

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Professor Dr. med. Michael Amling

Auswirkungen des Alters und der Knochenmikroarchitektur auf die
trabekuläre Knochenmineralisationsdichteverteilung:
Eine rasterelektronenmikroskopische Studie an 152 humanen
Beckenkammbiopsien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Natalie Verena Küsters

aus Aachen

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.06.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Martin Gosau

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. BESTANDTEILE DES KNOCHENGEWEBES	4
2.1.1. KNOCHENGRUNDSUBSTANZ	4
2.1.2. KNOCHENZELLEN	5
2.2. MAKROSKOPISCHER AUFBAU DES KNOCHENS	8
2.3. MIKROSKOPISCHER AUFBAU DES KNOCHENS	11
2.3.1. KNOCHENFORMEN	11
2.3.2. OSSIFIKATION	12
2.3.3. KNOCHENDICHTE	14
2.3.4. ANALYSEVERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER KNOCHENDICHTEMESSUNG UND MINERALISATION	14
2.4. BONE MODELING	18
2.5. BONE REMODELING	19
2.5.1. REGULATION DES REMODELING-ZYKLUS	20
2.6. KNOCHENMINERALISATION	22
2.7. KALZIUMHOMÖOSTASE	23
2.8. REGULATION DES KALZIUMHAUSHALTES	25
2.8.1. PARATHORMON	25
2.8.2. VITAMIN D	26
2.8.3. CALCITONIN	28
2.8.4. SEXUALHORMONE	29
2.8.5. CORTISOL	29
2.8.6. WACHSTUMSHORMONE	31
2.8.7. VITAMIN C	31

2.9. KNOCHENERKRANKUNGEN.....	32
2.9.1. OSTEOMALAZIE.....	32
2.9.2. OSTEOPOROSE.....	33
3. MATERIAL UND METHODEN.....	35
3.1. HERKUNFT UND GEWINNUNG DER PROBEN.....	35
4. ERGEBNISSE.....	44
4.1. CHARAKTERISIERUNG DES KOLLEKTIVS.....	44
4.2. KNOCHENSTRUKTURPARAMETER.....	46
4.3. KNOCHENMINERALISATION.....	46
5. DISKUSSION.....	58
5.1. DISKUSSION DER METHODEN.....	60
5.1.1. CHARAKTERISIERUNG DES KOLLEKTIVS.....	60
5.2. AUSWIRKUNG DES ALTERS AUF DIE KNOCHENMINERALISATION.....	64
5.3. AUSWIRKUNG DER MIKROARCHITEKTUR AUF DIE KNOCHENMINERALISATION ..	66
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8. DANKSAGUNG.....	88
9. LEBENS LAUF.....	89
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
BMD	Bone mineral density (Knochenmineraldichte)
BMDD	Bone mineral density distribution (Knochenmineraldichteverteilung)
BMI	Body-Mass-Index
BV/TV	bone volume per tissue volume (Osteoidvolumen pro Knochenvolumen)
Ca	Kalzium
Ca high	Menge an hoch mineralisiertem Knochen (Fläche über dem 5. Perzentil der Kalziumverteilung)
Ca low	Menge an gering mineralisiertem Knochen (Fläche unter dem 5. Perzentil der Kalziumverteilung)
Ca mean	Mittlerer Kalziumgehalt (Mittelwert der Kalziumverteilung)
Ca peak	Häufigster Kalziumgehalt (Spitze der Kalziumverteilung)
Ca width	Heterogenität des Kalziumgehalts (Standardabweichung der Kalziumverteilung)
DEXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
DXA	dual X-ray absorptiometry
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FGF	Fibroblast growth factor
gr.	griechisch
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
OPG	Osteoprotegerin
OS/BS	osteoid surface per bone surface (Osteoidoberfläche pro Knochenoberfläche)
OV/BV	osteoid volume per bone volume (Osteoidvolumen pro Knochenvolumen)
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related protein
qBEI	quantitative backscattered electron imaging (quantitative Rasterelektronenmikroskopie)
QCT	quantitative Computertomographie

RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
Tb. N.	trabecular number (Trabekelanzahl)
Tb. Th.	trabecular thickness (Trabekeldicke)
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UVB	Ultraviolett B
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
μ m	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Aufbaus eines langen Röhrenknochens (modifiziert nach Benninghoff).....	10
Abbildung 2 Regulation der Kalziumhomöostase.....	24
Abbildung 3 Schema Vitamin D Synthese.....	28
Abbildung 4 Entnahmestelle der Beckenkammbiopsie, erstmals beschrieben von P. Bordier et al. 1964 (modifiziert nach Koehne 2014).....	36
Abbildung 5 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie mit Kortikalis und Spongiosa.....	37
Abbildung 6 Acrylatzylinder mit eingebetteter, humaner Beckenkammbiopsie.....	38
Abbildung 7 Humane Beckenkammbiopsie in von Kossa/ van Gieson Färbung.....	39
Abbildung 8 Acrylatzylinder mit eingebetteter Beckenkammbiopsie nach Kohlenstoffbedampfung.....	41
Abbildung 9 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie aus der Substantia spongiosa mittels qBEI.....	41
Abbildung 10 BMDD Histogramm in schematischer Darstellung.....	43
Abbildung 11 Prozentuale Verteilung der Männer und Frauen des Kollektivs.....	44
Abbildung 12 Altersverteilung der untersuchten weiblichen und männlichen Individuen in Jahren und absoluter Anzahl.....	45
Abbildung 13 Darstellung des ansteigenden Gesamtkalziums in Abhängigkeit des Alters	47
Abbildung 14 Darstellung der Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Alters.....	48
Abbildung 15 Darstellung des signifikanten Anstiegs des Kalzium-Spitzenwertes in Abhängigkeit des Alters.....	48
Abbildung 16 Auftragung des Gesamtkalziumwertes in Abhängigkeit des Knochenvolumens.....	49
Abbildung 17 Darstellung der Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Knochenvolumens.....	49
Abbildung 18 Darstellung des Kalziumspitzenwertes in Abhängigkeit vom Knochenvolumen.....	50
Abbildung 19 Auftragung des sinkenden Gesamtkalziumwertes mit Zunahme der trabekulären Dicke.....	51
Abbildung 20 Auftragung des Gesamtkalziumwertes mit ansteigender Trabekelanzahl....	51
Abbildung 21 Auftragung des Kalziumspitzenwertes mit ansteigender Trabekeldicke.....	52

Abbildung 22 Auftragung des Gesamtkalziumwertes in Abhängigkeit des Osteoidvolumens.....	53
Abbildung 23 Darstellung der steigenden Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Osteoidvolumens.....	53
Abbildung 24 Auftragung des signifikant fallenden Kalziumspitzenwertes gegen das Osteoidvolumen.....	54
Abbildung 25 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie mittels qBEI eines jungen Patienten a und eines älteren Patienten b.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Osteoporose.	15
Tabelle 2: Durchschnitt des Alters und des Body-Mass-Index der Männer und Frauen.....	45
Tabelle 3: Knochenvolumen, trabekuläre Dicke, Trabekelanzahl, Trabekelabstand, Osteoidvolumen sowie Osteoidoberfläche der Männer und Frauen in Prozent und absoluter Zahl.....	46
Tabelle 4: Darstellung der Knochenmineralisationsparameter des trabekulären Knochens.	46
Tabelle 5: Korrelationen der Mineralisationsparameter mit Alter, Geschlecht und BMI. ...	55
Tabelle 6: Korrelationen der Mineralisationsparameter mit dem Knochenvolumen und der Trabekelbeschaffenheit.....	56
Tabelle 7: Korrelation der Mineralisationswerte und der Osteoidparameter.....	57
Tabelle 8: Internationale Klassifikation für Untergewicht, Normalgewicht und Übergewicht abhängig vom Body-Mass-Index für Erwachsene	65

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der weiter voranschreitende demographische Wandel in Deutschland bedeutet für den medizinischen Sektor, dass immer mehr ältere Patientinnen und Patienten versorgt werden müssen und auch für längere Zeit auf medizinische Hilfe angewiesen sein werden. Das statistische Bundesamt schätzt für 2050 das in Deutschland mehr als zehn Millionen Menschen über 80 Jahre leben werden. Im Vergleich dazu betrug die Anzahl der über 80-jährigen Senioren im Jahr 2005 nur rund 3,7 Millionen.

Ein besonderes Problem stellt in diesem Zusammenhang die Sturzproblematik dar, denn ungefähr ein Drittel aller Personen über 65 Jahren stürzt einmal pro Jahr. Auslöser hierfür können z. B. organische Ursachen, wie Schwindel, Sehstörungen oder Herzrhythmusstörungen oder aber äußere Faktoren wie Treppenstufen oder Teppichvorleger sein. In rund zehn Prozent der Fälle ist die Verletzung schwerwiegender und es lässt sich sogar eine Fraktur nachweisen. Die am häufigsten betroffenen Regionen sind hier der Schenkelhals, die Wirbelkörper oder der Unterarm. Dann beginnt in der Regel für den Patienten ein längerer Krankenhausaufenthalt, nicht selten mit einer notwendigen Operation und einem damit einhergehenden akuten Verlust der Selbstständigkeit. Im Verlauf kommt es häufig, vor allem durch die Immobilisation bedingt, zu sekundären Komplikationen, wie z.B. Embolien oder Pneumonien, welche gerade bei älteren Patienten schwerwiegende Folgen haben und sogar letal enden können.

Doch wieso ist diese Anzahl der Frakturen schon bei Bagateltraumata z.B. im Vergleich zu Kleinkindern, welche bedeutend öfter stürzen, aber seltener Knochenbrüche davontragen, so hoch?

Gerade im höheren Alter kommt es durch den Verlust an Knochenmasse und einen durch verschiedene Ursachen bedingten, veränderten Mineralisationsgehalt des Knochens zu einem individuell erhöhten Risiko für Frakturen. Dieser Effekt kann gegebenenfalls durch das Vorliegen einer noch nicht diagnostizierten Knochenmineralisationserkrankung noch verstärkt werden.

Eine genauere Erkenntnis über den Knochenmineralisationsstatus der deutschen Bevölkerung könnte daher zu einer besseren Frakturprävention und damit dem Erhalt der Lebensqualität der Patienten und zudem zu einer deutlichen Reduktion der Kosten im Gesundheitssystem führen.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, durch die Analyse von humanen Beckenkammbiopsien herauszufinden;

- a) inwieweit sich der Mineralisationsgehalt des trabekulären Knochens durch epidemiologische Parameter wie Alter, Geschlecht und BMI verändert
- b) und sich der Mineralisationsgehalt im Verhältnis zu den wichtigsten Knochenstrukturparametern verhält.

Von besonderem Interesse ist hierbei die genaue Zusammensetzung des Kalziumgehaltes im Knochen verglichen mit der Knochenquantität. Denn es ist anzunehmen, dass die Knochenmatrixmineralisation neben der dreidimensionalen Knochenbeschaffenheit eine zentrale Rolle in der biomechanischen Stabilität des Knochens spielt. Um die Knochenmineralisationsverteilung präzise messen zu können, wurden die Proben des Kollektivs durch das Verfahren der quantitativen Rückstreuелеktronen-Abbildung (qBEI) vermessen.

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Daten sollen in Hinblick auf die klinische Relevanz eine zukünftige Verbesserung in der Frakturprävention darstellen und so maßgeblich zur Erhaltung eines gesunden und aktiven Lebens für Senioren aber auch für jüngere Patienten mit Osteopathien beitragen.

2. Einleitung

Als Knochen bezeichnet man eine spezielle Art von Bindegewebe aus organischen und anorganischen Anteilen, deren Zwischenzellsubstanz verkalkt ist und die von spezifischen Knochenzellen produziert wird. Die Aufgaben des Knochens sind äußerst vielfältig. Er ist ein wesentlicher Teil des Bewegungs- und Stützapparates, stellt eine Schutzhülle für die inneren Organe wie z.B. das Gehirn dar und umgibt das blutbildende Knochenmark (Weather, 1987). Der Knochen bietet zudem mit seiner Oberfläche einen Ansatzpunkt für Muskeln und Sehnen und spielt als Kalziumreservoir eine zentrale metabolische Rolle in der Kalziumhomöostase. Denn Kalzium macht ein bis zwei Prozent des gesamten Körpergewichtes eines gesunden Erwachsenen aus, wovon sich ca. 99 % des Gesamtkalziums im Knochen befinden (Cashman, 2002). Auch für die Homöostase von Magnesium, Phosphor, Natrium und weiteren lebenswichtigen Ionen des humanen Organismus ist der Knochen essentiell.

Das menschliche Skelett besteht aus circa 210 einzeln abgrenzbaren Knochen, die miteinander artikulieren und steht im Mittelpunkt des passiven Bewegungsapparates. Abhängig von der Verschmelzung kleinerer Knochen variiert die Knochenanzahl dezent zwischen den einzelnen Individuen (Drenckhahn, 2008). Die Knochenentwicklung beginnt bereits ab der sechsten Embryonalwoche. Das Knochenmaterial unterliegt einem stetigen Umbauprozess, welcher durch das physiologische Alter sowie bestimmte Knochenerkrankungen beeinflusst werden kann. Ein genereller Verlust an Knochensubstanz, die strukturelle Veränderung der Architektur des Knochens oder eine Verschiebung der Knochenmatrixmineralisation ist ein wesentlicher Aspekt für das Entstehen von Frakturen (Seeman, 2006).

Die Mineralisierung des Knochengewebes wird durch extraossäre Regulationsmechanismen gesteuert. Kommt es zu Störungen dieser Stoffwechselfvorgänge entstehen charakteristische skelettale Veränderungen, wie zum Beispiel bei der Osteoporose auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen wird. Nach dem Tod ist es dem menschlichen Skelett möglich noch mehrere Millionen Jahre intakt erhalten zu bleiben, wohingegen es zu Lebzeiten einem ständigen Umbauprozess unterliegt (Manolagas, 2010).

2.1. Bestandteile des Knochengewebes

Knochen ist das mechanisch am vielseitigsten beanspruchbarste Gewebe des Körpers. Es hat eine um etwa die Hälfte höhere Zugfestigkeit als eine Sehne und eine zehnmal so hohe Druckfestigkeit wie Knorpel (Lippert, 2003). Knochengewebe vereint in unnachahmlicher Weise Härte und Stärke mit dem durch eine Leichtbauweise möglichen geringsten Gewicht. Während die organischen Anteile für die Elastizität sorgen, verleihen die mineralischen Bestandteile die nötige Steifigkeit (Follet, 2004).

2.1.1. Knochengrundsubstanz

Die Knochengrundsubstanz weist spezifische Merkmale und Eigenschaften auf, die dem Knochen erhebliche Torsions- und Biegebeanspruchung verleihen. Im Knochen liegt die Matrix zum einen in mineralisierter und zum anderen in noch nichtmineralisierter Form, dem sogenannten Osteoid, vor. Die Steifigkeit und Härte des Knochens ist unter anderem abhängig vom Grad der Mineralisation der Knochenmatrix und steigt nachweisbar mit deren Zunahme (Fratzl 2004). Betrachtet man die Knochengrundsubstanz im gesunden Organismus bezogen auf ihr Trockengewicht besteht sie zu 65 % aus anorganischer und zu 35 % aus organischer Matrix (Aumüller, 2007).

Die anorganische Matrix enthält hauptsächlich Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), eine kristalline Form des Kalziumphosphats. Die Apatitkristalle sind nadelförmig und ca. 40 nm lang und 1,5-3 nm dick. Diese lagern sich parallel zur Längsachse an die Kollagenfibrillen an. Apatit wird auch in kleinen „Matrixvesikeln“ von den Osteoblastenfortsätzen abgeschnürt. Durch die geringe Größe entsteht eine verhältnismäßig große Oberfläche der Kristalle, die den Stoffaustausch mit anderen Geweben ermöglicht (Welsch, 2010).

Die organische Matrix besteht in ihrer ungeformten Komponente aus Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen. In ihrer geformten Komponente besteht sie aus 90 % Kollagenfasern Typ I, welche sich molekular von den Typ I Fasern des lockeren Bindegewebes unterscheiden und aus 10 % verschiedener nichtkollagenen Proteinen. Es ist in der aktuellen Studienlage noch nicht abschließend geklärt, welche exakten Faktoren für die Mineralisierung eine Rolle spielen. Man geht davon aus, dass die von Knochenzellen synthetisierten nicht-kollagenen Proteine, wie Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin und

Sialoprotein, wesentlich an der Entstehung der Apatitkristalle beteiligt sind. Entscheidend für die Knochengrundsubstanz und ihre individuellen Funktionen ist das Zusammenspiel aus hormonellen, metabolischen und nutritiven Einflüssen. Ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung des Mineralgehaltes und der Knochengrundsubstanz führt zu einem Verlust der Widerstandsfähigkeit gegenüber der mechanischen Belastung. Die auf den Knochen einwirkende Energie führt durch veränderte Kollagenvernetzungen auf kleinster Ebene zu Mikrofrakturen und dadurch zu einer Brüchigkeit des gesamten Knochens (Zimmermann, 2011).

Die optimale Zusammensetzung sowie der einzigartige Aufbau in einem dreidimensionalen Geflecht sorgen für die Ableitung der auf den Knochen einwirkenden Energie und damit zur Verhinderung von Frakturen (Chavassieux, 2007).

2.1.2. Knochenzellen

Im humanen Knochengewebe lassen sich morphologisch folgende vier Zellarten unterscheiden, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird;

- Osteoprogenitorzellen
- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

Die ersten drei Zellen entsprechen einem gemeinsamen Zelltyp in unterschiedlichen funktionellen Phasen (Welsch, 2010).

Osteoprogenitorzellen oder auch „Knochenstammzellen“ differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen und sind die Vorläuferzellen der Osteoblasten. Sie erscheinen als schmale hellkernige Zellen nahe der Knochenoberfläche im Periost oder Endost und können dort z.B. im Falle einer Fraktur aktiviert werden. Ihre Entwicklungsreihe über Präosteoblasten wird unter anderem über Parathormon (PTH) und Vitamin D sowie weitere morphogenetische Proteine gesteuert (Riminucci, 2015).

Die basophilen Osteoblasten („Knochenbildner“, von gr. ostéon = Knochen, blastós = Spross) sind für den Aufbau von wachsendem und ausgereiftem Knochen verantwortlich. Sie weisen eine 15 bis 30 µm dicke, kubische bis prismatische Form auf und liegen vornehmlich in epithelähnlicher Anordnung auf der von ihnen produzierten

Matrixoberfläche. Diese Aufreihung ähnelt dem Bild einer „Perlenschnur“. Sie sezernieren unter anderem Kollagen, Proteoglykane, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin sowie alkalische Phosphatase. Die von ihnen aufgebaute nicht-mineralisierte Matrix bedeckt bei einem gesunden Erwachsenen ca. 10-15 % der Knochenoberfläche und ist die Grundlage für eine effektive Mineralisation. Die Aktivität und Entwicklung der Osteoblasten ist komplex und wird autokrin, parakrin und endokrin gesteuert. Von besonderer Bedeutung sind hier Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin-like growth factor (IGF), Fibroblast growth factor (FGF), Endothelin-1, Prostaglandin Agonisten und Parathormon (Eriksen, 2010). Osteoblasten sind die einzigen Knochenzellen, welche Rezeptoren für das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon besitzen. Wird dieses ausgeschüttet, werden von den Osteoblasten Zytokine und andere Faktoren sezerniert, welche die Osteoklasten stimulieren und dadurch den Abbau der Knochenmatrix aktivieren. Ihre Lebenserwartung entspricht etwa einer Dauer von 30 Monaten als aktive Osteoblasten (Franz-Odendaal, 2006).

Mit etwa 60 % bis 80 % der ursprünglich entstandenen Osteoblasten geht ein Großteil der Zellen in die Apoptose, den programmierten Zelltod, über. Die übrig gebliebenen Zellen werden zu ruhenden Osteoblasten, den sogenannten Knochensaumzellen („bone lining cells“), oder mauern sich ein und reifen weiter zu Osteozyten heran (Jilka, 2007). Im aktuellen Stand der Wissenschaft ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Transformation als aktiver oder passiver Vorgang vollzogen wird (Delgado-Calle, 2017).

Die so entstehenden Knochensaumzellen bedecken und schützen mit einer Höhe von einem Mikrometer und einer Fläche von ca. 12 μm die Knochenoberfläche. Über so genannte „gap-junctions“, aus Proteinkomplexen zusammengesessene Zell-Zell-Verbindungen, stehen sie mit benachbarten Zellen ihrer Art und den Osteozyten in Verbindung. Sie verhindern den direkten Kontakt zwischen den Osteozyten und der Knochenmatrix und dienen so dem Schutz vor Knochenresorption an der jeweiligen Oberfläche (Florencio-Silva, 2015). Man geht aktuell davon aus, dass diese Zellen sich wieder in ihre aktive Zellform umwandeln können und somit eine wichtige Quelle für den Osteoblastenvorrat im Erwachsenenalter darstellen (Matic, 2016).

Osteozyten („Knochenzellen“, von gr. osteon = Knochen, kytos = Zelle) sind der dominierende Zelltyp im adulten Knochen. Hier machen sie einen Anteil von 90 bis 95 % aller Knochenzellen aus und sind damit etwa zehnmal häufiger zu finden als z.B.

Osteoblasten (Junqueira, 2005). Die Osteozyten liegen in kleinen, linsenförmigen Lakunen, von wo aus sie über kleinste Kanäle, die so genannten „Canaliculi“ durch Zellfortsätze ein großes Netzwerk zwischen benachbarten Osteozyten, Osteoblasten, „bone lining cells“ und Blutgefäßen erschaffen. Um die jeweilige Zelle besteht ein schmaler Hohlraum, welcher mit Kollagenfibrillen und interstitieller Flüssigkeit gefüllt ist und für eine Informationsweitergabe im Hohlraumlabirinth per Diffusion sorgt (Lüllmann-Rauch, 2012). Diese hoch organisierte Architektur ermöglicht dem Netz aus Zellen eine interzelluläre Kommunikation über die entsprechenden Zellverbindungen. Diese verbinden als transmembrane Kanäle das Zytoplasma der benachbarten Zellen und werden unter anderem über mechanische Reize, Ionen und Hormone gesteuert. Sie transportieren Moleküle mit einer Masse von unter einem Kilodalton (kDa) (Xia, 2010).

Die Zellaktivität und die morphologischen Unterschiede variieren mit dem Alter der Osteozyten. Jüngere Zellen besitzen ein Zellvolumen, ähnlich dem der Osteoblasten, wohin gegen ältere Osteozyten wesentlich tiefer in der Knochenmatrix eingemauert sind und deutlich weniger Zellvolumen aufweisen. Ihnen bleibt eine gewisse Stoffwechselaktivität erhalten, wodurch sie in der Lage sind Interzellulärsbstanz aufzulösen und somit eine wichtige Rolle in der Kalziumhomöostase spielen.

Osteozyten sind ein zentraler Bestandteil im Knochenumbauprozess. Sie regulieren die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten und fungieren so als endokrine Zellen. Außerdem stabilisieren sie den Vorgang der Knochenmineralisation, indem sie das lokale Milieu aufrechterhalten (Bonewald, 2011). Man geht davon aus, dass Osteozyten in der Lage sind bei mechanischer Beanspruchung des Knochens die Osteoblasten zur Rank-Ligand Sezernierung zu stimulieren (Tatsumi, 2007).

Einige Osteozyten gehen im Verlauf ihrer Lebenszeit in Apoptose und hinterlassen leere Lakunen, die dann nach einiger Zeit entweder von Osteoblasten mit neuer Knochenmatrix aufgefüllt werden, so dass diese im Lichtmikroskop nicht mehr zu erkennen sind. Oder sie werden im Laufe des Lebens durch Resorption der Osteoklasten aufgelöst (Parfitt, 2002).

Ein erniedrigter Oestrogenspiegel, als ein wesentlicher hormonaler Regulator des Knochenmetabolismus, führt zu einer erhöhten Apoptoserate der Osteozyten sowie zu einer verstärkten Osteoklastenbildung (Tomkinson, 1997) (Klein-Nulend, 2015).

Osteoklasten („Knochenbrecher“, von gr. *ostéon* = Knochen, *klan* = brechen) sind mehr- bis vielkernige Riesenzellen mit einer variierenden Größe von 50-100 μm . Ihre Aufgabe ist es, die verkalkte Knochenmatrix zu resorbieren und so für einen ständigen, individuell

angepassten Knochenumbau zu sorgen. Sie lösen sowohl die mineralische als auch die organische Komponente der Matrix auf. Man geht davon aus, dass sie mit Makrophagen verwandt sind und aus pluripotenten hämopoetischen Stammzellen hervorgehen. Osteoklasten sind reich an Mitochondrien, Golgi-Apparaten und Lysosomen (Teitelbaum, 2006).

Im spongiösen Knochen liegen sie in den durch ihre Resorption geschaffenen „Howship-Lakunen“. Hier bildet ihre Zellmembran einen als „ruffled border“ bezeichneten Saum aus vielen, dicht aneinander liegenden Falten. Osteoklasten kreieren ein saures Mikromillieu zwischen ihrer eigenen Oberfläche und der Knochenoberfläche und sind so von einer „sealing zone“ umgeben, welche als Versiegelungszone dient und den Adhäsionsapparat zur Anheftung an die Knochenmatrix darstellt. Über ihre Ausläufer gelangt saure Phosphatase und Cathepsin K zur Resorptionszone an der Knochenoberfläche, wo diese dann mit dem Knochenabbau beginnen (Väänänen, 2000) (Matsumoto, 2013).

Die Osteoklastenregulation wird durch verschiedene Faktoren gesteuert, einer der Hauptregulationswege wird über den RANKL/RANK/OPG Pfad reguliert. Der RANK-Ligand, welcher von Osteoblasten sezerniert wird, bindet an den RANK-Rezeptor (Receptor Activator of NF- κ B) auf den Osteoklastenvorläuferzellen und aktiviert diesen, wodurch es zu einer weiteren Differenzierung kommt (Khosla, 2001). Aber auch andere Komponenten spielen eine wichtige Rolle in diesem Kreislauf. Unter anderem inhibiert Calcitonin die Osteoklastenaktivität, wohingegen $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 die Resorption vorantreibt (Shen, 2015). Um einen gesunden Knochenstatus zu gewährleisten, benötigt der Organismus ein intaktes Zusammenspiel, der für den Knochenstoffwechsel wichtigsten Faktoren, auf welche im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

2.2. Makroskopischer Aufbau des Knochens

Die Entstehung von Knochen wird als Osteogenese bezeichnet. Im menschlichen Organismus unterscheidet man den Geflechtknochen, welcher als primärer Knochen entsteht, vom Lamellenknochen, dem sekundären Knochen. Im adulten Skelett ist bereits ab dem zehnten Lebensjahr der Anteil an primärem Knochen fast vollständig durch Lamellenknochen ersetzt (Aumüller, 2014).

Außen ist der Knochen von einer Knochenhaut, dem Periost, überzogen. Diese fehlt lediglich an Gelenkflächen und Ansatzpunkten für Bänder und Sehnen. Das Periost ist in der Lage den Knochen während des Wachstums oder im Rahmen der Frakturheilung exakt

zu formen. Die innere Oberfläche wird von so genanntem „Endost“ ausgekleidet. Es ist etwas dünner, als das Periost, dient aber ebenfalls der Ernährung und Erneuerung des Knochens. Histologisch lassen sich zwei Gewebsschichten darstellen. Das Stratum osteogenicum liegt innen und enthält zum einen Blut- und Nervenzellen und zum anderen Knorpel- und Knochenvorläuferzellen, welche zur Erneuerung von dort direkt in den Knochen einwandern können. Vor Ort bilden sie Ersatzgewebe, den so genannten „Kallus“, welcher später zu stabilem Knochen umgebaut wird. Das Stratum fibrosum verbindet das Periost mit der Knochenmatrix. Hierfür ragen Fasern aus straffem, kollagenen Bindegewebe, sog. „Sharpeysche Fasern“ bis in das Kollagenfibrillensystem der Kortikalis (Drenckhahn, 2008).

Die spätere Form der Knochen ist genau an die jeweilige Beanspruchung angepasst und genetisch determiniert. Es werden lange, kurze, platte sowie luftgefüllte Knochen unterschieden. Die Extremitäten bestehen hauptsächlich aus langen Röhrenknochen (*Ossa longa*), wie z.B. dem Humerus, dem Femur oder der Tibia. In der Mitte dieser Knochen befindet sich ein Schaft, die so genannte Diaphyse. Diese ist über die Metaphyse, welche für das Längenwachstum zuständig ist, verbunden mit einem proximalen und einem distalen, aufgetriebenen Ende, welches als Epiphyse bezeichnet wird. An dieser befinden sich jeweils die Gelenkflächen. Hier sitzen die Apophysen, welche als Knochenvorsprünge den Bändern und Sehnen als Ansatzpunkte dienen.

Die platten Knochen (*Ossa plana*), wozu auch das Hüftbein (*Os coxae*) zählt, aus welchem die vorliegenden Beckenkammknochen entnommen wurden, bestehen aus einem kompakten äußeren Rahmensystem sowie einem innen gelegenen schwammartigen Knochengestüt, der *Substantia spongiosa* (Aumüller, 2014). Am ausdifferenzierten Knochen lassen sich makroskopisch diese beiden strukturell sehr unterschiedlichen Kompartimente unterscheiden, welche an ihren Grenzen fließend ineinander übergehen (siehe Abbildung 1).

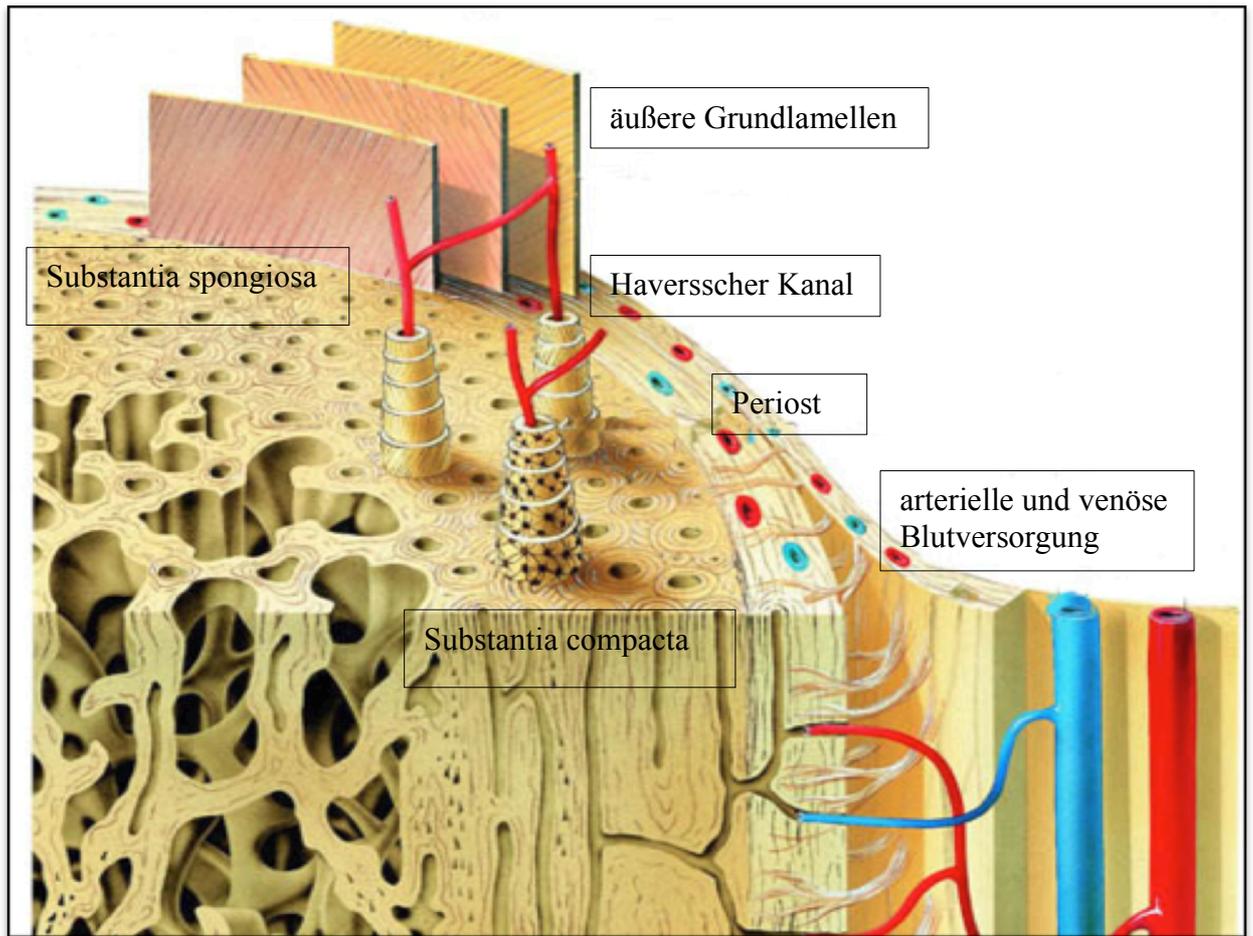


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Aufbaus eines langen Röhrenknochens (modifiziert nach Benninghoff).

Die Substantia spongiosa ist die im Inneren des Knochens gelegene Schicht und erscheint als dreidimensionales, schwamm-ähnliches Netzwerk. Sie besteht aus feinsten Bälkchen, den Trabekeln, welche sich parallel zur größten Druck- oder Biegebeanspruchung ausrichten. Die dadurch entstehenden Hohlräume sind mit Knochenmark, dem wichtigsten blutbildenden Organ des Menschen, ausgefüllt. Bei einem Erwachsenen macht dies ca. zwei bis drei Kilogramm des gesamten Körpergewichtes aus. Durch ihre große Oberfläche nimmt die Substantia spongiosa über 80 % des Gesamtvolumens des Knochens ein. Sie macht jedoch durch ihre einzigartige Leichtbauweise nur etwa 20 % der gesamten Knochenmasse aus (Kanis, 1994).

Ein besonders großer Anteil von Substantia spongiosa befindet sich im Achsenskelett des Menschen. Es grenzt den Rumpf zum Extremitätenskelett ab. Sie gibt daher auch einen guten Überblick über die Knochengesundheit eines Menschen, weshalb sie unter anderem für die vorliegende Studie ausgewählt wurde.

Aus den oben genannten Gründen manifestiert sich daher auch beim Krankheitsbild der Osteoporose, der pathologischen Abnahme der Knochendichte, im Frühstadium der Hauptanteil des Knochenschwundes in der Substantia spongiosa (Rahn, 1994). Auf dieses und weitere wichtige Krankheitsbilder des Knochenstoffwechsels wird im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch detailliert eingegangen.

Im Gegensatz dazu stellt die Substantia compacta, auch Kortikalis genannt, die äußere Begrenzung des Knochens dar. Makroskopisch imponiert sie als feste, solide Masse ohne erkennbare Zwischenräume und ist mit zahlreichen Blutgefäßen versehen. Sie ist hauptsächlich für die stützende und protektive Funktion des Skelettes verantwortlich. Das Verhältnis zwischen Kortikalis und Spongiosa variiert stark zwischen den einzelnen Knochenvarianten (Geneser, 1990).

2.3. Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Auch mikroskopisch unterscheiden sich die beiden genannten Knochenformen voneinander.

2.3.1. Knochenformen

Der Geflechtknochen, als primäre Knochenform, entsteht initial während der embryonalen Knochenentwicklung. Begonnen im Alter von zwei bis drei Jahren wird dieser dann in den langen Röhrenknochen durch Lamellenknochen ersetzt. Daher sind die Knochen von Kleinkindern im Vergleich zum adulten Skelett „weicher“ und „elastischer“. Sie verfügen zur Stabilitätssicherung aus diesem Grund auch über einen kräftigeren Bandapparat. Zudem ist das Periost noch dicker und stärker durchblutet, weshalb es bei Kindern nach einem Trauma statt einer richtigen Fraktur eher zu einer Fissur, also einer Spaltbildung ohne komplette Unterbrechung der Kontinuität des Knochens, kommt. Einen solchen Biegebruch bezeichnet man auch ähnlich wie das Bersten eines jungen Astes beim Knick als „Grünholzfraktur“ (Bald, 2012). Die Schädelnähte, die Alveolarwände, die ektopische Ossifikation und der neu entstehende Knochen bei der Frakturheilung bestehen aber auch beim Erwachsenen weiterhin aus Geflechtknochen.

Osteozyten liegen hier unregelmäßig verteilt vor, die Kollagenfibrillen sind isotop ausgerichtet und verflochten. Es liegen im Geflechtknochen insgesamt mehr Knochenzellen vor und die Grundsubstanz weist einen geringeren Mineralgehalt sowie einen höheren liquiden Anteil auf. Auf Grund dieser eher unorganisierten Struktur ist er so biege- und zugbelastbar, weist aber eine insgesamt geringere Stabilität im Vergleich zum

Lamellenknochen auf. Wird der Geflechtknochen abgebaut entsteht dadurch in der direkten Folge der Lamellenknochen. Dieser ist durch seine sich wiederholenden Bauelemente ebenfalls perfekt an seine individuellen Funktionen angepasst. Die einzelnen Knochenlamellen bestehen aus einer Dicke von drei bis sieben μm und bilden die zentralen Elemente des Lamellenknochens. Sie besteht aus anisotrop gelegenen Kollagenfibrillen, die im 90° Winkel zur benachbarten Lamelle stehen. Diese spezielle Anordnung imponiert im Polarisationsmikroskop wie ein Zebrastrifenmuster (Rahn, 1994).

Im adulten Lamellenknochen lassen sich bei identischer chemischer Zusammensetzung sowohl makroskopische als auch mikroskopische Strukturunterschiede zwischen Kortikalis und Spongiosa erkennen. Das Grundgerüst des Lamellenknochens ist das Haverssystem, auch als Osteon bezeichnet, als kleinste funktionelle Einheit. Dieses zylindrische Gebilde wurde nach seinem Erstbeschreiber Clopton Havers benannt (Havers, 1691). Mit einem Durchmesser von 200 bis 250 μm und einer Länge von bis zu einem Zentimeter, besteht es aus 20 bis 30 konzentrisch, um einen Kanal gelegene Lamellen, welche durch eine Kittlinie begrenzt werden. In einem solchen Kanal befinden sich Blutgefäße, Nerven sowie Lymphabflusswege (Reisinger, 2011).

Vom Periost aus laufen die so genannten Volkmann-Kanäle im rechten Winkel auf die Haverskanäle zu. Osteozytenausläufer schaffen ein Netzwerk zwischen den Gefäßen und sichern so die Vaskularisierung des Knochens. Generallamellen dienen dazu das Knochenmark abzugrenzen. Die Osteone machen insgesamt ca. zwei Drittel des kortikalen Knochenvolumens aus. Als Zeichen des stetigen Knochenumbaus finden sich als Überreste von abgebauten Osteonen die so genannten „Schaltlamellen“ (Cowin, 2001).

2.3.2. Ossifikation

Für den physiologischen Prozess der Knochenneubildung hat der Mensch zwei unterschiedliche Formen entwickelt. Es wird zwischen einer chondralen Ossifikation (Ossificatio cartilaginea) und einer desmalen Ossifikation (Ossificatio membranalis) unterschieden.

Bei der chondralen oder auch indirekten Verknöcherung, wird zuerst eine Vorstufe aus Knorpelzellen gebildet. Ab der sechsten Embryonalwoche entwickelt sich der Knochen aus osteogenen und chondrogenen Mesenchymverdichtungen. Das fetale Primordialskelett wird dann durch perichondrale und enchondrale Ossifikation umgebaut, Gelenkknorpel und Rippenknorpel werden ausgespart und bleiben erhalten. Der Prozess beginnt, indem

initial ein Knorpelgerüst angelegt wird, aus diesem später in zwei weiteren Schritten der Knochen entsteht. Zuerst bildet sich die Diaphyse als so genannte Knochenmanschette. Durch das Längenwachstum wird das Knorpelgewebe im Inneren gestützt und differenziert sich zu „Blasenknorpel“ um. Während dieser verkalkt, dringen Blutgefäße ein und die enchondrale Ossifikation beginnt. Es wandern mehrkernige Chondroklasten ein, welche die verkalkte Matrix abbauen und so Hohlräume für das Knochenmark schaffen. Aus gleichzeitig eingewanderten Osteoprogenitorzellen entstehen Osteoblasten. Diese beginnen Osteoid zu bilden. Die Knorpel-Knochengrenzen schieben sich so bis zu den jeweiligen Enden des Knochens vor (Drenckhahn, 2008).

Die Schädelknochen, sowie die Klavikula gehen aus der desmalen oder auch direkten Knochenbildung hervor. Als direkte Knochenbildung wird dieser Vorgang bezeichnet, weil sich hier der Knochen unmittelbar aus embryonalem Bindegewebe entwickelt. Dabei differenzieren sich Mesenchymzellen an den Ossifikationspunkten zu Osteoblasten, die dann beginnen Osteoid zu bilden. Die sich dabei entwickelnde primäre Spongiosa wird als Geflechtknochen bezeichnet (Welsch, 2010).

In beiden Knochenbildungsprozessen entsteht zuerst diese Knochenvorstufe, in der die Kollagenfibrillen noch ungeordnet vorliegen, die dann wie zuvor beschrieben im Verlauf zu Lamellenknochen umgebaut wird. Das Knochenwachstum wird von einer Kombination aus genetischen Faktoren und äußeren Einflüssen bestimmt. Studien haben gezeigt, dass vor allem die mechanische Stimulation einen besonderen Einfluss auf das Skelettsystem im Wachstum hat (Kannus, 1995).

2.3.3. Knochendichte

Der Knochen ist neben dem Zahngewebe das schwerste Gewebe des menschlichen Körpers. Die Dichte wird mit ca. zwei bis drei g/ml gemessen (Lippert, 2011). Physiologische Umbauprozesse des Knochens sind geprägt durch unterschiedliche Lebensdekaden des Menschen. Im Laufe der Zeit passt sich die Knochendichte perfekt an die individuell gegebenen Umstände an.

Sowohl Männer als auch Frauen erreichen im Alter von etwa 25 Jahren die höchste Knochendichte. Nach den ersten drei Lebensjahrzehnten nimmt die Volumendichte der Spongiosa dann von 35 % auf 23 % ab und sinkt in der achten Lebensdekade auf nur noch 10 % (Adler, 2000). Frühe Studien konnten bereits nachweisen, dass sich eine gesteigerte physische Aktivität bei jungen Menschen positiv auf die spätere Knochendichte auswirkt (Recker, 1992). Ebenso bedingt eine abnorme Reduktion der Knochendichte bereits im Kindesalter ein nachweislich erhöhtes Frakturrisiko (von Heideken, 2014). Daher ist vor allem die Messung der Dichte für die Knochengesundheit der Bevölkerung von wesentlicher Bedeutung.

2.3.4. Analyseverfahren zur Bestimmung der Knochendichtemessung und Mineralisation

Die heutigen Messverfahren liefern detaillierte Informationen über die chemische und kristalline Zusammensetzung der Knochenmasse. Sie ermöglichen es, das Knochenalter fast exakt zu ermitteln und geben Aufschluss über knochenspezifische Erkrankungen. Das konventionelle Röntgen dient auf Grund der nicht-invasiven Methodik, der hohen Verfügbarkeit und der sowohl kostengünstigen als auch einfachen Handhabung als erstes Diagnostikum. Hiermit lassen sich z.B. grobe Deformitäten der Knochen, Frakturen oder Knochenmetastasen sicher und schnell erkennen. Schwieriger gestaltet sich hingegen eine Diagnose im Frühstadium einer Osteopathie, da ein auffälliger Knochenbefund meist erst nach längerer Zeit der Erkrankung radiologisch deutlich sichtbar wird.

Möchte man eine Aussage über die Struktur des Knochens und damit eine Quantifizierung der Knochendichte machen, muss man also eine Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) heranziehen. Hierfür stehen heutzutage unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Vor allem für Patienten mit Knochenerkrankungen wie z.B. der

Osteoporose ist eine einfache und sichere Diagnostikmethode, welche im Frühstadium aber auch zur Verlaufsbeurteilung der Erkrankung geeignet ist, von besonderer Bedeutung.

Dual-Energy X-Ray Absorptiometry

Den Goldstandard liefert hierfür die Doppelröntgenabsorptiometrie, auch DXA oder früher DEXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry) genannt. Es lässt sich hiermit ein Zusammenhang zwischen der röntgenologischen Dichte und der Knochenfestigkeit ermitteln (Dalen, 1976). Man nutzt hier den Effekt der unterschiedlichen Absorption der Röntgenstrahlen auf die Knochendichte des Zielausschnittes. Der ermittelte Wert wird für jeden Patienten in Bezug auf den so genannten „T“- beziehungsweise „Z-Score“ betrachtet. Der T-Score beschreibt die Standardabweichung der Knochendichte vom Durchschnittswert eines gesunden Menschen mit 30 Jahren. Der Z-Score misst den Bezug der Knochendichte des Patienten zu einem Vergleichskollektiv gleichen Alters und Geschlechts.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Osteoporose.

WHO Klassifikation	Grad	T-Wert	Frakturen
Normalbefund		+1 bis -1	Keine Frakturen
Osteopenie	0	-1 bis -2,5	Keine Frakturen
präklinische Osteoporose	1	ab -2,5	Keine Frakturen
manifeste Osteoporose	2	ab -2,5	1 bis 3 Wirbelkörperfrakturen
Fortgeschrittene Osteoporose	3	ab -2,5	multiple Wirbelkörperfrakturen, oft auch extraspinale Frakturen

Ab 1987 entwickelte man durch diese planare Technik präzise Referenzwerte für die lumbale Wirbelsäule sowie den proximalen Femur als längsten und kräftigsten Röhrenknochen des menschlichen Skelettes. So konnte im Jahr 1994 die Osteoporose von der World Health Organisation (WHO) erstmals als Erkrankung definiert werden. Durch die gute Reproduzierbarkeit der DXA wurde es z.B. möglich Verlaufskontrollen im Rahmen einer laufenden Therapie zu fertigen, weshalb diese Mess-Methode auch für die Forschung von besonderem Interesse war. Als Einschränkungen der DXA ist jedoch die Überlagerung von degenerativen Verkalkung z.B. der Aorta bei älteren Patienten oder bei

stattgehabten Frakturen zu nennen. In Kombination mit der Frakturrisiko-Formel „FRAX“ kann sogar ein individuelles Risiko einer bevorstehenden Fraktur berechnet werden. Bereits eine Standardabweichung der Knochendichte von 1.5 führt zu einem signifikant erhöhten Frakturrisiko (Kanis, 2007).

Die Messung der Knochendichte mittels DXA ist das aktuell einzige durch die WHO zugelassene Messverfahren. Sie ist mit einer geräteabhängigen Untersuchungsdauer von wenigen Sekunden bis zehn Minuten und ungefähren Kosten von 50 Euro eine im Praxisalltag gut durchführbare diagnostische Maßnahme (World Health Organization, 2004).

Besonders wichtig ist die Knochendichtebestimmung für die initiale Diagnosestellung von Skeletterkrankungen, da erst bei einer Reduktion der Knochenmasse um 30 % im nativen Röntgenbild eine verminderte Knochendichte zu erkennen ist (Bohndorf, 2006). Die Quantifizierung der Knochendichte ermöglicht dem behandelnden Arzt eine frühe Detektion z.B. einer Osteoporose, häufig noch vor dem Eintreten von Frakturen.

Studien zeigen, dass eine durch DXA ermittelte Erniedrigung der Knochendichte z.B. bei postmenopausalen Frauen mit einem doppelt erhöhten Frakturrisiko innerhalb von zwölf Monaten nach der erfolgten Bestimmung einhergeht (Miller, 2002).

Die Metaanalyse weiterer prospektiver Kohortenstudien konnte zeigen, dass das relative Frakturrisiko bei einer DXA-Messung am Femurhals pro Standardabweichung Abnahme 1,6 (95% KI 1,4 – 1,8) für vertebrale Frakturen und Hüftfrakturen betrug (Johnell, 2005).

Quantitative Computertomographie

Eine weitere Methode der Knochendichtemessung ist die quantitative Computertomographie (QCT). Bei diesem volumetrischen Messverfahren wird die physikalische Dichte jedes Volumenelements in kg/m^3 dargestellt. Der wesentliche Aspekt ist die dreidimensionale Darstellung des Knochenabschnittes, wodurch es möglich ist Spongiosa und Kortikalis zu unterscheiden und so getrennt voneinander zu betrachten. Während die Spongiosa eine sensitivere Aussage über den aktuellen Knochendichtestatus zulässt, wird durch die zusätzliche Betrachtung der Kortikalis eine genauere Einschätzung des Frakturrisikos möglich gemacht. Der Stellenwert in der alltäglichen Diagnostik ist jedoch bei eingeschränkter Reproduzierbarkeit, höherem Kosten- und Gerätesaufwand und der deutlich größeren Strahlenbelastung des Patienten eher gering (Kurth, 2013).

Histomorphometrie

Die invasivste aber auch sensitivste Methode zur Bestimmung von Knochenpathologien stellt auch weiterhin die Histomorphometrie dar. Mit diesem quantitativen Verfahren, bei welchem Strukturparameter der Knochenbiopsie bestimmt werden, lässt sich ein genaues Bild der Knochenqualität darstellen. Hierzu dient die zweidimensionale Vermessung der Biopsie. Durch die ermittelten Messinformationen kann dann ein dreidimensionaler Parameter wie das Knochenvolumen errechnet werden.

Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein einheitliches Terminologiesystem für die Knochenhistomorphometrie entwickelt. Zum einen kann das Knochenvolumen im Verhältnis zum Gewebevolumen (BV/TV), die Trabekeldicke (Tb.Th.), die Trabekelanzahl (Tb.N) und der Abstand der einzelnen Trabekel zueinander (Tb.Sp.) bestimmt werden. Ergänzend kann das Osteoidvolumen im Verhältnis zum Gewebevolumen (OV/TV) sowie das jeweilige Osteoidvolumen pro Knochenvolumen (OV/BV) dargestellt werden (Parevell, 1983) (Parfitt, 1988). So ist gewährleistet, dass eine überregionale Vergleichbarkeit der Patientendaten in der Diagnostik, Verlaufskontrolle und für histomorphometrische Analysen besteht.

Quantitative Backscattered Electron Imaging

Zur Untersuchung der Qualität des Knochenmaterials zu welcher der Grad der Knochenmatrixmineralisation als ein wichtiger Faktor für die mechanischen Eigenschaften des Knochens zählt, wird eine weitere Messmethode benötigt. Ein adäquates Verfahren um nicht nur die Knochenmineraldichte (bone mineral density = BMD) sondern auch die Knochenmineraldichteverteilung (bone mineral density distribution = BMDD) beurteilen zu können, stellt die Methode des „Quantitative Backscattered Electron Imaging“ (qBEI) dar.

Hier können Unterschiede im Grad der Mineralisation der entnommenen Knochenbiopsie unabhängig vom Knochenvolumen dargestellt werden. Diese Methode basiert auf einer linearen Korrelation zwischen unterschiedlichen Graustufen der inhomogenen Knochenmatrix, wodurch die Kalziumverteilung exakt bestimmt werden kann (Boskey, 2001) (Milovanovic, 2014). Um eine pathologische Knochenmineraldichteverteilungen detektieren zu können und so ein Verständnis für die Mineralisationskinetik zu erlangen, muss zuerst ein Standardwert für das gesunde Kollektiv festgelegt werden.

Besonders gut eignen sich Beckenkammbiopsien für diese histopathologische Untersuchung, da diese standardisiert entnommen werden können und durch die

Entnahmestelle wenig postinterventionelle Komplikationen, wie z.B. Schmerzen oder Hämatome zu erwarten sind. Die Entnahme aus dem Beckenkamm bietet eine adäquate Beurteilung des Knochenstoffwechsels durch den hohen Anteil an spongiösem Knochen mit großer Relevanz für die aktuelle Knochenumbaurate.

2.4. Bone Modeling

Während des Heranwachsens eines Individuums verschiebt sich das Verhältnis von Knochenanbau und Knochenabbau zu Gunsten des Knochenwachstums. Es wird mehr Knochen gebildet als gleichzeitig resorbiert werden kann und die Knochenmasse und Körpergröße nehmen dadurch zu. Das „Bone Modeling“ kontrolliert somit das exakte Wachstum, die Größe und die Form des jeweiligen Knochens. Diese sind genetisch festgelegt und entsprechen der jeweiligen Funktion im Skelettsystem. Zudem kann sich die Architektur des Knochens an die sich stetig ändernde mechanische Bedingung anpassen, wodurch eine durchgehende optimale Beanspruchung gewährleistet ist (Giustina, 2008).

Die individuelle endgültige Körpergröße kann in der Pubertät zum Beispiel durch eine konventionelle Röntgendiagnostik der Mittelhand detektiert werden. Sie zeigt den Status über den noch zu erwartenden Wachstumsschub aufgrund der Verknöcherungen der einzelnen Knochen an. Diese Bestimmung der Knochenreife dient dem Abgleich zwischen der individuellen Entwicklung eines Kindes mit dem ebenso alten Vergleichskollektiv. Hierzu kann zum Beispiel die Atlasmethode nach Greulich und Pyle herangezogen werden, bei der die zunehmenden Verschmelzungen der Fingerknochen und der Epiphysenfugen verglichen werden und anhand einer Vergleichstabelle das aktuelle Alter sowie die voraussichtliche Endgröße des Kindes bestimmt werden kann (Speer, 2013).

Besondere Bedeutung hat diese Diagnostik unter anderem für die Abklärung von Groß- oder Kleinwuchssyndromen in der humangenetischen Beratung (Moog, 2014).

Aber sie wird auch zunehmend in der Forensik zur Schätzung des tatsächlichen Alters bei unklaren Altersangaben und Festlegung einer Volljährigkeit angewandt (Nowotny, 2014). Hierbei gilt es zu beachten, dass trotz vorangeschrittener Messmethoden lediglich eine Eingrenzung des realen Alters erfolgen kann.

2.5. Bone Remodeling

Das menschliche Skelett muss sich fortlaufend dem Wachstum des Individuums in seiner äußeren Form anpassen. Das Verhältnis von Resorption und Synthese befindet sich bei diesem Vorgang normalerweise im Gleichgewicht (Wolff, 1892). Einer der Vorreiter seiner Zeit war Harold M. Frost (1921 – 2004), der unter anderem den Begriff des „bone remodeling“ prägte. Die Knochensubstanz unterliegt diesem lebenslangen, balancierten Umbau und schafft ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Knochenabbau durch Osteoklasten und der Produktion neuer Knochenmatrix durch Osteoblasten (Frost, 2003). Kommt es zu Störungen der Balance entstehen spezifische Erkrankungen des Knochens. Eine Aufgabe des Remodeling ist die Anpassung der Proportionen während des Längen- und Dickenwachstums des Knochens. In den ersten beiden Lebensjahren eines Individuums werden 50 % des Gesamtskelettes pro Jahr umgebaut. Bei Erwachsenen sind es dann noch rund fünf Prozent pro Jahr (Jerosch, 2002).

Durch den Prozess der Knochenumwandlung hält der Körper zudem den Kalziumhaushalt im Gleichgewicht, er erhält die Statik und passt den Knochen an aktuelle Druckverhältnisse und Belastung an. Gleichzeitig werden auch Mikrofrakturen im Gewebe repariert. Dafür zuständig ist die „BMU“ (basic multicellular unit) die einen Verband aus Osteoblasten und Osteoklasten darstellt (Frost, 1990).

Der Remodeling-Zyklus besteht aus drei aufeinander folgenden Phasen;

Er beginnt mit der Resorptionsphase, in welcher die Osteoklasten durch Mineralverlust gealterte Knochenmatrix abbauen. Im Anschluss folgt die Umstellungsphase in der einkernige Deckzellen auf der Knochenoberfläche erscheinen und diese entsprechend präparieren. Damit beginnt die abschließende Formationsphase. In dieser Phase füllen Osteoblasten die entstandenen Lakunen wieder mit neuer Knochensubstanz auf. Zum Schluss wird die Knochenoberfläche von den elliptischen, flachen Knochensaumzellen bedeckt, die dort solange verbleiben, bis der Zyklus wieder von vorne beginnt. Die Resorptionsphase dauert ungefähr zwei Wochen, etwa doppelt so lange benötigt die zweite Phase. Für die Osteoidsynthese brauchen die Osteoblasten ca. vier Monate (Hadjidakis, 2006). Im Anschluss erfolgt die Mineralisation der entstanden Matrix in einer frühen und einer späten Mineralisationsphase.

2.5.1. Regulation des Remodeling-Zyklus

Die mechanische Beanspruchung ist ein wesentlicher Aspekt in der Regulation des Knochenbaus. Kommt es zu einer fehlenden Beanspruchung, ist ein Verlust von Knochenmasse die unmittelbare Folge. Dies zeigt sich zum Beispiel bei hospitalisierten Patienten mit eingeschränkter Beweglichkeit oder einer vollständigen Bettlägerigkeit.

Aber auch bei einem Aufenthalt im Weltraum ist ein Schwund von Knochenmasse zu beobachten. Durch die fehlende Gravitationskraft kommt es nachweislich in nur einem Monat zu einem Verlust von rund einem Prozent der gesamten Knochenmasse (Bartl, 2013). Man geht davon aus, dass hier die Osteozyten als Mechanosensoren eine wesentliche Rolle spielen.

Um die Balance zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität zu steuern, sind zudem weitere verschiedene systemisch und lokal wirkende Regulationsmechanismen notwendig.

Unter anderem spielen folgende Faktoren eine zentrale Rolle:

- M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)
- RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)
- RANK (Receptor Activator of NF- κ B)
- Ephrin B2 (Protein der Ephrin-Familie)
- OPG (Osteoprotegerin)
- TGF - β (Transforming Growth Factor)

Zu Beginn wird der von Osteoblasten sezernierte M-CSF für die Proliferation der Osteoklastenvorläufer benötigt, damit die Osteoklasten in ihre aktive Form übergehen (Lüllmann-Rauch, 2012). Eine zentrale Rolle spielt im weiteren Verlauf das RANKL-Osteoprotegerin-Zytokinsystem. Lacey und Kollegen entdeckten 1998 unabhängig von drei weiteren Forschungsgruppen das zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehörende Osteoprotegerin (Lacey, 1998). Dieses wird von Osteoblasten sezerniert und blockiert die Differenzierung von Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen. Damit übt es eine indirekte Auswirkung auf die Knochenresorptionsrate aus (Simonet, 1997).

„Receptor Activator of NF- κ B Ligand“, kurz „RANKL“, gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie und bindet an den RANK Rezeptor von osteoklastären Vorläuferzellen. Dies führt zu deren Reifung und Überleben. RANKL wird von Osteoblasten und von T-Lymphozyten gebildet (Raju, 2011). Im Falle eines Anstieges werden vermehrt Osteoklasten aktiviert.

Diese sorgen daraufhin für einen gesteigerten Knochenabbau, wodurch es im Verlauf zu einem erhöhten Knochenverlust kommt. OPG wirkt als Rezeptorantagonist und kann so die Knochenresorption über RANKL steuern. Die Osteoklastenaktivität kann unter anderem durch Ephrin B2, welches sich auf dem Osteoklasten befindet und den dazugehörigen Rezeptor auf dem Osteoblasten, gestoppt werden. Zudem fördert diese Interaktion die Differenzierung der Osteoblasten und somit den Anbau von neuem Knochen. Es ist von besonderer Bedeutung dieses empfindliche System noch exakter zu entschlüsseln, da eine übermäßige Aktivierung von Osteoklasten u.a. mit verschiedenen osteopenen Störungen assoziiert ist und dadurch weitere Ansatzpunkte für eine Therapie gefunden werden könnten (Honma, 2014).

Durch die wechselnde Beanspruchung des menschlichen Skelettsystems werden durch den ständigen Umbau auch kleinste belastungsbedingte Schädigungen abgebaut, wodurch einer Materialermüdung vorgebeugt wird. Kommt es jedoch zu einer identischen und permanenten Überbelastung kann es auch bei einem knochengesunden Organismus aufgrund der fehlenden zeitlichen Komponente des Remodelings durch die initiale Osteolyse zu Ermüdungsfrakturen kommen. Ein Beispiel hierfür ist die so genannte „Marschfraktur“ des Mittelfußknochens, welche ohne ein eigentliches Trauma durch eine ungewohnte zeitlich anhaltende Geh- und Laufbelastung entstehen kann (Richard, 2014).

2.6. Knochenmineralisation

Die Mineralisierung des Knochengewebes ist abhängig von der Kalzium- und Phosphatkonzentration im Plasma. Sie benötigt zudem einen alkalischen pH-Wert, da die Kalziumphosphate erst in saurem Milieu löslich werden (Schmidt, 2011). Die neu entstehende Knochenmatrix wird immer auf bereits vorhandenes, mineralisiertes Knochenmaterial aufgelagert. Die dafür benötigte Osteoid-Schicht, besteht aus Kollagenfibrillen und wird von den aktiven Osteoblasten als organisch-chemisches Grundgerüst produziert. Die Informationsübermittlung über die gap-junctions zwischen den Osteoblasten ermöglicht eine synchrone Bildung der neuen Knochenlamellen. Für die Mineralisation müssen kristalline Kalzium-Phosphat-Präzipitate gebildet werden. Dazu schnüren die Osteoblastenausläufer etwa 70 nm messende Vesikel in die Extrazellulärmatrix ab. Sie enthalten unter anderem das Enzym alkalische Phosphatase, welches durch einen Lipidanker an der Außenseite der Membran lokalisiert ist. In den Matrixvesikeln bilden sich, bei hoher Ionenkonzentration, kleine Hydroxyapatit-Kristalle. Man geht davon aus, dass Kalzium-bindende Moleküle den Kristallisationskern hierfür bilden. Die Kristalle wachsen so lange heran, bis diese die Vesikelmembran perforieren und im Extrazellularraum zirkulieren. Hier nehmen sie weiter an Masse zu und lagern sich an die Kollagenfibrillen an. So entstehen unterschiedliche Mineralisationsstufen direkt nebeneinander, weshalb der Knochen eine insgesamt inhomogene Mineralisationsverteilung aufweist (Lüllmann-Rauch, 2012).

Der Mechanismus des Remodelings verläuft im trabekulären Knochen verglichen mit dem kortikalen Knochen auf Grund der deutlich größeren relativen Oberfläche mit einer etwa zehnmal höheren Umbaurate ab. Es werden jährlich ungefähr 28 % des spongiösen und vier Prozent des kortikalen Knochens umgebaut. Basierend auf der Tatsache, dass die Spongiosa ca. ein Viertel der gesamten Skelettmasse ausmacht, ergibt sich dadurch ein Gesamtumbau von rund zehn Prozent im Jahr für einen Erwachsenen (Lüllmann-Rauch, 2012).

In der Spongiosa wandern die Osteoklasten mit 25 μm pro Tag über die Oberfläche und hinterlassen Erosionslakunen, die etwa 50-70 μm tief sind und einen Durchmesser von 100 μm besitzen. Osteoblasten füllen die dadurch entstehenden Furchen im Anschluss wieder mit Osteoid auf. In der Substantia compacta erschaffen Osteoklasten mit einer Geschwindigkeit von bis zu 40 μm pro Tag Erosionstunnel. Diese können einen

Durchmesser von 200 μm erreichen und mehrere Millimeter tief sein. Aus ihnen entstehen im Verlauf neue Osteone (Drenckhahn, 2008).

2.7. Kalziumhomöostase

Kalzium spielt als fünfthäufigstes Element eine wesentliche Rolle im menschlichen Körper. Es ist unter anderem essentiell für eine funktionierende Mineralisation, die Steuerung von Signaltransduktionswegen, die Aktivierung von Proteinen, die Kontraktion der Muskeln sowie für die Blutgerinnung (Peacock, 2010). Es befindet sich circa ein Kilogramm Kalzium in einem gesunden humanen Organismus, wovon 99 % als Hydroxylapatit in Zähnen und Knochen gespeichert ist (Rassow, 2008). Der Kalziumspiegel kann durch ein sensibles Zusammenspiel zwischen Knochen, Extrazellularräum und der Resorption über den Darm jederzeit konstant gehalten werden. Die Serumkonzentration von Kalzium liegt bei 2,2 bis 2,6 mmol/l, wovon 1,2 mmol/l als freie Ionen vorliegen (Benninghoff, 2003).

Für den Körper ist diese Konstanz lebensnotwendig, da es schon bei winzigen Schwankungen zum Beispiel zu einer hypokalzämischen Tetanie mit charakteristischer Pfötchenstellung kommen kann. Eine solche Hypokalzämie wird zum Beispiel durch eine chronische Niereninsuffizienz oder aber durch einen manifesten Vitamin D Mangel hervorgerufen.

Tritt im Gegensatz dazu eine Hyperkalzämie, z.B. durch Medikamente, eine Tumorerkrankung oder eine Schilddrüsenüberfunktion auf, entstehen Symptome wie Herzrhythmusstörungen, Polyurie, Nephrolithiasis oder eine Pankreatitis. Bei einer rasch progredienten Entwicklung kann es sogar zu einer lebensbedrohlichen hyperkalzämischen Krise kommen (Balletshofer, 2009).

Vereinfacht dargestellt wird die Kalziumhomöostase durch folgende vier Organe reguliert (siehe Abbildung 2);

- Dem Knochen, welcher als Speicherorgan fungiert.
- Den Nebenschilddrüsen, welche die Regulation steuern.
- Dem Darm, welcher für die Aufnahme von Kalzium sorgt.
- Den Nieren, welche für die Ausscheidung von Kalzium verantwortlich sind.

Die Speicherung von Kalzium und Phosphat im Knochen unterliegt einer exakten hormonellen Steuerung. Sollte die Konzentration im Serum unter den Normalwert des Gesamtkalziums von 2,2 mmol/l sinken, sorgen Parathormon und Calcitriol für einen erneuten Kalzium-Anstieg. Dies geschieht unter anderem durch die Freisetzung von Ionen aus dem Knochengewebe. Kommt es zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut auf Werte über 2,6 mmol/l wird die Synthese von Calcitonin gehemmt. Dies stimuliert dann einen zügigen Abfall der Kalziumkonzentration im Blut (Lumachi, 2011).

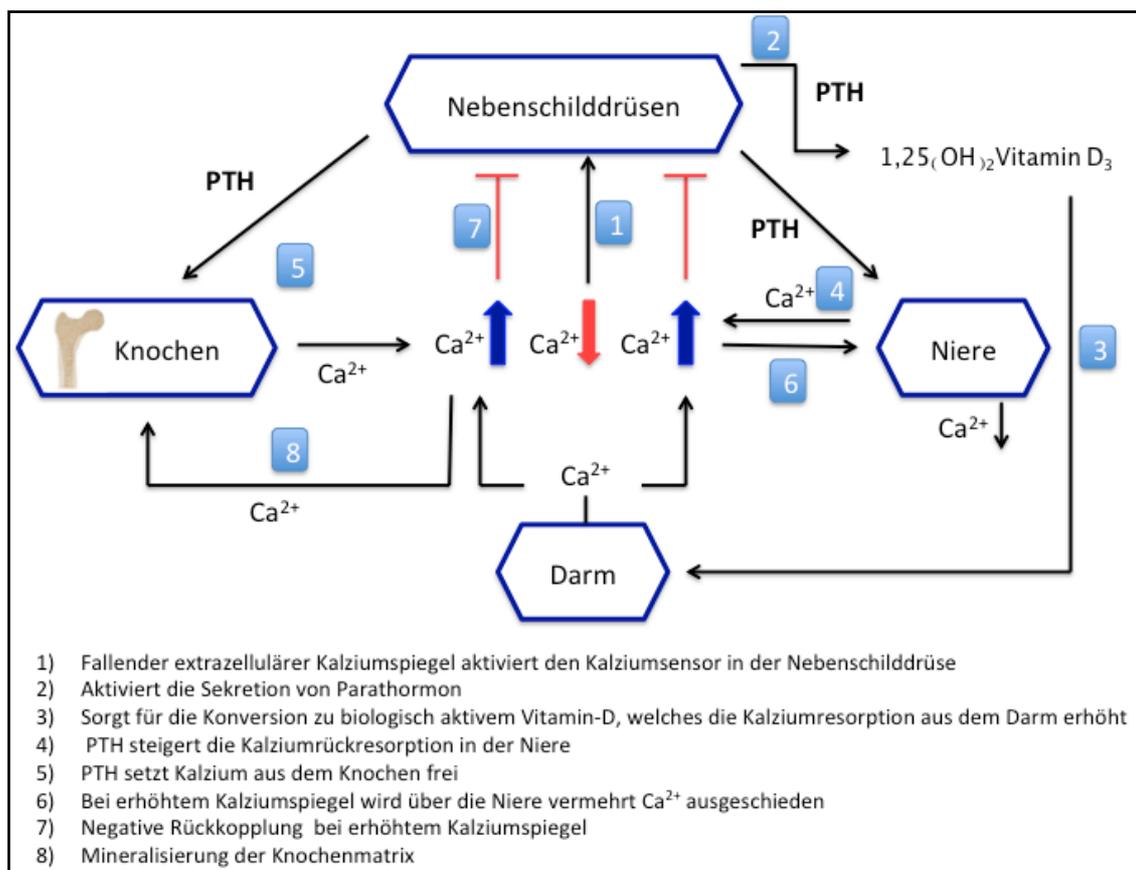


Abbildung 2 Regulation der Kalziumhomöostase.

2.8. Regulation des Kalziumhaushaltes

Besonderes Augenmerk soll in der vorliegenden Arbeit auf den Aspekt des Knochens in diesem komplexen Kreislauf gelegt werden. Durch den zuvor beschriebenen lebenslang ablaufenden Umbau-Prozess kommt es zur dauerhaften Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen, wodurch die Kalziumhomöostase stetig aufrecht erhalten wird. Die Steuerung der Osteoklasten und Osteoblasten beim Knochenumbau beinhaltet wie oben beschrieben sehr komplexe und noch nicht vollständig entschlüsselte Regulationsmechanismen. Eine wesentliche Rolle in diesen Prozess spielen die im Folgenden aufgeführten Hormone.

2.8.1. Parathormon

Der menschliche Organismus weist vier paarig angelegte, etwa 30 mg schwere Nebenschilddrüsen (*Glandulae parathyroideae*) auf, welche der Schilddrüse rechts und links anliegen. Sie sind aber ein funktionell eigenständiges Organ und sorgen durch eine kontinuierliche Anpassung der Parathormonsekretion für ein konstantes Serumkalziumlevel.

Parathormon ist ein Peptidhormon bestehend aus 84 Aminosäuren, welches in den Nebenschilddrüsen gebildet und auch gespeichert wird. Fällt die extrazelluläre Kalziumkonzentration, gelangt es von dort in die Blutbahn und sorgt gleichzeitig für einen Kalziumanstieg sowie einen Phosphatspiegelabfall (Bartl, 2008). Die Nebenschilddrüsen verfügen für diese Steuerung über einen „calcium-sensing-rezeptor“. Dieser zentrale Regulator ist bereits in allen bei der Kalziumhomöostase mitwirkenden Zellen nachgewiesen worden (Kallay, 2012). Zudem weist PTH eine extrem kurze Halbwertszeit von nur vier Minuten auf, wodurch dem Körper eine besonders schnelle und exakte Regulation ermöglicht wird. Im Knochen führt PTH zu einer raschen Freisetzung von Kalzium und Phosphat. Es bindet an gleichnamige Rezeptoren, die von Osteoblasten und Epithelzellen des distalen Nierentubulus exprimiert werden. Kommt es zu einem PTH-Anstieg, setzen die Osteoblasten ihre Osteoidsynthese herab und sezernieren Transmitter, welche wiederum Osteoklasten aktivieren. Daraufhin werden Kalzium- und Phosphationen aus dem Knochen freigesetzt und unmittelbar ins Blut abgegeben. Um eine Gewebsverkalkung zu verhindern, werden gleichzeitig die Phosphattransporter der Nieren reduziert. Zusätzlich wird in der Niere die Stimulation der 1α -Hydroxylase und somit die

Bildung von Calcitriol begünstigt sowie die Rückresorption von Kalzium aus dem Harn stimuliert (Siewert, 2012).

Bei einem hohen Serum-Kalziumspiegel wird die PTH-Sekretion im gesunden Organismus über eine negative Rückkopplung vermindert. Kommt es zu einer Dysregulation dieses sensiblen Zusammenspiels entsteht jeweils eine Hypo- beziehungsweise eine Hyperkalzämie. Eine Erhöhung des Serumkalizumspiegels entsteht zum Beispiel durch eine Nebenschilddrüsenüberfunktion, welche häufig durch ein Adenom verursacht wird. Hier liegt ein so genannter primärer Hyperparathyreoidismus vor (Adler, 2000). In diesem Fall befindet sich sowohl der Parathormonspiegel als auch der Serumkalziumspiegel oberhalb des Normwertes. Dadurch wird zu viel Knochen abgebaut und durch Bindegewebe ersetzt und es kann das Krankheitsbild einer Osteodystrophia fibrosa cystica entstehen (Rhee, 2013). Die Therapie der Wahl ist die rechtzeitige chirurgische Resektion der erkrankten Nebenschilddrüse, wodurch sich eine normale Hormonregulation mit regelrechter, negativer Rückkopplung noch intraoperativ wieder einstellt.

Eine weitere klinisch bedeutende Ursache für eine Hyperkalzämie ist der gesteigerte Abbau von Knochenmaterial durch „parathormon-related protein“ (PTHrP), welches auf gleichem Wege wirkt wie das PTH und z.B. von malignen Tumoren gebildet wird (Sen, 2017).

2.8.2. Vitamin D

Das zweite wichtige Steuerelement des Körpers für den Kalzium- und Phosphathaushalt stellt das Vitamin D dar. Vitamin D nimmt in der Gruppe der Vitamine eine einzigartige Position ein. Denn es kann sowohl über die Nahrung aufgenommen, aber auch vom Körper selbst produziert werden und erfüllt daher eher die Charakteristika eines Hormons. Seit der frühen Evolution spielt Vitamin D eine bedeutende Rolle im Knochenmetabolismus. Im Jahr 1928 wurde der Nobelpreis für Chemie an Adolf Windaus für seine Studien über die Beschaffenheit der Sterole und deren Verbindung zu den Vitaminen verliehen (Wolf, 2004).

Für den Menschen bieten sich zwei verschiedene Quellen, um sich mit Vitamin D zu versorgen. Es kann sehr einfach über die Nahrung aufgenommen werden. Nennenswerte Konzentrationen des Vitamin D₃, auch Cholecalciferol genannt, welches einen tierischen

Ursprung hat, finden sich in Fisch, wie z.B. Lachs, Makrele, Sardinen und in Lebertran (Mansuri, 2016).

Die pflanzliche Variante Vitamin D₂, auch als Ergocalciferol bezeichnet, nimmt der Mensch in sehr geringen Dosen durch Hefen, Pilze oder z.B. Avocados auf (Kirch, 2009). Zum anderen kann Vitamin D mit der Hilfe von Sonnenlicht vom Körper selbst produziert werden. Dafür wird eine Ultraviolett B Strahlung mit Wellenlängen zwischen 290 und 315 nm benötigt, die das aus der Leber in die Keratinozyten transportierte, 7-Dehydrocholesterol zu Prävitamin D₃ aktiviert. Dieses wandelt sich schnell zu Vitamin D₃ um. Der Prozess wird durch das Hautpigment Melanin beeinflusst, da dieses mit dem Prävitamin D₃ konkurriert. Aus diesem Grund produzieren Menschen mit dunklerer Hautfarbe bei gleicher Sonneneinstrahlung weniger Vitamin D als Menschen mit einem hellen Hauttypen (Landry, 2011).

Zu viel UVB Strahlung wandelt es wieder in inaktive Produkte um, sodass es auch bei starker Sonnenexposition zu keiner Intoxikation kommen kann. Durch eine Isomerisierung entsteht das stabile Vitamin D, welches aus der Zelle ausgeschleust wird und zusammen mit Transportproteinen über die Blutbahn in die Leber gelangt. Dort wird das Vitamin D beider Quellen zu 25-Hydroxyvitamin D metabolisiert. Von dort gelangt es in die Nieren, wo es mit Hilfe des Enzyms 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase in seine aktive Form das 1,25-Dihydroxyvitamin D, auch Calcitriol genannt, umgewandelt wird. Dieser Schritt wird über Parathormon, den Kalzium- und Phosphatserumspiegel reguliert. Calcitriol erhöht im Dünndarm die Transportproteine, wodurch mehr Kalzium und Phosphationen resorbiert werden können (Nussey, 2001).

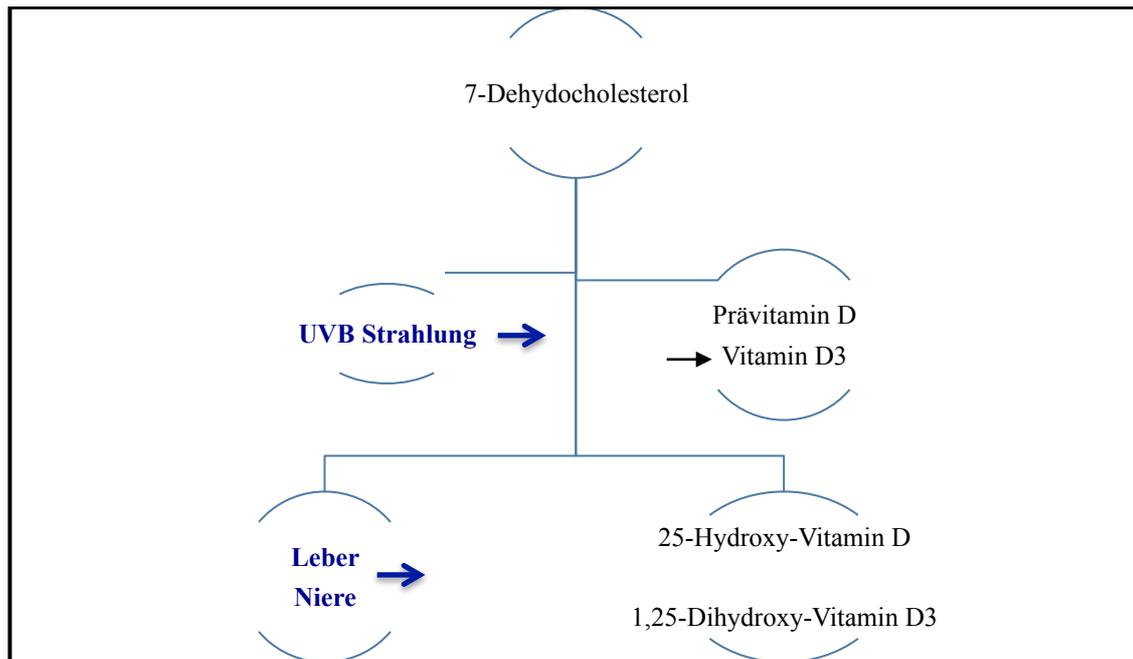


Abbildung 3 Schema Vitamin D Synthese.

Die Entdeckung, dass zahlreiche Gewebe und Zellen im Organismus einen passenden Rezeptor besitzen, führte zu neuen Erkenntnissen über die Funktionen von Vitamin D und über den Einfluss auf verschiedene chronische, autoimmune, infektiöse und kardiovaskuläre Erkrankungen (Holick, 2007).

Vitamin D sorgt in Interaktion mit den Nieren, dem Gastrointestinaltrakt und dem Knochengewebe für ein konstantes Level von Serumkalzium und Phosphat. Ein Mangel an Vitamin D führt zu einem Mineralisationsungleichgewicht im Knochen, welches mit einem erhöhten Risiko für eine Fraktur einhergeht, weshalb es besonders im Alter zur Prävention von Knochenerkrankungen eine bedeutende Rolle spielt (Busse, 2013).

2.8.3. Calcitonin

Im Gegensatz zu diesen beiden Hauptregulatoren spielt Calcitonin eine eher untergeordnete Rolle im Regulationskreislauf des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Calcitonin ist ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren und wird in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert. Es reguliert ebenfalls den Kalzium- und Phosphathaushalt und stellt den Antagonisten des PTH dar. Kommt es zu einem Kalzium-Anstieg im Blut wird es vermehrt sezerniert und bindet an osteoklastäre Calcitoninrezeptoren. Dies führt zu einer Aktivitätsminderung der Osteoklasten, wodurch weniger Kalzium aus dem Knochen freigesetzt wird. Zudem wird die Kalzium- und Phosphatausscheidung über die Niere

stimuliert und die Kalziumresorption über den Darm reduziert. Eine erniedrigte Kalziumkonzentration führt entsprechend zu einer verminderten Sekretion von Calcitonin (Felsenfeld, 2015).

2.8.4. Sexualhormone

Sexualhormone gehören zur Klasse der Steroidhormone. In Bezug auf den Knochenstoffwechsel spielen Estrogene und Androgene ebenfalls eine Rolle. Beide verfügen sowohl über eine direkte als auch über eine indirekte Wirkung auf den Knochen. Sie sind wichtig für das Wachstum und später für die Aufrechterhaltung des männlichen und weiblichen Skeletts. Die Wirkung von Testosteron z.B. erfolgt zum einen direkt über den im Knochen exprimierten Androgen-Rezeptor und zum anderen indirekt, indem es die Umsetzung von Testosteron zu Estradiol katalysiert (Laurent, 2014). Eine im Vergleich höhere Expression von Sexualhormonen führt besonders in der Pubertät bei Männern zu einer dickeren Schicht an kortikalem Knochen. Dies bewirkt eine bessere Stabilität und dient der Protektion vor Frakturen (Ohlsson, 2009).

Beim Knochenwachstum sorgen Estrogene für einen Schluss der Epiphysenfugen und bei der Kalziumhomöostase sorgen sie für einen Kalziumanstieg durch eine erhöhte Aufnahme über den Dünndarm. Sowohl Estrogene als auch Androgene regulieren das Osteoblastenwachstum und supprimieren die Apoptoserate der Osteozyten (Majeska, 2000).

2.8.5. Cortisol

Auch Cortisol hat einen regulatorischen Einfluss auf die Knochenmineralisationsdichte und damit auf die Stabilität und das Frakturrisiko des Knochens (Eller-Vainicher, 2012). Cortisol ist ein Steroidhormon, gehört zur Gruppe der Glukokortikoide und wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert. Dieser Vorgang unterliegt einer Steuerung durch das im Hypophysenvorderlappen gebildete adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Im gesunden Organismus hat Cortisol sowohl einen Einfluss auf den Knochenaufbau als auch auf den Knochenabbau (Talbot, 2007).

Erste Zusammenhänge zwischen dem Verlust an Knochenmasse und einer Überproduktion an Cortisol wurde von Harvey Cushing 1932 beschrieben (Cushing, 1932). Kommt es zu

einem Überangebot an Cortisol, z.B. durch einen ACTH-produzierenden Hypophysentumor (Morbus Cushing) oder durch entzündungshemmende und immunsuppressive Therapeutika, entsteht das klinische Bild der Osteoporose. Glukokortikoide beeinflussen die Knochenformation durch direkte Effekte, indem sie hemmend auf Osteoblasten wirken und gleichzeitig die Resorptionsrate der Osteoklasten steigern. Indirekt wirken sie, indem sie die intestinale Kalziumaufnahme und die Rückresorption in den Nieren vermindern und so dem Körper weniger Mineralien zur Verfügung stellen. Einen weiteren Aspekt liefert die Beeinträchtigung der physischen Aktivität durch Glukokortikoid-induzierten Muskelabbau (van der Eerden, 2007).

2.8.6. Wachstumshormone

Das Wachstumshormon Somatotropin, auch „growth hormone“ (GH) genannt, spielt vor allem in der Pubertät eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Es stimuliert über osteoblastäre GH-Rezeptoren die Knochenhomöostase und sorgt für ein regelrechtes Längenwachstum sowie eine Zunahme des Knochenvolumens. Im weiteren Verlauf des Lebens wirkt es als anaboles Hormon und sorgt so für einen Erhalt der Knochenmasse. Auch wenn Wachstumsfaktoren direkt auf Knochenzellen wirken können, verlaufen viele Effekte über Mediatoren, wie z.B. den „Insulin-Like Growth Factor-1“ (IGF-1) (Giustina, 2008). Die Bildung im Knochen wird durch Somatotropin stimuliert. Ein Mangel an Wachstumshormonen im Alter kann durch einen verzögerten Knochenumbau zu einer erniedrigten Knochendichte und damit zu einem erhöhten Frakturrisiko führen (Kann, 2004).

2.8.7. Vitamin C

Doch Vitamin D ist nicht das einzige Vitamin, welches eine Rolle in der Knochengesundheit spielt. Auch Vitamin C ist ein Kofaktor, welcher benötigt wird, um z.B. Prolin und Lysin im Kollagen zu hydroxylieren. Ist nicht genügend Vitamin C im Organismus vorhanden kommt es zu dem Krankheitsbild Skorbut, bei welchem vom Körper nur noch minderwertiges Kollagen gebildet wird. Dies führt im Krankheitsverlauf zu Mikrofrakturen des Knochens, Zahnausfall und einer erhöhten Blutungsneigung (Drenckhahn, 2008).

Die tägliche Aufnahme an Vitamin C solle bei Frauen ca. 75 mg pro Tag und bei Männern etwa 90 mg pro Tag betragen. Bei Rauchern sollte die Tagesdosis durch den zusätzlichen oxidativen Stress um etwa 35 mg erhöht werden (Hart, 2015).

2.9. Knochenerkrankungen

Die Knochenmineralisation spiegelt den Gesundheitsstatus eines Organismus wider. Wie zuvor dargestellt, unterliegen Knochensynthese und Resorption einem strengen Regulationsmechanismus der jeweiligen Pfade. Geht diese Balance verloren entstehen entsprechende Erkrankungen des Knochens.

2.9.1. Osteomalazie

Parfitt et al. definierten 1990 das Krankheitsbild der Osteomalazie. Hier liegt eine Hemmung der Mineralisation des Knochengewebes vor. Ausgelöst durch einen Mangel an aktivem Vitamin D kommt es zu einer Akkumulation von Osteoid, wodurch die namensgebende „Malazie“ (altgriechisch für „Weichlichkeit“) zustande kommt. Verglichen mit mineralisiertem Knochen ist dieses Gewebe aus mechanischer Sicht minderresistent, wodurch es zu einer Verbiegung bei Belastung kommt. Tritt diese Erkrankung bereits im Kindesalter auf, wird sie auch als „Rachitis“ (gr. rháchis = Rücken) bezeichnet.

Erste Anzeichen von schwerem Vitamin D-Mangel in der Bevölkerung entstanden in den Zeiten der industriellen Revolution in England. Das Leben in den Städten und das Arbeiten in geschlossenen Räumen, kombiniert mit schlechter Ernährung, boten dem Körper keine ausreichende Versorgung mit Vitamin D mehr. Dies führte zu einer hohen Inzidenz von unterschiedlichen Knochenerkrankungen (Romani de Gabriel, 2010).

Doch ein Mangel an Vitamin D ist bei weitem keine Erkrankung der Vergangenheit. Heutige Ursachen eines manifesten Vitamin D Mangels sind weiterhin eine unzureichende Nahrungszufuhr, eine verminderte UV-Exposition oder eine Malabsorption. Gerade bei älteren Menschen in Deutschland liegt häufig eine Kombination dieser Ursachen vor, welche eine Entstehung des Erkrankungsbildes noch potenziert.

Das Leitsymptom ist der generalisierte Knochenschmerz sowie ein Druck- und Kompressionsschmerz. Gerade im Frühstadium sind die Laborparameter und die röntgenologischen Veränderungen noch unspezifisch, weshalb hier oft erst eine invasive Beckenkammbiopsie die Diagnose sichern kann (Freyschmidt, 2016). Histologisch ist eine übermäßige Osteoidschicht charakteristisch. Es besteht eine Kombination aus einem Quotienten von über zehn Prozent Osteoidvolumen zu Knochenvolumen und einer Osteoid-Dicke von über 12,5 µm (Ott, 2008). Delling et al. legten hier durch die

Auswertung von nicht entkalkten Knochenbiopsien bereits 1975 einen Grenzwert für eine Volumenosteoidose von 1,2 % OV/BV fest (Delling, 1975).

Eine Therapie der Osteomalazie beinhaltet eine ausreichende orale Kalziumzufuhr, sofern möglich eine adäquate Sonnenexposition und eine medikamentöse Vitamin D Substitution. Die genaue Dosierung ist hier abhängig vom Schweregrad des Mangels sowie der zugrundeliegenden Stoffwechselstörung.

2.9.2. Osteoporose

Die Weltgesundheitsorganisation zählt die Osteoporose zu den wichtigsten Erkrankungen der heutigen Zeit. Gründe hierfür sind der demographische Wandel und ein voranschreitender knochenschädigender Lebensstil der Gesellschaft. Die Kosten für das Gesundheitssystem werden laut aktuellen Studien durch Therapiekosten und die durch Osteoporose entstehenden Frakturen bis 2025 um ca. 25 % ansteigen (Svedbom, 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass Frakturen bei 50-jährigen Frauen mit Osteoporose im Vergleich zu gesunden Frauen mehr als dreimal so hohe Lebenszeitkosten für eine Therapie verursachen (Bükow, 2015). Allen Formen der Osteoporose liegt eine pathologisch negative Knochenbilanz zugrunde. Diese entsteht durch ein gestörtes Verhältnis von Knochenresorption und Knochenanbau, welches bedingt ist durch ein Ungleichgewicht der Zellaktivitäten. Osteoblasten produzieren weniger Matrix während die Osteoklasten gleichzeitig vermehrt Knochen resorbieren. Die Folgen sind eine geringere Knochenmasse und Knochendichte, wodurch die Stabilität des Knochens sinkt und die Frakturrate enorm ansteigt (Marcu, 2011). Ob die Matrixzusammensetzung selbst bei diesem Krankheitsbild gestört ist, konnte basierend auf der aktuellen Studienlage noch nicht eindeutig geklärt werden (Christodoulou, 2013).

Die genaue Definition der Osteoporose wurde 1994 durch die WHO festgesetzt. Liegt der Anteil des mineralisierten Gewebes eines Patienten 10 bis 25 % unter dem eines gesunden 30-jährigen Erwachsenen handelt es sich um eine Osteopenie. Bei einem Verlust von 25 % spricht man dann von einer Osteoporose. Eine manifeste Osteoporose ist zu diagnostizieren, wenn charakteristische Frakturen, z.B. im Bereich der Wirbelkörper, des Schenkelhalses oder des Radius, hinzukommen (WHO, 2014).

Im Alter sorgen vor allem zwei Mechanismen für eine geringere Mineralisation des Knochens. Zum einen wird die Aktivität der α -1-Hydroxylase schwächer, wodurch

weniger Calcitriol produziert wird. Als Folge davon wird weniger Kalzium aufgenommen und dem Organismus zur Verfügung gestellt (Dörner, 2013). Man unterscheidet bezogen auf die Aktivität des Knochenbaus eine „high- turnover“ von einer „low-turnover“ Osteoporose. Bei der „high-turnover“ Osteoporose ist ein Knochenmasseverlust durch einen rasch gesteigerten Umbau nachweisbar. Durch die große relative Oberfläche manifestiert sich dieser Prozess besonders im spongiösen Knochen. Im Gegensatz dazu entsteht der Knochenmasseverlust bei der „low-turnover“ Osteoporose durch einen verringerten Knochenanbau (Freyschmidt, 2016).

Die postmenopausale Osteoporose gilt als häufigste Form der Osteoporose. Aus diesem Grund ist die ständig voranschreitende Erkenntnis über die Entstehung besonders im Hinblick auf die Therapie von wesentlicher Bedeutung. Bonewald et al. beschrieben 2003 den auf Osteozyten antiapoptotisch wirkenden Effekt von Estrogen, der einen möglichen Grund für den Knochenschwund darstellt (Bonewald, 2004).

Die klinische Symptomatik der Osteoporose besteht häufig aus chronischen Schmerzen im Bereich der Wirbelsäule und akuten Schmerzen im Falle einer Fraktur, welche meist durch ein Bagatell-Trauma entsteht und die Wirbelsäule, den Femur oder den Radius betrifft.

Zur Diagnostik gehört die konventionelle Röntgenuntersuchung in zwei Ebenen der Lendenwirbelsäule oder des proximalen Femurs. Zur Diagnosesicherung ist die Knochendichtemessung der aktuelle Gold-Standard.

In Hinblick auf die stetig alternde Bevölkerung ist auch hier die sich stets weiterentwickelnde Forschung zur Therapie und Prävention ein wesentlicher Aspekt der aktuellen Medizin. Aus diesem Grund sind Veränderungen der Kalziumverteilung im trabekulären Knochen (BMDD), wie sie in dieser Arbeit in Abhängigkeit des Alters und der Knochenstruktur untersucht wurden, von großem prognostischem Wert.

3. Material und Methoden

3.1. Herkunft und Gewinnung der Proben

Für diese Studie wurden humane Autopsieproben verwendet, welche in einer früheren Arbeit am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) entnommen und im Institut für Osteologie und Biomechanik prozessiert wurden. Für die Studie von Priemel et al. erfolgte im Vorfeld eine Überprüfung durch die Ethikkommission (OB-024/05) (Priemel, 2010).

Es wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 152 Beckenkammbiopsien aus dem Entnahmejahr 2008 ausgewählt, aufgearbeitet und analysiert. Die 152 ausgewählten Proben stammen von Frauen und Männer im Alter von 30 bis 90 Jahren. Das Durchschnittsalter der Frauen liegt bei 67,45 Jahren und das der Männer bei 62,45 Jahren.

Um möglichst repräsentative Ergebnisse in Bezug auf die Knochenbeschaffenheit zu erhalten, wurden in der ursprünglichen Studie alle Patienten mit metabolischen Erkrankungen, wie primären oder sekundären Knochenerkrankungen, Infektionskrankheiten, Malignomen und chronischer Niereninsuffizienz, ausgeschlossen.

Patienten mit einem Todesereignis nach längerem Krankenhausaufenthalt wurden ebenfalls aus der Studie eliminiert, da sich zum Beispiel eine Immobilisation auf den Knochenstatus ausgewirkt haben könnte. Für diese Studie wurden außerdem Proben ausgeschlossen, bei denen der Quotient von Osteoidvolumen zu Knochenvolumen (OV/BV) über zwei Prozent lag, da dies ebenfalls ein Hinweis auf eine pathologische Knochenmineralisation darstellt (Christodoulou, 2013) (Barvencik, 2015). Zudem wurde eine Probe mit einem pathologisch erhöhten BMI von 54.62 kg/m² eliminiert.

Die Haupttodesursachen der Patienten waren Herz- und Gefäßerkrankungen, Suizide, Unfälle mit Todesfolge, Blutungen sowie pulmonologische Erkrankungen (Priemel, 2010).

Bei Beginn dieser Arbeit lagen die Proben als in Kunststoff eingebettete und nach histologischer Aufarbeitung angeschnittene Präparate vor. Im Folgenden wird die von Priemel et al. beschriebene Entnahme, Einbettung und histologische Aufarbeitung kurz dargestellt.

Innerhalb von 48 Stunden post mortem wurden, im Rahmen einer vollständigen Obduktion die Proben nach Bordier et al. durch die Kollegen der Rechtsmedizin des UKE entnommen. Bei dieser etablierten Methode erfolgte die Entnahme zwei Zentimeter caudal der Crista iliaca und zwei Zentimeter dorsal der Spina iliaca anterior superior (Bordier, 1964).



Abbildung 4 Entnahmestelle der Beckenkammbiopsie, erstmals beschrieben von P. Bordier et al. 1964 (modifiziert nach Koehne 2014).

Nach der Entnahme wurden die Beckenkammbiopsien bei 4° Celsius für maximal sechs Stunden gelagert. Im Anschluss wurden die Knochenproben mit kortikalen und spongiösen Anteilen mit einer diamantbesetzten Präzisionssäge (Exakt, Nordsted, Deutschland, Typ.No. 36/137) in 10 mm x 10 mm x 5-10 mm große, bicorticale Blöcke gesägt. Die Schnittführung wurde unmittelbar unterhalb der Crista iliaca angesetzt (Priemel, 2010).

Entwässerung

Die so entstandenen Präparate wurden für drei Wochen in 3,5 % Formaldehyd (Merk 1.04002.2500) fixiert und dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 x 80 % (V/V) Ethanol, 4 x 96 % (V/V) Ethanol, 5 x 100 % (V/V) Ethanol) behandelt, um wässrige Fixierlösung und Gewebewasser zu verdrängen. Im Anschluss daran wurden die Proben um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden, bei 4° Celsius in eine Infiltrationslösung

(10 % (V/V) Nonylphenol und 0,33 % (W/V) Benzoylperoxid in endstabilisiertem Methylmethacrylat) gelegt (Priemel, 2010).

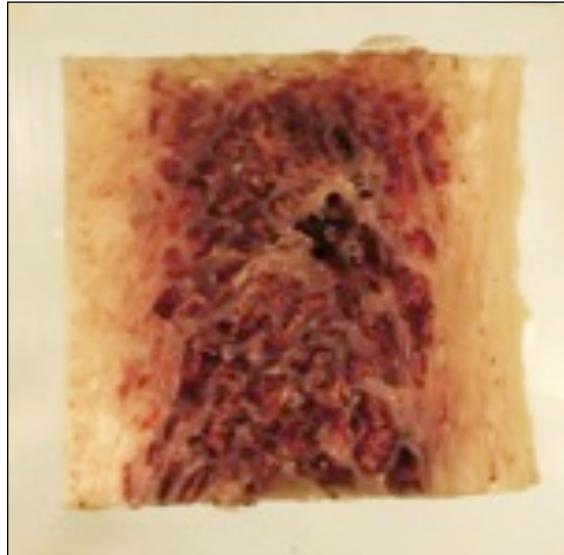


Abbildung 5 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie mit Kortikalis und Spongiosa.

Polymerisation

Die Proben wurden im Anschluss mit der Längsseite mittig auf den Boden eines Rollrandglases (Rotilabo^R-Rollrandglas 25 ml) gelegt und mit 15-20 ml Polymerisationslösung (10 % (V/V) Nonylphenol und 0,66 % (W/V) Benzoylperoxid in entstabilisiertem Methylmethacrylat überschichtet. Um die Polymerisation in Gang zu setzen wurde im Verhältnis 200:1 N,N-Dimethyl-p-Toluidin dazu gegeben. Die Proben wurden durchgehend nummeriert und luftdicht verschlossen, um anschließend in einem 4° Celsius kalten Wasserbad zu erhärten (Priemel, 2010).

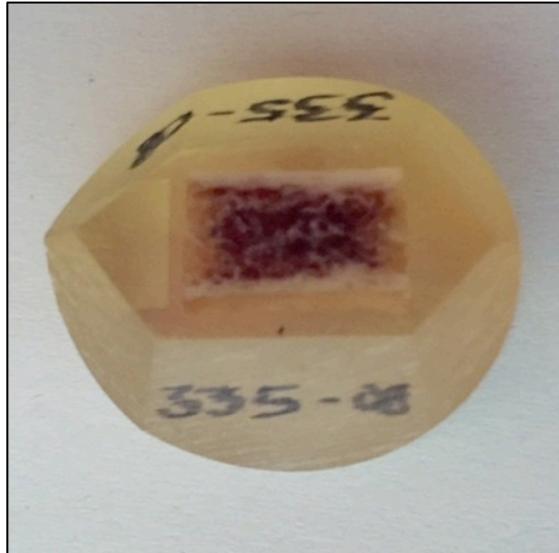


Abbildung 6 Acrylatzylinder mit eingebetteter, humaner Beckenkammbiopsie.

Aufarbeitung

Zur Herstellung der histologischen Schnittpräparate wurden die komplett ausgehärteten Acrylatzylinder als nächstes aus den Rollrandgläsern herausgelöst. Die im Zylinder enthaltene Probe wurde mit einem Schleifpapier der Körnung P 80 in einer Phoenix Alpha Grinder/Polisher (Hersteller Buehler) so weit abgeschliffen, bis die Biopsie vollständig an der Oberfläche frei lag. Das zuvor runde Polyacrylat an der Seite wurde zu einem gleichmäßigen Sechseck mit zentral befindlicher Beckenkammbiopsie abgetragen.

Färbung

Mittels Hartschnittmikrotom (Techno-Med, München, Deutschland) wurden jeweils 3 μm messende Schnittpräparate der Biopsien angefertigt. Diese wurden im nächsten Schritt auf Glasobjektträger aufgebracht und bei 60°C getrocknet. Im Folgenden wurden die Proben entplastet und im weiteren Verlauf rehydriert. Anschließend erfolgte eine von Kossa/ van Gieson Färbung (Priemel, 2010).

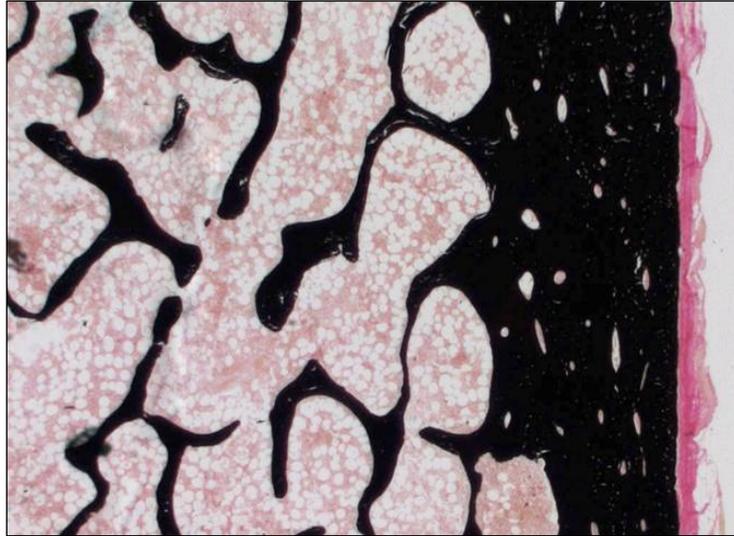


Abbildung 7 Humane Beckenkammbiopsie in von Kossa/ van Gieson Färbung.

Bei dieser Methode färbt sich das verkalkte Knochengewebe im nicht entkalkten Präparat wie in Abbildung 7 dargestellt schwarz und die Osteoidschicht imponiert rötlich (Curran, 2013).

Histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung mittels den Bildanalyse-Programmen Osteo-Measure (Osteometrics, Inc., Atlanta, Georgia) und Bioquant (Bioquant Image Analysis, Inc., Nashville, Tennessee) war zum Studienbeginn bereits erfolgt. Für die vorliegende Studie wurden folgenden Parameter verwendet;

- Knochenvolumen zu trabekulärem Volumen (BV/TV [%])
- Trabekelanzahl (Tb.N. [mm^{-1}])
- Trabekel-Dicke (Tb.Th. [mm])
- Trabekelabstand (Th.Sp. [mm])
- Osteoidvolumen zu Knochenvolumen (OV/BV [%])
- Osteoidoberfläche zu Knochenoberfläche (OS/BS [%]) (Parfitt, 1987).

Bestimmung der Knochenmineralisationsdichteverteilung mittels quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEI)

Für die weitere Auswertung wurden die Beckenkammbiopsien aus dem Jahr 2008 des oben beschriebenen Kollektivs aufgearbeitet. Hierfür wurden mit Hilfe einer Fuchsschwanz-Säge (450 mm Länge, 11 Zähne/Inch) die Acrylatzylinder auf eine Länge von 12-14 mm gekürzt und mit der Seite der Knochenbiopsie auf einem Objektträger mittels doppelseitigem Klebeband fixiert.

Danach wurden die Blöcke mit einer Schleifmaschine (Phoenix Alpha Grinder/Polisher, Hersteller Buehler) und einem Schleifpapier der Körnung P 80 zehn Minuten lang planparallel geschliffen. Anschließend wurden sie mit der Rückseite befestigt und das Knochenpräparat weitere zehn Minuten mit einer Körnung von P 200 poliert. Die Zeitnahme erfolgte durch eine digitale Stoppuhr. Das Schleifpapier wurde regelmäßig in identischem Abstand erneuert, um ein optimales Schleifergebnis für alle Proben zu gewährleisten.

Nach der Methode von Roschger et al. wurde im Anschluss die Mineralisationsdichteverteilung mittels quantitative backscattered electron imaging (qBEI) in der Spongiosa der Proben gemessen. Dazu wurde ein Rasterelektronenmikroskop (LEO 435 VP, Leo Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) mit einem festen Detektor (BSE Detector, Type 202, K.E. Developments Ltd., England) verwendet (Koehne, 2014).

In einem Rasterelektronenmikroskop tastet ein fein gebündelter Elektronenstrahl die Oberfläche der Probe systematisch ab. Da es nur möglich ist elektrisch leitende Oberflächen abzuleiten, erfolgte zuvor die Beschichtung der Oberfläche der Proben mit Kohlenstoff. Um Artefakte zu vermeiden ist es von großer Bedeutung, dass diese Schicht gleichermaßen verteilt und nicht zu dick aufgetragen wird. Dafür wurde die Oberfläche der abgetrockneten Acrylatblöcke mit einem feinen Tuch poliert um Verunreinigungen durch Staub oder Spuren von Feuchtigkeit vollständig zu beseitigen. Der äußere Rand der Probe wurde mit einem ca. 40 mm langen und 5 mm breiten, einseitig haftenden Kohlenstoffklebeband versehen (Abbildung 8). Vor der Messung wurden jeweils vier Proben gleichzeitig mittels Vakuum mit einer dünnen Kohlenstoffschicht im BAL-TEC CED 030 Carbon Evaporator bedampft.

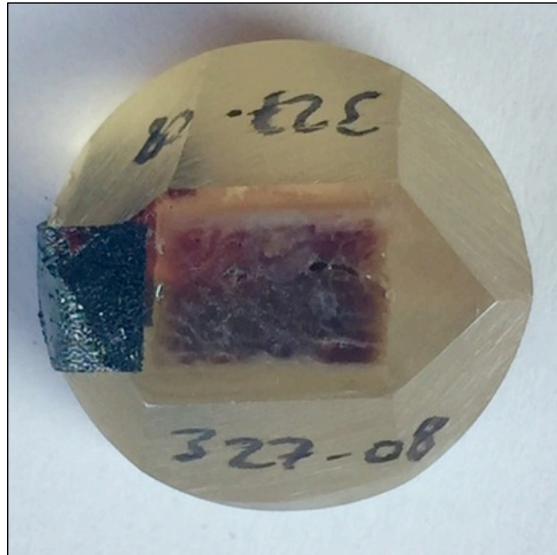


Abbildung 8 Acrylatzylinder mit eingebetteter Beckenkammbiopsie nach Kohlenstoffbedampfung.

Die Messung im Rasterelektronenmikroskop erfolgte mit 20 kV und 580 pA, wobei die Probe eine konstante Distanz von 20 mm zum Detektor aufwies (BSE Detector, Type 202, K.E. Developments Ltd., England). Das Prinzip der Methode beruht auf einem linearen Zusammenhang zwischen den Grauwerten der aufgenommenen Bilder und des Kalziumgehalts der korrespondierenden Knochenareale.

Die unterschiedlichen Mineralisationsgrade des spongiösen Knochens konnten so mittels qBEI-Verfahren sichtbar gemacht werden. Die verschiedenen Abstufungen der Grau-Level korrespondieren unmittelbar mit dem Kalziumgehalt des dargestellten Knochenabschnittes (Roschger, 1998).

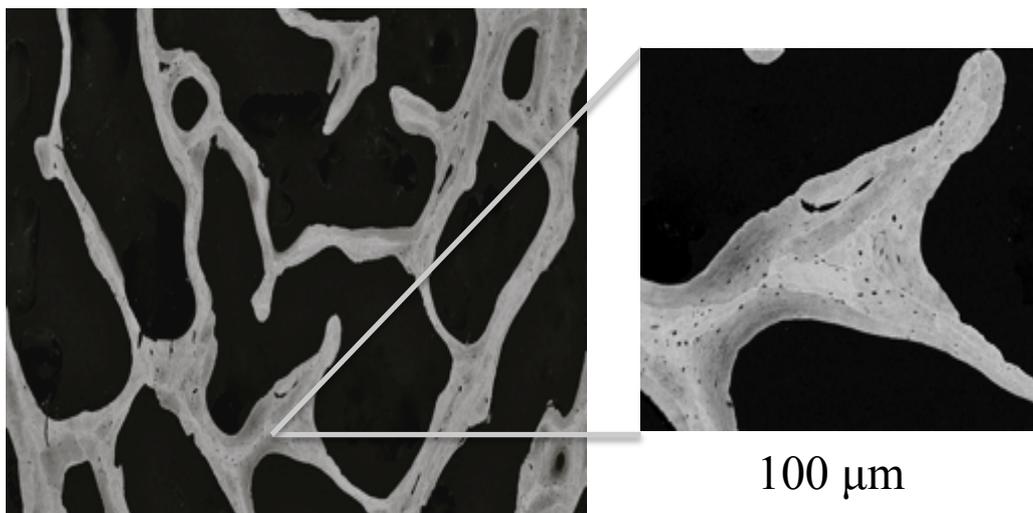


Abbildung 9 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie aus der Substantia spongiosa mittels qBEI.

Eine Nahaufnahme der Spongiosa, wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigt deutlich die inhomogene Mineralisation der Knochenmatrix, welche sich in den unterschiedlichen Grau-Abstufungen widerspiegelt. Hellere Grauschattierungen bilden einen hohen Kalziumgehalt ab, während die dunkleren Areale einen niedrigeren Kalziumanteil darstellen. Das umgebende nichtmineralisierte Material imponiert schwarz.

Um eine komplette Probe darstellen zu können, wurden je nach Größe der Beckenkammbiopsie vier bis neun Einzelfotos eines Acrylblockes mit einer Messzeit von 35 Sekunden pro Bild und einer fünfzigfachen Vergrößerung angefertigt. Somit wurde eine Fläche von mindestens 36 mm² der jeweiligen Probe abgebildet. Diese Einzelbilder wurden im Anschluss mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop (CS5) wieder zu einem kompletten Bild zusammengefügt.

Im Anschluss wurden die Fotos im Programm Image J (1.42, National Institute of Health, USA) geladen und nachweisbare Artefakte, z.B. durch kleinste Verunreinigungen, manuell herausgeschnitten. Die Elementzusammensetzung der jeweiligen Probe wurde nur im Bereich der Spongiosa ausgemessen und ein Graustufen-Histogramm angefertigt. Um die Grauwerte in Kalzium gewichtete Prozent zu überführen, wurde zudem eine Eichgerade zwischen dem Grauwert und dem Kalziumgehalt mittels Energiedispersive Röntgenstrahlen-Analyse („Energy Dispersive X-ray Analysis“ EDAX DX-4, EDXA Inc., USA) erstellt. Die Eichung des Rasterelektronenmikroskops erfolgt durch einen faradayschen Käfig und einen Kohlenstoff- bzw. Aluminiumstandard (MAC Consultants Ltd., England). Der von Roschger und Kollegen empfohlene Wert für die Pixelauflösung liegt bei vier µm/Pixel mit einer Graustufenauflösung von 256 Abstufungen (Roschger, 1998).

Die Grauwert-Histogramme wurden mittels ImageJ (1.42, National Institute of Health, USA) ausgelesen und in Microsoft Excel (15.11, 2016) überführt. Hier erfolgte die Standardisierung der Histogramme sowie die Umrechnung der Grauwerte in Ca-Gewicht %. Aus der so erhaltenen Kalziumverteilung konnten die benötigten Kalziumparameter, wie Ca mean (Gesamtkalzium), Ca width (Kalziumverteilung) und Ca peak (Kalziumspitzenwert) für jede Probe ermittelt werden.

Im Anschluss wurden die 5. und 95. Perzentile berechnet, welche jeweils dem Knochenanteil mit einer Mineralisation der untersten beziehungsweise der obersten fünf Prozent entspricht. Für jede Verteilungskurve wurde der Wert links der 5. Perzentile als Ca low entsprechend dem Areal der geringsten Mineralisation und der entsprechende Wert

rechts der 95. Perzentile als Ca high, entsprechend dem höchsten Areal der Mineralisation, bestimmt (siehe Abbildung 10).

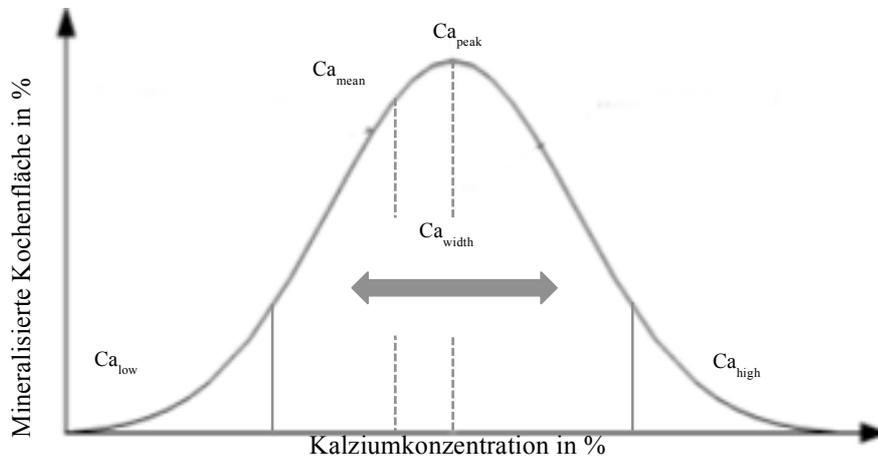


Abbildung 10 BMDD Histogramm in schematischer Darstellung.

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 14.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Für den Fehler 1. Art wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($\alpha = 0,05$) bestimmt. Mittels T-Test wurde der Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Proben berechnet. Eine univariate Regression wurde zur Ermittlung der Abhängigkeit des Mineralisationsgrades von Alter, Geschlecht, BMI und den histomorphometrischen Daten angewendet. Die multivariate Regressionsanalyse diente der Berechnung möglicher Beeinflussung der einzelnen Parameter untereinander.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des Kollektivs

Zu Beginn der Auswertung der nachfolgenden Daten wurde das Kollektiv aus dem Jahr 2008 in männliche und weibliche Individuen aufgeteilt. Es ergibt sich eine nahezu ausgeglichene Geschlechterverteilung von 56 % männlichen und 44 % weiblichen Individuen.

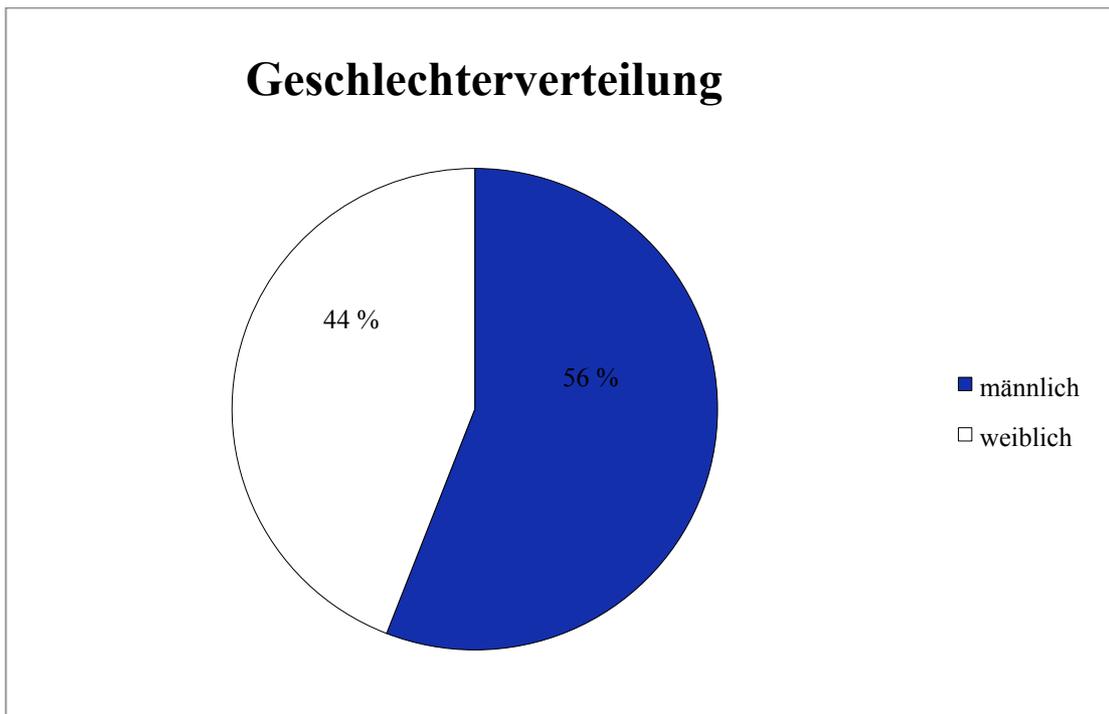


Abbildung 11 Kreisdiagramm. Prozentuale Verteilung der Männer und Frauen des Kollektivs.

Desweiteren wurde die Altersverteilung im Kollektiv ermittelt. Bei einer Gesamtanzahl von 152 Proben ergibt sich ein mittleres Alter der Frauen von 67,45 Jahren. Die Männer liegen im Vergleich dazu mit 62,45 Jahren fünf Jahre unter dem ermittelten Alter der Frauen. Betrachtet man die aktuellen Lebenserwartungen des statistischen Bundesamtes, zeigen die erhobenen Daten, nach Eliminierung der Proben von Patienten über 90 Jahren, einen repräsentativen Querschnitt durch die deutsche Bevölkerung. Die Lebenserwartung liegt für weibliche Individuen bei 82,40 Jahren und für männliche Individuen bei 77,17 Jahren (Statisches Bundesamt, 2015).

In dem in dieser Studie untersuchten Kollektiv verstirbt ebenfalls der größte Teil der Frauen erst in der 9. Lebensdekade, während der Hauptteil der Männer nur die 8. Lebensdekade erreicht.

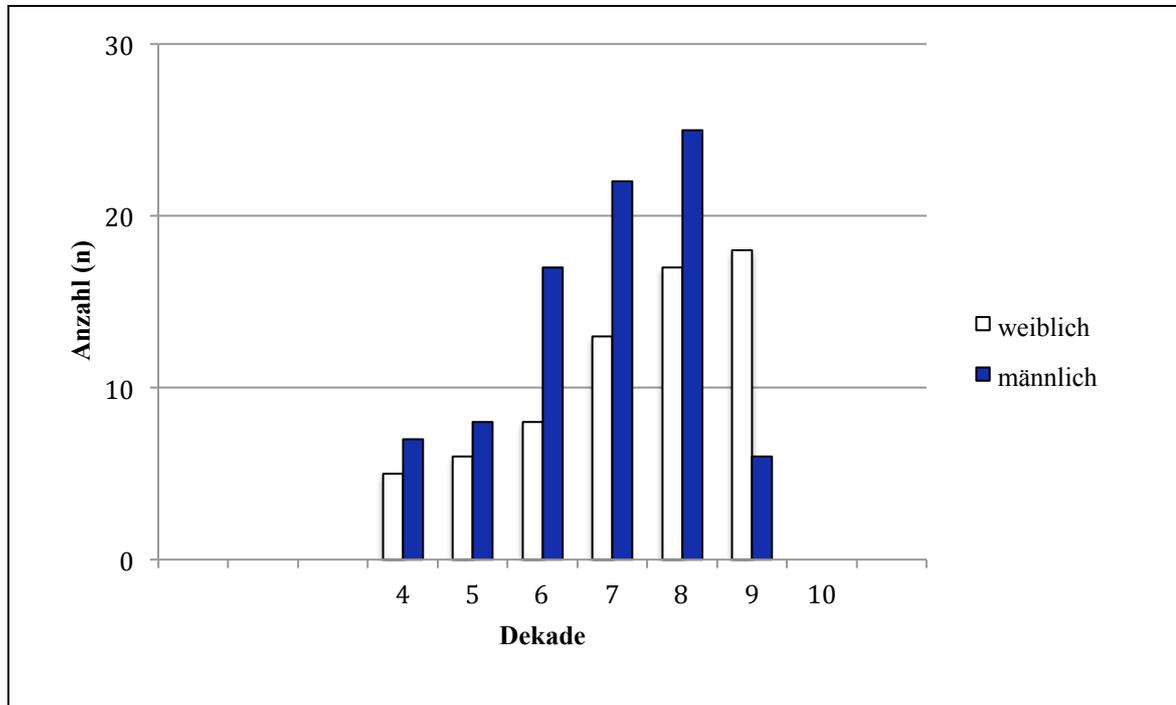


Abbildung 12 Balkendiagramm. Altersverteilung der untersuchten weiblichen und männlichen Individuen in Jahren und absoluter Anzahl.

Zur weiteren Charakterisierung des allgemeinen Gesundheitsstaus im vorliegenden Kollektiv erfolgte die Berechnung des Body-Mass-Index (BMI), da dieser ebenfalls mit dem Knochenstatus in enger Verbindung steht. Hierfür teilt man die Masse eines Menschen in Kilogramm durch das Quadrat der Körpergröße. Dieser ermittelte Indexwert beschreibt anhand einer festgelegten Tabelle die vermeintliche Abweichung vom Normalgewicht. Der Body-Mass-Index liegt in diesem Kollektiv im Mittel bei 25,64 für weibliche und bei 26,17 für männliche Individuen. Dies entspricht für beide Geschlechter bereits dem unteren Grenzwert einer Präadipositas.

Tabelle 2: Durchschnitt des Alters und des Body-Mass-Index der Männer und Frauen.

		Alter (Mittelwert)	BMI (Mittelwert)
Geschlecht	weiblich	67,45 Jahre	25,64
	männlich	62,45 Jahre	26,17

4.2. Knochenstrukturparameter

Unter der Annahme, dass die Stärke des trabekulären Knochens abhängig ist von seiner Mikroarchitektur und seinen Eigenschaften auf Gewebeebene wurde eine Analyse beider Geschlechter durchgeführt. Dazu wurden im Folgenden zuerst die histomorphometrischen Parameter wie Knochenvolumen, Trabekeldicke, Trabekelanzahl und trabekulärer Abstand sowie Osteoidvolumen und Osteoidoberflächenverhältnis des Kollektives untersucht und zwischen den Frauen und Männern verglichen. Anhand der nachfolgenden Tabelle ist ersichtlich, dass sich zwischen den beiden Geschlechtern keine messbar signifikanten Unterschiede ausmachen lassen.

Tabelle 3: Knochenvolumen, trabekuläre Dicke, Trabekelanzahl, Trabekelabstand, Osteoidvolumen sowie Osteoidoberfläche der Männer und Frauen in Prozent und absoluter Zahl.

		BV/TV %	Tb. Th.	Tb. N.	Tb. Sp.	OV/BV %	OS/BS %
Geschlecht	weiblich	15,22	141,99	1,03	966,69	0,64	13,93
	männlich	13,97	135,37	1,00	979,87	0,80	14,92

4.3. Knochenmineralisation

Als nächstes wurden das Gesamtkalzium, die Kalziumheterogenität, die Kalzium-Spitzenwerte und der Mineralisationsgrad der 5. und 95. Perzentile des trabekulären Knochens für Männer und Frauen analysiert und verglichen. Auch hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern nachweisen.

Tabelle 4: Darstellung der Knochenmineralisationsparameter des trabekulären Knochens.

		Ca mean (wt.%)	Ca width (Δwt.%)	Ca peak (wt.%)	Ca low (%)	Ca high (%)
Geschlecht	weiblich	22,87	3,49	24,02	4,90	5,10
	männlich	22,93	3,44	24,02	4,69	5,17

Ca mean liegt bei den männlichen Proben mit 22,93 wt.% knapp oberhalb der weiblichen Messwerte mit 22,87 wt.%. Die Werte für Ca width liegen bei 3,49 Δ wt.% für die weiblichen und bei 3,44 Δ wt.% für die männlichen Individuen. Der Wert für Ca peak der weiblichen und der männlichen Spongiosa zeigt sich sogar identisch und liegt bei jeweils

24,02 wt.%. Der Anteil an niedrig mineralisiertem Knochengewebe liegt bei den Frauen bei 4,90 % und bei den Männern bei 4,69 %. Auch die prozentual am höchsten mineralisierten Knochenareale unterschieden sich mit 5,10 % vs. 5,17 % in beiden Geschlechtern kaum voneinander (Tabelle 4).

Mineralisationsdichteverteilung der Spongiosa in Bezug auf das Alter

Im nächsten Schritt wurden die Mineralisationsparameter des trabekulären Knochens im Bezug zum Alter analysiert.

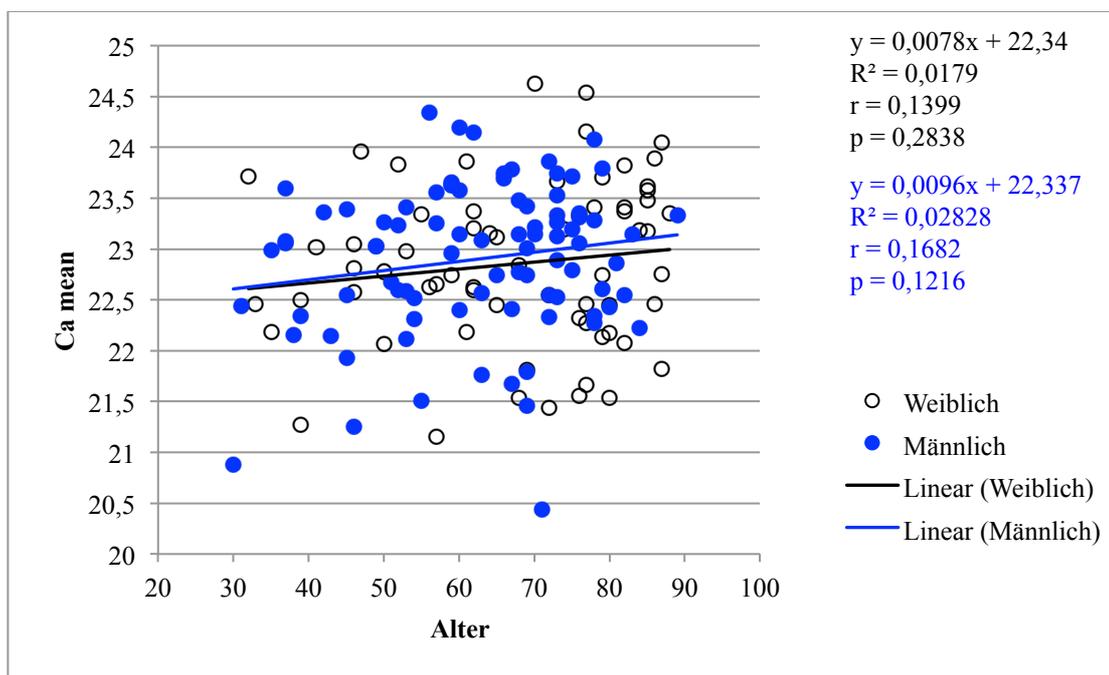


Abbildung 13: Darstellung des ansteigenden Gesamtkalziums in Abhängigkeit des Alters.

Für das Ca mean ergeben sich wie oben beschrieben Mittelwerte der Frauen von 22,85 wt.% und der Männer von 22,90 wt.%. Obwohl ein Anstieg des Gesamtkalzium im Alter zu beobachten ist, kann in der univariaten Regressionsanalyse bei einem Signifikanzniveau von $< 0,05$ kein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und Gesamtkalzium ermittelt werden.

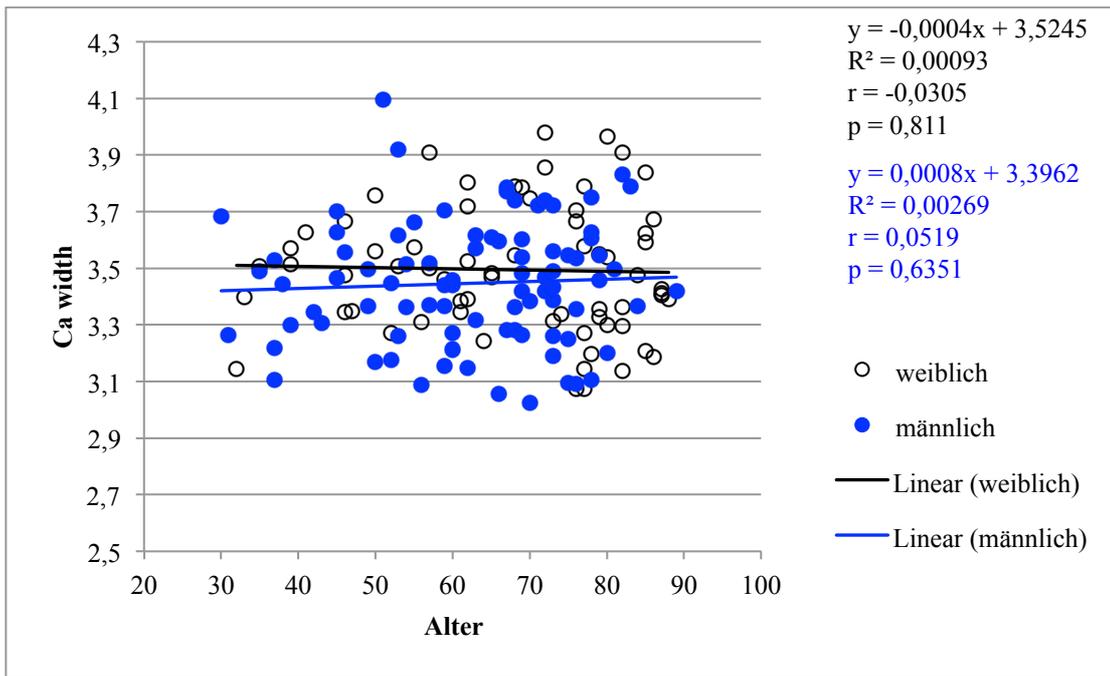


Abbildung 14: Darstellung der Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Alters.

Für die Kalziumheterogenität im trabekulären Knochen ergibt sich aus den vorliegenden Daten der beiden Geschlechter kein signifikanter Unterschied in Bezug zum Alter.

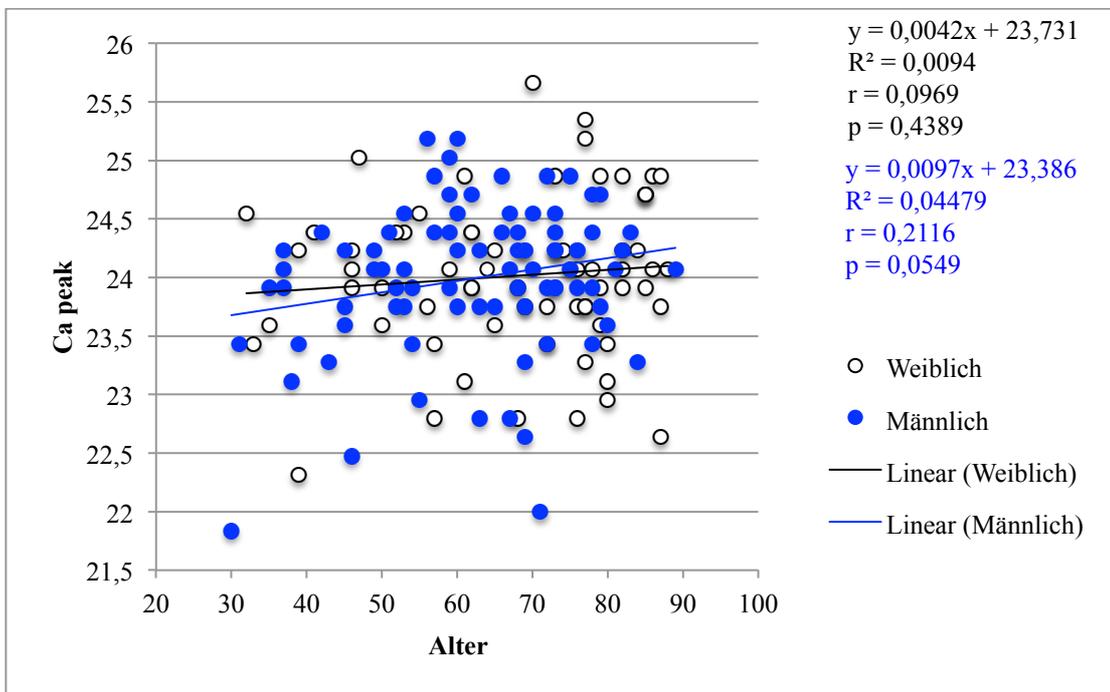


Abbildung 15: Darstellung des Anstiegs des Kalzium-Spitzenwertes in Abhängigkeit des Alters.

Der gemessene Kalziumspitzenwert in der Spongiosa der Beckenkammbiopsien zeigt eine positive Korrelation in Bezug zum Alter für beide Geschlechter.

Analyse der Knochenmineraldichteverteilung in Bezug zur Histomorphometrie

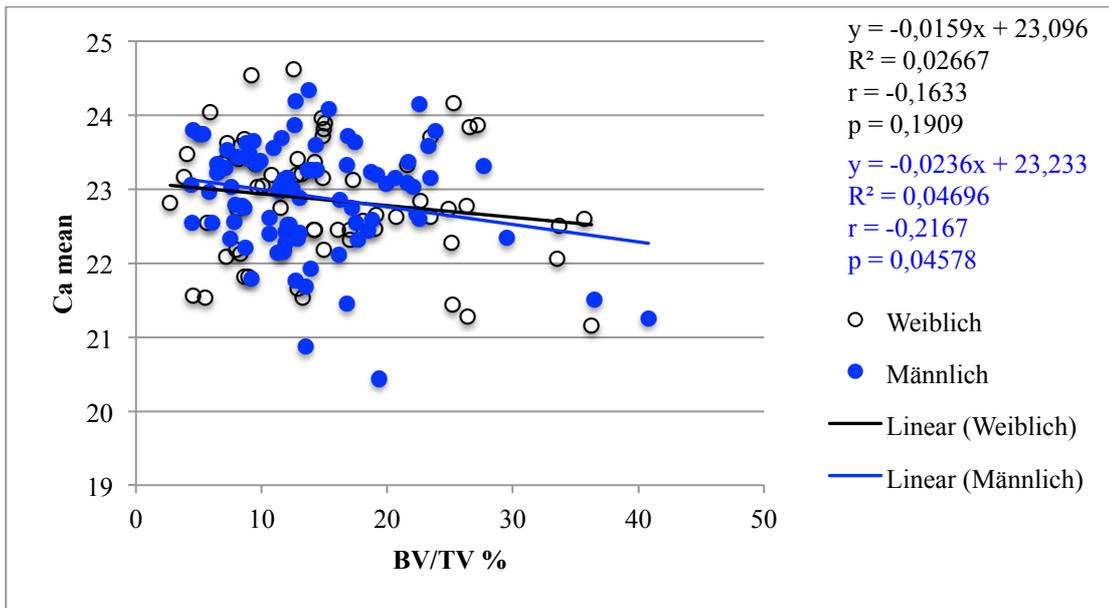


Abbildung 16: Auftragung des Gesamtkalziumwertes in Abhängigkeit des Knochenvolumens.

Das Gesamtkalzium im trabekulären Knochen zeigt in Bezug auf das steigende Knochenvolumen für die männlichen Proben eine signifikant negative Korrelation. Für die weiblichen Proben zeigt sich bei einem Signifikanzniveau von $<0,05$ keine Signifikanz.

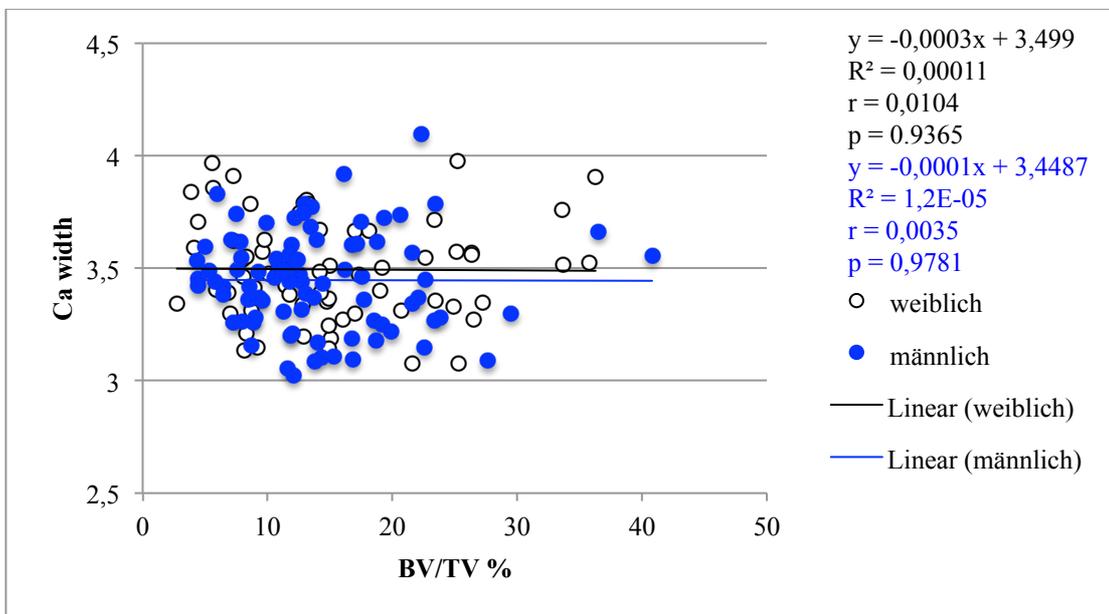


Abbildung 17: Darstellung der Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Knochenvolumens.

Die Betrachtung der Kalziumheterogenität der Frauen und Männer ergibt keinen signifikanten Zusammenhang zur Knochen volumendichte der Spongiosa.

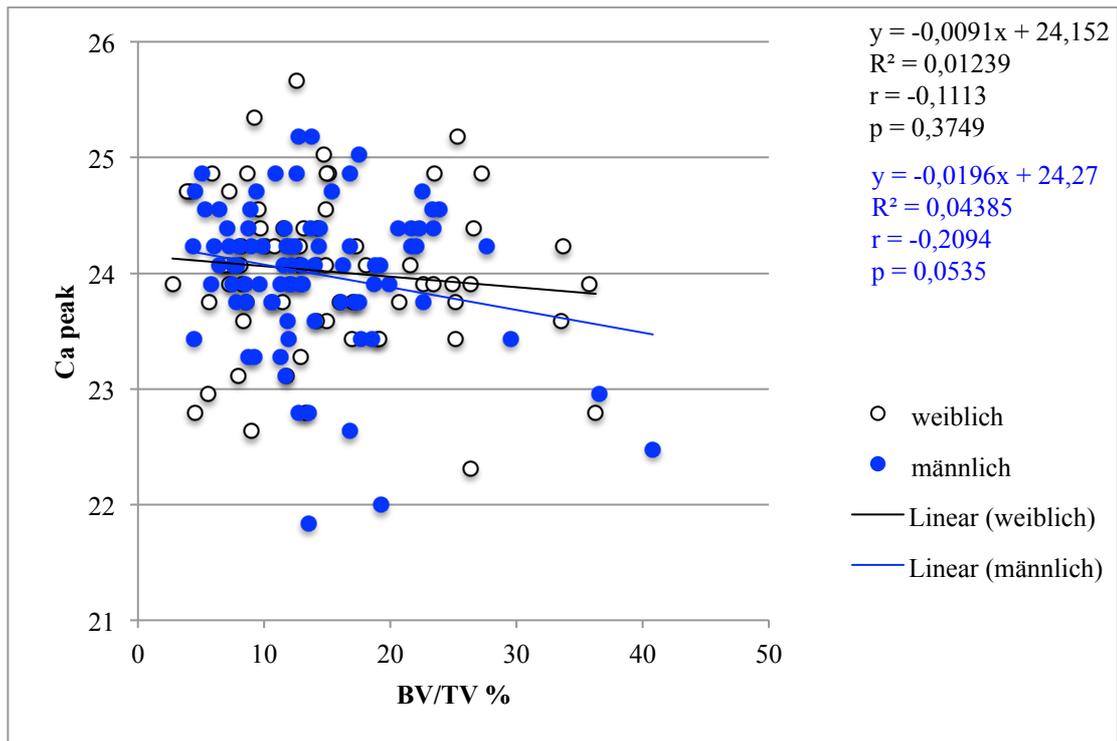


Abbildung 18: Darstellung des Kalziumspitzenwertes in Abhängigkeit vom Knochenvolumen.

Auch die Auswertung der Korrelationen des Kalziumspitzenwertes zur Knochenvolumendichte in der Spongiosa zeigt keine Signifikanz.

Mineraldichteverteilung in Bezug auf die Trabekelbeschaffenheit

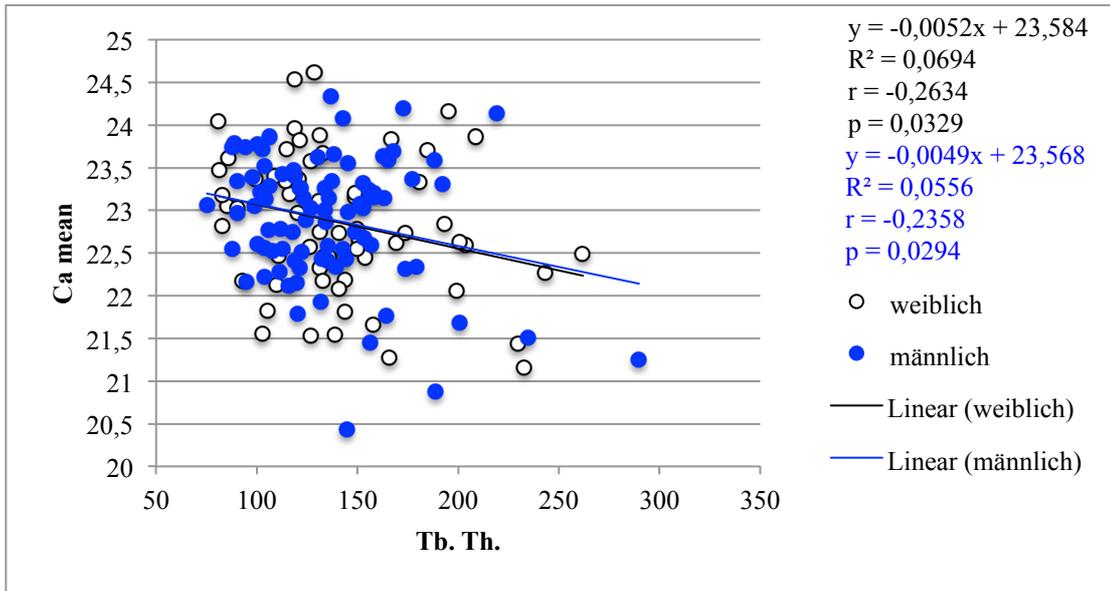


Abbildung 19: Auftragung des sinkenden Gesamtkalziumwertes mit Zunahme der trabekulären Dicke.

Es lässt sich in den untersuchten Proben eine signifikant negative Korrelation des Gesamtkalziumwertes bei einer Zunahme der Dicke der einzelnen Trabekel der Beckenkammbiopsien nachweisen.

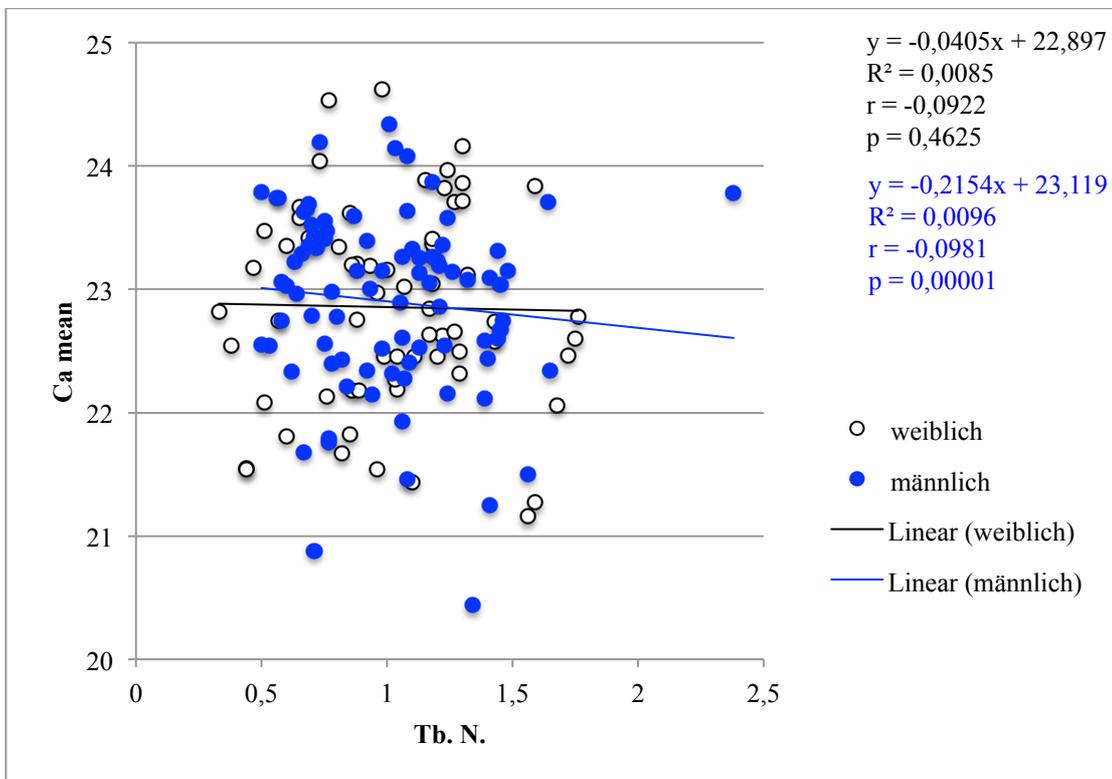


Abbildung 20: Auftragung des Gesamtkalziumwertes mit ansteigender Trabekelanzahl.

Das Gesamtkalzium zeigt für die weiblichen Proben keinen Einfluss auf die Anzahl der einzelnen Trabekel. Für die Männer ergibt sich eine negative Signifikanz.

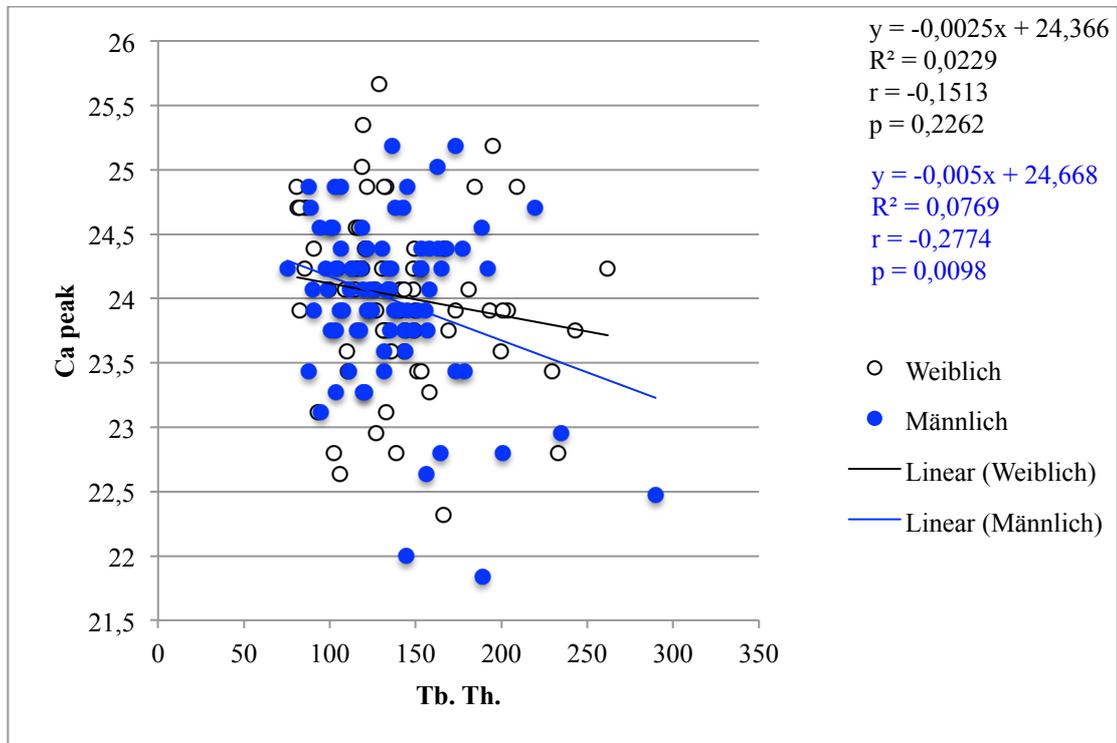


Abbildung 21: Auftragung des Kalziumspitzenwertes mit ansteigender Trabekeldicke.

Auch die Kalziumspitzenwerte zeigen bei den Männern eine signifikante Erhöhung je dünner ein Trabekel ist. Für die weiblichen Proben zeigt sich bei gleichem Trend jedoch keine Signifikanz.

Bei der Betrachtung der histomorphometrischen Parameter nimmt das Gesamtkalzium der humanen Beckenkammbiopsien mit der ansteigenden Trabekeldicke ab. Was durch eine Größenzunahme der einzelnen Trabekel durch nicht mineralisiertes Gewebe zur erklären wäre. Dieses Ergebnis korrespondiert mit einer Ausdünnung der einzelnen Trabekel im Alter, welche eine geringere Mineralisation in der Knochenoberfläche bedingt. Die trabekuläre Dicke ist der einzige Faktor, welcher eine negative Korrelation zu Ca mean, Ca peak und Ca low zeigt.

Verhältnis der Mineralisation in Bezug auf den Osteoidanteil

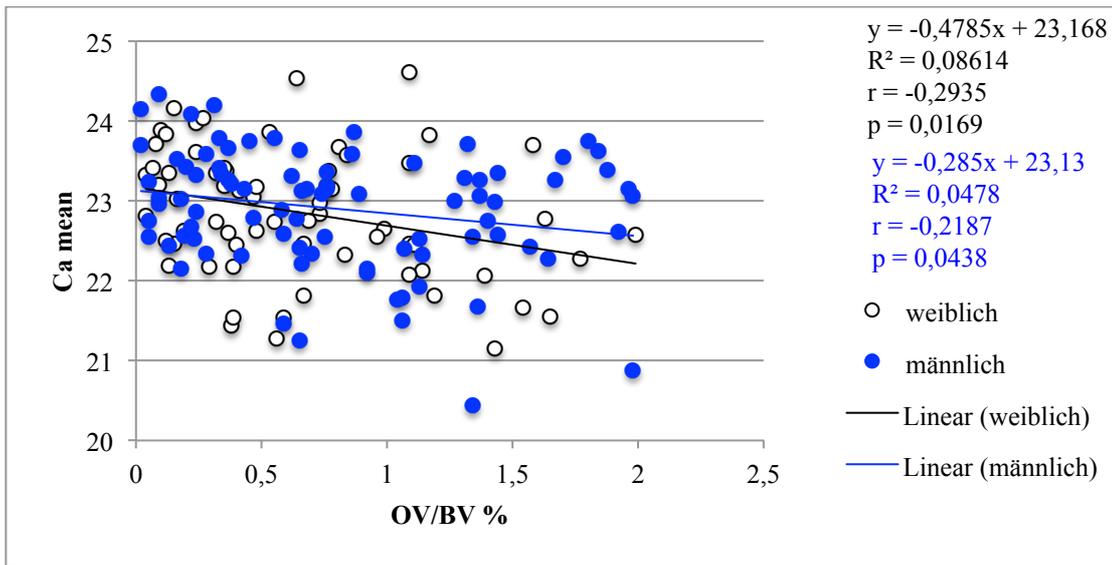


Abbildung 22: Auftragung des Gesamtkalziumwertes in Abhängigkeit des Osteoidvolumens.

Die Daten zeigen auf, dass bei einem physiologischen Osteoidwert (< 2% OV/BV) im trabekulären Knochen das Gesamtkalzium bei beiden Geschlechtern signifikant bei einem Anstieg des Verhältnisses von Osteoidvolumen zu Knochenvolumen sinkt.

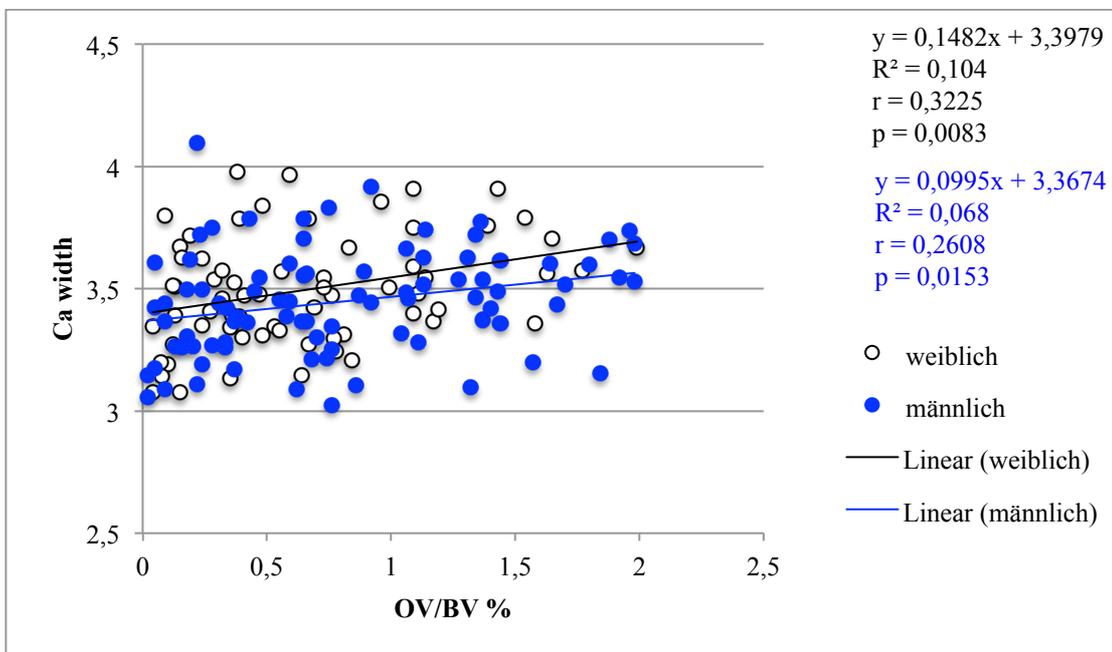


Abbildung 23: Darstellung der steigenden Kalziumheterogenität in Abhängigkeit des Osteoidvolumens.

In gleicher Weise ergibt sich eine signifikant positive Korrelation, da die Kalziumheterogenität des trabekulären Knochen bei einem Anstieg des Verhältnisses von Osteoidvolumen zu Knochenvolumen steigt.

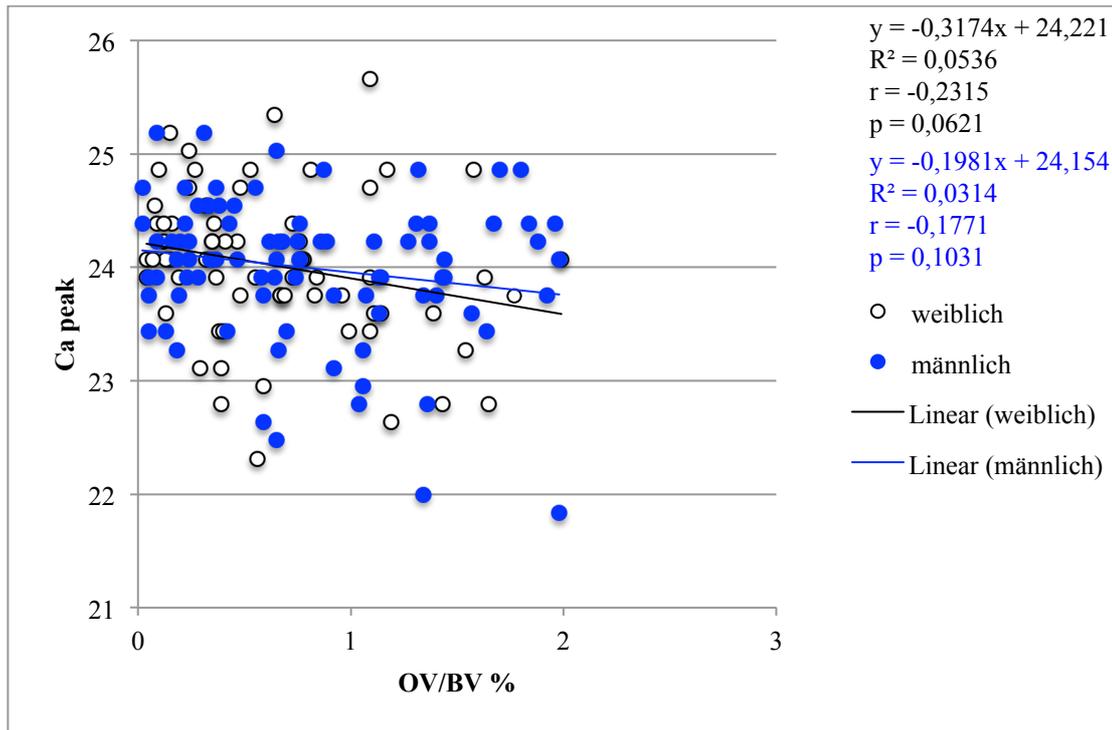


Abbildung 24: Auftragung des fallenden Kalziumspitzenwertes gegen das Osteoidvolumen.

Ein physiologischer Osteoidanteil ist ein starker und sensitiver Faktor für die Knochenmineralisation. Dies spiegelt sich in einem erniedrigten Gesamtkalzium bei steigendem OV/BV wider, wodurch die Heterogenität der Kalziumverteilung erhöht wird. Die Kalziumheterogenität steigt daher signifikant mit dem Anstieg der Osteoidparameter (Osteoidvolumen und Osteoidoberflächenverhältnis). Die Kalzium-Spitzenwerte ergaben eine negative Korrelation, jedoch keine Signifikanz im Vergleich zu OV/BV% für beide Geschlechter.

Korrelation der Mineralisationsparameter in Bezug auf das Alter, das Geschlecht, den BMI des trabekulären Knochens

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels multivariater Regressionsanalyse.

Tabelle 5: Korrelationen der Mineralisationsparameter mit Alter, Geschlecht und BMI.

	Alter	Geschlecht	BMI
Ca mean			
Korrelation nach Pearson	,199*	-,058	,098
Signifikanz (2-seitig)	,0,27	,523	,299
Ca width			
Korrelation nach Pearson	,110	-,008	-,147
Signifikanz (2-seitig)	,225	,930	,118
Ca peak			
Korrelation nach Pearson	,237**	-,055	,065
Signifikanz (2-seitig)	,008	,545	,492
Ca high			
Korrelation nach Pearson	,262**	-,038	,055
Signifikanz (2-seitig)	,003	,675	,556
Ca low			
Korrelation nach Pearson	,090	,020	,133
Signifikanz (2-seitig)	,321	,822	,156

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

**.. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Unter der Begutachtung des Gesamtkalziums mit dem Alter und dem Geschlecht als Kovarianten lässt sich auch hier eine signifikant positive Korrelation mit dem Alter nachweisen. Es lässt sich kein direkter Nachweis einer Korrelation des Gesamtkalziums mit dem Geschlecht oder dem BMI darstellen.

Der Kalziumspitzenwert sowie der prozentuale Anteil an stark mineralisiertem Knochenareal zeigt ebenfalls eine positive Korrelation zum Alter. Die Kalziumheterogenität zeigt keinerlei Korrelationen mit den epidemiologischen Parametern. Der ermittelte Wert des geringsten Mineralisationsgrades unterhalb der 5. Perzentile der humanen Beckenkammbiopsien zeigt sowohl für Männer als auch für Frauen keine messbare Signifikanz zum Alter.

Korrelation der Mineralisationsparameter in Bezug auf die histomorphometrischen Variablen des trabekulären Knochens

Tabelle 6: Korrelationen der Mineralisationsparameter mit dem Knochenvolumen und der Trabekelbeschaffenheit.

	BV/TV	Tb. Th.	Tb. N.	Tb. Sp.
Ca mean				
Korrelation nach Pearson	-,240**	-,183*	-,216*	,173
Signifikanz (2-seitig)	,007	,042	,016	,051
Ca width				
Korrelation nach Pearson	,007	-,015	-,001	,066
Signifikanz (2-seitig)	,940	,865	,988	,465
Ca peak				
Korrelation nach Pearson	-,220*	-,135	-,232**	,190*
Signifikanz (2-seitig)	,014	,135	,009	,034
Ca high				
Korrelation nach Pearson	-,250**	-,194*	-,235**	,220*
Signifikanz (2-seitig)	,005	,031	,008	,014
Ca low				
Korrelation nach Pearson	-,142	-,082	-,130	,058
Signifikanz (2-seitig)	,114	,365	,149	,524

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Auch in der multivariaten Regressionsanalyse der strukturellen histomorphometrischen Variablen zeigen sich unterschiedliche Signifikanzen. Es ergibt sich eine negative Korrelation des Gesamtkalziumwertes mit dem Knochenvolumen, der trabekulären Dicke und der Trabekel-Anzahl. Die Kalziumheterogenität zeigt auch hier keine messbaren Korrelationen. Der Kalziumspitzenwert weist eine negative Korrelation mit dem Knochenvolumen und der Trabekel-Anzahl sowie eine positive Korrelation mit dem Trabekel-Abstand auf. Kalzium-High zeigt jeweils negative Korrelationen mit dem Knochenvolumen, der Trabekel-Dicke und der Trabekel-Anzahl und eine positive Korrelation mit dem Trabekel-Abstand.

Korrelation der Mineralisationsparameter in Bezug auf die Osteoidverteilung des trabekulären Knochens

Tabelle 7: Korrelation der Mineralisationswerte und der Osteoidparameter.

	OV/BV	OS/BS
Ca mean		
Korrelation nach Pearson	-,302**	-,163
Signifikanz (2-seitig)	,001	,071
Ca width		
Korrelation nach Pearson	,196*	,200*
Signifikanz (2-seitig)	,030	,026
Ca peak		
Korrelation nach Pearson	-,252**	-,084
Signifikanz (2-seitig)	,005	,335

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Es besteht eine signifikant negative Korrelation des Gesamtkalziums mit dem Osteoidvolumen sowie eine positive Korrelation der Kalziumheterogenität mit dem Osteoidvolumen und des Osteoidoberflächenquotienten.

Der Kalziumspitzenwert zeigt eine negative Korrelation mit dem Osteoidvolumen.

5. Diskussion

Die Prävention von Frakturen, gerade bei älteren Menschen, stellt einen zentralen Aspekt des Gesundheitssystems dar. Denn ist es erst einmal zu einer Fraktur gekommen, bedeutet dies für die Patienten häufig den akuten Verlust der Selbstständigkeit und damit einhergehend eine deutliche Verminderung der Lebensqualität.

Auch für die Ausgaben des Gesundheitssystems ist eine Investition in die Prävention ein wesentlicher Aspekt der Kostensenkung für die Zukunft. Gerade das Krankheitsbild der Osteoporose rückt die Knochengesundheit wieder verstärkt in den Fokus der medizinischen Forschung, aber auch in die Köpfe der Bevölkerung. Die Osteoporose ist jedoch nicht, wie häufig angenommen, ausschließlich ein Thema für den älteren Teil der Bevölkerung. Denn schon in der Kindheit und Jugend wird der Grundstein für eine optimale Entwicklung des Skelettsystems, welches sich zeitlebens durch das Remodeling an die sich ändernden Verhältnisse anpasst, gelegt. Bereits seit Langem ist bekannt, dass das Auftreten von osteoporotischen Frakturen unter anderem mit einem Verlust von Knochenmasse sowie einer Änderung in der Knochen-Mikroarchitektur, durch die Herabsetzung des Vernetzungsgrades der einzelnen Trabekel und einer damit einhergehenden Verminderung der Knochenmaterialqualität zu erklären ist (Roschger, 2016).

Doch zur Knochenqualität und damit zum individuellen Risiko für Frakturen trägt in gleichem Maße auch der Grad der Knochenmatrixmineralisation bei. Denn dieser ist ebenfalls ein wesentlicher Faktor für die biomechanische Stabilität des Knochens. Aus diesem Grund wurde als Ziel der vorliegenden Studie der Mineralisationsgehalt des humanen, trabekulären Knochens des Beckenkamms in Bezug zu epidemiologischen Parametern wie Alter, Geschlecht und BMI analysiert.

Hier konnte abschließend gezeigt werden, dass eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Alter und dem Ca peak besteht. Mit BMI und Geschlecht als Kovarianten ließ sich auch ein signifikanter Anstieg des Ca mean im Alter nachweisen. Genauer konnte gezeigt werden, dass es altersabhängig zu einem Anstieg von höher mineralisierten Knochenarealen kommt, was zu einem höheren Gesamtkalzium sowie einem erhöhtem Kalziumspitzenwert führt.

Ein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied konnte in der vorliegenden Arbeit gerade in der multivariaten Regressionsanalyse nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Kalziumspitzenwerte zeigten bei den Männern eine signifikante Erhöhung je dünner ein

Trabekel ist, was für die Frauen nicht nachgewiesen werden konnte. Dies könnte ggf. an der zu Beginn erfolgten Eliminierung der weiblichen Patienten über 90 Jahre liegen, da hier ein weiterer Anstieg des Ca. peak zu erwarten wäre. Aufgrund der ermittelten Daten ist davon auszugehen, dass sich die Kalziumparameter im gesunden Knochen von Frauen und Männern nicht nachweislich unterscheiden.

Es konnte anhand unserer Daten keine signifikante Auswirkung eines erhöhten Body-Mass-Index auf die Mineralisation der Knochenmatrix festgestellt werden. Bekannt ist, dass sich die Knochenmatrix durch Mineralisationskinetik und Remodeling, aus unterschiedlich mineralisierten Knochenpaketen zusammensetzt. Dieser inhomogene Mineralisationsgehalt wurde ausgewertet und im Verhältnis zu den wichtigsten Knochenstrukturparametern untersucht.

Die Betrachtung der histomorphologischen Daten zeigte, dass eine Abnahme der Trabekeldicke mit einer Erhöhung der Knochenmineralisation einhergeht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass physiologische Osteoidwerte ($<2\%$ OV/BV) mit der Kalziumverteilung korrelieren und damit den Einfluss des Knochen-Remodelings auf die Kalziumverteilung in geeigneter Weise widerspiegeln.

Aufgrund des ausgesprochen großen Kollektives von 152 Beckenkammbiopsien norddeutscher Individuen ohne primäre Knochenerkrankungen oder Knochenmineralisationsdefekte kann die Datenerhebung der vorliegenden Studie als Referenz für die Festlegung der Knochenmineralisationsdichteverteilung mittels quantitativer Rückstreuemikroskopie für beide Geschlechter angesehen werden. Dadurch kann zum Beispiel eine sensitivere Diagnostik für die Detektion einer Osteopathie erfolgen, da hier häufig eine deutlich niedrigere Knochenmatrixmineralisation nachweisbar ist. Durch die Erkenntnis über den aktuellen Stand der Knochengesundheit in Norddeutschland ist so für die Zukunft unter Umständen eine frühzeitigere Prophylaxe und damit sogar die potentielle Vermeidung von Frakturen möglich. Ebenso dient dieses Wissen im klinischen Alltag zum Monitoring des Therapieverlaufes einer Knochenerkrankung und zum weiteren Verständnis der Wirkmechanismen der unterschiedlichen Therapieoptionen. Denn die Veränderungen der Knochenmineralisationsdichteverteilung lassen sich auch teilweise auf Veränderungen in der mit DXA gemessenen Knochendichte übertragen. Diese Studie liefert damit wichtige Erkenntnisse über die Pathophysiologie altersabhängiger Frakturen und kann auf Grund der hohen Probenanzahl als Referenzkollektiv für alters- und strukturabhängige Veränderungen der Knochenmineralisation verwendet werden.

5.1. Diskussion der Methoden

5.1.1. Charakterisierung des Kollektivs

Untersucht wurden insgesamt 152 Biopsien von 66 weiblichen und 86 männlichen Individuen im Alter von 30 bis 90 Jahren, welche im Jahr 2008 im Rahmen von Sektionen im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen wurden. Proben von Individuen unter 30 Jahren wurden aufgrund des noch nicht ausgereiften Knochenmineralisationsstatus und dem Anstieg der Knochendichte um das 25. Lebensjahr ausgeschlossen (Cattran, 2015).

Der höhere Anteil an männlichen Individuen in der vorliegenden Studie könnte damit in Zusammenhang stehen, dass im Gesamtkollektiv auch Personen mit Unfällen mit Todesfolge eingeschlossen wurden. Laut statistischem Bundesamt haben Männer im Vergleich zu Frauen ein deutlich höheres Risiko im Straßenverkehr tödlich zu verunglücken. In der letzten Berechnung für 2014 kamen bezogen auf die Einwohnerzahl in Deutschland dreimal so viele Männer wie Frauen im Straßenverkehr ums Leben. Dieses Verteilungsrisiko gilt für alle Altersgruppen (Bundesamt, 2014).

Für die Detektierung des Knochenstatus wurde die Kohorte der Patienten über 90 Jahre, welche fast ausschließlich weiblich war, bei zu geringer Fallzahl aus der Studie ausgeschlossen. Das durchschnittliche Alter der Frauen lag somit bei nur 67,45 Jahren fünf Jahre über dem der Männer mit 62,45 Jahren, auch dies entspricht in etwa der aktuellen höheren Lebenserwartung der weiblichen Bevölkerung in Deutschland.

Alle verwerteten Proben stammen von Individuen, deren Todesursache kein längerer Krankenhausaufenthalt vorangegangen ist. Da ein solcher, durch z.B. Mangel an Vitamin D, einer Immobilisation oder einer Mangelernährung zu einer Knochenstrukturveränderung oder einer Änderung der Knochenmineralisation führen kann. Alle Biopsien von Patienten mit Krebserkrankungen, Nierenerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen, da hier ebenfalls häufig pathologische Knochendichtewerte vorliegen können (Covic, 2017) (Kanis, 1997).

Ebenfalls eliminiert wurden alle Proben, bei welchen eine bereits diagnostizierte Knochenerkrankung vorlag. Somit wurden auch Biopsien mit einem pathologischen Osteoidvolumen $> 2\%$ aus dieser Studie ausgeschlossen, da hier definitionsgemäß eine

Osteoidose vorliegt und die Auswertung einer gesunden Vergleichsgruppe ohne Knochenmineralisationsdefekte das Ziel der vorliegenden Studie war (Edouard, 2011).

Das untersuchte Kollektiv stellt daher weitestgehend einen Querschnitt der gesunden norddeutschen Bevölkerung dar und die Größe des Kollektivs sowie die strengen Auswahlkriterien bilden einen validen Grundstock für die erhobenen Daten.

Da die Beckenkammbiopsien im Rahmen der Sektion entnommen wurden, ist bei ungeklärten Todesfällen eine Beeinträchtigung der Knochengesundheit, z.B. durch zuvor bestehende Medikamenteneinnahme, jedoch nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen (Sirola, 2002).

Laborchemische Parameter, welche den Knochenstoffwechsel beeinflussen, wurden in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt, da es sich um bereits verstorbene Patienten handelt. Von besonderer Bedeutung wäre hier die Bestimmung des Serumkalziums, Phosphats, der alkalischen Phosphatase und des Vitamin D Spiegels gewesen. Dieser direkte Zusammenhang sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, um ergänzende Details des Knochenstoffwechsels in Bezug zur Kalziumverteilung im Knochen aufweisen zu können.

Um eine hohe Vergleichbarkeit der Beckenkammbiopsien zu schaffen, erfolgte die Entnahme der jeweiligen Proben standardisiert nach Bordier et al. circa zwei Zentimeter dorsal der Spina ilica anterior superior und zwei Zentimeter caudal der Crista iliaca (Bordier, 1964). Da dies eine invasive Entnahmemethode darstellt, wäre eine vergleichbar große Studie an lebenden Individuen ohne den Hinweis auf eine primäre oder sekundäre Osteopathie ethisch nicht vertretbar und damit nicht möglich gewesen. Daher ist die vorliegende Studie durch die ausgesprochene Größe des gesunden Kollektivs mit 152 Biopsien von besonderer Bedeutung und hoher klinischer Relevanz. Eine nicht-invasive Methode der Darstellung der Knochendichte, welche auch bei lebenden Probanden einfacher durchführbar wäre, stellt die DXA dar. Durch eine Studie von Fratzl et al. ließen sich die mittels DXA erhobenen Daten zum Knochenstoffwechsel sowie eine mittels qBEI vermessene Knochenbiopsie von Patientinnen mit einer Osteoporose und erhaltener Bisphosphonat-Therapie unmittelbar vergleichen. So konnte auch hier gezeigt werden, dass der Effekt auf die Knochenmineraldichte teils auf Veränderungen der Matrixmineralisierung und teilweise auf Veränderungen des Knochenvolumens zurückzuführen ist (Fratzl, 2007). Diese dreidimensionale Diagnostik basiert auf der dichteabhängigen Schwächung der Röntgenstrahlen und dient heute vor allem der

Verlaufskontrolle von Patienten mit Osteoporose. Eine genaue Ermittlung des Kalzifizierungsgrads des Knochens ist mit diesem Verfahren allein jedoch noch nicht möglich.

Eine klinische Methode, welche die Mineralisation der Spongiosa und der Kortikalis getrennt voneinander darstellen kann, ist die quantitative Computertomographie (QCT) (Genant, 2008). Zu beachten ist hier jedoch die hohe Strahlenbelastung sowie die enormen Kosten dieser Methode (Donnelly, 2011). Beide Verfahren sollten in weiteren Studien mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen werden, um ihren Einsatz im klinischen Alltag zu verifizieren.

Im Gegensatz zu diesen nicht-invasiven Methoden kann mittels quantitativer Rasterelektronenmikroskopie die exakte Kalziumverteilung im trabekulären und kortikalen Knochen dargestellt werden. Viele Studien ermittelten bereits Daten zur Knochemineralisationsdichteverteilung in Bezug auf Knochenerkrankungen in humanen und tierischen Biopsien. Zum Beispiel konnten Brennan et al. an einem Modell mit Messungen am Femur von Schafen zeigen, dass die Verteilung des Kalziumgehaltes als Schlüsseldeterminante der Knochenstärke eine veränderte Mineralverteilung nach Estrogenmangel aufwies (Brennan, 2014).

Der Zusammenhang zwischen Kalziumdichteverteilung, Alter, Geschlecht und histomorphometrischen Parametern wurde jedoch zuvor noch nicht in einem so großen Kollektiv untersucht. Die Ermittlung der normwertigen Kalziumparameter, wie Ca mean, Ca peak und Ca width dient für zukünftige Studien als Grundlage für weitere Datenerhebungen, besonders im Vergleich zu pathologischen Knochenmineralisationswerten.

Reid und Boyde veröffentlichten Daten zum Knochenstatus von humanen Proben aus der sechsten Rippe eines Kollektivs von Individuen im Alter von acht Wochen bis 59 Jahren. Sie konnten ebenfalls einen schrittweisen Anstieg des höher mineralisierten Knochens mit zunehmendem Alter darstellen (Reid, 1987).

In der vorliegenden Studie wurden im Vergleich dazu Biopsien aus dem humanen Beckenkamm betrachtet. Im Gegensatz zu anderen Knochen des menschlichen Körpers kann der Beckenkamm standardisiert biopsiert werden und ist nicht zuletzt durch den hohen Anteil an Spongiosa besonders gut geeignet, um die Knochenstruktur und die Mineralisation auf histologischer Ebene zu untersuchen.

So konnten Roschger et al. zeigen, dass trabekuläre Biopsien aus dem Beckenkamm repräsentativ für das übrige Skelettsystem anzusehen sind. Sie untersuchten mittels qBEI Proben aus der Patella, dem vierten Lendenwirbelkörper und dem Femur und stellten keine signifikanten Unterschiede der Knochenmineraldichtevertelung fest. Daher ist anzunehmen, dass sich die ermittelten Kalziumwerte dieser Studie problemlos auf die übrigen Knochenkompartimente übertragen lassen.

Des Weiteren konnten keine ethnischen Veränderungen detektiert werden. Auch hier wurde, wie in den vorliegenden Daten, kein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied der Mineralisierung nachgewiesen (Roschger, 2003).

Direkte Rückschlüsse über die Kalziumverteilung in der Kortikalis, welche ebenfalls einen großen Anteil an der Stabilität des Knochens aufweist, lassen sich aus der vorliegenden Studie aufgrund der zuvor beschriebenen Strukturunterschiede nicht ziehen. Hierzu konnte eine Studie von Misof et al. in einer Untersuchung von 73 Beckenkammbiopsien zeigen, dass die Korrelation von kortikaler und spongiöser BMDD eine koordinierte Regulation des Knochenumsatzes zwischen beiden Knochenkompartimenten nahelegt. Nur in wenigen Fällen gab es einen geringfügigen Unterschied im Mineralisierungsgrad zwischen der Kortikalis und der Spongiosa (Misof, 2014). Daraus lässt sich schließen, dass auch in der vorliegenden Studie die Kortikalis einen übertragbaren Grad der Kalziumverteilung aufweist. Hier wäre eine Kontrollstudie der Kalziumparameter der Kortikalis von großem Interesse, um auch diesen Zusammen an einem großen Kollektiv abschließend klären zu können.

Bei der Untersuchung der mittels Rasterelektronenmikroskopie erstellten Bilder zeigten sich vereinzelt Artefakte, welche am ehesten auf die Schleifmethode zurückzuführen sind. Das manuelle Entfernen der Artefakte stellt beim potentiellen Übersehen oder dem zu großzügigen Entfernen eine mögliche Fehlerquelle der vorliegenden Studie dar. Die Artefakte wurden individuell per Hand herausgefiltert, markiert und mit Hilfe des Programms „Image-J“ eliminiert, um eine exakte Probe für die Auswertung zu erhalten. Diese potentielle Fehlerquelle könnte in weiteren Studien gegebenenfalls durch eine Verlängerung der Polierzeit und der damit einhergehenden Reduktion von Artefakten optimiert werden.

Auch die Bestimmung der Spongiosagrenzen, welche wie in der Einführung beschrieben einen fließenden Übergang zur Kortikalis aufweisen, erfolgte für jede einzelne Probe manuell und stellt somit ebenfalls eine mögliche Messfehlerquelle für die ermittelten Daten dar.

5.2. Auswirkung des Alters auf die Knochenmineralisation

Obwohl bereits einige Studien zur altersabhängigen Veränderung der Knochengewebes durchgeführt wurden, konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob das Alter des Patienten oder das Alter des Knochengewebes die Mineralisation bedingt.

In der vorliegenden Analyse konnte eine positive Korrelation zwischen dem Alter und dem Ca peak gezeigt werden. Die klassischen Mineralisationsmuster der BMDD entstehen durch zwei wesentliche Aspekte im Knochenstoffwechsel. Die Mineralisationskinetik entscheidet über den Kalziumspitzenwert. Je schneller und höher die Knochenmatrix mineralisiert wird, umso weiter verschiebt sich die Kurve hin zu höheren Kalziumwerten. Zudem wird in dieser Methode das mittlere Gewebeatler der Matrix detektiert. Wie bereits ausführlich geschildert unterliegt dieses dem ständigen Remodeling-Prozess, wobei die sekundäre Mineralisation mehrere Monate bis Jahre in Anspruch nimmt (Akkus, 2003). Daher lässt sich schließen, dass je höher die Umbaurate ist, desto mehr junge Knochenpakete mit gering mineralisiertem Gewebe vorhanden sind. Die Kurve des Kalziumspitzenwertes verschiebt sich nach links (Fuchs, 2008).

Im Gegensatz dazu hat die Matrix bei einer niedrigeren Umbaurate, wie sie im höheren Alter besteht, mehr Zeit für die Mineralisation und der Ca peak steigt an. Anhand unserer Daten konnten wir nachweisen, dass die Abwesenheit von niedrig mineralisierter Knochenoberfläche und ausgedünnten Trabekeln mit einem höheren Mineralisationsgrad im vorhandenen Knochen einhergeht und die unabhängig vom Alter des Individuums ist.

Unter Hinzunahme der Parameter Geschlecht und BMI in einer multivariaten Analyse ergibt sich auch ein positiver Zusammenhang mit dem Wert des Ca mean. Durch die Größe unseres Kollektivs konnte dieser Zusammenhang nun endlich abschließend geklärt werden.

Weder das Geschlecht noch der BMI zeigt einen nachweisbaren Einfluss auf die jeweiligen Kalziumparameter der Spongiosa in den vorliegenden Daten.

Evans et al. konnten in einer Studie mit 100 übergewichtigen Patienten ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) eine erhöhte Trabekelanzahl sowie erhöhte Knochendichte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von normalgewichtigen Probanden nachweisen (Evans, 2015). Hierbei wurde die Knochendichte jedoch mit klinischen Verfahren wie DXA und qCT bestimmt, die keine direkten Rückschlüsse auf die ultrastrukturelle Mineralverteilung bieten.

Da unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und Mineralverteilung besteht, ist anzunehmen, dass die Beobachtungen von Evans et

al. auf BMI-abhängige Veränderungen der Knochenmasse und nicht der Knochenmineralisation zurückzuführen sind.

Nebenbefundlich zeigen die vorliegenden Daten des norddeutschen Bevölkerungsquerschnittes für beide Geschlechter einen BMI von knapp über 25 kg/m². Laut den aktuellen Angaben der WHO wird ein BMI von > 25.00 kg/m² bereits als Präadipositas bezeichnet und geht mit einem gesundheitlichen Risiko durch z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Diabetes mellitus einher. Diese Daten wären durch eine gesonderte Studie zu eruieren, um die allgemeine Gesundheit des norddeutschen Kollektivs zu eruieren und damit in einem weiteren Schritt die damit einhergehenden Erkrankungen zu vermeiden.

Tabelle 8: Internationale Klassifikation für Untergewicht, Normalgewicht und Übergewicht abhängig vom Body-Mass-Index für Erwachsene.

Klassifikation	BMI(kg/m ²)	
	generelle Grenzbereiche	ergänzende Grenzbereiche
Untergewicht	<18.50	<18.50
starkes Untergewicht	<16.00	<16.00
moderates Untergewicht	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
leichtes Untergewicht	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Normalgewicht	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Übergewicht	≥25.00	≥25.00
Präadipositas	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49
		27.50 - 29.99
Adipositas	≥30.00	≥30.00
Adipositas I	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Adipositas II	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Adipositas III	≥40.00	≥40.00

Studien zeigen, dass ein höherer BMI auch in der Jugend eine positive Korrelation zum späteren BMD aufweist. Dies wird jedoch hauptsächlich von vielen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen beeinflusst. So konnte eine Studie von Kim et al. nahelegen, dass

die mütterliche Vererbung eine wichtige Determinante für die Knochenmasse der Tochter darstellt und dass dieser erbliche Faktor jedoch je nach BMI der Tochter beeinflusst werden kann (Kim, 2016). Bestätigend hierfür sind auch Daten, welche bei einer erfolgreichen Behandlung einer juvenilen Anorexia nervosa eine signifikante Verbesserung der BMD zeigten (Jagielska, 2017).

Es konnte zwar ein geringeres Risiko für proximale Femur- und Wirbelkörperfrakturen bei adipösen Erwachsenen nachgewiesen werden, allerdings ist das Risiko anderer Frakturen, wie des proximalen Humerus und des oberen Sprunggelenkes, im Vergleich höher. Der Zusammenhang des BMI mit einer erhöhten BMD lässt auf eine Erhöhung der Leptin und Aromataseaktivität schließen. Fettdepots könnten jedoch auch negative Auswirkungen auf den Knochenstatus haben. Zytokine aus viszeralem Fett sind zum Beispiel pro-resorptiv und ein hoher intramuskulärer Fettgehalt ist mit einer schlechteren Muskelfunktion assoziiert, wodurch wiederum das Sturzrisiko erhöht ist (Walsh, 2017). Die Mineraldichteverteilung der Matrix lies in den vorliegenden Daten keine Korrelation zum BMI nachweisen.

5.3. Auswirkung der Mikroarchitektur auf die Knochenmineralisation

Der Kalziumspitzenwert zeigt in den erhobenen Daten eine negative Korrelation mit dem Knochenvolumen und der Trabekel-Anzahl sowie eine damit einhergehende positive Korrelation mit dem Trabekel-Abstand.

Das Gesamtkalzium zeigt im Verhältnis zum Gesamtknochenvolumen und der Dicke der Trabekel im spongiösen Knochen eine negative Korrelation. Diese beiden Ergebnisse ergeben sich daraus, dass durch das stetige Remodeling ein Abbau der Vernetzungen zwischen den einzelnen Trabekeln im Alter stattfindet. Der Trabekel-Abstand wird im Alter größer und die Trabekeldicke nimmt signifikant ab.

Es konnte gezeigt werden, dass gerade dieser Prozess im Alter bei einem Sturz aus dem Stand, meist seitlich oder rückwärts, viel häufiger zu einer Hüftfraktur führt, als bei jüngeren Patienten. Aus einer histomorphometrischen Analyse ging hervor, dass der Schwund des Knochengewebes im Rahmen der Gewebealterung im Bereich der Hüfte genau an der Stelle reduziert ist, an welcher der Kortex bereits am dünnsten ist und auch bei einem seitlichen Sturz zusammengedrückt wird (Reeve, 2014).

Mittels qBEI lässt sich in der Spongiosa bei jungen Patienten eine geringere Mineralisation bei breiten, eng aneinander grenzenden Trabekeln gut verdeutlichen. Auch die Knochenpakete mit hoch mineralisiertem Gewebe bei älteren Patienten, mit schmalen Trabekel und weitem Abstand, werden durch diese Methode gut sichtbar, vergleiche Abbildung 26.

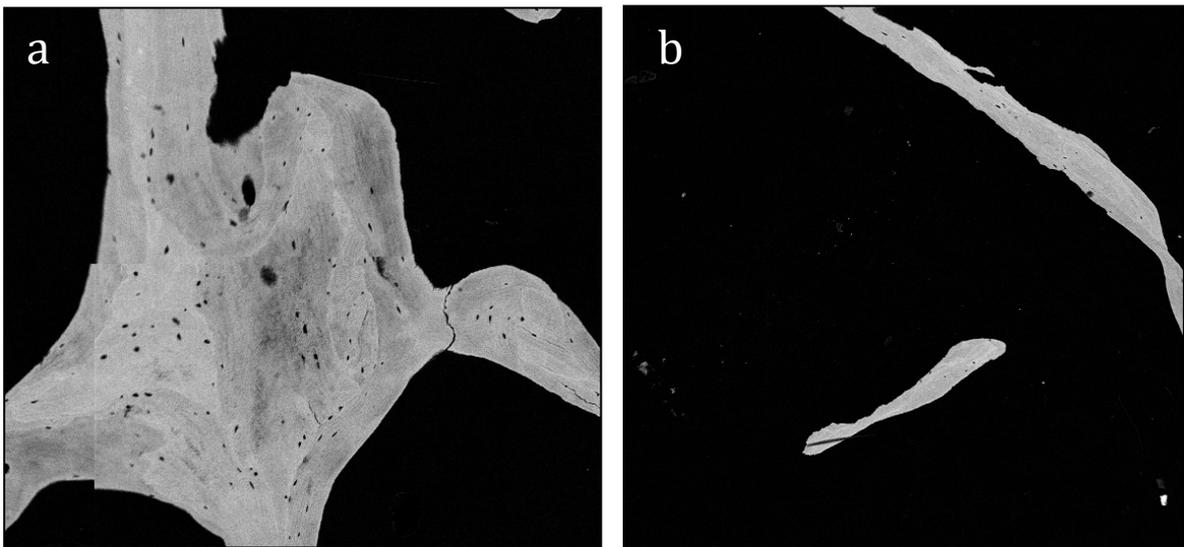


Abbildung 25 Darstellung einer humanen Beckenkammbiopsie mittels qBEI eines jungen Patienten a und eines älteren Patienten b.

Eine grobe Voraussage für eine potentielle Fraktur lässt sich in der Klinik mit der Abnahme der Knochendichte um eine Standardabweichung und einem damit einhergehenden Risikoanstieg um 50 bis 200 Prozent festlegen. Die genaueste Vorhersagekraft ergibt sich, wenn die DXA Knochendichtemessung an der Knochenmanifestation erfolgt, für welche das Frakturrisiko geschätzt werden soll (Cummings, 1993).

Brennan et al. konnten ebenfalls zeigen, dass ein Anstieg der Knochenmineralisationsdichteverteilung bei vorliegendem Estrogenmangel durch einen direkten Einfluss auf Osteoblasten und eine erhöhte Apoptoserate der Osteoklasten nachweisbar war. Der Knochen wies eine erhöhte Mineralheterogenität auf, was zu einem gesteigerten Frakturrisiko führt (Brennan, 2014).

Auch Roschger et al. konnten mittels qBEI Messungen zeigen, dass es bei Patienten mit mildem Hyperparathyreoidismus zu einer erhöhten Inhomogenität und einem reduzierten Gesamtkalzium in Korrelation mit der Knochenumbaurate, im Vergleich zu gesunden Individuen, kommt (Roschger, 2007).

Ein weiterer Grund für die Fragilität von gealtertem Knochen ist die Annahme, dass bei einer Rissausdehnung in der Größenordnung von Millimetern der Bruchwiderstand von jungem Knochen etwa fünfmal höher ist als bei gealtertem Knochengewebe. Zudem wird das erhöhte Frakturrisiko durch die Kombination einer höher mineralisierten Matrix mit einer höheren Osteonendichte und der damit einhergehenden Porosität begünstigt (Zimmermann, 2015).

Aufbauend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre es von besonderer Bedeutung die Beschaffenheit der Kalziumverteilung im kortikalen humanen Knochen eines großen Kollektives zu bestimmen um eine Stärke und Belastbarkeit für das gesamte Skelettsystem berechnen zu können. Fratzl-Zelman et al. konnten in einer Studie mit einer kleinen Fallzahl von 25 Patienten mittels qBEI an spongiösen Knochenbiopsien einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Kalziumheterogenität und einem erhöhten Frakturrisiko nachweisen (Fratzl-Zelman, 2011).

Auch Simon et al. zeigten im Tiermodell, dass ein Kalziummangel bei Schafen zu einer Mineralisationsstörung des trabekulären und des kortikalen Knochens führt und gleichzeitig ein erhöhtes Frakturrisiko mit sich bringt (Simon, 2014). Ausschlaggebend für das Frakturrisiko ist neben der Mineralisation des Knochens auch die weitere Zusammensetzung der Matrix mit der Zusammensetzung der Kollagenfibrillen, welche für eine optimale Elastizität sorgen (Zebaze, 2011).

Doch nicht nur isoliert für Deutschland gilt es Präventionsstrategien für altersbedingte Frakturen zu eruiieren. Auch global gesehen ist die Thematik der Hüftfrakturen mit ihren sozioökonomischen Auswirkungen von großem Interesse. Eine Hochrechnung unter der Annahme, dass sich die alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz weltweit konstant verhält, wird die Zahl der Hüftfrakturen bis 2025 auf etwa 2,6 Millionen und bis zum Jahr 2050 auf sogar 4,5 Millionen geschätzt (Gullberg, 1997).

Durch die jüngsten Entwicklungen im Verständnis weshalb genau gealterter Knochen zerbrechlicher wird, soll es durch präventive Strategien gelingen das Frakturrisiko zu reduzieren und dadurch die wachsenden, weltweiten Auswirkungen auf unsere alternde Bevölkerung und das Gesundheitssystem zu verringern. Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Mineralisationsdichteverteilung, der Matrix und dem tatsächlichen Frakturrisiko beweisen zu können werden jedoch noch weitere Studien benötigt werden.

6. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Studie wurde der spezifische Kalziumgehalt in spongiösem Knochen mittels quantitativer rasterelektronenmikroskopischer Analyse nachgewiesen.

Das Patientenkollektiv von 152 Individuen im Alter von 30 bis 90 Jahren ist weitestgehend repräsentativ für die adulte norddeutsche Bevölkerung. Die Biopsien wurden zur optimierten Vergleichbarkeit nach der Methode von Bordier et al. aus dem Beckenkamm entnommen. Die Qualität von humanem Knochen hängt vom Grad der Mineralisation und dem strukturellen Aufbau ab. Daher wurde der Zusammenhang des Kalziumgehaltes in Bezug auf patientenspezifische Parameter (Alter, Geschlecht und BMI) und histomorphometrische Variablen (BV/TV, Tb.Th., Tb.N., Tb.Sp., OV/BV, OS/BS,) mittels univariater und multivariater Analyse ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Alter eine positive Korrelation mit dem Gesamtkalzium und dem Kalziumspitzenwert hat. Der ermittelte Gesamtkalziumwert zeigte bei reduziertem spongiösem Gesamtknochenvolumen und bei einer Abnahme der Trabekeldicke eine negative Korrelation.

Ebenfalls untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Osteoidverteilung und der Knochenmineralisation, welche einen Anstieg der Kalziumheterogenität einhergehend mit einem Abfall des Gesamtkalziums zeigte.

Mit den vorliegenden Daten konnte bewiesen werden, dass die Mineralisation von trabekulären Beckenkammbiopsien abhängig vom Alter sowie der Knochenmasse des Individuums ist. Dadurch konnte eine Verminderung der Knochenmaterialqualität im Alter durch eine repräsentative Kollektivgröße abschließend bestätigt werden.

Da der Grad der Knochenmatrixmineralisation ein wichtiger Faktor für die mechanischen Eigenschaften des Knochens ist, liegt hier nahe, dass durch den erhöhten Mineralisationsgrad und die damit einhergehende Steifigkeit des Knochenmaterials ein erhöhtes Frakturrisiko besteht.

Welche Präventionsmaßnahmen zur Verminderung des Frakturrisikos zusammenspielen, ist noch nicht abschließend geklärt und bleibt weiterhin ein wichtiges Thema der aktuellen Forschung und Diskussion.

Die Erhebung von standardisierten Kalziumwerten eines großen Kollektivs bietet eine wichtige Grundlage für weitere Studien im Hinblick auf einen Vergleich mit Biopsien von Patienten mit Knochenerkrankungen zur besseren Diagnostik, Verlaufskontrolle und Therapieoptimierung.

Summary

The aim of the present study was to clarify how bone quality and strength of trabecular bone depends on its microarchitecture and its tissue level properties. The iliac crest bone cores were analyzed by quantitative backscattered electron imaging. The patient collective of 152 individuals between the ages of 30 and 90 is largely representative of the adult northern German population. The quality of human bone depends on the degree of mineralization and structural composition. Therefore, the relationship between calcium content and patient-specific parameters (age, sex and BMI) and histomorphometric variables (BV / TV, Tb.Th., Tb.N., Tb.Sp., OV / BV, OS / BS,) was determined. Univariate and multivariate analyses were conducted. It has been shown that age has a positive correlation with calcium mean and calcium peak. The determined calcium mean value showed a negative correlation with reduced spongy total bone volume and a decrease in the trabecular thickness. The relationship between osteoid distribution and bone mineralization was also investigated, showing an increase in calcium width with a decrease in total calcium. The available data proved that the mineralization of trabecular iliac crest biopsies is dependent on the age as well as the bone mass of the individual. This finally confirmed a reduction in bone quality in old age based on the representative collective size. Since the degree of bone matrix mineralization is an important factor for the mechanical properties of the bone, it is suggested that there is an increased risk of fracture due to the increased mineralization and concomitant stiffness of the bone material. Which preventive measures interact to reduce the risk of fractures has not yet been conclusively clarified and remains an important topic of current research and discussion. The collection of standardized calcium values from this underlying large collective provides an important basis for further studies to compare biopsies from patients with bone disease for better diagnostics, follow-up and therapy optimization.

7. Literaturverzeichnis

Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K (1987) Themicroanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. Clin Orthop Relat Res 215: 260-271.

Adler CP (2000) Macroscopic, Histological, and Radiological Diagnosis of Structural Changes in the Skeleton. In: Bone Diseases Bd. 3 (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 8-80.

Akkus O, Polyakova-Akkus A, Adar F, Schaffler MB (2003) Aging of microstructural compartments in human compact bone. J Bone Miner Res (18):1012–1019.

Aumüller G, Aust G, Engele J (2014) Bewegungssystem – Grundlagen. In Anatomie 3. Auflage, Schmidt, W (Hrg.) Thieme, Stuttgart, 79, 223-224.

Bald, M. (2012) Typische Verletzungen und Frakturen des Kindesalters, Kinderorthopädische Erkrankungen. In: Kurzlehrbuch Pädiatrie. Hellstern G, Bald M, Blattmann C, Bosse H (Hrg.) 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, 510.

Balletshofer B (2009) Cushing-Syndrom. In: Endokrinologie und Diabetes. Balletshofer B, Gallwitz B, Müssig K (Hrg.) 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, 109.

Bartl R (2013) Sonderformen. In: Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie. Bartl R, Bartl C (Hrg.) 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 149.

Barvencik FA, Amling M (2015) Vitamin-D-Stoffwechsel des Knochens. Der Orthopäde. 44(9):686-694.

Benninghoff D (2003) Knochengewebe. In: Anatomie. Drenckhahn D (Hrs.) 16. Auflage, Urban &Fischer, München, 147.

Bohndorf KI (2006) Ischämische Knochenerkrankungen. In: Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. Bohndorf KI, Imhof H, Fischer K (Hrg.) 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 238.

Bonewald LF (2004) Osteocyte biologie: Its implications for osteoporosis. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 4(1):101-4.

Bonewald LF (2011) The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 26(2):229-38.

Bordier P, Matrajt H, Miravet L, Hioco D (1964) Histological measure of the volume and resorption of bone joints. *Pathol Biol Paris* 12:1238-43.

Boskey AL (2001) Bone Mineralization. In: *Bone Mechanics Handbook*, Cowin SC (Hrg.) 2. Auflage, CRC Press, Florida, 5.1-5.7.

Brennan MÁ, Haugh MG, O'Brien FJ, McNamara LM (2014) Estrogen withdrawal from osteoblasts and osteocytes causes increased mineralization and apoptosis. *Horm Metab Res* 46(8):537-45.

Brennan, MÁ, Gleeson, JP, O'Brien FJ, McNamara LM (2014) Effects of ageing, prolonged estrogen deficiency and zoledronate on bone tissue mineral distribution. *J Mech Behav Biomed Mater* 29:161–170.

Brown M (2008) Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ* 32(2):120-6.

Statistisches Bundesamt (2014) Unfälle von Frauen und Männern im Straßenverkehr. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, URL:

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/UnfaelleFrauenMaenner5462407147004.pdf%3F_blob%3DpublicationFile_Bundesamt.

[Stand: 03.02.2018 11:00].

Statistisches Bundesamt (2012) Periodensterbetafeln für Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, URL:

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Bevoelkerung/Bevoelkerungsbewegung/PeriodensterbetafelnBundeslaender5126204117004.pdf?_blob=publicationFile.

[Stand: 01.02.2018 13:00].

Statistisches Bundesamt (2015) Lebenserwartung in Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, URL:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Sterbefaelle/Tabellen/LebenserwartungDeutschland.html>. [Stand: 30.09.2017 15:00].

Busse B, Bale HA, Zimmermann EA, Panganiban B, Barth HD, Carriero A, Vettorazzi E, Zustin J, Hahn M, Ager JW, Püschel K, Amling M, Ritchie RO (2013). Vitamin D deficiency induces early signs of aging in human bone, increasing the risk of fracture. *Sci Transl Med* 10;5(193):88.

Bükow A (2015) Knochenbrüche durch Osteoporose verursachen hohe Kosten, Berlin, URL: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/62470/Knochenbrueche-durch-Osteoporose-verursachen-hohe-Kosten>. [Stand: 20.09.2017 14:30].

Cashman KD (2002) Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr* 87(2):169-77.

Cattran AK, Kalkwarf HJ, Pinney SM, Huang B, Biro FM (2015) Bone Density and Timing of Puberty in a Longitudinal Study of Girls. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 28(3):170-2.

Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD (2007) Insights into Material and Structural Basis of Bone Fragility from Diseases Associated with Fractures: How Determinants of the Biomechanical Properties of Bone Are Compromised by Disease. *Endocr Rev* 28(2):151-64.

Christodoulou S, Goula T, Ververidis A, Drosos G (2013) Vitamin D and bone disease. *Biomed Res Int* 2013:396541.

Clarke BL, Khosla S (2010) Physiology of bone loss. *Radiol Clin North Am* 48(3): 483–495.

Covic A, Vervloet M, Massy ZA, Torres PU, Goldsmith D, Brandenburg V, Mazzaferro S, Evenepoel P, Bover J, Apetrii M, Cozzolino M (2017) Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6(4):319-331.

Cowin SC (2001) Mechanics of Materials. In: *Bone Mechanics Handbook*, Cowin SC (Hrg.) 2. Auflage, CRC Press, Florida, 6.1.

Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM (1993) Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 341(8837):72-5.

Cushing, H (1932) The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1:137-195.

Dalen N, Hellström L, Jacobson, B (1976) Bone mineral content and mechanical strength of the femoral neck. *Acta Orthop Scand* 4 (7(5)): 503-8.

Del Fattore A, Cappariello A, Teti A (2007) Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone* 42(1):19-29.

Delgado-Calle J, Bellido T (2017) New insights into the local and systemic functions of sclerostin: Regulation of quiescent bone lining cells and beige adipogenesis in peripheral fat depots. *J Bone Miner Res* 32(5):889-891.

Delling G (1975) Endokrine Osteopathien: Morphologie, Histomorphometrie und Differenzialdiagnose. *Veroff Pathol* (98):1-111.

Donnelly E (2011) Methods for Assessing Bone Quality: A Review. *Clin Orthop Relat Res* 469(8): 2128–2138.

Dörner K (2013) Knochenstoffwechsel. In: *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie*. Dörner K (Hrg.) 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, 546.

Drenckhahn D, Benninghoff A (2008) Knochengewebe. In: Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Drenckhahn D (Hrg.) 17. Auflage, Urban & Fischer, München, 133-148.

Edouard, T, Glorieux FH, Rauch F (2011) Relationship between vitamin D status and bone mineralization, mass, and metabolism in children with osteogenesis imperfecta: histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 26(9):2245-51.

Eller-Vainicher C, Morelli V, Olivieri FM, Palmieri S, Zhukouskaya VV, Cairoli E, Pino R, Naccarato A, Scillitani A, Beck-Peccoz P, Chiodini I (2012) Bone quality, as measured by trabecular bone score in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism. *J Bone Miner Res* 27(10):2223-30.

Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11(4):219-27.

Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS (2015) Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res* 30(5):920-8.

Felsenfeld AJ, Levine BS (2015) Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten?. *Clin Kidney J* 8(2):180-7.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746.

Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ (2004) The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 34(5):783-9.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE (2006) Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235(1):176-90.

Fratzl-Zelman, N, Roschger P, Misof BM, Nawrot-Wawrzyniak K, Pötter-Lang S, Muschitz C, Resch H, Klaushofer K, Zwettler E (2011) Fragility fractures in men with idiopathic osteoporosis are associated with undermineralization of the bone matrix without evidence of increased bone turnover. *Calcif Tissue Int* 88(5):378-87.

Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P (2004) Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 14: 2115–23.

Fratzl, P Roschger P, Fratzl-Zelman N, Paschalis EP, Phipps R, Klaushofer K (2007) Evidence that treatment with risedronate in women with postmenopausal osteoporosis affects bone mineralization and bone volume. *Calcif Tissue Int* 81(2):73-80.

Freyschmidt J (2016) Veränderungen im Knochenstoffwechsel und/oder an der Knochenmatrix. In: *Skeletterkrankungen. Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose*, Freyschmidt J (Hrg.) 4. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 209-231.

Frost HM (1990) Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU):2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 226(4):414-22.

Frost HM (2003) Bone's Mechanostat: A 2003 Update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275(2):1081-101.

Fuchs RK, Allen MR, Ruppel ME, Diab T, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB (2008) In situ examination of the time-course for secondary mineralization of Haversian bone using synchrotron Fourier trans. *Matrix Biol* 27(1):34-41.

Genant H, Engelke K, Prevrhal S (2008) Advanced CT bone imaging in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*. 47(4):9-16.

Geneser F, Schwerdtfeger WK (1990) Knorpel- und Knorpelgewebe. In: *Histologie*, Geneser F (Hrg.) 1. Auflage, Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 216-225.

Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008) Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29(5):535-59.

Gullberg B, Johnell O, Kanis JA (1997) World-wide projections for hip fracture. *Osteoporos Int* 7(5):407-13.

Hadjidakis D, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-96.

Hart A, Cota A, Makhdom A, Harvey EJ (2015) The Role of Vitamin C in Orthopedic Trauma and Bone Health. *Am J Orthop* 44(7):306-11.

Havers C (1691) *Osteologia nova, or some new Observations of the Bones, and the Parts belonging to them, with the manner of their Accretion and Nutrition*. Ann Arbor, MI: University Microfilms International (1691).

Holick M (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3):266-81.

Holtrop ME., Raisz LG, Simmons HA (1974) The effects of parathyroid hormone, colchicine, and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *J Cell Biol* 60(2):346-55.

Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H (2014) Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep* 12(1):115-20.

Jagielska G, Przedlacki J, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Butwicka A, Racicka E, Rowiński O, Brzewski R, Wolańczyk T, Tomaszewicz-Libudziec C, Szymańska U (2017) Bone mineralization and densitometric evaluation of vertebral fractures in women 6-21 years after the onset of anorexia nervosa symptoms. *Psychiatr Pol* 30;51(2):231-246.

Jee WS (2001) Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomie and Physiology in Bone mechanics handbook. In: *Bone Mechanics Handbook*, Cowin SC (Hrg.) 2. Auflage, CRC Press, Florida, 1.25- 1.26.

Jerosch, J, Bader, A, Uhr G (2002) Funktionelle Anatomie des Knochens. In: Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial, Jerosch J (Hrg.) 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, 28.

Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC (2007). Perspective Quantifying Osteoblast and Osteocyte Apoptosis: Challenges and Rewards. *J Bone Miner Res* 22(10):1492-501.

Johnell, O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mellstrom D, Meunier PJ, Melton LJ 3rd, O'Neill T, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A (2005) Predictive Value of BMD for Hip and Other Fractures. *J Bone Miner Res* 20(7):1185-94.

Junqueira C, Carneiro J, Gratzl M (2005) Knochen und Knochenverbindungen. In: Histologie, Gratzl M (Hrg), 6. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 92.

Kallay E (2012) Ein Hormon stellt sich vor: Der Calcium-sensing Rezeptor. *J Clin Endocrinol* 5(4), 28-30.

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N (1994) The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 9(8):1137-41.

Kanis JA, McCloskey EV (1997) Bone turnover and biochemical markers in malignancy. *Cancer* 15;80(8):1538-45.

Kanis, JA (2007) Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, 288.

Kann PH (2004) Growth hormone, bone metabolism and osteoporosis in adulthood. In: Wachstumshormon, Knochenstoffwechsel und Osteoporose beim Erwachsenen. 10. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1390-4.

Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, Sievänen H, Pasanen M, Heinonen A, Oja P, Vuori I (1995) Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* 1;123(1):27-31.

Kim KM, Kim YJ, Choi SH, Lim S, Moon JH, Kim JH, Kim SW, Jang HC, Shin CS (2016) The effects of body mass index on the hereditary influences that determine peak bone mass in mother-daughter pairs. *Osteoporos Int* 27(6), 2057-64.

Kirch W, Middeke M, Rychlik R (2009) Medizinische Versorgung und Prävention In: Aspekte der Prävention. Kirch W (Hrg.), 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, 312.

Khosla S (2001) The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 142(12):5050-5.

Klein-Nulend J, van Oers RF, Bakker AD, Bacabac RG (2015) Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *J Biomech* 18;48(5):855-65.

Koehne T, Marshall RP, Jeschke A, Kahl-Nieke B, Schinke T, Amling M (2013) Osteopetrosis, osteopetrorickets and hypophosphatemic rickets differentially affect dentin and enamel mineralisation. *Bone* 53(1):25-33.

Kurth A, Hovy L, Hennigs T (2013) Densitometrische Methoden zur quantitativen Beurteilung von pathologischen Knochenveränderungen. In: Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen: Tumorosteolysen Osteoporose M. Paget Endoprothetik. Hennigs T (Hrg.), 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 73.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 17;93(2):165-76.

Landry CS, Ruppe MD, Grubbs EG (2011) Vitamin D receptors and parathyroid glands. *Endocr Pract* 17(1):63-8.

Laurent M, Antonio L, Sinnesael M, Dubois V, Gielen E, Classens F, Vanderschueren D (2014) Androgens and estrogens in skeletal sexual dimorphism. *Asian J Androl* 16(2):213-22.

Lippert H (2011) Bewegungsapparat. In: *Lehrbuch der Anatomie*, Lippert H (Hrg.) 6. Auflage, Elsevir, München, 29, 37.

Loveridge N, Power J, Reeve J, Boyde A (2004) Bone mineralization density and femoral neck fragility. *Bone* 35(4):929-41.

Lüllmann-Rauch R, Asan E (2012) Knochen. In: *Histologie*. Lüllmann-Rauch R (Hrg.) 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, 157-163.

Lumachi F, Motta R, Cecchin D, Ave S, Camozzi V, Basso SM, Luisetto G (2011) Calcium metabolism & hypercalcemia in adults. *Curr Med Chem* 18(23):3529-36.

Majeska R (2000) Cell Biologie of bone. In: *Bone Mechanics Handbook*, Cowin SC (Hrg.) 2. Auflage, CRC Press, Florida, 2.11.

Manolagas SC, Parfitt AM (2010) What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab* 21(6):369-74.

Mansuri S, Badawi A, Kayaniyil S, Cole DE, Harris SB, Mamakeesick M, Wolever T, Gittelsohn J, Maguire JL, Connelly PW, Zinman B, Hanley AJ (2016) Traditional foods and 25(OH)D concentrations in a subarctic First Nations community. *Int J Circumpolar Health* 75(1):31956.

Marcu F, Bogdan F, Muşiu G, Lazăr L (2011) The histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol* 52(1):321-5.

Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymant NA, Worthley DL, Rowe DW, Grcevic D, Kalajzic I (2016) Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells* 34(12):2930-2942.

Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S (2013) Regulation of bone resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through protein kinase B-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res* 28(5):1191-202.

Miller P, Siris ES, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, Chen YT, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM (2002) Prediction of Fracture Risk in Postmenopausal White Women With Peripheral Bone Densitometry: Evidence From the National Osteoporosis Risk Assessment. *J Bone Miner Res* 17(12):2222-30.

Milovanovic P, Rakocevic Z, Djonic D, Zivkovic V, Hahn M, Nikolic S, Amling M, Busse B, Djuric M (2014) Nano-structural, compositional and micro-architectural signs of cortical bone fragility at the superolateral femoral neck in elderly hip fracture patients vs. healthy aged controls. *Exp Gerontol* 55:19-28.

Misof BM, Dempster DW, Zhou H, Roschger P, Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Silverberg SJ, Shane E, Cohen A, Stein E, Nickolas TL, Recker RR, Lappe J, Bilezikian JP, Klaushofer K (2014) Relationship of bone mineralization density distribution (BMDD) in cortical and cancellous bone within the iliac crest of healthy premenopausal women. *Calcif Tissue Int* 95(4):332-9.

Moog U, Rieß O (2014) Wachstumsstörungen. In: *Medizinische Genetik für die Praxis*. Moog U (Hrg.), 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, 235.

Nowotny T, Eisenberg W, Mohnike K (2014) Unbegleitete minderjährige Flüchtlinge: Strittiges Alter – strittige Altersdiagnostik. *Dtsch Arztebl* 111(18):786.

Ohlsson C, Vandenput L (2009) The role of estrogens for male bone health. *Eur J Endocrinol* 160:883-889.

Ott SM (2008) Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:151-6.

Parevell PA (1983) Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol* 36(12):1323–1331.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610.

Parfitt AM (2002) Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2(6):499-500.

Peacock M (2010) Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 51:23-30.

Peters KM, König DP (2010) Auffüllung von Knochendefekten mit bioresorbierbaren Implantatmaterialien. In: Fortbildung Osteologie 3. König DP (Hrg.) 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 48.

Priemel M, von Domarus C, Klante TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Püschel K, Amling M (2010) Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res* 25(2):305-12.

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (2011) Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt. In: Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie, Schmidt RF (Hrg.) 31. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 689.

Schulz A, Komak U (2008) Osteopetrose - aktuelle Diagnostik und Therapie. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen*. 15(4):174-182.

Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality-The material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354(21):2250-61.

Sen S, Dasgupta P, Kamath G, Srikanth HS (2017) Parathormone related protein (peptide): A novel prognostic, diagnostic and therapeutic marker in Head & Neck cancer. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 119(1):33-36.

Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V (2012) Nebenschilddrüsen. In: Praxis der Viszeralchirurgie: Endokrine Chirurgie, Siewert JR (Hrg.), 2. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 231.

Simon MJ, Beil FT, Rüter W, Busse B, Koehne T, Steiner M, Pogoda P, Ignatius A, Amling M, Oheim R (2014) High fluoride and low calcium levels in drinking water is associated with low bone mass, reduced bone quality and fragility fractures in sheep. *Osteoporos Int* 25(7):1891-903.

Simonet W, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89(2):309-19.

Shen Y, Jiang T, Wang R, He S, Guo M, Zuo J, He D (2015) (5R)-5-Hydroxytriptolide (LLDT-8) inhibits osteoclastogenesis via RANKL/RANK/OPG signaling pathway. *BMC Complement Altern Med* 24;15:77.

Sirola J, Honkanen R, Kröger H, Jurvelin JS, Mäenpää P, Saarikoski S (2002) Relation of statin use and bone loss: a prospective population-based cohort study in early postmenopausal women. *Osteoporos Int* 13(7):537-41.

Speer C, Gahr M (2013) Endokrinologie und Diabetologie. In: Pädiatrie. Gahr M (Hrg.) 4. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 731.

Stark Z, Savarirayan R (2009) Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 20:4-5.

Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos* 2013;8:137.

Rahn B, Drenckhahn D (1994) Knochenbau. In: Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Drenckhahn D (Hrg.) 15. Auflage, Urban & Fischer, München, 145-159.

Raju R, Balakrishnan L, Nanjappa V, Bhattacharjee M, Getnet D, Muthusamy B, Thomas JK, Sharma J, Rahiman A, Harsha HC, Shankar S, Prasad K, Mohan S, Bader GD, Wani MR, Pandey A (2011) A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. Database 2011;021.

Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K (2008) Zelluläre Kommunikation. In: Duale Reihe Biochemie. Rassow J (Hrg.) 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, 622.

Recker R, Davies KM, Hinders SM, Heaney RP, Stegman MR, Kimmel DB (1992) Bone Gain in Young Adult Women. JAMA 4;268(17):2403-8.

Reeve J, Loveridge N (2014).The fragile elderly hip: Mechanisms associated with age-related loss of strength and toughness. Bone 61(100):138-148.

Rehman M, Hoyland JA, Denton J, Freemont AJ (1994) Age related histomorphometric changes in bone in normal British men and women J Clin Pathol 47(6):529-34.

Reid S, Boyde A (1987) Changes in the mineral density distribution in human bone with age: image analysis using backscattered electrons in the SEM. J Bone Miner Res 2(1):13-22.

Reisinger AG, Pahr HD, Zysset K (2011) Principal stiffness orientation and degree of anisotropy of human osteons based on nanoindentation in three distinct planes. J Mech Behav Biomed Mater 4(8):2113-2127.

Rhee Y, Lee EY, Lezcano V, Ronda AC, Condon KW, Allen MR, Plotkin LI, Bellido T (2013) Resorption controls bone anabolism driven by parathyroid hormone (PTH) receptor signaling in osteocytes. J Biol Chem 11;288(41):29809-20.

Richard HA, Kullmer G (2014) Anpassung des Bewegungsapparats an die mechanische Belastung. In: Biomechanik: Grundlagen und Anwendungen auf den menschlichen Bewegungsapparat. Richard HA (Hrg.) 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 202.

Riminucci M, Remoli C, Robey PG, Bianco P (2015) Stem cells and bone diseases: new tools, new perspective. *Bone*. 70:55-61.

Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K (1998) Validation of Quantitative Backscattered Electron Imaging for the Measurement of Mineral Density Distribution in Human Bone Biopsies. *Bone* 23(4):319-26.

Roschger, P, Gupta HS, Berzlanovich A, Ittner G, Dempster DW, Fratzl P, Cosman F, Parisien M, Lindsay R, Nieves JW, Klaushofer K (2003) Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. *Bone* 32(3):316-23.

Roschger P, Dempster DW, Zhou H, Paschalis EP, Silverberg SJ, Shane E, Bilezikian JP, Klaushofer K (2007) New observations on bone quality in mild primary hyperparathyroidism as determined by quantitative backscattered electron imaging. *J Bone Miner Res* 22(5):717-23.

Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K (2008) Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone* 42(3):456-66.

Roschger P, Misof BM, Klaushofer K (2016) Osteoporosetherapie und Knochenmineralisation. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen* 23(3):94-99.

Talbott S, Kraemer W (2007) The Adrenal Glands. In: The cortisol connection. Talbott S (Hrg.) 2. Auflage, Hunter House, Alameda, 40.

Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K (2007) Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 5(6):464-75.

Teitelbaum S, Zaidi M (2006) Skeletal development. In: Skeletal development and remodeling in health, disease, and aging. Zaidi M (Hrg.) 1. Auflage, Wiley-Blackwell, Bosten, 95.

Thomsen JS, Jensen MV, Niklassen AS, Ebbesen EN, Brüel A (2014) Age-related changes in vertebral and iliac crest 3D bone microstructure-differences and similarities. *Osteoporos Int* 26(1):219-28.

Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS (1997) The Death of Osteocytes via Apoptosis Accompanies Estrogen Withdrawal in Human Bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82(9):3128-35.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113(3):377-81.

van der Eerden A, den Heijer M, Oyen WJ, Hermus AR (2007) Cushing's syndrome and bone mineral density: lowest z scores in young patients. *Neth J Med* 65(4):137-41.

von Heideken J, Svensson T, Iversen M, Ekbohm A, Janarv PM (2014) Femur shaft fracture at a young age and the risk of subsequent severe injuries during childhood: a cohort study. *BMC Pediatr* 3;14:62.

Walsh JS, Vilaca T (2017) Obesity, Type 2 Diabetes and Bone in Adults. *Calcif Tissue Int* 100(5):528-535.

Welsch U, Deller T (2010) Knochengewebe. In: Lehrbuch Histologie. Welsch U (Hrg.) 4. Auflage, Urban & Fischer, München, 108-120.

World Health Organization (2004) WHO Scientific Group on Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level. Summary Meeting Report Brussels.

URL: <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>. [Stand: 30.09.2017, 11:00].

World Health Organization (2006) BMI classification. Global database on body-mass-index. URL: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. [Stand: 09.09.2015, 10:00].

World Health Organization (2014) WHO Definition der Osteoporose. DVO Leitlinie Osteoporose. URL: <http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie.pdf>. [Stand: 01.09.2017, 11:00].

Wolf G (2004) The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 134(6):1299-302.

Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2010) Prostaglandin Promotion of Osteocyte Gap Junction Function through Transcriptional Regulation of Connexin 43 by Glycogen Synthase Kinase 3/Catenin Signaling. *Mol Cell Biol* 30(1):206-19.

Zebaze RM, Jones AC, Pandy MG, Knackstedt MA, Seeman E (2011) Differences in the degree of bone tissue mineralization account for little of the differences in tissue elastic properties. *Bone* 1;48(6):1246-51.

Zimmermann EA, Schaible E, Bale H, Barth HD, Tang SY, Reichert P, Busse B, Alliston T, Ager JW 3rd, Ritchie RO (2011) Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical bone at multiple length scales. *Proc Natl Acad Sci USA* 30;108(35):14416-21.

Zimmermann EA, Busse B, Ritchie RO (2015) The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. *Bonekey Rep.* 2;4:743.

Zustin J, Amling M, Crazzolara R, Butscheidt S, Schulz A, Oheim R (2017) Morphological characteristics of osteopetrosis. *Pathologe* 39(2):164-171.

8. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Amling für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die exzellente Betreuung in der Klinik für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Till Köhne der mich stets mit ausgesprochener Hilfsbereitschaft und Geduld unterstützt und betreut hat. Durch ihn erhielt ich eine fabelhafte Einarbeitung und die umfassende Anleitung in die Geräte und die notwendigen Methoden. Ohne seine konstruktive Kritik und seine zahlreichen Anregungen wäre diese Arbeit nicht entstanden. Weiterer Dank gebührt allen Mitarbeitern des Institutes für Osteologie und Biomechanik in der Lottestraße.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Marlies Küsters und Bernhard Wiese-Küsters ohne die mein Studium sowie diese Dissertation niemals möglich gewesen wären. Außerdem danke ich meinem Freund Christian Commichau, der mir reichlich emotionale und motivierende Unterstützung gab, welche für die Fertigstellung dieser Arbeit von großer Bedeutung war.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Natalie Küsters