

Aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik

(Prof. Dr. med. dent. Ralf Bürgers)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**μCT-Untersuchung sowie histologische Auswertung zur
Knochendichte- und -dickenmessung der subchondralen
Kompakta bei Osteoarthrose des Menschen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Linus Gödeke

aus

Bad Driburg

Göttingen 2016

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent:

Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Referent/in:

Univ.-Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand

Datum der mündlichen Prüfung:

18.12.2017

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das menschliche Skelett.....	1
1.1.1 Aufbau des Knochens	1
1.1.2 Knochenab- und umbau	2
1.1.3 Zusammensetzung des Knochengewebes.....	2
1.2 Epidemiologie der Osteoarthrose	2
1.3 Ätiologie und Pathogenese der Osteoarthrose	3
1.3.1 Genetische Entstehungsfaktoren	4
1.3.2 Mechanische Entstehungsfaktoren	4
1.3.3 Entzündungsprozesse im Verlauf der Osteoarthrose.....	5
1.3.4 Das subchondrale Knochengewebe und dessen Veränderungen	6
1.4 Symptomatik der Osteoarthrose	8
1.5 Therapie der Osteoarthrose.....	9
1.5.1 Nichtpharmakologische Therapie der Osteoarthrose	9
1.5.2 Pharmakotherapie der Osteoarthrose	9
1.6 Radiologische Diagnostik.....	10
1.7 Radiologische Verfahren der Knochendichtebestimmung	11
1.7.1 Die μ CT-Methode zum Nachweis der Knochendichte und - struktur	12
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Präparatgewinnung.....	17
3.2 Schnitthanfertigung und Färbung.....	18
3.3 Vermessung der Schnitte am Computer	20
3.4 Anfertigung der μ CT-Aufnahmen	21
3.5 Bildumrechnung.....	22
3.6 Auswertung der Daten am Computer	23

3.7	Statistische Methodik.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	μ CT-Aufnahmen	26
4.1.1	Auswertung der μ CT-Aufnahmen – Dickemessung	29
4.1.2	Auswertung der μ CT-Aufnahmen – Knochendichtebestimmung....	30
4.1.3	Statistische Auswertung der μ CT-Daten	36
4.2	Dünnschnitte und mikroskopische Untersuchungen	39
4.2.1	Dickebestimmung am Mikroskop	42
4.2.2	Vergleich der Dickebestimmungen im Mikroskop bzw. μ CT	43
5	Diskussion	44
5.1	Diskussion der μ CT- Messungen der Knochendichte	44
5.2	Diskussion der Mikroskopuntersuchungen	47
5.3	Vergleichende Diskussion der Untersuchungsmethoden.....	47
6	Zusammenfassung.....	49
7	Literaturverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1.1: Zusammenfassende Darstellung zur Knie-Osteoarthritis nach Lories und Luyten (2011).	6
Abbildung 1.2: Gelenkschädigung nach Lories und Luyten (2011). Abkürzungen: ERK: <i>extracellular signal-regulated kinase</i> ; IL-6: interleukin-6; MAPK: <i>mitogen-activated protein kinase</i> ; MMP: <i>matrix metalloproteinase</i> ; TGF- β 1: <i>transforming growth factor β1</i> ; VEGF: <i>vascular endothelial growth factor</i>	8
Abbildung 3.1: Zone der Präparatgewinnung (rotes Rechteck): Die Probenkörper wurden aus möglichst oberflächennaher subchondraler Knochenzone ausgeschnitten (modifiziert nach Lories und Luyten 2011). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.....	17
Abbildung 3.2: Einteilung des Präparates in die Abschnitte G (Gesund), R (Rand) und D (Defekt)	18
Abbildung 3.3: Darstellung von Probe 413G (Gesund) in zweidimensionaler Ansicht. An der Oberfläche ist die Kompakta zu erkennen, im unteren rechten Bild sieht man auch hier den Bereich, aus dem die Stanze zur weiteren histologischen Untersuchung gewonnen wurde. Die Helligkeitswerte wurden im Anschluss randomisiert innerhalb der Kompakta erhoben.	23
Abbildung 3.4: Vermessung des Referenzkörpers, einem aus drei Knochenersatzmaterialien (Apatit) bestehenden Röhrchen mit bekannter und jeweils unterschiedlicher Dichte	24
Abbildung 4.1: μ CT-Aufnahme von zwei Seiten des aus dem defekten Bereich von Probe 398 ausgeschnittenen Probenkörpers	26
Abbildung 4.2: Durch digitale Bildverarbeitung herausgearbeitete Schnittansicht von Probe 398 in der dreidimensionalen Rekonstruktion; hier zu sehen die Defektzone der Probe.	27
Abbildung 4.3: Dreidimensionale Rekonstruktion der gesunden Zone von Probe 398. Die Vertiefung der Schnittmitte stellt den Bereich der Stanzenentnahme dar.....	27
Abbildung 4.4: Vermessung der Stärke der subchondralen Matrix mit Hilfe der Bildverarbeitung, Probe 400 (Defektzone)	28
Abbildung 4.5: Vermessung der Stärke der subchondralen Matrix mit Hilfe der Bildverarbeitung, Probe 400 (gesunde Zone).....	28

Abbildung 4.6:	Aus jeweils 10 Einzelmessungen bestimmte Dicke (in mm) der subchondralen Kompakta der Probenbereiche Gesund (G) und Defekt (D) mit Standardabweichung	29
Abbildung 4.7:	Plotdiagramm aus dem Programm MicroView der Fa. GE Healthcare (London, Canada), dargestellt ist eine exemplarische Messlinie der subchondralen Kompakta in Probe 413 G (Gesund)	31
Abbildung 4.8:	Aus jeweils 20 Einzelmessungen bestimmte Grauwertmittel der Knochenmatrix mit Standardabweichung, jeweils für die Probenbereiche Gesund (G), Defekt (D) und Rand (R)	32
Abbildung 4.9:	An dem Grauwert des mitgemessenen Probenträgers sowie um Hintergrundrauschen korrigierte kalibrierte Grauwerte in den Bereichen Gesund (G), Defekt (D) sowie der Randzone (R)	34
Abbildung 4.10:	Regressionsanalyse zur Herstellung des Zusammenhangs zwischen Grauwert und Dichte anhand der drei Apatitvergleichsproben.....	35
Abbildung 4.11:	Kalibrierte und anhand der Apatitvergleichsproben skalierte Werte der Knochendichte in den Bereichen „Gesund“ (G), „Defekt“ (D) sowie der Randzone (R).....	36
Abbildung 4.12:	Q-Q-Diagramm für die Einzelmesswerte Probe 400, gesunder Bereich	37
Abbildung 4.13:	Q-Q-Diagramm für die Einzelmesswerte Probe 400, Defektbereich	37
Abbildung 4.14:	Mittelwerte für die ermittelte Dichte in mg/cm ³ bzw. Helligkeitswerte in ADUs (Arbitrary Digital Units) der Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“ mit Standardabweichung	39
Abbildung 4.15:	Probe 8 Defektbereich; im mittleren Bildbereich gut zu erkennen ist die beginnende Verschmelzung von Knorpel, calcinierten Knorpelbestandteilen sowie der Knochenmatrix	40
Abbildung 4.16:	Probe 8 gesunder Bereich mit deutlich klarer abgegrenzter Kompakta und vergleichsweise gleichmäßig ausgeprägter Kompaktadicke.....	40
Abbildung 4.17:	Probe 14 defekter Bereich. Ein klarer Übergang zwischen Knorpelgewebe, kalzifizierter Zone und subchondralem Knochen existiert zwar noch, dieser erscheint jedoch bereits unregelmäßiger	41
Abbildung 4.18:	Messergebnisse aus jeweils 10 gemittelten, manuell am Mikroskop vorgenommenen Vermessungen der subchondralen Matrix mit Standardabweichung	42

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1.1: Verlaufsphasen der Osteoarthritis	7
Tabelle 1.2: Knorpelschädigung bei Osteoarthritis nach Lories und Luyten (2011). Abkürzungen: MMP: matrix <i>metalloproteinase</i> ; VEGF: <i>vascular endothelial growth factor</i> ; ADAMT: <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>	8
Tabelle 1.3: Einteilung der Stadien der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (1957)	10
Tabelle 3.1: Zuordnung der Probennummern zwischen beiden Zweigen der Untersuchung.....	20
Tabelle 4.1: Mittelwerte und Standardabweichung der Dicke gesunder und defekter Kompakta	30
	31
Tabelle 4.2: Grauwerte bei den jeweiligen Messungen im gesunden Bereich (G), im defekten Bereich (D) und im Randbereich (R) des mitgemessenen Probenhalters GW_{tube} und des Hintergrundrauschens durch in der Messkammer verbliebene Restluft GW_{luft}	33
Tabelle 4.3: Kalibrierte Grauwerte am Beispiel der Probe 398 in den Zonen „Gesund“ (G), „Defekt“ (D) und „Rand“ (R).....	34
Tabelle 4.4: Deskriptive Statistik der kalibrierten Werte für die Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“	38
Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichung der Kompakta in den Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“.....	43

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Skelett

Das menschliche Skelett hat vielfältige Aufgaben. Es bietet zum einen Schutz für die inneren Organe und ermöglicht durch seine Stabilität die Fortbewegung, zum anderen dient es auch als Umhüllung des blutbildenden Knochenmarks und als wichtigstes Reservoir des Körpers für Mineralionen wie Calcium, Magnesium und Phosphor.

Es gibt dabei mit der Kompakta und der Spongiosa zwei histologisch sowie radiologisch unterscheidbare Knochengewebearten.

Gemeinsam ist beiden Knochenarten dabei, dass sie von Knochenkanälchen durchzogen werden und dass in ihnen spezialisierte Zellen (Osteoblasten und Osteoklasten) vorkommen, welche insbesondere wichtig sind, um die Adaptation des Knochengewebes an wechselnde Anforderungen, beispielsweise Ein- oder Abbau von gespeicherten Ionen, zu gewährleisten sowie um - durch ständige Neuorganisation - die Struktur des Skeletts zu erhalten (Boskey 1999).

1.1.1 Aufbau des Knochens

Mikroskopisch unterscheidet man den sehr faser- und zellreichen, dafür aber mineralarmen Geflechtknochen vom reifen Lamellenknochen. Geflechtknochen stellt dabei, beispielsweise im Wachstum sowie bei Reparaturprozessen, die Vorstufe zu Lamellenknochen dar. Ferner lassen sich mikroskopisch im Bereich der Kompakta des Knochens Kanalsysteme erkennen. Hierbei unterscheidet man die zur Nutrition dienenden und längs zur Knochenrichtung verlaufenden Havers-Kanäle von Volkmann-Kanälen, welche quer zur Knochenrichtung verlaufen und eine Verbindung zwischen den einzelnen Havers'schen Kanälen herstellen.

Über dieses gefäßführende Kanalsystem steht die Kompakta in einer Verbindung zur Markhöhle des Knochens.

An einen Havers'schen Kanal sind zwischen 5 und 20 Knochenlamellen konzentrisch angelagert. Diese Einheit, aus jeweils einem Havers-Kanal mit seinen ihn umgebenden Lamellen, nennt man Osteon. Das Osteon stellt histologisch betrachtet die Grundeinheit des Knochens dar (Schmolke 2001).

1.1.2 Knochenab- und umbau

Der Umbauzyklus des Knochens, reguliert durch Hormone wie Parathormon, Calcitonin oder Calcitriol, wird zunächst bestimmt durch Resorption des Knochens, was mit Hilfe von Osteoklasten geschieht. Im Anschluss findet die Formation neuen Knochens durch Osteoblasten statt. Osteoklasten und Osteoblasten bilden dabei eine funktionelle Einheit, die so genannte *bone remodelling unit* (Schmolke 2001).

1.1.3 Zusammensetzung des Knochengewebes

Menschlicher Knochen ist, in absteigender Reihenfolge, zusammengesetzt aus Mineralien, Kollagen, Wasser, Proteinen (nicht kollagenoid), Lipiden, Gefäßzellen sowie Knochenzellen.

Etwa die Hälfte des Knochengewebes machen dabei die anorganischen Bestandteile in Form von Apatitkristallen aus. Die restlichen 50 % verteilen sich je zur Hälfte auf organisches Material sowie Hydratationswasser.

Die im Knochengewebe vorkommenden organischen Bestandteile sind zum größten Teil Kollagen vom Typ I. Ebenfalls zur organischen Matrix zählen enthaltene Proteine wie Osteopontin, -calcin, -nectin sowie Proteoglykane.

Die genaue Zusammensetzung variiert dabei je nach Alter, Lokalisation im Skelett sowie dem Ernährungs- und Gesundheitszustand eines jeden Individuums und orientiert sich vorrangig an der Aufgabe, spontan auftretende, bewegungsbedingte mechanische Lasten aufzunehmen und abzuleiten (Wolff 1986).

1.2 Epidemiologie der Osteoarthrose

Das Krankheitsbild der Arthrose zählt zu den so genannten Volkskrankheiten. So gehört sie zu denjenigen pathologischen Prozessen, deretwegen am häufigsten Beratungen in allgemeinmedizinischen Praxen in Deutschland durchgeführt werden (Fink und Haidinger 2007).

Diese Aussage wird gestützt durch eine Untersuchung von Krasnokutsky et al. (2007), in der festgestellt wird, dass Arthrose in den Industrienationen eine der Hauptursachen für die Beeinträchtigung der physischen Befindlichkeit sowie der Lebensqualität darstellt.

Insgesamt sollen mehr als 50 % aller Personen über 65 Jahren an einer Osteoarthritis bzw. Osteoarthrose (OA) leiden (Felson 2006). Diese Tatsache führt unweigerlich zu schwerwiegenden sozioökonomischen Folgen. So ist das Krankheitsbild der Arthrose verantwortlich für einen Anteil von 45 % an sämtlichen verordneten Rehabilitationsmaßnahmen sowie an 30 % der Berentungen vor dem jeweilig eigentlichen Renteneinstiegssalter (Vetter 1998).

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Osteoarthrose

Gemäß der 1994 festgelegten Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO ist OA ein Resultat aus degenerativen, sowohl mechanischen wie auch biologischen Faktoren, welche das Gleichgewicht zwischen Degradation und Synthese von Chondrozyten, Extrazellulärer Matrix (EZM) und subchondralem Knochen stören. Sämtliche Gelenkstrukturen sind an diesen Vorgängen, welche sich in morphologischen, biomechanischen sowie biochemischen Veränderungen äußern, beteiligt. Klinisch beobachtbar sind Gelenkschmerzen, eine Einschränkung der Bewegungsfreiheit, Gelenksteifheit, Krepitation, vermehrte Gelenkfüllung sowie die verschiedenen bekannten Stadien einer Entzündung (Mollenhauer et al. 2002).

Am häufigsten betroffen sind hierbei Hand, Knie, Hüfte sowie Wirbelsäule. Festgestellt wurde dabei eine Inzidenz von 240 für Knie-, 100 für Hand- sowie 88 für Hüftgelenksarthrosen pro 100.000 Personen und Jahr (Oliveria et al. 1995).

Die OA kann entweder primär, also idiopathisch oder sekundär, als Folge anderer Erkrankungen auftreten. Als vorhergehende Ursache kommt eine Vielzahl von Erkrankungen wie beispielsweise Adipositas oder auch rezidivierende Verletzungen der Gelenke in Frage. Diese führen dann entweder zu einer direkten Schädigung des Knorpels, zur Gelenkinstabilität oder zu einer veränderten Krafteinwirkung (Goldring und Goldring 2007).

Die Progression des Krankheitsbildes der OA wird während seines weiteren Verlaufes multifaktoriell beeinflusst. Dies geschieht zum einen durch Fehlstellungen, durch eine von Adipositas hervorgerufene zusätzliche Belastung, durch fortschreitendes Alter, die Ablagerung von intraartikulären Kristallen, Muskelschwäche oder periphere Neuropathien.

Die aufgezählten Faktoren lassen sich dabei in folgende Kategorien einteilen:

- genetische Faktoren,
- mechanische Faktoren und
- Effekte des Alterns (Goldring und Goldring 2007).

Das Krankheitsbild der OA entsteht in allen Kategorien infolge des Auftretens oben genannter Faktoren durch die Störung des dynamischen Gleichgewichts zwischen Knorpelaufbau und -abbau (Eyre 2004).

So konnte gezeigt werden, dass bei OA-Patienten die Apoptoserate der Chondrozyten deutlich zunimmt (Thomas et al. 2007).

1.3.1 Genetische Entstehungsfaktoren

Genetische Prädispositionen können sehr wahrscheinlich das Auftreten einer primären Osteoarthritis beeinflussen (Valdes et al. 2006). Einen entscheidenden Anhaltspunkt dafür lieferten Spector et al. (1996) mit einer Zwillingsstudie, welche zeigt, dass bei Erkrankung eines Zwillings mit OA das Zwillingsgeschwister mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 bis 65 % ebenfalls eine OA entwickelt. Bisher konnten vor allem Mutationen in den für Typ-IX-Kollagen und COMP kodierenden Bereichen für einen vorzeitigen Ausbruch einer OA verantwortlich gemacht werden (Borochowitz et al. 2004, Goldring und Goldring 2007).

1.3.2 Mechanische Entstehungsfaktoren

Ein entscheidender Faktor bei der Entstehung einer OA sind mechanische Veränderungen. Diese können sowohl durch bestehende Fehlstellungen in den Gelenken als auch durch Fehlbelastungen hervorgerufen werden.

Roos (2005) lieferte Hinweise, dass Veränderungen der Lastverteilung innerhalb des Gelenkes den Beginn sowie das Fortschreiten einer Arthrose beschleunigen können.

Eine Erhöhung des Risikos um den Faktor fünf, bei bestehender Valgus-Fehlstellung an einer lateralen Gonarthrose zu erkranken belegt, dass orthopädische Fehlstellungen – und in deren Folge Kompressionen des Gelenks mit einhergehender struktureller Veränderung – wesentlich zur Entstehung einer OA beitragen können (Sharma et al. 2001).

Ein ebenfalls gewichtiger mechanischer Faktor ist Übergewicht. Gerade das Kniegelenk ist bei adipösen Patienten wesentlich häufiger von OA betroffen als bei Normalgewichtigen (Coggon et al. 2001)

1.3.3 Entzündungsprozesse im Verlauf der Osteoarthritis

Bei einer OA handelt es sich nicht um eine klassische Entzündung, da, entgegen der Definition einer Entzündung, keine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten stattfindet und sich auch keine systemischen Auswirkungen einer Entzündung zeigen. Lediglich sekundär können Schmerzen, eine Schwellung oder Gelenksteifheit resultieren (Felson 2006).

Aufgrund der Einwanderung von B- und T-Lymphozyten sowie der Aktivierung von Zytokinkaskaden kommt es zu einer Fehlregulation der Chondrozytenfunktion (Benito et al. 2005) und zeitgleich zu einer Synovitis, wobei ein Ungleichgewicht zwischen anabolischen und katabolischen Stoffwechselprozessen entsteht, welches Störungen in der EZM des Knorpels zur Folge hat (Loeser 2006, Ekenstedt et al. 2006).

Die genauen Abläufe der Syntheseinitiation von inflammatorischen Molekülen sind größtenteils noch unklar, In-vitro-Studien konnten jedoch zeigen, dass die Chondrozyten von OA-Patienten zur Bildung von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β), dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und auch dem Rezeptor für Typ-1-IL (IL-1RI) befähigt sind (Goldring und Goldring 2007, Tetlow et al. 2001). IL-1 β unterdrückt unter anderem die Expression diverser Gene, welche in differenzierten Chondrozyten exprimiert sind, so z.B. Kollagen Typ II A1 (Goldring und Goldring 2004).

Aufgrund der Bildung von Zytokinen geht die Synthese von Kollagen zurück und die Produktion von knorpelabbauenden Proteasen, zum Beispiel der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), wird heraufgefahren. So tragen vor allem MMP-1, -3, -8, -13 sowie die Aggrecanase ADAMTS-5 zur Pathogenese der OA bei (Cawston und Wilson 2006). Auch andere inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E2 (PGE2), IL-6, IL-8 oder Stickstoffmonoxid (NO) können nun, stimuliert durch den Anstieg von IL-1 β und TNF- α , gehäuft nachgewiesen werden.

PGE2 wird dabei über eine verstärkte Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) sowie der Phospholipase A2 stimuliert, NO über Stickstoffmonoxid-Synthetasen (iNOS).

NO spielt eine große Rolle bei der Schädigung des Knorpels, da es die Neubildung von Kollagenen verhindert und den oxidativen Stress erhöht. Diese Tatsache sowie die mechanische Belastung stehen im Verdacht, eine vermehrte Expression der Mediatoren zu verursachen (Goldring und Goldring 2007).

1.3.4 Das subchondrale Knochengewebe und dessen Veränderungen

Die fortschreitende Destruktion des Knorpelgewebes führt im Krankheitsverlauf zu pathologischen Veränderungen am gelenknahen Knochen. Dabei führt die Osteoarthritis zu einer charakteristischen subchondralen Sklerosierung, zur Bildung von Knochenzysten sowie zur Ausbildung von Osteophyten (Hill et al. 2001). Im Verlauf der OA kommt es zu einer erhöhten Vaskularisation im Grenzbereich zwischen hyalinem Knorpel und subchondralem Knochengewebe. Die Gefäßneubildungen bringt man mit Knorpelschäden und klinischen Erkrankungszeichen in Verbindung (Walsh et al. 2007). Möglicherweise liegt hier ein Grund für die zu beobachtenden Strukturveränderungen an der Gelenkoberfläche.

Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Veränderung des Knochengewebes spielt NO, da erhöhte Konzentrationen sowohl die Knochenneubildung fördern als auch die Osteoklastenfunktion hemmen können (van't Hof und Ralston 2001).

Auch die verstärkte Produktion von Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) und Transforming-growth-factor- β (TGF- β) kann zur Ausbildung von Knochenveränderungen wie z.B. Knochenneubildungen beitragen (Bettica et al. 2002). Abbildung 1.1 zeigt zusammenfassend den Pathogenesepfad der Knie-Osteoarthritis nach Lories und Luyten (2011).

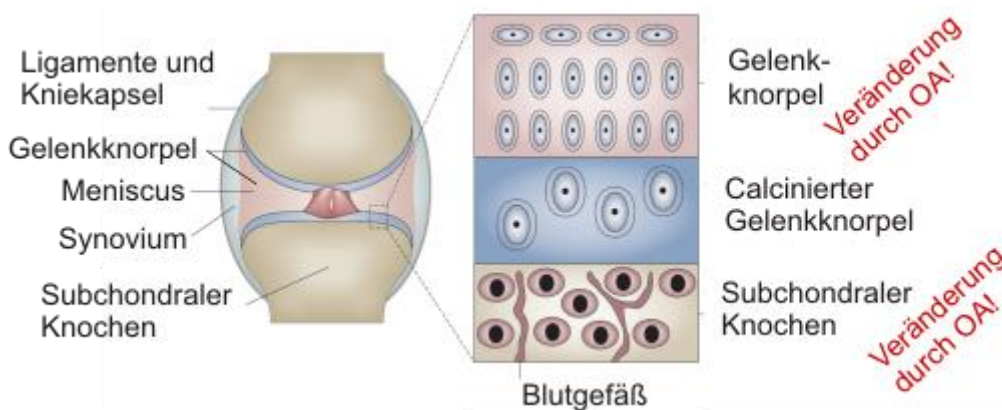


Abbildung 1.1: Zusammenfassende Darstellung zur Knie-Osteoarthritis nach Lories und Luyten (2011).

Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Nach Lories und Luyten (2011) führen komplexe Schädigungsmechanismen im Gelenk-Knochen-Übergang zum vermehrten Austausch flüssiger Bestandteile. Dieser Austausch wird durch die schwarzen Pfeile in der Bildmitte (Abbildung 1.2, S. 8) symbolisiert. Im gesunden Gelenk stellt der calcinierte Gelenkknorpel für diesen Gelenkflüssigkeitsaustausch eine zuverlässige Barriere dar; die maligne Struktur wird

durch Gangbildungen, Risse und Lochbildungen jedoch permeabel (Milz 1993, Milz und Pütz 1994). Die Veränderungen der subchondralen Struktur, hervorgerufen durch aktivierte Osteoblasten, verursachen ein krankhaftes und schnelles Knochenwachstum. Insbesondere die Anwesenheit von IL-6 aktiviert die Osteoblasten im entzündlichen Milieu unter Anwesenheit von MMPs. Tabelle 1.1 veranschaulicht die einzelnen Verlaufsphasen der Osteoarthritis:

Subchondrale Sklerose des Knochens
Übermäßiges Aufwachsen der subchondralen Platte
Modifikation der trabekulären Architektur
Knochenabrieb
Erhöhter Knochenneuaufbau (<i>bone remodelling</i>)

Tabelle 1.1: Verlaufsphasen der Osteoarthritis

Auf die Schädigung der subchondralen Knochenstruktur folgt nach Lories und Luyten (2011) eine übermäßige Knochenneubildung, jedoch von, wie zuvor beschrieben, strukturell weniger widerstandsfähiger und weniger tragfähiger Matrixarchitektur. Insbesondere die Sklerosierung und die nach neueren Erkenntnissen gestörten Stoffwechselforgänge beeinflussen die Umwandlungs- und Calcinationsprozesse der Knochenmatrix negativ und rufen Entzündungsmediatoren auf den Plan. Abbildung 1.2 (S. 8) zeigt vermutete inflammatorische Prozesse einer Tibiaschädigung bei Osteoarthritis des Kniegelenks:

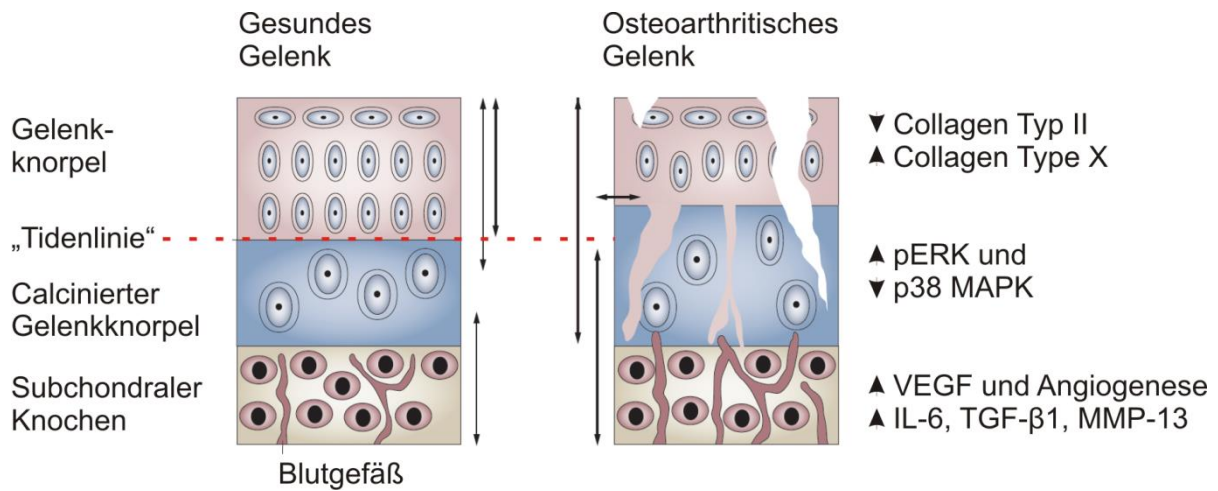


Abbildung 1.2: Gelenkschädigung nach Lories und Luyten (2011). Abkürzungen: ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; IL-6: *interleukin-6*; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; MMP: *matrix metalloproteinase*; TGF- β 1: *transforming growth factor β 1*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Lories und Luyten fassten die in Tabelle 1.2 aufgelisteten Faktoren der Entstehung einer Knorpelschädigung wie folgt zusammen:

Erhöhte Matrixsynthese
Erhöhte Knorpelzell-Proliferation
Produktion proinflammatorischer Zytokine (insbesondere Interleukine-1)
Produktion von gewebserstörenden Enzymen (MMPs und ADAMTs)
Verlust der normalen Gewebsstruktur
Produktion von VEGF und MMP-13
Dünnerwerden des Gelenkknorpels (Verlust an Knorpelmasse)

Tabelle 1.2: Knorpelschädigung bei Osteoarthritis nach Lories und Luyten (2011). Abkürzungen: MMP: *matrix metalloproteinase*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; ADAMT: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*

1.4 Symptomatik der Osteoarthrose

Die Leitsymptome einer manifesten OA sind sowohl Schmerz als auch eine Einschränkung der Gelenkfunktion (Guccione et al. 1994). Beide Symptome sind vor allem auf den Verlust von Knorpelgewebe sowie auf das Vorhandensein von Osteophyten zurückzuführen.

Zu Beginn der Erkrankung macht sich die OA bei den betroffenen Patienten vor allem durch Ermüdungs- und Belastungsschmerzen bemerkbar. Erst in weiter fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung entwickelt sich ein Dauerschmerz und es kann zu Bewegungseinschränkungen und zu Krepitationen kommen. In dieser Phase ist es oftmals möglich, auch äußerliche Veränderungen, z.B. in Form von Veränderungen der Gelenkkonturen, von Deformationen oder Fehlstellungen zu beobachten.

Die exakte Genese der durch den Patienten wahrgenommenen Schmerzen ist noch nicht vollständig bekannt, es wird jedoch vermutet, dass Schmerz bei der OA hauptsächlich in der stark innervierten Gelenkkapsel, im subchondralen Knochengewebe sowie in der Synovia entsteht. Auch das für gewöhnlich gut innervierte Periost ist an der Schmerzentstehung aller Wahrscheinlichkeit nach beteiligt (Hunter 2007).

1.5 Therapie der Osteoarthritis

Die Therapiemöglichkeiten bei Patienten, welche an einer OA leiden, beschränken sich derzeit noch auf die ausschließliche Therapie der Symptome wie Schmerzen, Einschränkungen der Bewegung sowie Schwellungen. Eine Heilung im Sinne einer Rückführung der Gelenkanatomie in einen gesunden ursprünglichen Zustand ist bisher nicht möglich. Bei der Therapie der OA kann zwischen pharmakologischer, nicht-pharmakologischer und chirurgischer Therapie unterschieden werden.

1.5.1 Nichtpharmakologische Therapie der Osteoarthritis

Bei der symptombezogenen nichtpharmakologischen Therapie stehen eine Reduktion des Patientengewichtes sowie Krankengymnastik im Vordergrund.

So konnten beim Versuch der Linderung der Schmerzen durch eine Kombination von Diät und speziell ausgearbeiteter Sportprogramme bisher gute Ergebnisse erzielt werden (Messier et al. 2004). Wichtig sind bei der Auswahl der Betätigungsarten vor allem eine gleichmäßige Belastung der betroffenen Gelenke sowie eine Vermeidung von abrupten Bewegungen.

1.5.2 Pharmakotherapie der Osteoarthritis

Bei der medikamentösen Therapie der OA stehen vor allem die Beseitigung von Schmerzen sowie der entzündlichen Begleiterscheinungen der OA im Vordergrund.

Vorrangig verwendet werden hierzu nichtsteroidale Antiphlogistika (NSA), Metamizol sowie Paracetamol. Letzteres ist dabei nach dem aktuellen Stand das Mittel der Wahl bei den meisten mit Schmerz assoziierten Gelenkerkrankungen (Pendleton et al. 2000). Bei Krankheitsverläufen mit zunehmend entzündlich veränderten Gelenken steht die Therapie mit NSA im Vordergrund.

Seit einiger Zeit wird auch die Möglichkeit der intraartikulären Therapie mit Hyaluronsäure diskutiert. Erste Studien (Lo et al. 2003) konnten dabei bereits positive Effekte feststellen.

1.6 Radiologische Diagnostik

Die im Verlauf einer OA auftretenden radiologisch sichtbaren Veränderungen werden nach Kellgren und Lawrence (1957) in mehrere Stadien eingeteilt (siehe Tabelle 1.3):

Stadium	zu beobachtender Befund
0	Ohne pathologischen Befund
1	Beginnende Osteophytenbildung -> initiale Arthrose
2	Mäßige Verschmälerung des Gelenkspaltes sowie subchondrale Sklerosierung -> definitive Osteophytose
3	Rückgang des Gelenkspaltes auf unter 50 %, stark ausgeprägte subchondrale Sklerosierung -> ausgedehnte Osteophytose
4	Verlust bzw. weitgehender Rückgang des Gelenkspaltes, zystische Veränderungen, Subluxation -> Gelenkdestruktion

Tabelle 1.3: Einteilung der Stadien der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (1957)

Eine wichtige Beobachtung durch Hannan et al. (2000) ist, dass die Symptomatik einer OA in keinem direkten Verhältnis zu den zu beobachtenden radiologischen Veränderungen steht. So weisen nur etwa die Hälfte der Patienten, welche radiologische Kennzeichen einer Kniegelenks-OA tragen, Schmerzen auf (Peat et al. 2006). Auf der anderen Seite sind radiologische Veränderungen nur bei etwa zwei Drittel der Patienten zu beobachten, die angeben, unter anhaltenden Schmerzen im Knie zu leiden.

Bedson und Croft (2008) stellten drei hauptsächliche Fehlerquellen bei durchgeführten Studien zur Diagnostik von Arthrosen heraus. Zum einen eine oftmals unsachgemäß vorgenommene Röntgendiagnostik, zum anderen eine ungleichmäßig ausgeprägte Schmerzempfindung der Patienten und weiterhin Fehler, welche bei dem Versuch der Normierung auftreten. Zusätzlich stelle auch die Auswahl des Patientenpools zumeist nach Frakturen eine große Fehlerquelle dar. Möglicherweise sind diese Ergebnisse aber auch auf fehlerhaft durchgeführte Röntgenaufnahmen, z.B. durch die Wahl eines falschen Bildausschnittes oder durch eine unsachgemäße Befundung zurückzuführen.

1.7 Radiologische Verfahren der Knochendichtebestimmung

Die verschiedenen Messmethoden zur Bestimmung der Knochendichte werden zudem unterschiedlich bewertet. In den letzten Jahrzehnten sind eine Reihe von Messmethoden entwickelt worden, um die Knochendichte bestimmen zu können. Diese lassen sich im wesentlichen zwei Gruppen zuordnen: Die eine Gruppe verwendet Photonenabsorptionstechniken und die andere computertomographische Methoden. Am häufigsten kommen in der Praxis DXA und die quantitative Computertomographie (qCT), vor allem axiale und periphere CT, zum Einsatz. Als Strahlenquelle dient bei Letzteren eine Röntgenröhre, wobei die Knochendichtemessungen hauptsächlich an Tibia und Radius erfolgen (Emmert 2002). Gemessen wird die Knochendichte als Volumeneinheit (g/cm^3). Vorzüge des qCT bestehen in der geringeren Strahlenbelastung (0,1 mGy Knochenmark), guter Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient: 0,5-1 %) und der kurzen Untersuchungszeit von fünf bis zehn Minuten. Die Dual-Photonen-Absorptiometrie (DPA), die bislang den sogenannten Gold-Standard darstellt, basiert auf einer Radionuklidquelle mit relativ geringer Strahlenexposition (0,15 mGy) und guter Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient: 1-3 %).

Frühere Untersuchungen kamen zum Ergebnis, dass sich DXA und qCT in Bezug auf die Dichtebestimmung wenig unterscheiden, die entsprechenden Korrelationen lagen je nach Region zwischen 0,71 und 0,76 (Grampp et al. 1997). Neuere Studien belegen einen ähnlich hohen Zusammenhang, die lateral an verschiedenen Lendenwirbelkörpern gemessenen Korrelationen betragen 0.75 bis 0.92 (Krimphove 2001).

Wesentlicher Kritikpunkt bei der Diagnose der OA war die ausschließliche Bestimmung über die Knochendichte bzw. über den Mineralisierungsgrad des involvierten

Knochens. Neuere bildgebende Verfahren gehen daher über die reine Knochendichtebestimmung hinaus und zielen auf den Nachweis von Strukturveränderungen innerhalb des betreffenden Knochengewebes ab: "Vielmehr sind es vor allem Strukturparameter, Materialeigenschaften (u. a. die erwähnte Mineralisierung), Remodellingaktivität, Matrixeigenschaften sowie geometrische Verhältnisse, welche alle zusammen die tatsächliche Knochenfestigkeit bestimmen. Die Diagnose der Osteoporose nur über die Messung eines einzigen dieser Parameter - der Knochendichte - zu stellen, ähnelt dem Versuch, die Stabilität des Eiffelturms nur aufgrund seines Gewichts beurteilen zu wollen" (Radspieler 2006, *Jenseits der Knochendichte...*, S. 6). Insbesondere die μ CT-Untersuchung ist hier aufgrund der sehr hohen Auflösung und der 3D-Projektion bei der Gesamtbeurteilung der Knochenfestigkeit im Vorteil.

1.7.1 Die μ CT-Methode zum Nachweis der Knochendichte und -struktur

Zum festen Bestandteil der diagnostischen Werkzeuge im Bereich der Knochenforschung gehört seit ihrer serienreifen Entwicklung durch Hounsfield und Cornmark im Jahr 1971 die Methode der Röntgen-Computer-Tomographie (Ambrose und Hounsfield 1973), da diese es ermöglicht, einen Prüfkörper dreidimensional abzubilden, seine Dichte zu bestimmen und Strukturunterschiede darzustellen, ohne die Probe dabei beschädigen oder Weichgewebe entfernen zu müssen.

Der Computertomograph an sich besteht aus einer dedizierten Untersuchungseinheit, der sogenannten Gantry, einer Recheneinheit für die Rekonstruktion der Daten zu betrachteten Bildern sowie einer Bedieneinheit mit Befundungsmonitor. In der Gantry befinden sich sowohl die Strahlenquelle als auch das ihr gegenüberliegende Detektorsystem. Die Strahlenquelle besitzt zur optimalen Untersuchung verschiedener Schichtstärken einen veränderbaren Fokus. Je geringer dabei der Fokus eingestellt ist, desto höher ist auch die Ortsauflösung.

Die Röntgenröhre ist zumeist mit einer Bleiumhüllung versehen, welche aufgrund einer darin befindlichen Öffnung den Strahl, je nach System, auf einen Fächer- oder auf einen Kegelstrahl einstellt. Heutzutage wird dabei zumeist ein Kegelstrahl (der sogenannte *Cone-Beam*) erzeugt und verwendet. Im weiteren Strahlenverlauf finden sich zusätzliche Blenden sowie ein Kollimator zur Reduktion der Streustrahlung. Die Blenden dienen dabei der Verbesserung der Bildqualität hinsichtlich des Kontrastes und der Schärfe (Kalender 2006).

Am Ende des Strahlenganges, also nachdem das zu untersuchende Objekt durchdrungen wurde, befindet sich der Detektor, bei dem es sich zumeist um einen Szintillationskristall handelt, welcher durch die auftreffenden Röntgenstrahlen in Schwingung gerät und dabei sichtbares Licht freisetzt, welches, nun theoretisch auch für das menschliche Auge sichtbar, über eine Optik aus Glasfasern zu einem CCD-Sensor weitergeleitet und in diesem in digitale Signale umgewandelt wird (Kalender 2006).

Das Funktionsprinzip eines Computertomographen unterscheidet sich dabei nicht wesentlich von dem einer herkömmlichen Röntgenaufnahme. Der entscheidende Unterschied ist, dass verschiedene Aufnahmen des gleichen Objekts nach jeweiliger Drehung des Strahlenganges gemacht und diese dann mit Hilfe eines Computers zu einem auswertbaren Bild zusammengesetzt werden. Dies bringt einen entscheidenden Vorteil gegenüber einer klassischen zweidimensionalen Röntgenaufnahme mit sich, da hierbei keine Überlagerung von Gewebsstrukturen die Darstellung beeinflusst (Gielen und Van Bree 2003).

Dabei werden die jeweiligen einzelnen Strahlengänge als Summationsschwächung (Lambert-Beersches Gesetz) durch ein Detektorsystem erfasst. Durch Bestrahlung aus unterschiedlichen Winkeln ergibt sich ein Summationsbild, welches der Computer grafisch darstellen und mit Hilfe von Algorithmen in dreidimensionale Modelle umrechnen kann (Kuszyk et al. 1996).

Konventionelle, in der klinischen Diagnostik eingesetzte Computertomographen wurden für den speziellen Fall der Untersuchung von lebenden Menschen konstruiert und unterliegen somit entsprechenden Konventionen. So ist es beispielsweise erforderlich, dass sich das System aus Detektor und Strahlenquelle um den Patienten dreht. Auch der innere Durchmesser dieser Einheit muss so bemessen sein, dass mindestens ein normalgewichtiger Erwachsener im Durchmesser vollständig erfasst werden kann.

Aus diesen Vorgaben ergeben sich zwei physikalische Nachteile: Zum einen wird das aufgezeichnete Bild umso unschärfer, je größer der Abstand zwischen Strahlenquelle, Objekt und Detektor ist. Zum anderen ist die mechanische Konstruktion durch die notwendige Rotation des Strahlenganges um den Patienten eher aufwendig.

Ein weiteres Problem stellt die Strahlendosis dar. Sie ist, aufgrund der relativen Strahlensensitivität des Menschen, nicht beliebig wählbar. So sind sowohl bei der

Intensität der Strahlung als auch bei der Belichtungszeit aufgrund des Risikos von biologischen Schäden die für den jeweiligen Einsatzzweck geringstmöglichen Werte zu wählen.

Eine aktuelle Übersichtsarbeit im *New England Journal of Medicine* berichtet, dass die heute angefertigten CTs in einigen Jahrzehnten für etwa 1,5–2 % aller Krebserkrankungen verantwortlich sein könnten (Brenner und Hall 2007). Entscheidend ist daher, stets genau abzuwägen, ob der mögliche Nutzen einer solchen diagnostischen Methode das Risiko überwiegt.

All die vorstehenden Limitationen gelten für die Analyse von nicht-vitalen, kleineren Proben nicht, was in der logischen Konsequenz 1980 zur Entwicklung des Micro-CT (μ CT) durch JC Elliot geführt hat (Elliott und Dover 1982).

Erste klinische Untersuchungen wurden durch Burstein et al. (1984) an Mäusen durchgeführt. Dazu entwickelten diese das von Elliot konstruierte μ CT weiter und nutzten eine Anordnung von rotierendem Objektstisch, fester Röntgenröhre mit Fächerstrahl sowie einem speziellen Detektor. An dieser Anordnung hat sich, zumindest für die Untersuchung in vitro, bis heute nichts geändert.

Wegweisend für die heutige, dreidimensionale, Darstellung von μ CT-Bildern war die Entwicklung eines neuen Kegelstrahl-Algorithmus durch Feldkamp et al. (1984), da dieser aufgrund einer neuen Methode zur Rückprojektion, erst eine dreidimensionale Rekonstruktion aufgrund der gewonnenen μ CT-Daten möglich machte.

Der Feldkamp-Algorithmus, ursprünglich für den industriellen Einsatz - nämlich die Untersuchung der Feinstruktur von Keramikteilen in Turbinenmotoren - entwickelt, ist nach wie vor der am häufigsten verwendete.

Feldkamp entwickelte darüber hinaus auch einen eigenen μ CT-Scanner, welcher - neben seinem eigentlichen Einsatzgebiet in der Industrie - zunächst dazu verwendet wurde, das subchondrale Knochengewebe in Meerschwein-OA-Modellen zu untersuchen (Layton et al., 1988).

Damit gelten Feldkamp et al. (1984) auch als Begründer der Anwendung des dreidimensionalen μ CT in der Knochenforschung (Engelke et al. 1999). Nachdem Ruegsegger et al. (1996) eine weitgehend automatisch operierende μ CT-Einheit konstruierten und damit die Untersuchungsmethode in Hinsicht auf benötigte Zeit und Auf-

wand stark verbesserten, sind heute viele Firmen wie beispielsweise Stratec, Scanco oder General Electrics HealthCare mit eigenen μ CT-Systemen am Markt vertreten.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Knochendichte und Knochendicke in gesunden und defekten Gewebeproben der osteoarthritischen Kompakta mittels μ CT. In Abweichung von herkömmlichen Verfahren der Bestimmung über Software-Lösungen wurde hier ein Referenzkörper zur Bestimmung herangezogen und die anfänglich gewonnenen Grauwerte aus den Probenkörpern daraufhin umgerechnet, um belastbare Absolutwerte der Knochendichte zu erhalten.

Erwartet wurden höhere Knochendichten bei gesunden Proben gegenüber defekten Proben der subchondralen Kompakta.

Darüber hinaus wurden Strukturveränderungen der osteoarthritischen Kompakta auch histochemisch untersucht und mit den Ergebnissen der bildgebenden μ CT-Messungen verglichen, um deren Validität zu überprüfen.

3 Material und Methoden

3.1 Präparatgewinnung

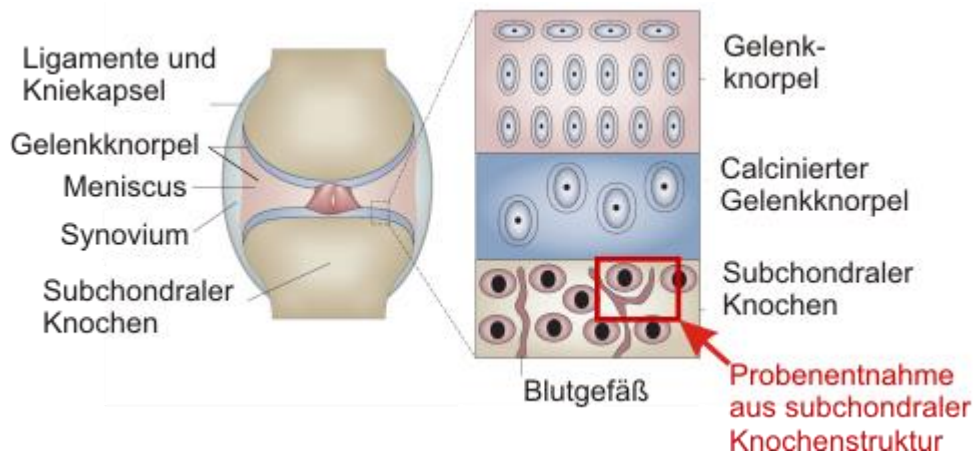


Abbildung 3.1: Zone der Präparatgewinnung (rotes Rechteck): Die Probenkörper wurden aus möglichst oberflächennaher subchondraler Knochenzone ausgeschnitten (modifiziert nach Lories und Luyten 2011). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Für beide Zweige der Untersuchungen an subchondralem Knochengewebe aus dem Kniegelenk wurden aus im Rahmen von Prothesenversorgungen entferntem Knochenmaterial sechs an OA erkrankter Patienten Proben entnommen. Dies erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Einholung des schriftlichen Einverständnisses der jeweiligen Patienten. Die Ethikantragsnummer ist 25/12/10.

Die Proben wurden derart ausgewählt, dass sie sowohl gesunde Zonen als auch von krankheitsbedingten Knochenveränderungen befallene Zonen enthielten. Es wurde stets ein oberflächennaher Ausschnitt, also nahe an dem Übergang zum Gelenkknorpel, ausgewählt. Die ausgeschnittenen Würfel hatten eine Kantenlänge von ca. 10 mm.

Die Präparate wurden zunächst makroskopisch in die drei Abschnitte - G (Gesund), R (Rand) sowie D (Defekt) - unterteilt. Aus den drei Bereichen wurde jeweils eine Stanze entnommen. Diese wurde separat in Alkohol gelagert, um eine separate histologische Untersuchung der Gewebe zu ermöglichen (zweiter Zweig der Untersu-

chungen). Der verbleibende Probenkörper wurde sodann dem ersten Zweig der Analyse zugeführt, den Untersuchungen am μ CT-Gerät.

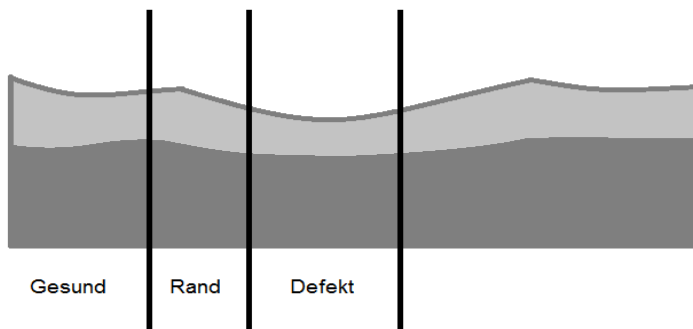


Abbildung 3.2: Einteilung des Präparates in die Abschnitte G (Gesund), R (Rand) und D (Defekt)

3.2 Schnitthanfertigung und Färbung

Um sicherzustellen, dass bei der radiologischen Begutachtung und Auswertung auch die jeweils korrekten Stellen untersucht wurden sowie um die gemessene Breite des subchondralen Knochens zu verifizieren, mussten zusätzlich Schnitte der Gewebeproben angefertigt werden. Hierzu wurden Stanzen aus dem Gewebe entnommen. Diese wurden zunächst in Paraffin eingebettet und unter Zuhilfenahme eines Schneidemaschinen der Fa. Leica (Nussloch, Deutschland) aufgeschnitten.

Um die angefertigten Schnitte dann auch lichtmikroskopisch beurteilen zu können, wurden sie mit Hilfe der HE-Färbung angefärbt. Hierzu wurden die Objektträger mit den Schnitten in einer Halterung in folgender Reihenfolge rehydriert:

1. 15 min in Xylol
2. 10 min in Xylol (sauber)
3. 5 min in abs. Ethanol
4. 5 min in 96 % Ethanol
5. 5 min in 90 % Ethanol
6. 5 min in 80 % Ethanol
7. 5 min in 70 % Ethanol
8. 5 min in 50 % Ethanol
9. 10 min in 1x PBS zum Spülen.

Die eigentliche Färbung wurde mit Hilfe eines Färbeautomaten (Stainix DiaPath, Weinkauf Medizintechnik, Deutschland) wie folgt durchgeführt:

Hämalaun-Eosin-Färbung

abs. Ethanol	5 min
80 % Ethanol	10 min
aqua dest.	5 min
Hämalaun (nach Meyer)	4 min
aqua dest.	1 min
fließend Wasser	15 min
0,1 % Eosin Y	7 min
aqua dest.	1 min
80 % Ethanol	5 min
abs. Ethanol	2 min
abs. Ethanol	2 min
Xylol	3 min

Die Objektträger mit den Schnitten wurden im Anschluss in einer Alkoholreihe wie nachfolgend beschrieben dehydriert:

1. 5 min in 50 % Ethanol
2. 5 min in 70 % Ethanol
3. 5 min in 80 % Ethanol
4. 5 min in 90 % Ethanol
5. 5 min in 96 % Ethanol
6. 5 min in abs. Ethanol

Danach wurden die Schnitte 5 Minuten in Xylol (2x) gegeben, mit Eukitt der Fa. Kindler (Bobingen, Deutschland) eingedeckt, getrocknet und konnten nun lichtmikroskopisch betrachtet werden.

Die Bezeichnung der Schnitte erfolgte gemäß dem in der Arbeitsgruppe verwendeten Schema einer durchlaufenden Nummerierung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit

werden im Folgenden lediglich die letzten zwei Ziffern dieser Nummer für die Bezeichnung der histologischen Präparate verwendet.

Die Zuordnung zwischen der Nummerierung der Proben und der der Schnitte geht aus Tabelle 3.1 hervor. Im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführung wurde die Fallzahl auf $n=5$ reduziert, weshalb Tabelle 3.1 lediglich fünf Proben auflistet.

Proben-Nr. μ CT	Proben-Nr. Histologie
398	11
400	9
401	15
413	8
420	14

Tabelle 3.1: Zuordnung der Probennummern zwischen beiden Zweigen der Untersuchung

3.3 Vermessung der Schnitte am Computer

Zunächst wurden - bei am Mikroskop gleichbleibend eingestellter Vergrößerung - Aufnahmen der Schnitte gemacht. Hierzu wurde eine auf den Tubus des Mikroskops aufgesetzte Kamera vom Typ D-90 der Firma Nikon (Minato, Japan) verwendet. Zeitgleich wurde eine mit der identischen Vergrößerung der Schnitte angefertigte Aufnahme eines Kalibrationsmikrometers der Fa. LACERTA (Wien, Österreich) angefertigt, um dessen Skala dank der identischen Auflösung digital in die Schnitte übertragen zu können. Die Aufnahmeparameter der Kamera blieben während der Aufnahmen unverändert und die Bilder wurden in der größtmöglichen Auflösung sowie im herstellerspezifischen Rohdatenformat gespeichert.

Für die spätere Auswertung der Bilder am Computer wurden diese bei ebenfalls gleichbleibenden Parametern in der Software Capture NX2 der Fa. Nikon (Minato, Japan) digital entwickelt und, um sie in das Auswerteprogramm einlesen zu können, bei niedrigster Kompressionsrate im „JPG“-Format gespeichert.

Die Vermessung der Schnitte erfolgte im Anschluss in der Software AxioVision der Fa. Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland). Hierzu wurde in der Software die

Aufnahme der Skala des vorgenannten Mikrometers eingelesen und in dieser die Länge der Skala referenziert. Nach dieser notwendigen Kalibrierung der Software konnten die Dickenmessungen von jeweils 10 angefahrenen Abschnitten der Kompakta des subchondralen Knochens an den nun mit passendem Maßstab versehenen Aufnahmen vorgenommen werden. Die Messpunkte wurden dabei anhand eines ausgewählten Abstandes von jeweils 0,27 mm (entspricht 500 Pixeln) zueinander und ausgehend von der Mitte der Schnitte festgelegt.

3.4 Anfertigung der μ CT-Aufnahmen

Die eigentliche Messung von Dichte und Dicke der subchondralen Kompakta erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Dullin, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie im Zentrum Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen, an Aufnahmen eines μ CT. Das hierzu verwendete Gerät eXplore Locus der Fa. GE HealthCare (London, Canada) liefert eine Auflösung von 25 μ m, was bedeutet, dass Strukturen, welche kleiner als 25 μ m sind, nicht mehr korrekt darstellbar sind.

Jeweils drei Proben wurden in Plastikröhrchen, die sogenannten Tubes, gegeben, im Gerät positioniert und dann jeweils einem Scan-Durchlauf unterzogen. Dieser dauerte im 360-Grad-Scanverfahren etwa 6 bis 8 Stunden pro Tube und wurde jeweils mit den Parametereinstellungen einer Spannung von 72 kVp (Kilo-Volt-Peak), einer Stromstärke von 110 μ A (Micro-Ampere) und einer daraus und aus dem Binning-Prozess resultierenden Auflösung von 0,0145 mm durchgeführt. Die Expositionszeit betrug 5000 ms und es wurden - außer der geräte- und softwareseitig vorhandenen - keine externen Filter zur Aufhärtung der Strahlung eingesetzt.

Da jedoch aufgrund einer Fehlfunktion oder Fehlbedienung am μ CT-Gerät die gesunde Probe eines Patienten und die Probe „Rand“ eines weiteren nach starker Überbelichtung nicht auswertbar waren und eine Wiederholung der Scans aufgrund von sichtbarer Austrocknung der Präparate durch den mehrstündigen Verbleib im Tube keine vergleichbaren Ergebnisse zu ermöglichen schien, wurde die Anzahl der Patienten für die Untersuchung auf $n=5$ reduziert. Der Patient, dessen Probenbereich „Rand“ nicht korrekt auswertbar war verblieb in der Untersuchung, da eine erste Sichtung der weiteren Resultate keine signifikanten Ergebnisse für diesen Probenbereich versprach und dieser daher in der späteren Auswertung eine untergeordnete Rolle spielen würde.

Da die verwendete μ CT-Einheit eXplore Locus bereits geräteseitig mit Hilfe von Algorithmen eine Bildkorrektur vornimmt war, um eine Messung der Dichte möglich zu machen, der Einsatz eines Referenzobjektes zur Kalibrierung bzw. Re-ferenzierung der Daten notwendig.

Die an den Rechner ausgegebenen Helligkeitswerte der Pixel sind in der nicht-SI-und gerätespezifischen Einheit ADU (Arbitrary Digital Units) angegeben. Diese Einheit erlaubt jedoch keine exakte Einordnung der gewonnenen Daten, da die Werte zwischen verschiedenen Scans auch bei gleicher Probe und identischen Scanparametern variieren können (GE Healthcare eXplore Locus User Guide 2007, S. 22).

Um trotz dessen einen Absolutwert für die Kochendichte ermitteln zu können wurden, bei gleichen Parametereinstellungen, drei Apatit-Proben mitgescannt, deren Masse und Dichte bekannt waren. Zusätzlich mussten, um zu vergleichbaren Dichte-Werten zu gelangen, jeweils etwas Luft sowie Teile der Kunststoffubes mitgescannt werden, um später – anhand dieser sich im Strahlengang gleich darstellenden Materialien - eine Normierung der verschiedenen Scandurchläufe zu ermöglichen.

Diese Vorgehensweise - also das Scannen eines Referenzkörpers bei gleichbleibenden Aufnahmeparametern - wird auch durch den Hersteller des μ CT-Systems empfohlen, der im Gerätehandbuch beschreibt, dass es zur Ermittlung der Dichte eines gescannten Objektes unumgänglich ist im gleichen Scandurchlauf einen Körper mit bekannten Absorptionseigenschaften mitzuscannen um somit eine Skalierung der gewonnenen Daten zu ermöglichen (GE Healthcare eXplore Locus User Guide 2007, S. 31).

3.5 Bildumrechnung

Die Gantry des eXplore Locus -Systems gibt die gemessenen Daten in roher Form zur weiteren Verarbeitung an das angeschlossene Rechnersystem aus. Dieses errechnet in mehreren Stunden anhand von Bildalgorithmen ein dreidimensionales Modell, welches man entweder in Gänze oder in virtuell erstellten zweidimensionalen Schnitten betrachten kann. Man unterscheidet dabei zwischen der zweidimensionalen Darstellung durch Pixel (*Picture elements*) und der dreidimensionalen Darstellung durch Voxel (*Volume elements*). Dabei haben sowohl Pixel als auch Voxel einen festgelegten numerischen Wert. Um die gewünschte Auflösung zu erreichen wird, falls diese von der Maximalauflösung abweicht, ein sog. Binning-Prozess durchlau-

fen. Dabei werden die numerischen Helligkeitswerte einzelner Pixel zu einem gesamten Helligkeitswert für die gewünschte Blockgröße addiert.

Mit Hilfe dieser Methode wird eine höhere Lichtempfindlichkeit erreicht, was jedoch zu Lasten der Auflösung geschieht, welche sich entsprechend der Anzahl der jeweils zusammengefassten Pixel reduziert.

Um die Bilddateien, welche nun noch mehrere Gigabyte an Daten umfassen, komfortabel an verschiedenen Systemen betrachten und auswerten zu können, wurden sie in das standardisierte ".VFF"-Format konvertiert. Dazu wurde die Aufnahme eines Tubes mit 3 Proben virtuell aufgeteilt, und es wurde für jede Probe eine jeweils separate und deutlich kleinere Datei erzeugt.

3.6 Auswertung der Daten am Computer

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes MicroView der Fa. GE HealthCare (London, Kanada) welches zur Auswertung von μ CT-Daten entwickelt wurde. Dabei wurden die Dateien zunächst eingelesen um, wie in Abbildung 3.3, ihre Güte zu kontrollieren. Falls die Proben nicht vollständig abgebildet oder unscharf waren, wurde ein erneuter Scanvorgang nötig, andernfalls konnte nun mit der Auswertung begonnen werden.

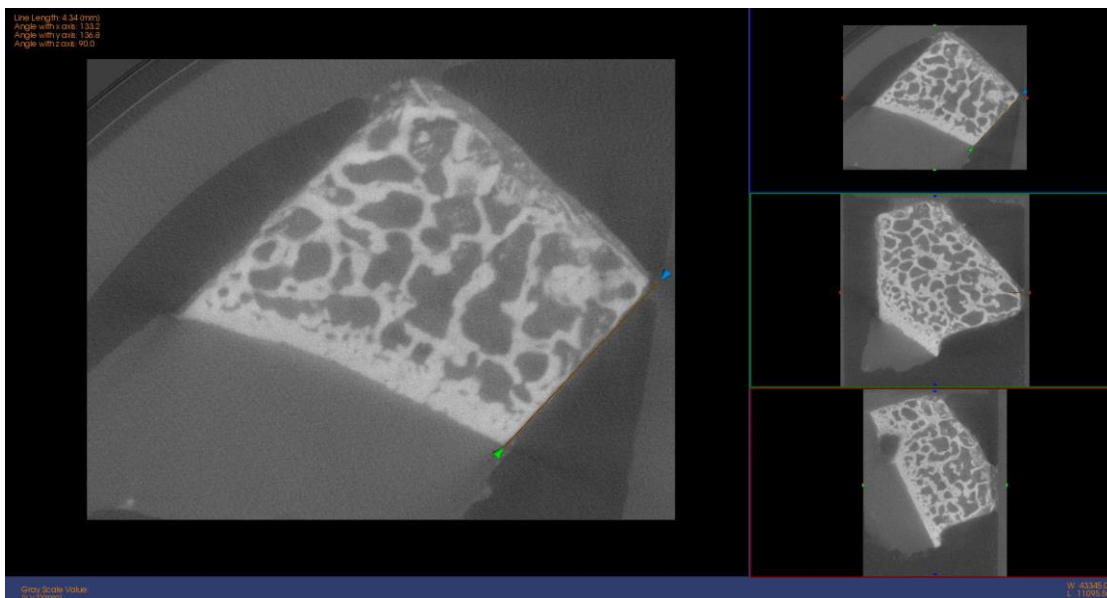


Abbildung 3.3: Darstellung von Probe 413G (Gesund) in zweidimensionaler Ansicht. An der Oberfläche ist die Kompakta zu erkennen, im unteren rechten Bild sieht man auch hier den Bereich, aus dem die Stanze zur weiteren histologischen Untersuchung gewonnen wurde. Die Helligkeitswerte wurden im Anschluss randomisiert innerhalb der Kompakta erhoben.

Um die Dicke der subchondralen Kompakta bestimmen zu können wurde diese an 10 einzelnen Strecken je Probenkörper in unterschiedlichen Ebenen und an entfernt voneinander liegenden Punkten vermessen. Dazu wurde die Messfunktion der Bildbearbeitungssoftware genutzt, als weitere Kontrolle diente das Auszählen der Bildpunkte.

Die Bestimmung der Dichte sollte über den Vergleich der Helligkeitswerte ermöglicht werden, da die Dichte eines Materials mit dessen Absorptionseigenschaften direkt proportional korreliert.

Hierzu wurde zunächst der Bereich der subchondralen Kompakta aufgesucht und einzelne Helligkeitswerte ermittelt. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu ermöglichen, wurden pro Probe randomisiert 20 Werte aus der Kompakta ermittelt und zu einem Durchschnittswert umgerechnet.

Um einen absoluten Wert für die Knochendichte zu erhalten, war es weiterhin unumgänglich, nach dem gleichen Verfahren einen Referenzkörper zu vermessen. Dieser besteht aus drei verschiedenen angemischten Knochenersatzmaterialien mit jeweils bekannter Dichte. Die folgende Abbildung 3.4 zeigt den gemessenen Referenzkörper in dreidimensionaler Ansicht. Gut zu erkennen sind die drei unterschiedlich dichten Schichten des Körpers, welche von unten (dichter) nach oben (weniger dicht) in verschiedenen Grauwerten dargestellt werden.

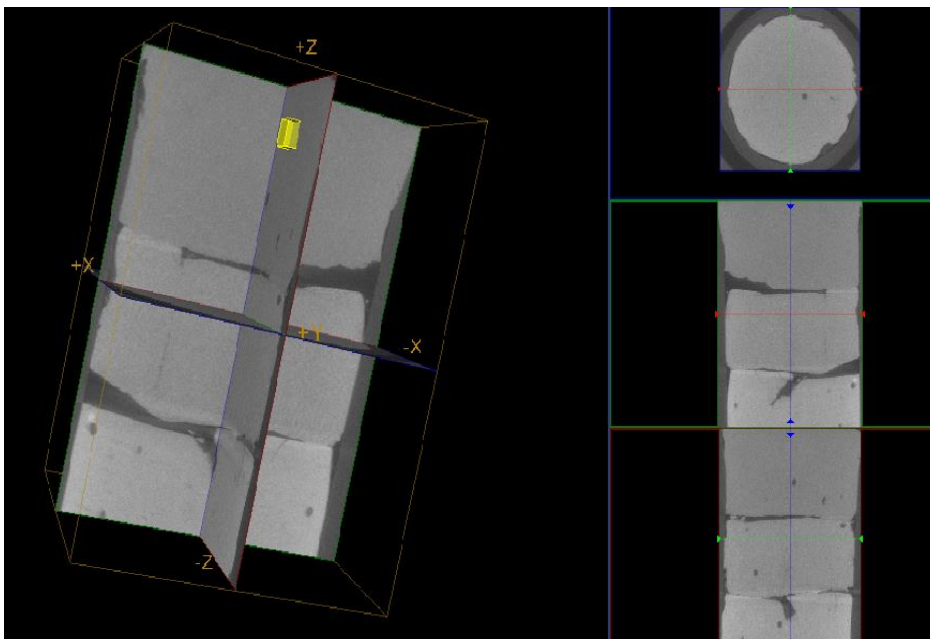


Abbildung 3.4: Vermessung des Referenzkörpers, einem aus drei Knochenersatzmaterialien (Apatit) bestehenden Röhrchen mit bekannter und jeweils unterschiedlicher Dichte

3.7 Statistische Methodik

Tests auf Mittelwert-Unterschiede wurden mit dem t-Test für zwei unverbundene Stichproben und im Mehrgruppen-Vergleich mit einer Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Je nach Vergleich kam dabei ein uni- oder zweifaktorielles Design zum Einsatz. Die Sicherheitswahrscheinlichkeit betrug jeweils 95%.

Da das Vorliegen einer Normalverteilung eine Voraussetzung für die Durchführung einer Varianzanalyse (ANOVA) ist, musste das Vorliegen einer solchen zunächst bewiesen werden

Hierzu wurden für die jeweils 20 Grauwerte, die je Probe gemessen wurden, zunächst jeweilig der Minimal- und der Maximalwert ermittelt. Aus diesen wurden dann anhand der reziproken Normalverteilung 19 an den Rändern entsprechend größere, zur Mitte hin kleinere Abstände auf der x-Achse der Quantil-Quantil-Diagramme aufgetragen. Jedem dieser Normalquantilwerte wurde der reale Wert auf der y-Achse zugeordnet. Diese Diagramme wurden für jede Probe erstellt. Anhand der Nähe zur Teilungsgeraden und anhand einer gleichmäßigen Streuung ohne Gruppenbildung konnte so die Normalverteilung der Messwerte nachgewiesen werden. Um den statistischen Zusammenhang zwischen dem errechneten, kalibrierten Grauwert und der Dichte des Apatit-Probenkörpers herzustellen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt.

Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikpaket SPSS v23 (IBM, Armonk, USA) nach Beratung durch die Zentrale Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik unter der Leitung von PD Dr. Klaus Jung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 μ CT-Aufnahmen

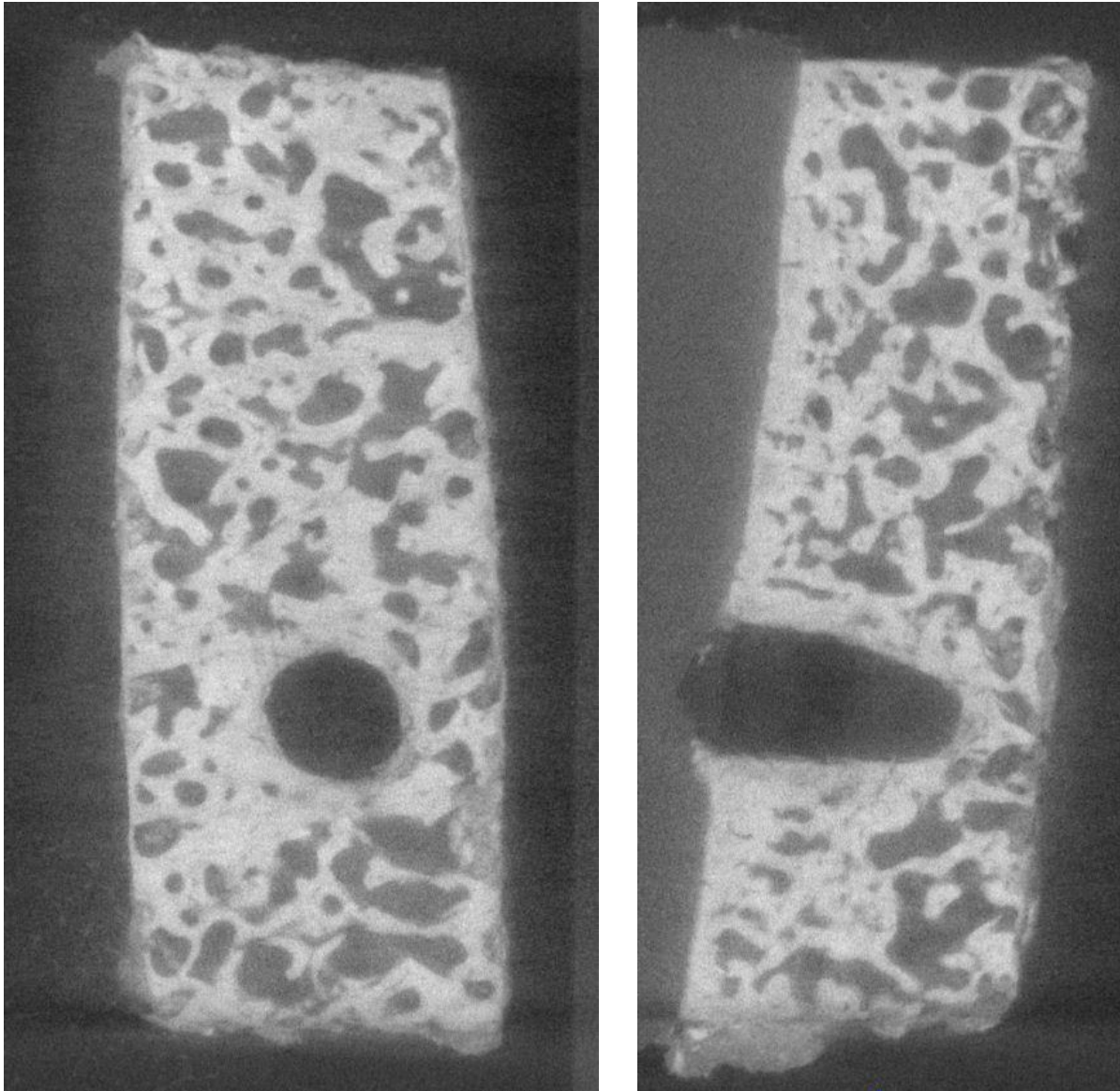


Abbildung 4.1: μ CT-Aufnahme von zwei Seiten des aus dem defekten Bereich von Probe 398 ausgeschnittenen Probenkörpers

Abbildung 4.1 zeigt zwei Schnittansichten des Probenwürfels aus dem defekten Bereich von Probe 398. Das Stanzloch ist in beiden Ansichten deutlich zu erkennen. Hier wurde aus Probe 398D das Material für die zuvor beschriebenen Dünnschnitte gewonnen.

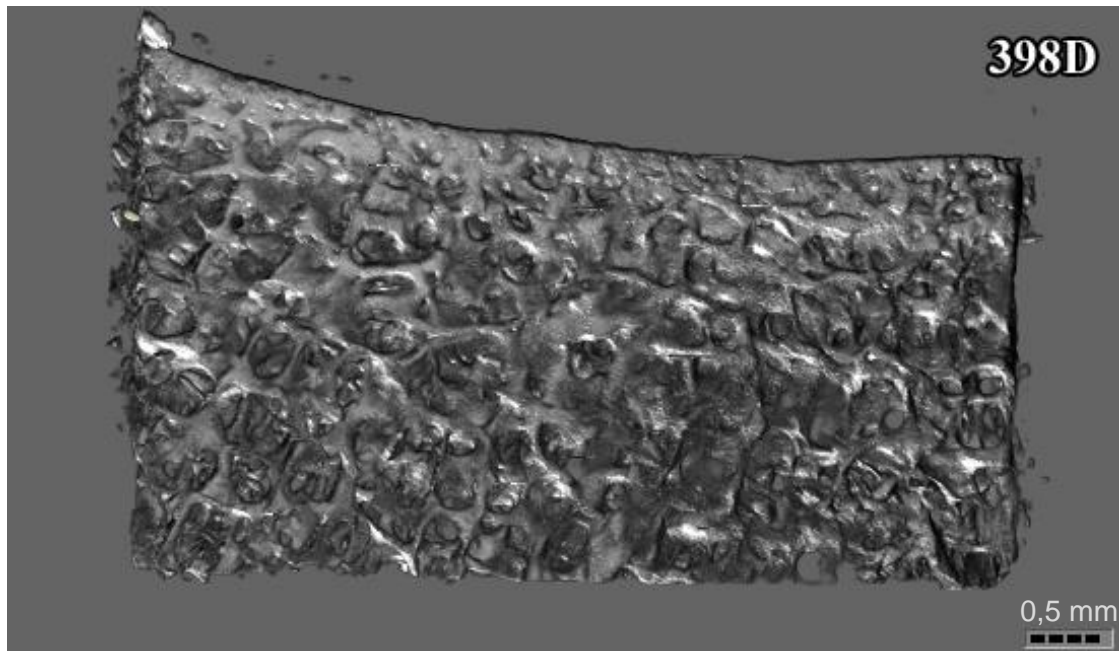


Abbildung 4.2: Durch digitale Bildverarbeitung herausgearbeitete Schnittansicht von Probe 398 in der dreidimensionalen Rekonstruktion; hier zu sehen die Defektzone der Probe.

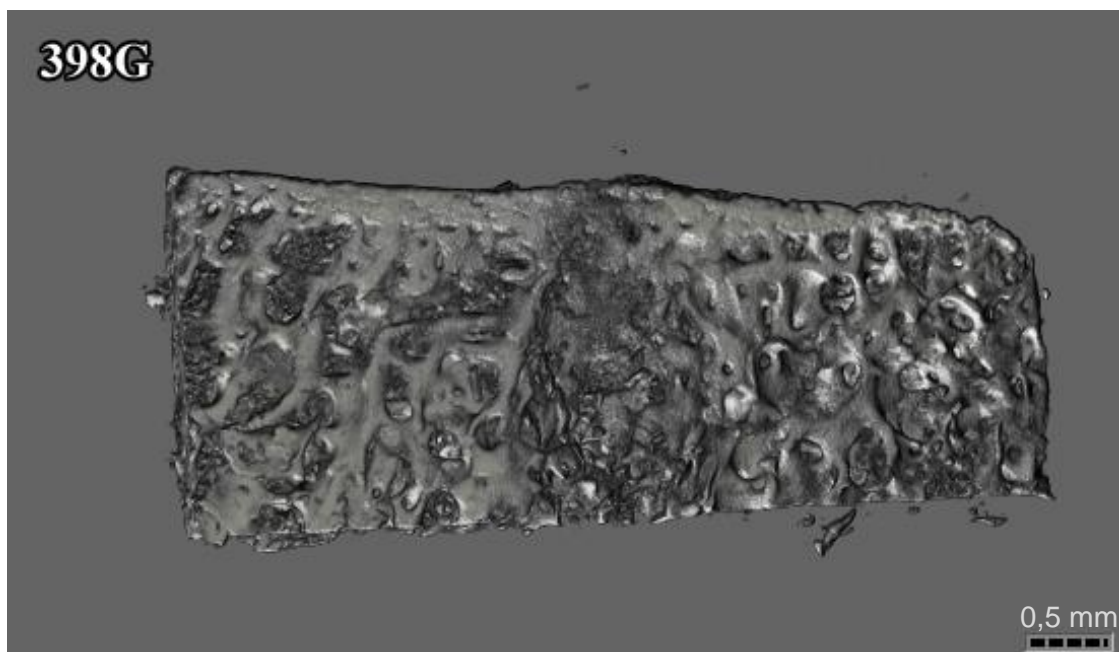


Abbildung 4.3: Dreidimensionale Rekonstruktion der gesunden Zone von Probe 398. Die Vertiefung der Schnittmitte stellt den Bereich der Stanzenentnahme dar.

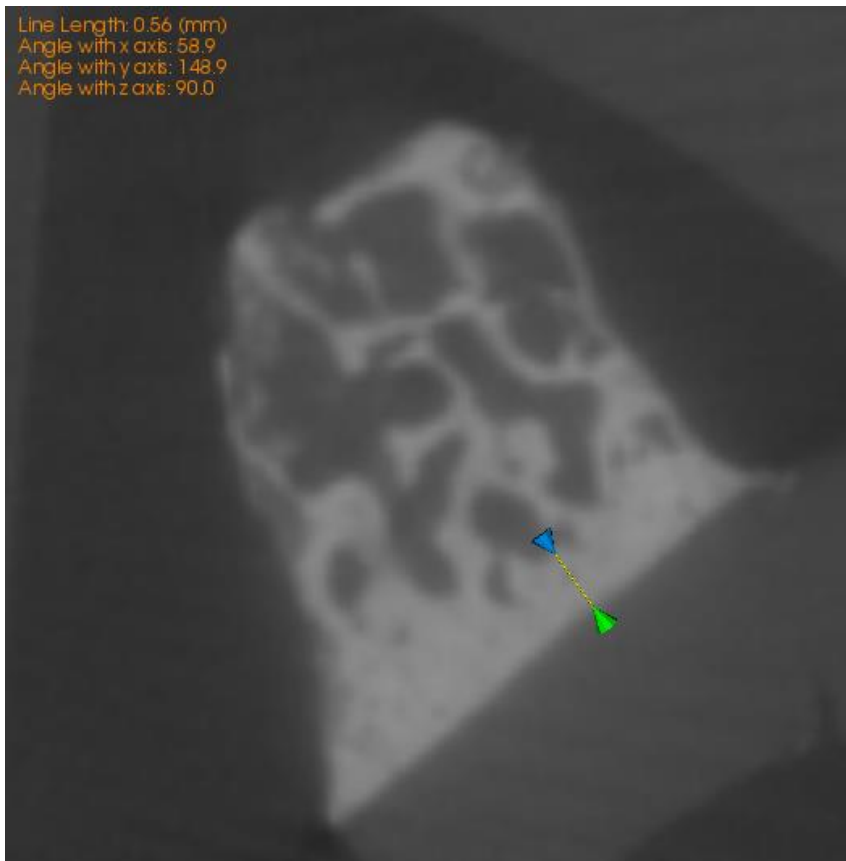


Abbildung 4.4: Vermessung der Stärke der subchondralen Matrix mit Hilfe der Bildverarbeitung, Probe 400 (Defektzone)

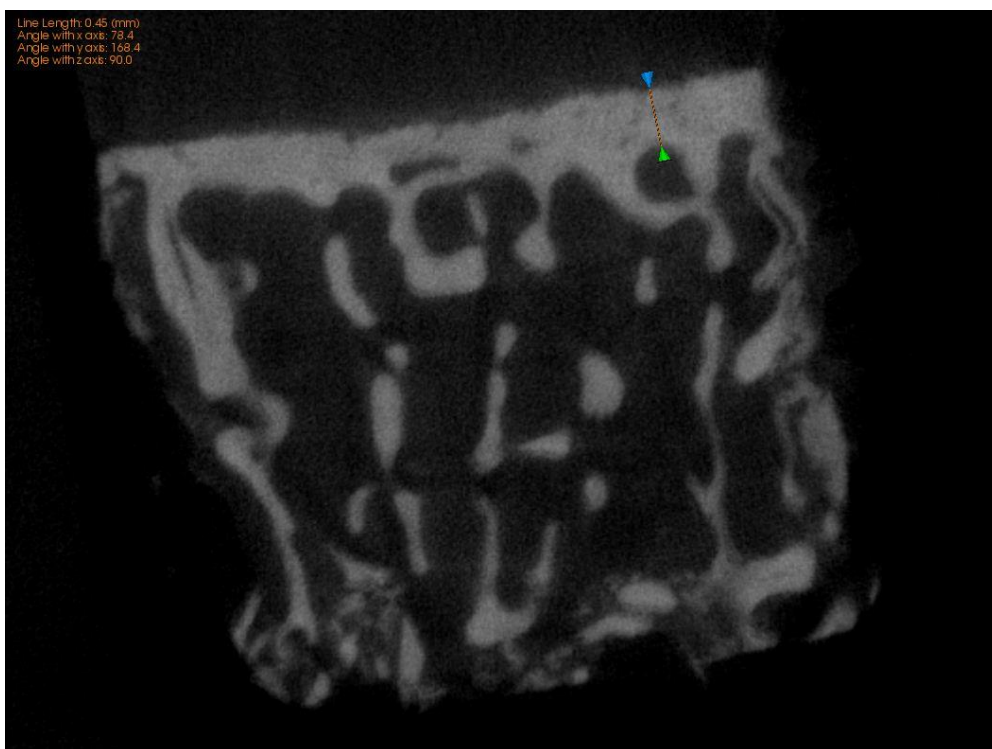


Abbildung 4.5: Vermessung der Stärke der subchondralen Matrix mit Hilfe der Bildverarbeitung, Probe 400 (gesunde Zone)

Abbildungen 4.2 und 4.3 (S. 27) zeigen in der Übersicht die subchondrale Kompakta und ihre jeweilige Ausdehnung. Abbildung 4.2 zeigt eine eher dick erscheinende Schicht calcinierter Matrix, während die gesunde Matrix in Abbildung 4.3 (S. 27) schon auf den ersten Blick eine dünnere Kompakta aufweist. Zur weiteren Bewertung wurden die Grauwerte dieser Kompaktazonen ebenfalls ausgewertet, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Dichte und somit den Calciniierungsgrad bzw. die Härte und Festigkeit der Kompakta ziehen zu können. In den folgenden Abschnitten wird auf diese Dichtemessungen näher eingegangen.

Abbildung 4.5 (S. 28) zeigt anhand Probe 400 (Gesund) die Vermessung der subchondralen Matrix, deren Rand sich zwar klar abzeichnet, bei der jedoch der Übergang zur darunterliegenden, aus calcinierter und auch nichtcalcinierter Knochenmatrix bestehenden, Knochenstruktur schwer auszumachen ist. Diese unklare Abgrenzung von subchondraler Kompakta zur darunterliegenden Knochenstruktur machte die Vermessung problematisch.

4.1.1 Auswertung der μ CT-Aufnahmen – Dickemessung

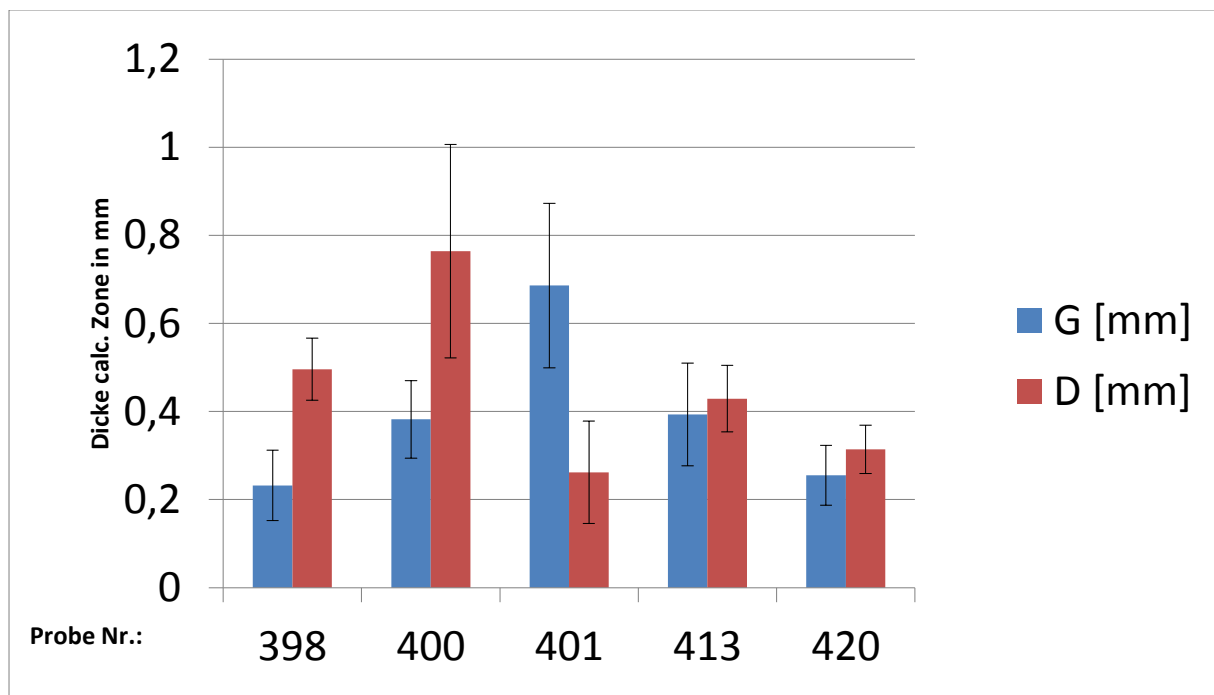


Abbildung 4.6: Aus jeweils 10 Einzelmessungen bestimmte Dicke (in mm) der subchondralen Kompakta der Probenbereiche Gesund (G) und Defekt (D) mit Standardabweichung

Abbildung 4.6 zeigt die Werte der fünf je zwei Proben umfassenden μ CT-Messreihen. Außer bei Probe 401 wurde bei den aus den jeweiligen Defektzonen

entnommenen Proben eine größere Dicke der subchondralen Kompakta im Mittel festgestellt (vgl. Tabelle 4.1).

		n	Mittelwert	Standardabweichung
Kompakta	gesund	50	0,390	0,198
	defekt	50	0,453	0,218

Tabelle 4.1: Mittelwerte und Standardabweichung der Dicke gesunder und defekter Kompakta

Eine Varianzanalyse für wiederholte Messungen erbringt jedoch ein nicht signifikantes Ergebnis ($p= 0.61$), d.h. gesunde Proben unterschieden sich gegenüber defekten Kontrollen hinsichtlich der Dicke nicht, die höheren Werte der Defektproben lagen daher im Bereich des Zufalls.

4.1.2 Auswertung der μ CT-Aufnahmen – Knochendichtebestimmung

Anhand der Grau- bzw. Helligkeitswerte der Proben an geeigneter Stelle sollte die Dichtemessung der calcinierten Knochenmatrix vergleichend, sowohl qualitativ als auch quantitativ, vorgenommen werden.

Abbildung 4.7 (S. 31) zeigt das Diagramm eines Linienplots, also der virtuellen Verbindung zweier durch den Benutzer an Ober- und Unterkante der subchondralen Kompakta definierten Punkte. Deutlich zu erkennen ist die Schwankungsbreite der Grauwerte im Schnitt durch die Kompakta. Es wurden im Folgenden die Mittelwerte der einzelnen Grauwertmessungen bestimmt und die Proben - entsprechend diesem Vorgehen - jeweils an 20 in gleichmäßigem Abstand ausgewählten Stellen vermessen.

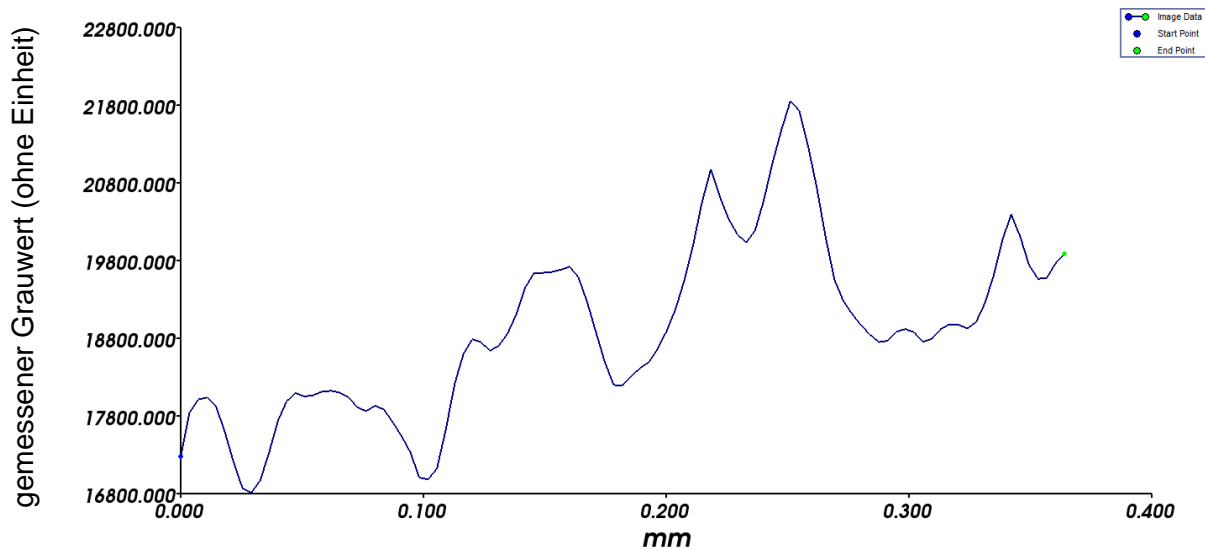


Abbildung 4.7: Plotdiagramm aus dem Programm MicroView der Fa. GE Healthcare (London, Canada), dargestellt ist eine exemplarische Messlinie der subchondralen Kompakta in Probe 413 G (Gesund)

Der Graph der Helligkeitswerte des Linienplots in Abbildung 4.7 steigt dabei im Verlauf vom inneren, an den spongiösen Knochen angrenzenden, Bereich des subchondralen Knochens (links, im Ursprung des Graphen) zum Kontaktbereich mit dem Gelenkknorpel (rechts) sichtbar an.

Die Messung der Helligkeitswerte für die einzelnen Proben ergab die folgenden, in Abbildung 4.8 (S. 32) dargestellten und aus jeweils 20 Einzelmessungen gemittelten, Ergebnisse:

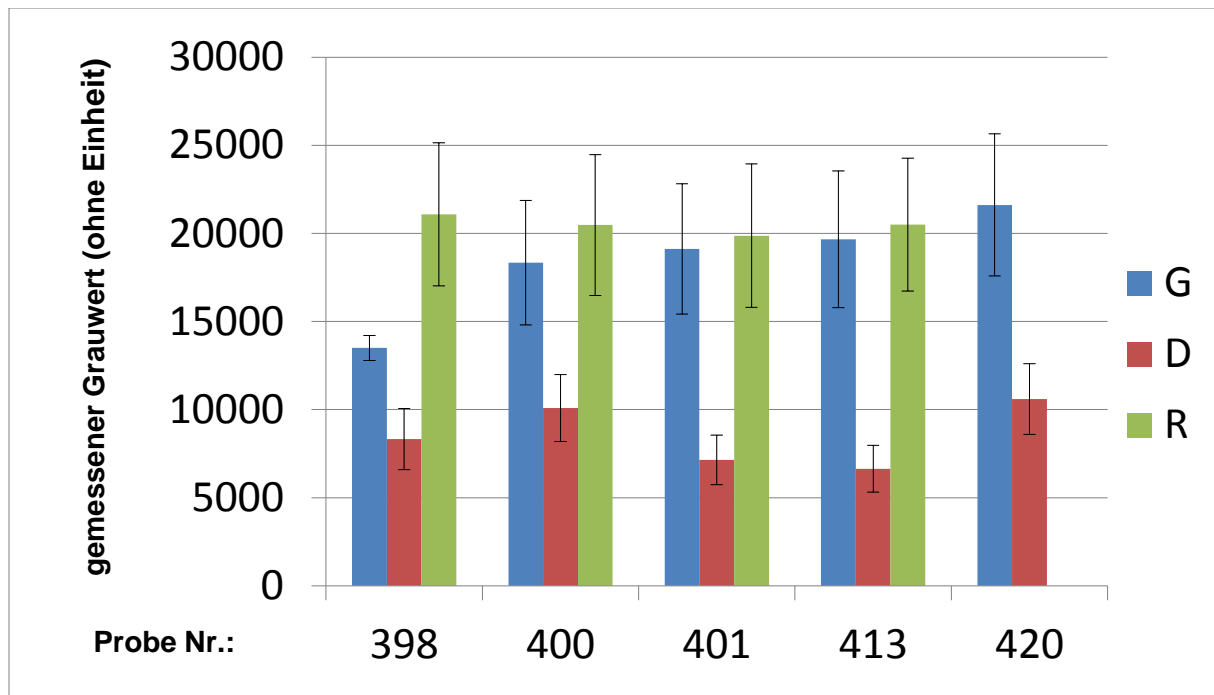


Abbildung 4.8: Aus jeweils 20 Einzelmessungen bestimmte Grauwertmittel der Knochenmatrix mit Standardabweichung, jeweils für die Probenbereiche Gesund (G), Defekt (D) und Rand (R)

Diese in Abbildung 4.8 aufgetragenen Daten lassen bereits einen ersten Rückschluss auf die Vergleichbarkeit der Werte zu, sind jedoch noch nicht absolut, da das μ CT die aufgenommenen Bilder im Hinblick auf ihre Grauwerte geräteseitig anpasst, um eine ideale Betrachtbarkeit zu ermöglichen. Diese - an sich nützliche - Funktion verhindert jedoch leider, dass man aus den gemessenen Helligkeitswerten einen absoluten Wert für die Dichte eines Materials errechnen kann.

Um dieses Problem zu lösen, wurden - zusätzlich zu den Helligkeitswerten der Proben - auch entsprechend randomisiert gewonnene Grauwerte für die ebenfalls auf allen μ CT-Bildern sichtbaren Probenbehältnisse, die sogenannten Tubes (GW_{tube}), sowie für das Hintergrundrauschen (GW_{luft}) gemessen. Tabelle 4.2 (S. 33) zeigt am Beispiel von Probe 400 folgende Messwerte:

Probe 400	G	D	R
GW_{luft}	695,35	325,25	592,55
GW_{tube}	2922,37	2449,81	4218,93

Tabelle 4.2: Grauwerte bei den jeweiligen Messungen im gesunden Bereich (G), im defekten Bereich (D) und im Randbereich (R) des mitgemessenen Probenhalters GW_{tube} und des Hintergrundrauschens durch in der Messkammer verbliebene Restluft GW_{luft}

Um die hardwareseitige Verfälschung der Helligkeitswerte mathematisch zu eliminieren, wurden die zusätzlich gewonnenen durchschnittlichen Grauwerte für den Bereich des Probenhalters (Tube) sowie die durchschnittlichen Grauwerte des Hintergrundrauschens (Luft) mit den gewonnenen Daten aus den untersuchten Bereichen in einer Formel zusammengebracht, um einen künstlichen vergleichbaren Wert, im folgenden kalibrierter Grauwert genannt, zu erhalten. Die dazu verwendete Formel lautet:

$$GW_{kal} = \frac{GW_{probe}}{GW_{tube} - GW_{luft}} + GW_{luft}$$

mit:

GW_{kal} Kalibrierter Grauwert

GW_{probe} Grauwert der Probe

GW_{tube} Grauwert des Probenhalter-Röhrchens

GW_{luft} Grauwert der Luft im Messraum des μ CT

Es ergeben sich damit z.B. für die Probe 398 die folgenden kalibrierten Grauwerte (Tabelle 4.3, S. 34):

Probe 398	G	D	R
GW _{probe}	13498	8330	21083
GW _{luft}	623,02	87,12	657,25
GW _{tube}	3321,48	2065,27	4323,49
GW _{kal}	4,77	4,17	5,57

Tabelle 4.3: Kalibrierte Grauwerte am Beispiel der Probe 398 in den Zonen „Gesund“ (G), „Defekt“ (D) und „Rand“ (R)

Diese anhand der Probenträger-Röhrchen und der verbliebenen Luft kalibrierten Werte ermöglichen nun eine direkte Vergleichbarkeit sowie die Umrechnung in absolute Werte unter Zuhilfenahme der jeweiligen Grauwertverhältnisse GW_{tube} / GW_{luft} der einzelnen Messungen sowie des Grauwertverhältnisses des ebenfalls gemessenen Referenzobjektes.

Insgesamt ergeben sich die folgenden - jetzt direkt vergleichbaren - Messwerte für sämtliche Proben (Abbildung 4.9):

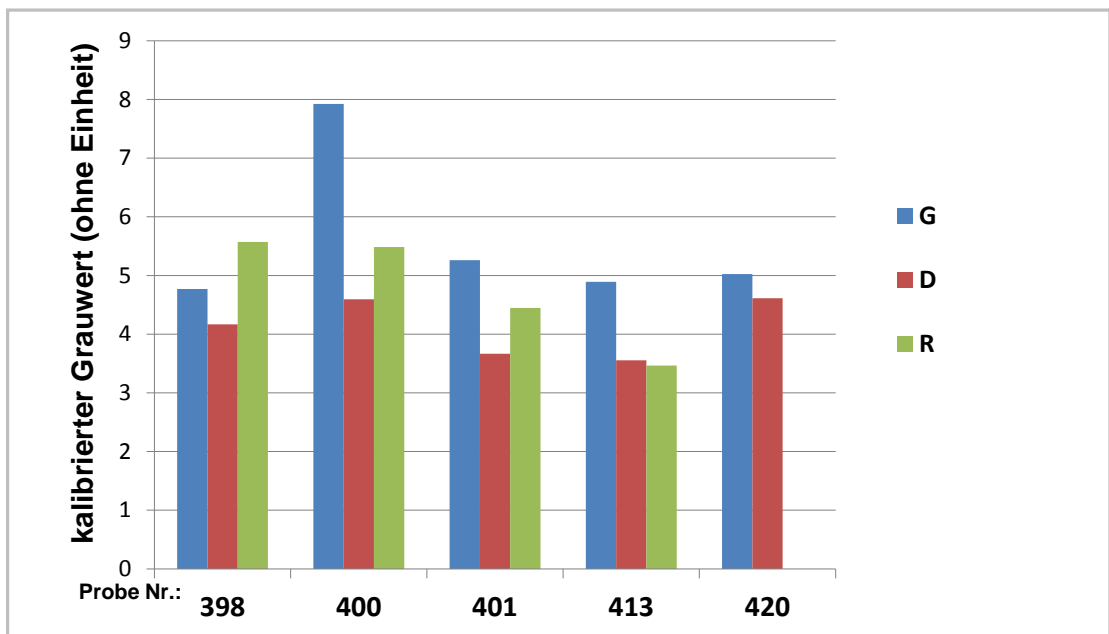


Abbildung 4.9: An dem Grauwert des mitgemessenen Probenträgers sowie um Hintergrundrauschen korrigierte kalibrierte Grauwerte in den Bereichen Gesund (G), Defekt (D) sowie der Randzone (R)

Diese Werte ermöglichen nun eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen gemessenen Proben.

Um jedoch einen absoluten Wert für die *Bone Mineral Density* (BMD) zu erhalten, mussten diese Werte mit den Helligkeitswerten (GVAL, *Grey Value*) sowie den daraus resultierenden kalibrierten Werten des Referenzkörpers verglichen werden. Abbildung 3.4 (S. 24) zeigt die Vermessung der drei verschiedenen Zonen mit jeweils verschiedener, aber exakt bekannter Dichte eines der Apatit-Probekörpers. Durch lineare Regression konnte mit einem sehr guten Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,98$ der Zusammenhang zwischen dem jeweiligen kalibrierten Grauwert und der Dichte des Apatit-Probekörpers hergestellt werden.

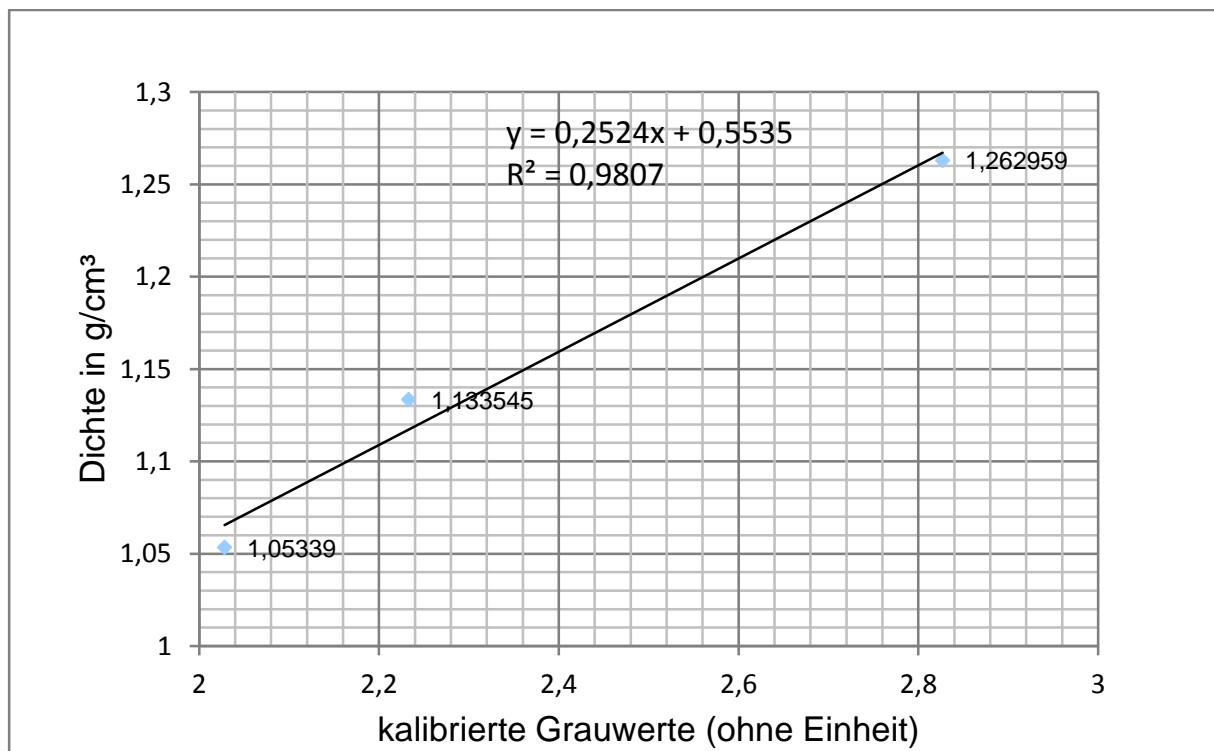


Abbildung 4.10: Regressionsanalyse zur Herstellung des Zusammenhangs zwischen Grauwert und Dichte anhand der drei Apatitvergleichsproben

Die Dichte berechnet sich demnach aus dem jeweils bestimmten kalibrierten Grauwert anhand der Gleichung:

$$\rho_{\text{Probe}} = 0,2524 \times \text{GW}_{\text{kal}} + 0,5535$$

mit

ρ_{Probe} Knochendichte in g/cm³

GW_{kal} kalibrierter Grauwert der gemessenen Knochenmatrixprobe

Nunmehr wurden die gemessenen Knochenmatrizes mit obiger Gleichung entsprechend skaliert und die quantitative Vergleichbarkeit zu anderen Knochenmatrizes hergestellt.

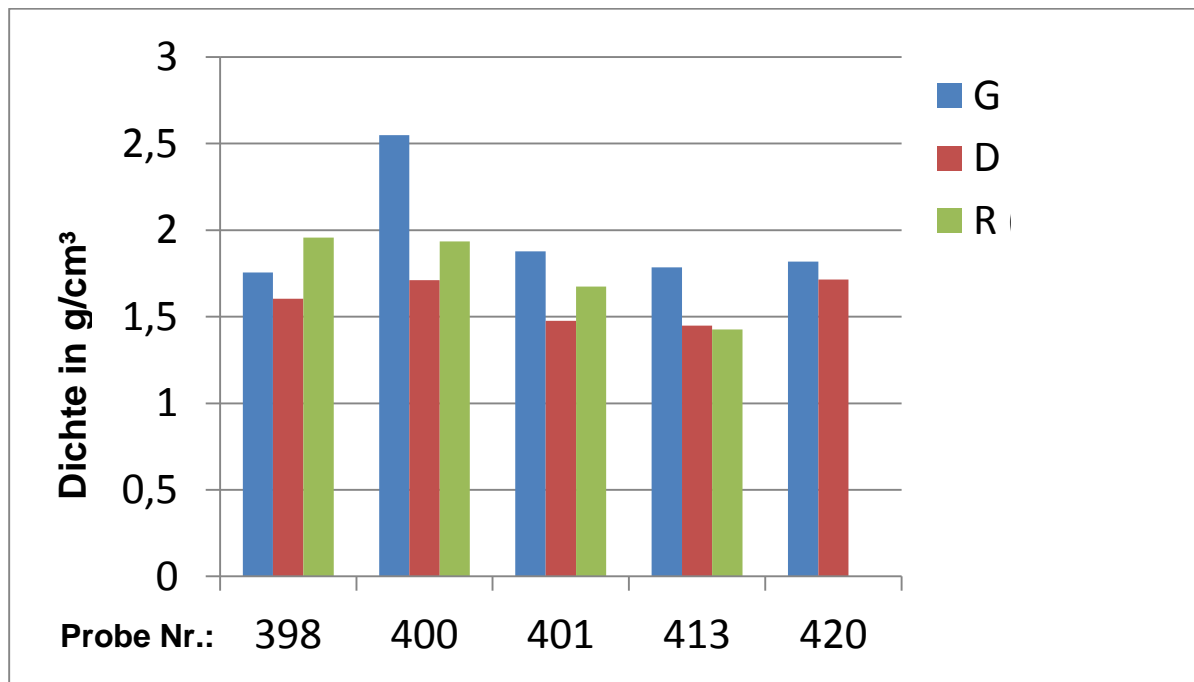


Abbildung 4.11: Kalibrierte und anhand der Apatitvergleichsproben skalierte Werte der Knochendichte in den Bereichen „Gesund“ (G), „Defekt“ (D) sowie der Randzone (R)

4.1.3 Statistische Auswertung der μ CT-Daten

Abbildung 4.12 (S. 37) zeigt exemplarisch die Q-Q-Normalquantilauftragung zum Nachweis des Vorliegens einer Normalverteilung für Probe 400, gesunder Bereich. Im Gegensatz zur Auftragung für den defekten Bereich, Abbildung 4.13 (S. 37), folgen die Messwerte nicht exakt der Normalverteilung.

Die Datenpunkte liegen eher auf einer s-förmigen Kurve; ein Zeichen dafür, dass die gemessene Verteilung etwas breiter und flacher ist, die Messwerte also vergleichsweise stärker streuen.

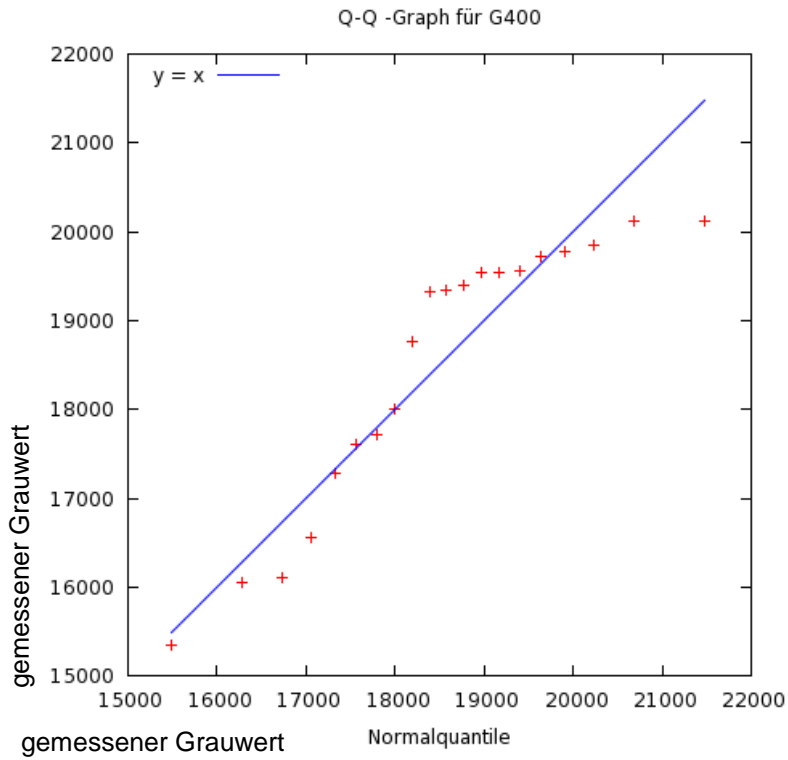


Abbildung 4.12: Q-Q-Diagramm für die Einzelmesswerte Probe 400, gesunder Bereich

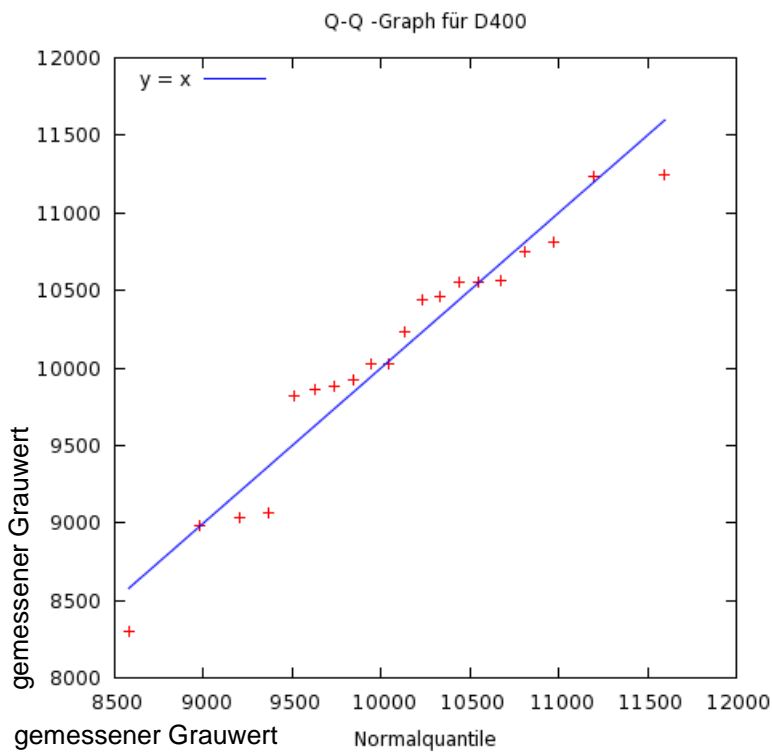


Abbildung 4.13: Q-Q-Diagramm für die Einzelmesswerte Probe 400, Defektbereich

Die deskriptiven Statistiken in Tabelle 4.4 zeigen eine auffällig geringere Streuung bei den defekten Proben, die im Mittel rund 0,13 g/cm³ beträgt im Vergleich zu den untersuchten gesunden Proben mit einer Standardabweichung von rund 0,33 g/cm³.

Proben		in mg/cm ³	Standardfehler
Gesund	Mittelwert	1942,7	334,0
	Standardabweichung	333,9	
	Minimum	1755,3	
	Maximum	2549,6	
Defekt	Mittelwert	1443,8	126,0
	Standardabweichung	125,7	
	Minimum	1398,6	
	Maximum	1669,4	

Tabelle 4.4: Deskriptive Statistik der kalibrierten Werte für die Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“

Die Dichten der gesunden Proben lagen dabei im Mittel bei 1,9 g/cm³ und damit statistisch signifikant höher als bei Proben defekter Herkunftsbereiche der Kompakta mit rund 1,4 g/cm³. Das ergab eine Varianzanalyse mit Messwiederholung ($df= 1$, $p < .001$, wobei p die Signifikanz und df die Anzahl der Freiheitsgrade angibt. Das Signifikanzniveau betrug 5%).

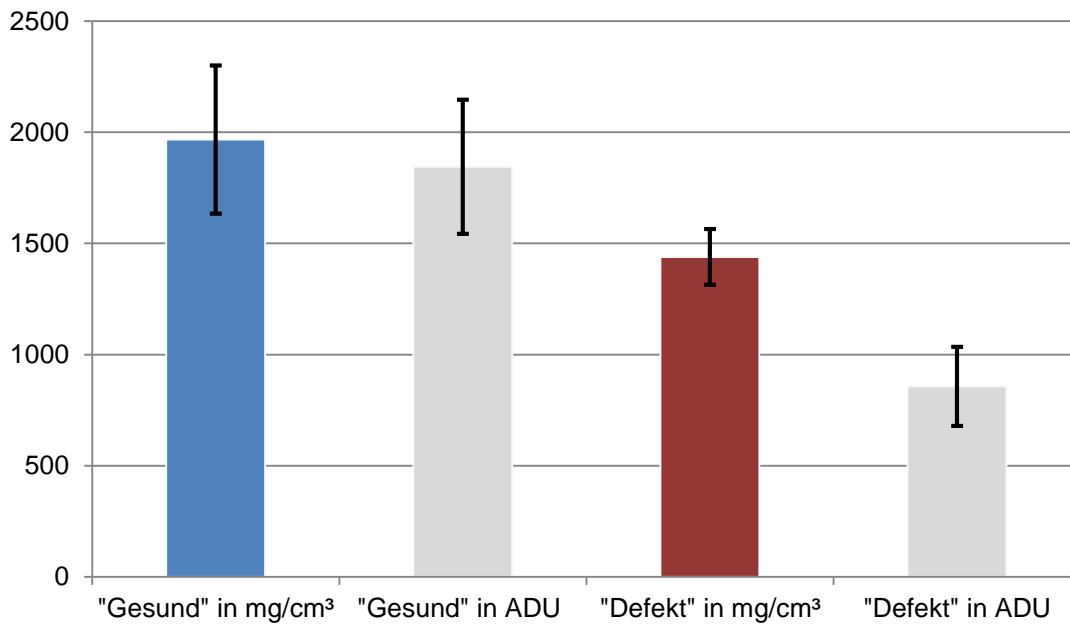


Abbildung 4.14: Mittelwerte für die ermittelte Dichte in mg/cm³ bzw. Helligkeitswerte in ADUs (Arbitrary Digital Units) der Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“ mit Standardabweichung

4.2 Dünnschnitte und mikroskopische Untersuchungen

Die Dünnschnitte zeigen den Übergang vom Gelenkknorpel, der durch die Färbung violett erscheint, über den calcinierten Gelenkknorpel hin zur subchondralen Knochenmatrix. Abbildung 4.15 (S. 40) zeigt einen Ausschnitt aus der defekten Zone. Am oberen Bildrand ist der Gelenkknorpel deutlich zu erkennen. Zwischen subchondralem Knochen und Knorpel liegen - ohne klare Abgrenzung - gemischt calcinierter Knorpel, calcinierte Knochenmatrixbestandteile und nicht calcinierte Knochenstrukturen vor. Die einzelnen Komponenten beginnen allmählich miteinander zu verschmelzen. Eine Kontinuität im Verlauf des subchondralen Knochengewebes scheint nicht mehr durchgängig zu existieren.

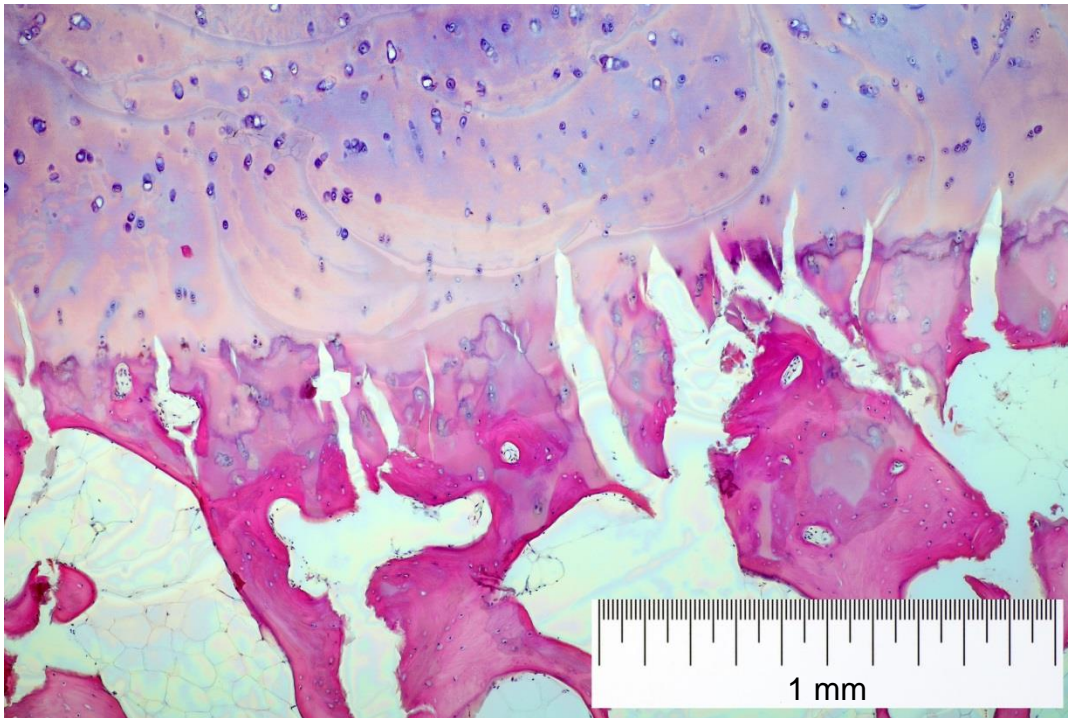


Abbildung 4.15: Probe 8 Defektbereich; im mittleren Bildbereich gut zu erkennen ist die beginnende Verschmelzung von Knorpel, calcinierten Knorpelbestandteilen sowie der Knochenmatrix

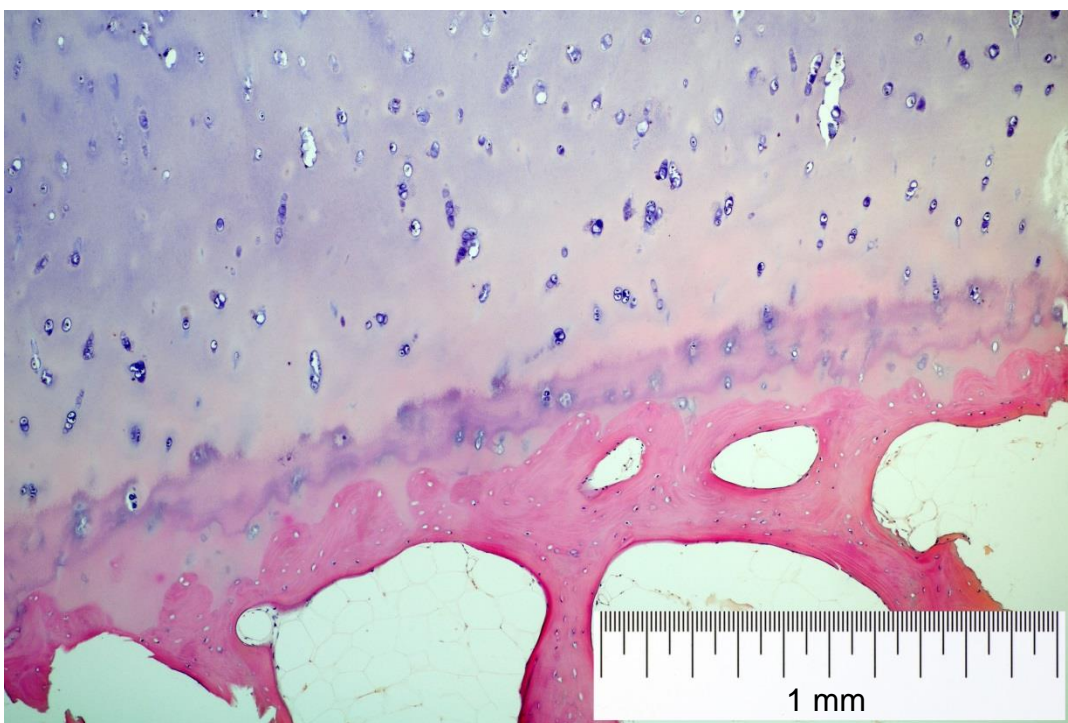


Abbildung 4.16: Probe 8 gesunder Bereich mit deutlich klarer abgegrenzter Kompakta und vergleichsweise gleichmäßig ausgeprägter Kompaktadicke

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 4.16 (S. 40) den gesunden Bereich derselben Probe. Hier ist eine eindeutige Schichtung der einzelnen Bereiche erkennbar. Der Anteil an voll calcinierter Matrixstruktur in der subchondralen Kompakta ist in der gesunden Struktur deutlich höher als im defekten Bereich. Auch das Erscheinungsbild der in Abbildung 4.15 (S. 40) im unteren Bereich des Bildes befindlichen Knochenmatrix unterscheidet sich von der gesunden Matrix in Abbildung 4.16 (S. 40). Die defekte Matrix weist noch Reste nicht voll calcinierter Zellstrukturen auf, aus denen die violette Farbe nach dem Färben nicht vollständig durch das Ethanol herausgewaschen wurde.

In Abbildung 4.17 ist eine Defektzone zu erkennen, in der es erst zu einer leichten Verwischung und Unklarheit der Abgrenzung der Schichten gekommen ist. Das Gelenkknorpelgewebe erscheint an seinem Übergang zum calcinierten Gelenkknorpel und zur subchondralen Kompakta etwas ausgewaschen. Abbildung 4.16 (S. 40) zeigt wiederum eine deutliche Schichtung der gesunden Gelenkstruktur.

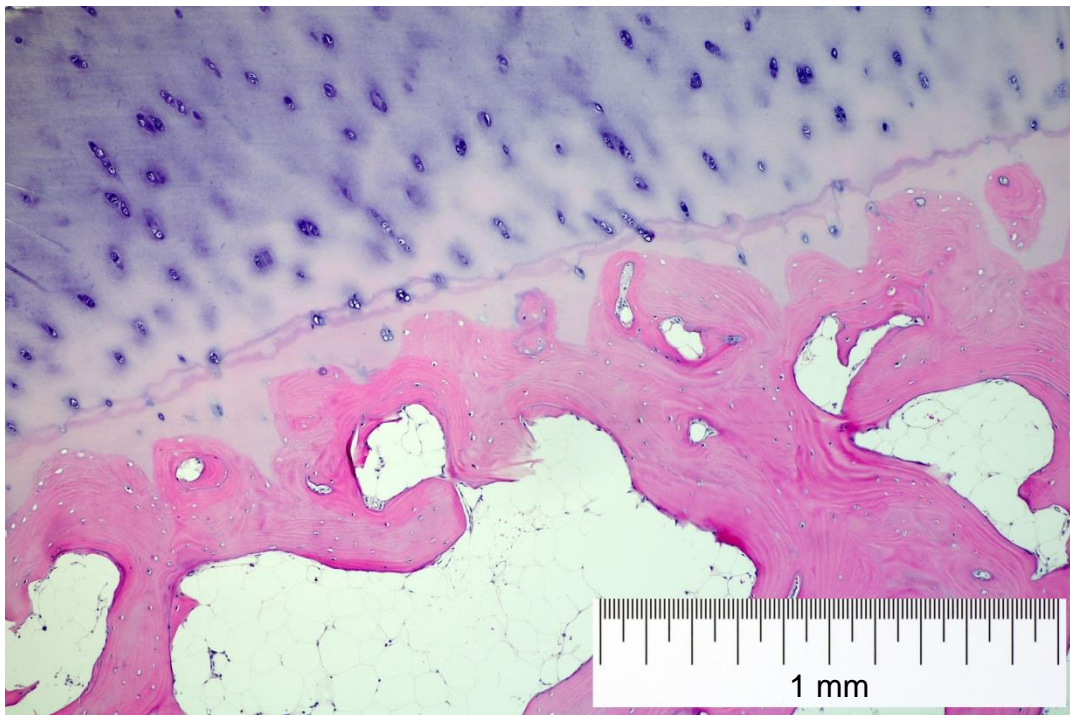


Abbildung 4.17: Probe 14 defekter Bereich. Ein klarer Übergang zwischen Knorpelgewebe, kalzifizierter Zone und subchondralem Knochen existiert zwar noch, dieser erscheint jedoch bereits unregelmäßiger

4.2.1 Dickebestimmung am Mikroskop

Die subchondrale Matrix wurde während der mikroskopischen Untersuchung der Proben anhand der Färbung identifiziert und abgegrenzt. Die Fotografien wurden an charakteristischen Stellen vergrößert und die Strecke jeweils abgemessen.

Abbildung 4.18 zeigt die Messwerte der Dickebestimmung als Balkendiagramm. Probe 14 zeigt eine vergleichsweise starke subchondrale Kompakta in der defekten Zone, die übrigen Proben sind eher ähnlich aufgebaut und zeigen tendenziell eine dünnere Kompakta in den jeweiligen Defektzonen.

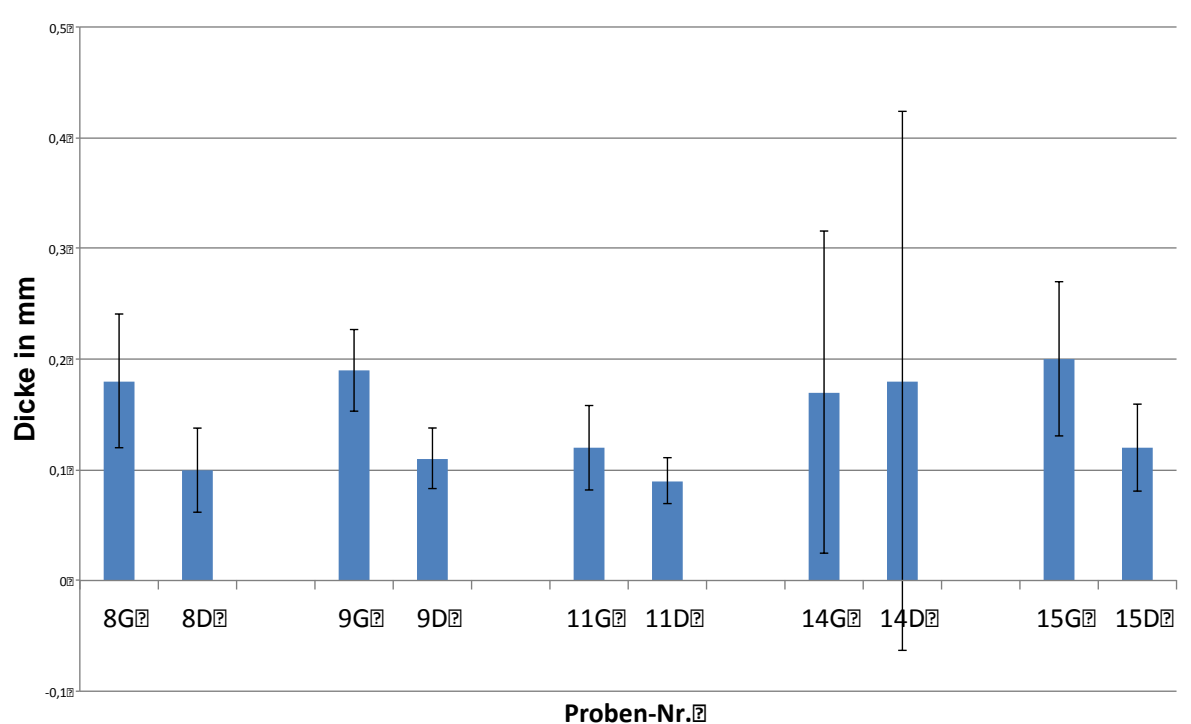


Abbildung 4.18: Messergebnisse aus jeweils 10 gemittelten, manuell am Mikroskop vorgenommenen Vermessungen der subchondralen Matrix mit Standardabweichung

Der Vergleich der gemittelten Dicken über alle gesunden bzw. defekten Proben zeigt ähnliche Mittelwerte bei einer etwas höheren Standardabweichung der Defektproben (vgl. Tabelle 4.5, S. 43).

		n	Mittelwert	Standardabweichung
Kompakta	gesund	50	0,172	0,031
	defekt	50	0,120	0,035

Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichung der Kompakta in den Probengruppen „Gesund“ und „Defekt“

Der Test auf Mittelwertunterschiede bei Messwiederholung (ANOVA repeated measures) bringt wie erwartet auch kein signifikantes Ergebnis ($p=0.51$). Der Faktor Status enthielt dabei die Einordnung nach gesunden bzw. defekten Proben.

4.2.2 Vergleich der Dickebestimmungen im Mikroskop bzw. μ CT

Zum Vergleich der beiden Messverfahren wurde ebenfalls eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen unter Einbezug des Status (gesund, defekt) und des Messverfahrens durchgeführt. Bei den untersuchten Proben ergab die Dickebestimmung über das Mikroskop tendenziell niedrigere Werte. Die Varianzanalyse zeigt, dass die beiden Verfahren der mikroskopischen und μ CT-Bestimmung der Dicke der subchondralen Kompakta sich erwartungsgemäß auch statistisch signifikant unterschieden ($p=0.001$).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der Tibia, insbesondere die der subchondralen Knochenmatrix, infolge arthritischer Veränderungen untersucht. Dazu wurden Resektate der Tibia herangezogen und in gesunde sowie defekte Zonen eingeteilt, Probenkörper geschnitten und jeweils aus diesen Dünnschnitte gefertigt. Diese Dünnschnitte wurden mikroskopisch begutachtet und anschließend die würfelförmigen Probenkörper im μ CT untersucht. Zunächst werden nun die Ergebnisse bezüglich Stärke und Dichte der subchondralen Matrix am μ CT diskutiert, in Abschnitt 5.2 dann die Ergebnisse der Auswertung der Dünnschnitte. Abschnitt 5.3 thematisiert den Vergleich beider Untersuchungsmethoden.

5.1 Diskussion der μ CT- Messungen der Knochendichte

Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig durch Kalibrierung und Referenzierung von Grauwerten berechneten Absolutwerte der Knochendichte erscheinen zum überwiegenden Teil plausibel. Natürlich lässt sich aufgrund der eher geringen Fallzahl der vorliegenden Untersuchung keine allgemeine Aussage treffen, auch wenn die nahezu einheitlich vorliegende Kongruenz der Messwerte eine klare Tendenz erkennen lässt.

Des Weiteren liegt der Untersuchung das grundsätzliche Problem zu Grunde, dass sowohl die Proben „Gesund“ und „Defekt“ letztlich aus den gleichen, bei Prothesenoperationen resezierten, erkrankten Kniegelenken stammen, da es naturgemäß sehr schwierig ist, Resektate vollkommen gesunder Knie für eine In-vitro-Untersuchung zu erhalten. Die Annahme, dass man im Randbereich der Kniegelenksflächen eines an Osteoarthritis erkrankten Patienten einem Gesunden nahekommende strukturelle Verhältnisse vorfindet ist jedoch sehr naheliegend – auch beim operativen Verfahren der Autotransplantation, also der Verpflanzung wenig belasteter Randbereichsstrukturen in das osteoarthritisch geschädigte Zentrum des Gelenks, wird diese Tatsache ausgenutzt (Werner 2003).

Eine mögliche theoretische Fehlerquelle, nämlich die Absorption der Röntgenstrahlung von Luft aufgrund des Nichtvorhandenseins eines Vakuums im Strahlengang, konnte durch das Miteinberechnen der Helligkeitswerte des Hintergrundrauschens,

also der durchdrungenen Luft, bei der Berechnung der Absolutwerte der Knochendichte eliminiert werden.

Dieser Fehler tritt jedoch bei der Arbeit mit Hounsfield-Einheiten anstatt der hier errechneten absoluten Dichte in g/cm^3 auf, da dort, in der Hounsfield-Skala, die Schwächung der Luft bei der Detektorkalibrierung vereinfachend gleich null gesetzt wird (Ambrose 1973) und Luft pauschal einen Wert von 1000 HU (Hounsfield-Units) erhält – allerdings beeinflusst dies letztlich die Bildqualität nur in sehr geringem Ausmaß (Brooks 1977).

Die Absolutwerte der Knochendichte, die durch Vergleich der gemessenen Knochenmatrizes mit definierten Apatitkörpern bestimmt wurden, lagen bei durchschnittlich $1,9 \text{ g}/\text{cm}^3$ (SD: $0,33 \text{ g}/\text{cm}^3$) bei gesunden Probenkörpern. Knochendichten von ungefähr $2 \text{ g}/\text{cm}^3$ sind typisch für eine gesunde, calcinierte Knochenmatrix humanen Ursprungs. So wird bei Hayes (1991) der entsprechende Referenzwert einer vollständig dichten Kortikalis mit $1,8 \text{ g}/\text{cm}^3$ angegeben. Auch bei Windler und Klabunde (2001) finden sich Hinweise auf Dichtewerte, die beim kortikalen Knochen etwa bei $1,8 - 2,0 \text{ g}/\text{cm}^3$ liegen. Der entsprechende Wert der Spongiosa variiert stark, wobei der Massenanteil der Spongiosa nur etwa 20 % beträgt, allerdings bei einem etwa 10-fachen Oberfläche/Volumen-Verhältnis im Vergleich zum kortikalen Knochen. Je nach anliegender Belastung kann die Dichte des spongiösen Knochens zwischen 5 und 70 % der Dichte des kortikalen Knochens betragen (Gibson und Ashby 1997).

Die Knochendichten in den defekten Zonen sind deutlich geringer als in den gesunden Knochenmatrizes. Dies bestätigt die These des vermehrten schnellen Knochenabbaus in den Defektzonen. Arbeiten über femurale Knochenschädigungen und mittels qCT bestimmte deutlich niedrigere Knochendichten bei rheumatisch-arthritischen Patienten stehen im Wesentlichen in Einklang mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das wurde bei Sambrook (1987) deutlich; die entsprechenden Dichtewerte lagen im Durchschnitt bei $0,6 - 1,4 \text{ cm}^2$ und sanken mit zunehmenden Alter linear ab. DXA-Messungen am proximalen Femurhals ergaben bei osteoporotischen Patientinnen ähnliche Knochendichtewerte (Grampp et al. 1997). Niedrige Knochendichten erhöhen dabei das Risiko einer Fraktur deutlich (Wahner 1989).

Insgesamt sind die hier vorgelegten Ergebnisse konsistent mit den theoretischen Erwartungen zur Entwicklung der Dichte der subchondralen Kompakta. Während die Dicke und das Volumen in etwa gleich bleiben, kommt bei es osteoarthritischen

Schädigungen zu einer Verringerung der Mineralisation und damit zu einer geringeren Dichte (Day et. al. 2001). Das hängt auch mit dem komplexen Zusammenspiel zwischen subchondralen trabekulären bzw. kortikalen Knochenstrukturen zusammen, wobei die Knochenmasse insgesamt erhalten bleibt (Goldring und Goldring 2007). Die Knochenarchitektur und morphologische Veränderungen im Zeitverlauf der OA sind neben der Dichte wichtige Parameter zur Prognose des Krankheitsverlaufs und verlangen eine Messung in drei Dimensionen, wie es mit einem μ CT möglich wird. Gelenkknorpel und subchondrale Kompakta stehen bei Strukturveränderungen dabei in engem Zusammenhang, wie Neogi et al. (2009) zeigen konnten. Subchondrale Knochendichteabnahme stand dabei mit Gelenkknorpelverlusten in der gleichen Region hochsignifikant in Verbindung. Studien am Tiermodell bei Schweinen mit induzierter Arthritis zeigten, dass die Knorpeldicke zwischen Experimental- und Kontrollgruppe in etwa gleich ausfiel, die trabekuläre Dichte jedoch bei arthritisch modifizierten Tieren etwas größer war (Layton et al. 1988). Auch hier wurden die Bestimmungen über μ CT vorgenommen.

Bei der Diagnose osteoporotischer Patienten hat sich bisher als großes Problem der relativ große Variationskoeffizient bei wiederholten Messungen ergeben (Börner und Schneider 1991). Das Problem aller planaren absorptiometrischen Knochenmineral-Messtechniken (DPA, DEXA, SPA) ist, dass Messergebnisse in g/cm^2 oder in Gramm Knochenmineral keine Aussage über das dazugehörige Knochenvolumen erlauben. Dies führt zu einer Fehleinschätzung des Mineralgehalts von bis zu 15 % bei unterschiedlicher Größe der Knochen (Wirbelkörper, Schenkelhals, Radius). In der Dichtebestimmung über μ CT, die ja das Volumen direkt in die Berechnung der Knochendichte miteinbezieht, sind derartige Spannbreiten dagegen nicht zu erwarten. Zwar wurden hier Messwiederholungen an verschiedenen Bereichen gesunder und defekter Kompakta durchgeführt, aber die Dichtewerte variieren bei der Messmethode unter μ CT und anschließender Kalibrierung der Grauwerte zwischen den einzelnen Messungen eher wenig. Noch homogener erscheinen die Dichtewerte defekter Proben. Die geringere Streuung der Messwerte der defekten Zone könnte für das Vorliegen einer homogeneren Knochenmatrix bei geringerer Dichte sprechen.

5.2 Diskussion der Mikroskopuntersuchungen

Die mikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen den morphologischen Schadmechanismus des osteoarthritischen Gelenks (Lories und Luyten 2011). Nach Lories und Luyten (2011) führen komplexe Schädigungsmechanismen im Gelenk-Knochenübergang zum vermehrten Austausch flüssiger Bestandteile. Im gesunden Gelenk stellt der calcinierte Gelenkknorpel für diesen Gelenkflüssigkeitsaustausch eine zuverlässige Barriere dar, die maligne Struktur dagegen wird durch Gangbildungen, Risse und Lochbildungen permeabel (Milz 1993, Milz und Pütz 1994). Die rissigen Strukturen, Löcher, aber vor allem das Verwischen der Grenzlinien konnten nachgewiesen werden. Das Verschieben der sogenannten Tidenlinie konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der mikroskopischen Untersuchungen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der Dicke einer Struktur mittels Lichtmikroskopie besteht in der Tatsache, dass das Objekt möglicherweise nicht absolut gerade eingebettet beziehungsweise in Folge dessen oder erst beim Dünnschnitt nicht im rechten Winkel zur zu messenden Struktur angeschnitten worden sein kann (Junqueira 1986). Aufgrund der Zweidimensionalität der Dünnschnitte kann dies - im Gegensatz zur dreidimensionalen Darstellung in der Rekonstruktion einer μ CT-Aufnahme - während der späteren Auswertung nicht mehr eindeutig festgestellt oder korrigiert werden.

5.3 Vergleichende Diskussion der Untersuchungsmethoden

Es konnte kein signifikanter Unterschied im statistischen Sinne zwischen defekten und gesunden Proben nachgewiesen werden. Dies galt für beide alternativen Dickenbestimmungen. Das könnte sicherlich auch an der geringen Zahl der Proben liegen, jedoch kamen beide Messmethoden zum gleichen Ergebnis. Der Vergleich der mikroskopisch gewonnenen sowie der mittels μ CT-Messung ermittelten Dicken der subchondralen Kompakta führte zu der Erkenntnis, dass die μ CT-Messung dabei die Dicken tendenziell überschätzte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass die vermessenen Stellen in μ CT und Lichtmikroskopie nicht kongruent ausgewählt werden konnten, da das Gewebe für die histologische Untersuchung ja bereits vor dem anfertigen der μ CT-Scans per Stanze aus dem jeweiligen Probenkörper

entnommen wurde und daher bei der Auswertung der μ CT-Daten diese Probenregion gar nicht mehr vorhanden war. Des Weiteren zeigt die statistische Auswertung eine relativ hohe Schwankungsbreite im Hinblick auf die gemessenen Dicken, hier müsste bei einer zukünftigen weiteren Untersuchung sicherlich die Anzahl der ausgemessenen Strecken erhöht werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen und darüber hinaus eine Möglichkeit gefunden werden identische Bereiche zu untersuchen. Dies war zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung nicht möglich, da die Proben aufgrund der langen Dauer der μ CT-Aufnahmen derart stark dehydrierten, dass eine anschließende vergleichende histologische Untersuchung und Darstellung, vor allem der weichgewebigen Anteile, unmöglich war. Ein möglicher Ausweg wäre hier gewesen die Stenzen - beziehungsweise einen kleineren Bereich der Probe - zunächst einzubetten und erst im Anschluss daran zu scannen. Dies ist grundsätzlich denkbar, da Paraffin einen dem von Weichgewebe ähnlichen Absorptionskoeffizienten zu haben scheint (Scott 2015), erschwert aber eine spätere Berechnung eines Absolutwertes für die Knochendichte deutlich, da eine Voraussetzung hierfür wäre, dass sich bei der Aufnahme des zur Kalibrierung genutzten Phantomkörpers eine exakt gleiche Menge an Paraffin im Strahlengang befindet um eine Beeinflussung des errechneten Wertes durch unterschiedliche Absorption der Röntgenstrahlung zu verhindern.

Theoretisch erscheint die Lichtmikroskopie bei der Streckenmessung als dem μ CT überlegen, da sie – andere Faktoren wie Eindeckung des Präparates und Güte des verwendeten Mikroskopes unberücksichtigt – zunächst nur durch die Beugung des Lichtes limitiert wird (Abbe 1873), was rein rechnerisch eine theoretische Auflösung von $0,3 \mu\text{m}$ möglich macht. Allein die bei der vorliegenden Arbeit durchgeführte digitale Fotografie zur Vermessung der Präparate am Computer reduziert das Auflösungsvermögen jedoch bereits auf etwa $0,55 \mu\text{m}$, da die maximale angewandte Auflösung der verwendeten Digitalkamera im Rohbildmodus (RAW) 1836 Bildpunkte auf 1 mm betrug – die hardwareseitige Anpassung durch unter anderem Binningprozesse innerhalb der Kamera unberücksichtigt gelassen. Dies ist jedoch immer noch weit mehr als die im μ CT-Scan erreichte Auflösung von $0,0145 \text{ mm}$, also $14,5 \mu\text{m}$.

6 Zusammenfassung

Die Bestimmung wichtiger Parameter wie der Knochendichte und Knochendicke bei der Diagnose einer Osteoarthrose des Kniegelenks mittels μ CT stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel war es unter anderem zu untersuchen, ob eine indirekte Messung der Knochendicke mit Messungen an entsprechenden histologischen Präparaten übereinstimmt und wie sich die absolute Knochendichte der subchondralen Kompakta im Krankheitsverlauf verändert. Verglichen wurden fünf defekte und gesunde Proben der subchondralen Kompakta resezierter Kniegelenke, welche im Rahmen von Prothesenversorgungen entfernt wurden. Zusätzlich wurden den Proben vor der μ CT-Untersuchung entnommene Stenzen histologisch untersucht und die Dicke des subchondralen Knochengewebes in den hergestellten Schnitten lichtmikroskopisch ermittelt.

Im Ergebnis stützen die mittels μ CT gewonnenen Dichtewerte die These des abnehmenden Mineralisierungsgrades geschädigter Bereiche der subchondralen Kompakta und stehen in Einklang mit bisherigen Befunden zur Dichtemessung mit anderen Verfahren wie z.B. der DXA oder der qCT. Die Dichtemessung mittels μ CT unter Einbeziehung eines Referenzkörpers ergab einen Mittelwert von $1,9 \text{ g/cm}^3$ für die gesunden und $1,4 \text{ g/cm}^3$ für die Proben aus defekten Bereichen. Im Vergleich zur mikroskopischen Bestimmung überschätzt das μ CT-Verfahren die Dicke der Gewebeproben jedoch etwas. Die Mittelwerte der μ CT-Messungen betragen für die Dicke $0,39 \text{ mm}$ bei gesunden und $0,45 \text{ mm}$ bei den defekten Probenbereichen, während die Auswertung der Lichtmikroskopie lediglich Mittelwerte von $0,17 \text{ mm}$ für gesunde und $0,12 \text{ mm}$ für die defekten Probenbereiche ergab.

Sicher ist das hier gewählte Verfahren, die indirekte Messung der Knochendichte über genau definierte Referenzkörper, aufgrund des Aufwands, der Dauer und auch der höheren Streuung klinisch nicht anwendbar, zeigt aber die Validität der über μ CT-Messungen erhaltenen Dichtewerte bei der subchondralen Kompakta.

7 Literaturverzeichnis

- Abbe E** (1873): Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Archiv für mikroskopische Anatomie. 9(1), 413–468
- Ambrose J, Hounsfield G** (1973): Computerized transverse axial tomography. Br J Radiol. 46(542), 148-149
- Bedson J, Croft PR** (2008): The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: A systematic search and summary of the literature. BMC Musculoskelet Disord. 9,116
- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B** (2005): Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 64(9), 1263-1267
- Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD** (2002): Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study. Arthritis Rheum. 46(12), 3178-3184
- Bingham CO 3rd, Buckland-Wright JC, Garnero P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, Clauw DJ, Spector TD, Pelletier JP, Raynauld JP** (2006): Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. Arthritis Rheum. 54(11), 3494-507
- Börner W, Schneider P** (1991): „DPA“ - Nicht mehr aktuell. Dtsch Arztebl. 88(13), 1088-1089
- Borochowitz ZU, Scheffer D, Adir V, Dagoneau N, Munnich A, Cormier-Daire V** (2004): Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin 3 type: homozygote matrilin 3 mutation in a novel form of SEMD. J Med Genet. 41(5), 366-372

- Boskey AL**, Wright TM, Blank RD (1999): Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res.* 14(3), 330-5
- Brenner DJ**, Hall EJ (2007): Computed tomography- an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med.* 357(22), 2277-84
- Brooks RA** (1977): A Quantitative theory of the Hounsfield unit and its application to dual energy scanning. *J Comput. Assist Tomogr* 1(4), 487–493
- Buckland-Wright JC**, Messent EA, Bingham CO 3rd, Ward RJ, Tonkin C (2007): A 2 yr longitudinal radiographic study examining the effect of a bisphosphonate (risedronate) upon subchondral bone loss in osteoarthritic knee patients. *Rheumatology (Oxford).* 46(2), 257-64
- Burstein D**, Gray ML (2006): Is MRI fulfilling its promise for molecular imaging of cartilage in arthritis? *Osteoarthritis Cartilage.* 14(11), 1087-1090
- Burstein P**, Bjorkholm PJ, Chase RC, Seguin FH (1984): The largest and smallest X-Ray computed tomography systems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research.* 221(1), 207-212
- Cawston TE**, Wilson AJ (2006): Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 20(5), 983-1002
- Coggon D**, Reading I, Croft P, McLaren M, Barrett D, Cooper C (2001): Knee osteoarthritis and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25(5), 622-627
- Day JS**, Ding M, van der Linden JC, Hvid I, Sumner DR, Weinans H (2001): A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with prearthritic cartilage damage. *J Orthop Res.* 19(5), 914–918
- Ding C**, Cicuttini F, Jones G (2007): Tibial subchondral bone size and knee cartilage defects: relevance to knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 15(5), 479-486

- Ekenstedt KJ**, Sonntag WE, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS (2006): Effects of chronic growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on osteoarthritis severity in rat knee joints. *Arthritis Rheum.* 54(12), 3850-8
- Elliott JC**, Dover SD (1982): X-ray microtomography. *J Microsc.* 126(2), 211-213
- Emmert A** (2002). Die Knochendichte am proximalen Femur bei gesunden Deutschen. Einfluß von Alter, Größe, Gewicht und Menopause sowie indirekter Muskelkraft. Med. Diss. Würzburg 2002
- Engelke K**, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe.* 39(3), 203-12
- Eyre DR** (2004): Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat Res.* 427, 118-122
- Feldkamp LA**, Davis LC, Kress JW (1984): Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America A.* 1(6), 612-619
- Felson DT** (2006): Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 354(8), 841-848
- Fink W**, Haidinger G (2007): Die Häufigkeit von Gesundheitsstörungen in 10 Jahren Allgemeinpraxis. *Z Allg Med.* 83(3),102–108
- Gibson LJ**, Ashby MF: Cellular Solids- second edition. 2. Auflage; Cambridge University Press, Cambridge 1997
- Gielen I**, van Bree H: Computertomographie. In: Kramer M (Hrsg.): Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie: Für Studium und Praxis (vet.kolleg). 1. Auflage, Schlütersche, Hannover 2003, 110-113
- Goldring MB**, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 213(3), 626-34
- Goldring MB**, Goldring SR (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1192, 230–237

- Goldring SR**, Goldring MB (2004): The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 427, 27-36
- Grampp S**, Genant HK, Mathur A, Lang P, Jergas M, Takada M, Glüer CC, Lu Y, Chavez M (1997). Comparisons of noninvasive bone mineral measurements in assessing age-related loss, fracture discrimination, and diagnostic classification. *J Bone Miner Res.* 12(5), 697-711
- Guccione AA**, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PW, Kelly-Hayes M, Wolf PA, Kreger BE, Kannel WB (1994): The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health.* 84(3), 351-358
- Hannan MT**, Felson DT, Pincus T (2000): Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 27(6), 1513-1517
- Hayes WC** (1991): Biomechanics of cortical and trabecular bone: Implications for assessment of fracture risk. In: Mow VC, Hayes WC (Hrsg.) *Basic Orthopaedic Biomechanics*. 1. Auflage; Raven Press, New York 1991, 93-142
- Hill CL**, Gale DG, Chaisson CE, Skinner K, Kazis L, Gale ME, Felson DT (2001): Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. *J Rheumatol.* 28(6), 1330-7
- Hunter DJ** (2007): In the clinic. Osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 147(3), ITC8-1-ITC8-16
- Junqueira LC**, Carneiro J, Schiebler TH, Peiper U, Schneider FR: *Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 2. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 1986, 21
- Kalender WA**: *Computertomographie: Grundlagen, Gerätetechnologie, Bildqualität, Anwendungen*. 2. Auflage; Publicis Verlag, Erlangen 2006

- Kallai I**, van Lenthe GH, Ruffoni D, Zilbermann Y, Müller R, Pelled G, Gazit D (2010): Quantitative, structural, and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells. *J Biomech.* 43(12), 2315–2320
- Kellgren JH**, Lawrence JS (1957): Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 16(4), 494-502
- Krasnokutsky S**, Samuels J, Abramson SB (2007): Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 65(3), 222-228
- Krimphove M**: Zum Zusammenhang zwischen mechanischer Belastbarkeit und Knochendichte von Lendenwirbelkörpern - eine in vitro Untersuchung, Med. Diss. Bochum 2001
- Kuszyk BS**, Heath DG, Bliss DF, Fishman EK (1996): Skeletal 3-D CT: advantages of volume rendering over surface rendering. *Skeletal Radiol.* 25(3), 207-214
- Layton MW**, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA., Kubinski DJ, Bole GG (1988): Examination Of Subchondral Bone Architecture In Experimental Osteoarthritis By Microscopic Computed Axial Tomography. *Arthritis Rheum.* 31(11), 1400-1405
- Lo GH**, LaValley M, McAlindon T, Felson DT (2003): Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *JAMA* 290(23), 3115-3121
- Loeser RF** (2006): Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum.* 54(5), 1357-1360
- Lories RJ**, Luyten FP (2011): The bone–cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 7(1), 43–49
- Messier SP**, Loeser RF, Miller GD, Morgan TM, Rejeski WJ, Sevick MA, Ettinger WH Jr, Pahor M, Williamson JD (2004): Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum.* 50(5), 1501-1510

- Milz S:** Funktionelle Morphologie von subchondraler Mineralisierungszone und subartikulärer Spongiosa des Tibiaplateaus. In: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B (Hrsg.): Osteologie aktuell VII. 1.Auflage; Springer, Berlin 1993, 537-540
- Milz S, Pütz R:** Lückenbildungen der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus (Perforations of the Subchondral Plate of the Tibial Plateau) In: Osteologie; Organ der Deutschen Gesellschaft für Osteologie und der Arbeitsgemeinschaft Knochentumoren, Band 3(2), Verlag Hans Huber, Bern 1994, 110-118
- Mollenhauer J, Aurich ME, Zhong Z, Muehleman C, Cole AA, Hasnah M, Oltulu O, Kuettner KE, Margulis A, Chapman LD (2002):** Diffraction-enhanced X-ray imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 10(3), 163-71
- Neogi T, Felson D, Niu J, Lynch J, Nevitt M, Guermazi A, Roemer F, Lewis Ce, Wallace B And Zhang Y (2009):** Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: a within-knee subregion-matched approach from the Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 61(11), 1539–1544
- Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM (1995):** Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*. 38(8), 1134-1141
- O.V.:** GE Healthcare eXplore Locus User Guide, Direction 2394683 Revision 4, o. Verl., London (Canada) 2007, 22 u. 31
- Peat G, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. (2006):** Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann Rheum Dis*. 65(10), 1363-1367
- Pendleton A, Arden N, Dougados M, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Cluzeau F, Cooper C, Dieppe PA, Günther KP (2000):** EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 59(12), 936-944

- Radspieler H:** Jenseits der Knochendichte..., Informationsbroschüre des Osteoporosezentrums München, o. Verl., München 2006, 3-21
- Roos EM** (2005): Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr Opin Rheumatol.* 17(2), 195-200
- Rüegsegger P, Koller B, Müller R** (1996): A microtomographic system for the non-destructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 58(1), 24-9
- Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Yeates Pocock NA, Eberl S** (1987): Determinants of axial bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30(7), 721-8
- Schmolke B** (2001): Labordiagnostik der Osteoporose. *Der Orthopäde* 30(7), 425-436
- Scott AE, Vasilescu DM, Seal KAD, Keyes SD, Mavrogordato MN** (2015): Three Dimensional Imaging of Paraffin Embedded Human Lung Tissue Samples by Micro-Computed Tomography. *PLOS ONE* 10(6), e0126230
- Sharma L, Song J, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD** (2001): The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA.* 286(2), 188-195
- Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D** (1996): Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 312(7036), 940-943
- Spector TD, Conaghan PG, Buckland-Wright JC, Garnero P, Cline GA, Beary JF, Valent DJ, Meyer JM** (2005): Effect of risedronate on joint structure and symptoms of knee osteoarthritis: results of the BRISK randomized, controlled trial [ISRCTN01928173]. *Arthritis Res Ther.* 7(3), 625-33
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE** (2001): Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44(3), 585-94

- Thomas CM**, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M (2007): Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage*. 15(1), 27-34
- Valdes AM**, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, Spector TD (2006): Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum*. 54(2), 533-539
- van't Hof RJ**, Ralston SH (2001): Nitric oxide and bone. *Immunology*. 103(3), 255-261
- Vetter C** (1998): Standard und Optionen für die Therapie der Arthrose. *Dtsch Arztebl*. 95(46), 2896-2900
- Wahner HW** (1989): Measurements of bone mass and bone density, *Endocrinol Metab Clin North Am*. 18(4), 995-1012
- Walsh DA** Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF (2007): Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 15(7), 743-51
- Werner A**, Fuß M, Krauspe R (2003): Operative gelenkerhaltende Verfahren bei Gelenkknorpelschäden: Knorpel induzierende Techniken und Knorpeltransplantation, *Dtsch Arztebl*. 100(9), 546-554
- Windler M**, Klabunde R.: Titanium for hip and knee prostheses. In: Brunette P, Textor M, Thomson P (Hrsg.): *Titanium in Medicine*. 1. Auflage; Springer, Berlin 2001, 703-746
- Wolff J**: *The Law of Bone Remodelling*. Springer, Berlin 1986

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Nicolai Miosge, Abteilung für Zahnärztliche Prothetik, für seine Geduld, seine Anregungen und die Begleitung der Arbeit.

Ebenfalls aus der Abteilung Prothetik möchte ich Dr. Boris Schminke für seine Begleitung der μ CT-Untersuchungen danken.

Für die Unterstützung bei der Durchführung, Planung und der dreidimensionalen Darstellung der μ CT-Untersuchungen gilt darüber hinaus mein herzlicher Dank Herrn Christian Dullin vom Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Weiterhin danke ich sehr herzlich Dr. Tolga Kizildere und Dr. Christoph Boese für unsere Diskussionen und den regen Austausch während des Verfassens der Arbeit.