

Knochenanalyse: Beinharte Bilder

Auch Ingenieurwissen ist in den Life Sciences gefragt. Der Kombination von neuen Bildgebungssystemen und quantitativen biologischen Analysen gehört die Zukunft. Ein mit ETH und Universität Zürich entwickelter Kompakt-Mikro-Computertomograph erlaubt einen schnellen Zugriff auf die 3D-Mikrostruktur des Knochens und eröffnet neue Einblicke in genetische Hintergründe der Osteoporose.

VON RALPH MÜLLER

Mit der rasanten Entwicklung in der Genomik und der molekularen Medizin ergibt sich ein grosser Bedarf für Verfahren der quantitativen Biologie. Eine Reihe von neuen Verfahren der mikrostrukturellen Bildgebung wurde in den letzten Jahren eingeführt. Diese Verfahren erlauben eine präzise phenotypische Charakterisierung von verschiedenen humanen und tierischen Modellsystemen, die sich genotypisch, also in ihrem Erbgut, unterscheiden. Obwohl die Technologie für biomedizinische Bildgebung vorhanden ist, wurden in der Vergangenheit nur relativ wenige Versuche unternommen, die Möglichkeiten solcher Systeme dahingehend zu erweitern, dass quantitative Analyseverfahren als integrativer Bestandteil dieser biomedizinischen Informationstechnologien angeboten werden. Mit dem Einzug von mikrostrukturellen Bildgebungssystemen konnte in den letzten zehn Jahren eine neue Generation von bildgebenden Instrumenten eingeführt werden, die sowohl qualitative als auch quantitative Analysen erlauben. Eine solche Entwicklung ist der Kompakt-Mikro-Computertomograph, der an der ETH und der Universität Zürich in Zusammenarbeit mit der schweizerischen Firma Scanco Medical AG (www.scanco.ch) entwickelt wurde. Die Kompakt-Mikro-Computertomographie ermöglicht einen einfachen, schnellen und relativ kostengünstigen Zugang zur 3D-Mikrostruktur des Knochens. Sie bietet heute

Forschern auf der ganzen Welt ein wirksames Verfahren für die Erforschung des alters- und krankheitsbedingten Knochenverlusts, ein Symptom, das besser unter dem Namen Osteoporose bekannt ist.

Systemische Erkrankung

Osteoporose tritt am häufigsten bei Frauen nach der Menopause und im hohen Alter auf. Sie ist definiert als eine systemische Erkrankung des menschlichen Skeletts, die sich durch eine tiefe Knochenmasse und mikroarchitektonische Veränderungen des Knochengewebes auszeichnet. Die Konsequenz aus diesen krankhaften Änderungen ist eine reduzierte Knochenstärke und ein damit einhergehendes erhöhtes Frakturrisiko. Die Erkenntnis hat sich durchgesetzt, dass die Osteoporose schon wegen der grossen Zahl der Betroffenen (fast jede zweite Frau über 65 erleidet einen osteoporotischen Knochenbruch) und den entsprechend grossen sozioökonomischen Problemen ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellt. Obwohl viele ältere Leute Knochenmasse verlieren, haben nicht alle Frakturen. Knochendichte, Geometrie, Mikroarchitektur und Knochenqualität sind Komponenten, welche die eigentliche Knochenstärke bestimmen. Im Mittel können 70 bis 80% der Variabilität der Knochenstärke durch die Knochendichte bestimmt werden. Für einen individuellen Patienten aber bestimmt die Dichte manchmal 90% und manchmal nur 10% der Knochenstärke; das bedeutet eben auch, dass bis zu 90% der Variabilität der Knochenstärke nicht von der Dichte bestimmt werden. Erste Resultate zeigen, dass die Vorhersage der Knochenstärke stark verbessert werden kann, wenn zusätzlich zur Knochendichte auch mikroarchitektonische Parameter in die Analyse miteinbezogen werden.

Mikro-tomographisches Kompaktsystem

Quantitative Morphometrie ist eine Methode zur Analyse der mikrostrukturellen Eigenschaften von Knochen. In der Morphometrie werden traditionell zweidimensionale Dünnschliffe (2D-Histologie) ausgewertet, und die Analyse der dritten Dimension wird mit Hilfe der Stereologie dazugewonnen. Dieser konventionelle Ansatz

Dr. Ralph Müller ist SNF-Professor für Bioingenieurwissenschaften am Institut für Biomedizinische Technik der ETH und Universität Zürich.

beinhaltet eine arbeitsintensive Präparation des Knochens. Besonders einschränkend wirkt sich die destruktive Verarbeitung der Proben aus. Auf diese Weise wird verhindert, dass sie auch für sekundäre Messungen, wie z.B. den biomechanischen Test, gebraucht werden können. Mikro-Computertomographie ist ein alternativer Ansatz für die 3D-Bildgebung und die Analyse von mikrostrukturellen Knochen. Ende der Acht-

ren. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass wir im menschlichen Körper verschiedene Typen von Knochenarchitekturen unterscheiden. Die Art und Häufigkeit dieser Architekturen hängt vom anatomischen Ort und dem Alter des Knochens ab und lässt sich prinzipiell in stab- und plattenartige Strukturen unterteilen (Figur 1 a–c). Für die quantitative Analyse dieser Änderungen werden eine Reihe von morphometrischen Parametern berechnet. Diese Parameter werden direkt in den 3D-Bilddaten berechnet und beinhalten Werte für die volumetrische Dichte, die Strukturfläche, die Dicke, den Abstand und die Anzahl von einzelnen Platten und Stäben sowie quantitative Werte zur Anisotropie und Konnektivität der Struktur. Alle Werte zusammen ergeben dann ein Gesamtbild, wie Knochenstrukturen prinzipiell aufgebaut sind und wie sie sich mit dem Alter oder durch Krankheiten ändern.

Abb. 1:
Dreidimensionale Rekonstruktionen mikro-tomographischer Bilddaten. Menschlicher Knochen:
a) Oberschenkel (Plattenstruktur);
b) Beckenkamm (Hybridstruktur);
c) Wirbelkörper (stabartige Struktur);
Mausknochen:
d) Oberschenkel;
e) Wirbelkörper;
f) heilende Oberschenkelfraktur.

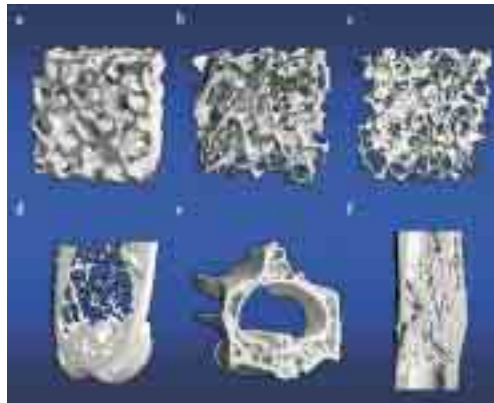
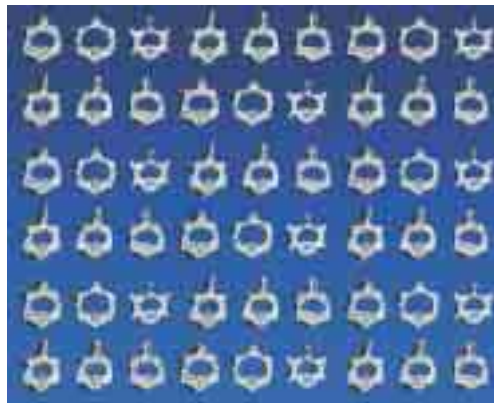


Abb. 2:
Hochdurchsatz-Mikro-Tomographie für genetische Studien in der Maus. Bis zu hundert Wirbelkörper pro Tag können mit einer Auflösung von 10 Mikrometer gemessen und vollautomatisch analysiert werden.



zigerjahre wurden die ersten 3D-Mikro-Tomographiesysteme für Knochen präsentiert. Diese Systeme waren aber sehr gross und unhandlich und konnten somit keine weitere Verbreitung finden. Um den Zugang zu solchen Systemen für die Forscher in der Grundlagen- und präklinischen Forschung zu erhöhen, wurde an der ETH und der Universität Zürich Mitte der Neunzigerjahre ein mikro-tomographisches Kompakt-system entwickelt und kommerzialisiert, das durch seine kleinen Dimensionen auf jeden Labortisch passt. Diese Art von Systemen erreichen nominale Auflösungen von 5 bis 50 Mikrometer in 3D und sind somit in der Lage, normale und pathologische Veränderungen in menschlichen Knochenproben sehr genau festzustellen und zu quantifizie-

Mäuseknochen und Mausgene

Der Einsatzbereich dieser Geräte hat sich aber in den letzten Jahren durch das grosse Interesse an genomischer und molekular-genetischer Forschung auf die Messung von Knochen von Kleintieren, insbesondere der Maus, ausgeweitet. Die Maus als Modellorganismus ist heute das wichtigste Tiermodell in der molekularen Knochenforschung, da das Mausgenom wie das menschliche Genom nun vollständig entschlüsselt ist und sich zudem diese Tiere sehr gut für genetische Manipulationen (transgenic, knock-out, knock-in) eignen. Als eine Konsequenz daraus ergibt sich eine Vielzahl neuer genotypisch verschiedener Modelle, die auch auf ihre phenotypische Erscheinungsform untersucht werden müssen. Eine spezielle Herausforderung besteht nun darin, dass die Mäuseknochen sehr klein sind, und sich deshalb die Mikro-Tomographie mit ihrer hohen örtlichen Auflösung auch sehr eignet, um quantitative Untersuchungen der Mikrostruktur von intakten Mäuseknochen durchzuführen (Figur 1 d–f). Da die Anzahl der zu untersuchenden Tiere sehr hoch sein kann (pro Studie bis zu mehreren tausend), muss die Interaktionszeit des Bedieners auf ein Minimum reduziert werden, und die analytischen Verfahren müssen vollautomatisch ablaufen. Dies bedeutet einen hohen Durchsatz mit enormen Datenmengen. Am Institut für Biomedizinische Technik werden während einer Studie bis zu

20 Gigabyte Daten pro Tag produziert und automatisch analysiert, was auf einen jährlichen Datendurchsatz weit über der Terabyte-Grenze schliessen lässt. Dem informationstechnologischen Aspekt solcher Anwendungen kommt eine wichtige Bedeutung zu, da solche Datenmengen auch richtig verwaltet werden müssen. Aus diesem Grunde ist die biomedizinische Informationstechnologie ein wichtiger Teil der Forschung in der Fachgruppe. Obwohl die produzierte Datenmenge sehr gross ist und die Verwaltung und Analyse eine echte Herausforderung darstellt, ist der Nutzen solcher Hochdurchsatz-Ansätze (Figur 2) beträchtlich. So konnte in einer aktuellen Studie zum ersten Mal gezeigt werden, dass Knochenarchitektur und Knochenstärke im Allgemeinen durch Gene auf verschiedenen Chromosomen beeinflusst werden und dass in verschiedenen Knochen des Skelettes verschiedene Genkombinationen zum Tragen kommen. Dies hat auch wichtige Implikationen für die Beurteilung des Frakturrisikos beim Menschen, da rund 70% des Risikos für eine Osteoporose genetisch bedingt sind.

Knochenversagen in 3D

Obwohl die quantitative Knochenmorphometrie interessante Einsichten in die Entwicklung und die altersabhängige Veränderung des Knochens liefern kann, ermöglicht sie keinen direkten Rückschluss von der Knochenarchitektur auf das eigentliche Frakturverhalten. Um eine direkte Einsicht in das Versagen von Knochen zu erhalten, haben wir eine Methode entwickelt, die es erstmals erlaubt, Knochenversagen dreidimensional zu visualisieren und zu analysieren. Das Zusammenbringen von Mikrokompression und Mikro-Tomographie erlaubt es, über das elastische Verhalten des Knochens neue Aufschlüsse über die Plastizität und das lokale Versagensverhalten des mikrostrukturellen Knochens zu erhalten. Um nicht nur schöne Visualisierungen, sondern auch Berechnungen der lokalen Verschiebungen und Dehnungen in den komprimierten Strukturen machen zu können, wurde ein neues Verfahren entwickelt. Diese neue Methode braucht sequenzielle, zeitaufgelöste Mikrokompressionsbilder, um

1. die Bilddaten der verschiedenen Schritte auszurichten,
2. lokale anatomische Punkte (Knoten) in der Struktur zu identifizieren und in allen Schritten zu verfolgen,

3. ein Netzwerk von Konnektivitäten zwischen den Knoten zu erstellen,
4. die lokalen Verschiebungen und Dehnungen zwischen diesen Knoten zu berechnen.

In einer Studie wurden so humane Knochenzylinder in Schritten von 0%, 4%, 8% und 12% komprimiert und mikrotomographisch gemessen. Dabei wurden die lokalen Dehnungen direkt aus dem Experi-

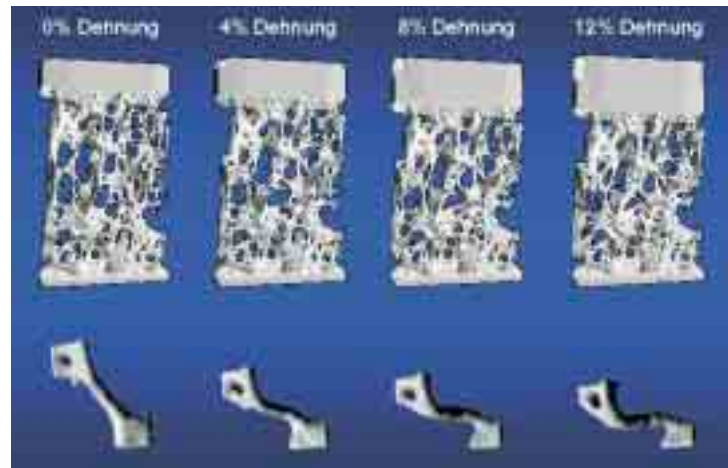


Abb. 3: Zeitaufgelöste experimentelle Messung des Versagensprozesses in der menschlichen Wirbelsäule. Die obere Reihe zeigt einen Ausschnitt einer zylindrischen Knochenprobe, die in Schritten von 4% Dehnung belastet und jeweils mikrotomographisch gemessen wurde. Die untere Reihe zeigt, wie mit Hilfe der Mikrokompression die Verformung eines einzelnen Elementes verfolgt werden kann.

ment berechnet. Die Resultate zeigten, dass die mittleren Dehnungen viel kleiner als die von aussen aufgelegte Dehnung waren. Dafür waren aber maximale lokale Dehnungen 5 bis 8 mal grösser als die externe Dehnung. Dies bestätigte unsere Theorie eines lokalen, bandartigen Versagens des mikrostrukturellen Knochens (Figur 3 oben). Die höchsten lokalen Dehnungen wurden meistens in stabartigen Strukturen gefunden, die in der Haupttrichtung der Belastung lagen (Figur 3 unten). Diese Untersuchungen zeigten aber auch, dass Knochen nach dem Prinzip des schwächsten Gliedes in der Kette brechen: Sobald ein Element nachgibt, werden auch umliegende Elemente überlastet. Das führte schliesslich zu einem schwerwiegenden Versagen der ganzen Struktur. Ziel zukünftiger Studien wird es sein, zu untersuchen, inwieweit sich das Frakturverhalten von osteoporotischem Knochen von normalem Knochen unterscheidet und inwieweit sich dieses Verhalten auf genetische Faktoren zurückführen lässt.

