

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Chirurgisches Forschungslabor
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Scanning Acoustic Microscopy
zur Beurteilung von neu gebildetem Knochen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

vorgelegt von

Ursula Christine Winkler-Budenhofer
aus Wasserburg am Inn

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Reiner Bartl

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Volkmar Jansson

Prof. Dr. med. Willibald Permanetter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2007

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	6
1.1. Theoretische Grundlagen	6
1.1.1. Aufbau und Biomechanik von Knochengewebe.....	6
1.1.2. Untersuchungsverfahren zur Beurteilung von Stabilität, Struktur und Mineralisationsgehalt von Knochen	10
1.2. Ultraschallmikroskopie - Entwicklung und Stand der Forschung	15
1.2.1. Geschichtlicher Überblick	15
1.2.2. Bisherige Anwendung zur Untersuchung von Knochengewebe	18
1.3. Aufgabenstellung.....	22
2. Untersuchungsmaterial und Methoden	24
2.1. Das Ultraschallmikroskop	24
2.1.1. Technische Geräteinformation.....	26
2.1.2. Aufbau und Funktionsprinzip	27
2.1.2.1. Linse.....	28
2.1.2.2. Transducer und Signalverarbeitung	29
2.1.2.3. Kopplungsmedium.....	29
2.1.3. Bildgenerierung.....	30
2.2. Probengewinnung	35
2.2.1. Tierversuche	35
2.2.2. Erstellung der histologischen Präparate	37
2.2.3. Bearbeitung für die Ultraschallmikroskopie.....	37
2.3. Mikroradiographie (MR).....	39
2.4. Scanning Acoustic Microscopy (SAM).....	40
2.4.1. Erstellung der akustischen Bilder.....	40
2.4.2. SAM als Bilderzeugungsmethode: Qualitative Darstellung von Knochen	42
2.4.3. Methodenvergleich SAM versus MR.....	42
2.4.3.1. Qualitativer Vergleich	42
2.4.3.2. Quantitativer Vergleich	43
2.4.4. Beurteilung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe	44
2.5. Statistische Analyse	45
3. Ergebnisse	46
3.1. SAM als Bilderzeugungsmethode: Qualitative Darstellung von Knochengewebe.....	46
3.2. Methodenvergleich SAM versus MR	48
3.2.1. Qualitativer Vergleich.....	48
3.2.2. Quantitativer Vergleich.....	52
3.3. Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften von Knochengewebe	57
4. Diskussion	60
4.1. Diskussion von Material und Methoden.....	60
4.1.1. Versuchsmodell	60
4.1.2. Präparatherstellung	62
4.1.3. Ultraschallmikroskopie	65
4.2. SAM zur Darstellung von neu gebildetem Knochen	68
4.3. Methodenvergleich: SAM versus MR	70
4.4. Inhomogenität und elastomechanische Eigenschaften von Knochengewebe	75
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis.....	84

Anhang	95
Abkürzungsverzeichnis	98
Danksagung.....	99
Curriculum vitae	100
Publikationen	102

1. Einleitung

Bei der Beurteilung von Knochengewebe, insbesondere von neu gebildetem Knochen, stellt die Erfassung makroskopischer und mikroskopischer Strukturmerkmale sowie deren Wechselwirkungen zueinander, welche die Mechanik des Knochens bestimmen, ein Hauptanliegen der osteologischen Forschung dar.

Scanning Acoustic Microscopy (SAM) verspricht ein neues bildgebendes Verfahren zu sein, das die Möglichkeit zur nicht invasiven Beurteilung der biomechanischen Eigenschaften von Knochen auf mikroskopischer Ebene bieten soll (Qin et al. 2004, Katz et al. 1997) und dabei eine Auflösung ähnlich der des Lichtmikroskops aufweist (Liu et al. 2004, Katz et al. 2003). Die vorliegende Arbeit befasst sich im Rahmen dessen mit dem Thema „Scanning Acoustic Microscopy zur Beurteilung von neu gebildetem Knochen“.

1.1. Theoretische Grundlagen

1.1.1. Aufbau und Biomechanik von Knochengewebe

Der komplexe, hierarchische Aufbau von Knochen auf makroskopischer, mikroskopischer sowie nanoskopischer Ebene macht ihn zu einem äußerst anisotropen, heterogenen und inhomogenen Material, dessen biomechanisches Verhalten nur schwer quantifizierbar ist (Rho et al. 1998).

Man unterscheidet zwischen Geflechtknochen, der während der Entwicklung und Knochenneubildung auftritt, und Lamellenknochen, der in Spongiosa und Kompakta, bei Röhrenknochen Kortikalis genannt, unterteilt wird. Lamellenknochen besteht typischer Weise aus Osteonen, die aus einem Zentral-Kanal (Havers-Kanal), um den mehrere (3 bis 20) so genannte Speziallamellen verlaufen, gebildet werden. Zwischen den Osteonen befinden sich Schaltlamellen, die zu ab- bzw. umgebauten Osteonen gehören (Junqueira et al. 1996). Nach außen zum Periost und nach innen

zum Endost hin wird kortikaler Knochen durch Generallamellen begrenzt. Die Lamellen werden durch Osteozyten, Verlaufsrichtung und Steigungswinkel der Kollagenfasern, die den jeweiligen lokalen Beanspruchungen des Knochens angepasst sind, sowie Mineralisationsgehalt charakterisiert.

Der geschilderte Aufbau gilt auch für den spongiösen Knochen, jedoch ist die Anordnung der genannten Strukturen nicht derart systematisch wie die der Kortikalis.

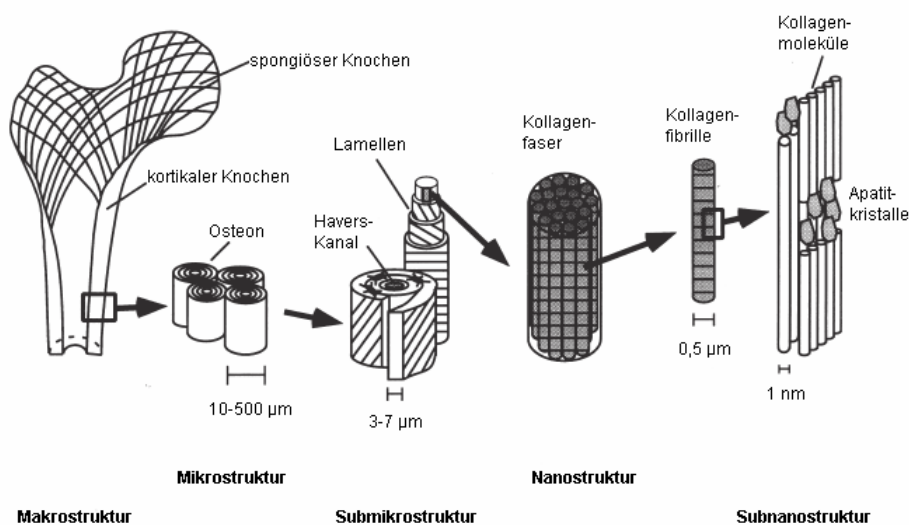


Abb. 1: Struktureller Aufbau und hierarchische Organisation von Knochengewebe nach Rho et al. (1998)

Die Biomechanik des Knochens kann zum einen durch dessen Stabilität beschrieben werden, also durch die Beständigkeit des in einem stabilen Gleichgewicht stehenden, durch innere Kräfte zusammengehaltenen Gewebes, auch unter Einwirkung äußerer Kräfte, solange diese eine bestimmte Stärke nicht überschreiten (Meyers enzyklopädisches Lexikon 1978). Die Stabilität von Knochengewebe wird also durch die Fähigkeit definiert, einer aus einem stabilen Gleichgewicht führenden äußeren Kraft entgegenzuwirken und nach Beendigung derselben bzw. durch auftretende Rückstellkräfte in den stabilen Zustand zurückzukehren.

Demgegenüber beschreibt die Elastizität die Fähigkeit, eine durch äußere Kräfte verursachte Form- oder Volumenänderung rückgängig zu machen, d.h. die ur-

sprüngleiche Form wieder einzunehmen (Meyers enzyklopädisches Lexikon 1978). Im Bezug auf Knochengewebe wird die Rückstellkraft des Kristallgitters charakterisiert. Ein Maß für das elastische Verhalten stellt der Elastizitätsgrad η_e dar:

$$\eta_e = \frac{W_2}{W_1}$$

Dabei beschreibt W_1 die dem Gewebe durch äußere Belastung zugeführte Formänderungsarbeit und W_2 die nach Entlastung durch Rückbildung der Formänderung freigesetzte mechanische Arbeit.

Für den vollkommen elastischen Körper hat η_e den Wert Eins, für den vollkommen unelastischen, also plastischen Körper, Null.

Die Biomechanik des Knochengewebes wird wesentlich durch den großen Volumenanteil an Hohlräumen sowie Spongiosabälkchen (Trabekel), die gemäß der mechanischen Hauptbelastungsrichtung (Trajektorien) ausgerichtet sind, bestimmt. Dadurch wird eine hohe mechanische Stabilität bei minimalem Materialbedarf erreicht (Deetjen et al. 2005). Bedeutend für die mechanische Belastbarkeit ist auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die zu etwa 50 % aus Mineralien bzw. Kristallen (Kalziumhydroxylapatit und andere „Kalziumphosphate“), zu 25% aus organischen Verbindungen (vor allem Kollagen Typ I) und zu 25% aus Wasser, das vorwiegend als Hydratationsmantel die Hydroxylapatitkristalle umgibt, gebildet wird (Junqueira et al. 1996). Weiterhin liegen in der extrazellulären Matrix Induktorsubstanzen (Zytokine, Knochenwachstumsfaktoren) vor, die die Differenzierung und Funktion der Zellen kontrollieren. Dabei stellen der Mineralisationsgrad des Knochens (Burstein et al. 1975) sowie Aufbau und Ausrichtung der Lamellen bedeutende Parameter für dessen Festigkeit dar und beeinflussen somit wesentlich das biomechanische Verhalten von Knochen (Turner et al. 1995, Ascenzi 1988).

Die Festigkeit des Knochens wird daher stark von seiner gesamten Architektur bestimmt.

In der experimentellen Untersuchung von Knochen, insbesondere von neu gebildetem Knochengewebe, besteht ein Hauptanliegen in der Erfassung seines strukturellen Aufbaus auf makroskopischer wie mikroskopischer Ebene sowie in der Beurteilung der funktionellen und mechanischen Eigenschaften und der Wechselwirkungen der einzelnen, hierarchisch gegliederten Strukturen zueinander. Die Problematik in der Erfassung dieser Eigenschaften liegt in der Vielfalt der Faktoren, die zusammen die Biomechanik des Knochens bestimmen, wie Mineralisationsgehalt, Verlauf der kollagenen Fasern, Anordnung der Trabekel – also Zusammensetzung und struktureller Aufbau (Rho et al. 1998). Die Beurteilung kann auf jeder strukturellen Ebene von Knochengewebe erfolgen, allerdings wird immer nur eine Komponente erfasst, sodass die erhobenen Werte nur innerhalb der entsprechenden Ebene verglichen werden können.

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Gebiet der osteogenen Wachstumsfaktoren zu einem bedeutenden Forschungsbereich entwickelt, da man sich durch diese die Möglichkeit einer biologischen Regeneration und Reparatur von Knochen- und Knorpelgewebe erhofft.

1965 entdeckte Urist eine zur Osteoinduktion fähige Substanz der Knochenmatrix und bezeichnete diese als Bone Morphogenic Protein (BMP) (Urist 1965). Schließlich wurden die physiologischen Eigenschaften der BMPs untersucht (Knutsen et al. 1993, Wozney 1992, Wozney 1989) und deren übergeordnete Bedeutung in der Embryogenese sowie im erwachsenen Organismus als Wachstums- und Differenzierungsfaktor nicht nur für Knochengewebe erkannt (Dean et al. 2004, Wozney 1998, Lefer et al. 1992). Insbesondere in der Orthopädie, Traumatologie und Zahnheilkunde stellt der Einsatz von BMPs eine viel versprechende Methode dar (Gupta et al. 2005, Nakashima 2005, Nakashima et al. 2003, Wozney 2002).

Insgesamt konnten bis heute 47 verschiedene BMPs identifiziert werden, die alle unterschiedliche Potenz zur Induktion von Zellwachstum, Apoptose und Zelldifferenzierung besitzen (Bramlage et al. 2005). Dadurch entsteht letztlich auch vitales Knorpel- und Knochengewebe mit blutbildendem Knochenmark (Wozney 1989).

Heute werden rekombinant hergestellte osteogene Wachstumsfaktoren wie z.B. Osteogenic Protein-1 (= BMP 7), das auch in der dieser Untersuchung vorausgehenden Studie verwendet wurde, tierexperimentell untersucht (Regauer 2005, Cook

et al. 2003, Gerhart et al. 1996) und auch bereits klinisch eingesetzt (Ristiniemi et al. 2007, Gupta et al. 2005, Friedlaender et al. 2001, Johnson et al. 2000, Johnson et al. 1988).

Die Entwicklung biokompatibler Implantatstoffe unter der Verwendung von BMPs erfordert Möglichkeiten zur Beurteilung des neu gebildeten Knochengewebes bereits auf mikroskopischer Ebene, wofür derzeit die Möglichkeiten noch begrenzt sind.

1.1.2. Untersuchungsverfahren zur Beurteilung von Stabilität, Struktur und Mineralisationsgehalt von Knochen

Zur quantitativen und qualitativen Beurteilung von Knochengewebe wurden verschiedene Untersuchungsmethoden etabliert.

Das älteste Verfahren zur Darstellung und morphologischen Beurteilung von Knochen stellt die konventionelle Röntgenuntersuchung dar, wobei die Bildgebung durch Struktur und Mineralisationsgehalt des Gewebes bestimmt wird. Basierend auf Röntgenstrahlung wurden zahlreiche andere, nicht invasive Methoden entwickelt, wie auch die Computertomographie (CT). Die quantitative CT liefert dreidimensionale Bilder und ermöglicht Aussagen zum strukturellen Aufbau, wobei das zu geringe Auflösungsvermögen keine histomorphometrische Charakterisierung von z.B. einzelnen Trabekeln erlaubt (Prevrhal et al. 1998, Reichel et al. 1998). Die Mikro-CT ist wegen seiner maximalen Ortsauflösung von 2 bis 30 µm ebenfalls nur begrenzt zur mikrostrukturellen Analyse einsetzbar (Cooper et al. 2004, Jones et al. 1994, Engelke et al. 1999). Weitere bildgebende Verfahren auf der Basis von Röntgenstrahlung zur Beurteilung von Knochen stellen die Röntgenabsorptiometrie (Einhorn 2003) als Single-X-Ray-Absorptiometrie (SXA) (Felsenberg et al. 1999, Qin et al. 1999) sowie als Dual-X-Ray-Absorptiometrie (DEXA) (Cherian et al. 2000, Felsenberg et al. 1999, Jergas et al. 1999) dar, welche neben der Bildgebung die Quantifizierung von Knochenmineraldichte bzw. -gehalt ermöglichen. Die genannten Verfahren erlauben eine in vivo-Beurteilung von Knochengewebe. Die Magnetresonanztomographie (MRI) bietet den Vorteil einer hochaufgelösten strukturellen Darstellung von Knochengewebe ohne Strahlenbelastung für den Patienten (Hudelmaier et al. 2005).

Histologische Untersuchungen wie z.B. Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie erlauben eine genauere Beurteilung der morphologischen Eigenschaften von Knochengewebe (Regauer et al. 2005, Schortinghuis et al. 2003, Reichel et al. 1998, Markel et al. 1991), wobei diese Methoden nicht in vivo anwendbar sind.

Neben der Morphologie wird Knochengewebe durch seine biomechanischen Eigenschaften wie Stabilität oder Elastizität charakterisiert. Zu deren Quantifizierung dienen biomechanische Messungen wie der 4- bzw. 3-Punkt-Biegeversuch (Nonaka et al. 2006, Regauer et al. 2005). Weitere Verfahren zur Erfassung biomechanischer Eigenschaften von Knochengewebe basieren auf Torsion oder axialer Kompression (Reichel et al. 1998). Diese Methoden sind allerdings destruktiv und nur ex vivo durchführbar. Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Verfahren zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von Knochen auf mikrostruktureller Ebene stellt das Nanoindenter-Verfahren dar, mit dem Aussagen über die Knochenhärte in einer Auflösung von bis zu 400 nm gewonnen werden können (Turner et al. 1999, Rho et al. 1997, Rho 1996).

Eine bedeutende bildgebende, quantitative Untersuchungsmethode zur Histomorphometrie von kalzifiziertem Knochengewebe stellt die Mikroradiographie (MR) dar, die auf der Basis von Röntgenstrahlung Strukturen im mikroskopischen Bereich visualisiert. Dabei wird der Kontrast des Bildes letztlich durch den Mineralisationsgehalt des untersuchten Gewebes bestimmt (Graham 1955). Bereits in den 50er Jahren wurde die Mikroradiographie erstmals zur Beurteilung von Knochengewebe (Engstrom et al. 1953, Sissons 1950) oder anderem kalzifiziertem Gewebe wie z.B. Zähnen (Bergman et al. 1954) verwendet. Dieses Verfahren erlaubt die Messung des Mineralisationsgrades sowie der Mineralisationsverteilung innerhalb des Knochen- (Boivin et al. 2002, Hobson et al. 1997) bzw. Zahngewebes (Wang et al. 2005). Weiterhin ermöglicht diese Methode die quantitative Beurteilung von Knochenwachstum bzw. neu gebildeter Knochenfläche (Schortinghuis et al. 2003). In der Zahnheilkunde wird die Mikroradiographie häufig angewendet, um den Zusammenhang zwischen der Mineralisation und der Pathogenese von Karies zu erforschen (Smith et al. 2005, Smith et al. 2005, Ogaard et al. 1986, Bergman et al. 1954). Die Mikroradiographie hat sich zu einer Standardmethode für die Untersuchung von kal-

zifiziertem Gewebe entwickelt und ist auch heute noch von Bedeutung (Bollet-Quivogne et al. 2005, Roldan et al. 2004, Qin et al. 2001, Hobson 1998, Nyssen-Behets et al. 1994). Allerdings wird die Mikroradiographie in Zukunft aufgrund der nachlassenden Produktion der notwendigen Photoplatten immer weniger verfügbar sein.

Ein weiteres, relativ neues Verfahren zur Quantifizierung der Dichte und Mineralisation von Knochengewebe stellt die Back Scattered Electron Microscopy (BSE) dar (Boyde et al 2005, Roschger et al. 1997, Boyde et al. 1996, Roschger et al. 1995). In Abhängigkeit von der Ordnungszahl des untersuchten Materials wird ein Teil des auftreffenden Elektronenstrahls reflektiert und ein Grauwert histogramm erstellt. Das vorherrschende Atom von Knochengewebe stellt Kalzium dar, welches eine relativ hohe Ordnungszahl besitzt, sodass die Intensität des zurückgeworfenen Elektronenstrahls vor allem durch den Mineralisationsgrad des Knochengewebes bestimmt wird. Durch Analyse der Mittelwerte des Grauwert histogramms wird auf Mineralisationsgehalt und –verteilung innerhalb einzelner Trabekel geschlossen (Banse et al. 2005, Abendroth et al. 1996). Ein bedeutender Vorteil gegenüber anderen Methoden zur Knochendichtemessung besteht darin, dass Unterschiede im Grad der Mineralisation gemessen werden können (Roschger et al. 1998, Boyde et al. 1993).

Scanning Acoustic Microscopy (SAM) stellt eine neue bildgebende, nicht invasive Technik dar, die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung zur nicht destruktiven und daher beliebig wiederholbaren Untersuchung von biologischem Gewebe gewonnen hat.

Als Bilderzeugungs- und Bildanalyzesystem besitzt SAM ein räumliches Auflösungsvermögen ähnlich dem des Lichtmikroskops (Yu et al. 1995). Dabei können Materialien untersucht werden, die optisch undurchsichtig sind (Bumrerraj et al. 2001). Diese nicht invasive Methode wird über die Bildgebung hinaus verwendet, um biomechanische Eigenschaften homogener Substanzen und biologischer Gewebe zu charakterisieren (Kessler et al. 2003, Rho 1996, Hirsekorn et al. 1994).

1.1.3. Ultraschall

Die Methode der Scanning Acoustic Microscopy beruht auf der Verwendung von hochfrequenten Schallwellen, deren Verlauf von den elastischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials bedingt wird. Gemäß des jeweiligen Anwendungsgebiets wird der passende Frequenzbereich ausgewählt. Dabei werden Frequenzen von 5 MHz bis 8 GHz verwendet (Quate 1985, Hadimioglu et al. 1984).

Von Ultraschall spricht man ab einer Frequenz von über 20 kHz, für welche das menschliche Gehör nicht mehr sensibel ist. Jedoch können einige Tiere diesen Frequenzbereich durchaus noch hören sowie auch selbst erzeugen und ihn – wie z.B. Fledermäuse – zu Navigationszwecken nutzen, indem sie durch den reflektierten Anteil ihrer gesendeten Schallwellen Distanzen berechnen (Harms 1998).

Da Ultraschallwellen mechanische Wellen sind, benötigen sie zu ihrer Ausbreitung ein elastisches Medium wie Gas, Flüssigkeiten oder Festkörper, wohingegen sie sich nicht wie Lichtwellen im Vakuum fortbewegen können (KSI Germany 2003, Yu et al. 1995). Treffen die Schallwellen auf Grenzschichten zweier Materialien verschiedener Dichte und Elastizität, wird ein Teil des Schalls reflektiert, während der Rest sich weiter fortbewegt. Dabei wird der Verlauf der Schallwellen direkt von den elastischen Eigenschaften des Materials bestimmt (Yu et al. 1995).

Physikalisch betrachtet lässt sich eine Ultraschallwelle durch deren Länge und Amplitude charakterisieren.

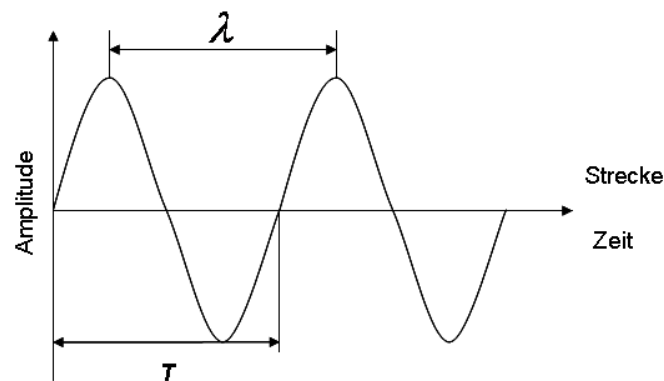


Abb. 2: Wellenlänge (λ) und Periode (T) einer Ultraschallwelle

Die Frequenz wird definiert als Anzahl der Wellen innerhalb einer Sekunde und besitzt die Einheit Hertz [$1\text{Hz} = \frac{1}{s}$]. Die Zeit, die für eine komplette Welle benötigt wird, wird als Periode T bezeichnet und in Sekunden s angegeben. Dadurch ergibt sich für die Frequenz f :

$$f = \frac{1}{T} \quad [1\text{Hz} = \frac{1}{s}]$$

Die theoretische Eindringtiefe der Schallwelle entspricht dessen Wellenlänge λ , wobei die tatsächliche Ausbreitungsfähigkeit auch von den elastischen Eigenschaften des Mediums und der verwendeten Frequenz bedingt wird (Atalar 1985).

Die Schallgeschwindigkeit v berechnet sich aus Frequenz f und Wellenlänge λ :

$$v = f * \lambda = \frac{\lambda}{T} \quad [\frac{m}{s}]$$

Dabei hängt die Schallgeschwindigkeit von der Elastizität der Verbindung der Moleküle, welche durch den Elastizitätskoeffizienten C angegeben wird, sowie der Dichte σ ab, sodass sich Schallwellen in unterschiedliche Materialien mit verschiedenen Geschwindigkeiten ausbreiten.

Aufgrund dieser Zusammenhänge beträgt die durchschnittliche Schallgeschwindigkeit in Knochen ($\rho = 1700 \text{ kg/m}^3$) 3600 m/s.

Schallgeschwindigkeit v und Dichte σ eines Materials bestimmen dessen akustische Impedanz z , welche in Megarayl [Mrayl] angegeben wird und die Übertragungseigenschaften eines Mediums beschreibt:

$$z = \sigma * v \quad \left[1 \text{ Mrayl} = 1 * 10^6 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2 * \text{s}} \right]$$

Die akustische Impedanz, auch Schallwellenwiderstand genannt, ist eine material-spezifische Größe, die auch durch das Verhältnis der aufzuwendenden Auslenkkraft oszillierender Teilchen (Schalldruck ρ) zu ihrer Ortsänderungsgeschwindigkeit (Schallfluss v) beschrieben wird und wiederum von Dichte und Elastizität der Verbindung der Moleküle abhängt.

$$z = \frac{\rho}{v} = (\sigma * C)^{\frac{1}{2}} \quad \left[\frac{\text{Ns}}{\text{m}^2} \right]$$

Ultraschall kann somit Materialien wie menschliches Gewebe durchdringen, ohne dieses zu zerstören oder ihm zu schaden. Aufgrund dieser Eigenschaften verwendet man ihn zur nicht invasiven Untersuchung von organischem Gewebe.

1.2. Ultraschallmikroskopie - Entwicklung und Stand der Forschung

1.2.1. Geschichtlicher Überblick

Die Idee für ein nicht invasives akustisches Bildgenerierungssystem in der Medizin geht auf den Wiener Neurologen und Psychiater Karl Theodor Dussik zurück, der bereits 1942 erste erfolgreiche Untersuchungen am Gehirn mit Ultraschall – seinerseits als Hyperphonographie bezeichnet - aufweisen konnte (Shampo et al 1995). 1949 stellte der russische Wissenschaftler Sokolov fest, dass die Wellenlänge von

Schall mit einer Frequenz von 3 GHz in Wasser der Wellenlänge von grünem Licht entspricht. Er entwarf das Konzept für ein akustisches Mikroskop (Sokolov 1949). Das erste praktisch anwendbare Scanning Acoustic Microscope wurde 1974 von Lemons und Quate entwickelt, um mit einer Auflösung im μm -Bereich akustische Eigenschaften von homogenen Materialien zu untersuchen (Lemons et al. 1979, Lemons et al. 1974). Zunächst wurde diese neue Methode ausschließlich zur Untersuchung von homogenen Materialien aus Technik und Industrie erforscht (Hirse Korn et al. 1995, Kulik et al. 1990, Ishikawa et al. 1989, Gilmore et al. 1986, Weaver et al. 1985). SAM stellt heute eine bedeutende Methode dar, um industriell verwendete, homogene Materialien wie Keramik nicht invasiv zu untersuchen und zu bewerten sowie in diesen kleinste Fehler bzw. Strukturunebenheiten zu verifizieren (Denisova et al. 2004, Maebayashi et al. 2004, Kessler et al. 2003, Berezina et al. 2000, Zhai et al. 1997). SAM findet insbesondere Anwendung in der Halbleitertechnik, aber auch in der Automobilindustrie (Todt 2005, Balk et al. 2002) und in der Luft- und Raumfahrttechnik (Göbel et al. 2003).

Bereits Ende der 70er Jahre wurden erste Versuche unternommen, SAM auch auf dem Gebiet der Biologie und Medizin anzuwenden (Katz et al. 1984, Hildebrand et al. 1981, Johnston et al. 1979, Marmor et al. 1977).

SAM wurde verwendet, um Knochen (Bumrerraj et al. 2001, Hasegawa et al. 1995, Zimmerman et al. 1990), aber auch andere Gewebe des Bewegungsapparates wie z.B. intervertebrale Bandscheiben (Johnson et al. 2002) zu untersuchen. Auch für kardiovaskuläre Fragestellungen wurde SAM häufig zu Forschungszwecken eingesetzt. So wurden Aortenklappen (Lu et al. 2000), Koronararterien (Machado et al. 2002) oder arteriosklerotische Gefäße (Saijo et al. 1998) untersucht sowie gesundes und infarziertes Myocard auf mikroskopischer Ebene verglichen (Saijo et al. 1997) bzw. die akustischen Eigenschaften von Myozyten gesunder und pathologischer Gewebe analysiert (Masugata et al. 1999). In der Gastroenterologie fand SAM Anwendung zur Erforschung mechanischer Eigenschaften einzelner Wandschichten des Dünndarms (Jorgensen et al. 2001) oder von Magenkarzinomgewebe (Saijo et al. 1991). Auf dem Gebiet der Urologie wurde SAM bereits genutzt zur Charakterisierung der Wandschichten von Urethra (Andersen et al. 2003) sowie zur Untersuchung

veränderter Eigenschaften von Glomerulae bei Glomerulonephritiden (Hitomi et al. 2000). In der Ophthalmologie konnten neue Erkenntnisse bezüglich des Zusammenhangs von Dicke der Sklera und der uvealen Effusion gewonnen werden (Lam et al. 2005). SAM wurde auch verwendet, um Gewebe bei entzündlichen und neoplastischen Hauterkrankungen zu untersuchen (Barr et al. 1991)

SAM erlaubt die Beurteilung von lebenden Zellen (Hildebrand et al. 1981), in Alginat eingekapselter Zellen (Klemenz et al. 2003) oder der Zelladhäsion von Osteoblasten an verschiedenen, in der Orthopädie verwendeten Materialien (Myrdycz et al. 1999). Bei der Untersuchung von Chromosomen konnte mit der Ultraschallmikroskopie ein zum konventionellen Bandmuster differierendes abgebildet werden (Rugar et al. 1980). Auch physiologische Vorgänge wie der Wundheilungsprozess wurden durch SAM beurteilt (O'Brien et al. 1981).

In den letzten Jahren hat sich das Gebiet der Ultraschallmikroskopie zu einem bedeutenden Forschungsfeld entwickelt. So wurden im Zeitraum von 1990 bis 1994 nur 34 Artikel zu diesem Thema veröffentlicht, von 2002 bis 2006 aber 245. Dies unterstreicht die zunehmende Bedeutung, die dieser Technik zugeschrieben wird.

Ein bedeutender Vorteil der SAM besteht in der Möglichkeit, nicht nur die Oberfläche eines Präparates zu untersuchen, sondern auch tiefere, innerhalb der Probe gelegene Ebenen (Briggs 1992, Quate 1979, Douglas 1978). Dies ist auch bei Materialien möglich, die optisch undurchsichtig sind (Katz et al. 1993, Lemons et al. 1974). Darüber hinaus kann frisches wie auch fixiertes biologisches Gewebe untersucht werden, da bei dieser Technik Wasser als Kopplungsmedium verwendet wird, um die akustischen Wellen zu übertragen und somit das Präparat keine Feuchtigkeit verliert (Bumrerraj et al. 2001, Katz et al. 1993). Demgegenüber erfordert das BSE (= Scanning Electron Microscopy [SEM]) eine Vakuumkammer, um das Präparat zu untersuchen, sodass nur eingebettete Proben untersucht werden und Artefakte wie Risse entstehen können (Katz et al. 1993).

Die mit dem Ultraschallmikroskop potentiell erreichbare Auflösung wird neben der Frequenz auch durch die Wellenlänge des Schalls, die proportional zur Auflösung ist, limitiert (Quate 1985). Aus einer Verkürzung der Wellenlänge resultiert also eine

höhere Auflösung. Durch Verwendung von kryogenen Kopplungsmedien wie flüssigem Helium konnte durch die extrem niedrigen Temperaturen eine Verringerung der Schallgeschwindigkeit und somit eine kürzere Wellenlänge bei konstanter Frequenz erzielt werden (Yu et al. 1995, Quate 1985), sodass bei 8 GHz und Verwendung von Helium als Kopplungsmedium eine Auflösung von 200 Å (= 20 nm) erreicht wurde (Quate 1985, Hadimioglu et al. 1984). Von großem Interesse auf dem Gebiet der Ultraschallmikroskopie ist die Möglichkeit zur nicht invasiven Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften von Festkörpern und biologischen Geweben (Denisova et al. 2004, Yu et al. 1995, Hirsekorn et al. 1994, Briggs et al. 1993), wobei dies meist durch Bestimmung der akustischen Impedanz bzw. des Elastizitätskoeffizienten erfolgt, indem die Laufzeit des Ultraschalls im Präparat ermittelt wird (Raum 2002, Turner et al. 1999, Hasegawa et al. 1995, Turner et al. 1995).

1.2.2. Bisherige Anwendung zur Untersuchung von Knochengewebe

Die Ultraschallmikroskopie wurde schon früh als viel versprechende Methode erkannt, um nicht invasiv histomorphometrische sowie biomechanische Eigenschaften von Knochen zu untersuchen und neue Erkenntnisse über dieses Gewebe zu erhalten.

Die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Untersuchung von Knochengewebe durch die Ultraschallmikroskopie wurden unter anderem von den Arbeitsgruppen um Zimmerman und Katz durchgeführt (Katz et al. 1993, Zimmerman et al. 1989). Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz konnten sie schon eine Auflösung von 140 µm erreichen, bei der Anwendung von 600 MHz bis zu 1,7 µm. In einer älteren Untersuchung wurde bereits die Anisotropie von Knochen mit dem Scanning Acoustic Microscope nachgewiesen (Turner et al. 1995).

So wurde in einer Studie von Katz und Meunier (1993) bei der Untersuchung von Osteonen mit SAM bereits festgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen Grauwert und Materialdichte bzw. elastomechanischen Eigenschaften des fokussierten Bereichs besteht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die äußersten Lamellen des Havers'schen Systems dunkler abgebildet werden und deshalb eine niedrigere akustische Reflektivität besitzen. Teilweise schien eine Verbindung zwischen den äußeren

Lamellen verschiedener Osteone zu bestehen, wohingegen im elektronenmikroskopischen Vergleich diese deutlich abgegrenzt waren (Katz et al. 1993).

Eine Untersuchung von Shieh et al. (1995) zu den Umbauvorgängen an Knochendefekten zeigte, dass neu gebildetes periostales wie endostales Gewebe eine große Grauwertvarianz und somit deutliche Unterschiede in der akustischen Impedanz aufweisen. Demgegenüber stellen sich intrakortikale Regionen als sehr homogen dar mit hoher akustischer Impedanz (Shieh et al. 1995).

Eine weitere Studie von Harten et al. (1997) befasste sich ebenfalls mit der klinisch bedeutenden Problematik der Frakturheilung, indem die Kallusbildung mittels SAM quantitativ durch Bestimmung der akustischen Impedanz und zusätzlich auch im zeitlichen Verlauf beurteilt wurde. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der akustischen Impedanz des Kallusgewebes nach intramembranöser und enchondraler Ossifikation festgestellt sowie ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen Anstieg der durchschnittlichen Impedanz des Kallus und der Wundheilungszeit (Harten et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse konnten an mandibulärem Knochen von Hunden nach Knochendistraktion erhoben werden. Auch hier bestand eine enge Korrelation zwischen akustischer Impedanz und Konsolidierungszeit (Adolphs et al. 2005).

Von ebenso bedeutender, auch klinischer Relevanz ist die Untersuchung von osteoporotischem Knochen, da diese häufige Krankheit ein deutliches Frakturrisiko in sich birgt. Hasegawa et al. stellten in ihrer Studie zu elastischen Eigenschaften von osteoporotischem Knochen (1995) überraschenderweise fest, dass die akustische Schallgeschwindigkeit nicht in osteoporotischem, sondern in gesundem prämenopausalen Knochen am niedrigsten ist. Die höchsten Werte erreicht die Schallgeschwindigkeit in postmenopausalem Knochen einer Vergleichsgruppe gleichen Alters. Ebenso waren die dunklen Flächen niedriger akustischer Impedanz, also geringerer Dichte bzw. Elastizität, in gesundem prämenopausalen Knochen genauso groß wie in osteoporotischem Knochen und auch signifikant größer als in gesundem postmenopausalen Knochen, der deutlich mehr helle Bereiche höherer akustischer Impedanz entsprechend höhere Elastizität bzw. Dichte aufwies. Somit scheint die Messung der akustischen Impedanz kein wesentlicher Prognosefaktor für das Frakturrisiko zu sein (Hasegawa et al. 1995).

Es stellte sich auch die Frage, inwiefern die notwendige Kunststoffeinbettung des Knochens die elastomechanischen Eigenschaften desselben und somit die Messung der akustischen Impedanz beeinflusst. Zu diesem Zwecke verglichen Zimmerman et al. (1994) zum einen uneingebettetes Knochengewebe, zum anderen in Polymethylacrylat eingebettete Proben. Dabei stellte man fest, dass die Kunststoffeinbettung zu signifikant höheren Werten bei der Messung der akustischen Impedanz im Vergleich zu normalem Knochen führt, wobei diese Differenz konstant war, sodass durch Kalibrierung des Messsystems auch von eingebettetem Knochen der reelle Wert der akustischen Impedanz und somit die elastomechanischen Eigenschaften korrekt ermittelt werden können (Zimmerman et al. 1994).

Weiterhin wurde auch die Abhängigkeit der Grauwertdifferenzierung des Bildes vom Reflexionskoeffizienten des betrachteten Knochengewebes untersucht. In einer Studie von Qin et al. (2004) konnte eine starke lineare Abhängigkeit zwischen der durchschnittlichen Helligkeit eines Ausschnittes des SAM-Bildes und dem entsprechenden mittleren Reflexionskoeffizienten des Knochengewebes nachgewiesen werden. Somit kann von einer dunklen Region auf einen niedrigen Reflexionskoeffizienten und auf geringe mittlere akustische Impedanz des betrachteten Knochengebietes geschlossen werden (Qin et al. 2004).

Trotz der zahlreichen Untersuchungen und Überlegungen zur Charakterisierung elastomechanischer Eigenschaften von Knochen durch SAM konnte noch kein standardisiertes Verfahren zur Beurteilung von größeren Knochenbereichen etabliert werden. Zwar wurde von mehreren Autoren eine simultane Messung verschiedener standardisierter Prüfkörper einerseits und des Knochenpräparates andererseits versucht (Bumrerraj et al 2001, Weiss et al 1998, Shieh et al 1995, Zimmerman et al. 1994). Eine nachträgliche Messung an bereits erstellten Bildern wurde allerdings noch nicht durchgeführt.

Bislang wurden durch SAM nur einzelne Osteone bezüglich ihrer Reflektivität untersucht, um davon auf das lokale elastomechanische Verhalten des Knochengewebes zu schließen (Qin et al. 2004, Eckardt et al. 2001, Katz et al. 1993). Eine quantitative Beurteilung von Knochenquerschnitten oder gar größeren „Knochensegmenten“ scheint derzeit aufgrund der Inhomogenität des Knochengewebes nicht möglich. Es

bestehen auch Hinweise darauf, dass von mikroskopischen Knochenstrukturen und deren biomechanischen Eigenschaften, die mit SAM ermittelt werden, nicht auf die Festigkeit des gesamten makroskopischen Knochens geschlossen werden kann (Eckardt et al. 2001).

Der Schwerpunkt der Forschung liegt derzeit auf der Möglichkeit zur elastomechanischen Charakterisierung von Knochen durch SAM, sodass kaum Untersuchungen zur Validität von SAM als Bildgenerierungsmethode, auch nicht zum Zwecke von histomorphometrischen Messungen vorliegen. Wohl aus diesem Grunde existiert noch kein etabliertes, standardisiertes Verfahren zur Bilderzeugung (Qin et al. 2004, Klemenz et al. 2003, Eckardt et al. 2001, Hasegawa et al. 1995, Hildebrand et al. 1984).

Wichtige Arbeitsschritte werden je nach Autor unterschiedlich ausgeführt. Dabei beeinflussen zahlreiche Faktoren Verlauf und Größe des Ultraschallsignals, wodurch die Abbildung eines Präparates verfälscht werden kann. Mögliche Fehlerquellen bestehen bereits bei der Präparatherstellung, die zu Oberflächenartefakten, welche die akustischen Eigenschaften verändern, führen können (Bumrerraj et al. 2001). Auch das Kopplungsmedium beeinflusst die Bilderzeugung z.B. durch Dämpfung des Schalls, woraus eine Kontrastminderung resultiert, und stellt gleichzeitig eine Fehlerquelle dar, wie z.B. durch Schwebstoffe, welche Wellenverlauf und –amplitude verändern (Sharples et al. 2003) oder unterschiedliche Temperaturen des Kopplungsmediums, woraus eine veränderte akustische Impedanz folgt (Eckardt et al. 2001).

Ein weiteres Problem stellt die Heterogenität des Knochengewebes insbesondere während der Wachstumsphase dar, sodass eine Unterscheidung zwischen neuem und kortikalem Knochen mit Problemen behaftet (Harten et al. 1997) und die Anwendbarkeit der SAM dadurch erschwert sein kann. Darüber hinaus wird die Reflexion der Schallwelle bei anisotropen Materialien wie Knochen auch durch die strukturelle Ausrichtung des Gewebes an der Oberfläche bestimmt (Briggs 1992).

Bisher wurde die Validität der Bildgenerierung und Abbildung durch SAM im Vergleich zu einer konventionellen Methode zur histologischen Bildgenerierung wie der Mikroradiographie noch nicht überprüft, d.h. es wurde noch kein quantitativer Ver-

gleich der morphologischen Darstellung unternommen. Es stellt sich die Frage, ob durch SAM Knochenstrukturen verlässlich strukturgleich abgebildet werden, inwiefern die Bildgebung von den bereits genannten Fehlerquellen sowie der Inhomogenität des Knochengewebes beeinflusst wird und somit die erstellten Bilder mit den durch etablierte Methoden erzeugten übereinstimmen. Diese Fragen zur Validität der Bildgebung mit SAM sind besonders von Interesse, da die Mikroradiographie aufgrund der immer geringeren Verfügbarkeit der Photoplatten zukünftig kaum mehr angewendet werden kann. Aus diesem Grunde besteht ein Hauptanliegen in der Etablierung einer zumindest gleichwertigen Methode.

1.3. Aufgabenstellung

Das Ziel der Untersuchung bestand darin, die Anwendbarkeit von SAM zur Charakterisierung histomorphometrischer sowie biomechanischer Eigenschaften von neu gebildetem Knochen zu beurteilen.

Zum einen sollte elaboriert werden, inwiefern SAM als Bildergenerierungsmethode zur qualitativen Darstellung und Beurteilung von Knochengewebe, insbesondere von neu gebildetem Knochen, bei osteologischen Fragestellungen angewendet werden kann. Dabei sollten die Möglichkeiten zur Optimierung der visuellen Hervorhebung verschiedener Knochenstrukturen herausgearbeitet werden, um insbesondere die Abgrenzbarkeit von neu gebildetem Knochen zu kortikalem Knochen zu verbessern.

Den Schwerpunkt der Untersuchung stellte der Methodenvergleich zwischen der Scanning Acoustic Microscopy und der Mikroradiographie als Standardmethode zur histologischen Untersuchung von kalzifiziertem Knochengewebe dar. Die beiden Methoden sollten bezüglich Bildgenerierung und Histomorphometrie qualitativ und quantitativ miteinander verglichen werden.

In einem weiteren Schritt sollte die Möglichkeit der Charakterisierung akustischer Eigenschaften von Knochengewebe mit SAM durch Grauwertanalyse an bereits er-

stellten Bildern und ein daraus möglicher Rückschluss auf Dichte und Elastizität untersucht werden, was eine nicht destruiende biomechanische Beurteilung von Knochen ermöglichen könnte.

2. Untersuchungsmaterial und Methoden

2.1. Das Ultraschallmikroskop

Scanning Acoustic Microscopy (SAM) stellt ein nicht invasives bildgebendes Verfahren auf der Basis von Ultraschall dar, das ein vergleichbares Auflösungsvermögen wie die Lichtmikroskopie aufweist (Liu et al. 2004, Katz et al. 2003). Es bietet die Möglichkeit, mikroskopische Bilder hoher Qualität zu erzeugen und stellt eine viel versprechende Methode dar, nicht invasiv elastische Eigenschaften beurteilen zu können (Yu et al 1995). Dabei können nicht nur Informationen bezüglich der Oberfläche, sondern auch in begrenztem Maße über das Innere eines Präparates gewonnen werden (Briggs 1992, Douglas 1978), wobei die mögliche Eindringtiefe etwa einer Wellenlänge des verwendeten Schalls entspricht (Yu et al. 1995).

Das erste von Lemons und Quate entwickelte Ultraschallmikroskop arbeitete mit zwei konfokal angeordneten Linsen, wobei eine als Sender, die andere als Empfänger der Signale dient und dazwischen das Präparat angebracht wird. Mit diesem Mikroskoptyp können nur sehr dünne Präparate mit einer akustischen Impedanz ähnlich der von Wasser untersucht werden. Außerdem ist die korrekte Anbringung zweier Linsen aufwändig und fehleranfällig.

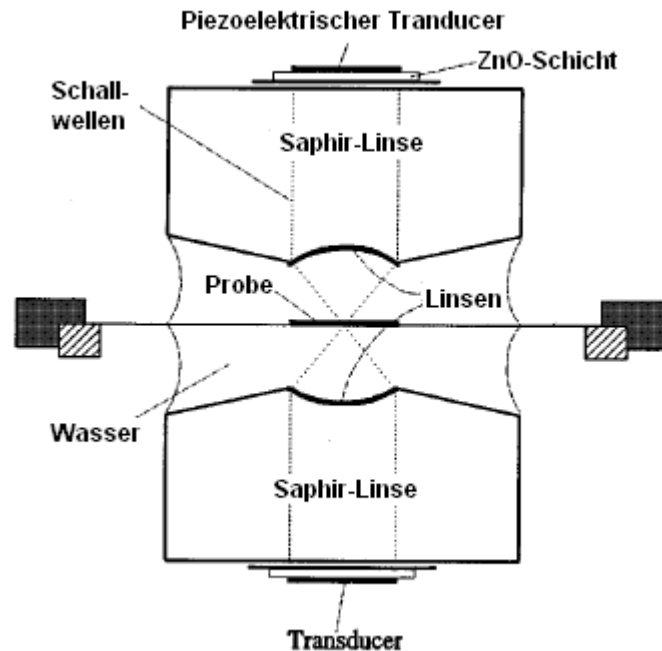


Abb. 3: Linsengeometrie des Transmission Acoustic Microscope nach Yu et al. (1995)

Mittlerweile findet meist nur noch das sogenannte Reflection-SAM Anwendung, bei dem eine Linse gleichzeitig sendet und empfängt. Dieser Typ erlaubt die Untersuchung von dickeren Schnitten sowie von Materialien mit hoher Impedanz. Weiterhin ist die Verwendung von nur einer Linse mit weniger technischen Schwierigkeiten behaftet (Yu et al. 1995).

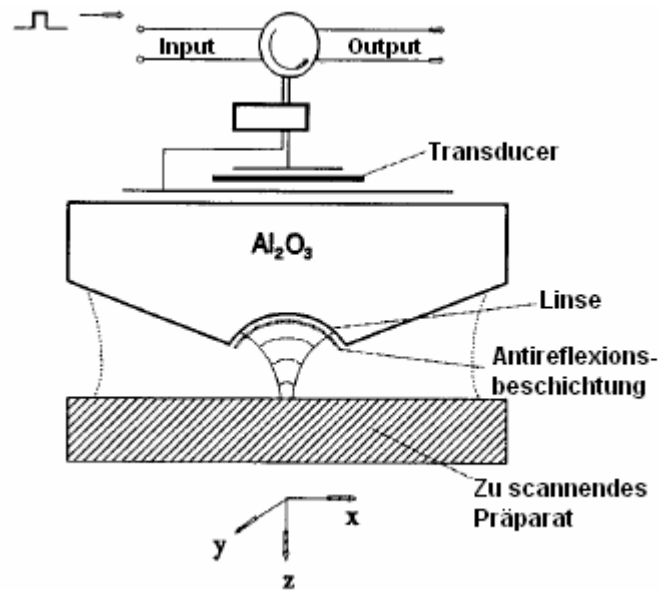


Abb. 4: Schematischer Aufbau des Reflection-SAM nach YU et al. (1995)

Auch in unserer Untersuchung wurde mit einem Reflection-Scanning Acoustic Microscope gearbeitet, sodass sich alle weiteren Beschreibungen auf diesen Typ beziehen.

2.1.1. Technische Geräteinformation

In dieser Untersuchung wurde ein Scanning Acoustic Microscope vom Typ WINSAM 100 (Krämer Scientific Instruments GmbH, Herborn, Germany) verwendet, bei dem durch spezielle Anfertigung der anwendbare Frequenzbereich von 1 bis 100 MHz auf 200 MHz erweitert worden war.

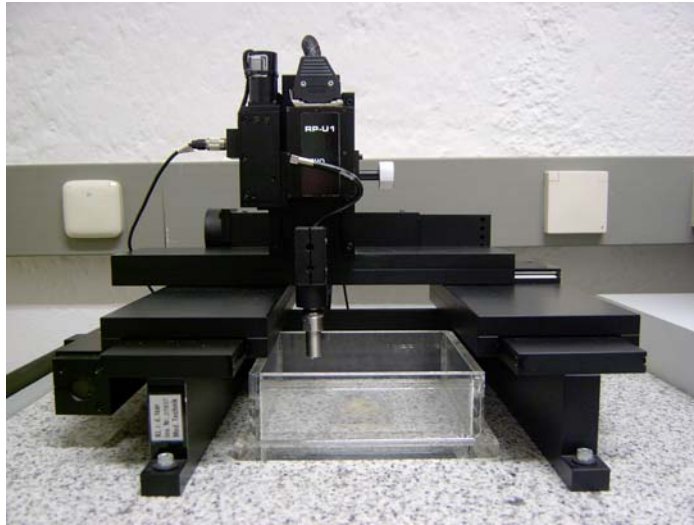


Abb. 5: SAM WINSAM 100 (KSI, Herborn) mit 50 MHz-Linse

Zur Untersuchung der transversalen Knochenschnitte wurde eine 50 MHz-Sonde mit einer Fokusslänge von 10 mm verwendet, mit der eine nominale laterale Auflösung von 30 μm bzw. von 1280 x 1024 pixel erreicht werden kann. Der maximal scanbare Bereich beträgt 300 x 300 mm^2 . Die Scan-Geschwindigkeit schwankt je nach verwendeten Einstellungen zwischen 8 und 1000 mm/s (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003). Die Darstellung des Präparates auf dem Bildschirm erfolgt in bis zu 256 Grauwerten. Das Echosignal wird vollkommen digitalisiert, sodass es durch das On-Screen Digital Oscilloscope als Oszillationen auf dem Monitor des Computers dargestellt wird und dazu synchron das entsprechende Bild zeilenförmig erstellt wird. Somit können direkt anhand des beobachteten Signals die Scan-Parameter verändert werden. Das digitale Oszilloskop besitzt ein maximales Zeitfenster von 50 μs (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003).

2.1.2. Aufbau und Funktionsprinzip

Im Folgenden sollen der allgemeine Aufbau und das Funktionsprinzip eines Reflection-SAM erläutert werden.

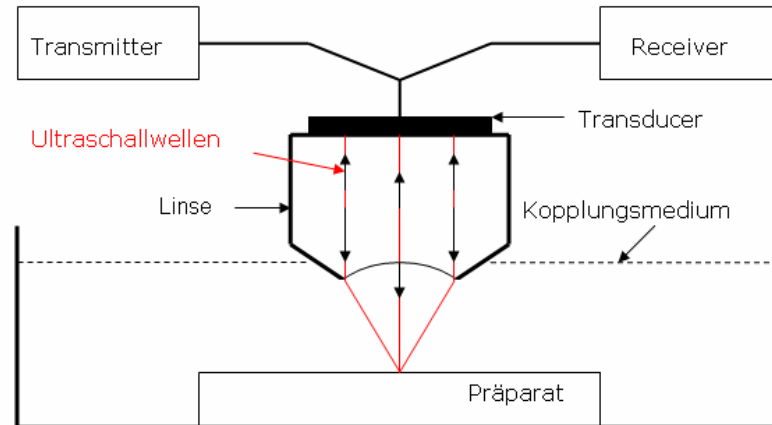


Abb. 6: Funktioneller Aufbau eines SAM

2.1.2.1. Linse

Das Kernstück des Ultraschallmikroskops stellt die akustische Linse aus Saphir (Al_2O_3) dar. Ihre Unterseite ist zur Fokussierung der Ultraschallwellen konkav geformt, wobei der Krümmungsradius 3 mm beträgt. Die probenferne Seite ist flach und wird mit dem Transducer verbunden. Zwischen Saphirlinse und Kopplungsmedium besteht ein großer Impedanzunterschied, was eine hohe Reflexion der durchtretenden Schallwellen zur Folge hat. Um diese zu minimieren, wird die Saphirlinse mit Kalkglas beschichtet, wodurch eine bessere Impedanzanpassung von Saphir und Kalkglas bzw. Kalkglas und Wasser erzielt wird (Quate 1985). Zur Fokussierung wird die Linse motorgesteuert in z-Richtung senkrecht zur Präparatoberfläche bewegt. Die Linse sendet die Ultraschallwellen des Wandlers und empfängt gleichzeitig den reflektierten Schall. Während des Scan-Vorgangs bewegt sich die Linse mit Transducer mit Hilfe eines elektronisch gesteuerten Motors mäanderförmig in x- und y- Richtung über die Präparatoberfläche, um somit alle Punkte zu erfassen (Kessler et al. 2003).

2.1.2.2. Transducer und Signalverarbeitung

Der Transducer, ein piezoelektrischer Halbleiter, dient der Linse als Sender des Schalls und gleichzeitig Empfänger des reflektierten Signals. Entsprechend der Linse wird der zum Frequenzbereich passende Transducer ausgewählt. Im Bereich unter 100 MHz besteht der Transducer aus Lithiumniobat, Quartz, Saphir oder Keramik. Für Frequenzen darüber werden Kristalle aus Zinkoxid eingesetzt (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003).

Vom Transmitter fließen elektrische Wechsellpulse zum Transducer, der diese in hochfrequente Ultraschallwellen umwandelt und zur Linse leitet. Gleichzeitig empfängt der Transducer den reflektierten Schall von der Linse wieder, um ihn dann wiederum in ein elektrisches Signal zu transformieren, das von einem Verstärker aufgenommen wird. Synchron zum Scan-Vorgang wird das reflektierte Signal durch das On-Sreen Digital Oscilloscope vollkommen digitalisiert auf dem Monitor als Oszillation wiedergegeben. Dabei wird die Amplitude des elektrischen Signals als Funktion der Laufzeit des Schalls dargestellt. Je länger die Laufzeit des reflektierten Signals, umso tiefer die Schicht, an der der Ultraschall im Präparat gebrochen wurde. Gleichzeitig wird das für jeden gescannten Bildpunkt gewonnene Echosignal entsprechend seiner Amplitude auf dem angeschlossenen Monitor als spezifischer Grauwert bei einer Auflösung von bis zu 256 Grauwerten abgebildet.

2.1.2.3. Kopplungsmedium

Da Ultraschallwellen mechanische Wellen sind, können sie nur materialgebunden Energie übertragen, eine Ausbreitung im Vakuum ist nicht möglich (Yu et al. 1995). Zur Weiterleitung des Ultraschalls von der Linse auf das Präparat wurde für diese Untersuchung destilliertes Wasser von Zimmertemperatur als Kopplungsmedium verwendet. Dadurch wird der Unterschied der Impedanz verringert, woraus eine bessere Energieübertragung resultiert (Riede 2000). Durch die Impedanzanpassung wird die Bilderzeugung erst möglich.

Da die Temperatur die Schallgeschwindigkeit beeinflusst und somit zu unterschiedlichen Messergebnissen führt (Eckardt et al. 2001), soll das Kopplungsmedium von

konstanter Temperatur sein. Je niedriger die Temperatur, umso geringer sind Schallgeschwindigkeit und Wellenlänge, woraus eine höhere Auflösung resultiert (Yu et al. 1995).

2.1.3. Bildgenerierung

Das Prinzip der Scanning Acoustic Microscopy beruht auf der Verwendung hochfrequenten Ultraschalls.

Wie bereits erläutert, verlassen die vom Transducer generierten hochfrequenten Schallwellen durch die Linse das Mikroskop und treffen auf das im Kopplungsmedium liegende Präparat, um teils direkt an der Oberfläche gebrochen und reflektiert zu werden. Die Linse leitet das Echosignal zurück zum Transducer, der dieses wieder in ein elektrisches Signal umwandelt (Kessler et al. 2003, Katz et al. 1993, Lemons et al. 1974). Das restliche Signal dringt je nach verwendeter Frequenz in das Präparat ein, um dort an Grenzflächen, an denen sich die Dichte und Elastizität des Materials ändern, wiederum gebrochen und reflektiert zu werden (Kessler et al. 2003). Dabei entspricht die Eindringtiefe in etwa einer Wellenlänge des verwendeten Ultraschalls (Yu et al. 1995). Normalerweise werden 70% bis 90% des Ultraschalls an der ersten Grenzfläche reflektiert, sodass die nachfolgenden Signale nur noch schwach sind (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003).

Wird homogenes Material wie Glas oder Silikon untersucht, so wird der Ultraschall nur an der Oberfläche und Unterseite des Präparats gebrochen, da sich dort die Dichte zum angrenzenden Medium ändern. Somit entstehen entsprechend zwei digitalisierte Echosignale auf dem Oszilloskop.

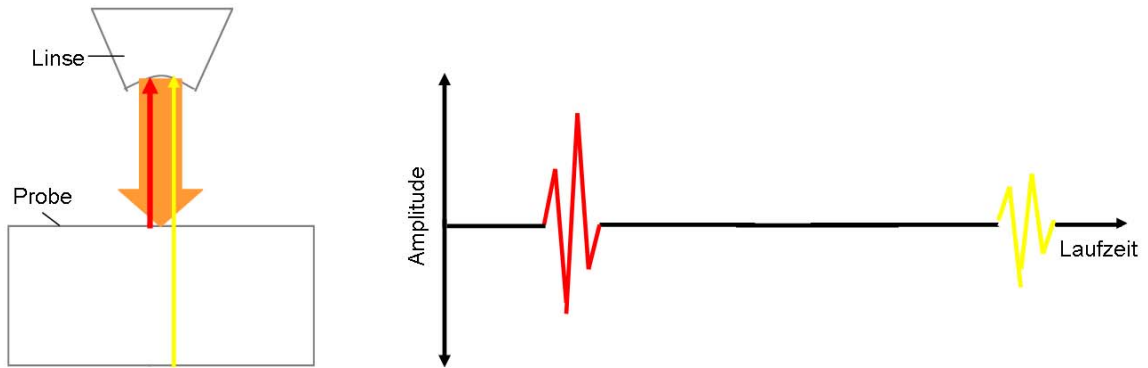


Abb. 7: Ultraschallsignal bei homogener Probe

Liegt innerhalb der Probe aber ein Defekt vor wie ein Frakturriß oder eingeschlossene Luft, so werden die Schallwellen an dieser Grenzfläche gebrochen. Kleinste Defekte können dadurch nachgewiesen werden (Kessler et al. 2003).

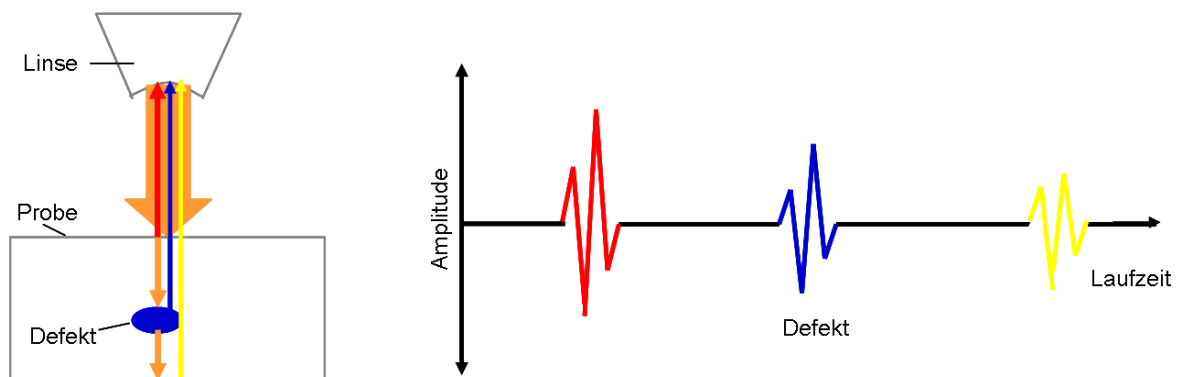


Abb. 8: Ultraschallsignal bei vorliegendem Defekt

Die Intensität jedes elektronischen Eingangssignals, die sich in der Größe der Amplitude widerspiegelt, wird durch einen entsprechenden Grauwert im Bild dargestellt. Bei der Untersuchung von inhomogenem Material wie Knochen durchdringt der Schall ständig Grenzflächen, an denen sich die Dichte und Elastizität ändern, sodass auf diese Art Information von unter der Oberfläche liegenden Schichten gewonnen

werden kann. Werden Oberflächen untersucht, so spiegelt das entstandene Bild das unterschiedliche akustische Reflexionsverhalten der verschiedenen im Fokus liegenden Punkte wider (Katz et al. 1993). Bei anisotropen Materialien besteht zusätzlich eine Abhängigkeit des entstehenden akustischen Signals und folglich der Bildgenerierung von der strukturellen Ausrichtung des Materials an der Oberfläche und der Ausbreitung der Wellen im Inneren des Präparates (Briggs 1992).

Wie aber lässt sich dieses Reflexionsverhalten eines Materials beschreiben?

Die Amplitude des Echosignals wird von der Dichte der beiden aneinander grenzenden Bereiche, wie z.B. Wasser und Knochen, an denen das Signal gebrochen wird sowie von der Schallgeschwindigkeit im jeweiligen Material bestimmt (Kessler et al. 2003). Letztere steht wiederum im direkten Zusammenhang mit dem Elastizitätskoeffizienten. Diese Größen bestimmen die akustische Impedanz z eines Materials:

$$z = \sigma * v = (\sigma * C)^{\frac{1}{2}}$$

σ = Dichte
 v = Schallgeschwindigkeit
 C = Elastizitätskoeffizient

Aus der akustischen Impedanz, die also durch die physikalischen Eigenschaften eines Materials bestimmt wird, lässt sich nun der Reflexionskoeffizient R berechnen, der direkt proportional zur Amplitude des reflektierten Signals ist (Kessler et al. 2003, Hasegawa et al. 1995). Bewegt sich nun eine Ultraschallwelle aus dem Medium 1 mit der Dichte σ_1 sowie der akustischen Impedanz z_1 in ein angrenzendes Medium 2 mit der Dichte σ_2 und der akustischen Impedanz z_2 , dann gilt unter der Voraussetzung eines senkrechten Strahlenganges:

$$R = \frac{z_2 - z_1}{z_2 + z_1}$$

z_1 = Akustische Impedanz Kopplungsmedium
 z_2 = Akustische Impedanz Präparat

Der Reflexionskoeffizient wird also über die akustische Impedanz eines Materials durch dessen elastomechanische Eigenschaften bestimmt, wobei eine Abhängigkeit zweiten Grades zwischen Elastizitätskoeffizient C ($C = \sigma * v^2$) und Reflexionskoeffizient R nachgewiesen werden konnte (Zimmerman et al. 1994).

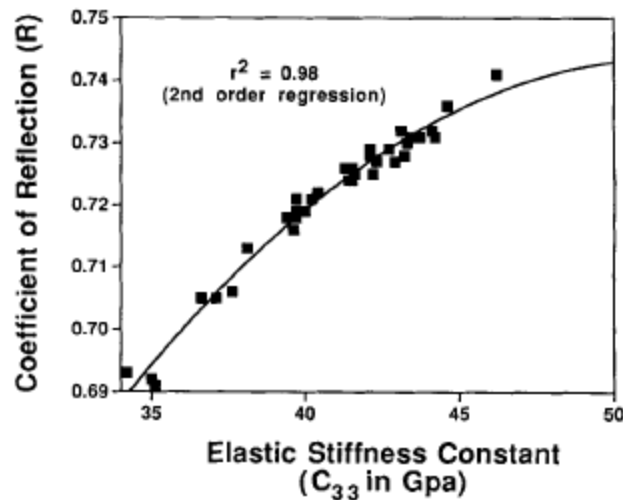


Abb. 9: Abhängigkeit zweiten Grades des Reflexionskoeffizienten R vom Elastizitätskoeffizient C nach Zimmerman et al. (1994)

Da die Intensität des reflektierten Signals, die durch die Amplitude wiedergegeben wird, den Grauwert der Abbildung bestimmt und wiederum eine Proportionalität zwischen Reflexionskoeffizient und Amplitude besteht (Yu et al. 1995), lässt sich ein Zusammenhang zwischen Reflexionskoeffizient und jeweiliger Grauwertstufe zeigen, der linear ist (Hirse Korn et al. 1995). Damit bestimmt der Reflexionskoeffizient den Kontrast des Bildes.

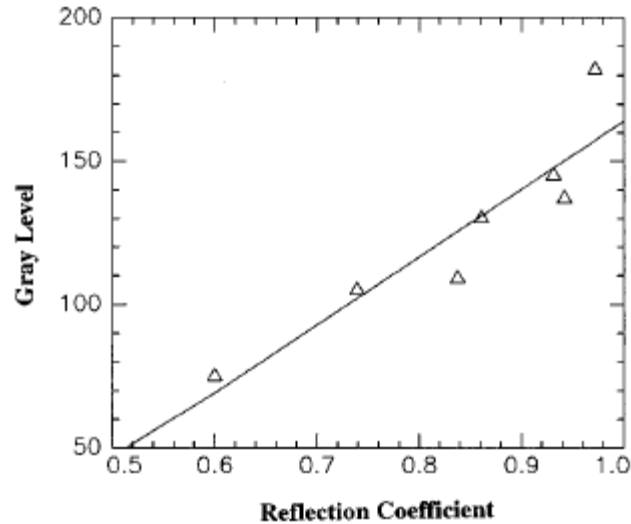


Abb. 10: Abhängigkeit der Grauwertdifferenzierung vom Reflexionskoeffizienten nach Hirsekorn et al. (1995)

Dabei entsprechen Unterschiede der Graustufen veränderten lokalen Materialeigenschaften, nämlich Dichte und Elastizität. Allerdings zeigen sich auch bei konstanter Dichte verschiedene lokale Grauwerte, was auf unterschiedliche elastische Eigenschaften zurückzuführen ist, also der strukturellen Ausrichtung der Kristalle oder Kohäsionskräfte (Katz et al. 1993). Ein helleres (dunkleres) Bild bedeutet dabei eine höhere (niedrigere) akustische Impedanz, also höhere (geringere) Dichte bzw. Elastizität des untersuchten Materials, vorausgesetzt die Impedanz des Kopplungsmediums bleibt konstant (Andersen et al. 2003, Hasegawa et al. 1995). Der Kontrast wird also durch verschiedene physikalische Eigenschaften - wie Dichte und Elastizität - an der Oberfläche sowie im Inneren bestimmt (Yu et al. 1995, Hirsekorn et al. 1994). Änderungen der elastischen Eigenschaften werden somit in einem akustischen Bild dargestellt, die mittels eines optischen Systems nicht erfassbar sind (Yu et al. 1995, Quate 1985, Johnston et al. 1979). Dadurch, dass der Schall auch in tiefere Schichten des Präparates eindringt und nicht invasiv Information aus dem Inneren liefert (Kessler et al. 2003), kann auch ein dreidimensionales Bild der Probe erstellt werden.

Das Kraemer WinSAM 100 ist zum einen – wie in dieser Untersuchung – mit einem 50 MHz-Transducer anwendbar (nominale laterale Auflösung = 30 μm), der im Puls Modus betrieben wird, sowie auch mit einem 200 MHz-Transducer auf der Basis des so genannten Burst Modus (nominale laterale Auflösung = 7,5 μm).

Beim Puls Modus, bei dem die Linse jeweils einen einzigen, genau definierten Puls der gegebenen Frequenz sendet, können die gesendeten und reflektierten Signale zeitlich voneinander durch ein elektronisches Zeitfenster getrennt werden. Im Frequenzbereich dieses Modus werden Information über die Oberfläche, aber auch über das Innere eines Präparates gewonnen (Katz et al. 1993). Die Eindringtiefe in Knochengewebe ($\sigma \approx 1700 \text{ kg/m}^3$) der in dieser Untersuchung verwendeten 50 MHz-Sonde beträgt etwa 80 μm bei einer Schallgeschwindigkeit von etwa 4000 m/s und einer lateralen Auflösung von 40 μm (Weiss et al. 1998, Harten et al. 1997).

Demgegenüber erhält man mittels des Burst Modus Bilder von viel höherer Auflösung, sodass bei Verwendung der 200 MHz-Sonde einzelne Osteone mit einer Auflösung bis zu 5 μm dargestellt werden können. Dabei werden vom Transducer akustische Wellen bestehend aus sinusoidalen Zyklen der gegebenen Frequenz ausgesendet (Katz et al. 1993).

Im Allgemeinen verwendet man Frequenzen über 100 MHz zur Untersuchung von Oberflächenstrukturen, wohingegen geringere Frequenzen die Möglichkeit bieten, unter der Oberfläche liegende Bereiche zu beurteilen (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003).

2.2. Probengewinnung

2.2.1. Tierversuche

Die histologischen Präparate, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, entstammen einer vorausgegangenen Untersuchung zur Beurteilung der Knochenneubildung und Knochendefektheilung nach Anwendung von Osteogenic Protein-1 (= BMP 7) im langstreckigen Segmentdefektmodell der Schafstibia (Regauer et al. 2005).

In dieser Studie wurden 21 weibliche, ausgewachsene Merinoschafe im Alter von 3 bis 5 Jahren und einem mittleren Körpergewicht von $63 \pm 6,1$ kg als Versuchstiere verwendet (Tier-Identifizierungsnummern [= Tier-Ident.] siehe Anhang). Als standardisiertes Problemdefektmodell diente ein segmentaler 5 cm langer Defekt der linken Tibiadiaphyse mit einem mittleren Volumen von 20 ml, der durch Tibiamarknagelung mit einer beabsichtigten Rotationsinstabilität von etwa 10° versorgt und gemäß der Gruppeneinteilung mit verschiedenen Implantaten aufgefüllt wurde.

Versuchsgruppe	1	2	3	4	5
Implantat	OP-1 +	OP-1 +	AS	IDKM	IDKM +
	IDKM	IDKM +			AKM
		AKM			

Tabelle 1: Versuchsgruppeneinteilung nach Regauer et al. (2005)

OP-1 = Osteogenic Protein-1, je 5mg
IDKM = Inaktivierte, demineralisierte Knochenmatrix
AS = Autogene Spongiosa
AKM = Autogenes Knochenmark

Dabei stellte der rekombinant hergestellte Wachstumsfaktor Osteogenic Protein-1 (OP-1) die Testsubstanz dar, die inaktivierte, demineralisierte Knochenmatrix die Trägersubstanz. Die Defektauffüllung mit autogener Spongiosa diente als Standardvergleich. Bei Versuchsende nach 12 Wochen wurden nach Euthanasie der Tiere beide Tibiae entnommen und bei -70° C tiefgefroren, was die mechanischen Eigenschaften des Knochens nicht beeinflusst (Ashman et al. 1984).

Folgende Untersuchungen wurden im Rahmen dieses Tierversuches durchgeführt:

- Röntgenverlaufskontrolle im zweiwöchigen Abstand
- 3D-CD Volumetrie
- Biomechanische Untersuchung (4-Punkt-Biegeversuch)
- Unentkalkte Knochenhistologie
- Mikroradiographie
- Fluoreszenzmikroskopie

2.2.2. Erstellung der histologischen Präparate

Das Herstellungsverfahren der histologischen Präparate en detail ist in Regauer et al. (2005) aufgeführt. Hier soll nur auf die wesentlichen Schritte eingegangen werden. Nach mehrmaliger Entfettung sowie Entwässerung der Knochensegmente erfolgte die Einbettung in monomeres Methylmethacrylat. Es wurde gezeigt, dass aus der Einbettung zwar ein signifikanter, jedoch konstanter Anstieg der gemessenen Werte der akustischen Impedanz resultiert (Zimmerman et al.1994).

Anschließend wurden horizontale Schnitte von 500 µm Dicke für die Mikroradiographie und SAM (WINSAM 100) angefertigt, wobei insgesamt fünf transversale Schnittebenen durch den Knochen festgelegt wurden: die proximale und distale Defektkante sowie die dazwischen liegenden Viertelpunkte.

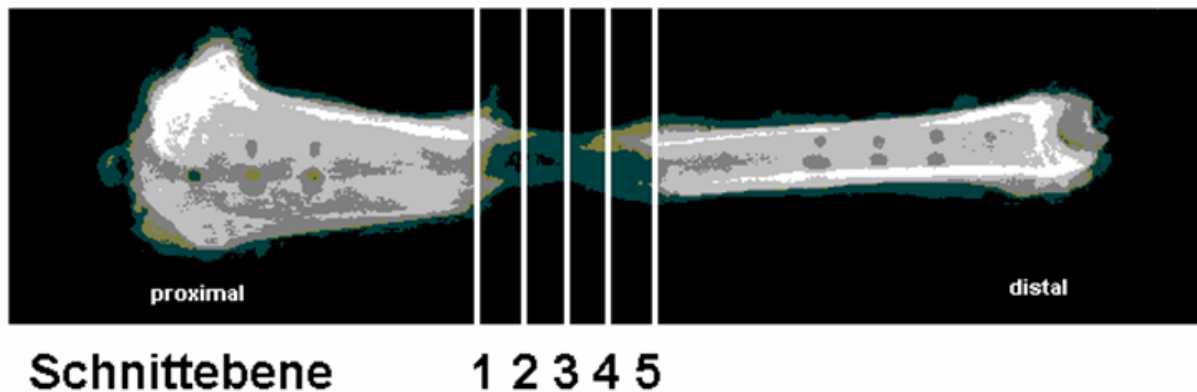


Abb. 11: Schnittschema der Schafstibia nach Regauer et al. (2005)

2.2.3 Bearbeitung für die Ultraschallmikroskopie

Für die Ultraschallmikroskopie wurden nur Knochenpräparate der Versuchsgruppen 1, 2 und 3 verwendet, da aufgrund der Implantate der anderen beiden Gruppen dort kaum Knochenneubildung erfolgt war (Regauer et al. 2005). Wegen des hohen zeitlichen Aufwandes zur Präparatherstellung für SAM wurden als repräsentative Schnitte die Ebenen 1 (proximale Defektkante), 3 (Defektmittle) und 5 (distale Defektkante) gewählt.

Die Knochenschnitte ($n = 42$) wurden mittels eines lichthärtenden Methymethacrylat-Präzisionsklebers (Technovit 7210 VLC, Fa. EXAKT Apparatebau, Worheim) auf Objektträger geklebt, um dann die Präparatoberfläche mit einem rotierenden Mikroschleifsystem (Typ 400 CS, Fa. EXAKT Apparatebau, Norderstedt) zu bearbeiten und glatt zu polieren. Dabei wurde Schleifpapier (Fa. Hermes, Hamburg) mit einer aufsteigenden Körnung (800 – 1000 – 4000) verwendet.



Abb. 12: Mikroschleifgerät 400 CS (Fa. EXAKT Apparatebau, Norderstedt)

Es wurden zwischen 120 und 240 μm abgetragen, wobei der Erfolg des Schleifens und Polierens an der Oberflächenbeschaffenheit, die möglichst eben und glatt sein musste, gemessen wurde. Das exakte Polieren der Proben ist von hoher Relevanz, da die Anwendung von SAM eine vollkommen ebene und glatte Oberfläche der Präparate erfordert. Schon kleinste Kratzer oder Unebenheiten können den Energiefluss der Schallwellen beeinflussen und führen zu Artefakten auf dem akustischen Bild (Riede 2000, Shieh et al. 1995). Deshalb erfordert die Erstellung der Präparate für die Ultraschallmikroskopie große Sorgfalt.



Abb. 13: Präparierter Knochenschnitt für SAM

2.3. Mikroradiographie (MR)

Die genaue Erstellung der Mikroradiographien wird in Regauer et al. (2005) beschrieben.

Zu diesem Zwecke wurden von den 500 µm dicken histologischen Schnitten mittels eines Faxitron Mikrofocus X-Ray-Systems (Fa. Hewlett-Packard, Californien, USA) auf hochauflösenden Fotoplatten (Fa. IMTEC, Californien, USA) Mikroradiographien erstellt (0,18 x 0,18 mm² pixel, Faxitron X-Ray Cooperation, Illinois). Bei Betrachtung unter einem Makroskop (Typ M 420, Fa. Wild, Deutschland) wurden die Bilder über eine Videokamera (3 CCD Colour-View-Camera, Fa. Sony) mittels einer Grafikkarte in einem Computer gespeichert und maßstabsgetreu mit Hilfe einer Bildanalyse-Software (Kontron KS 400, Windows-NT-basiert, Fa. Zeiss) vermessen. Nach Unterteilung der Knochenquerschnitte in Quadranten wurde neben verschiedenen Werten

auch der für die vorliegende Arbeit relevante Parameter der Gesamtfläche des neu gebildeten Knochens ermittelt.

2.4. Scanning Acoustic Microscopy (SAM)

2.4.1. Erstellung der akustischen Bilder

Die für die Ultraschallmikroskopie erstellten 500 µm dicken, polierten Knochenquerschnitte ($n = 42$) wurden nach Einfüllung geringer Mengen destillierten Wassers auf den Boden eines quadratischen Plexiglasbehälters ($15 \times 15 \text{ cm}^2$) mit der zu untersuchenden Fläche linsenwärts gelegt und durch Adhäsionskräfte fixiert. Diese Methode hat gegenüber der von manchen Autoren verwendeten Technik des Festklebens des Präparates mit Klebestreifen (Riede 2000) den Vorteil, dass kein Klebstoffreste zurückbleibt oder sich im Kopplungsmedium lösen kann, der dann den Strahlengang des Ultraschalls und somit das Bild verfälschen könnte. Allerdings erfordert dies große Vorsicht, da das Präparat sich beim Scan-Vorgang leichter vom Untergrund lösen kann.

Um Artefaktbildung durch Luftbläschen an der Unterseite der Linse, die beim Eintauchen der Linse in das Kopplungsmedium entstehen können, zu verhindern, werden diese vorsichtig mit einem feinen Haarpinsel entfernt.

Die Linse wird senkrecht zur Probe (= z-Achse) bewegt, bis die Präparatoberfläche sich im Fokus der Linse befindet. Dies ist der Fall, wenn die erste Amplitude des empfangenen Signals, welche der Oberflächenreflexion entspricht, sich im Bereich des eingestellten Autofokusbereiches befindet. Der Fokusabstand der Linse beträgt 10 mm. Die Intensität des empfangenen Signals wird am Monitor als Amplitude in Abhängigkeit von der Laufzeit des reflektierten Schalls registriert.

Nach einem Prescan, der ein grobes Bild zur Orientierung erstellt, wird durch Veränderung verschiedener Parameter ein optimales Bild erzeugt. Dabei kann bei der verwendeten Schallenergie zwischen High- (= 60 dB) und Low- (= 30 dB) Energy gewählt werden, die Feineinstellung erfolgt in 1 dB-Schritten. Durch Markierung eines „Data-Gates“ auf der x-Achse der Oszillationen wird das Zeitfenster des reflek-

tierten Schalls festgelegt, der von Interesse ist und gescannt werden soll. Dadurch wird die zu erfassende Ebene und die Tiefe derselben im Präparat begrenzt. Signale mit kürzerer oder längerer Laufzeit, also aus darüber oder darunter liegende Bereiche, werden ausgeschlossen. Je schmaler das gesetzte Gate gewählt wird, umso dünner ist die jeweils gescannte Schicht im Präparat. Würde man kein Data-Gate festlegen, so würden alle reflektierten Ultraschallwellen gescannt werden, woraus eine undifferenzierte Abbildung in einer Graustufe resultiert.

Für diese Untersuchung wurden nur die Amplituden des ersten Echosignals, das dem Oberflächensignal entspricht, in das Data-Gate einbezogen.

Weiterhin können Auflösung, Scan-Geschwindigkeit und Größe des zu scannenden Bereichs des Knochenquerschnitts verändert werden. Dabei soll eine möglichst gute Visualisierung und Differenzierbarkeit von kortikalem und neu gebildetem Knochen erreicht werden. Es wurde der gesamte Knochenquerschnitt gescannt, um ein der Mikroradiographie möglichst ähnliches Bild zu erzeugen.

Nach dem Prescan und Optimierung der Scan-Parameter erfolgt der eigentliche Scan-Vorgang, der je nach verwendeten Einstellungen bis zu drei Stunden in Anspruch nimmt, sowie die darauf folgende Anbringung einer Eichstrecke innerhalb der Abbildung.

Bei diesem so genannten C-Scan bleibt die z-Position der Linse konstant, während sie sich in x- und y-Richtung mäanderförmig über die Präparatoberfläche bewegt. Die Linse sendet und empfängt während dieses Vorgangs gleichzeitig, wobei die Intensität des reflektierten Echosignals durch die Größe der am Monitor dargestellten Amplitude wiedergegeben wird. Die den elastomechanischen Eigenschaften entsprechenden Signalamplituden der reflektierten Wellen werden für jeden im Fokus liegenden Punkt der Probe in einem Messfenster aufgezeichnet. Dadurch erhält man für jeden gescannten Punkt des Knochenschnittes einen Datenwert für die histomorphologische Darstellung - basierend auf den elastomechanischen Eigenschaften - auf dem Monitor.

Zur genauen Bildentstehung vgl.: 1.3 Bildgebung.

2.4.2. SAM als Bilderzeugungsmethode: Qualitative Darstellung von Knochen

Zunächst wurden die Anwendungsmöglichkeiten von SAM als Bilderzeugungsmethode bei osteologischen Fragestellungen allgemein untersucht.

Es sollte elaboriert werden, inwiefern durch Veränderung verschiedener Scan-Parameter (Energie, Auflösung etc.) sich die qualitative Darstellung des Knochenquerschnittes sowie einzelner Knochenstrukturen verändert und welche Möglichkeiten zur Optimierung der visuellen Darstellung und akzentuierten Hervorhebung verschiedener Knochenstrukturen bestehen, um insbesondere die Abgrenzbarkeit von neu gebildetem Knochen zu kortikalem Knochen zu verbessern.

2.4.3. Methodenvergleich SAM versus MR

Im qualitativen wie quantitativen Vergleich der beiden Methoden SAM und MR war insbesondere von Interesse, ob durch SAM eine strukturgleiche Darstellung der korrespondierenden Knochenflächen im Vergleich zur etablierten Methode möglich sei. Somit sollte die Validität der Ultraschallmikroskopie als Bilderzeugungsmethode überprüft werden.

2.4.3.1. Qualitativer Vergleich

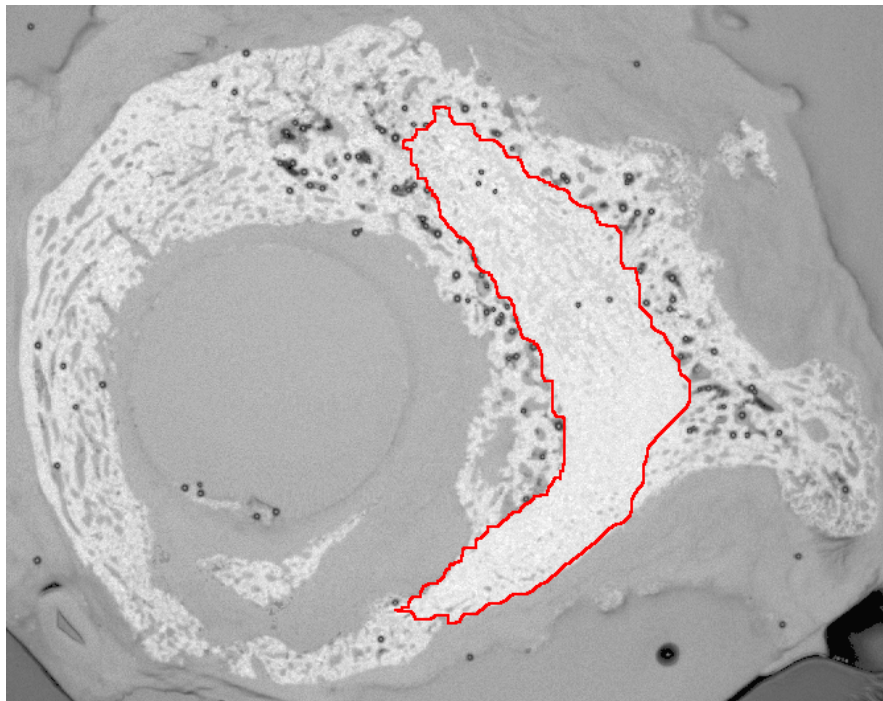
Die beiden Methoden SAM und MR wurden bezüglich der Bildgebung qualitativ verglichen, indem die Abgrenzbarkeit verschiedener Knochenstrukturen, insbesondere der Kortikalis von neu gebildetem Knochen, die Bildschärfe, die Auflösung sowie der Kontrast beurteilt wurden. Diese Kriterien sollten anhand von Übersichtsbildern der transversalen Knochenschnitte sowie von Ausschnittsvergrößerungen untersucht werden.

Darüber hinaus sollten mögliche Abbildungsvorteile des SAM erarbeitet werden.

2.4.3.2. Quantitativer Vergleich

Weiterhin sollten SAM und MR als Bilderzeugungsmethoden zur quantitativen histomorphometrischen Beurteilung von Knochengewebe verglichen werden. Dafür wurden die ermittelten Werte der neu gebildeten Knochenfläche auf den jeweiligen durch die beiden Methoden generierten Abbildungen korrespondierender Knochenquerschnitte gegenübergestellt.

Auf den mittels SAM abgebildeten transversalen Knochenquerschnitten erfolgte die Vermessung der neu gebildeten Knochenfläche im freehand-modus durch Umfahren derselben mit der Computer-Mouse, wobei die Werte durch eine Bildanalyse-Software (Kontron KS 400, Windows-NT-basiert, Fa. Zeiss) erhoben wurden.



**Abb. 14: Begrenzung des kortikalen Knochengewebes auf SAM-Bild
(Gruppe 2, Ebene 1, Tier-Ident. 10)**

Zur Bestätigung der Validität der Messungen der neu gebildeten Knochenflächen wurde der persönliche Messfehler ermittelt, indem die neu gebildete Knochenfläche einer Abbildung zwölfmal an drei verschiedenen Tagen umfahren und gemessen

wurde, um Mittelwert und Standardabweichung zu berechnen. Die anschließende Messung jedes Schnittes wurde dreimal durchgeführt und ein Mittelwert gebildet, um den Messfehler möglichst klein zu halten.

Die Größe der neu gebildeten Knochenflächen der MR-Bilder wurde auf die gleiche Weise im Rahmen der vorausgehenden Arbeit von Regauer et al. (2005) erhoben.

Im Folgenden wurden die Werte der SAM-Bilder mit denen der MR-Bilder der entsprechenden Knochenquerschnitte verglichen, wobei insgesamt 40 Paare gegenübergestellt wurden. Zwei Paare mussten aufgrund Beschädigung während der Präparation ausgeschlossen werden.

2.4.4. Beurteilung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe

Zuletzt war die Möglichkeit einer Beurteilung der elastomechanischen Eigenschaften bzw. der Festigkeit von Knochengewebe durch eine Grauwertanalyse anhand bereits erstellter Bilder von Interesse.

Dabei stellte sich die Frage, ob eine Beurteilung des neu gebildeten Knochens in Bezug zur Kortikalis möglich wäre, indem die Grauwerte dieser Strukturen verglichen werden und so eine relative Aussage über die elastomechanischen Eigenschaften machbar wäre. Davon ausgehend, dass die elastomechanischen Eigenschaften, die durch Dichte und Elastizität bestimmt werden, das Reflexionsverhalten und den daraus resultierenden jeweiligen Grauwert des im Fokus liegenden Punktes bestimmen, könnte wiederum über eine Grauwertbestimmung ein Rückschluss auf die mechanischen Eigenschaften möglich sein. Ebenso könnte über das Verhältnis der Grauwerte verschiedener Strukturen innerhalb eines Präparates zueinander eine relative Aussage bezüglich dieser Eigenschaften einer Knochenstruktur zur anderen gemacht werden. Das Verhältnis der Grauwerte verschiedener Bereiche eines identischen Knochenschnittes müsste dabei aber auch unabhängig von den Scan-Parametern immer konstant sein, falls die Grauwertdifferenzierung nur von den mechanischen Eigenschaften abhänge.

Um den Ansatz dieser Hypothese zu untersuchen wurden von einem Präparat zwei Abbildungen unter Verwendung unterschiedlich hoher Energiestufen bei sonst konstanten Scan-Parametern erstellt. Anschließend wurden nach dem Zufallsprinzip

jeweils 20 Punkte aus neu gebildetem und kortikalem Knochen ausgewählt, die mittleren Grauwerten für jeden Bereich ermittelt und der Quotient aus mittlerem Grauwert von neu gebildetem Knochen und mittlerem Grauwert aus kortikalem Knochen für jede Abbildung gebildet und verglichen.

2.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003, StatView for Windows sowie SPSS 12.0 und beinhaltete eine deskriptive statistische Auswertung (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Korrelationskoeffizienten) sowie den T-Test für verbundene Stichproben mit einem Konfidenzintervall von 5 %, um die statistische Signifikanz der Differenzen der Wertepaare der durch SAM und MR ermittelten Flächen zu bestimmen (StatView for Windows, Version 5.0.1 SAS Institute inc.). Die Korrelation zwischen SAM- und MR-Werten verschiedener Schnittebenen sowie deren Verhältnis zueinander wurde mittels linearer Regressionsanalyse beurteilt (Pearson Korrelationskoeffizient und Present Standard Error Of Estimate = %SEE). Die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten wurde durch die Fischer Z-Transformation bestimmt. Zuletzt wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Analyse erfolgte zunächst für die einzelnen Versuchsgruppen (Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3) und anschließend für die Gesamtheit der Werte (n = 40).

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 40 Präparate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 350 μm durch quantitative SAM und in einer vorausgehenden Studie durch MR abgebildet und untersucht.

3.1. SAM als Bilderzeugungsmethode: Qualitative Darstellung von Knochengewebe

Bei der Untersuchung der Anwendbarkeit von SAM zur Knochendarstellung bei osteologischen Fragestellungen zeigte sich, dass durch Veränderung der Scan-Parameter am SAM verschiedene Strukturen des Präparates hervorgehoben und besser visualisiert werden können, da die differenzierte Darstellung von kortikalem und neu gebildetem Knochen nicht nur auf strukturelle Unterschiede, sondern auch auf das unterschiedliche akustische Verhalten der beiden Knochenbereiche zurückzuführen ist. Durch Optimierung verschiedener Parameter konnte eine verbesserte Differenzierbarkeit und Abgrenzbarkeit von neu gebildetem zu kortikalem Knochen erzielt werden.

Bei Anwendung von hoher Energie (= 60 dB) ließ sich im Vergleich zur niedrigeren Energiestufe (= 30 dB) eine bessere Darstellung des kortikalen Knochens mit insgesamt deutlicher Abgrenzbarkeit zum neu gebildeten Gewebe erzielen. Dagegen wurden in dem durch 30 dB erzeugten Bild der gesamte Knochenquerschnitt wie auch einzelne Strukturen schärfer, differenzierter und kontrastreicher abgebildet, die Kortikalis war aber schwerer abgrenzbar. Selbst bei Veränderung der verwendeten Energie in 1 dB-Schritten zeigte sich das gleiche Verhältnis: kontrastreichere, differenziertere Darstellung durch Verminderung, bessere Abgrenzbarkeit von kortikalem und neu gebildetem Knochen durch Erhöhung der Energie.

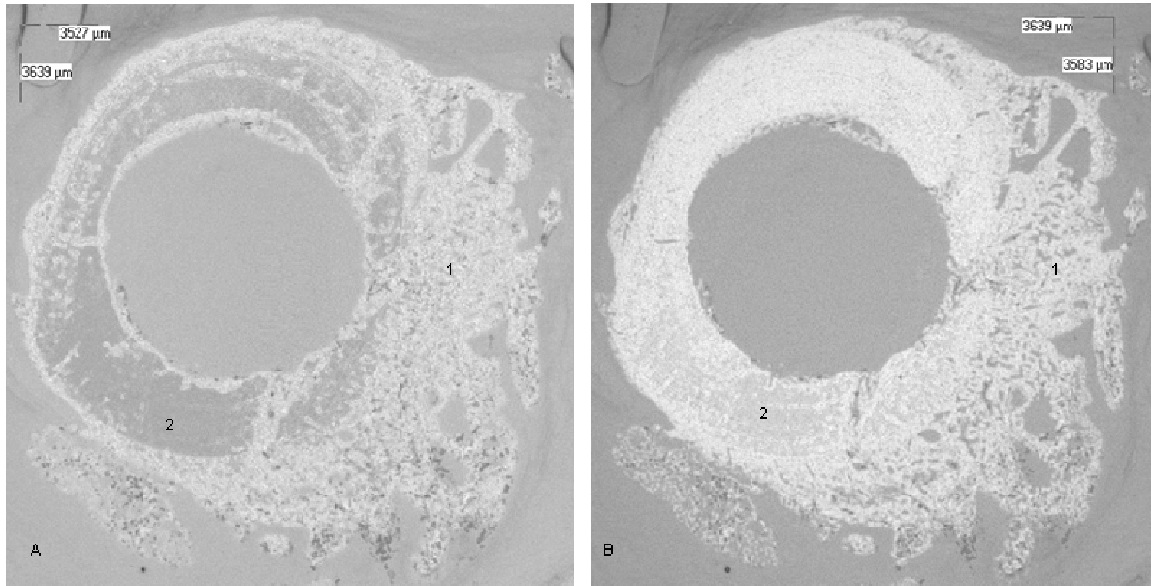


Abb. 15: Abbildung eines Knochenquerschnittes (Gruppe 3; Ebene 5, Tier-Ident. 462) mit A: High Energy (= 60 dB) und B: Low Energy (=30 dB) (1: Neu gebildeter Knochen; 2: Kortikaler Knochen)

Defokussiert man von der Oberfläche, sodass die Fokusebene unterhalb der Oberfläche zu liegen kommt, gewinnt man ein kontrastreicheres Bild (Yu et al. 1995).

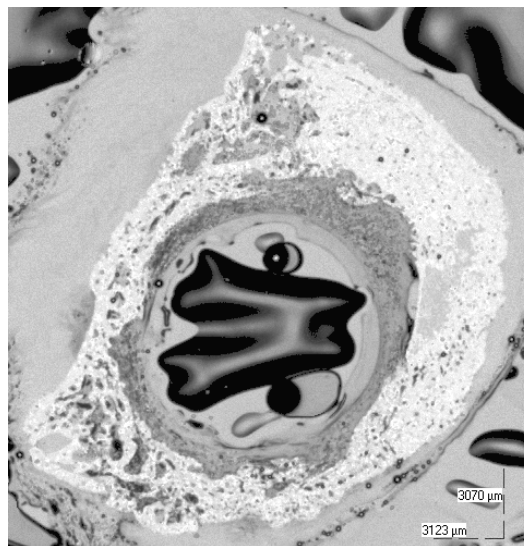


Abb. 16: Kontrastreichere Darstellung durch Defokussierung (Low Energy, Gruppe 2, Ebene 5, Tier-Ident. 430)

Die Knochenschnitte wurden zwischen 4- und 16-fach optisch vergrößert. Weiterhin zeigte sich, dass die gewählte Auflösung für histomorphometrische Messungen innerhalb gewisser Grenzen die ermittelten Werte wenig beeinflusst. So betrug bei 16-facher Vergrößerung der Mittelwert der neu gebildeten Knochenfläche nach zehnmaliger Messung 26,28 mm², bei 4-facher Vergrößerung 26,04 mm².

3.2. Methodenvergleich SAM versus MR

Insgesamt wurden von 42 Knochenschnitten aus der Schafstibia mit einem mittleren Durchmesser von 350 µm Mikroradiographie- und SAM-Bilder erstellt. Zwei Paare mussten aufgrund Beschädigung der Proben bei der Präparation (1 Mikroradiographie und 1 SAM-Bild) von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

3.2.1. Qualitativer Vergleich

Im qualitativen Vergleich erlaubten beide Methoden bei den Präparaten der proximalen bzw. distalen Bereiche des früheren Defekts eine gute Abgrenzbarkeit des neu gebildeten vom kortikalen Knochen.

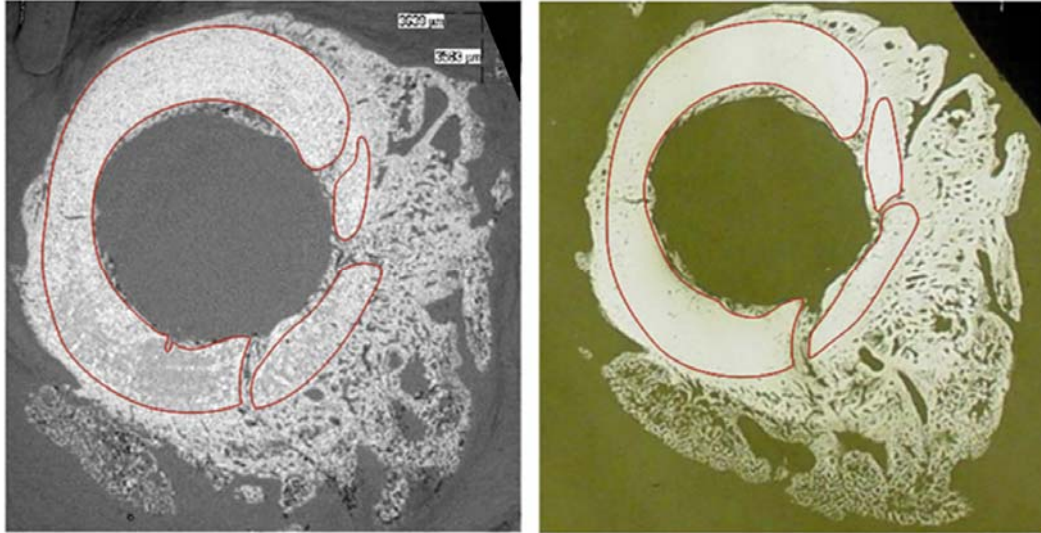


Abb. 17: Qualitativer Vergleich von SAM (links) und MR (rechts) mit Umrandung des kortikalen Knochens (Gruppe 3, Ebene 5, Tier-Ident. 462)

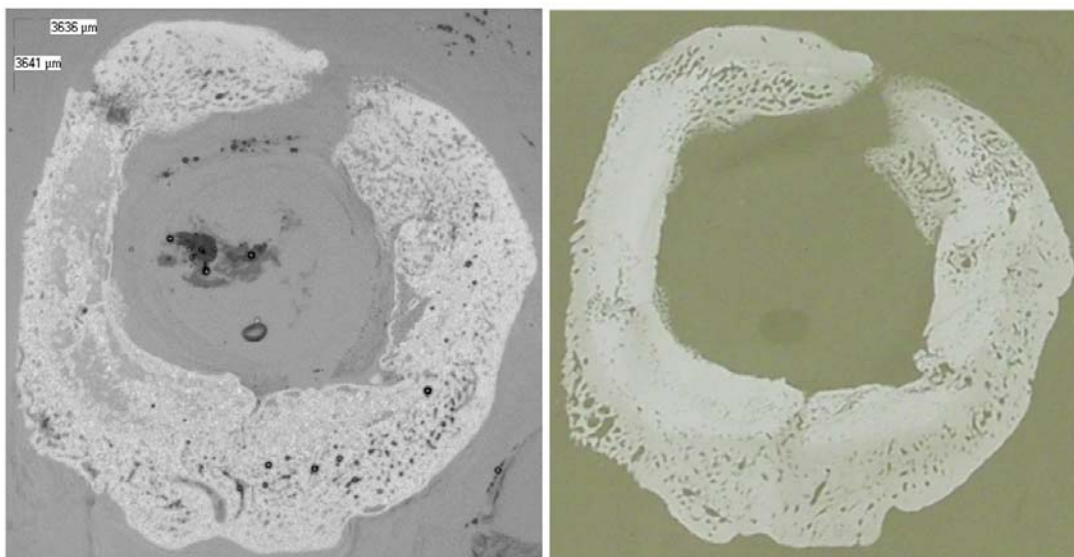


Abb. 18: Qualitativer Vergleich SAM (links) und MR (rechts) (Gruppe 3, Ebene 1, Tier-Ident. 420)

In der Mikroradiographie konnte in der Bildgebung der neu gebildete vom kortikalen Knochen durch strukturelle Unterschiede abgegrenzt werden. Dagegen tragen bei

SAM zusätzlich noch die akustischen Eigenschaften, welche die entsprechenden Grauwerte und somit auch den Kontrast bestimmen, zu einer differenzierteren Darstellung dieser beiden Bereiche von veränderter Qualität bei.

Die durch die beiden Methoden generierten Übersichtsbilder der Knochenquerschnitte zeigten eine vergleichbare Auflösung und Bildschärfe. Die MR ermöglichte zwar eine kontrastreichere Abbildung, sodass kortikaler von neu gebildetem Knochen oft leichter zu unterscheiden und der Knochen zur Umgebung bzw. zu Freiräumen innerhalb des Gewebes leichter abgrenzbar war als bei den SAM-Bildern. Insgesamt aber erlaubte SAM aufgrund der sehr differenzierten Grauwertdarstellung gemäß der akustischen bzw. elastomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes eine deutlich differenziertere Darstellung des Knochenquerschnitts. Einzelne Gewebestrukturen erschienen plastischer und konnten besser visualisiert werden.

Bei Ausschnittsvergrößerungen konnte mit SAM eine höhere Auflösung als mit MR erreicht werden, woraus eine schärfere und besser aufgelöste Abbildung des Knochengewebes resultierte, sodass sich sogar einzelne Osteone erkennen ließen.

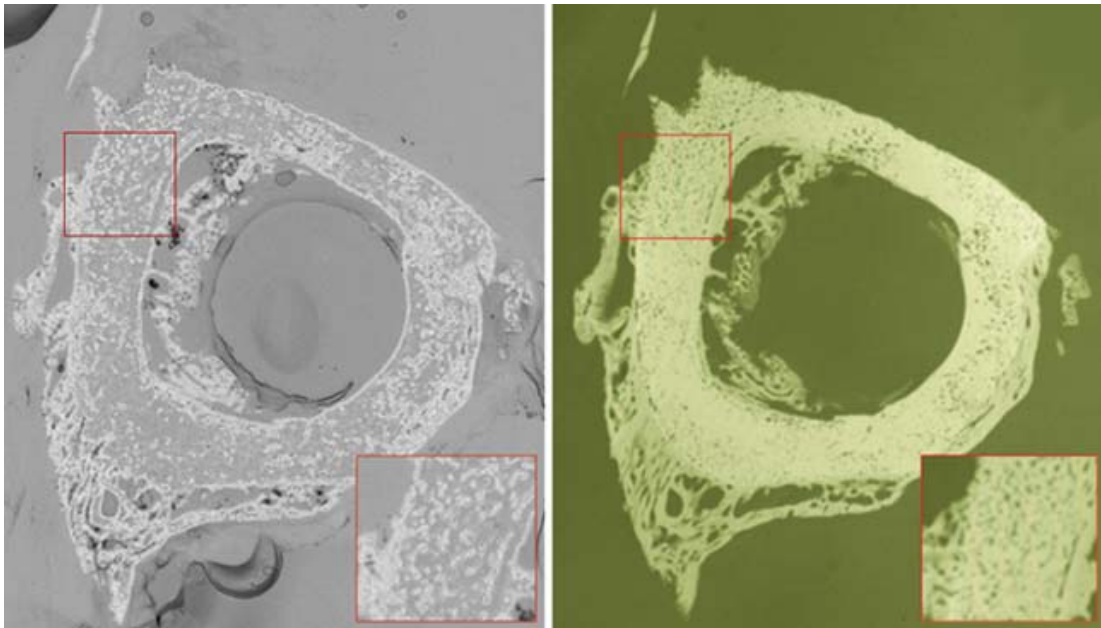


Abb. 19: Markierung korrespondierender Ausschnitte in SAM- (links) und MR- (rechts) Bildern und Vergrößerung derselben: höhere Auflösung mit Darstellung einzelner Osteone im SAM-Bild (Gruppe 1, Ebene 1, Tier-Ident. 403)

Weiterhin ermöglichte SAM eine farbliche Nachbearbeitung der erzeugten Bilder und Coloration gemäß der entsprechenden Graustufen, wodurch einzelne Strukturen hervorgehoben werden können. Daraus resultierte wiederum eine bessere Abgrenzbarkeit von kortikalem zu neu gebildeten Knochen im Vergleich zu den MR-Bildern.

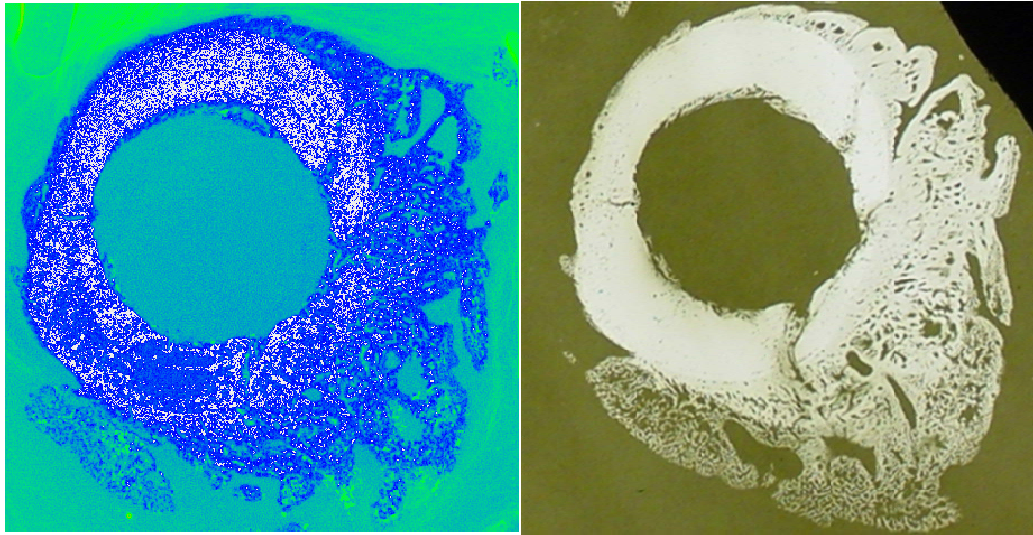


Abb. 20: Vergleich SAM (links) und MR (rechts): akzentuierte Hervorhebung von Knochenstrukturen durch farbliche Nachbearbeitung bei SAM möglich (Gruppe 3, Ebene 5, Tier-Ident. 462)

Darüber hinaus lassen sich durch die Ultraschallmikroskopie neben Knochen auch Weichteile darstellen, sodass die Lage des Knochengewebes zu Weichteilstrukturen beurteilt werden kann. Dies ist durch Mikroradiographie alleine nicht möglich.

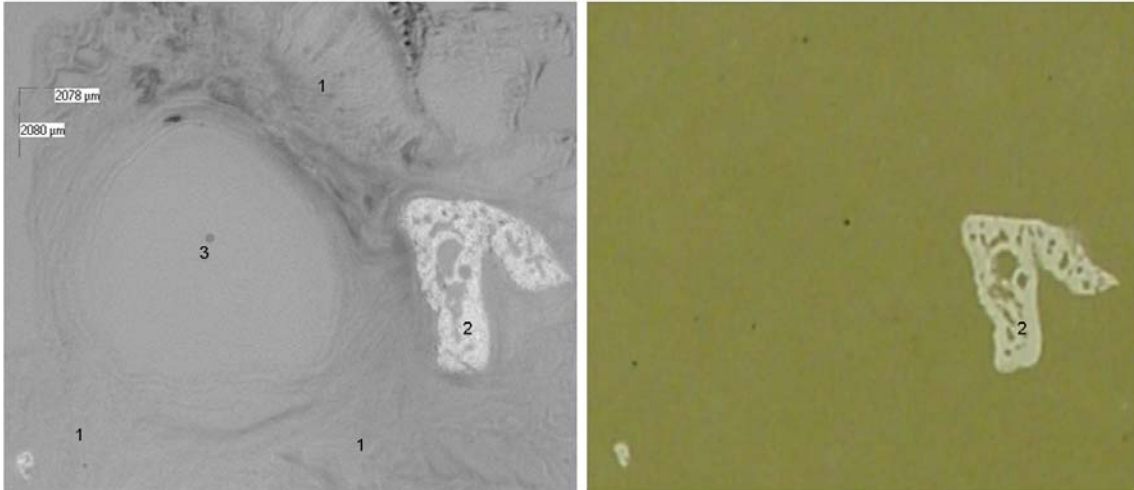


Abb. 21: Darstellung von Knochen im Bezug zu Weichteilgewebe durch SAM (links) möglich, nicht durch MR (rechts) (1: Weichteil- und Muskelgewebe; 2: neu gebildeter Knochen; 3: ehemalige Lage des Marknagels) (Gruppe 1, Ebene 3, Tier-Ident. 474)

3.2.2. Quantitativer Vergleich

Der quantitative Vergleich erfolgte, wie bereits erläutert, durch Vermessung der neu gebildeten Knochenflächen auf den durch die beiden Methoden jeweils generierten Abbildungen und Gegenüberstellung der entsprechenden Werte. Dabei wurden 40 Wertepaare verglichen.

Der persönliche Messfehler bei der Begrenzung mit der Computer-Mouse per Hand und Abmessung der neu gebildeten Knochenfläche betrug 0,97% bei einem arithmetischen Mittelwert von 183,87 mm² (Min = 180,46 mm², Max = 186,66 mm²) und einer Standardabweichung von 1,79 mm² (n = 12).

Zunächst erfolgte die Analyse der ermittelten Werte der einzelnen Versuchstiergruppen.

Für Gruppe 1 (n = 14) betrug der Mittelwert der SAM-Bilder 85,02 mm² bei einer Standardabweichung von 62,18 mm², wobei ein Minimum von 0,00 mm² und ein Maximum von 182,87 mm² ermittelt wurde. Der Median lag bei 62,85 mm². Entspre-

chend konnten durch die Mikroradiographie folgende Werte erhoben werden: Mittelwert 94,05 mm², Standardabweichung 74,87 mm², Minimum 0,00 mm², Maximum 255,80 mm², Median 70,34 mm². In der Regressionsanalyse konnte für die durch die beiden Methoden erhobenen Werte ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von $r = 0,92$ sowie ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,84$ ermittelt werden. Die Werte der Gruppe 1 erbrachten bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,73$).

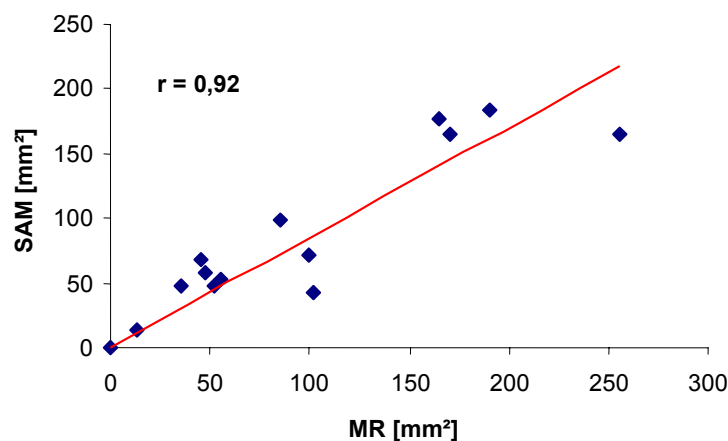


Diagramm 1: Regressionsgerade für Gruppe 1 (n = 14). Vergleich der Werte der neu gebildeten Knochenfläche auf den durch SAM und MR generierten Bildern ($r = 0,92$).

In Gruppe 2 (n = 14) konnte für die SAM ein Mittelwert von 110,09 mm², eine Standardabweichung von 92,01 mm² (Minimum = 0 mm², Maximum = 267,67 mm²) bei einem Median von 108,84 mm² berechnet werden. Die Werte der MR betragen 88,33 mm² für den Mittelwert, 61,17 mm² für die Standardabweichung, 0,00 mm² für das Minimum, 170,3 mm² für das Maximum sowie 99,89 mm² für den Median. Es wurden für die Gruppe 2 ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,89$ und ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,79$ ermittelt. Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ergab sich kein signifikanter Unterschied für die durch die beiden Methoden erhobenen Werte ($p = 0,47$).

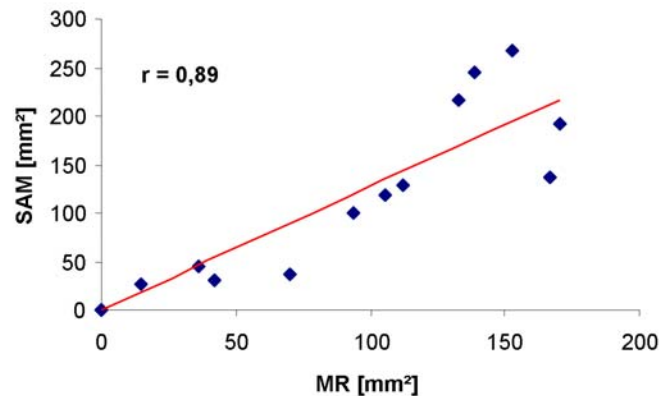


Diagramm 2: Regressionsgerade für Gruppe 2 (n = 14). Vergleich der neu gebildeten Knochenfläche auf den durch SAM und MR generierten Bildern (r = 0,89).

Zuletzt wurde Gruppe 3 analysiert (n = 12). Der Mittelwert der neu gebildeten Knochenfläche der SAM-Bilder betrug 286,72 mm² bei einer Standardabweichung von 124,85 mm² (Minimum = 80,05 mm², Maximum = 598,62 mm²). Der Median lag bei 248,29 mm². Die korrespondierenden Werte für die MR betragen 265,10 mm², 134,50 mm² (Min = 54,98 mm², Max = 594,00 mm²) sowie 252,24 mm². Es wurde innerhalb dieser Gruppe ein Korrelationskoeffizient von r = 0,97 und ein Bestimmtheitsmaß von r² = 0,93 erhoben. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab wiederum keinen signifikanten Unterschied zwischen den durch SAM und MR erhobenen Werten (p = 0,73).

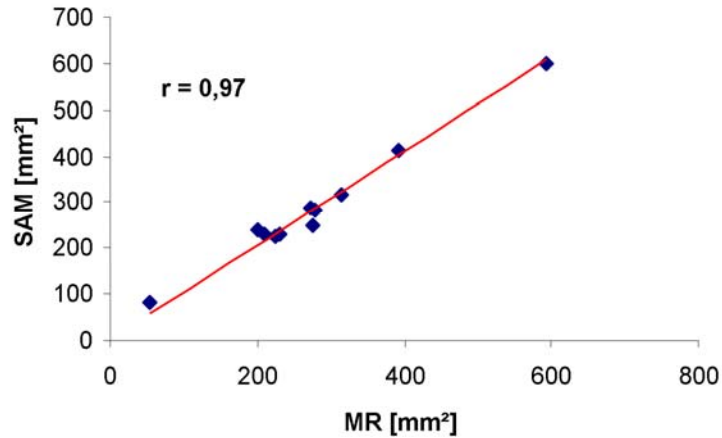


Diagramm 3: Regressionsgerade für Gruppe 3 (n = 12). Vergleich der neu gebildeten Knochenfläche auf den durch SAM und MR erzeugten Bildern (r = 0,97).

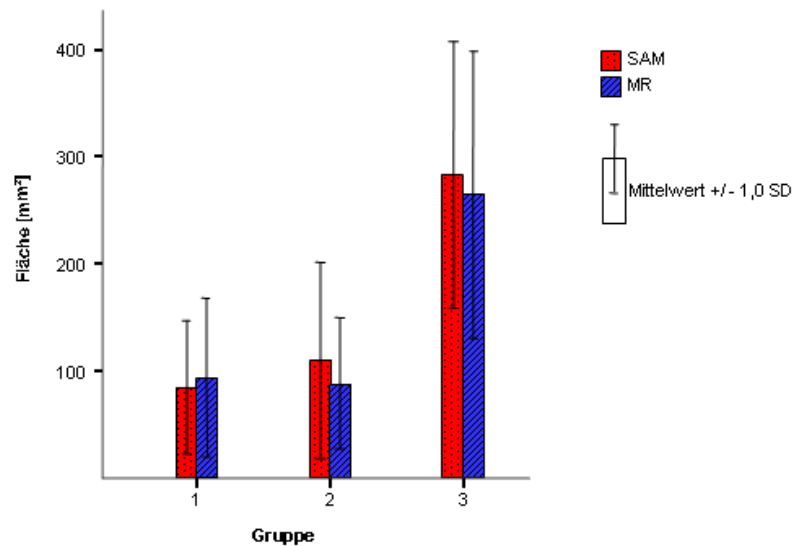


Diagramm 4: Vergleich der Gruppen bezüglich Mittelwert und Standardabweichung der neu gebildeten Knochenfläche von SAM- und MR-Bildern.

Anschließend wurden die durch SAM und MR erhobenen gesamten Werte unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit gegenübergestellt und analysiert (n = 40).

Bei den durch SAM gewonnenen Werten der neu gebildeten Knochenfläche ergab sich ein arithmetischer Mittelwert von $153,37 \text{ mm}^2$ ($n = 40$) mit einer Standardabweichung von $126,79 \text{ mm}^2$ (Min = $0,00 \text{ mm}^2$, Max = $598,98 \text{ mm}^2$). Der Median lag bei $132,50 \text{ mm}^2$. Für die MR betragen die korrespondierenden Werte $143,38 \text{ mm}^2$ bzw. $121,40 \text{ mm}^2$ (Min = $0,00 \text{ mm}^2$, Max = $593,98 \text{ mm}^2$) sowie $122,50 \text{ mm}^2$. Es bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,12$) zwischen den durch SAM und MR erhobenen histomorphometrischen Ergebnissen.

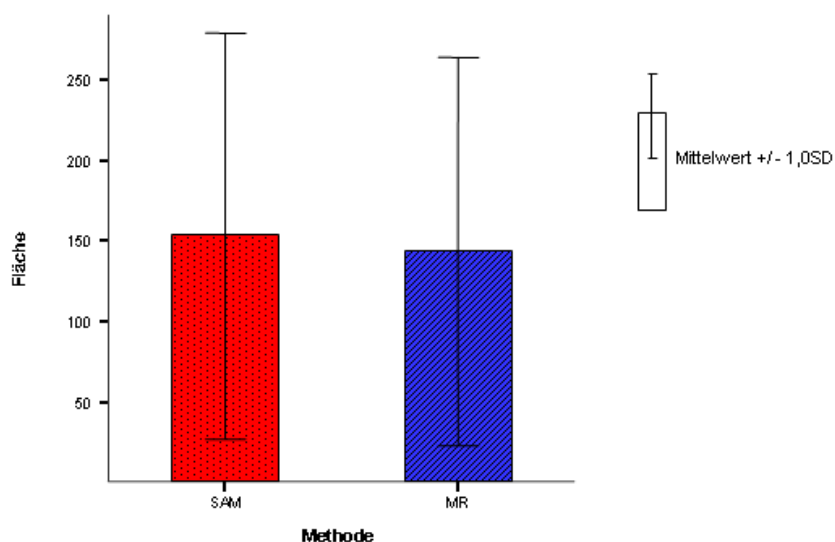


Diagramm 5: Neu gebildete Knochenfläche in mm^2 (Median, Mittelwert und Standardabweichung) gemessen mit SAM ($132,50$; $153,37 \pm 126,79$) und mit MR ($122,50$; $143,38 \pm 121,40$)

Die lineare Regressionsanalyse zeigte einen sehr engen quantitativen Zusammenhang der Werte beider Methoden mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,90$ ($p < 0,0001$; $n = 40$). Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient und der geschätzte Standardfehler betragen $r = 0,95$ und $\text{SEE} = 10\%$.

Im Vergleich zu den interindividuellen Variationskoeffizienten (82,7% für SAM und 84,7% für MR) war die intraindividuelle Variabilität sehr gering (0,97%). Diese große Variabilität innerhalb einer Untersuchungsmethode ergibt sich aus den großen Unterschieden der Knochenneubildung verschiedener Gruppen und Defektebenen.

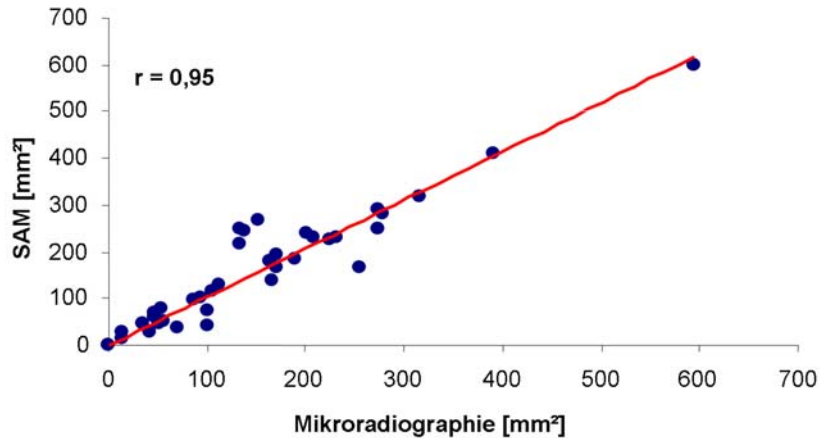


Diagramm 6: Regressionsgerade für alle Werte ($n = 40$). Vergleich der neu gebildeten Knochenfläche auf den durch SAM und MR generierten Bildern ($r = 0,95$).

In der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ergab sich für die Werte der durch SAM und MR generierten Bilder kein signifikanter Unterschied ($p = 0,72$, $n = 40$).

3.3. Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften von Knochengewebe

Zuletzt wurden erste Überlegungen und Versuche unternommen, elastomechanische Eigenschaften von Knochengewebe anhand einer Grauwertanalyse von bereits erstellten Bildern zu beurteilen.

Sollte ausgehend von den Grauwerten der SAM-Bilder ein Rückschluss auf die elastomechanischen Eigenschaften des Gewebes möglich sein, so müsste auch das Verhältnis der mittleren Grauwerte verschiedener Bereiche eines identischen Knochenschnittes entsprechend deren physikalischen Eigenschaften konstant sein und zwar unabhängig von den eingestellten Scan-Parametern.

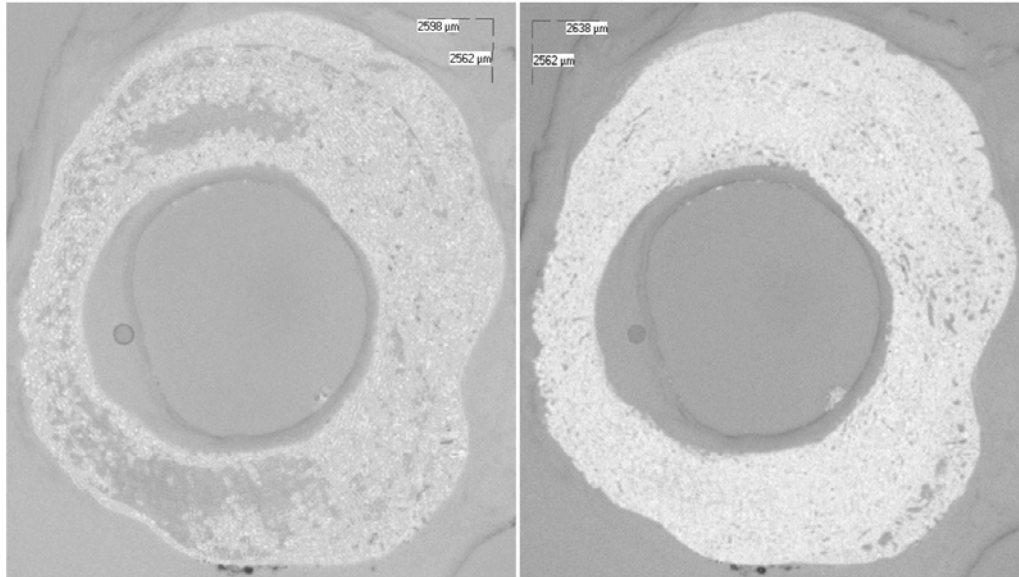


Abb. 22: Grauwertdifferenzierung identischer Knochenschnitte bei Anwendung von High Energy (links) und Low Energy (rechts) (Gruppe 3, Ebene 5, Tier-Ident. 421)

Bereits durch den optischen Eindruck scheint diese These nicht überzeugend. Je nach verwendetem Energiebereich wird die Kortikalis dunkler (60 dB) oder heller (30 dB) als der neu gebildete Knochen dargestellt, das heißt, die Kortikalis besäße bei Gültigkeit der These eine geringere (60 dB) bzw. höhere Reflektivität (30 dB) und somit jeweils andere elastomechanische Eigenschaften im Verhältnis zum neu gebildeten Knochen.

Beim Vergleich der Quotienten aus den mittleren Grauwerten von neu gebildetem Knochen und Kortikalis eines identischen Schnittes bei verschiedenen Energiestufen wird die oben deskriptive Feststellung verstärkt. Der Wert des Quotienten betrug bei Anwendung hoher Energie 1,11. Somit besäße das neu gebildete Knochengewebe einen größeren Reflexionskoeffizienten als die Kortikalis. Bei niedriger Energie ergab sich für den Quotienten ein Wert von 0,93, was einen geringeren Reflexionskoeffizienten für den neu gebildeten als für den kortikalen Knochen bedeuten würde. Je nach verwendeter Energiestufe wurden neu gebildeter Knochen und Kortikalis in unterschiedlichem Helligkeitsverhältnis zueinander abgebildet, woraus jeweils auf

verschiedene elastomechanische Eigenschaften geschlossen werden würde, auch im Vergleich zueinander. Die Grauwertdifferenzierung eines identischen Schnittes wird also nicht nur durch Knochenstruktur und akustisches Verhalten des untersuchten Gewebes, sondern auch von Scan-Parametern bestimmt, die die Helligkeitsverhältnisse verschiedener Knochenbereiche zueinander verändern können. Dabei muss eingeräumt werden, dass sich beide Werte nahe 1,0 befanden und nur zwei Messungen vorlagen, sodass mehr Untersuchungen erforderlich wären, um diese These zu untermauern bzw. zu widerlegen.

4. Diskussion

Scanning Acoustic Microscopy ist ein Bilderzeugungs- und Bildanalyse-System mit einer Auflösung ähnlich der der Lichtmikroskopie (Liu et al. 2004, Katz et al. 2003, Johnston et al. 1979). Die vorliegende Studie stellt gemäß unserer Erkenntnis den ersten Versuch zur Überprüfung der Validität der Bildgebung durch SAM und der durch diese Methode ermittelten quantitativen Daten zur Knochenhistomorphometrie dar, wobei nachgewiesen werden konnte, dass SAM zumindest als eine äquivalente Alternative zur Mikroradiographie, einer Standardmethode zur histomorphometrischen Untersuchung von kalzifiziertem Knochengewebe, zu betrachten ist. In einer früheren Studie wurden MR und SAM zwar gegenübergestellt, aber um die Korrelation zwischen Färbeintensität, Festigkeit und Mineralisationsgrad von Knochengewebe zu analysieren (Qin et al. 2001). Derzeit wird intensiv an der Möglichkeit zur Beurteilung der akustischen bzw. elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe durch SAM geforscht (Hube et al. 2006, Qin et al. 2004, Raum et al. 2004, Andersen et al. 2003, Sharples et al. 2003, Machado et al. 2002, Sathish et al. 2002).

SAM eröffnet neue Möglichkeiten in der histomorphometrischen Untersuchung sowie zukünftig möglicherweise in der biomechanischen Beurteilung histologischer Präparate, insbesondere von Knochengewebe.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1. Versuchsmodell

Scanning Acoustic Microscopy erlangt zunehmend an Bedeutung für die Untersuchung von Knochengewebe im mikrostrukturellen Bereich. Dabei besteht ein Hauptanliegen in der Visualisierung akustischer bzw. elastomechanischer Eigenschaften von Strukturen, die durch optische Systeme nicht darstellbar sind (Lemons et al.

1974). In dieser Studie sollten die Abbildungsmöglichkeiten mit SAM zur optimierten Darstellung von neu gebildetem und kortikalem Knochen sowie der Einfluss des akustisches Verhaltens auf die Bildgebung elaboriert und die Validität von SAM als Bildgenerierungsmethode für histomorphometrische Messungen überprüft werden.

Bisher war der Einfluss der Inhomogenität der Präparatoberfläche bei Knochengewebsproben sowie verschiedener für SAM notwendiger Faktoren (mechanische Bearbeitung der Proben, Kopplungsmedium etc.) auf die Validität der Bildgenerierung unklar. Denn diese ist abhängig von der Art und Weise, wie die Ultraschallwellen reflektiert werden, was durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden kann (Briggs 1992).

Ebenso wurden kaum Untersuchungen zum Vergleich der Bildgebung durch SAM mit etablierten Methoden unternommen (Qin et al. 2001, Turner et al. 1999, Katz et al. 1993). Deshalb sollte in dieser Studie analysiert werden, inwiefern die Abbildung von Knochengewebe, insbesondere von neu gebildetem, durch SAM strukturgleich zu der durch MR ist.

Es sollten von einer großen Anzahl ($n = 42$) von Präparaten SAM-Bilder des gesamten transversalen Schnittes erstellt werden. In früheren Studien mit ähnlich großem Probenumfang und der Zielstellung, gesamte Knochenquerschnitte zu scannen, wurden Frequenzbereiche von 50 MHz oder geringer gewählt (Shieh et al. 1995, Zimmerman et al. 1989). Aus diesen Gründen schien die Verwendung einer 50 MHz-Sonde am besten geeignet. Diese erlaubt die Darstellung größerer Bereiche und somit auch ganzer Knochenquerschnitte, wobei die erreichbare Auflösung (15 bis 30 μm) (Krämer Scientific Instruments GmbH 2003) bereits eine gute Beurteilung der Mikrostruktur von Knochen erlaubt, sodass einzelne Osteone unter Umständen schon dargestellt werden können (Raum et al. 2004). Die Abbildungen sind von hervorragender Qualität, die eine Beurteilung des Knochengewebes und die Abmessung des neu gebildeten Knochens ermöglicht. Zwar würde durch einen höheren Frequenzbereich (200 MHz, 400 MHz) eine bessere Auflösung erzielt werden, allerdings verlängert sich die notwendige Zeit zur Erstellung der Bilder in hohem Maße, sodass diese Frequenzbereiche in der Praxis kaum für eine größere Probenanzahl und zur Darstellung von großen transversalen Knochenschnitten geeignet sind. Der Anwendungsbereich von Frequenzen über 100 MHz liegt bei der Untersuchung von

kleineren Ausschnitten eines Präparates wie einzelner Osteone (Qin et al. 2004, Bumrerraj et al. 2001, Eckardt et al. 2001, Katz et al. 1993).

Das Versuchsmodell für die SAM wurde erst nach der Erstellung der Mikroradiographien entwickelt, sodass die Knochenschnitte aufgrund des notwendigen Schleif- und Polierprozesses für die Ultraschallmikroskopie gewisse morphologische Unterschiede im Vergleich zur MR aufweisen können. Allerdings wurde nicht erwartet, dass der Schleifprozess teilweise sogar makroskopisch erkennbare Veränderungen bewirken würde. Um dieses Problem zu vermeiden, hätte die mechanische Bearbeitung der Präparate bereits vor der Mikroradiographie durchgeführt werden müssen, was aber nicht möglich war, da die Mikroradiographien aus einer vorausgehenden Studie stammten (Regauer et al. 2005).

Weiterhin wurden die SAM-Bilder nur von einem Untersucher erstellt. Obwohl die Beurteilung der Qualität dem subjektiven Ermessen unterliegt, bleibt diese in der Versuchsreihe konstant und auch für außenstehende Betrachter nachvollziehbar. Ebenso erfolgte die quantitative Auswertung der SAM-Abbildungen durch nur einen Untersucher. Deshalb wurden zur Bestimmung und Verringerung des subjektiven Messfehlers Vorversuche sowie mehrmalige Messungen durchgeführt, sodass die Ergebnisse als valide und verlässlich zu betrachten sind.

4.1.2. Präparatherstellung

Die histologischen Präparate entstammen einem Tierversuch zur Untersuchung von Osteogenic Protein-1 von Regauer et al. (2005). Das angewendete Verfahren zur Materialgewinnung und Einbettung sowie die Aufarbeitung für die Ultraschallmikroskopie entsprechen den für die Ultraschallmikroskopie notwendigen Anforderungen. In anderen Studien wurde ähnlich vorgegangen (Raum et al. 2004, Eckardt et al. 2001, Smitmans 2001, Turner et al. 1995, Katz et al. 1993).

Allerdings existiert kein standardisiertes Verfahren zur Präparatherstellung. Die Einbettung der Proben erfolgt zwar meist in Polymethylmethacrylat, die Kunststoffeinbettung führt aber zu signifikant höheren Werten bei der Messung der akustischen Impedanz im Vergleich zu uneingebettetem Knochen (Zimmerman et al. 1994). Da

diese Erhöhung allerdings bei standardisiertem Einbettungsverfahren konstant ist, können durch Kalibrierung des Systems die Messergebnisse um den konstanten Wert reduziert werden. Somit können durch ein standardisiertes Vorgehen valide Werte der akustischen Impedanz erhoben werden.

Weiterhin bestehen Unterschiede in der Schnittdicke der Präparate (Qin et al. 2004, Hasegawa et al. 1995, Katz et al. 1993, Katz et al. 1987). So schwanken die in der Literatur erstellten Präparathöhen zwischen 300 μm (Qin et al. 2004) und 5 mm (Smitmans 2001), was allerdings nur bei Verwendung niedriger Frequenzen (≤ 50 MHz) von Bedeutung ist. Denn besonders dünne Schnitte können nicht bei diesen niedrigen Frequenzen verwendet werden, wenn sie dünner als die angewendete Wellenlänge sind (Douglas 1978).

Bei der Aufklebung der Präparate auf die Objektträger wurden teilweise existierende Freiräume innerhalb des Knochenschnittes nicht durch den lichthärtenden Kleber ausgefüllt, sodass Luftbläschen eingeschlossen wurden, die auch durch SAM abgebildet wurden. Allerdings beeinflussten diese nicht den Messvorgang der Knochenfläche, da sie nicht die Bereiche, die von Interesse waren, betrafen und als Artefakte erkannt werden konnten.

Zwei wesentliche Voraussetzungen für die SAM bestehen in einer ebenen, kratzerfreien Oberfläche sowie einer exakten Lage des gesamten Präparates 90° zum Strahlengang, wodurch der vorausgehende Schleif- und Polierprozess von großer Bedeutung und unumgänglich ist.

Es stellt sich aber die Frage, inwiefern die mechanische Bearbeitung, also der Schleifprozess, die Beschaffenheit der Präparatoberfläche beeinflusst. Unterschiedlich harte Knochenbereiche und Methylmethacrylatbezirke unterliegen einer verschieden starken Abtragung durch die mechanische Präparation, sodass weichere Bezirke stärker abgetragen werden können. Daraus kann sich eine mögliche Veränderung der lokalen Materialeigenschaften und somit der gemessenen Werte der akustischen Impedanz ergeben, woraus eine Verfälschung der Bildgebung bzw. Artefakte resultieren könnten (Bumrerraj et al. 2001, Smitmans 2001).

Es ist also nahezu unmöglich ist, eine den oben genannten Voraussetzungen vollkommen entsprechende Oberfläche zu erzeugen. Der Grund dafür liegt in der Inho-

mogenität des Knochens und in der Varianz der Festigkeit verschiedener Bereiche, insbesondere an der Grenze von neu gebildetem Knochen zu Kortikalis (Eckardt et al. 2001). Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch manuelles Nachpolieren sowie Reinigung der Präparate von Schleifmittelresten mit Wasser und Ethanol vor dem Mikroskopieren nahezu glatte Oberflächen mit nur minimalen Schleifspuren erzeugt werden konnten (Smitmans 2001), sodass diese Nachbearbeitung eine bedeutende Ergänzung darstellt, um die Artefaktbildung zu minimieren.

Das Ziel des Schleifprozesses bestand also darin, eine möglichst plane und glatte Oberfläche zu erstellen, sodass der Erfolg des Vorgangs an diesen Bedingungen gemessen wurde. Je nach Knochenschnitt erforderte dies aber eine unterschiedlich starke Abtragung gemäß der Qualität der vorbestehenden Oberfläche. Somit entstanden unterschiedlich dicke Präparate, was für den späteren Scan-Vorgang von Nachteil war, da bei jeder Probe die Fokusebene sowie die entsprechenden Scan-Parameter neu eingestellt werden mussten. Aus diesem Grund lassen sich die Präparate untereinander bezüglich der Grauwertdifferenzierung entsprechender Strukturen nicht vergleichen. Dafür müsste der Scan-Vorgang unter standardisierten Parametern erfolgen, was aber gleich dicke Präparate erfordert, um den Linsen-Präparatoberflächen-Abstand konstant halten zu können. Dies ist aber aufgrund der bereits genannten wesentlichen Voraussetzungen für die Ultraschallmikroskopie, die eine unterschiedlich starke Abtragung erfordern können, nicht umsetzbar.

Eine Möglichkeit zur Herstellung gleich dicker Präparate besteht in der Abtragung eines sehr hohen Bereiches, bis ein festgelegter Durchmesser erreicht wird. Aufgrund des langen und intensiven Schleifprozesses entsteht dann sicherlich auch eine glatte und ebene Oberfläche. Dafür müssten aber die ursprünglichen Knochenschnitte schon eine größere Dicke aufweisen, um dementsprechend viel abschleifen zu können. Bei den in dieser Untersuchung verwendeten Knochenschnitten von 500 μm Dicke wäre eine solch starke Abtragung nicht möglich gewesen, da die Ultraschallmikroskopie im 50 MHz-Bereich eine Probenstärke von mindestens etwa 72 μm erfordert ($f = 50 \text{ MHz}$, durchschnittliche Schallgeschwindigkeit in Knochen $v = 3600 \text{ m/s}$).

4.1.3. Ultraschallmikroskopie

Die Ultraschallmikroskopie stellt einen äußerst komplexen und sensiblen Vorgang dar, der eine vielfältige Bildgebung hoher Variabilität ermöglicht, aber auch zahlreiche Quellen für Artefaktbildung liefert. Die Information wird dabei auf die Art und Weise gespeichert und in eine Abbildung transformiert wie die akustische Welle vom Präparat reflektiert wird (Briggs 1992).

Die Abbildung der Präparatoberfläche durch die SAM bzw. deren Grauwertdarstellung wird neben den lokalen elastomechanischen Eigenschaften auch von den Messbedingungen beeinflusst (Raum et al. 2002, Eckardt et al. 2001, Yu et al. 1995, Johnston et al. 1979).

Meist wird als Kopplungsmedium, wie auch bei dieser Untersuchung, destilliertes Wasser verwendet (Raum et al. 2004, Andersen et al. 2003, Every et al. 2003, Turner et al. 1999, Hasegawa et al. 1995, Johnston et al. 1979), welches das Kristallisieren der Salze an der Präparatoberfläche sowie eine Interaktion mit Kalzium des Knochens verhindert (Johnston et al. 1979). Allerdings existieren auch Untersuchungen mit Methanol als Kopplungsmedium (Jaffre et al. 2002) oder Quecksilber (Berezina et al. 2000), welche eine andere akustische Impedanz als Wasser besitzen. Dabei ergibt sich ein anderer Reflexionskoeffizient für das untersuchte Material, sodass am gleichen Präparat erhobene Werte deutlich von denen mit Wasser als Kopplungsmedium ermittelten differieren würden.

Weiterhin beeinflusst die Temperatur des Kopplungsmediums die gemessenen Werte der akustischen Impedanz und somit die Bildgebung. So steigen mit der Temperatur die Schallgeschwindigkeit sowie die gemessene akustische Impedanz (Eckardt et al. 2001, Yu et al. 1995), woraus eine hellere Abbildung resultiert. Deshalb ist das Konstanthalten der Temperatur innerhalb eines Versuches von großer Bedeutung.

Die Notwendigkeit eines flüssigen Kopplungsmediums zur Schallübertragung stellt also einen Nachteil der Ultraschallmikroskopie dar. Das Kopplungsmedium kann selbst die Bilderzeugung beeinflussen, z.B. durch die temperatur- und mediumabhängige Dämpfung des Schalls, woraus eine Kontrastminderung resultiert, und es kann gleichzeitig eine Fehlerquelle darstellen, wie z.B. durch Schwebstoffe, welche

Wellenverlauf und –größe verändern können (Sharples et al. 2003). Allerdings ermöglicht das Kopplungsmedium Wasser aber auch die Untersuchung von frischem Gewebe (Bumrerraj et al. 2001, Katz et al. 1993):

Eine weitere Variable, welche die Bildergebung verfälschen kann, besteht in der Fixierung des Präparats auf dem Boden des Kopplungsmediumbehälters: durch Verwendung von dünnem, doppelseitig klebendem Fotoband (Tesa®) (Riede 2000) können Klebstoffreste im Kopplungsmedium zurückbleiben, die dann den Strahlengang des Ultraschalls beeinflussen können und zu Artefakten bei der Abbildung führen. Aus diesem Grunde wurde in dieser Untersuchung das Präparat nur durch die entstehenden Adhäsionskräfte durch das Kopplungsmedium am Boden fixiert, was große Sorgfalt beim Scan-Vorgang erfordert, da sich das Präparat leicht wieder lösen kann.

Schon bei der Präparatherstellung und der Ultraschallmikroskopie selbst bestehen viele mögliche Fehlerquellen, die zu Artefakten bei der Bildgebung führen können. Deshalb ist eine Standardisierung dieser Vorgänge innerhalb einer Untersuchung unumgänglich, denn nur so können reproduzier- und vergleichbare Ergebnisse verlässlich ermittelt werden. Besonders für die Möglichkeit zur nicht invasiven Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften im mikrostrukturellen Bereich durch SAM, welche derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist und auf welche später eingegangen wird, ist ein standardisiertes Vorgehen von großer Bedeutung, um vergleichbare Daten zu erhalten.

Gewöhnlich ist für die Bildgebung bzw. die Mikroskopie die Auflösung der maßgebende Parameter, der letztlich die Bildqualität bestimmt. Bei der Ultraschallmikroskopie liegt der Schwerpunkt des Interesses neben der Auflösung auch auf dem Kontrast des Bildes, der durch die physikalischen bzw. elastomechanischen Eigenschaften der Präparatoberfläche wie darunter gelegener Ebenen bestimmt wird (Yu et al. 1995). Diese Art der Bildgenerierung ist bislang einzigartig in der Mikroskopie und qualifiziert SAM zu einer Methode, die eine neue Qualität der Bildgebung mit Darstellung bislang nicht visualisierbarer Strukturen erlaubt (Lemons et al. 1974), auch in optisch undurchsichtigen Materialien (Berezina et al. 2000, Katz et al. 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Auflösung entscheidend für die qualitative Abbildung eines Präparates ist, sondern auch der durch eine Methode erzeugbare Kontrast eine wesentliche Rolle spielt. So ist die durch die Ultraschallmikroskopie erreichbare Auflösung von 200 \AA ($= 20 \text{ nm}$) bei einer Frequenz von 8 GHz und flüssigem Helium als Kopplungsmedium genauso groß wie z.B. die des Transmission Electron Microscopes (TEM), jedoch erlaubt SAM eine kontrastreichere Darstellung, die durch Veränderung der lokalen akustischen Eigenschaften eines Materials gewonnen wird, woraus die Abbildung von Strukturen resultiert, die durch TEM nicht visualisierbar sind (Hadimioglu et al. 1984). Die Arbeitsfrequenz des SAM kann aber nicht unbegrenzt erhöht werden, denn eine steigende Frequenz führt zu höheren Schallgeschwindigkeiten. Daraus resultieren Dämpfungsphänomene im Kopplungsmedium, sodass ab einer bestimmten Schwellenfrequenz kein auswertbares Signal mehr erzeugt wird (Turner et al. 1995).

Weiterhin ist anzumerken, dass die Abbildung durch SAM zwar in bis zu 256 Graustufen erfolgt, trotzdem ist die Bildschirm-Kontrasttiefe dadurch begrenzt. Geringfügige Unterschiede der akustischen Eigenschaften des Knochens können nicht mehr als Signalunterschied dargestellt werden. Durch diese begrenzte Bildgebung in 256 Grauwerten wird Knochengewebe fälschlicherweise homogener abgebildet als dieses wirklich ist.

Darüber hinaus sollte die Forderung nach einer universellen Computersoftware zur Quantifizierung der Grauwerte gestellt werden, die die Helligkeitsstufen entsprechend eines Standards analysiert. Nur so sind Ergebnisse verschiedener Labors und Arbeitsgruppen vergleichbar, austausch- und reproduzierbar (Qin et al. 2004).

SAM stellt allerdings eine sehr zeitintensive Methode dar, da der Scan-Vorgang eines Präparates mit den vorausgehenden Einstellungen und Prescans zur Erstellung des optimalen Bildes selbst bei Verwendung einer 50 MHz-Sonde mehrere Stunden erfordert und sich bei höheren Frequenzen nochmals deutlich verlängert. Darüber hinaus ist bereits die Präparatherstellung für SAM sehr zeitaufwändig, insbesondere das Schleifen und Polieren beansprucht bereits bis zu fünf Stunden je Probe. Der Einsatz des SAM zur Beurteilung einer größeren Anzahl von Präparaten ist mit ex-

trem hohem Zeitaufwand verbunden, sodass es fraglich ist, ob sich SAM für Studien mit großen Probenzahlen ($n > 100$) etablieren kann.

SAM ermöglicht eine nicht destruktive Beurteilung von Knochengewebe, die keine Färbung erfordert (Lemons et al. 1974), sodass ein Präparat für andere Mess- oder Bildgebungsmethoden wie Lichtmikroskopie, Scanning bzw. Transmission Electron Microscopy wieder verwendet werden kann (Qin et al. 2001). Dadurch kann aus einem Präparat auf vielfältige Weise Information auf unterschiedlichen Ebenen und bezüglich verschiedener Qualitäten gewonnen werden, sodass eine bessere, sich ergänzende Charakterisierung und Beurteilung von Knochengewebe möglich ist.

4.2. SAM zur Darstellung von neu gebildetem Knochen

Die Anwendung von SAM zur Abbildung von neu gebildetem Knochen erbrachte Bilder hoher Qualität mit einer sehr differenzierten, gut aufgelösten Darstellung der einzelnen Knochenstrukturen, sogar von Osteonen, wobei die Arbeitsfrequenz bei 50 MHz lag. Die Verwendung dieses Frequenzbereiches erlaubte auch in anderen Studien die Visualisierung von Osteonen (Turner et al. 1995), wohingegen diese bei niedrigeren Frequenzen nicht mehr aufgelöst werden können, da sie noch kleiner als die entsprechende Wellenlänge des Schalls sind (Raum et al. 2004).

Durch höhere Frequenzen kann die Auflösung deutlich verbessert werden. In einer Untersuchung, bei der ein Frequenzbereich von 200 bis 600 MHz verwendet wurde, konnten nicht nur einzelne Osteone abgegrenzt, sondern ihr Aufbau beurteilt werden. Es wurde festgestellt, dass die äußeren ein bis zwei Lamellen in einer dunkleren Graustufe als die inneren Lamellen abgebildet werden und deshalb eine niedrigere akustische Reflektivität besitzen (Katz et al. 1993). Diese Osteone wurden aufgrund ihrer akustischen Eigenschaften dunkler dargestellt als das umgebende Knochengewebe. Bei der Beurteilung der Osteone impliziert dabei eine dunklere Darstellung eine geringere Knochendichte bzw. veränderte elastische Eigenschaften (Bumrerraj et al. 2001, Katz et al. 1993).

In einer weiteren Untersuchung wurde mit einer 400 MHz-Linse osteoporotischer Knochen mit prämenopausalem und postmenopausalem Knochen verglichen (Hasegawa et al. 1995). Dabei konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass prämenopausaler, gesunder Knochen gleichgroße dunkle Areale, also Flächen geringerer Elastizität bzw. Dichte, wie osteoporotischer Knochen aufwies und diese dunklen Flächen der beiden Gruppen signifikant größer waren als bei postmenopausalem Knochen, der deutlich mehr hellere Bereiche höherer Elastizität bzw. Dichte zeigte. Aus diesen Untersuchungen ließe sich schließen, dass die Elastizität von Knochen nicht der wesentliche Faktor für das Frakturrisiko von Knochen ist.

SAM bietet die Möglichkeit, durch Veränderung der Scan-Parameter verschiedene Strukturen hervorzuheben sowie den Kontrast des Bildes zu verändern, ohne dass eine Färbung der Präparate notwendig ist (Qin et al. 2001, Lemons et al. 1974). Durch Verwendung niedriger Energiestufen und Einstellung der geeigneten Parameter konnte eine sehr differenzierte strukturelle Darstellung des Knochengewebes auf den durch SAM erstellten Bildern erreicht werden, wohingegen die Anwendung höherer Energiebereiche die Abgrenzbarkeit des neu gebildeten vom kortikalen Knochen optimiert, allerdings wurde dann die Auflösung des Bildes scheinbar verringert. Diese Erkenntnis unterscheidet sich von den Beobachtungen anderer Studien, in denen der neu gebildete Knochen in einem Femurschaft-Frakturmodell der Ratte nach acht Wochen nur schwer von kortikalem Knochen zu unterscheiden war (Harten et al. 1997), wobei die verwendeten Scan-Parameter nicht beschrieben waren. Bereits kleinste Abstandsänderungen der Linse zur Präparatoberfläche beeinflussen den Kontrast des Bildes (Yu et al. 1995), was auch in dieser Untersuchung festgestellt wurde.

Weiterhin wird die Abbildung und die Grauwertdifferenzierung auch von der verwendeten Frequenz beeinflusst, sodass das Bild eines identischen Präparates bei Verwendung von zwei verschiedenen Frequenzbereichen in unterschiedlichen Graustufen dargestellt wird bzw. verschiedene Impedanzwerte für identische Strukturen gemessen werden (Raum et al. 2004).

Im Vergleich zu anderen Methoden wie der Lichtmikroskopie bietet SAM den Vorteil, dass die lokalen akustischen Eigenschaften des Präparates die Bildgebung bestim-

men, indem diese in den korrespondierenden Grauwerten abgebildet werden (Zimmerman et al. 1994). Zusätzlich können Schwerpunkte bei der Visualisierung verschiedener Bereiche gewählt werden. Diese Eigenschaften von SAM führen zu einer vollkommen neuen Art der Bildgebung, Bildqualität und Beurteilungsmöglichkeit des Knochens. Identische Schnitte können unterschiedlich kontrastreich abgebildet und dabei verschiedene Strukturen hervorgehoben werden.

Für die Untersuchung des neu gebildeten Knochens wurde zur Darstellung des gesamten transversalen Knochenschnittes eine 50 MHz-Sonde gewählt, da sie für diese Fragestellung und Anwendung am besten geeignet schien. Die Verwendung der 50 MHz-Linse bietet die Vorteile einer relativ hohen Auflösung bei im Vergleich zu höheren Frequenzen geringerem Zeitaufwand für den Scan-Vorgang, sodass eine größere Anzahl an Präparaten ($n = 40$) von hoher Bildqualität gescannt werden kann.

Auch in zahlreichen anderen Studien wurde mit einer 50 MHz-Sonde gearbeitet (Turner et al. 1999, Weiss et al. 1998, Harten et al. 1997, Hasegawa et al. 1995, Shieh et al. 1995, Zimmerman et al. 1989), um vor allem größere Knochensegmente oder –querschnitte abzubilden.

4.3. Methodenvergleich: SAM versus MR

Der Vergleich von SAM und MR als Bilderzeugungs- und Bildanalysemethoden erfolgte qualitativ und quantitativ. Insgesamt wurden 40 Paare verglichen, nachdem zwei Paare aufgrund Beschädigung bei der Präparation ausgeschlossen werden mussten.

Die durch SAM erstellten Bilder überzeugten durch eine differenziertere Darstellung der einzelnen Knochenstrukturen, da der Kontrast durch Änderung der lokalen physikalischen bzw. akustischen Eigenschaften entsteht (Johnston et al. 1979). Bei der MR dagegen bestimmt der Mineralisationsgrad den Kontrast, der aber nicht die entsprechende Differenzierung in Grauwerte erlaubt (Schortinghuis et al. 2003, Graham

1955). Allerdings erschwert die Darstellung in Grauwertstufen gemäß der lokalen Materialeigenschaften, die in Knochengewebe äußerst heterogen sind, die Abgrenzbarkeit des kortikalen von neu gebildetem Knochen, sodass die Unterscheidung vom Untersucher gewisse Erfahrung erfordert. Die Mikroradiographie dagegen erlaubt eine deutlichere Abgrenzbarkeit der verschiedenen Knochenbezirke, was durch die in weniger Graustufen differenzierte, ausschließlich auf den Mineralisationsgehalt basierende Darstellung des Knochengewebes bedingt wird.

Selbst bei 50 MHz scheinen die durch SAM erstellten Bilder eine höhere Auflösung (15-30 μm [Krämer Scientific Instruments GmbH, 2003]) zu besitzen. In anderen Studien zur Ermittlung der maximalen Auflösbarkeit wurde zwar festgestellt, dass bei Verwendung von Wasser als Kopplungsmedium – wie in unserer Untersuchung - die höchste anwendbare Frequenz 4,5 GHz beträgt, sodass die maximal erreichbare Auflösung auf 200 nm limitiert ist und dagegen die Mikroradiographie eine potentiell höhere Auflösung besitzt (50 bis 70 nm) (Quate 1985), die allerdings durch die Qualität der verfügbaren Photoplatten, der Röntgenstrahlen und der Dicke der Präparate nicht realisierbar ist. Jedoch könnte durch Verwendung von Präparaten mit einer Dicke von weniger als 15 μm (entsprechend der maximalen Auflösung bei 50 MHz durch SAM) durch die MR eine höhere Auflösung erreicht werden als durch die SAM (Maier et al. 2004, Schortinghuis et al. 2003, Tischer et al. 2002, Heuck 1973).

Durch Erniedrigung der Temperatur des Kopplungsmediums bei SAM wird die Schallgeschwindigkeit verringert. Das hat eine Verkürzung der Wellenlänge zur Folge, woraus eine höhere Auflösung resultiert (Yu et al. 1995). Die Verwendung von kryogenen Kopplungsmedien wie z.B. flüssigem Stickstoff oder Helium, welche die Wellenlänge durch eine Verminderung der Schallgeschwindigkeit verkürzen, kann die Auflösung verbessern und den Frequenzbereich deutlich erweitern. Die nun mögliche Anwendung von 8 GHz erlaubt eine Auflösung von 200 Å (= 20 nm) (Quate 1985, Hadimioglu et al. 1984), sodass SAM eine Visualisierung von Strukturen ermöglicht, die mit der MR nicht darstellbar sind. Natürlich ist die Verwendung solcher Kopplungsmedien aufwändiger und es ist deshalb fraglich, ob diese für Untersuchungen mit höheren Probenzahlen praktikabel sind.

Die bereits derzeit schon höhere erreichbare Auflösung durch SAM, die sicherlich noch verbessert werden kann, stellt einen weiteren Vorteil der SAM gegenüber der MR dar, deren potentielle maximale Auflösung wegen der bereits genannten Faktoren nicht erreicht werden kann.

Wie bereits in 4.2 erläutert, qualifiziert die SAM aber nicht ausschließlich die Auflösung, sondern auch ihre kontrastreiche Darstellung gemäß der lokalen akustischen bzw. elastomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes.

Weiterhin ermöglicht SAM durch zahlreiche Scan-Modi die vielfältige Darstellungsweise und akzentuierte Hervorhebung verschiedener Strukturen an einem Knochnschnitt (vgl. 4.2), was durch die MR nicht möglich ist.

Ein eindeutiger Vorteil der SAM gegenüber der MR besteht in der Möglichkeit zur Weichteildarstellung. Somit kann die Lage des Knochens zu umgebendem Gewebe beurteilt werden, was bei der Knochenneubildung, insbesondere bei durch Wachstumsfaktoren (OP-1) induzierter Knochenneubildung, von Bedeutung ist. Die Applikation von OP-1 kann zu Osteoinduktion auch in Weichteilen führen, was durch die Mikroradiographie, die nur kalzifiziertes Gewebe erfasst, nicht beurteilt werden kann. SAM dagegen erlaubt eine Darstellung des Knochens in Bezug zu Weichteilgewebe. Die Mikroradiographie ermöglicht dagegen nur die Darstellung von kalzifiziertem Gewebe, wobei auch gezeigt wurde, dass besonders kleine Knochenstrukturen ($< 0,09$ mm) während der Wachstumsphase nicht durch die MR abgebildet werden können (Schortinghuis et al. 2003).

Allerdings stellt die Ultraschallmikroskopie im Gegensatz zur MR eine viel zeitintensivere Methode dar, mit der nur jeweils ein Präparat nach langer Vorbearbeitung in einem zeitaufwendigen Scan-Vorgang abgebildet werden kann, wie bereits in 4.2 beschrieben. Die MR ermöglicht dagegen eine relativ schnelle Bildgenerierung – bei dem in dieser Untersuchung verwendeten X-Ray-System 80 min mit anschließender 30 minutenlanger Entwicklung der Photoplatten -, wobei mehrere Proben gleichzeitig erfasst werden, gemäß deren Größe und der der Photoplatten.

Im Vergleich zur Mikroradiographie beruht die Bildgebung durch Back Scatterd Electron Microscopy (BSE) auch auf dem lokalen Mineralisationsgehalts des unter-

suchten Gewebes, allerdings mit einer viel höheren Auflösung (Roschger et al. 1998). Die maximal erreichbare Auflösung mit BSE beträgt 0,1 μm , gewöhnlich aber 1 bis 2 μm (Banse et al. 2005, Roschger et al. 1997, Roschger et al. 1995). Gegenüber der Mikroradiographie bietet BSE - wie auch SAM - den Vorteil, dass die Bildgebung nicht von der Gesamtdicke des Präparates abhängig ist, da eine Schicht von nur bis etwa 0,5 μm unterhalb der Oberfläche erfasst wird und somit die Unschärfe und Fehler durch Projektion der bei der MR 500 μm dicken Schnitte vermieden werden (Roschger et al. 1998).

Ähnlich dem SAM bildet BSE Knochengewebe in verschiedenen Grauwertstufen ab, wobei diese Differenzierung von der Ordnungszahl der Atome des untersuchten Gewebes bzw. bei Knochen v.a. von dessen Mineralisationsgehalt abhängt, aufgrund dessen Grauerthistogramme und entsprechende Bilder erstellt werden (Roschger et al. 1998, Boyde et al. 1993). Ein Vorteil der SAM besteht darin, dass auch Dichte und Elastizität die Bildgebung bestimmen. Diese Eigenschaften werden zwar auch vom Mineralisationsgehalt bestimmt, aber ebenso von der strukturellen Ausrichtung von Kollagen und Kristallen sowie anderer Komponenten (Turner et al. 1995, Katz et al. 1993, Briggs 1992). Somit erlaubt SAM einen weiteren Informationsgewinn. Darüber hinaus bildet SAM auch Weichteilgewebe ab, während mit BSE nur mineralisiertes Gewebe erfassbar ist, einzelne Zellen sind mit BSE nicht darstellbar (Boyde et al. 2005). Ein Vorteil der BSE soll dabei die leichte Abgrenzbarkeit des neu gebildeten Knochens sein (Banse et al. 2005). Allerdings wird die Validität der BSE limitiert durch die inkonstante Stabilität des Systems bzw. die erforderliche Kalibrierung anhand von bekannten standardisierten und unter dem Elektronenstrahl stabilen Testsubstanzen, um den Mineralisationsgrad quantitativ beurteilen zu können (Roschger et al. 1998). Ein weiterer Nachteil des BSE besteht im notwendigen Vakuum zur Untersuchung der Präparate, wodurch Artefakte wie Risse in der Oberfläche entstehen können (Katz et al. 1993). Demgegenüber erlaubt SAM Untersuchungen sowohl an frischen als auch an eingebetteten Präparaten (Katz et al. 2003).

Der quantitative Vergleich von SAM und MR als Bilderzeugungsmethode für histomorphometrische Messungen erbrachte Werte von hoher Korrelation. Bei der Messung der neu gebildeten Knochenfläche der transversalen Knochenschnitte auf den

durch die beiden Methoden generierten Bildern korrelierten die Werte sehr gut miteinander. Die durchschnittliche Fläche betrug für SAM für alle Knochenschnitte (arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung) $153,37 \pm 126,79 \text{ mm}^2$, für MR $143,38 \pm 121,40 \text{ mm}^2$, der Korrelationskoeffizient der Wertepaare 0,95 ($n = 40$). Die große Standardabweichung des Mittelwerts der neu gebildeten Knochenfläche aller Proben lässt sich auf die hohe interindividuelle Variabilität der Knochengröße der einzelnen Tiere zurückführen, da die Proben aus unterschiedlichen Schafen und verschiedenen Schnitthöhen der Tibia stammten.

Einzelne Knochenschnittpaare wiesen zum Teil allerdings bereits makroskopisch erkennbare morphologische Unterschiede der Knochenflächen auf. Diese Differenzen sind auf den notwendigen Schleifprozess für SAM zurückzuführen, durch den Gewebeareale unterschiedlicher Härte verschieden stark abgetragen werden (vgl. 4.1.2). Somit können die entsprechenden zu vergleichenden transversalen Knochenschnitte geringe morphologische Unterschiede aufweisen.

Die mit SAM abgebildeten Knochenstrukturen entsprechen morphologisch den durch die Mikroradiographie erstellten Bildern, was durch die Messung der neu gebildeten Knochenfläche auf den durch die beiden Methoden generierten Bildern bestätigt wird. SAM stellt somit eine äquivalente Methode zur Bildgenerierung für histomorphometrische Messungen im Vergleich zur Mikroradiographie dar. Des Weiteren wird durch das Scannen einer definierten Ebene die Überlagerung der darüber bzw. darunter liegender Strukturen vermieden, woraus wiederum eine schärfere Abbildung resultiert. Die Röntgenstrahlen bei der MR erfassen dagegen die gesamte Schnittdicke, wodurch sich Strukturen übereinander projizieren.

Durch die weiteren aufgezeigten Vorteile wie der Möglichkeit zur optischen Hervorhebung und besseren Visualisierung bestimmter Knochenstrukturen, der Darstellung unter der Oberfläche liegenden Schichten einer Probe, der Weichteildarstellung und der Kontrastierung gemäß der lokalen physikalischen Eigenschaften, qualifiziert sich SAM zu einem hochwertigen Bildgenerierungs- und Bildanalyseverfahren. Die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung elastischer Eigenschaften auf mikroskopischer Ebene (Yu et al. 1995) könnte darüber hinaus theoretisch eine vollkommen neue

Qualität der Charakterisierung von Knochengewebe ermöglichen, jedoch konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

4.4. Inhomogenität und elastomechanische Eigenschaften von Knochengewebe

Die mechanischen Eigenschaften des Knochens bestimmen in der Unfallchirurgie und Orthopädie maßgebend die Knochenqualität. Eine exakte Bestimmung der mechanischen Eigenschaften ist letztlich nur durch invasive destruierende biomechanische Testverfahren möglich. Eine nicht destruktive Beurteilung der mechanischen Eigenschaften von Knochen kann derzeit indirekt durch Beschreiben von Struktur und Mineralisationsgrad in der radiologischen und histologischen Bildgebung erfolgen, wie z.B. durch DEXA oder Mikro-CT (vgl. 1.1.2.). Diese Verfahren gelten derzeit in der klinischen Medizin als Standardmethoden. Es liegen jedoch experimentelle Studien vor, die eine strenge Korrelation insbesondere von Mineralisationsgrad und mechanischen Eigenschaften anzweifeln (Friedlaender et al. 2001) bzw. darauf hinweisen, dass der Mineralisationsgehalt nur einen von mehreren Faktoren darstellt, welche die mechanischen Eigenschaften bestimmen (Rho et al. 1998, Weiner et al. 1998). Neben der makroskopischen Beurteilung erlangt daher gegenwärtig die Einschätzung der biomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe auch auf mikrostruktureller Ebene zunehmend an Bedeutung. Ein neuer, nicht destruktiver Ansatz wäre daher die direkte Visualisierung elastomechanischer Eigenschaften auf mikrostruktureller Ebene durch Bestimmung der akustischen Impedanz des Gewebes.

Die in der Literatur am meisten verwendete Methode zur Charakterisierung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochen stellt die Messung der akustischen Impedanz dar (Eckardt et al. 2001, Harten, Jr. et al. 1997), wobei diese Größe auch in den Reflexionskoeffizienten eingeht, der sich wiederum linear zu den Grauwertstufen verhält (Qin et al. 2004, Hirsekorn et al. 1995) (vgl. 2.1.3.). Daraus folgt die Überlegung, über die Grauwertbestimmung auf die mechanischen Eigenschaften rückschließen zu können.

Dieser Gedanke wurde in einem ersten Versuchsansatz durch Vergleich der Relation der Werte akustischer Impedanz von neu gebildetem zu kortikalem Knochen überprüft. Hierbei konnten aber keine überzeugenden und reproduzierbaren Daten erhoben werden, da die verschiedenen Knochenareale eines Schnittes je nach verwendeter Energiestufe in verschiedenen Helligkeitsstufen zueinander abgebildet wurden, sodass der neu gebildete Knochen einmal von höherer, einmal von niedrigerer Festigkeit im Vergleich zur Kortikalis erschien. Somit lässt sich bei vorliegender Hypothese durch alleinige Betrachtung der Grauwertdarstellung keine vergleichende Aussage bezüglich der elastomechanischen Eigenschaften machen, wenn die Scan-Parameter innerhalb einer Untersuchung nicht konstant gehalten werden können. Standardisierte Einstellungen der Scan-Parameter existieren nicht und können derzeit auch noch nicht begründet werden, da für jedes zu scannende Präparat die Einstellungen neu optimiert und kalibriert werden müssen.

Es muss aber eingeräumt werden, dass sich beide Quotienten der Messwerte nahe 1,0 befinden und nur zwei Messungen durchgeführt wurden. Deshalb könnte man aus vorliegenden Ergebnissen ebenso schließen, dass die elastomechanischen Eigenschaften der einzelnen im Fokus liegenden Messpunkte – unabhängig davon, ob von kortikalem oder neu gebildetem Knochen - ähnlich sind, aus der Gesamtheit aber letztlich die Qualität eines größeren Knochenareals resultiert. Somit liegt wieder die Problematik einer punktuellen Messung eines so inhomogenen Materials wie Knochen vor. Letztlich sind zur Bestätigung bzw. Widerlegung der Hypothese noch weitere Untersuchungen notwendig.

Allerdings wurde ähnliches auch in einer anderen Studie festgestellt, in der gezeigt wurde, dass ein heller (oder dunkler) Grauwert nicht unbedingt hoher (oder niedriger) Dichte oder großer (oder geringer) Elastizität entspricht. Der Kontrast variiert dabei sehr stark mit bereits kleinsten Veränderungen des Abstands zwischen Linse und Präparat oder mit der Oberfläche des Präparates. Deshalb bedeutet ein identischer Grauwert nicht zwangsläufig gleiche mechanische Eigenschaften (Yu et al. 1995.)

Außerdem wurde gezeigt, dass bei der Knochenneubildung in der optischen Darstellung kein Unterschied zwischen einem 75% mineralisierten Osteon zu einem voll-

ständig mineralisierten, reifen Osteon besteht und somit in diesem Bereich kein Unterschied in der Grauwertdifferenzierung vorliegt (Qin et al. 2004). Es ergibt sich also ein identischer Reflexionskoeffizient sowie Impedanzwert für Osteone mit einem Mineralisationsgehalt zwischen 75 und 100%. Für diesen Bereich erlaubt die Impedanzmessung keinen Rückschluss auf die mechanischen Eigenschaften der Osteone, denn es würden fälschlicherweise gleiche Werte trotz existierender Unterschiede erhoben werden.

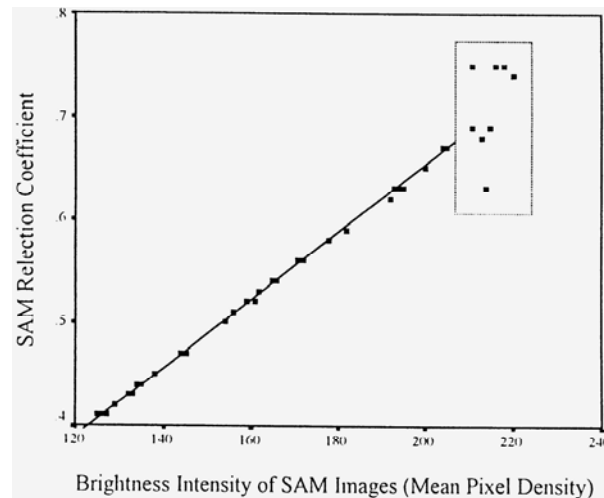


Abb. 23: Lineare Abhängigkeit zwischen Reflexionskoeffizienten des fokussierten Punktes und Helligkeitsstufe bis zu einem Mineralisationsgehalt der Osteone von 75% (Qin et al. 2004)

Die Aussagekraft und Validität der Messung der akustischen Impedanz zur Quantifizierung der elastomechanischen Eigenschaften wird also durch zahlreiche Faktoren begrenzt.

Die für Knochengewebe gemessenen Impedanzwerte sowie die Grauwertdarstellung werden auch von den jeweiligen Messbedingungen beeinflusst (Raum et al. 1999), sodass die Konstanzhaltung derselben eine notwendige Voraussetzung ist.

Es wurde gezeigt, dass ein signifikanter Anstieg der gemessenen Impedanzwerte identischer Strukturen mit steigender Ultraschallfrequenz besteht (Raum et al. 2004). Aus diesem Grunde können nur relative Werte verglichen werden, die mit identischen Frequenzbereichen ermittelt wurden, eine absolute Aussage ist aber nicht

möglich. Weiterhin bewirkt die Einbettung des Knochenpräparates in Kunststoff wie Polymethylmethacrylat einen signifikanten Anstieg der gemessenen Impedanzwerte, der allerdings konstant innerhalb einer Messreihe bleibt und durch Kalibrierung ausgeglichen werden kann (Zimmerman et al. 1994).

Bei einer weiteren Untersuchung von kortikalem Knochen konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche elastische Eigenschaften für transversale und axiale Schnitte ermittelt werden (Turner et al. 1999). Es wurde auch nachgewiesen, dass eine Abhängigkeit der gemessenen Impedanzwerte vom Schnittwinkel der Knochensegmente besteht (Smitmans 2001). Die mechanische Bearbeitung der Präparatoberfläche führt aufgrund der Inhomogenität und Varianz der Festigkeit in unterschiedlichem Maße zu einer Abtragung des Knochengewebes (vgl. 4.1.2.). Dadurch werden folglich auch die lokalen mechanischen Eigenschaften verändert, sodass die Validität der Messung der akustischen Impedanz der bearbeiteten Probenoberfläche angezweifelt werden kann (Eckardt et al. 2001).

Die gemessenen Werte sind aufgrund der Heterogenität des Knochens folglich nur für den untersuchten Anteil der Gewebeprobe repräsentativ. Wegen der vielseitigen Problematik kann SAM derzeit nur als eine Ergänzung zur makroskopischen Beurteilung der mechanischen Eigenschaften von Knochengewebe betrachtet werden.

In einer Studie an menschlichem kortikalen und trabekulären Knochen wurde nachgewiesen, dass durch Grauwertbestimmung an standardisierten homogenen Körpern bekannter akustischer Impedanz das Erstellen einer Eichkurve für jedes einzelne untersuchte Präparat mittels SAM legitim ist, sodass jeder Graustufe des Knochnschnittes unter Beibehaltung der jeweiligen Scan-Parameter ein entsprechender Impedanzwert zugeordnet werden kann (Bumrerraj et al. 2001). Dieser Versuchsansatz kann auch in einer dieser Untersuchung folgenden Arbeit übernommen werden. Die Bestimmung des Grauwerts von standardisierten homogenen Prüfkörpern (Plexiglas, Aluminium) bekannter akustischer Impedanz nach Optimierung der Scan-Parameter ermöglicht die Erstellung einer Eichkurve für jedes einzelne untersuchte Präparat, sodass durch Ermittlung des Grauwertes von Knochengewebe indirekt dessen akustische Impedanz unter für die jeweilige Probe konstanten Bedingungen bestimmt werden kann. Allerdings kann die Messung der akustischen Impedanz und somit der

elastischen Eigenschaften nur lokal erfolgen (Hirse Korn et al. 1995) und es ist fraglich, inwiefern über die punktuell gemessene akustische Impedanz die Biomechanik eines so heterogenen, anisotropen Materials wie Knochengewebe wirklich sinnvoll beurteilt werden kann.

Darüber hinaus ist zu vermerken, dass weder die Schallgeschwindigkeit noch die Dichte, aus denen sich die akustische Impedanz berechnet, durch SAM direkt gemessen werden können (Bumrerraj et al. 2001) und somit die Legitimität einer Charakterisierung von mechanischen Knocheneigenschaften über die akustische Impedanz noch mehr in Frage gestellt werden kann.

Knochen weist eine äußerst komplexe Organisation auf und ist aus strukturell hierarchische Ebenen aufgebaut, wobei jede Ebene eigene mechanische Eigenschaften besitzt, die zueinander in Wechselwirkung stehen und letztlich als Ganzes die Biomechanik des Knochens bestimmen (Weiner et al. 1998). Dieser Aufbau stellt generell Methoden, die nur eine der funktionellen Ebenen erfassen können, in Frage.

Prinzipiell ist kein Rückschluss von den biomechanischen Eigenschaften im mikrostrukturellen Bereich auf das elastomechanische Verhalten des Knochens auf makroskopischer Ebene möglich. Die Begründung dafür liegt zwar in der Inhomogenität des Knochengewebes, wobei die Erklärungsansätze sehr stark differieren.

Zum einen besteht die Meinung, dass die elastomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes vor allem durch den makroskopischen Knochenaufbau bestimmt werden und wenig von mikroskopischen Strukturen wie der Ausrichtung der Kristalle (Eckardt et al. 2001). In einer weiteren Untersuchung wurden Ergebnisse erhoben, die diese These unterstützen. Es wurde mit SAM ermittelt, dass prämenopausaler, gesunder Knochen eine niedrigere akustische Impedanz besitzt als der osteoporotischer Knochen der Vergleichsgruppe, der wiederum in den durch SAM erzeugten Bildern mehr helle Bereiche aufweist, welche eine höhere akustische Impedanz sowie Elastizität und Dichte implizieren (Hasegawa et al. 1995). Somit scheinen die elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe auf mikroskopischer Ebene keine Aussage für das Frakturrisiko des gesamten Knochens zu ermöglichen.

Andere Autoren betrachten die Osteone, deren lamellären Aufbau sowie die Ausrichtung der Lamellen, als mechanische Basiseinheit des kortikalen Knochengewebes,

welche die größte Bedeutung für die Bestimmung der individuellen mechanischen Knocheneigenschaften besitzt (Weiner et al. 1999, Ascenzi 1988). Somit könnte eine Bestimmung der elastomechanischen Eigenschaften von Osteonen, wie in vielen Studien unternommen, durchaus Rückschluss auf die Mechanik des gesamten Knochens erlauben. Ähnlich ist die Auffassung, dass im mikroskopischen Bereich die mechanischen Eigenschaften des Knochens vor allem durch den Verlauf der kollagenen Fasern, der gemäß der lokalen Anforderungen an den Knochen angepasst ist, charakterisiert werden (Junqueira et al. 1996) und nicht mit der Messung der akustischen Impedanz erfasst werden.

Auf makroskopischer Ebene soll dagegen die Festigkeit des Knochens maßgeblich vom Verlauf der Spongiosabälkchen, der überwiegend den Hauptspannungslinien entspricht, bestimmt werden (Junqueira et al. 1996) sowie vom Mineralisationsgehalt des Knochens, von dem auch die durch SAM gemessene akustische Impedanz letztlich abhängt und der für manche Autoren sogar den wichtigsten Parameter für dessen Festigkeit darstellt (Burstein et al. 1975).

Auch bezüglich des hierarchischen Aufbaus und der Strukturebenen besteht in der Literatur Uneinigkeit. Manche Autoren unterteilen Knochen in sieben strukturelle Ebenen, die die mechanischen Eigenschaften des Knochens bestimmen (Weiner et al. 1998), andere nur in fünf (Rho et al. 1998). Es besteht keine einheitliche Auffassung über die Biomechanik des Knochens bzw. die Bedeutung und Wichtung der einzelnen Determinanten für die funktionellen und mechanischen Eigenschaften. Somit ist also fraglich, ob und wie SAM zur Beurteilung der Festigkeit bzw. Biomechanik von Knochen angewendet werden kann, da mit dieser Methode momentan Knochengewebe nur auf der Ebene von Osteonen untersucht bzw. bezüglich elastomechanischer Eigenschaften quantifiziert werden kann und auch diese Charakterisierung anzweifelbar ist. Die Biomechanik wird aber von zahlreichen einzelnen strukturellen Faktoren sowie deren Wechselwirkungen untereinander bestimmt (Weiner et al. 1998).

Die Heterogenität des Knochengewebes stellt ein für die Ultraschallmikroskopie derzeit nicht lösbares Problem dar, da die Messung der akustischen Impedanz als Pa-

parameter für die Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften von Knochen nur für die jeweils untersuchten Anteile der Gewebeprobe Gültigkeit besitzt. Ein Rückschluss auf die Mechanik größerer Bereiche oder des gesamten Knochens erscheint mit dieser Methode aber nicht möglich, da z.B. trotz einer Frakturlinie die punktuelle Messung eines bestimmten Bereiches auf mikroskopischer Ebene hervorragende Werte liefert, der Knochen insgesamt aber trotz guter mikroskopischer Qualität makroskopisch instabil ist. Die elastomechanischen Eigenschaften eines solch inhomogenen, anisotropen Gewebes lassen sich nur schwer quantifizieren. Deshalb stellt sich generell die Frage, ob die Ultraschallmikroskopie eines so heterogenen Gewebes valide Ergebnisse liefert.

SAM bietet gegenüber den destruktiven Methoden aber den Vorteil der Wiederholbarkeit mit geringerem Messfehler und höherer Präzision (Hasegawa et al. 1995).

Allerdings kann SAM die biomechanischen Methoden nur ergänzen und zumindest derzeit nicht ersetzen, zum einen wegen der bereits erläuterten Problematik, zum anderen auch aus technischen Gründen, da der gesamte Knochen nicht komplett erfassbar ist, was für die klinische Medizin von hoher Relevanz ist.

Letztlich stellt SAM eine viel versprechende, nicht destruktive Methode dar, die Informationen von neuer Aussagekraft und Bedeutung über die Morphologie und Qualität von Knochengewebe liefert, die die Erkenntnisse aus anderen mikroskopischen, histologischen und mechanischen Untersuchungen ergänzen kann und somit die Kenntnisse über das komplexe Gewebe Knochen bedeutend erweitert. Bereits heute liefert SAM valide histomorphometrische Werte von Knochengewebe und stellt somit eine gleichwertige Methode im Vergleich zu MR bei etwa gleicher Auflösung für die Beurteilung von Knochengewebe dar.

Die Ergebnisse dieser Studie sind bedeutsam für die Grundlagenforschung, da SAM zukünftig besser verfügbar sein könnte als MR. Ferner stellt die quantitative SAM eine potentielle Methode dar, um elastomechanische Eigenschaften von Knochengewebe nicht invasiv zu bestimmen, sobald diese Methode diesbezüglich ausgereift ist und konstante bzw. valide Werte liefert.

5. Zusammenfassung

Scanning Acoustic Microscopy (SAM) stellt ein nicht invasives Bildgenerierungs- und Bildanalyzesystem dar mit einer Auflösung ähnlich der des Lichtmikroskops, die eine Darstellung von mikroskopischen Strukturen ohne Anwendung von Färbetechniken erlaubt. Aufgrund dieser Eigenschaften wird SAM ein großes Potential zur histomorphometrischen und biomechanischen Charakterisierung von Knochengewebe zugesprochen.

In dieser Untersuchung sollten die Anwendungsmöglichkeiten von SAM zur Darstellung und Beurteilung von neu gebildetem Knochen bei osteologischen Fragestellungen erarbeitet werden. Des Weiteren wurde SAM bezüglich Bildgenerierung und Histomorphometrie mit der Mikroradiographie - einer Standardmethode zur histomorphometrischen Untersuchung von kalzifiziertem Knochengewebe - qualitativ und quantitativ verglichen, um die Validität von SAM zu prüfen. Der Forschungsschwerpunkt liegt derzeit auf der Möglichkeit zur Charakterisierung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe. Deshalb wurde zudem ein Versuchansatz entwickelt, um durch eine Grauwertanalyse anhand bereits erstellter Bilder die elastomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes zu untersuchen.

Die 42 transversalen, unentkalkten Knochenschnitte stammten aus einem Segmentdefektmodell der Schafstibia, aufgefüllt mit Bone Morphogenetic Protein-7 und autogenem Knochenmark. Nach Einbettung in Methylmetacrylat wurden die Präparate mittels konventioneller Mikroradiographie und SAM dargestellt. Anschließend erfolgten die Beurteilung von 40 SAM-Bildern bezüglich der qualitativen Abbildung des neu gebildeten und kortikalen Knochens sowie der qualitative und quantitative Vergleich der durch SAM und MR gewonnenen Bilder. Dabei wurden die beiden Methoden durch Messung der neu gebildeten Knochenfläche histomorphometrisch analysiert. Zuletzt wurde die Möglichkeit zur Charakterisierung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe durch eine Grauwertanalyse zweier Abbildungen eines identischen Knochenschnittes bei unterschiedlichen Scan-Parametern betrachtet.

SAM überzeugte als Bildgenerierungsverfahren, um Knochengewebe auf mikroskopischer Ebene darzustellen. Dabei konnte durch Anwendung geeigneter Scan-Parameter eine deutliche Abgrenzbarkeit von neu gebildetem zu kortikalem Knochen erreicht werden. Im qualitativen Vergleich von SAM und MR erlaubte die Ultraschallmikroskopie Bilder höherer Auflösung sowie eine differenzierte Grauwertdarstellung gemäß der akustischen Eigenschaften. Die durch SAM und MR erhobenen Werte korrelierten sehr gut miteinander, es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden erhoben werden. Die Beurteilung der elastomechanischen Eigenschaften über eine Grauwertanalyse erbrachte uneinheitliche Ergebnisse, da identische Knochenstrukturen je nach verwendeten Scan-Parametern in unterschiedlichem Helligkeitsverhältnis abgebildet wurden.

SAM stellt eine viel versprechende Methode dar, um Knochengewebe nicht invasiv zu visualisieren und zu charakterisieren. SAM ermöglicht eine neue Qualität der Bildgebung basierend auf den akustischen bzw. elastomechanischen Eigenschaften des untersuchten Gewebes. Dies qualifiziert SAM zu einer einzigartigen Methode, die eine hoch aufgelöste Abbildung von Knochen- und Weichteilgewebe erlaubt. Die vielfältige Darstellung eines identischen Präparates durch SAM erweitert das Beurteilungsspektrum deutlich. Im Vergleich zur Mikroradiographie stellt SAM eine äquivalente Methode für histomorphometrische Messungen dar und kann diese durchaus ersetzen, insbesondere auch aufgrund der qualitativen Vorteile der Abbildung. Allerdings ist SAM derzeit wegen der noch zeitintensiven Bilderzeugung nicht in dem Umfang anwendbar wie die MR. Eine zukünftige Anwendung von SAM zur Beurteilung elastomechanischer Eigenschaften von Knochengewebe scheint möglich, ist derzeit aber limitiert durch zahlreiche Faktoren wie fehlende Standardisierung der Messungen, der Größe des erfassbaren Knochengewebes sowie dessen Inhomogenität, aber auch uneinheitlicher Ergebnisse zur Validität der Messung und deren Aussagekraft sowie Relevanz. Diese Studie liefert bedeutsame Erkenntnisse für die Grundlagenforschung, um die Anwendbarkeit des SAM bei osteologischen Fragestellungen zu erweitern und zu optimieren.

6. Literaturverzeichnis

- Abendroth B, Semmler K, Seidel T, Abendroth K (1996): Bone Mineral Composition Analysis by Back-Scattered Electron Microscopy (BSE) and Linescanning. *Bone* 19(3):129-169
- Adolphs N, Kunz C, Pyk P, Hammer B, Rahn B (2005): Callus mineralization following distraction osteogenesis of the mandible monitored by scanning acoustic microscopy (SAM): *J Craniomaxillofac Surg* 33(5):314-317
- Andersen T, Jensen AS, Lalla M, Jorgensen CS, Jorgensen TM (2003): A new method to correlate histology with biomechanical properties in urethral tissue. An in-vitro study using light microscopy and scanning acoustic microscopy. *APMIS Suppl* (109):35-38
- Ascenzi A (1988): The micromechanics versus the macromechanics of cortical bone - a comprehensive presentation. *J Biomech Eng* 110(4):357-363
- Ashman RB, Cowin SC, Van Buskirk WC, Rice JC (1984): A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomechanics* 17:349-361
- Atalar A (1985): Penetration depth of scanning acoustic microscope. *IEEE Trans Sonics Ultrason* SU-32(2):164-167
- Balk LJ, Heiderhoff R, Liu XX, Lepidis P (2002): Korrelation von elastischen Materialeigenschaften mit makroskopischen Werkstoffkenngrößen - Forschungsbericht 2000-2002. Elektrotechnik und Informationstechnik Lehrstuhl für Elektronik, Bergische Universität Wuppertal
- Banse X, Devogelaer JP, Holmyard D, Grynepas M (2005): Vertebral cancellous bone turnover: Microcallus and bridges in backscatter electron microscopy. *Micron* 36(7-8):710-714
- Barr RJ, White GM, Jones JP, Shaw LB, Ross PA (1991): Scanning acoustic microscopy of neoplastic and inflammatory cutaneous tissue specimens. *J Invest Dermatol* 96(1):38
- Berezina S, Blank V, Levin V, Prokhorov V (2000): Observation of ultrasound velocity gradient in fullerene ceramics by acoustic microscopy. *Ultrasonics* 38:327-330
- Bergman G, Engfeldt B (1954): Studies on mineralized dental tissues. II. Microradiography as a method for studying dental tissues and its application to the study of caries. *Acta Odontol Scand* 12(2):99-132
- Boivin G, Meunier PJ (2002): The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int* 70(6):503-511

-
- Bollet-Quivogne FR, Anderson P, Dowker SE, Elliott JC (2005): Scanning microradiographic study on the influence of diffusion in the external liquid on the rate of demineralization in hydroxyapatite aggregates. *Eur J Oral Sci* 113(1):53-59
- Boyde A, Compston JE, Reeve J, Bell KL, Noble BS, Jones SJ, Loveridge N (1998): Effect of estrogen suppression on the mineralization density of iliac crest biopsies in young women as assessed by backscattered electron imaging. *Bone* 22(3):241-250
- Boyde A, Davy KWM, Howell PGT, Jones SJ (1996): Standards for backscattered electron (BSE) imaging of skeletal and dental tissue. *Bone* 19(6):685-701
- Boyde A, Elliott JC, Jones SJ (1993): Stereology and histogram analysis of backscattered electron images: age changes in bone. *Bone* 14(3):205-210
- Boyde A, Jones SJ, Aerssens J, Dequeker J (1995): Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by backscattered electron image analysis: variations with age, sex, and degree of osteoarthritis. *Bone* 16(6):619-627
- Boyde A, Lovicar L, Zamecnik J (2005): Combining confocal and BSE SEM imaging for bone block surfaces. *Eur Cell Mater* 9:33-38
- Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, Bramlage P, Müller GA, Strutz F (2005): Bone Morphogenic Proteins im Skelettsystem – eine zusammenfassende Darstellung. *Z. Rheumatol* 64: 416-422
- Briggs GA (1992): Acoustic Microscopy – A Summary. *Rep Prog Phys* 55:851-909
- Briggs GA, Wang J, Gundle R (1993): Quantitative acoustic microscopy of individual living human cells. *J Microsc* 172 (Pt 1):3-12
- Bumrerraj S, Katz JL (2001): Scanning acoustic microscopy study of human cortical and trabecular bone. *Ann Biomed Eng* 29(12):1034-1042
- Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L (1975): Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 57(7):956-961
- Cherian RA, Haddaway MJ, Davie MW, McCall IW, Cassar-Pullicino VN (2000): Effect of Paget's disease of bone on areal lumbar spine bone mineral density measured by DXA, and density of cortical and trabecular bone measured by quantitative CT. *Br J Radiol* 73(871):720-726
- Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC (2003): Repair of Articular Cartilage Defects with Osteogenic Protein-1 (BMP-7) in Dogs. *J Bone Surg Am* 85:116-123
- Cooper DM, Maytas JR, Katzenberg MA, Hallgrimsson B (2004): Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradiographic Measurements of Cortical Bone Porosity. *Calcif Tissue Int* 74(437):447

- Dean C, Ito M, Makarenkova HP, Faber SC, Lang RA (2004): Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation. *Development* 131(17):4155-4165
- Deetjen P, Speckmann EJ, Heschler J (2005): *Physiologie*. Auflage 4:188-196. Urban & Fischer, München
- Denisova LA, Maev RG, Poyurovskaya IY, Grineva TV, Denisov AF, Maeva EY, Bakulin EY (2004): The use of acoustic microscopy to study the mechanical properties of glass-ionomer cement. *Dental Materials* 20(4):358-363
- Douglas JH (1978): Sound Reveals a Hidden Microscopic World. *Science News* 114(13):219
- Eckardt I, Hein HJ (2001): Quantitative measurements of the mechanical properties of human bone tissues by scanning acoustic microscopy. *Ann Biomed Eng* 29(12):1043-1047
- Einhorn TA (2003): Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:82-88
- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Mikro-CT. Technologie und Applikation zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Radiologe* 39(3):203-212
- Engstrom A, Engfeldt B (1953): Lamellar structure of osteons demonstrated by microradiography. *Experientia* 9(1):19
- Every AG, Deschamps M (2003): Principal surface wave velocities in the point focus acoustic materials signature $V(z)$ of an anisotropic solid. *Ultrasonics* 41(7):581-591
- Felsenberg D, Gowin W (1999): Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. *Radiologe* 39(3):186-193
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S (2001): Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions: A Prospective, Randomized Clinical Trial Comparing rhOP-1 with Fresh Bone Autograft. *J Bone Joint Surg Am* 83:151-158
- Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E (1996): Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293:317-326
- Gilmore RS, Tam KC, Young JD, Howard DR (1986): Acoustic Microscopy from 10 to 100 MHz for Industrial Application. *Phil Trans R Soc Series A* 320:215-235
- Göbel U, Lefranc G, Degischer HP (2003): Non-destructive Investigation of AlSi7Mg/SiC70pMMCs by means of Acoustic Scanning Microscopy, X-Ray and Neutron Diffraction. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 34:375-380

-
- Grahma JG (1955): A technique of microradiography. *Radiography* 21(246):120-127
- Gupta MC, Khan SF (2005): Application of bone morphogenetic proteins in spinal fusion. *Cytokine & Growth Factor Rev* 16(3):347-355
- Hadimioglu B, Foster JS (1984): Advances in superfluid helium acoustic microscopy. *J Appl Phys* 56(7):1976-1980
- Harms V (1998): *Physik für Mediziner und Pharmazeuten*. Auflage 14. Harms-Verlag, Kiel-Mönkeberg
- Harten RD Jr., Lee FY, Zimmerman MC, Hurowitz E, Arakal R, Behrens FF (1997): Regional and temporal changes in the acoustic properties of fracture callus in secondary bone healing. *J Orthop Res* 15(4):570-576
- Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB (1995): Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy. *Bone* 16(1):85-90
- Heuck F (1973): Results of microradiography in bone diseases. *Radiologe* 13(3):102-110
- Hildebrand JA, Rugar D (1984): Measurement of cellular elastic properties by acoustic microscopy. *J Microsc* 134:245-260
- Hildebrand JA, Rugar D, Johnston RN, Quate CF (1981): Acoustic microscopy of living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(3):1656-1660
- Hirse Korn S, Pangraz S (1994): Materials characterization with the acoustic microscope. *Appl Phys Lett* 64(13):1632-1634
- Hirse Korn S, Pangraz S, Weides G, Arnold W (1995): Measurement of elastic impedance with high resolution using acoustic microscopy. *Appl Phys Lett* 67(6):745-747
- Hitomi H, Kiyomoto H, Hashimoto M, Aki Y, Uchida K, Takahashi N, Fukunaga M, Mizushige K, Senda S, Sakamoto H, Matsuo H, Yuasa S (2000): A new approach for glomerular lesions: evaluation of scanning acoustic microscopy (SAM) for experimental glomerular disease in rats. *Ultrasound Med Biol* 26(4):571-577
- Hobson RS (1998): A pilot study of mineralization distribution in the cortical bone of the human mandible. *Arch Oral Biol* 43(8):633-639
- Hobson RS, Beynon AD (1997): Preliminary quantitative microradiography study into the distribution of bone mineralization within the basal bone of the human edentulous mandible. *Arch Oral Biol* 42(7):497-503
- Hube R, Mayr H, Hein W, Raum K (2006): Prediction of biomechanical stability after callus distraction by high resolution scanning acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 32(12): 1913-1921
- Hudelmaier M, Kollstedt A, Lochmuller EM, Kuhn V, Eckstein F, Link TM (2005): Gender differences in trabecular bone architecture of the distal radius assessed with magnetic

- resonance imaging and implications for mechanical competence. *Osteoporos Int* 16(9):1124-1133
- Ishikawa I, Semba T, Kanda H, Katakura K, Tani Y, Sato H (1989): Experimental Observation of Plastic Deformation Areas, Using an Acoustic Microscope. *IEEE Trans UFFC* 36:274-279
- Jaffre B, Raum K, Brandt J, Watrin A, Klemenz A, Netter P, Laugier P, Saied A (2002): Assessment of Changes Occuring in Subchondral Bone during Rat Skeletal Maturation using 400 MHz Quantitative Ultrasound. *J Bone Miner Res* 17(1):420-421
- Jergas M, Schmid G (1999): Konventionelle Radiologie der Osteoporose und Röntgenabsorptiometrie. *Radiologe* 39(3):174-185
- Johnson EE, Urist MR (2000): Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop* 371:61-76
- Johnson EE, Urist MR, Finerman GA (1988): Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone augmented with human bone morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop* 236:249-257
- Johnson S, McNally D, Halliwell M (2002): High-frequency ultrasound imaging of the intervertebral disc. *Ultrasound Med Biol* 28(7):939-947
- Johnston RN, Atalar A, Heiserman J, Jipson V, Quate CF (1979): Acoustic microscopy: resolution of subcellular detail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7):3325-3329
- Jones AC, Sakellariou A, Limaye A, Arns CH, Senden TJ, Sawkins T, Knackstedt MA, Rohner D, Hutmacher DW, Brandwood A, Milthorpe DK (2004): Investigation of microstructural features in regenerating bone using micro computed tomography. *J Mater Sci Mater Med* 15(4):529-532
- Jorgensen CS, Assentoft JE, Knauss D, Gregersen H, Briggs GA (2001): Small intestine wall distribution of elastic stiffness measured with 500 MHz scanning acoustic microscopy. *Ann Biomed Eng* 29(12):1059-1063
- Junqueira LC, Carneiro J (1996): *Histologie*. Auflage 4:190-217. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg
- Katz JL, Meunier A (1987): The elastic anisotropy of bone. *J Biomech* 20(11-12):1063-1070
- Katz JL, Meunier A (1993): Scanning acoustic microscope studies of the elastic properties of osteons and osteon lamellae. *J Biomech Eng* 115(4B):543-548
- Katz JL, Meunier A (1997): Scanning Acoustic Microscopy of human and canine cortical bone microstructure at high frequencies. *Stud Health Technol Inform* 40:123-137

-
- Katz JL, Spencer P, Nomura T, Wagh A, Wang Y (2003): Micromechanical properties of demineralized dentin collagen with and without adhesive infiltration. *J Biomed Mater Res* 66(1):120-128
- Katz JL, Yoon HS, Lipson S, Maharidge R, Meunier A, Christel P (1984): The effects of remodeling on the elastic properties of bone. *Calcif Tissue Int* 36(1):S31-S36
- Kessler L, Adams T (2003): Full-Volume Analysis of Material by Acoustic Microimaging. *Microscopy And Analysis (Euro)* 86:9-11
- Klemenz A, Schwinger C, Brandt J, Kressler J (2003): Investigation of elastomechanical properties of alginate microcapsules by scanning acoustic microscopy. *J Biomed Mater Res* 65A(2):237-243
- Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S (1993): Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 194(3):1352-1358
- Krämer Scientific Instruments GmbH (2003): Acoustic Microscopy – Fundamental Principles
Krämer Scientific Instruments GmbH (2003) WINSAM Bedienungsanleitung
- Kulik A, Gremaud G, Satish S (1990): Acoustic Microscopy as a Polyvalent Tool in Material Science. *Trans R Microsc Soc* 1:85-90
- Lam A, Sambursky RP, Maguire JI (2005): Measurement of scleral thickness in uveal effusion syndrome. *Am J Ophthalmol* 140(2):329-321
- Lefter AM, Tsao PS, Ma XL, Sampath TK (1992): Anti-ischaemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein (hOP-1): *J Mol Cell Cardiol* 24(6):585-593
- Liu JB, Peterson JN, Forsberg F, Jaeger MD, Kynor DB, Kline-Schoder RJ (2004): Acoustic microscopy system: design and preliminary results. *Ultrasonics* 42(1-9):337-341
- Lemons RA, Quate CF (1974): Acoustic microscope-scanning version. *Appl Phys Lett* 24:163-165
- Lemons RA, Quate CF (1979): Acoustic microscopy. *Phys Acoust* 14:1-92
- Lu X, Senda S, Mizushige K, Masugata H, Sakamoto S, Sakamoto H, Matsuo H (2000): Evaluation of progression in nonrheumatic aortic valvular stenosis by scanning acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 26(4):563-569
- Machado JC, Foster FS, Gotlieb AI (2002): Measurement of the ultrasonic properties of human coronary arteries in vitro with a 50-MHz acoustic microscope. *Braz J Med Biol Res* 35(8):895-903

-
- Maebayashi M, Matsuoka T, Koda S, Hashitani R, Nishio T, Kimura S (2004): Study on polystyrene thin film on glass substrate by scanning acoustic microscope. *Polymer* 45(22):7563
- Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weiler C, Refior HC, Schmitz C (2004): New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density. *Orthopade* 33(12):1401-1410
- Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EY (1991): Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies. *J Bone Joint Surg Am* 73(6):914-923
- Marmor MF, Wickramasinghe HK, Lemons RA (1977): Acoustic microscopy of the human retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16(7):660-666
- Masugata H, Mizushige K, Senda S, Kinoshita A, Lu X, Sakamoto H, Sakamoto S, Matsuo H (1999): Tissue characterization of myocardial cells by use of high-frequency acoustic microscopy: differential myocyte sound speed and its transmural variation in normal, pressure-overload hypertrophic, and amyloid myocardium. *Angiology* 50(10):837-845
- Meunier A, Riot O, Christel P, Katz JL (1991): Characterization of local anisotropic elastic properties of femoral and tibial diaphysis using acoustic transmission measurements and acoustic microscopy. In: Toni A, Middleton J, Palloti G (Ed): *Interfaces in Medicine and Mechanics II*, Elsevier Applied Science, London
- Meyers enzyklopädisches Lexikon in 25 Bänden (1978): Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich. Band 7:609-610
- Meyers enzyklopädisches Lexikon in 25 Bänden (1978): Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich. Band 22:402
- Myrdycz A, Lefebvre F, Ouafrouh M, Monchau F, Callens D, Hildebrand HF (1999): Potentialities of the Ultrasounds for the Nondestructive Evaluation of Cell Adhesion. *Bone* 25(2):75-79
- Nakashima M (2005): Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(3):369-376
- Nakashima M, Reddi AH (2003): The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 21(9):1025-1032
- Nonaka K, Fukuda S, Aoki K, Yoshida T, Ohya K (2006): Regional distinctions in cortical bone mineral density measured by pQCT can predict alterations in material property at the tibial diaphysis of the *Cynomolgus* monkey. *Bone* 38(2):265-272
- Nyssen-Behets C, Arnould V, Dhém A (1994): Hypermineralized lamellae below the bone surface: a quantitative microradiographic study. *Bone* 15(6):685-689

-
- O'Brien WD, Olerud J, Shung KK, Reid JM (1981): Quantitative acoustical assessment of wound maturation with acoustic microscopy. *J Acoust Soc Am* 69(2):575-579
- Ogaard B, Arends J, Schuthof J, Rolla G, Ekstrand J, Oliveby A (1986): Action of fluoride on initiation of early enamel caries in vivo. A microradiographical investigation. *Caries Res* 20(3):270-277
- Prevrhal S, Genant HK (1998): Quantitative Computertomographie. *Radiologe* 39(3):194-202
- Qin L, Bumrerraj S, Leung K, Katz L (2004): Correlation study of scanning acoustic microscope reflection coefficients and image brightness intensities of micrographed osteons. *J Bone Miner Metab* 22(2):86-89
- Qin L, Hung L, Leung K, Guo X, Bumrerraj S, Katz L (2001): Staining intensity of individual osteons correlated with elastic properties and degrees of mineralization. *J Bone Miner Metab* 19(6):359-364
- Qin M, Lin S, Song Z, Tian J, Chen F, Yan H et al. (1999): Comparison of bone mass in forearm, lumbar vertebra and hip by single and/or dual energy X-ray absorptiometry. *Chin Med Sci J* 14(2):117-120
- Quate CF (1979): Scanning Acoustic Microscopy. *Physics Today* 32(5):20-21
- Quate CF (1985): Acoustic Microscopy. *Physics Today* 38(8):34-42
- Raum K (2002): Quantitative Akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe. Ph.D. Thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Raum K, Bandt J, Klemenz A, Cobet U (1999): Quantitative Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Akustischen Impedanz von Kortikalem Knochengewebe. *Z Med Phys* 9:246-253
- Raum K, Reissauer J, Brandt J (2004): Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy. *J Biomed Mater Res* 71(3):430-438
- Regauer M, Jurgens I, Kotsianos D, Stutzle H, Mutschler W, Schieker M (2005): New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical defect model in sheep. *Zentralbl Chir* 130(4):338-345
- Reichel H, Lebek S, Alter C, Hein W (1998): Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep. *Clin Orthop*(357):237-246
- Rho JY (1996): An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone. *Ultrasonics* 34:777-783

- Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998): Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20(2):92-102
- Rho JY, Tsui TY, Pharr GM (1997): Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* 18(20):1325-1330
- Riede U (2000): Elastomechanische Eigenschaften des diaphysären Knochens nach Kallusdistraction: Eine Untersuchung mit akustischer Rastermikroskopie und Mikroindentation. Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Ristiniemi J, Flinkkila T, Hyvonen P, Lakovaara M, Pakarinen H, Jalovaara P (2007): Rh-BMP-7 accelerates the healing in distal tibial fractures treated by external fixation. *J Bone Surg Br* 89(2): 265-272
- Roldan JC, Jepsen S, Schmidt C, Knuppel H, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H (2004): Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res* 15(6):716-723
- Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K (1998): Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 23(4):319-326
- Roschger P, Fratzl P, Klaushofer K, Rodan G (1997): Mineralization of cancellous bone after alendronate and sodium fluoride treatment: a quantitative backscattered electron study on minipig ribs. *Bone* 20(5):393-397
- Roschger P, Plenk H Jr, Klaushofer K, Eschberger J (1995): A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning Microsc* 9(1):75-86
- Rugar D, Heiserman J, Minden S, Quate CF (1980): Acoustic microscopy of human metaphase chromosomes. *J Microsc* 120(Pt 2):193-199
- Saijo Y, Sasaki H, Okawai H, Nitta S, Tanaka M (1998): Acoustic properties of atherosclerosis of human aorta obtained with high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 24(7):1061-1064
- Saijo Y, Tanaka M, Okawai H, Sasaki H, Nitta SI, Dunn F (1997): Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 23(1):77-85
- Saijo Y, Tanaka M, Okawai H, Dunn F (1991): The ultrasonic properties of gastric cancer tissues obtained with a scanning acoustic microscope system. *Ultrasound Med Biol* 17(7):709-714

- Sathish S, Martin RW (2002): Quantitative imaging of Rayleigh wave velocity with a scanning acoustic microscope. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 49(5):550-557
- Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B (2003): Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 48(2):155-160
- Shampo MA, Kyle RA (1995): Karl Theodor Dussik – pioneer in ultrasound. *Mayo Clin Proc* (70)12:1136
- Sharples SD, Clark M, Somekh MG (2003): All-optical adaptive scanning acoustic microscopy. *Ultrasonics* 41(4):295-299
- Shieh SJ, Zimmerman MC, Langrana NA (1995): The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodeling study. *J Biomech Eng* 117(3):286-292
- Sissons HA (1950): Microradiography of bone. *Br J Radiol* 23(265):2-7
- Smith PW, Preston KP, Higham SM (2005): Development of an in situ root caries model A. In vitro investigations. *J Dent* 33(3):253-267
- Smith PW, Preston KP, Higham SM (2005): Development of an in situ root caries model B. In situ investigations. *J Dent* 33(3):269-273
- Smitmans LF (2001): Zur Bestimmung akusto-elastischer Eigenschaften von humanem, kortikalen Knochengewebe mit der akustischen Rastermikroskopie. *Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Sokolov SY (1949): *Dokl Akad Nauk SSSR* 64:333
- Tischer T, Milz S, Anetzberger H, Müller PE, Wirtz DC, Schmitz C, Ueberle F, Maier M (2002): Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone – results of an in-vivo animal trial. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140(3):281-285
- Todt C (2005): Focus - Informationen für die Mitarbeiter der Jenoptik Gruppe. *Jenoptik AG*
- Turner CH, Rho J, Takano Y, Tsui TY, Pharr GM (1999): The elastic properties of trabecular and cortical bone tissue are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J Biomechanics* 32:437-441
- Turner CH, Chandran A, Pidaparti RMV (1995): The Anisotropy of Osteonal Bone and Its Ultrastructural Implications. *Bone* 17(1):85-89
- Urist MR (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(698):893-899
- Wang J, Someya Y, Inaba D, Longbottom C, Miyazaki H (2005): Relationship between electrical resistance measurements and microradiographic variables during remineralization of softened enamel lesions. *Caries Res* 39(1):60-64

-
- Weaver JMR, Ilett C, Somekh MG, Briggs GAD (1985): Acoustic Microscopy of solid material. *Metallography* 18(1):3-34
- Weiner S, Traub W, Wagner HD (1999): Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol* 126(3):241-255
- Weiner S, Wagner HD (1998): The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu Rev Mater Sci* 28:271-298
- Weiss S, Zimmerman MC, Harten RD, Alberta FG, Meunier A (1998): The Acoustic and Structural Properties of the Human Femur. *Journal of Biomechanical Engineering* 120:71-76
- Wozney JM (1989): Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1(4):267-280
- Wozney JM (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32(2):160-167
- Wozney JM (1998): The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:160-166
- Wozney JM (2002): Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27(16 Suppl 1):2-8
- Yu Z, Boseck S (1995): Scanning acoustic microscopy and its applications to material characterization. *Reviews of Modern Physics* 67(4):863-891
- Zhai T, Bennink DD, Knauss D, Briggs GADMJW (1997): Depth Measurement of Short Cracks in Perspex with the Scanning Acoustic Microscope. *Materials Characterization* 39:653-664
- Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P (1990): The evaluation of cortical bone remodeling with a new ultrasonic technique. *IEEE Trans Biomed Eng* 37(5):433-441
- Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P, Sedel L (1989): The evaluation of bone remodeling about orthopaedic implants with ultrasound. *J Orthop Res* 7(4):607-611
- Zimmerman MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H (1994): The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy. *J Biomed Mater Res* 28(8):931-938

Anhang

Tier-Nr.	Gruppe	Tier-Ident.	Ebene 1	Ebene 3	Ebene 5
1	1	403	41,58	47,99	67,38
2	1	474	164,36	13,31	72,17
3	1	472		182,87	165,56
4	1	470	52,73	98,46	58,32
5	1	431	177,35	0	47,17
Mittelwert			109,01	68,53	82,12
SD			96	74,39	47,61
6	2	430	117,37	0	137,3
7	2	432	100,31	44,57	127,7
8	2	10	245,6	192,45	267,67
9	2	424	216,56	35,86	37,26
10	2	427	29,62	0	26,282
Mittelwert			141,89	54,58	119,24
SD			88,41	79,71	97,2
11	3	466	411,26	227,53	289,35
12	3	462	282,09	598,62	247,08
13	3	421	317,58	229,48	80,05
14	3	420	241,7	229,13	249,5
Mittelwert			313,16	321,19	216,5
SD			72,38	184,96	93,01

Tabelle 2: SAM – Gesamtfläche des neu gebildeten Knochens der einzelnen Knochenquer-schnitte

Gruppe	Tier-Ident.	Ebene	SAM	MR
1	403	1	42,58	101,52
		3	47,99	52,21
		5	67,38	45,68
1	474	1	164,36	170,16
		3	13,31	13,13
		5	72,17	99,55
1	472	1		261,71
		3	182,87	189,89
		5	165,56	255,77
1	470	1	52,73	55,15
		3	98,46	85,53
		5	58,32	47,3
1	431	1	177,35	164,88
		3	0	0
		5	47,17	35,87
2	430	1	117,37	105,68
		3	0	0
		5	137,3	166,78
2	432	1	100,31	94,09
		3	44,57	36,19
		5	127,7	112,12
2	10	1	245,6	138,73
		3	192,45	170,34
		5	267,67	152,77
2	424	1	216,56	132,88
		3	35,86	70,11
		5	37,26	
2	427	1	29,62	41,98
		3	0	0
		5	26,28	14,98
3	466	1	411,26	391,88
		3	227,53	225,38
		5	289,35	273,35
3	462	1	282,1	278,36
		3	598,62	593,98
		5	247,08	275,02
3	421	1	317,58	315,94
		3	229,48	208,31
		5	80,05	54,98
3	420	1	241,7	200,3
		3	229,13	231,13
		5	249,5	133,11

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Werte der neugebildeten Knochenfläche auf den durch SAM und MR generierten Bildern

472-3	Messung	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	Summe	
	1	132,87	54,56	-1,61	185,82	
	2	130,53	55,56	-1,99	184,1	
	3	132,41	56,56	-2,31	186,66	Max
	4	130,56	55,94	-2,44	184,06	
	5	128,39	54,18	-2,09	180,48	Min
	6	129,75	54,41	-1,69	182,47	
	7	132,53	54,62	-1,68	185,47	
	8	131,2	53,67	-1,79	183,08	
	9	129,7	53,98	-1,89	181,79	
	10	129,98	54,56	-1,66	182,88	
	11	131,06	55,52	-1,85	184,73	
	12	131,41	55,13	-1,69	184,85	
					183,87	<u>Mittelwert</u>
					1,79	SD

Tabelle 4: Messungen zur Bestimmung des persönlichen Messfehlers durch wiederholte Messung der Flächen eines Knochenquerschnittes

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Al ₂ O ₃	Saphir
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSE	Back Scattered Electron Microscopy
MR	Mikroradiographie
MRI	Magnetresonanztomographie
OP	Osteogenic Protein
SAM	Scanning Acoustic Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die zur Durchführung und zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Mutschler, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die Förderung meiner Promotionsarbeit. Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. M. Schieker, Arbeitsgruppenleiter der AGTEK, für die stetige Unterstützung danken. Insbesondere gilt mein Dank Herrn M. Regauer für die Überlassung der Präparate, aber v.a. für die stets hilfreiche Betreuung und den fachlichen Rat. Ich möchte auch Herrn PD Dr. S. Milz für die Unterstützung seitens der anatomischen Anstalt bei der Erstellung der Präparate danken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. H. F. Zeilhofer, Herrn Prof. Dr. Dr. R. Sader und Herrn Dr. P. Jürgens für die Überlassung des Ultraschallmikroskops des High Tech Forschungszentrum des Klinikums Rechts der Isar.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Edeltraud Budenhofer und Dr. Hermann Budenhofer, ohne deren in jeder Hinsicht intensive Unterstützung ich mein Studium und meine Dissertation nicht mit dem Engagement und der Intensität in all den Jahren hätte durchführen können, wie sie es mir ermöglichten.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem lieben Ehemann, Dr. Tobias Winkler - für die immer währende konstruktive wie auch liebevolle Unterstützung, Geduld und Kraft, die er mir während der gesamten Zeit zuteil werden ließ.

Curriculum vitae

Angaben zur Person

Geburtstag und –ort: 06. Februar 1981, Wasserburg am Inn
 Familienstand: verheiratet
 Eltern: Dr. Hermann Budenhofer und Edeltraud Budenhofer
 Geschwister: Dr. Peter Budenhofer und Brigitte Budenhofer

Schulausbildung

09/1987 - 07/1991 Grundschule Reitmehring / Bayern
 09/1991 - 06/2000 Luitpold-Gymnasium Wasserburg am Inn
 30.06.2000 Abitur, Note 1,0

Hochschulstudium und berufliche Laufbahn

10/2000 – 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 20.09.2002 Ärztliche Vorprüfung
 28.08.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 02.09.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 10/2005 – 09/2006 Praktisches Jahr
 Chirurgie, Spital Uster /Schweiz
 Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Großhadern – München
 Innere Medizin, Klinikum Großhadern - München
 26.10.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Gesamtnote „Sehr Gut“

Weiterbildung

02.11.2006	Erhalt der Approbation als Ärztin
01.01.2007	Beginn der fachärztlichen Weiterbildung für Innere Medizin im Klinikum Großhadern – Campus LMU München, Medizinische Klinik und Poliklinik 2 (Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke)

Stipendien

06/2000 – 10/2005	Bayerisches Begabtenstipendium
06/2000 – 08/2005	e-fellows.net-Stipendium
10/2005 – 03/2007	Eliteförderung des Freistaates Bayern zur Hochbegabtenförderung, Max-Weber-Programm der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Publikationen

Originalarbeiten

Regauer M, Jürgens P, Budenhofer U, Hartstock M, Böcker W, Bürklein D, Mutschler W, Sader R, Schieker M (2006): Quantitative scanning acoustic microscopy compared to microradiography for assessment of new bone formation. *Bone* 38(4):564-570

Kremer AE, Budenhofer U, Beuers U, Rust Ch (2007): 47-jähriger Hundezüchter mit chronischer Polyarthritis, Gewichtsverlust und hohem Fieber. *Z Gastroenterol* accepted

Bibliographisch zitierfähige Abstracts von Vorträgen und Postern

Budenhofer U (2004): Quantitative Scanning Acoustic Microscopy for Characterisation of newly formed Bone. *Langenbeck's Archives of Surgery* 389(5):457

Jürgens P, Regauer M, Budenhofer U, Hartstock M, Milz S, Mutschler W, Schieker M, Zeilhofer HF, Sader R (2006): Quantitative Scanning Acoustic Microscopy (SAM) zur Analyse der Knochenneubildung – vergleichende Untersuchung zur Mikroradiographie. Posterpräsentation 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Dresden

Budenhofer U, Kremer AE, Rust Ch, Beuers U (2007): Septisches Krankheitsbild eines M. Whipple unter TNF α -Antagonisten. *Z Gastroenterol* 45 DOI:10.1055/s2007-992724

Sonstige Vorträge

Budenhofer U (2004): Scanning Acoustic Microscopy zur Beurteilung von neu gebildetem Knochen nach Anwendung von Osteogenic Protein-1 (OP-1) im Segmentdefektmodell der Schafstibia. 8. Chirurgische Forschungstage Mannheim

Budenhofer U (2005): Quantitative Scanning Acoustic Microscopy zur Beurteilung von neu gebildetem Knochen. Wissenschaftliches Kolloquium, Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der Universität München

Budenhofer U (2007): Pharmakokinetik von UDCA in Serum und Galle bei Patienten mit Primär Biliärer Zirrhose und Gesunden. 11. Retreat der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern, Lenggries

Budenhofer U (2007): Der besondere Fall - Akute Exazerbation einer chronischen Risedronsäure-induzierten Ösophagitis unter Clindamycin. Fortbildung der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern

Budenhofer U (2007): Fieberhafter Infekt mit B-Symptomatik und Arthralgien. Klinischen Kolloquium der Medizinischen Kliniken I / II / III - Großhadern