

Journal für  
**Mineralstoffwechsel**

Zeitschrift für Knochen- und Gelenkerkrankungen  
Orthopädie • Osteologie • Rheumatologie

**Röntgenkleinwinkelstreuung in der  
Osteologie**

Fratzl P, Klaushofer K

*Journal für Mineralstoffwechsel &  
Muskuloskelettale Erkrankungen*

2001; 8 (2), 12-19

**Homepage:**

**[www.kup.at/  
mineralstoffwechsel](http://www.kup.at/mineralstoffwechsel)**

**Online-Datenbank mit  
Autoren- und Stichwortsuche**

Member of the



Indexed in SCOPUS/EMBASE/Excerpta Medica  
[www.kup.at/mineralstoffwechsel](http://www.kup.at/mineralstoffwechsel)



Offizielles Organ der  
Österreichischen Gesellschaft  
zur Erforschung des Knochens  
und Mineralstoffwechsels



Österreichische Gesellschaft  
für Orthopädie und  
Orthopädische Chirurgie



Österreichische  
Gesellschaft  
für Rheumatologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P.b.b. GZ02Z031108M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

# **Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis**

## **Mehr als nur eine Dekoration:**

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

**Dann sind Sie hier richtig**



# RÖNTGENKLEINWINKELSTREUUNG IN DER OSTEOLOGIE

## Summary

*The mechanical properties of bone depend on all levels of hierarchical structure. Consequently, fracture incidence is not fully predicted by the bone mineral density alone but lower hierarchical levels, such as the structure of the collagen-mineral composite, need to be conside-*

*red for some diseases. The technique of small-angle X-ray scattering (SAXS) is suited to give such information using standard histological sections prepared from bone biopsies. The principles and several recent examples of the application of SAXS are reviewed.*

## EINLEITUNG

Die mechanischen Eigenschaften des Knochens sind durch den komplexen hierarchischen Aufbau der Matrix bestimmt. Die Abbildung 1 zeigt schematisch einige hierarchische Ebenen in der Struktur des humanen Wirbelknochens. Der spongiöse Körper des Wirbels ist aus Trabekeln (Dicke im Bereich 200  $\mu\text{m}$ ) aufgebaut. Deren lamellare Struktur wird aus Kollagenfibrillen (Durchmesser einige 100 nm) unterschiedlicher Ausrichtung aufgebaut. Die das Gewebe verstärkenden Partikel aus Kalziumphosphat-Mineral haben

schließlich nur noch eine Dicke von wenigen Nanometern. Mit dieser Darstellung wird verdeutlicht, daß die verschiedenen strukturellen Ebe-

nen mehr als 6 Größenordnungen (von Nanometer bis Millimeter) überspannen.

Seit langem ist bekannt (Wolff 1870) [1], daß die Anordnung der Trabekel im spongiösen Knochen im Hinblick auf die typische mechanische Belastung des Knochens optimiert ist. Das bedeutet, daß die Trabekel in ihrer Ausrichtung im wesentlichen den Hauptspannungslinien folgen. Forschungen der jüngeren Zeit zeigen, daß eine Optimierung auch auf niedrigeren hierarchischen Ebenen erfolgt [2], z. B. in bezug auf die lamellare Struktur des Knochens [3]

Abbildung 1: Schematische Darstellung von verschiedenen hierarchischen Ebenen im spongiösen Knochen (humaner Wirbelknochen).

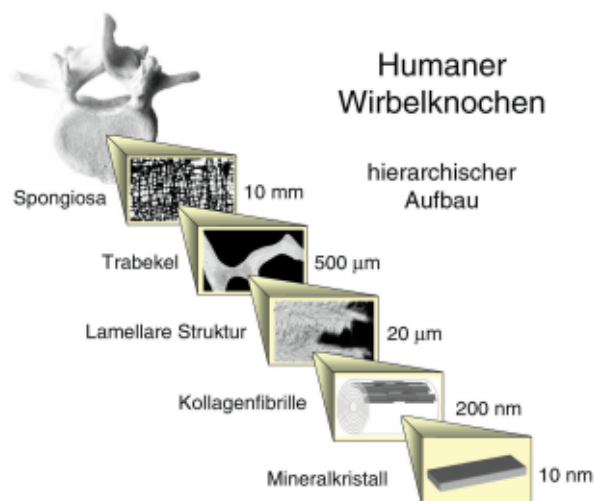
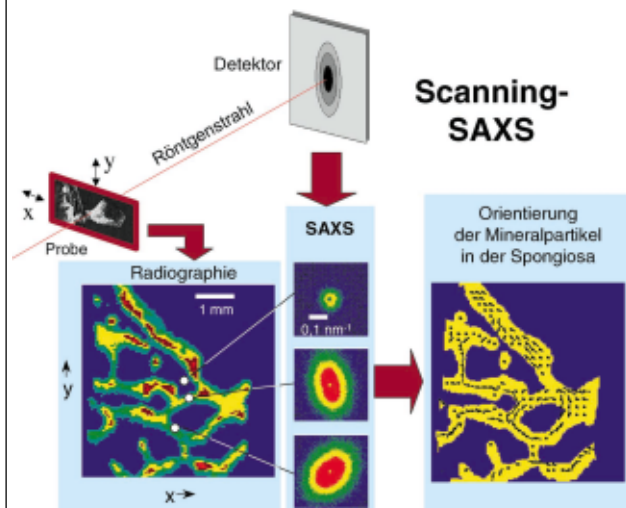


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Meßvorganges bei der Kleinwinkelstreuung (SAXS) sowie bei Scanning-SAXS. Ein Röntgenstrahl durchdringt die Probe und das gebeugte Signal wird auf einem Detektor gemessen (links oben). Das SAXS-Signal gibt Informationen über jenes Volumen der Probe, das durch den Strahldurchmesser und die Probendicke definiert wird. In kommerziellen Geräten (Nanostar, Fa. Bruker AXS, Karlsruhe) ist der Strahldurchmesser 100–200  $\mu\text{m}$ . Bei Verwendung von Synchrotronstrahlung kann er bis auf wenige Mikrometer reduziert werden. Die Dicke der Probe sollte sinnvollerweise etwa so groß sein wie der Strahldurchmesser, aber nicht mehr als ca. 200  $\mu\text{m}$  betragen. Die Messung der Absorption des Röntgenstrahls durch die Probe (die direkt in der SAXS-Apparatur erfolgt) an verschiedenen Stellen führt zu dem Bild links unten (Radiographie). Die Probe wird dabei in zwei Richtungen senkrecht zum Strahl (x, y) bewegt. Verschiedene Stellen können nun für die Aufnahme von SAXS-Bildern (Mitte unten) ausgewählt werden. Die Auswertung dieser Bilder (siehe Abb. 3 und 4) liefert mehrere Parameter, wie z. B. die typische Ausrichtung der länglichen Mineralpartikel in der Knochenmatrix, die im Bild rechts unten dargestellt ist. Die Länge der Balken bezeichnet den Grad der Ausrichtung p. In dem Bild zu erkennen ist z. B., daß die Orientierung der Mineralpartikel genau jener der Trabekel folgt.





oder die typische Ausrichtung der Mineralkristalle [4].

Wenn man nun davon ausgeht, daß das Wolffsche Gesetz auf allen hierarchischen Stufen gilt, so bedeutet jede Veränderung der Struktur auf einer dieser Stufen eine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften. Knochenerkrankungen können unterschiedliche Stufen dieser Hierarchie betreffen. Bei Osteoporose, die als eine Störung der Mikroarchi-

tektur definiert ist, besteht in erster Linie eine Verringerung der spongiösen Knochenmasse, z. B. im Wirbel-

knochen. Dadurch ist auch die trabekuläre Architektur betroffen. In Abbildung 1 sind das die obersten

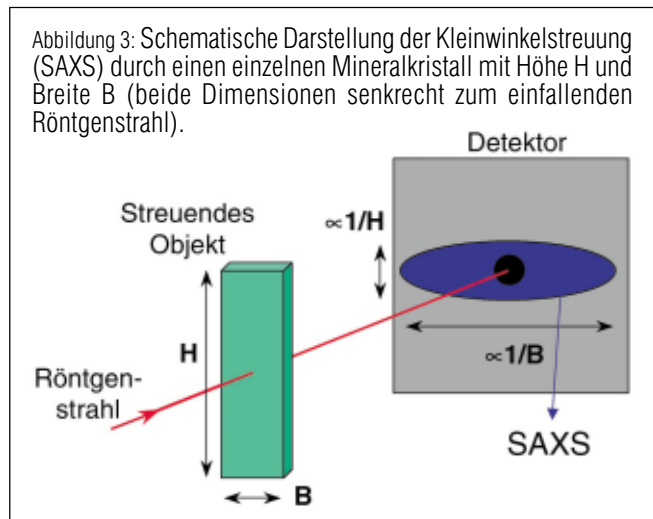


Abbildung 4: Links ein typisches SAXS-Bild der Knochenmatrix. Der Farbcode (von schwarz bis weiß) bezeichnet ansteigende Streuintensitäten. In der oberen Zeile wird das SAXS-Bild entlang von konzentrischen Kreisen aufsummiert. Das Ergebnis ist eine Funktion von  $q$  (rechts oben), wobei  $q$  den Radius des Kreises bezeichnet. Die eingezeichnete Gerade entspricht dem sogenannten Porod-Gesetz [7, 14, 19] und beschreibt das Verhalten der Kurve bei großem  $q$ . Aus dieser Funktion kann  $T$  und auch  $G(x)$  berechnet werden (siehe Abb. 8). In der unteren Zeile wird das SAXS-Bild innerhalb von Kreissektoren aufsummiert. Das Ergebnis ist eine Funktion von  $\Psi$  (rechts unten). Die Richtung  $\Psi_0$  in der Mitte zwischen den beiden Maxima entspricht der typischen Richtung der langen Kristallachse (in Übereinstimmung mit Abb. 3). Der Grad der Ausrichtung  $\rho$  berechnet sich schließlich aus den Flächen  $A_0$  (grau) und  $A_1$  (weiß).

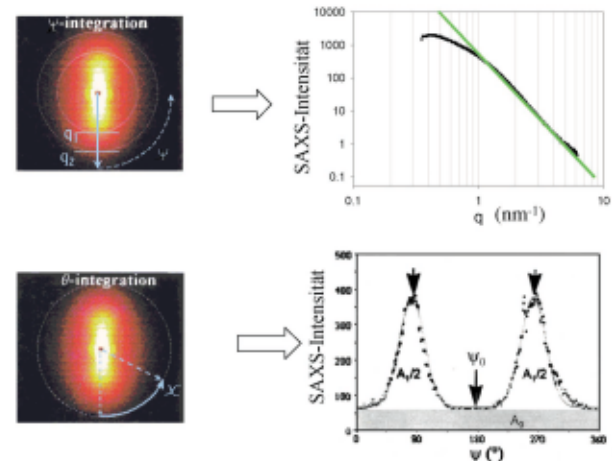


Abbildung 5: Untersuchung eines Trabekels in humaner Spongiosa mittels SAXS, BEI (rechts) und Lichtmikroskopie (links). Das linke Bild zeigt, daß die lokale Ausrichtung der Kollagenmatrix (im polarisierten Licht erkennbar) mit jener der Mineralkristalle konform geht (nach [4]).

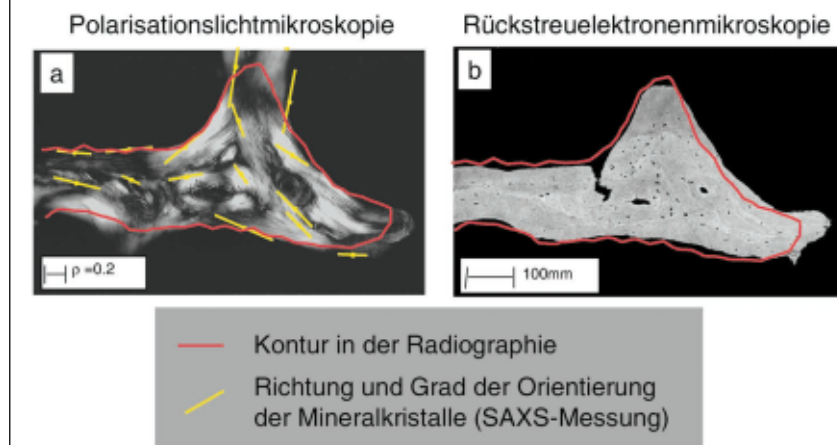
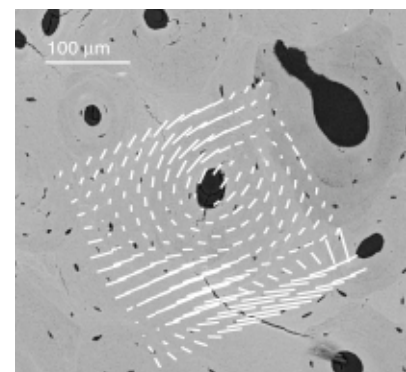


Abbildung 6: Ausrichtung der Mineralkristalle (weiße Balken) in der Umgebung eines Osteons aufgetragen auf eine Aufnahme der selben Probe mittels BEI. Die SAXS-Messungen erfolgten an der Synchrotronquelle ELETTRA in Triest (nach [26]).



beiden Stufen der Hierarchie. Aus diesem Grund erlaubt die Messung der Knochenmasse alleine noch keine vollständige Beschreibung des Krankheitsbilds bei Osteoporose, sondern es müssen auch Konnektivität und Ausrichtung der Trabekel mit berücksichtigt werden. Bei anderen Knochenerkrankungen, wie z. B. der Osteomalazie, sind niedrigere Stufen in der Hierarchie betroffen. Die Osteomalazie, die durch Vitamin D-Mangel verursacht wird, bewirkt eine geringere und inhomogene Verteilung des Minerals innerhalb der Knochenmatrix. In Abbildung 1 wäre diese Erkrankung auf den Stufen 2 bis 3 sichtbar. Osteogenesis imperfecta schließlich ist ein Beispiel, wo die Krankheitsursache die unterste hierarchische Stufe, nämlich die Kollagenmoleküle, betrifft.

Für die Beurteilung der Knochenstruktur, z. B. für diagnostische Zwecke, bedeutet der hierarchische Aufbau eine erhebliche Erschwernis, weil eine Meßtechnik alleine nicht ausreicht, alle strukturellen Ebenen zu erfassen. *In vivo* ist nur die Beurteilung der BMD als Maß für die Knochenmasse routinemäßig möglich („dual X-ray absorptiometry“ oder quantitative Computertomographie). Mittels hochaufgelöster Röntgentomographie oder Kernspin-Resonanz ist es gerade noch möglich, in den Bereich der zweiten hierarchischen Ebene (trabekuläre Architektur) vorzudringen. Für eine Beurteilung kleinerer Strukturen sind Biopsien erforderlich. Wenn es allerdings um die Erfassung der kleinsten relevanten Dimensionen, nämlich jener der Kollagenfibrillen und Mineralkristalle geht, so sind ganz spezielle Untersuchungstechniken – wie z. B. die Transmissionselektronenmikroskopie – erforderlich. Das Problem bei dieser Technik ist der hohe Präparationsaufwand und der Umstand, daß ultradünne Schnitte sowie Färbungen erforderlich sind. In diesem Bereich bietet die Röntgenkleinwinkelstreuung eine interessante Alternative. Diese Technik basiert auf der Beu-

gung von Röntgenstrahlen und erfordert einen verhältnismäßig geringen Präparationsaufwand. Konventionelle histologische Schnitte mit einer Dicke von einigen Zehntel Millimetern können verwendet werden und werden durch die Messung nicht verändert.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS) wurde Mitte des 20. Jahrhunderts von Gruppen in Paris [5] und Graz [6, 7] entwickelt. Zu diesem Zeitpunkt waren Elektronenmikroskope noch nicht so weit verbreitet wie heute. In den Jahren danach gab es einige wenige Versuche, die Knochenstruktur mittels SAXS zu untersuchen [5, 8, 9], aber erst in den 1990er Jahren wurde die Methode systematisch für die Anwendung in der Osteologie entwickelt [10–24]. Eine deutschsprachige Beschreibung der grundsätzlichen Methodik findet sich in [13]. Der letzte Stand der Entwicklungen eröffnet die Möglichkeit, durch die Verwendung eines sehr feinen Röntgenstrahls einen histologischen Schnitt abzurastern und an verschiedenen Stellen innerhalb des Schnitts die Struktur des Kollagen-Mineralverbundes mittels SAXS zu charakterisieren. Derzeit ist ein Abrastern mit Schritten in der Größenordnung von 100 µm (also etwas weniger als die Dicke eines Trabekels) mit einem kommerziell erhältlichen Laborgerät möglich [4]. Durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung als Röntgenquelle kann der Rasterschritt bis auf wenige Mikrometer verringert werden [25, 26].

In diesem Artikel werden die Methodik der Röntgenkleinwinkelstreuung kurz dargestellt und einige Anwendungen im Bereich der osteologischen Forschung gezeigt.

## PRINZIP DER RÖNTGEN-KLEINWINKELSTREUUNG

Die typische Meßanordnung ist in Abbildung 2 (oben) gezeigt. Der monochromatische Röntgenstrahl (aus einer Röhre oder auch einer Synchrotronquelle) durchtritt die Probe und die um den Primärstrahl gebeugten Photonen werden in einem flächenhaften Röntgendetektor nachgewiesen. Der Primärstrahl hat in der konventionellen Laboranordnung einen Durchmesser von etwa 100–200 µm. Der Durchmesser des Synchrotronstrahls kann bis auf wenige µm verringert werden. Die Probe selbst kann in zwei Richtungen quer zum Strahl (x, y) bewegt werden. In Abbildung 2 links unten ist das typische Bild eines Knochenschnitts (Radiographie) zu sehen. An verschiedenen Punkten innerhalb dieses Schnitts wird ein SAXS-Bild (Abb. 2, unten Mitte) aufgenommen. Die Interpretation dieses SAXS-Bildes liefert nun Aufschlüsse über die Größe und Orientierung der Mineralkristalle in der Knochenmatrix.

Die Abbildung 3 zeigt die zugrundeliegende theoretische Interpretation eines SAXS-Bildes: Die Knochenmatrix besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten sehr unterschiedlicher Elektronendichte, der kollagenreichen organischen Matrix sowie den Mineralpartikeln aus Kalziumphosphat. Diese Partikel können entweder plättchen- oder nadelförmig sein und ihre Größe beträgt nur wenige Nanometer [27, 28]. Ein solcher kleiner Kristall (Höhe H, Breite B) ist in Abbildung 3 skizziert. Wenn der Röntgenstrahl auf diesen Kristall trifft, so wird er in Richtung der Höhe weniger stark gebeugt als in Richtung der Breite. Dadurch ergibt sich auf dem Detektor ein elliptisches Bild mit einer Höhe proportional 1/H und einer Breite proportional 1/B. Die Einschränkung dabei ist, daß nur für Dimensionen kleiner als 50 nm eine meßbare Beugung stattfindet,

d. h. Strukturen größer als etwa 50 nm tragen nicht zum SAXS-Signal bei.

Die Abbildung 3 zeigt auch, daß das SAXS-Bild sowohl Information über die Größe des Kristalls, als auch über seine Ausrichtung enthält: Würde man den Kristall um 90° drehen, so würde sich auch das Streubild entsprechend mitdrehen. Natürlich gibt es innerhalb der Knochenmatrix aber eine große Zahl von Kristallen mit unterschiedlicher Größe und Ausrichtung. Die entsprechenden Streusignale überlagern sich und ergeben das tatsächliche SAXS-Bild auf dem Detektor. Die Interpretation einer tatsächlichen Messung wird in Abbildung 4 gezeigt. Links ist ein Streubild zu sehen, das auf zwei Arten integriert werden kann: Einerseits kann die Streuintensität entlang von konzentrischen Kreisen mit dem Radius  $\rho$  aufsummiert werden, was die Kurve rechts oben im Bild ergibt. Andererseits kann die Streuintensität innerhalb von Kreissektoren aufsummiert werden, wodurch man die Abhängigkeit vom Winkel  $\Psi$  erhält (Kurve rechts unten). Aus der ersten Kurve kann die mittlere Dicke der Mineralkristalle,  $T$ , extrahiert werden, aus der zweiten Kurve die mittlere Ausrichtung und auch der Grad der Ausrichtung. Die mathematischen Formeln für die Datenauswertung können z. B. in [4, 19] nachgelesen werden. Die genaue Definition von  $T$  ist:

$$T = 4 \Phi (1 - \Phi) / \sigma$$

wobei  $\Phi$  den Volumenanteil des Minerals innerhalb der Knochenmatrix und  $\sigma$  die gesamte Oberfläche pro Einheitsvolumen der Matrix bezeichnen.  $T$  kann also in etwa als das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche der Kristalle verstanden werden. Bei plättchenförmigen Kristallen entspricht  $T$  genau der Dicke der Plättchen [14, 19].

Der Winkel  $\Psi_0$  in Abbildung 4 rechts unten entspricht der mittleren Richtung der länglichen Kristalle. Weiters

definieren wir einen Grad der Ausrichtung  $\rho$  als das Verhältnis der weiß gehaltenen Fläche unterhalb der Kurve in Abbildung 4 rechts unten zur gesamten Fläche unter der Kurve (= Summe aus weiß und grau):

$$\rho = A_1 / (A_1 + A_0) \quad (\text{siehe Abb. 4})$$

SAXS wird am besten an in Kunstharz eingebetteten (histologischen) Schnitten angewandt. Die Methode kann aber auch zur Charakterisierung von Mineralkristallen in Dispersion [29], von nativem Knochen [10, 11] oder von in Zellkulturen produzierter Matrix [24] verwendet werden. SAXS ist nicht identisch mit der zur Charakterisierung des Knochenminerals oftmals verwendeten Methode der Röntgendiffraktion („X-ray diffraction“ [30, 31]). Die Informationen aus beiden Techniken können als komplementär betrachtet werden.

## ANWENDUNGSBEISPIELE

### Kombination mehrerer Untersuchungstechniken an histologischen Präparaten

Die für Untersuchungen mittels SAXS erforderlichen Präparate sind typische fixierte und in Kunstharz (Polymethylmetacrylat oder Epon) eingebettete Schnitte, z. B. von Biopsien. Die Abbildung 5 zeigt als Beispiel das Präparat eines trabekulären humanen Knochens, das sowohl mit Polarisationslichtmikroskopie (links), Rückstreuungselektronenmikroskopie, (back scattered electron imaging, BEI), (rechts) und SAXS untersucht wurde [4]. BEI [32–34] und SAXS geben komplementäre Informationen über das Knochenmineral: quantitative Aussagen über die Verteilung der Mineralmenge in der Knochenmatrix („Bone Mineral Density Distribution“, BMDD) aus BEI [32–34] und über die Größe und Ausrichtung der Mineralpartikel aus SAXS. Abbildung 5 zeigt, daß Mineralpartikel und Kollagenfibrillen im wesentlichen parallel verlaufen, was der üblichen Vorstel-

lung entspricht, wie die Mineralpartikel in die Kollagenmatrix eingebettet sind [12, 27, 28, 35].

Die Abbildung 6 zeigt das Beispiel einer Messung an kompakten Knochen [26]. Das Untergrundbild ist eine Aufnahme mittels BEI und zeigt die Verteilung der Mineralmenge als Graustufen an [32–34]. Klar zu erkennen sind einige Osteone und viele Osteozytenlakunen. Das Feld mit den weißen Balken bezeichnet die typische Orientierung der Mineralkristalle in der Umgebung eines der Osteone. Der Abstand zwischen Einzelmessungen mittels SAXS beträgt gerade 20  $\mu\text{m}$ , weshalb die Verwendung einer Synchrotron-Röntgenquelle erforderlich war [26]. Zusätzlich zu der in den Abbildungen 5 und 6 gezeigten Methodenkombination wurde auch der gemeinsame Einsatz von SAXS und Infrarotspektroskopie demonstriert [36].

### Ursprung der Knochensprödigkeit bei Osteogenesis imperfecta

An Hand eines tierischen Modellsystems wurde der Ursprung der Sprödigkeit des Knochens bei Osteogenesis imperfecta (OI) untersucht. Es handelt sich dabei um eine transgene Maus (osteogenesis imperfecta murine, oim), die nicht in der Lage ist, Prokollagen des Typs  $\alpha_2$  zu produzieren und deren Kollagenmatrix daher ausschließlich aus  $\alpha_1$  Triplehelices besteht. Die mechanischen Eigenschaften des Knochens von oim-Mäusen sind vergleichbar mit jenen bei milder humaner OI (Typ I).

Es wurden einerseits die mechanischen Eigenschaften des Kollagens von oim mit jenen von Kontrollen verglichen [37]. Dabei ergab sich eine Verringerung der Dehnbarkeit um einen Faktor zwei. Andererseits wurden auch die Mineralkristalle mittels SAXS untersucht [17] und festgestellt, daß diese in der Kortikalis von Röhrenknochen der oim-Mäuse dünner und weniger parallel ausgerichtet sind als in entsprechenden

Abbildung 7: Modell für die Sprödigkeit des Knochens in einem Tiermodell der Osteogenesis imperfecta (oim), basierend auf (a) SAXS-Untersuchungen des Knochenminerals [17] und (b) Messungen der mechanischen Eigenschaften des Kollagens [37].

### Osteogenesis Imperfecta (Maus Modell oim)

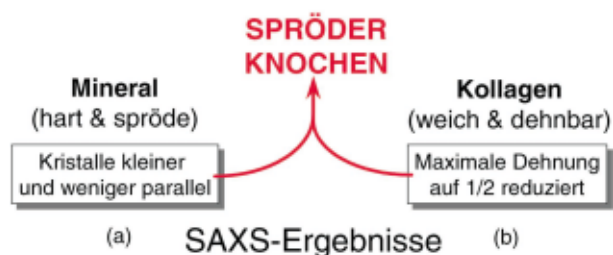


Abbildung 9: Lokale Schwankungen der Mineralstruktur nach Fluoridbehandlung. Die Zahlen geben den Wert für  $\eta$  (x 1000) an verschiedenen Stellen des Schnitts. Kleinere Werte von  $\eta$  sind für fluorotischen Knochen charakteristisch ( $1000 \eta \leq 2$ ). Das BEI-Bild links unten zeigt die Koexistenz von normaler (vermutlich alter) Knochenmatrix und jener, die während der Fluorideinwirkung gebildet wurde [22].

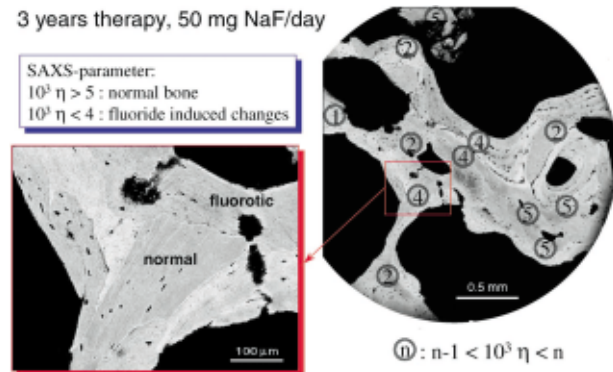
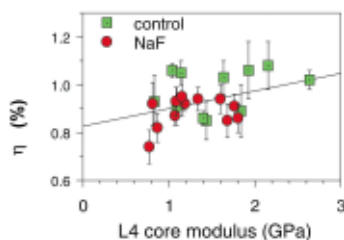


Abbildung 11: Korrelation zwischen dem SAXS-Parameter  $\eta$  und dem Kompressionsmodul des Wirbels L4 in Minis Schweinen [20].



Kontrollen. Das führt zu dem in Abbildung 7 gezeigten Modell. Die mechanischen Eigenschaften der Knochenmatrix sind intermediär zwischen jenen von Kollagen, das weich und dehnbar ist, und jenen des Minerals, das hart und spröde ist. Der wesentliche negative Effekt der genetischen Mutation dürfte jener der Reduktion der Dehnbarkeit des Kollagens sein, denn geringe Dehnbarkeit ist das wesentliche Merkmal der Sprödigkeit. Andererseits ist auch die Mineralphase verändert. Neuere

Abbildung 8: Effekt der Behandlung mit Fluorid auf die Knochenmatrix [15]. BEI-Aufnahmen zeigen oben links normalen und rechts Knochen nach Fluorid-Überdosierung. Im fluorotischen Knochen sind viele Mineralisationsdefekte sichtbar. Die Graphiken unten zeigen die entsprechenden SAXS-Kurven  $G(x)$  für den normalen und den fluorotischen Knochen, aber auch für intermediäre Zustände („intermediate“) wie sie bei der Behandlung von Osteoporose mit Fluorid auftreten können [15]. Der Parameter  $\eta$  misst die Differenz zwischen dem gemessenen  $G(x)$  und einer Standardkurve (ausgezogene Linie). Je kleiner  $\eta$  desto näher ist die Struktur der Knochenmatrix an jener des fluorotischen Knochens.

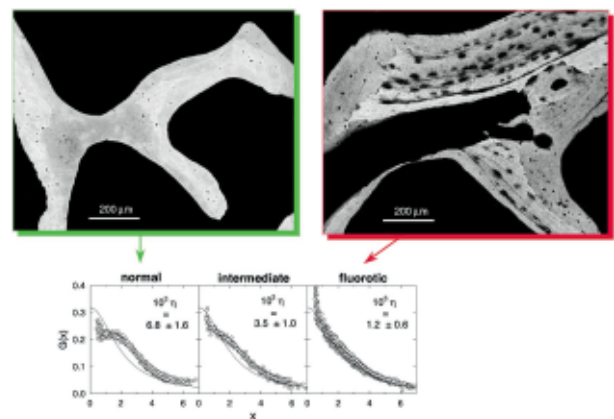
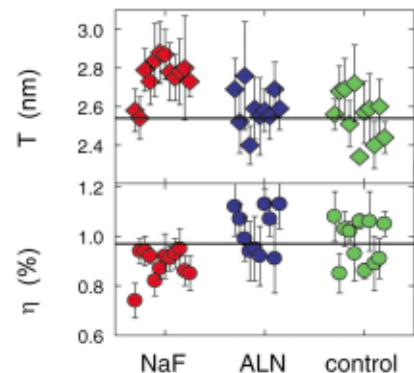


Abbildung 10: SAXS-Parameter  $\eta$  und T für die Knochenmatrix in den Wirbeln von Minis Schweinen nach Behandlung mit Fluorid (NaF) oder mit dem Bisphosphonat Alendronat (ALN) im Vergleich zu Kontrollen [20].



Untersuchungen (Kombination von SAXS, BEI und Mikrohärtemessungen) in Abhängigkeit des Alters zeigen, daß die Mineralmenge eher erhöht ist, was als Reaktion des Systems Knochen auf die geringe Festigkeit des Materials gedeutet werden könnte [38]. Allerdings ist bei mehr Mineral zwar die Steifigkeit erhöht (wodurch sich die Dehnungen im Material bei gleicher Belastung verringern), aber auch die Sprödigkeit (was die Frakturwahrscheinlichkeit bei gleicher Belastung steigert).

Natürlich muß man sehr vorsichtig sein, wenn man diese Ergebnisse auf humane OI extrapolieren möchte, denn der genetische Kollagendefekt ist ja praktisch in jeder OI-Familie unterschiedlich und nicht unbedingt mit jenem des Tiermodells vergleichbar.

### Fluoridbehandlung der Osteoporose

Ein schon lange viel diskutierter Ansatz zur Behandlung der Osteoporose ist die Fluoridtherapie. Der Grund ist die enorme Stimulation der Knochenneubildung, die bei der Behandlung mit Fluorid auftritt. Die Gefahr ist allerdings, daß die Qualität des neu gebildeten Knochens möglicherweise geringer als normal sein könnte. Bei der Erforschung dieser Fragestellung hat sich der Einsatz von SAXS und scanning-SAXS als besonders hilfreich erwiesen. Abbildung 8 (oben) zeigt zwei Bilder, die mittels BEI an normalem (links) bzw. fluorotischem (rechts) Knochen aufgenommen wurden [15]. In beiden Fällen handelte es sich um Beckenkambiospien. Die Fluorose in der extremen Ausbildung wie in Abbildung 8 (rechts oben) war die Folge einer Fluorid-Überdosierung über einen langen Zeitraum. Klar zu erkennen sind Mineralisationsdefekte, die an eine Malazie erinnern. In Abbildung 8 unten sind SAXS-Ergebnisse dargestellt. Die Kurven  $G(x)$  sind durch eine einfache Transformation direkt von SAXS-Kurven abgeleitet, von denen eine exemplarisch in Abbildung 4 (rechts oben) zu sehen ist. Der Unterschied zwischen der linken („normal“)  $G(x)$  Kurve in Abbildung 8 ist gut zu erkennen. Das bedeutet, daß auch die nur einige Nanometer großen Mineralpartikel unterschiedlich sind. Die Interpretation geht dahin, daß es im fluorotischen Knochen eine zusätzliche Population von eher größeren (vermutlich außerhalb der Kollagenfibrillen befindlichen) Mineralpartikeln gibt [15].

Besonders interessant für diagnostische Zwecke ist der Umstand, daß auch geringfügige Veränderungen, die im histologischen Schnitt noch nicht als Malazie erkenntlich sind, mit SAXS nachgewiesen werden können (Abb. 8, unten Mitte, „intermediate“). Solche Veränderungen können bei der Behandlung der Osteoporose mittels Fluorid auftreten [15]. Eine Quantifizierung des Effekts von Fluorid wurde mittels eines Parameters  $\eta$  erreicht, der die Abweichung von  $G(x)$  von einer vorgegebenen Standardkurve (ausgezogene Linie in den Graphen von Abb. 8, unten) beschreibt. Je kleiner der Wert von  $\eta$  desto näher ist die Knochenmatrix am fluorotischen Zustand.

Eine weitere Beobachtung ist, daß die Effekte des Fluorids nicht homogen in der Knochenmatrix verteilt sind. Das ist in Abbildung 9 zu sehen [16], wo der Wert von  $\eta$  in einer Biopsie nach Fluoridbehandlung (mit eher hoher Dosis, siehe Abb. 9, unter Kombination mit Kalzium und Vitamin D) an verschiedenen Orten eines Schnittes gezeigt ist. Der Wert von  $\eta$  variiert von normal ( $\geq 5 \times 10^{-3}$ ) bis fluorotisch ( $\leq 2 \times 10^{-3}$ ) innerhalb eines Knochentrabekels. Der Grund ist in der Vergrößerung (rechts unten) gezeigt. An den normalen Knochen (der vermutlich vor der Fluorid-Behandlung gebildet worden ist) wurde stark verändertes Material (vermutlich unter dem Einfluß der Fluorid-Behandlung) angelagert. Da die Umbauvorgänge im Knochen regional sehr unterschiedlich sein können, ist auch die Verteilung des durch Fluorid veränderten Knochenmaterials sehr inhomogen.

### Vergleich von Osteoporosetherapien

Da mit SAXS konventionelle histologische Schnitte (zerstörungsfrei) untersucht werden können, eignet sich die Methode auch hervorragend zur Begleitung von präklinischen Studien über die Auswirkungen von Osteoporosetherapien auf die Mineralkristalle. Das sei hier an einer ab-

geschlossenen Studie an einem Tiermodell demonstriert. In dieser Studie wurden Minischweine mit Natriumfluorid (NaF), bzw. dem Bisphosphonat Alendronat (ALN) behandelt und die Knochenmatrix von Wirbelkörpern wurde in einer blinden Studie mit SAXS und auch anderen Methoden im Vergleich zu Kontrollen untersucht [20, 33]. Das SAXS-Ergebnis ist in Abbildung 10 zu sehen. Der Parameter  $\eta$  der (wie oben erwähnt) die Fluorid-bedingten Veränderungen quantitativ beschreibt (siehe Abb. 8), ist auch in den Minischweinen nach Fluoridbehandlung verringert. Die mittlere Dicke der Kristalle,  $T$ , war nach Fluoridbehandlung entsprechend vergrößert. Die Behandlung mit ALN ergab keinen Unterschied in beiden Parametern. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß eine signifikante Korrelation zwischen dem Parameter  $\eta$  und mechanischen Eigenschaften der Wirbelkörper bestand (Abb. 11) [20]. Die durch NaF hervorgerufene Strukturänderung korreliert also deutlich mit einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften.

Interessant ist noch, daß die ALN-Behandlung zwar keinen sichtbaren Effekt auf die unterste hierarchische Ebene der Knochenstruktur hatte (siehe Abb. 1), wie die SAXS-Messungen zeigen. Andererseits gab es aber sehr wohl Effekte auf (mittels SAXS nicht sichtbare) höhere hierarchische Ebenen: Auf der Ebene der Trabekel (siehe Abb. 1) war mit BEI eine Erhöhung des mittleren Mineralgehalts erkennbar [33]. Umgekehrt wurde keine Veränderung des mittleren Mineralgehalts der Matrix bei NaF-Behandlung festgestellt, obwohl eine deutliche Veränderung in Größe und Verteilung der Mineralpartikel mit SAXS beobachtet wurde (Abb. 10). Dieses Beispiel zeigt recht deutlich, daß die Auswirkungen von NaF- und ALN-Behandlung jeweils auf anderen hierarchischen Ebenen der Knochenstruktur zu sehen sind. Das hat wohl mit der sehr unterschiedlichen Wirkung der beiden Medikamente



(aufbaufördernd für NaF und abbauehemmend für ALN) zu tun.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) stellt sich als eine inzwischen gut etablierte Methode zur Charakterisierung der Eigenschaften des Knochenminerals dar. Der Vorteil bei klinisch motivierten Studien ist, daß konventionelle histologische Schnitte verwendet werden können und daß diese nach der Untersuchung unverändert zur Verfügung stehen. Dies ist insbesondere wichtig, wenn man die Eigenschaften des Knochenminerals an verschiedenen Stellen eines Präparats kennen will (Scanning-SAXS) oder wenn SAXS mit anderen Untersuchungen kombiniert werden soll, wie zum Beispiel Lichtmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie, Infrarotspektroskopie, um nur einige zu nennen.

## DANK

Die Autoren sind allen in den besprochenen Projekten involvierten Mitarbeitern des Ludwig Boltzmann-Institutes für Osteologie bzw. des Erich Schmid-Institutes für Materialwissenschaft zu großem Dank verpflichtet.

## Literatur:

1. Wolff J. Über die innere Architectur der Knochen und ihre Bedeutung für die Fragen vom Knochenwachstum. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie* 1870; 50: 389–450.
2. Currey JD. Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. *J Biomech* 1990; 23: 837–44.
3. Weiner S, Wagner HD. The material bone: structure-mechanical function relations. *Ann Rev Mater Sci* 1998; 28: 271–98.
4. Rinnerthaler S, Roschger P, Jakob HF, Nader A, Klaushofer K, Fratzl P. Scanning small angle scattering analysis of human bone sections. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 422–9.
5. Guinier A, Fournet G. Small-angle scattering of x-rays. Wiley, New York, 1955.
6. Glatter O, Kratky O (eds). Small-angle x-ray scattering, Academic Press, London, 1982.
7. Porod G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *Kolloid Zeitschrift* 1951; 124: 83–114; 1952; 125: 51–57, 108–122.
8. Eanes ED, Zipkin I, Harper RA, Posner AS. Small-angle x-ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. *Arch Oral Biol* 1965; 10: 161–73.
9. Matsushima N, Akiyama M, Terayama Y. Quantitative analysis of the orientation of mineral in bone from small-angle x-ray scattering patterns. *Jap J Appl Phys* 1982; 21: 186–9.
10. Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Vogl G, Koller K. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle x-ray scattering. *Calcif Tissue Int* 1991; 48: 407–13.
11. Fratzl P, Groschner M, Vogl G, Plenk H, Eschberger J, Fratzl-Zelman N, Koller K, Klaushofer K. Mineral crystals in calcified tissues: a comparative study by SAXS. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 329–34.
12. Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K. Collagen packing and mineralization: an x-ray scattering investigation of turkey leg tendon. *Biophys J* 1993; 64: 260–6.
13. Fratzl P, Klaushofer K. Röntgenkleinwinkelstreuung: eine Methode zur Untersuchung der Nanostruktur mineralisierter Gewebe. *Osteologie* 1993; 2: 24–30.
14. Fratzl P. Statistical model of the habit and arrangement of mineral crystals in the collagen of bone. *J Stat Phys* 1994; 77: 125–43.
15. Fratzl P, Roschger P, Eschberger J, Abendroth B, Klaushofer K. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis. A small-angle x-ray scattering study. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1541–9.
16. Fratzl P. Holz und Knochen – Intelligente Werkstoffe der Natur. *Phys Bl* 1995; 51: 1191–2.
17. Fratzl P, Paris O, Klaushofer K, Landis WJ. Bone mineralization in an osteogenesis imperfecta mouse model studied by small angle x-ray scattering. *J Clin Invest* 1996; 97: 396–402.
18. Fratzl P, Schreiber S, Boyde A. Characterization of bone mineral crystals in horse radius by small-angle x-ray scattering. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 341–6.
19. Fratzl P, Schreiber S, Klaushofer K. Bone mineralization as studied by small-angle x-ray scattering. *Conn Tissue Res* 1996; 34: 247–54.
20. Fratzl P, Schreiber S, Roschger P, Lafage M-H, Rodan G, Klaushofer K. Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs. A small-angle x-ray scattering study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 248–53.
21. Fratzl P, Jakob HF, Rinnerthaler S, Roschger P, Klaushofer K. Position resolved small-angle x-ray scattering of complex biological materials. *J Appl Cryst* 1997; 30: 765–9.
22. Fratzl P, Rinnerthaler S, Roschger P, Klaushofer K. Mineral crystals after fluoride treatment in osteoporosis. *Osteologie* 1998; 7: 130–3.
23. Fratzl P. Biologische Materialien – dem Bauplan natürlicher Hochleistungswerkstoffe auf der Spur. *Physik in unserer Zeit* 1999; 5: 196–200.
24. Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Hörandner H, Grabner B, Varga F, Ellinger A, Klaushofer K. Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by a  $\beta$ -glycerophosphate pulse. *Bone* 1998; 23: 511–20.
25. Zizak I, Paris O, Roschger P, Bernstorff S, Amenitsch H, Klaushofer K, Fratzl P. Investigation of bone and cartilage by synchrotron scanning SAXS and -XRD with micrometer spatial resolution. *J Appl Cryst* 1999; 33: 820–3.
26. Paris O, Zizak I, Lichtenegger H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. Analysis of the hierarchical structure of biological tissues by scanning x-ray scattering using a micro-beam. *Cell Mol Biol* 2000; 46: 993–1004.
27. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop* 1985; 200: 87–98.
28. Glimcher MJ. Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds. *Phil Trans R Soc London* 1984; B304: 479–508.
29. Wachtel E, Weiner S. Small-angle x-ray scattering study of dispersed crystals from bone and tendon. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1651–5.
30. Grynpas MD, Bonar LC, Glimcher MJ. X-ray diffraction radial distribution function studies on bone mineral and synthetic calcium phosphates. *J Material Sci* 1985; 19: 723–36.
31. Sasaki N, Sudoh Y. X-ray pole figure analysis of apatite crystals and collagen molecules in bone. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 361–7.
32. Roschger P, Plenk H Jr, Klaushofer K, Eschberger J. A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: Backscattered electron image grey-levels correlated to Ca-K $\alpha$  line intensities. *Scann Microsc* 1995; 9: 75–88.
33. Roschger P, Fratzl P, Klaushofer K, Rodan GA. Mineralization of cancellous bone after Alendronate and Sodium Fluoride treatment: A quantitative backscattered electron imaging study on minipig ribs. *Bone* 1997; 20: 393–7.
34. Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 1998; 23: 319–26 and 1999; 24: 619–21.
35. Jaeger I, Fratzl P. Mineralized collagen fibrils – a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys J* 2000; 79: 1737–46.
36. Camacho NP, Rinnerthaler S, Paschalis EP, Boskey AL, Fratzl P. Complementary inform-

ation on bone ultrastructure from scanning small angle x-ray scattering and fourier transform infrared spectroscopy. Bone 1999; 25: 287–93.

37. Misof K, Landis WJ, Klaushofer K, Fratzl P. Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. J Clin Invest 1997; 100: 40–5.

38. Grabner B, Landis WJ, Roschger P, Rinnerthaler S, Peterlik K, Klaushofer K, Fratzl P. Age- and genotype dependence of bone material properties in the osteogenesis imperfecta murine model (oim). Bone 2000; submitted.

**Korrespondenzadresse:**

*o. Univ.-Prof. Dr. Peter Fratzl  
Erich Schmid Institut für Materialwis-  
senschaft,  
Österreichische Akademie der Wissen-  
schaften und Institut für Metallphysik,  
Montanuniversität Leoben  
A-8700 Leoben, Jahnstraße 12  
e-mail: fratzl@unileoben.ac.at*

# Mitteilungen aus der Redaktion

## Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

☒ [Bilddatenbank](#)

☒ [Artikeldatenbank](#)

☒ [Fallberichte](#)

## e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ [Bestellung e-Journal-Abo](#)

## Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)