

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

## Biomechanische Charakterisierung muriner Knochenphänotypen

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Robert Percy Marshall  
aus Berlin

Hamburg 2010

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.11.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. M. Amling**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. rer. nat. T. Schinke**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. K. Püschel**

"Patience is waiting. Not passively waiting. That is laziness.  
But to keep going when the going is hard and slow - that is patience."

*Author Unknown*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>DAS ORGAN KNOCHEN</b>	1
1.1.1	KNOCHENZELLEN	2
1.1.2	KNOCHENGEWEBE	3
1.1.3	OSTEOGENESE UND MINERALISATION	5
1.1.4	STRUKTURANALYSE	6
1.2	<b>KNOCHENTYPEN DES SKELETTSYSTEMS</b>	7
1.2.1	MAKROSKOPISCHER AUFBAU DES KNOCHENS	8
1.3	<b>BIOMECHANIK DES KNOCHENS</b>	9
1.3.1	FRAKTUREN	12
1.3.2	FRAKTUR ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN	14
1.4	<b>TIERE IN DER KNOCHENFORSCHUNG</b>	15
1.5	<b>GRUNDLAGEN DER BIOMECHANIK</b>	16
1.5.1	PARAMETER DER BIOMECHANIK	17
1.5.2	MECHANISCHE KNOCHENPRÜFUNG	19
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>26</b>
3.1	<b>MAUS-MODELLE</b>	26
3.1.1	C57BL/6	26
3.1.2	KRM2 <sup>TG</sup>	28
3.1.3	ISG15 <sup>-/-</sup>	29
3.1.4	SRC <sup>-/-</sup>	29
3.2	<b>PRÄPARATION UND KONSERVIERUNG</b>	30
3.3	<b>MIKROCOMPUTERTOMOGRAPHIE</b>	31
3.3.1	MINERALISATIONANALYSE	32
3.4	<b>EXPERIMENTELLE BIOMECHANIK</b>	33
3.4.1	ENERGIEAUFNAHME	34
3.4.2	3-PUNKT-BIEGEPRÜFUNG	35
3.4.3	KOMPRESSIONS-PRÜFUNG	36
3.5	<b>STATISTIK</b>	40
3.6	<b>FINITE-ELEMENTE-SOFTWARE</b>	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
4.1	<b>EXPERIMENTELLE BIOMECHANIK</b>	41
4.1.1	PRÜFKURVEN	41



4.1.2	ENERGIEAUFNAHME .....	42
4.2	<b>MAUSMODELLE</b> .....	42
4.2.1	KNOCHENMORPHOLOGIE .....	42
4.2.2	MINERALISATION.....	45
4.3	<b>BIOMECHANISCHE PRÜFUNG</b> .....	46
4.3.1	MAXIMALKRAFT.....	46
4.3.2	STEIFIGKEIT.....	48
4.3.3	ENERGIEABSORPTION .....	50
4.4	<b>VERGLEICH DER VARIANZEN</b> .....	52
5	<b>DISKUSSION</b> .....	53
5.1	<b>AUSWAHL DER ZU ANALYSIERENDEN PARAMETER</b> .....	54
5.1.1	HISTOMORPHOMETRIE.....	54
5.1.2	MINERALISATION.....	55
5.1.3	AUSWAHL DER MECHANISCHEN PARAMETER .....	55
5.1.3.1	ENERGIEABSORPTION .....	56
5.2	<b>AUSWAHL DER MECHANISCHEN MATERIALPRÜFUNG</b> .....	56
5.2.1	REPRODUZIERBARKEIT MECHANISCHER PRÜFMETHODEN.....	57
5.2.2	GRÖßENUNABHÄNGIGE PRÜFMETHODEN .....	57
5.2.3	RELEVANZ BIOMECHANISCHER PRÜFMETHODEN.....	57
5.3	<b>KONSERVIERUNG UND MECHANIK DES KNOCHENS</b> .....	59
5.4	<b>VERGLEICH DER BEIDEN PRÜFMETHODEN</b> .....	60
5.4.1	WILDSTYPKONTROLLEN.....	60
5.4.2	OSTEOPOROTISCHE MAUSMODELLE.....	61
5.4.3	OSTEOPETROTISCHES MAUSMODELL .....	62
5.5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	66
5.6	<b>FAZIT UND AUSBLICK</b> .....	67
6	<b>ANHANG: TABELLARISCHE ERGEBNISSE</b> .....	68
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	69
8	<b>DANKSAGUNG</b> .....	83
9	<b>LEBENS LAUF</b> .....	84
10	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	85

# Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1	ZELLEN DES KNOCHENS .....	2
ABB. 1-2	KNOCHENGEWEBE .....	4
ABB. 1-3	SCHEMATISCHE UNTERTEILUNG EINES RÖHRENKNOCHENS.....	9
ABB. 1-4	SCHEMATISCHE UNTERTEILUNG EINES WIRBELKÖRPERS .....	10
ABB. 1-5	CULMANN – VON MEYER – ZEICHNUNGEN (1866).....	12
ABB. 1-6	FRAKTURFORMEN .....	13
ABB. 1-7	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES KRAFT-WEG-DIAGRAMMS .....	18
ABB. 1-8	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG BIOMECHANISCHER PRÜFVERFAHREN.....	24
ABB. 3-1	SCANCO $\mu$ CT40 .....	31
ABB. 3-2	MINERALISATIONSPHANTOM FÜR DAS $\mu$ CT.....	33
ABB. 3-3	VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER ENERGIEAUSWERTUNG.....	34
ABB. 3-4	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FEMURPROBENHALTERS.....	35
ABB. 3-5	SCHEMATISCHE FEMURPRÜFUNG IN DER 3 PUNKT-BELASTUNG.....	36
ABB. 3-6	SCHEMA EINER WIRBELKÖRPERKOMPRESSIONSPRÜFUNG.....	37
ABB. 3-7	MIKRO-POSITIONIERUNGSTRUMENT FÜR MÄUSE-VERTEBRAE .....	37
ABB. 3-8	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES WIRBELKÖRPERPROBENHALTERS.....	39
ABB. 4-1	KRAFT-WEG-DIAGRAMM DER PRÜFVERFAHREN .....	41
ABB. 4-2	$\mu$ CT SCANS DER VERSCHIEDENEN MAUSMODELLE .....	43
ABB. 4-3	ERGEBNISSE: MORPHOMETRIE BEI OSTEOPOROSE.....	44
ABB. 4-4	ERGEBNISSE: MORPHOMETRIE BEI OSTEOPETROSE .....	44
ABB. 4-5	ERGEBNISSE: KNOCHENMINERALSALZDICHTHE DER MAUSMODELLE .....	45
ABB. 4-6	ERGEBNISSE: MAXIMALKRAFT BEI OSTEOPOROSE .....	47
ABB. 4-7	ERGEBNISSE: MAXIMALKRAFT BEI OSTEOPETROSE.....	47
ABB. 4-8	ERGEBNISSE: STEIFIGKEIT BEI OSTEOPOROSE.....	49
ABB. 4-9	ERGEBNISSE: STEIFIGKEIT BEI OSTEOPETROSE .....	49
ABB. 4-10	ERGEBNISSE: ENERGIEABSORPTION BEI OSTEOPOROSE.....	51
ABB. 4-11	ERGEBNISSE: ENERGIEABSORPTION BEI OSTEOPETROSE .....	51
ABB. 4-12	VARIATIONSKOEFFIZIENTEN DER PRÜFVERFAHREN.....	52
ABB. 5-1	VERÄNDERUNG DES HUMANEN SKELETTES IM ALTER.....	62
ABB. 5-2	RADIOLOGISCHE UND $\mu$ CT ANALYSE OSTEOPETROTISCHER FEMORA .....	63
ABB. 5-3	FINITE ELEMENTE ANALYSE DER SRC <sup>-/-</sup> FEMORA .....	64

# Begriffsdefinitionen

---

**Arbeit:** Arbeit [J] ist die Energie, die durch eine Kraft längs eines Weges auf einen Prüfkörper übertragen wird.

**Biegeprüfung:** In dieser Arbeit wird eine 3-Punkt-Biegeprüfung angewendet. Hierzu liegt der Prüfkörper auf zwei Auflagerpunkten auf. Beim Drei-Punkt-Biegeversuch kommt es zu einer einzelnen Druckbelastung im zentralen Bereich des zu prüfenden Körpers.

**BV/TV:** Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtgewebe.

**Energieabsorption:** Energie [N x mm], die ein Prüfkörper aufnehmen kann, bevor es zum Materialversagen kommt. Wird durch die Fläche unterhalb des Kraft-Weg-Diagramms dargestellt.

**Härte:** Mechanischer Widerstand [ $\text{J/m}^3$ ], den ein Werkstoff der mechanischen Eindringung eines härteren Prüfkörpers entgegensetzt. Wird durch die Fläche unterhalb des Spannungs-Dehnungs-Diagramms dargestellt.

**Knochenmineralisationsdichte (BMD):** Mineralisationskonzentration des Knochens [ $\text{g/cm}^3$ ].

**Kompressionsprüfung:** Materialprüfmethode, die den Prüfkörper axial belastet.

**Kraft:** Produkt aus Masse und Beschleunigung [N]. Ursache von Orts- oder Formveränderung von Körpern.

**Kraft-Weg-Diagramm:** Jede Belastung eines Körpers führt zu dessen Verformung. Kurve aus aufgewendeter Kraft und zurückgelegter Strecke ist das Kraft-Weg-Diagramm. Spiegelt Verhältnis von Kraft zu Verformung bis zum Bruch wieder.

**Maximalkraft:**  $F_{\max}$  [N], maximale Kraft, die auf den Körper gewirkt hat. Sie muss nicht gleichbedeutend mit der Bruchkraft sein. Mit diesem Parameter lassen sich Aussagen über den Knochen als Verbundstoff treffen.

**Osteoblasten:** Die einzigen Zellen, die Knochen aufbauen. Einkernige annähernd kubisch geformte Zellen. In Bereichen neuer Knochenproduktion bildet sich ein Saum dieser Zellen, wo sie dann Osteoid bilden.

**Osteoid:** „Primärer Knochen“, mineralisiert kontinuierlich und härtet dadurch zu Knochen aus.

# Begriffsdefinitionen

---

**Osteoklasten:** Vielzellige Riesenzellen (Durchmesser bis zu  $100\mu\text{m}$ ), entstanden durch Fusion von Vorläuferzellen der Monozytenlinie. Mit Hilfe einer Versiegelungszone („ruffled border“) und durch Protonenpumpen erzeugtes saures Milieu für Knochenabbau und Kalziumfreisetzung verantwortlich.

**Osteopetrose:** Durch Aktivitätsminderung von Osteoklasten bzw. Unfähigkeit zur Knochenresorption entstandene Verknöcherung.

**Osteoporose:** Skeletterkrankung mit unzureichender Knochenfestigkeit und erhöhtem Frakturrisiko meist aufgrund einer Ausdünnung und Abnahme der trabekulären Strukturen und der Knochenmineralisation.

**Osteozyten:** Eingemauerte Osteoblasten, Großteil der ossären Zellen, genaue Funktion unklar, evtl. eine Form von Mechanosensorik für Knochenadaptation.

**Remodeling:** Gleichgewicht aus Ab- und Anbau der Knochensubstanz, fein abgestimmte interzelluläre Kommunikation innerhalb des Knochensystems. Eine Störung des Remodelings kann zu einer erhöhten Frakturgefährdung führen.

**Spannungs-Dehnungs-Diagramm:** Geometrieunabhängige Darstellung von Kräften innerhalb eines Körpers (Spannung, [Pa]) und der dimensionslosen Dehnung [1/L], ermittelt aus Zugversuch oder nach Abzug der Geometrie-Komponente aus dem Kraft-Weg-Diagramm.

**Steifigkeit:** Die Steigung des linearen Abschnitts der elastischen Verformung nennt man *Steifigkeit* [N/mm].

# Kapitel 1

## Einleitung

Diese Arbeit vergleicht zwei Methoden zur Charakterisierung muriner Knochen-Phänotypen.

Der erste Abschnitt dient der Beschreibung des Knochens auf mikroskopischer Ebene. Darauf folgend wird der makroskopische Knochenaufbau und die verschiedenen Knochentypen erklärt. Anschließend wird auf die Funktion des Knochens mit speziellem Augenmerk auf Frakturgeschehen und Biomechanik eingegangen. Es folgt eine kurze Einführung über die Verwendung von Tiermodellen in der Knochenforschung. Der letzte Abschnitt dient der Beschreibung der Grundlagen der Biomechanik sowie den darauf resultierenden Prüfmethode von Knochen.

### 1.1 Das Organ Knochen

---

Das Knochen-System wird, zusammen mit den Gelenken und Bändern, dem passiven Bewegungsapparat zugeteilt.

Das menschliche Skelettsystem erfüllt entscheidende Funktionen im Organismus. Es stellt ein hoch differenziertes Stützgewebe dar, ist aber auch Schutz für lebenswichtige Organe wie zum Beispiel dem Gehirn. Gleichzeitig ermöglicht es dem Menschen Bewegung und Stabilität in vielen unterschiedlichen Körperhaltungen. Zudem dient es der Übertragung von Kräften auf benachbarte Körperpartien, was die Vielfalt unserer Bewegungen erklärt und uns das aufrechte Gehen ermöglicht (Drenckhahn und Kugler 2008).

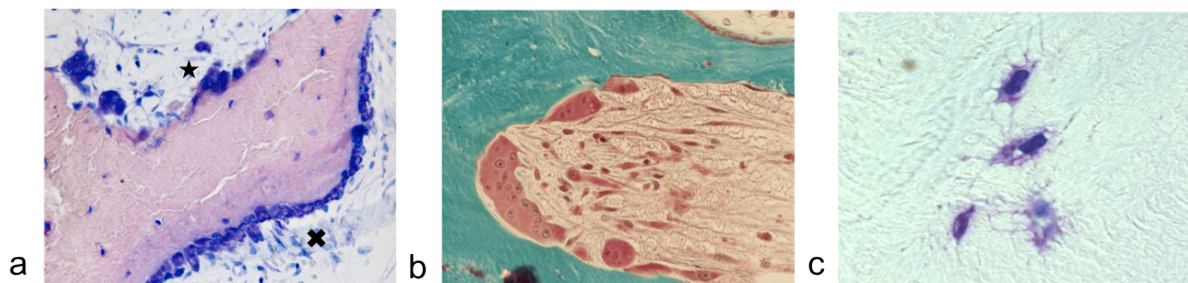
Mit 99% des gesamten Calciumspeichers dienen die Knochen zudem als wichtiges Reservoir für den Calciumhomöostase des Menschen (Cashman 2002). Darüber hinaus ist das rote Knochenmark Ort der Blutbildung.

## 1.1.1 Knochenzellen

Neuer Knochen wird durch Zellen gebildet und kontinuierlich verändert. Es gibt drei spezifische Knochenzellen, die Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten:

Die Osteoblasten sind die einzigen Zellen, die Knochen aufbauen. Sie sind einkernige annähernd kubisch geformte Zellen. In Bereichen neuer Knochenproduktion bildet sich ein Saum dieser Zellen, wo sie dann Osteoid bilden (Abb. 1-1) (Harada und Rodan 2003). Dieses Osteoid mineralisiert kontinuierlich und härtet dadurch zu Knochen aus. Im Laufe des Knochenwachstums und der Mineralisierung des Osteoids kommt es zu einer Einmauerung der Osteoblasten, die daraufhin zu Osteozyten umgewandelt bzw. inaktiviert werden (Abb. 1-1). Sie stellen den Großteil der ossären Zellen dar. Ihre genaue Funktion ist allerdings noch immer im Fokus der Forschung. Es wird diskutiert, dass sie eine Form von Mechanosensorik für den Knochen darstellen (Henriksen et al. 2009).

Auch eine Reaktivierung nach Freilegung durch Osteoklasten erscheint möglich (Majeska 2001). Osteoklasten entstehen durch die Fusion von Vorläuferzellen der Monozytenlinie. Sie sind vielzellige Riesenzellen (Durchmesser bis zu 100µm), die für Knochenabbau und Kalziumfreisetzung verantwortlich sind. Sie können sich mit Hilfe einer Versiegelungszone („ruffled border“) an die Knochenoberfläche anheften und erzeugen mit Protonenpumpen ein saures Milieu, wodurch dort der Knochen abgebaut wird. Es entstehen die sogenannte HOWSHIPschen Lakunen (Abb. 1-1) (Teitelbaum und Ross 2003). Stand aktueller Erkenntnis ist eine Kommunikation dieser drei verschiedenen Zell-Arten untereinander. Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch noch nicht voll erforscht bzw. verstanden (Henriksen et al. 2009).



**Abb. 1-1:** Zellen des Knochens. Das linke Bild (a: Giemsa-Färbung, 100fache Vergrößerung) zeigt alle drei oben beschriebenen Knochenzellen in ihrem Zusammenspiel. Die mehrkernigen Osteoklasten bauen die Knochenstruktur ab (Sternmarkierung, siehe auch (b: Goldner-Färbung, 200fache Vergrößerung)). Gleichzeitig bauen die als dichter Saum die Gegenseite des Trabekels besiedelnden Osteoblasten (Kreuzmarkierung) die Knochenmatrix wieder auf. Das rechte Bild (c: Toluidinblau, 400fache Vergrößerung) zeigt Osteozyten und ihre Ausläufer, die im linken Bild in der Knochensubstanz zu erahnen sind. (Mit freundlicher Genehmigung von Dipl. Ing. Dr. Michael Hahn.)

## 1.1.2 Knochengewebe

Knochengewebe kann in zwei Arten differenziert werden: Lamellen- und Geflechtknochen.

Dabei stellt Lamellenknochen vornehmlich die adulte Knochensubstanz dar, welcher als schwammartiges Gerüst dünner, balkenförmiger Strukturen (spongiöser Knochen, *Substantia spongiosa*, Abb. 1-2) oder solides Knochengewebe (kompakter Knochen, *Substantia compacta*, Abb. 1-2) im Organismus vorkommt. Die *Substantia compacta* bildet vor allem die Außenschicht des Knochens (*Substantia corticalis*), während spongiöser Knochen einen Großteil des Knocheninneren ausfüllt. Aufgrund seiner hohen Dichte stellt kompakter Knochen mehr als zwei Drittel des gesamten Knochenmaterials (Drenckhahn und Kugler 2008).

Die *Substantia compacta* besteht zu etwa 95% aus Osteonen. Bei einem Osteon handelt es sich um etwa 30 konzentrisch geformte Lamellen, die einen konzentrischen nicht verknöcherten Kanal, den sogenannten HAVERS'schen Kanal (*Canalis centralis*), umschließen. Sie verlaufen longitudinal und folgen den Verzweigungsmustern der sie durchlaufenden Gefäße (Jee 2001). Senkrecht dazu (quer- bzw. transversal-orientiert) verlaufende Kanäle nennt man VOLKMANN'sche Kanäle, denen allerdings die konzentrische Ummantelung fehlt. Innerhalb des Lamellensystems sind Lakunen vorhanden, die die dort eingeschlossenen Osteozyten beherbergen. Diese sogenannten Osteozyten-Lakunen wiederum sind miteinander durch winzige *Canaliculi ossei* verbunden, über die diese spezielle Knochenzelle ähnlich einer Nervenzelle mit ihren Zellfortsätzen in Verbindung steht. Gleichwohl enthält kompakter Knochen zusätzlich sogenannte interstitielle Osteone, die Zwischenräume füllen, periostal oder endostal gelegene Zirkumferenzlamellen sowie Trabekellamellen (Junqueira und Carneiro 2004).

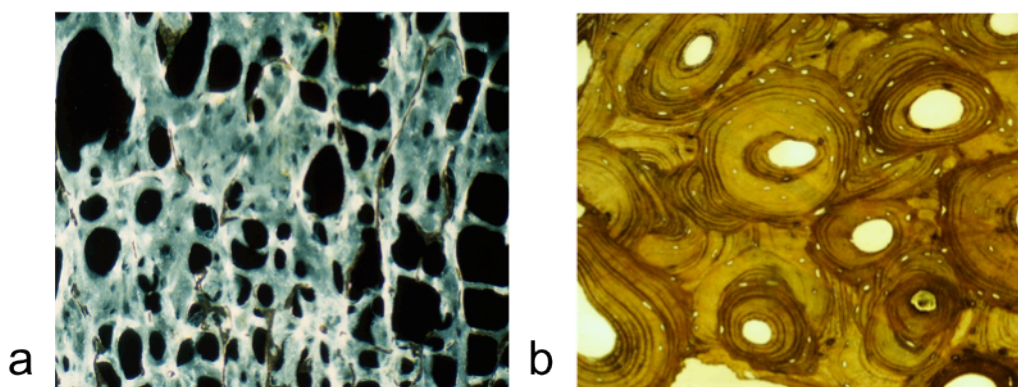
Geflechtknochen bildet eine Zwischenstufe der Knochenentstehung bei Knochenneubildung oder -heilung. Es stellt eine Form des unreifen im Wachstum befindlichen Knochens dar. Dabei bilden sowohl die Kollagenfibrillen als auch die Osteone ein geflechtartiges Muster, ohne eine erkennbare organisierte Struktur aufzuweisen (Currey 2006).

Durch die Leichtbauweise der Knochen hat der Organismus eine Optimierung und Reduzierung des Gewichtes erreicht. Das heißt, es wurde eine optimale Funktionalität des Knochens mit so wenig wie möglich, aber so viel wie notwendig

Masse erreicht. Das Gesamtgewicht des reinen Knochengewebes eines 70kg schweren Erwachsenen beträgt ca. 4kg und nimmt dabei ein Volumen von etwa 1720cm<sup>3</sup> ein. Damit verursacht das menschliche Skelettsystem nur 11,6% des Gesamtgewichtes des menschlichen Körpers (Ziegelroth 1896).

Knochengewebe ist einem ständigen An- und Abbau unterworfen. Dieser Knochenumbauprozess wird Remodeling genannt. Pro Jahr werden etwa 10% des menschlichen Skelettes resorbiert und wieder neu synthetisiert. Von entscheidender Bedeutung ist die Erkenntnis, dass Resorption und Umbau nur an der Knochenoberfläche durch Osteoblasten und Osteoklasten stattfinden kann (Jee 2001). Daher spielt die Substantia spongiosa aufgrund ihrer größeren Oberfläche (ca. 11m<sup>2</sup>) eine weitaus wichtigere Rolle bei Knochenresorptionsvorgängen (vor allem zur Kalzium-Homöostase) als die vergleichsweise kleinere Oberfläche der Substantia compacta (1m<sup>2</sup>) (Abrams 2001).

Eine weitere Möglichkeit des Funktionellen-Remodelings im Knocheninneren ist das Eindringen der Osteoklasten in den Knochen, einem Bohrkopf gleich. Diesem „Bohr-Verlauf“ folgend wachsen Blutgefäße in den Knochen ein. So entsteht ein Gefäßführender Kanal in den Geflechtknochen, der bereits den Durchmesser des späteren Osteons besitzt (Kragstrup 1985). Auf diesem Wege gelangen später die Osteoblasten in das Knochengewebe.



**Abb. 1-2:** Knochengewebe. Das linke Bild [a] zeigt die typische verzweigte Struktur der Spongiosa unter dem Mikroskop (Oberflächen gefärbtes Blockpräparat mit anschließender Versilberung, 10fache Vergrößerung). Das rechte Bild [b] stellt ein Schliffpräparat der Substantia compacta dar (Schliffpräparat mit von-Kossa-modifizierter Versilberungstechnik (Krutsay 1985), 50fache Vergrößerung). (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Michael Amling).



## 1.1.3 Osteogenese und Mineralisation

Die meisten Knochen entstehen durch *chondrale bzw. indirekte Knochenbildung*. Die Knochenbildung erfolgt hierbei über eine knorpelige Vorstufe. Aus mesenchymalen Stammzellen entsteht in der Embryonalphase ein präformiertes Primordialskelett, das langsam von einer Knochenmanschette ummantelt und mineralisiert wird. Nach Umbauprozessen von Osteoklasten und Einwachsen von Gefäßen in der Diaphyse bildet sich dort der primäre Knochenkern. Es entstehen proximale und distale Wachstumszonen (Epiphysenfugen), sowie ein sekundärer Knochenkern in der Metaphyse. Die Epiphysenfugen treiben das Längenwachstum der Knochen voran. Man nennt dieses Wachstum interstitielles Längenwachstum (Jee 2001). In einem Alter von 18-23 ist der Knochenwachstum in der Regel abgeschlossen und die Wachstumszonen schließen sich (Hall 2005).

Im Gegensatz dazu kommt es bei der *desmalen Osteogenese* zu einer direkten Umwandlung von osteogenen Mesenchymzellen zu aktivierten Osteoblasten, die in alle Richtungen Osteoid produzieren und später von der Knochensubstanz umschlossen werden. Es kommt somit zu keiner chondralen Vorstufe des Knochens. Auf diese Art wird zum Beispiel Geflechtknochen gebildet, der nach Remodelling zu Lamellenknochen umgebaut wird oder über Kompaktierung verwächst (Marks und Odgren 2001).

Während des Knochenwachstums und Knochenheilungsprozesses unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Mineralisation. Fünf bis zehn Tage nach neuen Umbauvorgängen und neu entstandener Knochenmatrix erfolgt die sogenannte primäre Mineralisation. Nach Bildung des vorläufigen Knochengewebes schließt sich die sekundäre Mineralisation an, während der sich langsam sowohl die Kristallanzahl und -größe als auch die Mineralisationskonzentration erhöht (Boivin und Meunier 2002).

Knochen besteht zu ca. 80% aus anorganischem und zu 20% aus organischem Material. Das anorganische Knochenmaterial setzt sich zu einem Großteil aus Calciumphosphat zusammen. 99% des menschlichen Calciums (ca. 1050g bei 70kg Körpergewicht) ist im Knochensystem gespeichert. Die Mineralsubstanz besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Nur in geringen Mengen sind auch Kalziumcarbonat und Kalziumhydrogenphosphat zur schnelleren

Kalziumaustauschbarkeit vorhanden (Deutzmann et al. 2002). Die uns bekannte Härte des Knochens resultiert vor allem aus dieser Mineralzusammensetzung. Dies konnte auch vielfach in Versuchen gezeigt werden, in denen mit Hilfe von Säuren die Mineralkomponente herausgelöst wurde und das skelletale Exoskelett bestehen blieb, allerdings ohne seine ursprüngliche Festigkeit (Dorozhkin und Epple 2002).

Die Hauptkomponente (90%) des organischen Materials ist Kollagen vom Typ 1. Sie verleiht den Knochen die Elastizität und Zugfestigkeit, die sich auch in der biomechanischen Prüfung zeigt. Ohne die organische Substanz wäre der Knochen zu brüchig, um alltäglichen Belastungen Stand zu halten (Jee 2001).

## 1.1.4 Strukturanalyse

Neben einer rein qualitativen Beschreibung von Knochengewebe gibt es verschiedene Zell- und Strukturparameter, die quantitativ erfasst werden können. Dies erfolgt mit Hilfe mit Mikroskopen, in der Regel mit unterschiedlichen Zähl- oder Messhilfen. Die quantitative Charakterisierung von Knochengewebe nennt man Histomorphometrie, für die PARFITT 1988 eine einheitliche Nomenklatur entwickelte (Parfitt 1988). Einige wichtige Parameter sind:

- BV/TV: Dies ist die Verteilung von Knochenvolumen zu Gesamtgewebe.
- OV/BV: Dabei handelt es sich um das Verhältnis des Osteoidvolumens zu dem Gesamtvolumen des Knochens (Chappard et al. 2008).
- Trabekuläre Charakteristika: Tb.Th ist die durchschnittliche Trabekeldicke, Tb.N. die Trabekelanzahl und Tb.S die Entfernung der Trabekel voneinander.
- Kortikale Dicke und Radius / Diameter

Der Goldstandard zur Messung dieser Parameter ist noch immer die histologisch mikroskopische Analyse. Gleichwohl gibt es mit hochauflösenden Computertomographen eine Möglichkeit, auf ähnlich hohem Niveau den Knochen zerstörungsfrei zu quantifizieren.

Mit Hilfe dieser neuen bildgebenden Verfahren können Parameter nicht nur zweidimensional sondern auch über ein ausgewähltes Volumen berechnet werden. Für die unten genannten Messwerte hat sich die dreidimensionale gegenüber der mikroskopischen 2D-Auswertung durchgesetzt und wird nun standardmäßig mit Hilfe von hochauflösenden Computertomographen bestimmt:

- Flächenträgheitsmoment: Es gibt den Widerstand eines Körpers gegen Biegung an. Mit steigendem Wert bedarf es einer größeren Energie bis es zu einem Biegen des Materials kommt. Dieser Wert errechnet sich aus dem Produkt der Fläche des Körpers um seine neutrale Achse (Magnus und Müller-Slany 2005).
- Trabecular Bone Pattern Factor: Dies ist ein Parameter, der die quantitative Auswertung der intratrabekulären Konnektivität darstellt (Hahn et al. 1992).

Allerdings sind mit dieser radiologischen Technik keine Zellparameter messbar, da nur die mineralisierte Knochensubstanz erfasst wird. Hier ist man weiter auf histologische Präparate und spezielle Färbungen angewiesen. Nur damit lassen sich Aussagen über die den Knochen besiedelnden Zelltypen und damit über den Knochenstatus (High Turnover, Low Turnover, etc.) treffen.

Die Mineralisation des Knochengewebes kann durch Veraschung oder aber durch spezielle Bildgebung analysiert werden (Currey et al. 1996, Burghardt et al. 2008).

## 1.2 Knochentypen des Skelettsystems

---

In der makroskopischen Anatomie findet eine Unterteilung der Knochen nach ihrem Aussehen und Aufbau statt:

1. *Lange Knochen* (Ossa longa) sind Röhrenknochen und bestehen aus Diaphyse, Epiphyse und Metaphyse. Dabei ähnelt die Epiphyse in ihrer Beschaffenheit den spongiösen Knochen, die Diaphyse bildet einen durch die Corticalis (Substantia compacta) umgebenen Hohlraum, in dem das Knochenmark und ein Teil der roten Blutkörperbildung beherbergt ist. Sie bestehen zum Großteil aus Corticalis und stellen ca. 80% des gesamten Knochensystems dar (Jee 2001).
2. *Kurze Knochen* (Ossa brevia) sind zum Beispiel Hand- und Fußwurzelknochen. Im Gegensatz zu den langen Knochen gibt es in der Diaphyse fast keinen Hohlraum (Schiebler und Korf 2002).
3. *Platte Knochen* (Ossa plana) bestehen aus zwei massiven kortikalen Schichten, zwischen denen sich unterschiedlich viel spongiöse Substanz befinden kann, wie dies zum Beispiel im Schulterblatt oder dem

Schädeldachknochen der Fall ist. Auch hier findet ein Teil der roten Blutkörperbildung statt (Schünke et al. 2005).

4. *Unregelmäßige Knochen* (Ossa irregularia) sind zum Großteil aus Spongiosa bestehende Knochen, die durch die Substantia corticalis ummantelt werden. Sie lassen sich keiner der oben genannten Definition zuordnen. Zusammen mit den platten Knochen bilden sie etwa 20% des gesamten Skelettsystems (Schünke et al. 2005).

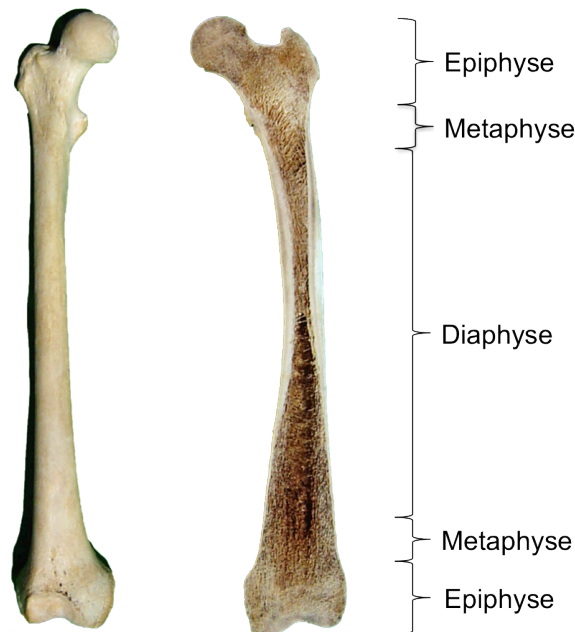
Irreguläre Knochen und lange Röhrenknochen bilden mehr als 95% der gesamten Knochen (Schünke et al. 2005).

## 1.2.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Knochen sind von der äußeren Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Das Periost ist fest mit der Substantia compacta verbunden und dient unter anderem der Blutversorgung. Seine wichtigste Funktion ist allerdings die Kallusbildung nach Fraktur und damit Ausheilung von Defekten (Drenckhahn 2008). Im Folgenden wird detailliert nur der Aufbau der langen Röhrenknochen und irregulären Knochen beschrieben, da sie mit 95% den Großteil des Knochensystems bilden und in dieser Arbeit Bestandteil der mechanischen Prüfung sind:

- a) Die Extremitäten werden vor allem von langen, schaffförmigen Knochen, sogenannten Röhrenknochen (Ossa longa) gebildet, die ihren Namen aufgrund der röhrenförmigen Beschaffenheit des mittleren Abschnitts erhalten haben (Diaphyse). Endständig verbreitern sich die Knochen zu den Epiphysen, deren Enden mit Knorpel überzogen sind und dort mit anderen Knochen über Gelenke in Verbindung stehen (Schünke et al. 2005). Bereits vor der Epiphyse liegt ein im Vergleich zu der Diaphyse verbreiteter Abschnitt, die Metaphyse. Zwischen Epi- und Metaphyse liegt die Epiphysenfuge, auch Wachstumsfuge genannt, die für ein normales Wachstum zuständig ist (Abb. 1-3). Mit Beendigung des Wachstums verknöchert dieser Bereich zur Linea epiphysalis (Drake et al. 2007). Sowohl Epiphyse als auch Metaphyse bestehen zum Großteil aus spongiösen Knochen während die Hülle von kortikalen Knochen geformt wird. Diese dienen der optimierten Kraftüberleitung der auf die Gelenkflächen wirkenden Kräfte in die Kortikalis und vice versa, um so eine optimale Kraftverteilung bei

geringstmöglicher Knochenmasse zu erreichen. Zusätzlich sind die Zwischenräume der Spongiosa meist mit dem blutbildenden roten Knochenmark ausgefüllt. Im Gegensatz dazu besteht die Diaphyse hauptsächlich aus Substantia compacta, die die von Fett gefüllte Markhöhle umschließt (Drenckhahn 2008).

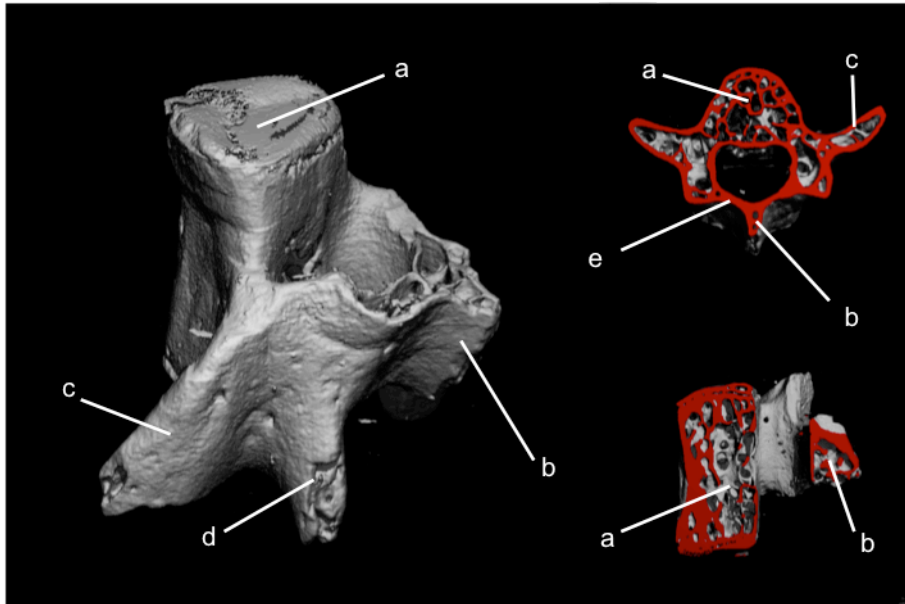


**Abb. 1-3:** Schematische Unterteilung eines Röhrenknochen

b) Wirbelkörper sind ein Beispiel für irreguläre Knochen. Mit Ausnahme des Atlas und der Axis bestehen alle Verterbrae aus einem annähernd zylindrischen Körper. Dieser ist über den Wirbelbogen mit den Processi transversi und spinosus verbunden. Beide dienen als Ansatz für viele Muskeln und Sehnen. Der Wirbelbogen umgibt den Spinalkanal, der das Rückenmark beherbergt (Abb. 1-4).

Die mechanische Hauptlast trägt der Wirbelkörper über die Artikulation der benachbarten Wirbel und den dazwischen liegenden Bandscheiben. Gleichwohl stehen die Wirbel zusätzlich über die Pedikel miteinander in Verbindung. Anders als die langen Röhrenknochen bestehen die irregulären Knochen vor allem aus trabekulären Strukturen. Diese tragen den Hauptteil der Belastung. Daher ist die Kortikalis auch nur sehr dünn (Silva et al. 1994). Finite Elemente Analysen legen nahe, dass lediglich 15% der Last von der

Kortex getragen werden (Silva et al. 1997). Dabei weist die Spongiosa abhängig von der Nähe zu den Endplatten unterschiedliche Dichte-Werte auf (je näher desto dichter). Prüfungen konnten zeigen, dass auch die Knochenmineralsalzdichte an den Endplatten höher ist als im Zentrum (Keller et al. 1992).



**Abb. 1-4:** Schematische Unterteilung eines Wirbelkörpers ( $\mu$ CT Aufnahmen). a: Corpus vertebrae; b: Processus spinosus; c: Processus transversus; d: Processus articularis inferior; e: Arcus vertebrae.

## 1.3 Biomechanik des Knochens

Durch die Größenzunahme der Landlebewesen wurde ein funktioneller Stützapparat zum Selektionsvorteil. Für eine Optimierung des Energiehaushaltes des gesamten Organismus mussten Knochen bei höchstmöglicher Stabilität gleichzeitig eine möglichst geringe Masse besitzen. Um die Leichtbausweise der Knochen zu ermöglichen, ist ein Erhalt der optimalen Qualität des Knochens durch konstante Reparatur- und Umbauvorgänge, das sogenannte Remodeling, Voraussetzung. Auf diese Weise werden Defekte repariert und der Knochen kann sich aktiv auf veränderte Lebensumstände bzw. veränderte mechanische Belastungen reagieren. Bereits vor über 300 Jahren vermuteten Forscher (GALILEI 1683 (Todd und Robinson 2003), BELL 1827 (Bell 2008)) Zusammenhänge zwischen dem Aufbau der Knochen und der auf sie wirkenden Kraft, ohne jemals Beweise dafür liefern zu können (Martin et al. 1998). Diese These unterstützten die technischen Zeichnungen

des schweizer Ingenieurs KARL CULMANN und dem Anatomen HERMANN VON MEYER (Abb. 1-5). Die durch MEYER angefertigten Schliffe eines proximalen Femurs erinnerten den Ingenieur an die Bauweise eines Lastkranes (Thompson 1942).

1855 postulierte JULIUS WOLFF seine Theorie, Knochen werden abhängig von ihrer Benutzung umgebaut und angepasst (Wolff 1892). Seine Thesen waren über viele Jahrzehnte in Form des WOLFF'schen Gesetzes ein Pfeiler des biomechanischen Verständnisses über den Aufbau und die Anatomie des Knochens. Viele Jahre später kritisierten Forscher, dass WOLFF in seinen Betrachtungen die Inhomogenität und anisotrope Struktur des Knochens außer Acht gelassen habe. Seine Theorien wurde vor allem von HAROLD FROST und STEPHEN COWIN diesen Erkenntnissen angepasst und erweitert (Frost 2000, Cowin 2001b). Mittlerweile weiß man, dass die trabekuläre Architektur der Knochen, dem trajektoriiellen Aufbau aus der Architektur entspricht. Der Körper modelliert seine Knochen so, dass die spongiöse Substanz den auf sie wirkenden Druck- und Zugspannungen optimal angepasst ist. Eine logische Konsequenz daraus ist, dass Knochen bei Minderbelastung abgebaut und bei Überbelastung verstärkt wird (Frost 2001, Rittweger und Felsenberg 2003).

Vor allem die oben beschriebene Inhomogenität des Knochens erschwert jedoch noch immer das vollständige biomechanische Verständnis des knöchernen Systems (Ulrich et al. 1998). Für die trabekuläre Knochenstruktur ist das mechanische trajektorielle Bauprinzip von entscheidender Bedeutung. Sie sind entsprechend der Einwirkung der Druck- und Zugspannungen ausgerichtet. Ein Beispiel bieten die Wirbelkörper, bei denen sowohl ein Knochenbälkchen-System entstanden ist, dass vor allem vertikal verläuft um Druckspannungen aufzufangen, als auch horizontal verlaufende Trabekel um seitliche Zugspannungen aufzunehmen (Cowin 2001b).

Gleichzeitig entwickelten sich die Röhrenknochen, die aufgrund ihrer Bauweise 40% des Gewichtes im Vergleich zu massiven Knochen einsparen konnten und dennoch denselben mechanischen Biegebelastungen standhalten können wie solide Knochen gleichen Ausmaßes (Saša und Borislav 2002).

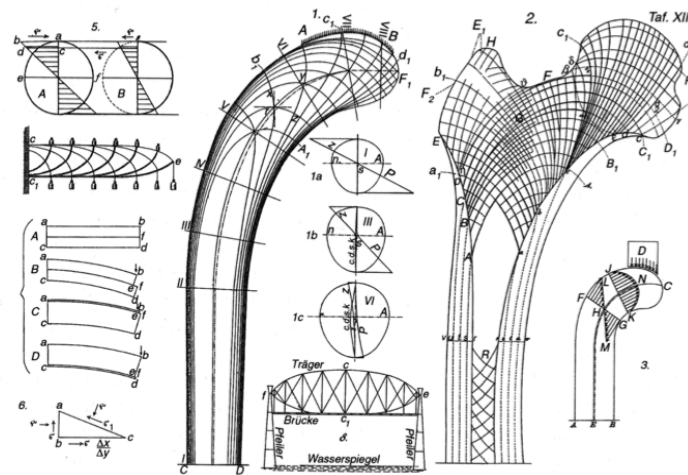


Abb. 1-5: Culmann – von Meyer – Zeichnungen (von Meyer 1873).

Entscheidend ist aber nicht nur die Leichtbauweise der Knochen sondern auch die Komposit-Bauweise aus anorganischem und organischem Material, die dem Knochen ein optimales Maß aus Elastizität (Kollagenfasern) und Härte (Mineralgehalt) verleiht. Dabei entscheidet auch die Kollagenausrichtung darüber, ob der Knochen eher druck- (longitudinale Ausrichtung) oder zugstabil (transversale Ausrichtung) ist. Der Körper ist in der Lage mittels der Trabekelausrichtung und Knochenmasse die Belastbarkeit des Knochens zu variieren. Auch die Mineralisation der Knochen ist kein konstanter Parameter und kann durch Variation die Festigkeit des Knochens beeinflussen (Mammone und Hudson 1993, Landis 1999).

## 1.3.1 Frakturen

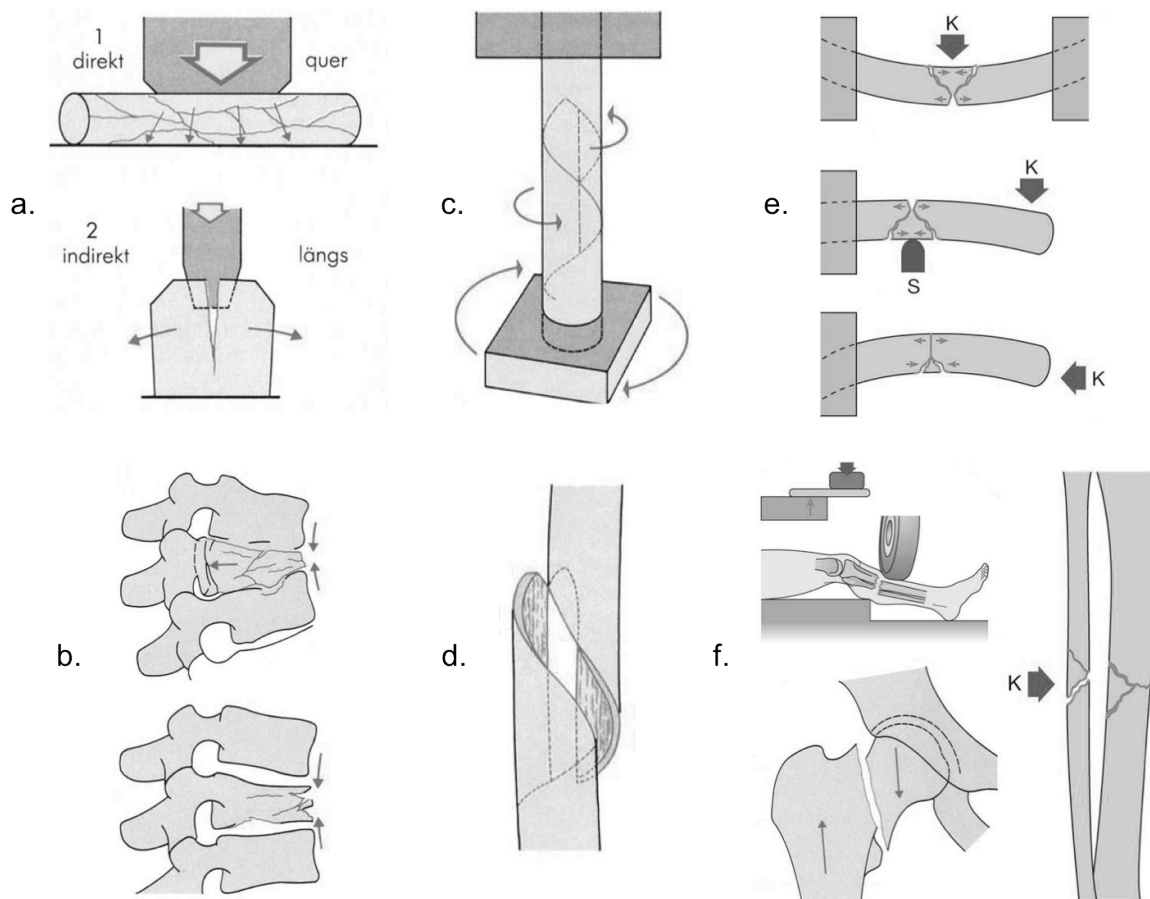
Das Verständnis über den Aufbau des Knochens und seine biomechanische Funktionalität kann im klinischen Alltag nicht nur für die Erforschung von Knochenerkrankungen eingesetzt werden, sondern hilft auch für das Verständnis über die Entstehung von Frakturen.

Ein Beispiel dafür ist die Belastbarkeit von Röhrenknochen. Diese sind für Biegebelastung am anfälligsten, da sie aufgrund ihrer hohen Spezialisierung über eine hohe Druckfestigkeit, jedoch nur über geringe Zugfestigkeit verfügen (Schünke et al. 2005).

Eine Studie zur Häufigkeit von Frakturen bei Erwachsenen in Schottland aus dem Jahr 2000 ergab die folgende Verteilung, die in etwa dem Durchschnitt der



Industrienationen entsprechen dürfte: Distaler Radius 17,5%, Metacarpale Frakturen 11,7%, proximaler Femur 11,6%. Wie man der Arbeit entnehmen kann, handelt es sich bei 6 der ersten 10 Frakturarten um Brüche der langen Röhrenknochen und bei den restlichen vier um kurze, irreguläre Knochen. Dabei variieren die verschiedenen Brucharten in ihrer Verteilung im Geschlecht und Alter erheblich (Court-Brown und Caesar 2006).



**Abb. 1-6:** Frakturformen. Die oberen drei Zeichnungen zeigen schematisch die Kraftentwicklung bei Kompressions- oder Stauchungsfrakturen [a], Torsionsfrakturen [c] und Biegefrakturen [e] mit oder ohne Widerlager. Die unteren Darstellungen zeigen die dafür typischen klinischen Frakturgeschehen: osteoporotische Wirbelkörperfrakturen als Beispiel für Stauchungsfrakturen [b], Torsionsfrakturen als Komplikation bei komplizierten Schaftbrüchen [d] und den Schenkelhalsbruch oder aber Überrolltraumata als Beispiel für Biegefrakturen [f]. (aus Berchthold Chirurgie, 5. Auflage, 2005)

Man unterscheidet in der Unfallchirurgie unter anderem zwischen Scherfrakturen, Abscherfrakturen, Biegefrakturen, Torsionsfrakturen, Kompressionsfrakturen und Abrissfrakturen (Abb. 1-6). Dabei kommt es bei Scherfrakturen zu einer direkten Scherung innerhalb des Knochens, während Abscherfrakturen durch Krafteinwirkung gelenknaher Partner entstehen. Biegefrakturen können entweder den Schaftbereich von Knochen durch ein auf sie ausgeübtes Biegemoment oder im spongiosen

Bereich über eine durch Biegekräfte verursachte Impaktation der Kortikalis in die Spongiosa entstehen. Torsionsfrakturen werden durch indirekt axial einwirkende Drehmomente verursacht. Kompressionsfrakturen entstehen durch die Zerdrückung der Knochen durch Druckbelastung des Knochens gegenüber einem Widerlager. Dabei kommt es häufig zu einer Berstung, Spaltung oder Impression der von Kortikalis umgebenen trabekulären Strukturen (Wanner und Trentz 2006).

Kombiniert man dieses Wissen mit der Inzidenz adulter Frakturen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Bieigungs- und Kompressionsfrakturen zu den häufigsten Bruchformen des adulten Patienten gehören.

## **1.3.2 Fraktur assoziierte Erkrankungen**

Es gibt eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit einer erhöhten Frakturrate einhergehen. Dies kann zum Beispiel im Rahmen einer Mindermineralisation aufgrund von z.B. Vitamin D3- oder Calcium-Mangel entstehen (Osteomalazie). Eine weitere Gefährdung stellt der Abbau von Knochensubstanz initial im Rahmen einer Osteopenie später einer Osteoporose dar. Auch eine Verknöcherung und Übermineralisation kann zu einer Versprödung mit erhöhter Brüchigkeit führen (Osteopetrose; d.h. ein Funktionsverlust der Osteoklasten).

Dabei ist die Osteoporose das volkswirtschaftlich bedeutsamste Knochenleiden des Menschen. Osteoporose ist eine systemische skelettale Erkrankung, die durch eine verringerte Knochenmasse sowie einen Untergang der trabekulären Strukturen des Knochens und einer dadurch assoziierten erhöhten Knochenbrüchigkeit und den damit einhergehenden Frakturen definiert ist (1993). Osteoporose ist eine der am volkswirtschaftlich kostenintensivsten Erkrankungen Deutschlands. Wie eine Studie im Auftrag der gesetzlichen Krankenkassen unter der Leitung von DIETER FELSENBURG zeigen konnte, kostet Osteoporose dem deutschen Gesundheitssystem etwa 5,4 Milliarden Euro und nur etwa 23% der Patienten werden mit einer spezifischen Medikation behandelt. Damit ist die Osteoporose eine unterschätzte Erkrankung des in der Regel älteren Menschen (Haussler et al. 2007). Ein Großteil dieser Kosten entsteht durch die mit der Osteoporose assoziierten Frakturen und der daraus resultierenden Krankenhausaufenthalte, Pflegebedürftigkeit und Mortalität (Lippuner et al. 2005).

Als systemische Erkrankung kann das gesamte Skelettsystem betroffen sein. Die am

häufigsten betroffenen Knochen sind jedoch die Wirbelsäule, die Hüfte sowie der Humerus und der distale Radius (Riggs 1995).

Man differenziert zwischen der primären Osteoporose ohne erkennliche Entstehungsursache und der sekundären Osteoporose. Hier sind unter anderem Vitamin-D-Mangel im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz (Cunningham 2007) oder Lebererkrankungen (Ebeling 1998) zu nennen. Auch die systemische Einnahme von Glukokortikoiden oder Aromatasehemmern kann zu einer reduzierten Knochenmasse im Sinne einer sekundären Osteoporose führen (Kok und Sambrook 2009).

Im Schatten der Osteoporose stehen weitere mit einer erhöhten Frakturgefährdung assoziierten, weitaus seltenere systemische Erkrankungen des Knochensystems wie zum Beispiel die Pycnodysostosis (Schilling et al. 2007), die Osteogenesis imperfecta (Rauch und Glorieux 2004), Morbus Paget (Singer 2009), knöcherne Tumoren (Biermann et al. 2010, Wagner et al. 2001) sowie die Neurofibromatose (DiSimone et al. 1988).

Klinische und Grundlagenforschung im Bereich der Knochen befasst sich vor allem mit dem Ziel, die Frakturanfälligkeit eines Systems zu reduzieren, indem antiresorptive oder knochenanabole Targets gesucht werden. Im Rahmen der Knochenforschung wird nach einer Optimierung der Medikation sowie nach einem besseren Verständnis der Ursachen und des Verlaufs dieser Erkrankungen gesucht. Dafür ist jedoch nicht nur ein Wissen über die Knochenarchitektur und des Knochenstoffwechsels sondern vor allem über die Auswirkung dieser Parameter auf die Knochenfestigkeit von besonderer Bedeutung. Dies rückt biomechanische Knochenuntersuchungen in den Interessensfokus, weil damit die klinischen Auswirkungen der Erkrankung aufgezeigt werden können.

## **1.4 Tiere in der Knochenforschung**

---

Tierversuche stellen einen essentiellen Bestandteil in der experimentellen Knochenforschung dar. Je nach Art der Untersuchung müssen die Tiere bzw. ihre Knochen eine entsprechende Größe haben. Während Ratten, Mini-Schweine, Schafe, Frettchen und Nicht-Menschenaffen vielfach für die Erforschung von pharmazeutischen (Knochen-anabolen bzw. –antikatabolen) Targets benutzt

werden, bedarf es z.B. in der Gelenkforschung vielfach operativer Intervention. Hunde stellten einen Großteil der Versuchsgruppe dieser Prüfungen dar, aber auch Schafe, Schweine, Hasen, Ziegen und Affen wurden für solche Versuchsreihen benutzt (Turner und Burr 2001, Kimmel 2001).

Mehr als die Hälfte (53%), der in Europa 2005 verwendeten Tiere, sind Mäuse. Gefolgt werden sie von Ratten (19%), Kaltblütlern (15%), Vögeln (5,4%), Hasen (2,6%) und Ginea-Schweinen (2,1%) (Communities 2007).

Der Vorteil der Mäuse in der Knochenforschung ist die geringe genetische Variabilität innerhalb einer Kolonie und des Geschlechts. Das erlaubt Versuchsreihen mit nur geringen Gruppengrößen (Corwin und Rowe 2001). Hinzu kommt, dass das Mausgenom besser als viele andere Tiergruppen analysiert wurde und sich dadurch für genetische Forschung anbietet. Allerdings limitiert ihre Knochengröße die Versuchsreihen auf Biege- und Kompressionsprüfung in der täglichen Routine. Die Maushaltung ist einfacher und weniger kostenintensiv als bei Großtieren und auch die Züchtung ist bedeutend leichter. Gleichsam altern Mäuse im Vergleich zu Großtieren schneller. Auf diesem Wissen basierend werden bereits ein Jahr alte Mäuse für das Krankheitsbild Erwachsener herangezogen (Rosen et al. 2001, Schilling et al. 2001, Pogoda et al. 2005, Waterston et al. 2002).

## 1.5 Grundlagen der Biomechanik

---

Kraft ist das Produkt aus Masse und Beschleunigung. Sie stellt die Ursache von Orts- oder Formveränderung von Körpern dar. Die Einheit der Kraft im SI-System ist das Newton [N], benannt nach dem gleichnamigen Physiker Isaac Newton. Ein Newton ist diejenige Kraft, durch die einer Masse von 1kg eine Beschleunigung von  $1\text{m/s}^2$  erteilt wird (Magnus und Müller-Slany 2005).

Man muss zwischen äußeren und inneren Kräften unterscheiden. Äußere Kräfte führen zu Drehmomenten (Hebelarm, Kraft mal Weg) im Innern des Körpers. Wenn die Kraft senkrecht zur Längsachse einwirkt, spricht man von einem Biegemoment. Axialkräfte wirken entlang der Längsachse, während Querkräfte transversal wirken (Magnus und Müller-Slany 2005, Cowin 2001a).

Innere Kräfte sind analog zu den äußeren und werden als Spannungen bezeichnet. Es gibt Normalspannungen  $\sigma$  in Längsrichtung (Druck- und Zugspannungen) und

Querspannungen  $\tau$  in transversaler Richtung (Schub-, Scher- und Torsionsspannungen).

Diese Differenzierung ist für das Verständnis der Knochenbiomechanik von entscheidender Bedeutung, da die verschiedenen Knochen speziell auf die physiologischen Belastungsformen ausgerichtet sind und hierfür die größte Widerstandsfähigkeit aufweisen. Sobald jedoch eine unphysiologische Belastung erfolgt (z.B. durch einen Unfall), versagt der Knochen in seiner Funktion und es kommt zu einer Fraktur (Geusens et al. 2004, Nalla et al. 2005).

Arbeit ist die Energie, die durch eine Kraft längs eines Weges auf einen Körper übertragen wird. Seine SI-Einheit ist Joule [J] (Gerthsen und Vogel 1999). Der Mineralisationsgrad bestimmt zu einem Großteil die Brüchigkeit und damit das Biegeverhalten des Knochens. Ein wenig mineralisierter Knochen, kann ähnlich einem jungen Ast, eine hohe Energie aufnehmen, bevor es zu einem Bruch kommt (sog. Grünholzfraktur). Im Gegensatz dazu kommt es durch eine Übermineralisation zu einer erhöhten Brüchigkeit und einer verminderten Energieaufnahme (Turner 2006).

Für Knochen gilt sowohl in vitro als auch ex vivo in der Bruchprüfung, dass die Stabilität primär von drei Parametern abhängig ist, der geometrischen Struktur des Knochens, den mechanischen Eigenschaften des Materials (Spannungs-, Dehnungsverhalten, Druckresistenz), sowie der Größe und Richtung der angreifenden Kraft. Wichtig ist die Erkenntnis, dass nicht die gesamt einwirkende Kraft entscheidend für das Verhalten des Knochens ist sondern die Verteilung der inneren Kräfte (Einhorn 1992, Cowin 2001a).

## 1.5.1 Parameter der Biomechanik

Im Folgenden werden zum Verständnis der später genannten Prüf-Ergebnisse die relevanten biomechanischen Parameter und deren Erklärung dargelegt.

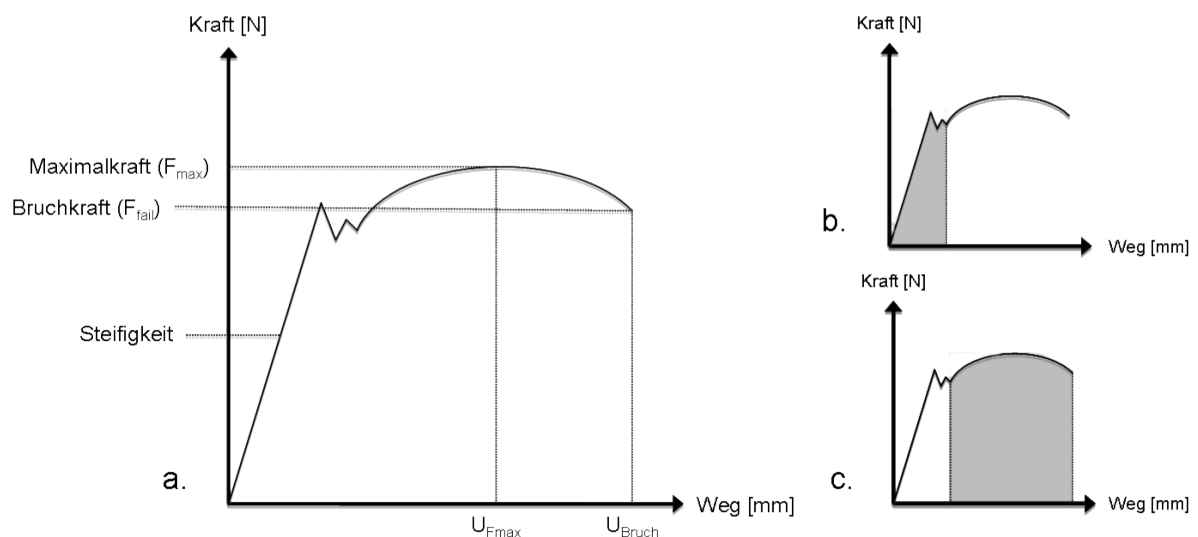
Zunächst ist es wichtig, zwischen den Begriffen Dehnung und Spannung zu unterscheiden. Dehnung ist die Veränderung eines Körpers in der Länge und wird in Prozent angegeben. Je nach Richtungs- und Größenveränderung unterscheidet man zwischen Stauchung (negatives Vorzeichen) und Dehnung (positives Vorzeichen). Spannung kann als die Intensität einer Kraft, die in einer bestimmten Ebene wirkt,

verstanden werden. Dabei spricht man von Normalspannungen, die längsaxial wirken, und von Scherkräften sobald sie horizontal wirken (Turner 2006) .

Jede Kraft kann in Vektoren zerlegt werden, die wiederum den oben genannten Spannungen entsprechen.

Jede Belastung eines Körpers führt zu dessen Verformung. Werden aufgewendete Kraft und die dadurch zurückgelegte Strecke mit einer Kurve festgehalten, so erhält man ein Kraft-Weg-Diagramm (Abb.1-7). Dies spiegelt das Verhältnis von Kraft zu Verformung des Körpers bis zum Bruch wieder (Magnus und Müller-Slany 2005).

Man unterscheidet zwei Arten der Verformung, die elastische und die plastische (Abb. 1-7 b und c). Diese beiden Verformungsarten werden durch die Quetschgrenze im Druckversuch und Streckgrenze im Zugversuch von einander getrennt. Innerhalb der elastischen Region sind alle Veränderungen innerhalb des zu prüfenden Körpers reversibel. Oberhalb dieses Punktes kommt es zu plastischen Verformungen, die auch nach Abbrechen des Versuches nicht reversibel sind. Diese Veränderungen entstehen vor allem durch Kriechbewegungen und Mikrofrakturen innerhalb des Materials (Currey 2006). Es gibt vielfältige Methoden diesen Punkt zu berechnen. Eine Möglichkeit ist es den Wendepunkt der Kurve im Kraft-Weg-Diagramm zu wählen.



**Abb. 1-7:** Schematische Darstellung eines Kraft-Weg-Diagramms und der daraus errechenbaren Parameter [a] sowie der Unterschied zwischen elastischer [b] und plastischer Verformung [c].

Die Steigung des linearen Abschnitts der elastischen Verformung nennt man *Steifigkeit* [N/mm]. Die Steifigkeit steht beim Knochen in direktem Verhältnis zur Mineralisierung.

Die *Maximalkraft*,  $F_{\max}$  [N], ist die maximale Kraft, die während des Versuches auf den Körper gewirkt hat. Sie muss nicht gleichbedeutend mit der Bruchkraft sein, da die Materialstärke aufgrund der plastischen Verformungen schwächer werden kann. Mit diesem Parameter lassen sich Aussagen über den Knochen als Verbundstoff treffen.

Die *Energie* [N\*mm], die ein Knochen aufnehmen kann, bevor es zum Versagen des Körpers kommt, wird durch die Fläche unterhalb der Prüfkurve dargestellt. Je geringer die plastische Verformbarkeit eines Materials ist, desto höher ist auch seine Brüchigkeit. Je größer die durch die Kurve gebildete Fläche ist, desto geringer ist auch seine (Material-) Festigkeit.

Alle diese Faktoren müssen im besten Fall bekannt sein, um einen Prüfkörper und seine mechanischen Eigenschaften adäquat zu definieren.

Wird das Kraft-Weg-Diagramm in ein Druck-Zug-Diagramm umgewandelt, so kommt es zu einer Eliminierung der geometrischen Komponenten. Die Steigung dieser Geraden wird in diesem Fall *Elastizitätsmodul* genannt. Es ist der Wert, der die intrinsische Steifigkeit des Materials beschreibt. Die Fläche unter der Kurve gibt hier die Härte des Materials wieder.

## 1.5.2 Mechanische Knochenprüfung

Das Besondere an dem Prüfkörper „Knochen“ ist, dass dieses Material, wie auch einige andere Stoffe, nicht homogen ist. Knochen ist ein Kompositgebilde und dadurch anisotrop. Das bedeutet, der Knochen ist in seinen Achsen nicht gleichermaßen widerstandsfähig. Das menschliche Femur zum Beispiel ist aufgrund seiner Strukturen und Faserausrichtungen deutlich belastbarer auf Druck- und Zug- als auf Biegebelastungen. Ein isotropes Material hingegen ist in allen Achsen gleich belastbar und weist in allen Dimensionen gleiche Materialeigenschaften auf (Davison et al. 2006).

Des Weiteren ist Knochen viskoelastisch. Viskoelastizität ist definiert als die Eigenschaft eines Körpers zeit-, temperatur- und frequenzabhängig, unterschiedliche Elastizität bei unterschiedlicher mechanischen Belastung zu zeigen. So kann bei sehr langsamer Belastung der Elastizitätsmodul deutlich niedrig sein, während eine schnelle Prüfung zu höheren Werten führt. Es ist deswegen also unabdingbar, dass

für die Prüfungen die selben standardisierten Prüfprotokolle verwendet werden, um so auch vergleichbare Werte zu erhalten (Lakes 2001, LeMaitre 2001).

Das bedeutet für die Knochenforschung, dass viele Parameter lediglich eine Annäherung an die Realität darstellen. Zudem wird in der biomechanischen Knochenprüfung eine Struktur ex vivo geprüft, die in vivo ein dynamisches sich adaptierendes System darstellt. Die Ergebnisse der Materialprüfung stellen damit immer nur eine momentane Bestandsaufnahme dar.

Im Folgenden werden die häufigsten mechanischen Knochenprüfformen dargestellt (Abb. 1-7). Jede biomechanische Prüfung erfolgt unter standardisierten Protokollen. Dafür wird eine Materialprüfmaschine mit speziell für die Prüfung gefertigter Vorrichtung verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgt an dem die Prüfmaschine steuernden Computer:

a) *Zugtestung:*

Zugtestung wird in der Literatur als die akkurateste Prüfmethode angegeben. Einzige Limitierung ist, dass die Kraft rein axial wirken muss, damit keine Biegemomente auf das zu prüfende Material wirken. Man kann sowohl kortikalen als auch trabekulären Knochen auf diese Art und Weise prüfen. Allerdings müssen die Proben relativ lang und breit (Länge : Breite = 15-25mm : 40mm) sein (Davy und Jepsen 2001).

b) *Kompressionstestung:*

Im Gegensatz zur Zugtestung können mit dieser Methode auch kleinere Knochenobjekte geprüft werden (7-10mm Länge). Allerdings sind die Prüfergebnisse nicht so valide und reliabel wie in der Zugtestung. Für möglichst gute Ergebnisse müssen die zu beladenden Flächen möglichst parallel angeordnet sein. Bei dieser Prüfung darf es zu keiner abscherenden Bewegung kommen, damit reine Druckspannungen gemessen werden. Hinzu kommt die aufwendige Vorbereitung und Präparation der zu prüfenden Objekte. Eine reine Prüfung trabekulärer Knochenbälkchen ist nur bei relativ großen Trabekelstrukturen möglich. Durch das Herausschneiden der Proben aus ihrem Verbund wird die Kraft bei dieser Materialprüfung häufig unphysiologisch in die Struktur eingeleitet. Erst weit im Inneren des Prüfkörpers wird die Kraft physiologisch auf das gesamte System aufgeteilt. Gleichwohl entspricht diese Art der Prüfung einer Vielzahl von natürlichen Belastungen (Turner und Burr 2001).



Anders als zum Beispiel der Zugtest misst der Kompressionstest dabei nicht nur intrinsische Charakteristika sondern auch die mechanischen Eigenschaften des gesamten Körpers. So können zum Beispiel Wirbelkörper verschiedener Osteoporose-Schweregrade mit einander verglichen werden oder die Effektivität unterschiedlicher pharmazeutischer Behandlungen auf das knöcherne System evaluiert werden. Die Kompressionsprüfung von Wirbelkörpern hat außerdem den Vorteil, dass er in seiner Belastungsform der anatomisch physiologischen Beanspruchung von Wirbelkörpern entspricht (Keller und Liebschner 2000).

Ähnlich wie menschliche Wirbel bestehen auch Mauswirbel zu einem großen Teil aus trabekulärer Struktur (Ferguson und Steffen 2003). Es haben sich für humane Wirbel Prüfmethode etabliert, bei denen kleine würfel- oder zylinderförmige Proben aus dem Skelett geschnitten werden, um dann auf ihre Druckbelastbarkeit geprüft zu werden (Turner und Burr 2001). Dieses System kann aufgrund des erheblichen Größenunterschiedes von Mensch zu Maus nicht übernommen werden. Will man in ähnlicher Versuchsdurchführung murine Wirbel biomechanisch prüfen, so müssen ganze Wirbelkörper geprüft werden. Dabei muss man sich bewusst sein, dass die Messwerte ein Kompositgebilde aus kortikalem und trabekulärem Knochen widerspiegeln. Der exakte Einfluss einzelner Strukturen (Spongiosa, Kompakta) kann mit histomorphometrischen Analysen und Finite-Elemente-Software lediglich abgeschätzt werden.

Der Wirbelkompressionsprüfung der Maus wird deutlich seltener verwendet als der Femur-Biegebelastung. Ein Problem stellte bisher die Präparation der Wirbel vor der Prüfung dar. In einigen Arbeitsgruppen wurden die Endplatten entfernt um möglichst parallele Oberflächen für eine Krafteinleitung zu schaffen. Dies führte allerdings zu einer nicht unerheblichen Verkleinerung der Knochen, sowie Mikrofrakturen und anderen Präparationsartefakten an den Auflageflächen. Dadurch wird jedoch ein nicht standardisierbarer Anteil kortikalen und trabekulären Knochens entfernt. Alternativ wurde der Druck direkt auf die Endplatten ausgeübt unabhängig von seiner Abweichung aus der Horizontalen. Dies führt erneut zu einer Druckabweichung und –konzentrierung die eine Reproduzierbarkeit der Daten unmöglich macht (Turner und Burr 2001). GÖTZEN konnte zeigen, dass es bei diesen

Alterationen der Knochen zu nicht physiologischen Veränderungen der mechanischen Belastbarkeit kommt und einzelne Regionen des Knochens anders als in der Realität belastet werden (Götzen 2006). Dadurch kann es zu einer Fehleinschätzung der Belastbarkeit kommen.

Die von GÖTZEN etablierte Wirbelkörper-Kompressionsprüfung wird im Rahmen dieser Arbeit für die Materialprüfung von murinen Wirbelkörpern verwendet.

c) *Torsionstestung:*

Mit der Torsionstestung wird der Widerstand meist vollständiger Knochen gegenüber Scherkräften gemessen. Zur Prüfung ist eine Einbettung der Knochenenden in die Prüfvorrichtung nötig. Dies ist zeitintensiv, die Kleber müssen speziell für die Materialprüfung ausgesucht werden und es darf keinerlei axiale Abweichung während der Einbettung geben. Torsionstestung wird nur selten durchgeführt. Ausnahme bildet die mechanische Evaluation von verheilten Knochenbrüchen und Allografts. Diese Prüfung ermöglicht eine Krafteinleitung entfernt von der zu prüfenden Stelle und so eine genaue Untersuchung der Selben (Sharir et al. 2008).

d) *Biegetestung:*

Biomechanische Untersuchungen an Röhrenknochen werden primär mit Biegeversuchen durchgeführt. Biegeversuche sind eine Alternative zu Druck- und Zugprüfungen, wenn die Festigkeitswerte von sehr kleinen Knochen ermittelt werden sollen, da die Durchführung hierbei deutlich einfacher ist. Prüfung der Knochen durch Biegebeanspruchung erfolgt in der Regel durch 3- oder 4-Punkt-Belastung. Hierfür sollten möglichst symmetrische Knochen verwendet werden, um eine homogene Kraftverteilung zu garantieren (Turner und Burr 2001).

Bei dem Drei-Punkt-Biegeversuch kommt es zu einer einzelnen Druckbelastung im zentralen Bereich des zu prüfenden Knochens. Ein klarer Vorteil gegenüber anderen Prüfmethode ist der einfache Versuchsaufbau. Ein Nachteil hingegen ist der inhomogene Verlauf des Biegemomentes, was zu einer maximalen Konzentrierung der Scherspannungen im Bereich des Krafteinleitungspunktes führt. Dadurch kommt es nicht mehr zu einem Materialversagen am schwächsten Punkt des Knochens zwischen den

Auflageflächen sondern zu einer Spannungskonzentration in einem Punkt, wodurch eine Sollbruchstelle vorgegeben wird (Jiang et al. 2001).

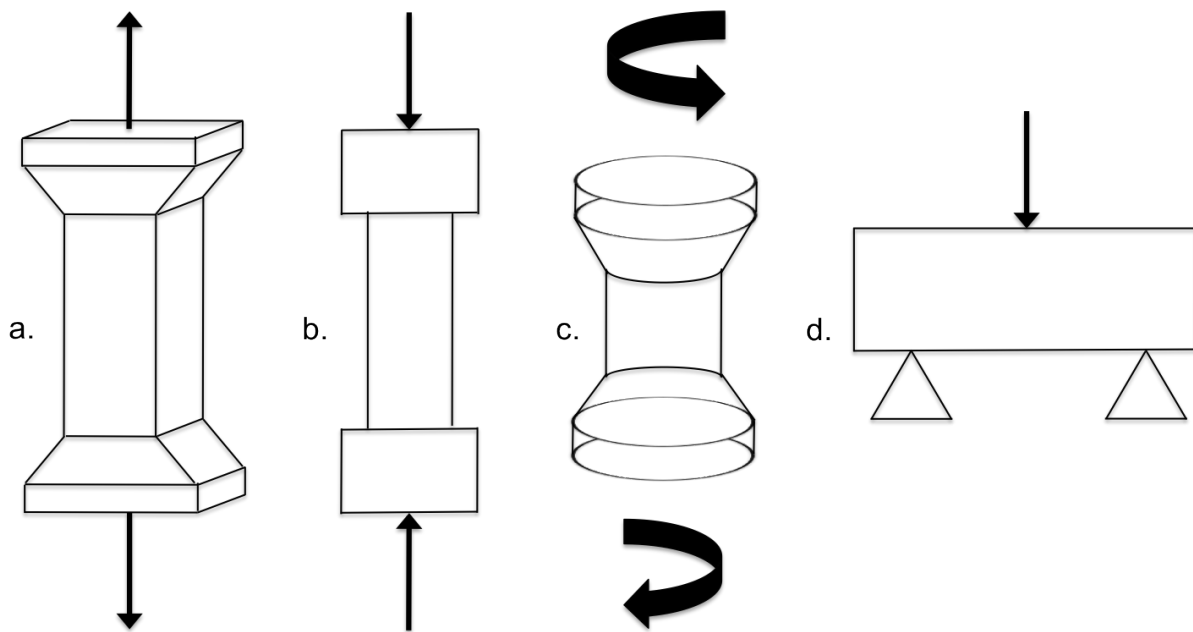
Bezogen auf eine optimale Kraftverteilung bei Belastung des Körpers ist der Vier-Punkte-Biegeversuch dem oben genannten Aufbau deutlich überlegen. Dabei wird die Kraft parallel an zwei Punkten eingeleitet und es kommt zwischen ihnen zu einer homogen auf den Knochen verteilten Biegebelastung ohne Scherkräfte. Dieser Versuchsaufbau führt dazu, dass der so geprüfte Knochen zwischen den Auflagerflächen an seiner strukturell schwächsten Stelle bricht. Reproduzierbare Vier-Punkt-Biegungen sind bei der Prüfung nicht symmetrischer Knochen nur schwer zu realisieren, da eine Krafteinleitung exakt gleich erfolgen muss. Auch bei dieser Art der Materialprüfung kommt es häufig zu Quetschungs-Veränderungen innerhalb des Prüfkörpers zwischen den Auflageflächen aufgrund des geringen Abstandes der Widerlager. Zudem ist der Prüfaufbau aufwendiger als für den Drei-Punkt-Biegeversuch (Kummer 2007).

Deshalb wird bisher die Dreipunktbiegung zur mechanischen Analyse der Röhrenknochen bevorzugt (Keller und Liebschner 2000). KUMMER konnte zudem zeigen, dass der Drei-Punkte-Biege-Versuch dem Vier-Punkt-Biegeversuch in seiner Reproduzierbarkeit deutlich überlegen ist (Kummer 2007).

Aus diesem Grund wird die 3-Punkt-Biegebelastung im Rahmen dieser Arbeit für die Materialprüfung von murinen Femora verwendet.

e) *Ermüdungstestung:*

Wenn ein Material in einer hohen Frequenz im Bereich seiner elastischen Verformung belastet wird, kommt es durch die hohe Wiederholungszahl allmählich zu einer Verringerung seiner mechanischen Eigenschaften. Dieses Verhalten nennt man Ermüdung. Die Form der Belastung kann dabei zwischen Biegung, Torsion, Zug und Druck variieren. Normalerweise wird der Ermüdungsbruch mit einer Verringerung des Elastizitätsmoduls um 30% definiert. Von entscheidender Bedeutung für die Prüfung hierbei sind Hydratationsgrad und Umgebungstemperatur (Turner und Burr 2001).



**Abb. 1-8:** Schematische Darstellung biomechanischer Prüfmethode. Zugtestung [a], Kompressionstestung [b], Torsionstestung [c] und Biegetestung [d].

Die biomechanische Prüfung von Femora und Wirbelkörpern in Form von 3-Punkt-Biege- bzw. Kompressionsprüfung ist in unserer Arbeitsgruppe ein fester Bestandteil zur Charakterisierung muriner Knochenphänotypen genetischer Mausmodelle.

# Kapitel 2

## Fragestellung

Es sollen die beiden in unserer Arbeitsgruppe etablierten Prüfmethoden zur Charakterisierung eines murinen Knochenphänotyps untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Haben die Biegeprüfung muriner Femora und die Kompressionsprüfung muriner Wirbelkörper die gleiche Aussagekraft?
2. Welche Parameter sollten für eine biomechanische Charakterisierung verwendet werden?

Ziel ist es einen Leitfaden und eine Standardisierung zur biomechanischen Charakterisierung muriner Knochenphänotypen zu entwickeln.

## Material und Methodik

### 3.1 Maus-Modelle

---

Die zur Kontrolle der Prüfmethode ausgewählten Mausmodelle wurden aufgrund ihres bereits zuvor bekannten Knochenphänotyps ausgewählt. Es wurde Wert darauf gelegt, Mausmodelle einzubeziehen, die sowohl eine verringerte als auch eine erhöhte Knochenmasse aufweisen.

Alle Mäuse stammen aus aktuellen Projekten des Instituts für Osteologie und Biomechanik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf und stellen Modelle zur Erforschung des Knochenstoffwechsels dar. Die Anzahl der analysierten Mäuse und Knochen abhängig von der ausgewählten Mausfamilie.

Die folgenden beschriebenen transgenen und knock-out Mausmodelle haben als genetischen Hintergrund die Familie C57bl6 (s.u.).

Um einen Vergleich der Prüfgruppen zu ermöglichen, wurden gleiche Altersgruppen, Geschlecht sowie Konservierungsmethode ausgewählt.

Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen und in Einklang mit den Tierschutzbedingungen gehalten. Alle Versuchsreihen wurden beim Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angemeldet.

#### 3.1.1 C57BL/6

Die Mausfamilie BL6 geht auf die Zuchtmutter mit dem Namen „C57“ zurück und wird aufgrund ihrer dunklen Fellfarbe „C57 Schwarzes 6“ (bzw. C57bl/6) genannt. BL6 stellt eine der ältesten und am häufigsten in der Forschung genutzten Linien dar. Sie entstand durch das wissenschaftliche Züchten und Verpaaren von Mauslinien durch

Dr. Little zu Beginn des 19. Jahrhunderts. Diese Mauslinie wird vor allem als Grundlinie für genetisch veränderte Mäuse verwendet. Sie findet überwiegend in der Erforschung von Herz-Kreislauf (Shao et al. 2010), Diabetes (Tesch und Nikolic-Paterson 2006), Immunologie (Liebig et al. 2010) und Neurologie (Torkildsen et al. 2008) Verwendung. Tiere der Familie BL6 werden besonders alt und eignen sich dadurch zur Zucht von schwierig zu generierenden genetischen Mausmodellen (Silver 1995).

BL6 wurde in vielen biomechanischen Studien verwendet und es ist eine Vielzahl von Studien dazu veröffentlicht. Sie stellt dabei in der Regel die Kontroll-Gruppe zu anderen Mauslinien oder genetisch veränderten Linien dar. Dadurch hat sich ein fundiertes Wissen über die Knochenparameter dieser Mauslinie etabliert (Jiao et al. 2007).

Erste Knochendichte-Analysen wurden durch BEAMER (Beamer et al. 1996) und AKHTER (Akhter et al. 2004) durchgeführt, indem BL6 Linien mit anderen Mausfamilien verglichen wurden. Beide Gruppen konnten zeigen, dass BL6 eine signifikant niedrigere BV/TV aufweist. TURNER's Arbeitsgruppe war dabei die erste, die zusätzlich zu der bis dato etablierten histomorphometrischen Analyse eine biomechanische Untersuchung in Form von Mikro-Kompressionsversuchen von Mauswirbelkörpern und Femur-Biegeprüfungen den Analysen hinzufügten (Turner et al. 2000). Zusätzlich waren sie eine der ersten Arbeitsgruppen, die  $\mu$ CT-Analysen in die Knochen-Phänotypisierung mit einfließen ließen.

BRODT (Brodt et al. 1999) und HALLORAN (Halloran et al. 2002) analysierten die Veränderungen des knöchernen Phänotyps durch Alterung. Sie konnten zeigen, dass sich alle strukturellen Parameter mit der Alterung verändern und ab einem Alter von 6 Monaten ein konstantes Plateau erreicht haben. Biomechanische Werte hingegen erreichen ihren Höhepunkt in einem Alter von etwa 20 Wochen. Dabei hatten Materialeigenschaften einen stärkeren Einfluss auf die Rigidität und die Maximalkraft als die geometrischen Eigenschaften (Brodt et al. 1999). BV/TV der trabekulären Strukturen in der tibialen Diaphyse nahm zwischen einem Alter von 6 Wochen bis zu einem Alter von 24 Monaten signifikant ab (-60%). Männliche Individuen zeigten dabei immer etwas höhere Werte als Weibchen (Halloran et al. 2002).

In allen Prüfreihen dienten jeweils gleichaltrige C57BL/6 Mäuse als Kontrollgruppe. Dadurch wurde sichergestellt, dass ein beobachteter Effekt auf den

Knochenphänotyp allein auf den genetischen und nicht einen möglichen Altersunterschied zurückzuführen ist. Damit kann für diese Gruppe zusätzlich eine Aussage zum Einfluss des Alters auf die biomechanische Kompetenz des Knochens getroffen werden.

Die geprüften Mäuse waren 16, 20, 24 und 42 Wochen alt und weiblichen Geschlechts.

### 3.1.2 Krm2<sup>tg</sup>

Der Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg reguliert den Knochenstoffwechsel durch Induktion der Osteoblastenproliferation sowie Inhibition der Osteoklasten- und Osteoblasten-Apoptose. Krm bildet zusammen mit LRP6 und Dkk1 einen Komplex, der den Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg inhibiert. Die antagonistische Wirkung von Dkk1 im Knochenstoffwechsel wird durch die Anwesenheit von Krm erheblich verstärkt. Dadurch bilden die Krm-Gene negative Regulatoren des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweges und hemmen somit die normale Knochenentwicklung (Mao et al. 2002). Im Gegensatz zu Dkk1 bleibt die genaue Rolle von Krm2 noch immer unklar. Krm1 ist für die Thymusentwicklung der Maus als Wnt-Gegenspieler zuständig (Cselenyi und Lee 2008). Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass Krm2 unabhängig von Dkk-Proteinen funktionieren kann. In Abwesenheit von Dkk1, wirken Krm1 und Krm2 als Agonisten des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweges indem LRP6 gebunden und in seiner Funktion an der Plasmamembran verstärkt wird (Davidson et al. 2002).

Es bleibt noch unklar, welche genaue Funktion Krm in der Entwicklung der Maus spielt. Es bleibt fraglich, ob Krm-Proteine R-Spondine beeinflussen (Ellwanger et al. 2008). SCHULZE generierte zur genaueren Erforschung der Krm-Gruppe eine Krm2 transgene Maus, die in ihren Osteoblasten Krm2 überexprimiert (Schulze und Seitz S 2010). Diese Mäuse zeigten einen erheblichen osteoporotischen Knochenphänotyp, die nicht nur mit verminderter Knochenformation sondern zusätzlich mit einer erhöhten Knochenresorption erklärt werden muss. Es konnten eine Reduktion in BMD, kortikaler Dicke, trabekulärer Dicke und BV/TV gezeigt werden.

Die geprüften Tiere waren 24 Wochen alt und weiblichen Geschlechts.



## 3.1.3 Isg15<sup>-/-</sup>

Isg15 teilt sich viele bekannte Eigenschaften mit anderen ubiquitin-ähnlichen Molekülen. Seine entscheidende Rolle spielt dieses Protein jedoch in der Immunabwehr. Es ist ein durch Interferon I und Lipopolysaccharide stimuliertes Gen, das sowohl in Monozyten als auch in Lymphozyten nachgewiesen werden kann (Ranheim et al. 2005, Wang et al. 1999). Es ist auch bekannt als UCRP (ubiquitin cross-reactive Protein), da es unter anderem zwei homologe Tandem-Domänen enthält und funktioniert als ein kreuzreagierender Ubiquitin-Antikörper (Blomstrom et al. 1986, Osiak et al. 2005).

Im Rahmen einer Studie zum Einfluss der Frizzled-9 Rezeptoren auf den murinen Knochenphänotyp, konnte ALBERS (Albers et al.) in Fzd9<sup>-/-</sup> Mäusen eine ebenfalls erheblich reduzierte Aktivität von Isg15 zeigen. Postulierend, dass der osteopore Knochentyp durch die Kombination beider herunterregulierter Gene entsteht, wurde eine Mauslinie die für Isg15 defizitär ist auf seinen Knochenphänotyp histologisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten einen osteoporotischen Knochenphänotyp mit einem verminderten BV/TV sowie eine reduzierte kortikale Dicke (Albers et al.).

Eine Verbindung dieses Gens auf den Knochen wurde vor den Versuchen unserer Arbeitsgruppe noch nicht untersucht.

Die geprüften Tiere waren 20 Wochen alt und weiblichen Geschlechts.

## 3.1.4 Src<sup>-/-</sup>

Src (C-src) ist ein Protein, eine Tyrosin-Kinase, die für die Signaltransduktion in verschiedenen Zellen verantwortlich ist (Boyce et al. 1992). Durch ihre Aktivierung werden unter anderem die Adhäsion, Wachstum, Bewegung und Differenzierung von Zellen beeinflusst (Tatosyan und Mizenina 2000). Es konnte zudem gezeigt werden, dass C-src bei der Kanzerogenese aktiviert ist (Lowe et al. 1993).

1991 wurde von SORIANO ein Mausmodell entwickelt, das eine homologe Deletion des Proto-Onkogens C-src aufwies. Die ersten Tiere verstarben bereits in einem jungen Alter aufgrund der sich entwickelnden starken Osteopetrose, die im Wachstum schon nach wenigen Tagen bis Wochen eine normale Nahrungsaufnahme unmöglich machte (Soriano et al. 1991). Die Erforschung von C-src war von entscheidender Bedeutung für das heutige Verständnis über den

Knochenstoffwechsel.

In C-src defizitären Mäusen sind Osteoklasten zwar intakt, jedoch aufgrund der Unfähigkeit, *ruffled borders* zu bilden, nicht in der Lage, den für die Knochenresorption notwendigen niedrigen pH-Wert innerhalb der Resorptionslakunen zu bilden. Dadurch ist der Knochenabbau gestört. Es kommt zu einer Entwicklung kürzerer Extremitäten mit einem partiellen Verlust des Knochenmarkes durch Verknöcherung der Knochenmark-Höhlen. Somit hat die Erforschung dieser Mäuse erheblich zu den Erkenntnissen über die interne und externe Funktion des Osteoklasten beigetragen. Bis zu der Arbeit von GÖTZEN hatte es keine biomechanische Analyse dieses Knochenphänotypen gegeben (Götzen 2006).

Um ein Fortschreiten der Verknöcherung im Alter beurteilen zu können, wurden 16 und 42 Wochen alte weibliche Mäuse geprüft.

## 3.2 Präparation und Konservierung

---

Die Materialprüfung wurde an explantierten Knochen geopferter Mäuse durchgeführt. Anschließend wurden unabhängig von der späteren Prüfmethode zwei unterschiedliche Methoden zur Konservierung der Knochen verwendet:

1. Direkt nach dem Töten der Tiere werden die explantierten Knochen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Diese Methode wurde für die Knochenproben der Src<sup>-/-</sup>-Mäuse und deren Wildtypkontrollen verwendet.
2. Nach dem Töten der Tiere erfolgt zur Konservierung initial eine Fixierung mit Formalin 2% für 2 Tage, später die Lagerung in 80%-Ethanol. Erst zur Materialprüfung wurden die Knochen explantiert. Die explantierten Knochen der ISG15<sup>-/-</sup>- und Krm2<sup>tg</sup>-Mäuse sowie deren Wildtypkontrollen wurden auf diese Weise konserviert.

Die Konservierungsmethode war innerhalb der einzelnen Prüfgruppen konsistent. In der Diskussion wird näher darauf eingegangen, ob sich unterschiedliche Konservierungsmethoden auf die biomechanischen Prüfungsergebnisse auswirken können.

## 3.3 Mikrocomputertomographie

---

Bei dem hier beschriebenen Mikrocomputertomographen handelt es sich um ein  $\mu$ CT 40 der Firma SCANCO (Scanco Medical, Basserdorf (Schweiz)). Es kann Proben von einer Größe bis zu 36,5mm im Durchmesser und 80mm in der Länge messen. Dieses hochauflösende bildgebende System ist aus den Plänen von RUEGSEGGER et. al. 1996 entwickelt worden. Anders als in herkömmlichen CT-Scannern rotiert dabei die Probe in einem starren Röntgenfokus (small angle cone beam = Kegelstrahl). Der Detektor besteht aus einem CCD-Array mit 2048x256 Elementen und einem Abstand von 24 $\mu$ m. Die Datensätze haben eine maximale Auflösung von 2048x2048x1500 Pixel in 16bit Graustufen. Die isometrische Voxel-Auflösung beträgt 10 $\mu$ m (Ruegsegger et al. 1996).

Die Mikrotomographie bietet viele Vorteile. Es ist eine nicht-invasive Technik und die gescannten Proben können im Gegensatz zu einer histologischen Analyse anschließend mit anderen Untersuchungsmethoden weiter analysiert werden (Ruegsegger 2001, Muller et al. 1998, Delling et al. 1995, Feldkamp et al. 1989).



Abb. 3-1: SCANCO  $\mu$ CT40

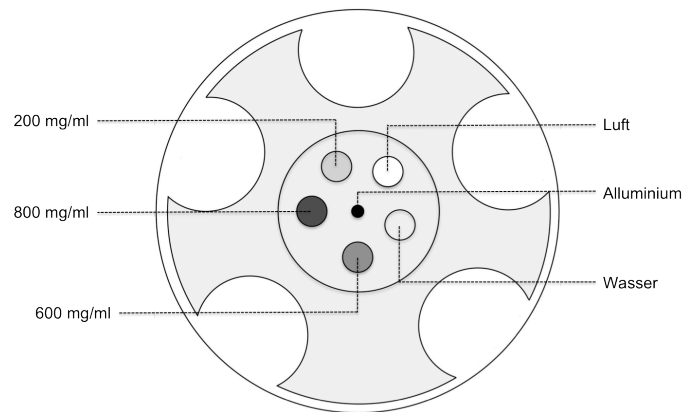
## 3.3.1 Mineralisationsanalyse

Ähnlich bedeutend wie die Kenntnis über die knöchernen Strukturparameter und die biomechanische Belastbarkeit eines Prüfkörpers ist für die Charakterisierung eines Knochenphänotypen das Wissen über seinen Mineralisationsgrad. Wie bereits eingangs beschrieben, beeinflusst der Knochenmineralsalzgehalt die Belastbarkeit des Knochengewebes.

Der Goldstandard zur Analyse der Mineralisationsdichte war lange Zeit das „Veraschen“ von Knochen, um den Mineralisationsgrad zu messen. Dabei versteht man unter dem Parameter *Bone Mineral Density* (BMD) das Verhältnis des Gewichts der aus der Verbrennung des Knochens gewonnenen Asche zu dem Gesamtgewicht der gemessenen Knochenprobe (Kastl et al. 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist die Destruktion des Körpers, der damit nicht für weitere Analysen genutzt werden kann.

Das  $\mu$ CT stellt eine zerstörungsfreie Alternative zur Messung der Mineralsalzdichte eines Knochens dar. Basierend auf den Graustufenwerten eines Scans ist es möglich jedem Bildpunkt einer CT-Aufnahme einen Dichtewert zuzuweisen. BURGHARDT (Burghardt et al. 2008) und NAZARIAN (Nazarian et al. 2008) konnten in ihren Studien beweisen, dass die Ergebnisse der  $\mu$ CT-Analysen mit den Ergebnissen der Veraschung linear korrelieren.

Um eine Mineralisationsanalyse mit dem  $\mu$ CT durchführen zu können, müssen die Proben zuerst mit Hilfe eines Standard (Phantom) geeicht werden. Das von uns zur Dichtemessung verwendete Phantom beruht auf dem von GOETZEN für den Wirbelkörper der Maus vorgestellten System und wurde analog dazu für die Scannung von Femora angepasst. Es befindet sich jeweils im zentralen zylindrischen Strahl des Probenhalters. Das Phantom besteht aus fünf Kammern, von denen drei mit Granulat verschiedener Hydroxyapatit-Konzentration (QRM GmbH, Möhrendorf, Deutschland) gefüllt sind, die beiden verbleibenden Kammern mit Wasser und Luft (Abb. 3-2). Durch eine standardisierte Auswertung dieser Bereiche ergibt sich eine lineare Eichkurve, mit deren Hilfe man den Knochenmineralsalzgehalt der Knochen errechnen kann.



**Abb. 3-2:** Mineralisationsphantom für das  $\mu$ CT

Das in dieser Arbeit verwendete System hat den Vorteil, dass es im selben Scanvorgang sowohl das Phantom als auch die Knochen misst. In anderen Konstruktionen müssen separate Scan-Vorgänge durchlaufen werden und erst im Nachhinein können dann Proben- und Phantomdaten zusammengeführt werden. Zusätzlich ist in das von GÖTZEN entwickelte System ein zentraler Aluminiumstab integriert, der die Aufhärtung des Strahlenkegels („*beam hardening*“) durch unterschiedliche Knochendichten verhindert, indem er Streustrahlung absorbiert (Götzen 2006).

## 3.4 Experimentelle Biomechanik

---

Die biomechanische Prüfung der Knochenproben wurden mit Hilfe einer Zwick Prüfmaschine (Modell Z2.5/TN1S, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) und speziell für die Belastung muriner Knochen konstruierte Prüfvorrichtungen wie unten beschrieben durchgeführt. Der hier verwendete Kraftaufnehmer hat eine Belastungsgrenze von 200N (Angewandte System Technik GmbH, Dresden, Deutschland).

Die Protokollierung der biomechanischen Parameter und Prüfabläufe erfolgte durch die von Zwick entwickelte *TestExpert*-Software (Version 10.1). Es wurden die Maximalkraft, die Steifigkeit des Knochens, die absorbierte Energie sowie die entsprechenden Durchbiegungen der einzelnen Proben ermittelt.

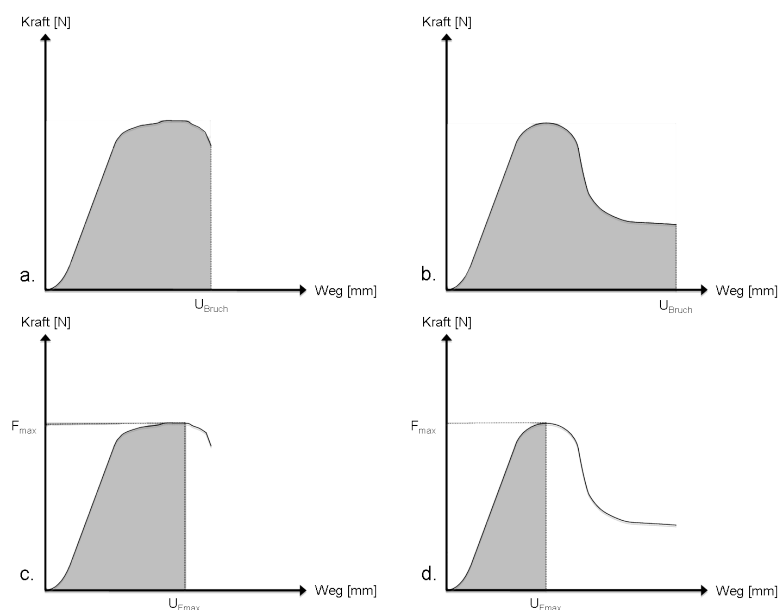
Die mechanische Belastbarkeit von Knochen ist als ein Ergebnis seiner Struktur und

Materialeigenschaften zu verstehen. Um die biomechanischen Prüfergebnisse besser zu verstehen, wurden die Knochenproben vor jeder biomechanischen Prüfung im  $\mu$ CT gescannt. Mit Hilfe der dadurch gewonnenen morphometrischen Parameter und Mineralisationsdichtewerten konnten die Ergebnisse der Materialprüfung interpretiert werden. Durch die speziell für diese Messungen angefertigten Probenhalter konnten jeweils fünf Knochen gleichzeitig gescannt werden.

Im Rahmen der biomechanischen Charakterisierung muriner Knochenphänotypen wurden die beiden in unserer Arbeitsgruppe für die biomechanische Charakterisierung verwendeten und etablierten Prüf-Methoden (3-Punkt-Biege- und Kompressionsprüfung) angewendet. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde stets dasselbe vordefinierte Prüfprotokoll für die Materialprüfung eingehalten.

## 3.4.1 Energieaufnahme

Der zur Beschreibung der Energieabsorption verwendete Parameter ist in der Materialprüfung normalerweise „*Work to Failure*“ ( $W_{Fail}$ ). Er ist definiert als die Fläche unterhalb der Prüfkurve bis zum Erreichen des Materialversagens innerhalb des Kraft-Weg-Diagramms (Abb. 3-3) (Magnus und Müller-Slany 2005). Jedoch nur mit Erreichen eines abrupten Materialbruches kann dieser Messwert ausgewertet werden.

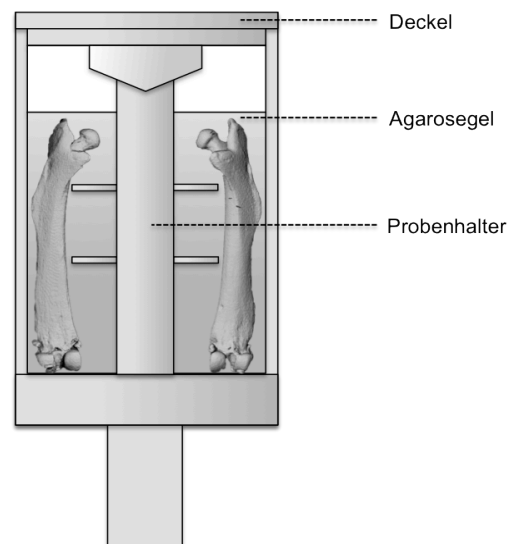


**Abb. 3-3:** Vergleichende Darstellung der Energieauswertung, Die grau unterlegten Flächen stellen jeweils  $W_{Fail}$  (a) und  $W_{rm}$  (c) bei der Femurprüfung, sowie  $W_{Fail}$  (b) und  $W_{rm}$  (d) bei der Wirbelkörperprüfung dar.

Die Prüfsoftware TestXpert liefert hingegen einen möglichen im Alltag bisher nicht angewandten Parameter mit.  $W_{rm}$  ist die Energie die ein Prüfkörper bis zum Erreichen der Maximalkraft aufgenommen hat. Ein Materialversagen ist hier nicht erforderlich.

## 3.4.2 3-Punkt-Biegungsprüfung

Um mögliche Bewegungsartefakte sowie ein Austrocknen der Knochen während der Bildgebung zu verhindern, wurden die Knochen zusammen mit dem Probenhalter in Agarosegel eingebettet (Abb. 3-3).



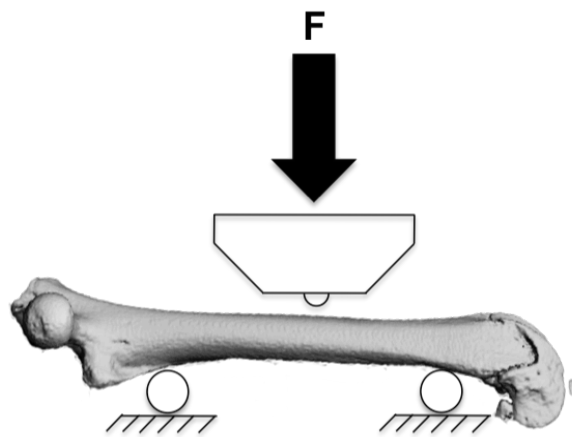
**Abb. 3-4:** Schematische Darstellung des Femurprobenhalters

Wie bereits zuvor beschrieben wird bei dieser Prüfmethode der Knochen auf zwei Auflagern liegend vertikal in seiner Mitte bis zum Versagen belastet (Abb. 3-4). Ähnlich der Kompressionsprüfung werden die aufgebrachte Kraft und der Weg durch die Maschine aufgezeichnet (Turner und Burr 2001).

KUMMER und GÖTZEN (Kummer 2007) entwickelten eine Biegevorrichtung mittels *Computer Aided Design* (Rhinoceros 3.0 - McNeel North America, Seattle, USA), die eine Messung mit verschiedenen Abständen der Auflager (unten mit den Abständen 5, 6 und 7mm, oben für die Vierpunktbiegung in einem Abstand von 3, 4 und 5mm oder die reine Dreipunktbiegung) abhängig von der zu prüfenden Knochengröße ermöglicht. Dabei sind die oberen Auflager rotationsgelagert, so dass es zu einer den

geometrischen zum Teil unebenen Gegebenheiten des Knochens angepassten möglichst parallelen (4-Punkt-Biegung) oder vertikalen (3-Punkt-Biegung) Krafteinwirkung kommen kann.

Die unteren Auflager sind auf einem speziell gefertigten X-Y-Tisch befestigt (Kugellager und Schienen: SKF GmbH, Schweinfurt, Deutschland) und erlauben es, das System automatisch so zu positionieren, dass die unteren Auflager im Verhältnis zu den oberen in der Belastungsebene stehen.



**Abb. 3-5:** Schematische Femurprüfung in der 3 Punkt-Belastung

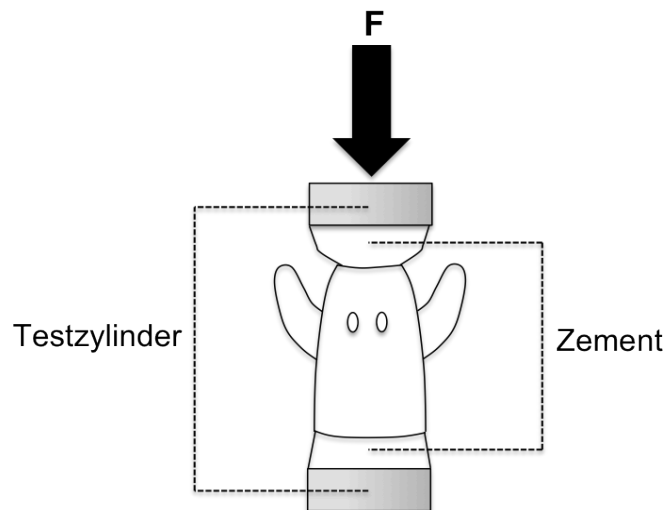
Das Prüfprotokoll der 3-Punkt-Biegebelastung beinhaltet das Halten einer Vorkraft von 1N für 3 Sekunden vor Beginn der eigentlichen Prüfung, um eine homogene Ausrichtung des Femurs zu ermöglichen. Die Prüfungsgeschwindigkeit betrug 3mm/min. Als Abschaltswelle (erfolgreicher Bruch) wurde eine Reduzierung der Maximalkraft um mehr als 50% definiert. Die Kraftgrenze der Materialprüfung wurde mit 100N definiert. Der untere Auflagerabstand betrug 7mm.

### 3.4.3 Kompressions-Prüfung

In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit wurden die Deckplatten und Processi Spinosi nicht entfernt (Abb. 3-5). GÖTZEN hat mit seiner Arbeit eine Art der Prüfung etabliert mit der es ermöglicht ist, Wirbelkörper als Gesamtorgan ohne schwerwiegendere mechanische oder chirurgische Einflussnahme zu untersuchen. Dazu wird ein Wirbelkörper zwischen zwei Schichten von Zwei-Komponenten-Zement eingebettet, der die kaudale und craniale Deckplatte bedeckt und der Kraftübertragung dient. Die

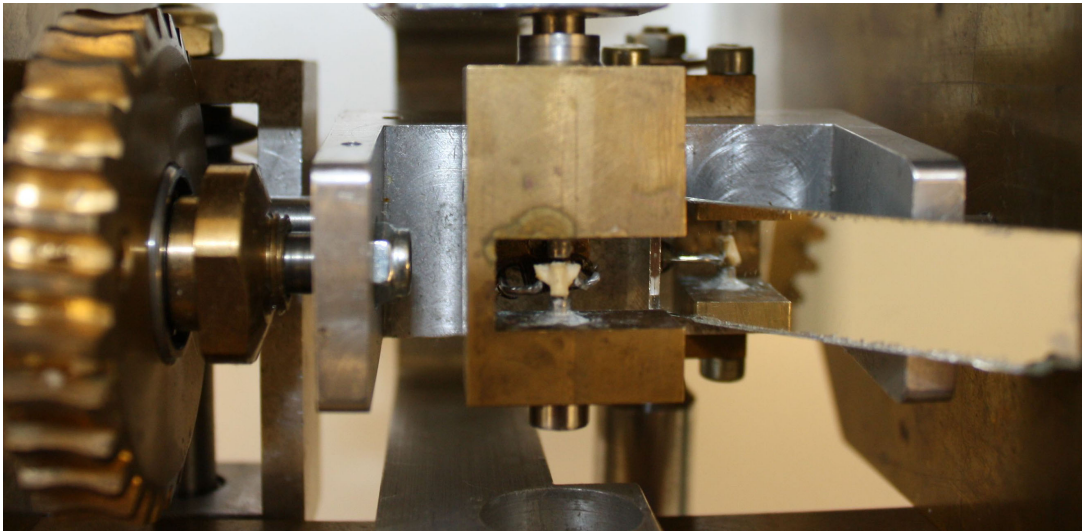


Kraftübertragung findet über zwei extra angefertigte Zylinder statt. Zur Prüfung wurden lumbale Wirbel (LWS 4-6) ausgewählt und freipräpariert, da diese die größten Wirbel des murinen Organismus darstellen und sich dadurch besser zur biomechanischen Analyse eignen. Es wurden die Bandscheiben, sowie umliegendes Bindegewebe und Muskulatur entfernt (Götzen 2006).



**Abb. 3-6:** Schema einer Wirbelkörperkompressionsprüfung

Das Einbringen der Wirbelkörper zwischen die Zylinder findet mit Hilfe eines sonderangefertigten Mikro-Positionierungs-Konstrukts statt. Die frei präparierten Wirbelkörper werden zwischen zwei Drahtspannen fixiert (Abb. 3-6). Dort können sie in 5 Freiheitsgraden bewegt und positioniert werden (X-, Y-, Z-Achse, laterale Rotation in den X-Y-Achsebene und sagittale Rotation in Y-Z-Achsebene). Um das Fixieren der Wirbelkörper möglichst genau zu ermöglichen, wurde der Arbeitsschritt durch ein Bifokales-Mikroskop (Zeiss, Stemi 2000-C) bei 6,5-facher Vergrößerung verfolgt. Außerdem kann ein kleiner Spiegel (45 Grad zur Arbeitsebene) so bewegt werden, dass eine gleichzeitige laterale Beurteilung und Korrektur der Ausrichtung des Wirbelkörpers möglich ist (Windolf 2003).



**Abb. 3-7:** Mikro-Positionierungsinstrument für Mäuse-Vertebrae. Der Wirbelkörper ist zwischen zwei Klammern fixiert, die Deckplatten sind zentral auf die Prüfzylinder ausgerichtet (ober- und unterhalb des Wirbelkörpers). Rechts sieht man einen Spiegel zur gleichzeitigen Beurteilung der seitlichen Ausrichtung.

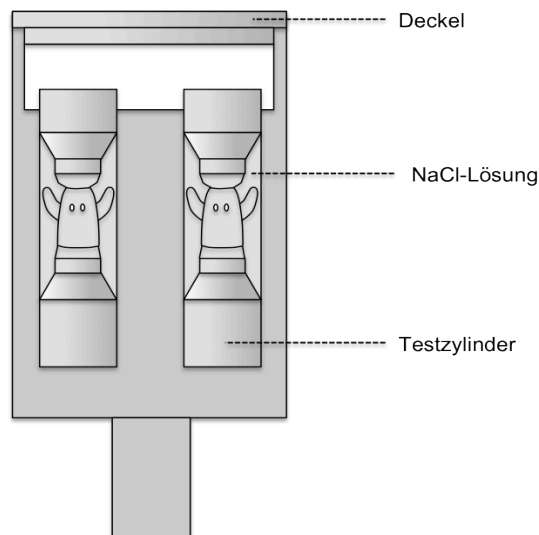
GÖTZEN verwendete für die Knochen-Zylinder-Verbindung einen unter Kaltlicht aushärtenden Zwei-Phasen-Komponenten-Kleber wie er auch in der Kieferheilkunde eingesetzt wird. Dieser Stoff besticht durch seine kurze Aushärtungszeit und sehr gute Haftungseigenschaften. Allerdings ist man in der Zahnheilkunde darauf bedacht, dass die neu eingebrachten Materialien in späteren Röntgenkontrollen stets gut zu sehen und beurteilen sind. Dafür sind diese Zement-Arten absichtlich besonders röntgendicht, was in den Bilddaten des Scans in der Übergangszone zwischen Zylinder und Knochen zu Artefaktbildung führen kann (Götzen 2006).

Deshalb wurde in dieser Arbeit mit iCem Self Adhesive (Heraeus Kulzer GmbH) ein anderer Kleber verwendet, der trotz geringerer Röntgendichte die gleichen mechanischen Eigenschaften wie der von GÖTZEN verwendete Verbundstoff aufweist. Dabei handelt es sich um einen thioxtopen röntgentransluminenten Kleber mit hoher Viskosität, der aufgrund der geringeren Röntgendichte eine Differenzierung der einzelnen Materialien ohne Artefakte in den Bilddaten des  $\mu$ CT vereinfacht. Vor der Applikation wurde der 2-Phasen-Kleber in einem Verhältnis 50:50 vermischt bis eine homogene visköse Masse entstanden war. Diese wurde in Form von kleinen Tropfen an den Endflächen der Zylinder angebracht. Danach wurden diese an den Wirbelkörper herangefahren, so dass es zu einer Verbindung zwischen den drei Zylindern und dem Knochen kam. Wichtig war hierbei, dass darauf geachtet wurde, dass der Zement lediglich die Endplatte bedeckte und möglichst weitere Bestandteile des Wirbels ausgespart waren, um so eine optimale und physiologische Belastung des Wirbels zu ermöglichen. Gleichzeitig wurden die Deckplatten der Wirbelkörper

parallel zu den Zylindern positioniert, um eine Fehlrotation oder Verkantung zu vermeiden.

Nach korrekter Einbringung wurde der Zement mit Hilfe einer Kaltlichtlampe (Zeiss, KL 15000 LCD) für 3 Minuten ausgehärtet. Nachdem es zu einer festen Verbindung zwischen den Körpern gekommen war, wurde der so entstandene Verbund in den Sample-Holder eingebracht.

Ein von GÖTZEN eigens angefertigter Spezialbehälter aus festem Acryl ist in fünf zylindrische Slots unterteilt, in denen die vorbereiteten Wirbelkörper sicher und fest Platz finden können (Abb. 3-7). Um eine Austrocknung der Proben während des Scannens zu verhindern, werden die Kammern mit physiologischer Kochsalzlösung geflutet (Götzen 2006).



**Abb. 3-8:** Schematische Darstellung des Wirbelkörperprobenhalters

GÖTZEN konnte in seiner Arbeit zeigen, dass in der Auswertung der biomechanischen Parameter die Reibungskräfte zwischen Zylindern und umgebenem Acrylmaterial vernachlässigt werden können (Götzen 2006).

Es wurde für jede Versuchsreihe dasselbe Versuchsprotokoll verwendet, um aufgrund des visko-elastischen Verhaltens von Knochen vergleichbare Daten zu erhalten. Anders als bei der Biegeprüfung kommt es jedoch nicht zu einem plötzlichen Bruch des gesamten Knochens sondern vielmehr zu einer Komprimierung des Wirbels durch Mikrofrakturierung der trabekulären Strukturen. Daher wurde zusätzlich als Beendigung des Prüfverfahrens die Zusammenstauchung des Wirbels von mehr als 2mm definiert. Die obere Kraftschwelle war mit 180 Newton festgelegt.

## 3.5 Statistik

---

Die gemessenen Werte wurden mit SPSS 14.0 (Chicago, Illinois) statistisch ausgewertet. Mit Annahme, dass es sich dabei um Stichproben aus normalverteilten Maus-Populationen handelt, wurde zur Analyse Two-Way-Anova-Analysen bzw. der Students-T-Test mit dementsprechender Anpassung verwendet, um somit einen Signifikanz-Verlust zu verhindern. Als statistisch signifikant wurde vorab ein p-Wert von 0,05 definiert.

## 3.6 Finite-Elemente-Software

---

Zur Analyse von Spannungsverteilungen innerhalb des Prüfkörpers, seiner Verbiegung und seiner Biegesteifigkeit wurde die Finite-Elemente-Software *Ansys* (Version 10.1 – Ansys Inc., Canonsburg, USA) benutzt. Dabei handelt es sich bei der Finite-Elemente-Methode um ein numerisches Verfahren zur virtuellen Annäherung von Kraftentwicklungen und Verformungen bzw. Errechnung biomechanischer Parameter innerhalb eines dreidimensional im Computer dargestellten Körpers. Die Software bildet den gesamten Prüfkörper durch endliche Anzahl untereinander in Verbindung stehender kleinster Tetraeder nach. Diesen Kleinstkörpern werden die Materialeigenschaften des gesamten Körpers zugewiesen. Dadurch können alle Kräfte innerhalb des Körpers virtuell abgeschätzt und simuliert werden.

Dieses Verfahren wird in vielen wissenschaftlichen Bereichen eingesetzt. So ist es ein fester Bestandteil in der Entwicklung von Automobilen und Flugzeugen.

## Ergebnisse

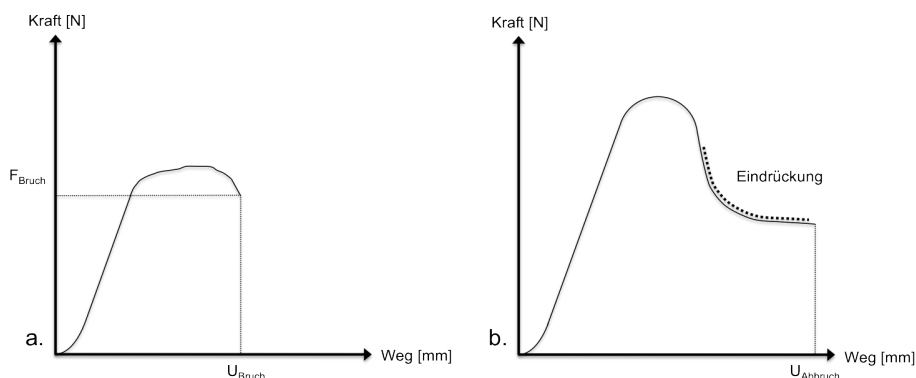
Die numerischen Ergebnisse der im kommenden Kapitel zum Teil graphisch zusammengefassten Daten sind im tabellarischen Anhang ab Seite 64 im Detail nachzulesen.

### 4.1 Experimentelle Biomechanik

---

#### 4.1.1 Prüfkurven

Der Vergleich der Kurvenverläufe der Kraft-Weg-Diagramme beider Prüfmethoden zeigt einen deutlichen Unterschied auf (Abb. 4-1). Während der Biegeprüfung der Femora kommt es im Bereich der plastischen Verformung zum Erreichen der Maximalkraft und wenig später zum Materialversagen und Bruch des gesamten Knochens. Bei der typischen Kompressionsprüfung eines Wirbelkörpers hingegen ist der schematische Kurvenverlauf anders geartet. Nach Erreichen der Maximalkraft kommt es nicht zu einem abrupten Materialversagen sondern zuerst zu einer Kompaktierung bzw. Stauchung des Wirbelkörpers durch Ausbildung von Mikrofrakturen innerhalb des trabekulären Systems.



**Abb. 4-1:** Kraft-Weg-Diagramm beider Prüfverfahren. Kurve [a] stellt den typischen Kurvenverlauf einer Biegeprüfung eines Femurs dar. Graphik [b] hingegen zeigt den schematischen Kurvenverlauf einer typischen Kompressionsprüfung eines Wirbelkörpers. Gemäß dem Prüfprotokoll wird der Bruch abgebrochen, wenn die maximale zulässige Eintauchung erreicht wird (2mm). Wirbelkörper weisen in der Kompressionsprüfung eine größere Belastbarkeit auf als Femora unter Biegebelastung.

## 4.1.2 Energieaufnahme

Wie zuvor beschrieben konnte der bisher etablierte Wert für absorbierte Energie,  $W_{\text{Fail}}$ , nicht für die Kompressionsprüfung verwendet werden. Zwar konnte bei allen Biegeversuchen dieser Wert ermittelt werden, bei der Kompressionsprüfung der Wirbelkörper war jedoch die Ausfallquote deutlich höher (17%), weshalb nicht bei allen Proben  $W_{\text{Fail}}$ -Werte berechnet werden konnten.

Der neue Prüfparameter,  $W_{\text{rm}}$ , ließ sich dagegen bei allen biomechanischen Versuchen ermitteln.

## 4.2. Mausmodelle

---

### 4.2.1 Knochenmorphologie

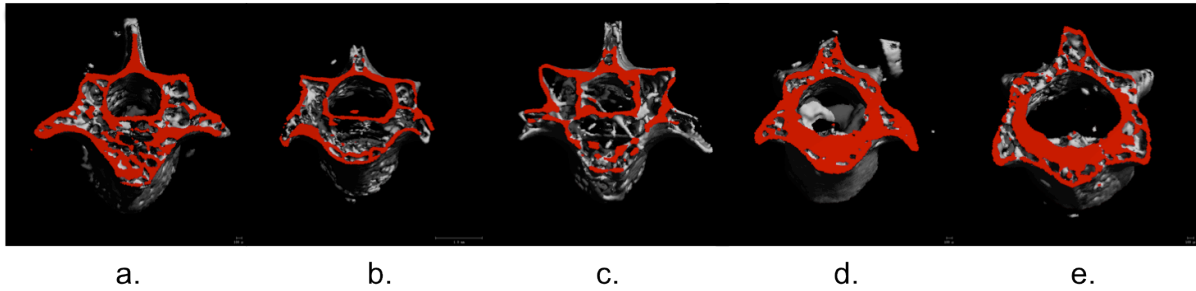
In den vor der Prüfung durchgeführten Scans zeigte sich ein deutlicher Unterschied des Knochenphänotyps zwischen den einzelnen Mausgruppen. Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits alle Gruppen histomorphometrisch analysiert worden (Albers et al., Schulze und Seitz S 2010, Götzen 2006). Vergleicht man diese Daten, entsprechen die dreidimensionalen Bilddaten des  $\mu\text{CTs}$  den Auswertungsergebnissen (Abb. 4-3).

C57BL/6: Diese Mausgruppe dient als Wildtypkontrolle.

Isg15<sup>-/-</sup>, Krm2<sup>tg</sup>: Es zeigt sich eine deutliche Reduzierung der trabekulären Strukturen. Dieses Mausmodell stellt ein Knochenmasseverlustsyndrom im Sinne einer Osteoporose dar. Kortikale Strukturen sind weniger betroffen.

Dabei stellt sich Krm2<sup>tg</sup> als der stärker ausgeprägte Phänotyp dar.

Src<sup>-/-</sup>: In den Src<sup>-/-</sup> Mäusen kommt es im Sinne einer starken Osteopetrose zu einer Verknöcherung. Diese ist so stark, dass kaum eine klare Grenze zwischen Kortikalis und Spongiosa gezogen werden kann.



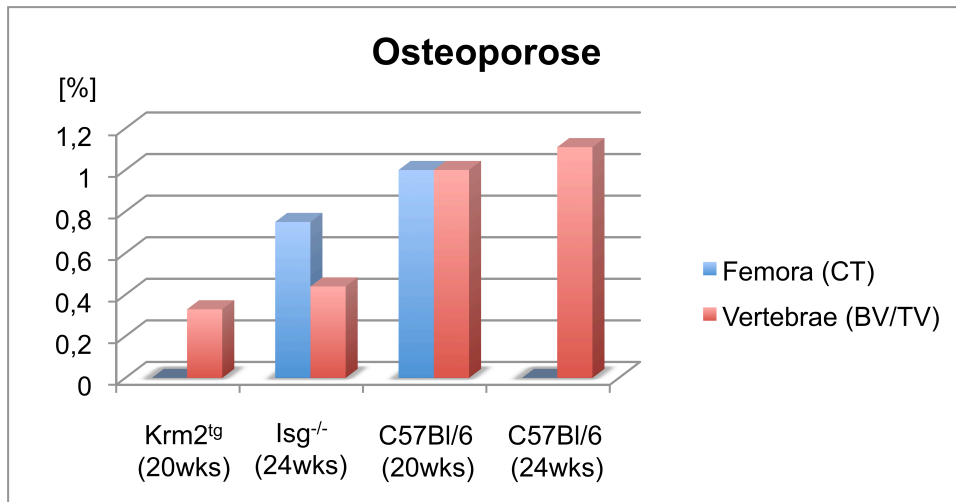
**Abb. 4-2:**  $\mu$ CT Scans der verschiedenen Mausmodelle: [a] C57Bl/6 16 Wochen, [b]  $Isg15^{-/-}$ , [c]  $Krm2^{tg}$ , [d]  $Src^{-/-}$  16 Wochen, [e]  $Src^{-/-}$  42 Wochen

Mit Zunahme des für die mechanische Belastbarkeit entscheidenden Parameters des jeweiligen Knochentyps (Wirbelkörper =  $BV/TV$ , Femur = Kortikale Dicke / CT, Mineralisation) wurde eine entsprechende Zunahme der Belastbarkeit erwartet. Mit Hilfe dieser Annahme wurde eine Rangfolge jeweils für das Osteoporose- und das Osteopetrose-Modell erstellt (Abb. 4-3, Abb. 4-4).

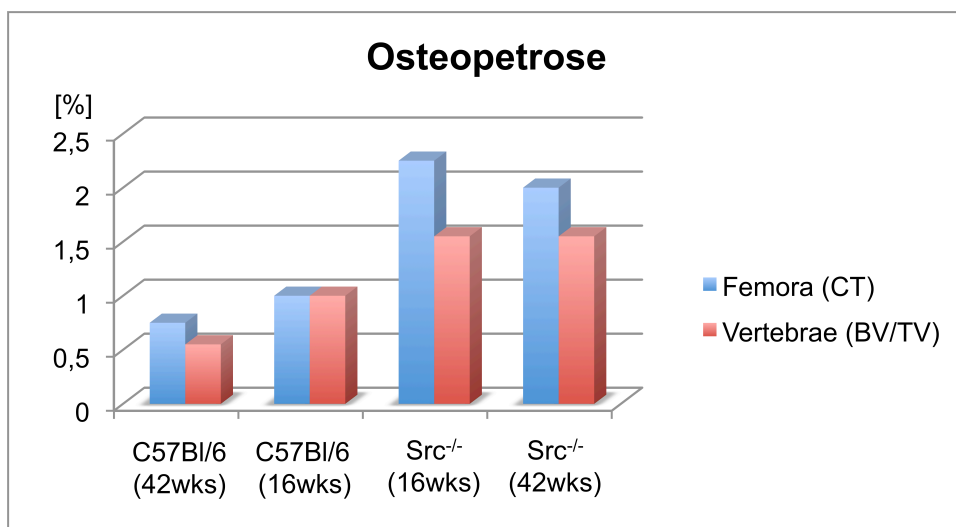
Diese Reihenfolge wird in der Darstellung der folgenden Ergebnisse beibehalten, um eine Korrelation der Daten mit der Erwartung zu überprüfen.

Sowohl innerhalb der Osteoporose- als auch der Osteopetrose-Gruppe gab es zwei Wildtypkontrollen unterschiedlichen Alters. Dies ist dem Fakt geschuldet, dass die einzelnen genetisch modifizierten Mausfamilien unterschiedlich alt geprüft wurden (s.o.). Dadurch ist eine sehr heterogene Gruppierung und Altersverteilung entstanden. Um das Vergleichen der Ergebnisse zu vereinfachen, wurde im Fall der osteoporotischen Prüfreihe beliebig eine der beiden Wildtyp-Mausgruppen als Referenzgruppe ausgewählt (20 Wochen C57Bl/6) und in der osteopetrotischen Prüfreihe die 16 Wochen alten Mäuse, da im Alter von 42 Wochen bereits ein Alters-induzierter Knochenabbau stattgefunden hatte.

Die diesen Mäusen zuzuordnenden Ergebnisse mit „1“ gleichgesetzt.



**Abb. 4-3:** Morphometrie bei Osteoporose. Verhältnisrangfolge der histomorphometrisch ermittelten Werte für BV/TV bzw. kortikale Dicke der osteoporotischen Mausmodelle.



**Abb. 4-4:** Morphometrie bei Osteopetrose. Verhältnisrangfolge der histomorphometrisch ermittelten Werte für BV/TV bzw. kortikale Dicke der osteopetrotischen Mausmodelle.



## 4.2.2 Mineralisation

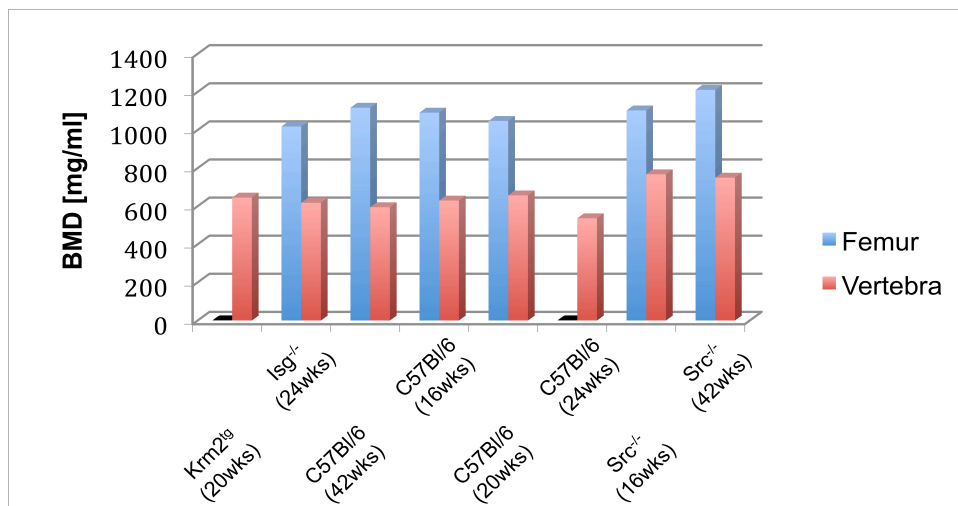
Bei der Analyse aller Proben zeigten sich signifikant niedrigere Mineralisationswerte für Wirbelkörper im Vergleich zu den Femora. Dieser Unterschied war unabhängig vom gemessenen Mausmodell (Abb. 4-5).

**C57BL/6:** Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Knochendichte der Wirbelkörper im Alter von 24 Wochen verglichen mit den anderen Altersgruppen der Wildtypkontrollen ( $p < 0,001$ ).

**Isg15<sup>-/-</sup>:** Es zeigte sich eine signifikante erniedrigte Mineralisation der Wirbelkörper im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ( $p < 0,001$ ).

**Krm2<sup>tg</sup>:** In dieser Prüfgruppe war eine Mineralisationsanalyse der Femora aufgrund von fehlenden Bilddaten nicht möglich. Die Mineralisation der Wirbelkörper entsprach dem der Wildtypkontrollen.

**Src<sup>-/-</sup>:** Es konnte ein signifikant erhöhter Knochenmineralsalzgehalt der Wirbelkörper der src-defizitären Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen im Alter von 42 Wochen gezeigt werden ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 4-5:** Knochenmineralsalzdichte der Mausmodelle: Durchschnittliche Knochenmineralsalzdichte in mg/ml Hydroxylapatit der gemessenen Proben.

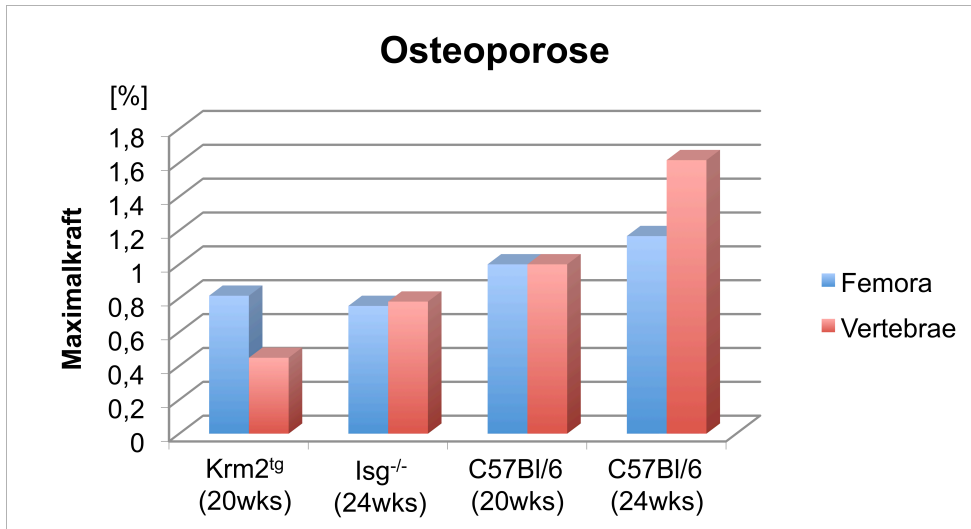
## 4.3 Biomechanische Prüfung

---

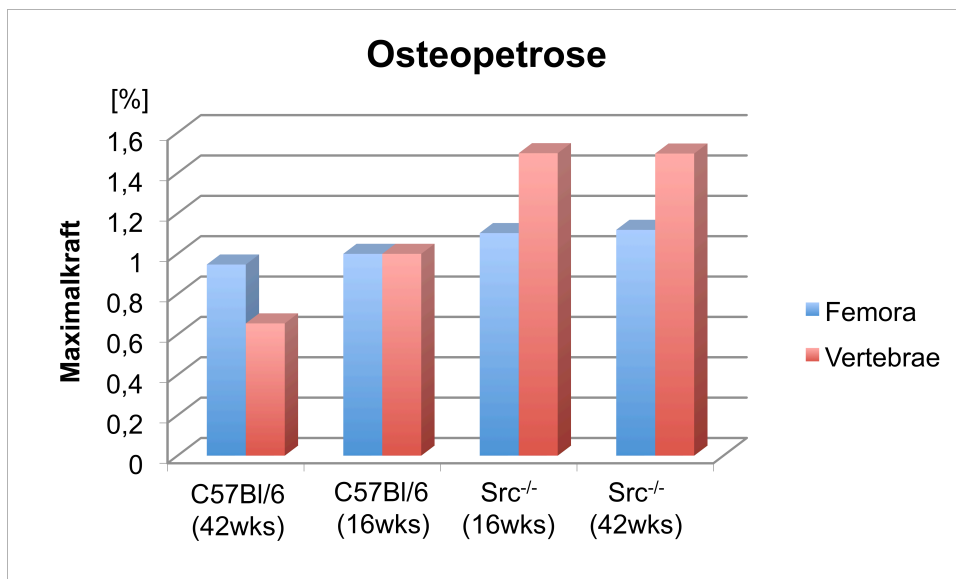
### 4.3.1 Maximalkraft

Die Ergebnisse der Materialprüfung werden in den Abbildungen 4-6 und 4-7 graphisch dargestellt.

- C57BL/6: Es zeigte sich keine altersabhängige Veränderung der Maximalkraft bei Auswertung der Ergebnisse der Biegeprüfung. Die Kompressionsprüfung zeigte eine signifikante Erhöhung der Maximalkraft im Alter von 24 Wochen im Vergleich zu den 20 Wochen alten Tieren ( $p = 0,0011$ ).
- ISG15<sup>-/-</sup>: Beide Messverfahren zeigten eine signifikante Verringerung der Maximalkraft der Knock-Out Mäuse im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ( $p < 0,001$ ).
- Krm2<sup>tg</sup>: Beide Messverfahren zeigten eine signifikante Abnahme der Maximalkraft der transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ( $p < 0,001$ ).
- Src<sup>-/-</sup>: Die Wirbelkörperfestung in dieser Gruppe zeigte unabhängig vom Alter der Testtiere eine signifikant erhöhte Belastbarkeit (16 Wochen,  $p = 0,012$ ; 42 Wochen,  $p < 0,001$ ). Die Biegeprüfung hingegen ergab keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 4-6:** Ergebnisse: Maximalkraft bei Osteoporose. Durchschnittliche Belastbarkeit der osteoporotischen Mausmodelle, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.

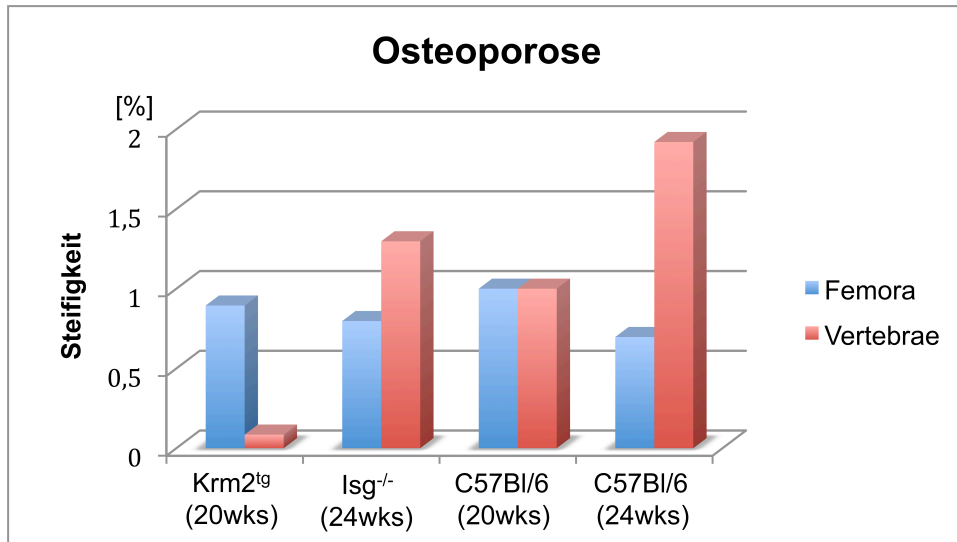


**Abb. 4-7:** Ergebnisse: Maximalkraft bei Osteopetrose. Durchschnittliche Belastbarkeit der osteopetrotischen Mausmodelle, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.

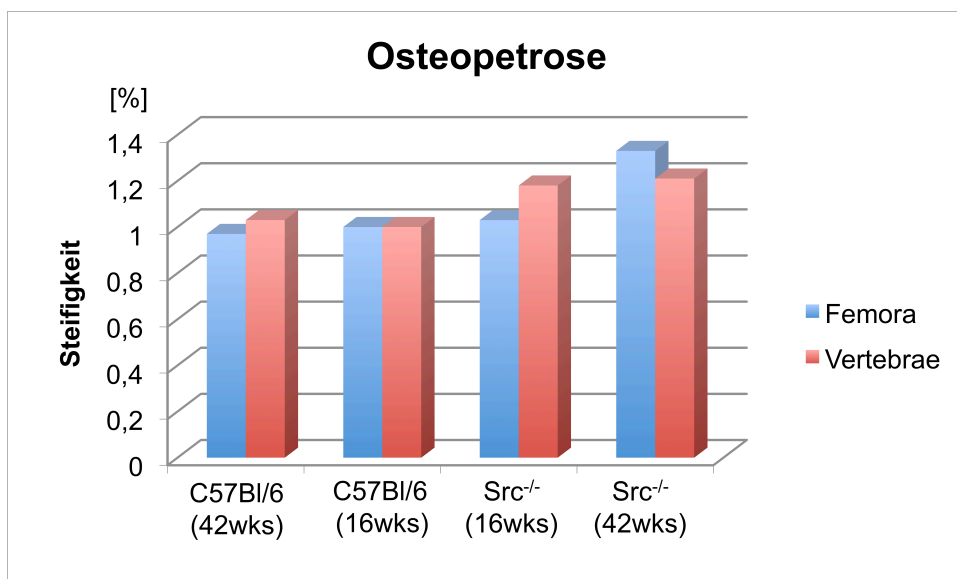
## 4.3.2 Steifigkeit

Die Ergebnisse der Materialprüfung werden in den Abbildungen 4-8 und 4-9 graphisch dargestellt.

- C57BL/6: Die Steifigkeit der 24 Wochen alten Tiere im Kompressionsversuch ist im Vergleich zu den 20 Wochen alten Mäusen signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). In der Biegeprüfung zeigte sich keine signifikante Veränderung der Steifigkeit im Verlauf der Alterung.
- Isg15<sup>-/-</sup>: Es bestand kein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollen.
- Krm2<sup>tg</sup>: Die Vergleiche zwischen den Wirbelkörpern ergaben eine signifikante Reduzierung im Vergleich zu den Wildtykontrollen ( $p = 0,004$ ). Dieser Unterschied zeigte sich jedoch nicht bei der Femurprüfung.
- Src<sup>-/-</sup>: In beiden Altersgruppen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.



**Abb. 4-8:** Ergebnisse: Steifigkeit bei Osteoporose, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.

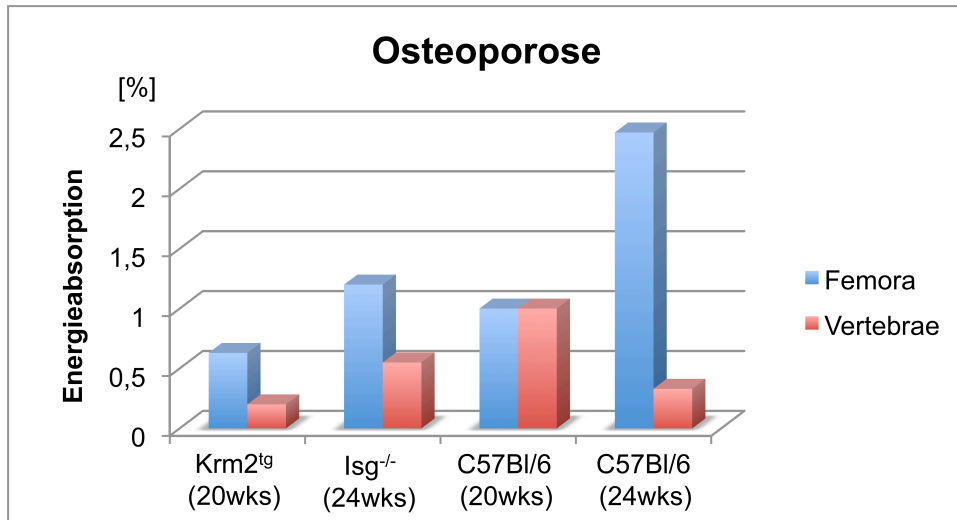


**Abb. 4-9:** Ergebnisse: Steifigkeit bei Osteopetrose, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.

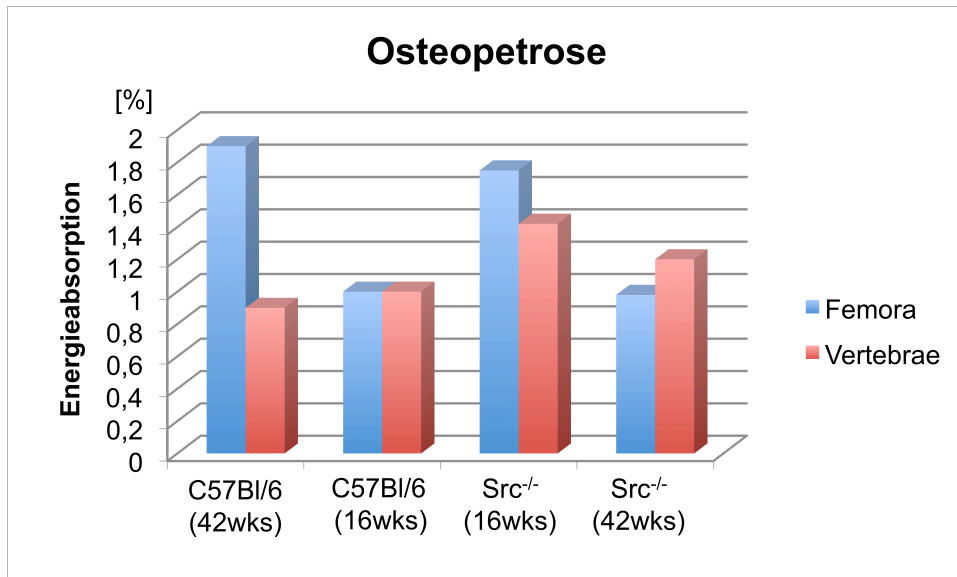
## 4.3.3 Energieabsorption

Die Ergebnisse der Materialprüfung werden in den Abbildungen 4-10 und 4-11 graphisch dargestellt.

- C57BL/6: In der Femurprüfung zeigte sich eine signifikante Zunahme der absorbierbaren Energie bis zum Erreichen der Maximalkraft zwischen den 20 und 24 Wochen ( $p < 0,001$ ) alten Tieren. Die Kompressionstestung der Wirbelkörper der selben Tiere wiesen jedoch im Alter von 24 Wochen eine signifikant geringere Maximalkraft auf ( $p = 0,001$ ).
- Isg15<sup>-/-</sup>: Die Werte der Knock-out Mäuse waren erniedrigt jedoch nicht signifikant.
- Krm2<sup>tg</sup>: Für beide Prüfmethode zeigte sich eine signifikant erniedrigte Energieaufnahme ( $p = 0,005$ ).
- Src<sup>-/-</sup>: Im Alter von 42 Wochen zeigte sich eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,001$ ) nach Auswertung der Ergebnisse der Kompressionsprüfung und eine signifikante Reduzierung ( $p = 0,001$ ) der Energieaufnahme nach Durchführen der Biegeprüfung.



**Abb. 4-10:** Energieabsorption bei Osteoporose. Durchschnittliche Energieabsorption der osteoporotischen Mausmodelle, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.



**Abb. 4-11:** Energieabsorption bei Osteopetrose. Durchschnittliche Energieabsorption der osteopetrotischen Mausmodelle, Reihenfolge anhand der zuvor bestimmten morphometrischen Rangfolge.

## 4.4 Vergleich der Prüfmethode

Da es in der biomechanischen Prüfung von Knochen noch keinen Goldstandard gibt, ist es nicht möglich die Richtigkeit der ermittelten Werte zu kontrollieren. Man kann lediglich versuchen die histologischen und mikro-computertomographischen Erkenntnisse in Einklang mit den biomechanischen Messergebnissen zu bringen und kritisch zu hinterfragen.

Um jedoch die Genauigkeit der Prüfungen zu ermitteln, ist eine Möglichkeit, deren Varianzen miteinander zu vergleichen. Da sich die Varianz jedoch immer aus dem Mittelwert errechnet, muss hier eine Normierung erfolgen. Mit Hilfe des Variationskoeffizienten ( $V_k$ ) ist eine solche Vergleichbarkeit möglich. Dieser statistische Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Standardabweichung zu dem Mittelwert. Je kleiner der Koeffizient ist, desto geringer ist auch die Varianz.

Der Vergleich der Variationskoeffizienten der beiden Prüfmethode ergab keinen signifikanten Unterschied mit Werten für die Biegebelastung von 0,1498 ( $\pm 0,042$ ) und 0,1488 ( $\pm 0,048$ ) für die Wirbelkörperprüfung (Abb. 4-12).

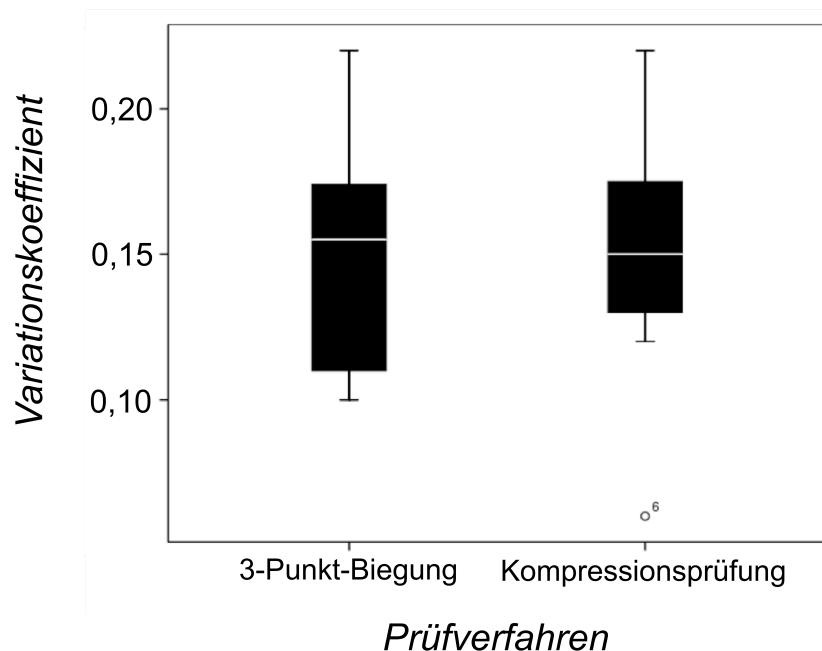


Abb. 4-12: Variationskoeffizienten der Prüfverfahren.



# Kapitel 5

## Diskussion

---

Dieses Kapitel setzt sich mit der Fragestellung und den Ergebnissen dieser Arbeit auseinander. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Wirbelkörper-Kompressionsversuch mit dem Femur-Biegeversuch zu vergleichen und zu überprüfen, ob eine alleinige Durchführung einer der beiden Prüfmethode zur Charakterisierung eines murinen Knochenphänotyps ausreichend ist.

Bei der Interpretation und dem Vergleichen der Prüfergebnisse müssen verschiedene Tatsachen mitberücksichtigt werden:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei mechanische Prüfmethode miteinander verglichen, die sich in ihrem Grundgedanken voneinander unterscheiden. Die Biegeversuche sind für einen langen Röhrenknochen wie das Femur unphysiologisch und folgerichtig ist dieser Knochen für eine solche Belastungsform nur sehr gering belastbar. Die Kompressionsversuche von Wirbelkörpern hingegen stellen eine für Wirbelkörper physiologische Belastungsform dar, für die dieser Knochen entsprechend ausgerichtet ist.

Zudem wurden mit den jeweiligen Prüfmethode unterschiedliche Knochenkompartimente miteinander verglichen. So wurde im Wirbelkörper primär die Belastbarkeit von spongiösen, im Femur von kortikalem Knochen geprüft.

Des Weiteren geht die mechanische Materialprüfung von homogenen Prüfkörpereigenschaften aus. Knochen ist jedoch ein inhomogenes, sich dynamisch veränderndes Kompositgebilde. Daher unterscheidet sich sein Prüfverhalten von dem homogener Proben.

## 5.1 Auswahl der zu analysierenden Parameter

---

Eine biomechanische Prüfung von Knochen liefert, wie zuvor beschrieben Kennwerte wie zum Beispiel Maximalkraft, Steifigkeit oder absorbierte Energie. Diese Parameter sind jedoch in der Regel Geometrie-abhängig bzw. können nur nach Analyse der knöchernen Strukturen und Berücksichtigung dieser Einflussgrößen analysiert und verstanden werden (van der Meulen et al. 2001, Davison et al. 2006). Ein Zusammenführen des Wissens über die biomechanische Belastbarkeit des Knochens und seinen strukturellen Aufbau ist notwendig, um eine umfassende Charakterisierung des Knochens zu erhalten. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage, welche Strukturparameter dabei berücksichtigt werden sollten.

### 5.1.1 Histomorphometrie

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass für kortikalen Knochen wie das Femur die kortikale Dicke (Turner 2002, Ammann et al. 1999, Crabtree et al. 2001, T 2007) für die biomechanischen Belastbarkeit von entscheidender Bedeutung ist. Dabei führt eine am Außenrand beginnende Ausdünnung (reduzierter Durchmesser) zu einer größeren Frakturgefährdung, als wenn eine ähnliche Dickenreduktion seinen Ursprung im Innern (gleichbleibender Außendurchmesser) hat (Seeman 2002).

Andere Studien konnten zeigen, dass für primär spongiöse Strukturen wie Wirbelkörper vor allem die trabekuläre Architektur (Parkinson und Fazzalari 2003, Keaveny 2001), ihrer Konnektivität (Goulet et al. 1994, Bell et al. 1967) und Dicke der trabekulären Elemente (Silva und Gibson 1997, Martin 1991) und in geringerem Ausmaße auch die kortikale Dicke (Link et al. 2000, Mosekilde und Mosekilde 1986) mit ihrer biomechanischen Belastbarkeit korreliert. Das bedeutet, vor allem eine Abnahme trabekulärer Strukturen und der damit assoziierten Parameter erhöht die Frakturanfälligkeit.

Diese Parameter können mit Hilfe unterschiedlicher Methoden gemessen werden. Nach wie vor stellt die Histomorphometrie (Parfitt 1988) den Goldstandard dar. Gleichwohl sind auch Analysen mit Hilfe von Microtomographie möglich (Judex et al. 2003, Ruegsegger et al. 1996). Ein Vorteil hierfür ist die reibungslosere und zerstörungsfreie Integration der micro-computertomographischen Analysen in den

Arbeitsablauf der Phänotypisierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Einklang mit GÖTZEN (Götzen 2006) und KUMMER (Kummer 2007) die kortikale Dicke und BV/TV der trabekulären Strukturen zur Quantifizierung der Femora bzw. der Wirbelkörper ausgewertet. Beide Studien konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Belastbarkeit der Knochenproben und der oben genannten Parameter zeigen.

## **5.1.2 Mineralisation**

CURREY konnte zeigen, dass für die mechanische Belastbarkeit von Knochengewebe nicht nur Strukturparameter von Bedeutung sind, sondern auch die Mineralisationsdichte. Es zeigte sich eine erhöhte Steifigkeit und Brüchigkeit aufgrund einer erhöhten Knochenmineralisationsdichte (Currey et al. 1996, Boskey 2001, Mosekilde et al. 1987). Diese Ergebnisse konnten in unserer Arbeitsgruppe sowohl für Femora- als auch Vertebra-Prüfung reproduziert werden (Götzen 2006). Damit stellt dieser Parameter weiterhin einen wichtigen Teil der Phänotypisierung des Knochens dar. Gleichwohl konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Kenntnis der Mineralisationsgrades keine absoluten Rückschlüsse auf die Belastbarkeit zulässt. Vielmehr muss die Knochenmineralisationsdichte als ergänzender Parameter verstanden werden. So ist zum Beispiel die erhöhte Steifigkeit der osteopetrotischen Mausmodelle wahrscheinlich zum Teil durch seine erhöhte Mineralisation zu erklären.

## **5.1.3 Auswahl der mechanischen Parameter**

Um die Ergebnisse biomechanische Belastbarkeit von Knochen unterschiedlicher Arbeitsgruppen miteinander vergleichen zu können, ist eine standardisierte Auswertung notwendig. Leider ist eine solche Einigung zwischen den einzelnen in diesem Bereich forschenden Arbeitsgruppen nicht üblich. Die möglichen auszuwählenden Parameter sind vielfältig, ihre Aussagekraft ebenso (Boskey et al. 2003).

In der experimentellen Forschung mit Tieren wird in der Regel mit sehr kleinen Gruppen gearbeitet, was eine statistische Auswertung ohnehin erschwert. Daher

sollte die Ausfallquote der Versuchstiere möglichst gering sein. Es galt daher in dieser Arbeit Parameter zu finden und zu verwenden, die für beide Prüfmethoden auswertbar und in ihrer Aussagekraft möglichst valide und reproduzierbar sind.

Klinisch relevante Parameter sind die maximale Kraft, die ein Körper aufnehmen kann, sowie seine Steifigkeit als Widerstandsparameter gegen Verformung. Eine Analyse der Streckgrenzen ist für den klinischen Alltag nur von geringer Bedeutung. Gleichmaßen ist die Analyse eines Spannungs-Dehnungsdiagramms aufgrund der den Knochen charakterisierenden Inhomogenität schwierig, die Aussagekraft mangelhaft (Ulrich et al. 1998).

Das Wissen über die absorbierbare Energie eines Prüfkörpers zusätzlich zu seiner maximalen Belastbarkeit ist von Interesse, da dieser Parameter anders als die erreichte Maximalkraft, stärker von der Knochenmineralisation beeinflusst wird.

### **5.1.3.1 Energieabsorption**

Erfreulicherweise kann mit dem neuen in dieser Arbeit verwendeten Prüfparameter  $W_{rm}$  alle Materialprüfungen dieser Arbeit ausgewertet werden (Ausfallquote 0%).

Vergleicht man zudem in allen valide auswertbaren Prüfdurchläufen, in denen sowohl  $W_{Fail}$  als auch  $W_{rm}$  auswertbar waren, die beiden Energieabsorptionsformen mit Hilfe einer Korrelationsanalyse nach Pearson, so zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation ( $p < 0,01$ ) von 0,899. Das bedeutet mit  $W_{rm}$  hat man einen Parameter gefunden, der in seiner Aussage mit denen des bereits etablierten Wertes  $W_{Fail}$  übereinstimmt und vergleichbare Ergebnisse liefert.

## **5.2 Auswahl der mechanischen Materialprüfmethode**

---

Zur biomechanischen Charakterisierung eines Knochenphänotypen ist die Auswahl des Knochens und der Prüfmethode von zentraler Bedeutung.

Die Auswahl der Prüfmethode kann nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen: Es kann eine optimale Reproduzierbarkeit gefordert sein. Gleichwohl kann die mechanische Prüfmethode größenlimitiert sein. Alternativ kann eine für die klinische Übertragbarkeit möglichst relevante Belastung der Knochen gefordert werden. Im

besten Fall vereint eine Materialprüfmethode alle genannten Charakteristika.

## **5.2.1 Reproduzierbarkeit mechanischer Prüfmethoden**

Reproduzierbare Ergebnisse lassen sich bei der Materialprüfung durch den Zugversuch ermitteln (Reilly et al. 1974). Allerdings ist hier die Probengröße von entscheidender Bedeutung. Es muss mindestens eine Probendicke von 4-8 mm erreicht werden. Eine ähnlich valide alternative Prüfmethode ist die Scherprüfung, die ebenfalls für kleinere Proben (5-10 mm Dicke) Verwendung findet (Turner und Burr 1993). Der Knochen wird hierbei als Komposit-Gebilde geprüft. Innerhalb des Knochens kommt es dabei zu unterschiedlichen Kraftentwicklungen (Tarnopolskii und Kintsis 1985). Eine weitere Alternative bieten Torsionsversuche, die sich auf die Prüfung ganzer Knochen beschränken. Sie wird häufig bei der Untersuchung von Nagetierknochen verwendet (Einhorn et al. 1992).

## **5.2.2 Größenunabhängige Prüfmethoden**

Alle im vorangegangenen Abschnitt aufgelisteten Prüfmethoden sind jedoch aufgrund ihrer Anforderungen an die Probengröße nur begrenzt einsetzbar und können somit in der Charakterisierung muriner Knochen nicht verwendet werden.

Wie bereits in der Einleitung und in den vorangegangenen Unterpunkten erwähnt, beeinflusst die Größe des Knochen erheblich die Möglichkeiten der biomechanischen Charakterisierung (Turner und Burr 2001, 1993). Der Biege- und Kompressionsversuch wie sie von GOETZEN (Götzen 2006) und KUMMER (Kummer 2007) etabliert wurden, sind im Bezug auf Reproduzierbarkeit möglicherweise nicht die besten Prüfmethoden, eignen sich aber zur Untersuchung kleiner Mäuseknochen, da es für die Prüfkörper nur eine geringe Größenbeschränkung gibt.

## **5.2.3 Relevanz biomechanischer Prüfmethoden**

Will man die Prüfmethode anhand ihrer klinischen Relevanz auswählen, müssen andere Kriterien bedacht werden:

Die schottische Studie von COURT-BROWN zeigte, dass mit zunehmendem

Lebensalter Wirbelkörper-Frakturen eine steigende Inzidenz auf aufweisen. Die häufiger auftretenden Frakturen der Mittelhandknochen sind zumeist traumatischer Genese und betrifft vor allem Patienten jüngeren Alters mit vor allem gesunder Knochensubstanz (Court-Brown und Caesar 2006).

In einer ähnlichen Studie untersuchte DENNISON im Jahr 2000 lediglich das Auftreten osteoporotischer Frakturen und konnte zeigen, dass das Lebenszeitrisiko für eine über 50jährige Frau eine Hüftfraktur zu erleiden bei 14% (♂: 3%), eine distale Radiusfraktur bei 13% (♂: 2%) und eine Wirbelkörperfraktur bei 11% (♂: 2%) liegt. Entscheidend hierbei sind jedoch zwei weitere Parameter, die diese epidemiologische Studie mit einbezogen hat. Während das Durchschnittsalter der Handgelenks- und Wirbelbrüche in den späten 60ern liegt, so ist der durchschnittliche Patient mit einer Hüftfraktur 79 Jahre halt. Gleichsam ist die relative Überlebenschance einer Handgelenksfraktur 100% im Gegensatz zu einer Hüftfraktur mit 83% bzw. einer Wirbelkörperfraktur mit 82% (Dennison und Cooper 2000). Das bedeutet, Wirbelkörperfrakturen sind Frakturen des jüngeren Osteoporosepatienten mit der höchsten Mortalitätsrate der Patientengruppe und verursachen dadurch einen hohen volkswirtschaftlichen Schaden sowie einen hohen Leidensdruck bei den Patienten.

Diese Zahlen verdeutlichen die vorrangige Bedeutung biomechanischer Untersuchungen knöcherner Strukturen trabekulärer Strukturen insbesondere der Wirbelkörper. Gleichwohl kann die Kenntnis über die Veränderung kortikalen Strukturen und deren Belastbarkeit für therapeutische Zwecke von großem Nutzen sein.

Möchte man isoliert die biomechanische Qualität spongiöser Strukturen prüfen, hat man die Möglichkeit, aus großen Knochenproben isoliert einzelne Knochenbälkchen oder Spongiosablöcke zu entnehmen und zu prüfen (Kuhn et al. 1989, Busse et al. 2010). Eine Prüfung im Verbund kann in Form einer Belastung des gesamten Wirbelkörpers stattfinden (Götzen 2006, Turner und Burr 2001). Um möglichst einen genauen Frakturmechanismus z.B. den einer Hüftfraktur nachzustellen, müssen spezielle Frakturmodelle angewandt werden (Lehmann et al. 2010).

Möchte man die Frakturgefährdung des gesamten Knochenapparates ermitteln, ist es notwendig, möglichst viele Vertreter der einzelnen Knochengruppen zu prüfen. Irreguläre Knochen und lange Röhrenknochen bilden mehr als 95% des Skeletts. Damit stellt die Belastungsuntersuchung des Femurs und des Wirbelkörpers, als

Repräsentanten des jeweiligen Knochentyps eine adäquate Möglichkeit der mechanischen Analyse dar.

## 5.3 Konservierung und Mechanik des Knochens

---

Bevor auf die Interpretation und Vergleichbarkeit der Prüfmethode eingegangen werden kann, muss der Einfluss der Probenfixierung auf die Biomechanik des Knochens diskutiert werden, da die geprüften Mausmodelle zum Teil unterschiedlich konserviert wurden. In verschiedenen Arbeiten wurde auf den Einfluss unterschiedlicher Konservierungsformen hingewiesen.

Werden Knochen oder Gewebeproben nicht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tief gefroren, so werden sie in unserer Arbeitsgruppe initial für 2 Tage in Formalin gelagert, bevor sie in 80% Ethanol eingebettet werden.

PANJABI zeigte, dass das Einfrieren von humanen Wirbelkörpern bei  $-18^{\circ}\text{C}$  keinen signifikanten Einfluss auf deren biomechanischen Eigenschaften hat (Panjabi et al. 1985). Diese Ergebnisse konnten auch von GOH (Goh et al. 1989) reproduziert werden.

CURREY untersuchte 1994 die Auswirkung von Formaldehyd auf die Biomechanik des Knochens und konnte hier ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die erreichte Maximalkraft bei der Prüfung zeigen (Currey et al. 1995). Diese Ergebnisse decken sich mit noch nicht veröffentlichten Ergebnissen einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Schilling et al.). GOH kommt zu einer ähnlichen Aussage, schränkt gleichwohl ein, dass bei gleichbleibender Maximalkraft eine erhöhte Brüchigkeit und damit signifikant reduzierter Energieaufnahme durch die Konservierung mit Formaldehyd erreicht wird (Goh et al. 1989).

In einer weiteren Studie von LINDE konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss einer Konservierung mit Ethanol gezeigt werden (Linde und Sorensen 1993).

Den genauen Einfluss der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Konservierungsschritte ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden. Zum momentanen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass eine Fixierung durch Formaldehyd und Ethanol die Maximalkraft sowie die maximale Energieaufnahme aufgrund einer erhöhten Brüchigkeit geringfügig erniedrigt (Schilling et al.). Im Rahmen dieser Arbeit wird angenommen, dass alle Mausmodelle gleichermaßen von diesen

Veränderungen betroffen sind und somit der relative Unterschied erhalten bleibt. Ein Beweis dieser Theorie muss allerdings noch mit Hilfe von weiteren Studien erbracht werden.

## **5.4 Vergleich der beiden Prüfmethoden**

---

Um die beiden Prüfmethoden miteinander zu vergleichen und hier eine Aussage treffen zu können, muss man alle drei Gruppen, Wildtypkontrollen, osteoporotische und osteopetrotische Mausmodelle, getrennt voneinander betrachten.

### **5.4.1 Wildtypkontrollen**

In der Ergebnisauswertung der Femurprüfung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Energieaufnahme der beiden konservierten Gruppen im Alter von 24 Wochen (Vergleich zu 20 Wochen). Gleichsam wurde eine leicht erhöhte Maximalkraft gemessen. Leider gibt es zu den 24 Wochen alten Tieren keine Mineralisationswerte, da die Femora vor der Biegebelastung nicht gescannt wurden. Es ist zu diskutieren, ob der gemessene mechanische Unterschied der Biegeprüfung eher auf ein Konservierungsartefakt zurückzuführen ist.

Die oben genannten Tendenzen konnten in ähnlicher Form für die Kompressionprüfung reproduziert werden. Hier zeigte sich im Alter von 24 Wochen eine signifikante Abnahme der Energieabsorption, bei gleichzeitig signifikanter Erhöhung der Steifigkeit und Maximalkraft.

Prinzipiell hätten wir hier keine signifikanten Veränderungen erwartet. Die oben genannten Veränderungen könnten in dieser Konstellation am Ehesten mit einer Zunahme der Mineralisation erklärbar sein, die hier jedoch nicht nachgewiesen wurde. Daher ist davon auszugehen, dass z.B. ein Fehler im Rahmen des Konservierungsprotokolls aufgetreten ist. Dabei kann es initial zu einer Zunahme der Maximalkraft und Energieabsorption kommen. Später kommt weiter zu einer signifikanten Zunahme der Biegesteifigkeit und Maximalkraft sowie konsekutiv Abnahme der Energieabsorption gekommen. Es bleibt Bestandteil dieser Diskussion, ob ein solcher Konservierungsfehler sich erheblicher aufgrund der erhöhten



Oberflächeneinwirkung auf trabekuläre (und damit den Wirbelkörper) als auf kortikale Strukturen auswirkt.

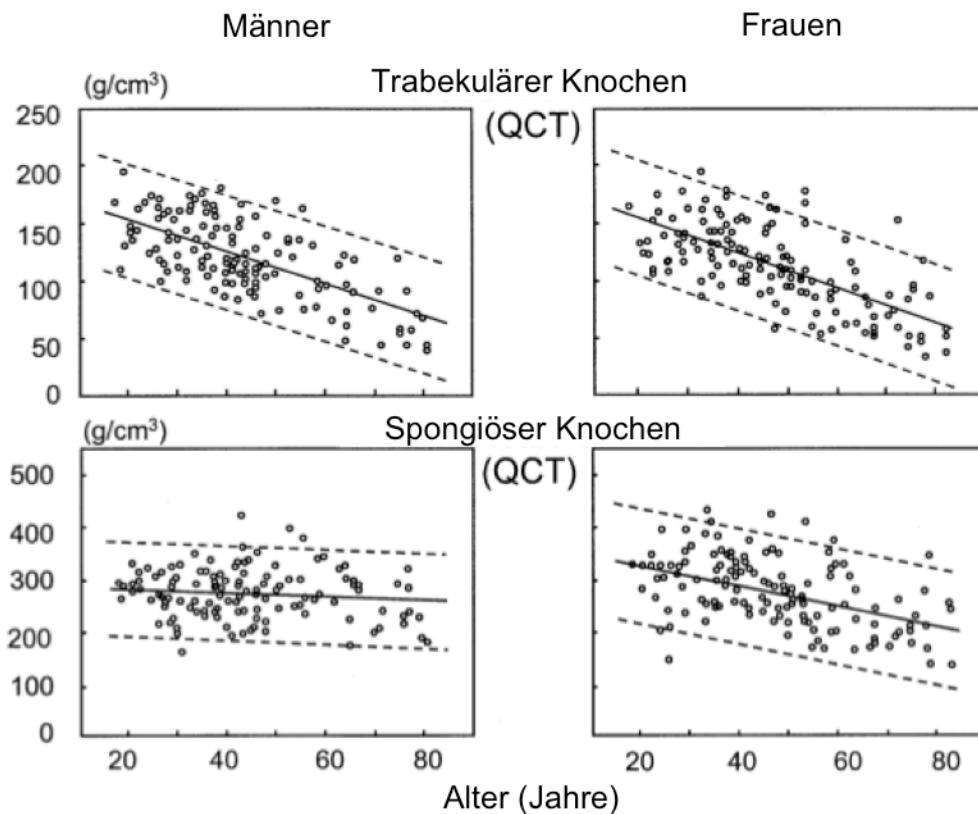
## 5.4.2 Osteoporotische Mausmodelle

In der Analyse der osteoporotischen Mausmodelle zeigt sich eine Inkongruenz der mechanischen Parameter. Zwar kann für beide Prüfmethode eine signifikante Reduzierung der mechanischen Maximalkraft gezeigt werden. Beide Messungen der absorbierbaren Energien hingegen ergeben lediglich eine signifikante Reduzierung der transgenen Krm-Mäuse, nicht jedoch der  $Isg^{-/-}$  Tiere. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das  $Krm2^{tg}$  Mausmodell einen ausgeprägteren Phänotypen als  $Isg15^{-/-}$  aufweist.

Dies legt den Schluss nahe, dass die Maximalkraft der sensiblere Parameter zur Ermittlung der osteoporotischen Auswirkungen auf die Belastbarkeit des Knochens ist.

Zudem fällt auf, dass beide Prüfmethode die gleiche Aussage haben. Sie zeigen jeweils eine signifikante Abnahme der Maximalkraft und somit der mechanischen Belastbarkeit. Vergleicht man jedoch die p-Werte, so zeigt sich eine stärkere Aussagekraft der Wirbelkörperprüfung. Hier werden jeweils p-Werte von kleiner 0,001 erreicht.

Es ist zu diskutieren, ob sich osteoporotische Veränderungen in ausgeprägterer Form in der Materialprüfung spongiöser Strukturen darstellen lassen und weniger bei kortikalem Knochen. Eine mögliche Antwort liefert eine Studie von KALENDAR (Kalender et al. 1989). Er konnte in einer Studie zeigen, dass im alternden Menschen der trabekuläre Knochen prozentual mehr abnimmt als die kortikale Dicke des Knochens (Abb. 5-1). Es ist anzunehmen, dass auch in der osteoporotischen Maus zuerst die trabekulären Knochenstrukturen betroffen sind und sich dadurch biomechanische Unterschiede initial z.B. im Wirbelkörper widerspiegelt. Das würde bedeuten, dass die Kompressionsprüfung der Biegebelastung in ihrer Sensitivität überlegen ist, wie bereits 1999 von BURR und TURNER beschrieben (Burr und Turner 1999).



**Abb. 5-1:** Veränderung des humanen Skelettes im Alter modifiziert nach KALENDAR (Kalender et al. 1989)

### 5.4.3 Osteopetrotisches Mausmodell

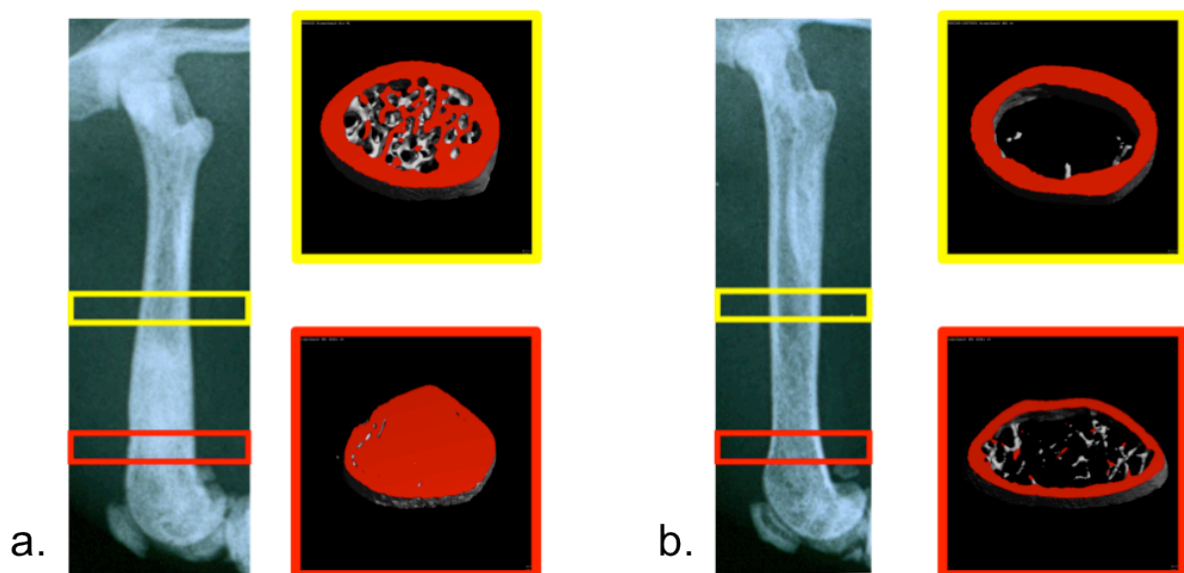
Das reine Wissen über die Verknöcherung der osteopetrotischen Mausmodelle würde eine erhöhte mechanische Belastbarkeit erwarten lassen. Dies steht in Kontrast zu den klinischen Erfahrungswerten, die besagen, dass Osteopetrose ebenfalls mit einer erhöhten Frakturinzidenz in Verbindung gebracht wird (Landa et al. 2007, Schilling et al. 2007, Cadosch et al. 2009). Die Auswertung der Biegeprüfung kann diese erhöhte Frakturgefährdung bestätigen. Es kommt zu einer signifikanten Reduzierung der absorbierbaren Energie (bei unveränderter Maximalkraft) und somit zu einem früheren Materialversagen.

Vergleicht man die Ergebnisse der Biegeversuche der Femora mit den Ergebnissen der Kompressionsprüfung, so erkennt man jedoch einen bedeutsamen klinischen Unterschied. In der Belastung der Wirbel zeigt sich in beiden Alterstufen sowohl eine signifikant erhöhte Maximalkraft als auch eine erhöhte absorbierte Energie der src-defizitären Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Prüfmethode widersprechen sich damit.

In der Strukturanalyse der Femora der Src<sup>-/-</sup> Mäuse, zeigt sich nicht nur eine Verdickung der Kortikalis sondern zusätzlich eine beinahe durchgehende Verknöcherung des distalen Femurs (Abb. 5.2).

Die Biegebelastung geht von der Voraussetzung aus, dass bei der Materialprüfung ein idealisiertes Hohlrohr untersucht wird. Dabei treten an der ventralen der an der Seite der Krafteinleitung Druck- und an der Gegenseite Zugspannungen auf. Der Punkt der höchsten Belastung ist der obere Auflagerpunkt der Prüfvorrichtung (Kummer 2007). Dennoch kommt es zu einer weitestgehend homogenen Spannungsverteilung innerhalb des Knochens. Zwischen den Auflagerflächen wird bei einem normalen Tierknochen also nur die Diaphyse in ihrer Eigenschaft eines Röhrenknochens belastet. Die epi- und metaphysären Abschnitte mit ihren trabekulären Strukturen sind nicht Teil der Prüfung.

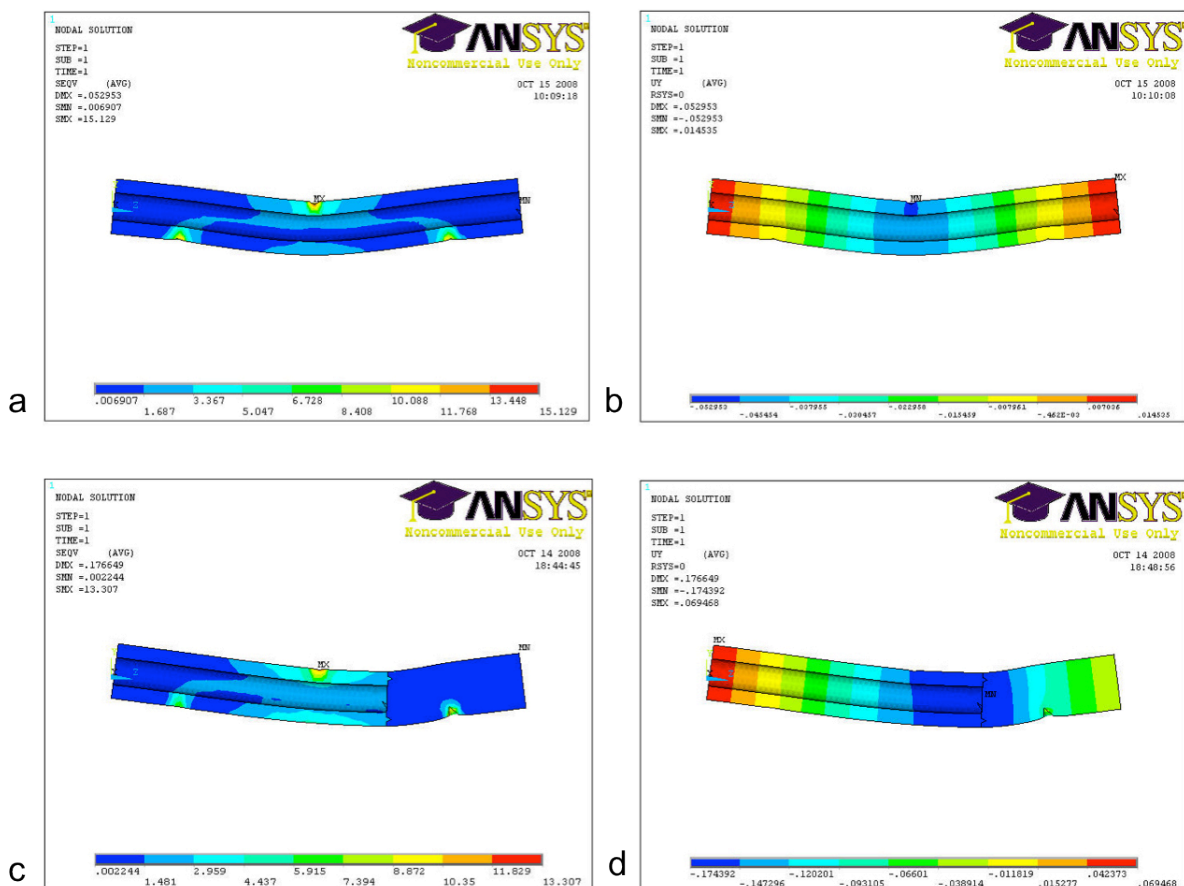
Diese Bedingungen werden bei der Biegebelastung der Src-defizitären Femora jedoch nicht erfüllt. Die Verknöcherung der Knochen ist bereits im Alter von 16 Wochen so fortgeschritten, dass im Bereich der Auflagefläche den Epikondylen ein beinahe solides (Voll-)Rohr (entspricht an dieser Stelle einem Stab) entstanden ist. Erst im proximalen Verlauf kommt es zu einer Zurückbildung der Verknöcherung.



**Abb. 5-2:** Radiologische und  $\mu$ CT Analyse eines osteopetrotischen Femurs [a] und seiner Wildtypkontrolle [b]

Durch die Verknöcherung kommt es zu einer Veränderung der Biegeeigenschaften des Femurs. Die Verknöcherung basiert augenscheinlich auf zwei Mechanismen. Zum einen kommt es zu einer Verdickung der Kortikalis zum anderen zu einer distalen Verknöcherung des Knochenmarkraumes durch Spongiosa. Diese weist

eine deutlich geringere Mineralisationsdichte auf, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Dies erlaubt die Hypothese, dass die Materialeigenschaften dort weicher sind als im Bereich der reinen Kortikalis. Das wiederum führt zu einer Konzentration der Spannungen an der Grenzfläche zwischen Hohl- und Vollrohr. Es zeigt sich eine geringere Biegesteifigkeit und damit einhergehend verringerter Energieaufnahme der Femora wie in einer Finite-Elemente-Simulation (Abb. 5-3) gezeigt werden konnte. Der verknöcherte Bereich des Vollrohres ist aufgrund der geringer mineralisierten und weniger festen Spongiosa in seinem Innern ( $E_{\text{Spong}} = 500 \text{ MPa}$ ) weicher die Kortikalis. Das proximale Femur ohne innerer Verknöcherung ist daher in der mechanischen Belastbarkeit deutlich härter ( $E_{\text{Kort}} = 1000 \text{ MPa}$ ) (Reilly und Burstein 1975, Lotz et al. 1991, Guo 2001, Majumdar 1998, Turner et al. 1990). Dadurch entsteht eine erhöhte Spannungsdichte im Grenzbereich und als Folge verringerte Biegefestigkeit, was zu einem früheren Materialversagen bei gleicher Belastung führt.



**Abb. 5-3:** Finite Elemente Analyse der SRC<sup>-/-</sup> Femora. [a] zeigt die Verbiegung einer Wildtypkontrolle mit maximalen Spannungen von 15MPa. Die maximale Durchbiegung beträgt 0,014mm [b]. Im Falle der SRC<sup>-/-</sup> defizitären Mäuse kommt es jedoch durch die Veränderung des Elastizitätsmoduls im Bereich des Vollrohres zu einer Tolerierung von maximalen Spannungen von 13MPa [c] bei gleicher Belastung und Materialversagen bei einer maximalen Durchbiegung von nur 0,07mm [d].

Es lässt sich also festhalten, eine Verknöcherung, wie sie im Falle der Src-defizitären Mäuse stattgefunden hat, führt zu einer Veränderung der Biegeeigenschaften. Es kommt zu einer Sollbruchstelle im Grenzbereich und dadurch zu einem früheren Materialversagen. Dieses Verhalten kann eine erhöhte Frakturgefährdung der Röhrenknochen bei Fällen mit einer Osteopetrose erklären (Dahl et al. 1992), lässt aber aufgrund der unterschiedlichen Geometrie keine Vergleichbarkeit mit den hier verwendeten Wildtypkontrollen zu.

Durch die homogene Verknöcherung über die gesamte Länge sowie Belastung der Wirbelkörper bei den Kompressionsversuchen tritt dieses Phänomen nicht auf (Götzen 2006). Hier ist eine Vergleichbarkeit der Prüfmethode möglich und es zeigt sich nun eine signifikante Erhöhung der Belastbarkeit.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Femurprüfung nur für ideale Röhrenknochen und nicht für osteopetrotische Mausmodelle verwendet werden kann. Die Kompressionsprüfung von murinen Wirbelkörpern hingegen kann sowohl ein mechanisches Defizit bei osteoporotischen als auch bei osteopetrotischen Mausmodellen detektieren. Die Ergebnisse der mechanischen Prüfungen legen zudem nahe, dass die Kompressionsprüfung osteoporotische Veränderungen sensibler als die Biegeprüfung misst.

Die für eine biomechanische Charakterisierung notwendigen Parameter sollten Auskunft über die Knochenarchitektur (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, CT) sowie die Knochenmineralsalzdichte geben.

## 5.5 Zusammenfassung

---

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zu einer vollständigen Beurteilung der Frakturgefährdung eines Knochens und seiner biomechanischen Belastbarkeit sowohl Daten über die Knochenstrukturparameter und der Mineralisation, als auch zu den mechanischen Materialeigenschaften vorliegen müssen. Nur in Kenntnis dieser verschiedenen Parameter ist eine komplette biomechanische Phänotypisierung und Interpretation der einzelnen Ergebnisse möglich.

Die für eine biomechanische Charakterisierung notwendigen Parameter sollten Auskunft über die Knochenarchitektur (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, CT) sowie die Knochenmineralsalzdichte geben. Diese Daten können mit Hilfe des standardisierten mikroskopischen Histomorphometrieverfahrens oder alternativ mit Hilfe von hochauflösender zerstörungsfreier Bildgebung ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei mechanische Parameter ermittelt, die standardmäßig zur Phänotypisierung eines Knochenphänotyps herangezogen werden sollten: Maximalkraft, Steifigkeit und die „Energieabsorption bis zum Erreichen der Maximalkraft“ ( $W_{rm}$ ).

Es ist deutlich geworden, dass die beiden in unserer Arbeitsgruppe etablierten Prüfmethode für murine Knochencharakterisierung gute Ergebnisse liefern. Zudem konnte gezeigt werden, dass vor allem der Wirbelkörperprüfung eine entscheidende klinische Relevanz zukommt. Dabei zeigte sich, dass die Kompressionsbelastung von murinen Wirbelkörpern ein mechanisches Defizit bei osteoporotischen Mausmodellen sensibel detektieren kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die Femurprüfung nur für ideale Röhrenknochen und nicht für osteoporotische Mausmodelle verwendet werden kann.

Damit ist die prädiktive Aussagekraft der Wirbelkörperkompression besser als die Biegeprüfung der Femora.

Der Autor schränkt jedoch ein, dass eine vollständige Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften eines Skelettes möglichst auch eine Biegebelastung eines Femurs beinhalten sollte. Nur so kann mit der Prüfung eines irregulären Knochens (Wirbelkörper) und eines Röhrenknochens (Femur) ein Großteil des knöchernen Systems geprüft und somit analysiert werden.

## 5.6 Fazit und Ausblick

---

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aber auch methodische Fragen aufgezeigt werden, die durch zukünftige Studien geklärt werden sollten.

So ist zu klären, welchen Einfluss unterschiedliche Konservierungsmethoden auf die mechanische Prüfung haben, um diese externen Einflussfaktoren auf die biomechanischen Kennwerte zu minimieren.

Finiten Element-Programme werden zukünftig ein vielversprechendes Werkzeug für ein verbessertes Verständnis über die biomechanischen Eigenschaften des Knochens darstellen. Nach Einschätzung des Autors sollten sich diese Analyseprogramme langfristig in der Knochenforschung festigen können, auch wenn mit dieser Technik die komplexen und dynamischen Mechanismen der biologischen Struktur „Knochen“ sicher nie exakt simulierbar sein wird.

# Kapitel 6 - Anhang: Tabellarische Ergebnisse

## I. Prüfergebnisse (Femora):

	Anzahl	Mineralisation [g / cm <sup>3</sup> ]	Steifigkeit [N / mm]	Fmax [N]	Wrm [N x mm]
C57Bl/6 16wks	10	1091,03 ± 14,73	213,58 ± 12,74	26,39 ± 1,50	5,65 ± 0,42
C57Bl/6 20wks	12	1047,44 ± 7,89	123,45 ± 10,90	20,76 ± 0,72	2,98 ± 0,14
C57Bl/6 24wks	11	-	85,80 ± 18,74	24,21 ± 1,23	2,14 ± 0,18
C57Bl/6 42wks	5	1116,9 ± 25,39	207,3 ± 14,36	24,99 ± 1,41	5,26 ± 0,33
Krm2 <sup>tg</sup>	10	-	110,11 ± 18,39	16,9 ± 0,85	1,36 ± 0,16
lsg15 <sup>-/-</sup>	8	1018,48 ± 8,97	98,96 ± 10,16	15,65 ± 0,83	2,56 ± 0,178
Src <sup>-/-</sup> 16wks	8	1103,73 ± 14,06	213,58 ± 12,74	29,09 ± 1,07	5,20 ± 0,44
Src <sup>-/-</sup> 42wks	8	1210,69 ± 25,25	284,93 ± 29,63	29,52 ± 2,40	2,91 ± 0,36

## II. Prüfergebnisse (Wirbelkörper):

	Anzahl	Mineralisation [g / cm <sup>3</sup> ]	Steifigkeit [N / mm]	Fmax [N]	Wrm [N x mm]
C57Bl/6 16wks	5	629,38 ± 10,76	92,94 ± 9,28	56,16 ± 5,73	19,05 ± 2,99
C57Bl/6 20wks	4	656,57 ± 2,57	73,92 ± 11,11	45,09 ± 1,32	21,44 ± 4,16
C57Bl/6 24wks	5	654,88 ± 4,19	140,48 ± 14,57	72,78 ± 6,34	27,12 ± 4,27
C57Bl/6 42wks	5	594,5 ± 6,30	95,02 ± 14,80	36,81 ± 2,58	9,12 ± 0,65
Krm2 <sup>tg</sup>	5	645,13 ± 7,79	62,22 ± 4,31	20,19 ± 1,40	5,43 ± 1,25
lsg15 <sup>-/-</sup>	3	617,61 ± 1,55	94,75 ± 9,68	35,13 ± 2,90	15,64 ± 3,35
Src <sup>-/-</sup> 16wks	5	767,45 ± 34,34	109,81 ± 7,48	84,20 ± 5,96	30,38 ± 3,77
Src <sup>-/-</sup> 42wks	5	749,60 ± 19,34	112,60 ± 7,10	84,05 ± 4,75	25,18 ± 1,90



# Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

1. Abrams SA. Calcium turnover and nutrition through the life cycle. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(2):283-289.
2. Akhter MP, Otero JK, Iwaniec UT, Cullen DM, Haynatzki GR, Recker RR. Differences in vertebral structure and strength of inbred female mouse strains. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(1):33-40.
3. Albers J, FT B, Jochen Schulze MG, Robert P. Marshall, Kristofer Wintges, Felix W. Friedrich, Matthias Priemel, Tobias Kummer, Arndt F. Schilling, Johannes M. Rueger, Kerstin Cornils, Boris Fehse, Thomas Streichert, Guido Sauter, Franz Jakob, Barbara Pobe. Control of Bone Formation by the Serpentine Receptor Frizzled-9. (ahead of print).
4. Ammann P, Bourrin S, Bonjour JP, Brunner F, Meyer JM, Rizzoli R. The new selective estrogen receptor modulator MDL 103,323 increases bone mineral density and bone strength in adult ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1999;10(5):369-376.
5. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone.* 1996;18(5):397-403.
6. Bell GH, Dunbar O, Beck JS, Gibb A. Variations in strength of vertebrae with age and their relation to osteoporosis. *Calcif Tissue Res.* 1967;1(1):75-86.
7. Bell T. On two new genera of land tortoises. *Transactions of the Linnean Society of London.* 2008;15(2):392-401.
8. Biermann JS, Holt GE, Lewis VO, Schwartz HS, Yaszemski MJ. Metastatic bone disease: diagnosis, evaluation, and treatment. *Instr Course Lect.* 2010;59:593-606.
9. Blomstrom DC, Fahey D, Kutny R, Korant BD, Knight EJ. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *J Biol Chem.* 1986;261(19):8811-8816.
10. Boivin G, Meunier PJ. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(6):538-543.
11. Boskey AL. Bone Mineralization. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition.* Informa Healthcare; 2001. p. 5-1 - 5-33.
12. Boskey AL, van der Meulen MC, Wright TM. Guidelines for describing mouse skeletal phenotype. *J Orthop Res.* 2003;21(1):1-5.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

13. Boyce BF, Yoneda T, Lowe C, Soriano P, Mundy GR. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1622-1627.
14. Brodt MD, Ellis CB, Silva MJ. Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties. *J Bone Miner Res.* 1999;14(12):2159-2166.
15. Burghardt AJ, Kazakia GJ, Laib A, Majumdar S. Quantitative assessment of bone tissue mineralization with polychromatic micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int.* 2008;83(2):129-138.
16. Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, Seitz S, Zustin J, Semler J, Amling M. Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure. *Acta Biomater.* 2010 (Epub ahead of print).
17. Rosen CJ, Donahue LR, Beamer WG. Defining the Genetics of Osteoporosis Using the Mouse to Understand Man. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology, Second Edition (2 Vol. Set)*. Academic Press; 2001.
18. Cadosch D, Gautschi OP, Brockamp T, Zellweger R. Osteopetrosis--a challenge for the orthopaedic surgeon. *S Afr J Surg.* 2009;47(4):131-133.
19. Cashman KD. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 2:S169-77.
20. Chappard D, Basle MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie.* 2008;92(299):162-170.
21. Communities CotE. Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and othe Scientific Purposes in the Member States of the European Union. Report from the Commission to the Council and the European Parliament. 2007
22. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993;94(6):646-650.
23. Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury.* 2006;37(8):691-697.
24. Cowin SC. Mechanics of Materials. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. Informa Healthcare; 2001a. p. 6-1 - 6-24.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

25. Cowin SC. The False Premise in Wolff's Law. In: Cowin SC, editor. Bone Mechanics Handbook, Second Edition. Informa Healthcare; 2001b. p. 30-1 - 30-15.
26. Crabtree N, Loveridge N, Parker M, Rushton N, Power J, Bell KL, Beck TJ, Reeve J. Intracapsular hip fracture and the region-specific loss of cortical bone: analysis by peripheral quantitative computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2001;16(7):1318-1328.
27. Cselenyi CS, Lee E. Context-Dependent Activation or Inhibition of Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling by Kremen. *Science's STKE.* 2008;1(8)
28. Cunningham J. Pathogenesis and prevention of bone loss in patients who have kidney disease and receive long-term immunosuppression. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(1):223-234.
29. Currey JD, Brear K, Zioupos P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech.* 1996;29(2):257-260.
30. Currey JD, Brear K, Zioupos P, Reilly GC. Effect of formaldehyde fixation on some mechanical properties of bovine bone. *Biomaterials.* 1995;16(16):1267-1271.
31. Currey JD. *Bones: Structure and Mechanics.* Princeton University Press; 2006
32. Dahl N, Holmgren G, Holmberg S, Ersmark H. Fracture patterns in malignant osteopetrosis (Albers-Schonberg disease). *Arch Orthop Trauma Surg.* 1992;111(2):121-123.
33. Burr DB, Turner CH. Biomechanical Measurements in Age-Related Bone Loss. In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP, editors. *The Aging Skeleton.* Academic Press; 1999.
34. Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development.* 2002;129(24):5587.
35. Davison KS, Siminoski K, Adachi JD, Hanley DA, Goltzman D, Hodzman AB, Josse R, Kaiser S, Olszynski WP, Papaioannou A, Ste-Marie LG, Kendler DL, Tenenhouse A, Brown JP. Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts. *Semin Arthritis Rheum.* 2006;36(1):22-31.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

36. Davy DT, Jepsen KJ. Bone Damage Mechanics. In: Cowin SC, editor. Bone Mechanics Handbook, Second Edition. Informa Healthcare; 2001. p. 18-1 - 18-25.
37. Dellling G, Hahn M, Bonse U, Busch F, Gunnewig O, Beckmann F, Uebbing H, Graeff W. [New possibilities for structural analysis of bone biopsies using microcomputer tomography (muCT)]. *Pathologe*. 1995;16(5):342-347.
38. Dennison E, Cooper C. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Horm Res*. 2000;54 Suppl 1:58-63.
39. Deutzmann R, Bruckner-Tudermann L, Bruckner P. Biochemie und Pathobiochemie des Skelettsystems. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, editors. Biochemie und Pathobiochemie (inkl. Poster). Springer, Berlin; 2002. p. 773-779.
40. DiSimone RE, Berman AT, Schwentker EP. The orthopedic manifestation of neurofibromatosis. A clinical experience and review of the literature. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;(230):277-283.
41. Kimmel DB. Animal Models in Osteoporosis Research. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology, Second Edition (2 Vol. Set). Academic Press; 2001.
42. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002;41(17):3130-3146.
43. Drake LR, Vogl W, Mitchell AWM. Gray's Anatomie für Studenten mit StudentConsult-Zugang. Urban & Fischer Bei Elsevier; 2007
44. Drenckhahn D. Allgemeine Knochenlehre. In: Benninghoff A, Drenckhahn D, editors. Anatomie Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer Bei Elsevier; 2008. p. 266 - 277.
45. Drenckhahn D, Kugler P. Allgemeine Gewebelehre - Knochengewebe. In: Benninghoff A, Drenckhahn D, editors. Anatomie Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer Bei Elsevier; 2008. p. 133 - 149.
46. Ebeling PR. Osteoporosis in men. New insights into aetiology, pathogenesis, prevention and management. *Drugs Aging*. 1998;13(6):421-434.
47. Einhorn TA. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int*. 1992;51(5):333-339.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

48. Einhorn TA, Wakley GK, Linkhart S, Rush EB, Maloney S, Faierman E, Baylink DJ. Incorporation of sodium fluoride into cortical bone does not impair the mechanical properties of the appendicular skeleton in rats. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(2):127-131.
49. Ellwanger K, Saito H, Clement-Lacroix P, Maltry N, Niedermeyer J, Lee WK, Baron R, Rawadi G, Westphal H, Niehrs C. Targeted disruption of the Wnt regulator *Kremen* induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol.* 2008;28(15):4875-4882.
50. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11.
51. Ferguson SJ, Steffen T. Biomechanics of the aging spine. *Eur Spine J.* 2003;12 Suppl 2:S97-S103.
52. Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(6):305-316.
53. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001;262(4):398-419.
54. Gerthsen C, Vogel H. *Gerthsen Physik.* Springer-Verlag GmbH; 1999
55. Geusens P, Sambrook P, Lindsay R. *Osteoporosis in clinical practice: a practical guide for diagnosis and treatment.* Springer Verlag; 2004
56. Goh JC, Ang EJ, Bose K. Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones. *Acta Orthop Scand.* 1989;60(4):465-467.
57. Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JLT, CH, Cowin SC, Rh. The fabric dependence of the orthotropic elastic constants of cancellous bone. *J Biomech.* 1994;27(4):375-389.
58. Guo XE. Mechanical Properties of Cortical Bone and Cancellous Bone Tissue. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition.* Informa Healthcare; 2001. p. 10-1 - 10-23.
59. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone.* 1992;13(4):327-330.
60. Hall BK. *Bones and Cartilage: Developmental Skeletal Biology.* Academic Press; 2005

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

61. Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *J Bone Miner Res.* 2002;17(6):1044-1050.
62. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-355.
63. Haussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int.* 2007;18(1):77-84.
64. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.* 2009;44(6):1026-1033.
65. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition.* Informa Healthcare; 2001. p. 1-1 - 1-34.
66. Jiao Y, Chiu H, Fan Z, Jiao F, Eckstein EC, Beamer WG, Gu W. Quantitative trait loci that determine mouse tibial nanoindentation properties in an F2 population derived from C57BL/6J x C3H/HeJ. *Calcif Tissue Int.* 2007;80(6):383-390.
67. Judex S, Boyd S, Qin YX, Miller L, Muller R, Rubin C. Combining high-resolution micro-computed tomography with material composition to define the quality of bone tissue. *Curr Osteoporos Rep.* 2003;1(1):11-19.
68. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Neue Approbationsordnung.* Springer, Berlin; 2004
69. Kalender WA, Felsenberg D, Louis O, Lopez P, Klotz E, Osteaux M, Fraga J. Reference values for trabecular and cortical vertebral bone density in single and dual-energy quantitative computed tomography. *Eur J Radiol.* 1989;9(2):75-80.
70. Kastl S, Sommer T, Klein P, Hohenberger W, Engelke K. Accuracy and precision of bone mineral density and bone mineral content in excised rat humeri using fan beam dual-energy X-ray absorptiometry. *Bone.* 2002;30(1):243-246.
71. Keaveny TM. Strength of Trabecular Bone. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition.* Informa Healthcare; 2001. p. 16-1 - 16-42.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

72. Keller TS, Liebschner MAK. Tensile and compression testing of bone. *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*, 1st ed CRC Press, Boca Raton. 2000;175-205.
73. Keller TS, Moeljanto E, Main JA, Spengler DM. Distribution and orientation of bone in the human lumbar vertebral centrum. *J Spinal Disord*. 1992;5(1):60-74.
74. Kok C, Sambrook PN. Secondary osteoporosis in patients with an osteoporotic fracture. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(6):769-779.
75. Kragstrup J. Osteons in trabecular bone. Morphometric studies of bone formed by remodeling. *Dan Med Bull*. 1985;32(6):287-295.
76. Krutsay M. [Silver impregnation of bone tissue]. *Anat Anz*. 1985;160(5):369-371.
77. Kuhn JL, Goldstein SA, Choi K, London M, Feldkamp LA, Matthews LS. Comparison of the trabecular and cortical tissue moduli from human iliac crests. *J Orthop Res*. 1989;7(6):876-884.
78. Kummer T. Ein Modell zur Untersuchung der biomechanischen Funktion des kortikalen Knochens [dissertation]. Hamburg: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; 2007.
79. Lakes R. Viscoelastic Properties of Cortical Bone. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook*, Second Edition. Informa Healthcare; 2001. p. 11-1 - 11-15.
80. Landa J, Margolis N, Di Cesare P. Orthopaedic management of the patient with osteopetrosis. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007;15(11):654-662.
81. Landis WJ. An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. *Gravit Space Biol Bull*. 1999;12(2):15-26.
82. Lehmann W, Rupprecht M, Hellmers N, Sellenschloh K, Briem D, Puschel K, Amling M, Morlock M, Rueger JM. Biomechanical evaluation of peri- and interprosthetic fractures of the femur. *J Trauma*. 2010;68(6):1459-1463.
83. LeMaitre J. *Handbook of Materials Behavior Models (3-Volume Set)*. Academic Press; 2001
84. Liebig TM, Fiedler A, Klein-Gonzalez N, Shimabukuro-Vornhagen A, von Bergwelt-Baildon M. Murine model of CD40-activation of B cells. *J Vis Exp*. 2010;(37)
85. Linde F, Sorensen HC. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech*. 1993;26(10):1249-1252.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

86. Link TM, Doren M, Lewing G, Meier N, Heinecke A, Rummeny E. Cross-sectional area of lumbar vertebrae in peri- and postmenopausal patients with and without osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2000;11(4):304-309.
89. Lippuner K, Golder M, Greiner R. Epidemiology and direct medical costs of osteoporotic fractures in men and women in Switzerland. *Osteoporos Int.* 2005;16 Suppl 2:S8-S17.
90. Lotz JC, Gerhart TN, Hayes WC. Mechanical properties of metaphyseal bone in the proximal femur. *J Biomech.* 1991;24(5):317-329.
91. Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P. Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(10):4485-4489.
92. Windolf M. Konstruktion eines Mikro-Positionierungsinstrumentes für Mäuse-Vertebrae [dissertation]. Hamburg: TUHH - Universität Hamburg; 2003.
93. Magnus K, Müller-Slany HH. Grundlagen der Technischen Mechanik. Vieweg+Teubner; 2005
94. Majeska RJ. Cell Biology of Bone. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition.* Informa Healthcare; 2001. p. 2-1 - 2-24.
95. Majumdar S. A review of magnetic resonance (MR) imaging of trabecular bone micro-architecture: contribution to the prediction of biomechanical properties and fracture prevalence. *Technol Health Care.* 1998;6(5-6):321-327.
96. Mammone JF, Hudson SM. Micromechanics of bone strength and fracture. *J Biomech.* 1993;26(4-5):439-446.
97. Marks, SC., jr., Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology, Second Edition (2 Vol. Set).* Academic Press; 2001.
98. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/b-catenin signalling. *Nature.* 2002;417:664-667.
99. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. *Skeletal Tissue Mechanics.* Springer; 1998
100. Martin RB. Determinants of the mechanical properties of bones. *J Biomech.* 1991;24 Suppl 1:79-88.
101. Mosekilde L, Mosekilde L. Normal vertebral body size and compressive strength: relations to age and to vertebral and iliac trabecular bone compressive strength. *Bone.* 1986;7(3):207-212.



## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

102. Mosekilde L, Mosekilde L, Danielsen CC. Biomechanical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. *Bone*. 1987;8(2):79-85.
103. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Ruegsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998;23(1):59-66.
104. Nalla RK, Stolken JS, Kinney JH, Ritchie RO. Fracture in human cortical bone: local fracture criteria and toughening mechanisms. *J Biomech*. 2005;38(7):1517-1525.
105. Nazarian A, Snyder BD, Zurakowski D, Muller R. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. *Bone*. 2008;43(2):302-311.
106. Götzen N. Integrated Phenotypical Characterization of the Murine Skeleton [dissertation]. Hamburg: Technical University Hamburg-Harburg; 2006.
107. Osiak A, Utermohlen O, Niendorf S, Horak I, Knobloch KP. ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol*. 2005;25(15):6338-6345.
108. Panjabi MM, Krag M, Summers D, Videman T. Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J Orthop Res*. 1985;3(3):292-300.
109. Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone Miner*. 1988;4(1):1-5.
110. Parkinson IH, Fazzalari NL. Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume. *J Bone Miner Res*. 2003;18(12):2200-2205.
111. Pogoda P, Priemel M, Schilling AF, Gebauer M, Catala-Lehnen P, Barvencik F, Beil FT, Munch C, Rupprecht M, Muldner C, Rueger JM, Schinke T, Amling M. Mouse models in skeletal physiology and osteoporosis: experiences and data on 14,839 cases from the Hamburg Mouse Archives. *J Bone Miner Metab*. 2005;23 Suppl:97-102.
112. Ranheim EA, Kwan HCK, Reya T, Wang YK, Weissman IL, Francke U. Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood*. 2005;105(6):2487.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

113. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 2004;363(9418):1377-1385.
114. Reilly DT, Burstein AH. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech*. 1975;8(6):393-405.
115. Reilly DT, Burstein AH, Frankel VH. The elastic modulus for bone. *J Biomech*. 1974;7(3):271-275.
116. Riggs BL. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis, and Management*. Lippincott Williams & Wilkins; 1995
117. Rittweger J, Felsenberg D. Patterns of bone loss in bed-ridden healthy young male subjects: results from the Long Term Bed Rest Study in Toulouse. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003;3(4):290-1; discussion 292-4.
118. Ruegsegger P, Koller B, Muller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int*. 1996;58(1):24-29.
119. Rügsegger P. Imaging of Bone Structure. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. Informa Healthcare; 2001. p. 9-1 - 9-24.
120. Saša B, Borislav O. article language: English Review Paper Mechanical force and bones density. *Facta universitatis-series: Physical Education and Sport*. 2002;1(9):37-50.
121. Schiebler TH, Korf H-W. *Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates. Anatomie*. Steinkopff; 2002. p. 133-150.
122. Schilling AF, Andersson B, Kummer T, Perkovic S, Winter O, Marshall RP, Morlock MM, A A. Effect of Different Fixation Methods on Biomechanical Properties of Mouse Bones. ahead of print.
123. Schilling AF, Mulhausen C, Lehmann W, Santer R, Schinke T, Rueger JM, Amling M. High bone mineral density in pycnodysostotic patients with a novel mutation in the propeptide of cathepsin K. *Osteoporos Int*. 2007;18(5):659-669.
124. Schilling AF, Priemel M, Timo Beil F, Haberland M, Holzmann T, Catala-Lehnen P, Pogoda P, Blicharski D, Muldner C, Locherbach C, Rueger JM, Amling M. Transgenic and knock out mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(3):275-289.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

125. Schulze J, Seitz S ea. Negative Regulation of Bone Formation by the Transmembrane Wnt Antagonist Kremen-2. PLoS ONE. 2010;(accepted) ahead of print
126. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Knochenentwicklung und Knochenumbauvorgänge. PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Thieme, Stuttgart; 2005. p. 14-19.
127. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Lernatlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Thieme, Stuttgart; 2007
128. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. Lancet. 2002;359(9320):1841-1850.
129. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. Hypertension. 2010;55(3):579-592.
130. Sharir A, Barak MM, Shahar R. Whole bone mechanics and mechanical testing. Vet J. 2008;177(1):8-17.
131. Silva MJ, Gibson LJ. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. Bone. 1997;21(2):191-199.
132. Silva MJ, Keaveny TM, Hayes WC. Load sharing between the shell and centrum in the lumbar vertebral body. Spine (Phila Pa 1976). 1997;22(2):140-150.
133. Silva MJ, Wang C, Keaveny TM, Hayes WC. Direct and computed tomography thickness measurements of the human, lumbar vertebral shell and endplate. Bone. 1994;15(4):409-414.
134. Silver LM. Mouse genetics: concepts and applications. Oxford University Press, USA; 1995
135. Singer FR. Paget disease: when to treat and when not to treat. Nat Rev Rheumatol. 2009;5(9):483-489.
136. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. Cell. 1991;64(4):693-702.
137. Corwin S, Rowe D. Application of Transgenic Mice To Problems of Skeletal Biology. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology, Second Edition (2 Vol. Set). Academic Press; 2001.
138. Tarnopolskii IUM, Kintsis TA. Static test methods for composites. New York, N.Y.: Van Nostrand Reinhold Co.; 1985:xviii, 301.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

139. Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(1):49-58.
140. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003;4(8):638-649.
141. Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104(2):e57-62.
142. Thompson DAW. *On Growth and Form, Volume II, Second Edition*. CAMBRIDGE AT THE UNIVERSITY PR; 1942
143. Todd JA, Robinson RJ. Osteoporosis and exercise. *Postgrad Med J*. 2003;79(932):320-323.
144. Torkildsen Ø, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2008;117(s188):72-76.
145. Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*. 2002;13(2):97-104.
146. Turner CH. Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:429-446.
147. Turner CH, Burr DB. Experimental Techniques for Bone Mechanics. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. Informa Healthcare; 2001. p. 7-1 - 7-35.
148. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
149. Turner CH, Cowin SC, Rho JY, Ashman RB, Rice JC. The fabric dependence of the orthotropic elastic constants of cancellous bone. *J Biomech*. 1990;23(6):549-561.
150. Turner CH, Hsieh YF, Muller R, Bouxsein ML, Baylink DJ, Rosen CJ, Grynpas MD, Donahue LR, Beamer WG. Genetic regulation of cortical and trabecular bone strength and microstructure in inbred strains of mice. *J Bone Miner Res*. 2000;15(6):1126-1131.
151. Ulrich D, Van Rietbergen B, Weinans H, Regsegger P. Finite element analysis of trabecular bone structure: a comparison of image-based meshing techniques. *Journal of biomechanics*. 1998;31(12):1187-1192.
152. van der Meulen MC, Jepsen KJ, Mikic B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone*. 2001;29(2):101-104.

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

153. von Meyer GH. Die Statik und Mechanik des menschlichen Knochengerüsts. Engelmann; 1873
154. Wagner LM, Neel MD, Pappo AS, Merchant TE, Poquette CA, Rao BN, Rodriguez-Galindo C. Fractures in pediatric Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23(9):568-571.
155. Wang YK, Sporle R, Paperna T, Schughart K, Francke U. Characterization and expression pattern of the frizzled gene Fzd9, the mouse homolog of FZD9 which is deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics.* 1999;57(2):235-248.
156. Wanner GA, Trentz O. Verletzungen des Halte- und Bewegungsapparates. In: Berchtold R, Bruch H-P, Trentz O, editors. *Chirurgie.* StudentConsult. Urban & Fischer Bei Elsevier; 2006.
157. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS,

## Kapitel 7 - Literaturverzeichnis

---

- Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520-562.
158. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Hirschwald, Berlin. 1892
159. Jiang Y, Zhao J, Genant HK. Macro- and Microdamagin of Bone Architecture. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*, Second Edition (2 Vol. Set). Academic Press; 2001.
160. Ziegelroth VD. Das spezifische Gewicht des menschlichen Körpers und Blutes — zugleich ein Beitrag zur Krasenlehre. *Virchows Archiv*. 1896;Volume 146

# Kapitel 8

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Amling als Freund und Doktorvater für seine Förderung, die Möglichkeiten, die ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeit hatte, und für seine unerschütterliche Geduld.

Ich danke meiner Familie. Ohne sie wäre ich nie zu dieser Arbeit in der Lage gewesen.

Und ich danke Julia, für die Energie, die sie mir immer geduldig gespendet hat.

Diese Arbeit ist für Berlin und Hamburg!

# Kapitel 9 - Lebenslauf

Robert Percy Marshall

## **Persönliche Informationen**

Geburtsdatum: 11.03.1980

Geburtsort: Berlin

## **Schulische Ausbildung**

1986 – 1990 Grundschule Marschweg, Hamburg

1997 – 1998 Highschool Cayuga, New York, USA

1990 – 2000 Gymnasium Rissen, Hamburg, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

## **Studium**

08/2000 – 04/2003 General Engineering Science (Technische Universität Hamburg-Harburg)

08/2003 Beginn des Studiums für Humanmedizin an der Universität Hamburg

09/2005 Physikum

11/2009 Staatsexamen

## **Beruf**

01.12.2009 Approbation als Arzt

Seit dem 01.12.2009

Arzt im Institut für Osteologie und Biomechanik

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Lottestraße 59

22529 Hamburg

Hamburg, den 06.08.2010



# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....