

Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Felix Natzschka
geboren am 05.09.1988 in Dippoldiswalde

Betreuer:
Prof. Dr. Karl-Stefan Delank

Gutachter:
Prof. Dr. Karl-Stefan Delank, Halle (Saale)
Prof. Dr. Andreas Roth, Leipzig
Prof. Dr. Philipp Drees, Mainz

Datum der Verteidigung: 03.07.2023

Referat

Das Knochengewebe spielt eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Stütz- und Bewegungsapparates. Dabei ist der Knochen mit seiner materialsparenden Bauweise optimiert für die physiologischen Belastungen. Bei der Osteonekrose kommt es zu einer regionalen Störung des Knochenstoffwechsels, die zu einer Schädigung der Architektur und Stabilität des Gewebes führt. Die mikroskopischen Veränderungen und zellulären Prozesse dieses Krankheitsbildes wurden bereits erforscht und sind in der Literatur beschrieben. Die Auswirkungen auf die extrazelluläre Matrix, Veränderungen der Nanostruktur und die Ursachen der Instabilität, die schließlich zum Kollaps des Knochens führen, sind jedoch weitgehend unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Darstellung der Schädigungen durch die Osteonekrose auf verschiedenen Strukturebenen. Es wurde nach den Mechanismen gesucht, welche die Stabilität des Knochens einschränken. Dazu wurden Femurkopfnekrosen und Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen histologisch aufgearbeitet und mit verschiedenen licht- und elektronenmikroskopischen Verfahren untersucht. Neben typischen histologischen Befunden konnte nachgewiesen werden, dass bei Femurkopfnekrose die Spongiosa in der Nekrosezone morphologisch verändert war. Es kam zu einem vermehrten Auftreten von Mikrorissen und verformten Trabekeloberflächen. Bei der Nachverfolgung der Veränderungen bis in die Nanoebene wurde gezeigt, dass sich die Auflösung der geordneten Struktur bis zu den Grundbausteinen des Knochengewebes fortsetzt. Die wiederkehrenden Muster der Schädigung wurden in der Dissertation näher beschrieben. Insbesondere die natürlichen Strukturgrenzen zwischen Fasern, Lamellen und Osteonen waren bei Osteonekrose kaum noch darstellbar. Dies zeigte auch Auswirkungen auf die mikromechanischen Deformationsmechanismen bei Mikroschäden. Zähigkeitssteigernde Phänomene wie Rissablenkung und -stopp, sowie die Überbrückung der Rissufer durch ungebrochene Elemente traten aufgrund der Degeneration deutlich seltener auf. Die Nanostruktur war durch typische Muster mineralisierter Kollagenfibrillen gekennzeichnet, zeigte sich aber auch häufig ungeordnet. Hervorstechend waren Ansammlungen veränderter Mineralkristalle mit unregelmäßiger Form und der Bildung dichter Agglomerate. Morphologische Messungen von Länge, Breite und Dicke waren nur an normalen Kristallplättchen möglich und es konnten keine Abweichung von Literaturwerten festgestellt werden. Die veränderten, auffällig kleinen Mineralkristalle gingen jedoch wegen fehlender Abgrenzung einzelner Kristalle nicht in die statistische Auswertung ein.

Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, wie sich die Schädigung der extrazellulären Matrix durch die Osteonekrose auf verschiedenen Strukturebenen fortsetzt. Dabei brachte der Vergleich der Nanostruktur von Kiefernekrose und Femurkopfnekrose keine relevanten Unterschiede. Weiterhin wurden Auswirkungen der Destruktion auf mikromechanische Eigenschaften des Knochengewebes nachgewiesen. Damit konnte die Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose leisten.

Natzschka, Felix: Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochen und Knochengewebe	1
1.1.1	Funktionelle Anatomie	1
1.1.2	Knochenstoffwechsel und Mineralisation	2
1.2	Osteonekrose	5
1.2.1	Krankheitsbild	5
1.2.2	Histopathologie	6
1.2.3	Femurkopfnekrose	8
1.2.4	Kiefernekrose	10
1.3	Bruchverhalten von Knochenmaterial	13
1.3.1	Stabilitätsfaktoren	13
1.3.2	Mikromechanische Deformationsmechanismen	15
1.3.3	Rissausbreitung im Knochen	16
2	Zielstellung	19
3	Material und Methodik	20
3.1	Knochenproben	20
3.1.1	Femurköpfe	20
3.1.2	Kieferknochen	20
3.2	Histologische Aufarbeitung	20
3.2.1	Einbettung	20
3.2.2	Herstellung mikroskopischer Präparate	24
3.2.3	Histologische Färbungen	25
3.3	Untersuchungstechniken	26
3.3.1	Lichtmikroskopie	26
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	28
3.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	29
3.3.4	Statistische Auswertung der Kristallmessungen	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Zusammensetzung des Patientenkollektivs	31

4.2	Histopathologie der Knochenproben	31
4.2.1	Makroskopische Beurteilung	32
4.2.2	Histologische Auswertung	33
4.3	Mikromechanische Prozesse und Nanostruktur	35
4.3.1	Mikrorisse im nekrotischen Knochen	36
4.3.2	Elektronenmikroskopische Darstellung der Osteonekrose	40
4.3.3	Morphologie der Hydroxylapatit-Kristalle	44
5	Diskussion	49
5.1	Die Schadensentwicklung bei Osteonekrose	49
5.1.1	Histologische Untersuchungen	50
5.1.2	Mikromechanische Prozesse bei Osteonekrose	52
5.1.3	Elektronenmikroskopische Darstellung der Osteonekrose	55
5.2	Methodik	59
5.2.1	Probenmaterial	59
5.2.2	Präparationstechniken	60
5.2.3	Untersuchungstechniken	61
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	62
6	Zusammenfassung	65
7	Literatur	68
8	Thesen	73
Erklärungen		
Veröffentlichungen		
Danksagung		

Abkürzungsverzeichnis

ARCO	<i>Association Research Circulation Osseous</i> – Internationale Gesellschaft zur Erforschung der Durchblutung des Knochens und assoziierter Erkrankungen
BMU	<i>basic multicellular unit</i> – Grundlegende multizelluläre Einheit
BPO	Dibenzoylperoxid
BRONJ	<i>bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw</i> – Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers
CT	Computertomographie
DBP	Dibutylphthalat
MMA	Methylmethacrylat
MRONJ	<i>medication-related osteonecrosis of the jaw</i> – Medikamenten-assoziierte Osteonekrose des Kiefers
MRT	Magnetresonanztomographie
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

1 Einleitung

Der menschliche Knochen ist in seinem Aufbau überaus komplex und zeigt besondere mechanische Eigenschaften. Er ist damit optimiert auf die physiologischen Belastungen, die auf den Stütz- und Bewegungsapparat einwirken. Dabei folgt die Struktur dem Leichtbauprinzip, wodurch bei Einsparung von Knochensubstanz eine ausreichende Steifigkeit und Festigkeit erreicht wird. Gegenüber synthetischen Materialien bietet das Knochengewebe den Vorteil, dass es sich selbst regenerieren kann, wenn durch die Beanspruchung kritische oder subkritische Schädigungen entstehen.

Die Osteonekrose stellt eine seltene Knochenerkrankung dar, bei der meist Durchblutungsstörungen den natürlichen Stoffwechsel beeinträchtigen. Im Zentrum nekrotischer Läsionen findet keine Regeneration statt, während es in der Peripherie zu teils übermäßigen Reparaturprozessen kommt. Dies führt zur Schädigung der Knochenstruktur und schließlich zum Versagen bei physiologischer Last. Bisher wurden bei der Untersuchung des Krankheitsbildes vornehmlich histologische Veränderungen auf zellulärer Ebene und ihre Auswirkungen auf den Knochen beschrieben. Die genauen Schädigungsmechanismen, die letztlich zur Instabilität der extrazellulären Matrix führen, sind noch weitgehend unbekannt. Intensive Forschung kann zum Verständnis sowohl der strukturellen und mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes, als auch des Pathomechanismus der Osteonekrose beitragen. Im Folgenden werden grundlegende Erkenntnisse der Erforschung des Knochens, der Osteonekrose und des Bruchverhaltens von Knochengewebe beschrieben.

1.1 Knochen und Knochengewebe

1.1.1 Funktionelle Anatomie

Das menschliche Skelett ist mit rund 200 Knochen das Grundgerüst des Bewegungsapparates. Mit seiner Stabilität und Struktur erfüllt es mehrere Funktionen: es bestimmt die Form und Architektonik, überträgt mechanische Kräfte, schützt die Weichteile und dient als Speicherorgan für Calcium und Phosphat [1]. Im übertragenen wie im wörtlichen Sinne bilden die Knochen durch ihre Stützfunktion das Rückgrat des Körpers. Als passive Elemente können sie durch den Zug von Skelettmuskeln und Bindegewebe in ihrer Stellung verändert werden und dienen dabei der Fortbewegung und Stabilisierung. Aktiv passt sich der Knochen nach dem Wolff'schen Gesetz an sich verändernde Anforderungen an, indem die Struktur qualitativ und quantitativ optimiert wird [2, 3].

Neben dem Verbundbau aus Proteinen und Mineralien sind somit die Stoffwechselaktivitäten des Knochengewebes entscheidend für die permanente Stabilität verantwortlich.

Die spezifischen Akteure des Knorpelgewebes sind hierbei Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten, die in ihrem Zusammenspiel die Homöostase des Systems aufrecht erhalten. Die eigentliche Stützfunktion wird jedoch von der durch Volumen und Masse dominierenden extrazellulären Matrix übernommen. Ihre Bausteine sind Calciumhydroxylapatit, Kollagenfibrillen vom Typ I, verschiedene Proteoglykane und Glykoproteine sowie weitere anorganische Ionen [4]. Ihre Strukturierung ist den typischen mechanischen Kräften, die auf den Knochen einwirken, angepasst und wird durch die Knochenzellen bestimmt, die das Material auf- und abbauen können. Hierdurch zeigen sich Vorzugsrichtungen im Knorpelgewebe, die eine Anisotropie der mechanischen Eigenschaften bewirken [2].

Der Aufbau des Knochenmaterials ist von der makroskopischen über die mikroskopische bis zur nanoskopischen Skala überaus komplex. Zur Beschreibung des Knochens haben sich deshalb Einteilungen in **hierarchische Strukturebenen** etabliert. Sie helfen beim Verständnis der mechanischen Eigenschaften, des Knochenstoffwechsels, sowie degenerativer und pathologischer Veränderungen. Gleichzeitig spiegeln sie die Strukturierung der Knochenmatrix durch die spezifischen Knochenzellen wider. Rho et al. (1998) fassen die hierarchisch strukturelle Organisation von der Makrostruktur bis zur Subnanostruktur in fünf Ebenen zusammen. Maßgeblich für dieses Schema sind die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden, die für Studien auf jeder Ebene eingesetzt werden können. Zur Makrostruktur, der ersten Ebene zählen die beiden Grundformen des Knorpelgewebes: die Kompakta und die Spongiosa. Als zweite Ebene wird die Mikrostruktur mit Havers-Systemen und Trabekeln bezeichnet, deren Skala zwischen 10 μm und 500 μm liegt. Gemeinsames Strukturelement sind die Knochenlamellen mit einer Dicke von 3 μm bis 7 μm , welche der Submikrostruktur-Ebene zugeordnet werden. Sie wiederum werden aus Kollagenfasern aufgebaut, die von Mineral durchzogen sind. Diese Ebene zwischen einem Mikrometer und mehreren Hundert Nanometern wird als Nanostruktur bezeichnet. Grundsubstanz und damit die Subnanostrukturebene bilden die Kollagenfibrillen und angelagerte Mineralkristalle, die bis zu einer Auflösung von Zehntel-Nanometern darstellbar sind [5].

1.1.2 Knochenstoffwechsel und Mineralisation

Entscheidend für die Stoffwechselforgänge und Strukturierung des Knochens sind die spezifischen Knochenzellen. Knochenbildner sind die Osteoblasten, die sich von mesenchymalen Stammzellen ableiten und auf den Oberflächen des Knochens zu finden sind. Sie synthetisieren das Kollagengerüst, das schichtweise abgelagert und als Osteoid bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf der Ossifikation steuern sie dessen Mineralisation [1, 6].

Wird auf dem Rücken der Osteoblasten eine neue Schicht aufgebaut, so werden diese eingemauert und differenzieren sich terminal zu Osteozyten. Diese liegen in Lakunen und sind durch lange Zellausläufer zu einem synzytialen Netzwerk verbunden. Die Verbindungskanäle verlaufen in kleinen Knochenkanälchen, die als *Canaliculi* bezeichnet werden, und dienen der erleichterten Diffusion von Nährstoffen, zur Kommunikation und als Mechanosensoren. Signale werden über die Zellausläufer bis zu den außenliegenden Osteoblasten weitergegeben [4]. Die Osteozyten sind so alt wie die umgebende Knochenmatrix und

haben Einfluss auf deren Homöostase. Eine verminderte Osteozytenzahl führt zu einem rapiden Verlust der Knochenstabilität, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch kaum bekannt [7].

Die Gegenspieler der Knochenbildner sind die Osteoklasten, mehrkernige Riesenzellen mit 50 μm bis 100 μm Durchmesser, die auf Abbau und Resorption von mineralisierter Knochenmatrix spezialisiert sind. Sie leiten sich von den monozytären Vorläuferzellen ab, haften an den Knochen und bilden lokalisiert proteolytische Enzyme und Säure. Damit fressen sie Gruben in die Knochenoberfläche, die als Howship-Lakunen bezeichnet werden. Gesteuert werden sie durch Zytokine der Osteoblasten, die wiederum unter dem Einfluss verschiedener Hormone stehen [4].

Die inneren und äußeren Oberflächen des Knochens sind durch Zellschichten ausgekleidet. Innen liegende Flächen werden durch Endost bedeckt, das aus einer kontinuierlichen Schicht von mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Osteoklasten besteht. Sie werden auch als *lining cells* bezeichnet und befinden sich mehrheitlich in einem Ruhezustand. Durch zelluläre, mechanische und hormonelle Signale können sie aktiviert werden. Die äußere Knochenhaut, das Periost, besitzt die gleiche Zellschicht, die jedoch zusätzlich durch eine bindegewebige Schicht überlagert wird. Diese ist reich durchblutet und Ausgangsort für Umbau- und Reparaturmaßnahmen [4, 8].

Die Knochenneubildung erfolgt appositionell an die Knochenoberfläche. So wird die Matrix schichtweise in Form von Lamellen angebaut [4]. Nach der Synthese des Proteins folgt die **Mineralisierung** der Kollagenmatrix mit Calciumhydroxylapatit. Sie wird durch die Osteoblasten gesteuert, die zugrunde liegenden Prozesse sind aber bisher nur in Ansätzen verstanden. Voraussetzung für die Bildung von Calciumhydroxylapatit-Kristallen sind lokal hohe Konzentrationen von Calcium und Phosphat sowie die Bildung von Kristallisationskeimen [4]. Es wird davon ausgegangen, dass Vorstufen und Kristallisationskeime an die *gap zones* der Kollagenfibrillen gebracht werden und die eigentliche Kristallisierung, Reifung und das Kristallwachstum matrixgesteuert verläuft [8–13]. Mahamid et al. (2011) und Nitiputri et al. (2016) konnten dichte Calciumphosphat-Granula von 80 nm Durchmesser mit Carbonat und fibrillären organischen Anteilen in Vesikeln sowie direkt am Kollagen nachweisen. Diese werden als primäre Keimzentren interpretiert, deren Calcium-zu-Phosphat-Verhältnis bei der weiteren Reifung zum Hydroxylapatit steigt [10, 12]. Regulierend für die finale Kristallgröße, Form und Anzahl sind die Makromoleküle der Knochenmatrix [14]. Schlussendlich reift das Mineral an seinem Bestimmungsort zu plattenartigen Kristallen aus [11]. Die Dauer des Mineralisationsprozesses wird für den Lamellenknochen mit bis zu 200 Tagen bis zur Vollendung angegeben [8].

Nach dem Tod können Skelette bei guten Bedingungen über Millionen von Jahren intakt bleiben [7]. Fehlt jedoch die Durchblutung und damit die Versorgung des lebenden Knochengewebes, stirbt der Knochen ab und wird innerhalb von Monaten unter physiologischer Belastung instabil und bricht in sich zusammen. Dies weist darauf hin, dass die Stoffwechselforgänge im Knochengewebe eine entscheidende Bedeutung für die Stabilität und Funktion des Skelettapparates haben. Ohne die ständige Erneuerung der Knochenmatrix wären Toleranzgrenzen der Belastbarkeit nach kurzer Zeit erreicht [8].

Nach dem Wolff'schen Gesetz verändert sich die innere und äußere Architektur des Knochens bei mechanischer Beanspruchung. Dieser Prozess, der vornehmlich im Wachstum und bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielt, wird als *Modeling* bezeichnet. Weitaus häufiger findet die Erneuerung des Knorpelgewebes statt, die als *Remodeling* bekannt ist. Es dient sowohl dem Erhalt der Knochenstärke als auch der Aufrechterhaltung des Mineralhaushalts. Die grundlegenden zellulären Prozesse sind beim *Modeling* und *Remodeling* die gleichen, lediglich die zeitliche und räumliche Koordination unterscheiden sich [2, 3, 14]. Es handelt sich um gekoppelte Prozesse der Knochenresorption und -formation. Beim *Modeling* führt die räumliche Trennung dieser Vorgänge zu einer Veränderung der Architektur des Knochens. Das *Remodeling* ist durch multizelluläre Einheiten gekennzeichnet, die am selben Ort in einer zeitlichen Folge Matrix ab- und wieder aufbauen [2]. Dazu werden Osteoklasten und Osteoblasten in einem Bautrup, der *basic multicellular unit* – Grundlegende multizelluläre Einheit (BMU), organisiert. In kompaktem Knochen fressen zunächst die Osteoklasten eine definierte Resorptionshöhle in das Gewebe, welche die Größe eines zukünftigen Osteons besitzt. In diesen Defekt wächst Bindegewebe mit Nerven und Gefäßen ein und es bildet sich ein Endost mit aktivierten *lining cells*. Die Osteoblasten legen nun in fünf bis zehn Schichten Osteoidlamellen an der Innenwand ab und werden ihrerseits eingemauert. Nach Mineralisierung des Osteoids ist so ein neues Osteon mit Havers-Kanal in der Mitte entstanden. Als äußere Begrenzung eines solchen konzentrischen Lamellensystems bleibt die Kitt-Linie zurück, die bei histologischen Techniken eine erhöhte Anfärbbarkeit aufweist. Eine einzelne Baumaßnahme der BMU dauert mehrere Monate und erfordert ständigen Nachschub von Nährstoffen und Zellen. Deshalb sind die Blutversorgung und der weitere Nährstofftransport über die Zellausläufer der Osteozyten wichtig. In der Spongiosa ist die metabolische Aktivität deutlich höher, aber der zelluläre Ablauf gleich. Zuerst fressen die Osteoklasten Howship-Lakunen in die Trabekeloberfläche, danach wird der Defekt durch Osteoblasten aufgefüllt. Durch den auf eine kleine Fläche begrenzten Umbau ergibt sich das unregelmäßige Lamellenmuster der Spongiosa, in den ebenfalls Kitt-Linien auftreten [4, 7].

Die Wahrscheinlichkeit für ein *Remodeling* der Spongiosa sinkt mit dem Abstand von der Trabekeloberfläche. Bis zu einer Tiefe von 50 μm wird das Gewebe häufig erneuert, ab 75 μm tritt eine Isolation vom Knochenumbau auf [7]. Reguliert wird die Stoffwechselaktivität durch verschiedene Hormone und die lokale mechanische Beanspruchung. Vermutlich dienen die Osteozyten als Mechanosensoren und leiten Signale an die Osteoblasten weiter. Diese werden aktiviert und übernehmen gleichzeitig eine Steuerfunktion und mobilisieren die Osteoklasten, sodass eine Balance zwischen Knochenformation und -resorption entsteht [2, 4, 7]. Belastungsabhängige Mikroschäden am Knochen konnten bereits in vielen Studien nachgewiesen werden. Da diese im Alter nicht zunehmen, müssen sie durch zufälliges oder gezieltes *Remodeling* repariert worden sein. Es wird vermutet, dass Osteozyten Mikrofrakturen im Knorpelgewebe erkennen und dadurch ein gezieltes *Remodeling* hervorrufen. Ob es zu einer wirklich gezielten Reparatur wie beim makroskopischen Bruch oder zu einem regional gesteigerten *Remodeling* durch Aktivierung kommt, konnte bisher nicht geklärt werden [15].

1.2 Osteonekrose

1.2.1 Krankheitsbild

Osteonekrose bezeichnet allgemein das Absterben von Knochengewebe in situ. Sie beinhaltet den Tod aller Zellen im Knochen und Veränderungen in der Knochenmatrix, die letztlich zur Schädigung oder Zerstörung ihrer Architektur führen. Je nach Erscheinungsbild und Ätiologie werden die Knochennekrosen in verschiedene Formen unterteilt. Septische Nekrosen, die als sekundäres Begleitbild der Osteomyelitiden auftreten, werden von posttraumatischen und aseptischen Osteonekrosen abgegrenzt, deren Ursache in mangelnder Versorgung liegt oder idiopathisch ist. Während bei septischen und posttraumatischen Osteonekrosen der Pathomechanismus zumeist klar ist, kann bei aseptischen Nekrosen nur in 80 % der Fälle ein Risikofaktor benannt werden, der wahrscheinlich letztlich zur Erkrankung geführt hat. Als Pathomechanismus werden unterschiedliche Theorien diskutiert, Studien zur Entstehung dieser Krankheit sind jedoch rar [1, 8, 16].

Die meisten Autoren gehen davon aus, dass Zirkulationsstörungen im Knochen zu einer Minderversorgung prädisponierter Areale führen. Gehäuft werden sie bei Thrombophilie, Kollagenosen und Glucocorticoid-Therapie diagnostiziert, aber die Ursachen sind komplex und oft multifaktoriell. Anämische Knocheninfarkte treten nach Frakturen, Embolien, stenosierender Arteriosklerose, bei Vaskulitiden oder iatrogen auf. Sie sind selten, da das Skelett ausgezeichnet durch die *Arteriae nutritiae* versorgt wird [1, 8, 16]. Auch ein erhöhter intraossärer Druck kann durch Störung der Mikrozirkulation eine Rolle bei der Entstehung einer Osteonekrose spielen, dessen Ursache in Stoffwechselstörungen und venösen Okklusionen bestehen kann [8, 16]. Häufige Gelenkergüsse stören die Durchblutung des subchondralen Knochens und führen beispielsweise zu einer Risikoerhöhung für Osteonekrosen am Talus [16]. Andere direkte Schädigungen des Knochengewebes können ebenso zu Knochennekrosen führen. Hierzu zählen Knochenentzündungen, Strahlenschäden und Hormonstörungen [1, 16]. Bekannt ist auch eine Assoziation mit dem Alkoholabusus, der primär oder sekundär den Knochen schädigt [8, 16]. Osteonekrosen finden sich in Bereichen starker Belastung und eine Durchblutungsstörung als häufigste Ursache wird meist nur angenommen, da die klinische Beweisführung umständlich und therapeutisch irrelevant erscheint. Sonderformen sind die aseptischen Epiphysennekrosen, die im Wachstumsalter vorkommen und die Wachstumszonen des Skeletts betreffen. Zu ihnen gehören beispielsweise der Morbus Perthes, Osgood-Schlatter, Köhler und Kienböck. Auch hier wird von einer Störung der Durchblutung in stark belasteten Regionen ausgegangen, die auf hormonelle Veränderungen und Umbauvorgänge zurückzuführen sind [1].

Akamatsu et al. (2012) konnten nachweisen, dass die Osteonekrose der medialen Femurkondyle beim Morbus Ahlbäck mit einer verminderten Knochendichte des gesamten Femurs assoziiert ist. Diese Studie unterstützt eine These, wonach subchondrale Mikrofrakturen für die Pathogenese der Knochennekrosen ebenfalls entscheidend sind [17]. Unabhängig von der Ätiologie verliert das Knochengewebe durch die Noxe seine Fähigkeit sich nach Belastung selbst zu erneuern. Dadurch neigt der Knochen dazu, auch unter normaler

Last zu brechen, was dem Mechanismus einer pathologischen Fraktur entspricht. Dem wirken Reparaturmechanismen entgegen, die im günstigsten Fall zu einer *Restitutio ad integrum* führen. Fehlen diese Prozesse oder sind sie insuffizient, so schreitet die Zerstörung des Knochengewebes fort. Auch überschießende Reparaturprozesse können zum Krankheitsbild beitragen. Im Endstadium kommt es zu einer Ermüdungsfraktur, dem Kollaps des Knochens und bei Gelenkbeteiligung zu einer Desintegration des synovial versorgten Knorpels mit Gelenkdeformierung [8].

Der Verdacht auf eine Osteonekrose kann aufgrund der Vorgeschichte und des klinischen Bildes gestellt werden und zur Ausschlussdiagnostik erfolgt eine Röntgenuntersuchung, in der jedoch nur Spätstadien mit beginnendem Kollaps des Knochens und Frakturierung erkannt werden können. Bei klinischem Verdacht kann die Osteonekrose mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Szintigraphie dargestellt werden. Dabei grenzt sich typischerweise der Nekrosekern durch einen reaktiven und hyperämischen Randsaum ab. Der direkte Nachweis kann aber nur durch eine Biopsie des Knochens und dessen histopathologischer Untersuchung erzielt werden [1, 8].

Aufgrund zu geringer Kenntnisse über die Ätiologie und Pathophysiologie von Osteonekrosen ist eine kausale Therapie derzeit nicht verfügbar [16]. Die Behandlung beginnt deshalb supportiv mit Immobilisierung der betroffenen Skelettregion, Schmerztherapie und Entzündungshemmern. Eine zusätzliche Physiotherapie dient der Entlastung des Knochens. Risikofaktoren, die als Ursache der Erkrankung angenommen werden, sollten nach Möglichkeit therapiert werden. Eine operative Versorgung durch Anbohrung der Nekrosezone zur Dekompression und Förderung der Revaskularisierung zeigt zumeist nur geringe Erfolgsraten. Die Prognose ist insgesamt eher schlecht, weshalb häufig die definitive operative Versorgung mit Arthrodesen sowie Verfahren des Knochen- und Gelenkersatzes unumgänglich sind [8].

1.2.2 Histopathologie

Der Nachweis einer Osteonekrose erfolgt mit histologischen Techniken. Makroskopisch zeigt sich am Knochenpräparat eine intensiv gelbe Zone mit hämorrhagischem Randsaum [18]. Sie entspricht der zentralen Nekrose des Fettmarks und Knochengewebes mit reaktiv-entzündlicher Reaktion im Übergang zum gesundem Bereich, der sich hellgelb mit intakter Trabekeltextur zeigt. Dieser strukturelle Aufbau lässt sich bereits frühzeitig in der MRT als so genanntes *doughnut sign* nachweisen [8]. Im Gelenkbereich kommt es in späteren Stadien zu einer Ablösung des Knorpels zwischen der subchondralen Grenzlamelle und der epiphysären Spongiosa. Sie entsteht durch die Zerstörung des Knochengewebes im nekrotischen Bereich. Der darüber liegende Knorpel wird jedoch durch die Synovia weiter versorgt und bleibt somit intakt [18]. In Röntgenaufnahmen und der Computertomographie (CT) zeigen sich subchondrale Frakturlinien als sichelförmige Aufhellungszone. Dieses Zeichen des beginnenden Kollapses des Knochens ist bei der Femurkopfnekrose als *crescent sign* bekannt [19]. Die Nekrosezone zeigt sich in diesem Stadium grau-gelb und besitzt durch den Zerfall und das reaktive Granulationsgewebe eine körnige Konsistenz [18].

Das histologische Bild kommt je nach Fokus, Ätiologie und Stadium der Osteonekrose unterschiedlich zur Darstellung. Entscheidende Hinweise sind die leeren Osteozytenlakunen und die umgebenden Entzündungsreaktionen des Knochenmarks, die für das Krankheitsbild spezifisch sind [1, 8, 20–22]. Differenzierte Beschreibungen gibt es zu den Stadien der ischämischen Osteonekrosen. Hier sterben zunächst die Zellen mit hohem Stoffwechsel und Energiebedarf, sodass das hämatopoetische Knochenmark verschwindet und es zu einer granulären Nekrose des Fettmarks kommt. Eventuell entstehen Einblutungen in die Markhöhle und etwas später kommt die Zerstörung der Bindegewebsbestandteile mit kompletter Nekrose des Knochenmarks und des trabekulären Knochens dazu [21]. Die *lining cells* und Zellen von Endost sowie Periost sterben ebenfalls und sind nicht mehr darstellbar [20]. Die nekrotische Knochensubstanz zeigt eine verwaschene oder aufgehobene lamelläre Schichtung und in den Osteozytenlakunen fehlen die sonst typischen Zellkerne. Nach Fortschreiten der Zerstörung ist der Markraum mit amorphem basophilen Detritus und gelegentlich dystrophischen Verkalkungen gefüllt [1].

Verändert wird das histologische Bild durch die später einsetzenden Reparaturvorgänge. Diese gehen wiederum zunächst vom Markraum aus, in dem Detritus und verbliebenes Gewebe durch histiozytäre Phagozytose abgeräumt werden [22]. Im Randbereich zeigen sich als Ausdruck der Aktivierung eine Hyperämie und eine medulläre Fibrose mit lockerem kollagenen Bindegewebe und Entzündungszellen. Es wachsen neue Gefäße in das avaskuläre Zentrum der Nekrose und der nekrotische Knochen wird durch Osteoklasten resorbiert oder durch Anbau von neuen Schichten regelrecht ummauert. Diese reaktiven Knochenanbauten sind durch ausgezogene Kitt-Linien abgrenzbar und werden von einigen Autoren als Tafelosteone bezeichnet. Die Trabekel wirken durch den Umbau plump und verbreitert mit unregelmäßigen Begrenzungen. Als Zeichen der aktiven Knochenformation finden sich teilweise verbreiterte Osteoidsäume [1, 8, 21, 22]. In der Phase der Regeneration kommt es häufig zu einer überschießenden Ausbildung des fibrotischen Narbengewebes, was die weiteren Heilungsvorgänge in der Nekrosezone behindert. Voraussetzung für den Umbau ist die Revaskularisierung der Nekrosezone. Weiterhin besteht eine Art Wettlauf zwischen den Reparaturvorgängen und der Degeneration des toten Knochengewebes. Die verminderte mechanische Stabilität des Gewebes führt bei weiterer zyklischer Stresseinwirkung in der Folge zu Mikrofrakturen und schließlich zum Kollaps und Konturverlust des Knochens. Nur selten gelingt nach umfangreichem *Remodeling* eine vollständige *Restitutio ad integrum* [1, 22].

Histopathologische Untersuchungen der Osteonekrose konzentrierten sich bisher hauptsächlich auf die zellulären Strukturen und die Mikrostruktur des erkrankten Knochengewebes. Nur wenige Publikationen beschäftigen sich mit den ultrastrukturellen und molekularen Veränderungen. Chai et al. (1998) konnten durch transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an entkalkten Femurköpfen mit avaskulärer Nekrose zeigen, dass es in gesunden Bereichen regelmäßig angeordnete Kollagenbündel gibt, während die Matrix in nekrotischen Arealen orientierungslos wirkt und die Bündel keine gleichmäßigen Durchmesser aufweisen. Der Hauptfokus der Studie lag jedoch auf den strukturellen Veränderungen der Osteozyten, die in verschiedenen Phasen ihres Lebenszyklus auf Höhe

der Submikro- und Nanostruktur dargestellt wurden [23]. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen stellten die zellulären Veränderungen der Knochenzellen [24] oder der umgebenden Bindegewebe und Blutgefäße [25] in den Fokus. Eine amerikanische Arbeitsgruppe um Aruwajoye et al. (2012) befasste sich umfassend mit den morphologischen und mikromechanischen Veränderungen des Knochens bei Osteonekrose. Sie nutzten ein Ferkel-Modell und induzierten ischämische Femurkopfnnekrosen, um mittels mikroskopischer Techniken und Nanoindentation das geschädigte Gewebe zu charakterisieren. Neben einer signifikant gesteigerten Anzahl von subchondralen Mikrofrakturen und Abweichungen des Nanoindentationsmoduls konnten Veränderungen der Mineralisation nachgewiesen werden [26]. Nachfolgende Untersuchungen setzten sich mit der chemischen Zusammensetzung des Hydroxylapatits auseinander und konnten einen erhöhten Carbonat-Phosphat-Quotienten zeigen [27]. Zu beachten ist hierbei, dass dehydrierter und teilweise eingebetteter Knochen von Tieren verwendet wurde. Pascart et al. (2017) untersuchten ebenfalls die molekulare Ebene des nekrotischen Knochens. Allerdings konnten sie mittels Raman-Spektroskopie an menschlichen Knochenproben keine signifikanten Abweichungen molekularer Parameter in den verschiedenen Zonen der Femurkopfnnekrose finden. Auch der Carbonat-Gehalt im Hydroxylapatit war im Gegensatz zu den Ferkel-Studien nicht verändert. Pathologische Veränderungen fanden sie lediglich auf zellulärer Ebene [28]. Eine weitere Studie von Narayanan et al. (2017) an nativen Femurkopfnnekrosen konnte wiederum mit Hilfe der Micro-Raman-Spektroskopie signifikante Veränderungen der chemischen Mineral-Matrix-Komposition zeigen. Auch hier nahm der Carbonat-Anteil zu und der Mineralgehalt insgesamt ab. Neben weiteren Untersuchungen wurden durch rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen Veränderungen der Wabenstruktur des spongiösen Knochens nachgewiesen werden [29]. Alle Veröffentlichungen zur Histopathologie der Osteonekrose lassen detaillierte Darstellungen der kalzifizierten extrazellulären Matrix von der Submikrostruktur bis zur Nanostruktur vermissen.

1.2.3 Femurkopfnnekrose

Die Osteonekrose trifft meist die Gelenkabschnitte und Metaphysen des Knochens und tritt gehäuft am Femurkopf auf. Zusätzlich werden Knochennekrosen am Humeruskopf und am Talus gefunden [16]. Andere typische Lokalisationen sind beschrieben worden, treten aber deutlich seltener auf. Wegen der hohen Belastung ist vermehrt die untere Extremität betroffen und es wurde beobachtet, dass nahezu immer der Gelenkkopf erkrankt ist und nur sehr selten die Gelenkpfanne [30].

Der Femurkopf ist der mit Abstand am häufigsten betroffene Skelettteil, weil verschiedene Faktoren zu einer Prädisposition für Osteonekrosen führen. Das Gelenk ist vor allem beim Gehen zyklisch sehr starken Druckkräften ausgesetzt, denen Knorpel und Knochengewebe widerstehen müssen. Zu dieser biomechanisch hohen Beanspruchung kommt eine diffizile Anatomie, die zu einer gefährdeten Gefäßversorgung des Knochens führt. Durch die Lage der Blutgefäße um das Gelenk im Bereich der Kapsel und am *Ligamentum capitis femoris* besteht ein hohes Risiko, dass die Perfusion des Femurkopfes bei Luxationen und Schen-

kelhalsfrakturen gestört wird. Je nach Luxations- oder Frakturtyp kommt es mehr oder weniger häufig zu einer mechanischen Unterbrechung oder Zerreißung der Kapselgefäße, die den Hauptteil der Versorgung übernehmen. Durch eine zeitnahe Reposition des Hüftgelenkes kann das Risiko für das Entstehen einer traumatischen Femurkopfnekrose gesenkt werden [22, 31]. Ein großer Anteil der Femurkopfnekrosen entsteht jedoch atraumatisch, wobei davon über 40 % idiopathischer Genese sind. Sehr häufig ist das Krankheitsbild mit dem Alkoholabusus und der Einnahme von Steroiden verbunden, aber der genaue Pathomechanismus konnte bisher nicht geklärt werden. Es scheint auch hier einen Zusammenhang zur Blutversorgung und biomechanischen Belastung zu geben, denn es wurden ebenfalls intraossäre Gefäßveränderungen nachgewiesen [16, 22]. Atraumatische Femurkopfnekrosen können in jedem Alter auftreten, betroffen sind aber vorwiegend männliche Patienten im Alter von 30 bis 60 Jahren [1, 19, 22, 30]. Bei 30 % bis 60 % tritt das Krankheitsbild beidseitig auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesen Fällen systemische oder anlagebedingte Faktoren eine Rolle spielen [16, 19].

Der kraniomediale Anteil des Femurkopfes ist bevorzugt betroffen. Hier entstehen zunächst meist herdförmige Knochenmarksnekrosen, die später konfluieren und einen konisch geformten Osteonekroseherd bilden. Darauf folgen die typischen Veränderungen des Knochengewebes, die bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben wurden [16, 22]. Nur in sehr seltenen Fällen kann es bei kleinen Nekrosearealen zu einer spontanen Ausheilung kommen. Wegen der verminderten mechanischen Stabilität der Nekrosezone steigt unter der zyklischen Stresseinwirkung am Hüftgelenk das Risiko für Mikrofrakturen. In circa 85 % der Fälle ist ein Kollaps des subchondralen Knochens mit einer Desintegration des darüber liegenden Knorpels, was zu einem Konturverlust des Gelenkkopfes innerhalb von Monaten bis wenigen Jahren führt, die Folge. Das wiederum ist der Ausgangspunkt für eine schwere *Arthrosis deformans*, die mit einer rasch progredienten Zerstörung des Gelenkes einhergeht. Der Kopf flacht ab und wird durch Osteophyten, die sich kappenartig über den Schenkelhals wölben, verbreitert. Die Pfanne bleibt demgegenüber meist unbetroffen und der Knorpel noch lange erhalten, sodass die sekundäre Koxarthrose weniger im Vordergrund steht [1, 16, 22, 30].

Um den zeitlichen Verlauf und Schweregrad der Femurkopfnekrosen abzubilden, hat sich im deutschsprachigen Raum die Stadieneinteilung der ARCO-Klassifikation (*Association Research Circulation Osseous* – Internationale Gesellschaft zur Erforschung der Durchblutung des Knochens und assoziierter Erkrankungen (ARCO)) durchgesetzt. Sie hat sich aus der Steinberg-Klassifikation, die im amerikanischen Raum üblich ist, und der älteren französischen Klassifikation nach Ficat und Arlet, die auf histopathologischen Studien beruht, entwickelt. Die ARCO teilt das Krankheitsbild nach der Nachweisbarkeit eines Nekroseareals mit radiologischen Mitteln, Strukturveränderungen der Gelenkkugel, dem betroffenen Femurteil und der Größe der Läsion in fünf Stadien ein. Im Stadium 0 lassen sich ausschließlich histologische Veränderungen nachweisen und es ist nur relevant, wenn die Gegenseite betroffen ist. Beim Stadium I ist bereits eine Nekrosezone nachzuweisen, die Knochenstruktur jedoch noch nicht kompromittiert. Im Gegensatz dazu kann bereits im Stadium II eine subchondrale Veränderung der Knochenstruktur ausgemacht werden,

ohne dass die Kontur des Femurkopfes verändert ist. Erst im Stadium III bricht die Kalotte ein und führt im Stadium IV zu einer deutlichen *Arthrosis deformans* [16, 19].

Durch eine frühzeitige Diagnose kann eine endoprothetische Versorgung in jungen Jahren durch einfachere chirurgische Maßnahmen verhindert oder zumindest hinausgezögert werden [16]. Die Femurkopfnekrose kann auch lange asymptomatisch bleiben, was durch die spätere Diagnosestellung und Therapie zu einer schlechteren Prognose führt [19].

Die Therapie der Femurkopfnekrose orientiert sich an den Stadien der ARCO-Klassifikation. Primär sollten eine Entlastung des betroffenen Hüftgelenks und die Schmerztherapie erfolgen, bis nach der erweiterten Diagnostik eine definitive Versorgung durchgeführt werden kann. Zusätzliche konservative Maßnahmen, wie die experimentelle Gabe von Iloprost, Alendronat, oder eine hyperbare Sauerstofftherapie, stellen keine kurative Therapieoption dar, können aber in niedrigen Stadien supportiv eingesetzt werden [19]. Nach der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie e.V. kann bis zum Stadium III gelenkerhaltend operiert werden. Das Verfahren muss anhand der Ausdehnung der Osteonekrose gewählt werden. Im Stadium I und II mit medialer oder zentraler Nekrose kleiner als 30 % des Kopfes sollte eine Dekompressionsbohrung über den Schenkelhals durchgeführt werden. Ziel hierbei ist es den intraossären Druck zu entlasten und Wege für die Revaskularisierung zu öffnen. In speziellen Zentren kann die Anbohrung mit Knochentransplantationen und gefäßgestielten Plastiken kombiniert und bei strenger Indikationsstellung auch im Stadium III eingesetzt werden. Auch die Umstellungsosteotomie, die zur Änderung des Belastungszentrums und zum Erhalt des Gelenks eingesetzt wird, ist ein hoch anspruchsvoller Eingriff und deshalb keine Routineanwendung. Als Goldstandard der Versorgung der Stadien III und IV gilt der Gelenkersatz mit einer Totalendoprothese. Wichtig bei jeder Therapieform ist die Kontrolle der Gegenseite, die oftmals im Verlauf ebenfalls eine Femurkopfnekrose entwickeln kann [16, 19, 22].

1.2.4 Kiefernekrose

Osteonekrosen des Kiefers traten bis vor einigen Jahren vor allem nach konventioneller Bestrahlung im Gesichtsbereich oder durch Osteomyelitiden bei bakteriellen Infektionen im Mund auf [1]. Im Jahr 2003 wurde erstmals von einer neuen Form der Kiefernekrosen berichtet, die im Zusammenhang mit einer Bisphosphonattherapie auftreten kann: die *bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw* – Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (BRONJ) [32]. Zahlreiche Studien haben sich seitdem mit diesem speziellen Krankheitsbild befasst, das durch ein Areal exponierten Knochens in der maxillofazialen Region definiert ist. Es kommt innerhalb von acht Wochen nach der Entdeckung zu keiner Abheilung der Läsion und zusätzlich muss eine vorherige Bisphosphonatbehandlung vorliegen. Eine Bestrahlung ist ein Ausschlusskriterium für die Diagnose [33, 34]. Eine direkte Beziehung zwischen der Therapie mit Bisphosphonaten und der Kiefernekrose konnte zwar zunächst nicht nachgewiesen werden, jedoch war diese Medikamentengruppe die einzige konstante Variable bei der Erforschung der Ätiologie, sodass ein Zusammenhang zumindest sehr wahrscheinlich ist. Mittlerweile wurde die Definition der Erkrankung erweitert,

da auch andere antiresorptive und antiangiogenetische Medikamente das Krankheitsbild hervorrufen können. Sie wird deshalb als *medication-related osteonecrosis of the jaw* – Medikamenten-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (MRONJ) bezeichnet [32, 33, 35, 36]. Bisphosphonate werden zur Behandlung knochenassoziiierter Komplikationen bei malignen Grunderkrankungen eingesetzt. Sie vermeiden erfolgreich durch ossäre Metastasen bedingte Hypercalcämien, Knochenschmerzen, pathologische Frakturen und Spinalkanalstenosen und steigern damit die Lebensqualität der Krebspatienten. Ein weiteres Anwendungsgebiet sind Knochenstoffwechselstörungen wie der Morbus Paget und die Osteoporose. Bisphosphonate greifen regulierend in die Calciumhomöostase ein, indem sie die osteoklastische Resorption inhibieren. Dadurch können die Knochendichte gesteigert und nachweislich das Frakturrisiko und das Metastasenwachstum im Knochen gesenkt werden [33, 34, 37].

Der Eingriff in den Knochenstoffwechsel bringt mit sich, dass auch die Frakturheilung und das *Remodeling* gestört werden können. Bei einer Langzeitanwendung von Alendronat konnten eine verzögerte Frakturheilung und verminderter Knochenanbau nachgewiesen werden. Es zeigten sich eine gesteigerte Mineralisierung des Kallus und eine gute mechanische Belastbarkeit, aber das anschließende *Remodeling* verlief deutlich langsamer [38].

Als weitere unerwünschte Wirkung der Bisphosphonate kommen die Kiefernekrosen hinzu. Das klinische Bild gleicht der Osteomyelitis und der Osteoradionekrose des Kiefers. Typische Symptome sind orale Schmerzen mit Schwellung des Weichgewebes, Fisteln und Ulzerationen mit freiliegendem Knochen. Es kommt häufig zu einer bakteriellen Superinfektion und damit zu eitriger Sekretion. Klinisch sind die Krankheitsbilder nur durch die unterschiedliche Vorgeschichte zu unterscheiden, dennoch sind die üblichen konservativen und operativen Therapiestrategien in diesem Fall nicht erfolgreich. Die BRONJ spricht nur schlecht auf Antibiotika, hyperbare Oxygenation und chirurgisches Debridement an. Sie tritt im Gegensatz zur Osteoradionekrose und Osteomyelitis, die zumeist auf die Mandibula beschränkt sind, ebenfalls in der Maxilla auf [20, 33, 34, 38, 39].

In den meisten Fällen gehen der Kiefernekrose Zahnextraktionen oder andere kieferchirurgische Eingriffe voraus. Die Inzidenz liegt bei einer Kombination von Bisphosphonatbehandlung und Zahnextraktion bei 1 % bis 18 % [32–34, 38, 39]. Zur Pathogenese hat bereits Marx (2003) als Erstbeschreiber mehrere Theorien formuliert. Zum einen geht er von einer Störung des *Remodelings* durch die fehlende osteoklastäre Funktion aus, weshalb die natürliche Erneuerung der Knochenmatrix fehlt und Mikrofrakturen akkumulieren. Zum anderen ist der Kieferknochen prädisponiert, weil er in besonderem Maße der Umwelt exponiert ist. Es besteht eine direkte Verbindung zu den Zähnen, die sehr häufig von entzündlichen Geschehen betroffen sind. Zusätzlich erfolgt die Abgrenzung des Knochens zum Mundraum nur durch eine dünne Mucosa [32]. Weitere anatomische Faktoren sind der hohe Knochenstoffwechsel im Bereich des Kiefers bei vulnerabler Durchblutung, insbesondere der Mandibula [38]. Bisphosphonate führen am häufigsten zur MRONJ, was auf ihre antiresorptive und antiangiogenetische Wirkung zurückzuführen ist [36]. Durch den hohen Knochenstoffwechsel am Kieferknochen akkumulieren Bisphosphonate im Kiefer. Hierdurch kann es zu einer Übersuppression und einem toxischen Effekt auf die Osteozyten kommen [37]. Konstante Mikrotraumen durch die Kaubewegungen führen in der Folge

zu einer Anhäufung von Mikrorissen, die nicht durch das *Remodeling* repariert werden können [39]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass bei Bisphosphonattherapie die Zahl der Mikrorisse deutlich zunimmt und auch ohne freiliegendem Knochen Osteonekrosen des Kieferknochens bestehen [40, 41].

Über den letztlichen Auslöser einer symptomatischen Kiefernekrose gibt es wiederum mehrere Theorien. Einige Autoren gehen davon aus, dass das Krankheitsbild durch eine Schädigung der Mucosa initiiert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch den niedrigen pH-Wert bei entzündlichen Reaktionen, zum Beispiel nach zahnchirurgischen Eingriffen, Bisphosphonate lokal akkumulieren und einen direkten toxischen Effekt auf das Epithel haben können. Dies führt zu einer offenen Wunde mit schlechter Heilung und Freilegung der Knochenoberfläche [34]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass bei Langzeitbehandlung mit Bisphosphonaten Integrine und Transmembranproteine in der Mucosa signifikant abnehmen, sodass die Zell-Zell-Adhäsion gestört ist und damit Nekrosen entstehen können [37]. Erleichtert durch vorbestehende Mikrorisse und ohne die immunologische Barriere können nun Bakterien der Mundflora den Knochen infiltrieren und durch Toxine zu einer Schädigung der Osteozyten und damit zu Osteonekrose führen. Andere Autoren gehen von einer Vorschädigung des Kieferknochens durch die Bisphosphonate mit lokalen Osteonekrosen aus. Durch eine Zahnextraktion oder Bagatelltraumen der oralen Mucosa wird der tote Knochen freigelegt und sekundär infiziert. Erst dann entsteht durch eine Wundheilungsstörung die symptomatische Kiefernekrose [33, 34, 39]. Durch die Wirkung der Bisphosphonate kann es nun zu einem *Circulus vitiosus* kommen: die bakterielle Infiltration und Störung der Integrität der Mucosa führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, diese steigert den örtlichen Knochenstoffwechsel und senkt den pH-Wert, wodurch sich bei Hemmung der Osteoklasten nur ein Knochenanbau vollzieht und die Bisphosphonate stärker akkumulieren. Immunzellen können ohne Hilfe der Osteoklasten nicht zum Entzündungsfokus gelangen, sodass die Bakterien weiter ungehindert wirken können. Die Imbalance des Knochenstoffwechsels führt zu einem Osteosklerosesaum, der den Zugang für Immunzellen weiter erschwert [33]. Für eine Beteiligung von Bakterien an der Pathogenese spricht die durch Studien belegte Beobachtung, dass eine verbesserte Zahnhygiene das Risiko der Entstehung der BRONJ deutlich verringern kann [33, 38]. Zusätzlich besteht unter der medikamentösen Therapie maligner Grunderkrankungen eine Immunsuppression, die ebenfalls ein erhöhtes Infektionsrisiko und eine verzögerte Wundheilung mit sich bringen [34, 38].

Histologisch haben sich nur wenige Unterschiede zwischen Osteomyelitis, Osteoradionekrose und BRONJ gezeigt. Gemein ist ihnen die zentrale Osteonekrose, die wie in anderen Regionen des Körpers durch leere Osteozytenlakunen, Zerstörung der Knochenmatrix und nekrotisches Markraumgewebe gekennzeichnet ist. Hinzu kommt eine periphere Entzündungsreaktion mit einer Vielzahl von Entzündungszellen, die vor allem bei der Osteomyelitis im Vordergrund steht. Oft lassen sich Mikroorganismen direkt nachweisen, am häufigsten sind dabei Actinomyceten beteiligt. Als Besonderheit der BRONJ sind keine Entzündungszellen zentral im Knochenmarkraum zu finden und die vorhandenen Howship-Lakunen sind leer. Osteoklasten kommen vor allem peripher vor und stellen sich inaktiv

ohne Knochenkontakt dar. Der Knochenstoffwechsel ist reaktiv gesteigert, was sich in massivem Knochenanbau um die Nekrosezone zeigt. Mikroorganismen zeigen sich nur an der Knochenoberfläche und es kommt zu fokalen Abszedierungen [20, 35, 39]. Aghaloo et al. (2011) konnten im Rattenexperiment unter kontrollierten Bedingungen mit Zahnligaturen und Bisphosphonatbehandlung Kiefernekrosen auslösen und die gleichen histologischen Veränderungen zeigen [33]. Die Klärung der Pathogenese bei BRONJ ist Gegenstand weiterer klinischer und experimenteller Forschung.

1.3 Bruchverhalten von Knochenmaterial

1.3.1 Stabilitätsfaktoren

Die Hauptfunktionen des Knochens sind die Stabilität und Formgebung für den Bewegungsapparat des Körpers, wodurch er vor allem Druck- und Zugkräften widerstehen kann. Bei der evolutionären Optimierung dieser Tragstruktur hat sich eine überaus komplexe Morphologie mit unterschiedlichen Strukturebenen (Kap. 1.1.1) entwickelt, die individuell betrachtet werden müssen. Entscheidend für die Festigkeit und Zähigkeit des Knochens ist die Kombination aus elastischen Kollagenfasern und dem harten Mineral Calciumhydroxylapatit, die durch enge Beziehungen ihre mechanischen Eigenschaften ergänzen. Aus materialwissenschaftlicher Sicht handelt es sich somit um einen Kompositwerkstoff, weshalb die Geometrie der beiden Bestandteile großen Einfluss auf mechanische Kennwerte hat [5, 42, 43].

Die Inhomogenität des Knochengewebes führt zu einer deutlichen Anisotropie der Eigenschaften, die auf eine Auslegung des Gewebes auf uniaxiale Belastung hinweist. Dadurch entstehen Vorzugsrichtungen und man erkennt auf mehreren Ebenen eine morphologische Anpassung der Knochenstruktur an die Hauptkraftlinien. Diese spiegelt sich schon in der makroskopischen Form der Röhrenknochen wider, die für Druckkräfte parallel zur Längsachse ausgelegt sind. Die bei Belastung länglicher Körper zusätzlich auftretenden Biege- und Torsionsspannungen sind im Schaftbereich distal vom Schwerpunkt am größten, weshalb die Röhrenform mit außen liegender Kompakta, die aufgrund ihrer Dichte die größte Festigkeit aufweist, die optimale Bauform darstellt. Die Anordnung der Osteone in der Kortikalis entlang der Längsachse führt zu höchster Belastbarkeit für Druck- und Zugkräfte in axialer Richtung. Durch den zentralen Markraum, der ohne Bedeutung für die Stabilität des Knochens ist, können Gewicht und Material gespart werden. Dies weist darauf hin, dass es sich um natürliche Leichtbaustrukturen handelt, was einen weiteren Aspekt der Optimierung darstellt. Auch an den Knochenenden zeigt sich diese Leichtbauweise durch Verwendung von spongiösem Knochen, in dem die Trabekel entlang der Hauptkraftlinien trajektorieell ausgerichtet sind. In diesem Bereich treten hauptsächlich Druckkräfte auf, die von den Gelenken mit einem vergrößerten Querschnitt auf den Knochen übergeleitet werden. Entsprechend ist die kortikale Deckschicht unter dem Knorpel relativ dünn, dafür wird durch die optimal verteilten Trabekel eine Querschnittszunahme ohne große Massenzunahme ermöglicht. Dämpfende Eigenschaften der schwammartigen

Struktur polstern zusätzlich zum Knorpel bei zumeist stoßartigen Belastungsspitzen im Gelenkbereich. Trotzdem sind Überlastungen bei der häufig wechselnden Beanspruchung oft unvermeidlich, sodass besonders gelenknah Mikroschädigungen des Knochengewebes auftreten. Ein bedeutender Unterschied zu synthetischen Materialien liegt darin, dass der gesunde Knochen seine Struktur an die tatsächliche Belastung anpasst und Schädigungen selbstständig reparieren kann [43–45].

Die grundlegende Baueinheit des Knochens bildet die mineralisierte Kollagenfibrille. Ihre mechanischen Eigenschaften werden durch die Elastizität des Kollagens und die Steifigkeit des Calciumhydroxylapatitkristalls bestimmt. Erst die Vereinigung der beiden Bestandteile macht den Kollagen-Mineral-Nanokomposit rigide und resistent gegen die physiologischen Belastungen. Frühere Studien gingen davon aus, dass der Anteil des Minerals allein die Steifigkeit des Materials bestimmt. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass der organische Anteil und seine Geometrie einen weit größeren Einfluss auf das Material haben, als bisher angenommen wurde. Wichtig für die viskoelastischen Eigenschaften des Kollagens sind zum einen die helicale Wicklung der Proteinketten, zum anderen aber auch viele spontan kondensierende Querverbindungen, die sich zwischen den Helices ausbilden können. Bei Zugbelastung lösen sich zunächst diese Wasserstoffbrückenbindungen, womit ein Großteil der bei schneller Belastung einwirkenden Energie abgeleitet werden kann. Die Reversibilität der Bindungen ermöglicht die Viskoelastizität und Zähigkeit der Kollagenmatrix. Beeinflusst wird sie durch den Wassergehalt des Gewebes, Mutationen der Kollagengene und auch das Alter und somit der Degeneration der Proteinketten. Bei geringerer Feuchtigkeit und bei Alterung nehmen die Querverbindungen zu, woraus eine zunehmende Sprödigkeit resultiert [7, 14, 42, 46].

Die Steifigkeit der Kollagenmatrix wird durch die enge Beziehung mit dem Mineral enorm gesteigert. Die Mineralisierung erfolgt durch Calciumhydroxylapatit-Plättchen, die sich in und um die Kollagenfibrillen anlagern. Ihre Ausrichtung in einer Achse führt zu dem Ursprung der anisotropen Eigenschaften des Knochengewebes, die auch in höheren Strukturebenen durch parallele Anordnungen von Fasern fortgeführt wird. Gegenstand weiterer Forschung ist die Schnittstelle zwischen der organischen und der anorganischen Phase. Es wird davon ausgegangen, dass Gleitbewegungen zwischen den Bestandteilen die Energieabführung um ein Vielfaches erhöhen. Dadurch ist der Mineralanteil der bestimmende Faktor für die mechanischen Eigenschaften des Knochens. Aber auch innerhalb desselben Knochengewebes zeigen sich zum Teil deutliche Mineralisierungsunterschiede mit Stufenbildung zwischen den Osteonen. Diese resultieren aus der Besonderheit, dass nach der primären Mineralisierung der Mineralgehalt des Gewebes mit dem Alter sekundär zunimmt. Bei mikroskopischen Untersuchungen zeigt sich deshalb durch den erhöhten Mineralgehalt der älteren Anteile des Knochengewebes ein Mosaik verschiedener *Remodeling*-Episoden. Der Zuwachs der anorganischen Phase wird hauptsächlich auf eine Dickenzunahme der Kristallplättchen zurückgeführt, die aber zu keiner linearen Zunahme der Steifigkeit des Knochens führt. Sowohl die Hypermineralisierung als auch die Demineralisierung gehen letztlich mit einer gesteigerten Frakturhäufigkeit des Knochens einher. Die Anteile des Komposits sind somit ein Kompromiss aus der Steifigkeit des Minerals und der Zähigkeit

der organischen Matrix, die gemeinsam zu der Festigkeit des Knochens führen [42, 46, 47]. Die strukturelle Inhomogenität des Knochengewebes bewirkt, dass bei mechanischen Tests je nach Probengröße, Entnahmestelle, Belastungsart und Probenausrichtung sehr unterschiedliche mechanische Kennwerte messbar sind. Dieser Effekt wird auf die Geometrie, Vorzugsrichtungen, interfibrilläres Gleiten und den Einfluss der nicht-kollagenen Matrix zurückgeführt. So treten zwischen jeder Strukturebene auch Grenzzonen auf, bei denen eine Überbrückung durch Molekülbindungen oder Fasern nachgewiesen ist oder angenommen wird. Solche Strukturgrenzen zeigen eine lokalisierte Nachgiebigkeit, die bei übermäßiger Belastung zur Fehlerbildung neigen. Die Energieaufnahme bei Deformation dieser Schwachstellen hat den Vorteil, dass die Gesamtstruktur geschützt werden kann, bis die Schädigung durch natürliches *Remodeling* repariert wird [5, 42, 43, 46].

1.3.2 Mikromechanische Deformationsmechanismen

Neben den mechanischen Kennwerten spielen Deformationsmechanismen eine entscheidende Rolle für die Belastbarkeit des Knochens. Durch die Gewichtsoptimierung des Skeletts kommt es auch bei physiologischer Belastung regelhaft zu lokaler Überlastung mit der Bildung von Mikroschäden. Die Ableitung von Kräften mit der Aufnahme von Energie durch plastische Verformung kann hierbei die Zähigkeit des Materials deutlich steigern. Der Vorteil des vitalen Knochengewebes ist, dass durch gezieltes *Modeling* und *Remodeling* Schäden repariert und die Knochenstruktur an veränderte Belastungen angepasst werden können [14, 46, 48].

Mikromechanische Deformationsmechanismen sind detailliert für Kunststoffe beschrieben worden. Die Ähnlichkeit des Knochengewebes zu komplexen Polymerwerkstoffen und Kompositen wurde bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Entsprechend sind auch am Knochen ähnliche mikromechanische Eigenschaften zu erwarten, die durch Testverfahren quantifiziert werden können. Knochen ist ein duktileres Material, das heißt, dass bei Steigerung der Belastung zunächst eine elastisch-reversible Verformung auftritt, bis die Fließgrenze erreicht ist. Ab diesem Punkt treten plastische Verformungen auf, die nicht oder nur teilweise reversibel sind, da die Bestandteile aneinander gleiten, sich voneinander lösen oder brechen. Durch die Inhomogenität der mechanischen Eigenschaften treten Brüche zuerst an Schwachstellen auf. Schließlich kommt es nach dem Überschreiten der Bruchgrenze zum vollständigen Versagen des Materials [45, 49].

Die Einleitung von Rissen findet in Bereichen von Spannungskonzentrationen statt und führt durch Dehnung und Spaltung von Makromolekülen zu lokaler Mikrohohlraumbildung. In der Bruchmechanik wird von einer bereits vorhandenen Fehlstelle ausgegangen, an der die Rissbildung stattfindet. Damit entsteht ein Mikroriss, der sich durch weitere Spannungskonzentration an der Rissspitze ausbreiten kann. In diesen Bereichen kann durch Relaxationsmechanismen zusätzliche Bruchenergie aufgenommen werden, was die vollständige Zerstörung der Probe verzögert. Es kommt je nach Material zur Überbrückung der Rissufer durch Fasern, Verstreckungen der rissnahen Matrix und der Bildung von weiteren Mikrorissen in der unmittelbaren Umgebung der Rissspitze. Bei mikroskopischen

Untersuchungen der Rissumgebung zeigen sich Scherbänder und durch Fibrillierung an der Risspitze das so genannte *Crazing*. Das Fortschreiten und die Morphologie der Deformationsmechanismen hängt stark von der Ausrichtung und Form der Bausteine ab, aus denen der Werkstoff aufgebaut ist. Anisotrope und inhomogene Stoffe haben den Vorteil, dass an Phasengrenzen und Orientierungsänderungen ein fortschreitender Riss abgelenkt werden kann und zumeist dem Weg des geringsten Widerstandes folgt. Damit werden lokale Spannungskonzentrationen abgeleitet und dann durch die Energieaufnahme bei Deformationen ein weiteres Ausbreiten des Bruches verhindert. Ein Riss kann durch Hineinlaufen in eine lokale Festphase, mit Entlastung durch Mikrorisse, Crazes und Rissüberbrückung, sowie durch Rissspitzenverrundung aufgehalten werden. Dadurch wird die Zähigkeit des Materials gesteigert [45, 49].

Durch die Untersuchung der mikromechanischen Deformationsmechanismen bei Risseinleitung, -ausbreitung und -stopp können Fehlerstellen im Material aufgedeckt und indirekte Hinweise zu Veränderungen des Werkstoffes gefunden werden. So können auch die Ursachen, die zu einer verminderten Belastbarkeit des Probenkörpers geführt haben, genauer erforscht werden. Sie zeigen auch, welche Eigenschaften zu einer Verbesserung der Stabilität von Materialien führen können [45, 50].

1.3.3 Rissausbreitung im Knochen

Wie bei den Kunststoffen entstehen Risse im Knochen durch Spannungskonzentrationen und breiten sich unter dem Einfluss von der Krafteinwirkung und den inhomogenen Strukturmerkmalen des Gewebes aus. Sie treten beim Überschreiten der maximalen Last oder durch zyklische Belastung auch unter physiologischer Last als Materialermüdung auf. Für Ermüdungsbrüche, die auch bei Osteonekrose zur Schädigung der Knochenarchitektur führen, ist vor allem die Bildung von Mikrorissen relevant. In der genaueren Betrachtung dieser Schäden finden sich auch typische Deformationsmechanismen, die in Kapitel 1.3.2 beschrieben wurden. Jede Strukturebene (Kap. 1.1.1) hat dabei einen besonderen Einfluss auf die Rissausbreitungs-, -ablenkungs- und -stoppmechanismen, der aus Strukturgrenzen und anisotropen Eigenschaften resultiert [5, 46, 48, 51].

Mikrorisse im Knochen sind definiert durch scharfe Risskanten und eine Größe, die zwischen der Ausdehnung von *Canaliculi* und Gefäßkanälen liegt. Durch spezielle Färbetechniken können sie von Artefakten, die durch die Probenpräparation hervorgerufen wurden, unterschieden werden [52–54]. In experimentellen Anordnungen haben zyklische Überlastungen am Wirbelkörper zuerst Schädigungen in der Spongiosa gezeigt. Die Kortikalis wird bei kompressiver Belastung erst sehr spät in Mitleidenschaft gezogen [55]. Kurzfristig nach zyklischer Kompression von Wirbelkörpern zeigt sich neben einer erhöhten Dichte von Mikrofrakturen auch eine vermehrte Steifigkeit des Knochengewebes, wobei die Bruchenergie in Versagenstests sank [51]. Wird dem Knochengewebe Zeit gegeben durch Stoffwechselaktivitäten Mikrofrakturen von Trabekeln zu reparieren, entsteht ähnlich zur makroskopischen Bruchheilung der langen Röhrenknochen ein Mikrokallus, der die Rissenden überbrückt. Dadurch wird die Stabilität wiederhergestellt und der Knochen kann

durch *Remodeling* die normale Struktur erreichen [56]. Bei Versagensprüfungen isolierter Trabekel und Kortikalis im Biegeversuch zeigte sich, dass der kompakte Knochen eine höhere Festigkeit besitzt. Die Trabekel werden vor dem Bruch signifikant verformt, während die Kortikalis nach zyklischer Belastung spröde bricht. Eine mikroskopische Bruchanalyse hat gezeigt, dass der Knochen bei beiden Knochenarten vor allem entlang der Kitt-Linien und Lamellengrenzen reißt [48].

Weitere Bruchtests und Untersuchungen von Bruchenden sowie Mikrorissen im Knochengewebe konnten einige spezifische Deformationsmechanismen aufdecken. Oberflächenmuster nach Biegebruchtests am Femurschaft weisen auf Ähnlichkeiten zu faserverstärkten synthetischen Kompositen hin. Durch Zug entstanden büstenartige Bruchflächen mit ausgezogenen Fasern und Löchern, die auf einen Ausriss von Fasern hinweisen. Eine streifenförmige Regelmäßigkeit ist Ausdruck der regelmäßigen Anordnung in Lamellen, die auch durch Dehnung im Sinne einer Delaminierung separiert werden [57].

Analysen der Rissverläufe konnten zeigen, wie die Ausbreitung, Ablenkung und der Stopp durch strukturelle Eigenschaften und die mechanische Triebkraft beeinflusst werden. Im Bereich der Mikrostruktur kommt es zu starken Rissablenkungen durch die Osteone, die als Strukturgrenzen dienen (Abb. 1 A). Die Risse neigen selbst bei senkrechtem Auftreffen auf den äußeren Osteonrand dazu, entlang der Längsachse auszulaufen. Der gleiche Effekt ist in der Submikrostruktur an den Lamellengrenzen im Knochengewebe sichtbar. Trifft ein Mikroriss transversal auf eine Lamellengrenze oder eine Kitt-Linie, dann wirkt diese als eine Delaminationsbarriere, sodass es zu starken Rissauslenkungen kommt. Die Lamellenschichten werden leichter voneinander getrennt, als dass sie selbst brechen. Längs zur Lamellenrichtung kann sich eine Riss relativ leicht und ohne Ablenkung interlaminär ausbreiten, da hier nur schwache Bindungen vorherrschen. An dieser Stelle offenbart sich der Effekt der Anisotropie sehr deutlich, da die Bruchausbreitung durch die Ausrichtung der Lamellen oder Osteone stark erschwert wird. Die Rissablenkung an den Strukturgrenzen führt letztlich zum Abbau von Spannungskonzentrationen und erhöht signifikant die Bruchzähigkeit. Zusätzlich wird der Mikroriss durch überbrückende Filamente (Abb. 1 B) verschiedener Stärke, so genannte *uncracked ligaments* stabilisiert, die noch nicht gebrochen wurden. Es handelt sich um Faserbündel, Fasern und Fibrillen der Nanostruktur, deren Ausrichtung quer oder spitzwinkelig zur Rissausbreitungsrichtung liegt. Sie entstehen unter anderem dadurch, dass Spannungen vor der Risspitze bereits Vorrisse (Abb. 1 C) erzeugen, die sich bei weiterer Spannung vereinigen können. Klehm et al. (2016) konnten feststellen, dass es an der Risspitze zu crazeartigen Deformationen kommt, bei denen eine Überbrückung durch mineralisierte Kollagenfibrillen mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm stattfindet [2, 46, 50].

Bei Betrachtung der nanoskopischen Strukturebenen zeigt sich, dass die mineralisierten Kollagenfibrillen zum einen durch Verdrillen und Anordnung in Arrays fest miteinander verwoben sind. Zum anderen werden die Fibrillen durch eine nicht-kollagene Matrix verbunden, die einer Separation der Fasern und Fibrillen entgegenwirkt. Bei Belastung kommt es zu Zugkräften entlang der Fibrillen und Scherkräften auf die teilweise mineralisierte Matrix, die duktil und sukzessive brechen kann. Launey et al. (2010) gehen davon aus, dass so

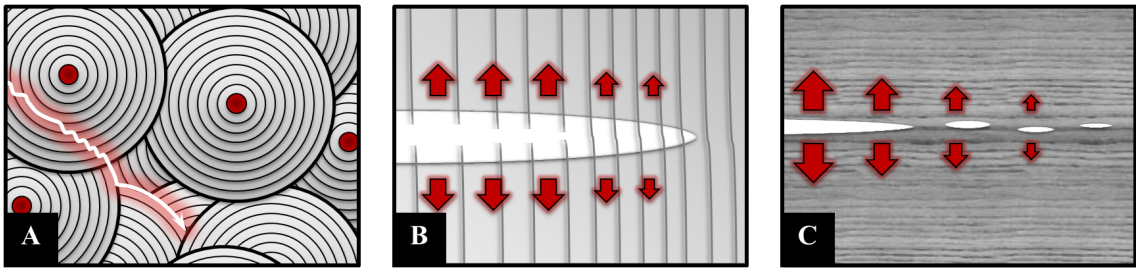


Abbildung 1: Mikromechanische Mechanismen am Knochen:

A Vorrisse; **B** Rissüberbrückung durch ungebrochene Filamente; **C** Rissablenkung und -stopp an Strukturgrenzen

genannte Opferbindungen zwischen dem Kollagen und der Matrix existieren, die bei Deformation reversibel brechen und damit zu einer erhöhten Zähigkeit führen. Sie beschreiben die interfibrillären Moleküle als eine Art Kittsubstanz, in der Proteine und Proteoglykane nachgewiesen wurden. Die mineralisierte Kollagenfibrille steigert ihre Zähigkeit bei Zugbelastung nach theoretischen Modellen durch kontinuierliche Gleitmechanismen zwischen der Protein- und der Mineralphase. Der Vergleich von Gewebeproben mit steigendem Mineralgehalt hat im Zugtest eine Vervielfachung des Elastizitätsmoduls gezeigt. In den Kollagenmolekülen selbst entstehen plastische Deformationen durch irreversibles intermolekulares Gleiten, bei der die Querverbindungen zwischen den Tropokollagenen reißen und es zu einer Dehnung und Entwindung der Helices kommt. Wegen der engen räumlichen Beziehung der Proteinketten können sich die Wasserstoffbrückenbindungen spontan neu bilden [46].

Durch die Deformationsmechanismen entstehen typische makroskopische und mikroskopische Rissmuster im Knochen. Mit jedem Strukturlevel steigt die Zähigkeit durch gleichzeitige Erhöhung der Fehler- und Bruchgrößentoleranz und die Begrenzung der Rissausbreitung zwischen den Strukturgrenzen. Abweichungen von der bekannten Rissform könnten einen Hinweis auf pathologische Veränderungen des Knochengewebes geben und bruchgefährdete Materialstellen anzeigen. Sowohl die Versprödung der Kollagenmatrix durch Hypermineralisierung als auch eine Osteomalazie, die durch Demineralisierung entsteht, führen zu einer generell verminderten Bruchresistenz. Durch Erforschung der mikromechanischen Deformationsmechanismen kann lokalisiert sprödes oder viskoelastisches Verhalten, das zur Entstehung von Knochenschädigungen beiträgt, erkannt werden [14, 42, 44, 48, 58].

2 Zielstellung

Die Hauptfunktion des Knochengewebes liegt in der Bildung eines stabilen Grundgerüsts für den Bewegungsapparat. Bei dem Krankheitsbild der Osteonekrose geht diese Stabilität verloren, die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher unklar. Bisherige Forschungen konzentrierten sich auf die zellulären Veränderungen und nachfolgende Umbauprozesse. Ziel dieser Arbeit ist es, die Prozesse der Schadensentwicklung in der Knochenmatrix bei Osteonekrose genauer zu untersuchen.

Zur Erforschung der Ursachen von Materialversagen dienen Betrachtungen der Materialeigenschaften und die Analyse mikromechanischer Mechanismen. Der Aufbau des Knochengewebes ist durch die verschiedenen Strukturebenen überaus komplex, sodass die Untersuchungen auf mehreren Ebenen erfolgen müssen. Für gesunden Knochen konnte gezeigt werden, dass inhomogene Strukturmerkmale Rissablenkungs- und -stoppmechanismen begünstigen und damit dem Ermüdungsbruch entgegen wirken [2, 46]. Aus bisherigen Arbeiten ist bekannt, dass sich bei Osteonekrose die Strukturgrenzen auf der Mikrostrukturebene auflösen und es zu einer Degeneration der geordneten extrazellulären Matrix kommt. Es wird postuliert, dass durch die fortwährende Belastung des Materials bei insuffizientem *Remodeling* Mikroschäden akkumulieren, die schließlich zu einer Ermüdungsfraktur führen [8, 22]. Eine zugrundeliegende Schädigung der mineralisierten Kollagenfibrillen ist anzunehmen. Bisher gibt es keine Veröffentlichungen, welche die Nanostruktur des geschädigten Knochens und Deformationsmechanismen bei Osteonekrose beschreiben.

Die vorliegende Arbeit soll die Osteonekrose von der Makro- bis zur Subnanostruktur darstellen und durch Betrachtung histomorphologischer Veränderungen Ursachen für den Stabilitätsverlust des Materials beleuchten. Die folgenden Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Setzt sich die Auflösung der geordneten Struktur des Knochengewebes bei Osteonekrose in niedrigeren Strukturebenen fort?
- Wie stellen sich die mikromechanischen Deformationsmechanismen bei Osteonekrose dar?
- Welche morphologischen Veränderungen finden sich auf Höhe der Nano- und Subnanostruktur?

Zur Verifikation der zuvor genannten Thesen werden in dieser Arbeit Knochenproben von Femurkopfnekrosen und Kiefernekrosen histologisch aufgearbeitet und danach morphologischen Untersuchungen zugeführt. Die Studie wird im Rahmen des DFG-Förderprojektes Br1348/7-1 angefertigt, welches mit dem Votum der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Aktenzeichen 220/16.06.10/9, genehmigt wurde.

3 Material und Methodik

3.1 Knochenproben

3.1.1 Femurköpfe

Zur Untersuchung der Femurkopfnekrose dienten resezierte Femurköpfe von Patienten des Departments für Orthopädie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale). Das Patientenkollektiv umfasste 14 Patienten, die sich im Zeitraum zwischen August 2011 und Juni 2015 einer endoprothetischen Operation des Hüftgelenks unterzogen haben. Die Diagnose und Indikation, sowie weitere Patientendaten sind in Tabelle 1 dargestellt. Der bei diesem Eingriff routinemäßig entfernte Femurkopf wurde direkt im Anschluss der Operation bis zur weiteren Bearbeitung in einem Tiefkühlschrank bei -75°C gelagert. Insgesamt standen 15 Femurköpfe für die Untersuchungen zur Verfügung, wobei ein Patient aufgrund einer beidseitigen Femurkopfnekrose operiert wurde.

3.1.2 Kieferknochen

Für vergleichende Studien an Kieferknochen wurden von der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Georg-August-Universität) resezierte Kiefernekrosen zur Verfügung gestellt, die im Zeitraum zwischen Dezember 2012 und September 2014 operiert worden sind. Diese wurden nach der Resektion in einer 4%igen Formalinlösung gelagert und mit dazugehörigen Patientendaten an das Labor für Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Halle (Saale) verschickt. Insgesamt standen Proben von vier Patienten zur Verfügung, die Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

3.2 Histologische Aufarbeitung

3.2.1 Einbettung

Für die Konservierung und Stabilisierung der Knochenproben wurde die Einbettung in Kunstharz gewählt. Durch die dem Knochen ähnliche Härte bietet dieses Verfahren den Vorteil, dass bei der nachfolgenden Hartschnitt- oder Hartschlifftechnik sowohl anorganische als auch Weichgewebeanteile gleichermaßen erhalten bleiben. Es war somit keine Entkalkung des Gewebes notwendig, wodurch das Gewebe im nahezu natürlichen Zustand untersucht werden konnte. Zusätzlich zeigen Hartschnitt- und Hartschlifftechniken eine bessere Auflösbarkeit der Strukturen und Morphologie, weniger Schrumpfungartefakte und glattere Schnittflächen als bei der üblichen Paraffin-Einbettung. Für die nachfolgende

Tabelle 1: Patientenkollektiv Femurköpfe

SN	Pat.	Diagnose	Lok.	OP-Indikation	Probe
1	♀, 87	mediale Schenkelhalsfraktur und Femurkopfnekrose	L	V	HK3N
2	♂, 58	Koxarthrose mit Femurkopfnekrose	R	S, M	HK5N
3	♀, 53	Koxarthrose °IV bei Femurkopfnekrose	R	S, M	HK6N
4	♀, 79	Femurkopfnekrose	R	ARCO IV, S	HK7N
5	♀, 79	avaskuläre Femurkopfnekrose, Knochenmarkinfarkt proximales Femur	L	ARCO IV, S, M	HK8N
6 *	♂, 45	Femurkopfnekrose, Zustand nach Anbohrung links 2014	B	ARCO IV, S, M	HK9N, HK16N
7	♀, 79	avaskuläre Femurkopfnekrose	R	ARCO IV, S, M	HK11N
8	♂, 39	Femurkopfnekrose, Zustand nach Anbohrung 2009	R	ARCO IV, S, M	HK12N
9	♂, 44	Femurkopfnekrose	R	ARCO IV, S, M	HK13N
10	♀, 71	Femurkopfnekrose mit kranialer Luxation und Acetabulumdestruktion	L	ARCO IV, S, M	HK14N
11	♂, 71	Koxarthrose °IV bei Femurkopfnekrose	L	ARCO IV, S, M	HK15N
12	♀, 50	Femurkopfnekrose bei Hüftdysplasie, Zustand nach Anbohrung 2011	L	S, M	HK23
13	♂, 42	Femurkopfnekrose, Zustand nach gefäßgestielter Fibulaplastik 1994	R	ARCO IV, S, M	HK26
14	♀, 71	Koxarthrose bei Femurkopfnekrose	L	S, M	HK27

Anmerkungen:

- SN : Spendernummer
 * : zweizeitige Operation im Abstand von vier Monaten (zuerst rechts)
 Pat. : Patient (Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt des Eingriffs [Jahre])
 Lok. : Lokalisation (R – rechts, L – links, B – beidseitig)
 OP-Indikation : nach Leitlinie [19, 59, 60]
 V : altersentsprechendes und reduziertes Leistungsvermögen
 S : ausgeschöpfte konservative Therapie, Ruhe-, Anlauf- und Belastungsschmerz
 M : eingeschränkte Gehstrecke, Hinken und Bewegungseinschränkungen
 ARCO IV : Stadium der Femurkopfnekrose

Tabelle 2: Patientenkollektiv Kieferknochen

SN	Pat.	Diagnose	Lokalisation	Bisphosphonate	Probe
15	♂, 76	Prostatakarzinom	Unterkiefer R	2006 bis 2010 hochdosierte intravenöse Therapie	KN-1
16	♂, 72	Plasmozytom	Unterkiefer L	bis 2010 hochdosierte Therapie	KN-2
17	♂, 57	Prostatakarzinom	Unterkiefer R	2012 neun Monate Therapie	KN-3
18	♀, 73	Mammakarzinom	Oberkiefer L	2010 bis 2013 intravenöse Therapie	KN-4a, KN-4b

Anmerkungen:

- SN : Spendernummer
 Pat. : Patient (Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt des Eingriffs [Jahre])
 Lokalisation : Lokalisation der Kiefernekrose (R – rechts, L – links)
 Bisphosphonate : vorangegangene Behandlung

Ultradünnschnitt-Herstellung und elektronenmikroskopische Untersuchung war die Entwässerung und Kunststoffeinfbettung unumgänglich. Wichtige Arbeitsschritte waren hierbei die Fixierung, Entwässerung, Kunststoff-Infiltration und Polymerisation [61, 62].

Zur Kunststoff-Einfbettung wurden Systeme auf Methylmethacrylat (MMA)-Basis ausgewählt, da sie eine hohe Härte und Elektronenstrahl-Beständigkeit aufweisen. Gleichzeitig sind diese Acrylate leicht zu entplasten und der Kunststoff kann durch Zusätze erweicht werden. Gegenüber den Epoxidharzen weisen sie den Vorteil auf, dass fluoreszenzmikroskopische Techniken anwendbar sind. Das Präparat wurde mit niedermolekularem MMA infiltriert und der Polymerisationsprozess durch einen Initiator ausgelöst. Die Reaktion verläuft exotherm und musste deshalb unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Mit dem Einbettungssystem Technovit® 9100 konnte das Untersuchungsspektrum durch die Möglichkeit des Aushärtens bei Kälte um enzymhistochemische Reaktionen erweitert werden [61, 62].

Nach Erhalt der **Femurköpfe** im gefrorenen Zustand wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgte eine eingehende makroskopische Inspektion und Fotodokumentation. Für das gleichmäßige Durchdringen mit dem Einbettmittel war die Parzellierung der Knochenproben in kleinere Einheiten notwendig (Abb. 2). Dazu wurden entweder auf der Sägefläche der intraoperativen Resektion, oder einer ebenfalls sagittalen Hilfsschnittfläche am medialen Femurkopf Markierungen aufgetragen. Das Präparat wurde in acht keilförmige Segmente unterteilt. Die Segmentbezeichnung erfolgte im Uhrzeigersinn von A bis H, um eine spätere räumliche Zuordnung der Segmente zu ermöglichen. Im Anschluss wurde der Femurkopf mit Hilfe der Diamantbandsäge zersägt und die Schnittflächen auf pathologische Veränderungen untersucht. Die acht Segmente wurden einzeln in Proben-tüten verpackt und für die weiteren Infiltrationsschritte in ein gemeinsames Sammelgefäß gegeben.

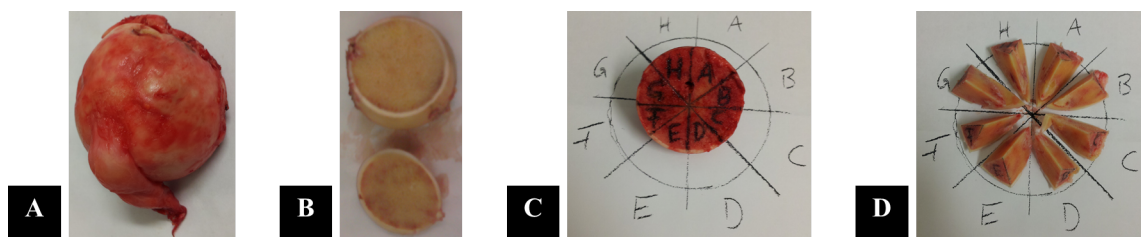


Abbildung 2: Segmentierung der Femurköpfe:

A Femurkopf vor der Bearbeitung; **B** sagittaler Hilfsschnitt; **C** Markierungen auf der Knochenfläche; **D** Trennung in acht keilförmige Segmente

Die Fixierung erfolgte mit einer 2%igen Formaldehyd-Lösung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS), welche frisch aus kristallinem Paraformaldehyd hergestellt wurde. Überschüssiges Formaldehyd wurde anschließend mit 6,8%iger Saccharose-Lösung in PBS neutralisiert. Es folgte eine Entwässerung in Ethanollösungen mit aufsteigender Konzentration und als Intermedium wurden Xylole verwendet. Zwischen jedem Fixierschritt verblieb der Sammelbehälter bei Raumtemperatur auf dem Universal-schüttler. Verweildauern und Fixierschritte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Nach den Fixierschritten erfolgte die erste Infiltration der Knochenproben mit dem Mo-

nomer MMA. Um den Knochen gleichmäßig zu durchdringen, wurde der Sammelbehälter für 10 min im Vakuum Infiltrator bei 150 mbar inkubiert. Für vier bis fünf Tage verblieb der Sammelbehälter bei Raumtemperatur auf dem Universalschüttler. Die zweite Infiltration wurde mit einer Mischung von MMA mit Dibutylphthalat (DBP) als Weichmacher im Verhältnis 90:10 unter Zugabe von 10 g/l Dibenzoylperoxid (BPO) als Initiator durchgeführt. Nach zehnmütiger Inkubation im Vakuum wurde der Sammelbehälter bei 8 °C für vier bis fünf Tage gekühlt, um eine vorzeitige Polymerisation des Kunststoffes zu verhindern. Danach wurden die Knochensegmente in einzelne Einbettgefäße gegeben. Das Einbettmedium bestand aus der Mischung von MMA mit DBP im Verhältnis 90:10 mit zusätzlich 30 g/l BPO. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min im Vakuum. Um eine kontrollierte Polymerisation des Kunststoffes zu Polymethylmethacrylat (PMMA) zu erreichen, wurden die Einbettgefäße in einem Wasserbad bei 27 °C temperiert. Der Kunststoff härtete innerhalb von circa zehn Tagen aus. Die fertigen Proben wurden in Anlehnung an die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath 1989 (siehe Kap. 3.2.2) bearbeitet [63].

Tabelle 3: Fixierung der Knochenproben

#	Chemikalie	Verweildauer	Zweck
Fixierung von Femurköpfen			
1	2%iges Formaldehyd in PBS	48 h	Denaturierung
2	6,8%ige Saccharose in PBS	48 h	Neutralisierung
3	70%ige Ethanol-Lösung	je 48 h bis 72 h	Entwässerung
4/5	80%ige Ethanol-Lösung		
6/7	96%ige Ethanol-Lösung		
8/9/10	Ethanol (absolut)		
11/12	Xylole	48 h	Intermedium
Fixierung von Kiefernekrosen			
1	70%ige Ethanol-Lösung	je 2 h bis 4 h	Entwässerung
2/3	80%ige Ethanol-Lösung		
4/5	96%ige Ethanol-Lösung		
6/7/8	Ethanol (absolut)		
9/10	Xylole	2 h bis 3 h	Intermedium

Zur Erweiterung des Untersuchungsspektrums um enzymhistochemische Techniken für nachfolgende Studien wurde zur Einbettung das Polymerisationssystem Technovit® 9100 gewählt. Die Polymerisation des MMA erfolgte unter Sauerstoffausschluss mit einem Katalysatorsystem aus Peroxid und Amin. Durch die Verwendung von PMMA-Pulver und Regler konnte die Reaktion gesteuert bei -2 °C bis -20 °C durchgeführt und die Polymerisationswärme vollständig abgeleitet werden.

Damit das gleichmäßige Durchdringen der Proben mit dem Kunststoff erreicht werden konnte, wurden mehrere Präinfiltrationsschritte durchgeführt. Das Einbettungsprogramm und die verwendeten Lösungen werden in den Tabellen 4 und 5 dargestellt. Nach jedem Lösungswechsel wurde für zehn Minuten im Vakuum Infiltrator bei 150 mbar inkubiert.

Tabelle 4: Einbettung von Kiefernekrosen

#	Lösung	Verweildauer	Temperatur
1	Xylole/Basislösung (1:1)	3 h bis 5 h	24 °C
2	Präinfiltration 1	3 h bis 5 h	4 °C
3	Präinfiltration 2	24 h bis 30 h	4 °C
4	Infiltrationslösung	1 h bis 5 h	4 °C
5	Polymerisationslösung	> 24 h	-10 °C

Tabelle 5: Einbettungslösungen Technovit® 9100

	Basislösung	PMMA	Härter 1	Härter 2	Regler
Präinfiltration 1	200 ml stabilisiert		1 g		
Präinfiltration 2	200 ml entstabilisiert		1 g		
Infiltrationslösung	250 ml entstabilisiert		1 g		
Präinfiltration 2	200 ml entstabilisiert	20 g	3 g		
Stammlösung A	500 ml entstabilisiert	80 g	3 g		
Stammlösung B	50 ml entstabilisiert			4 ml	2 ml
Polymerisationsgemisch	9 Volumenteile Stammlösung A 1 Volumenteil Stammlösung B				

Komponenten:

- PMMA : Technovit® 9100 PMMA-Pulver
Härter 1 : Peroxidverbindung (Pulver)
Härter 2 : Technovit® Härterflüssigkeit
Regler : Technovit® 9100 Polymerisationsregler

3.2.2 Herstellung mikroskopischer Präparate

Die in Kunststoff eingebettete Hartschubstanz stellt besondere Ansprüche an die Herstellung mikroskopischer Präparate. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Probengröße und Beschaffenheit kamen hier zwei verschiedene Techniken zum Einsatz: die Trenn-Dünnschliff-Technik in Anlehnung an Donath 1989 und die Hartschnitt-Mikrotomie. Letztere hat den Vorteil, dass innerhalb von wenigen Minuten Schnitte von 5 µm bis 30 µm mit geringen Abtragsverlusten hergestellt werden können. Nachteilig sind jedoch Schneidartefakte, welche die morphologische Beurteilung am Mikroskop einschränken können. Für größere Knochenproben ist die Mikrotomie nicht geeignet [61, 63].

Die Bearbeitung der in PMMA eingebetteten Femurkopf-Proben erfolgte in Anlehnung an die **Trenn-Dünnschliff-Technik** von Donath [63]. Beginnend von der distalen Schnitt- oder Bruchfläche des Femurkopfes wurden mit Hilfe der Diamantbandsäge sagittale Schlitze angefertigt. Die Schliffdicke betrug 500 µm bis 600 µm. Es wurden für jedes Knochensegment fünf Schlitze angefertigt. Die distale Schliffseite wurde manuell mittels Schleifpapier poliert, um Schleifspuren des Trennbandes zu entfernen. Für den späteren Schleifvorgang wurde die Dicke des Schliffes mit einer Mikrometerschraube ermittelt. Die Schlitze wurden mit Hilfe von lighthärtendem Kleber auf MMA-Basis und der Präzisions-Klebedresse Exakt 402 mit der polierten Seite auf Objektträger planparallel aufgeklebt. Nach circa 15 min unter konstantem Druck und UV-Licht-Bestrahlung härtete der Kleber aus.

Für histologische Untersuchungen wurden die Proben mit Hilfe des Schleifsystems lapgrinder und Schleifpapier der Körnung 1200 auf eine Dicke von 50 µm bis 100 µm geschlif-

fen. Es folgten Polierschritte mit Schleifpapier der Körnungen 2400 und 4000. Im Folgenden werden die polierten Proben als Dünnschliff bezeichnet.

Für die Kiefernekrosen, die eine deutlich geringere Probengröße aufwiesen, wurde eine materialsparende Präparationstechnik angewandt. Nach der Einbettung in Technovit® 9100 (Kap. 3.2.1) wurden Schnitte von 6 µm Dicke mit Hilfe eines Hartschnittmikrotoms unter Verwendung eines Hartmetallmessers von der Probe abgenommen. Mit 50%iger Ethanol-Lösung konnten die Schnitte faltenfrei aufgenommen und auf Glasobjektträger übertragen werden. Um eine sichere Haftung zu erreichen, wurden die Schnitte mit Polyethylenfolien bedeckt, gepresst und verblieben für mindestens 24 Stunden bei 50 °C im Wärmeschrank. Die fertigen Dünnschnitte konnten nach dem Entfernen der Folien histologisch gefärbt werden (Kap. 3.2.3). Das Eindecken erfolgte mit Deckgläsern und Leica-Eindeckmedium.

Für Untersuchungen des Knochengewebes im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) werden Probendicken von 50 nm bis 70 nm benötigt, um eine gute Darstellung der Nanostruktur zu ermöglichen. Als Präparationsmethode wurde hierfür die **Ultramikrotomie** gewählt. Dieses Verfahren ähnelt der Mikrotomie, ermöglicht aber deutlich geringere Schnitticken von wenigen Nanometern. Dazu wurden zunächst von den Dünnschliffpräparaten durch Lichtmikroskopie relevante Regionen ausgewählt und mit Hilfe der Diamantbandsäge freipräpariert. Es entstand ein Probenblöckchen von circa 1 mm³, das aus einem Teil des Objektträgers mit dem aufgeklebten Probenschliff bestand. Das Blöckchen wurde in einen Probenhalter eingespannt und danach manuell unter einem Stereomikroskop mittels Rasiermessern getrimmt. Dabei war das Ziel eine Pyramidenform mit stumpfer Spitze, auf deren Oberseite der Schliff als trapezoide Fläche mit einer Kantenlänge von maximal 0,1 mm lag. Zum präzisen Nachtrimmen wurden Glasmesser und das Ultramikrotom verwendet. Das eigentliche Herstellen der Ultradünnschnitte erfolgte im Nassschnittverfahren mit einem Diamantmesser und einem Probenvorschub von 50 nm bis 60 nm. Als Abschwemmflüssigkeit wurde destilliertes Wasser verwendet und es erfolgte eine permanente Kontrolle mit dem geräteeigenem Stereomikroskop bei einer Schnittgeschwindigkeit von 0,25 mm/s bis 0,50 mm/s. Zur Aufnahme und Überführung der Schnitte auf Kupfer-Grids wurde eine Spezialöse benutzt. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Grids wurden die Proben bis zur Untersuchung im TEM bei Raumtemperatur in einem Trockenschrank gelagert [61, 62, 64].

3.2.3 Histologische Färbungen

Zum Erreichen einer besseren Anfärbbarkeit war bei bestimmten Färbetechniken ein **Anätzen** der Oberfläche der Dünnschliff-Präparate notwendig [62]. Dabei wurden sowohl der Knochen als auch das Einbettmittel PMMA angegriffen und die Oberfläche angeraut. Dies erleichterte das Eindringen der Farbstoffe in die Probe. Zum Anätzen diente eine 0,1%ige Methansäure-Lösung, die im Anschluss mit Methanol und Wasser neutralisiert wurde. Das hydrophobe PMMA verhindert naturgemäß das Eindringen der meisten Farbstoffe und großmolekularer immunologischer Reagenzien. Mit Hilfe von Xylofen kann der Kunst-

stoff vollständig entfernt werden, wodurch die Anwendung derselben Färbeprotokolle wie bei Paraffinschnitten mit nur geringen Modifikationen erlaubt wird. Auch enzym- und immunhistochemische Techniken werden so ermöglicht [62]. Dazu wurden die auf Glasobjektträgern fixierten Schnitte nach dem Protokoll in Tabelle 6 zum **Entplasten** in die angegebenen Lösungsmittel gegeben und konnten nachfolgend gefärbt werden.

Die **Färbung mit basischem Fuchsin** konnte ohne Vorbehandlung durchgeführt werden. Als Färbemittel wurde eine 1%ige basische Fuchsin-Lösung in 80%iger Ethanol-Lösung verwendet. Überschüssiger Farbstoff wurde mit 80%iger Ethanol-Lösung entfernt. Basisches Fuchsin hat die Eigenschaft in vorhandene Hohlräume zu diffundieren und diese anzufärben. Weiterhin handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der durch UV-Bestrahlung angeregt werden kann. Die Färbung gilt deshalb als eine etablierte Technik zur Detektion von Mikrorissen im Knochen [53, 54, 65, 66]. Zusätzlich werden Osteoid und Knochenzellen rot gefärbt, während der mineralisierte Knochen ungefärbt bleibt. Hyaliner Knorpel wird stark überfärbt und ist dadurch schlecht darzustellen.

Die **Masson-Goldner-Trichromfärbung** gilt in der Histologie als Spezialfärbung für die Zahn- und Knochenmorphometrie. Sie ermöglicht eine Unterscheidung zwischen nicht-mineralisierter und mineralisierter Knochenmatrix. Dabei stellen sich die mineralisierte Hartgewebematrix und das Kollagen leuchtend grün, Osteoid rot, Zellkerne blau-schwarz und Knorpel violett dar [62]. Zur Färbung von Dünnschliffen nach Masson-Goldner war zuerst ein Anätzen notwendig. Die als Einzelschritt enthaltene Eisenhämatoxylin-Färbung nach Weigert führte in Vorversuchen nur zu einer unzureichenden Anfärbung der Knochenzellkerne. Es wurde deshalb auf die Kernfärbung verzichtet [62].

Die **Giemsa-Färbung** ist eine Übersichtsfärbung und wird zur Darstellung von Blut- und Knochenmarkszellen genutzt. Sie hat den Vorteil eines guten Farbkontrastes zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz und ist auch zur Beurteilung der Knochenzellen gut geeignet. Mineralisierte Hartgewebematrix wird rosa bis zartrosa, Kollagen und Osteoid blassblau, Knorpelmatrix violett und Zellen mit Zellkern unterschiedlich blau dargestellt [62]. Zur Verbesserung des Färbeergebnisses war bei Dünnschliffen ein Anätzen nötig. Die einzelnen Schritte der Färbetechniken sind in Tabelle 6 dargestellt.

3.3 Untersuchungstechniken

Zur Beschreibung der Morphologie von nekrotischem Knochengewebe wurden verschiedene, hauptsächlich visuelle Untersuchungsmethoden angewandt. Dabei wurde hierarchisch von makroskopischen über mikroskopische Techniken bis in die Nanoebene vorgegangen, um für die Untersuchung relevante Strukturen zu selektieren (vgl. Abb. 3).

3.3.1 Lichtmikroskopie

An den gefärbten Dünnschliff- und Dünnschnittpräparaten wurden zunächst Untersuchungen am Lichtmikroskop durchgeführt. Sie dienten zum einen der histopathologischen Diagnosesicherung, zum anderen konnten nekrotische von gesunden Arealen abgegrenzt

Tabelle 6: Färbetechniken

#	Chemikalie	Dauer	Vorgang
Anätzen von Schliffpräparaten			
1	0,1%ige Methansäure-Lösung	2 min	Anätzen
2	Leitungswasser	–	Spülen
3	20%ige Methanol-Lösung	120 min	Neutralisieren
4	Leitungswasser	–	Spülen
Entplasten von Dünnschnitten			
1/2	Xylole	je 20 min	Spülen
3/4	(2-Methoxyethyl)acetat	je 20 min	Spülen
5/6	Aceton	je 5 min	Spülen
7	destilliertes Wasser	–	Spülen
Fuchsin-Färbung			
1	1%ige Fuchsin-Lösung in 80%iger Ethanol-Lösung	30 min	Färben
2	80%ige Ethanol-Lösung	–	Spülen
Modifizierte Masson-Goldner-Trichromfärbung			
1	Masson-I-Lösung	7 min	Färben
2	2%ige Essigsäure-Lösung	–	Spülen
3	Goldner-II-Lösung	5 min	Differenzieren
4	2%ige Essigsäure-Lösung	–	Spülen
5	Lichtgrün-Lösung	15 min	Färben bei 60 °C
6	2%ige Essigsäure-Lösung	–	Spülen
7	70%ige Ethanol-Lösung	–	Spülen
Giemsa-Färbung			
1	Giemsa-Lösung 1:10 in abgekochtem Reinstwasser	30 min	Färben bei 60 °C
2	abgekochtes Reinstwasser	–	Spülen
3	abgekochtes Reinstwasser mit 3 Tropfen Essigsäure auf 100 ml	–	Spülen

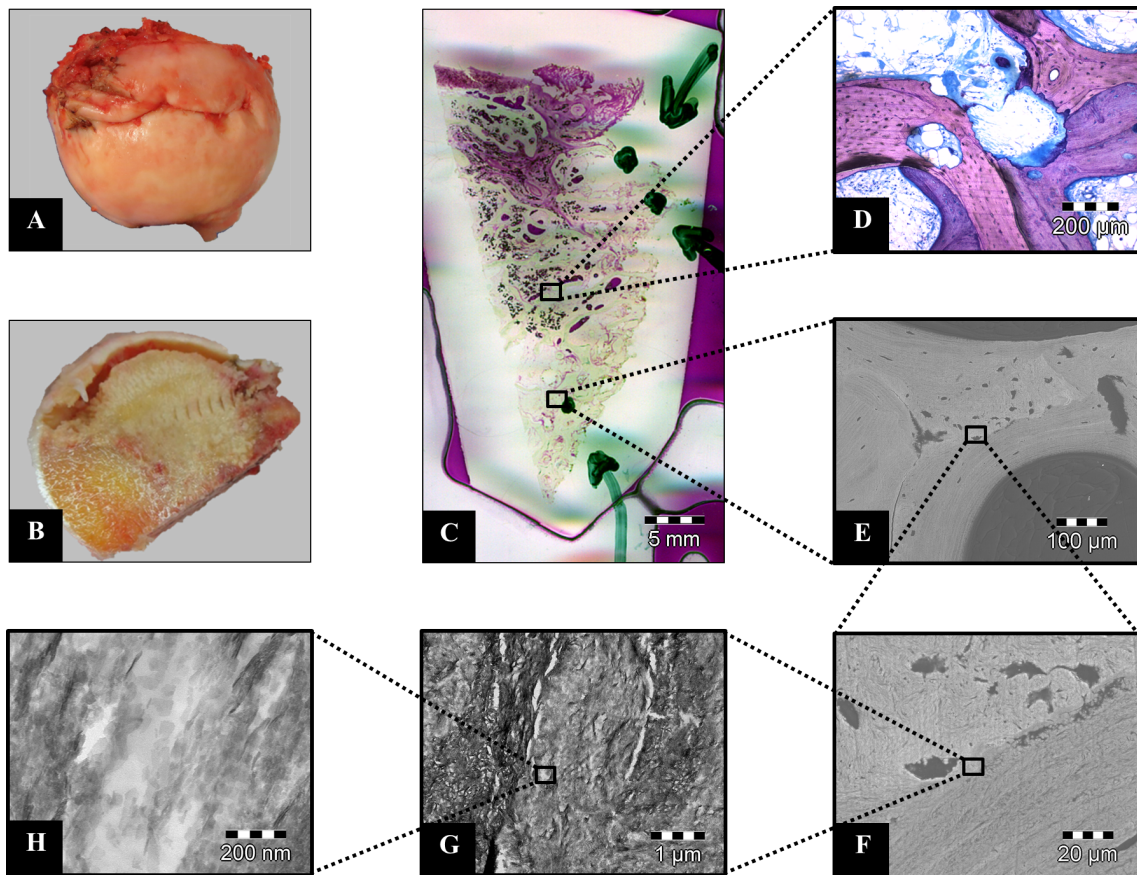


Abbildung 3: Übersicht der Untersuchungsverfahren anhand der Probe HK9N:

A Fotodokumentation des nativen Femurkopfes; **B** makroskopische Beurteilung des Querschnitts; **C** Schliffpräparat, Mikroschäden wurden markiert; **D** histologische Untersuchung mittels Lichtmikroskop; **E** REM-Bild der Mikrostruktur; **F** Vergrößerung aus E; **G** TEM-Aufnahme nach Zielpreparation auf nekrotisches Knochengewebe; **H** Darstellung der Nanostruktur mittels TEM

werden. Neben den in der Literatur beschriebenen Zeichen der Osteonekrose (Kap. 1.2.2) konnten weitere Vergleiche zwischen der physiologischen und pathologischen Knochenstruktur gezogen werden. Hierbei wurden die Mineralisierung der Hartgewebematrix anhand von Präparaten mit Masson-Goldner-Trichromfärbung und die Knochenzellen sowie das Knochenmark bei Giemsa-Färbung (Kap. 3.2.3) untersucht. Bei beiden Färbungen wurde speziell auf Veränderungen der Knochenmatrix geachtet, deren tiefere Struktur anschließend mit elektronenmikroskopischen Verfahren analysiert wurde.

Zur Detektion von Mikrorissen dienen Dünnschliffpräparate, die mit basischem Fuchsin gefärbt wurden (Kap. 3.2.3). Die Untersuchung wurde mit den Fluoreszenzfiltern WIBA (Anregung 460 nm bis 490 nm) und MWU (Anregung 330 nm bis 385 nm) am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Mikroskopische Defekte im Knochengewebe wurden dabei markiert, um sie weiteren Untersuchungen zuzuführen. Weiterhin erfolgte eine Fotodokumentation und Auswertung mit dem Bildanalyse-System Cell[^]F.

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) zeichnet sich durch die Möglichkeit aus, hochauflösende Aufnahmen von Oberflächen mit hoher Tiefenschärfe abzubilden [61]. Rasterelektro-

nenmikroskopische Untersuchungen konnten direkt an nativen und gefärbten Dünnschliffpräparaten durchgeführt werden. Es wurde der low vacuum-Mode mit 0,5 mbar und einer Beschleunigungsspannung von 10 kV bis 15 kV genutzt, wobei das Rückstreuelektronensignal (*backscattered electrons*, BSE) als Materialkontrastbild aufgezeichnet wurde.

Die Untersuchungen mit dem REM dienten der Darstellung der Knochenstruktur und der Veränderungen durch die Osteonekrose. Das Rückstreuelektronensignal eignete sich hierbei zur Visualisierung von Mineralisierungsunterschieden und der natürlichen Querstreifung der mineralisierten Kollagenmatrix, da die Signalintensität von der mittleren Ordnungszahl der Elemente im Material abhängt. Stärker mineralisiertes Gewebe wird somit heller dargestellt. Weiterhin konnten der Verlauf und die mikromechanischen Mechanismen der Mikrorisse im Knochen dargestellt werden, um sie mit bereits bekannten Veränderungen im gesunden Skelett zu vergleichen. Lichtmikroskopische Voruntersuchungen halfen dabei, entsprechende Veränderungen und Defekte in den Proben zu lokalisieren und für die Darstellung gezielt aufzusuchen.

3.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie kann die Nanostruktur des Knochengewebes hochauflösend dargestellt werden. Voraussetzung dafür ist die Herstellung sehr dünner Präparate, wofür in dieser Arbeit das Verfahren der Ultramikrotomie gewählt wurde (Kap. 3.2.2). Die auf Kupfer-Grids transferierten Ultradünnschnitte wurden am TEM untersucht. Ziel war die Darstellung der mineralisierten Kollagenfibrillen und der mit ihnen assoziierten Calciumhydroxylapatit-Kristalle, weshalb auf eine Entkalkung oder Kontrastierung der Knochenproben verzichtet wurde. Zur Probenauswahl gehörten Bereiche nekrotisch veränderten Gewebes in allen Femurköpfen und Kiefernekrosen, sowie ausgewählte Präparate mit zuvor dargestellten Mikrorissen, deren Risspitze gezielt herauspräpariert wurde. Am TEM wurde der Streuabsorptionskontrast im zero loss-Modus genutzt, bei dem Bereiche mit größerer Probendicke und Elementen höherer Ordnungszahl im Bild dunkler erschienen. Dadurch wird der Kontrast hauptsächlich vom Mineral gebildet.

Mit den TEM-Bildern konnten Veränderungen in der Anordnung und Struktur der mineralisierten Kollagenfibrillen dokumentiert werden. Ein weiterer Fokus lag in der Analyse der Morphologie der Calciumhydroxylapatit-Kristalle, weshalb gezielt Areale in den Proben aufgesucht wurden, in denen einzelne Kristalle hinsichtlich Länge, Breite und Dicke ausgemessen werden konnten. Die Bildauswertung und -bearbeitung erfolgte mit dem Bildanalysesystem Cell[^]F.

3.3.4 Statistische Auswertung der Kristallmessungen

Die morphologischen Untersuchungen der Calciumhydroxylapatit-Kristalle beinhalteten Messungen der Größe anhand von TEM-Bildern. Ermittelte Messwerte wurden in Tabellen in das Microsoft Office-Programm Excel 2010 eingegeben. Die Zuordnung der ermittelten Daten zu den Parametern Länge, Breite und Dicke erfolgte visuell und unter Beachtung der in der Literatur beschriebenen Referenzwerte. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung und Darstellung als Diagramme in Excel. Hierzu wurde der Median errechnet,

da dieser im Gegensatz zum arithmetischen Mittelwert weniger anfällig für Ausreißer und Messfehler ist. Als Streumaß für den Median wurde die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung ermittelt.

Tabelle 7: Verwendete Geräte und Materialien

Produkt	genaue Bezeichnung	Hersteller
Einbettungssystem	Technovit® 9100	Haereus Kulzer GmbH, Hanau, D
Diamantbandsäge	Exakt 300	Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, D
Universalschüttler	SM 30 B	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
K-VAC Vakuum Infiltrator	Typ DDM-P128	Medim GmbH, Gießen, D
Wasserbad	Bad-/Umwälzthermostat MD-27 mit Eintauchkühler FT200	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Gewebeeinbettungsautomat	Leica EM TP	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Diamantbandsäge	Exakt 300 mit Präzisions-Parallelführung Exakt 300 CP	Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, D
Schleifpapier	SiC Papier 305 mm, Körnungen 1200/2400/4000	Struers GmbH, Willich, D
Kleber auf MMA-Basis	Technovit 7210 VL	Haereus Kulzer GmbH, Hanau, D
Präzisions-Klebebresse	Exakt 402	Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, D
Objektträger	Plexiglas-Objektträger planparallel	Walter Messner GmbH, Oststeinbek, D
Schleifsystem	lap-grinder	Walter Messner GmbH, Oststeinbek, D
Hartschnittmikrotom	Hart- und Großschnittmikrotom Polycut-E	Reichert-Jung GmbH, Heidelberg, D
Glasobjektträger	Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Braunschweig, D
Wärmeschrank	Thermocenter Standard	SalvisLab Renggli AG, Rotkreuz, Schweiz
Leica-Eindeckmedium	Leica CV Mount	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Ultramikrotom	Super Nova Tissue Slicer 7050-01	Reichert-Jung GmbH, Heidelberg, D
Diamantmesser	ultra semi 35°	Diatome AG, Biel, Schweiz
TEM Grids	Formvar/Carbon, Copper 3,05 mm, 200 Mesh, Thin Bar	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Spezialöse	Perfect Loop	Diatome AG, Biel, Schweiz
Lichtmikroskop	BX51	Olympus Corp., Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus Corp., Tokio, Japan

Produkt	genaue Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzfilter WIBA	Anregung 460 nm bis 490 nm	Olympus Corp., Tokio, Japan
Fluoreszenzfilter MWU	Anregung 330 nm bis 385 nm	Olympus Corp., Tokio, Japan
Bildanalysesystem	Cell [^] F	Olympus Corp., Tokio, Japan
REM	Quanta 650	FEI Company, Hillsboro, USA
TEM	LEO 912	LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK
Flachbettscanner	Epson Perfection 4490 Photo	Seiko Epson Corp., Suwa, Japan

4 Ergebnisse

4.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Für die nachfolgenden Untersuchungen standen 15 resezierte Femurköpfe von 14 Spendern zur Verfügung, die sich einer Hüftendoprothesen-Implantation unterzogen hatten. Die Altersspanne zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 39 und 87 Jahren, wobei der Durchschnitt 62 Lebensjahre betrug. Das Geschlechterverhältnis war mit acht weiblichen und sechs männlichen Patienten genau wie die Seitenverteilung von sieben linken zu acht rechten Femurköpfen nahezu ausgeglichen. Ein Spender wurde im Abstand von wenigen Monaten nacheinander an beiden Hüftgelenken operiert. Bei der primären Diagnose- und Indikationsstellung war allerdings nicht bei allen Patienten das Vorliegen einer Femurkopfnekrose bekannt. Spendernummer eins wurde bei einer medialen Schenkelhalsfraktur operativ versorgt und die Osteonekrose zufällig entdeckt. Zwei Spender wurden aufgrund einer fortgeschrittenen Koxarthrose operiert und erst nach der Resektion wurde nach makroskopischer Sichtung des resezierten Femurkopfes der Verdacht auf eine Femurkopfnekrose geäußert. Retrospektiv zeigten sich bei diesen beiden im präoperativen Röntgenbild Hinweise auf eine Osteonekrose. Entsprechend musste in dieser Studie die Diagnose durch histologische Untersuchungen gesichert werden. Vier Patienten hatten bereits Voroperationen wegen ihrer bekannten Femurkopfnekrose erhalten. Dabei handelte es sich bei den Spendernummern 6, 8 und 12 um Anbohrungen des Femurkopfes und bei Spendernummer 13 um eine gefäßgestielte Fibulaplastik, die neun Jahre zuvor durchgeführt wurde.

Zur Erweiterung des Probenspektrums wurden fünf Knochenresektate von Kiefernekrosen untersucht. Sie stammten von vier Patienten im Alter von 57 bis 76 Jahren, die sich in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Göttingen behandeln ließen. Bei allen Spendern bestanden maligne Grunderkrankungen, welche Knochenherde ausbilden können, weshalb sie mit Bisphosphonaten behandelt wurden. Von den Patienten wurden drei Resektate aus dem Unterkiefer und zwei aus dem Oberkiefer untersucht.

4.2 Histopathologie der Knochenproben

Zur Sicherung der Diagnose erfolgte die eingehende makroskopische und lichtmikroskopische Inspektion der nativen Knochenproben und histologischen Präparate. Gleichzeitig dienten die Analysen zur Unterscheidung von gesunden und nekrotischen Arealen für die folgenden Schritte.

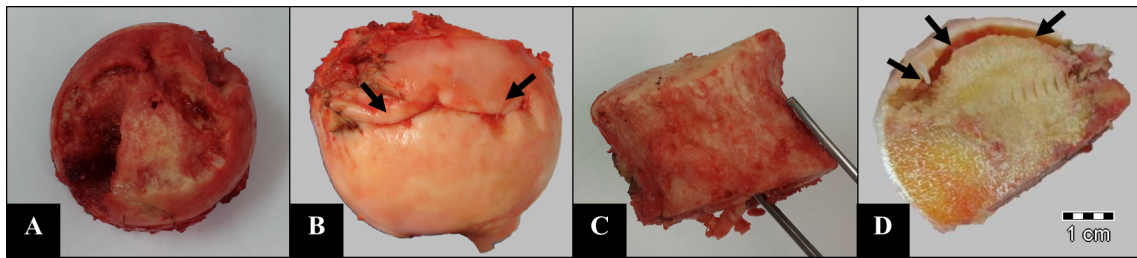


Abbildung 4: Femurköpfe makroskopisch:

A deformierter Femurkopf bei ARCO-Stadium IV; **B** Einfaltung der Knorpelschicht durch die Zerstörung des subchondralen Knochens (↑); **C** destruiertes Femurkopf bei natürlicher Girdlestone-Situation; **D** Schnittfläche durch einen nekrotischen Femurkopf mit gesunder Spongiosa (gelb), Nekroseareal (graugelb) und *crescent sign* (↑)

4.2.1 Makroskopische Beurteilung

Das makroskopische Bild der **Femurkopfnekrose** kann sich je nach Stadium, Ausdehnung und Lokalisation der Läsion deutlich unterscheiden. Auch die eventuell durchgeführten operativen Therapien, die im Vorfeld bei früheren Erkrankungsstadien eingesetzt wurden, haben einen Einfluss auf die Morphologie des Krankheitsbildes. Klassischerweise erfolgt die Resektion bei einer *Arthrosis deformans*, die bereits radiologisch als ARCO-Stadium IV gesichert wurde. Bei den untersuchten Femurköpfen konnte eine Deformierung in 11 von 15 Fällen makroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 4 A), wobei ein Resektat einen intakten Knorpel ohne Arthrosezeichen aufwies. In diesem Fall war die Knorpelschicht lediglich am kranial-lateralen Übergang zum Schenkelhals durch die subchondrale Zerstörung des Knochens eingefaltet, was zu einer Veränderung der Kopfkontur geführt hat (Abb. 4 B). Ein ähnliches Phänomen zeigte sich bei einem weiteren Femurkopf, allerdings war es bei diesem bereits sekundär zu einer kranialen Chondromalazie gekommen. 11 von 15 Resektaten wiesen eine primäre oder sekundäre Arthrose der Gelenkkugel auf, die sich durch eine degenerierte Knorpeloberfläche zeigte. In 11 von 15 Proben war ein Kollaps des subchondralen Knochens bereits im nativen Zustand direkt oder indirekt visuell durch eine eingesunkene Oberfläche, die vollkommene Deformierung des Kopfes oder eine pathologische Nachgiebigkeit des darüber liegenden Knorpels nachweisbar. Ein Femurkopf war bereits so stark deformiert, dass keine Kalotte und kein Knorpel mehr sichtbar waren. Es zeigte sich kaum mehr als eine flache Sklerosekappe auf dem Schenkelhals, die bei destruiertem *Acetabulum* bereits im Sinne einer Girdlestone-Situation mit dem Becken artikuliert hat (Abb. 4 C).

Durch die Parzellierung der Knochenproben für die weitere Verarbeitung ergab sich die Möglichkeit einer weiteren makroskopischen Beurteilung der Schnittflächen. Der Kollaps des subchondralen Knochens im Sinne des radiologischen *crescent signs* konnte hierbei in 8 von 15 Femurköpfen verifiziert werden. Bei 13 von 15 Proben demarkierte sich eine Nekrosezone, die sich durch eine granuläre grau-weiße Knochenstruktur, begleitende Entzündungsreaktionen oder einen peripheren Sklerosewall darstellte (Abb. 4 D). Nur ein Femurkopf zeigte bis auf eine Fraktur, die bei der Resektion durch eine instabile Knochenstruktur entstanden war, keinerlei makroskopische Zeichen einer Osteonekrose.

Die Probengröße war bei den **Kiefernekrosen** im Vergleich zu den Femurköpfen sehr

gering, sodass kaum Aussagen zur makroskopischen Struktur gemacht werden können (Abb. 5). Das kleinste Knochenstück maß 5 mm x 4 mm x 3 mm, während die größte Probe 20 mm x 10 mm x 5 mm Ausdehnung aufwies. Von einem Spender waren zwei Knochenresektate eingesandt worden, die separat eingebettet und untersucht wurden. Die Knochenstruktur wirkte bei allen fünf Proben irregulär mit Zeichen einer Sklerose des spongiosen Knochens und instabiler Kortikalis. Es waren keine Weichgewebeteile an den Resektaten zu finden.

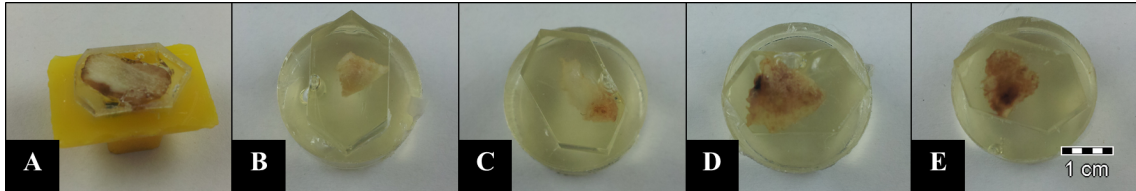


Abbildung 5: Kiefernekrosen makroskopisch nach Einbettung in Technovit® 9100: A KN-1; B KN-2; C KN-3; D KN-4a; E KN-4b

4.2.2 Histologische Auswertung

Nach der Anfertigung von Schliffpräparaten und deren Färbung konnte bereits makroskopisch bei allen 15 **Femurköpfen** eine Nekrosezone ausgemacht werden. Sie demarkierte sich entweder durch ein chromophiles Entzündungsgewebe im Markraum (Abb. 6 A) oder durch einen sklerotischen Randwall unterschiedlicher Ausprägung. Dieser reichte bei neun

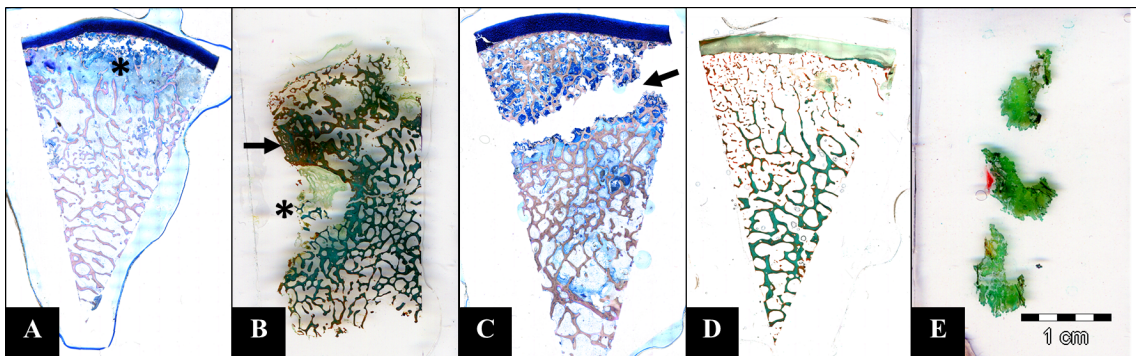


Abbildung 6: Übersichtsaufnahmen von Schliff- und Schnittpräparaten: A Schliffpräparat einer Femurkopfnekrose mit deutlichem Infiltrat (*) von Entzündungszellen und Fibrose; B Femurkopfnekrose mit Sklerosesaum (↑), Nekrosezone mit frakturierten Trabekeln (*); C Femurkopfnekrose mit Frakturspalt (↑); D Femurkopfnekrose mit deutlichem Gradienten der Trabekeldichte; E Schnittpräparat einer Kiefernekrose (A/C = Giemsa-Färbung, B/D/E = Masson-Goldner-Trichromfärbung)

der 15 Präparate von einer deutlichen Verdickung der Trabekelstruktur bis zur Bildung einer Schicht kortikalen Knochens um die Nekrose herum (Abb. 6 B). Der Kollaps des subchondralen Knochens zeigte sich bei sieben von 15 Femurköpfen durch eine Trümmerzone mit frakturierten Trabekeln bei teilweise noch erhaltener subchondraler Grenzlamelle, die am vitalen Knorpel anlag. Vier Proben wiesen Frakturzonen auf, die bei der Resektion des Gelenkkopfes entstanden sind und sich ebenfalls durch einen Bereich mit frakturierten Trabekeln sowie zerrissenem Knorpel darstellten (Abb. 6 C). Zehn Femurköpfe ließen einen

Gradienten der Trabekeldichte mit Ausdünnung der subchondralen Spongiosa erkennen, wobei letztere auch häufig von Mikrofrakturen betroffen war (Abb. 6 D).

In allen Proben ließ sich eine irreguläre Strukturierung der Trabekel nachweisen, die sich entweder auf den gesamten Femurkopf oder einen Anteil ausweitete. Besonders am Übergang zwischen gesundem und nekrotischen Knochen fanden sich bei 11 der 15 Femurköpfe verplumpte Trabekel. Teilweise waren zentral in den Knochenbälkchen Reste nekrotischen Knochens mit leeren Osteozytenlakunen und verwaschener Matrix zu finden, die von frischen Tafelosteonen eingerahmt wurden (Abb. 7 A & B). In Kreuzungsbereichen verdickter

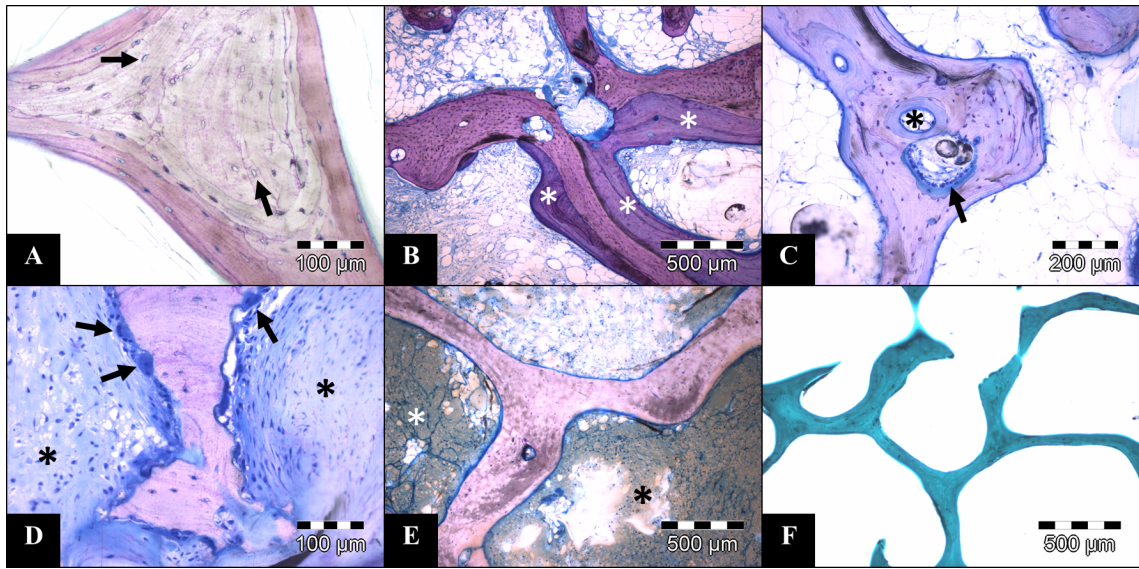


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Details von Femurkopfnekrosen:

A verdickter Trabekel mit zentraler Nekrose, leere Osteozytenlakunen (↑); **B** von Tafelosteonen (*) ummauerte nekrotische Trabekel; **C** Trabekelkreuzung mit osteonalen Strukturen (*), daneben aktive Osteoblasten (↑) in einer Resorptionshöhle; **D** Resorption nekrotischen Knochengewebes durch Osteoklasten (↑), Markraum mit Fibrose (*); **E** Markraumnekrose mit Detritus (*); **F** ausgedünnte und fragile Trabekel in der subchondralen Spongiosa

(A-E = Giemsa-Färbung, F = Masson-Goldner-Trichromfärbung)

Trabekel hatten sich teilweise vitale osteonale Strukturen mit konzentrischen Lamellen und zentralem Gefäßkanal gebildet. Auch in der Nekrosezone waren bei 14 Femurköpfen Knochenanbauten auf nekrotischen Knochenresten zu sehen. Osteoid als Zeichen aktiver Knochenformation fand sich eher peripher bei 14 von 15 Femurköpfen, wobei die Ausprägung gering und zwischen den Proben sehr unterschiedlich war (Abb. 7 C). Als weiteres Zeichen für Umbauprozesse waren bei den mit Giemsa-Lösung gefärbten Schliften bei allen Femurköpfen aktive Osteoklasten zu finden. Weiterhin waren besonders an nekrotischen Knochenoberflächen gehäuft Howship-Lakunen als Zeichen der Resorption zu sehen (Abb. 7 D). Fibrosen im Sinne einer Proliferation von Bindegewebe waren in Teilen des Markraums bei 12 von 15 Femurköpfen darzustellen und oft mit den aktiven Umbauvorgängen assoziiert. In neun der 15 Femurköpfe war eine frische Markraumnekrose mit Detritus nachweisbar, wobei 14 Proben in anderen Zonen auch normales Fettmark ohne pathologische Veränderungen besaßen (Abb. 7 E). Lediglich ein Resektat war durch eine generelle Nekrose aller Bindegewebsanteile und Knochenmarkzellen geprägt.

Die Struktur des Knochengewebes in der Nekrosezone war durch leere und deformierte Osteozytenlakunen sowie verstrichene Lamellengrenzen geprägt. Sie war in allen Proben nachweisbar. In einigen Schliffen lag in diesem fragilen Bereich eine Trümmerzone aus frakturierten Trabekeln, die dem subchondralen Kollaps der Kalotte entsprachen. Aber nicht immer war die Destruktion der Spongiosa mit Mikrofrakturen oder Mikrorissen verbunden. Teilweise kam es zu Verformungen der Trabekeloberflächen, ohne das Schäden auf die Instabilität der Matrix hinwiesen. Viel mehr waren besonders im subchondralen Bereich duktile Stauchungen und Biegungen der Trabekel, die gleichzeitig ausgedünnt und fragil wirkten, auffällig. Acht der 15 Femurköpfe zeigten diese Veränderung, die bereits makroskopisch durch eine verringerte Spongiosadichte sichtbar war (Abb. 7 F).

Bei den **Kiefernekrosen** ließen sich ohne mikroskopische Vergrößerung kaum Details ausmachen. In der Übersicht zeigte sich vornehmlich unregelmäßig strukturierter Knochen ohne klare Trennung zwischen Spongiosa und Kompakta (Abb. 6 E). Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen glich das Knochengewebe der gesunden Kompakta, deren Struktur aus Lamellen und Osteonen jedoch ungeordnet war. Es zeigten sich nur wenige vitale Zellen und viele Blutreste, die in Löchern der Knochenmatrix lagen. Es handelte sich um Hohlräume von unterschiedlichem Kaliber, die entweder den Havers-Kanälen entsprachen, oder den Resorptionshöhlen, da sich teilweise Spuren von Knochenabbauvorgängen in der Innenwand fanden (Abb. 8 A). Nur in einer Probe waren gelegentlich konzentrische Lamellen um die Löcher zu sehen, die auf Osteone hinwiesen (Abb. 8 B). Sonst erschien der Knochen als ein Nebeneinander von parallel angeordneten Lamellen und ungeordnetem Gewebe, das meist scharf voneinander abzugrenzen war (Abb. 8 C).

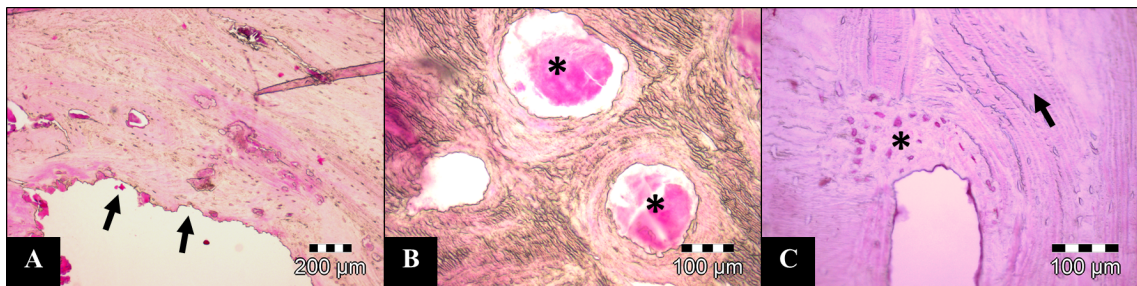


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Details von Kiefernekrosen:

A Gewebe mit Hinweisen auf Resorption (↑); **B** konzentrische Lamellen um debrisgefüllte Gefäßkanäle (*); **C** parallel angeordnete Lamellen (↑) und ungeordnetes Knochengewebe (*) mit veränderten Osteozytenlakunen (Fuchsin-Färbung)

4.3 Mikromechanische Prozesse und Nanostruktur

Die Untersuchung der Nanostruktur und der mikromechanischen Prozesse bei Osteonekrosen ermöglicht einen Einblick, welche Mechanismen letztlich zur Instabilität des Knochengewebes führen. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Fuchsin-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie Mikrorisse in den Knochenproben aufgesucht, dokumentiert und danach ausgewählte Defekte im REM dargestellt. Zusätzlich wurden Strukturveränderungen des

Knochengewebes bei Osteonekrose im REM und TEM untersucht und mit dem gesunden Knochen verglichen. TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten aus der Nekrosezone dienten dazu, die Maße der Hydroxylapatit-Kristalle zu ermitteln und mit den Werten gesunden Knochengewebes aus Voruntersuchungen und der Literatur zu vergleichen.

4.3.1 Mikrorisse im nekrotischen Knochen

Durch die Fluoreszenzmikroskopie konnten insgesamt 176 Risse und Mikrofrakturen in der Knochenstruktur detektiert und dokumentiert werden. Die Untersuchung erfolgte an je einem Schliff aus jedem Probensegment der 15 Femurköpfe, wobei sowohl nekrotische als auch gesunde Bereiche mit erfasst wurden. 131 Defekte, etwa drei Viertel, lagen nach histologischen Kriterien sicher in der Nekrosezone, wogegen 14 Läsionen im gesunden Knochengewebe, das zumeist zentral im Femurkopf liegt, zu finden waren. Die restlichen 31 Risse befanden sich in der Übergangs- und Umbauzone, in der nekrotische und vitale Bestandteile in enger Beziehung zueinander standen. Kompakter Knochen, der sich entweder subchondral oder in sklerotischen Zonen zeigte, war nur selten von Mikrorissen betroffen. 168 der 176 Risse durchzogen die Trabekel, wobei hinsichtlich des Durchmessers keine Bevorzugung dünnerer oder dickerer Knochenbälkchen zu eruieren war. Selbst eine hohe Trabekeldichte schützte nicht vor Läsionen des spongiösen Knochens und in 73 Fällen liefen die Risse durch Trabekelkreuzungen. In die Untersuchungen wurden auch 33 Risse einbezogen, die räumlich sehr nah an Makrofrakturen oder Bohrkanälen lagen, welche bei der Resektion der Femurköpfe entstanden sind. Solche makroskopischen Läsionen zeigten sich immer in Nekrosezonen oder den Übergangsbereichen, was bereits auf eine Instabilität dieser Regionen hinweist.

Da besonders in der Umbauzone und den Übergangsbereichen ein Nebeneinander von nekrotisch verändertem Knochen und vitalen Knochenanbauten zu finden war, wurde für jeden Riss die umgebende Knochenstruktur individuell betrachtet. Dadurch wurden auch bei Rissen, die klar in der Nekrosezone lagen, Abweichungen erkannt, wonach scharf abgrenzbare Strukturgrenzen auch hier vorkommen können. Demgegenüber gab es auch in Bereichen außerhalb der histologisch gesicherten Osteonekrose Knochengewebe, in dem nahezu keine Strukturgrenzen mehr zu differenzieren waren. In der Umbauzone kam es häufig vor, dass nekrotische Trabekel durch frischen Knochenanbau eingemauert wurden. Deshalb entstanden in diesem Areal auch Risse, die durch vitales und abgestorbenes Knochengewebe gleichermaßen drangen, sodass eine intensive Analyse der Rissverläufe notwendig wurde.

Die Risseinleitung erfolgte überwiegend quer zur Trabekeloberfläche und damit auch nahezu senkrecht durch die äußeren Lamellenschichten. Dabei kam es an den Lamellengrenzen immer wieder zu kleineren Ablenkungen, die zu einem typischen Zickzackverlauf führten (Abb. 9 A). Wenn Kitt-Linien vorhanden waren, kam es häufig zu einer Ablenkung der Rissverläufe, da sie eine sehr deutliche Strukturgrenze bildeten (Abb. 9 B). Die Mikrorisse zeigten oft die Neigung zu einer Ablenkung in die Längsrichtung der Trabekel und liefen dabei auch zwischen den Lamellengrenzen weiter (Abb. 9 C). Auslenkungen des Rissver-

laufs an konzentrischen Lamellen von osteonalen Strukturen sind im spongiösen Knochen nur selten zu finden, da diese Strukturen normalerweise nur in der Kompakta vorkommen. Bei verdickten Trabekeln in der Umbauzone zeigten sich jedoch besonders im Kreuzungsbereich häufig Gefäßkanäle und osteonale Strukturen, weshalb auch hier Ablenkungen entlang der konzentrischen Lamellen zu beobachten waren (Abb. 9 D).

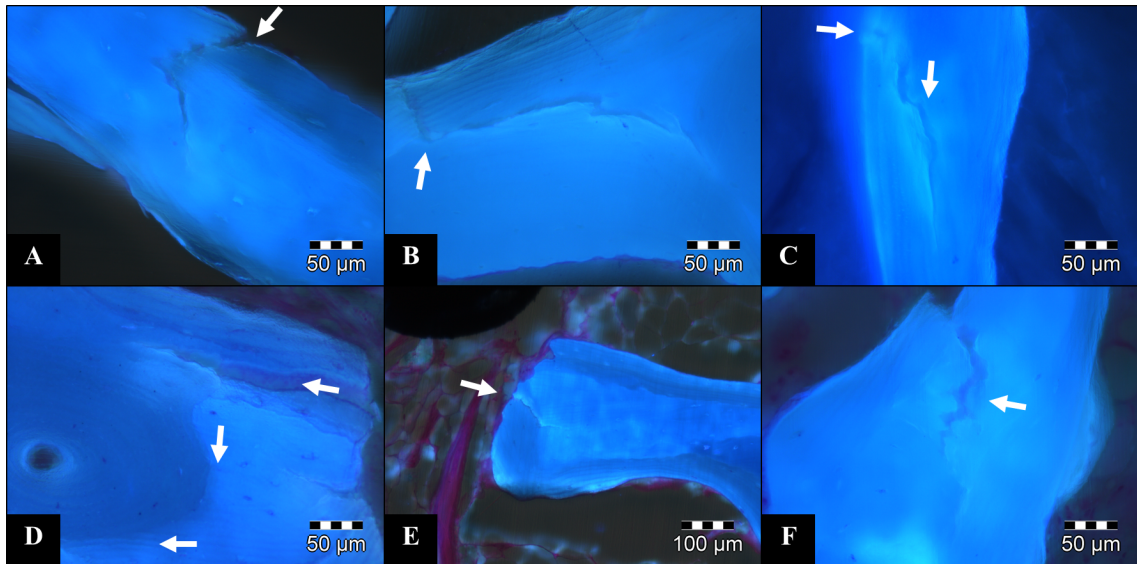


Abbildung 9: Rissverläufe (↑) im trabekulären Knochen:

A transversale Risseinleitung mit Zickzackverlauf durch die senkrecht getroffenen Lamellen; **B** Ablenkung an einer Kitt-Linie; **C** nahezu senkrechte Rissablenkung, danach interlamellärer Rissverlauf; **D** Auslenkung eines Mikrorisses um eine osteonale Struktur im verdickten Trabekel; **E** Risseinleitung an einer Frakturfläche mit Auftrennung an einer Strukturgrenze; **F** stumpfe Rissufer und abgerundetes Zickzackmuster bei Rissverlauf in unscharfen Lamellen (Fuchsin-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie)

Eine weitere Möglichkeit der Risseinleitung war oft in den Trümmerzonen zu beobachten, in denen rund die Hälfte der Risse detektiert wurden. An den Frakturflächen kam es zu Einrissen entlang von Kitt-Linien und Lamellengrenzen, sodass Knochengewebe an den Strukturgrenzen getrennt wurde (Abb. 9 E).

Abhängig von der Schärfe der Strukturgrenzen konnte auch eine Veränderung der Morphologie des Rissablenkungsverhaltens an den Lamellengrenzen ausgemacht werden. Waren die Richtungsänderungen bei intakter Struktur eher rechtwinklig und die Rissufer klar abgegrenzt, kam es bei unscharfem Gewebe zu einer Abstumpfung der Risszacken. Die Ecken waren eher fransig, abgerundet und es kam häufiger zum Überspringen ganzer Lamellenstapel, sodass ein sehr grobes Zickzackmuster des Rissverlaufs resultierte (Abb. 9 F).

Die für die Kompakta typischen Mikrorisse ohne Kontakt zur Knochenoberfläche waren nur sehr selten anzutreffen. Sie kamen im nekrotischen Kern verdickter Trabekel oder entlang von Kitt-Linien vor und mussten fast regelhaft als Artefakte der histologischen Bearbeitung ausgeschlossen werden. Ein Hinweis für die artifizielle Entstehung war das gerissene Einbettmittel.

Dank der komplexen Strukturierung des Knochengewebes zeigte sich eine große Bandbreite an Rissstoppmechanismen. Typisch war ein direkter Stopp an Strukturgrenzen wie den

Zementlinien oder zwischen den Lamellen (Abb. 10 A). Ein weiterer häufig anzutreffender Mechanismus war der Stopp nach einem mehrfachen zickzackförmigen Richtungswechsel beim Verlauf eines Risses quer zu einem Lamellenstapel (Abb. 10 B). Wenn der Riss axial zur Trabekelrichtung auslief, waren oft ein langer interlamellärer Verlauf oder eine Spaltbildung entlang der Zementlinie zu beobachten, bis es innerhalb dieser Strukturgrenzen zum Rissstopp kam (Abb. 10 C). Diese Rissphänomene zeigten sich auch bei den verwachsenen Strukturen des als nekrotisch eingestuftes Knochengewebes. Seltener war an der Rissspitze kein Stoppmechanismus erkennbar. Dieser Befund zeigte sich meist im Trabekelkern, in dem keine oder wenig Strukturgrenzen erkennbar waren und damit auch kaum Rissablenkung beobachtet werden konnte (Abb. 10 D).

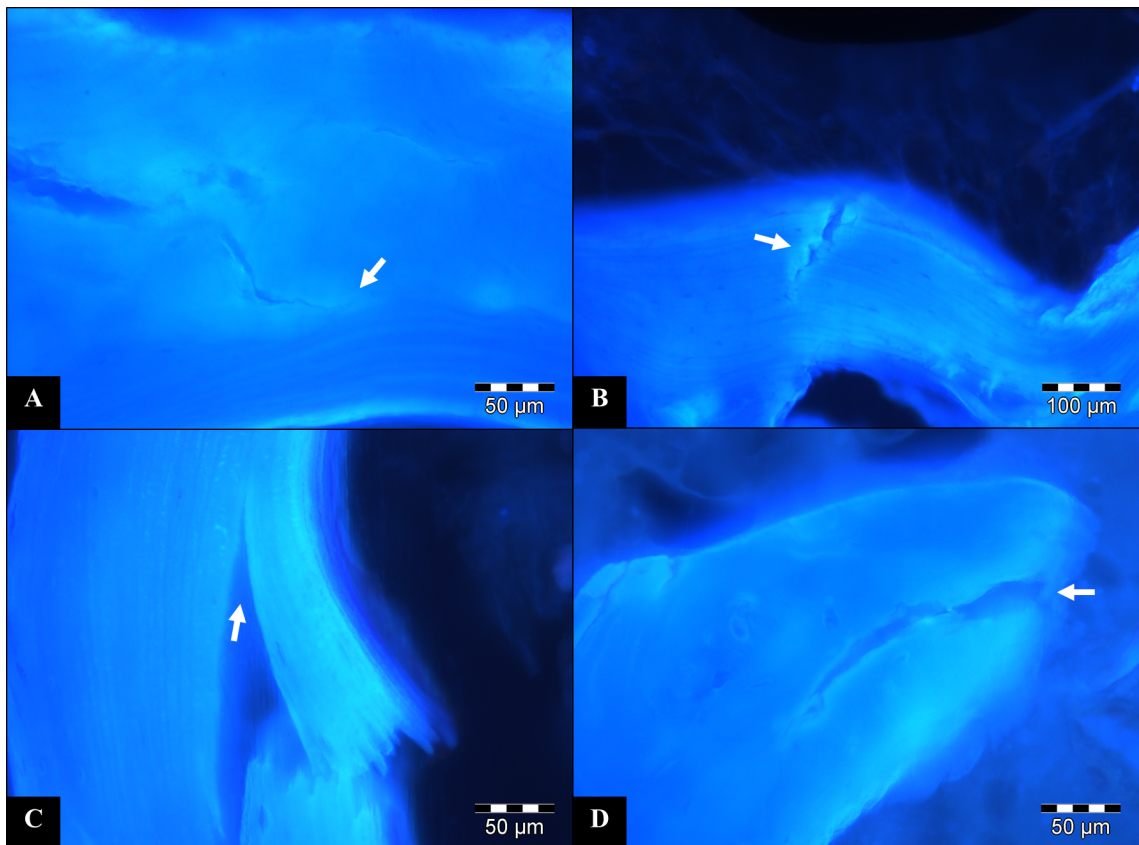


Abbildung 10: Rissstoppmechanismen (↑) im nekrotischen Knochen:
A Stopp an einer Strukturgrenze; **B** Rissstopp nach einem Zickzackverlauf; **C** interlamelläre Spaltbildung mit Stopp; **D** Riss ohne erkennbaren Stoppmechanismus
 (Fuchsin-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie)

Um zu zeigen, dass Veränderungen des Knochengewebes einen Einfluss auf die mikromechanischen Mechanismen haben, erfolgte eine Analyse der Struktur in der Rissumgebung. Hierbei stellte sich für die Umbauzone eine Häufung von Rissstopp-Phänomenen an Kitt-Linien dar, die besonders oft bei den ummauerten Trabekeln zu finden waren. Dabei war es unerheblich, ob der Riss vom nekrotischen Kern oder dem frischen Knochenanbau ausging. Auch ein Auslaufen des Risses entlang der Kitt-Linie war in diesem Bereich vermehrt anzutreffen. Je schärfer die Strukturgrenzen in der Umgebung abzubilden waren, desto öfter war der Stopp nach langem interlamellärem Verlauf nachzuweisen. Demgegenüber fanden

sich vollständige Frakturen der Trabekel vermehrt bei unscharfen Strukturen in der Nekrosezone und konnten nur sehr selten bei verdickten oder ummauerten Knochenbälkchen nachgewiesen werden. Für die weiteren oben genannten Rissstoppmechanismen konnten keine typischen Verteilungen im Zusammenhang mit der Knochenstruktur ausgemacht werden.

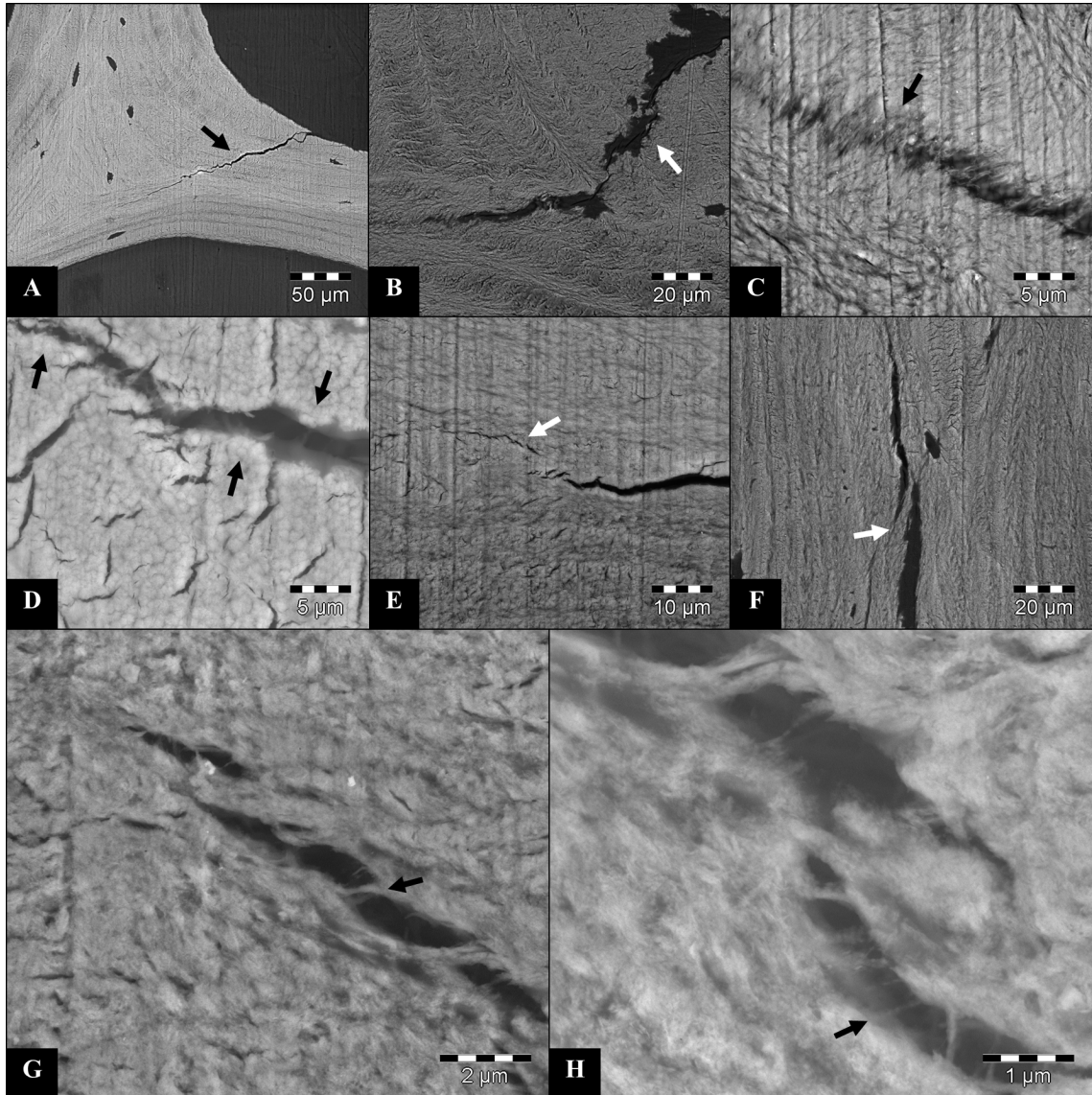


Abbildung 11: Mikrorisse des Knochengewebes im REM:

A scharfkantige und glatt berandete Rissufer (↑) bei intakter Knochenstruktur; **B** stumpfe Rissufer (↑) bei nekrotisch verändertem Knochengewebe; **C** fetzenartige Ausziehungen (↑) der Rissufer; **D** kugelig-knäuelartige Veränderungen (↑) am Rissufer; **E** Vorrisse (↑) parallel zur Ausbreitungsrichtung eines Mikrorisses; **F** Überbrückung der Rissufer durch eine ungebrochene Lamelle (↑); **G** Rissüberbrückung durch Fasern (↑); **H** Fibrillierungen (↑) an der Risspitze als Hinweis auf einen crazeartigen Prozess (REM, BSE-Materialkontrast)

Nach einer Vorauswahl der mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektierten Mikrorisse wurden 22 Defekte mittels REM weiter untersucht. Von diesen lagen 18 in der Nekrosezone, zwei in der Übergangszone und der Rest in anderen Bereichen der nekrotischen

Femurköpfe. Im Rissverlauf ließen sich bei 14 Mikrorissen gesunde Knochenstrukturen mit scharfen Lamellengrenzen nachweisen. Parallel waren aber auch in der Umgebung bei 16 Mikrorissen unscharfe Lamellen und bei acht Rissen amorphes Gewebe zu finden. Interessant waren die Rissufer, die sich sehr unterschiedlich darstellen konnten. So wirkten sie in Bereichen intakter Struktur scharfkantig und gerade (Abb. 11 A), wogegen bei verändertem Knochengewebe auch die Risskanten stumpf und unregelmäßig aussahen (Abb. 11 B). Neben hypermineralisierten amorphen Bereichen, die von den Mikrorissen nicht erreicht wurden, zeigten sich Auflockerungen der Faserstruktur. Letztere führten zu fetzenartiger (Abb. 11 C) oder kugelig-knäuel förmiger (Abb. 11 D) Materialmorphologie, die sich an den Rissufern fortführte. Auf die Veränderungen der Knochenstruktur bei Osteonekrose wird in Kapitel 4.3.2 näher eingegangen.

Bei sechs Defekten bestanden Vorrisse im Knochengewebe, die dem Riss in Ausbreitungsrichtung parallel voraus gingen (Abb. 11 E). Bei weiteren neun Rissspitzen waren Überbrückungen durch so genannte *uncracked ligaments* nachweisbar. Sie wurden durch intakte Lamellen (Abb. 11 F) oder Fasern (Abb. 11 G) gebildet. Weiterhin konnten Fibrillierungen an der Rissspitze im Sinne eines crazeartigen Prozesses bei drei der 22 im REM untersuchten Mikrorisse gefunden werden (Abb. 11 H). Alle an der Spitze überbrückten Mikrorisse zeigten in der unmittelbaren Umgebung eine nahezu intakte Mikrostruktur. Diese Beobachtung deckt sich mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen, bei denen Rissüberbrückungen hauptsächlich bei scharf abzubildendem Knochengewebe zu finden waren. Allerdings bestand keine vollständige Konsistenz mit den REM-Untersuchungen, da die Überbrückungen der Rissufer im Fluoreszenzmikroskop teilweise nicht sichtbar waren. In Voruntersuchungen hatten sich bei 24 Mikrorissen *uncracked ligaments* gezeigt.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Darstellung der Osteonekrose

An ausgewählten Proben wurden für die Untersuchung der Mikro- und Nanostruktur des nekrotischen Knochengewebes elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Ziel war hierbei die Darstellung der Knochenmatrix, wobei die zellulären Anteile aufgrund der Aufnahmetechnik nicht beurteilt werden konnten. Bilder der **Rasterelektronenmikroskopie** zeichnen sich durch eine hohe Tiefenschärfe bei gleichzeitig sehr gutem Auflösungsvermögen aus. Dadurch ist das REM besonders für die Darstellung von Oberflächen geeignet und wurde für die Analyse der Strukturveränderungen bei Osteonekrose verwendet.

Bereits in Übersichtsaufnahmen fiel im nekrotischen Knochen eine Anhäufung und veränderte Morphologie der Osteozytenlakunen auf. Die Lakunen wirkten zusammengedrängt, vergrößert und hatten nicht mehr ihre typische Linsenform. Stattdessen waren die Ränder ausgefranst, sodass die Löcher im Knochengewebe wie „Mottenfraß“ aussahen (Abb. 12 A). Bei höheren Vergrößerungen zeigte sich die Knochenmatrix oft aufgelockert und wolkig. Dadurch entstanden Strukturen, die wie kugel- oder knäuel förmige Agglomerate erschienen (Abb. 12 B). Die typische Querstreifung der mineralisierten Kollagenfibrillen, die mit dem REM in gesundem Knochengewebe sichtbar ist, ließ sich auch bei höchsten

Vergrößerungen nur schlecht darstellen.

Sowohl in der Spongiosa als auch in den verdichteten Kompakta-ähnlichen Bereichen konnten durch verschiedene Grauwerte unterschiedlich mineralisierte Lamellenstapel und Osteone ausgemacht werden (Abb. 12 C). Besonders im Kern von Trabekeln fanden sich helle hypermineralisierte Zonen, in denen die Strukturgrenzen nur schlecht erkennbar waren. In feinen Rissen waren gelegentlich überbrückende Fasern erkennbar, es bestanden jedoch hier keine Osteozytenlakunen (Abb. 12 D). Demgegenüber waren die hypomineralisierten Randbereiche oft mit den oben genannten atypischen Lakunen versehen und grenzten teilweise an die Resorptionszonen, die durch Howship-Lakunen gekennzeichnet sind (Abb. 12 E). Hier wirkten die Lamellengrenzen unscharf und waren teilweise gänzlich verschwunden. Die Grenzen zwischen den hyper- und hypomineralisierten Bereichen waren immer scharf abgebildet.

Die ummauerten Trabekel in der Umbauzone wiesen als Randanbau Tafelosteone mit normaler bis leicht unscharfer Struktur auf, während im Kern nekrotische Bereiche zu finden waren. Vereinzelt kam auch eine Mikropetrosis vor, die mit älteren Gewebeanteilen assoziiert wird. In der unmittelbaren Umgebung der verkalkten Osteozytenlakunen war kaum reguläre Strukturierung sichtbar (Abb. 12 F).

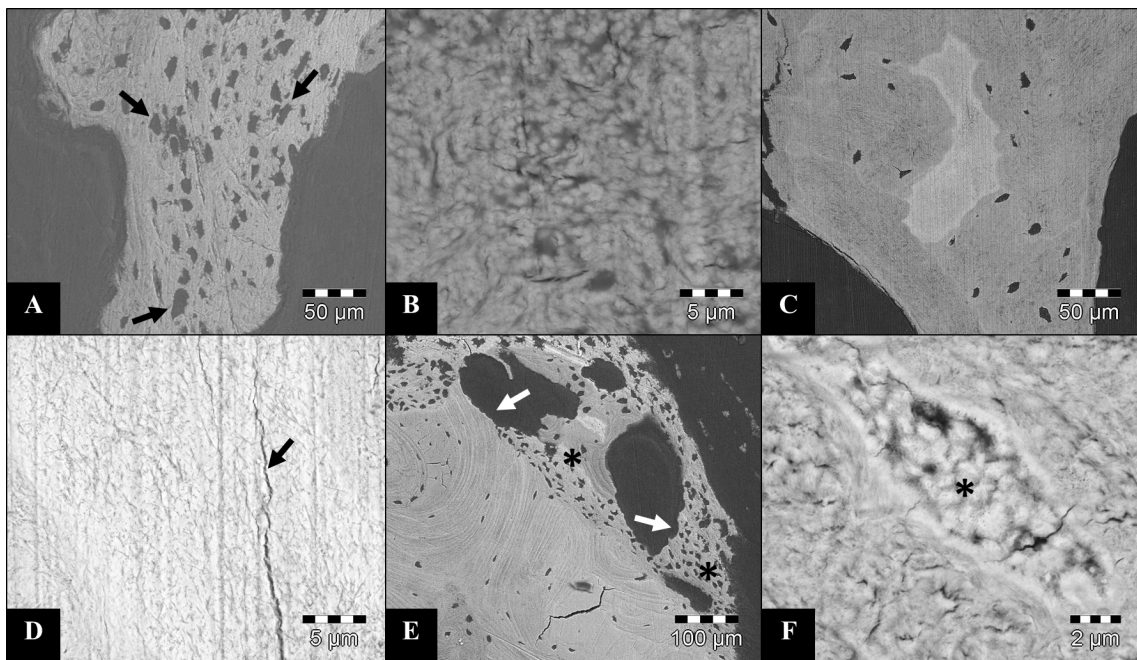


Abbildung 12: Nekrotisches Knochengewebe im REM:

A dicht gedrängte Osteozytenlakunen (↑) mit veränderter Morphologie; **B** kugelig-knäuelartige Veränderung der Knochenmatrix; **C** verschiedene Grauwerte des Knochengewebes als Hinweis auf unterschiedliche Mineralisierungsgrade; **D** hypermineralisierte Region, Schleifartefakte auf der Oberfläche, feiner Riss mit überbrückenden Fasern (↑); **E** hypomineralisierter Randbereich mit atypischen Osteozytenlakunen (*), unscharfe Lamellengrenzen, Howship-Lakunen (↑); **F** Mikropetrosis (*) im Kern eines ummauerten Trabekels, irreguläre Struktur in der Umgebung (REM, BSE-Materialkontrast)

Mit dem **TEM** können hochauflösende Aufnahmen von Ultradünnschnitten der mineralisierten Knochenmatrix angefertigt und die Anordnung der Mineralkristalle analysiert werden. Diese Technik wurde verwendet, um Veränderungen der Morphologie, Größe

und Organisation des Minerals, das in enger Beziehung zur Kollagenmatrix steht, bei nekrotischem Knochengewebe zu untersuchen. In allen Ultradünnschnitten fanden sich überwiegend normale Kristallanordnungen, wie sie von gesundem Knochengewebe bekannt sind. Durch die anisotropen Eigenschaften des Materials hängt das elektronenmikroskopische Bild der mineralisierten Kollagenfibrillen vom Winkel zwischen Schnittebene und Faserausrichtung ab. Bei ungefähr paralleler Ausrichtung war eine typische Querstreifung zu erkennen, die durch die regelmäßig auf dem Kollagenstrang angeordneten quaderförmigen Kristalle entsteht (Abb. 13 A). Teilweise ließen sich hier einzelne Calciumhydroxylapatit-Kristalle abgrenzen, die in der Aufsicht einem Rechteck mit abgestumpften Ecken, und bei Lage senkrecht zur Schnittebene einer Nadel gleichen (Abb. 13 B). Ihre Größe wurde an allen Präparaten bestimmt und die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3.3 dargestellt. Die bereits bei anderen Mikroskopietechniken mit niedrigeren Vergrößerungen sichtbaren Anordnungen von parallelen oder in Fischgrätenmustern liegenden Kollagenfasern ließen sich ebenfalls an einigen Stellen nachweisen (Abb. 13 C). Wurden die mineralisierten Kollagenfibrillen quer geschnitten, zeigte sich der Proteinanteil indirekt durch ein helles Loch, um welches die Mineralkristalle auf Kante in mehreren Schichten angeordnet lagen (Abb. 13 D). Das Kollagen selbst bildet im TEM keinen Kontrast, weshalb nur das Mineral einen Hinweis liefert, wie die Fibrillen ausgerichtet sind.

Neben den zuvor genannten regelmäßigen Anordnungen des Calciumhydroxylapatits, die mit dem Bild gesunden Knochengewebes übereinstimmen, fanden sich im nekrotischen Knochen auch wiederkehrend Strukturen, die einem pathologischen Prozess zuzuordnen sind. In vielen Regionen fehlte die regelmäßige Ausrichtung und Form des Minerals. Es zeigten sich verwirbelte Strukturen, in denen sich Agglomerate des Calciumhydroxylapatits bildeten (Abb. 13 E). Die Kristalle besaßen keine einheitliche Größe, waren sehr dicht gepackt und hatten eine ovale Form (Abb. 13 F). Dadurch ließen sich die oben genannten Messungen der Kristallgröße nicht durchführen. Hinweise auf das Vorhandensein und die Morphologie des Kollagens ergaben sich in diesen Bereichen nicht. Oftmals standen jedoch gesunde und anormale Strukturregionen in enger Nachbarschaft.

Durch Zielpräparation auf Bereiche in der Nekrosezone konnten weitere Veränderungen dokumentiert werden, die zur Morphologie der Osteonekrose gehören. In Probe HK5N fanden sich Flecke mit einer Größe von etwa $3\ \mu\text{m}$ bis $15\ \mu\text{m}$, in denen sich Mineral als desorganisierte granuläre Ansammlung befand (Abb. 14 A). Von der Größe und Form ähnelten sie stark den Osteozytenlakunen. Einzelne Kristalle ließen sich hier nicht voneinander trennen, aber es zeigte sich eine scharfe Abgrenzung zur umliegenden Struktur, die eine unscharfe Querstreifung aufwies. Parallele Risse durch die granuläre Struktur sind als Schneidartefakte zu betrachten. In einem anderen Bereich der Probe HK5N direkt am subchondralen Kollaps waren mineralfreie Zonen unterschiedlicher Größe und Form mit dazwischen liegenden runden Kristallagglomeraten sichtbar, die teilweise zu größeren Arealen verschmolzen (Abb. 14 B). Die Agglomerate wiesen eine räumliche Orientierung der einzelnen Kristalle und teilweise eine Querstreifung auf, wobei keine scharfe Abbildung der Strukturen gelang (Abb. 14 C). Im Überblick war für die räumliche Dichte der mineralisierten Inseln ein Gradient nachweisbar. Auf der einen Seite mit hoher Mineral-

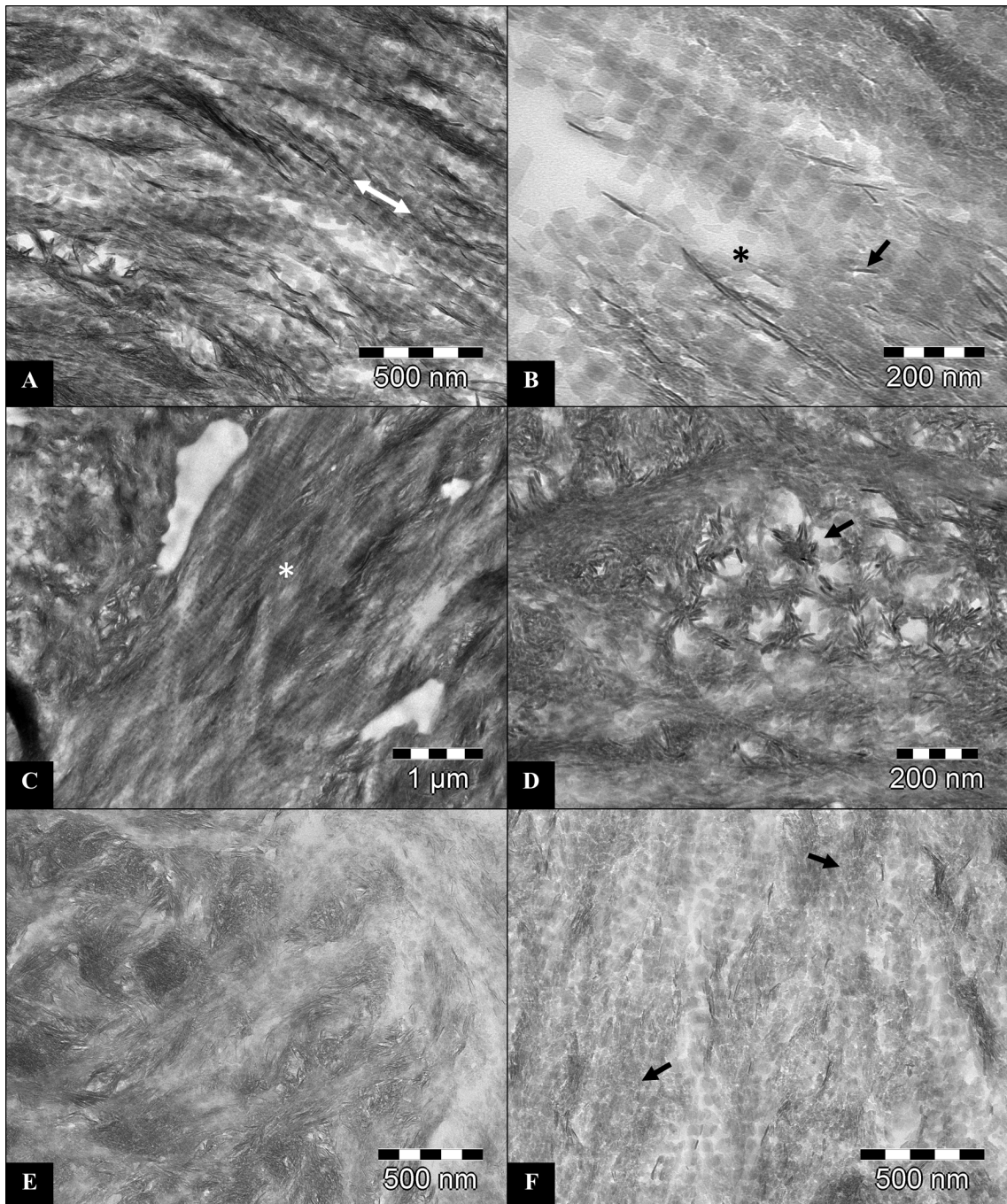


Abbildung 13: Typische Strukturen bei gesundem und nekrotischen Knochen im TEM: **A** Querstreifung der Kollagenfibrillen bei Faserverlauf (\updownarrow) parallel zur Schnittebene; **B** einzeln abgrenzbare Mineralkristalle in Aufsicht als Rechteck mit abgestumpften Ecken (*) und hochkant als Nadelform (\uparrow); **C** alternierende Muster von parallel gelagerten mineralisierten Kollagenfasern (*); **D** quer geschnittene Kollagenfibrillen mit um das Protein angeordneten Mineralkristallen, wegen fehlendem Kontrast ist das Kollagen als „helles Loch“ abgebildet (\uparrow); **E** verwirbelte Strukturen bei Osteonekrose, klare Muster fehlen; **F** veränderte Mineralkristalle, dicht gepackt (\uparrow), daneben normale Kristalle

dichte bildeten die Grenzen zwischen den Agglomeraten eine wabenartige Struktur und die Kristalle waren unregelmäßig granulär darstellbar (Abb. 14 D). Die andere Seite war durch eine Rarefizierung der Kristallinseln und vergrößerte Abstände gekennzeichnet, bis kein Mineral und damit keine Struktur mehr abzubilden war.

In einem anderen Bereich der Probe HK5N bestand ein Übergang von einer mineralisierten Matrix mit geordneter Struktur zu einer kontrastarmen Zone, in der kein Mineral nachzuweisen war. Im Grenzbereich waren vereinzelte Kristalle sichtbar, die sich teilweise in Gruppen von der regelmäßigen Struktur zu lösen schienen (Abb. 14 E). Die unmittelbare Umgebung war durch Zellen gekennzeichnet, die Anhand ihrer Form und den Schatten des Zellkerns erkennbar waren (Abb. 14 F). Aufgrund der fehlenden Kontrastierung konnte keine weitere Differenzierung der Zellen erfolgen. Auch in der Probe HK23 ließ sich ein Übergang von einem geordnet mineralisierten zu einem kristallfreien Bereich darstellen. Hier fand sich eine scharfe Abgrenzung zu einer zwischengeschalteten Zone mit verwirbelten Strukturen und veränderten Kristallen (Abb. 14 G). Eine Aufnahme von HK8N zeigte eine ähnliche Kristallstruktur, allerdings war hier noch eine deutliche Ausrichtung entlang von Kollagenfasern und ein Orientierungswechsel erkennbar (Abb. 14 H). In anderen Bereichen waren ebenfalls Überreste der regelmäßigen Anordnung des Minerals um Kollagenfasern zu erkennen. Diese Regionen waren durch sowohl normale als auch veränderte Kristalle gekennzeichnet, die verkleinert, Form-verändert und in Gruppen zusammengedrängt vorlagen (Abb. 14 I).

4.3.3 Morphologie der Hydroxylapatit-Kristalle

Bei der Untersuchung der Knochenproben mittels TEM wurde neben der Analyse der strukturellen Veränderungen eine besondere Betrachtung der Mineralkristalle durchgeführt. Im Vordergrund standen die Größe und Form der Hydroxylapatit-Plättchen, da hier Abweichungen durch die pathologischen Prozesse bei der Osteonekrose vermutet wurden. Wie bereits in Kapitel 4.3.2 dargestellt, war die Struktur in großen Teilen der Proben regelmäßig und entsprach dem gesunden Knochengewebe. In diesen Bereichen, die häufig auch in enger räumlicher Beziehung zu den oben genannten pathologischen Veränderungen standen, wurden normal geformte Hydroxylapatit-Kristalle vermessen (Abb. 15 A). In den Zonen, bei denen die bekannte regelmäßige Anordnung nicht darstellbar war, konnten kaum Werte für die Länge, Breite und Dicke einzelner Kristalle ermittelt werden. Das lag zumeist daran, dass das Mineral so dicht aneinander gedrängt lag, dass durch Überlagerungen kein einzelner Kristall abzugrenzen war (Abb. 15 B). Durch ihre unregelmäßig ovale Form und die verringerte Größe konnte keine Zuordnung zu den jeweiligen Dimensionen eines Kristalls erfolgen. Allein die Dicke konnte gelegentlich bei hochkant gestellten Mineralplättchen vermessen werden. Deutlich war auch, dass die morphologischen Veränderungen keine regionalen Prozesse sind, bei denen alle Kristalle innerhalb von Strukturgrenzen gleichermaßen betroffen sind. Oft bestanden normale Anordnungen von regelhaft geformtem Mineral unmittelbar neben Agglomeraten aus veränderten Kristallen, teilweise sogar in alternierender Abfolge (Abb. 15 C). Nur in Ausnahmefällen konnten am

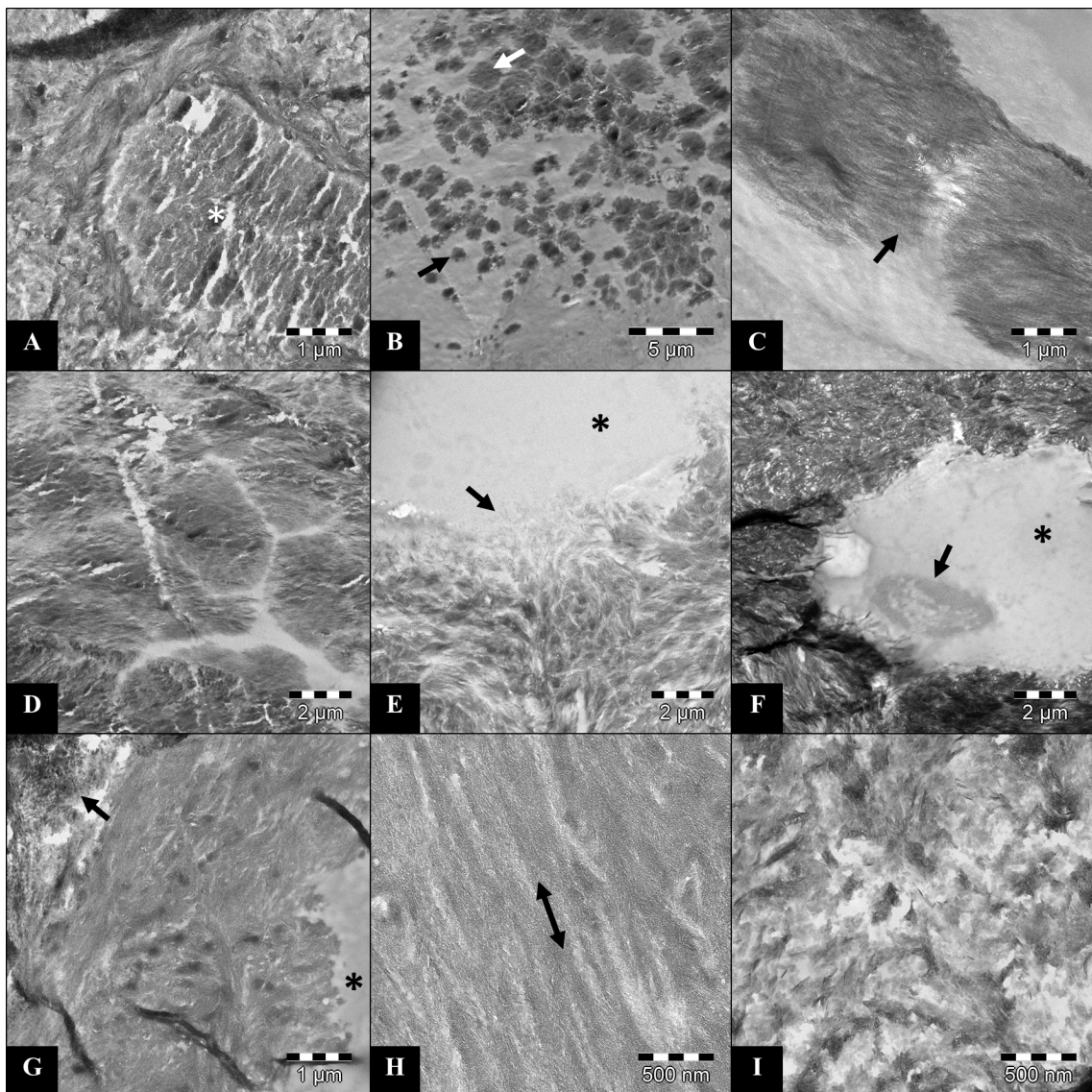


Abbildung 14: Spezielle Strukturveränderungen bei nekrotischem Knochen im TEM:
A desorganisierter Fleck mit granulär verändertem Mineral (*), scharfe Abgrenzung zu umliegenden mineralisierten Kollagenfasern; **B** demineralisierter Bereich mit konfluierenden Inseln (↑) aus Kristallagglomeraten; **C** Vergrößerung aus B, organisierte Mineralkristalle, teilweise Querstreifung (↑); **D** dicht gedrängte Mineralinseln begrenzt durch eine wabenartige Struktur; **E** Übergang zu einem demineralisierten Bereich (*) mit sich von der Struktur lösenden Kristallen (↑); **F** Zelle (*) mit sichtbarem Schatten des Kerns (↑); **G** Übergang von einem geordneten Bereich mit normalen Mineralkristallen (↑) zu einer demineralisierten Region (*), dazwischen scharf abgegrenzt ein Streifen mit verwirbelter Struktur und veränderten Kristallen; **H** Region mit eindeutig erkennbarer Ausrichtung der Kollagenmatrix (⇕), deutlich veränderte Mineralkristalle und kaum Querstreifung; **I** aufgelockerte Struktur, die Orientierung der Kollagenmatrix ist teilweise sichtbar, normale und veränderte Kristalle

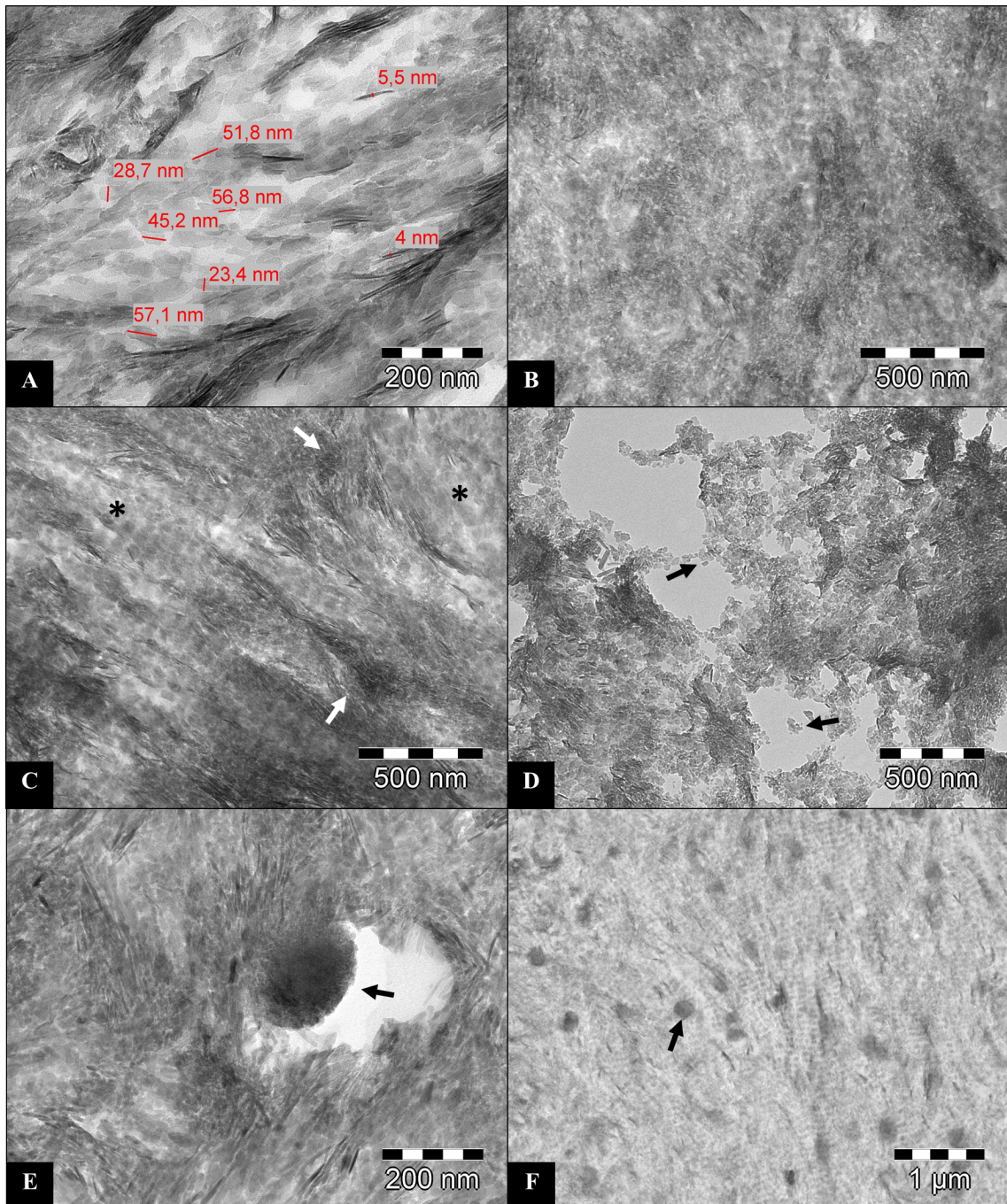


Abbildung 15: Normale und veränderte Mineralkristalle bei nekrotischem Knochen im TEM: **A** Normale Kristalle mit beispielhaften Messungen von Länge, Breite und Dicke; **B** dicht gedrängte Kristalle mit variabler Größe, keine regelmäßige Orientierung erkennbar; **C** Bereich mit normalen Kristallen in regelmäßiger Anordnung (*), dazwischen deutlich verkleinerte und agglomerierte Kristalle (†); **D** einzeln abgebildete Kristalle mit unregelmäßiger Form und Größe (†) am Rand eines Ultradünnschnittes; **E** dichtes Kristallagglomerat (†), vermutlich durch den Schneidvorgang bei der Ultramikrotomie teilweise aus der umliegenden Struktur herausgerissen; **F** unscharf und blass darstellbare Kristalle, dazwischen unregelmäßig dunkle Flecke (†) unbekannter Struktur und Herkunft

Rand eines Präparates auch einzelne veränderte Hydroxylapatit-Kristalle beziehungsweise Fragmente dargestellt werden (Abb. 15 D).

In einzelnen Proben waren morphologische Veränderungen sichtbar, deren Entstehung oder Abgrenzung zu Artefakten von der Präparation unklar blieb. So zeigten sich in Probe KN-1 mehrfach sehr dichte, solide Kristallformationen, die durch den Schneidevorgang bei der Ultramikrotomie aus der umliegenden Struktur herausgerissen zu sein schienen (Abb. 15 E). An anderer Stelle in der Probe HK12N waren regelmäßig angeordnete Kristalle nur sehr blass und unscharf darzustellen. Neben den schon bekannten Agglomeraten veränderter Kristalle bestanden dunkle unregelmäßig angeordnete Flecke, deren Struktur und Beziehung zum umliegenden Gewebe nicht visualisierbar waren (Abb. 15 F).

Die Messungen für die Kristallparameter Länge, Breite und Dicke sind als Mediane für die einzelnen Proben in Abbildung 16 im Säulendiagramm dargestellt. Grundlage waren 2 307 Einzelmessungen an den TEM-Aufnahmen. Als farbige Balken wurden die in der Li-

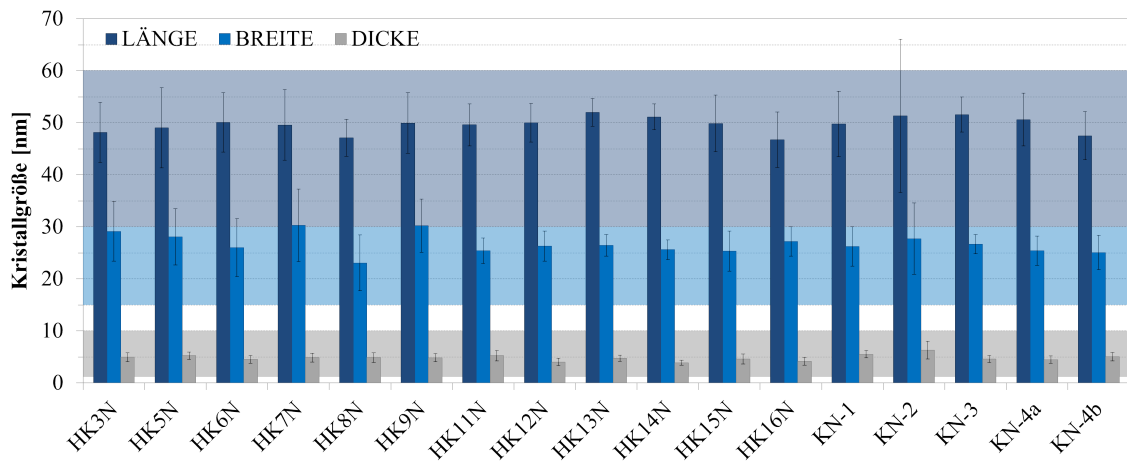


Abbildung 16: Gemessene Kristallgrößen aller Einzelproben (Länge, Breite, Dicke in nm)

teratur angegebenen, je nach Studie variierenden Maße von gesundem Knochen Grenzen hinterlegt (vgl. Tab. 8). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten aus den Untersuchungen der Femurkopf- und Kieferknochenproben, sodass hier keine Unterscheidung der Probenart vorgenommen wird. Nach Auswertung aller Messwerte von allen Knochenproben sind die Ergebnisse in Abbildung 17 zusammengefasst. Die Mediane der Kristalllänge lagen für alle Proben in den Literaturgrenzen und es zeigte sich nur eine geringe Streuung zwischen den einzelnen Proben. Als Streumaß ist zusätzlich die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung vom Median abgebildet, die analog zur Standardabweichung berechnet wird. Die entsprechenden Fehlerindikatoren gehen nur für die Probe KN-2 deutlich über die Literaturwerte hinaus. Der Median der Kristalllänge für alle Proben lag bei 49,9 nm. Bei den Medianen der Breite der Mineralkristalle wichen die Proben HK7N und HK9N mit je 30,3 nm leicht ab. Hier zeigten sich geringfügig verbreiterte Kristalle, wobei der Median über alle Proben mit 26,7 nm dennoch innerhalb der Literaturgrenzen liegt. Für die Kristalldicke konnte ebenfalls keine Abweichung vom gesunden Knochen festgestellt werden. Über alle Proben ergab sich nur eine sehr geringe Varianz der Messwerte, deren Median bei 4,9 nm lag.

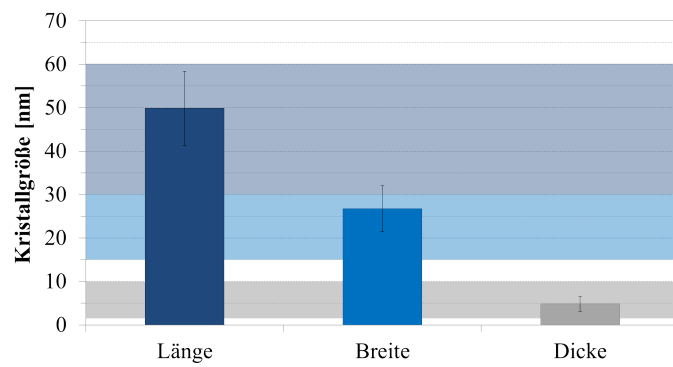


Abbildung 17: Durchschnittliche Kristallgrößen dieser Studie (Länge, Breite, Dicke in nm)

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Knochenproben von Femurkopfnekrosen und Kiefernekrosen histologisch aufgearbeitet und untersucht. Ziel war die Darstellung der Schadensentwicklung bei Osteonekrose mit Fokus auf die extrazelluläre Matrix. Dazu wurde vom makroskopischen Befund ausgegangen und über lichtmikroskopische Untersuchungen bis zur Elektronenmikroskopie die Knochenstruktur analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der geordneten Strukturen sich auf allen Strukturebenen nachweisen lässt. Weiterhin wurden mikromechanische Mechanismen dargestellt, die einen Hinweis auf Stabilitätsfaktoren geben, welche durch Veränderungen des Knochengewebes beeinträchtigt werden.

5.1 Die Schadensentwicklung bei Osteonekrose

Osteonekrose betrifft am häufigsten den Femurkopf. Es werden verschiedene Ursachen diskutiert, insbesondere sekundäre vaskuläre Veränderungen stehen im Vordergrund. Am meisten wird jedoch die idiopathische avaskuläre Femurkopfnekrose diagnostiziert. In der Literatur wird beschrieben, dass das Krankheitsbild vornehmlich bei männlichen Patienten im Alter von 30 bis 60 Jahren auftritt und die Schädigung über Monate bis Jahre progredient verläuft. Zur Stadieneinteilung wird in Deutschland die ARCO-Klassifikation empfohlen [1, 16, 19, 22, 30]. Für die Spender lag das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Resektion mit 62 Jahren über den Literaturwerten. Die Differenz kommt möglicherweise dadurch zustande, dass die definitive operative Versorgung mittels Endoprothese erst im späten Stadium (ARCO III und IV) indiziert ist [19]. Üblicherweise wird zu Beginn durch konservative Therapiemaßnahmen und kleinere operative Eingriffe versucht, das natürliche Gelenk zu erhalten. Dementsprechend waren bei drei Spendern in vorangegangenen Jahren Dekompressionsbohrungen und bei einem Patienten eine gefäßgestielte Fibulaplastik durchgeführt worden. Diese dienen dazu, die vaskuläre Versorgung des Femurkopfes zu verbessern und dadurch körpereigene Reparaturprozesse zu fördern. Bei den über 70-jährigen Spendern waren keine operativen Maßnahmen in der Vorgeschichte bekannt. Da bei ihnen meist zusätzlich eine Arthrose bestand, wurde die Indikation zur totalendoprothetischen Versorgung gestellt. Unbekannt ist bei den älteren Patienten, ob die Osteonekrose sekundär durch die arthrotischen Veränderungen entstanden war, oder umgekehrt die *Arthrosis deformans* eine sekundäre Arthrose initiiert hat, die letztlich zu den Beschwerden führte. Die genauen zeitlichen Zusammenhänge und Pathomechanismen, die letztlich zur Osteonekrose geführt hatten, blieben unklar und bedürften einer gesonderten umfangreichen klinischen Forschung. Unabhängig davon konnten in allen Knochenproben histologisch Nekrosezonen festgestellt und den weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

Die Diagnose- und Indikationsstellung zur Resektion des Kieferknochens erfolgte durch die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Der klinische und histologische Befund sowie die Vorgeschichte mit Bisphosphonatbehandlung sprechen für das Vorliegen einer BRONJ. Da bei allen Spendern maligne Grunderkrankungen vorlagen, die potentiell ossäre Metastasen bilden, ist eine Beeinflussung des Krankheitsbildes durch Tumorzellen nicht auszuschließen. Hinweise, dass es sich bei den Knochenläsionen im Kiefer um Metastasen handelt, ergaben sich jedoch nicht.

5.1.1 Histologische Untersuchungen

Bei den meisten **Femurköpfen** wurden bereits im nativen Zustand makroskopische Hinweise auf eine Osteonekrose sichtbar. Die Ursache der Deformationen und der Nachweis einer Nekrosezone konnten aber nur nach histologischer Aufarbeitung gefunden werden. Neun Femurköpfe wiesen mit einer subchondralen Trümmerzone und der damit verbundenen Ablösung des Knorpels von der Knochenstruktur das morphologische Korrelat zum radiologischen *crescent sign* auf. Diese Folge des Kollaps der Spongiosa ist der deutliche Hinweis, dass die Osteonekrose mit einem Verlust der Stabilität des Knochengewebes einhergeht. Entsprechend der makroskopischen Befunde befanden sich zwei Femurköpfe (HK3N und HK11N) im Stadium ARCO III und alle anderen im Stadium ARCO IV mit Konturveränderungen im Sinne einer *Arthrosis deformans*. Bei dem Femurkopf HK14N ist es zu einer Extremform der Deformierung gekommen, sodass die ursprünglich Kugelform nicht mehr auszumachen war (Abb. 4 C). Die Indikation zur operativen Versorgung wurde bei der Spenderin erst sehr spät gestellt, da sich die Femurkopfnekrose bei vorbestehender Querschnittslähmung erst durch das mechanische Problem gezeigt hatte. Bis dahin war die Kalotte bereits vollständig zusammengesintert und es hatte sich gelenkseitig eine dicke Sklerosekappe gebildet. Trotz des sehr spätem Stadiums und der massiven Umbauvorgänge waren im Bereich der Spongiosa auch frische Nekroseareale zu finden, die mit in die Untersuchungen eingebunden wurden.

Vier Femurköpfe wiesen bei der makroskopischen Untersuchung Frakturen mit teilweise zerrissenem Knorpel auf. Diese Schäden sind iatrogen bei der operativen Resektion entstanden. Auch dadurch zeigte sich die Instabilität des Knochengewebes, da der Femurkopf normalerweise bei der Resektion im Rahmen der Implantation einer Endoprothese nicht zerbricht.

Bei allen Femurköpfen gelang neben dem Beleg der zuvor genannten indirekten Zeichen auch der direkte histologische Nachweis von Nekrosezonen. Die Ursache für die lokale Begrenzung der Osteonekrose ist ein Hinweis auf die ischämische Genese des Krankheitsbildes. Als Diagnosekriterien galten die leeren Osteozytenlakunen, verstrichene Strukturgrenzen, sowie frische Markraumnekrosen und damit verbundener Detritus [1, 8, 20–22]. Da es sich bei der Osteonekrose um eine langsam progrediente Knochenerkrankung handelt, beeinflussen nach kurzer Zeit Umbau- und Reparaturvorgänge des Gewebes das Krankheitsbild. Der Umbau geht vom Rand der Nekrosezone aus und führt in den Übersichtsbildern zu einer unregelmäßigen Strukturierung der Spongiosa (Abb. 6 B & D). In der Literatur

werden plumpe, verbreiterte Trabekel beschrieben, die durch den Anbau neuen Knochenmaterials entstehen. Entsprechend dem radiologischen und makroskopischen Bild wird dieser Vorgang auch als Sklerosierung bezeichnet [1, 8, 21, 22]. Bei den histologischen Untersuchungen dieser Studie fanden sich zum einen nekrotische Trabekel, die durch vitale Tafelosteone ummauert und dadurch verbreitert waren (Abb. 7 B). Zum anderen bestanden durchgehend vitale Trabekel mit homogener Struktur, deren Querschnitt über die normalen 300 μm bis 400 μm hinaus ging. Besonders in Kreuzungsbereichen waren bei diesen plumpen Trabekeln konzentrische Lamellen mit zentralem Gefäßkanal zu finden, die sonst für kompakten Knochen typisch sind (Abb. 7 C). Offensichtlich handelt es sich bei diesem Phänomen um eine Notwendigkeit, um die Nutrition des Trabekelkerns zu sichern, da die Diffusionsstrecke zum nächsten Blutgefäß durch den Umbau deutlich verlängert wird [4]. In den Übersichten zeigte sich als Ausdruck der Veränderung der Trabekel ein Gradient der Dichte der Spongiosa vom Zentrum des Femurkopfes bis subchondral. Normal wäre eine homogene Verteilung mit regelmäßigen Abständen und Durchmessern der Trabekel, die sich gegebenenfalls entlang der Krafttrajektorien ausrichten [2, 4]. Eine scharfe Abgrenzung der Nekrosezone gelang durch die Umbauvorgänge im Randbereich selten. Dennoch waren bei fast allen Femurköpfen Regionen mit gesundem Fettgewebe im Markraum, das auf Vitalität des Gewebes hinweist, zu finden.

Das histologische Bild der **BRONJ** wird als zentrale Osteonekrose mit umgebender Entzündungsreaktion und Osteosklerosesaum beschrieben. In der Nekrosezone kommt es zur Markraumnekrose und Zerstörung der Matrix, was dem aus anderen Skelettregionen bekannten Bild entspricht. Im Zentrum der Läsion sind laut Literatur leere Howship-Lakunen und keine Entzündungszellen zu finden [20, 33, 35, 39]. Das Gewebe stellte sich in dieser Studie als ein Nebeneinander von kompaktem Lamellenknochen und ungeordnetem Knochengewebe dar (Abb. 8 C). Es zeigten sich Osteone und Lamellenstapel mit wenig vitalen Zellen, unscharfen Strukturgrenzen und vielen Blutresten in Hohlräumen. An den Innenwänden einiger Hohlräume waren Howship-Lakunen, aber keine Osteoklasten nachzuweisen (Abb. 8 A). Diese Befunde stimmen mit den oben genannten Beschreibungen überein. Eine gängige These ist, dass die Bisphosphonate durch die Hemmung der Osteoklasten das *Remodeling* und damit auch die Reparaturmechanismen des Knochens stören [38]. Das Fehlen der Osteoklasten in den vorliegenden Proben könnte ein Hinweis auf diesen Teil des Pathomechanismus sein. Denkbar sind ebenso Artefakte durch die Bearbeitung der Knochenresektate, weshalb bei der geringen Probenzahl keine genaueren Hinweise zu dieser Fragestellung zu erwarten waren. Der zuvor beschriebene Sklerosesaum mit Entzündungsreaktion konnte ebenfalls nicht dargestellt werden. Offensichtlich handelte es sich bei den Resektaten um Teile des zentralen Nekroseareals, dessen pathologische Strukturierung gut dargestellt werden konnte. Die peripheren Anteile und umgebendes Weichgewebe fehlten.

5.1.2 Mikromechanische Prozesse bei Osteonekrose

Die Instabilität des Knochengewebes führte zu einer Reihe weiterer Veränderungen, die auf die Schädigung und daraus resultierende Umbauvorgänge zurückzuführen sind. Laut Adler 2004 und Filler et al. 2005 kommt es durch die verminderte Widerstandsfähigkeit bei Stresseinwirkung zu subchondralen Mikrofrakturen, die schließlich den Kollaps der Kalotte zur Konsequenz haben [1, 22].

In dieser Studie fand sich entsprechend der Erwartung für die Nekrosezonen eine erhöhte Mikrorissdichte im Vergleich zu anderen Regionen des Femurkopfes. Oft waren ein deutlicher Kollaps der Kalotte und darunter viele kleine Trabekelfragmente sichtbar, wobei der Gelenkknorpel und die subchondrale Grenzlamelle meist intakt blieben. Dieser Befund spricht für eine physiologische nutritive Versorgung über die Gelenkflüssigkeit [8, 18]. Die These, dass eine Akkumulation von Mikrorissen schließlich zum Versagen der Spongiosa führt, scheint damit anhand der bildmorphologischen Befunde bestätigt zu sein. Ein weiterer Befund der histologischen Untersuchung weicht allerdings von dieser Vorstellung ab. In manchen subchondralen Bereichen mit nekrotischen Veränderungen stellten sich die Trabekel sehr dünn und mit verformten Oberflächen dar (Abb. 7F). Die Knochenbälkchen wirkten so, als wären sie durch Stauchungen und Biegungen duktil verformt worden. Zudem kamen in diesen Regionen kaum Mikrorisse vor. Denkbar ist hier ein differenter Schädigungsmechanismus, der zu einer Minderung der Sprödigkeit des Knochengewebes führt, wodurch eine plastische Verformung ohne Bruch ermöglicht wird.

Mikrorisse traten weiterhin vermehrt in der durch verdickte Trabekel gekennzeichneten Umbauzone auf. Auch die makroskopisch sichtbaren Knochenläsionen und artifiziellen Defekte lagen immer in der Nekrosezone oder dem Übergangsbereich. Der Durchmesser und die Dichte der Knochenbälkchen hatten dabei keinen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von Mikroschäden. Die Vergrößerung des Querschnitts durch den Umbau führt somit zu keiner suffizienten Sicherung der Stabilität des Femurkopfes. Mikrorisse waren nicht auf ältere und ummauerte Gewebeanteile beschränkt, sondern betrafen ebenso den Knochenanbau. Somit ist die Vitalität des Materials nicht der alleinige Faktor, sondern auch die Stabilität des gesamten Femurkopfes und die Kraftüberleitung sind entscheidend für die Risseinleitung an sogenannten Schwachstellen.

In Relation zum Gitternetzwerk der Spongiosa traten Mikrorisse im Bereich von Kreuzungen und entlang der Trabekel gleichermaßen auf. Dies spricht für eine ausgeglichene Verteilung der Spannungen im Knochengewebe bei Krafteinwirkung. Aufgrund der schwammartigen Struktur der Spongiosa sind Messungen, Simulationen und Vorhersagen von Spannungskonzentrationen äußerst kompliziert [43]. Seit langem ist aber die Ausrichtung des Trabekelnetzwerks an Krafttrajektorien bekannt [2, 4]. Das heißt, dass entlang der Längsachse der Trabekel hauptsächlich Druck- und Zugkräfte wirken. Beim Vergleich zu bekannten Modellen der Bruchmechanik von langen Röhrenknochen fällt auf, dass hier eine ähnliche Anisotropie der mechanischen Eigenschaften vorliegen könnte. Knochen reagiert relativ empfindlich auf Biegung. Dabei kommt es auf der konvexen Seite zu Zugbelastungen, die bei Überschreitung der Belastungsgrenzen auf dieser Seite zu ei-

ner **Risseinleitung** senkrecht zur Längsachse des Röhrenknochens führen [67]. In dieser Analyse des Knochengewebes erfolgte die Risseinleitung bevorzugt quer zur Trabekeloberfläche. Danach kam es häufig zur Ablenkung an den Lamellengrenzen, wodurch der Riss entlang der Längsrichtung des Trabekels auslief. Dieses Verhalten entspricht den Deformationsmechanismen in der gesunden Spongiosa [68].

An Frakturoberflächen kam es gelegentlich auch zur Einleitung von Längsrissen. Vermutlich hat hier bereits ein Querriss vorgelegen, der bis zur Fraktur geführt hat, und die Längsrisse entstanden durch Ablenkungen des ursprünglichen Risses. Auch ein neuer Einriss an der frakturierten und damit geschädigten Oberfläche ist denkbar. Die korrespondierende Frakturoberfläche ließ sich jedoch nur selten finden, sodass keine vollständige Analyse des Bruchmechanismus möglich war. Insgesamt waren Längsrisse im Trabekel und Mikrorisse ohne Kontakt zur Oberfläche sehr selten. Eine Ausnahme bildeten Risse im nekrotischen Kern, die quer von einem Tafelosteon zum nächsten zogen. Die meisten Längsrisse mussten als Artefakte der Präparation ausgeschlossen werden, da gerissenes Einbettmittel ein Hinweis auf ihre Entstehung nach der Einbettung war. Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen anderer Studien, die vornehmlich Längsrisse entlang von Kitt-Linien und im interstitiellen Knochen der Trabekel beschrieben haben [66, 69].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das **Rissablenkungsverhalten** verändert, wenn die Strukturgrenzen schlechter darstellbar waren. Studien von Choi, Goldstein (1992) sowie Launey et al. (2010) hatten gezeigt, dass Mikrorisse im Knochen an Lamellen, Osteonen, Kitt-Linien und anderen Diskontinuitäten abgelenkt und teilweise sogar gestoppt werden [46, 48]. In Regionen mit normaler, scharf darstellbarer Struktur konnten eben diese Mechanismen nachgewiesen werden. Besonders deutlich traten Rissablenkungs- und -stoppmechanismen an Strukturgrenzen in der Umbauzone hervor. Durch den Anbau von neuem Knochengewebe entsteht zwischen dem Tafelosteon und dem meist nekrotisch veränderten Trabekelkern ein scharfer Umbruch, der durch ausgezogene Kitt-Linien gekennzeichnet ist. Eben diese Strukturgrenze führte entweder zum unmittelbaren Stopp oder zu sehr starken Ablenkungen des Mikrorisses mit Verlauf entlang der Kitt-Linie. Dabei war es unerheblich, ob der Riss vom Trabekelkern oder dem Tafelosteon ausging. Es ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung dieser Verbindungsstellen signifikant vom umgebenden Knochengewebe unterscheidet. Der Mineralgehalt ist geringer und Kollagen kommt kaum vor. Dafür ist der Schwefelgehalt signifikant erhöht, was auf das vermehrte Vorkommen von Glykosaminoglykanen hinweist. Umstritten ist, ob die Kitt-Linien mechanische Schwachstellen sind, oder zur Widerstandsfähigkeit des Knochengewebes beitragen [4, 70]. Offensichtlich bestehen an den Kitt-Linien in der Umbauzone nur schwache Bindungen zwischen dem alten nekrotischen Knochen und dem frisch angebaute Knochengewebe, weshalb es zur Deflektion der Mikrorisse und dem Auslaufen entlang dieser Strukturgrenze kommt.

Bei nekrotischen Veränderungen des Knochengewebes waren vermehrt Strukturgrenzen darstellbar, die keinen Einfluss auf den Rissverlauf zeigten. Diese Besonderheit wurde verstärkt beobachtet, je schlechter die Lamellen voneinander abzugrenzen waren. Es entspricht der Erwartung, dass durch die Auflösung der Strukturen der Widerstand gegen die

Rissausbreitung sinkt, da die Rissablenkung dabei als wichtiger Mechanismus gilt [46, 70]. Fantner et al. (2006) konnten zeigen, dass neben der intrinsischen Stabilität der mineralisierten Kollagenfasern und Lamellen auch zwischen den Strukturelementen Bindungen bestehen. Diese werden von den Autoren als *sacrificial bonds* bezeichnet und wirken als eine Art Kleber der Delaminierung benachbarter Fibrillenbündel entgegen. Beim Bruch werden zunächst diese Bindungen getrennt. Dabei wird von einer Reversibilität der Schädigung ausgegangen [71]. Übertragen auf die Beobachtungen dieser Studie bedeutet das, dass bei Osteonekrose vor allem die intrinsische Stabilität der Strukturelemente abnimmt. Dadurch kann die Struktur der Rissausbreitung weniger entgegen setzen und es kommt nicht zur üblichen Spaltung der vermeintlich schwächeren *sacrificial bonds*. Entsprechend fehlt die typische Ablenkung an den Strukturgrenzen, wo der Riss normalerweise auch dem Weg des geringsten Widerstands statt nur der Belastungsrichtung folgen sollte.

Ein weiterer Hinweis auf das Nachlassen der Widerstandsfähigkeit des Knochengewebes bei Osteonekrose war die zunehmende Anzahl von vollständigen Frakturen in der Nekrosezone. Als Ursache der Instabilität wird das fehlende *Remodeling* gesehen, wodurch eine Alterung der Knochenstruktur und Akkumulation von Mikroschäden entsteht [1, 22]. Nach Burr (1993) und Mohsin et al. (2006) entstehen die Frakturen ohne die natürlichen Reparaturmechanismen durch die Rissausbreitung und das Erreichen überkritischer Risslängen [15, 70]. Der führende Mechanismus, der die Rissausbreitung begünstigt, ist die Verminderung der Widerstandsfähigkeit des Knochengewebes, die als Bruchzähigkeit bezeichnet wird. Wang et al. (2001) gehen davon aus, dass der Alterungsprozess mit einer Denaturierung des Kollagens einhergeht. Sie konnten nachweisen, dass dies wiederum zu einer Abnahme der Bruchzähigkeit und Festigkeit führt, wobei die Steifigkeit erhalten bleibt [72]. Das heißt, dass zwar der Widerstand gegen elastische Verformung nicht beeinträchtigt wird, aber geringere Spannungen ausreichen, um zu einem Versagen der Knochenstruktur zu führen. Andere Autoren gehen von einer Abnahme der Zähigkeit des Kollagens aus, da durch Alterung vermehrt Querverbindungen zwischen den Molekülen entstehen. Dadurch wird der Proteinanteil des Kollagen-Mineral-Nanokomposits verändert, der für die elastischen Eigenschaften des Knochens verantwortlich ist [7, 46]. Hinzu kommt, dass der Mineralgehalt und damit der bestimmende Faktor für die Steifigkeit des Knochengewebes mit dem Alter zunimmt [42, 46, 47]. Dieser Effekt konnte für die nekrotischen Kernbereiche der Trabekel mit Hilfe der REM-Aufnahmen nachgewiesen werden. Beide Schädigungsmechanismen führen dazu, dass der Knochen spröde wird und damit weniger Energie absorbieren kann, bis er bricht. Gerade die Spongiosa im Gelenkbereich nimmt zyklisch Druckkräfte auf und soll zu einer Dämpfung der stoßartigen Belastungsspitzen beitragen. Verliert das Gewebe seine elastischen Eigenschaften und die Fähigkeit zur zerstörungsfreien Energieaufnahme, resultiert der Bruch der Struktur schon bei geringerer Belastung.

Mikrorisse im Knochen sind durch scharfe Risskanten und ihre Größe in Relation zu umgebenden Strukturen definiert (vgl. Kap. 1.3.3). **Mikromechanische Mechanismen**, die das Rissbild beeinflussen, wurden durch Nalla et al. (2004), Launey et al. (2010) und Klehm et al. (2016) vorgestellt [46, 50, 73]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass

die Morphologie der Mikrorisse nicht nur von den Strukturebenen und der Belastungsrichtung abhängt. Auch die Degeneration der umgebenden Matrix hat Einfluss auf die Deformationsmechanismen und weist damit auf die Destabilisierung des Gewebes hin. Bei intakter Struktur stellten sich die bekannten Rissmorphologien mit scharfen Rissufern, Vorrissen und Überbrückungen durch *uncracked ligaments* dar. Auch Hinweise auf crazeartige Prozesse waren zu finden. Je unschärfer und unorganisierter das umgebende Gewebe wirkte, desto seltener konnten Überbrückungen festgestellt werden. Die Rissufer wirkten dann stumpf und waren durch kugelig-knäuelartige Veränderungen der Matrix geprägt. Mit den angewandten Techniken konnte das Alter der Risse nicht direkt bestimmt werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass die Rissufer erst nachträglich gemeinsam mit dem umgebenden Gewebe durch die Nekrose degenerierten. Ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss der Osteonekrose war, dass die in der Rissumgebung sichtbaren Strukturgrenzen den Rissverlauf weniger beeinflussten als in Bereichen mit gesundem Gewebe. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der Knochen bereits vor der Entstehung des Mikrorisses geschädigt war. Denkbar ist, dass der Riss sich zwischen den kugelig-knäuelartigen Agglomeraten den Weg des geringsten Widerstandes gesucht hat, wodurch die abgerundeten, stumpfen Kanten entstanden.

Das Fehlen der Rissüberbrückungen und Fibrillierungen an der Rissspitze ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die intrinsische Stabilität der Strukturelemente deutlich abnimmt. Die Osteonekrose hat zum frühzeitigen Bruch der sonst stabilisierenden *uncracked ligaments* geführt. Normalerweise führt die ungleichmäßige Ausdehnung der Rissfront dazu, dass ungebrochene Elemente die Rissufer überbrücken. Dieser Effekt, der nur an der Rissspitze auftritt, kann im gesunden Knochen die Bruchzähigkeit deutlich steigern [73]. Möglicherweise hat die Störung dieses Deformationsmechanismus einen größeren Anteil an der beschleunigten Schadensentwicklung bei Osteonekrose.

5.1.3 Elektronenmikroskopische Darstellung der Osteonekrose

Bisherige Untersuchungen der Osteonekrose mit REM und TEM waren auf zelluläre Veränderungen fokussiert, da diese Ausdruck der primär geschädigten vitalen Bestandteile des Knochens sind. In dieser Arbeit lag im Gegensatz dazu das besondere Augenmerk auf der extrazellulären Matrix, die als festes Gerüst des Bewegungsapparates die Hauptfunktion des Knochens übernimmt. Ziel war es, die strukturellen Veränderungen, die letztlich zur Instabilität des nekrotischen Knochens führen, auf verschiedenen Ebenen darzustellen.

Mit Hilfe von **lichtmikroskopischen Untersuchungen** war bereits gezeigt worden, dass es bei Osteonekrose neben dem Absterben der Zellen zu verwaschenen Strukturgrenzen und einer Aufhebung der lamellären Schichtung des Knochengewebes kommt. Dieses Bild ist Ausdruck der Auflösung der geordneten Struktur der extrazellulären Matrix. Es wurde deshalb erwartet, dass sich diese Schadensentwicklung auch im REM und TEM wiederfindet und auf niedrigeren Strukturebenen abzubilden ist.

Bei **REM-Aufnahmen** ließen sich in der Nekrosezone verwaschene Lamellengrenzen mit unterschiedlicher Ausprägung darstellen. Die lichtmikroskopisch leer dargestellten Osteo-

zytenlakunen waren an vielen Stellen vergrößert, zusammengedrängt und unförmig (Abb. 12 A). Auch die umgebende extrazelluläre Matrix erschien in diesen Bereichen unregelmäßig, demineralisiert und Lamellen waren nur noch schemenhaft abzugrenzen. Es schien, als wäre das Knochengewebe zusammengeschrumpft und habe dabei die Form der Lakunen verändert. An diese demineralisierten Bereiche grenzten oft Resorptionszonen, die im REM durch die typischen Howship-Lakunen erkennbar waren. Scharf abgegrenzt davon bestanden hypermineralisierte Areale, die besonders oft in den Trabekelkernen zu finden waren. In extremer Form waren keine Strukturen mehr erkennbar und das Material wirkte wie Kreide, dessen Oberfläche durch feine Kratzer von der Präparation geprägt war (Abb. 12 D). Die Lokalisation dieser hypermineralisierten Areale in den Trabekelkernen vor allem im Kreuzungsbereich lässt den Schluss zu, dass es sich hier um vergleichsweise altes Knochengewebe handelt. Da beim *Remodeling* der Spongiosa immer nur ein Teil der Trabekeloberfläche erneuert wird, hat der Kern eine niedrige Wahrscheinlichkeit für eine Erneuerung [7]. Mit dem Alter des Knochengewebes steigt auch der Mineralgehalt, was ebenfalls bei diesen Arealen zutrifft [42, 46, 47]. Ein weiteres Zeichen der Alterung war das gehäufte Vorkommen von Mikropetrosis in den Trabekelkernen [74]. Das Auftreten von extremer Hyper- und auch Demineralisierung in scharf abgegrenzten Zonen scheint jedoch ein typischer Befund bei Osteonekrose zu sein. Wahrscheinlich kommt es durch die Degeneration zu einer Auftrennung des Kollagen-Mineral-Nanokomposits und danach zu einer Akkumulation des Hydroxylapatits in prädisponierten Arealen.

Bei höheren Vergrößerungen war die extrazelluläre Matrix meist aufgelockert und wolkig. Regelmäßige Verdichtungen wurden als kugelig-knäuelartige Agglomerate beschrieben (Abb. 11 D & 12 B). Die sonst bereits im REM sichtbare typische Querstreifung der mineralisierten Kollagenfibrillen ließ sich kaum darstellen. Dieses Bild ist mit der These vereinbar, dass sich die Auflösung der geordneten Struktur bei Osteonekrose auch in den niedrigeren Strukturebenen fortsetzt. Zur Beurteilung der Anordnung und Beschaffenheit der mineralisierten Kollagenmatrix wurde das nekrotische Knochengewebe im **TEM** weiter untersucht. Hier zeigten sich sowohl normale parallel ausgerichtete Kollagenfibrillen mit alternierenden Mustern, als auch Bereiche, in denen keine Ordnung ausgemacht werden konnte. Es fanden sich wirbelartige Strukturen mit Agglomeraten von Mineralkristallen (Abb. 13 E). In der Nanoebene wurden intakte mineralisierte Kollagenfibrillen anhand von regelmäßigen Anordnungen von Mineralkristallen mit einer typischen Querstreifung identifiziert. Dazwischen lagen häufig Ansammlungen kleiner veränderter Kristalle, die keiner regelmäßigen Ordnung folgten (Abb. 13 F). Da Proteine bei nicht-entkalktem Knochengewebe im TEM keinen Kontrast bilden und deshalb nicht dargestellt werden, kann keine direkte Aussage zu Verbleib und Morphologie des Kollagens gemacht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Nanokomposit aus Kollagen und Mineralkristallen zerfällt und dann Kristalltrümmer im Gewebe agglomerieren. In manchen Arealen sind ganze Lamellen nur noch anhand ihrer Grenzen identifizierbar gewesen und die Struktur war nur noch durch die kleinen unregelmäßigen Mineralbruchstücke geprägt (Abb. 14 G & H). Die Schädigung der mineralisierten Kollagenmatrix verläuft nicht als synchroner Zerfall, weshalb intakte und stark geschädigte Areale dicht nebeneinander vorkamen. Wahrscheinlich spiegelt

diese Verteilung auch Bereiche mit ischämischer Schädigung beziehungsweise vorhandener Vaskularisierung wieder.

Bei den Untersuchungen im TEM konnten weitere Veränderungen dokumentiert werden, die mit der Schadensentwicklung bei Osteonekrose im Zusammenhang stehen. So konnten Areale abgebildet werden, die in ihrer Form und Größe Osteozytenlakunen entsprachen (Abb. 14 A). Sie waren mit einer granulären Masse gefüllt, die von ihrer Strahlendichte dem Mineral entspricht, und durch intakte Kollagenfibrillen begrenzt. Vermutlich handelt es sich hierbei um das elektronenmikroskopische Korrelat zur Mikropetrosis [74]. Die unregelmäßigen Querrisse im Mineral, das die ehemalige Osteozytenlakune ausfüllt, stammen vom Schneidvorgang bei der Ultramikrotomie.

Nahe den demineralisierten Zonen waren weitere Besonderheiten zu finden, die in Kapitel 4.3.2 abgebildet sind. Korrelierend zu den kugelig-knäuel förmigen Veränderungen, die bereits im REM zu erkennen waren, bestanden kugelige Kristallinseln, die an ihrem Rand durch mineralfreies Gewebe abgegrenzt wurden (Abb. 14 C & D). Zentral war gelegentlich eine Querstreifung zu erahnen, allerdings war die Struktur zu dicht, um einzelne Kristalle oder Kollagenfibrillen abzugrenzen. Zur demineralisierten Zone hin nahmen die Größe und Dichte der Kristallinseln stetig ab, sodass der Eindruck entstand, dass hier der Vorgang der Demineralisierung zu sehen war (Abb. 14 B). Das Bild besaß auch starke Ähnlichkeiten zum natürlichen Prozess der Mineralisierung, wie er von Nitiputri et al. (2016) dargestellt wurde [12]. Denkbar ist ein lokaler Reparationsprozess, bei dem nach Knochenformation eine natürliche Mineralisierung stattfindet. Gegen die These spricht, dass lokal keine histologischen Zeichen einer Knochenformation nachgewiesen werden konnten. Eine zweite Möglichkeit wäre ein Prozess, bei dem Mineral passiv agglomeriert. Denaturierte Kollagenfibrillen demineralisieren, wonach es zu lokal hohen Konzentrationen der Bestandteile des Hydroxylapatits kommt, welche dann an anderen Stellen der Kollagenmatrix auskristallisieren.

In Abbildung 14 E wird ein Übergang von einer relativ gut strukturierten mineralisierten Region zu einem mineralfreien Bereich gezeigt. Es ist zu sehen, dass sich im Grenzbereich einzelne Kristalle von der Kollagenmatrix lösen und mit zunehmendem Abstand von der Struktur immer blasser werden. Ob sich die Kollagenmatrix selbst verändert oder auflöst, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, da die Proteine ohne entsprechende Kontrastierung im TEM nicht dargestellt werden können. Bei diesem Übergang kommt es offenbar zur Auflösung oder Demineralisierung des Knochengewebes. Eventuell ist hier eine Resorption durch einen Osteoklasten dargestellt, wobei zelluläre Strukturen oder die typische Struktur der Howship-Lakune nicht sicher dargestellt werden konnten.

Die Untersuchungen der Nanostruktur zeigten keine auffälligen Unterschiede zwischen Femurkopfnekrose und Kiefernekrosen. Es ist somit davon auszugehen, dass die primäre Schädigung auf Nanoebene bei beiden Krankheitsbildern gleich abläuft, während sich das histologische Bild durch die spezifischen Pathomechanismen und Umbauprozesse unterscheidet.

Nach Betrachtung der Anordnung und Struktur der mineralisierten Kollagenfibrillen wurden die **Mineralkristalle** dargestellt, um Veränderungen ihrer Morphologie nachzuweisen.

In der Literatur werden die Kristalle als Plättchen oder Nadeln beschrieben, wobei bei der Nadelform davon auszugehen ist, dass es sich um plättchenförmige Kristalle handelt, die in der Bildebene auf Kante stehend dargestellt wurden [68, 75]. Die Plättchen werden als flach quaderförmig mit unregelmäßig abgerundeten Kanten beschrieben. In vielen Studien wurden Messungen für Länge, Breite und Dicke der Mineralplättchen durchgeführt, wobei jeweils verschiedene mineralisierte Gewebe von unterschiedlichen Spezies einbezogen wurden (vgl. Tab. 8). Für den humanen Knochen liegen die Kristallgrößen bei TEM-Messungen bei durchschnittlich 54 nm x 25,4 nm x 5,9 nm [68, 75, 76].

Tabelle 8: Gemessene Kristallgrößen in verschiedenen Studien

Untersuchungsmaterial	Länge [nm]	Breite [nm]	Dicke [nm]	Quelle
Literaturoauswertung, verschiedene Gewebe und Spezies einbezogen	30–50	15–30	2–10	[77]
Literaturoauswertung, verschiedene Gewebe und Spezies einbezogen	40–60	20–30	1,5–4	[78]
Humaner Knochen, gesund/osteoporotisch	57,0±6,7	27,2±3,0	7,7±3,5	[76]
Humaner Knochen, gesund/osteoporotisch	~50	~25	~5	[75]
Humaner Knochen, gesund/osteoporotisch	55±8	24±4	5±1	[68]
Literaturgrenzen	30–60	15–30	1,5–10	
Mittelwerte für den humanen Knochen	54	25,4	5,9	
Messungen dieser Studie	49,9	26,7	4,9	
Standardabweichung	7,6	5,3	1,2	

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl normal konfigurierte Mineralkristalle, die den Beobachtungen im gesunden Knochen entsprachen, als auch veränderte Kristalle dargestellt werden (Abb. 15 A–D). Eine Messung der Größen war nur an intakten und normal geformten Kristallen möglich, wobei die Messwerte im Rahmen der statistischen Schwankungen mit den Literaturwerten vergleichbar sind. Die Werte lagen nach Auswertung aller Proben im Mittel bei 50,5 nm x 27,4 nm x 5,0 nm. Beim Vergleich der Kristallmessungen von Kiefernekrosen und Femurkopfnekrosen fiel kein signifikanter Unterschied auf. Einzig die Probe KN-2 wies eine erhöhte Streuung der Messwerte auf, die sich in den großen Standardabweichungen im Diagramm widerspiegeln (Abb. 16). Die Mittelwerte lagen dennoch innerhalb der Literaturgrenzen und wichen kaum von den restlichen Proben ab. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit der Erwartung, dass es durch die Osteonekrose zu abweichenden Werten für die Kristallgrößen kommt. Die Darstellung im TEM hat jedoch eindeutig gezeigt, dass bei Osteonekrose kleine formveränderte Kristalle vorkommen, die sich zu unregelmäßigen Agglomeraten zusammenballen. In der Statistik der Kristallmessungen spiegelt sich diese Veränderung nicht wider, da es mit den zur Verfügung stehenden Techniken nicht möglich war, die veränderten Kristalle auszumessen. Auch für die zugrundeliegenden Prozesse, die zu den Kristallagglomeraten führen, gab es keine weiteren Hinweise. Wahrscheinlich ist, dass durch die Osteonekrose das Kollagen-Mineral-Nanokomposit geschädigt wird, sich in die Bestandteile auflöst und diese sich als Debris ablagern.

Abbildung 15 zeigt weitere Auffälligkeiten, die bei der Untersuchung von Ultradünnschnitten mit dem TEM gefunden wurden. An mehreren Stellen waren dichte Kristallagglomerate im Gewebe nachzuweisen, die unregelmäßig verteilt auftraten (Abb. 15 E). Sie waren oft durch den Schneidvorgang bei der Probenbearbeitung teilweise aus dem umliegenden Gewebe herausgerissen. Vermutlich handelt es sich hier um solide Zusammenballungen von Kristallen, die regelrecht miteinander verbacken sind. In anderen Bereichen wurden die in Abbildung 15 F dargestellten grauen Punkte nachgewiesen, die wie Schatten auf die Struktur projiziert liegen. Diese Flecke ließen sich nicht schärfer darstellen, sodass ihre Morphologie und Herkunft unbekannt blieb. Es könnte sich auch um Artefakte von der Probenbearbeitung handeln.

5.2 Methodik

Für die vorliegende Studie wurden Knochenproben histologisch aufgearbeitet und verschiedenen Untersuchungen zugeführt, um die Schadensentwicklung vom makroskopischen Befund bis zur Nanostruktur zu dokumentieren. Die angewandten Techniken stellen teilweise sehr unterschiedliche Anforderungen an das Probenmaterial, damit eine optimale Darstellung gelingen kann. Um die Aussagekraft der Ergebnisse bewerten zu können, werden im Folgenden die Limitierungen der Studie dargelegt.

5.2.1 Probenmaterial

Für die histologische Darstellung der Schadensentwicklung der Osteonekrose ist eine zerstörungsfreie Probengewinnung, optimalerweise eine Resektion en bloc notwendig, damit eine umfassende Beurteilung der Verhältnisse in situ ermöglicht wird. Ethische Grundsätze zwingen gleichzeitig dazu, dass der Patient und Proband nicht geschädigt, sondern nach bestem Wissen therapiert wird. Da es sich bei der Osteonekrose um eine seltene Erkrankung handelt, gestaltet sich die Probengewinnung schwierig. Der bei der Behandlung der Femurkopfnekrose mittels Hüftendoprothetik resezierte Femurkopf stellt somit eine besondere Chance für die Erforschung des Krankheitsbildes dar. Dennoch kommt diese operative Versorgung selbst in einem Endoprothesenzentrum nicht häufig vor, sodass die Probenakquise über einen längeren Zeitraum erfolgen musste. Ein weiterer Faktor, der die Probenanzahl begrenzte, war die aufwendige Probenbearbeitung und Untersuchung.

Durch den subakut bis chronisch progredienten Verlauf, der von wenigen Monaten bis zu mehreren Jahren gehen kann, können sich die Stadien der Osteonekrose massiv unterscheiden. Einen starken Beitrag dazu leisten Umbauvorgänge, die zu einer Stabilisierung und Selbstheilung der Läsionen führen sollen. Die in frühen Stadien eingesetzten operativen Therapien wie Dekompressionsbohrungen und Spongiosaplastiken beeinflussen zusätzlich den Verlauf. Bekannte Risikofaktoren der Osteonekrose wie Kortisonbehandlungen und Alkoholmissbrauch sind ebenfalls potentielle Einflussfaktoren, die zu Veränderungen des Knochengewebes führen können. Auch eine vorbestehende Osteoporose ist nicht ausgeschlossen und musste bei den histologischen Untersuchungen beachtet werden.

Um die Probenmenge und das Spektrum zu vergrößern, wurde die Studie auf ein weiteres Krankheitsbild erweitert, das mit einer Osteonekrose einhergeht: die Kiefernekrose. Da der Knochen aus einer anderen Körperregion stammt, sind andere anatomische Verhältnisse und mechanische Belastungen zu erwarten. Besonders die Untersuchungen der mikro-mechanischen Deformationsmechanismen waren nicht vergleichbar. Grundsätzlich waren beim Vergleich zweier Krankheitsbilder durch verschiedene Ätiologien große Unterschiede im Pathomechanismus und dem daraus resultierenden histologischen Bild zu erwarten. Besonders auf der Ebene der Nanostruktur unterschieden sich jedoch Femurkopfnekrosen und Kiefernekrosen kaum. Als weiterer Einflussfaktor, der eine Rolle für die Auswertung und den Vergleich der Krankheitsbilder spielt, musste die vorangegangene Bisphosphonatbehandlung beachtet werden. Da der Wirkungsort dieses Medikaments im Knochengewebe liegt und es direkt mit der Erkrankung in Verbindung zu stehen scheint, waren hier sichtbare Veränderungen zu erwarten. Das traf auch für die Femurkopfnekrosen zu, allerdings war bei diesen Spendern keine Bisphosphonatbehandlung dokumentiert worden. Schlussendlich konnte unter Einbeziehung von Femurkopfnekrosen und Kiefernekrosen eine angemessene Probenanzahl auf die Schadensentwicklung bei Osteonekrose untersucht werden. Das einheitliche Bild der Mikro- und Nanostruktur sowie die geringe Streuung der Messwerte für die Kristallgrößen weist auf eine ausreichend große Stichprobe für die durchgeführten Untersuchungen hin. Eine größere Varianz des Krankheitsbildes und seiner Auswirkungen auf die Knochenstruktur ist dennoch nicht auszuschließen.

5.2.2 Präparationstechniken

Sowohl die Probengewinnung als auch die Bearbeitung zur Vorbereitung für nachfolgende Untersuchungen kann potentiell zu Artefakten führen, die von den pathologischen Veränderungen durch die Erkrankung zu trennen sind. Schädigungen, die auf die Resektion der Knochenproben zurückzuführen sind, wurden bei den makroskopischen und histologischen Ergebnissen beschrieben. Um die Prozesse zu stoppen, die durch die Ischämiezeit und die nachfolgende Verwesung entstehen, wurden die Proben umgehend nach der Operation tiefgefroren oder, im Fall der Kiefernekrosen, in Formalin gelagert. Somit wurde auch bei der maximalen Lagerdauer von bis zu zwei Monaten bis zur weiteren Verarbeitung eine Veränderung des Knochengewebes weitgehend verhindert.

Zur Beurteilung der extrazellulären Matrix wurden Präparationsverfahren gewählt, die auf die Entkalkung des Gewebes verzichten. Die Vorteile dieser Techniken sind geringere Schrumpfungsfaktoren und der Erhalt des zu untersuchenden Minerals. Dennoch war vor der Einbettung in Kunstharz eine Entwässerung nötig, die trotz des schonenden Protokolls mit langen Infiltrationszeiten und ansteigenden Alkoholkonzentrationen zu Veränderungen der organischen und anorganischen Bestandteile des Gewebes führen kann. Im Vergleich zu anderen Präparationstechniken sind die artifiziellen Veränderungen jedoch gering und durch die Wahl von MMA-basierten Kunststoffen waren sowohl histologische Färbungen als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen möglich. Die Größe der Femurköpfe machte eine Probenparzellierung im nativen Zustand nötig, um eine homogene Einbettung

zu ermöglichen. Auch durch das sehr schonende Trennschleifen mit Diamantbandsäge und Wasserkühlung können an den Sägeflächen artifizielle Schädigungen nicht vollständig verhindert werden, weshalb die betroffenen Randbereiche von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath [63] wurde speziell für die histologische Aufarbeitung von Hartgeweben entwickelt. Polierschritte mit besonders feinem Schleifpapier entfernen dabei Schleifspuren von der Oberfläche, sodass selbst im REM nur bei hohen Vergrößerungen Schleifartefakte nachweisbar waren. Durch ihre geringe Tiefe und parallele Anordnung waren sie sicher von Strukturveränderungen des Knochengewebes zu unterscheiden. Ein Nachteil der Trenn-Dünnschliff-Technik war der hohe Materialabtrag, weshalb eine Nachverfolgung von Strukturen auf einem benachbarten Dünnschliff kaum möglich war. Hier zeigte die Mikrotomie ihre Stärke, da diese Technik materialsparend ist. Allerdings führten Schneidartefakte wie Falten und das Aufrollen der Schnitte dazu, dass viele artifizielle Risse im nekrotischen Knochen entstanden und die Qualität für Untersuchungen der mikromechanischen Deformationsmechanismen nicht ausreichte.

5.2.3 Untersuchungstechniken

Die Färbung der Präparate mit basischem Fuchsin diente zur leichteren Erkennung von Mikrorissen und anderen Defekten. Der Farbstoff sammelt sich in kleinen Hohlräumen und leuchtet unter Anregung mit UV-Strahlung. Natürlich wurden dadurch auch artifizielle Defekte angefärbt, die nach der Einbettung in PMMA entstanden sind, sodass diese Schäden von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden mussten. Erkennbar waren die Artefakte anhand ihrer Morphologie und des gerissenen Einbettmittels im Defekt. Zusätzlich ist bekannt, dass basisches Fuchsin nicht alle Risse anfärbt, sodass diese Technik nur als Hilfe für die Detektion fungierte, was jedoch nicht die intensive Analyse der Knochenstruktur ersetzte. Rissanalysen im REM sind deutlich sensitiver und erlauben aufgrund der hohen Auflösung und Tiefenschärfe detailliertere Untersuchungen [39]. Sie sind aber auch mit einem erhöhten Aufwand und Kosten verbunden. Des weiteren schädigt der Elektronenstrahl nach kurzer Zeit sichtbar Probe und Einbettmittel, sodass diese Technik nur an einer Auswahl lichtmikroskopisch detektierter Risse erfolgte.

Die Untersuchung der Mikrorisse in dieser Studie wurde an Dünnschliffpräparaten zweidimensional durchgeführt, obwohl aus Untersuchungen im Mikro-CT bekannt ist, dass die Risse im Knochen sich dreidimensional im Gewebe ausbreiten und meist eine Ellipsenform annehmen. Der Nachteil der letztgenannten Methode ist allerdings, dass die Auflösung begrenzt ist und einen hohen Aufwand an Rechenleistung und Auswertung benötigt. Zweidimensionale Darstellungen der Mikrorisse erlauben eine gute qualitative Beurteilung der mikromechanischen Deformationsmechanismen und konnten gleichzeitig zur Darstellung der Mikrostruktur des umgebenden Gewebes genutzt werden. Um quantitative Aussagen über die Rissmorphologie zu erhalten, wären dreidimensionale Analysen der gesamten Probe notwendig gewesen, wobei gleichzeitig keine sichere Trennung von Defekten im gesunden und nekrotischen Knochen hätte erfolgen können.

Die Qualität der TEM-Aufnahmen hängt stark von der Probenherstellung in der Ultramikrotomie ab. Zu dünne Schnitte führen zur Zerstörung der abzubildenden Bestandteile des Kollagen-Mineral-Nanokomposits und damit auch zu instabilen Proben. Zu dicke Schnitte zeigen im TEM Überlagerungen von Kristallen in verschiedenen Schichten, sodass keine Beurteilung der Morphologie mehr möglich ist. Als optimal für die Untersuchung von Knochengewebe haben sich Schnittdicken von 60 nm ergeben [75]. Für die Messung der Kristallgrößen kommt das TEM an seine Auflösungsgrenzen. Insbesondere die agglomerierten veränderten Kristalle konnten nicht befriedigend dargestellt werden. Systematische Messfehler sind besonders bei der Bestimmung der Kristalldicke zu erwarten, da hier schon wenige Pixel im Bild eine Abweichung von einem halben Nanometer bedeuten können. Durch viele Messungen und die Auswertung konnte der statistische Fehler gering gehalten werden. In der Literatur wird weiterhin darauf hingewiesen, dass die Messwerte der Kristallgrößen von der verwandten Präparations- und Messmethode abhängen. Bei Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM - *atomic force microscope*) wurden zum Teil deutlich größere Mineralkristalle gemessen [77, 78].

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten bei Knochenproben anhand typischer makroskopischer und histologischer Zeichen Osteonekrosen nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Beschreibung der Schäden und danach weiterführende Untersuchungen, um das Wesen der Schadensentwicklung bei diesem Krankheitsbild zu analysieren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten zeigen, dass sich bei Osteonekrose Veränderungen der extrazellulären Matrix von der Ebene der Mikrostruktur bis zur Nanostruktur fortsetzen. Die regelmäßig alternierenden Muster von mineralisierten Kollagenfibrillen werden durch verwirbelte Strukturen verdrängt, die vollkommen ungeordnet erscheinen. Weiterhin konnten TEM-Aufnahmen neben intakt erscheinenden mineralisierten Kollagenfibrillen ungeordnete Ansammlungen von veränderten Mineralkristallen darstellen, die in keiner geordneten Beziehung zum Proteinanteil zu sein schienen. Die Eigenschaften eines Komposits hängen stark vom Zusammenspiel und der Geometrie der Bestandteile ab, weshalb sich die Materialeigenschaften im Verbund ergänzen. Die nachgewiesene Störung der Anordnung und die Zeichen der Instabilität auf höheren Strukturebenen weisen darauf hin, dass die Integrität des Kollagen-Mineral-Nanokomposits durch die Osteonekrose gestört wird. Die Untersuchung der nicht-entkalkten unkontrastierten Proben im TEM ließ keine direkte Darstellung des Kollagens zu, weshalb Aussagen zu diesem Bestandteil des Komposits beschränkt sind. Zukünftige Forschungen könnten durch geeignete Kontrastierung die Darstellung des Proteins verbessern und somit Veränderungen nachweisen. Möglicherweise führt ein Verfall des Kollagens durch Denaturierung oder Autolyse zu der ungeordneten Nanostruktur, wodurch der Strukturverlust in höheren Ebenen einsetzt.

Mehrere vorangegangene Studien gingen davon aus, dass Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Skeletterkrankungen Auswirkungen auf die Größe und Morphologie der Mineralkristalle haben. In keiner der Studien konnte eine statistisch signifikante Abweichung

der Messparameter nachgewiesen werden [68, 75, 76]. Auch in dieser Studie konnten Messungen der Kristallgrößen Länge, Breite und Dicke keine Veränderung durch die Erkrankung beweisen. Dennoch sind im nekrotischen Knochen stellenweise kleine und unförmige Calciumhydroxylapatit-Kristalle mit veränderter Morphologie zu finden. Durch enges Zusammenballen und die überlagerte Darstellung des Minerals waren an diesen Kristallen keine Messungen möglich, sodass ihre Größe nicht in die statistische Auswertung einging. Die Untersuchung der mikromechanischen Deformationsmechanismen wurde in Abhängigkeit von den Strukturveränderungen in der Umgebung von Mikrorissen durchgeführt. Ziel war der Nachweis von Veränderungen dieser Mechanismen, wodurch gleichzeitig Hinweise auf die Ursachen der Instabilität nekrotischen Knochens gefunden werden sollten. Es wurde gezeigt, dass bei gut strukturiertem Gewebe dieselben Deformationsmechanismen auftreten, die von gesundem Knochen bekannt sind [46, 68]. Bei unscharfen Strukturgrenzen in der Umgebung änderte sich die Rissmorphologie dahingehend, dass kaum Ablenkung erfolgte, die Rissufer stumpf wirkten und deutlich weniger Überbrückungen durch sogenannte *uncracked ligaments* an der Risspitze darstellbar waren. Somit waren wichtige zähigkeitssteigernde Deformationsmechanismen gestört.

Bei den untersuchten Femurkopfnekrosen im fortgeschrittenen Stadium kam es bereits zum Kollaps der subchondralen Spongiosa. Viele Autoren gehen davon aus, dass durch das gestörte *Remodeling* Mikroschäden im Knochen nicht repariert werden und es deshalb durch die physiologische zyklische Belastung zu einer pathologischen Fraktur des Knochens kommt [8, 22]. Die Analyse der Dünnschliffpräparate von Femurkopfnekrosen in dieser Studie zeigte, dass Mikrorisse deutlich häufiger in der Nekrosezone und der Grenzregion vorkamen, als im umliegenden gesunden Gewebe. Zusätzlich war dieser Bereich häufiger von Mikrofrakturen der Trabekel betroffen, sodass die zuvor genannte These bestätigt werden kann. Weiterhin wurden Areale dokumentiert, in denen es zu einer Verformung der Knochenbälkchen gekommen ist, ohne dass diese vermehrt Risse oder Frakturen bekamen. Dort wirkten die Trabekel ausgedünnt, fragil und die Struktur wies auf duktile Verformungen hin. Möglicherweise handelt es sich hier um einen weiteren pathologischen Prozess, der durch einen Verlust der Festigkeit ebenfalls zu einem Kollaps der gelenktragenden Spongiosa führt. Um die Ursachen dieses Mechanismus zu erforschen, könnten weitere vergleichende Untersuchungen der Nanostruktur und Materialeigenschaften mittels Elektronenmikroskopie, Ultraschallmikroskopie und Nanoindentation erfolgen. Letztere bieten den Vorteil einer orts aufgelösten Darstellung mechanischer Kennwerte.

Bei der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose handelt es sich um eine spezielle Form der Osteonekrose, deren Ätiologie noch nicht eindeutig geklärt wurde. Die Verknüpfungen mit der medikamentösen Behandlung gibt jedoch Grund zu der Annahme, dass Bisphosphonate einen Pathomechanismus im Kieferknochen in Gang setzen, der letztlich zur Schädigung des Gewebes führt. Eine Beeinflussung der Nanostruktur und der Morphologie der Calciumhydroxylapatit-Kristalle war aufgrund des Wirkmechanismus der Bisphosphonate anzunehmen. Zum Nachweis von Veränderungen des Knochens, die sich von der Femurkopfnekrose unterscheiden, wurden die Proben den gleichen Untersuchungen unterzogen. Entgegen der Erwartung konnten beim erkrankten Knochen keine Abweichungen der Na-

nostruktur festgestellt werden. Weiterhin ergaben die Darstellungen der Morphologie der Mineralkristalle und die Messung von Länge, Breite und Dicke keinen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen von Femurkopfnekrosen. Bisphosphonate scheinen somit zwar an der Auslösung der Osteonekrose des Kieferknochens beteiligt zu sein, die Pathomechanismen auf der Ebene der Nanostruktur werden jedoch nicht sichtbar verändert. Um die Einflüsse der Bisphosphonat-Behandlung auf die Struktur des Knochengewebes zu untersuchen, sollten vergleichende histologische Untersuchungen von unbehandelten und behandelten Probanden mit Darstellung der Nanostruktur erfolgen. Möglicherweise zeigen sich durch diese Forschung auch Hinweise, weshalb es zur Entwicklung von Kiefernekrosen kommt.

6 Zusammenfassung

Bei der Osteonekrose wird der Stoffwechsel des Knochengewebes lokal massiv gestört. Durch eine Schädigung der Struktur kommt es unter physiologischer Belastung zum Versagen des Knochens. Die genauen Mechanismen, die zu der Instabilität führen, sind noch unklar. Bisherige Studien waren vor allem auf die mikroskopische Ebene und zelluläre Prozesse fokussiert. Das Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der extrazellulären Matrix des Knochengewebes von der makroskopischen Ebene bis zur Nanostruktur und die Analyse der bekannten Strukturebenen auf Schädigungen durch die Osteonekrose. Es wurde der Frage nachgegangen, ob sich die Auflösung der Strukturen in niedrigeren Ebenen fortsetzt und wie das Zusammenspiel von Mineral und Kollagen beeinflusst wird. Weiterhin wurden die mikromechanischen Deformationsmechanismen besonders in Hinblick auf Mikrorisse im Knochengewebe betrachtet. Als Untersuchungsmaterial dienten Femurköpfe, die bei fortgeschrittener Femurkopfnekrose im Rahmen der Implantation einer Hüftendoprothese reseziert wurden. Zusätzlich schloss die Untersuchung Resektate von Kieferknochen ein, die bei der Behandlung von Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrose entnommen wurden. Die Knochenproben wurden in PMMA-basierte Kunstharze eingebettet und anschließend Präparate nach der Trenn-Dünnschliff-Technik oder durch Mikrotomie hergestellt. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie erfolgte die histologische Beurteilung, während mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Mikroschäden gesucht wurde. Nekrotisches Gewebe und Mikrorisse wurden danach gezielt mit REM und TEM dargestellt, um Rissphänomene und die Strukturen von der Mikro- bis zur Nanoebene zu analysieren.

Für die Untersuchungen standen insgesamt 15 Femurköpfe und vier Kiefernekrosen zur Verfügung. Durch die histologische Darstellung wurde die Diagnose gesichert und es erfolgte eine Differenzierung von nekrotischen Arealen zu Umbauzonen und gesundem Knochengewebe. Neben den aus der Literatur bekannten Merkmalen der Osteonekrose konnten spezifische Veränderungen der Spongiosastruktur bei Femurkopfnekrosen beschrieben werden. In der Nekrosezone waren die Trabekel nach subchondral ausgedünnt und zeigten unregelmäßige Oberflächen. Teils kam es in diesen Bereichen zum Versagen der Struktur mit Trümmerzonen und frakturierten Trabekeln, teils wirkten die Trabekel duktil verformt ohne Strukturunterbrechungen. Bei den Kiefernekrosen stellte sich unregelmäßiger, kompakter Knochen dar, in dem kaum vitale Zellen zu finden waren. Es lag ein Nebeneinander von geordnetem und ungeordnetem Knochen vor.

Im REM zeigte sich das nekrotische Knochengewebe meist aufgelockert und wolkig. Es bildeten sich kugelig-knäuelartige Agglomerate und die sonst typische Querstreifung der mineralisierten Kollagenfibrillen war nur selten darstellbar. Mit zunehmender Degeneration verschwammen Strukturgrenzen zwischen Osteonen, Lamellen und Kollagenfasern. Im

Gewebe stellten sich demineralisierte und hypermineralisierte Zonen dar, die stets scharf von der umgebenden Struktur abgegrenzt waren. Oft war der Trabekelkern hypermineralisiert und zeigte weder Osteozytenlakunen noch Strukturgrenzen. Die demineralisierten Bereiche waren meist durch Zeichen der Resorption und atypischen Osteozytenlakunen charakterisiert. Die Lakunen erschienen vergrößert, zusammengedrängt und besaßen nicht mehr ihre typische Linsenform. Diese elektronenmikroskopischen Befunde ergänzen das bekannte histologische Bild.

Die Untersuchung auf Schäden ergab, dass sich die meisten Mikrorisse nach histologischen Kriterien in der Nekrosezone befanden. Einige Risse betrafen auch Trabekel der Umbauzone, aber gesundes Knochengewebe war kaum beeinträchtigt. Diese Beobachtungen können als Bestätigung der These gelten, dass eine Akkumulation von Mikroschäden in der Nekrosezone zur Instabilität des Knochens führt. Nähere Analysen der Rissumgebung und des Verlaufs ergaben, dass die Zähigkeitssteigernden mikromechanischen Deformationsmechanismen abhängig von der Darstellbarkeit der Strukturgrenzen waren. Risse im gesunden Gewebe waren durch scharfe Rissufer und Ablenkungen an Lamellengrenzen sowie durch Überbrückungen an der Risspitze durch so genannte *uncracked ligaments* gekennzeichnet. Bei fortgeschrittener Nekrose fehlten die für Rissablenkung und -stopp wichtigen scharfen Strukturgrenzen, sodass sich Mikrorisse ungehindert ausbreiten konnten. Dadurch kam es in der Nekrosezone vermehrt zu Mikrofrakturen ohne überbrückende *uncracked ligaments*. Im Gegensatz dazu führten ausgezogene Kitt-Linien in der Umbauzone dazu, dass durch diese sehr starke Strukturgrenze der Riss meist gestoppt oder stark abgelenkt wurde. Die mikromechanischen Deformationsmechanismen weichen somit bei Osteonekrose von den Beschreibungen in der Literatur ab.

Bei der Darstellung der Nanoebene mittels TEM überwogen mineralisierte Kollagenfibrillen und teilweise waren auch typische parallele Anordnungen oder Fischgräten-artige Muster erkennbar. In diesen Bereichen fanden sich normale Mineralkristalle, die vermessen wurden. Im Unterschied zu gesundem Knochengewebe konnten zwischen den Fibrillen kleine Kristallagglomerate nachgewiesen werden, in denen das Mineral eine unregelmäßige Form und Größe aufwies. Die Kristalle waren dort dicht gedrängt und konnten nicht voneinander abgegrenzt werden. In vielen Regionen fehlten die regelmäßige Anordnung und Fibrillenmuster gänzlich. Stattdessen zeigten sich verwirbelte Strukturen mit ungeordneten Ansammlungen von Kristallen und Kristallfragmenten, die keinen Rückschluss auf die Strukturierung und das Vorhandensein von Protein zuließen. Die Integrität der Kollagen-Mineral-Nanokomposits ist somit bei Osteonekrose gestört. Das Kollagen konnte mit den angewandten Techniken nicht direkt dargestellt werden. Die Vermessung der Mineralkristalle an den TEM-Bildern ergab keine signifikanten Abweichungen der Länge, Breite und Dicke von den Literaturwerten. Veränderte, unförmige Kristalle gingen jedoch nicht in die Messstatistik ein, da sie zu dicht agglomeriert und nicht einzeln abgrenzbar waren. Eine abweichende Morphologie der Mineralkristalle bei Osteonekrose ist somit nachzuweisen, aber die Quantifizierung war nicht möglich.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich bei der Osteonekrose die Auflösung der geordneten Strukturen bis in die Nanoebene fortsetzt. Beim Vergleich von Femur-

kopfnekrose und Kiefernekrose konnten auf Ebene der Nanostruktur keine Unterschiede nachgewiesen werden. Für nekrotisches Knochengewebe wurden Veränderungen der mechanischen Eigenschaften gezeigt, die zur Instabilität des Knochens führen. Damit wurden neue Erkenntnisse zur Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose gewonnen. Zukünftige Forschung könnte durch eine orts aufgelöste Darstellung mechanischer Kennwerte weitere Erkenntnisse zu den Ursachen der Instabilität bringen. Dazu wären zum Beispiel die Ultraschallmikroskopie oder Nanoindentation an nekrotischem Knochen geeignet.

7 Literatur

- [1] Adler CP: Knochenkrankheiten. 3. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 2004.
- [2] Zilles K, Tillmann B: Anatomie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 2010.
- [3] Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwald, Berlin, 1892.
- [4] Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2006.
- [5] Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998) Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20(2):92–102.
- [6] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE (2005) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235(1):176–190.
- [7] Manolagas SC, Parfitt AM (2010) What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab* 21(6):369–374.
- [8] Khurana JS (ed): Bone Pathology. 2nd ed. Humana Press, Springer, Dordrecht, 2009.
- [9] Mahamid J, Addadi L, Weiner S (2011) Crystallization pathways in bone. *Cells Tissues Organs* 194(2-4):92–97.
- [10] Mahamid J, Sharir A, Gur D, Zelzer E, Addadi L, Weiner S (2011) Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: a cryo-electron microscopy study. *J Struct Biol* 174(3):527–535.
- [11] Reznikov N, Shahar R, Weiner S (2014) Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater* 10(9):3815–3826.
- [12] Nitiputri K, Ramasse QM, Autefage H, McGilvery CM, Boonrungsiman S, Evans ND, Stevens MM, Porter AE (2016) Nanoanalytical electron microscopy reveals a sequential mineralization process involving carbonate-containing amorphous precursors. *ACS Nano* 10(7):6826–6835.
- [13] Schwarcz HP (2015) The ultrastructure of bone as revealed in electron microscopy of ion-milled sections. *Semin Cell Dev Biol* 46:44–50.
- [14] Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:131–139.
- [15] Burr DB (1993) Remodeling and the repair of fatigue damage. *Calcif Tissue Int* 53(1):75–81.
- [16] Peters KM, König DP (Hrsg): Fortbildung Osteologie 2. Steinkopff, Darmstadt, 2008.
- [17] Akamatsu Y, Mitsugi N, Hayashi T, Kobayashi H, Saito T (2012) Low bone mineral density is associated with the onset of spontaneous osteonecrosis of the knee. *Acta Orthop* 83(3):249–255.
- [18] Babhulkar S: Osteonecrosis. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2013.
- [19] Roth A, Beckmann J, Bohndorf K, Heiß C, Jäger M, Maus U, Nöth U, Peters KM, Rader C, Reppenhagen S, Landgraber S, Smolenski UC, Tingart M: S3-Leitlinie - Atraumatische Femurkopfnekrose des Erwachsenen. gültig bis 01.09.2023, URL: register.awmf.org/de/leitlinien/detail/033-050 (besucht am 04. 10. 2022).

- [20] Marx RE, Tursun R (2012) Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41(3):283–289.
- [21] Freyschmidt J: Skeletterkrankungen: Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose. 3. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg, 2008.
- [22] Filler TJ, Tingart M, Bähris H, Lüring C, Perlick L, Grifka J: Hüfte. In: Jerosch J, Heisel J, Imhoff AB (Hrsg): Fortbildung Orthopädie Traumatologie: Die ASG-Kurse der DGOOC, Bd. 11. Steinkopff, Darmstadt, 2005.
- [23] Chai B, Tang X, Li H (1998) Ultrastructural investigation of traumatic avascular necrosis of femoral-head. *Chin J Traumatol* 1(1):12–16.
- [24] Shibahara M, Nishida K, Asahara H, Yoshikawa T, Mitani S, Kondo Y, Inoue H (2000) Increased osteocyte apoptosis during the development of femoral head osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med Okayama* 54:67–74.
- [25] Amemiya M, Yashiro T, Kikuchi M, Kouki T, Nakama S, Hoshino Y (2011) Scanning and transmission electron microscopic observation of femoral head feeding vessels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Med Mol Morphol* 44(3):139.
- [26] Aruwajoye OO, Patel MK, Allen MR, Burr DB, Aswath PB, Kim HKW (2012) Microcrack density and nanomechanical properties in the subchondral region of the immature piglet femoral head following ischemic osteonecrosis. *Bone* 52:632–639.
- [27] Aruwajoye OO, Kim HKW, Aswath PB (2015) Bone apatite composition of necrotic trabecular bone in the femoral head of immature piglets. *Calcif Tissue Int* 96:324–334.
- [28] Pascart T, Falgayrac G, Migaud H, Quinchon JF, Norberciak L, Budzik JF, Paccou J, Cotten A, Penel G, Cortet B (2017) Region specific Raman spectroscopy analysis of the femoral head reveals that trabecular bone is unlikely to contribute to non-traumatic osteonecrosis. *Sci Rep* 7:97.
- [29] Narayanan A, Khanchandani P, Borkar RM, Ambati CR, Roy A, Han X, Bhoskar RN, Ragampeta S, Gannon F, Mysorekar V, Karanam B, V SM, Sivaramakrishnan V (2017) Avascular Necrosis of Femoral Head: A Metabolomic, Biophysical, Biochemical, Electron Microscopic and Histopathological Characterization. *Sci Rep* 7:10721.
- [30] Grifka J, Krämer J: Orthopädie Unfallchirurgie. 9. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg, 2013.
- [31] Schünke M, Schulte E, Schumacher U: Prometheus - LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart-New York, 2007.
- [32] Marx RE (2003) Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1115–1117.
- [33] Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S (2011) Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 26(8):1871–1882.
- [34] Paulo S, Abrantes AM, Laranjo M, Carvalho L, Serra A, Botelho MF, Ferreira MM (2014) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: specificities. *Oncol Rev* 8(2), 254:44–49.

- [35] Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD (2012) Histopathological features of bisphosphonate-associated osteonecrosis: findings in patients treated with partial mandibulectomies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 114(6):785–791.
- [36] Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw–2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 72:1938–1956.
- [37] De Ponte FS, Favalaro A, Siniscalchi EN, Centofanti A, Runci M, Cutroneo G, Catalfamo L (2013) Sarcoglycans and integrins in bisphosphonate treatment: immunohistochemical and scanning electron microscopy study. *Oncol Rep* 30(6):2639–2646.
- [38] Bartl R, von Tresckow E, Bartl C: Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien. Springer, Berlin-Heidelberg, 2006.
- [39] Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H (2009) Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig* 14:271–284.
- [40] Brennan O, Kennedy OD, Lee TC, Rackard SM, O’Brien FJ (2010) Effects of estrogen deficiency and bisphosphonate therapy on osteocyte viability and microdamage accumulation in an ovine model of osteoporosis. *J Orthop Res* 29(3):419–424.
- [41] Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K (2011) Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck* 33(2):199–207.
- [42] 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(14):2115–2123.
- [43] Richard HA, Kullmer G: Biomechanik: Grundlagen und Anwendungen auf den menschlichen Bewegungsapparat. Springer Vieweg, Wiesbaden, 2013.
- [44] Gao H (2006) Application of fracture mechanics concepts to hierarchical biomechanics of bone and bone-like materials. *Int J Fract* 138(1-4):101–137.
- [45] Michler GH: Kunststoff-Mikromechanik: Morphologie, Deformations- und Bruchmechanismen. Carl Hanser, München-Wien, 1992.
- [46] Launey ME, Buehler MJ, Ritchie RO (2010) On the mechanistic origins of toughness in bone. *Annu Rev Mater Res* 40(1):25–53.
- [47] Sutton-Smith P, Beard H, Fazzalari N (2008) Quantitative backscattered electron imaging of bone in proximal femur fragility fracture and medical illness. *J Microsc* 229(1):60–66.
- [48] Choi K, Goldstein SA (1992) A comparison of the fatigue behavior of human trabecular and cortical bone tissue. *J Biomech* 25(12):1371–1381.
- [49] Gross D, Seelig T: Bruchmechanik: Mit einer Einführung in die Mikromechanik. 5. Aufl. Springer Science + Business Media, Heidelberg, 2011.
- [50] Klehm J, Henning S, Adhikari R, Brandt J (2016) Bone fracture: parallels to polymer fatigue. *Macromol Symp* 366(1):52–59.

- [51] Lu WW, Luk KDK, Cheung KCM, Gui-Xing Q, Shen JX, Yuen L, Ouyang J, Leong JCY (2004) Microfracture and changes in energy absorption to fracture of young vertebral cancellous bone following physiological fatigue loading. *Spine* 29(11):1196–1202.
- [52] Burr DB, Stafford T (1990) Validity of the bulk-staining technique to separate artifactual from in vivo bone microdamage. *Clin Orthop Relat Res* 260:305–308.
- [53] Lee TC, Myers ER, Hayes WC (1998) Fluorescence-aided detection of microdamage in compact bone. *J Anat* 193(2):179–184.
- [54] Lee TC, Mohsin S, Taylor D, Parkesh R, Gunnlaugsson T, O'Brien FJ, Giehl M, Gowin W (2003) Detecting microdamage in bone. *J Anat* 203(2):161–172.
- [55] Kummari SR, Davis AJ, Vega LA, Ahn N, Cassinelli EH, Hernandez CJ (2009) Trabecular microfracture precedes cortical shell failure in the rat caudal vertebra under cyclic overloading. *Calcif Tissue Int* 85(2):127–133.
- [56] Fazzalari NL (1993) Trabecular microfracture. *Calcif Tissue Int* 53(1):143–147.
- [57] Braidotti P, Branca FP, Stagni L (1997) Scanning electron microscopy of human cortical bone failure surfaces. *J Biomech* 30(2):155–162.
- [58] Turner CH (2002) Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* 13(2):97–104.
- [59] Kirschner P, Bayer M: S1-Leitlinie - Endoprothese bei Koxarthrose. gültig bis 31.05.2013, URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/012-006.html> (besucht am 27.11.2015).
- [60] Bonnaire F, Weber A: S2e-Leitlinie - Schenkelhalsfraktur des Erwachsenen. gültig bis 09.10.2020, URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/012-001.html> (besucht am 27.11.2015).
- [61] Aescht E, Büchl-Zimmermann S, Burmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, Jach G, Kässens M, Makovitzky J, Mulisch M, al. et: Romeis Mikroskopische Technik. 14. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [62] Lang G: Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2. Aufl. Springer Science + Business Media, Wien, 2013.
- [63] Donath K: Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien: Geräte und Methodenbeschreibung. EXAKT-Kulzer-Druckschrift, Norderstedt, 1989.
- [64] Michler GH, Lebek W: Ultramikrotomie in der Materialforschung. Carl Hanser, München, 2004.
- [65] Frisch T, Sørensen MS, Bretlau P (2001) Recognition of basic fuchsin prestained microfissures of intravital origin with fluorescence microscopy: validation of a shortcut. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258(2):55–60.
- [66] O'Brien FJ, Taylor D, Dickson GR, Lee TC (2000) Visualisation of three-dimensional microcracks in compact bone. *J Anat* 197(3):413–420.
- [67] Schiebler T, Schmidt W, Zilles K (Hrsg): Anatomie. 8. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1999.
- [68] Klehm J: Einleitung und Wachstum von Mikrorissen im Knochen: Craziing als elementarer mikromechanischer Prozess. Diss., Zentrum für Ingenieurwissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2016.

- [69] Wenzel TE, Schaffler MB, Fyhrie DP (1996) In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone. *Bone* 19(2):89–95.
- [70] Mohsin S, O'Brien FJ, Lee TC (2006) Osteonal crack barriers in ovine compact bone. *J Anat* 208:81–89.
- [71] Fantner GE, Rabinovych O, Schitter G, Thurner P, Kindt JH, Finch MM, Weaver JC, Golde LS, Morse DE, Lipman EA, Rangelow IW, Hansma PK (2006) Hierarchical interconnections in the nano-composite material bone: fibrillar cross-links resist fracture on several length scales. *Compos Sci Technol* 66(9):1205–1211.
- [72] Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal C (2001) The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 19(6):1021–1026.
- [73] Nalla RK, Kruzic JJ, Ritchie RO (2004) On the origin of the toughness of mineralized tissue: microcracking or crack bridging? *Bone* 34:790–798.
- [74] Remaggi F, Ferretti M, Canè V, Zaffe D (1996) Histomorphological and chemico-physical analyses of the mineral matrix of micropetrotic human bone. *Ann Anat* 178:223–227.
- [75] Henning S: Morphologie und Mikromechanik von Knochen und neuartigen, partiell resorbierbaren Knochenzementen. Diss., Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006.
- [76] Rubin MA, Jasiuk I, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian RP (2003) TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. *Bone* 33(3):270–282.
- [77] Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Douglas EP, Gower LB (2007) Bone structure and formation: a new perspective. *Mater Sci Eng R-Rep* 58(3):77–116.
- [78] Chen P, Toroian D, Price P, McKittrick J (2011) Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone. *Calcif Tissue Int* 88:351–361.

8 Thesen

- 1 Die Auflösung der geordneten Struktur des Knochengewebes bei Osteonekrose setzt sich in niedrigeren Strukturebenen fort.
- 2 Die Akkumulation von Mikrorissen führt zur Instabilität der Nekrosezone und schließlich zum Kollaps des Knochengewebes.
- 3 Durch die Osteonekrose ändern sich grundlegende mikromechanische Deformationsmechanismen.
- 4 Die Integrität des Kollagen-Mineral-Nanokomposits wird durch die Osteonekrose gestört, weshalb es seine optimierten Materialeigenschaften verliert.
- 5 Die Osteonekrose führt zu einer veränderten Morphologie der Calciumhydroxylapatit-Kristalle.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 09.01.2023

Felix Natzschka

Veröffentlichungen von Resultaten dieser Arbeit

Vorträge

- Natzschka F, Klehm J, Henning S, Brandt J: Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose. 36. Workshop & Symposium für Experimentelle Osteologie der DGO, Halle (Saale), 06.06.2017
- Klehm J, Natzschka F, Henning S, Brandt J: Möglichkeiten zur Erforschung osteonekrotischer Prozesse im Knochen. 35. Workshop & Symposium für Experimentelle Osteologie der DGO, Hannoversch Münden, 04.06.2016
- Natzschka F, Klehm J, Henning S, Brandt J: Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose. 3. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 20.11.2015
- Natzschka F, Klehm J, Henning S, Brandt J: Schadensentwicklung im Knochen bei Osteonekrose. 34. Workshop & Symposium für Experimentelle Osteologie der DGO, Lutherstadt Wittenberg, 06.06.2015
- Klehm J, Natzschka F, Henning S, Brandt J: Licht- und Elektronenmikroskopische Befunde bei Osteonekrose. 33. Workshop & Symposium für Experimentelle Osteologie der DGO, Halle (Saale), 14.06.2014

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. habil. Jörg Brandt für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie fachliche Anmerkungen und Diskussionen, die zu dieser Arbeit führten. Prof. Dr. med. Karl-Stephan Delank danke ich für die Übernahme der Betreuung, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Promotionsarbeit wesentlich beitrug.

Ein besonderer Dank gilt Dr.-Ing. Jessica Klehm für die intensive Zusammenarbeit, fachliche und technische Unterstützung vor allem bei den praktischen Arbeiten im Labor und mikroskopischen Untersuchungen. Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Labors für Experimentelle Orthopädie, Cornelia Vetter und Angela Rosemeier, die mir bei der teilweise sehr aufwendigen Einbettung der Proben und Herstellung von Trenn-Dünnschliff-Präparaten zur Seite standen. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fraunhofer IMWS danke ich ebenfalls für die technische Unterstützung bei der Anfertigung von REM-Aufnahmen, Probenpräparation für die TEM-Mikroskopie und die zur Verfügung gestellten Materialien und Geräte. Namentlich sind hier Claudia Stehr, Dr. rer. nat. Sven Henning und Matthias Menzel zu erwähnen.

Dem Department für Orthopädie des Universitätsklinikums Halle danke ich für die Zurverfügungstellung der technischen Rahmenbedingungen und die Bereitstellung von Materialien und Proben zur Erstellung dieser Arbeit. Auch die Spender der Knochenproben sollen hier nicht unerwähnt bleiben. In diesem Zusammenhang danke ich auch der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen für das Überlassen einiger Knochenproben von Kiefernekrosen.

Meinen Eltern Antje und Thilo möchte ich danken, dass ihr von Anfang an meine Interessen gefördert und in mir den Anspruch geweckt habt, den es auch für diese Arbeit brauchte. Nicht zuletzt konnte ich mit eurer Hilfe die Bildung erfahren, die mir alle Wege offen gehalten hat.

Am allermeisten danke ich meiner Ehefrau und Managerin Steffi: Ohne dich würde ich vielleicht jetzt noch im Labor sitzen, mich in Details verlieren und neben Arbeit und Familie einfach nicht voran kommen. Auch wenn du meinen Perfektionismus teilst, hast du mich immer wieder ermahnt, mich auf das Wesentliche zu konzentrieren. Und du trittst mir in den Allerwertesten, wenn es mal nicht vorwärts gehen will. Danke, dass du mir bei allen großen und kleinen Fragen zur Seite gestanden und den mit dieser Arbeit verbundenen Stress mit mir ausgestanden hast.

Widmen möchte ich diese Dissertation schließlich meinen Söhnen Bela und Beat. Wenn jemand nach dem Sinn des Lebens sucht - ich habe ihn für mich gefunden. Klingt pathetisch, aber das seid ihr. Ich freue mich, viele weitere Momente mit euch gemeinsam genießen zu können, denn ihr macht mich glücklich. Und ja, ich habe gegen euch beide verloren...