



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**COMPUTER-UNTERSTÜTZTE RADIODENSITOMETRIE  
DER KNOCHENVERÄNDERUNGEN BEI  
EXPERIMENTELLER OSTEOMYELITIS**

verfasst von

Meliha Kujundzic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 442

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Anthropologie

Betreuerin / Betreuer: Univ.Prof.i.R. Dr. Hanns Plenk

Wien, im August 2013



*„Alles messen, was messbar ist.*

*Und was nicht messbar ist, messbar machen.“*

***Galileo Galilei (1564-1642)***

## **Danksagung**

An erster Stelle bedanken möchte ich mich bei Dr. Karl H. Kaudela für die Überlassung des radiologischen Studienmaterials und die freundliche Unterstützung dieser Diplomarbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Ass. Prof. Dr. Karl Grossschmidt und MTA Frau Astrid Haase (Medizinische Universität Wien, Zentrum für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie) für die Aufnahme in den Laborbetrieb, die Einführung in die Untersuchungstechniken, und die freundliche Hilfsbereitschaft, die sie mir entgegenbrachten.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Hanns Plenk (Medizinische Universität Wien, Institut für Histologie und Embryologie, Skelettgewebe- und Biomaterialforschung) für die hervorragende wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Diplomarbeit. Durch seine fachliche Kompetenz wurde mein Verständnis für das wissenschaftliche Arbeiten maßgeblich geprägt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Mag. Sylvia Kirchengast (Universität Wien, Department für Anthropologie) für ihre administrative Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir in jeglicher Hinsicht dieses Studium ermöglicht haben.

## **Kurzfassung**

### **COMPUTER-UNTERSTÜTZTE RADIODENSITOMETRIE DER KNOCHENVERÄNDERUNGEN BEI EXPERIMENTELLER OSTEOMYELITIS**

**Einleitung und Problemstellung:** Das konventionelle Röntgenbild spielt noch immer eine sehr große Rolle in der Osteomyelitis Diagnostik und Verlaufskontrolle. Beschreibungen und subjektive Einschätzung der entzündlichen und reparativen Knochenveränderungen bei experimenteller Osteomyelitis beruhen auf radiologisch etablierten Kriterien und pathohistologischem Scoring. Ziele dieser Diplomarbeit waren einerseits Erprobung computerunterstützter Messmethoden zur Erfassung der für Osteomyelitis charakteristischen Knochenveränderungen, andererseits die Eigenentwicklung einer Erfassung der Röntgendichte-Veränderungen an den vorliegenden Röntgenbildern einer experimentellen Studie. Die neuen objektiven radiologischen Bewertungen sollten mit bereits vorliegenden subjektiven Einschätzungen des Schweregrades der Osteomyelitis durch einen Radiologen verglichen, und mit eigenen pathohistologischen Befunden korreliert werden.

**Material und Methoden:** In der experimentellen Studie war in 4 Gruppen bei jeweils 8 Neuseeland-Kaninchen (w, 1.7- 2.0 kg) die rechte Tibia operativ mit Staphylococcus aureus (Gruppen A+B), und mit Pseudomonas aeruginosa (Gruppen C+D) infiziert worden. Die etablierte chronische Osteomyelitis war nach 4 Wochen operativ mit Antibiotikum-imprägniertem Humanbankknochen (A: Osteomycin®-Vancomycin; C: Osteomycin®-Tobramycin) behandelt worden, oder mit Antibiotikum-kombiniertem Knochenzement (B: Palacos®-Vancomycin, D: Palacos®-Gentamycin). Nach 7 Wochen waren die Tiere getötet und die Tibia für pathohistologische Untersuchungen (unentkalkte, Giemsa-oberflächengefärbte proximale und distale Querschliffe, Histomorphometrie, Polyfluorochrom-Sequenzmarkierung) entnommen worden. Analoge medio-laterale Röntgenbilder von 4 radiologischen Verlaufskontrollen (jeweils Beginn und Ende der Infektionsphase und Behandlungsphase) wurden für radiomorphometrische und radio-densitometrische Messungen digitalisiert, standardisiert und kalibriert. Die Messungen wurden mithilfe von Photoshop CS5 (Adobe®, USA) und

NIS-Elements AR 3.2 Software (Nikon, Japan) durchgeführt. Die Daten wurden statistisch mit SPSS 18.0 und SAS<sup>®</sup> Learning Edition 4.1 evaluiert.

**Ergebnisse:** Mithilfe der computerunterstützten Radio-Morphometrie konnten in der ausgewerteten Region (AOI) zwischen Tuberositas tibiae und fibulo-tibialen Vereinigung bei der Schaftverbreiterung in 3 von 4 Gruppen während der Behandlung eine Zunahme, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden. Die Vermessung der proximalen und distalen Tibia-Schaftdurchmesser ergab ebenfalls eine Zunahme während der Behandlungsphase, und dieser Parameter korreliert signifikant mit den Ergebnissen des subjektiven radiologischen Scorings. Mithilfe der radio-densitometrischen Quantifizierung der Röntgendichten konnten in der Infektions- bzw. Behandlungsphase bei allen Gruppen Veränderungen der Flächenanteile mit Kortikalisdichte, periostaler und intramedullärer Knochenbildung und am Bankknochen (nur Gruppen A und C) gezeigt werden, die mit den histomorphometrischen Befunden übereinstimmen. In den Gruppen A und B wurde in der Behandlungsphase ein Anstieg der Flächenanteile mit kortikaler Knochendichte gemessen. In beiden Gruppen nahm die periostale Knochenbildung ab, und die intramedulläre Knochenbildung nahm zu. Bei der Gruppe C zeigte sich in der Behandlungsphase eine deutliche Erhöhung der Knochenflächenanteile mit Kortikalisdichte. Die Menge des Bankknochens hatte sich deutlich verringert. In der Gruppe D blieb dagegen die periostale Knochenbildung während der Behandlungsphase gleich, und beim kortikalisdichten Knochen wurde eine Verminderung gemessen. Diese Befunde stimmen mit dem statistischen Vergleich der pathohistologischen Scores für Entzündung und Reparation bei den Gruppen C und D überein.

**Diskussion und Schlussfolgerungen:** Trotz standardisierter Anfertigung waren oft erhebliche Unterschiede in Belichtung und Bildqualität der analogen Röntgenbilder zu beobachten, die dann nach ebenfalls standardisierter Digitalisierung eine weitere angleichende Bildbearbeitung im Photoshop CS5 erforderten. Da wegen des geringeren Einflusses der Positionierung der rechten unteren Extremität nur die Röntgenbilder im medio-lateralen Strahlengang ausgewertet wurden, konnte dann aber bei der Radio-Densitometrie nur die anteriore Hälfte des Tibiaschaftes bewertet werden, weil in die posteriore Hälfte auch die Fibula projiziert war. Durch radio-morphometrische

Vermessung der konventionellen Röntgenbilder konnten die Veränderungen der Schaftdicke nachvollziehbar und als Zahlenwerte angezeigt werden, und diese Daten korrelierten auch deutlich mit der subjektiven Einschätzung dieser Parameter durch einen erfahrenen Radiologen. Die neuentwickelte Radio-Densitometrie zeigte großes Potential für eine detaillierte Befundung von Röntgendichteveränderungen im Verlauf dieser experimentellen Osteomyelitis-Studie, und ermöglicht auch eine vergleichende Erfolgsbewertung der verschiedenen Therapieverfahren.

## **Abstract**

### **COMPUTER-ASSISTED RADIODENSITOMETRY OF BONE CHANGES IN EXPERIMENTAL OSTEOMYELITIS**

**Introduction and Aims:** Conventional radiography is still standard for the clinical diagnosis and follow-up of osteomyelitis. Thus, in experimental osteomyelitis description and subjective estimation of inflammatory and reparative bone changes are based on parameters established in clinical radiology, and then supplemented by pathohistological scorings. Aims of the present diploma work were first the testing of computer-assisted morphometry for exact measurement of structural bone changes, and secondly the own development of a radiodensitometric quantification of bone changes on the existing conventional radiographs from an experimental osteomyelitis study. The resulting data should be compared with the subjective scoring of the severity of osteomyelitis by a clinical radiologist, and be correlated with own pathohistologic findings.

**Material und Methods:** For the experimental study in 4 groups of 8 New Zealand rabbits each (f, 1.7-2.0 kg) the right tibia was surgically infected with *Staphylococcus aureus* (groups A+B), and with *Pseudomonas aeruginosa* (groups C+D). The established chronic osteomyelitis was surgically treated after 4 weeks with either antibioticum-impregnated human bank bone (A: Osteomycin®-Vancomycin; C: Osteomycin®-Tobramycin), or antibioticum-combined bone cement (B: Palacos®-Vancomycin; D: Palacos®-Gentamycin). After 7 weeks the animals were sacrificed and the right tibia retrieved for pathohistological evaluations (undecalcified proximal and distal cross ground sections, Giemsa-surface stained histomorphometry, polyfluorochrome sequential labelling). For the radio-morphometric and the radio-densitometric evaluations analogous medio-lateral radiographs from 4 follow-ups (begin and end of infection phase and treatment phase) were digitized, standardized and calibrated. The measurements were performed with Photoshop CS5 (Adobe®, USA) and NIS-Elements AR 3.2 Software (Nikon, Japan). Data were statistically analyzed using SPSS 18.0 und SAS® Learning Edition 4.1.

**Results:** Using computer-assisted radio-morphometry, during treatment phase an increase of the tibial shaft area in the region (AOI) between tibial tuberosity and fibulo-

tibial union was measured only in groups A to C, while in D shaft thickness decreased, but differences between groups were not significant. Measurement of proximal and distal shaft diameters in the AOI yielded also increases in the treatment phase, and for this parameter a significant correlation with the subjective radiological scoring was calculated. Radio-densitometric evaluation could differentiate areas of cortical bone, periosteal and intramedullary bone density, and bank bone or bone cement, respectively, which corresponded with histometrical findings in all groups. In groups A and B areas of cortical and intramedullary bone density increased during treatment, while periosteal bone areas decreased. Also in group C cortical bone density areas increased significantly, and a decrease of bank bone was measured. In contrast, group D showed no changes in periosteal bone areas, and cortical bone density areas decreased during treatment. These differences in radiodensities between groups C and D were in accordance with the pathohistological scorings of inflammatory versus reparative changes.

**Discussion and Conclusions:** Despite standardized techniques the analogous radiographs were of different exposure and quality, requiring after standardized digitalization adaptive image processing in Photoshop CS5. Due to lesser variation in positioning of the right lower extremity only the medio-lateral radiographs could be used for evaluation, but then only the anterior half of the tibia was evaluated by radio-densitometry, because the fibula was projected over the posterior half. By radio-morphometric measurements on conventional radiographs the changes of tibial shaft thickness could be reproducibly expressed as hard data which correlated well with the subjective scoring by an experienced radiologist. The newly developed radio-densitometry showed great potential for a detailed evaluation of bone density changes during experimental osteomyelitis, allowing also the quantification of successful healing after different treatment modalities.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	IV
Kurzfassung.....	V
Abstract .....	VIII
Inhaltsverzeichnis .....	X
1. Einleitung .....	1
1.1. Definition und Klassifikationen der Osteomyelitis .....	1
1.1.1 Klassifikation nach der Entstehung.....	3
1.1.2. Klassifikation nach dem Erreger .....	3
1.1.3. Klassifikation nach dem zeitlichen Ablauf .....	4
1.2. Paläopathologie der Osteomyelitis.....	6
1.3. Diagnostik der Osteomyelitis .....	7
1.3.1. Klinische Befunde .....	7
1.3.2. Labordiagnostik.....	8
1.3.3. Bildgebende Diagnostik .....	8
1.3.3.1. Konventionelle Radiologie.....	8
1.3.3.2. Computertomographie (CT).....	9
1.3.3.3. Magnetresonanztomographie (MRT).....	10
1.3.3.4. Szintigraphie.....	11
1.3.4. Pathohistologische Diagnostik .....	12
1.4. Therapie der Osteomyelitis .....	13
1.5. Problemstellung und Ziele dieser Studie.....	14
2. Material und Methoden .....	16
2.1. Studienmaterial.....	16
2.2. Radiologische Dokumentation .....	18
2.3. Intravitale Polyfluorochrome Sequenzmarkierung .....	19
2.4. Auswertungsmethoden .....	19
2.4.1. Schritt 1 der Bildbearbeitung: Digitalisierung der analogen Röntgenbilder...19	
2.4.2. Schritt 2 der Bildbearbeitung: Kalibrierung der Röntgenbilder.....	21

2.4.3. Schritt 3 der Bildbearbeitung: Definition der Auswertungsareale ( Areas of interest = AOI).....	22
2.4.4. Radio-morphometrische Messungen .....	23
2.4.4.1. Methode 1: Flächenmäßige Erfassung der Dickenzunahme des Tibiaschaftes in der AOI.....	23
2.4.4.2. Methode 2: Metrische Erfassung der Tibia-Schaftdurchmesser in der AOI .....	24
2.4.5. Radio-densitometrische Messungen .....	25
2.4.5.1. Methode 1: Erfassung der Röntgendichteverteilungen im Tibiaschaft als Profil -und Oberflächen-Darstellung .....	25
2.4.5.2. Methode 2: Radio-densitometrische Auswertung der Röntgenaufnahmen der Tibiaschäfte und Vermessung der Flächen gleicher Röntgendichte in der AOI .....	26
2.4.6 Pathohistologische Auswertung.....	29
2.4.6.1 Präparat- Herstellung .....	29
2.4.6.2. Pathohistologische Evaluation und das Scoring System für die osteomyelitischen Veränderungen.....	30
2.4.6.3. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung .....	31
2.4.7. Histomorphometrische Auswertungen .....	32
2.4.8. Statistische Auswertungen.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1. Verlaufskontrolle von Infektions- und Behandlungsphase durch hämatologische und blutchemische Befunde.....	34
3.2. Radiologische Befunde.....	35
3.2.1. Radiographische Beurteilung der Osteomyelitis-Veränderungen durch einen externen Radiologen an konventionellen Röntgenaufnahmen mithilfe eines Scoring-Systems .....	35
3.2.2. Radio-morphometrische Messergebnisse .....	37
3.2.2.1. Flächenmäßige Veränderungen des Tibiaschaftes in der AOI .....	37
3.3. Metrische Erfassung der Veränderung der Schaftdurchmesser.....	41
3.4. Radio-densitometrische Profil-Darstellung der Knochenveränderungen.....	51
3.5. Radio-densitometrische Auswertung der konventionellen Röntgenaufnahmen...	52

3.6. Pathohistologische Evaluation und Scoring-Ergebnisse für die osteomyelitischen Veränderungen .....	64
3.7. Histomorphometrische Befunde.....	70
3.8. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Knochenumbauvorgänge in der Behandlungsphase mithilfe der intravitalem Polyfluorochrom-Sequenzmarkierung ....	74
4. Diskussion und Schlussfolgerungen.....	79
5. Literaturverzeichnis.....	84
6. Anhang .....	90
6.1 Anhang 1: Fotodokumentation der verwendeten konventionellen Röntgenbilderserien.....	90
6.2. Anhang 2: Tabellen der radio-densitometrisch berechneten Flächenanteile in der AOI.....	105
7. Curriculum vitae.....	113
8. Eidesstattliche Erklärung.....	114

# **1. Einleitung**

## **Das Krankheitsbild der Osteomyelitis**

Infektiöse Knochenkrankheiten sind schon aus den frühen Phasen der menschlichen Kulturgeschichte bekannt. Die Symptome einer Osteomyelitis wurden schon im Edwin Smith Papyrus- einem der ältesten medizinischen Texte beschrieben. [Walter et al. (2012)] Zeichen einer Osteomyelitis (z.B. Subperiostale Knochenreaktionen, und Verdickung oder Zerstörung der Kortikalis) werden auch sehr oft an fossilen menschlichen Skeletten beobachtet. Die ersten Berichte über die Ätiologie von Knochenentzündungen standen beinahe immer im Zusammenhang mit einem traumatischen Ereignis (Fraktur, Kriegsverletzungen, Operationen, etc.). Im Jahr 1852 wurde aber ein Fall einer Osteomyelitis bei einem zweijährigen Kind von Edouard Chassaignac beschrieben und die Bedeutung der hämatogenen Osteomyelitis erkannt. [Peltier (1993)] Bis in die 1920- und 1930-er Jahre stand die chirurgische Therapie der Osteomyelitis im Mittelpunkt der Diskussion. Die Heilungschancen wurden später durch die Einführung der Antibiotika deutlich erhöht. [Schwameis et al. (1996)]

### **1.1. Definition und Klassifikationen der Osteomyelitis**

Der Begriff Osteomyelitis leitet sich aus den zwei griechischen Wörtern – osteon (Knochen) und myelos (Mark) her, und „itis“ weist auf eine entzündliche Form dieser Knochenmarkserkrankung hin [Baltensperger und Eyrich (2009)].

Das Krankheitsbild der Osteomyelitis kann im Betracht auf bestimmte Kriterien in Gruppen eingeteilt werden (Abb.1.1.):

1. Klassifikation nach der Entstehung: exogene, hämatogen-endogene, oder idiopathische(=meist zu diesem Zeitpunkt noch unbekannte) Ursachen, z.B. stoffwechselstörungsbedingte oder genetische Ursachen
2. Klassifikation nach dem/den Erreger(n): unspezifische Entzündungen, spezifische Entzündungen

3. Klassifikation nach dem zeitlichen Ablauf: akute und/oder chronische Entzündungen
4. Klassifikation nach der Lokalisation: unifokale oder multifokale Läsionen.

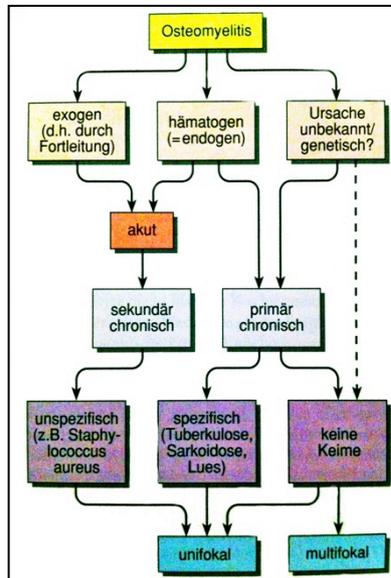


Abbildung 1.1.: Einteilung der Osteomyelitis [aus Jundt (2004)]

Eine weitere Unterteilung richtet sich nach dem Alter des Patienten und dem unterschiedlichen Vaskularisationsmuster des Knochens (Abb.1.2.). Die Osteomyelitis beim Säugling oder Kleinkind betrifft meistens die Metaphysen der langen Röhrenknochen und kann so über die Epiphyse in das Gelenk fortgeleitet werden. [Niethard et. al (2009)] Bei der Juvenilen Osteomyelitis stellt die knorpelige, daher avaskuläre Epiphysenfuge eine Barriere dar, so dass die Entzündung meistens auf die Metaphyse beschränkt bleibt.[Dietz et. al (2004)] Bei der Erwachsenenosteomyelitis breitet sich die Infektion ähnlich wie bei der Säuglingsosteomyelitis in die Epiphyse und das Gelenk aus.

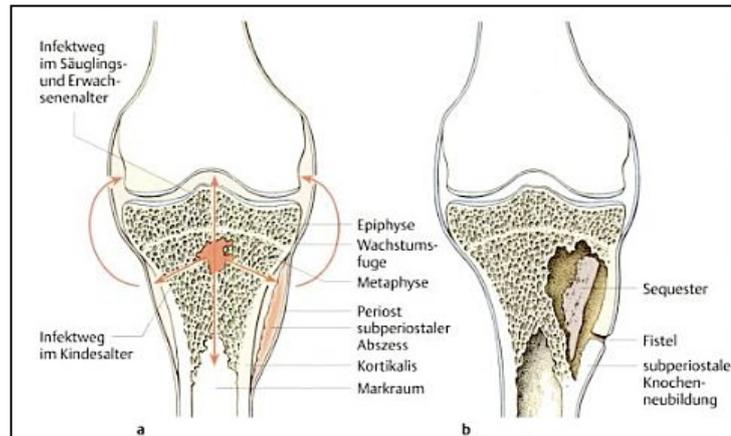


Abbildung 1.2.: Infektionswege und Verlauf der Osteomyelitis in verschiedenen Lebensaltern beim Menschen [aus Niethard et. al (2009)]

### 1.1.1 Klassifikation nach der Entstehung

Nach Art der Ausbreitung und Entstehung der Infektion unterscheidet man die exogene Form von der endogenen bzw. hämatogenen Form der Osteomyelitis. Die exogene Form kommt etwa doppelt so häufig vor wie die endogene Form. [Jundt (2004)]

Bei der exogenen Infektion gelangen die Erreger von außen (offene Frakturen, Verunreinigung bei Operationen) in den Knochen und breiten sich über die Kortikalis auf andere Knochenbestandteile aus (Osteitis - Osteomyelitis). [Stäbler (2012)] Bei der endogenen Knochenmarksentzündung gelangen die Erreger dagegen über die Blutbahn in den Knochen und die Infektion kann sich vom Knochenmark auf andere Bestandteile des Knochens ausbreiten (Osteomyelitis - Osteitis).

Der Begriff Osteomyelitis wird in der Praxis öfters durch den Begriff Osteitis ersetzt, da in vielen Fällen neben der Infektion des Knochenmarks auch alle anderen Knochenbestandteile befallen sind.

### 1.1.2. Klassifikation nach dem Erreger

Abhängig vom Infektionserreger unterscheidet man die unspezifische und die spezifische Osteomyelitis.

Die unspezifische Osteomyelitis manifestiert sich am häufigsten in den langen Röhrenknochen (80%), aber auch in platten Knochen (10%) und in den kurzen Röhrenknochen (8%). In den Knochen der Wirbelsäule kommt diese Form der Erkrankung jedoch selten vor. [Jundt et al. (2004)] Die häufigsten Erreger der unspezifischen Osteomyelitis sind Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa. [Gogia et al. (2007)] Diese Art der Infektion ist häufiger als die spezifische Osteomyelitis.

Bei der spezifischen Osteomyelitis kommt es bei der Knochenmarks- und Knochenentzündung zu für den Erreger charakteristischen pathohistologischen Strukturen, wie z.B. bei der Tuberkulose (Tuberkulome) und der Lues oder Syphilis (Gumenbildung).

### **1.1.3. Klassifikation nach dem zeitlichen Ablauf**

Für das diagnostische und therapeutische Vorgehen in der Praxis ist es sehr wichtig, zwischen akuter und chronischer Osteomyelitis zu unterscheiden.

Von einer akuten Osteomyelitis spricht man, wenn die Infektion weniger als vier Wochen dauert und dann ausheilt. Die akute Osteomyelitis tritt am häufigsten bei Säuglingen und Kindern, oder bei Erwachsenen ab dem 50. Lebensjahr als Folge einer Allgemeinerkrankung mit Fieber, Schüttelfrost und lokalen Schmerzen auf. [Bohndorf et al. (2006)] Charakteristisch für die akute Osteomyelitis ist die schnelle Entstehung und Ausbreitung. Bei adäquater Therapie ist ein schneller Rückgang der Symptome zu beobachten. Die Infektion entsteht meistens hämatogen, also endogen. Ein akuter Beginn einer exogenen Osteomyelitis ist auch möglich, jedoch verläuft diese meistens chronisch. (Tab.1.1.)

Wenn die Infektion aber länger als 4 Wochen anhält, handelt es sich um eine chronische Osteomyelitis. Die chronische Osteomyelitis entwickelt sich meistens aus dem akuten Stadium. Die primär chronische Osteomyelitis entsteht bei günstiger Abwehrlage, z.B. aus einer primär hämatogenen Aussaat der Bakterien [Niethard et al. (2009)] Bei der chronischen Osteomyelitis unterscheidet man zwischen der sekundären und der

selteneren primären Form. Die sekundär chronische Osteomyelitis entsteht meistens aus einer nicht abgeheilten exogenen Knochenentzündung. [Harder und Kuster (2011)]

Einteilung	Dauerder Osteomyelitis/Verlauf
Akute Osteomyelitis	≤ 4 Wochen
Chronische Osteomyelitis Form A	> 5-7 Wochen (gelegentlich Fistelbildung)
Chronische OsteomyelitisForm B	Rezidiv nach langem Intervall (Sequester)

Tabelle 1.1.:Osteomyelitisklassifikation nach dem Verlauf [aus Harder und Kuster (2011)]

Die primär chronische Osteomyelitis hat einen schleichenden, oft nicht erkannten Beginn, und hat einen langen, über Monate andauernden chronischen Verlauf. Man unterscheidet drei verschiedene Formen der primär chronischen Osteomyelitis:

- Osteomyelitis sklerosansGarré,
- Plasmazelluläre Osteomyelitis
- Brodie-Abszess [Weber und Stein (2004)]

Die Osteomyelitis sclerosans Garré ist eine seltene Form der chronischen Osteomyelitis. Bei dieser Form findet man keine Bildung eines Weichgewebe-Abszesses oder Knochen-Sequesters, und die vorausgehende Phase der Knochendestruktion kann nicht nachgewiesen werden. Man findet aber radiologisch eine sehr dichte Sklerosierung des befallenen Knochenteiles. Die chronisch- sklerosierende Osteomyelitis Garréist häufig nach einer Streptokokkensepsis zu beobachten. [Treisch und Langer (1992)]

Bei der Plasmazellulären Osteomyelitis handelt es sich um eine lokalisierte Form der chronischen Osteomyelitis mit einer Kavernenbildung, die fast nur Plasmazellen enthält. Ein Erregernachweis ist bei dieser Form meistens nicht möglich. [Niethard et al. (2009)]

Der Brodie-Abszess entwickelt sich meistens nach einer chronischen Osteomyelitis. Charakteristisch für diese Form der primär chronischen Osteomyelitis ist die

radiologisch auffällige Sklerosierung in der Metaphyse der langen Röhrenknochen, jedoch mit zentralen eitrigen Einschmelzungen. [Debrunner (1985)]

## **1.2. Paläopathologie der Osteomyelitis**

Die Paläopathologie ist eine Wissenschaft, die Krankheiten und degenerative Veränderungen an fossilen menschlichen und tierischen Skeletten aus verschiedenen frühgeschichtlichen Epochen analysiert und dokumentiert. Die Häufigkeit von Knochenentzündungen ist durch verschiedene osteologisch-paläopathologische Untersuchungen belegt. Die besten Beweise für die Diagnose einer Osteomyelitis an paläologischen Skelettfunden sind schwellungsartige Verdickungen der Diaphyse, Kloaken, Sequester und periostale Reaktionen. [Ortner und Putschar (1981); Herrmann et al. (1990)]

Im Bericht von Wood-Jones (1910) über Untersuchungen an altägyptischen Skeletten waren offensichtlich entzündliche Knochenkrankheiten sehr selten. [Sandison und Tapp (1998)] Nach einem Vergleich der Skelette von Ägyptern und Europäern aus der gleichen Epoche kam Wood-Jones zum Ergebnis, dass die alten Ägypter offenbar resistenter gegen infektiöse Erkrankungen des Knochens gewesen sein müssen als die Europäer. Ebenso hat Hooton (1930) insgesamt 503 Skelette von Indianern aus Nordamerika befundet und berichtete nur über 4 Fälle von Osteomyelitis. [Ortner und Putschar (1981)]

Ein diagnostisch klar erkennbares Beispiel der Osteomyelitis sind juvenile Skeletteile aus La Oroya -Peru, bei denen das Alter des Individuums auf 9 Jahre geschätzt wurde. [Ortner (2003)] Von diesem Individuum wurden nur die rechte und linke Tibia geborgen, die sich aber in einem sehr guten Erhaltungszustand befinden, und an der linken Tibia typische Veränderungen zeigen (siehe Abb.1.3.)

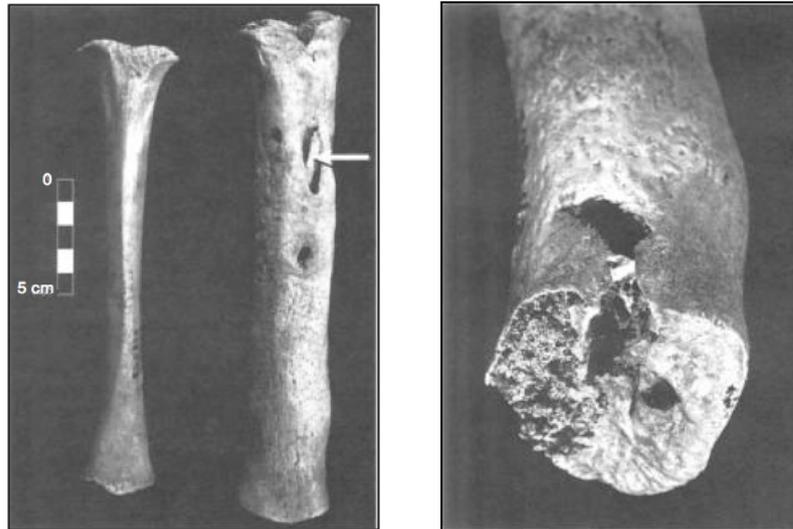


Abbildung 1.3.: Osteomyelitis bei einem 9 jährigen Kind: Die linke Tibia ist deutlich verdickt und länger, zeigt Kloakenbildungen und einen Sequester in einer Totenlade (Pfeil); das rechte Bild zeigt einen Querschnitt in der Höhe der Kloake [aus Ortner (2003)]

### 1.3. Diagnostik der Osteomyelitis

Die Diagnose einer Osteomyelitis am rezenten menschlichen oder tierischen Patienten wird anhand der klinischen Anamnese und durch Laborbefunde und bildgebende Diagnostik, sowie durch pathohistologische Befunde gestellt. [Lang (1996); Lew and Waldvogel (2004)]

#### 1.3.1. Klinische Befunde

Das klinische Bild der Osteomyelitis stützt sich an die fünf bekannten Entzündungszeichen: Rubor, Calor, Dolor, Tumor, Functio laesa. Daher klagen die Patienten über lokale Schmerzen, Rötung und Hautveränderungen, Überwärmung, Schwellung und Funktionsstörung des betroffenen Körperteiles, sowie über Allgemeinerscheinungen wie Fieber und Schüttelfrost.

### **1.3.2. Labordiagnostik**

Bei den Blutbild- und laborchemischen Untersuchungen werden im Falle eines Verdachtes auf Osteomyelitis die akuten Entzündungsparameter wie Erhöhung der Anzahl der Leukozyten (WBC) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BGS), und im chronischen Verlauf das C-reaktive Protein (CRP) in Betracht gezogen. Erhöhungen dieser Parameter mit obigen klinischen Beschwerden weisen auf eine Osteomyelitis hin. Es gibt jedoch Fälle, bei denen diese Entzündungsparameter unauffällig bleiben, eine Osteomyelitis aber nicht ausgeschlossen werden kann (z.B. bei primär chronischer Osteomyelitis). Eine wichtige Rolle bei einer unklaren Osteomyelitis-Diagnostik spielt der Nachweis von typischen Erregern in der Blutkultur, die eine Knochenmarksentzündung verursachen. In über der Hälfte der Osteomyelitis-Fälle sind die Blutkulturen positiv, was neben einer adäquaten Diagnose vor allem zu einer Therapie mit dem geeigneten Antibiotikum beiträgt. [Döbele et al. (2011)]

### **1.3.3. Bildgebende Diagnostik**

#### **1.3.3.1. Konventionelle Radiologie**

Bei klinischem Verdacht auf Osteomyelitis wird als erstes eine konventionelle Röntgenaufnahme gemacht. Dies dient zur Übersichtsdarstellung der Anatomie und eventuell veränderter Knochenstrukturen. Im Anfangsstadium einer Osteomyelitis kann das Röntgenbild jedoch unauffällig sein, denn im konventionellen Röntgenbild treten sichtbare Veränderungen erst nach 7 bis 14 Tagen auf. [Schmidt et al. (2011)]

Bei der akuten Osteomyelitis werden als erstes nur aufgehellte (=radioluzente, weniger röntgendichte) Strukturen sichtbar. Solche Strukturauflockerungen werden in der Kortikalis und der Spongiosa nachgewiesen (Abb.1.4.). Im weiteren Verlaufe der Entzündung kommt es aber zu distinkten periostalen und ossären Veränderungen, es

werden Periost Verdickungen und Sequester (meist in Totenladen) sichtbar. [Bohndorf et al. (2006), Kreitner K.F. (2006)]

Bei der chronischen Osteomyelitis werden dann charakteristische Röntgen-Verdichtungen des Knochens, also osteosklerotische Veränderungen sichtbar. (Abb.1.4.) Periostal ist die Region verbreitert und darunter eine konsekutive Kortikalisveränderung zu sehen. [Adler (2004), Bohndorf et al. (2006)] Im Röntgenbild wird jedoch eine periostal beginnende Sklerosierung auch als erstes Heilungszeichen der Osteomyelitis angesehen.

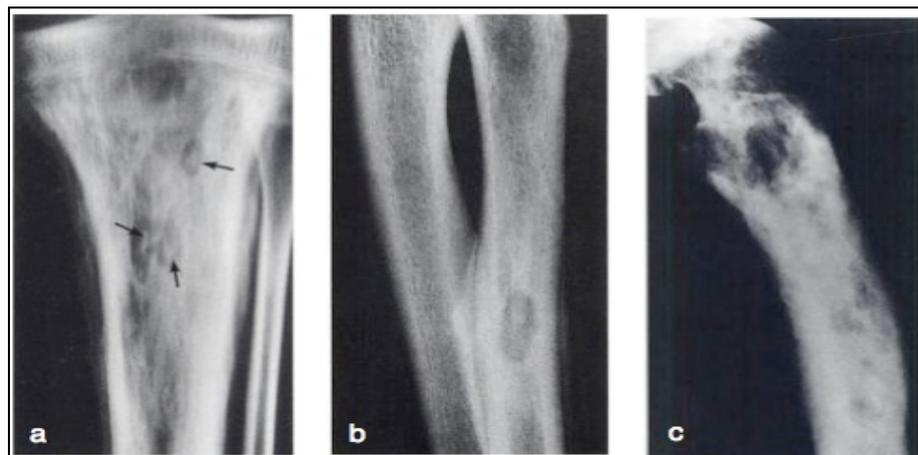


Abbildung 1.4.: a) Akute multifokale hämatogene Osteomyelitis der Tibia mit Aufhellungen und Sequesterbildung in Totenladen (Pfeile)

b) Akute hämatogene Osteomyelitis im Radius mit Aufhellung (Abszeßhöhle, Totenlade und Sequester), sowie periostaler Knochenneubildung, die zur Verschmelzung der Unterarmknochen führte.

c) Chronische Osteomyelitis im proximalen Femur mit Knochendestruktionen im Femurhals- und Trochanterbereich, und Verdickung mit flächiger Sklerosierung und Aufhellungen der Diaphysen-Kortikalis [aus Freyschmidt (2003)]

### 1.3.3.2. Computertomographie (CT)

Die Computertomographie (CT) wird für detailliertere Bildgebung und Nachweis der Knochenveränderungen eingesetzt, und ist wegen der Möglichkeit einer 3D-Rekonstruktion sehr hilfreich. Mit dieser Methode ist es möglich, sogar sehr diskrete Veränderungen darzustellen. Bei der chronischen Osteomyelitis werden abnormale Verdickungen der Kortikalis und sklerotische Veränderungen, sowie Sequester und

andere Anomalien die z.B. bei der herkömmlichen Röntgentechnik noch nicht sichtbar sind, dargestellt (Abb.1.5.). Nachteile diese Methode sind hohe Strahlenbelastung und im Vergleich zum MRT geringerer Weichteilkontrast. [Pineda et al. (2009)]



Abbildung 1.5.: Die CT-Schichtaufnahme eines linken Unterschenkels zeigt in der Tibia eine große Resorptionshöhle mit Sequester und Lufteinschluss [aus Flückiger und Zimmerli (2001)]

### **1.3.3.3. Magnetresonanztomographie (MRT)**

Die Magnetresonanztomographie hat auch eine bedeutende Rolle in der Osteomyelitis Diagnostik. Diese Methode wird grundsätzlich dann angewendet, wenn nach der Röntgenaufnahme noch immer eine Notwendigkeit einer zusätzlichen Diagnostik besteht. [Bohndorf et al. (2006)] Die MRT hat eine gute räumliche Auflösung und hohen Weichteilkontrast, weswegen diese Methode auch für die Darstellung von Abszessen, intramedullären Entzündungen und Nekrosen eingesetzt wird (Abb.1.6.). [Schmidt et al. (2011)] Bei der akuten Osteomyelitis werden im MRT-Bild z.B. Knochenmarksödeme, Fistelgänge, und andere Weichteilreaktionen deutlich sichtbar. [Hofman und Kramer (2001), Büll et al(2007)] Bei der chronischen Form der Osteomyelitis werden bei der MRT Untersuchung neben Flüssigkeitsansammlungen (Ödemen) auch sklerotische und fibrotische Knochenmarkanteile gut dargestellt. [Hofmann und Kramer (2001), Burgener et al.(2002)]

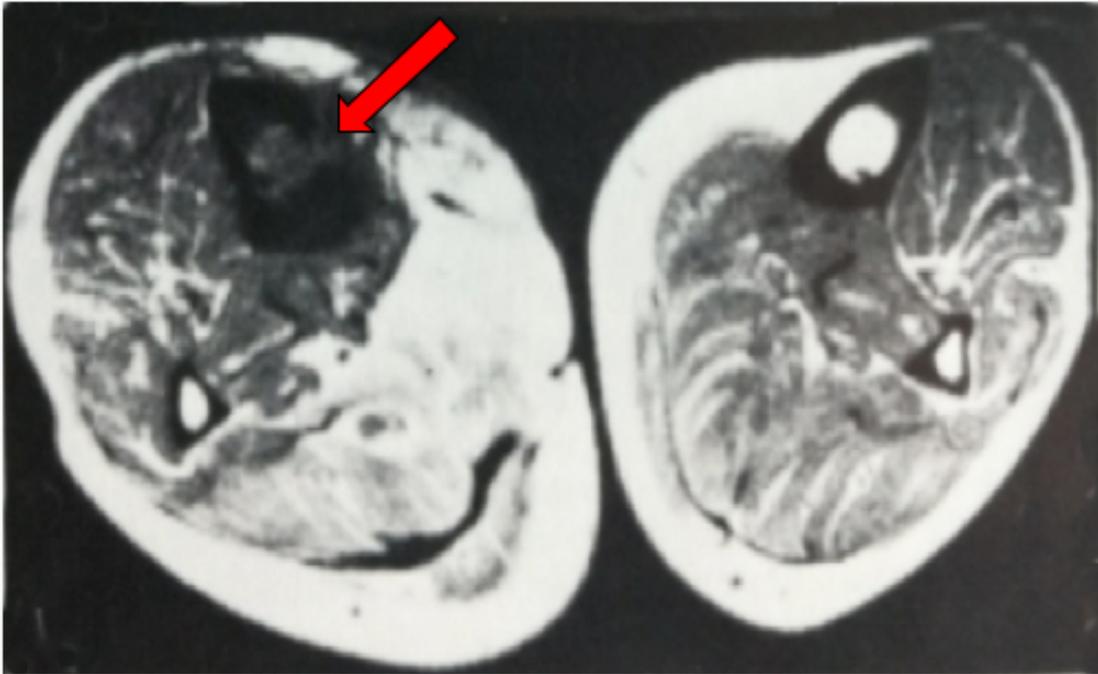


Abbildung 1.6.: Axiale MRT beider Unterschenkel. Geringe Signalintensität des Knochenmarks in der rechten Tibia mit Zerstörung der anteromedialen Kortikalis (Pfeil), und hoher Signalintensität der medio-posterioren Muskulatur im Gegensatz zum normalen Zustand der linken Tibia [aus Resnick and Niwayama, (1988)]

#### 1.3.3.4. Szintigraphie

Diese nuklearmedizinische Methode dient zur Darstellung der Intensität und Ausdehnung der Osteomyelitis. Die Szintigraphie ist auch für eine Früherkennung der Erkrankung sehr gut geeignet. [Hardt (1991)] Anhand der 3 Phasen-Knochenszintigraphie ist es möglich, eine Osteomyelitis schon 1 bis 2 Tage nach dem Eintreten zu diagnostizieren. [Weissleder et al. (2003)] Hierbei wird ein radioaktiver Tracer, in der Regel  $^{99m}\text{Tc}$  (Technetium) - Phosphatkomplexe, intravenös injiziert. [Freyschmidt (2003)] Die Substanz lagert sich zuerst im Weichgewebe und dann im Knochen ein. Drei bis vier Stunden nach der Injektion kann man die Aufnahmen machen. Im sogenannten Szintigramm kann man die von der Osteomyelitis befallenen Areale deutlich sehen (Abb. 1.7.).

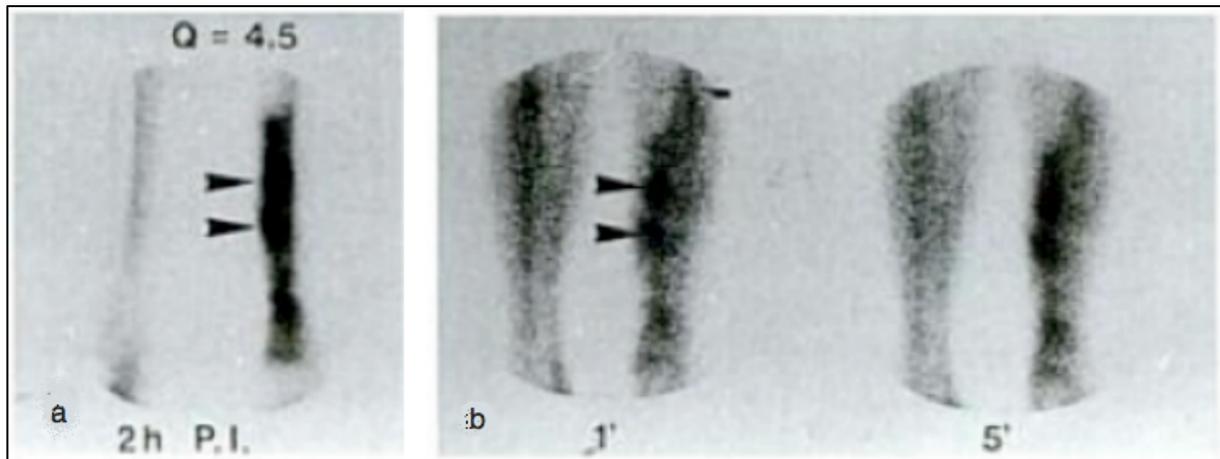


Abbildung 1.7.:Knochenszintigraphie : a) Chronische Osteomyelitis b)Subakute Osteomyelitis.  
[aus Bischoff (2009)]

#### 1.3.4. Pathohistologische Diagnostik

Die histologische Untersuchung hat eine besondere Aufgabe bei der Osteomyelitis Diagnostik, denn je nach Aktivität der Zell- und Gewebereaktionen kann man akute und chronische Osteomyelitis eindeutig unterscheiden. [Schmidt et al. (2011)] Für diese Untersuchungen müssen biopsische oder post-mortem Gewebeprobe n zuerst fixiert, eingebettet, zu Dünnschnitten verarbeitet und anschließend gefärbt werden.

Die akute Osteomyelitis ist durch einen mit Ödemflüssigkeit durchtränkten Markraum, Fibrinablagerungen und Granulozytenansammlungen charakterisiert. Bakterienkolonien und Sequester können auch sichtbar sein. Typisch für die chronische Osteomyelitis sind Lymphozyten-, Plasmazellen- und Makrophagen-Infiltrate. Oft sind jedoch auch noch Granulozyten-Infiltrate aus der akuten Phase sichtbar. Charakteristisch für spätere Stadien ist eine Markraumfibrose (=Narbengewebe), und auch eine irreguläre, oft schlecht abgrenzbare Geflechtknochen-Neubildung. Im Markraum und im Knochengewebe befindliche Osteoklasten- und Osteoblasten-Ansammlungen deuten auf fortgeschrittene Umbauprozesse hin (Abb.1.8.).

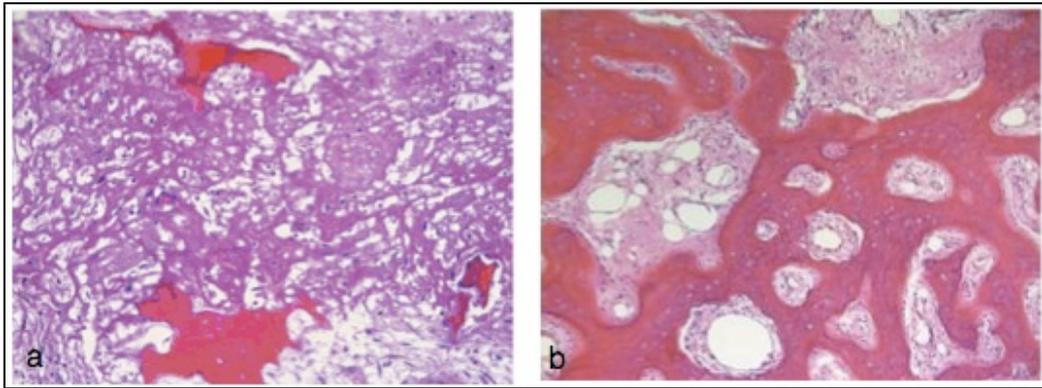


Abbildung 1.8.: Pathohistologische Diagnostik: a) akute Osteomyelitis mit Entzündungszell-Infiltraten im Markraum und Knochenresorption an endostalen Knochenbälkchen. b) sekundär chronische Osteomyelitis mit reaktiver Geflechtknochenneubildung [aus Krenn und Tiemann (2012)]

#### 1.4. Therapie der Osteomyelitis

Man unterscheidet die systemische und die lokale Therapie von Osteomyelitis. Die Therapie erfolgt entweder mit Antibiotika und/oder mit chirurgischen Maßnahmen. Diese Behandlung der Osteomyelitis kann häufig langwierig sein. Die noch nicht fortgeschrittenen Formen der Osteomyelitis werden zunächst systemisch mit hohen Dosen von Antibiotika behandelt. Man unterscheidet hierbei die gezielte und ungezielte Behandlung. [Stille et al. (2011)] Eine Antibiotikabehandlung ist in der akuten Phase erfolgsversprechend solange der Knochen noch ausreichend durchblutet ist. Bei der chronischen Osteomyelitis wird die Antibiotikabehandlung mit einer operativen Behandlung kombiniert. Bei der operativen Behandlung wird z.B. der Markraum eröffnet und das infizierte und meist nekrotische (avitale) Gewebe exzidiert, oder durch Kürettage mehr oder weniger vollständig entfernt. Nachdem das infizierte Gewebe entfernt worden ist, müssen die Hohlräume mit lokalen Antibiotikaträgern gefüllt werden. Als Antibiotikaträger werden verschiedene Knochenersatzmaterialien eingesetzt, wie z.B. nicht abbaubare Polymethylmethakrylat-Knochenzement-Plomben und PMMA-Ketten, oder abbaubare Knochenersatzmaterialien oder degradierbare Polymer-Schwämme u.ä. Vorteil solcher Antibiotikaträger ist die lokale Abgabe des Antibiotikums, weil systemisch über das Blut applizierte Antibiotika oft nicht in genügend hoher Konzentration in den Entzündungsbereich gelangen. [Jaspaul et al.

(2009)] Alternative neuere Antibiotikaträger sind antibiotikaimprägnierte Allografts (humane Bankknochen) [Winkler et al. (2000), Buttaro et al. (2003), Witsø et al. (2005)], wie sie in der tierexperimentellen Studie verwendet wurden, die dieser Diplomarbeit zugrunde liegt („Efficacy and Local Tolerance of CO<sub>2</sub>-cleaned and Antibiotic-impregnated Human Spongiosa in Chronic Osteomyelitis“, Seibersdorf Laboratories 2009-2012 )

### **1.5. Problemstellung und Ziele dieser Studie**

Die entzündlichen Knochenveränderungen und die therapeutisch erreichten Heilungsvorgänge bei tierexperimenteller Osteomyelitis wurden bisher nach radiologischen Kriterien beschrieben und nur subjektiv eingeschätzt [Smeltzer et al. (1997)]. Da sich im radiologischen Bild die destruktiven und die rekonstruktiven Knochenreaktionen auf die akute und chronische Entzündung mit körpereigenen und durch die Therapie ausgelösten Heilungsvorgängen überlagern, sind Ausmaß und zeitlicher Ablauf von Therapieeffekten so nur schwer erfassbar. Bei der obengenannten Studie zur Behandlung einer experimentellen Osteomyelitis beim Kaninchen mit Antibiotika-kombinierten humanen Bankknochen im Vergleich mit kommerziell erhältlichen Antibiotika-Knochenzement Präparationen ergab eine subjektive Einschätzung der radiologisch erfassbaren Veränderungen einen nicht nachvollziehbaren Therapie- Erfolg der Antibiotika-Bankknochen Kombination (Abb.1.9.)

Ziele dieser Diplomarbeit waren die Einführung computerunterstützter Messmethoden zur Erfassung der diaphysären Knochenstruktur- und Röntgendichte-Veränderungen an konventionellen Röntgenbildern der infizierten und dann behandelten Kaninchen-Tibia. Diese objektiven Messwerte sollten mit einer neuerlichen, unabhängigen subjektiven radiologischen Bewertung der Osteomyelitis-Veränderungen validiert werden. Darüber hinaus sollten diese eigenen quantitativen radiologischen Befunde auch mit eigenen pathohistomorphologischen und histometrischen Ergebnissen der Studie korreliert werden.

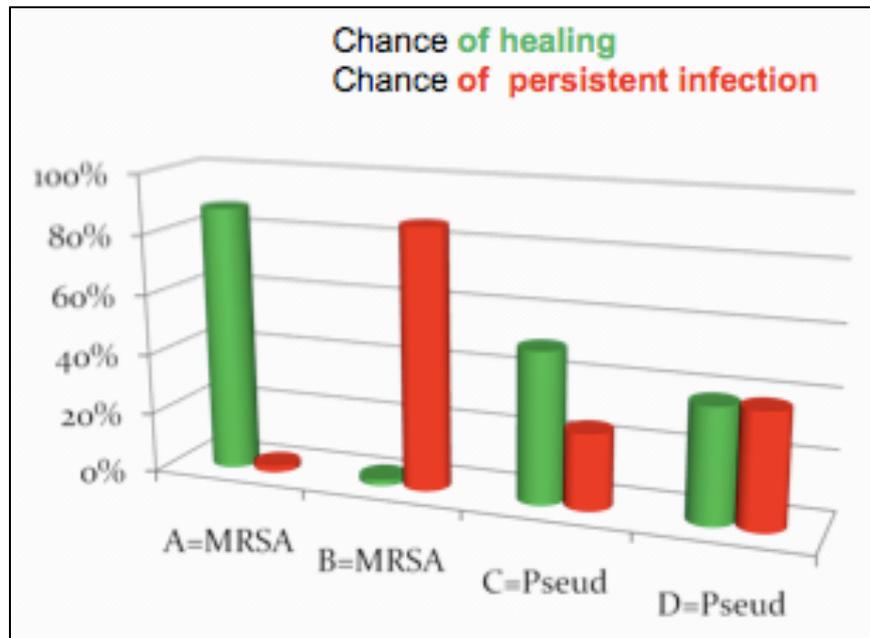


Abbildung 1.9.: Ergebnisse der subjektiven Einschätzung der radiologisch erfassbaren Veränderungen in den Gruppen A bis D und der statistischen Berechnung der Chancen auf Heilung oder Persistenz der Infektion [aus Kaudela et al. (2010)]

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienmaterial

Ausgangsmaterial dieser Diplomarbeit sind konventionelle analoge Röntgenaufnahmen (siehe Anhang) aus einer tierexperimentellen Studie („Efficacy and Local Tolerance of CO<sub>2</sub>-cleaned and antibiotic-impregnated Human Spongiosa in Chronic Osteomyelitis“, Seibersdorf Laboratories 2009-2012), bei der zwei verschiedene, mit Antibiotika kombinierte Knochenersatzmaterialien zur Behandlung einer klinisch manifesten Osteomyelitis bei Kaninchen eingesetzt und verglichen wurden.

**Versuchstiere:** Die insgesamt 32 Neuseeland-Kaninchen (ausgewachsen, weiblich, 1.7-2.0 kg Körpergewicht am Studienbeginn) wurden zu je 8 Tieren in vier Gruppen A bis D aufgeteilt.

**Infektion:** In einem ersten operativen Eingriff wurde bei allen 32 Kaninchen der Markraum der rechten Tibia proximal eröffnet, und bei den 16 Kaninchen der Gruppen A und B durch *Staphylococcus aureus* (MRSA) infiziert, indem eine bakterielle Suspension (0.10 ml je  $5 \times 10^7$  CFU /mL) injiziert und danach auch ein mit dieser Bakteriensuspension kontaminierter intramedullärer Nagel (Kirschnerdraht aus rostfreiem Stahl, 0,78 cm Durchmesser) inseriert wurde. Abschluß durch sterilen Wundverschluß.

Bei den 16 Kaninchen der Gruppen C und D wurde für diesen gleichen Infektionsvorgang das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (PMA); (0.10 ml je  $5 \times 10^7$  CFU / mL) verwendet.

Die Dauer der darauf folgenden Infektionsphase betrug jeweils 4 Wochen.

**Hämatologische und klinisch-biochemische Kontrolle während der Infektions- und Behandlungsphase:** Für die hämatologische bzw. biochemische Kontrolle wurden Blutproben aus der zentralen Ohrvene entnommen und folgende Parameter bestimmt:

A) Rotes Blutbild: Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC), Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hk), Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Mittleres Zellvolumen (MCV).

B) Weißes Blutbild: Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC), Differential-Blutbild der weißen Blutkörperchen (% der verschiedenen Zellarten)

C) Thrombozytenzahl

D) Klinisch-biochemische Kontrolle: CRP (C-reaktives Protein), Fibrinogen.

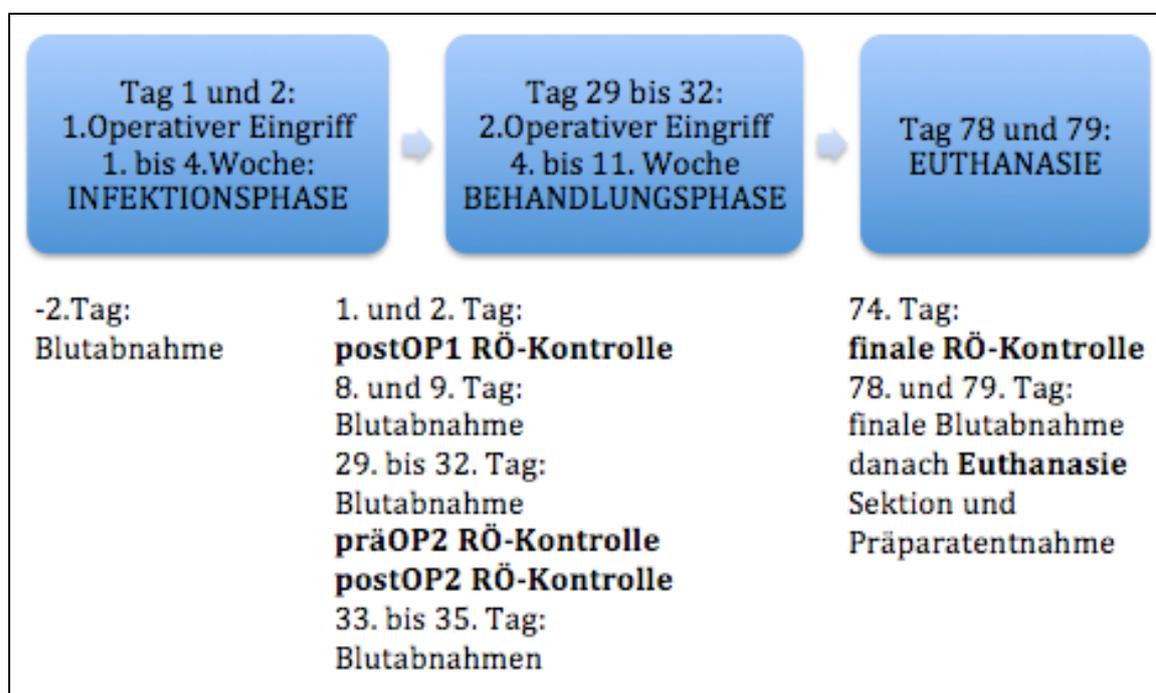


Abbildung 2.1.: Zeitlicher Ablauf der Studie und Zeitpunkte der jeweiligen Untersuchungen

**Behandlungen:** Nach vier Wochen wurde die Behandlung der klinisch-hämatologisch etablierten chronischen Osteomyelitis durch die in der Behandlung menschlicher Patienten üblichen Methoden in einem zweiten operativen Eingriff begonnen. Nach neuerlicher Markraumöffnung wurde der kontaminierte Nagel entfernt, ein Debridement (2mm Kürette von Medicon), und eine Lavage (0,9% sterile Kochsalzlösung von Braun/Melsungen) des Markraumes durchgeführt, dann jeweils mit Antibiotikum-kombinierter Bankknochen oder Knochenzement eingebracht, und mit einer neuerlichen Marknagelung (steriler Kirschnerdraht aus rostfreiem Stahl, 1,56 cm Durchmesser) und sterilem Wundverschluß abgeschlossen.

**Antibiotikum-kombinierte Bankknochen bzw. Knochenzement:**

In der Gruppe A wurde zur Behandlung das humane Bankknochen-Produkt Osteomycin-V® (ECTB, Europ. Cell & Tissue Bank, Österreich) verwendet. Hierbei handelt es sich um

mit Vancomycin(Vancocin<sup>®</sup>, AstroPharma) imprägnierte menschliche Spongiosa-Knochenexplantate (1g Vancomycin/ 1,8g Bankknochen).

Zur Behandlung bei der Gruppe C (n=8) wurde Osteomycin-T<sup>®</sup> (ECTB, Europ.Cell&Tissue Bank, Österreich) verwendet. Dieses Produkt besteht aus mit Tobramycin imprägniertem menschlichem Bankknochen (0,4g Tobramycin/1,8g Bankknochen).

Für die Behandlung der Tiere der Gruppe B wurde Palacos<sup>®</sup>Knochenzement (Heraeus GmbH, Deutschland) verwendet. Da dieses Produkt kein Antibiotikum enthält, wurde das Monomerpulver vor der Abmischung mit Vancocin<sup>®</sup>(Astro-Pharma) versetzt (1,0g Vancomycin-Hydrochlorid/10.0 g Knochenzement).

Die Gruppe D wurde ebenfalls mit Antibiotikum-imprägniertem Knochenzement behandelt. Hierbei handelte es sich um das kommerzielle Produkt Palacos<sup>®</sup>+G (Heraeus GmbH, Deutschland), welches im Gegensatz zu dem für die Behandlung von den Tieren der Gruppe B verwendeten Knochenzement das Antibiotikum Gentamycin schon beinhaltet.

Nach einer Behandlungsphase von 7 Wochen wurden die Tiere durch eine intravenöse Injektion von 100 mg/kg Thiopental<sup>®</sup> getötet und die Unterschenkelknochen für weitere mikrobiologische und pathohistologische Untersuchungen entnommen.

## **2.2. Radiologische Dokumentation**

Analoge Röntgenaufnahmen (Gerät: Siemens MULTIX C, Cawomat 2000 IR Processor, Belichtung: 60 kV mit Bucky Blende, automatische mAS, Korrektur 0, +1, +2, Film: Valmex VA 990 G-T green sensitive, 35x35 cm, Cassette: CAWO ABS OG8 ortho 400, Developer: ADEFO GV 60, Fixative: AGFA G 354) der rechten unteren Extremität wurden im antero-posterioren und medio-lateralen Strahlengang an vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt:

- 1) Beginn der Infektionsphase: Unmittelbar nach dem ersten Eingriff
- 2) Ende der Infektionsphase: 4 Wochen nach dem ersten Eingriff, vor dem zweiten Eingriff
- 3) Beginn der Behandlungsphase: 1 Woche nach dem zweiten Eingriff

4) Ende der Behandlungsphase: 7 Wochen nach dem zweiten Eingriff, am Tag vor der Tötung. (Siehe Abb.2.1.)

### **2.3. Intravitale Polyfluorochrome Sequenzmarkierung**

In der Behandlungsphase wurden die Reparatur-, und Umbauprozesse im Knochen in-vivo mit Hilfe einer dreifachen polyfluorochromen Sequenzmarkierung gekennzeichnet. Für die erste Markierung wurde Calcein (Merck, Deutschland) 10 Tage nach dem zweiten chirurgischen Eingriff verabreicht. Es wurde jeweils 5 mg Calcein / 2 mL dest. /kg, steril filtrierte subkutan injiziert.

Der zweite Farbstoff Alizarin-Komplexon (Chroma, Schweiz) wurde 21 Tage nach dem zweiten chirurgischen Eingriff verabreicht. Es wurde jeweils 30 mg Alizarin-Komplexon plus 20 mg NaHCO<sub>3</sub> / 2 mL dest. / Kg, pH 6-8, steril filtrierte subkutan injiziert.

Für die dritte Markierung wurde wieder Calcein (Merck, Deutschland) wie oben mindestens drei Tage vor der Tötung injiziert.

### **2.4. Auswertungsmethoden**

#### **2.4.1. Schritt 1 der Bildbearbeitung: Digitalisierung der analogen Röntgenbilder**

Der erste Schritt bei der Bildbearbeitung war die Digitalisierung der konventionellen analogen Röntgenaufnahmen in seitlicher (medio-lateraler) Projektion, die mit einer Digital-Kamera (Canon 450D mit Makroobjektiv) und einer Kaltlicht-Platte unter standardisierten Bedingungen aufgenommen wurden. Die digitalen Bilder wurden in Photoshop CS5 importiert. Da diese digitalen Bilder trotzdem von unterschiedlicher Qualität und Ausleuchtung waren, musste man diese anhand der verschiedenen Werkzeuge aus dem Photoshop CS5 angleichen, um einen Vergleich und Befund überhaupt möglich zu machen. Nach dem Import wurden die Bilder zuerst aus dem RGB-Modus mit Hilfe der Photoshop Korrekturoption in den Schwarzweiß-Modus transformiert. (Abb.2.2.)



Abbildung 2.2.: Transformation des digitalen Röntgenbildes vom RGB Modus in den Schwarzweiß Modus: a) Infektionsphase, Tier D-34, b) Behandlungsphase, Tier C-24

Um bestimmte Strukturen im Röntgenbild deutlicher hervorzuheben wurde das Werkzeug für die Tonwertkorrektur benutzt. Mit Hilfe dieser Option lässt sich der Kontrast erhöhen und bestimmte Strukturen im Bereich der proximalen Diaphyse deutlicher erkennen. (Abb. 2.3.)



Abbildung 2.3.: Effekt der Tonwertkorrektur, Tier D-32

In manchen Fällen kann es dennoch vorkommen dass die Bildqualität noch immer sehr schlecht ist, da die Bilder unter- bzw. überbelichtet waren. In diesem Fall benutzt man die Werkzeuge für Belichtungs – und für die Tiefen- und Lichterkorrektur. (Abb. 2.4.)

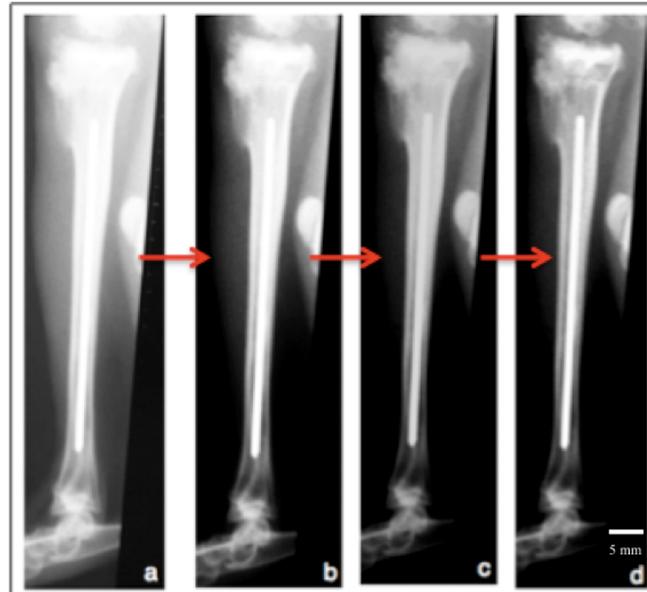


Abbildung 2.4.: a) überbelichtetes schwarz-weiß Bild, b) nach Tonwertkorrektur, c) nach Belichtungskorrektur, d) endgültige Tiefen und Lichterkorrektur, Tier C-21

#### 2.4.2. Schritt 2 der Bildbearbeitung: Kalibrierung der Röntgenbilder

Die Kalibrierung der Röntgenaufnahmen für metrische und Flächenmessungen wurde anhand der bekannten Durchmesser der intramedullären Nägel durchgeführt. Für diesen Schritt wurde die Analyse Funktion aus dem Photoshop CS5 benutzt, anhand welcher die Pixel in Millimeter konvertiert wurden. (Abb. 2.5.)



Abbildung 2.5. : Schritt 2-Kalibrierung: Dicke des Kirschnerdrahtes 1,56 mm der Behandlungsphase, Tier A-5

### 2.4.3. Schritt 3 der Bildbearbeitung: Definition der Auswertungsareale (Areas of interest = AOI)

Als die Area of Interest (AOI) wurde der Bereich von unterhalb der Tuberositas tibiae bis zur Ebene des fibulo-tibialen Übergangs definiert, um ungefähr den Anteilen des proximalen Tibiaschaftes zu entsprechen, die für die pathohistologische Auswertung gewonnen worden waren. Mit Hilfe des Auswahl-Werkzeuges wurde die AOI ausgewählt und anschließend mit einem Rahmen markiert. (Abb. 2.6.)



Abbildung 2.6.: Schritt 3- Definition der Area of Interest (AOI) von der Tuberositas tibiae bis zum fibulo-tibialen Übergang, Tier A-5

## 2.4.4. Radio-morphometrische Messungen

### 2.4.4.1. Methode 1: Flächenmäßige Erfassung der Dickenzunahme des Tibiaschaftes in der AOI

Mit Hilfe des Zauberstabes aus dem Photoshop wurden der anteriore und posteriore Teil des Tibiaschaftes innerhalb der AOI durch ihre höhere Röntgendichte gegenüber dem Weichteilkontrast ausgewählt und mit einer Falschfarbe markiert. Die Toleranz des Zauberstabes war generell auf 50 gesetzt, bei Bildern mit niedrigerer Auflösung musste der Toleranzbereich auf 30 gesenkt werden. Anschließend wurden nach Abzug des Marknagels die markierten Flächen-Messungen an den kalibrierten Bildern mittels der Analyse-Funktion als Absolutwerte aufgezeichnet und in MS Excel exportiert. (Abb. 2.7.)

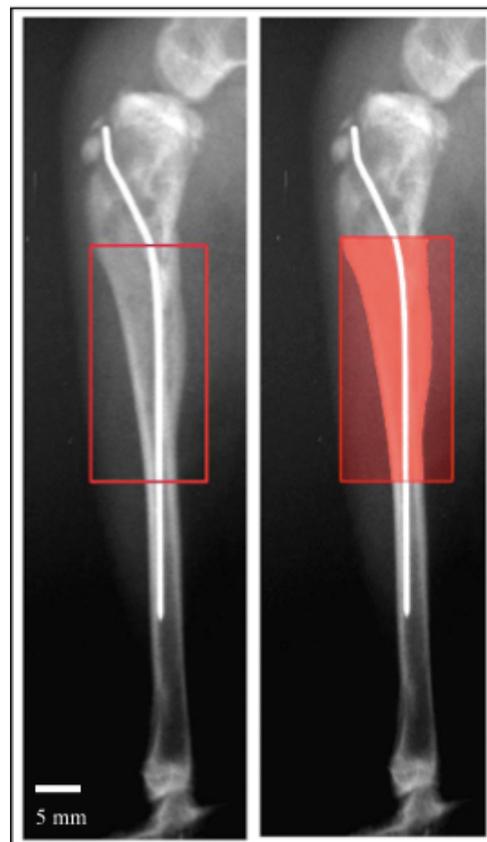


Abbildung 2.7.: Methode 1- Morphometrische Messung der hellrot markierten Tibia-Schaftfläche in der AOI, Tier A-5

#### 2.4.4.2. Methode 2: Metrische Erfassung der Tibia-Schaftdurchmesser in der AOI

Die Messungen wurden mit Hilfe des Linealwerkzeuges auf zwei Querschnittebenen innerhalb der AOI an den kalibrierten Röntgenbildern durchgeführt. Die erste gemessene Ebene liegt proximal knapp unterhalb der Tuberositastibiae, die zweite distal knapp über dem fibulo-tibialen Übergang. Für die Erfassung der metrischen Daten wurde die Analyse Funktion vom Photoshop CS5 verwendet. Die erhobenen Daten wurden als Tabellen aus dem Photoshop in MS Excel exportiert. (Abb. 2.8.)



Abbildung 2.8.: Schritt 4- Methode 2: Metrische Erfassung der Tibia-Schaftdicke in der AOI , Durchmesser 1 (proximal) und 2 (distal), Tier A-5

## 2.4.5. Radio-densitometrische Messungen

### 2.4.5.1. Methode 1: Erfassung der Röntgendichteverteilungen im Tibiaschaft als Profil -und Oberflächen-Darstellung

Mit Hilfe der Messfunktion aus dem Programm NIS-Elements AR 3.2 (Nikon, Japan) wurden Helligkeitsprofile bzw. Oberflächendarstellungen gemacht.

Die Profile wurden an drei verschiedenen Ebenen erstellt. Das erste Profil wurde an der proximalen Ebene knapp unterhalb der Tuberositas tibiae, das zweite distale Profil knapp über dem fibulo-tibialen Übergang, und das dritte Profil wurde in der Mitte zwischen diesen zwei Ebenen erstellt. Die Profile wurden als Histogramme abgespeichert und diskutiert. (Abb. 2.9.)

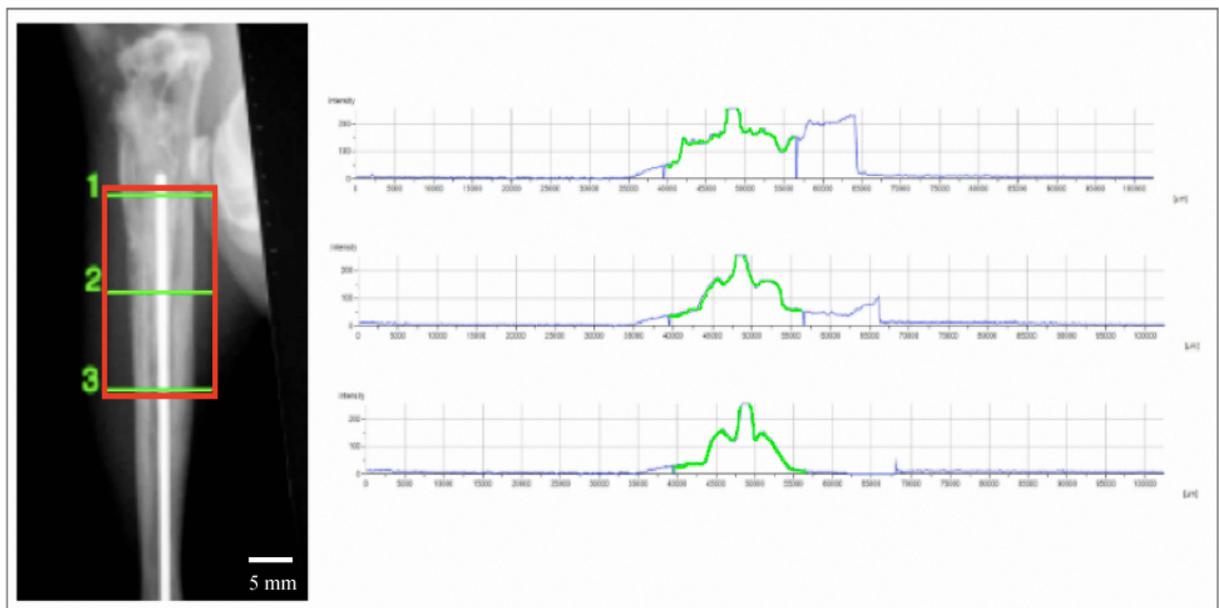


Abbildung 2.9.: Radio-densitometrische Helligkeitsprofile des Röntgenbildes in der proximalen Ebene 1, der Mittelebene 2, und der distalen Ebene 3 der AOI, Tier B-17

Die Intensitäts-Oberflächen-Darstellungsfunktion aus NIS-Elements kann auch für eine 3D-Radio-densitometrische Darstellung der Bilder benutzt werden. (Abb. 2.10.)



Abbildung 2.10.: 3D-Intensitäts Oberflächen Darstellung, Tier A-5

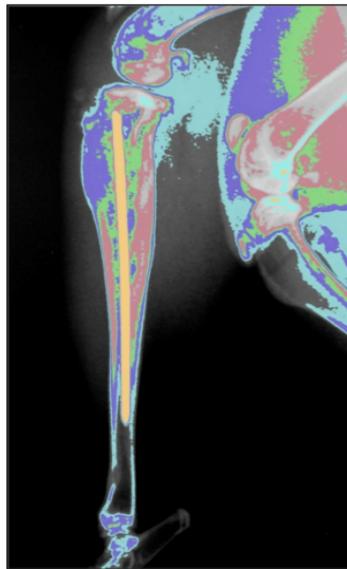


Abbildung 2.11.: Falschfarbenmarkierung von Flächen gleicher Röntgendichte, Tier A-5

#### **2.4.5.2. Methode 2: Radio-densitometrische Auswertung der Röntgenaufnahmen der Tibiaschäfte und Vermessung der Flächen gleicher Röntgendichte in der AOI**

Innerhalb der AOI wird mithilfe des Zauberstabes die anteriore Hälfte der Tibia (vor dem Marknagel) ausgewählt. Innerhalb der ausgewählten Region wird mithilfe des

Photoshop CS5 eine Tonwerttrennung vorgenommen. Durch die Tonwerttrennung werden die insgesamt 256 Grauwerte der ausgewählten Region (AOI) in 6 verschiedene Bereiche getrennt. Jeder dieser Grauwertbereiche definiert jeweils einen bestimmten Bereich der Röntgendichte des Knochens, Implantatmaterials und Marknagels (siehe Tab. 2.1. und Abb.2.12.).

Grauwerte	Knochen
0-50	Weichgewebekontrast
50- 100	Periostale Knochenformationen (grün)
100- 150	Intramedulläre Knochenformationen (rot)
150- 200	Kortikalisdichte (gelb)
> 150	Bankknochen oder Knochenzement (blau) (angrenzend an den Marknagel)
200- 250	Marknagelkontrast (weiß)

Tabelle 2.1.: Bereiche der Tonwerttrennung, Ordinate-Skala – Grauwerte 0-256

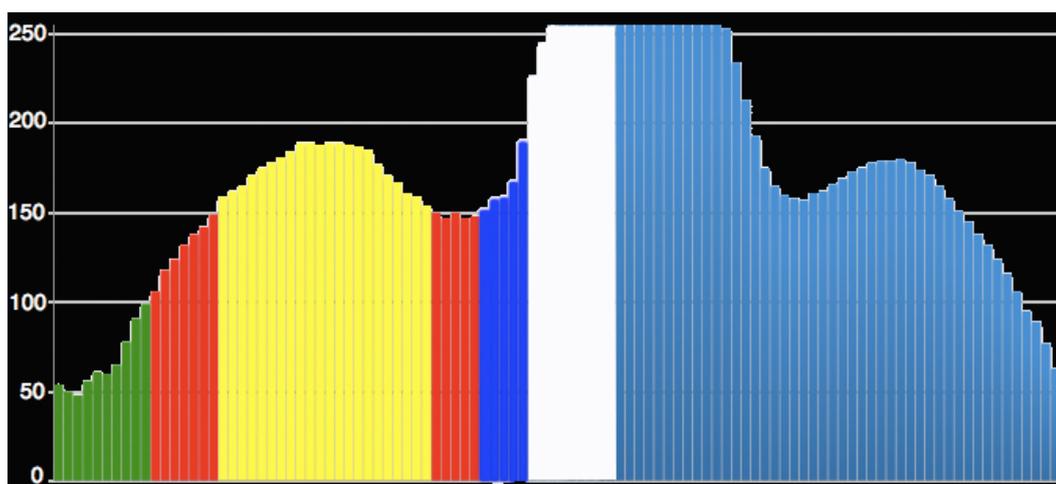


Abbildung 2.12.: Graphische Darstellung der Tonwerttrennungstufen, Grauwerte 0-256- anteriorer Teil des Tibiaschaftes

Nach der Tonwerttrennung wurden die jeweiligen Regionen einzeln mit dem Zauberstab ausgewählt und mit der dazugehörigen Farbe markiert. Nachdem die Falschfarbenmarkierung abgeschlossen war, konnte man mit den Messungen der jeweiligen Bereiche begonnen werden. Die jeweiligen Falschfarben-markierten Bereiche wurden wieder mit dem Zauberstab ausgewählt und mithilfe der Photoshop Analyse Funktion gemessen. Hierbei wurde nur der anteriore Teil der Tibia in der AOI vermessen, um die Überprojektion der Fibula im posterioren Teil auszuschließen

(Abb.2.13.: 2) Gruppe D). Die Daten wurden als % Werte der AOI, in Form von Tabellen in das MS Excel exportiert und berechnet.

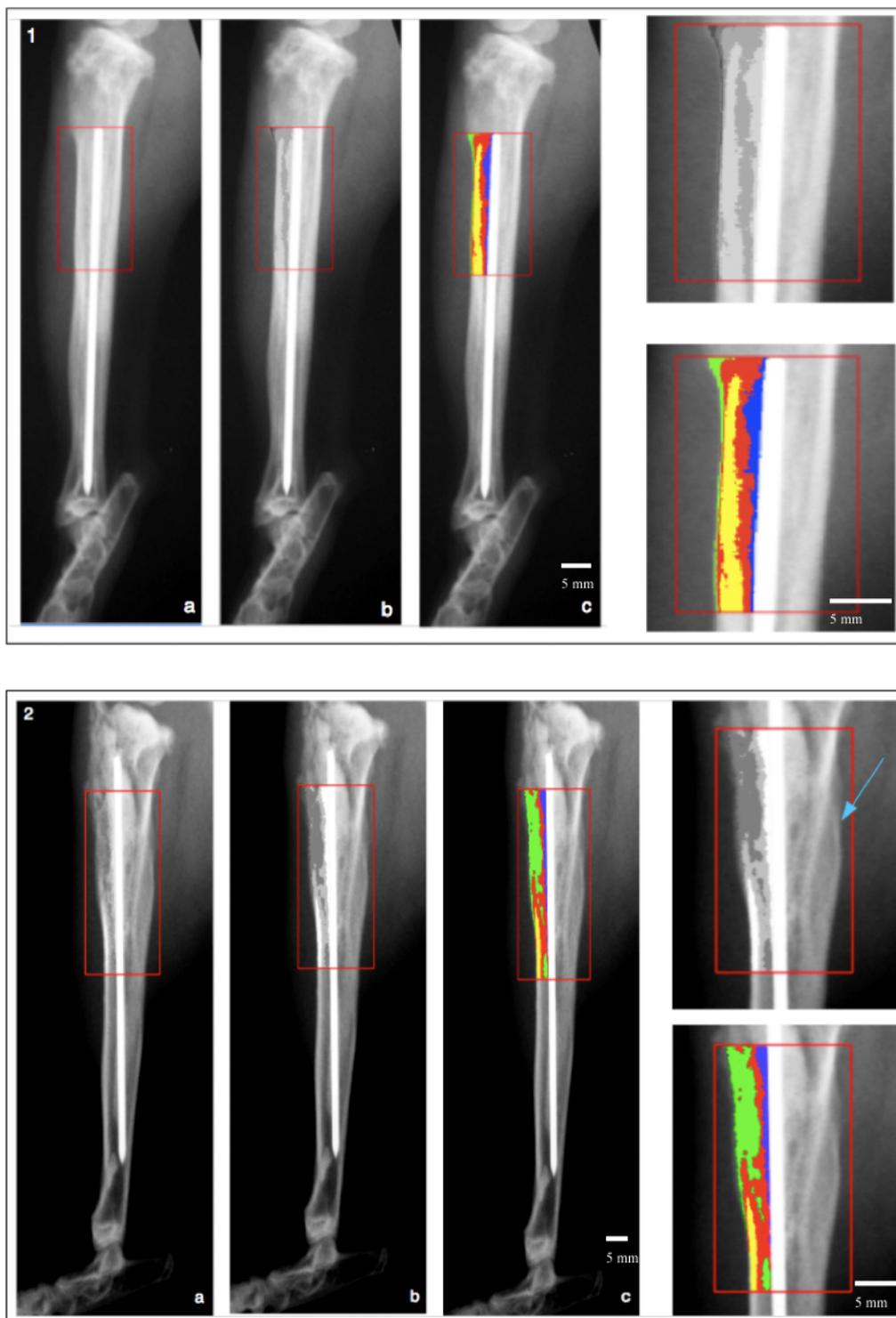


Abbildung 2.13.: Schritte der Radio-densitometrische Auswertung: 1) Gruppe C: C28-52062) Gruppe D: D32-5129a) Definition der AOI b) Tonwerttrennung c) Falschfarbenmarkierung; Rechts im Bild sind Ausschnittvergrößerungen nach Tonwerttrennung und Falschfarbenmarkierung zu sehen, Überprojektion der Fibula (blauer Pfeil)

## **2.4.6 Pathohistologische Auswertung**

### **2.4.6.1 Präparat- Herstellung**

Der Probenentnahme bei der Sektion der Tiere folgte die Herstellung der Präparate für die pathohistologischen Untersuchungen .

Nach Abtrennung der proximalen Epiphyse und des distalen Endes der Tibia mithilfe einer scharfen Knochenzange wurde der verbliebene mittlere diaphysäre Abschnitt der rechten Tibia (Abb. 20) (unterhalb der Tuberositas Tibiae bis zum fibulo- tibialen Übergang) in 4% Formalaldehydlösung zur Fixierung eingelegt. Bei einem Teil der Proben war es dabei zu Trümmerbrüchen des Tibiaschaftes gekommen, und der intramedulläre Nagel war manchmal nicht mehr vorhanden. Die Präparate wurden photographiert und ohne Entkalkung in Kunststoffharz eingebettet [Plenk (1988)]. Auf einem Rüttler wurden die Proben in verschließbaren Gläsern in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen für jeweils 48 Stunden entwässert und in Polymethylmethacrylat (PMMA, Merck GmbH, Deutschland) eingebettet. Die Gläser wurden zur Polymerisation in ein 30°C Wasserbad gestellt. Nach der Polymerisation wurden die Präparate aus den Glasbehältern entfernt, in Blöcken zugeschnitten, und Präparatröntgenaufnahmen angefertigt. Dann wurden die Schnittebenen bestimmt - die erste Schnittebene wurde knapp unterhalb der proximalen Trennungsebene, und die zweite knapp distal über dem fibulo-tibialen Übergang angesetzt, um möglichst unbeschädigte Knochenstrukturen zu untersuchen.

Zum Schneiden wurde die Isomet® Lowspeed Säge (Buehler Ltd., USA) mit einer wassergekühlten, diamantbesetzten Trennscheibe benutzt. Die entstandenen, ca. 300 µm dicken Schnitte wurden mit CA-8 Sekundenkleber (3M Comp., USA) auf Plexiglas-Objektträger geklebt. Mit einem automatischen Präzisions-Mikroschleifsystem (Exakt, Deutschland) wurden die Dickschnitte mit Naßschleifpapieren der Körnungen 200 bis 1200 auf eine Dicke von etwa 80 µm geschliffen und dann mit Schleifpapier der Körnung 4000 poliert. Anschließend wurden die Oberflächen der Dünnschliffe mit Aluminiumoxidpulver (Teilchengröße 1.0 und 0.3 µm) weiter poliert.

Die fertigen Dünnschliffe wurden für 30 Sekunden in 1% Ameisensäure geätzt. Anschließend wurden die Oberflächen der Präparate mit der GIEMSA- Farblösung (Merck, Deutschland) gefärbt. (Abb.2.14.) Von ausgewählten Dünnschliffpräparaten wurden mit dem FAXITRON-Tischröntgengerät (Hewlett-Packard Corp., USA) auch

Mikroradiographien hergestellt. (Abb. 3.3.2. und 3.3.4) [Für histotechnische Details siehe Plenk (1988)].

Für die Dokumentation und Auswertung wurde das FXA-Mikroskop mit der Optocam-Kamera oder der Nikon- J1 Systemkamera (Nikon, Japan) verwendet.

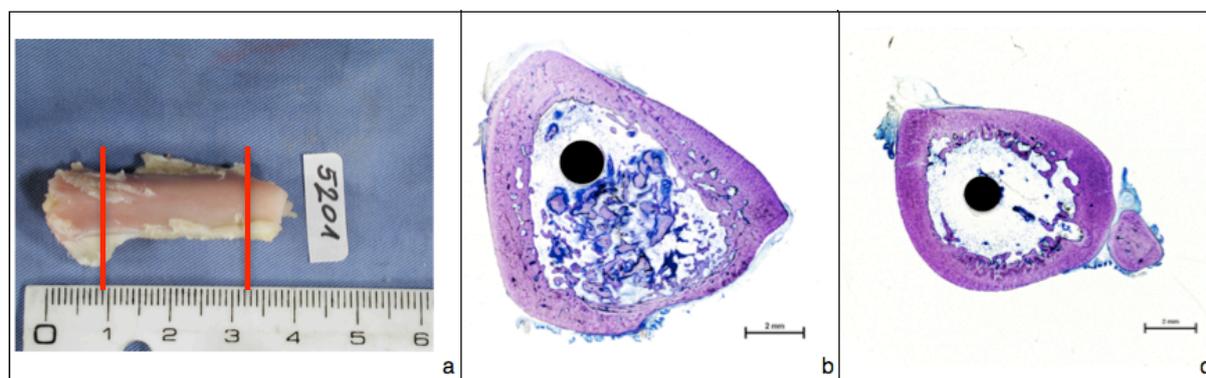


Abbildung 2.14.: Präparat Herstellung: a) Makroskopische Übersicht des Präparates (C22, 5201), mit Schnittebenen (rot) für b) proximalen (5201-1), und c) distalen (5201-2) Präparat-Dünnschliff nach Giemsa-Oberflächenfärbung. Man kann im proximalen Tibia-Querschliff (b) eine annähernd intakte Kortikalis, und im Markraum den Marknagel sowie die Bankknochen-Partikeln erkennen. Im distalen Querschliff (c) finden sich keine Bankknochen-Partikeln, dorso-lateral ist die Fibula zu erkennen.

#### **2.4.6.2. Pathohistologische Evaluation und das Scoring System für die osteomyelitischen Veränderungen**

Die GIEMSA-oberflächengefärbten proximalen und distalen Querschnitte wurden anhand der Veränderungen der Knochenstrukturen (Osteitis) in den periostalen, kortikalen und intramedullären Regionen, sowie anhand der entzündlichen Reaktionen im Knochenmark (Osteomyelitis) und anhand des Vorhandenseins von den Antibiotika Trägern (Bankknochen, Knochenzement) beurteilt.

Es wurde ein 5 Punkte Scoring-System erstellt, das an das Scoring-System von Smeltzer et al (1997) angepasst und durch Definitionen von intramedullären, periimplantären und Gelenkflüssigkeits-Infektionen verschiedener pathologischer Klassifikationen modifiziert wurde. (Otto 2008, Schmidt et al. 2011). Danach haben zwei unabhängige Beobachter zuerst unabhängig die jeweiligen Scores in den proximalen und distalen Querschnitten vergeben und nach Diskussion einen gemeinsamen Score festgelegt.

#### 1) Kortikale und periostale Knochen Veränderungen

0 =keine, 1= 25%, 2= 50%, 3= 75%, 4=100% des Umfangs verändert.

#### 2) Akute intramedulläre Entzündung

0= normales Fett/blutbildendes Knochenmark, keine Granulozyten (PMN)-Infiltrate,

1= fokale PMN-Infiltrate,2= einzelne Mikroabszesse,3= mehrere Mikroabszesse,

4= Makroabszess, eitergefüllte Markhöhle

#### 3) Chronische intramedulläre Entzündung

0= normales Fett/blutbildendes Knochenmark, keine PMN-Infiltrate

1= Lymphozyten/Plasmazelleninfiltrate im normalen Knochenmark

2= Lymphozyten/Plasmazelleninfiltrate im fibrovaskulären Knochenmark,

3= diffuse Knochenmarkfibrose,

4=Knochenmarkfibrose mit Knochenneubildung

#### 4)Endostale Knochenneubildung

0=Endostale Kortikalisoberfläche mit „inaktiven“ Knochenbelegzellen und Fettmark,

1= Endostale Kortikalisoberfläche mit stellenweisen Osteoblasten- und Osteoidsäumen,

2= Endostale Kortikalisoberfläche mit kontinuierlichen aktiven Knochenanbauzonen,

3=Stellenweise Knochenbälkchen mit aktiven Knochenanbauzonen im Markraum,

4= Markraum gefüllt mit neugebildeten Knochenbälkchen.

Die Daten wurden in MS Excel Tabellen eingetragen und anschließend mit SAS<sup>®</sup> Learning Edition 4.1 statistisch ausgewertet.

### **2.4.6.3. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung**

Die Verteilung der verschiedenen Fluorochrome im Knochen wurde an den unentkalkten, Giemsa-oberflächengefärbten proximalen und distalen Tibia-Querschnitten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie (Nikon FXA Mikroskop mit Nikon J1) untersucht, beurteilt und dokumentiert.

### 2.4.7. Histomorphometrische Auswertungen

Die quantitative Histomorphometrie wurde an ausgewählten Übersichtsbildern der Giemsa-oberflächengefärbten proximalen und distalen Querschnitte der Tibia von den 4 Gruppen durchgeführt, welche mithilfe eines Diakopiergeräts digitalisiert worden sind (Kodak Pro RFS 2035, 2000 dpi). In den Bildern wurden mithilfe von Photoshop CS5 die Flächen des Knochengewebes, Knochenmarkgewebes, vaskuläre Räume und die entsprechenden Antibiotikum-Träger (Bankknochen-Partikeln, Knochenzement) definiert und mit verschiedenen Falschfarben markiert. Anschließend wurden die Bilder mit der NIS-Elements AR 3.2 Software weiter bearbeitet.

Als erstes wurden die Areas of Interest (AOI) am Querschnitt definiert und die AOIs in drei Regionen unterteilt (Abb. 2.15.) und mit Falschfarben gekennzeichnet:

- periostale Region: grüne Falschfarbe
- kortikale Region: gelbe Falschfarbe
- intramedulläre Region: rote Falschfarbe
- Antibiotikum-Trägermaterial (Bankknochen, Knochenzement) : blaue Falschfarbe

Für die jeweiligen Regionen wurden die Flächen in Prozent (% Area) gemessen, und jeweils die Dichte des Knochengewebes (%BV/TV) berechnet.

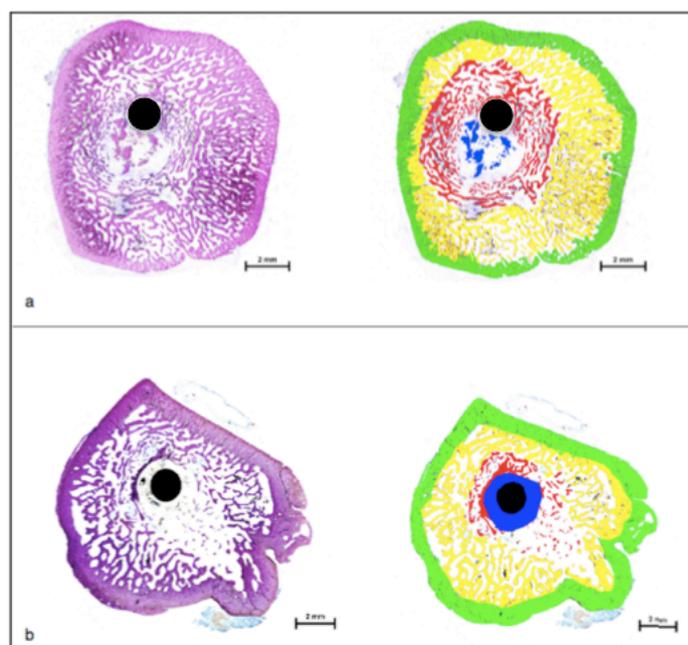


Abbildung 2.15.: Histomorphometrische Auswertungen: a) Im distalen Querschliff 5190-2 (Gruppe A) ist eine vollständige Spongiosierung der Kortikalis (gelb) zu erkennen, die periostale Knochenneubildung

zeigt außen eine Kompaktierung (grün). Der Markraum ist gefüllt mit endostaler/intramedullärer Knochenneubildung (rot), restliche Bankknochen-Partikeln (blau) in der Umgebung des Marknagels. b) Im distalen Querschliff -5129-2 (Gruppe D: D32) ist die spongiosierte Kortikalis (gelb) außen von einer kompaktierte Periostreaktion (grün) umgeben. Spärliche endostale/intramedulläre Knochenneubildung (rot) um den von Knochenzement (blau) eingehüllten Marknagel.

#### **2.4.8. Statistische Auswertungen**

Die numerischen Ergebnisse wurden in MS Excel eingegeben und sind in Tabellen und Diagrammen dargestellt.

Die Aufbereitung und statistische Auswertung der Daten wurde mit den Programmen SPSS 18.0, SAS<sup>®</sup> Learning Edition 4.1 und MS Excel durchgeführt. Für jede Gruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (+/-2) berechnet und für die graphische Darstellung benutzt.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet. Auf Korrelation zwischen den Methoden wurde mit Hilfe des Spearman-Tests untersucht.

Ein signifikantes Ergebnis ist dann gegeben, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ist.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verlaufskontrolle von Infektions- und Behandlungsphase durch hämatologische und blutchemische Befunde

Die Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen (WBC), welche ein Hauptindikator der akuten Infektion ist, zeigte bei allen Gruppen eine typische Zunahme in der ersten Woche der Infektionsphase. Während die Werte bei MRSA-Gruppe A gleichblieben, zeigte MRSA-Gruppe B einen weiteren Anstieg. Bei den PMA-Gruppen C und D nahmen die Werte sogar ab. Bei allen Gruppen verursachte die zweite Operation mit dem Beginn der Behandlung wieder einen kurzzeitig fulminanten Anstieg dieses Entzündungsparameters, der dann aber bei allen Gruppen eine stetige Abnahme und daher einen Behandlungserfolg bis zum Ende des Experimentes zeigte. In Gruppe B blieben die Werte zwar deutlich höher (Abb.3.1), es ergaben sich jedoch zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Behandlungserfolg. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei den blutchemischen Befunden.

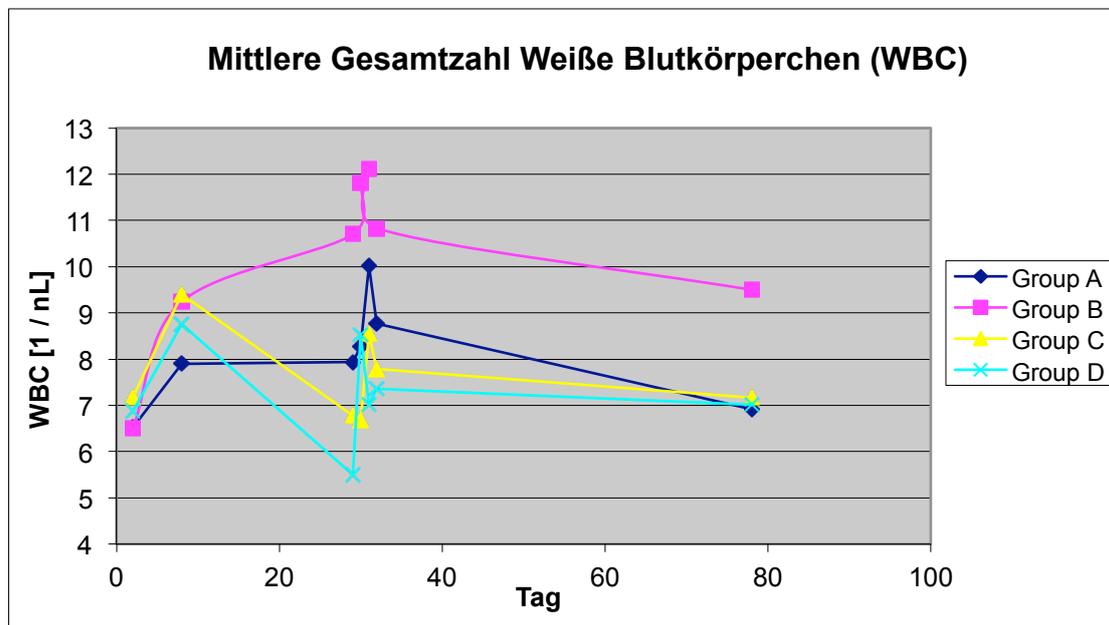


Abbildung 3.1: WBC während der Infektionsphase, um den Zeitpunkt der 2. Operation (Behandlungsbeginn), und bis zum Ende der Behandlungsphase [aus Kaudela et al. (2010)]

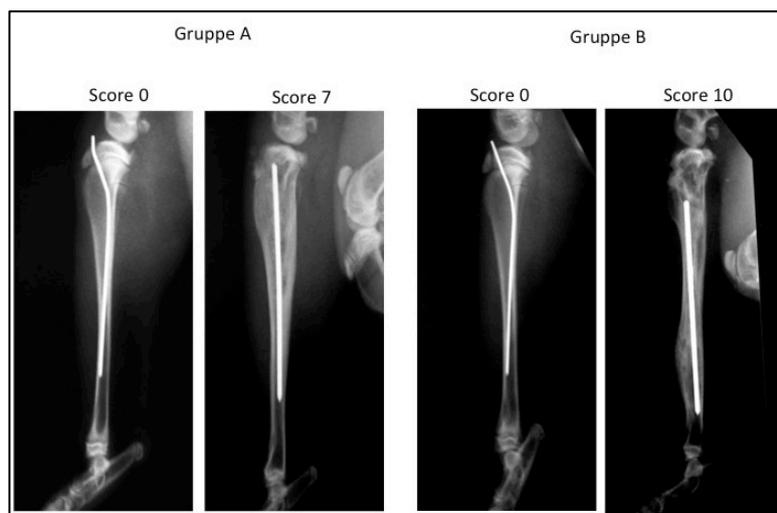
### 3.2. Radiologische Befunde

Die digitalisierten Röntgenbilder im seitlichen (medio-lateralen) Strahlengang, die von den Tieren in den 4 Gruppen am Beginn (begInf) und Ende der Infektionsphase (endInf), sowie am Beginn (begBeh) und Ende der Behandlungsphase (endBeh) angefertigt worden waren, sind am Ende des Textes im Anhang zusammengestellt. Eine große Variabilität der radiologischen Knochenveränderungen zwischen den Tieren einer Gruppe, und zwischen den Gruppen wird deutlich.

#### 3.2.1. Radiographische Beurteilung der Osteomyelitis-Veränderungen durch einen externen Radiologen an konventionellen Röntgenaufnahmen mithilfe eines Scoring- Systems

Die radiologische Beurteilung erfolgte durch einen unabhängigen erfahrenen Radiologen nach einem 4 Punkte-Scoring System (0-3) für folgende 5 Parameter: Periostreaktion, Schaftverbreiterung, Osteolyse, Osteosklerose, Frakturen. Die Scores der einzelnen Parameter wurden addiert, ein Maximalscore von 15 ergab daher ein stärkstes Ausmaß von osteomyelitischen Knochenveränderungen [Mayerhöfer (2012)]

In der folgenden Abbildung 3.2. sind Beispiele dieses radiologischen Scorings für die 4 Gruppen dargestellt.



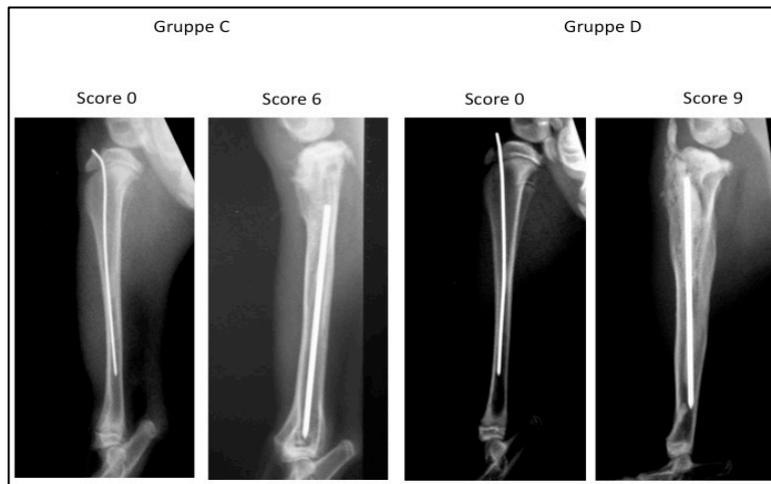


Abbildung 3.2.: Röntgenbilder der Tibiae von Tieren der Gruppen A bis D jeweils vom Beginn der Infektionsphase und vom Ende der Behandlungsphase mit den vom Radiologen vergebenen Scores für Osteomyelitis.

### Gruppen A und B

Während bei der Gruppe A in der Infektionsphase nur eine geringe Zunahme der Scores für Periostreaktion und Schaftweitung festgestellt wurde, sind bei der Gruppe B diese Scores deutlich angestiegen (Abb.3.3.). Die statistische Auswertung zeigte, dass diese beiden Osteomyelitis Scores in der Gruppe A zu Beginn und am Ende der Behandlung signifikant kleiner waren als in der Gruppe B.

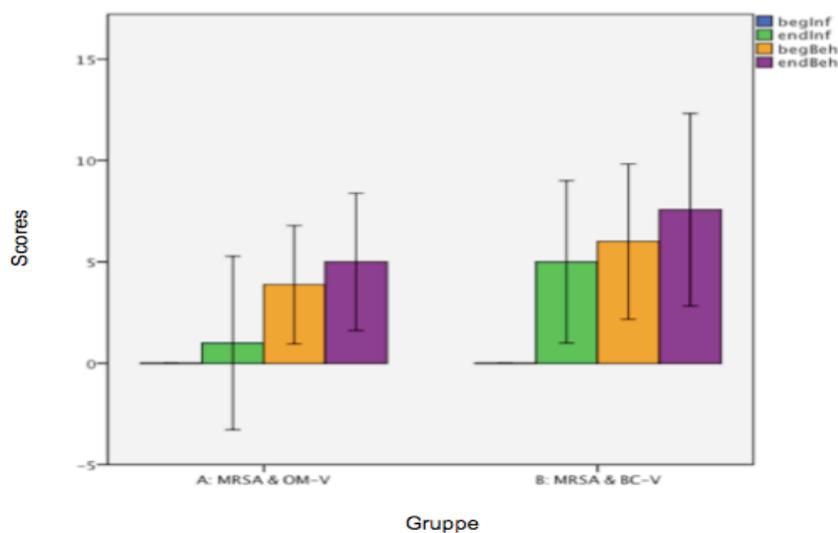


Abbildung 3.3.: Vergleich der radiologischen Scores 1 plus 2 an den vier Zeitpunkten begInf, endInf und begBeh, endBeh bei den Gruppen A (MRSA&OM-V) und B (MRSA&BC-V)

## Gruppen C und D

Die radiologischen Scores für Periostreaktion und Schaftverbreiterung zeigten in beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg während der Infektionsphase, blieben dann aber nach einer geringen Zunahme vom Beginn bis zum Ende der Behandlungsphase annähernd gleich hoch (Abb. 3.4.). Durch die statistische Auswertung der beiden Osteomyelitis Scores konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen C und D aufgezeigt werden.

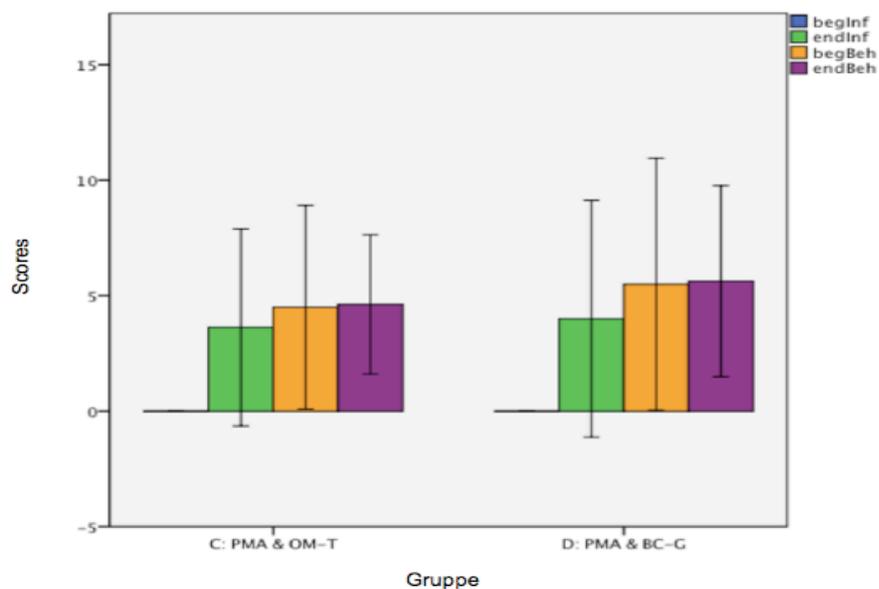


Abbildung 3.4.: Vergleich der radiologischen Scores 1 und 2 an den vier Zeitpunkten begInf, endInf und begBeh, endBeh bei den Gruppen C (PMA&OM-T) und D (PMA&BC-G)

## 3.2.2. Radio-morphometrische Messergebnisse

### 3.2.2.1. Flächenmäßige Veränderungen des Tibiaschaftes in der AOI

#### Gruppe A: MRSA & OM-V

Die morphometrischen Vermessungen des anterioren und posterioren Flächenteils der Tibiaschäfte innerhalb der AOI ergaben in der Gruppe A im Vergleich zur Ausgangsfläche keine Vergrößerung während der Infektionsphase, dann jedoch zum Anfang der Behandlung eine Flächenzunahme, die bei 5 der behandelten Tiere bis zum

Tag vor der Tötung weiter zunahm. Nur bei 2 Tieren (A3, A7) wurde während der Behandlung eine Reduzierung der Schaftfläche gemessen (Abb.3.5).

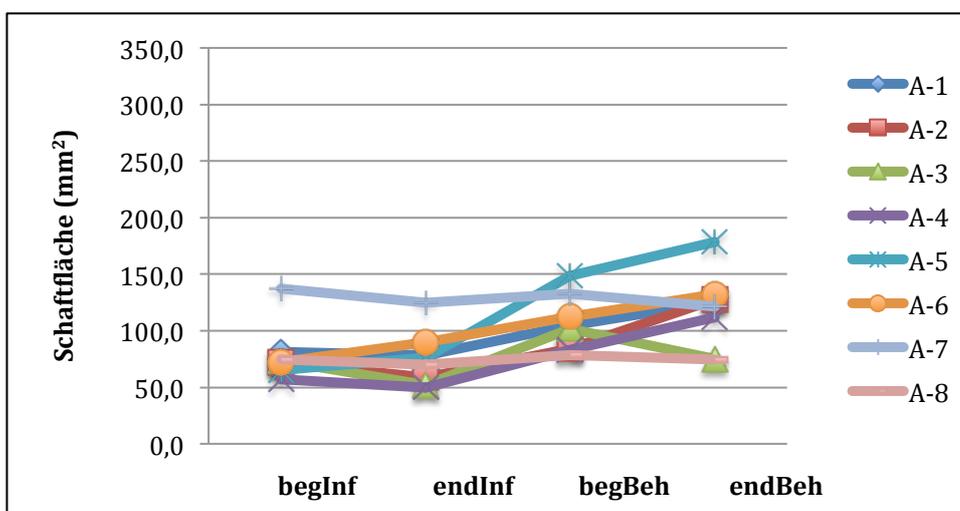


Abbildung 3.5.: Morphometrische Messungen der Schaftflächen in der Gruppe A: MRSA & OM-V

### Gruppe B: MRSA & BC-V

In der Gruppe B zeigten die morphometrischen Messungen in der Infektionsphase divergierende Schaftflächenwerte, zu Behandlungsbeginn aber bei 5 Tieren eine deutliche Vergrößerung der Schaftfläche innerhalb der AOI. Bei 2 Tieren (B12, B13) wurde eine Abnahme gemessen. Bis zum Tag vor der Tötung vergrößerte sich die Fläche bei 6 Tieren minimal bis deutlich weiter, nur bei einem Tier (B-15) fiel die Messung der Knochenfläche niedriger aus als am Beginn der Behandlung. (Abb.3.6)

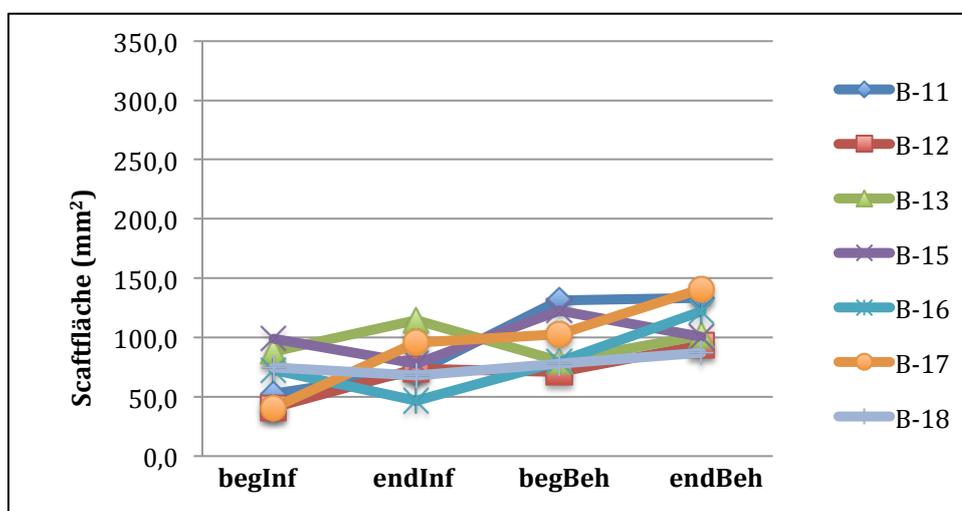


Abbildung 3.6.: Morphometrische Messungen der Schaftflächen in der Gruppe B: MRSA & BC-V

### Gruppe C: PMA & OM-T

Die morphometrischen Messungen innerhalb der definierten AOI zeigten bei 5 Tieren aus der Gruppe C am Ende der Infektionsphase eine Vergrößerung der Knochenfläche im Vergleich zum Beginn der Infektion. Bei 4 Tieren wurde dann eine Vergrößerung der Schaftfläche vom Beginn bis zum Ende der Behandlungsphase gemessen. Bei zwei Tieren blieben die Schaftflächen gleich groß. Eine Verkleinerung der Fläche wurde bei einem Tier (C25) gemessen.

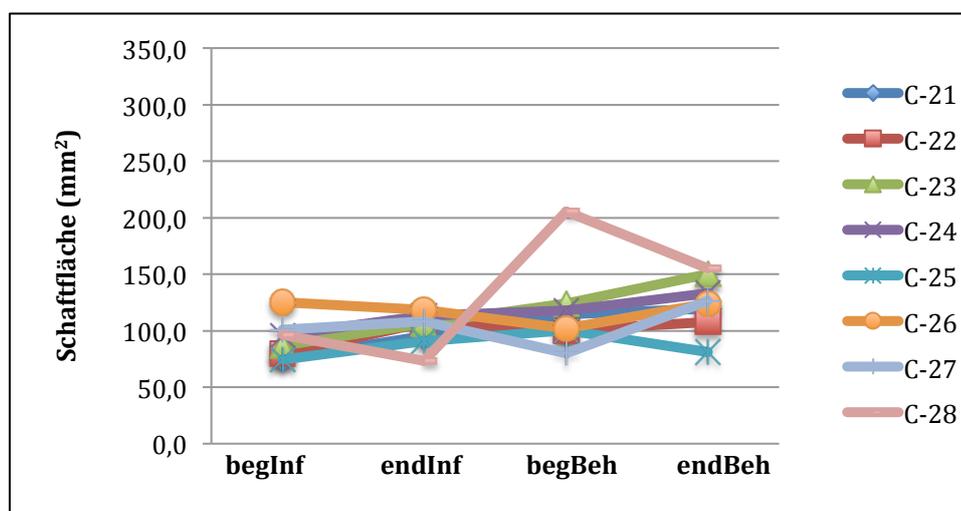


Abbildung 3.7.: Morphometrische Messungen der Schaftflächen in der Gruppe C: OMA & OM-T

### Gruppe D: PMA & BC-G

In der Gruppe D kam es während der Infektionsphase und dann während der Behandlung zu den ausgeprägtesten radiologischen Veränderungen der Tibiaschäfte. Morphometrisch wurden die höchsten Flächenwerte aller Gruppen gemessen. Während der Infektionsphase wurde bei 6 Tieren innerhalb der AOI ein Anstieg der Schaftfläche gemessen, und bei zwei Tieren (D34, D36) eine Verringerung. - Vom Beginn der Behandlung bis zum Tag vor der Tötung wurde bei 5 von insgesamt 8 Tieren eine Verringerung und bei 3 eine Zunahme der Schaftfläche gemessen.

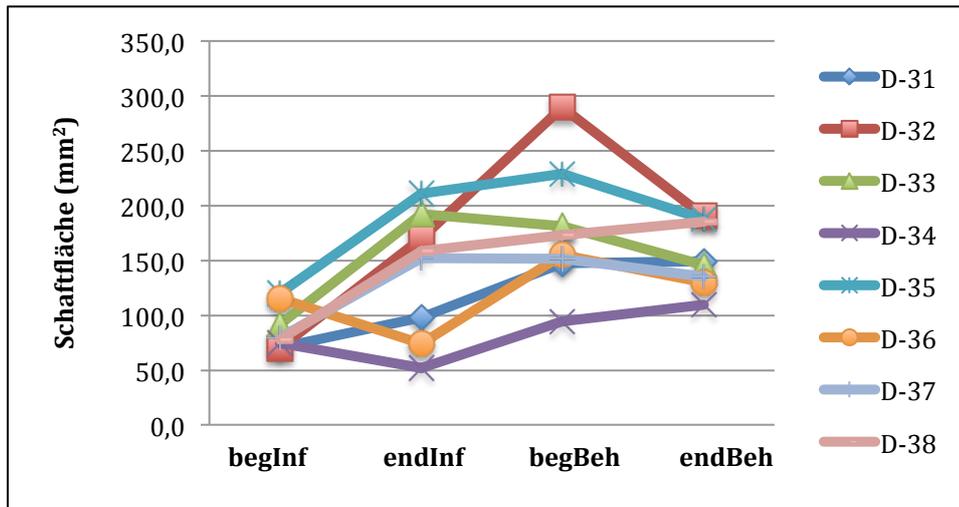


Abbildung 3.8.: Morphometrische Messungen der Schaftflächen in der Gruppe D: PMA & BC-G

Vergleicht man die Mittelwerte dieser morphometrischen Messwerte der Tibia-Schaftflächen innerhalb der AOI, so zeigten die Gruppen A bis C nur einen generellen Trend in der Zunahme der Knochenflächen im Zeitraum der Behandlungsphase, während sich bei der Gruppe D eine Abnahme der Schaftflächen ergab.

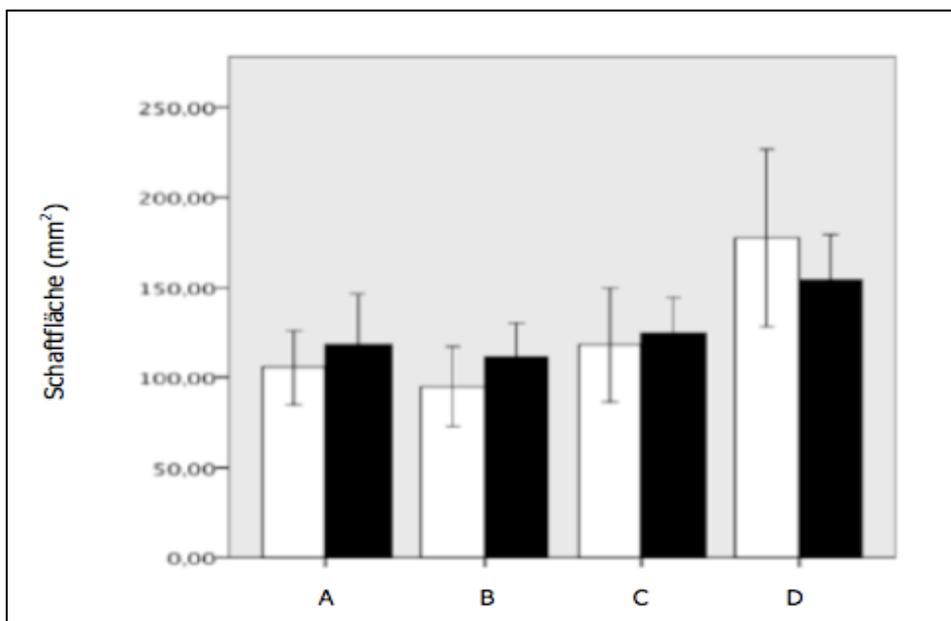


Abbildung 3.9.: Morphometrische Messungen der Tibia-Schaftflächen in der AOI, Gruppen A bis D vor (weiße Balken) und nach der Therapie (schwarze Balken)

### 3. 3. Metrische Erfassung der Veränderung der Schaftdurchmesser

#### Gruppe A: MRSA & OM-V

In der Gruppe der OSTEOMycin®-V Behandlung wurde 4 Wochen nach dem ersten Eingriff (in der Infektionsphase) und dann eine Woche nach dem zweiten Eingriff (am Beginn der Behandlungsphase) bei allen Tieren proximal sowie auch distal eine Zunahme der Schaftdurchmesser festgestellt. Während der Behandlung bis zum Tag vor der Tötung nahmen die Durchmesser der Tibia im proximalen Bereich bei 7 Tieren ab. Nur bei einem Tier (A5) stieg die Dicke deutlich. Im distalen Bereich nahm der Durchmesser der Tibia bei 5 Tieren zu, und bei 3 Tieren (A3, A7, A8) wurde eine Abnahme festgestellt.

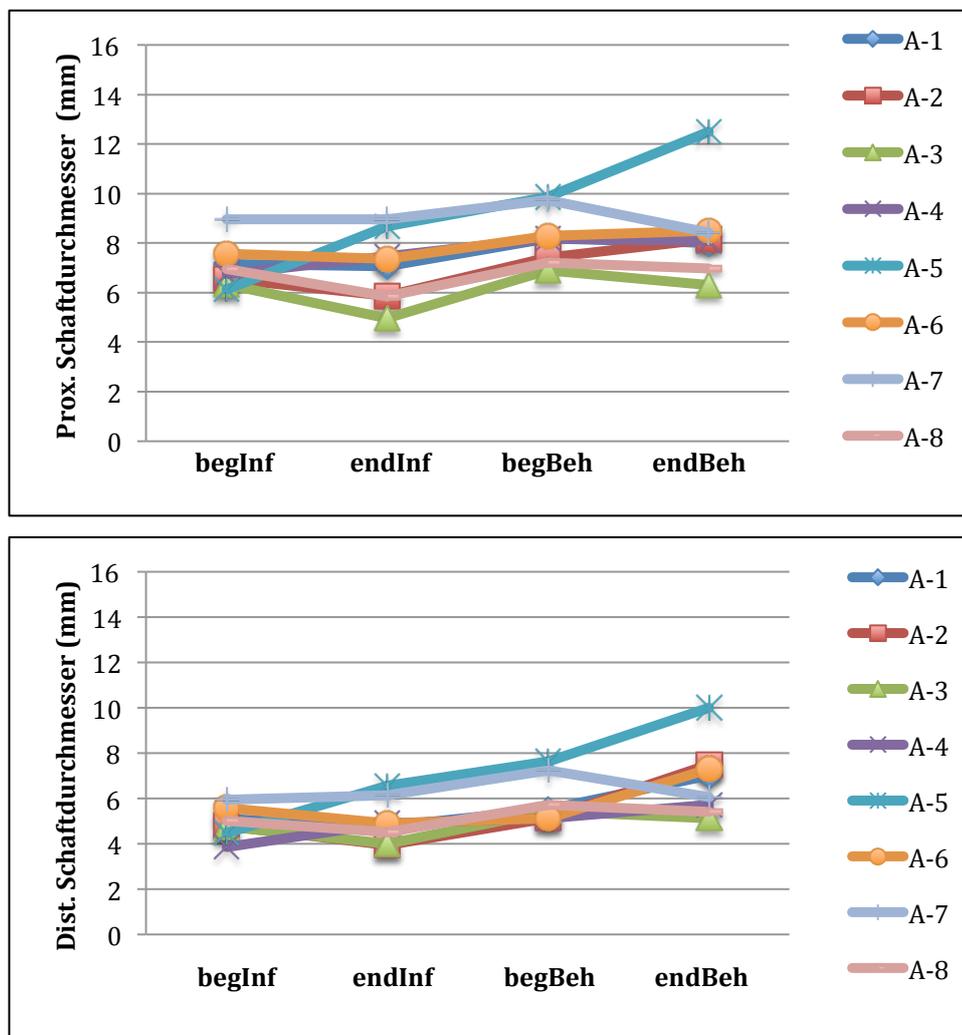


Abbildung 3.10.: Änderung der proximalen und distalen Tibia-Schaftdurchmesser, Gruppe A: MRSA & OM-V

## Gruppe B: MRSA & BC-V

In der mit MRSA infizierten und mit Antibiotika versetztem Knochenzement behandelten Gruppe B haben die Schaftdurchmesser im proximalen Bereich bei 5 Tieren im Zeitraum der Infektionsphase zugenommen. Bei einem Tier blieb der Knochen unverändert und bei einem zeigte sich eine Abnahme des Schaftdurchmessers. Ab Beginn der Behandlung bis einen Tag vor der Tötung zeigte sich bei 6 Tieren eine Zunahme des Schaftdurchmessers und nur bei einem gab es eine Reduzierung. Im distalen Bereich nahmen die Schaftdurchmesser bei 3 Tieren vor und bis zur Behandlung zu, bei einem Tier (B16) nahm der Schaftdurchmesser ab, bei 3 Tieren blieb dieser gleich. Ab dem Zeitpunkt der Behandlung bis zum Tag vor der Tötung wurde bei allen 7 Tieren eine Zunahme der Schaftdurchmesser festgestellt

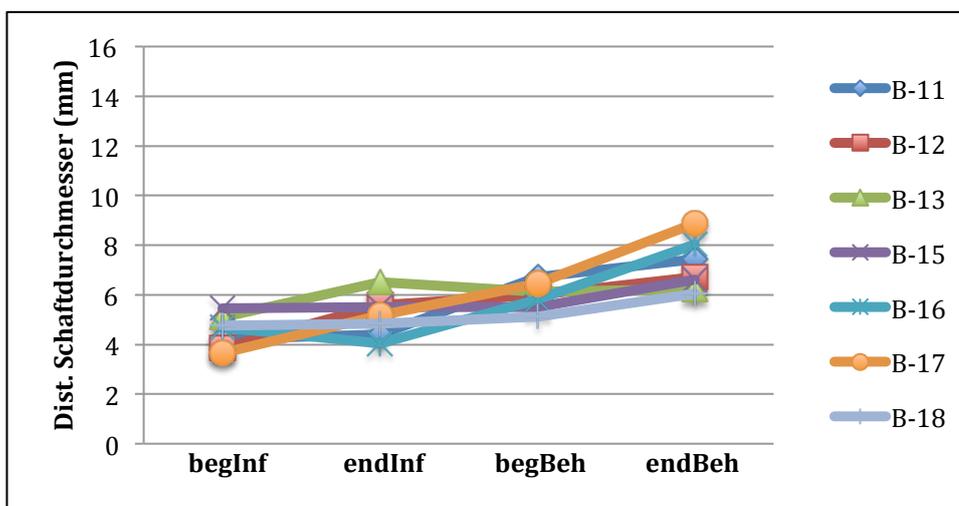
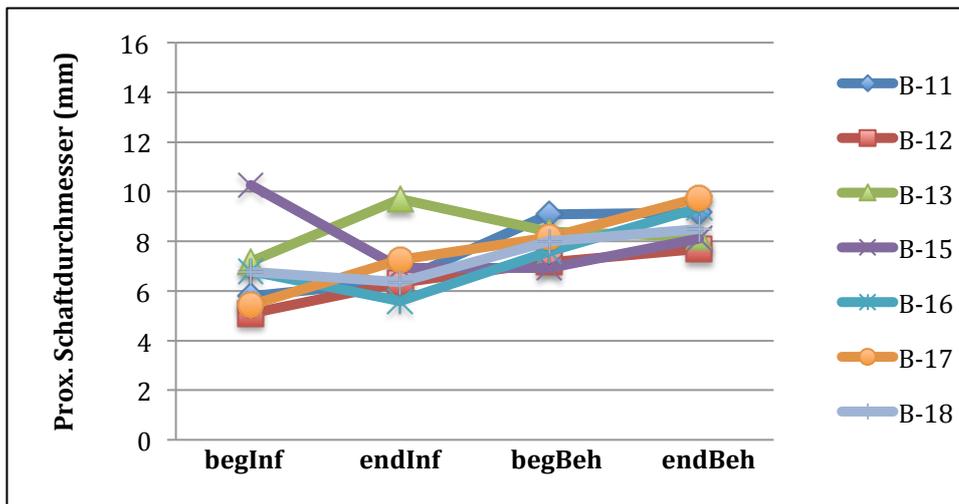


Abbildung 3.11.: Änderung der proximalen und distalen Tibia-Schaftdurchmesser, Gruppe B: MRSA & BC-V

## Vergleich der Gruppen A und B

Im Vergleich der Gruppen A und B zeigte sich keine Korrelation zwischen den metrischen Messungen der Zunahme der Schaftdicke und der radiographischen Beurteilung der Osteomyelitis anhand des Scoring Systems vor der Therapie und in der Zeit vom Anfang bis am Ende der Infektion sowie auch am Beginn der Therapie. Ein positiver Zusammenhang zeigte sich in der Berechnung der Korrelation zwischen den Messwerten und des Scoring Systems nach der Behandlung. Der Korrelationskoeffizient von 0,535 deutet auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen den zwei verglichenen Methoden hin.

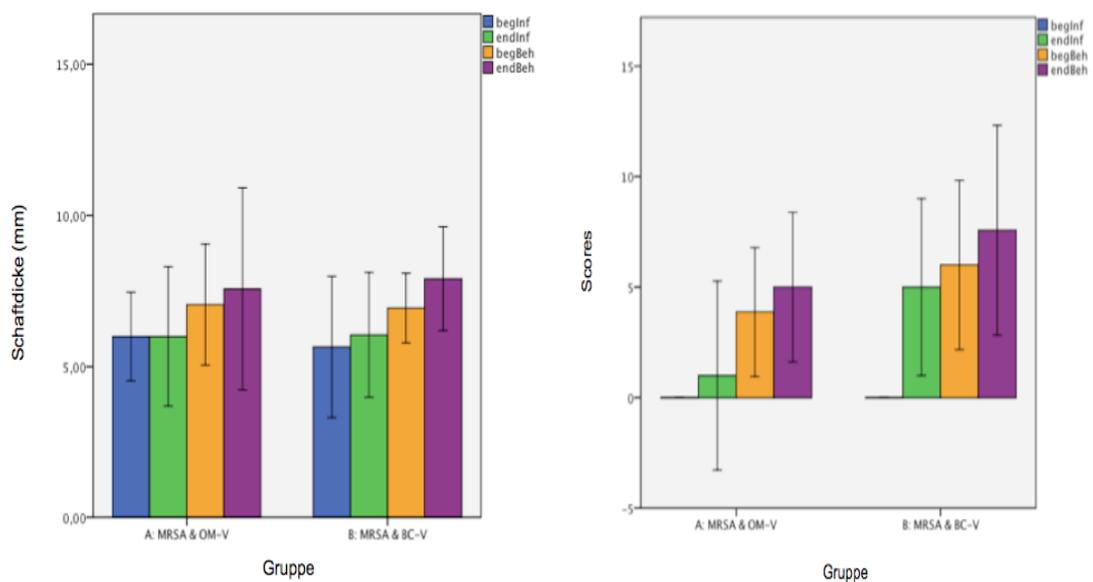


Abbildung 3.12.: Vergleich metrischer Messungen der Schaftdurchmesser in den Gruppen A und B mit den radiographischen Osteomyelitis Scores 1 und 2, die Periostreaktion und Schaftverbreiterung einschätzen

### Korrelationen

			begInf	begInfSCORE
Spearman-Rho	begInf Schaftdicke	Korrelationskoeffizient	1,000	.
		Sig. (2-seitig)	.	.
		N	16	16
	begInf SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient	.	.
		Sig. (2-seitig)	.	.
		N	16	16

			endInf	endInfSCORE
Spearman-Rho	endInf Schaftdicke	Korrelationskoeffizient	1,000	,781**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	16	16
	endInf SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient	,781**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	16	16

			begBeh	begBehSCORE
Spearman-Rho	begBeh Schaftdicke	Korrelationskoeffizient	1,000	,614*
		Sig. (2-seitig)	.	,011
		N	16	16
	begBeh SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient	,614*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,011	.
		N	16	16

			endBeh	endBehSCORE
Spearman- Rho	endBeh	Korrelationskoeffizient	1,000	,583*
	Schaftdicke	Sig. (2-seitig)	.	,018
		N	16	16
<hr/>				
	endBeh SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient	,583*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,018	.
		N	16	16

Tabellen 3.1.: Korrelation metrischer Messungen der Schaftdurchmesser in den Gruppen A und B mit den radiographischen Osteomyelitis Scores 1 und 2, die Periostreaktion und Schaftverbreiterung einschätzen; Korrelation signifikant wenn 0,05\* und hoch signifikant wenn 0,01\*\*

## Gruppe C: PMA & OM-V

Bei 6 von insgesamt 8 der mit OSTEOmycin-T<sup>®</sup> behandelten Tiere zeigte sich im proximalen Bereich eine Zunahme der Dicke des Knochens im Zeitraum vor und bis zum Beginn der Behandlung. Bei 2 Tieren (C26, C27) kam es zu einer Abnahme der Dicke. Eine Zunahme des Schaftdurchmessers ist bei zwei Tieren (C23, C27) bis zum Tag vor der Tötung beobachtet worden.. Im distalen Bereich nahm der Schaftdurchmesser vor und bis zur Behandlung bei 7 Tieren zu. Nur bei einem Versuchstier (C27) wurde eine Abnahme beobachtet. Vom Beginn der Behandlung bis zum Tag der Tötung wurde bei 5 Tieren eine Dickenzunahme gemessen, und bei 2 Tieren (C24, C25) eine leichte Reduzierung.

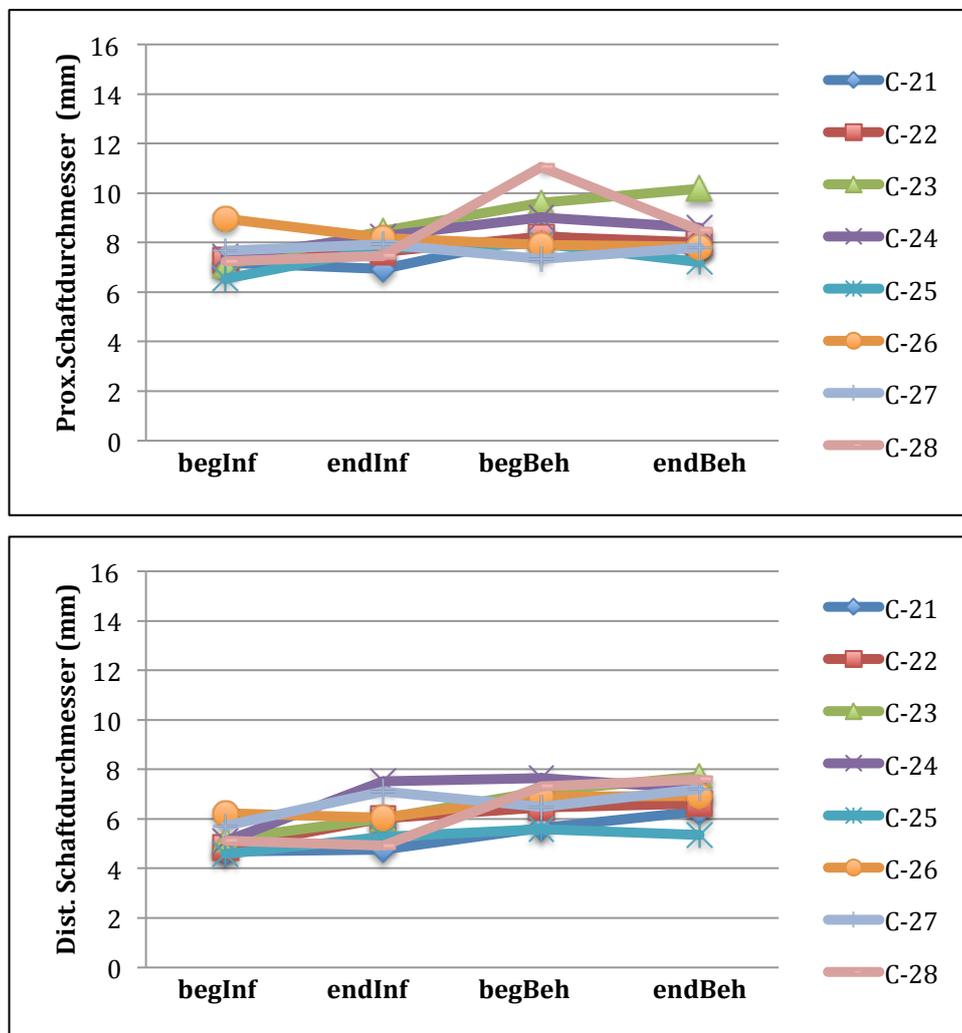


Abbildung 3.13.: Änderung der proximalen und distalen Tibia-Schaftdurchmesser, Gruppe C: PMA & OM-V

## Gruppe D: PMA & BC-G

In der Gruppe D (Palacos® +Gentamycin) wurde im proximalen Bereich bei 6 Tieren eine Zunahme der Schaftdurchmesser in der Infektionsphase gemessen. Bei 2 Tieren wurde eine deutliche Abnahme gemessen. In der Behandlungsphase haben die Schaftdurchmesser bei 5 Tieren deutlich abgenommen. Bei 3 Tieren wurde ein leichter Anstieg gemessen (D31, D34, D36). Im distalen Bereich gab es bei 6 Tieren eine Dickenzunahme des Knochens in der Infektionsphase und bei zwei Tieren (D34, D36) wurde ein leichter Abfall beobachtet. In der Behandlungsphase wurde eine Abnahme der Knochendicke bei 7 Tieren gemessen. Nur bei einem Tier (D34) gab es einen leichten Anstieg.

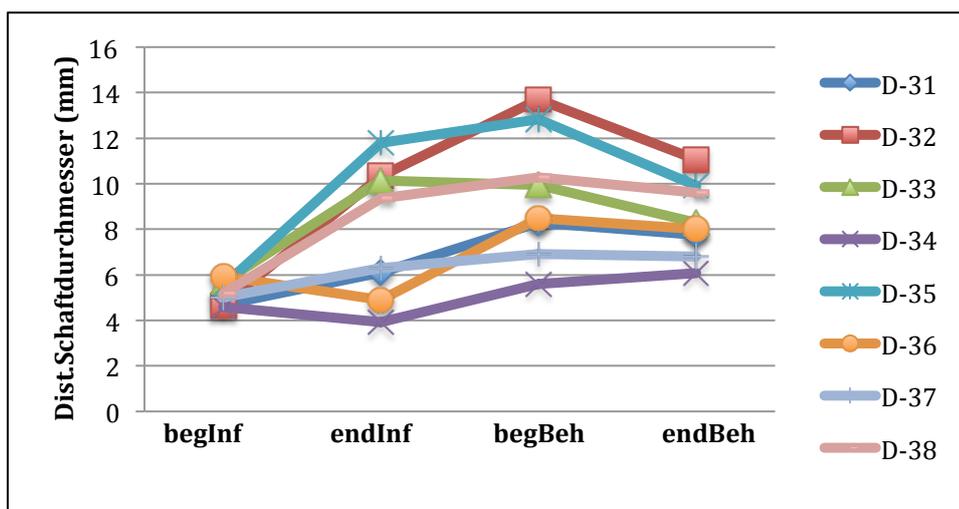
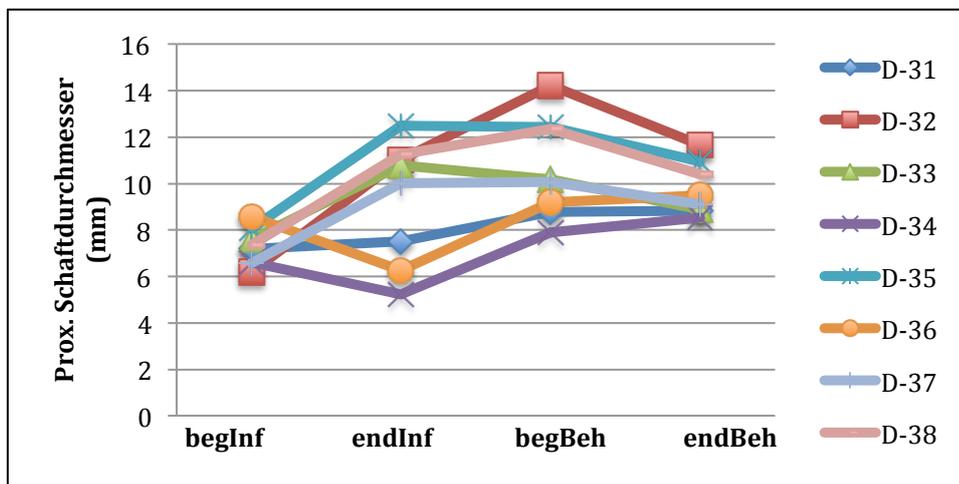


Abbildung 3.14.: Änderung der proximalen und distalen Tibia-Schaftdurchmesser, Gruppe D: PMA & OM-T

## Gruppen C und D

Im Vergleich der Gruppen C und D zeigte sich eine Korrelation zwischen den zwei angewendeten Methoden innerhalb von drei Zeitpunkten. Am Beginn der Infektion konnte natürlich keine Korrelation bewiesen werden. Die Korrelation zwischen den zwei Methoden am Ende der Infektionsphase ist jedoch hoch signifikant. Der Korrelationskoeffizient von 0,781 deutet auf einen hohen Zusammenhang hin. Bei den anderen zwei Zeitpunkten der Behandlungsphase weisen die Korrelationskoeffizienten auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Methoden hin.

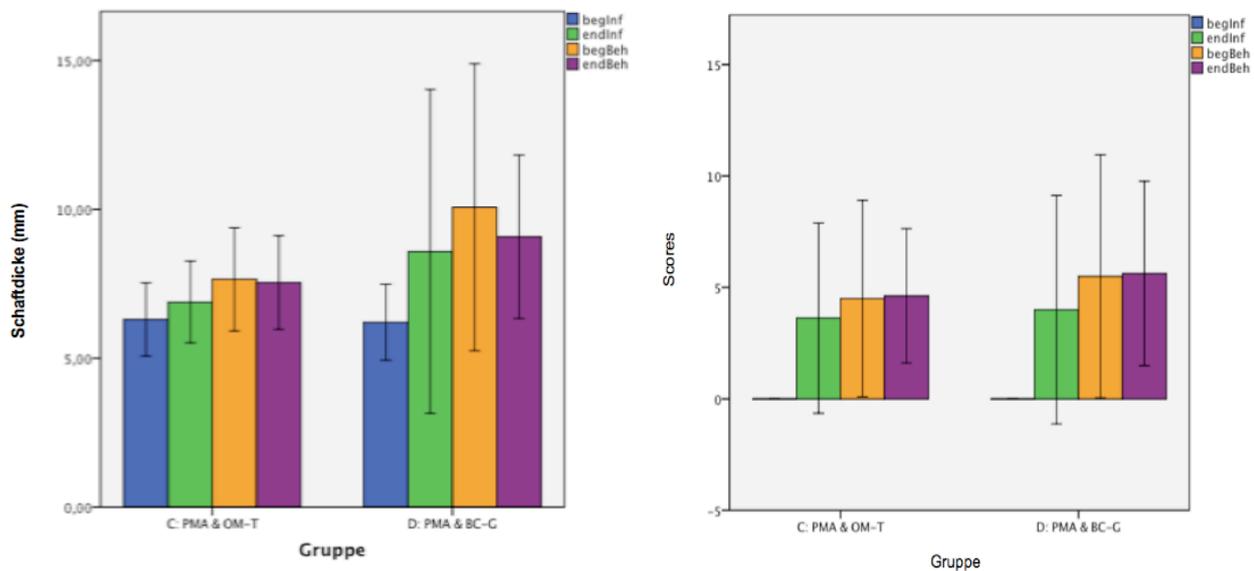


Abbildung 3.15.: Vergleich metrischer Messungen der Schaftdurchmesser in den Gruppen C und D mit den radiographischen Osteomyelitis Scores 1 und 2, die Periostreaktion und Schaftverbreiterung einschätzen

**Korrelationen**

			begInf	begInfSCORE
Spearman-Rho	begInf Schaftdicke	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig) N	1,000 . 16	. . 16
	begInf SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig) N	. . 16	. . 16

			endInf	endInfSCORE
Spearman-Rho	endInf Schaftdicke	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig)	1,000 .	,781** ,000
	endInf SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig)	,781** ,000	1,000 .

			begBeh	begBehSCORE
Spearman-Rho	begBeh Schaftdicke	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig) N	1,000 . 16	,614* ,011 16
	begBeh SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient Sig. (2-seitig) N	,614* ,011 16	1,000 . 16

			endBeh	endBehSCORE
Spearman-Rho	endBeh	Korrelationskoeffizient	1,000	,583*
	Schaftdicke	Sig. (2-seitig)	.	,018
		N	16	16
<hr/>				
	endBeh SCORES 1+2	Korrelationskoeffizient	,583*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,018	.
		N	16	16

Tabellen 3.2.: Korrelation metrischer Messungen der Schaftdurchmesser in den Gruppen C und D mit den radiographischen Osteomyelitis Scores 1 und 2, die Periostreaktion und Schaftverbreiterung einschätzen; Korrelation signifikant wenn 0,05\* und hoch signifikant wenn 0,01\*\*

### 3.4. Radio-densitometrische Profil-Darstellung der Knochenveränderungen

Die Erstellung der radio-densitometrischen Profile ermöglicht eine Darstellung der ortsspezifischen Knochenveränderungen anhand der Röntgendichteunterschiede.

So ist es möglich zwischen mehr und weniger röntgendichten Knochenanteilen zu unterscheiden, was in der untenstehenden Abbildung (Abb.3.16.) deutlich sichtbar ist. An der Röntgenaufnahme von einem Tier aus der Gruppe A ist anhand des Dichteprofiles der kortikale Knochen deutlich zu unterscheiden. Nach der Behandlung ist eine höhere Mineraldichte innerhalb der Markhöhle zu beobachten, was auch am radio-densitometrischen Profil sichtbar ist. Dies kann auf die Implantation des Bankknochens bei der Behandlung der Osteomyelitis zurückgeführt werden. Die Mineraldichte-Profile der Veränderungen innerhalb des Knochens entsprechen den histomorphologischen Befunden des proximalen Querschliffes am Ende der Behandlung. Der Marknagel mit seiner unterschiedlichen Dicke vor und nach der Behandlung ist am Profil auch deutlich zu erkennen.

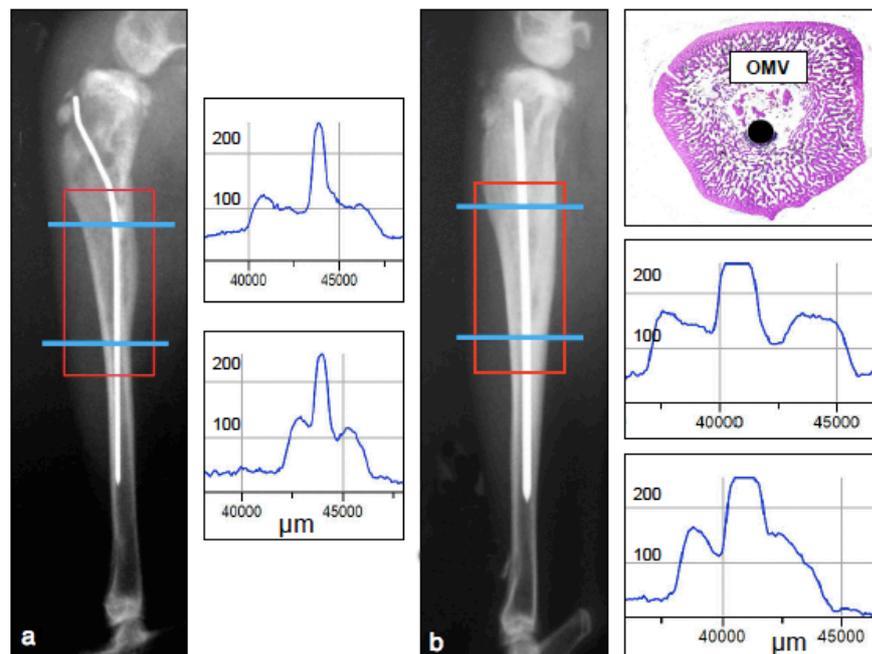


Abbildung 3.16.: Proximale und distale radio-densitometrische Profile in der AOI: Beispiel A5 aus Gruppe A (MRSA & OM-V): a) Röntgenaufnahme vor der Behandlung; b) Röntgenaufnahme nach der Behandlung. Die Histogramme stellen in Übereinstimmung mit den histomorphologischen Befunden (Bild rechts oben) die Abstufungen der mineralisierten Knochendichte und den Bankknochen dar (100-200 Helligkeitsintensität, µm Skala).

An den Profilen, die von Röntgenbildern der mit Knochenzement behandelten Tiere stammen, erkennt man deutlich die Abgrenzung des Knochenersatzmaterials zu den anderen Strukturen des Knochens. Auch bei diesen Gruppen entsprechen die radiologischen Veränderungen innerhalb des Knochens den histomorphologischen Befunden.

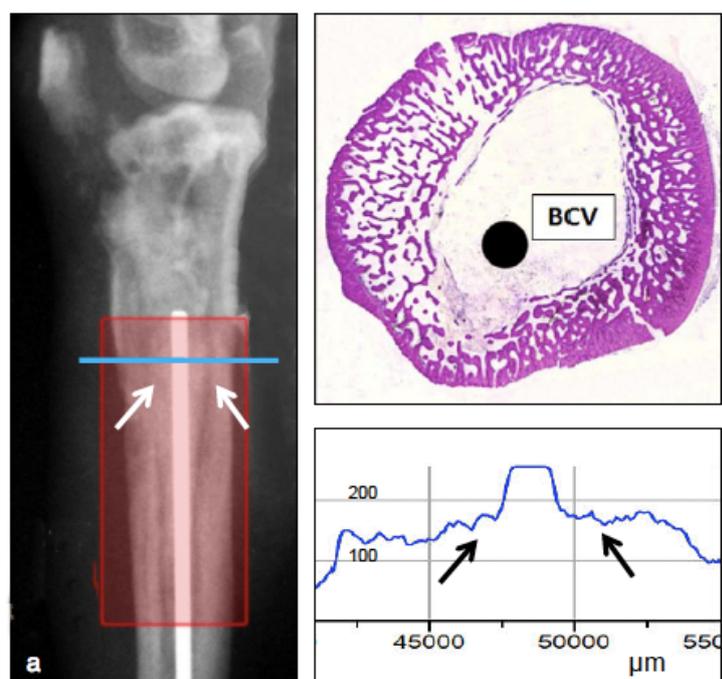
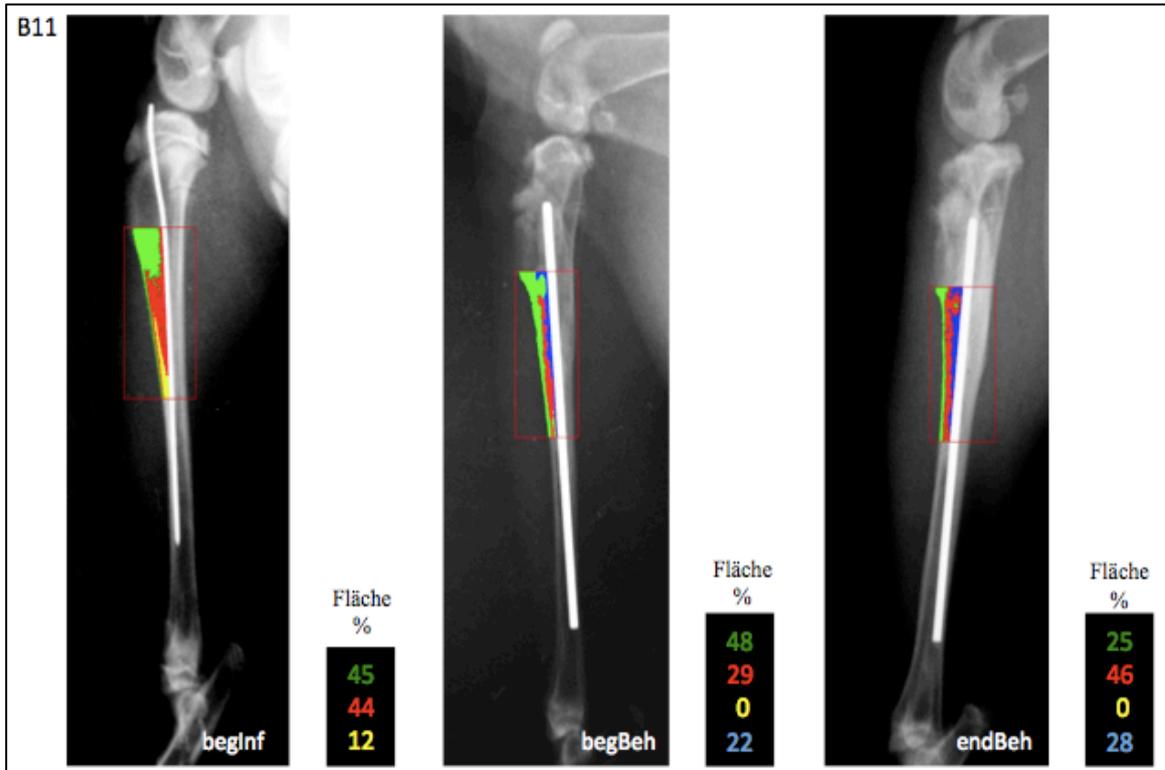
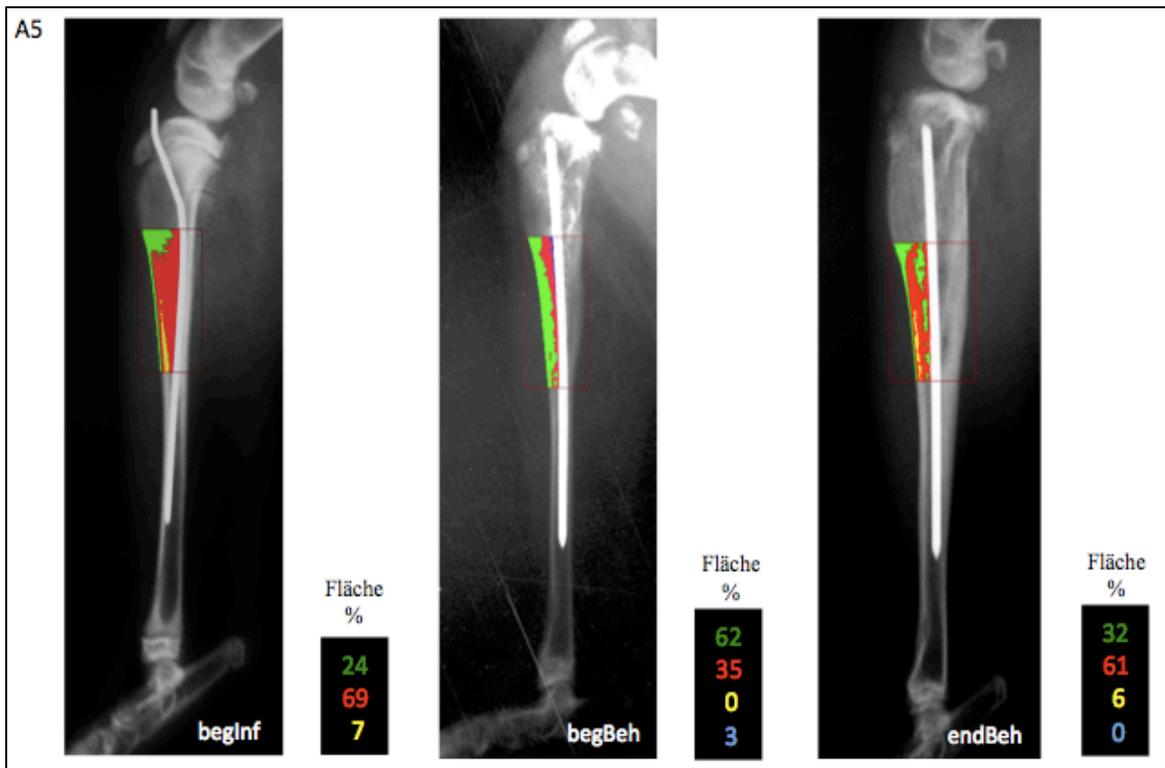


Abbildung 3.17.: Radio-densitometrische Profile: Gruppe B: MRSA & BC-V, B17 a) Röntgenaufnahme nach der Behandlung mit Palacos®-V, deutliche Übereinstimmung zwischen dem histomorphologischen Querschliff und dem radio-densitometrischen Profil des mineralisierten Knochens und des Knochenzementmantels um den Marknagel(Pfeile)

### 3.5. Radio-densitometrische Auswertung der konventionellen Röntgenaufnahmen

Mit Hilfe der radio-densitometrischen Messungen konnten die unterschiedlichen Knochenstrukturen deutlich dargestellt werden. So konnte man zwischen den periostalen, kortikalen und intramedullären Knochenanteilen bzw. dem mit Antibiotika kombiniertem Knochenersatzmaterial unterscheiden und nach Falschfarbenmarkierung die jeweiligen Flächenanteile in Prozent der AOI berechnen.



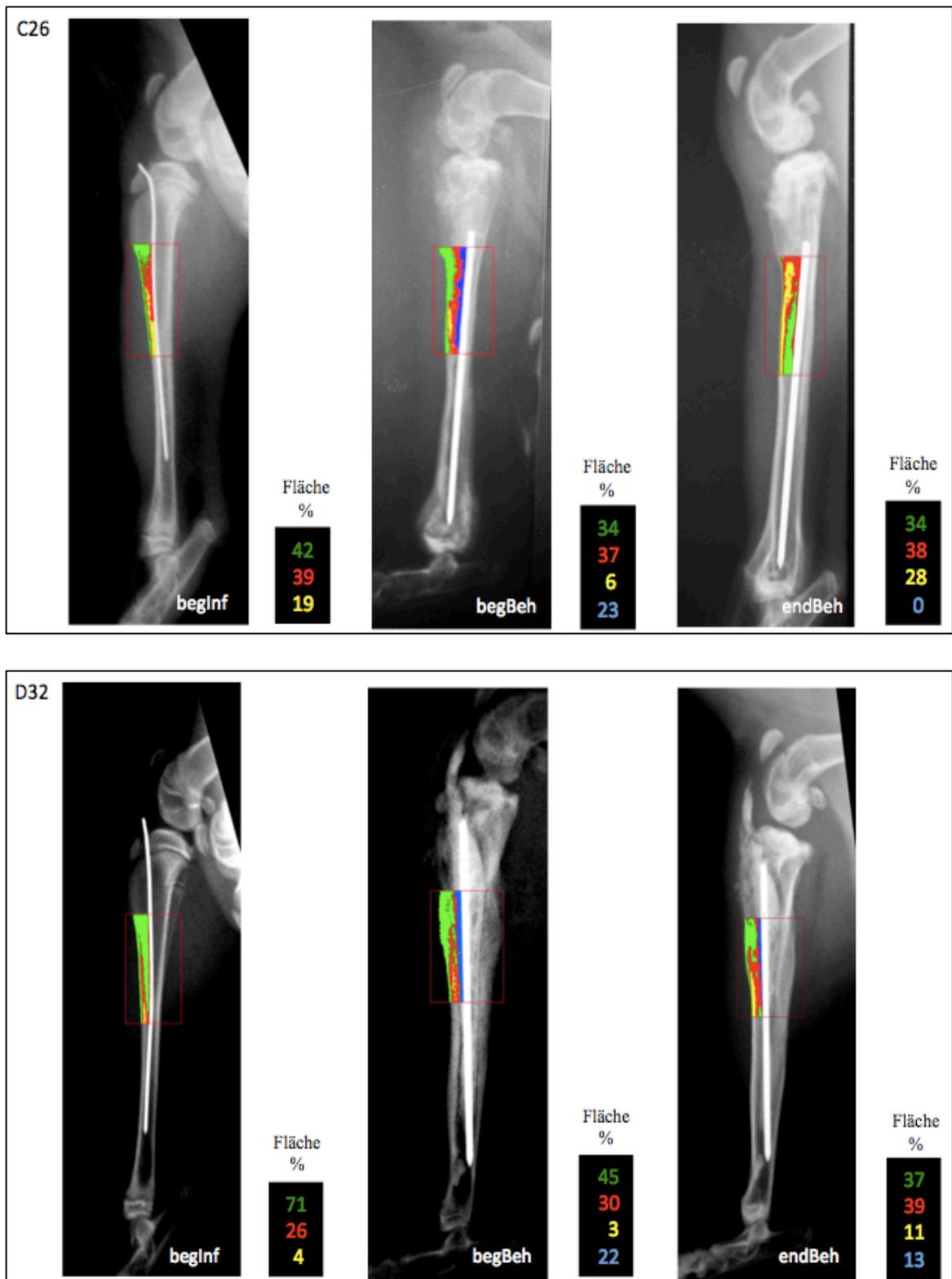


Abbildung 3.18.: Ausgewählte Röntgenbildserien vom Beginn der Infektionsphase (begInf), dem Beginn (begBeh) und dem Ende der Behandlungsphase (endBeh) jeweils eines Tieres der Gruppe A (A5), der Gruppe B (B11), der Gruppe C (C26) und der Gruppe D (D32). In den anterioren Hälften der AOI (rotes Rechteck) sind jeweils die radiodensitometrisch definierten Flächen mit periostaler (grün), kortikaler (gelb) und intramedullärer Knochendichte (rot), sowie der Antibiotika-Trägermaterialien Bankknochen

oder Knochenzement (blau) markiert, und die prozentuellen Flächenanteilstwerte rechts daneben angegeben.

Während in der Gruppe A die am Anfang der Infektionsphase noch sichtbare Kortikalis nach Behandlungsbeginn (begBeh) nicht mehr erkennbar ist und durch vermindert röntgendichten "periostalen" Knochen ersetzt wurde, wird am Ende der Behandlung wieder kortikalisdichter Knochen erkennbar.

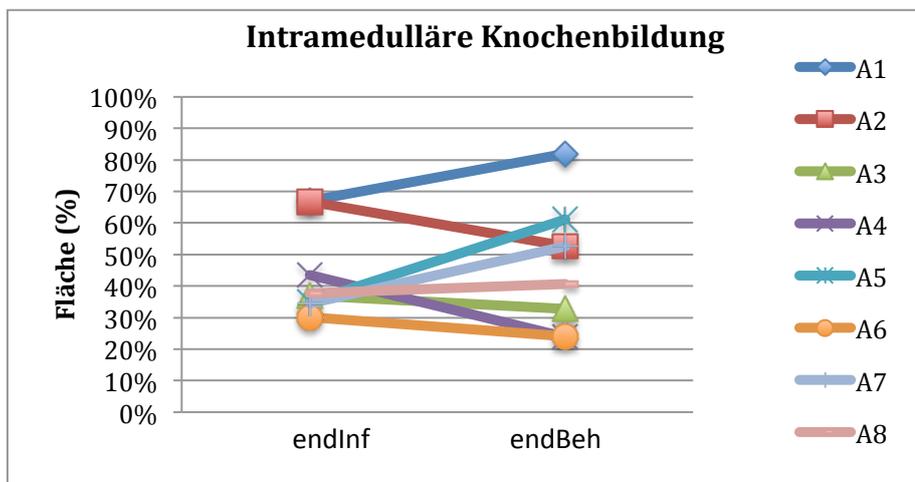
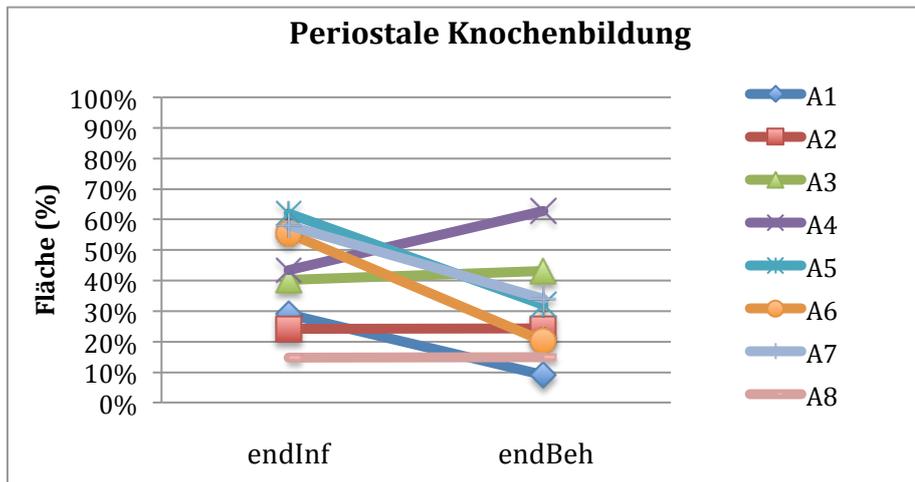
Bei der Gruppe B verschwindet in der Infektionsphase ebenfalls der kortikalisdichte Knochen, wird aber bis zum Ende der Behandlungsphase nicht wieder hergestellt. Der Knochenzementmantel um den Marknagel ist deutlich zu erkennen.

In der Gruppe C war es in der Infektionsphase bei diesem Tier ebenfalls zu einer Reduktion der kortikalisdichten Knochenanteile und zu einer Zunahme der Periostreaktion gekommen, am Ende der Behandlungsphase haben kortikalisdichte und intramedulläre Knochenanteile jedoch wieder deutlich zugenommen. Der Bankknochen um den Marknagel ist nicht mehr zu erkennen.

In der Gruppe D waren bei diesem Tier nur geringe Veränderungen des kortikalisdichten Knochenanteiles zu beobachten, die gering röntgendichten "periostalen" Knochenanteile am Beginn der Infektionsphase nahmen geringfügig ab, während Knochenanteile mit höherer "intramedullärer" Knochendichte bis zum Ende der Behandlungsphase leicht zunahmen. Beachte die anscheinende, nur durch die Projektion im Röntgenbild bedingte Abnahme des Knochenzementmantels.

## Gruppe A: MRSA & OM-V

Bei 4 von insgesamt 8 mit OSTEOMycin-V® behandelten Tieren wurde vom Anfang bis zum Ende der Behandlung eine Verringerung der periostalen Knochenbildung beobachtet. In 3 Fällen gab es keine Veränderungen, und in einem wurde eine Zunahme der periostalen Knochenfläche gemessen. Bei 4 Tieren zeigte sich eine Vergrößerung der Intramedullären Knochenflächenanteile und bei den anderen 4 Tieren eine Verkleinerung. Bei 6 Tieren wurde eine Zunahme der kortikalen Knochendichteanteile beobachtet und bei 2 Tieren ein leichter Abfall.. Die Menge des Bankknochens blieb bei einem Tier unverändert und bei den restlichen 3 Tieren wurde eine Reduzierung beobachtet. Bei 3 Tieren wurde jedoch eine Zunahme des Bankknochenanteiles gemessen.



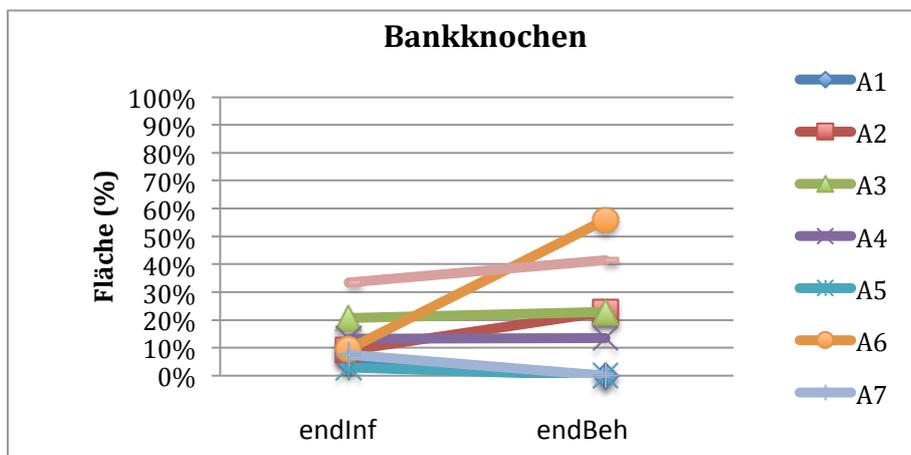
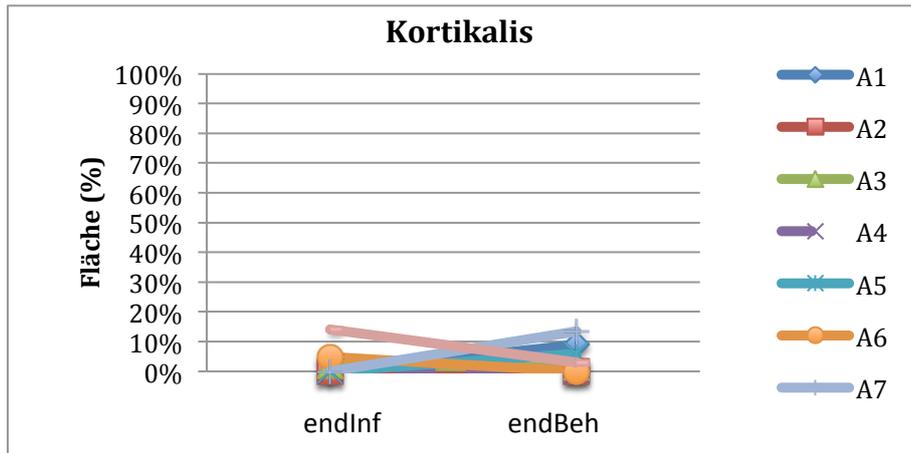


Abbildung 3.19. : Radiodensitometrische Messungen der Anteile von periostalen und endostalen Knochnneubildungen, der Kortikalisdichte, und des Bankknochens in der AOI , Gruppe A: Ende der Infektion (4 Wochen) und Ende der Behandlung (11 Wochen)

### Gruppe B: MRSA & BC-V

Bei 6 von den insgesamt 7 verbliebenen mit Palacos® + Vancomycin behandelten Tieren wurde eine Verringerung der periostalen Knochenbildung vom Anfang bis zum Ende der Therapie beobachtet. Nur in einem Fall blieb die periostale Knochenbildung unverändert. Bei 6 Tieren war eine deutliche Erhöhung und bei einem Tier ein leichter Anstieg der intramedullären Knochenbildung messbar. Die kortikalen Knochendichteanteile blieben bei 6 Tieren unverändert. Die Flächenanteile des Knochenzementes blieben naturgemäß unverändert.

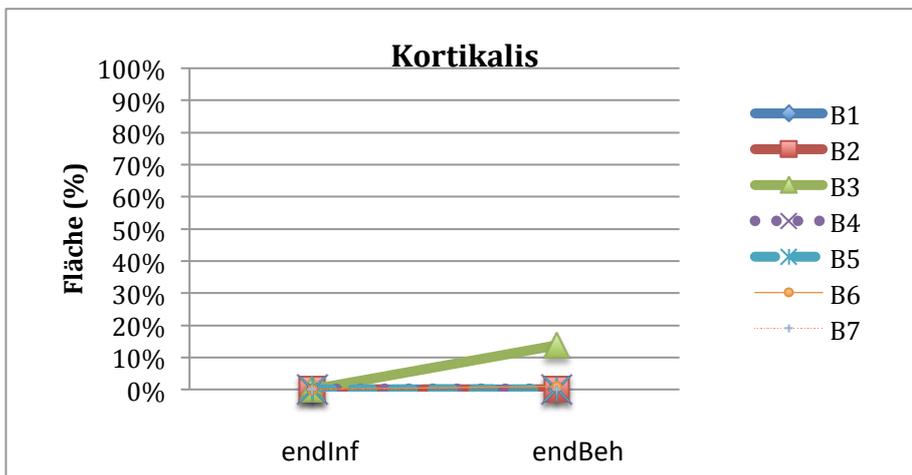
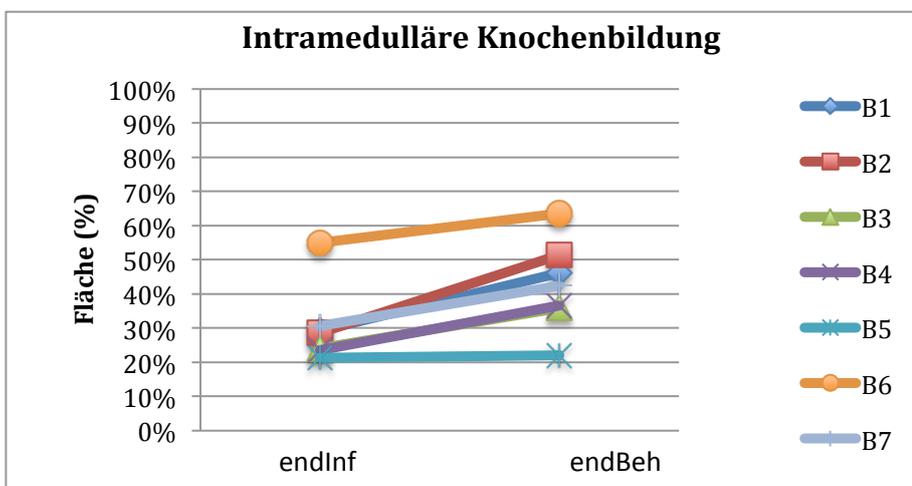
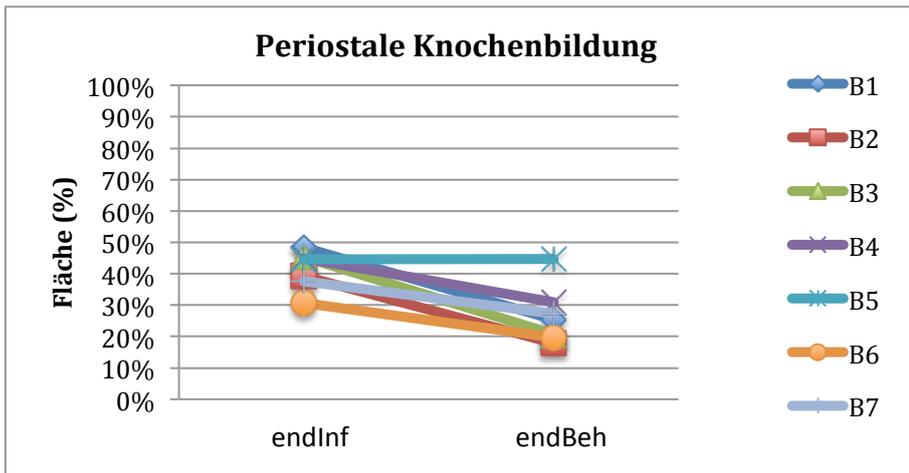


Abbildung 3.20. : Radiodensitometrische Messungen der Flächenanteile von periostaler und intramedullärer Knochenbildung und der Kortikalisdichte in Gruppe B, Ende der Infektion (4 Wochen) und Ende der Behandlung (11 Wochen)

## Vergleich der radio-densitometrischen Ergebnisse der Gruppen A und B

Die radio-densitometrischen Messungen zeigten in der Gruppe A einen leichten Anstieg der kortikalen Knochendichteanteile, während das in der Gruppe B nur bei einem (B3) Tier der Fall war. Die Menge des Bankknochens erhöhte sich in der Gruppe A, was mit den histologischen Daten nicht übereinstimmt. Bei der Gruppe B zeigte sich eine Verringerung des Periostalen Knochens.

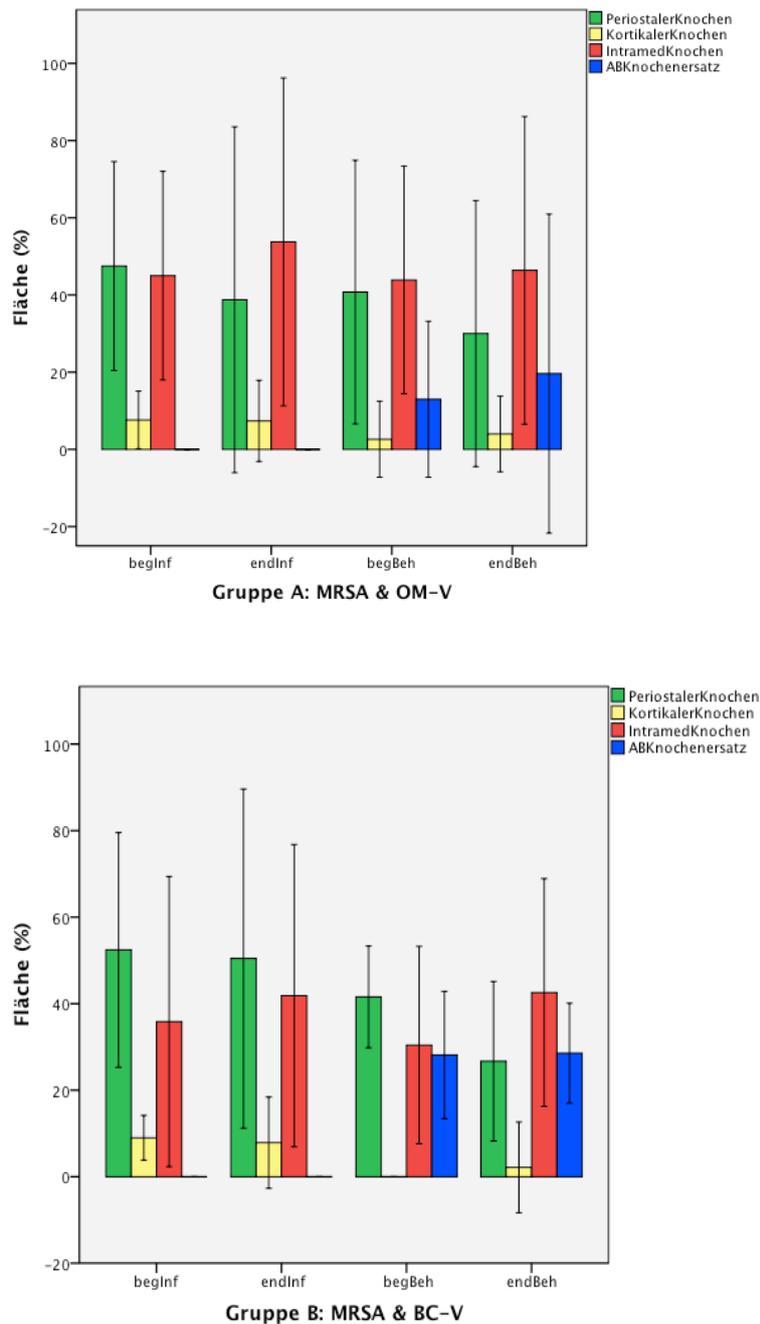
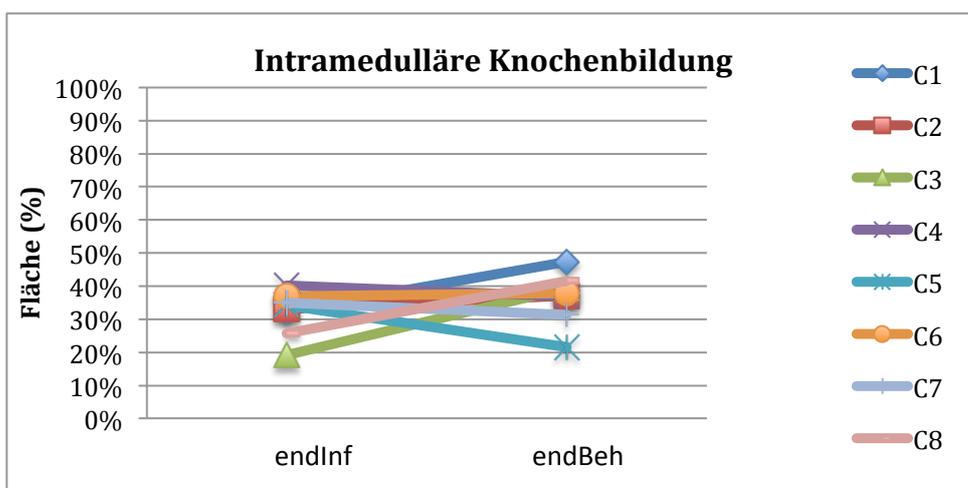
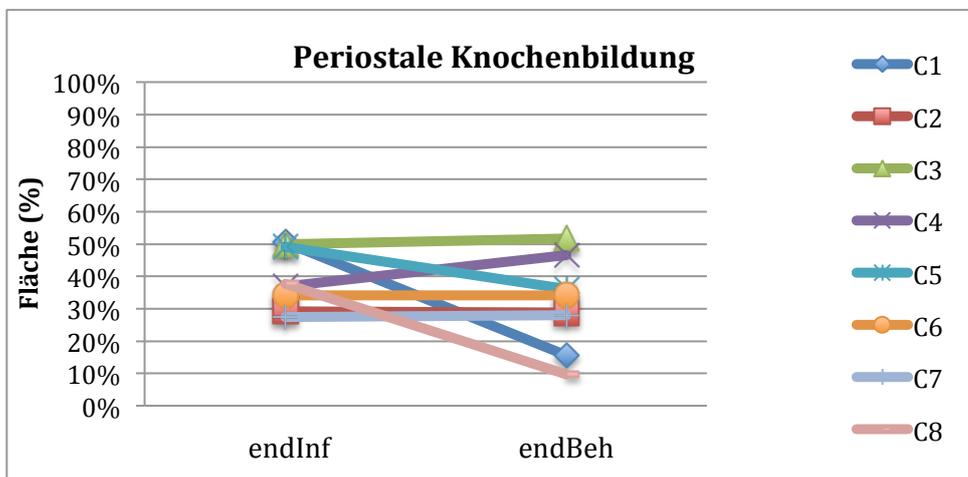


Abbildung 3.21.: Vergleich der Gruppen A: MRSA & OM-V und B: MRSA & BC-V, SD +/- 2

## Gruppe C: PMA & OM-T

In der Behandlungsphase wurde bei 3 von insgesamt 8 der mit OSTEOmycin-T® behandelten Tieren ein Abfall der periostalen Knochenbildung gemessen. Die periostale Reaktion blieb aber bei 3 Tieren unverändert, und bei 2 Tieren konnte ein Anstieg gemessen werden. Im intramedullären Bereich wurde bei 4 Tieren eine Vergrößerung und bei 3 Tieren eine Verkleinerung der entsprechenden Knochendichte-Flächenanteile gemessen. Kein Unterschied wurde bei einem Tier gemessen. Die kortikalen Knochendichteanteile stiegen bei allen Tieren in der Gruppe C deutlich an. Die Menge des Bankknochens verminderte sich in dieser Gruppe bei 6 Tieren. Bei 2 Tieren blieb die Menge des Knochenersatzmaterials jedoch unverändert.



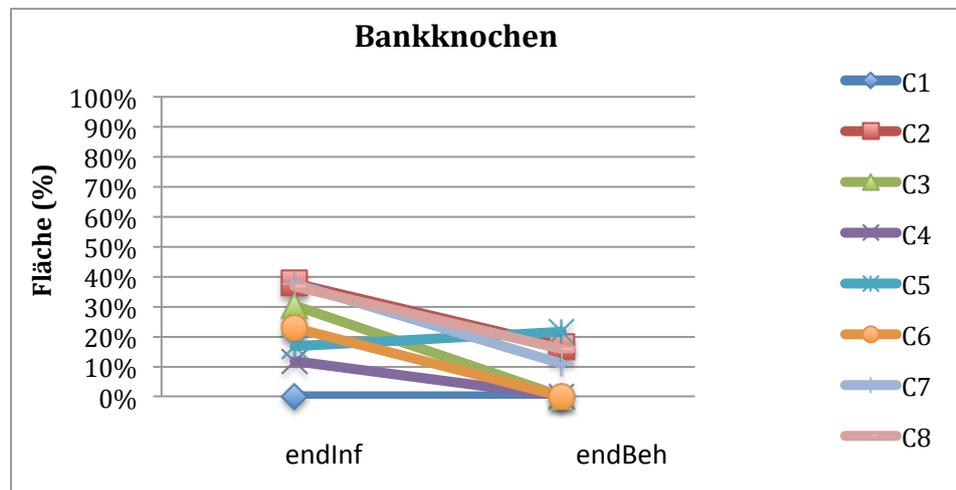
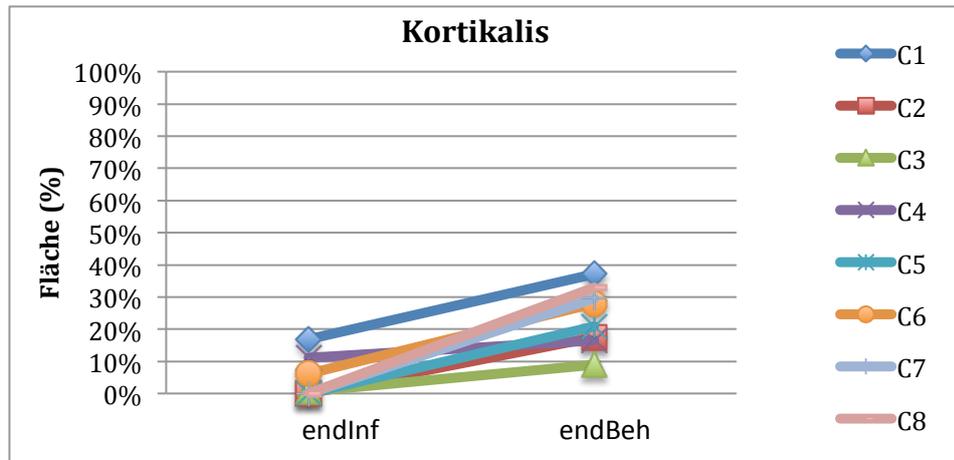


Abbildung 3.22. : Radiodensitometrische Messungen der Anteile von periostalen und endostalen Knochn Neubildungen, der Kortikalisdichte, und des Bankknochens in der AOI , Gruppe C: Ende der Infektion (4 Wochen) und Ende der Behandlung (11 Wochen)

### Gruppe D: PMA & BC-G

In der mit Palacos® +Gentamycin behandelten Gruppe wurde bei 3 Tieren eine erhöhte periostale Knochenbildung vom Anfang bis zum Ende der Behandlung gemessen. Bei 2 Tieren blieb die periostale Knochenbildung unverändert, und bei 2 Tieren wurde ein leichter Abfall beobachtet. Die Messungen wurden nur an insgesamt 7 Tieren durchgeführt. Bei 5 Tieren wurde ein Anstieg der intramedullären Flächenanteile gemessen. In einem Fall wurde eine Reduzierung beobachtet. Der Flächenanteil der intramedullären Knochenbildung blieb bei einem Fall gleich. Die kortikalen

Knochendichteanteile blieben bei 4 Tieren in dieser Gruppe unverändert. Ein Fall zeigte eine Erhöhung und 2 andere Fällen eine deutliche Reduzierung der kortikalen Knochendichteanteile in der AOI.

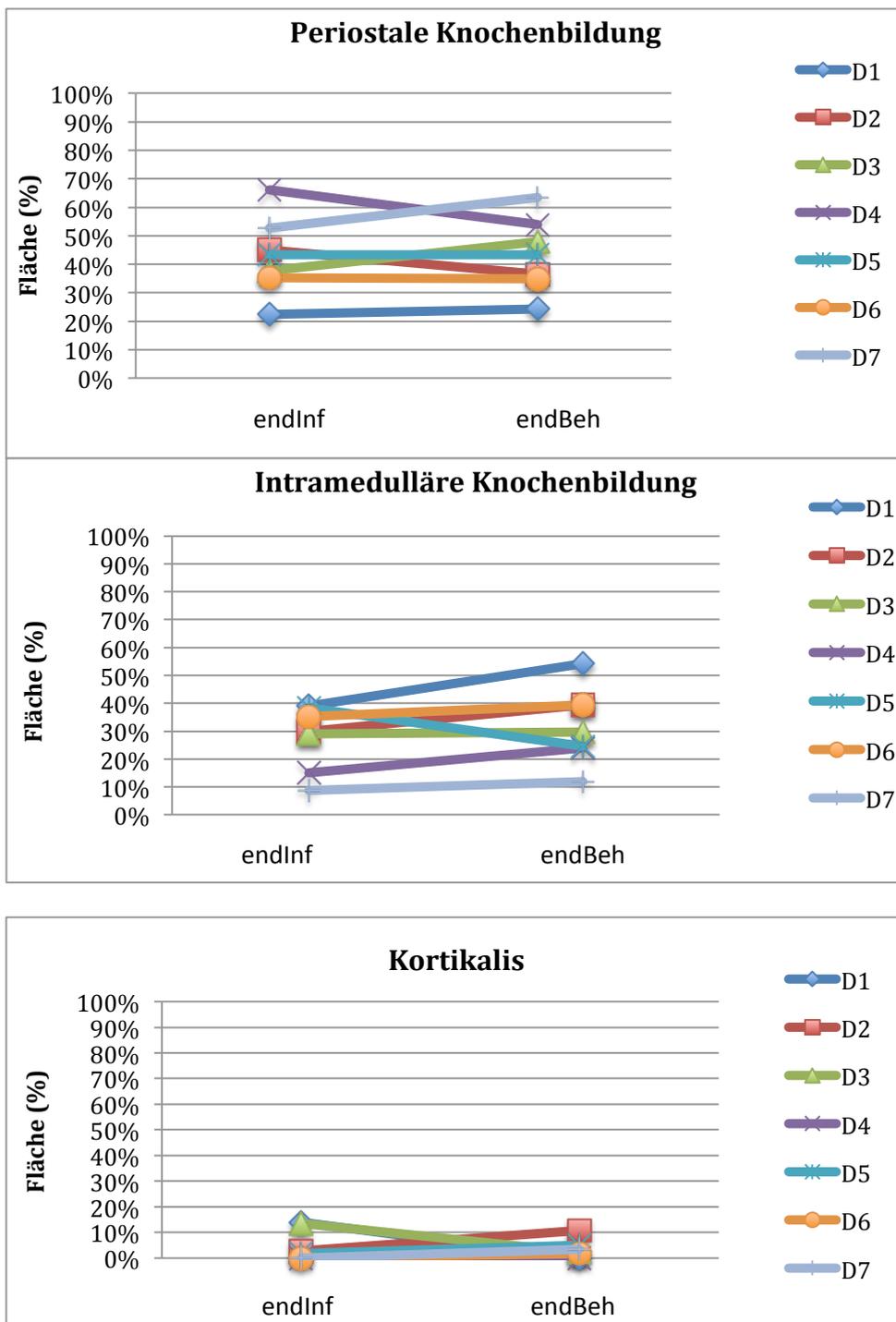


Abbildung 3.23.: Radiodensitometrische Messungen der Flächenanteile von periostaler und intramedullärer Knochenbildung und der Kortikalisdichte in Gruppe D, Ende der Infektion (4 Wochen) und Ende der Behandlung (11 Wochen)

## Vergleich der Ergebnisse der Gruppen C und D

Die radiodensitometrischen Messungen zeigten dass die Menge der kortikalen Knochenanteile in der Gruppe C deutlich anstieg, während sich die Menge des Bankknochens verringerte. In der Gruppe D erhöhte sich nur die peristotale Knochenbildung geringfügig.

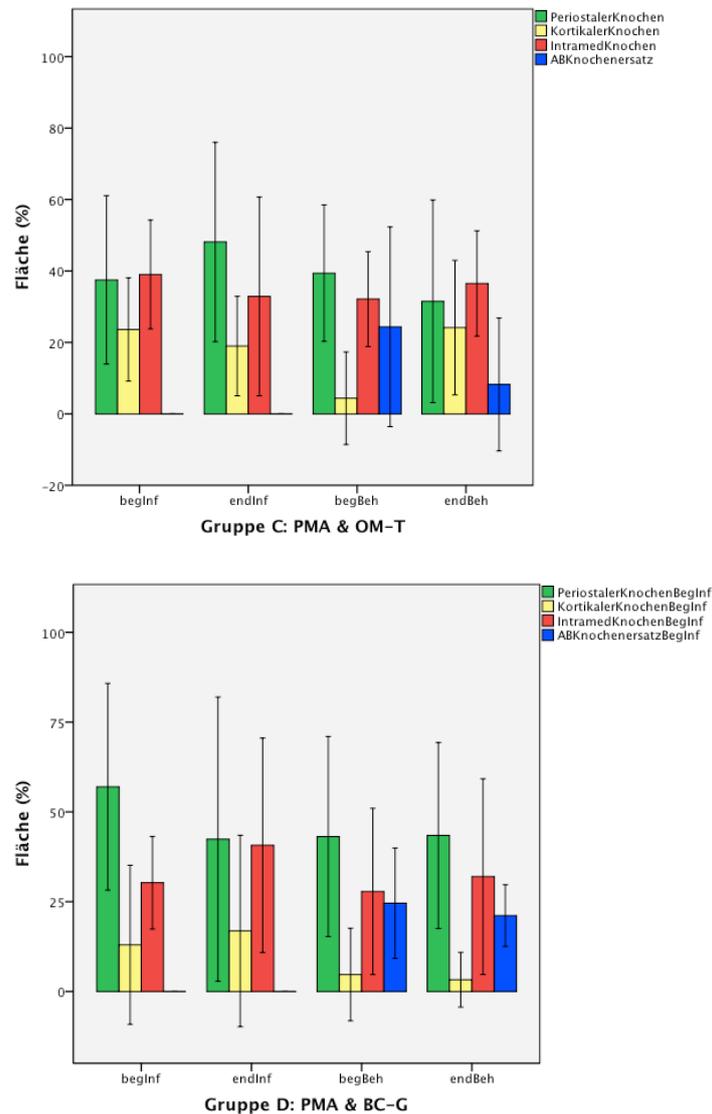
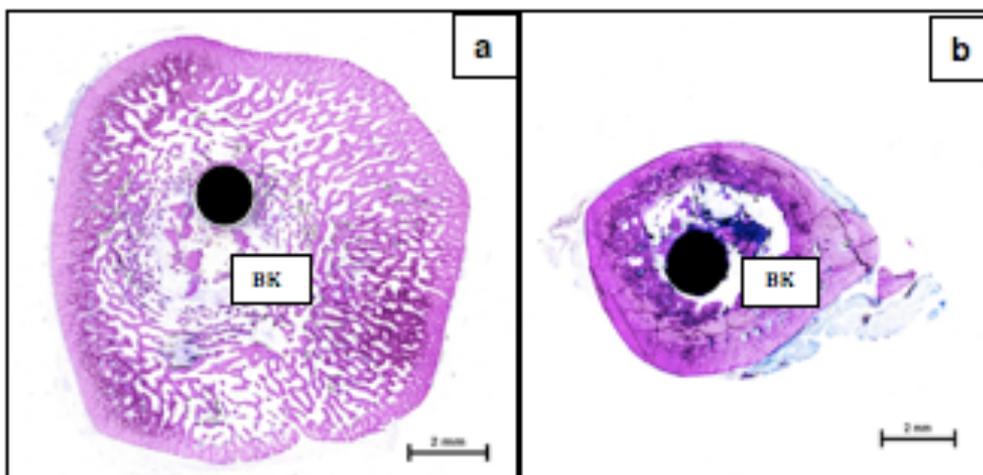


Abbildung 3.24.: Vergleich der Gruppen C: PMA & OM-T und D: PMA & BC-G, SD +/- 2

### 3.6. Pathohistologische Evaluation und Scoring-Ergebnisse für die osteomyelitischen Veränderungen

Auch die pathohistologische Evaluation ergab zum Teil sehr divergierende Ergebnisse innerhalb der Tiere einer Gruppe, und zwischen allen 4 Gruppen. Dazu kam, dass durch den Ausfall eines Tieres in der Gruppe B, und durch teilweise Zerstörung der Tibiapräparate bei der Entnahme unterschiedliche Anzahlen von Querschnittpräparaten pathohistologisch ausgewertet werden konnten. In der Abb. 3.25., (a-h) werden beispielhaft die Veränderungen und die vergebenen Scores dargestellt, so die Variationen der Kortikalis- und Periostreaktionen innerhalb der Gruppe A, oder die unterschiedliche intramedulläre Knochenneubildung im proximalen und distalen Querschnitt eines Tieres der Gruppe D. Bei Vorherrschen der akuten Entzündung fanden sich innerhalb des Markraumes multiple oder nur einzelne Mikroabszesse umgeben von aktiver Knochenneubildung, oder eine von Eiter mit neutrophilen Granulozyten gefüllte Markhöhle (= Makroabszeß) mit nekrotischen Knochenbälkchen und Bankknochenresten, die osteoklastische Resorption zeigen. Als Zeichen einer chronischen Knochenmarksentzündung fanden sich entweder ausgedehnte oder nur noch kleinere Lymphozyteninfiltrate, oder als fortgeschrittene chronische Entzündung eine Markfibrose mit aktiver Knochenneubildung um die Bankknochenpartikeln oder den Knochenzement.



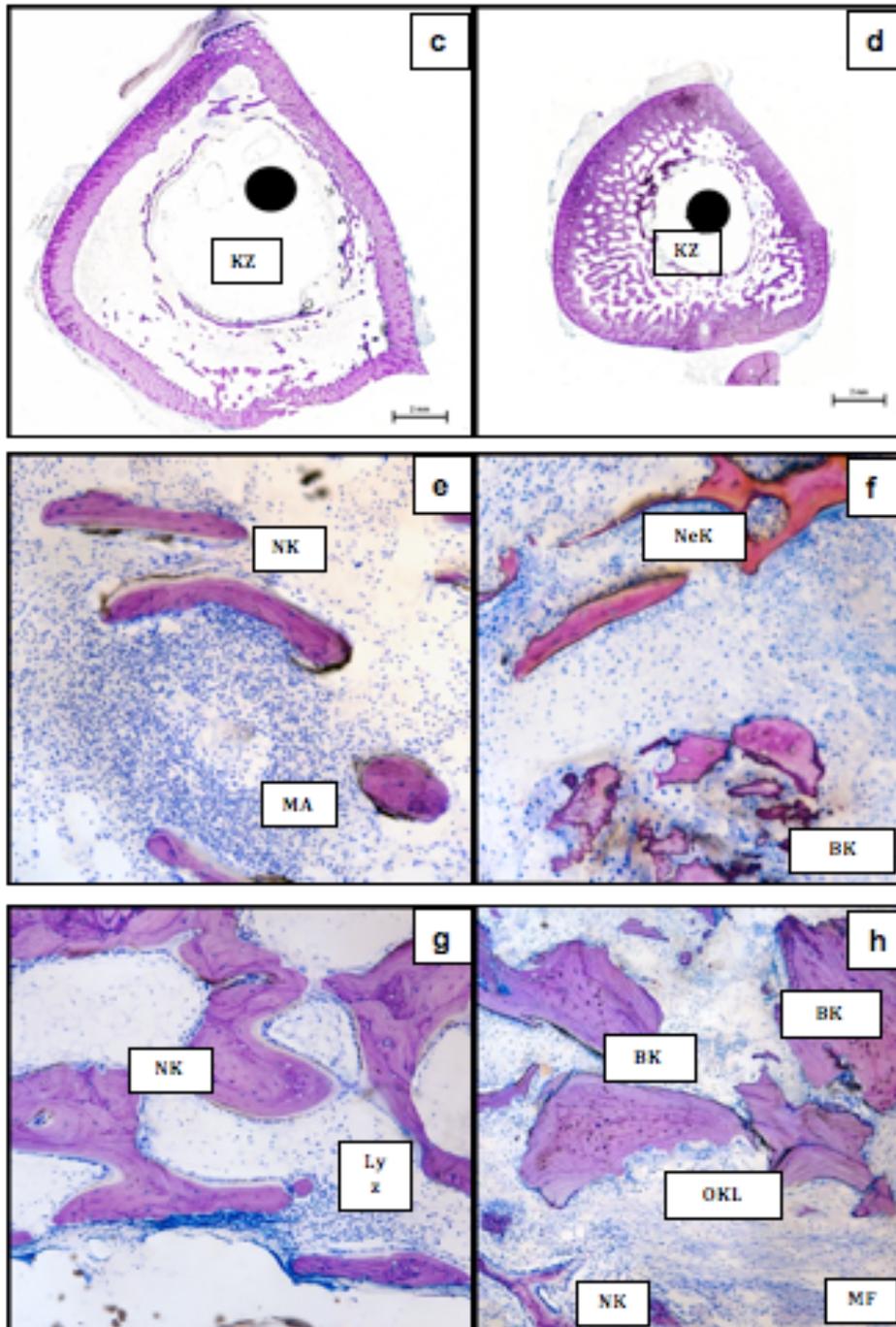


Abbildung 3.25., a-h: a) und b) distale Tibia-Querschnitte der Tiere A5 und A4 mit massiver Auflockerung (Score 4) oder unveränderter Struktur der Kortikalis (Score 0). BK=Bankknochen; c) und d) proximaler und distaler Tibia-Querschnitt des Tieres D38 mit spärlicher (Score 1) und deutlicher intramedullärer Knochenneubildung (Score 4) um den Knochenzementmantel (KZ); e) Mikroabszess (MA), umgeben von intramedullärer Knochenneubildung (NK) (Score 2); f) nekrotische Knochenpartikeln (NeK) und Bankknochenreste (BK) in der eitergefüllten Markhöhle (Makroabszess = Score 4); g) kleines Lymphozyteninfiltrat (Lyz) zwischen intramedullärer Knochenneubildung (NK) (Score 2); h)

Bankknochenpartikeln (BK) mit osteoklastischer Resorption (OKL) in Markfibrose (MF) mit Knochenneubildung (NK) (Score 4).

### **Gruppe A: MRSA & OM-V**

Bei 6 von insgesamt 8 mit OSTEOMycin-V® behandelten Tieren schien die Kortikalis im proximalen Bereich unverändert. Bei einem Tier wurde nur eine geringe, und bei einem anderen Fall eine sehr ausgeprägte Kortikalis-Veränderung beobachtet. Im distalen Bereich der Tibia schien die Kortikalis in 6 Fällen unverändert, nur zwei Tiere zeigten einen leichten bis stärkeren Umbau.

Im proximalen Bereich der Tibia wurden in 3 Fällen keine Anzeichen einer akuten Infektion gefunden. Bei 3 anderen Tieren wurden einzelne bzw. mehrere Mikroabszesse gefunden. Lediglich bei einem Tier wurde ein Makroabszess gefunden. In distalem Bereich wurden bei 5 von insgesamt 7 bewerteten Tieren Anzeichen einer akuten Entzündung ausgeschlossen. In einem Fall wurde ein Makroabszess gefunden

Nach der OSTEOMycin-V® Behandlung konnte bei allen Tieren im proximalen Bereich der Tibia eine fortgeschrittene chronische Entzündung mit Markfibrose, Knochenneubildung und deutlichen Heilungszeichen festgestellt werden. Im distalen Bereich zeigten 5 von insgesamt 7 Fällen eine fortgeschrittene chronische Entzündung und Heilung. Die endostale Knochenneubildung variierte stark in proximaler sowie in distaler Ebene.

### **Gruppe B: MRSA & BC-V**

Bei den mit Palacos® + Vancomycin behandelten Tieren zeigte sich eine geringe kortikale Veränderung im proximalen Bereich. Nur bei einem Tier wurde ein stärkeres Remodeling beobachtet. Im distalen Bereich zeigten 2 von 7 der Tiere keine, 4 Tiere eine geringe, und 1 Tier eine stärkere kortikale Veränderung. Keine Anzeichen einer akuten Entzündung wurden bei 4 von insgesamt 7 Tieren aus dieser Gruppe wurden keine Anzeichen einer akuten Entzündung im proximalen Bereich beobachtet. Bei einem Tier war ein Mikroabszess sichtbar, und bei den restlichen 2 wurden Makroabszesse gefunden. Im distalen Bereich zeigten sich . Bei 3 Fällen keine Anzeichen einer akuten

Entzündung. Bei einem Präparat waren fokale Granulozyten-Infiltrate zu erkennen. Ein Fall zeigte einzelne Mikroabszesse, und ein anderer zeigte einen Makroabszess. Nach der Behandlung mit Palacos® + Vancomycin zeigte sich im proximalen Bereich bei nur 3 Tieren eine fortgeschrittene chronische Entzündung. Bei 4 der insgesamt 7 Tiere wurden normales Knochenmark bzw. Lymphozyten und/oder Plasmazellinfiltrate beobachtet. Im distalen Querschnitt der Tibia wurde bei nur einem Tier eine fortgeschrittene chronische Entzündung mit Markfibrose festgestellt. Bei den restlichen 5 auswertbaren Querschnitten waren nur akute Entzündungszellinfiltrate zu sehen (siehe oben). Die endostale Knochenneubildung variierte sehr stark im proximalen sowie im distalen Bereich.

### Statistik des Vergleiches der Gruppen A und B

Die pathohistologischen Auswertungen zeigten, dass die Anzeichen einer ausgeprägten, chronischen Entzündung, welche auf eine Heilung hindeuten, in der Gruppe A deutlich häufiger vorkamen als in der Gruppe B. Dies ergab jedoch nur einen Trend und keinen signifikanten Unterschied. ( $p=0,0699$ )

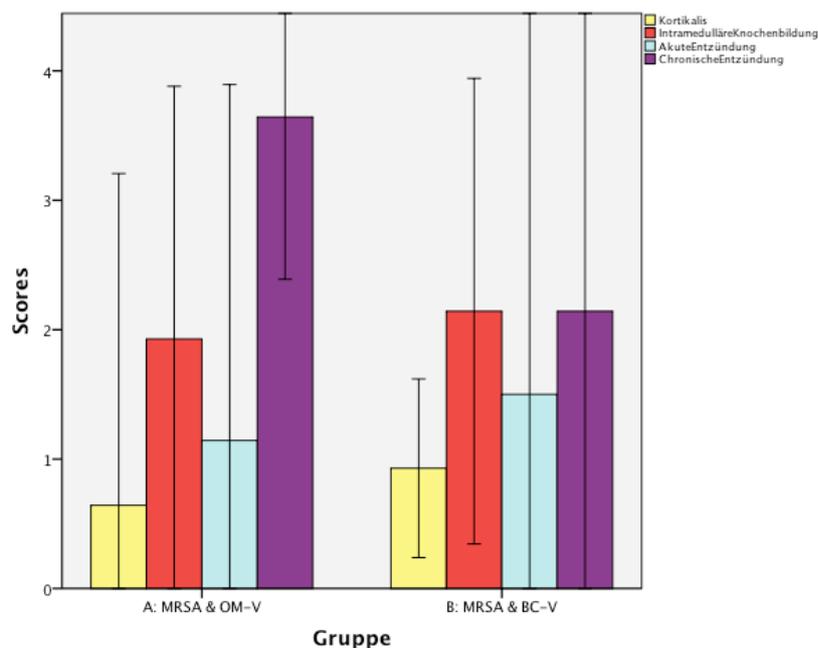


Abbildung 3.26.: Statistik der Pathohistologischen Evaluation, Gruppen A und B, Mittelwerte mit SD +/-2

### **Gruppe C: PMA & OM-V**

Bei den mit OSTEOMycin-T® behandelten Tieren zeigte sich nur ein minimaler Kortikalis-Umbau im proximalen sowie auch im distalen Bereich der Tibia.

Bei 6 Tieren zeigten sich sowohl im proximalen als auch im distalen Bereich keine Anzeichen einer akuten Entzündung. An den proximalen und distalen Querschnittebenen zeigten sich jeweils bei einem Fall ein Mikroabszess bzw. mehrere Mikroabszesse. Stadien einer fortgeschrittenen chronischen Entzündung mit Markfibrose und Knochenneubildung waren in dieser Gruppe sowohl proximal als auch distal vorhanden. An den Bankknochenpartikeln zeigte sich osteoklastische Resorption, und auch direkte endostale/intramedulläre Knochenneubildung, die allerdings auch in dieser Gruppe sehr stark variierte.

### **Gruppe D: PMA & BC-G**

In der mit Palacos® +Gentamycin behandelten Gruppe zeigte sich keine bzw. eine sehr minimale Veränderung der Kortikalis.

Im proximalen Bereich fanden sich bei 2 Tieren keine Entzündungszeichen, bei den restlichen 6 Tieren waren aber einzelne, oder multiple Mikroabszesse, oder ein Makroabszeß zu sehen. Im distalen Bereich zeigten sich bei 3 von insgesamt 8 Tieren keine Anzeichen einer akuten Entzündung, während bei den 5 restlichen Tieren jeweils mehrere Mikroabszesse zu sehen waren.

Sowohl proximal als auch distal waren in dieser Gruppe weitgehend mehr Lymphzellinfiltrate zu sehen, als andere Anzeichen einer chronischen Entzündung, die auf eine Heilung hindeuten. Die endostale/intramedulläre Knochenreaktion variierte wiederum sehr stark.

## Statistik des Vergleiches der Gruppen C und D

Die pathohistologischen Auswertungen zeigten, dass die chronischen Entzündungszeichen (=Heilung) in der Gruppe C signifikant ausgeprägter ( $p \leq 0,002$ ) waren als in der Gruppe D, bei welcher auch die akuten Infektionszeichen noch deutlich vorhanden waren.

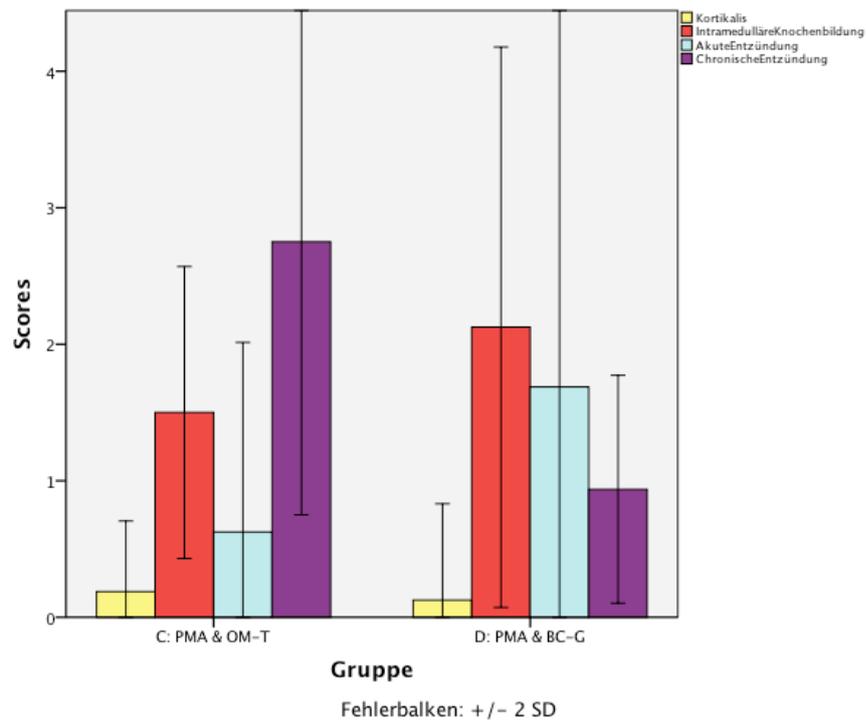
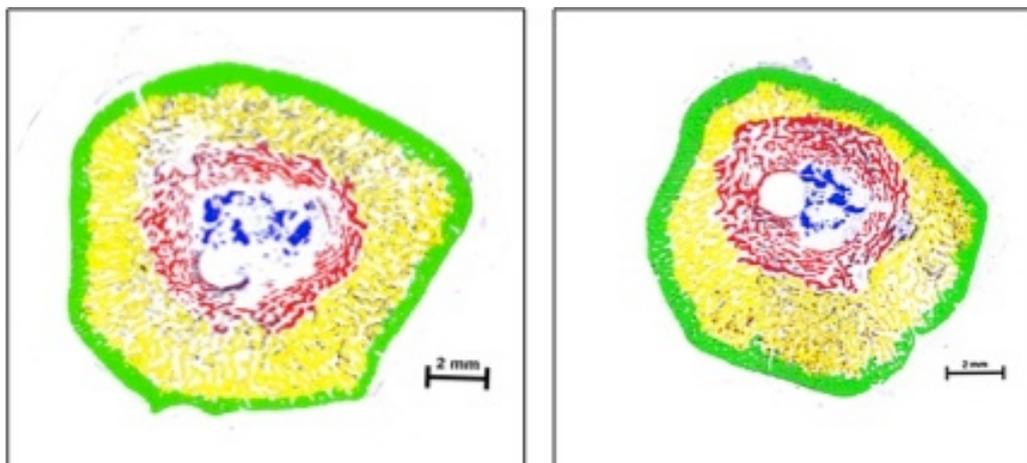


Abbildung 3.27.: Pathohistologische Evaluation, Gruppen C und D, Mittelwerte mit SD +/-2

### 3.7. Histomorphometrische Befunde

#### Gruppe A: MRSA & OM-V

Die histomorphometrischen Messungen zeigten, dass es in diesem Fall der Gruppe A sowohl proximal als auch distal zur Destruktion der Kortikalis (gelb gekommen war. Dies führte zu ähnlichen Knochendichtewerten (BV/TV) der destruierten Kortikalis und des neu entstandenen Knochens (rot) im Markraum, wie dies auch auf der radio-densitometrischen Auswertung des korrespondierenden Röntgenbildes zu erkennen ist. Zu beachten ist die Dichte der periostalen Rekortikalisierung (grün).



A 5 - 5190-1

A 5 - 5190-2

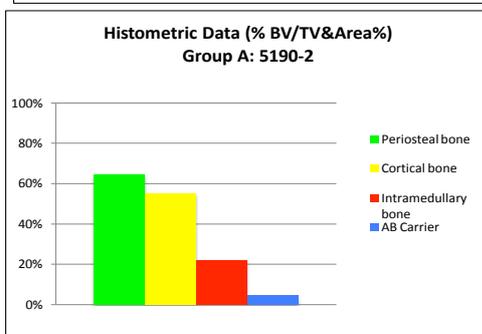
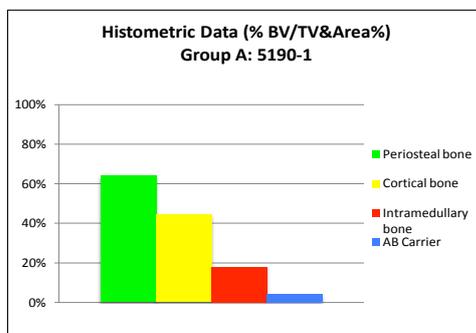


Abbildung 3.28.: Histomorphometrie, Gruppe A – 5190, % BV/TV und Area %

### Gruppe B: MRSA & BC-V

Die Messungen zeigten dass in diesem Fall der Gruppe B der kortikale Knochen (gelb) weniger zerstört war. Jedoch ist zu beachten, dass der Knochenzementmantel (blau) kaum Platz für intramedulläre Knochenneubildung (rot) übrig gelassen hat. Vergleiche die radio-densitometrische Auswertung. In dieser Gruppe ist auch eine dichte Rekortikalisierung der distal besonders starken Periostreaktion (grün) sichtbar.

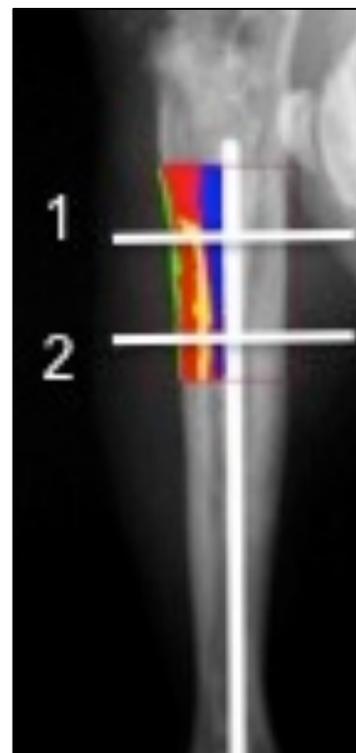
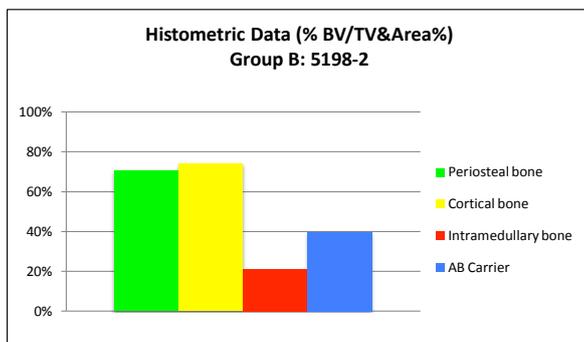
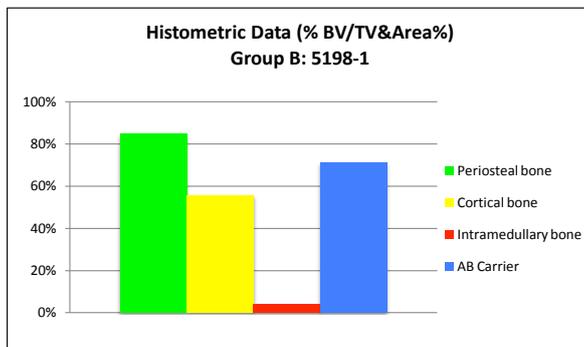
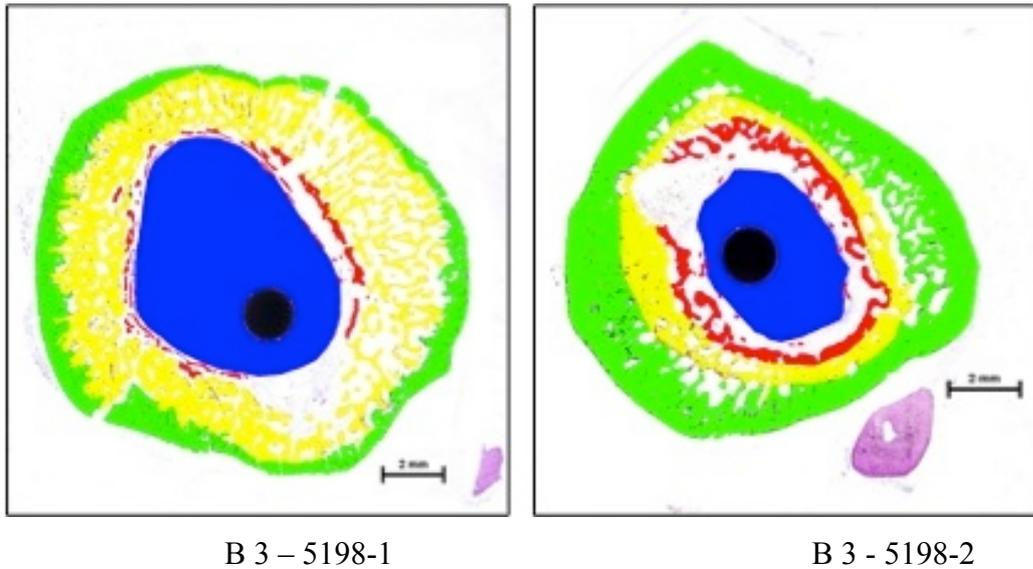


Abbildung 3.29.: Histomorphometrie, Gruppe B – 5198, %BV/TV und Area %

### Gruppe C: PMA & OM-V

Wie die morphometrischen Messungen gezeigt haben, wurde in diesem Fall der Gruppe C der Kortikalisknochen (gelb) kaum zerstört (vergleiche die radio-densitometrische Auswertung). Die Knochenneubildung im Markraum (rot) deutet auf eine Heilung hin. Nach distal nimmt die Bankknochenmenge (blau) ab, die Periostreaktion (grün) nimmt dagegen zu.

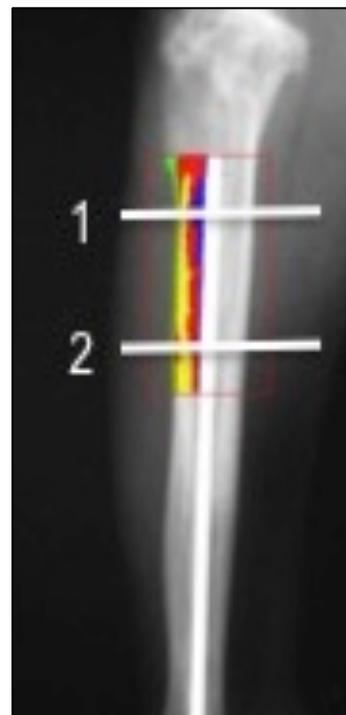
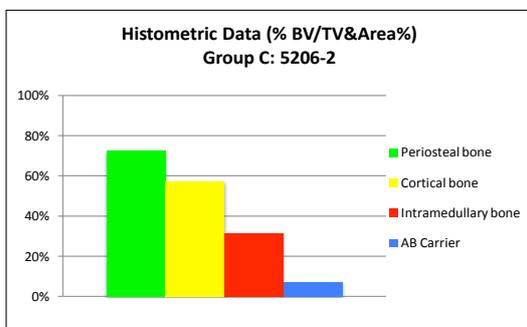
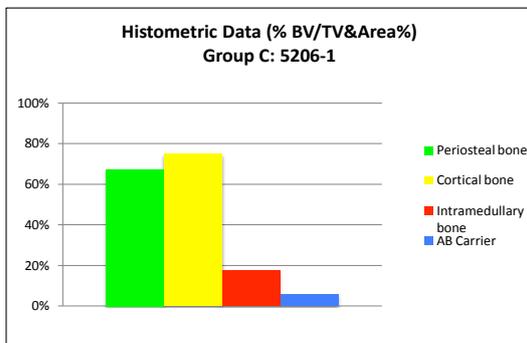
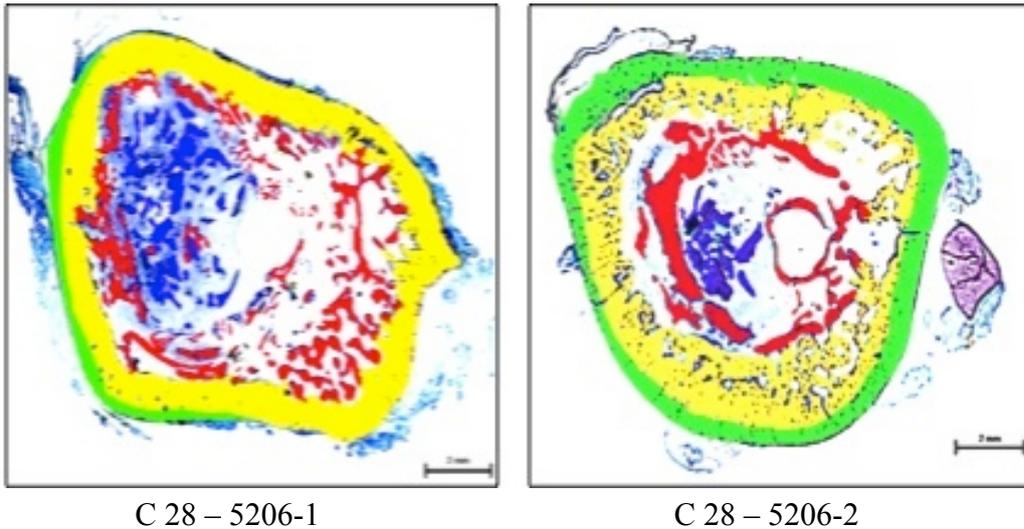
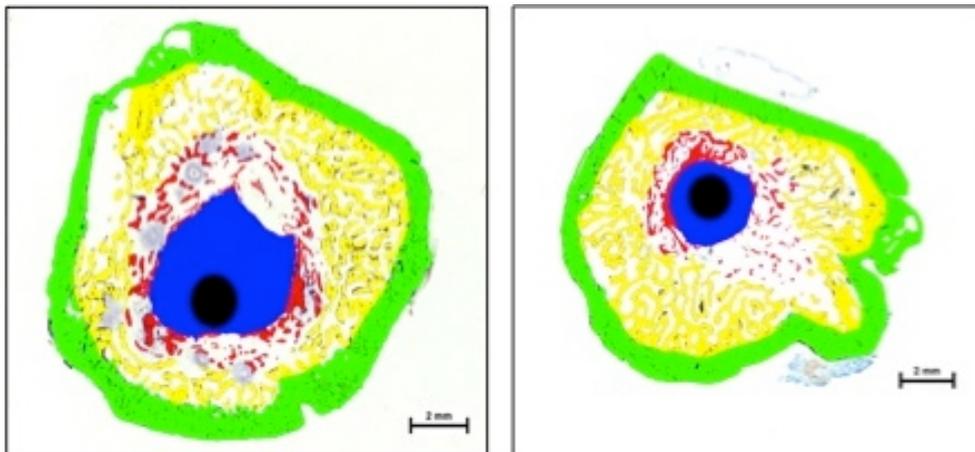


Abbildung 3.30.: Histomorphometrie, Gruppe C – 5206, %BV/TV und Area %

## Gruppe D: PMA & BC-G

In diesem Fall der Gruppe D zeigte sich vor allem proximal eine ausgeprägte Destruktion des kortikalen Knochens (gelb). Vergleiche die Röntgendichte (grün) in der radio-densitometrischen Auswertung. Um den Knochenzementmantel (blau) hatte sich spärlich neuer Knochen (rot) gebildet, jedoch sind Mikroabszesse im proximalen Markraum erkennbar. Die Verdichtung (Rekortikalisierung) der Periostreaktion (grün) ist proximal und distal deutlich sichtbar.



D 32 – 5129 -1

D 32 – 5129-2

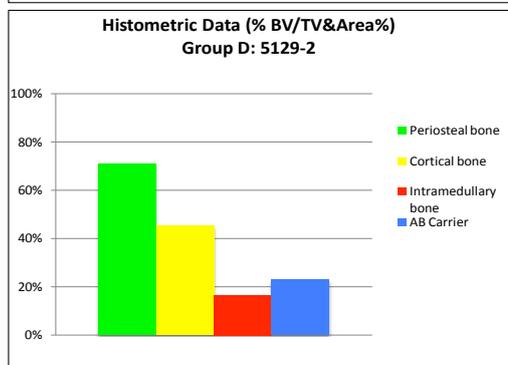
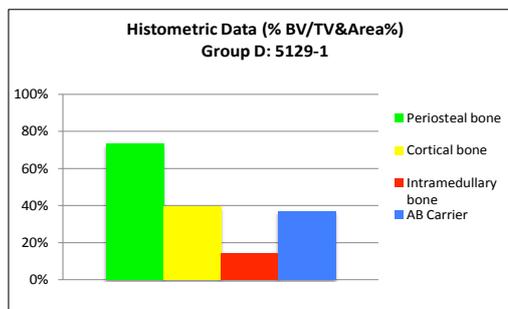


Abbildung 3.31.: Histomorphometrie, Gruppe D – 5129, %BV/TV und Area %

### 3.8. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Knochenumbauvorgänge in der Behandlungsphase mithilfe der intravitalen Polyfluorochrom-Sequenzmarkierung

Für die Differenzierung der interferierenden Knochenumbauvorgänge in der Infektions- und Behandlungsphase wurde eine polyfluorochrome Dreifachsequenzmarkierung während der Behandlungsphase herangezogen. An bisher ausgewerteten ausgewählten Fällen, zum Beispiel einem Tier der Gruppe PMA&OMV (C 22-5201) mit anscheinend gering veränderter Kortikalis und ausgedehnter Periostreaktion (Abb. 3.32. und 3.33.), und einem Tier der Gruppe PMA&BC-G (D 32 - 5129) mit hochgradig destrukturierter Kortikalis und einer dichten Periostreaktion (Abb.3.34. und 3.35.) konnte auch die erzielte Genauigkeit der Abgrenzung der periostalen, kortikalen und intramedullären Regionen bei der Histomorphometrie kontrolliert werden.

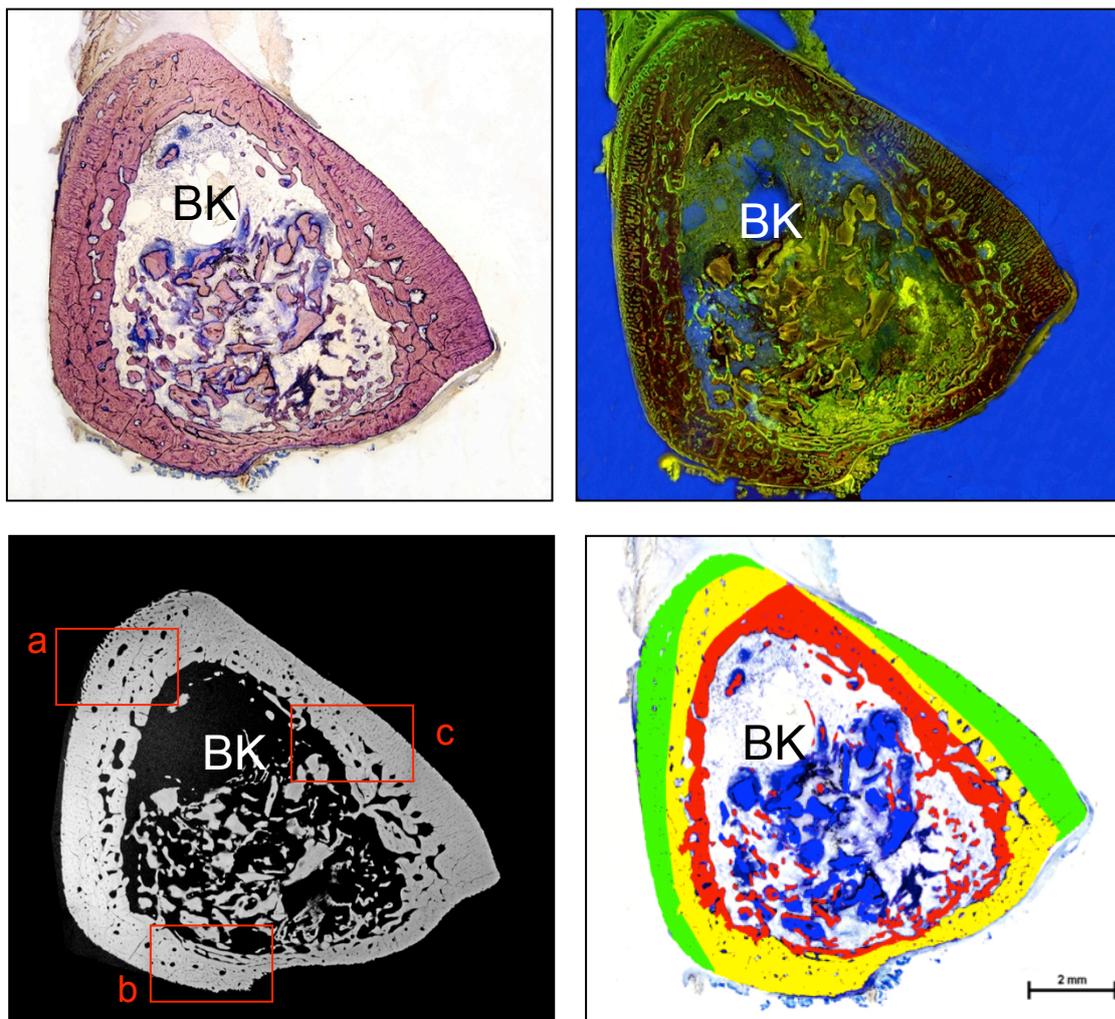


Abbildung 3.32: Proximales Querschliffpräparat der rechten Tibia von Tier C 22-5201 nach Giemsa-Oberflächenfärbung (links oben), fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (rechts oben), korrespondierende

Mikroradiographie (links unten), und histometrische Auswertung (rechts unten). Periostreaktion (grün), Kortikalis (gelb), endostale/intramedulläre Knochenneubildung (rot), Bankknochen BK (blau). Rechteckige Areale a),b), c) bezeichnen die Regionen, die vergrößert als Fluoreszenzmikrophotographien in Abb.3.30 dargestellt sind.

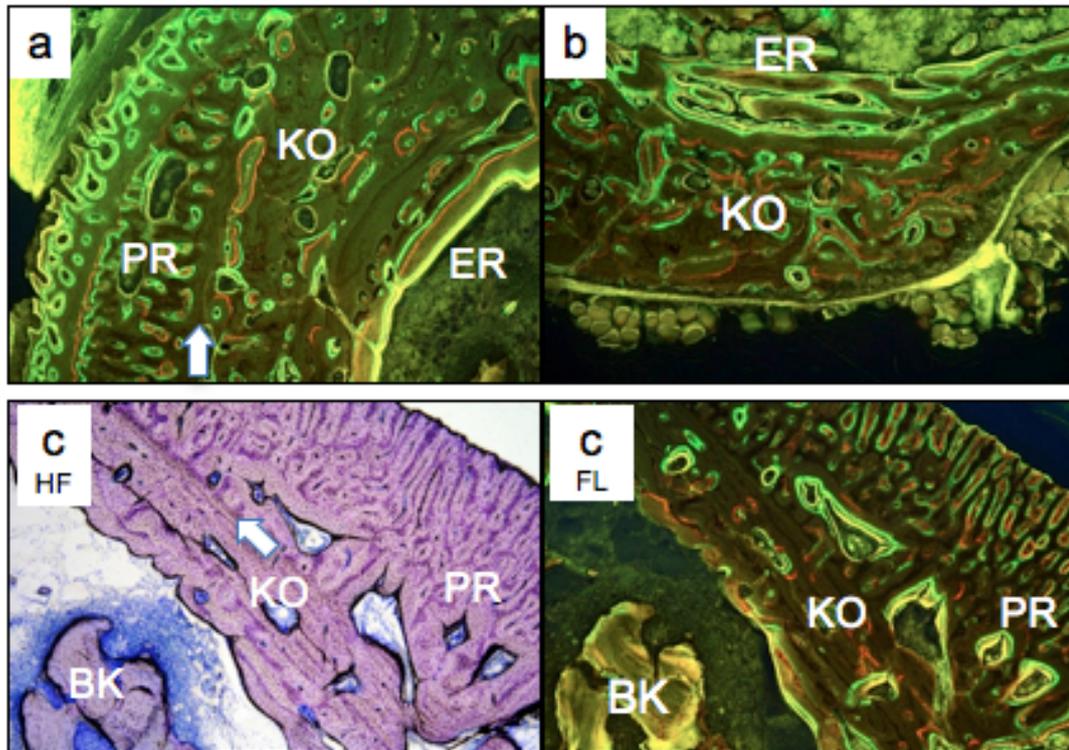


Abbildung 3.33, a-c: Detailvergrößerungen der Areale in 3.32 zeigen auf der medialen (a) und der lateralen Oberfläche der Tibia (c) Periostreaktionen (PR), die sich im Hellfeld (cHF) und auch fluoreszenzmikroskopisch (a) deutlich (siehe Pfeile) von der Kortikalis (KO) abgrenzen. Trotzdem war die Kortikalisabgrenzung im antero-lateralen Bereich nicht zweifelsfrei möglich. Die Fluorochrommarkierungen zeigen, dass die lamelläre Kompaktierung der senkrecht zur Tibiaoberfläche entstandenen periostalen Knochenformationen erst in der Behandlungsphase erfolgte (cFL). Vor allem an der Grenze zur Periostreaktion sind Resorptionshöhlen mit Knochenanbau am Ende der Behandlungsphase zu sehen (grüne Fluorochrommarkierungen). Knochenanbau findet auch auf der endostalen Oberfläche (ER) statt, vor allem auf der dorsalen Seite der Tibia( b), auf der aber keine Periostreaktion zu sehen war. An den Bankknochenpartikeln (BK) fand sich entweder eine heftige Lymphzellreaktion, oder meist geringe Knochenneubildung.

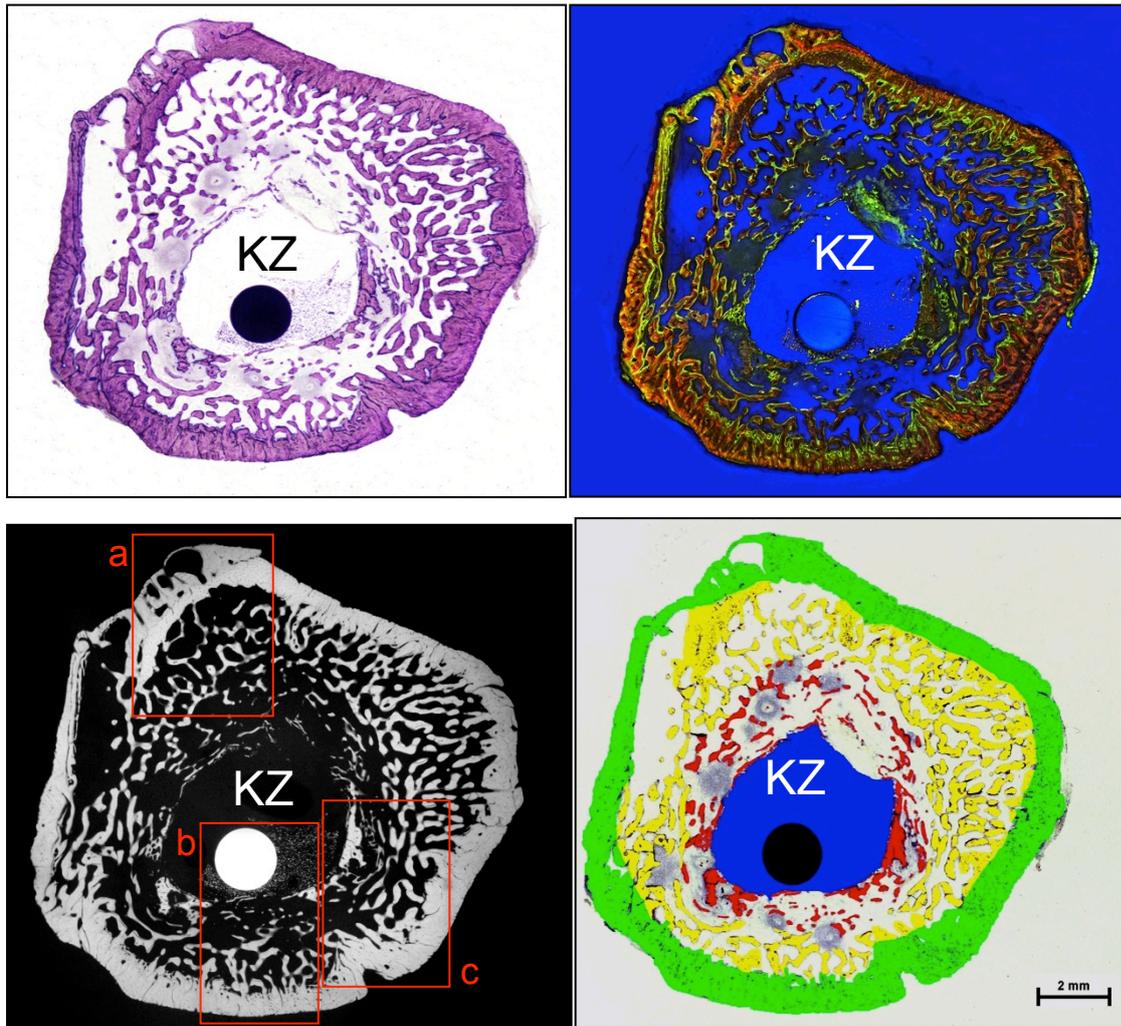


Abbildung 3.34.: Proximales Tibia-Querschliffpräparat von Tier D 32-5129 nach Giemsa-Oberflächenfärbung (links oben), fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (rechts oben), korrespondierende Mikroradiographie (links unten), und histometrische Auswertung (rechts unten). Periostreaktion (grün), Kortikalis (gelb), endostale/intramedulläre Knochenneubildung (rot), Knochenzement KZ (blau) um den zentralen Marknagel. Rechteckige Areale a), b), c) bezeichnen die Regionen, die vergrößert als Fluoreszenzmikrophotografien in Abb.3.32. dargestellt sind.

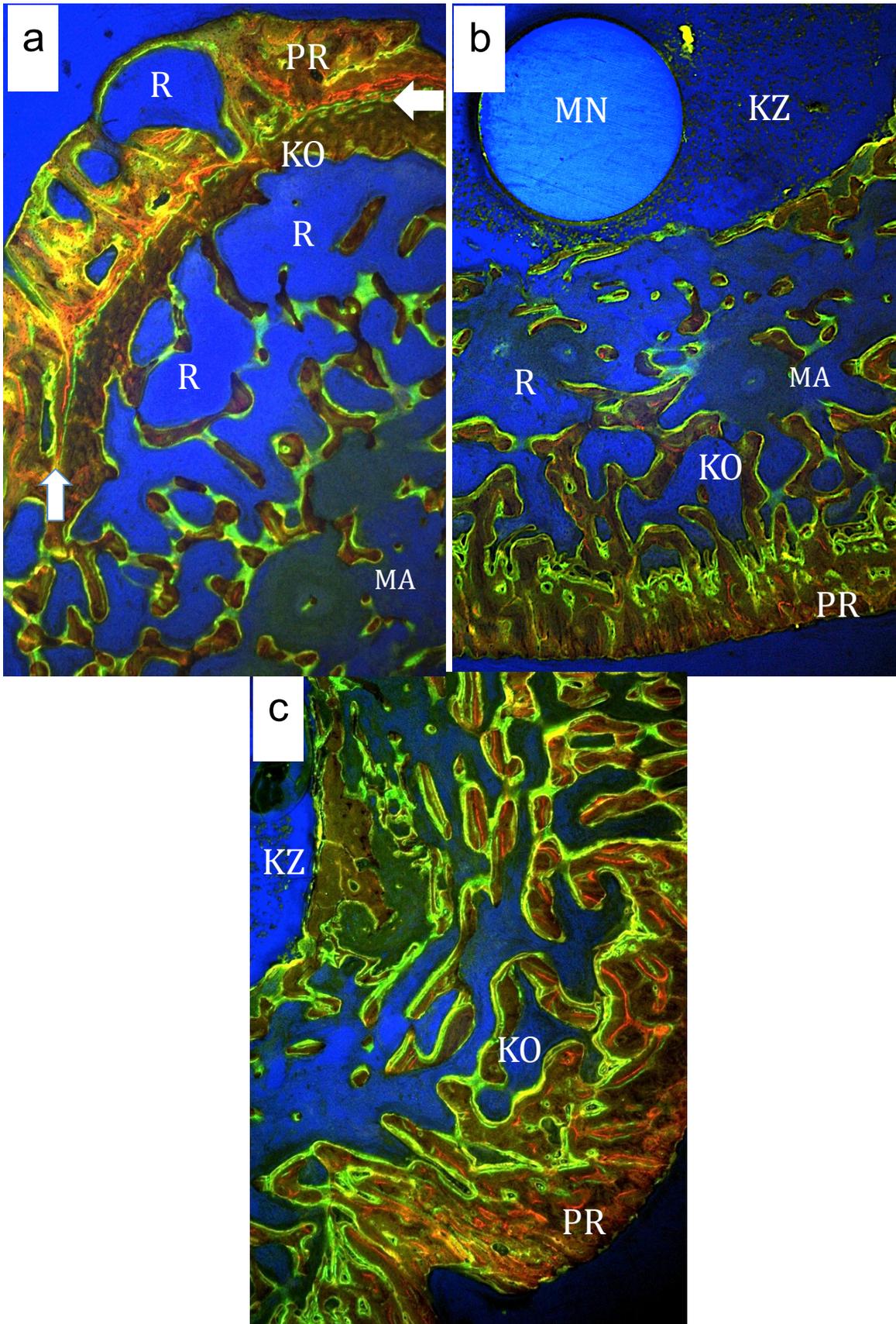


Abbildung 3.35, a-c: Eine deutliche Kortikalis-Aussengrenze ist nur stellenweise erhalten (siehe Pfeile in a), und die Kortikalis ist in der ganzen Zirkumferenz durch Resorptionshöhlen (R) hochgradig aufgelockert. Die bei der Mikroradiographie besonders deutlich erkennbare Knochenverdichtung der

gesamten Oberfläche entspricht weitgehend einer Periostreaktion (PR), die alle 3 Fluorochrommarkierungen (grün-rot-grün) der Behandlungsphase aufweist. Auch in der Periostreaktion sind Resorptionshöhlen zu sehen (a). Wie die abgeschnittenen roten Fluorochrommarkierungen im Kortikalisbereich zeigen (c), war es offensichtlich auch in der Behandlungsphase zum Knochenumbau und Anbau gekommen, der aber dann wegen der weiterbestehenden akuten Knochenmarksentzündung besonders in der Umgebung von Mikroabszessen (MA) wieder resorbiert wurde. Bei Versuchsende zeigen aber die meisten Knochenoberflächen die grüne Abschlußmarkierung. Marknagel (MN), Knochenzement (KZ).

## 4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Eine ausführliche Sichtung der pathophysiologischen Grundlagen für die Entstehung und das weitere Schicksal der Knochenveränderungen bei Osteomyelitis und Osteitis an klinischem, experimentellem und paläopathologischem Skelettmaterial hat gezeigt, dass die Beurteilungskriterien an konventionellen Röntgenbildern und anderen bildgebenden Verfahren weitgehend übereinstimmen. Im Rahmen dieser Studie wurde durch die Verwendung von computerunterstützten radiomorphometrischen Messungen eine Verbesserung der bisher ausschließlich subjektiven Beurteilungen der radiologischen Knochenveränderungen bei der Osteomyelitis geprüft, und eine neuentwickelte radiodensitometrische Quantifizierung von Röntgendichteveränderungen erprobt.

Das konventionelle Projektions-Röntgenbild spielt bei der Diagnostik der Osteomyelitis noch immer eine große Rolle. [Braunschweig et al. (2011)] Die Einschätzung struktureller Veränderungen an Röntgenbildern ist bei der Osteomyelitis durch ein „buntes Bild“ charakterisiert. [Schmidt et al. (2011)] Charakteristisch bei der Osteomyelitis ist das gleichzeitige Auftreten von ossärer Destruktion bzw Osteolysen, d.h. Röntgerndichteverlusten, und von Sklerosierungen, d.h. Röntgenverdichtungen. Der betroffene Knochen kann durch periostale Knochenreaktionen aufgetrieben und verdichtet bzw. deformiert sein. Für die Beurteilung von osteomyelitischen Veränderungen ist immer eine langjährige Erfahrung erforderlich [Schmidt et al. (2011)], welche dann aber auch trotz stets besser werdenden bildgebenden Methoden [Braunschweig et al. (2011)] nur auf subjektiven Einschätzungen beruht.

Als wichtigste Parameter für die Beurteilung der Osteomyelitis werden die periostale Auflagerung durch Knochenneubildung und die gleichzeitige Verbreiterung und Deformation des Knochenschaftes angesehen. [Smeltzer et al. (1997); Mayerhöfer 2012)]

Da bis jetzt noch keine computerunterstützte Methode zur Quantifizierung und Vermessung dieser Knochenveränderungen bei der Osteomyelitis angewendet worden war, wurden am Beginn der Studie zunächst 2 verschiedene morphometrische Zugänge gewählt.

Unter der Annahme, dass sich während der obengenannten osteomyelitischen Knochenumbauprozesse die diaphysäre Schaftfläche eines Röhrenknochens vergrößert, wurden zunächst die Flächen innerhalb der definierten AOI zu den 4 verschiedenen Zeitpunkten der radiologischen Kontrollen gemessen. Mit dieser Methode zeigte sich

ein genereller Trend der Schaftflächen-Zunahme in den Gruppen A, B, und C über den gesamten Beobachtungszeitraum, nur in der Gruppe D wurde dann in der Behandlungsphase eine mittlere Abnahme der Tibia-Schaftfläche gemessen. Die Knochendichte des Tibiaschaftes ist radiologisch eindeutig vom Weichteilhintergrund abzugrenzen, allerdings ist dieser „Flächenwert“ durch die sehr unterschiedliche Projektion der seitlichen Röntgenbild-Aufnahmen beeinträchtigt, da die unteren Extremitäten der Tiere offensichtlich in verschiedenen Positionen geröntgt worden sind. Diese Methode kann man daher durchaus für die Quantifizierung von Zu- und Abnahmen von Knochenflächen einsetzen, jedoch muss darauf geachtet werden dass die Röntgenbilder nach den gleichen Standards aufgenommen werden. Wie beim radiologischen Scoring ist eine kontinuierliche Zunahme der Schaftflächen nur ein Hinweis auf das Fortschreiten der Knochenneubildungen von der Infektions- in die Behandlungsphase dieser experimentellen Studie, kann aber das Auftreten und eventuelle Unterschiede von Therapieerfolgen nicht differenzieren.

Nachdem sich herausstellte, dass die Methode der Flächenvermessung in der AOI für das vorliegende Studienmaterial nicht genügend genau erschien, wurde versucht, mit der metrischen Erfassung des Schaftdurchmessers genauere Resultate zu erzielen. Die Messungen wurden an proximalen und distalen Querschnittebenen durchgeführt, die den Ebenen der Querschleifpräparate für die pathohistomorphologischen Untersuchungen entsprachen. Mit dieser Methode konnten metrische Resultate vom Beginn der Infektionsphase bis zum Ende der Behandlungsphase erzielt werden, welche mit den beiden Scores für Schaftverbreiterung und Periostreaktion übereinstimmten, die bei der radiologischen Beurteilung der Osteomyelitis verwendet worden waren. Zum Beispiel zeigte sich mit beiden Methoden, dass im Gegensatz zur Gruppe B und den anderen Gruppen bei der Gruppe A in der Infektionsphase nur geringfügige radiologische Veränderungen stattgefunden hatten, d.h. bei Gruppe A die Knochenmarksinfektion anscheinend nicht so erfolgreich gewesen war. Die signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen A und B in den radio-morphometrischen Messergebnissen stimmten auch mit den Ergebnissen der Leukozyten-Zählung als klinischer Indikator für die Osteomyelitis überein. Insgesamt konnten signifikante Korrelationen zwischen den zwei Methoden bei den Messungen am Ende der Infektion, am Beginn und am Ende der Behandlung errechnet werden, womit sich die radio-morphometrische Messung von Schaftdurchmessern als valide Alternativmethode oder Ergänzung zur radiologischen

Einschätzung des Verlaufes der Osteomyelitis erwiesen hat. Die weiteren radiologischen Scores für Osteolyse und Osteosklerose in diesem Scoring-System erfordern jedoch zusätzlich eine Erfassung der Röntgendichte-Veränderungen in der AOI, wie sie dann im Rahmen dieser Studie versucht und erprobt worden ist.

Die radiodensitometrische Analyse von Röntgenaufnahmen anhand der verschiedenen Röntgendichten bzw. Graustufen am Röntgenbild ist an sich ein in der Knochenforschung etabliertes Verfahren, z.B. bei Äquidensitenbildern von Knochenquerschnitten, siehe Tillmann (1987), oder Mikroröntgenaufnahmen von unentkalkten Dünnschliffpräparaten, siehe Plenk (1989), die beide nach Kalibrierung der Röntgendichtebereiche an standardisierten Röntgenbildern durchgeführt werden. In der klinischen Diagnostik wird z.B. das DEXA-(= Dual Energy X-ray Analysis) Verfahren zur Bestimmung der Knochenmineraldichte eingesetzt, bei dem die beiden Röntgenstrahlqualitäten zur Erkennen und Subtraktion des Weichteilhintergrundes verwendet werden. Bei standardisierten analogen oder digitalen Röntgenaufnahme kann man ein Grauwert- oder Helligkeits-Histogramm als Grundlage für die Unterscheidung des Weichteilmantels und der Knochengewebetypen von metallischen Implantaten verwenden und so Knochenveränderungen und Heilungsvorgänge quantifizieren. [Schönberger et al. (2010)]

Die Hauptaufgabe dieser Diplomarbeit war, auch in Anlehnung an die obengenannte Studie, eine eigene Methode zu erproben, anhand welcher man durch Erfassung der verschiedenen Röntgendichten die osteomyelitischen Knochenveränderungen im Rahmen der Infektions- und Behandlungsphase in der vorliegenden Studie adäquat computerunterstützt erkennen und vermessen könnte. Am Histogramm der AOI in den digitalisierten Röntgenbildern wurden die Knochenstrukturen in den verschiedenen Regionen korrespondierend zu den histomorphologischen Bildern der Tibiaquerschnitte Graustufenbereichen zugeordnet. So konnte man in den meisten Fällen deutlich zwischen periostalen und intramedullären Knochenneubildungen, den Regionen mit Kortikalisdichte und dem Antibiotikum-Trägermaterial im Markraum unterscheiden. Die an sich standardisiert angefertigten Röntgenbilder, die für diese Diplomarbeit zur Verfügung standen, waren jedoch in Belichtung und Bildkontrast sehr unterschiedlich, daher musste man diese digitalisierten Bilder im Photoshop CS5 zuerst subjektiv angleichen, um eine vergleichbare Auswertung machen zu können. Wie man an einzelnen Abbildungen im Text und im Anhang dieser Studie erkennen kann, kam es

nach den verschiedenen Bildbearbeitungsschritten auch zu einem Verlust von Knochenstrukturen im Röntgenbild. Eine objektivere und reproduzierbare Methode zum Angleichen von qualitativ unterschiedlichen Röntgenbildserien steht noch aus, wäre aber nicht nur für diese Studiauswertung, sondern auch eine breitere Anwendung der computerunterstützten Radiodensitometrie an bereits vorliegenden Röntgenbildern unterschiedlicher Qualität sehr wünschenswert. Auch bei dieser radiodensitometrischen Auswertung stellte der Projektionswinkel des Unterschenkelknochens ein Problem dar. Zunächst konnten nur die seitlichen Aufnahmen im medio-lateralen Strahlengang verwendet werden, weil im antero-posterioren Strahlengang der Unterschenkel der Tiere unterschiedlich lang projiziert worden war, und so keine vergleichbare Berechnung der Flächenprozentanteile in der AOI erlaubten. Andererseits stellte die Überprojektion der Fibula im posterioren Teil ein zusätzliches Problem bei den verwendeten medio-lateralen (seitlichen) Röntgenaufnahmen dar. Allerdings waren in manchen Fällen die Beine des Tieres auch wieder so verdreht gelegen, dass der anteriore Teil der Tibia fast gar nicht sichtbar war. Daher sind aus obigen Gründen die radiodensitometrischen Messungen nur in der anterioren Hälfte der Tibia gemacht worden.

Für eine Überprüfung der Ergebnisse der radiodensitometrischen Messungen einerseits, und für eine Zuordnung zu den Behandlungsvarianten andererseits wurden die eigenen pathohistologischen Befunde von allen Tieren dieser experimentellen Studie herangezogen, sowie ausgewählte histomorphometrische Analysen von Querschnitten des Tibiaschaftes von Tieren aus den 4 Versuchsgruppen. Die radiodensitometrischen Befunde stimmten größtenteils mit der pathohistologischen Beurteilung überein. Zum Beispiel zeigte sich eine radiologische Verringerung der kortikalen Knochendichte auch am histologischen Querschnittsbild und bei der korrespondierenden histometrischen Analyse (siehe Abb.3.28 bis 3.31). Die derzeit nur stichprobenartig durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Auswertung der polyfluorochromen Sequenzmarkierung zeigte (siehe Abb.3.32 bis 3.35), dass Umbauvorgänge und Spongiosierung der Kortikalis auch noch in der Behandlungsphase weitergehen, vor allem wenn im Markraum noch akute Entzündungszeichen wie Mikroabszesse zu erkennen sind. Die Periostreaktionen hatten offensichtlich schon während der Infektionsphase begonnen, da die senkrecht zur Oberfläche entstandenen Geflechtknochenbälkchen meist noch keine Fluorochrommarkierung aufwiesen. In der Behandlungsphase kam es aber dann mit entsprechenden Fluorochrommarkierungen zu einer sogenannten lamellären

Kompaktierung dieser periostalen Knochenreaktionen, die sich histologisch und histometrisch durch einen verdichteten Ring aus neugebildetem Knochengewebe darstellt. Zusammen mit Anbauvorgängen in der Kortikalis, und Knochenneubildungen im Markraum (=Spätphase der chronischen Entzündung) ergaben sich daraus bei jeweils einzelnen Fällen in den Gruppen dieser Studie auch radiodensitometrisch erfassbare Zeichen einer Heilung und Reparatur der osteomyelitischen Knochenveränderungen. Das Antibiotikum-Trägermaterial Bankknochen ist im Gegensatz zum Knochenzement abbaubar, und eine entsprechende Verminderung während der Behandlungsphase war auch radiodensitometrisch nachweisbar. Nach der vollständigen histomorphologischen und histometrischen Auswertung dieser Studie ist für entsprechende Publikationen in Fachjournalen eine ausführliche Prüfung der Korrelationen mit den radiomorphometrischen und radiodensitometrischen Daten geplant, um diese neuen Methoden weiter zu validieren, bevor eine Anwendung empfohlen werden kann.

## 5. Literaturverzeichnis

Adler C. P. (2005): Knochenentzündung. In: Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, S.131-141

Baltensperger M. M., Eyrich G. K. (2009): History. In: Osteomyelitis of the Jaws. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, S. 6-7

Bohndorf K., Imhof H., Fischer W. (2006): Knochen und Weichteilentzündungen. In: Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 144-160

Braunschweig R., Bergert H., Kluge, R., Tiemann A.H. (2011): Bildgebende Diagnostik bei Osteitis/Osteomyelitis und Gelenkinfekten. Z Orthop Unfall 149(4): 436-448

Burgener F. A., Meyers S. P., Tan R. K., Zaunbauer W. (2002): Bewegungsapparat: Lokalisierte Knochen- und Knochenmarkerkrankungen. In: Differentialdiagnose in der MRT. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S.446

Buttaro M. A., González Della Valle A. M., Piñeiro. L., Mocetti E., Morandi A. A, Piccaluga F. (2003): Incorporation of vancomycin-supplemented allografts: a radiographical, histopathological and immunohistochemical study in pigs. Acta Orthop Scand. 74 (5): 505-13

Büll U., Bares R., Reinartz P. (2007): Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie. In: Praxis der konservativen Orthopädie. Bischoff H. P., Heisel J., Locher H. (Hrsg), Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 61- 63

Debrunner, A. M. (1985): Orthopädie, Die Störungen des Bewegungsapparates in Klinik und Praxis. Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Toronto; S. 213

Dietz H. G., Bachmeyr A., Joppich I. (2004): Osteomyelitis im Kindesalter. *Der Orthopäde* 33 :287-296

Döbele S., Kouvelas G., Bogner J. (2011): Infektionserkrankungen. In: *Innere Medizin für Zahnmediziner: Mit Beiträgen zur Neurologie und Psychiatrie*. Wagner J., Fischereder M. (Hrsg.), 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 317

Flückiger U. und Zimmerli W. (2001): Osteomyelitis. *Schweiz Med Forum* 6 (7):.133-137

Freyschmidt J. (2003): Einführung in die Osteoradiologie. In: *Skeletterkrankungen: Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose*. 3.Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York; S. 16-18

Gogia S. J., Meehan J., Di Cesare P. E., Jamali A. A. (2009): Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis. *Semin Plast Surg.* 23 (2): 100–107

Harder L. und Kuster M. (2011): Frakturen, Gelenk- und Weichteilverletzungen. In: *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Grifka J. und Kuster M. (Hrsg.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New York; S. 370- 372

Hardt N. (1991): Osteomyelitis: scintigraphy. Bone scintigraphic studies in osteomyelitis of the jaws. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 101(3):318-27

Hofmann S., Kramer J. (2001): MRT der Hüfte. In: *Fortbildung Orthopädie 5: Magnet-Resonanz-Tomographie*. Imhoff A. B. (Hrsg.), 5. Band, Steinkopff Verlag, Darmstadt; S. 45-55

Jundt G. (2004): Knochen. In: *Pathologie*. Böcker W., Denk H, Heitz U. Ph. (Hrsg.) 3.Auflage, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München-Jena; S. 1036-1038,

Kaudela K., Burner U., Bonfert C., Plenck H., Winkler H., (2010): Treatment of extensive osteitis with antibiotic impregnated human bone graft versus antibiotic cement in a one stage revision procedure in an animal model. Abstract FR.03 Session 12, 19th

International Congress of the European Association of Tissue Banks (EATB), Berlin, 3.-5. November 2010

Kreitner K. F. (2006): Knochen, Gelenke und Weichteile. In: Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Intervention. Bücheler E., Lackner K. J., Thelen M. (Hrsg.), 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York; S. 161-163

Krenn V., Tiemann H.A. (2012): Infektiöse Erkrankungen des Bewegungsapparates. In: Pathologie des Bewegungsapparates. Rüter W. (Hrsg), 2. Auflage, Verlag De Gruyter, Berlin; S. 139-153

Kujundzic M., Kaudela K., Burner U., Winkler H., Plenk H. Jr. (2011): Radiograph Morphometry of Experimental Osteitis in Rabbits treated with Antibiotics-combined Human Bank Bone or Bone Cement. Abstract. European Cells and Materials Vol. 21, Suppl. 2: 61

Lang S. (1996): Osteomyelitis. Ein pathomorphologischer Überblick. Der Radiologe 36: 781-785

Lew P. D., Waldvogel A. F. (2004): Osteomyelitis. Lancet Vol. 364: 369-79

Mayerhöfer M. E. (2012): Unabhängige Beurteilung der osteomyelitischen Knochenveränderungen der vorliegenden experimentellen Studie (persönl. Mitteilung).

Niethard F. U., Pfeil J., Biberthaler P. (2009): Infektionen von Knochen und Gelenken. In: Orthopädie und Unfallchirurgie. 6. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 233-238

Ortner D. J. (2003): Infectious Diseases: Introduction, Biology, Osteomyelitis, Periostitis, Brucellosis, Glanders and Septic Arthritis. In: Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. Academic Press, Elsevier (Amsterdam-Boston-New York); S. 181-206

Ortner D. J., Putschar W. G. (1981): Identification of pathological conditions in human skeletal remains. Smithsonian Institution Libraries, Washington, DC; S. 105-129

Otto M. (2008): Klassifikation bei Protheseninsuffizienz und Partikelbestimmung. Pathologie 2008 [Suppl 2] 29:[afp]–[alp], DOI 10.1007/s00292-008-1070-7, Springer Medizin Verlag Berlin-Heidelberg; S. 232-239

Peltier L. F. (1993): Osteomyelitis. In: Orthopedics: A History and Iconography. Norman Publishing, San Francisco- California, USA; S. 101- 116

Pineda C., Espinosa R., Pena A. (2009): Radiographic Imaging in Osteomyelitis: The Role of Plain Radiography, Computed Tomography, Ultrasonography, Magnetic Resonance Imaging, and Scintigraphy. Semin Plast Surg. 23 (2): 80–89

Plenk H. Jr. (1989): Knochengewebe und Zähne. In: Romeis Mikroskopische Technik, Böck P. (Hrsg.), 17. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore; S. 527-566.

Sandison A.T., Tapp E. (1998): Disease in ancient Egypt. In: Mummies, Disease and Ancient Cultures. Cockburn A., Cockburn E., Reyman A. T. (Hrsg), 2. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge; S. 46-49

Schmidt H. G. K., Tiemann A. H., Braunschweig R., Diefenbeck M., Bühler M, Abitzsch D., Haustedt N., Walter G., Schoop R., Heppert V., Hofmann G. O., Glombitza M., Grimme C, Gerlach U.-J., Flesch I., Vorsitzender Arbeitsgemeinschaft septische Chirurgie der DGOUC (2011): Zur Definition der Diagnose Osteomyelitis – Osteomyelitis-Diagnose-Score (ODS). Z Orthop Unfall 2011, 149(4): 449-460

Schönberger T., Kasten P., Fechner K., Südkamp N. P, Pearce S., Niemeyer P. (2010): Eine neue objektivierte und validierte Methode zur Quantifizierung der Knochen-neubildung in Tiermodellen auf Basis eines frei verfügbaren Bildbearbeitungsprogramms. Z Orthop Unfall 2010; 148 (1): 19–25

Schwameis E., Abdolvahab F., Wurnig C. (1996): Osteomyelitis. Clinical aspects, diagnosis and therapy. *Der Radiologe*, Vol.36 (10): 823-833

Smeltzer S. M., Roby J.T., Hickmon S.G., Skinner R.A., Nelson L.C., Griffith D., Parr, Jr. R.T., Evans R. (1997): Characterization of a Rabbit Model of Staphylococcal Osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research* 15: 414-421

Stähler A. (2012): Systemerkrankungen mit Beteiligung des Fußes. In: *Bildgebende Diagnostik des Fußes*. Stähler A., Walther M., Szeimies U. (Hrsg.), 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 259- 265

Stille W., Brodt H. R., Groll A. H., Just-Nübling G. (2005): Infektionen der Knochen und Muskeln. In: *Antibiotika Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. 11. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart; S. 569-575

Tillmann B. (1987): Skelettsystem. In: Rauber/Kopsch, *Anatomie des Menschen*, Leonhardt H., Tillmann B., Töndury G., Zilles K. (Hrsg.), Band 1: Bewegungsapparat. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York; S. 51-127

Treich J., Langer M. (1992): Bewegungsapparat, Skelett, Gelenke, radiologische Verfahren in der Orthopädie und Unfallheilkunde. In: *Klinische Radiologie mit Repetitorium*. Felix R. und Langer R., (Hrsg.) Verlag De Gruyter. Berlin; S. 263-266

Walter G., Kemmerer M., Kappler C., Hoffmann R. (2012): Treatment Algorithms for Chronic Osteomyelitis. *Dtsch.Ärztebl.Int* 109 (14): 257-64; DOI: 10.3238/arztebl.2012.0257

Weber U., Stein S. (2004): Infektionen von Knochen und Gelenken. In: *Infektionskrankheiten*. Suttorp N, Mielke M., Keihl W., Stück B. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart; S. 432- 436

Weissleder R., Rieumont M. J., Wittenberg J. (2003): Nuklearmedizin. In: Kompendium der bildgebenden Diagnostik. Springer Verlag, Wien-New York; S.723- 724

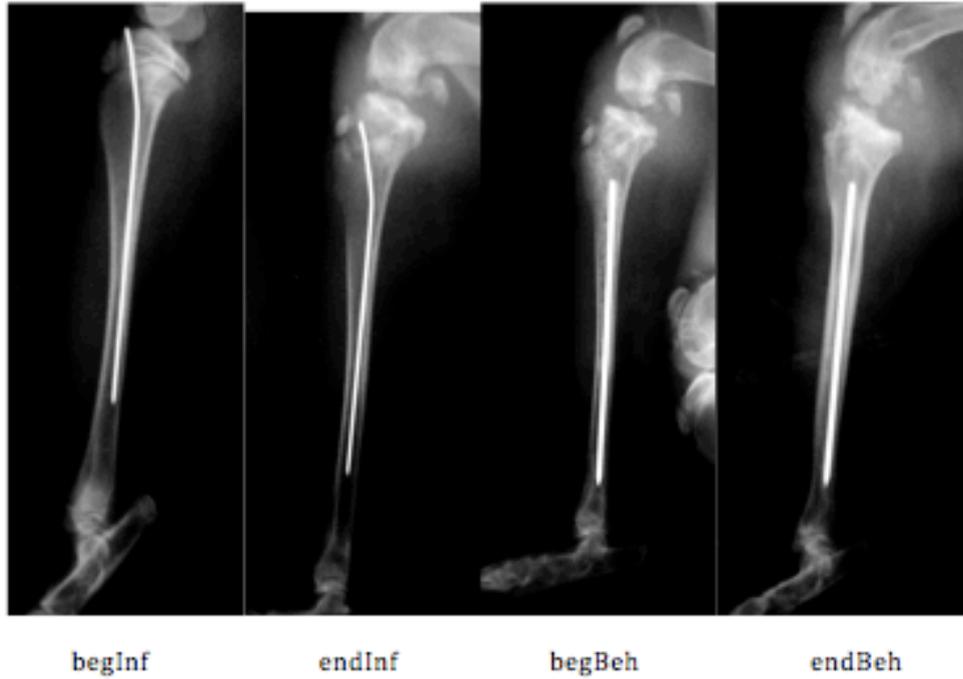
Winkler H., Janata O., Berger C., Wein W., Georgopoulos A. (2000): *In vitro* release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. J. Antimicrob. Chemother. 46 (3): 423-428.

Witsø E., Persen L., Benum P., Bergh K. (2005): Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. Acta Orthopaedica Scand. 76 (4): 481–486

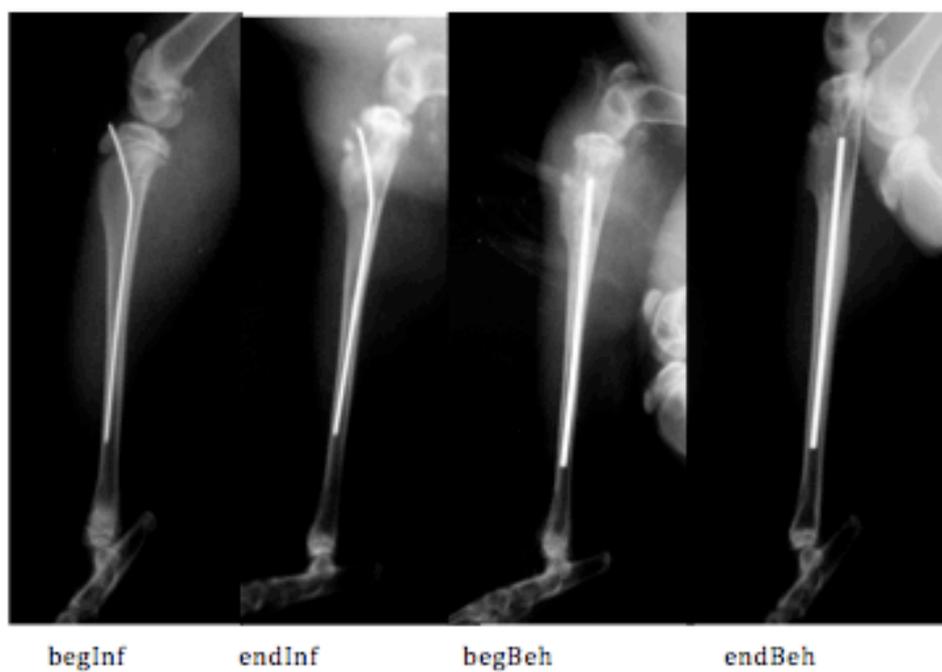
## 6. Anhang

### 6.1 Anhang 1: Fotodokumentation der verwendeten konventionellen Röntgenbilderserien

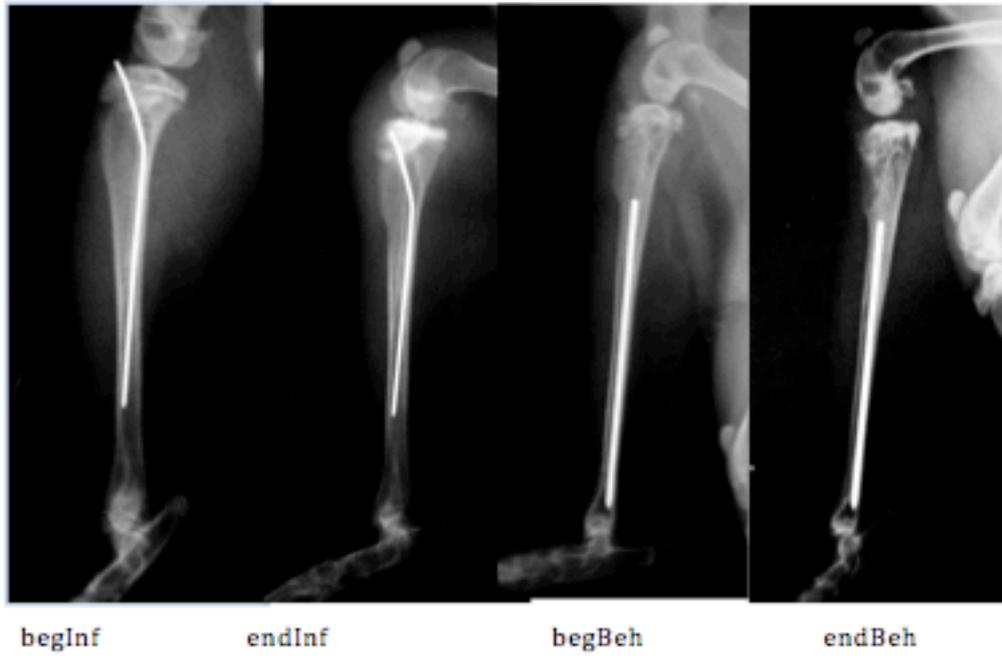
A1



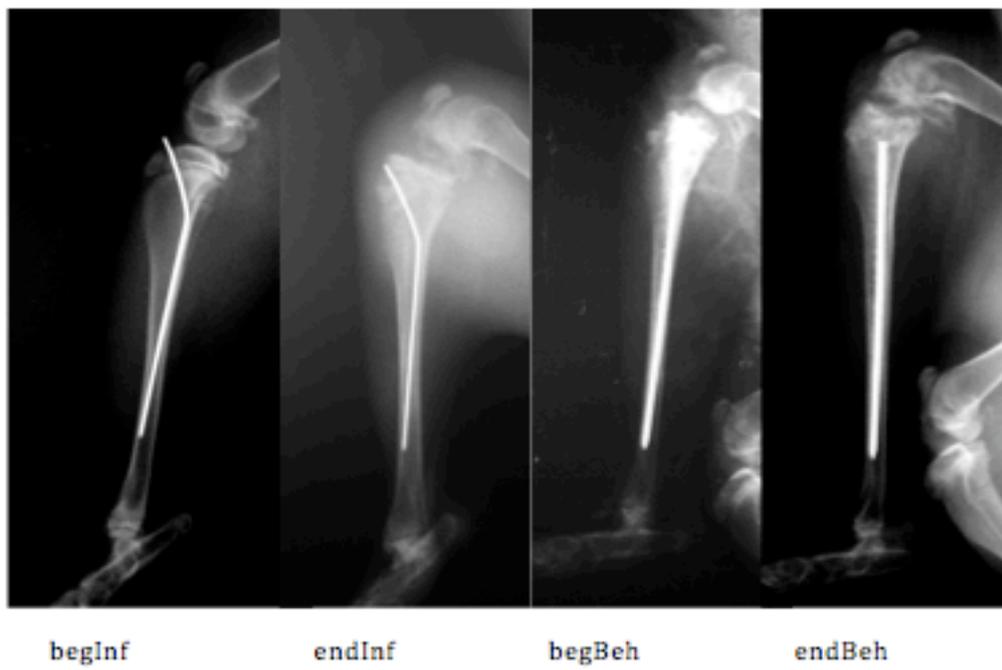
A2



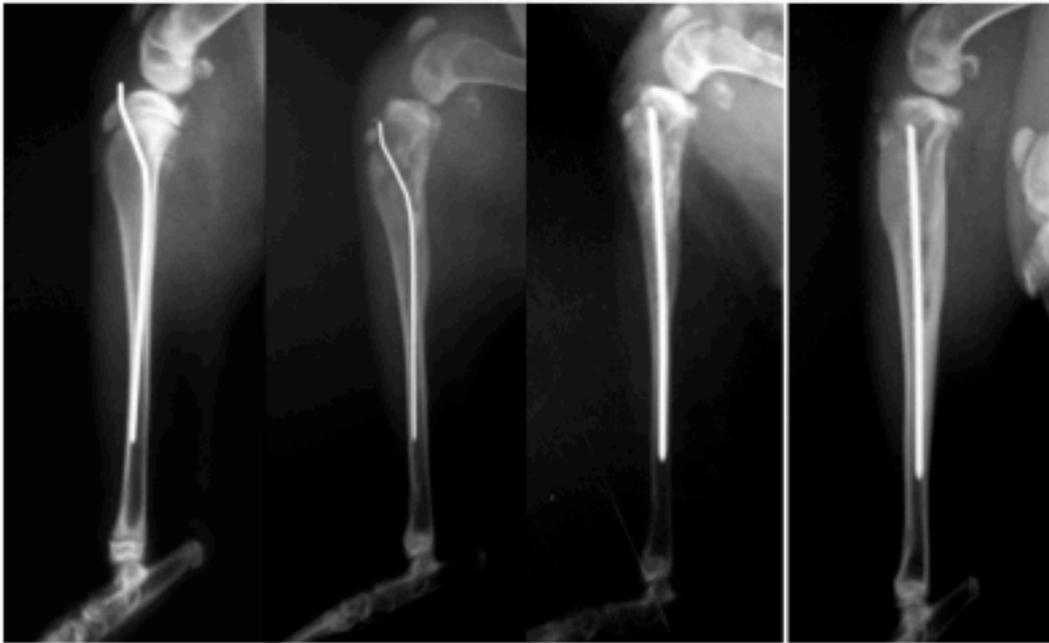
A3



A4



A5



begInf

endInf

begBeh

endBeh

A6



endInf

begBeh

endBeh

begInf

A7



begInf

endInf

begBeh

endBeh

A8



begInf

endInf

begBeh

endBeh

B11



begInf

endInf

begBeh

endBeh

B12



begInf

endInf

begBeh

endBeh

B13



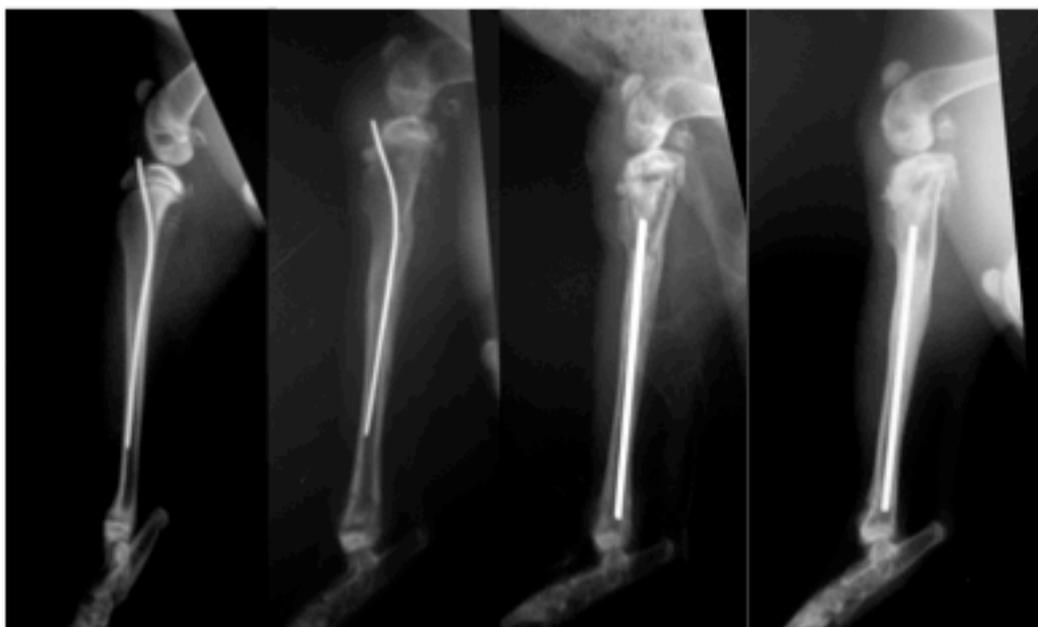
begInf

endInf

begBeh

endBeh

B15



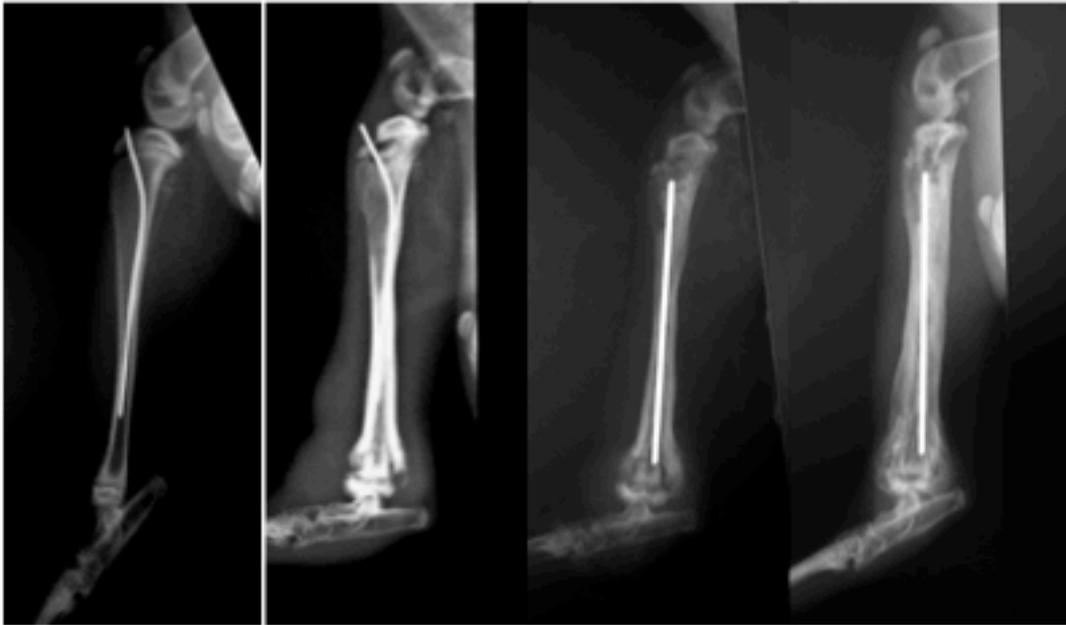
begInf

endInf

begBeh

endBeh

B16



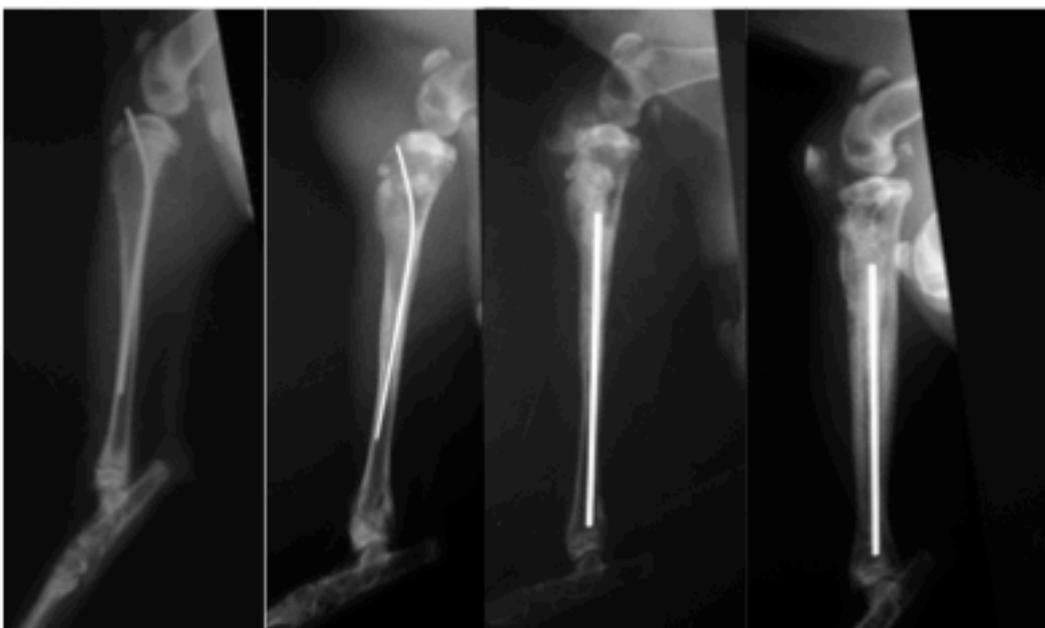
begInf

endInf

begBeh

endBeh

B17



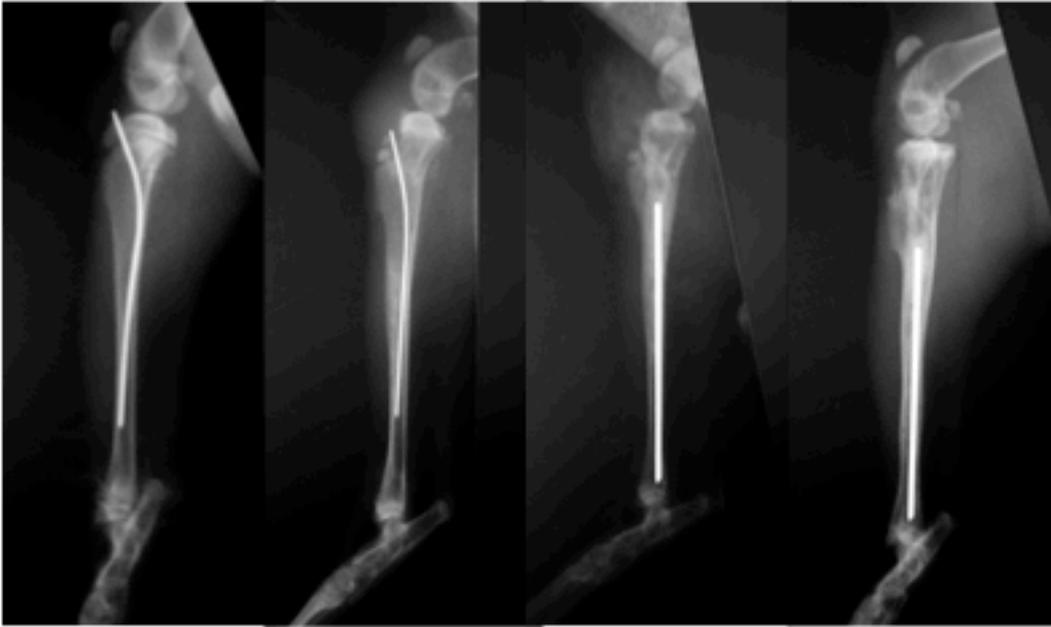
begInf

endInf

begBeh

endBeh

B18



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C21



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C22



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C23



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C 24



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C25



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C 26



begInf

endInf

begBeh

endBeh

C27



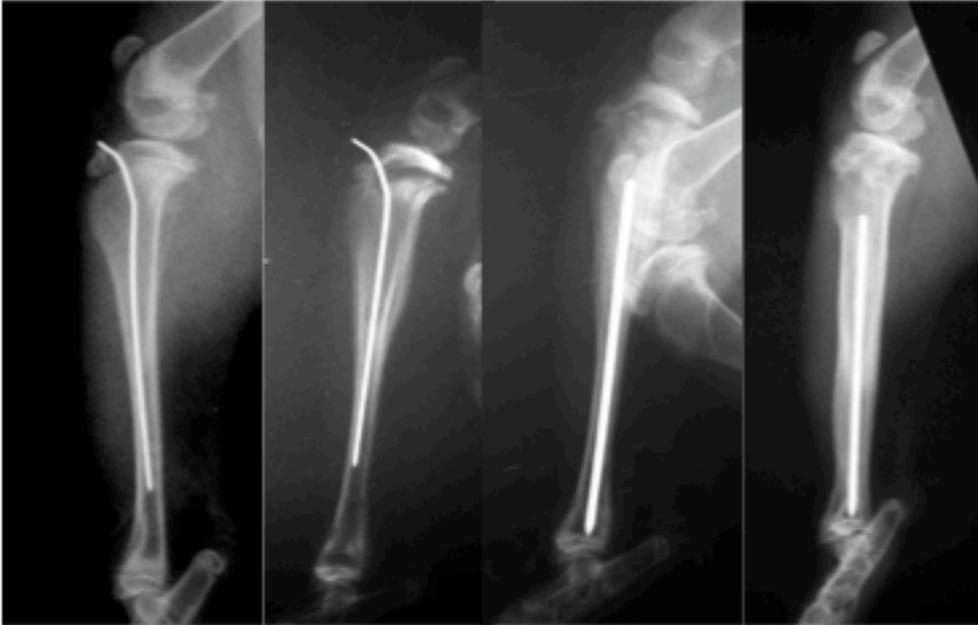
begInf

endInf

begBeh

endBeh

C28



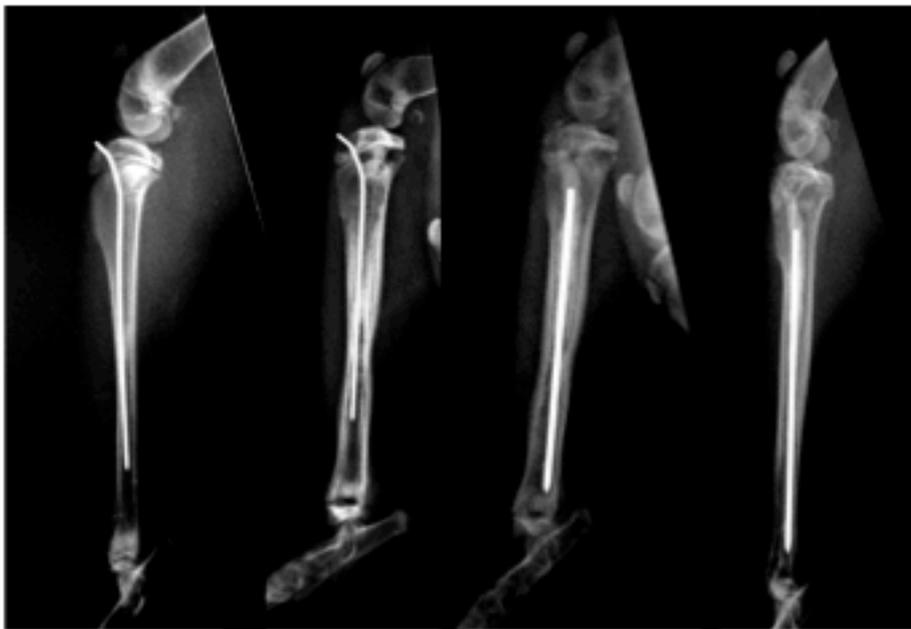
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D31



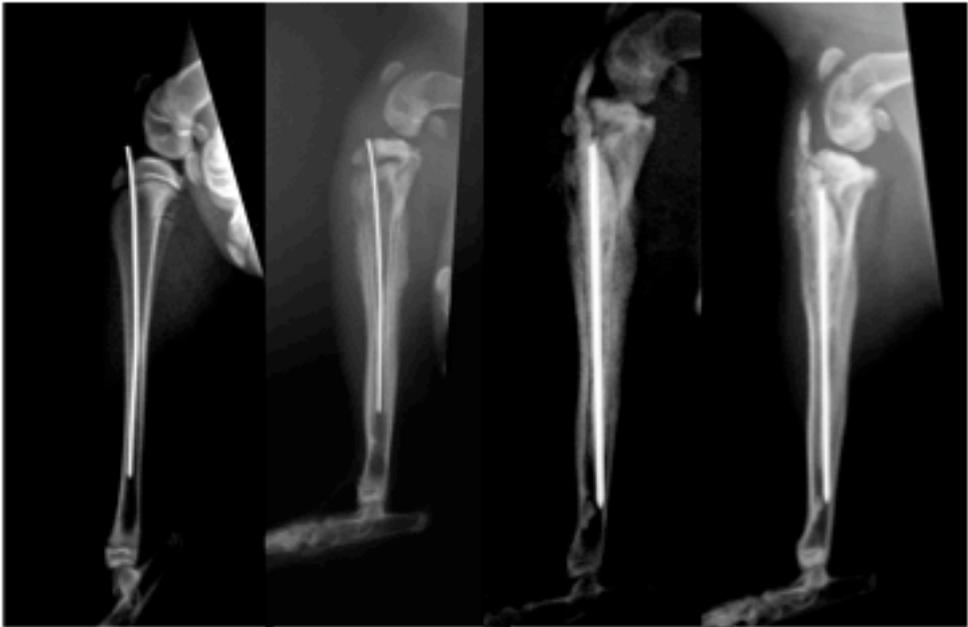
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D32



begInf

endInf

begBeh

endBeh

D33



begInf

endInf

begBeh

endBeh

D34



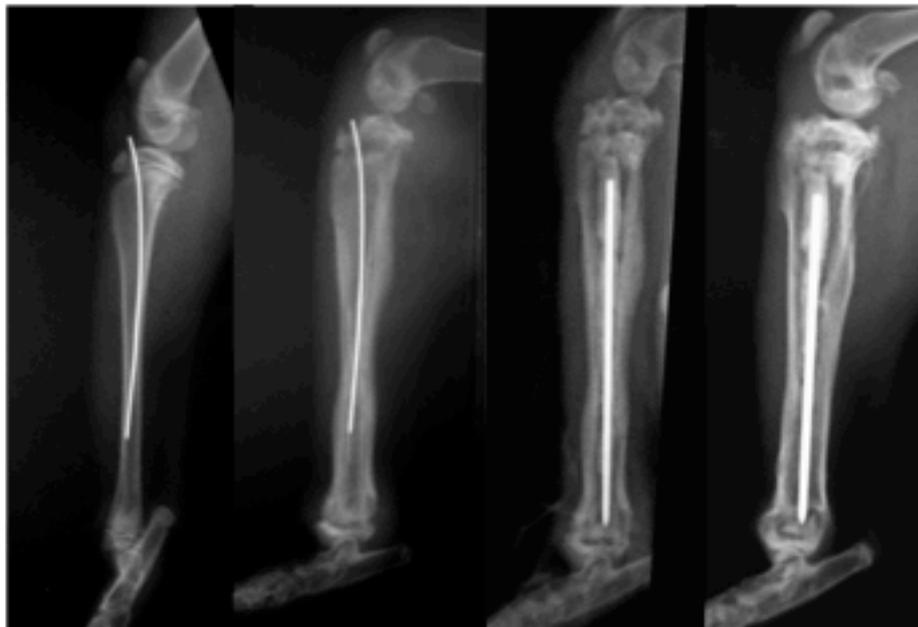
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D 35



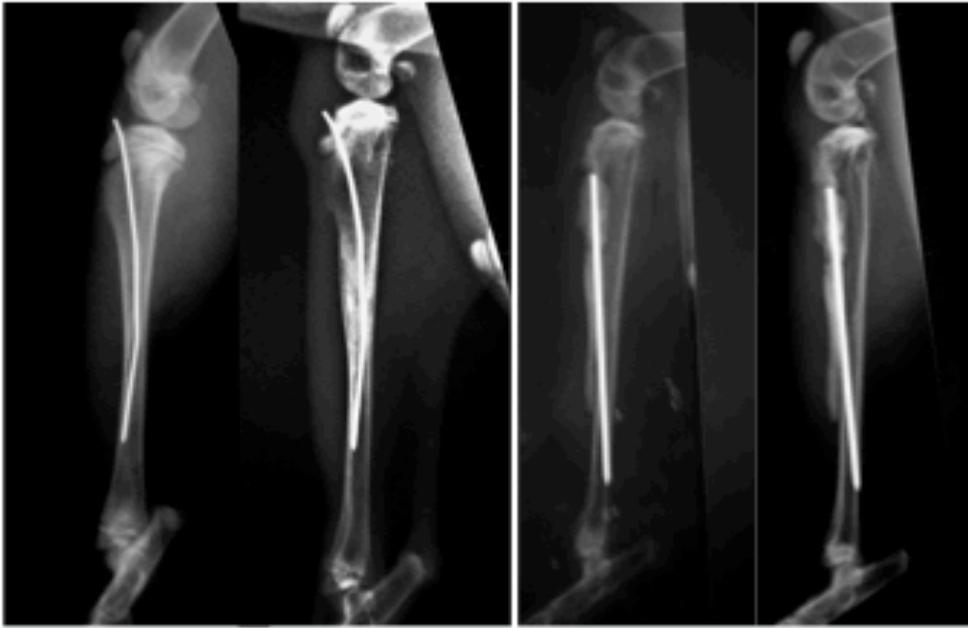
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D36



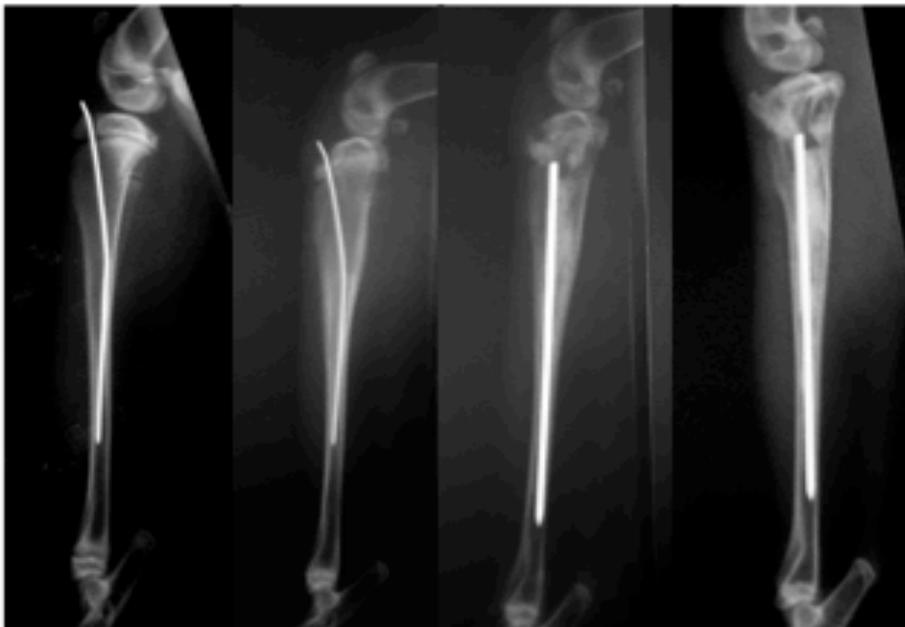
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D37



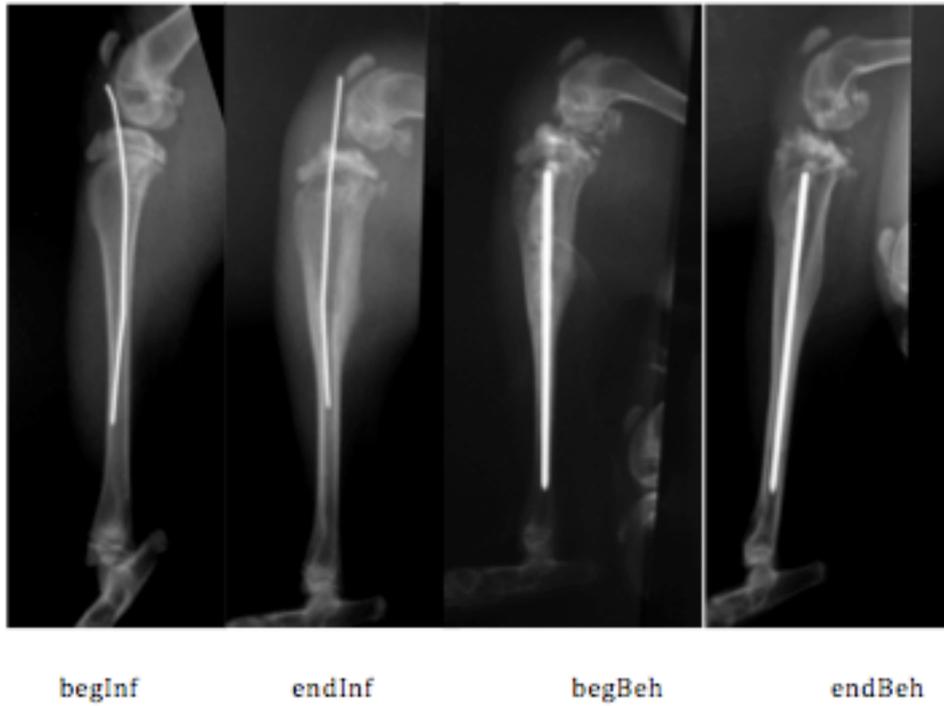
begInf

endInf

begBeh

endBeh

D38



## 6.2. Anhang 2: Tabellen der radio-densitometrisch berechneten Flächenanteile in der AOI

### Gruppe A

Tier	50-100	100-150	150-200	BB/BC	Gesamtfläche
A1					
begInf	17678	8497	2039	0	28214
	63%	30%	7%	0%	100%
endInf	22836	4580	1193	0	28609
	80%	16%	4%	0%	100%
begBeh	4161	9770	0	667	14598
	29%	67%	0%	5%	100%
endBeh	1496	13088	1449	0	16033
	9%	82%	9%	0%	100%

A2					
begInf	8653	9480	533	0	18666
	46%	51%	3%	0%	100%
endInf	5306	15223	722	0	21251
	25%	72%	3%	0%	100%
begBeh	3014	8303	0	1134	12451
	24%	67%	0%	9%	100%
endBeh	3802	8188	0	3569	15559
	24%	53%	0%	23%	100%
A3					
begInf	15255	13691	1461	0	30407
	50%	45%	5%	0%	100%
endInf	2940	14204	2743	0	19887
	15%	71%	14%	0%	100%
begBeh	5721	5273	287	2943	14224
	40%	37%	2%	21%	100%
endBeh	4217	3203	136	2233	9789
	43%	33%	1%	23%	100%
A4					
begInf	9566	11501	1401	0	22468
	43%	51%	6%	0%	100%
endInf	3786	10396	889	0	15071
	25%	69%	6%	0%	100%
begBeh	5896	5896	0	1787	13579
	43%	43%	0%	13%	100%
endBeh	9600	3643	0	2067	15310
	63%	24%	0%	14%	100%
A5					
begInf	6086	17143	1720	0	24949
	24%	69%	7%	0%	100%
endInf	7894	6363	2597	0	16854
	47%	38%	15%	0%	100%
begBeh	10551	6052	0	534	17137
	62%	35%	0%	3%	100%
endBeh	6155	11633	1181	0	18969
	32%	61%	6%	0%	100%
A6					
begInf	19096	6897	2062	0	28055
	68%	25%	7%	0%	100%
endInf	15111	8770	345	0	24226
	62%	36%	1%	0%	100%
begBeh	6394	3466	570	1102	11532
	55%	30%	5%	10%	100%

endBeh	1991	2377	0	5556	9924
	20%	24%	0%	56%	100%
A7					
begInf	9406	10145	2298	0	21849
	43%	46%	11%	0%	100%
endInf	6701	19917	1319	0	27937
	24%	71%	5%	0%	100%
begBeh	7848	4668	0	1032	13548
	58%	34%	0%	8%	100%
endBeh	3244	5004	1279	0	9527
	34%	53%	13%	0%	100%
A8					
begInf	9246	9202	3163	0	21611
	43%	43%	15%	0%	100%
endInf	5844	10379	2074	0	18297
	32%	57%	11%	0%	100%
begBeh	2251	5738	2146	5092	15227
	15%	38%	14%	33%	100%
endBeh	2088	5701	421	5801	14011
	15%	41%	3%	41%	100%

## Gruppe B

Tier	50-100	100-150	150-200	BB/BC	Gesamt fläche
B11					
begInf	7813	7639	2023	0	17475
	45%	44%	12%	0%	100%
endInf	7935	8222	3252	0	19409
	41%	42%	17%	0%	100%
begBeh	8436	5105	0	3925	17466
	48%	29%	0%	22%	100%
endBeh	3950	7178	0	4398	15526
	25%	46%	0%	28%	100%
B12					
begInf	12178	8198	2337	0	22713
	54%	36%	10%	0%	100%
endInf	11345	13591	1463	0	26399
	43%	51%	6%	0%	100%
begBeh	6340	4617	0	5173	16130
	39%	29%	0%	32%	100%
endBeh	1959	5629	0	3365	10953
	18%	51%	0%	31%	100%

B13					
begInf	16904	6602	1684	0	25190
	67%	26%	7%	0%	100%
endInf	23161	5974	304	0	29439
	79%	20%	1%	0%	100%
begBeh	5957	3161	0	4023	13141
	45%	24%	0%	31%	100%
endBeh	2100	3628	1387	3018	10133
	21%	36%	14%	30%	100%
B15					
begInf	9707	8548	2262	0	20517
	47%	42%	11%	0%	100%
endInf	10888	11052	638	0	22578
	48%	49%	3%	0%	100%
begBeh	4393	2303	0	3082	9778
	45%	24%	0%	32%	100%
endBeh	2913	3450	0	3056	9419
	31%	37%	0%	32%	100%
B16					
begInf	15667	5037	1260	0	21964
	71%	23%	6%	0%	100%
endInf	11288	4849	1353	0	17490
	65%	28%	8%	0%	100%
begBeh	4627	2213	0	3534	10374
	45%	21%	0%	34%	100%
endBeh	5576	2735	0	4142	12453
	45%	22%	0%	33%	100%
B17					
begInf	5767	10805	2000	0	18572
	31%	58%	11%	0%	100%
endInf	3438	13785	2000	0	19223
	18%	72%	10%	0%	100%
begBeh	3929	7047	0	1840	12816
	31%	55%	0%	14%	100%
endBeh	3363	10848	71	2780	17062
	20%	64%	0%	16%	100%
B18					
begInf	11804	9718	1470	0	22992
	52%	42%	6%	0%	100%
endInf	10637	5685	1801	0	18123
	59%	31%	10%	0%	100%
begBeh	5936	4833	0	5048	15817
	38%	31%	0%	32%	100%

endBeh	3250	5060	0	3602	11912
	27%	42%	0%	30%	100%

### Gruppe C

Tier	50-100	100-150	150-200	BB/BC	Gesamtfläche
C21					
begInf	2482	9295	4971	0	16748
	15%	55%	30%	0%	100%
endInf	5657	11954	3827	0	21438
	26%	56%	18%	0%	100%
begBeh	9049	5820	3022	0	17891
	51%	33%	17%	0%	100%
endBeh	2117	6432	5052	0	13601
	16%	47%	37%	0%	100%
C22					
begInf	5674	4592	2519	0	12785
	44%	36%	20%	0%	100%
endInf	13937	5513	1563	0	21013
	66%	26%	7%	0%	100%
begBeh	3040	3465	0	3945	10450
	29%	33%	0%	38%	100%
endBeh	3162	4084	1936	1840	11022
	29%	37%	18%	17%	100%
C23					
begInf	6210	5366	2430	0	14006
	44%	38%	17%	0%	100%
endInf	8164	8391	3169	0	19724
	41%	43%	16%	0%	100%
begBeh	7741	2965	108	4693	15507
	50%	19%	1%	30%	100%
endBeh	9801	7491	1688	0	18980
	52%	39%	9%	0%	100%
C24					
begInf	4426	2882	2321	0	9629
	46%	30%	24%	0%	100%
endInf	9527	3050	4996	0	17573
	54%	17%	28%	0%	100%
begBeh	4278	4667	1286	1372	11603
	37%	40%	11%	12%	100%
endBeh	9330	7376	3319	0	20025
	47%	37%	17%	0%	100%

C25					
begInf	5506	4422	3821	0	13749
	40%	32%	28%	0%	100%
endInf	6801	5132	1718	0	13651
	50%	38%	13%	0%	100%
begBeh	6510	4538	0	2232	13280
	49%	34%	0%	17%	100%
endBeh	6901	4137	4002	4126	19166
	36%	22%	21%	22%	100%
C26					
begInf	4977	4587	2213	0	11777
	42%	39%	19%	0%	100%
endInf	8802	2882	3022	0	14706
	60%	20%	21%	0%	100%
begBeh	6708	7266	1210	4489	19673
	34%	37%	6%	23%	100%
endBeh	6702	7456	5495	0	19653
	34%	38%	28%	0%	100%
C27					
begInf	2795	5147	4411	0	12353
	23%	42%	36%	0%	100%
endInf	12134	4637	4914	0	21685
	56%	21%	23%	0%	100%
begBeh	4918	6314	0	6778	18010
	27%	35%	0%	38%	100%
endBeh	6198	6926	6557	2426	22107
	28%	31%	30%	11%	100%
C28					
begInf	7211	6308	2313	0	15832
	46%	40%	15%	0%	100%
endInf	6283	8394	5214	0	19891
	32%	42%	26%	0%	100%
begBeh	9558	6536	0	9300	25394
	38%	26%	0%	37%	100%
endBeh	1552	6634	5271	2545	16002
	10%	41%	33%	16%	100%

## Gruppe D

Tier	50-100	100-150	150-200	BB/BC	Gesamtfläche
D31					
begInf	3008	3033	3398	0	9439
	32%	32%	36%	0%	100%
endInf	5500	2618	4158	0	12276
	45%	21%	34%	0%	100%
begBeh	2907	5077	1805	3215	13004
	22%	39%	14%	25%	100%
endBeh	3244	7233	0	2867	13344
	24%	54%	0%	21%	100%
D32					
begInf	9575	3492	514	0	13581
	71%	26%	4%	0%	100%
endInf	1746	9696	5818	0	17260
	10%	56%	34%	0%	100%
begBeh	10683	7118	663	5318	23782
	45%	30%	3%	22%	100%
endBeh	5839	6301	1737	2094	15971
	37%	39%	11%	13%	100%
D33					
begInf	11869	9321	2550	0	23740
	50%	39%	11%	0%	100%
endInf	11016	10101	4831	0	25948
	42%	39%	19%	0%	100%
begBeh	7132	5490	2582	3733	18937
	38%	29%	14%	20%	100%
endBeh	4982	3099	239	2100	10420
	48%	30%	2%	20%	100%
D34					
begInf	11899	3305	1712	0	16916
	70%	20%	10%	0%	100%
endInf	12051	3416	653	0	16120
	75%	21%	4%	0%	100%
begBeh	3812	869	0	1080	5761
	66%	15%	0%	19%	100%
endBeh	5576	2471	0	2282	10329
	54%	24%	0%	22%	100%
D35					
begInf	9274	5730	2782	0	17786
	52%	32%	16%	0%	100%
endInf	13343	10607	1160	0	25110

	53%	42%	5%	0%	100%
begBeh	11147	9858	440	4262	25707
	43%	38%	2%	17%	100%
endBeh	9964	5648	1178	6218	23008
	43%	25%	5%	27%	100%
D37					
begInf	15004	5851	638	0	21493
	70%	27%	3%	0%	100%
endInf	8311	11514	731	0	20556
	40%	56%	4%	0%	100%
begBeh	5118	5128	0	4301	14547
	35%	35%	0%	30%	100%
endBeh	4858	5497	259	3298	13912
	35%	40%	2%	24%	100%
D38					
begInf	10867	7200	2141	0	20208
	54%	36%	11%	0%	100%
endInf	5313	8444	3086	0	16843
	32%	50%	18%	0%	100%
begBeh	9970	1654	0	7291	18915
	53%	9%	0%	39%	100%
endBeh	12750	2386	687	4268	20091
	63%	12%	3%	21%	100%

## **7. Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Meliha Kujundzic  
Geburtsort: Sarajevo  
Nationalität: BiH

### **Ausbildung**

1993-1994 Volksschule „St. Ana“, Osijek – Kroatien  
1994-1996 Volksschule „Bazeilerschule“, München  
1996-1997 Volksschule „Fromundschule“, München  
1997-2001 Grundschule „7. Osnovna skola“, G.Rahic- BiH  
2001-2005 Gymnasium „Vaso Pelagic“, mit Reifeprüfung, Brcko –BiH  
10/2005 Beginn des Biologie Diplomstudiums (Anthropologie- A442) an der Universität Wien  
2011- 2013 Diplomarbeit : Computer- unterstützte Radiodensitometrie der Knochenveränderungen bei experimenteller Osteomyelitis (MedUni Wien, Institut für Knochen und Biomaterialforschung)

### **Berufserfahrung**

seit 1.1.2011 wissenschaftliche Mitarbeit am Projekt „Efficacy and Local Tolerance of CO<sub>2</sub>-cleaned and antibiotic-impregnated Human Spongiosa in Chronic Osteomyelitis“ und Entwicklung und Durchführung von computerunterstützter Bildauswertung an den Radiographien dieser Studie mit 3 Werksverträgen der Medizinischen Universität Wien vom 01. 08. 2011-31. 08. 2011, vom 01.10. 2011- 31. 10. 2011, und vom 01. 06. 2012- 15. 06. 2012

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Meliha Kujundzic, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfung vorgelegt.

Wien, im August 2013

Unterschrift  
Meliha Kujundzic