

Universitätsklinikum Halle (Saale)

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Kommissarische Direktorin: PD Dr. med. K. Neumann)

**Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der
akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher
Gehörknöchelchen bei Otitis media chronica**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanne Liebhold

geboren am 07.06.1979 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Haberland (Halle/Saale)
2. Prof. Dr. med. Zahnert (Dresden)
3. Prof. Dr. med. Pau (Rostock)

Eröffnungsdatum: 08.09.2009

Verteidigungsdatum: 07.06.2010

Meiner Tochter Hannah Sophie gewidmet

Referat

Mit der Ultraschallrastermikroskopie (Synonym: akustische Rastermikroskopie, englisch: scanning acoustic microscopy, SAM) können unter Verwendung von hochfrequentem Ultraschall mikroskopische Gefüge biologischer Gewebe zerstörungsfrei, ohne Anwendung von Färbetechniken und mit einer hohen örtlichen Auflösung zur Darstellung gebracht werden. Der Bildkontrast entsteht beim SAM-Verfahren durch die unterschiedlichen akustischen Impedanzwerte der verschiedenen Gewebekomponenten, wodurch Aufschlüsse über deren lokale mechanische Eigenschaften gewonnen werden können. Ziel dieser Arbeit war es, die SAM zur quantitativen Erfassung von morphologischen und elasto-mechanischen Veränderungen in Gehörknöchelchen von Patienten mit chronischer Otitis media heranzuziehen und mit dem konventionellen Verfahren der Auflichtmikroskopie zu vergleichen. Die Messungen erfolgten mit den akustischen Rastermikroskopen SAM200 Ex und KSI SAM2000 sowie dem Auflichtmikroskop Zeiss Axioplan der Orthopädischen Klinik der Universität Halle bei Arbeitsfrequenzen von 50 MHz und 200 MHz an in PMMA eingebetteten 32 Resektaten humaner Gehörknöchelchen aus der sanierenden Mittelohrchirurgie und 20, bei Obduktionen entnommenen Ossikeln ohne otologische Vorerkrankungen. In den Anschnitten der gesunden Gehörknöchelchen wiesen die Ambosse bei 50 MHz mit 8,00 Mrayl die geringste akustische Impedanz auf. Die Hämmer lagen mit 8,13 Mrayl knapp darüber. Bei 200 MHz lagen die akustischen Impedanzen bei 8,27 Mrayl (Hämmer) und 8,37 Mrayl (Ambosse). Die Schnittbilder der arrodiierten Gehörknöchelchen zeigten im Vergleich zu den gesunden Proben sowohl bei 50 MHz als auch bei 200 MHz eine statistisch signifikant niedrigere akustische Impedanz. So ließen sich in den Hämmern bei 50 MHz bzw. 200 MHz akustische Impedanzen von 7,39 Mrayl bzw. 7,83 Mrayl feststellen. In den Ambossen waren mit 7,45 Mrayl bzw. 7,60 Mrayl ähnlich niedrige Werte zu bestimmen. Damit gelang es in dieser Arbeit erstmalig, die akustische Impedanz als einen objektiven Parameter anzugeben, der die verminderte Steifigkeit von Gehörknöchelchen bei chronischer Mittelohrentzündung repräsentiert. Die praktische Anwendung dieser Ergebnisse besteht in der Möglichkeit, dass nur Ossikelfragmente als autologe Prothesen, z.B. in der Cholesteatomchirurgie, Verwendung finden, die bezüglich ihrer elasto-mechanischen Eigenschaften als cholesteatomfrei eingestuft werden. Es ist ebenfalls denkbar, dass das Verfahren der hochfrequenten Ultraschallmikroskopie von Bedeutung für die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der medikamentösen Cholesteatomtherapie sein kann. Des Weiteren können mit der akustischen Rastermikroskopie andere pathologische Mittelohrprozesse untersucht werden.

Liebhold, Susanne: Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher Gehörknöchelchen bei Otitis media chronica. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Das Mittelohr.....	3
2.1. Makroskopische Strukturen des Mittelohres	3
2.2. Mikroskopische Strukturen des Mittelohres	5
3. Krankheitsbilder des Mittelohres	8
3.1. Otitis Media chronica.....	8
3.1.1 Otitis media chronica mesotympanalis.....	8
3.1.2 Otitis media chronica epitympanalis	9
4. Funktionsweise der akustischen Rastermikroskopie	12
4.1 Das Puls-Echo-Verfahren in der Ultraschallrastermikroskopie.....	12
4.1.1 Materialeigenschaften und Ansprüche an das Einbettungsmedium	17
5. Material.....	18
5.1 Probengewinnung	18
5.2 Probenaufbereitung.....	18
6. Methoden.....	20
6.1 Auswahl der Messpunkte für die Akustische Rastermikroskopie	20
6.2 Akustische Rastermikroskopie mit dem SAM200 Ex	21
6.3 Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM2000.....	22
6.4 Datenverarbeitung.....	23
6.5 Auflichtmikroskopie mit dem Zeiss-Axioplan.....	24
7. Ergebnisse.....	26
7.1 Akustische Rastermikroskopie mit dem SAM200 Ex	26
7.1.1 Untersuchungen an gesunden Hämmern	26
7.1.2 Untersuchungen an gesunden Ambossen	27
7.1.3 Untersuchungen an Hämmern bei Otitis media chronica	29
7.1.4 Untersuchungen an Ambossen bei Otitis media chronica	32
7.2 Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM2000.....	35
7.2.1 Untersuchungen an gesunden Hämmern	35
7.2.2 Untersuchungen an gesunden Ambossen	37
7.2.3 Untersuchungen an Hämmern bei Otitis media chronica	40
7.2.4 Untersuchungen an Ambossen bei Otitis media chronica	42

7.3 Vergleich der Messergebnisse mit dem SAM 200Ex	45
7.3.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica	45
7.3.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica	45
7.4 Vergleich der Messergebnisse mit dem KSI SAM2000	46
7.4.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica	46
7.4.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica	47
7.5 Ergebnisse der Auflichtmikroskopie	48
7.5.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica im Vergleich	48
7.5.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica im Vergleich ...	51
8. Diskussion	54
8.1 Eigene Ergebnisse im Zusammenhang	54
8.2 Vergleich der angewendeten Verfahren	58
8.3 Methodik	59
8.4 Klinische Relevanz	61
9. Schlussfolgerungen	65
10. Zusammenfassung	66
11. Literaturverzeichnis	68
12. Anhang	76
12.1 Messwerte SAM200 Ex	76
12.1.1 Ambosse und Hämmer (gesund)	76
12.1.2 Ambosse und Hämmer (Otitis media chronica)	76
12.2 Messwerte KSI SAM2000	77
12.2.1 Ambosse und Hämmer (gesund)	77
12.2.2 Ambosse und Hämmer (Otitis media chronica)	77
13. Thesen	78
14. Danksagung	80
Selbständigkeitserklärung	81
Veröffentlichungen von Ergebnissen	82
Erklärung über frühere Promotionsversuche	83
Lebenslauf	84

Abkürzungen und Symbole

m	Masse
MHz	MegaHertz
Mrayl	MegaRayl
NA	numerische Apertur der Linse
$P(\theta)$	Pupillenfunktion der Linse
PMMA	Polymethylmethacrylat
PORP	partial ossicular replacement prosthesis
Q-Bam-Group	Labor für Quantitative B-Bild-Sonographie und akustische Mikroskopie
R	Reflexionskoeffizient
$R(\theta)$	Reflektanzfunktion
SAM	scanning acoustic microscopy / scanning acoustic microscope
TORP	total ossicular replacement prosthesis
V	Volumen
Z	Akustische Impedanz
Z1	Impedanz des Kopplungsmediums Wasser
Z2	Impedanz des Untersuchungsmediums Knochen
z	Linsen-Probenabstand in Vertikalrichtung
ρ	Massendichte
σ	Poissonverhältnis
λ_0	Wellenlänge der Ultraschallwellen
c	Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls
dB	Dezibel
k	Wellenvektor

1. Einleitung und Zielsetzung

Chronisch entzündliche Mittelohrerkrankungen, wie das Cholesteatom nehmen aufgrund ihrer destruierenden Prozesse an der Gehörknöchelchenkette, dem Felsenbein und dem Mastoid häufig einen komplikationsreichen Verlauf. Bei den meisten der betroffenen Patienten gehen sie wegen der stark atrodierten Ossikelkette mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Schalleitungsschwerhörigkeit einher. Die Diagnose wird aufgrund fehlender Frühsymptome häufig erst nach bereits deutlich fortgeschrittener Knochendestruktion und daraus resultierendem Hörverlust gestellt. Ziel muss es daher sein, chronisch entzündliche Mittelohrprozesse möglichst vor Funktionsverlust des Schalleitungsapparates zu erkennen. Die Pathomechanismen der Cholesteatomentstehung wurden wie bereits in zahlreichen Arbeiten [1, 2, 3] erforscht. Darüber hinaus ist es essentiell, die Destruktionsprozesse auf mikrostruktureller Ebene zu verstehen. Diese sind bereits mit zahlreichen Methoden, wie z.B. der Lichtmikroskopie [4], der Elektronenmikroskopie [5, 6], der Computer- und Magnetresonanztomographie [7, 8], der immunhistochemischen Analytik [9, 10, 11] und der Molekulargenetik [12] untersucht worden.

Eines der modernsten zur Verfügung stehenden mikroskopischen Untersuchungsverfahren, die Ultraschallrastermikroskopie (Synonym: akustische Rastermikroskopie, englisch: scanning acoustic microscopy, SAM), ergänzt die herkömmlichen Verfahren der Licht- und Elektronenmikroskopie, weil sich neben der Möglichkeit der Durchdringung optisch undurchsichtiger Materialien, aus der elastischen Wechselwirkung der akustischen Wellen mit dem von ihnen durchdrungenen Medium dessen elasto-mechanische Eigenschaften mit einer Auflösung bis in den Mikrometerbereich ableiten lassen. Bisher findet die akustische Rastermikroskopie vorwiegend Anwendung bei Untersuchungen an Knochengewebe, weil hierdurch Erkenntnisse über die Verteilung akustischer Kennwerte der mikroskopischen Gewebsbausteine erlangt werden konnten [13, 14]. Zahlreiche Arbeiten (veröffentlicht sind überwiegend Untersuchungen orthopädisch orientierter Gruppen) konnten zeigen, dass das SAM-Verfahren wertvolle Aufschlüsse über den mikrostrukturellen Aufbau von Zellen und Geweben sowie deren elasto-mechanischen Eigenschaften ermöglicht [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Untersuchungen an Gehörknöchelchen gab es bisher nur von Gaihede [24] und Gudziol [25]. Erste Arbeiten mit pathologisch verändertem Gewebe sind auch überwiegend aus der Orthopädie bekannt [26]. Ultraschallrastermikroskopische Untersuchungen an durch chronisch entzündliche Mittelohrprozesse veränderten Gehörknöchelchen sind in der Literatur bisher nicht zu finden. Die Bildkontrastentstehung bei der akustischen Rastermikroskopie von Knochenanschnitten ist anders als bei der Licht- oder Elektronenmikroskopie, bedingt durch die regionalen Unterschiede der elasto-mechanischen Eigenschaften bzw. der akustischen Impedanz [27]. Die akustische Impedanz

Z , eine materialspezifische Größe, ist definiert als das Verhältnis aus einwirkendem Schalldruck und der daraus resultierenden Ortsänderungsgeschwindigkeit der oszillierenden Teilchen. Des Weiteren lässt sie sich aus der lokalen Ausbreitungsgeschwindigkeit c , der Dichtewelle des Schalls in Longitudinalrichtung und der lokalen Massendichte ρ des untersuchten Bereiches der Knochenprobe berechnen ($Z=c*\rho$). Als Einheit wird das rayl mit $1 \text{ rayl}=\text{Ns}/\text{m}^3$ verwendet.

Die akustische Rastermikroskopie gestattet aufgrund der Verwendung von Ultraschallwellen, deren Schallfelddurchmesser und Wellenlängen wesentlich kleiner sind als die Dimensionen der Knochensubstrukturen, die Abbildung feinsten Gewebekomponenten mit einem bei entsprechender Frequenz dem Lichtmikroskop vergleichbaren Auflösungsvermögen [27]. Nach Aussagen der Autoren Weiner und Wagner [14] ist gerade die Ermittlung der mechanischen Eigenschaften des Knochens auf der Ebene der Knochenlamellen, bisher aufgrund ihrer geringen Größe am wenigsten auf ihre elasto-mechanischen Eigenschaften hin untersucht, am besten geeignet, die makroskopischen Eigenschaften des Knochengewebes zu beschreiben. Seit Einführung der ersten kommerziell nutzbaren Geräte kommt das Verfahren daher zunehmend bei Untersuchungen biologischer Proben zur Anwendung [28, 29, 30, 31].

Ein besonderes Potential der Ultraschallrastermikroskopie an Gehörknöchelchen liegt in der Erfassung pathologischer Veränderungen, die die mechanische Knochenstabilität beeinflussen, wie z.B. im Rahmen chronisch entzündlicher Mittelohrerkrankungen. Daraus sind Erkenntnisse über ihre mechanische Belastbarkeit zu erlangen. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da Gehörknöchelchenfragmente, neben künstlichen Ersatzmaterialien, oft zur Ossikelkettenrekonstruktion als autologes und damit biokompatibles Material verwendet werden. Bisher galt ein Gehörknöchelchen als cholesteatomfrei und damit geeignet für eine Ossikuloplastik, wenn bei Inspektion durch das Op-Mikroskop keine adhärennten Cholesteatommassen zu finden waren oder diese oberflächlich entfernt wurden [32]. Mögliche Änderungen seiner elasto-mechanischen Eigenschaften blieben unbeachtet.

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der Ultraschallrastermikroskopie zur systematischen Untersuchung von gesunden und krankhaft veränderten menschlichen Gehörknöchelchen bei chronischer Mittelohrentzündung in größerer Zahl und mit statistischer Absicherung. Es wurde die Verteilung der akustischen Impedanz in Anschnitten von eingebetteten gesunden und pathologisch veränderten Hämmern und Ambossen bei Arbeitsfrequenzen von 50 MHz und 200 MHz quantitativ ermittelt und anschließend im gesamten Knochenanschnitt sowie in anatomisch definierten Regionen verglichen. Neben der quantitativen Bestimmung der akustischen Impedanz bestand des Weiteren die Aufgabe, die bildmorphologische Darstellung der Ossikelanschnitte mittels Auflicht- und Ultraschallmikroskopie qualitativ zu vergleichen.

2. Das Mittelohr

2.1. MAKROSKOPISCHE STRUKTUREN DES MITTELOHRES

Als Resultat einer langandauernden Entwicklung wird das Ohr, welches zwei Sinnesorgane beherbergt (Gehör- und Gleichgewichtsorgan), beim Menschen und anderen höheren Wirbeltieren in äußeres Ohr (Auris externa), Mittelohr (Auris media) und Innenohr (Auris interna) unterteilt. (Abb. 1).

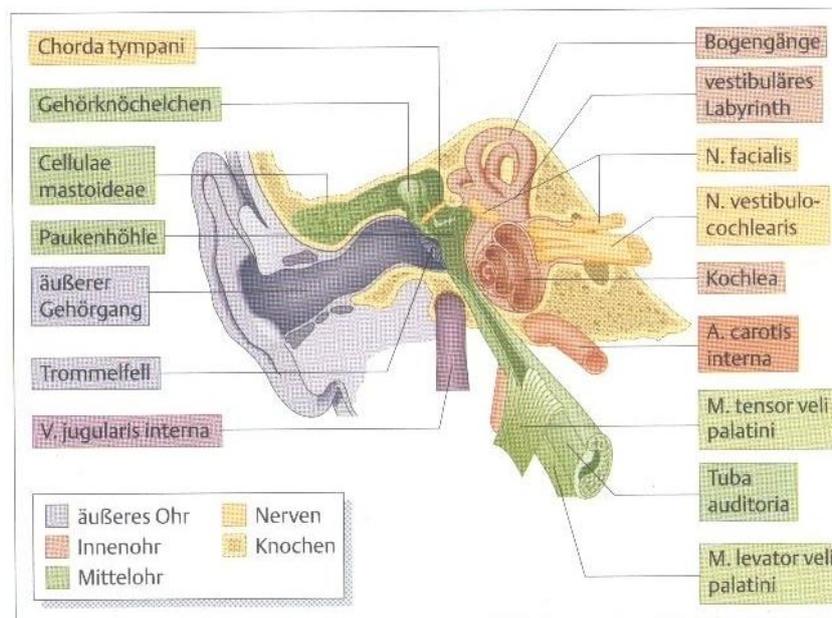


Abb. 1: Anatomie des äußeren Ohres, des Mittelohres und des Innenohres [33]

Am Ende des äußeren Gehörganges befindet sich das „Fenster“ zum Mittelohr, das Trommelfell, Membrana tympani. Das gesunde Trommelfell imponiert bei otoskopischer Betrachtung als perlmuttgraue, rund-ovale und in der Mitte trichterförmig zum Nabel (Umbo) eingezogene Fläche von ca. 8,5 x 10mm. Zur Orientierung erfolgt eine Einteilung des Trommelfells in vier Quadranten mit dem Umbo als Mittelpunkt. Ferner wird beim Trommelfell eine Pars flaccida (Shrapnell-Membran) zwischen den beiden Plicae mallearis anterior et posterior, von einer Pars tensa, dem größeren gespannten Anteil unterschieden. Durch den am Hammergriff angreifenden Muskel tensor tympani erfolgt die Spannungseinstellung des Trommelfells [34].

Das Mittelohr setzt sich aus einem mit Schleimhaut ausgekleideten, pneumatisierten Raumsystem im Os temporale, bestehend aus der Paukenhöhle und den lufthaltigen Nebenräumen, zusammen. Als Verbindung zum Rachenraum dient die Ohrtrumpete. Der Hauptraum, die Paukenhöhle, wird in drei Etagen - Mesotympanon, Recessus epitympanicus und Recessus hypotympanicus - unterteilt und enthält mit den drei Gehörknöchelchen den

schalleitenden Apparat (Abb. 2). Die durch Gelenke [35] miteinander verbundenen und über Ligamente im Cavum tympani verankerten Gehörknöchelchen bilden eine vom Trommelfell bis zum Vorhoffenster reichende bewegliche Kette. Sie dient der Übertragung der Trommelfellschwingungen auf das Innenohr.

Der Hammer (malleus) befindet sich im Epitympanon und wird ebenso wie die beiden anderen Gehörknöchelchen von Schleimhaut überzogen und durch Bänder gehalten. Von der Innenseite sind der Hammergriff (Manubrium mallei) und der Processus lateralis mallei mit dem Trommelfell verwachsen. Ausgehend vom Hammerhals zieht der Processus anterior beim Kind nach vorn unten zur Fissura petrotympanica. Beim Erwachsenen ist er zurückgebildet und dient als Bandansatz. Der Amboss (incus) liegt, wie der Hammer auch, im Recessus epitympanicus. Bestehend aus dem Corpus incudis und seinen zwei ungleich langen Fortsätzen, den Crura brevis et longum ähnelt er einem zweiwurzigen Backenzahn [36]. Corpus incudis und Caput mallei artikulieren in einem angedeuteten Sattelgelenk miteinander, das nur geringe Bewegung zulässt [37]. Der nach ventral und etwas nach medial gekümmert laufende lange Schenkel trägt an seinem Ende ein ovales Köpfchen, den Processus lenticularis, das mit dem Steigbügelköpfchen in Verbindung steht. Der Steigbügel (stapes) besteht aus dem Caput stapedis, den beiden unterschiedlich langen Crura stapedis und der Basis stapedis. Er bildet mit seinem lateralwärts gerichteten Kopf und dem Processus lenticularis des Ambosses die einem Kugelgelenk entsprechende Articulatio incudostapedialia. Das Crus anterius weist nach vorn und ist geringfügig kürzer als das nach hinten gebogene Crus posterius. Grund für diese asymmetrische Formgebung sind nach [38] die vom M. stapedius ausgeübten Zugkräfte. Die nach medial gewölbte Fußplatte des Steigbügels fügt sich in das ovale Fenster ein [39]. Ein Größenunterschied zwischen rechten und linken Gehörknöchelchen besteht nach [40] nicht. Jedoch ergeben sich aufgrund jeweiliger Anforderungen einer Spezies an ihren Lebensraum artspezifische Unterschiede in Form und Größe der Ossikel. So sind die Gehörknöchelchen von Nagern sehr leicht und starr, um besonders hohe Frequenzen besser übertragen zu können [38].

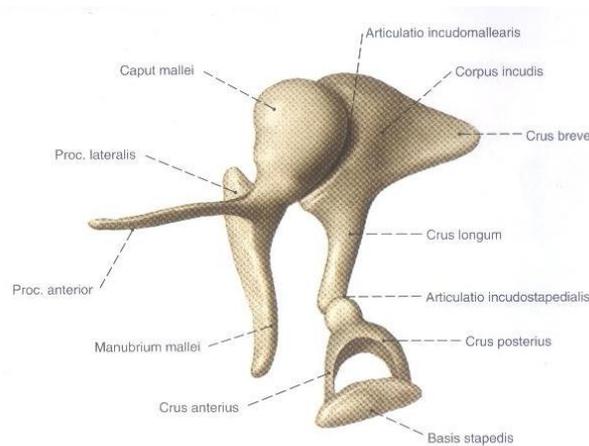


Abb. 2: Ossikelkette, bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel [41]

2.2. MIKROSKOPISCHE STRUKTUREN DES MITTELOHRES

Das ca. 0,1mm dicke Trommelfell weist mehrere Schichten auf. Die äußere Cutisschicht (Stratum cutaneum) wird gebildet vom mehrschichtigen Plattenepithel des äußeren Gehörgangs. Innen überzieht es die Mukosa (Stratum mucosum) der Paukenhöhle und zwischen beiden Schichten liegt die Lamina propria (Stratum fibrosum) als schallaufnehmender Teil der Pars tensa. Hier zeigen die Kollagenfasern einen charakteristischen Verlauf. Man unterscheidet die im Umbo zusammenlaufenden radiären Fasern von den zirkulären und parabolisch laufenden Kollagenbündeln, wobei die beiden letztgenannten die radiären Fasern verbinden. Die Pars flaccida weist hingegen hauptsächlich locker und ungerichtet gewebte Fasern auf [42].

Die auch als Mukoperiost bezeichnete Schleimhaut des Mittelohrs besteht im hinteren Paukenabschnitt aus einer einschichtigen Flimmer- und Becherzellen enthaltenden Epithellage und einem schmalen Bindegewebsstroma. Am Tubeneingang findet man ein mehrschichtiges kubisches Epithel mit breiter, gefäßreicher Submucosa [43]. Die Schleimhaut kleidet das gesamte Tympanon aus, zieht in die Cellulae mastoideae und ist dank ihres mukoziliären Transportsystems Teil des Abwehrsystems des Mittelohres.

Bei den Gehörknöchelchen bestehen bezüglich ihrer histologischen Zusammensetzung wesentliche Unterschiede zum übrigen Skelett. So findet man unter einem zarten Schleimhautüberzug und einem dünnen Periost neben Strahlenknochen, geflechtartigen Knochen und verkalkten Knorpelresten (Interglobularräume) nur wenig Lamellenknochen [44].

Allen Knochenarten gemein sind die beiden Grundbaumaterialien Knochenzellen und Matrix. Man unterscheidet an der äußeren und inneren Knochenoberfläche liegende proliferative Zellen (Vorläuferzellen) von die organische Grundsubstanz des Knochens (Osteoid) bildenden und an der Mineralisation beteiligten Zellen (Osteoblasten). Ferner findet man

Zellen (Osteozyten), welche, von Knochengrundsubstanz umgeben, in Lakunen sitzen und über viele Fortsätze untereinander in Kontakt stehen.

Die Zusammensetzung der Knochengrundsubstanz umfasst neben 70% anorganischen (u.a. Calcium, Phosphat) und 20% organischen (Osteoid (90-95% Kollagen Typ I, Proteoglykane u.v.m.) Bestandteilen auch ca. 10% Wasser.

Nach der Anordnung von Osteozyten und Kollagenfasern lassen sich auch in den Gehörknöchelchen Bereiche mit Geflecht-, Strähnen- und Lamellenknochen unterscheiden. Geflechtknochen stellt eine zellreiche und weniger stark mineralisierte embryonale Knochenform dar, in welcher die Kollagenfaserbündel ungeordnet verlaufen und die Osteozyten in Größe, Orientierung und Verteilung sehr variabel sind [45]. Er wird eigentlich durch den differenzierten Lamellenknochen ersetzt, bleibt jedoch überall dort bestehen, wo längere Zeit Druck- und Zugkräfte wirken (Ansatzstellen von Sehnen und Bändern). In den Gehörknöchelchen liegt er meist randständig [46].

Der ferner in den Gehörknöchelchen vorkommende Strähnenknochen ist ebenfalls eine embryonale Knochen substanz, welche keine Laminierung aufweist und deren Fibrillen sich zu Strähnen, ähnlich denen des Haares, verflechten. Er wird nicht, wie Geflechtknochen, durch Lamellenknochen ersetzt.

Der Lamellenknochen ist charakterisiert durch die parallele Anordnung seiner Kollagenfasern in den einzelnen Lamellen. Unterschieden wird zwischen Grundlamellen (mehrere konzentrisch um einen Havers-Kanal angeordnete Einzellamellen) und den als Schaltlamellen bezeichneten Resten abgebauter Osteone (Einheit aus Grundlamelle und Havers-Kanal). Die zwischen den Lamellen liegenden Osteozyten übernehmen den Stofftransport vom und zum Havers-Kanal. In den Gehörknöchelchen findet man hingegen völlig ungerichtet angeordnete Osteone [46]. Nach der Ansicht von Hüttenbrink und Wustrow [44, 47] fehlt den Ossikeln ein den mechanischen Grundsätzen folgender funktioneller Aufbau, was die Deutung des Lamellenknochens als bloßen Lückenfüller für die Markräume zulässt.

Im Rahmen der Ossifikation persistieren Knorpelreste in der Nähe von Globuli ossei (in Höhlen liegende Osteoid produzierende Osteoblasten) und bilden die sogenannten unregelmäßig angeordneten Interglobularräume [46].

Das den Knochen umgebende Periost besteht aus einem äußeren, kollagenfaserreichen Stratum fibrosum und einem inneren, gefäßtragenden Stratum cellulare und dient neben der Ernährung der Knochenregeneration [45].

Die mikroskopische Architektur der drei Gehörknöchelchen unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Gewebszusammensetzung nicht nur untereinander, sondern auch innerhalb jedes Gehörknöchelchens. So findet man im Hammerkopf hauptsächlich den die große Markhöhle umgebenden Strähnenknochen und im Hammergriff und in den Fortsätzen Lamellenknochen

[44, 48]. Ambosskörper und kurzer Schenkel sind größtenteils aus Strähnenknochen, der lange Schenkel fast ausschließlich aus Lamellenknochen aufgebaut. Der Proc. lenticularis besteht zentral aus Lamellenknochen, wesentlich aber aus verkalktem Knorpel. Der Stapes weist überwiegend Strähnenknochen auf. Es finden sich aber in beiden Schenkeln auch zwei äußere, dünne Geflechtknochenschichten [49].

Die Gehörknöchelchen sind gelenkig miteinander verbunden, was z.B. die rasterelektronenmikroskopische Arbeit von Hüttenbrink und Pfautsch 1987 [35] bestätigt, auch wenn einige Autoren nur von syndesmatischen Verbindungen sprechen [50]. Die Gelenkkapsel besteht aus reichlich elastischen Fasern. Die Gelenkfläche zeigt in der Abfolge von innen nach außen folgende Schichten: Knochenlage, eine Zone verkalkten Knorpels, hyalinen Knorpels und eine Terminallage bestehend aus Bindegewebe, Faserknorpel, Endothel und reichlich elastischen Fasern.

3. Krankheitsbilder des Mittelohres

3.1. OTITIS MEDIA CHRONICA

Begünstigt durch virale oder bakterielle Infekte der oberen Atemwege können verschiedenste Erreger (Pneumokokken, Staphylokokken, Haemophilus influenzae) über die Tuba auditiva, deren entzündliche Verschwellung ebenfalls zum Krankheitsgeschehen beiträgt, in das Mittelohr gelangen und hier zu einer akuten eitrigen, fieberhaften Entzündung mit Gefahr der Trommelfellperforation führen (Otitis media acuta). Aufgrund der rechtzeitigen und gezielten Verabreichung von Antibiotika sind komplizierte Verläufe wie eine Chronifizierung, Otitis media chronica, oder Ausbreitung der Entzündung mit eitriger Mastoiditis, Fazialisparese, otogener Labyrinthitis oder gar otogener Meningitis heute seltener geworden [51, 52, 53]. Zwei mögliche Komplikationen, die chronische Schleimhauteiterung (Otitis media chronica mesotympanalis) und die chronische Knocheneiterung (Otitis media chronica epitympanalis) sollen im Folgenden näher erläutert werden, da die durch sie verursachten strukturellen Veränderungen an den Gehörknöchelchen Mittelpunkt dieser Arbeit sind.

3.1.1 Otitis media chronica mesotympanalis

Die Otitis media chronica mesotympanalis, auch als chronische Schleimhauteiterung des Mittelohres bezeichnet, geht per definitionem mit einem mittelständigen Trommelfelldefekt in der Pars tensa bei erhaltenem Trommelfellrand (Limbus) einher [51]. Als ursächlich wird eine meist schon frühkindlich bestehende chronische Tubenfunktionsstörung mit einer Minderbelüftung des Mittelohres und daraus resultierender Umwandlung der Paukenschleimhaut mit Neigung zur Hypersekretion und Polypenbildung angesehen. Seltener ist sie auch Folge eines sich nicht wieder spontan verschließenden, traumatischen Trommelfelldefekts. In der Regel beschränkt sich die Entzündung auf die Schleimhaut des Mittelohres. Vereinzelt werden aber auch Kettenunterbrechungen durch Arrosionen der Gehörknöchelchen beschrieben. In wie weit die Zerstörung der Ossikel, ähnlich wie im Cholesteatom, Folge einer erhöhten osteoklastischen und proteolytischen Aktivität des entzündlichen Gewebes ist, wurde bis jetzt noch nicht hinreichend untersucht. Betroffene Patienten beklagen neben Otalgien und rezidivierenden eitrigen Otorrhöen, eine Hörminderung. Otoskopisch fällt die zentrale Trommelfellperforation oder ein durch den Defekt nach außen dringender Polyp auf. Eine Schallleitungsstörung wird durch audiometrische Untersuchungen aufgedeckt. Röntgenologisch kann eine für die chronische Mittelohrentzündung typische gestörte Mastoidpneumatisation dargestellt werden. Therapeutisch stehen neben einer gezielten Antibiotikatherapie unterstützt von desinfizierenden Gehörgangsspülungen operative Sanierungsmaßnahmen (Myringoplastik,

Verschluß (Trommelfellperforation und Tympanoplastik, Rekonstruktion des Schallleitungsapparates) im entzündungsfreien Intervall im Vordergrund.

3.1.2 Otitis media chronica epitympanalis

Per definitionem handelt es sich bei der epitympanalen Form der chronischen Otitis media um eine Entzündung mit randständigem Trommelfelldefekt unter Einbeziehung der knöchernen Strukturen in den Entzündungsprozess. Anders als bei der chronischen mesotympanalen Otitis media kommt es bei der Otitis media chronica epitympanalis (Synonym: chronische Knocheneiterung, Cholesteatom) zu einem Einwachsen ortsfremden, verhornenden Plattenepithels, ausgehend vom Meatus acusticus externus in die Paukenhöhle und in die pneumatisierten Nebenräume. Der epitheliale Anteil dieser Ansammlung zwiebelartig geschichteter Hornlamellen wird als Cholesteatommatrix bezeichnet. Das Perimatrix genannte subepitheliale Bindegewebe zeigt in der Regel eine chronische inflammatorische Reaktion [54]. Obwohl mit der Größenzunahme der Cholesteatommassen ein lokaler enzymatischer und osteoklastischer Knochenabbauprozess einhergeht, handelt es sich nicht um ein malignes Geschehen, sondern vielmehr um eine Sonderform einer chronischen Entzündung [51]. Eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung bleibt es aufgrund möglicher endokranieller oder septischer Komplikationen dennoch. Der etwas unglückliche und formal falsche Begriff „Cholesteatom“ ist seit langem etabliert und sollte deshalb Bestand haben. Er geht auf den deutschen Physiologen Johannes Müller (1838) und den damals als charakteristisches Merkmal des „Cholesteatoms“ geltenden Cholesterinkristallen zurück [55]. Er beschrieb seinerzeit einen „geschichteten Tumor aus Fett“. 1829 prägte Cruveilhier die Bezeichnung „tumeur perlée“ und Virchow führte später wegen der perlmuttähnlichen Oberfläche den Begriff „Perlgeschwulst“ ein [3, 56, 57]. Weitere in der Literatur zu findende Synonyma sind chronische Knocheneiterung, schwarze Cholesteatosis u.s.w.. Es existieren verschiedene Einteilungen des Cholesteatoms. So erfolgt in der chirurgischen Klassifikation nach Tos [58] eine Gliederung hinsichtlich der Lokalisation des Cholesteatoms und der Trommelfellperforation. So definiert er neben dem häufigsten Flaccida- oder Shrapnell-Cholesteatom, ausgehend von einer Retraktion oder Perforation der Shrapnell-Membran mit Ausdehnung ins Epitympanon und Mastoid, das Sinuscholesteatom, das Tensa-Retraktionscholesteatom und als Sonderform die Epidermosis. Hierbei besteht die Besonderheit im flächenhaften Aufwachsen des Epithels an der Trommelfellunterseite ausgehend von einer Perforation am Hammergriff [59]. Die klassischen Cholesteatomeinteilungen basieren auf den unterschiedlichen Ätiologietheorien [60], wobei

im Hinblick auf die Pathogenese das kongenitale und das erworbene Cholesteatom unterschieden werden. Bei dem sich in den meisten Fällen bereits in der frühen Kindheit (zwischen 3 und 5 Jahren) manifestierenden kongenitalen Cholesteatom, von welchem angenommen wird, dass es mit einer Häufigkeit von 2-5% und einer Geschlechtsverteilung von 3:1 (m:w) [61] sehr selten ist, entwickeln sich Prozesse hinter einem intakten Trommelfell [62]. Weitere Merkmale sind neben einer reizlosen Mittelohrschleimhaut das Fehlen vorheriger Traumen, Ohroperationen oder rezidivierender Mittelohrentzündungen. Es wird jedoch durch rezidivierende Otitiden auch nicht ganz ausgeschlossen, da beide Erkrankungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathomechanismen parallel ablaufen können. Um die Pathogenese für das kongenitale Cholesteatom begreiflich zu machen, wurden im Wesentlichen fünf Hypothesen formuliert: Neben der *Theorie der Migration* von Epithelzellen des verhornenden Plattenepithels durch das intakte Trommelfell [63] existieren noch die *Theorie des Refluxes amniotischer Zellen* in das Mittelohr [64], die *Theorie der embryonalen Keimversprengung* [65], die *Metaplasietheorie* [66] und die *Theorie der sog. Epidermoid Formation* [67]. Der Entstehungsmechanismus der erworbenen Cholesteatome ist heute noch nicht in allen Fällen eindeutig geklärt. In der Regel wird es aber zum einen durch das Eindringen von Plattenepithel des äußeren Gehörganges durch einen primären randständigen Trommelfelldefekt begünstigt. Außerdem spielen chronische Entzündungen der Mittelohrräume, *Immigrationstheorie* [68] oder die Ausbildung einer Retraktionstasche mit Verlust ihrer Selbstreinigungsfunktion auf dem Boden einer chronischen Tubenbelüftungsstörung, *Retraktionstheorie* [69] eine Rolle. Daneben existieren noch zwei weitere Entstehungstheorien. Die *Metaplasietheorie* basiert auf der Vorstellung, dass sich durch den Entzündungsreiz der chronischen Otitis media das flache, einschichtige Paukenepithel in Plattenepithel umwandelt [70] und nach der *Theorie der Basalzellhyperplasie* entsteht das Cholesteatom durch papilläres Tiefenwachstum von Keratinozyten [71] mit Ausbildung von gefüllten Epidermiszysten, aus welchen sich später die typische Cholesteatommatrix entwickelt [72]. Die beschriebenen Entstehungstheorien werden in der Literatur teilweise sehr kontrovers diskutiert, da insbesondere die Metaplasietheorie trotz neuester molekularbiologischer Methodik weder bewiesen noch ausgeschlossen werden konnte. Insgesamt scheint eine Kombination aus Retraktionstheorie und Theorie der Basalzellhyperplasie als wahrscheinlichster Erklärungsansatz zur Genese des erworbenen Cholesteatoms [73]. Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zeigen erworbenes und kongenitales Cholesteatom vergleichbare Eigenschaften. So neigt die Cholesteatommatrix als hyperproliferatives Epithelgewebe aufgrund der deutlich erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren (Epidermal growth factor receptor) und Zytokinen (Interleukin1) zum aktiven papillären Tiefenwachstum in das subepitheliale Bindegewebe [29, 73]. Die Perimatrix des Cholesteatoms zeigt erstens mit erhöhter Expression von

Proteinasen ein Ungleichgewicht zugunsten der proteolytischen Aktivität [74] und unterstützt zweitens die Proliferation der Cholesteatommatrix durch eine Neovaskularisation auf dem Boden einer erhöhten Expression angiogenetischer Faktoren [75]. Dies bedingt eine chronisch inflammatorische Reaktion mit entzündungsbedingter Chemotaxis und Aktivierung eines osteoklastären Knochenabbaus, insbesondere der Gehörknöchelchen [76, 77]. Der früheren Theorie einer reinen Drucknekrose oder Knochenatrophie [78, 79] misst man heute keine größere Bedeutung mehr zu. Die Ausprägung des Krankheitsbildes hängt vom Patienten und vom Schweregrad ab. Sie reicht vom symptomfreien Patienten, über Patienten mit Hörminderung, bis zu schwerkranken, lebensbedrohten Patienten mit intrakranieller Beteiligung. Häufig ist klinisch jedoch eine im Vergleich zur Otitis media chronica mesotympanalis ausgeprägtere und fast immer eitrig und fötide Otorrhoe, durch bakterielle Superinfektion, häufig mit Problemkeimen (Pseudomonas, Proteus...), sowie ein periaurikuläres Druckgefühl auffällig. Ferner wird bei Destruktion der Ossikelkette eine Schalleitungsschwerhörigkeit beklagt. Wichtigstes Diagnoseinstrument ist auch beim Cholesteatom die Otoskopie. Hier findet man neben einem hinsichtlich seiner Ausdehnung unterschiedlich großen randständigen Trommelfelldefekt die typischen weißlichen geschichteten Hornschuppenmassen des Cholesteatoms. Ergänzend kommen Tonschwellenaudiometrie, Stimmgabelversuche nach Weber und Rinne sowie Röntgenuntersuchungen zur Anwendung. Eine medikamentöse Therapie des Cholesteatoms ist bisher nicht etabliert, daher wird es in der Regel sanierenden Operationen zugeführt. Bei besonders ausgeprägter eitrigem Sekretion schaffen vorherige lokal desinfizierende und gezielt antibiotische oder antimykotische Maßnahmen günstigere Operationsvoraussetzungen. Je nach Ausmaß und Rezidivneigung des Cholesteatoms bevorzugt man verschiedene Verfahren (endaural, Zwei-Wege-Op, Radikalhöhlenanlage). So entwickelte und definierte Wullstein in den 50iger Jahren des 20. Jahrhunderts die Tympanoplastik und teilte sie in fünf Typen ein. Für die Praxis relevant sind die Tympanoplastik Typ 1 [Deckung der Trommelfellperforation mittels einer Muskelfaszie (Myringoplastik)], Typ 2 [Wiederherstellung der Hebelwirkung der Schalleitungskette (Ossikuloplastik)] und Typ 3 [Rekonstruktion der Ossikelkette unter Verwendung von biologischem oder künstlichem Prothesenmaterial (Keramik-, Titanprothesen)]. Abhängig von der verbliebenen Stapessuprastruktur wird eine PORP (partial ossicular replacement prosthesis) zwischen Trommelfell und Steigbügelköpfchen bzw. eine TORP (total ossicular replacement prosthesis) zwischen Trommelfell und Steigbügelfußplatte eingesetzt [53].

4. Funktionsweise der akustischen Rastermikroskopie

4.1 DAS PULS-ECHO-VERFAHREN IN DER ULTRASCHALLRASTERMIKROSKOPIE

Die akustische Rastermikroskopie arbeitet mit dem Puls-Echo-Verfahren (Abb. 3), d. h. die vorhandene stark fokussierende akustische Linse wird sowohl als Sender von Ultraschallimpulsen als auch als Empfänger von reflektierten Wellen verwendet. Dazu dient ein an der planaren Seite der Linse befindlicher ZnO-Kristall als Schallwandler, welcher als streng piezoelektrischer Halbleiter aus einer hochfrequenten Wechselspannung eine mechanische Schwingung erzeugt, die nahezu planare Schallwellen in axialer Richtung in die Linse schickt. Durch das an den Schallwandler elektrisch angeschlossene HF-Sende- und Empfangsteil wird für die jeweils benötigte Arbeitsfrequenz ein Maximum an elektrischer Energie auf den Wandler übertragen. Eine Ultraschallwelle, erzeugt durch einen elektrischen Impuls, durchläuft die Linse und wird nach Reflexion am Untersuchungsobjekt und erneutem Durchlaufen der Linse im Wandler empfangen und wiederum in ein elektrisches Signal umgewandelt. Durch eine kurze Pulsdauer von ca. 20 ns ist eine zeitliche Trennung des gesendeten und reflektierten Schalls gegeben. Um Interferenzen des an der Probe reflektierten Messsignals mit Störsignalen, wie sie z.B. in der Linse durch Mehrfachreflexion entstehen, welche andere Laufzeiten haben und damit verzögert zum Wandler zurückkehren, zu reduzieren, wird die Empfangszeit durch ein elektronisches Zeitfenster begrenzt. Ein Verstärker mit großer Bandbreite, elektronisch vor Übersteuerung geschützt, nimmt die reflektierten Signale auf [80, 81].

Die aus einem Saphirkristall mit geringer Dämpfung und hoher Schallgeschwindigkeit bestehende zylinderförmige Linse ist an der probenfernen Seite flach und weist an der probennahen Seite eine sphärische Kalotte mit einem Krümmungsradius von ca. 0,1mm auf. Diese fokussiert die vom Wandler ausgesendeten Wellen beim Übertritt in das Kopplungsmedium auf eine Fokuszone unterhalb der Kalotte, deren ungefähre Durchmesser eine Wellenlänge ($1,7\mu\text{m}$) beträgt. Saphirlinse und Kopplungsmedium haben sehr hohe Impedanzunterschiede, so dass zur Reduktion der Reflexionen an den Grenzflächen die Linse mit einer Entspiegelungsschicht aus SiO_2 (Siliciumdioxid, Quarz) oder Kalk-Glas ausgestattet ist. Die Dämpfung im Kopplungsmedium ist hoch und steigt mit der verwendeten Schallgeschwindigkeit quadratisch an, so dass die Linse stark an die Probe angenähert werden muss und durch eine computergesteuerte mechanische Scaneinrichtung in x-y-Richtung die Probe Punkt für Punkt abrastert. Dadurch erhält man für jeden gescannten Punkt der Probe sowohl Informationen bezüglich der Probenmorphologie als auch im Hinblick auf die örtlichen akusto-mechanischen Eigenschaften [27].

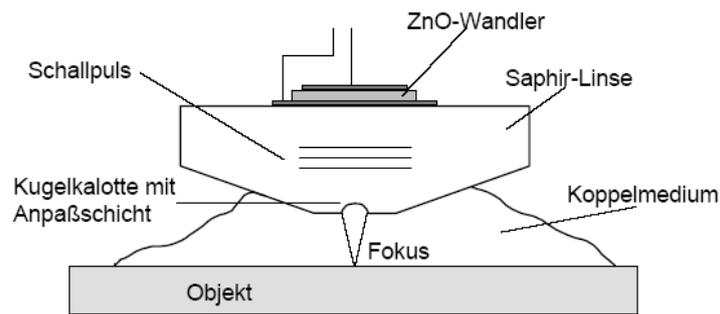


Abb. 3: Das Prinzip des Puls-Echo-Verfahrens

Die Trennfähigkeit eines Ultraschallgerätes für zwei Reflexionspunkte, die nebeneinander in gleicher Entfernung vom Wandler liegen, ist definiert als sein laterales Auflösungsvermögen. Durch Fokussierung, also Verringerung des Strahlenbündeldurchmessers, lässt sich eine höhere laterale Auflösung erreichen. Sie berechnet sich in der akustischen Rastermikroskopie im Reflektionsverfahren nach Gleichung 1.

$$\text{Gleichung 1: } w = 0,51 \lambda_0 / N.A.$$

Hierbei stehen N.A. für die numerische Apertur der Linse des akustischen Rastermikroskopes und λ_0 für die Wellenlänge des verwendeten Ultraschalls [81].

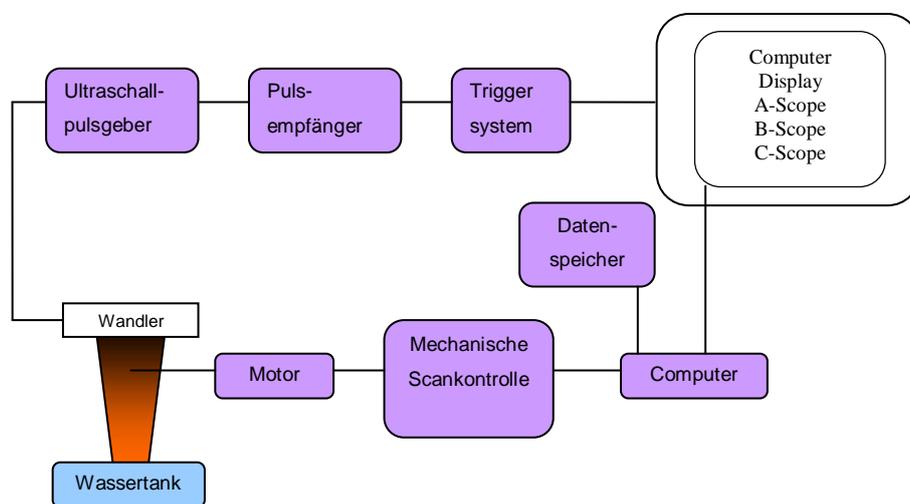


Abb. 4: Prinzipieller Messaufbau eines akustischen Rastermikroskopes im Reflexionsbetrieb [25]

Der Abstand z der Probenoberfläche vom Linsenfokus beeinflusst die am Wandler anliegende Ausgangsspannung. Die Spannungsamplitude des zurückgeworfenen Wellenbündels unterliegt einer charakteristischen $V(z)$ -Funktion, die bei veränderten Linsen-Probenabständen in z -Richtung für das Spannungssignal einen materialspezifischen oszillierenden Verlauf beschreibt und bei Defokussierung periodisch mehrere Nebenmaxima

sowie in der Fokusweite der Linse ein Hauptmaximum zeigt. Für die quantitative Bestimmung der elastomechanischen Knocheneigenschaften wird jeweils das maximal reflektierte Spannungssignal $V(z)$ im Fokusabstand verwendet.

$V(z)$ läßt sich angeben durch die Gleichung 2 [81]:

$$\text{Gleichung 2: } V(z) = \int_0^{\pi/2} P(\theta) R(\theta) e^{-izk \cos \theta} \sin(\theta) \cos(\theta) d\theta$$

$R(\theta)$ Reflektanzfunktion

$P(\theta)$ Pupillenfunktion der Linse

k Wellenvektor in der Flüssigkeit mit $k = 2 \pi / \lambda$

z Linsen-Probenabstand in Vertikalrichtung

θ Einfallswinkel des Wellenbündels zur Probenoberflächennormalen

Die lokalen Materialeigenschaften und damit die Intensität der an der Probenoberfläche reflektierten Ultraschallwelle des untersuchten Objektes bestimmen die Amplitude des $V(z)$ -Signals. Die Energie der reflektierten Ultraschallwellen wird im piezoelektrischen ZnO-Wandler in ein elektrisches Spannungssignal umgewandelt. Dieses wird zur quantitativen Auswertung für jeden untersuchten Punkt der Knochenprobe im Fokusabstand der Linse aufgenommen. Der geringe Schallfelddurchmesser im Fokusbereich ($1,7\mu\text{m}$) lässt eine Zuordnung des reflektierten Signals zu den lokalen Elastizitätseigenschaften an der Probenoberfläche mit hoher Auflösung zu [82]. Die Fokussierung stellt sicher, dass sich die Mehrheit der in die Probe eingesandten und nach der Reflexion zum Wandler zurückkehrenden Schallwellen in Phase befindet, also die gleiche Frequenz hat.

In axialer Richtung auf die Probe auftreffende Wellenbündel unterliegen einer Reflexion in gleicher Richtung entlang der Linsenachse. Wellenbündel aus weiter lateral gelegenen Linsenbereichen werden so reflektiert, dass das reflektierte Bündel symmetrisch zum einfallenden Bündel verläuft. Auf diese Weise tragen sie ebenfalls konstruktiv zum $V(z)$ -Signal bei, da sie mit dem axialen Wellenanteil in Phase interferieren. Voraussetzung ist, dass sich die Probe im Fokus der Linse befindet. Bei Defokussierung, das heißt einer Abstandsveränderung der Linse in z -Richtung, kommt es durch die nun destruktiv interferierenden Wellenanteile zu einer kontinuierlichen Abnahme der Signalamplitude. Bei noch weiterer z -Veränderung dominieren sekundäre Maxima das Amplitudensignal, weil wieder eine relative Phasendifferenz von ganzzahligen Vielfachen von 2π erreicht ist. Dadurch erklärt sich der charakteristische periodische Verlauf der $V(z)$ -Kurven in

Abhängigkeit von Fokussierung bzw. Defokussierung (Abb. 5).

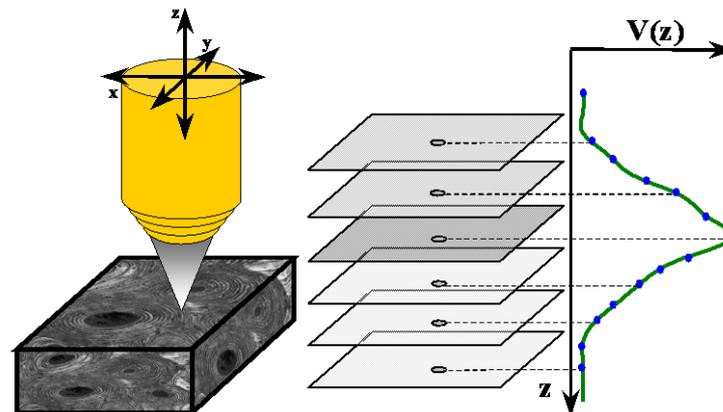


Abb. 5: Bildentstehung durch den Scanvorgang in der Focusebene und Signalabschwächung des $V(z)$ -Signals bei Defokussierung in z -Richtung [27]

Die Umsetzung der Reflexionssignale in Grauwerte mit maximalen Grauwerten in der Focusebene wird zur Ermittlung der Knochenimpedanzen verwendet und ermöglicht die automatische Erkennung des auszuwertenden Fokussignals für jeden Bildpunkt. Durch Aufnahme von Bildserien, ausgehend von positiver Defokussierung (Fokus oberhalb der Probe) bis zum Eintritt negativer Defokussierung, ist gewährleistet, dass von jedem Probenpunkt einmal ein Reflexionssignal im Fokusabstand der Linse aufgezeichnet wird.

Die Intensität der Grauwerte des entstehenden Rasterbildes hängt von der Stärke des elektronischen Eingangssignals ab, welches die zurücklaufende Ultraschallwelle generiert. Dieses wiederum korreliert mit dem Reflexionskoeffizienten R für die Probe an jeder gescannten Stelle. Der Reflexionskoeffizient berechnet sich nach Gleichung 3:

Gleichung 3:
$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2}$$

Z_1 : Impedanz des Untersuchungsmediums Knochen

Z_2 : Impedanz des Kopplungsmediums Wasser ($Z_2 \sim 1,5 \text{ Mrayl}$)

und ist bei angenommener Konstanz für Z_2 eine allein vom Untersuchungsmaterial abhängige Größe. Gleichung 3 gilt nur unter der Bedingung, dass die Wellenfronten die Probenoberfläche senkrecht erreichen und keine Scherwellen angeregt werden. Dann wird das resultierende Reflexionssignal nur durch die Interaktion der longitudinalen Schallwelle mit der Probenoberfläche an der Grenzfläche zum Kopplungsmedium Wasser bestimmt. Wird ein kritischer Winkel vom senkrechten Einfallswinkel überschritten, werden an der Objekt-oberfläche Scherwellen generiert, die aufgrund destruktiver Interferenzen zu Auslöschungsphänomenen der einzelnen Anteile des Wellenbündels führen und damit das

reflektierte Signal geringer erscheinen lassen. Ein Einfallswinkel von weniger als 10° zum Lot führt noch nicht zur Anregung von Scherwellen. Aufgrund von Oberflächenrauigkeiten ließ sich diese Bedingung in den für diese Arbeit verwendeten Proben nicht immer erfüllen. Mit Hilfe des von Raum et al. [27] entwickelten Mehrschichtanalyse-Verfahrens war jedoch eine gezielte quantitative Auswertung nur derjenigen reflektierten Signale möglich, für die die Bedingung eines Einstrahlwinkels kleiner 10° zutrafen. Nach Erstellung eines Topographiebildes konnten Kanten und stark geneigte Flächen erkannt und von ihnen ausgehende Signale von der weiteren Signalverarbeitung ausgeschlossen werden.

Unter genannten Bedingungen und in Kenntnis der Pupillenfunktion läßt sich schließlich die akustische Impedanz Z_2 für den Knochen bestimmen. Mittels dieser materialspezifischen Größe lassen sich die elasto-mechanischen Knocheneigenschaften über die Gleichung 4:

$$\text{Gleichung 4: } Z_2 = \rho v \quad (\rho: \text{Massendichte; } v: \text{longitudinale Schallgeschwindigkeit})$$

beschreiben.

Bei bekannter Impedanz können für isotrope Stoffe die mechanischen Größen Steifigkeit C und Young'sches Modul E nach den folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\text{Gleichung 5: } C = \rho v^2 = Z v \quad (v: \text{Schallgeschwindigkeit in Longitudinalrichtung})$$

$$\text{Gleichung 6: } E = \frac{C(1+\mu)(1-2\mu)}{(1+\mu)} = \rho v^2 \frac{(1+\mu)(1-2\mu)}{(1+\mu)} \quad (\mu: \text{Poissonverhältnis aus Lateral- und Axialdehnung})$$

Nach Aussagen von Raum et al. [27] gelten die Beziehungen für C und E sowohl für isotrope als auch für anisotrope Materialien. Dies ist insbesondere für Untersuchungen an kortikalem Knochengewebe als anisotropes Gewebe wichtig. In Kenntnis der Impedanz und der im interessierenden mikrostrukturellen Bereich des Knochens, z.B. nach Maev [83] berechneten Schallgeschwindigkeit, lassen sich Steifigkeit C und Elastizitätsmodul E ermitteln.

4.1.1 Materialeigenschaften und Ansprüche an das Einbettungsmedium

In der Histologie wird Polymethylmethacrylat (PMMA) besonders zum Einbetten von Hartgeweben verwendet. Das vor der Polymerisation flüssige Monomer (Methylmethacrylat) durchdringt Gewebe sehr gut und härtet exotherm zu einem festen Polymer (PMMA) aus. Durch Zugabe von Weichmachern ist sein Härtegrad variierbar. Dadurch eignet es sich sehr gut zur weiteren Bearbeitung (Schneiden, Schleifen, Polieren) und gewährleistet insbesondere das Anfertigen der für die akustische Rastermikroskopie notwendigen planparallelen Proben.

Untersuchungen anderer Gruppen ergaben, dass sich die Präparateimpedanz durch die Einbettung in PMMA im Vergleich zu Nativproben nur gering (um ca. 5%) erniedrigt [106]. Veränderungen durch das Einbetten in PMMA im Hinblick auf winkelabhängige Impedanzunterschiede bei der Darstellung der elastischen Eigenschaften von Knochen waren nicht festzustellen, so dass eine rechnerische Korrektur der Signalverschiebung erfolgen konnte [82].

5. Material

5.1 PROBENGWINNUNG

Die zur Untersuchung herangezogenen 32 Gehörknöchelchen mit pathologischen Veränderungen entstammen 23 unwillkürlich ausgesuchten Patienten (15 Männer, 6 Frauen) im Alter von 5 bis 75 Jahren (mittleres Alter = 40 Jahre) mit chronischer Mittelohrentzündung. Sie wurden operativ im Rahmen ohrsanierender Operationen (Tympanoplastik Typ III) gewonnen. Die als Vergleichsgruppe zur Untersuchung herangezogenen 20 gesunden Gehörknöchelchen wurden Felsenbeinen entnommen, die bei Obduktionen des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewonnen wurden. Nach dem Studium der Autopsieberichte ließen sich systemische Knochenerkrankungen bei den zufällig ausgewählten Verstorbenen (10 Männer, 2 Frauen) im Alter von 38 bis 74 Jahren (mittleres Alter = 61 Jahre) ausschließen. Über einen entweder enauralen oder retroaurikulären Zugang erfolgte nach Präparation der Felsenbeine die Entnahme der Gehörknöchelchen unter mikroskopischer Sicht. Kriterien für gesunde Gehörknöchelchen waren ein nach mikroskopischer Inspektion reizloser Gehörgang, ein intaktes Trommelfell und eine Pauke ohne pathologische Auffälligkeiten.

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Halle befürwortet und entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

5.2 PROBENAUFBEREITUNG

Sowohl die gesunden als auch die pathologisch veränderten Gehörknöchelchen wurden auf dieselbe Weise aufbereitet. Nach der Entnahme erfolgte die sofortige Fixation der Proben in 70%igem Ethanol. Daran schloss sich die Entwässerung aufsteigend in 96%igem und 100%igem Ethanol an. Später wurden die Proben in Histoclear®-Lösung (Xylol-Ersatz, 1,4-Dimethylbenzol) gereinigt und entfettet.

Hiernach wurden die Präparate zur Polymerisation in Methylmethacrylat entsprechend dem nachstehenden Verfahren eingebettet. Für einige Tage wurden die Ossikel in 100 Vol. % Methylmethacrylat mit 100 ppm Hydrochinon (Merck®) und anschließend für einen Tag in 90 Vol. % Polymethylmethacrylat mit 10 Vol. % Dibutylphthalat und Versetzung mit 1g Benzoylperoxid je 100 ml Ansatz gegeben. Bis zur vollständigen Aushärtung erfolgte die Einbettung in 90 Vol. % Polymethylmethacrylat. Um Brüche bei der späteren Verarbeitung zu verhindern wurde 10 Vol% Dibutylphthalat als Weichmacher zugesetzt. Die Zugabe von 3 g Benzoylperoxid je 100 ml Ansatzlösung diente der Initiierung der Polymerisation des zunächst mittels Hydrochinon stabilisierten flüssigen Methylmethacrylats.

Um störende Lufteinschlüsse während der Polymerisation zu vermeiden erfolgte die Aushärtung langsam. Hierzu wurden die Proben in Glaskölbchen im Wasserbad bei Raumtemperatur über eine Zeitspanne von 1 bis 3 Monaten aufbewahrt. Die Gehörknöchelchen waren nach diesem Verfahren entkalkt und haltbar. Die genaue Untersuchung der Präparate mit dem Ultraschallrastermikroskop setzt eine weitgehende Planparallelität der Proben voraus. Dazu wurden die Probenblöcke nach dem Aushärten zunächst aus den Glaskölbchen gelöst, mittels einer Trennschleifeinrichtung zu planparallelen Blöcken zugeschnitten und anschließend mit einem rotierenden Nassschleifgerät (EXAKT®, Norderstedt), welches die Blöcke mit einer horizontal oszillierenden Vakuumprobenhalterung fest verankert, bearbeitet. Schleifpapier mit absteigender Körnung (800-1200-2400-4000) kam hierbei zur Anwendung. Direkt vor den Ultraschallmessungen wurde die Probenoberfläche mit Diamantpaste der Körnung 1 und 0,25 μm und einem Samtpapier poliert sowie mittels Ethanol und Wasser von Schleifmittelresten gereinigt. Abb. 6 und Abb. 7 zeigen einen gesunden Hammer und einen gesunden Amboss, eingebettet in PMMA.

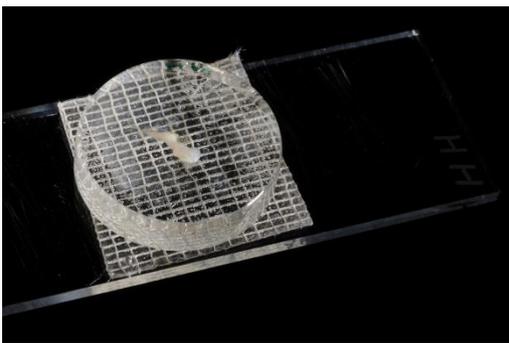


Abb. 6: Hammer, eingebettet in PMMA

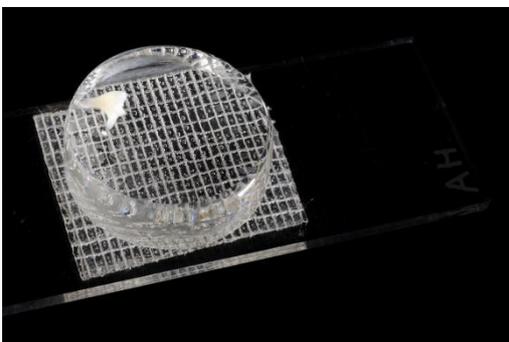


Abb. 7: Amboss, eingebettet in PMMA

6. Methoden

6.1 AUSWAHL DER MESSPUNKTE FÜR DIE AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE

Orientierend an anatomischen Strukturen (Abb. 8) erfolgte die Einteilung der Gehörknöchelchen in entsprechende Regionen. Der Hammerkopf wurde als Region 1, Collum, Processus lateralis, Processus anterior und Manubrium als Region 2 definiert. Die Zuordnung der Messergebnisse vom Amboss erfolgte ebenfalls in 2 Regionen. Corpus und Crus breve wurden zu Region 1, Crus longum und Processus lenticularis zu Region 2 zusammengefaßt.

Bei den Messungen mit dem SAM200 Ex konnte die gesamte Präparatoberfläche bei einem maximalen Scanbereich von 60x60 mm in einem Messvorgang untersucht werden. Die Bestimmung der akustischen Impedanz erfolgte vom gesamten Gehörknöchelchenanschnitt und den zuvor definierten Regionen. Da mit dem KSI SAM2000 ein maximaler Scanbereich von 1x1 mm pro Messung vorgegeben ist, wurde die Probenoberfläche in 1 mm² großen Meßflächen systematisch in den festgelegten Regionen untersucht und die akustische Impedanz hier und im gesamten Ossikelanschnitt durch Summation bestimmt.

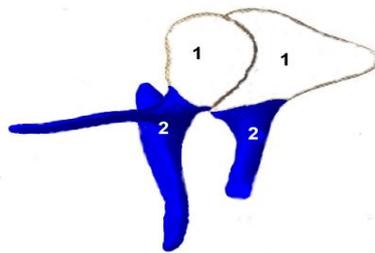


Abb. 8: Einteilung der Gehörknöchelchen in Regionen

Hammer:	Region 1:	<i>Caput</i>
	Region 2:	<i>Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium</i>
Amboss:	Region 1:	<i>Corpus, Crus breve</i>
	Region 2:	<i>Crus longum, Processus lenticularis</i>

6.2 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM SAM200 EX

Bei dem ersten für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden akustischen Mikroskop (Abb. 9) handelt es sich um ein zeitauflösendes Puls-Echo-Mikroskop (SAM200 Ex) mit einem Frequenzbereich bis 200 MHz, bestehend aus einem mechanischem Scansystem, einer Sender/Empfängereinheit, einem fokussierenden Ultraschallwandler und einer 8 bit A/D Wandlerkarte. Um die temperaturabhängige Dämpfung der Schallgeschwindigkeit bei hohen Frequenzen zu minimieren, wird die Probe in einem vom Q-Bam-Labor der Klinik für Orthopädie der Universität Halle entwickelten temperierbarem Wassertank platziert. Mittels Thermowiderständen lassen sich hier mit einer Genauigkeit von 0,1 K Temperaturen zwischen 20 und 60 °C einstellen. Alle Messungen erfolgten in einem bidestillierten und entgasten Wasserbad bei 25°C und einer Raumtemperatur von ebenfalls 25°C zur Vermeidung eines Temperaturgradienten (Abb. 9). Der Panametrics PR5900 mit einer 200 MHz Empfangsbandbreite und der V605 50 MHz kommen als Pulser/Receiver bzw. Schallwandler zur Anwendung. Mit einer Positioniergenauigkeit von 0,1µm werden Wandler und sphärische Linse computergesteuert in xy-Richtung über die Probe bewegt (Scanbereich maximal 60x60 mm²). Pro Linie kann die Anzahl der Messpunkte zwischen 32 und 256 Punkten festgelegt werden. Gespeichert wird eine Datenmatrix von 250 x 256 Punkten. Entlang der z-Achse, die parallel zur Schallstrahlachse ist, lässt sich ebenfalls eine Positioniergenauigkeit von 0,1µm bei einem Scanbereich von 26mm erreichen. Die Impulsdauer beträgt ca. 49 ns. Nach Kontrolle der Fokussierung mittels Reflexsignal am Monitor erfolgt die eigentliche Messung im Fokus. Die Bildgröße ist variabel. Bei 50 MHz und 25°C lässt sich mit dem Wandler eine laterale Auflösung von ca. 23 µm erreichen.



Abb. 9: Akustisches Rastermikroskop SAM200 Ex

6.3 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM2000

Die Messungen mit höherer Auflösung erfolgten mit dem KSI SAM2000, der Firma Krämer Scientific Instruments GmbH, Herborn, Deutschland (Abb. 10). Eine die Ultraschallimpulse fokussierende akustische Linse wird durch eine elektronisch gesteuerte Scaneinrichtung in Form eines Rasters über die zu untersuchende Probe bewegt. Die maximale Auslenkung in der x- und y-Achse beträgt 1mm. Unabhängig von der gewählten Auflösung wird eine Datenmatrix von 500 x 512 Punkten gespeichert [27].

Die zylinderförmige Saphir-Linse besitzt bei einer Mittenfrequenz von 180 MHz eine Bandbreite von 20 % und einen halben Öffnungswinkel von 30°. Als Schallgeber dient ein an der planeren Seite der Linse befindlicher Zinkoxid-Kristall. Dieser piezoelektrische Halbleiter empfängt ebenfalls die von der Probe reflektierten Wellen und überführt deren Energie in ein Spannungssignal. Er eignet sich für Frequenzen oberhalb 200 MHz. Gesendete und empfangene Schallwellenanteile werden durch ein elektronisches Zeitfenster voneinander getrennt. Die Pulsdauer beträgt ca. 60 ns und die Empfangszeit ist durch ein Zeitfenster begrenzt. So können Messsignale von Störsignalen, wie zum Beispiel in der Linse mehrfachreflektierte und mit Verzögerung am ZnO-Wandler ankommende Wellen, reduziert werden. Aufgrund der hohen Impedanzunterschiede zwischen Linse und dem Kopplungsmedium Wasser wurde die Linse mit einer Kalk-Glas-Schicht versehen, wodurch der Impedanzsprung und damit die Wellenreflektion von Linse zu Kopplungsmedium verringert und die Transmission der zur Linse reflektierten Strahlen erleichtert werden. Die Aufnahme der reflektierten Signale erfolgt in einem Echoverstärker mit großer Bandbreite, welcher vor Signalen aus Umschaltvorgängen und damit vor Übersteuerung elektronisch gesichert ist.

Nach Platzierung der Probe in der dafür vorgesehenen Haltevorrichtung des temperierbaren Probenbehälters erfolgte die auflichtmikroskopische Kontrolle der Probenoberfläche auf Schleifspuren und die anschließende Auswahl der zuerst zu untersuchenden Region mittels des in x- und y-Richtung horizontalverschiebbaren Probenstisches. Als Kopplungsmedium wurde destilliertes und entgastes Wasser von 25°C in den Probenbehälter gegeben. Die akustische Linse wurde nun über die Probe geschwenkt und unter visueller Amplitudenkontrolle des Reflexsignals auf dem Monitor mit möglichst maximaler Signalamplitude in z-Richtung fokussiert. Im Fokus beträgt der Linsen-Probenabstand etwa 500 µm. Die Messungen erfolgten in ca. 1µm Abständen in positiver und negativer z-Position vom Fokus bei einer Frequenz von 200 MHz und 25°C Wasser- und Raumtemperatur. So wurde eine laterale Auflösung von ca. 8 µm bei einer Bildgröße von 1x1 mm erreicht.



Abb. 10: Akustisches Rastermikroskop KSI SAM2000

6.4 DATENVERARBEITUNG

Im Labor für Quantitative B-Bild-Sonographie und akustische Mikroskopie (Q-Bam) der Klinik für Orthopädie der Universität Halle wurde durch Raum et al. [27] eine Software zur quantitativen Impedanzbestimmung der Knochenproben entwickelt.

Grundvoraussetzung für die quantitative Bestimmung von Probenimpedanzen ist, dass alle Bildpunkte im Fokus aufgezeichnet werden. Dies ist bei Objekten mit kleineren Oberflächenneigungen möglich, da das Phänom der Scherwellengenerierung erst bei größeren Einfallswinkeln ($> 10^\circ$) zu beobachten ist. Bereits bei der Probenpräparation können im Rahmen der mechanischen Bearbeitung (Schneiden, Schleifen, Polieren) durch den stärkeren Abrieb weicherer Materialien oder das Herausreißen von Apatitkristallen aus dem Kollagenverbund gewisse Oberflächenrauigkeiten entstehen. Die im Q-Bam-Labor entwickelte Schichtbildanalyse (Multi – Layer – Analysis) gewährleistet, dass das Signalmaximum jeweils aus der Fokusebene des gescannten Areals stammt. Die Beeinflussung des reflektierten Signals durch wechselnde topographische Gegenbenheiten aufgrund von Kanten und Präparationsartefakten wird durch die Software kompensiert. Darüber hinaus ermöglicht sie den Ausschluss von Störsignalen, welche an Grenzflächen mit hohen Impedanzunterschieden entstehen und verhindert eine Über- oder Untersteuerung des eingehenden Signals. Beginnend bei einer eindeutigen positiven Defokussierung aller Bildpunkte werden in $0,5 \mu\text{m}$ – Abständen in z-Richtung solange Bilder detektiert bis eine deutliche negative Defokussierung an jedem Bildpunkt erreicht ist. Somit wandert jeder Objektpunkt einmal durch den Fokus der Linse. Ferner wird das Linsenecho gemessen. Die Bestimmung der Maximalwerte an allen Objektpunkten ermöglicht die Darstellung des Oberflächenreliefs sowie die Ermittlung einer topographiekorrigierten Verteilung der Maximalwerte. Anhand der so ermittelten Werte erfolgt nach Gleichung 3 die Berechnung

der Impedanzverteilung im Knöchelchenanschnitt. Bildlich wurde jeder Impedanzwert mit einer ihm zugeordneten Farbe dargestellt. Mittels einer Ausschlußmaske wurden bei der Knochenimpedanzberechnung Bereiche, die nur aus der Einbettungssubstanz bestehen, wie Randzonen, größere mit PMMA aufgefüllte Destruktionszonen, Volkmann- und Haversche Kanäle [27] nicht berücksichtigt.

Die statistische Auswertung (t-test, verbunden) erfolgte mit WinSTAT® für Microsoft® Excel Version 2001.1. Die Voraussetzung fast ausschließlich normalverteilter Messwerte war gegeben.

6.5 AUFLICHTMIKROSKOPIE MIT DEM ZEISS-AXIOPLAN

Im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie, wo ein sehr dünnes transparentes Objekt von unten über eine Blende beleuchtet wird und der Bildkontrast durch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Gefügebestandteile entsteht, realisiert in Auflichtmikroskopen ein zwischen Objektiv und Okular eingefügtes optisches Element eine optimale Ausleuchtung des Objektes von oben. Hierzu befindet sich im Tubus des Mikroskops ein Prisma in einem Winkel von 45° . Die Beleuchtungseinrichtung wird auf die spiegelnde Fläche ausgerichtet. Hierdurch wird das Licht nach unten durch das Objektiv nahezu senkrecht auf das Objekt gelenkt und von dort reflektiert. Es ergeben sich zwei Abbildungsmöglichkeiten. Bei der Hellfeldabbildung wird das reflektierte Licht und das innerhalb des Öffnungsbereichs des Objektivs gebeugte bzw. diffus reflektierte Licht zur Abbildung genutzt. Das Objekt wird dabei nahezu senkrecht beleuchtet. Bei der Dunkelfeldabbildung wird der beleuchtete Strahlengang so geführt, dass die regulär reflektierten Strahlen nicht mehr in das Objektiv gelangen können. Zum Bild tragen so nur am Objekt gebeugte Strahlen bei, also jene Strahlen, welche bei der Hellfeldmessung ausgeschlossen wurden. Die Kontraste, also die lokalen Intensitätsunterschiede, resultieren bei der Hellfeldmessung zum einen aus lokalen Differenzen der Brechzahl sowie aus lokalen Differenzen des Absorptionskoeffizienten, denn beide beeinflussen das Reflexionsvermögen. Die Kontraste in der Dunkelfeldmessung erweisen sich komplementär zu denen der Hellfeldmessung.

Die Auflichtmikroskopie aller Proben erfolgte bei zehnfacher Vergrößerung mit dem Auflichtmikroskop Zeiss-Axioplan der Klinik für Orthopädie der Universität Halle. Hierzu wurde das Objektiv zunächst unter lichtmikroskopischer Kontrolle über die zuvor definierte Startregion des Präparates bewegt und scharfgestellt. Mittels einer elektronisch gesteuerten Motoreinheit (KONTRON Electronic MCP) wurde dann der gesamte Knochenanschnitt abgescannt und die Daten zur bildmorphologischen Darstellung von einem Kamerasystem (HVT-Horn Videosystem für Mikroskopie 3CCD Color Video Camera/CCD-IRIS) an den PC

übertragen. Die ca. 120 pro Präparat entstandenen Einzelaufnahmen wurden abschließend zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

Die so entstandenen digitalen lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden vergleichend zu den Maximalwertbildern der akustischen Rastermikroskopie herangezogen (Abb. 11). Dabei wurde das lichtmikroskopische Gesamtbild eines Präparates mit dem jeweils entsprechenden Maximalwertbild der 50 MHz Ultraschallmikroskopie verglichen. Da die Maximalwertbilder der 200 MHz Aufnahmen kleinere Ausschnitte definierter Knochenregionen abbilden wurde unter Zuhilfenahme einer Bildbearbeitungssoftware (Corel Photo Paint, Corel Draw) der entsprechende Ausschnitt in dem lichtmikroskopischen Gesamtbild gesucht und zu einem neuen Bild erstellt. Charakteristische Punkte (Randzonen, Volkmann- und Havers-Kanäle, Destruktionsbezirke) wurde nach Erstellung eines Rasters in allen Bildern (lichtmikroskopische Gesamtbilder, lichtmikroskopische Ausschnittsbilder, 50 MHz-Maximalwertbilder, 200 MHz Maximalwertbilder) zur besseren Vergleichbarkeit markiert.

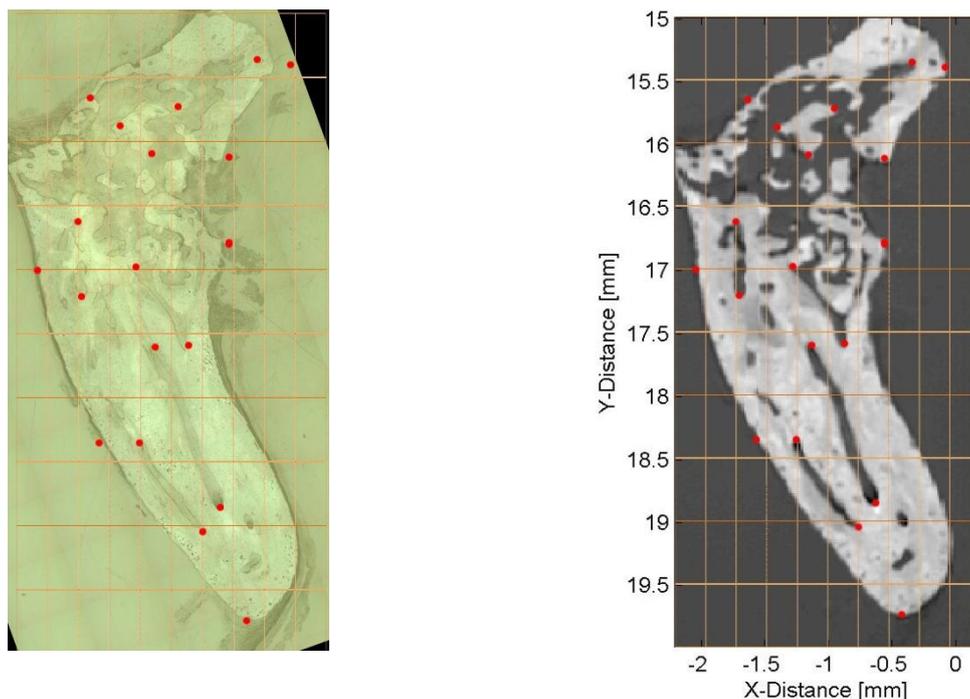


Abb. 11: *Maximalwertbild bei 50 MHz (links) und auflichtmikroskopisches Bild eines Hammeranschnitts mit chronischer Otitis media. Die Maßstäbe beider Bilder sind gleich.*

7. Ergebnisse

7.1 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM SAM200 EX

7.1.1 Untersuchungen an gesunden Hämmern

Qualitative Analyse

Bei einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz wurden von 10 gesunden Hämmern die Verteilung der Maximal- und Impedanzwerte bestimmt. Alle untersuchten Hämmer zeigten sich in der Ultraschallrastermikroskopie unverletzt mit glatter Oberfläche und intakter Knochentextur, welche nur gelegentlich durch Havers'sche Kanäle unterbrochen war. Ein ausgewähltes Beispiel für die aus den Maximalwerten berechneten Impedanzverteilungsbilder zeigt Abb. 12. Bereichen höherer akustischer Impedanz, z.B. im Bereich des Hammerkopfrandes, wurde ein roter Farbton zugewiesen. Wie in Ausschnitten des Hammergriffes zu sehen, wurden Bereiche mit niedriger akustischer Impedanz in hellblauen Farbtönen dargestellt. Bei diesem Präparat handelt es sich um den rechten Malleus eines 70-jährigen an Bronchialkarzinom verstorbenen Mannes. Anamnestisch liessen sich keine Hinweise auf Erkrankungen des Ohres eruieren. Ebenso ergab die mikroskopische Inspektion des äußeren Gehörganges, des Trommelfells und der Pauke keinen pathologischen Befund. Auch das Ultraschallbild des Hammers zeigt keine pathologischen Prozesse. Es fehlen keine anatomisch charakteristischen Strukturen, der Knochenrand ist glatt begrenzt und der Knochenverbund ist intakt.

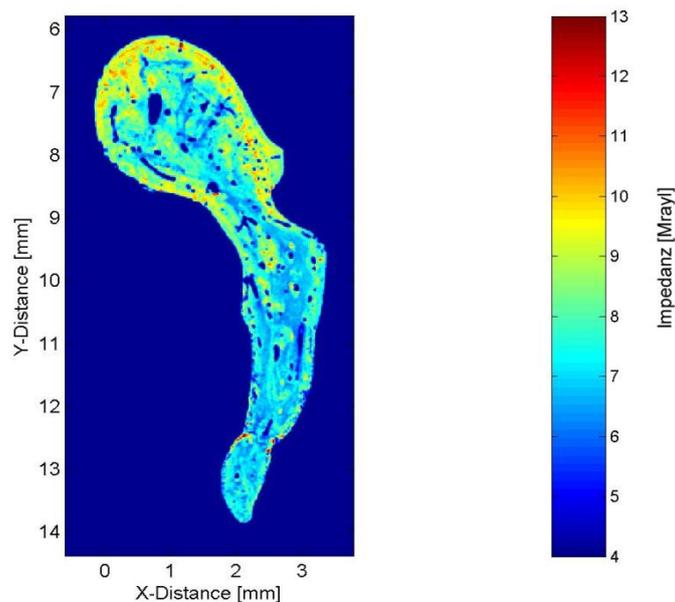


Abb. 12: Impedanzverteilung in einem gesunden Hammer (50 MHz)

Quantitative Analyse

Es wurde die akustische Impedanz für den gesamten Hammeranschnitt, Region 1 (Caput) und Region 2 (Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium) berechnet. Die angegebenen Impedanzwerte sind Mittelwerte. Diese sind mit Standardabweichung im Diagramm 1 veranschaulicht. Dabei wurde für die gesamte Hammerschnittfläche eine akustische Impedanz von $(8,13 \pm 0,42)$ Mrayl ermittelt. Die akustische Impedanz für Region 1 betrug $(8,23 \pm 0,39)$ Mrayl und für Region 2 $(7,96 \pm 0,51)$ Mrayl. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte für Region 1 und 2 nachgewiesen werden (t-test, $p=0,02$).

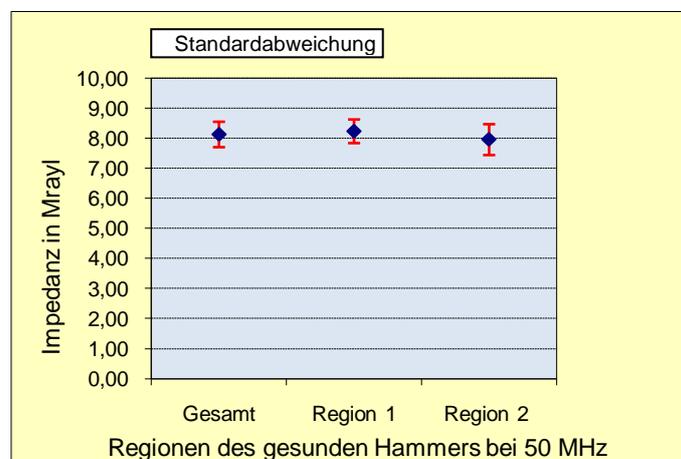


Diagramm 1: *Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des gesunden Hammers*

7.1.2 Untersuchungen an gesunden Ambossen

Qualitative Analyse

Ermittelt wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung von 10 Ambossen bei 50 MHz. In Abb. 13 ist die aus den Maximalwerten errechnete Verteilung der akustischen Impedanz eines typischen gesunden Ambosses aufgezeigt. Im Bereich des Corpus, dargestellt mit gelben und roten Farbtönen, findet man Bereiche mit höherer akustischer Impedanz (~ 12 Mrayl). Das Präparat entstammt dem rechten Felsenbein eines 51-jährigen Mannes, welcher an einem akuten Myokardinfarkt verstarb. In der Krankengeschichte des Verstorbenen gab es keine Hinweise auf chronische otologische Erkrankungen. Des Weiteren liessen sich bei der mikroskopischen Inspektion des äußeren Gehörganges, des Trommelfells und der Pauke keine pathologischen Befunde erheben. Auch in der ultraschallmikroskopischen Darstellung des Ossikels findet sich kein Anhalt für krankhafte Prozesse. Es stellen sich alle anatomisch wichtigen Strukturen dar und der Knochen lässt keine Destruktionszonen erkennen.

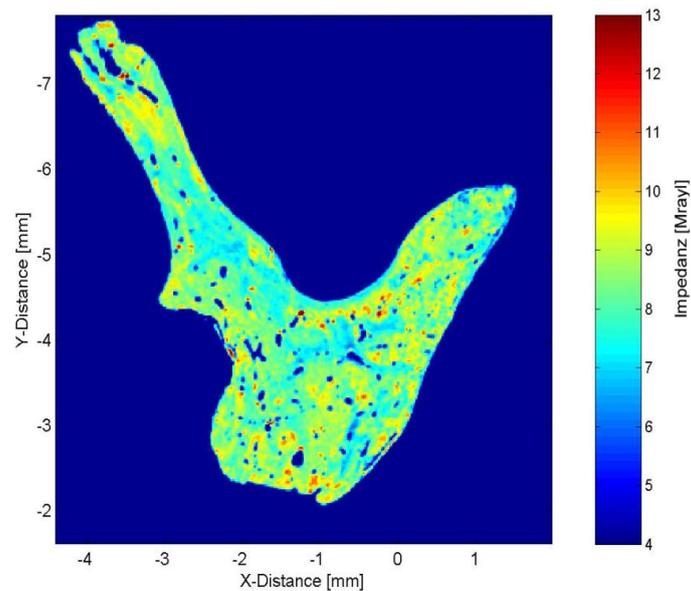


Abb. 13: Impedanzverteilung in einem gesunden Amboss (50 MHz)

Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzen von 10 gesunden Ambossen bei einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz ermittelt. Die Impedanzmittelwerte und die zugehörige Standardabweichung in den verschiedenen Regionen zeigt Diagramm 2. Die akustische Impedanz der gesamten Ambossschnittfläche betrug $(8,00 \pm 0,41)$ Mrayl. Für Region 1 (Corpus, Crus breve) wurde eine akustische Impedanz von $(7,90 \pm 0,66)$ Mrayl und für Region 2 (Crus longum, Processus lenticularis) von $(7,37 \pm 0,97)$ Mrayl. Der Unterschied der Impedanzmittelwerte von Region 1 und Region 2 war statistisch signifikant (t-test, $p=0,02$).

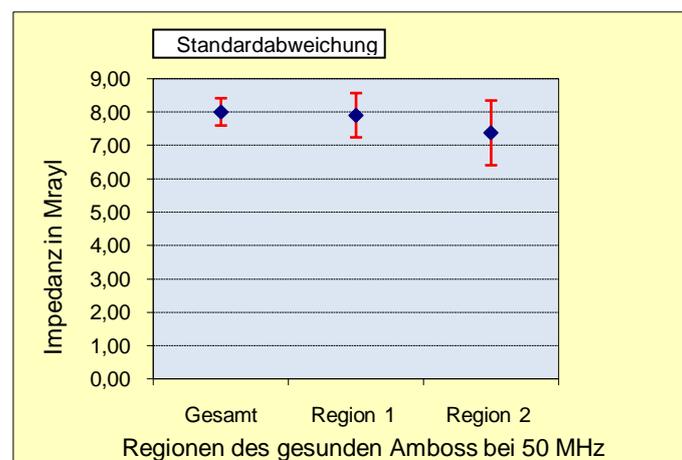


Diagramm 2: Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des gesunden Ambosses bei 50 MHz

7.1.3 Untersuchungen an Hämmern bei Otitis media chronica

Qualitative Analyse

Von 13 Hämmern mit chronischer Otitis media wurden die Maximalwert- und Impedanzwertverteilung ermittelt und dann graphisch dargestellt. Sämtliche Ossikel weisen deutliche Spuren des Knochenabbaus auf. Die Abb. 14 bis 16 veranschaulichen die Impedanzverteilung in typischen durch chronische Otitis media zerstörten Hammerlängsschnitten. Höhere Werte für die akustische Impedanz (gelber Farbton, ca. 10 Mrayl) sind z.B. im Bereich des Hammerkopfrandes, niedrigere Impedanzwerte im Bereich des Collums (blaue Farbtöne, ca. 7-8 Mrayl) zu sehen. Der in Abb. 14 dargestellte Hammerrest stammt von einem an gelegentlicher fötider Otorrhoe und zeitweiser Otagie des rechten Ohres leidenden Patienten. Eine ebenfalls subjektiv empfundene zunehmende Hörverschlechterung rechts wurde im Rahmen einer Tonschwellenaudiometrie als Schallleitungsschwerhörigkeit bestätigt. Intraoperativ stellten sich Cholesteatommassen mit Ummauerung der Gehörknöchelchen dar. Hammer- und Ambossreste wurden entfernt und die Ossikelkette sowie der Gehörgang rekonstruiert (Tympanoplastik Typ III). Das Ultraschallbild zeigt einen stark arradierten Malleus mit aufgelöst wirkender Knochenoberfläche und großen Destruktions- und Resorptionszonen. In dieser Region findet man auch niedrigere Werte für die akustische Impedanz, dargestellt durch überwiegend blaue Farbtöne.

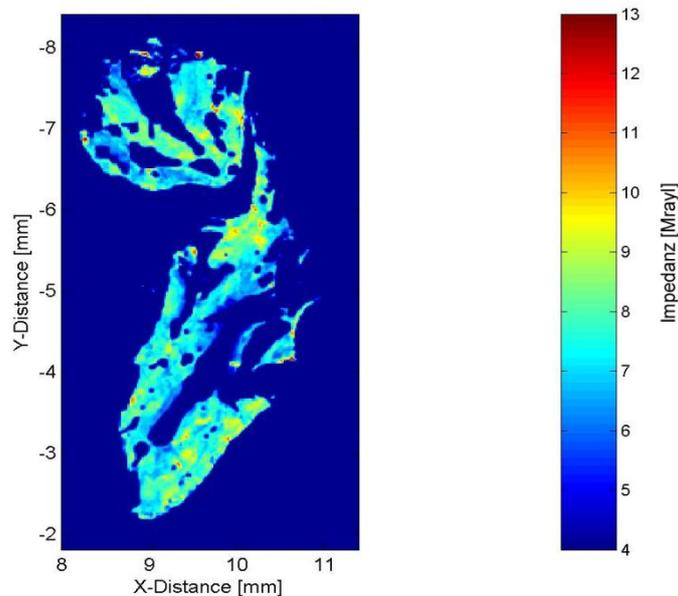


Abb. 14: Impedanzverteilung in einem Hammer bei chronischer Otitis media epitympanalis (50 MHz)

Abb. 15 zeigt den Rest des Hammers eines Patienten, welcher über gelegentliche Otagien, seltene Otorrhoen und leichte Hörminderung links klagte. Im Audiogramm ließ sich bei nahezu Normakusis rechts eine kombinierte Schwerhörigkeit links feststellen. Während der sanierenden Operation, ebenfalls Tympanoplastik Typ III, fand sich ein großes, die Pauke ausfüllendes und die komplette Gehörknöchelchenkette ummauerndes Cholesteatom mit teilweise freiliegendem Nervus facialis. Es konnte nach Gehörgangs- und Kettenrekonstruktion ein gutes operatives Ergebnis erzielt werden. In der ultraschallrasternmikroskopischen Darstellung gut zu sehen ist eine besonders im Collumbereich massiv zerstörte Knochenstruktur. Hier finden sich ebenfalls Bereiche einer niedrigeren akustischen Impedanz.

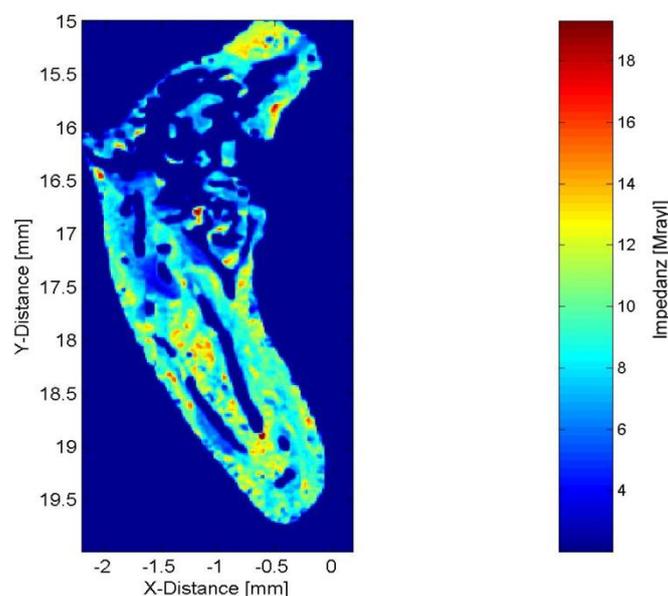


Abb. 15: Impedanzverteilung in einem Hammerschnitt mit chronischer Otitis media epitympanalis (50 MHz)

In Abb. 16 ist der Rest des Hammerkopfes eines Patienten mit rezidivierender Otorrhoe, häufigen Otagien und Schwerhörigkeit links zu sehen. Im Tonschwellenaudiogramm zeigte sich eine deutliche Schalleitungsschwerhörigkeit links. Intraoperativ fand sich ein stark vulnerables atrophes Trommelfell. Der gesamte Amboss und Teile des Steigbügels waren nicht darstellbar. Teile des mit der Paukenwand verwachsenen dislozierten Hammers konnten gelöst und entfernt werden. Es gelang schließlich die Kettenrekonstruktion durch Interposition eines Titantorps zwischen Steigbügelfußplatte und Hammergriff erfolgreich durchzuführen. Ultraschallmikroskopisch scheint das Präparat weitgehend intakt. Die Knochenoberfläche ist glatt, jedoch fallen erweiterte Havers'sche Kanäle auf und Bereiche der Collumregion scheinen arrodirt. Werte höherer akustischer Impedanz finden sich im ganzen Hammerkopf und besonders am Rand (gelb bis rot). Niedrigere Impedanzwerte (blau) dagegen zeigen die Region des Hammerhalses und der erweiterten Havers'schen Kanäle.

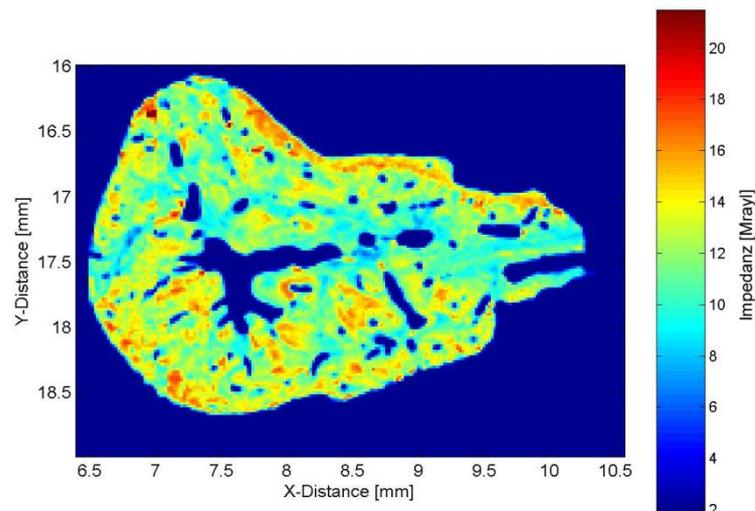


Abb. 16: Impedanzverteilung in einem Hammerkopf bei chronischer Otitis media mesotympanalis (50 MHz)

Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte der 13 Hämmer bei chronischer Otitis media bestimmt. Diese sind mit Standardabweichung für die einzelnen Regionen des Hammers in Diagramm 3 dargestellt. Für die gesamten Hammerschnitte konnte eine mittlere akustische Impedanz von $(7,39 \pm 0,57)$ Mrayl errechnet werden. Für Region 1 (Caput) betrug die akustische Impedanz $(7,74 \pm 0,67)$ Mrayl, für Region 2 (Collum, Proc. lateralis, Proc. anterior, Manubrium) $(7,29 \pm 0,39)$ Mrayl. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte von Region 1 und Region 2 liess sich nicht feststellen (t-test, $p=0,13$).

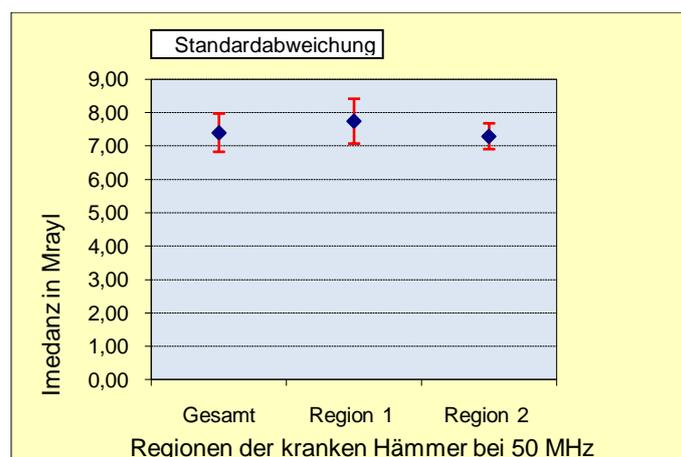


Diagramm 3: Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Hammers bei Otitis media chronica bei 50 MHz

7.1.4 Untersuchungen an Ambossen bei Otitis media chronica

Qualitative Analyse

Es wurde von 15 Ambossen mit chronischer Otitis media die Verteilung der Maximal- und Impedanzwerte bei einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz untersucht. In den Abb. 17 bis 19 sind die aus den Maximalwerten ermittelten typischen Verteilungsbilder der akustischen Impedanz destrukturierter Ambosse von Patienten mit chronischer Otitis media zu sehen. Im Bereich des Crus breve und Corpus sind z.B. Abschnitte mit hoher akustischer Impedanz sichtbar (roter Farbton, akustische Impedanz ca. 14 Mrayl). Abb. 17 zeigt den Rest des Ambosses eines Patienten mit rezidivierender Otorrhoe und gelegentlichen Tinnitus sowie subjektiver Hörverschlechterung des linken Ohres. Das Audiogramm ergab eine kombinierte Schwerhörigkeit links. Im Rahmen der Tympanoplastik Typ III stellte sich ein die Pauke ausfüllendes und die ganze Ossikelkette umwachsendes Cholesteatom dar. Zwischen langem Ambossschenkel und Stapesköpfchen bestand nur noch eine hauchdünne Verbindung. Hammerkopf und Amboss wurden entfernt und die Kette erfolgreich rekonstruiert. Auch im ultraschallrastermikroskopischen Bild kommt ein besonders im Corpusbereich zerstörter und ausgehöhlt erscheinender Amboss zur Darstellung. Ebenso zeigen Regionen des ehemaligen langen Ambossschenkels eine zerstörte Knochenoberfläche.

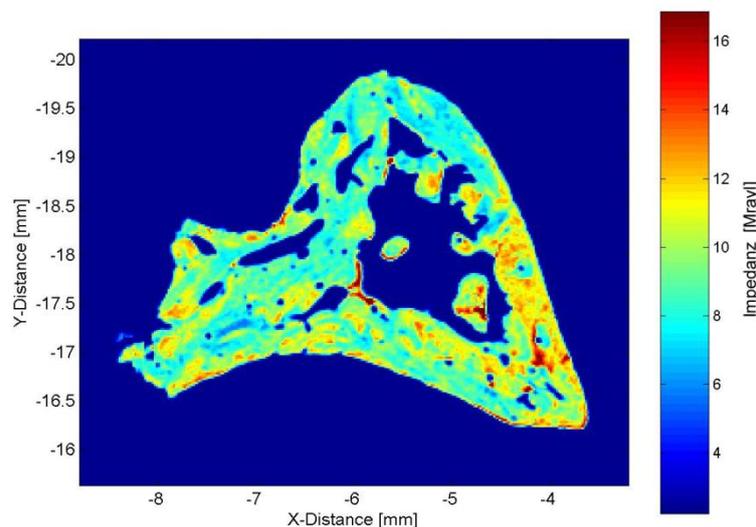


Abb. 17: *Impedanzverteilung in einem Amboss bei chronischer Otitis media epitympanalis (50 MHz)*

In Abb. 18 sieht man die Reste des Ambosses eines Patienten mit neu aufgetretener Otorrhoe und Otagien des linken Ohres. Die ebenfalls subjektiv empfundene Hörminderung wurde in der Tonschwellenaudiometrie bestätigt. Sowohl otoskopisch als auch intraoperativ zeigte sich ein ausgedehnter Befund. Cholesteatommassen fanden sich in der Paukenhöhle und ebenso im Mastoid. Amboss und Hammer, beide vollständig ummauert, wurden entfernt und das perforierte Trommelfell sowie die arrodiierte Kette rekonstruiert. Im Ultraschallbild bestätigt sich der intraoperative Befund. Es stellt sich ein von Destruktionszonen durchzogener Amboss dar. Wichtige anatomische Strukturen lassen sich nur schwer indentifizieren, die gesamte Knochenoberfläche ist aufgelöst. Gerade in Bereichen großer Destruktionsprozesse findet man niedrige Werte der akustischen Impedanz, überwiegend blaue Farbtöne kommen hier zur Darstellung.

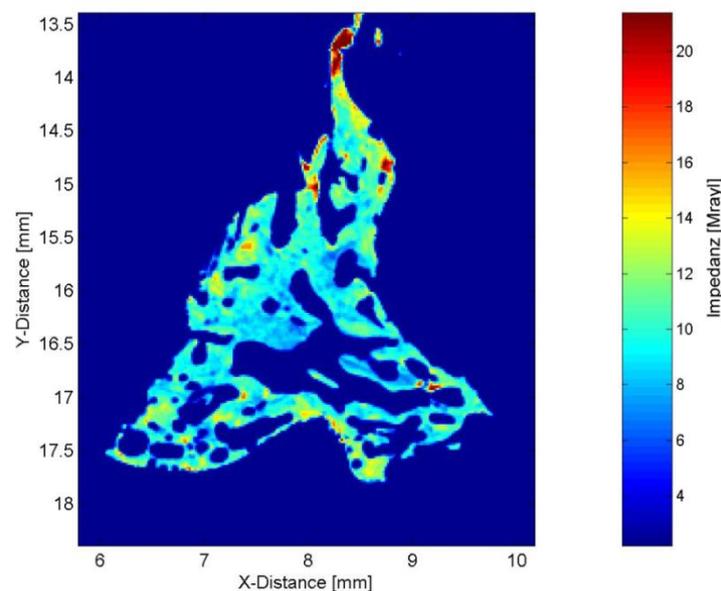


Abb. 18: *Impedanzverteilung in einem Amboss bei chronischer Otitis media epitympanalis (50 MHz)*

Abb. 19 zeigt den Amboss eines an chronischer, fötider Otorrhoe des rechten Ohres leidenden Patienten. Im Rahmen einer Tonschwellenaudiometrie zeigte sich eine kombinierte Schwerhörigkeit rechts. Intraoperativ fand sich ein stark arrodiiertes Ambosssteigbügelgelenk sowie eine subtotale Trommelfellperforation. Nach Entfernung des Amboss wurde die Kontinuität der Gehörknöchelchenkette durch Implantatinterposition wiederhergestellt. In der ultraschallmikroskopischen Darstellung sieht man eine vorwiegend intakte Knochenoberfläche und -struktur. Im Gebiet des Incudostapedialgelenks jedoch zeigen sich kleinere Destruktionsbereiche und eine unterbrochene Knochengrenze. Des Weiteren fallen auch in diesem Knöchelchen erweiterte Havers'sche Kanäle auf. Bei überwiegend blauem Farbspektrum sind in dieser Region auch Werte niedriger akustischer Impedanz zu finden.

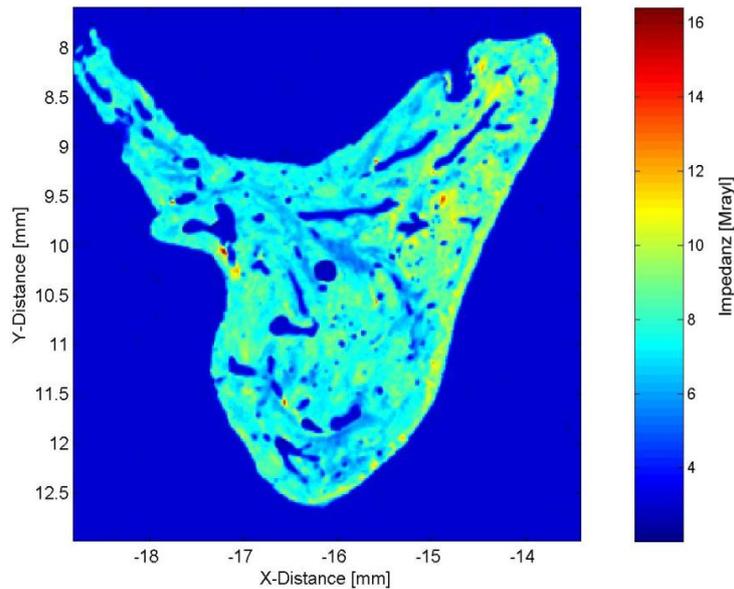


Abb. 19: *Impedanzverteilung in einem Ambosse bei chronischer Otitis media mesotympanalis (50 MHz)*

Quantitative Analyse

Es wurden von 15 kranken Ambossen die Mittelwerte der akustischen Impedanz bei einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz ermittelt. Die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die einzelnen Regionen der Ambosse bei chronischer Otits media sind in Diagramm 4 dargestellt. Für die gesamte Ambossschnittfläche ließ sich eine mittlere akustische Impedanz von $(7,45 \pm 0,47)$ Mrayl ermitteln. Die akustische Impedanz für Region 1 betrug $(7,41 \pm 0,57)$ Mrayl und für Region 2 $(7,46 \pm 0,57)$ Mrayl. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte von Region 1 und Region 2 (t-test, $p=0,42$).

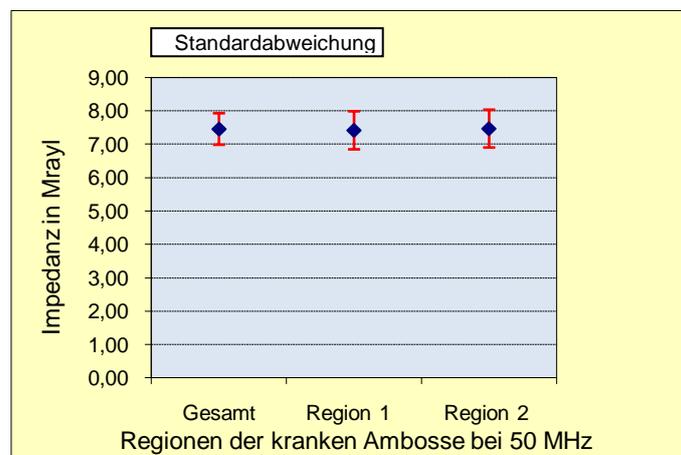


Diagramm 4: *Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Ambosses bei Otits media chronica bei 50 MHz*

7.2 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM2000

7.2.1 Untersuchungen an gesunden Hämmern

Qualitative Analyse

Unter Anwendung des Multi-Layer-Verfahrens wurde die Verteilung der Impedanzwerte in gesunden Hämmern bei einer Ultraschallfrequenz von 200 MHz ermittelt. In den Abb. 20 bis 22 sind die Impedanzverteilungsbilder typischer Bereiche (Caput, Collum und Manubrium) dargestellt. Dabei lassen gelbe und rote Farbtöne Bereiche höherer akustischer Impedanz erkennen (akustische Impedanz von ca. 9 Mrayl). Für das Einbettungsmedium PMMA, welches in den Lakunen und am Rand zu sehen ist, wurde eine akustische Impedanz von durchschnittlich 3,1 Mrayl ermittelt. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte des rechten Hammers eines 57-jährigen an Bronchialkarzinom verstorbenen Mannes. Mikroskopische Hinweise auf chronische Mittelohrprozesse fanden sich anamnestisch nicht. Auch die Inspektion von Gehörgang, Trommelfell und Pauke ergab keinen pathologischen Befund. Damit in Übereinstimmung zeigt auch das ultraschallrastermikroskopische Bild keine pathologischen Prozesse. Alle wichtigen anatomischen Strukturen kommen zur Darstellung, der Knochen ist glatt begrenzt und die Knochentextur ist frei von Destruktionszonen.

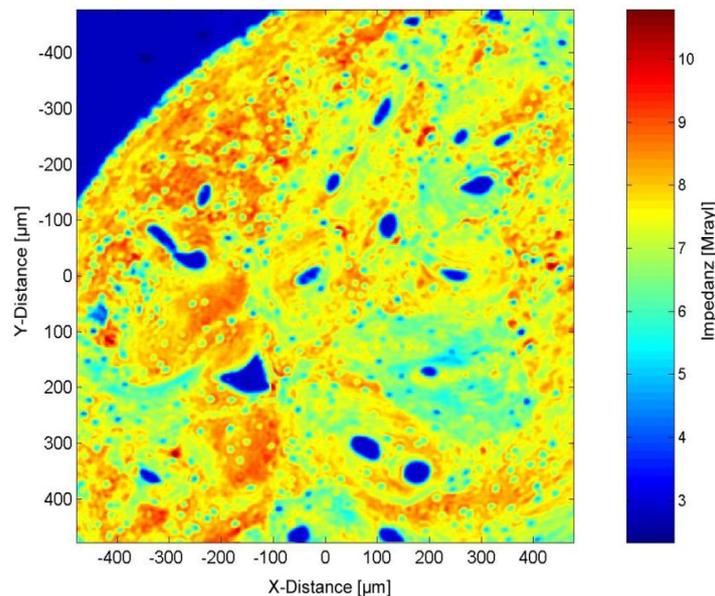


Abb. 20: Impedanzverteilung in einem gesunden Hammer [Ausschnitt Caput] bei 200 MHz

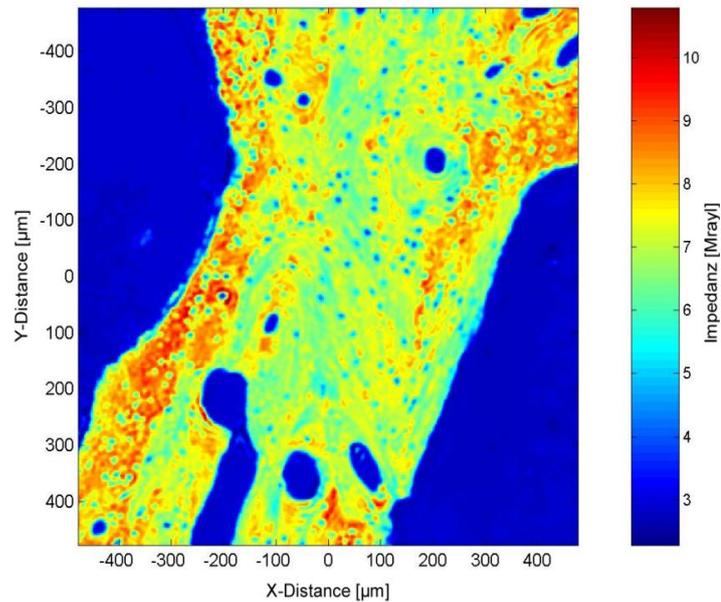


Abb. 21: Impedanzverteilung in einem gesunden Hammer [Ausschnitt Collum] bei 200 MHz

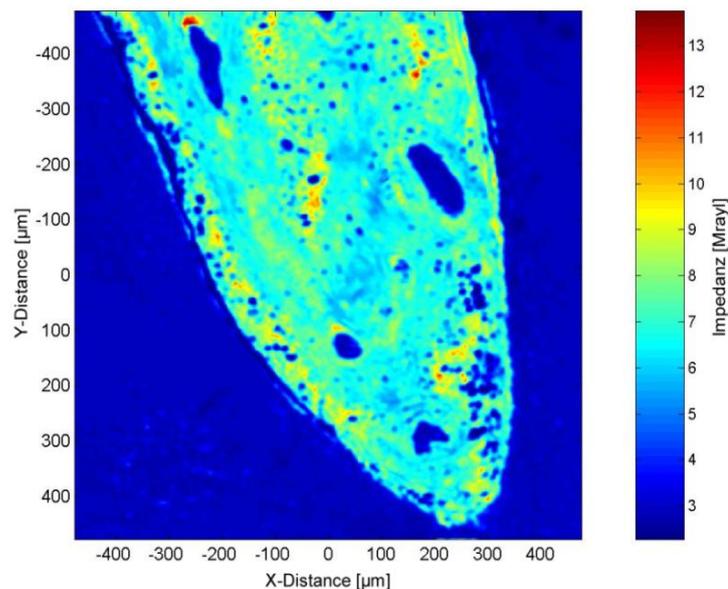


Abb. 22: Impedanzverteilung in einem gesunden Hammer [Ausschnitt Manubrium] bei 200 MHz

Quantitative Analyse

Die Mittelwerte der akustischen Impedanz wurden für die gesamte Hammerschnittfläche sowie für die Regionen 1 (Caput) und 2 (Collum, Proc. lateralis, Proc. anterior und Manubrium) bestimmt. Diagramm 5 veranschaulicht die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen der gesunden Hämmer. Für den gesamten Hammerlängsschnitt wurde eine mittlere akustische Impedanz von $(8,27 \pm 1,1)$ Mrayl ermittelt. Die akustische Impedanz von Region 1 betrug $(8,63 \pm 1,3)$ Mrayl und von Region 2 $(8,09 \pm 1,0)$ Mrayl. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied der

Impedanzmittelwerte zwischen Region 1 und Region 2 (t-test, $p=0,65$).

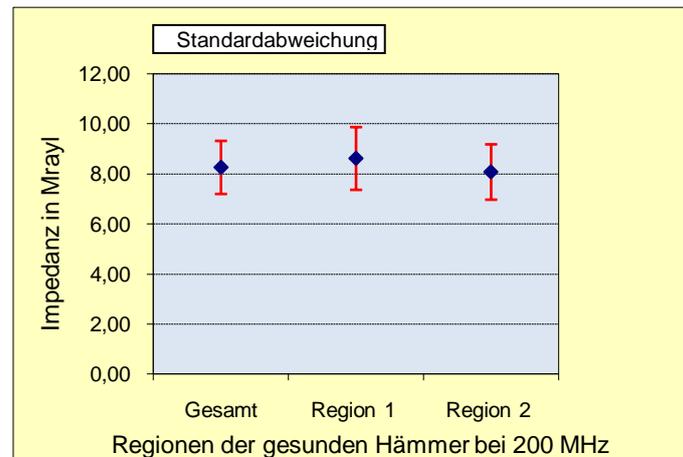


Diagramm 5: *Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des gesunden Hammers bei 200 MHz*

7.2.2 Untersuchungen an gesunden Ambossen

Qualitative Analyse

Mit dem Multi-Layer-Verfahren wurde bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz die Impedanzwertverteilung in gesunden Ambossen untersucht. In den Abb. 23 bis 25 ist die Verteilung der akustischen Impedanz für definierte Ambossregionen veranschaulicht. Dabei werden Bereichen höherer akustischer Impedanz gelbe und rote Farbtöne zugewiesen (akustische Impedanz von ca. 9 Mrayl). Das in den Lakunen und am Rand befindliche Einbettungsmedium PMMA weist eine mittlere akustische Impedanz von ca. 2,9 Mrayl auf. In den Abbildungen kommen Anschnitte des rechten Ambosses eines 38-jährigen an einem akuten Myokardinfarkt verstorbenen Mannes zur Darstellung. Es fanden sich weder anamnestisch noch nach der mikroskopischen Inspektion von Gehörgang, Trommelfell und Paukenhöhle Hinweise auf chronische Erkrankungen des Mittelohres. In den ultraschallrastermikroskopischen Aufnahmen sind alle anatomischen Charakteristika eines gesunden Incus, sowie eine intakte Knochengrenze und –struktur zu sehen.

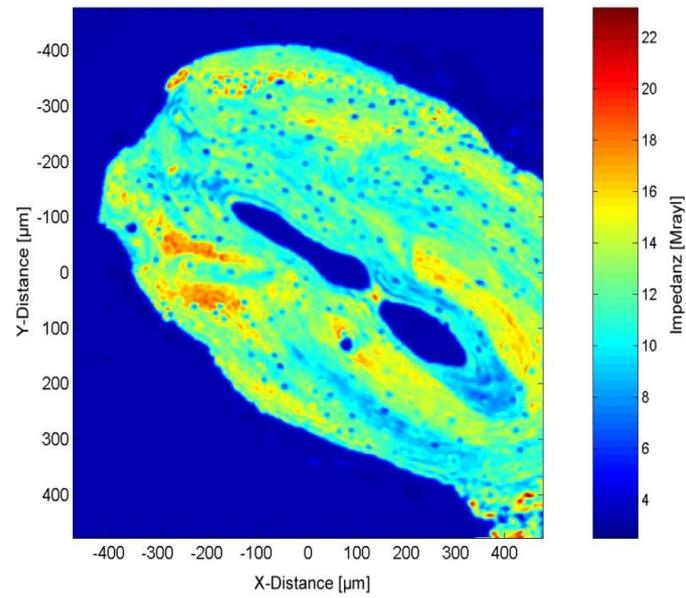


Abb. 23: Impedanzverteilung in einem gesunden Amboss [Ausschnitt Crus longum] bei 200 MHz

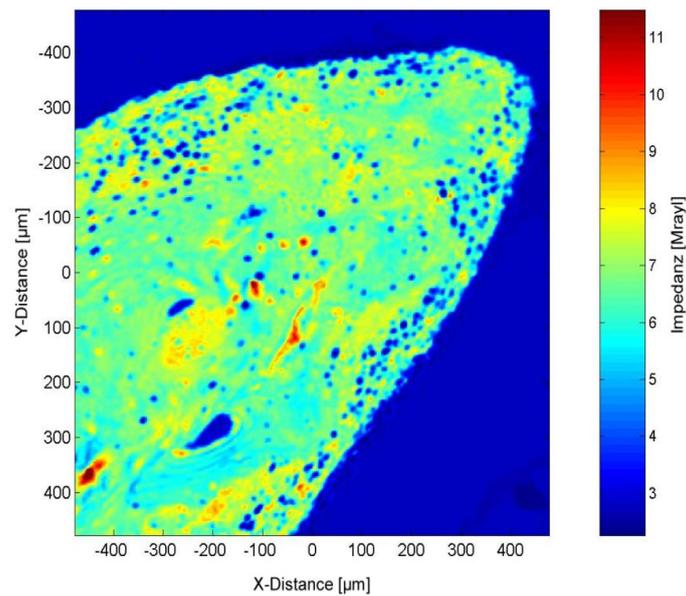


Abb. 24: Impedanzverteilung in einem gesunden Amboss [Ausschnitt Crus breve] bei 200 MHz

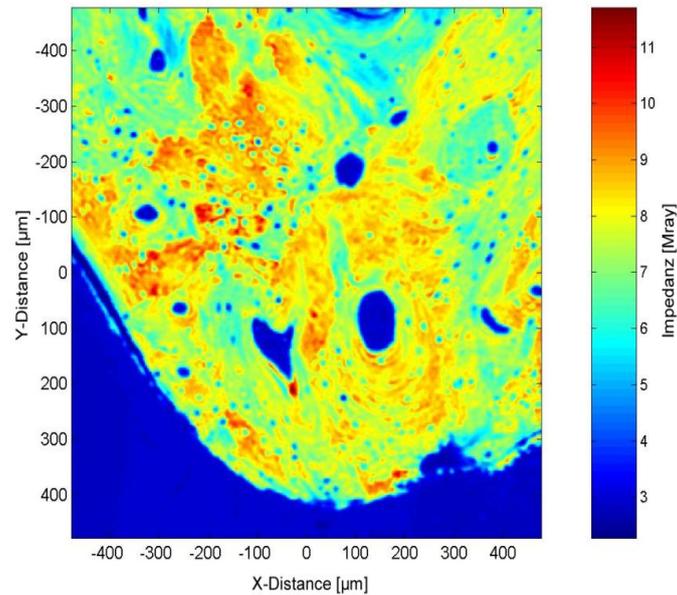


Abb. 25: Impedanzverteilung in einem gesunden Amboss [Ausschnitt Corpus] bei 200 MHz

Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte für die gesamte Fläche der Ambosse, für die Region 1 (Crus breve und Corpus) und die Region 2 (Crus longum und Proc. lenticularis) berechnet. Das Diagramm 6 zeigt diese mit Standardabweichung für die unterschiedlichen Regionen. Dabei betrug die akustische Impedanz für die gesamte Ambossfläche ($8,37 \pm 1,1$) Mrayl, für die Region 1 ($8,38 \pm 1,2$) Mrayl und für die Region 2 ($8,35 \pm 1,2$) Mrayl. Es ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen den beiden Regionen feststellen (t-test, $p=0,99$).

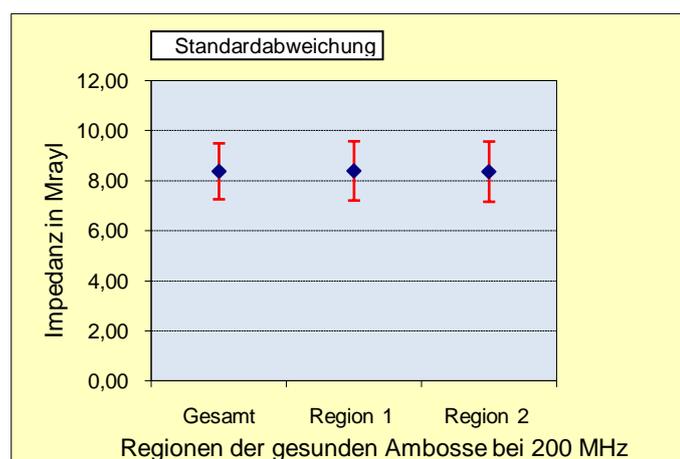


Diagramm 6: Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des gesunden Ambosses bei 200 MHz

7.2.3 Untersuchungen an Hämmern bei Otitis media chronica

Qualitative Analyse

Die Untersuchungen an den Hämmern mit chronischer Otitis media erfolgten bei 200 MHz und die Verteilung der akustischen Impedanz wurde mit dem Multi-Layer-Verfahren ermittelt.

Die Abb. 26 bis 28 zeigen die Verteilung der akustischen Impedanz in repräsentativen Ausschnittsbildern des destruierten Hammers. Bereiche mit einer höheren akustischen Impedanz sind im gelben und roten Farbton (akustische Impedanz von ca. 4 Mrayl) dargestellt. Regionen mit einer niedrigeren akustischen Impedanz wurden blaue Farben zugewiesen. Gut zu sehen ist dies in Abb. 27 mit Darstellung einer großen Resorptionslakune. Das Einbettungsmedium PMMA am Rand und in den Lakunen hat eine akustische Impedanz von ca. 2,8 Mrayl.

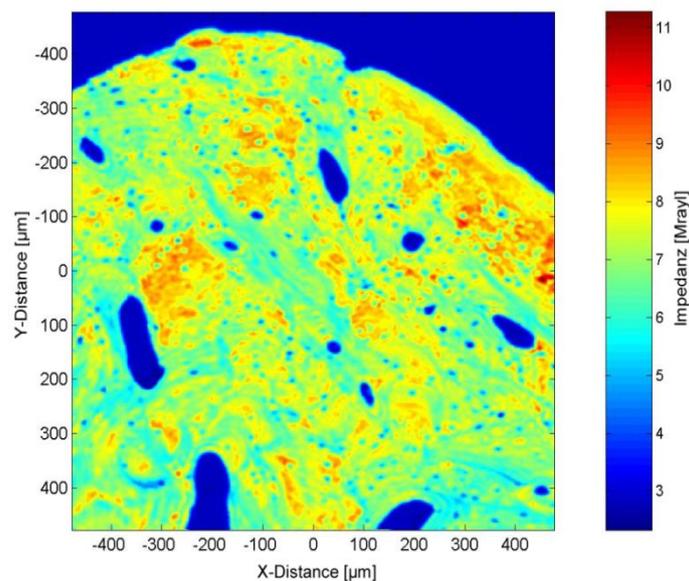


Abb. 76: *Impedanzverteilung in einem Hammer bei chronischer Otitis media mesotympanalis [Ausschnitt Caput] bei 200 MHz*

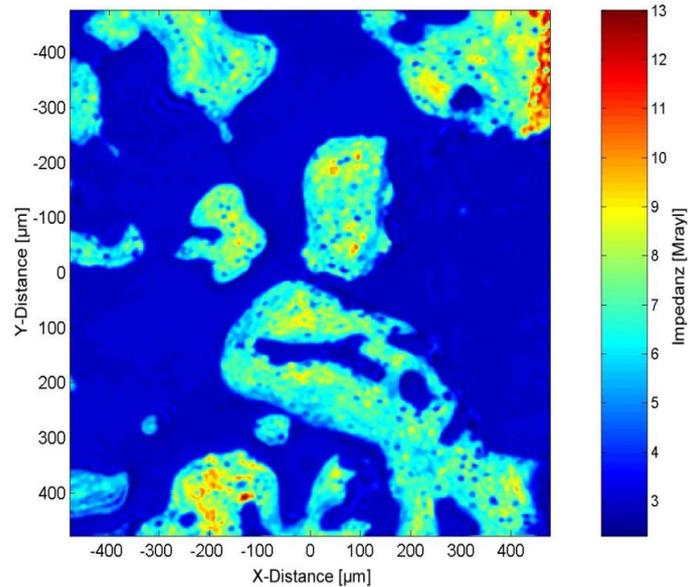


Abb. 27: *Impedanzverteilung in einem Hammer bei chronischer Otitis media epitympanalis [Ausschnitt Collum] bei 200 MHz*

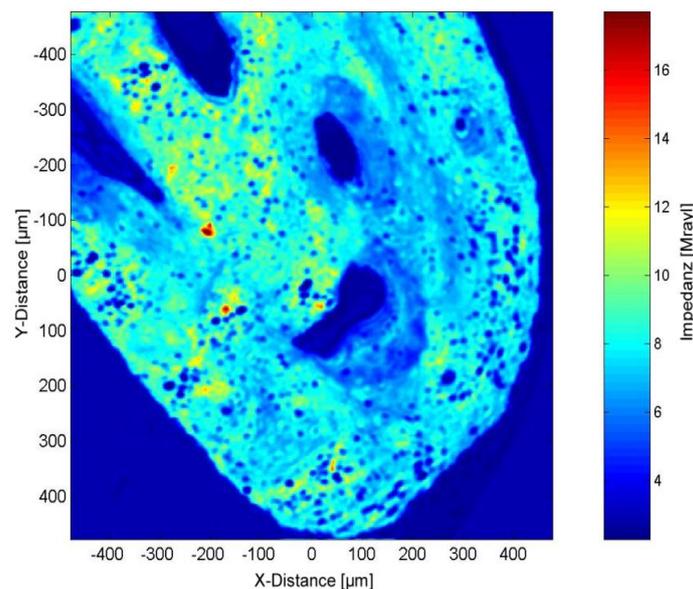


Abb. 28: *Impedanzverteilung in einem Hammer bei chronischer Otitis media epitympanalis [Ausschnitt Manubrium] bei 200 MHz*

Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte für den gesamten Hammeranschnitt, den Hammerkopf (Region 1) und den Hammerhals, den seitlichen und vorderen Fortsatz sowie den Hammergriff (Region 2) bestimmt. In Diagramm 7 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Hammers dargestellt. Die akustische Impedanz beträgt für die gesamte Hammerfläche ($7,83 \pm 1,2$) Mrayl, für Region 1

($7,88 \pm 1,2$) Mrayl und für Region 2 ($7,63 \pm 1,1$) Mrayl. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte war zwischen Region 1 und Region 2 nicht nachzuweisen (t-test, $p=0,57$).

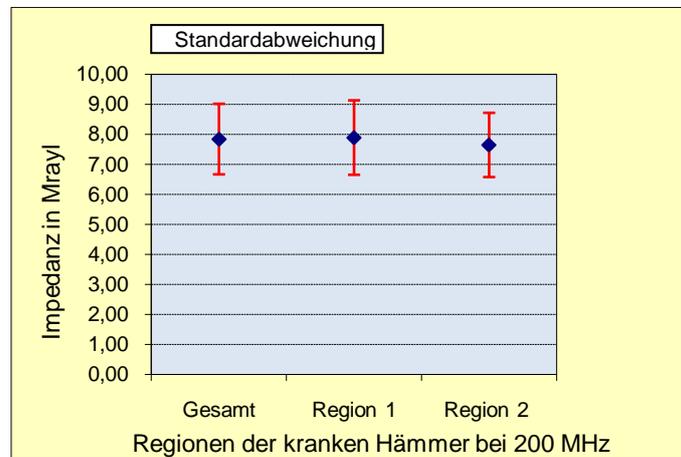


Diagramm 7: *Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des kranken Hammers bei 200 MHz*

7.2.4 Untersuchungen an Ambossen bei Otitis media chronica

Qualitative Analyse

Es wurde die Verteilung der akustischen Impedanz in durch chronische Otitis media zerstörten Ambossen mit dem Multi-Layer-Verfahren ermittelt. Untersucht wurde bei einer Ultraschallfrequenz von 200 MHz.

Die Verteilung der akustischen Impedanzwerte in charakteristischen Regionen der destruierten Ambosse ist in den Abb. 29 bis 31 dargestellt. Gelbe und rote Farbtöne weisen dabei auf Bereiche mit einer höheren akustischen Impedanz hin. (akustische Impedanz von ca. 10 Mrayl). Blaue Farbbereiche hingegen repräsentieren Regionen mit niedrigerer akustischer Impedanz, wie in Abb. 31, große Destruktionszone, aufgezeigt. Für das Einbettungsmedium PMMA am Rand und in den Lakunen wird eine akustische Impedanz von ca. 2,8 Mrayl ermittelt.

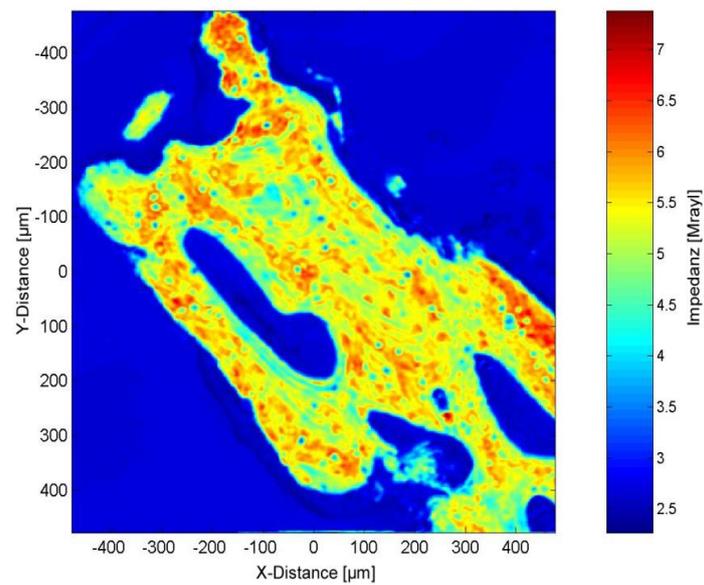


Abb. 29: *Impedanzverteilung in einem Amboss bei chronischer Otitis media epitympanalis [Ausschnitt Crus longum] bei 200 MHz*

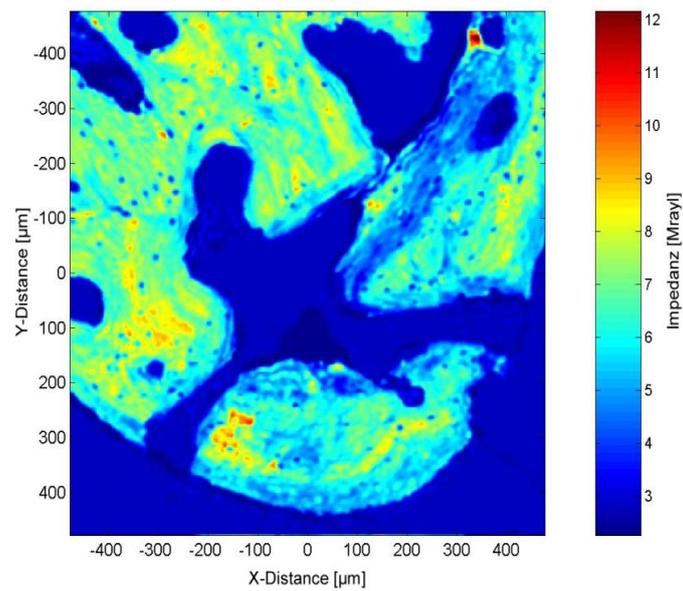


Abb. 30: *Impedanzverteilung in einem Amboss bei chronischer Otitis media epitympanalis [Ausschnitt Crus breve] bei 200 MHz*

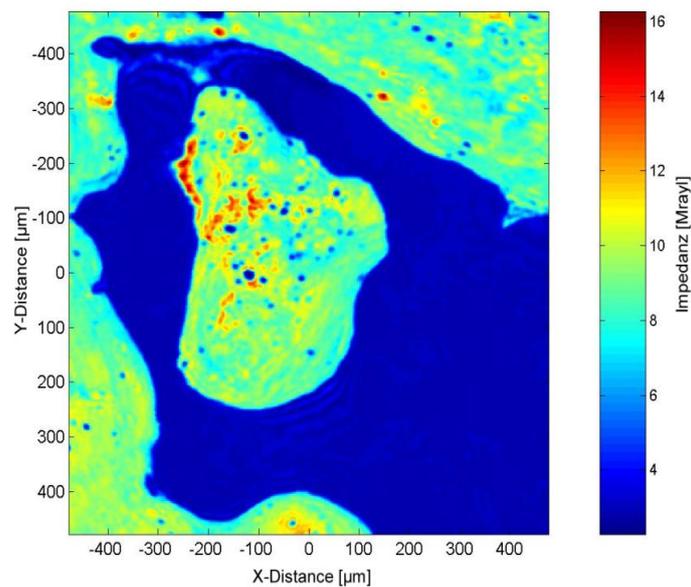


Abb. 31: *Impedanzverteilung in einem Amboss bei chronischer Otitis media epitympanalis [Ausschnitt Corpus] bei 200 MHz*

Quantitative Analyse

Es erfolgte die Bestimmung der Impedanzmittelwerte für den gesamten Amboss, den Ambosskörper und den kurzen Ambossschenkel (Region 1) sowie für den langen Ambossschenkel (Region 2). In Diagramm 8 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen der Ambosse dargestellt. Die akustische Impedanz beträgt für die gesamte Ambossfläche ($7,60 \pm 1,1$) Mrayl, für Region 1 ($7,27 \pm 1,2$) Mrayl und für Region 2 ($7,65 \pm 1,5$) Mrayl. Es war ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen Region 1 und Region 2 feststellbar (t-test, $p=0,005$).

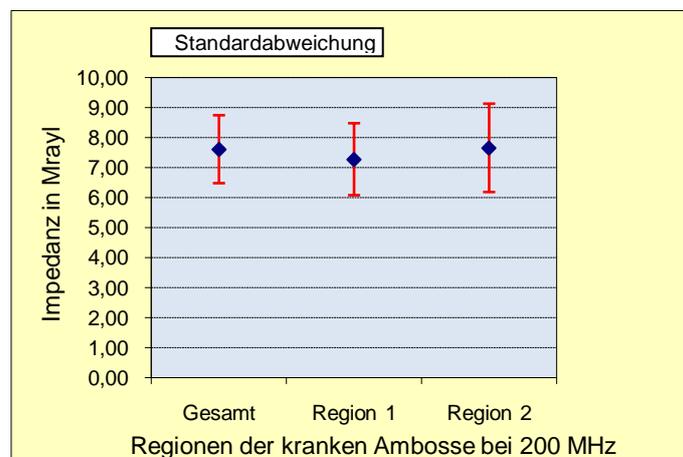


Diagramm 8: *Impedanzmittelwerte in Mrayl mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des kranken Ambosses bei 200 MHz*

7.3 VERGLEICH DER MESSERGEBNISSE MIT DEM SAM 200EX

7.3.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica

Es erfolgte ein Vergleich der akustischen Impedanzen der gesamten gesunden Hämmer und der Hammeranschnitte bei chronischer Otitis media, die bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz bestimmt wurden. Diagramm 9 stellt die Verteilung der mittleren akustischen Impedanz für die verschiedenen Regionen der beiden Stichproben graphisch dar. Es ließ sich ein nahezu statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen den gesunden Hämmern (8,13 Mrayl) und den kranken Hämmern (7,39 Mrayl) über die gesamte Schnittfläche nachweisen (t-test, $p=0,06$). Hingegen unterschieden sich die Impedanzmittelwerte der gesunden Hämmer (8,23 Mrayl) und der kranken Hämmer (7,74 Mrayl) in der Region des Hammerkopfes signifikant (t-test, $p=0,05$). Auch in der Region 2 der gesunden (7,96 Mrayl) und kranken Hämmer (7,29 Mrayl) unterschieden sich die Werte der akustischen Impedanz statistisch signifikant (t-test, $p=0,007$).

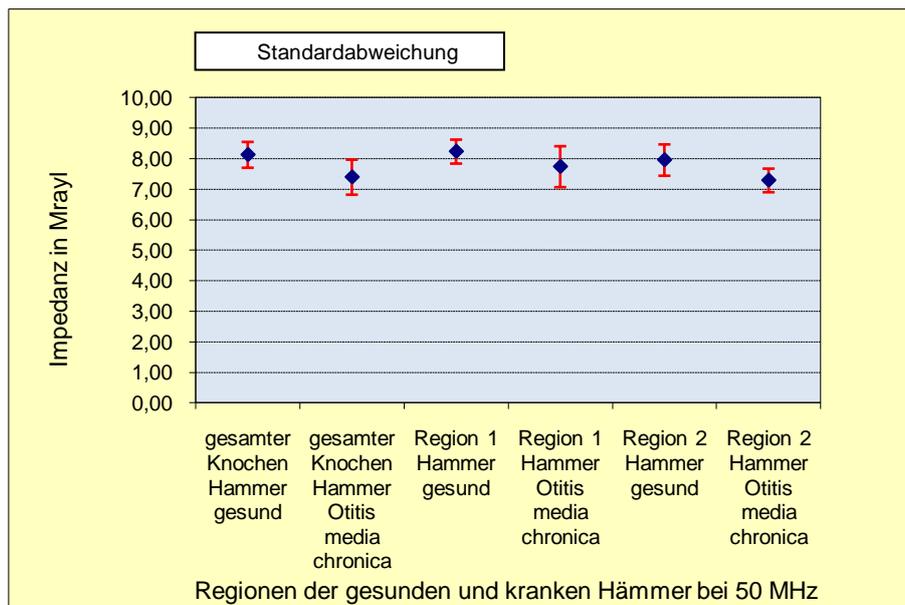


Diagramm 9: Mittlere akustische Impedanz der Regionen der gesunden Hämmer und der Hämmer bei Otitis media chronica mit Standardabweichung bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz

7.3.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica

Es erfolgte ein Vergleich der akustischen Impedanzen der gesamten gesunden und krankhaft veränderten Ambossschnitte, die bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ermittelt wurden. Im Diagramm 10 ist die Verteilung der Impedanzwerte für die verschiedenen Regionen der beiden Stichproben graphisch veranschaulicht. Es bestand kein statistisch

signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte in der Region 1 der gesunden (7,9 Mrayl) und der kranken Ambosse (7,41 Mrayl) (t-test, $p=0,2$). Ebenso unterschieden sich die Impedanzmittelwerte der gesunden Ambosse (7,37 Mrayl) und der kranken Ambosse (7,46 Mrayl) in der Region 2 nicht signifikant (t-test, $p>0,7$). Der Unterschied der akustischen Impedanz über die gesamte Ambossschnittfläche zwischen den gesunden Ambossen (8,00 Mrayl) und den kranken Ambossen (7,45 Mrayl) war statistisch annähernd signifikant (t-test, $p=0,07$).

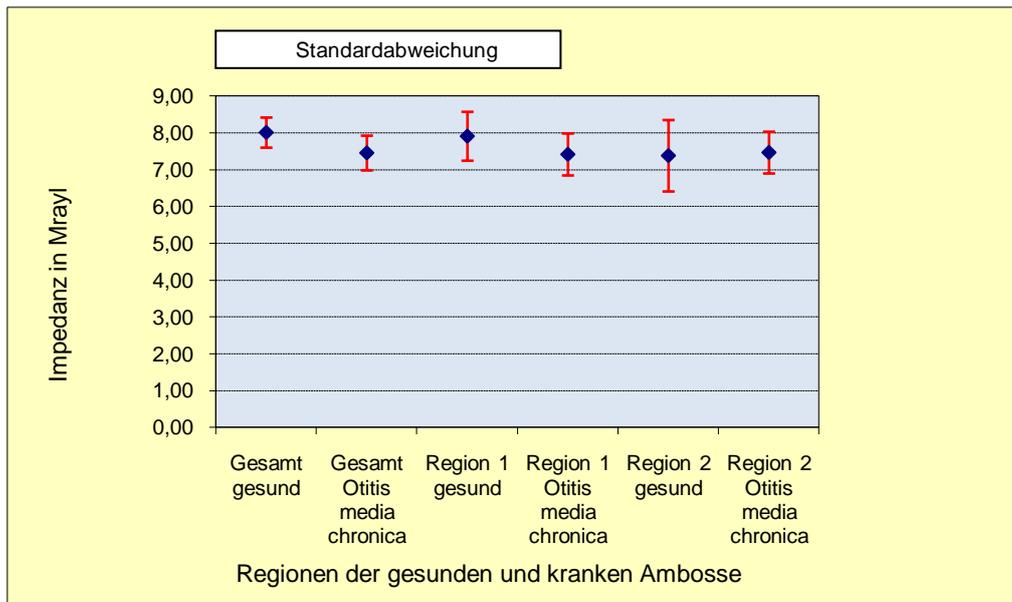


Diagramm 10: Mittlere akustische Impedanz der Regionen von gesunden Ambossen und Ambossen bei Otitis media chronica mit Standardabweichung bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz

7.4 VERGLEICH DER MESSERGEBNISSE MIT DEM KSI SAM2000

7.4.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica

Es wurden die akustischen Impedanzen von allen kranken und gesunden Hämmern verglichen, die bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz bestimmt wurden. Diagramm 11 zeigt die Verteilung der Impedanzwerte für die definierten Regionen der beiden Stichproben. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte über die gesamte Hammerschnittfläche zwischen den gesunden Hämmern (8,27 MRayl) und den kranken (7,83 Mrayl), (t-test, $p=0,33$). Die akustische Impedanz der gesunden Hämmer (8,09 Mrayl) und kranken Hämmer (7,63 Mrayl) in der Region 2 zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied (t-test, $p=0,21$) Die Impedanzmittelwerte in der Region 1 unterschieden sich hingegen statistisch signifikant (8,63 Mrayl bzw. 7,88 Mrayl) (t-test, $p=0,01$).

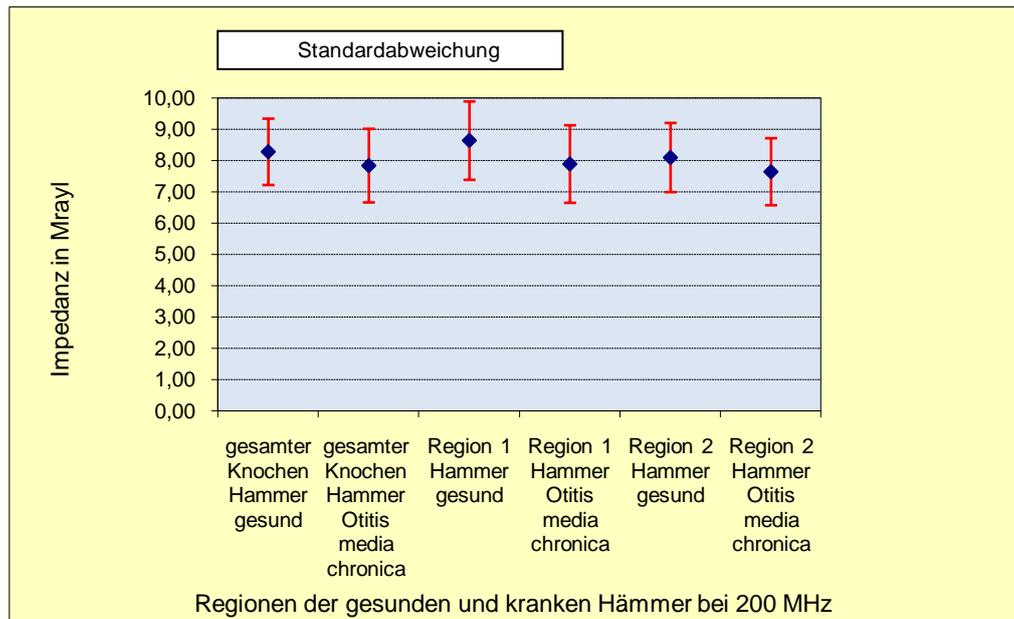


Diagramm 11: Mittlere akustische Impedanz der Regionen von gesunden und krankhaft veränderten Hämmern mit Standardabweichung bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz

7.4.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica

Es erfolgte der Vergleich der, bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz ermittelten, akustischen Impedanzen aller gesunden und kranken Ambossschnitte. Im Diagramm 12 ist die Verteilung der akustischen Impedanz für die verschiedenen Ambossregionen der beiden Stichproben graphisch dargestellt. Es wurde ein annähernd statistisch signifikanter Unterschied der akustischen Impedanz zwischen den gesunden Ambossen (8,37 Mrayl) und kranken Ambossen (7,60 Mrayl) über die gesamte Schnittfläche nachgewiesen (t-test, $p=0,08$). Es unterschieden sich die akustischen Impedanzwerte in der Region 1 der gesunden Ambosse (8,38 Mrayl) und der kranken Ambosse (7,27 Mrayl) statistisch signifikant (t-test, $p<0,05$). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte der gesunden Ambosse (8,35 Mrayl) und der kranken Ambosse (7,27 Mrayl) in der Region 2 bestand nicht (t-test, $p=0,11$).

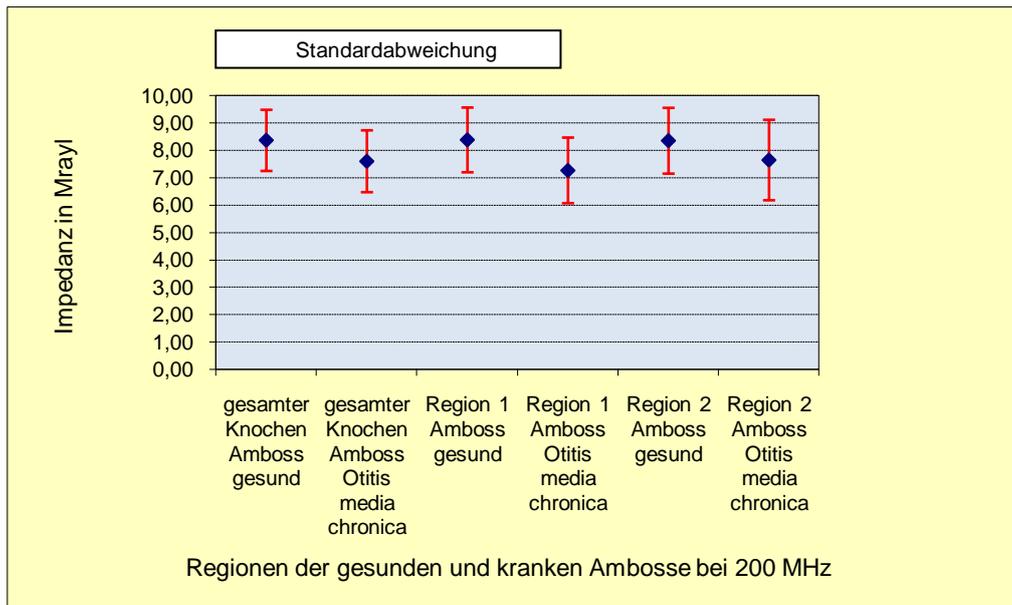


Diagramm 12: Mittlere akustische Impedanz der Regionen von gesunden und krankhaft veränderten Ambossen mit Standardabweichung bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz

7.5 ERGEBNISSE DER AUFLICHTMIKROSKOPIE

Genau wie die Auflichtmikroskopie erlaubt die akustische Rastermikroskopie die optische Darstellung von Gewebsstrukturen ohne Verwendung von Färbetechniken.

7.5.1 Gesunde Hämmer und Hämmer bei Otitis media chronica im Vergleich

Die Abb. 32 zeigt einen gesunden Hammeranschnitt einmal als auflichtmikroskopisches Bild bei 10-facher Vergrößerung und einmal als entsprechendes Ultraschallbild bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz. Die Maßstäbe beider Bilder sind gleich. Der Knochenrand ist glatt und es sind alle charakteristischen Strukturen: Caput, Collum, Manubrium sowie die entsprechenden Fortsätze zu sehen. Im Hammerkopf selbst ist neben Interglobularräumen ein Anschnitt der Markhöhle zu sehen. Die gesamte Binnenstruktur weist keine Inhomogenitäten im Sinne von Destruktionszonen auf. Die Unterscheidung der einzelnen Zonen von Lamellen- und Geflechtknochen sowie die genaue Darstellung der Osteone ist bei den verwendeten Auflösungen nicht möglich.

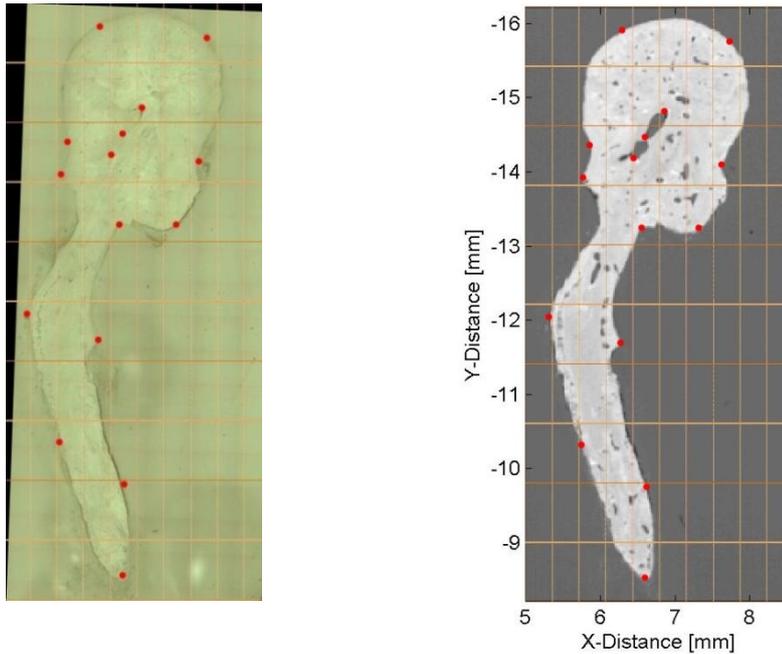


Abb. 32: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 50 MHz (rechts) eines gesunden Hammeranschnitts*

Ein Beispiel eines auflicht- und ultraschallrastermikroskopisch (50 MHz) untersuchten pathologisch veränderten Hammers ist in der Abb. 33 dargestellt. Die Maßstäbe beider Abbildungen sind gleich. In beiden Bildern ist neben der stark zerstörten Knochenstruktur auch die raue und arrodiierte Knochenoberfläche gut zu erkennen. Anatomische Charakteristika, wie Hammerhals oder Hammerfortsätze können nur noch schwer identifiziert werden. Die Darstellung der eigentlichen Cholesteatommatrix gelingt mittels beider Methoden nicht.

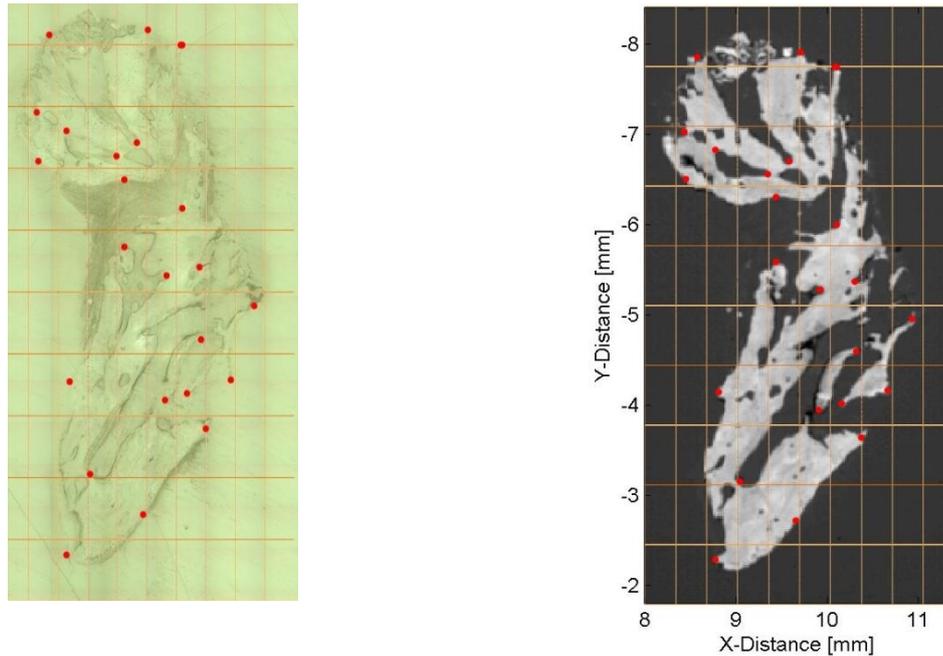


Abb. 33: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 50 MHz (rechts) eines Hammeranschnitts bei Otitis media chronica*

Die auflichtmikroskopische Darstellung des Ausschnittes aus einem gesunden Hammerkopf und das entsprechende Ultraschallrastermikroskopiebild gleichen Maßstabes, aufgenommen bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz, zeigt die Abb. 34. In beiden Bildern ist eine homogene Knochenstruktur ohne Erosionszonen zu sehen. Neben Interglobularräumen werden auch Gefäßanschnitte abgebildet.

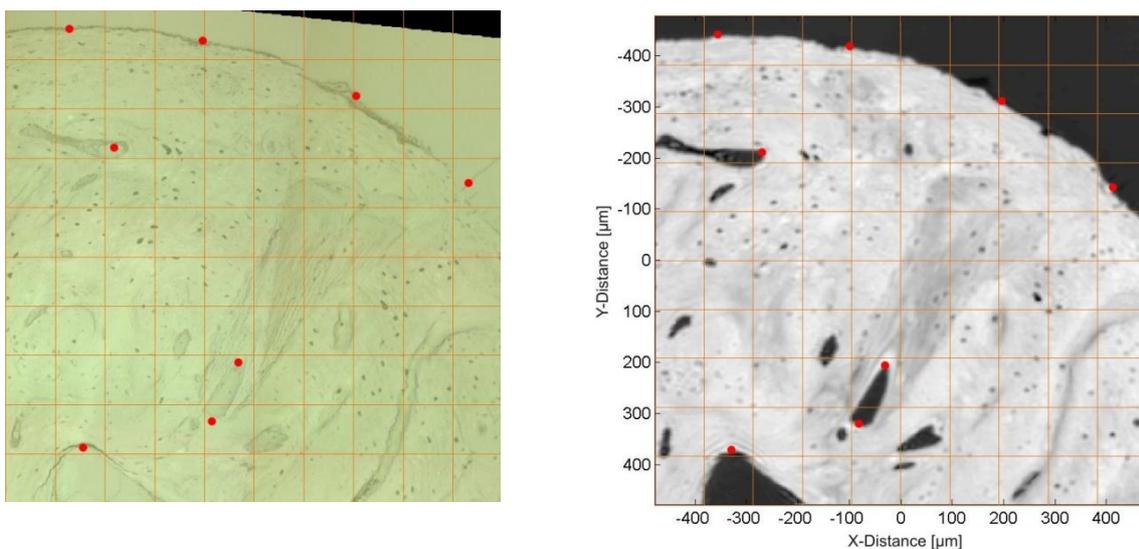


Abb. 34: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 200 MHz (rechts) eines gesunden Hammeranschnitts*

Die in der Abb. 35, bei gleichem Maßstab, zur Darstellung kommenden auflicht- und ultraschallrastermikroskopisch (200 MHz) aufgenommenen Bilder zeigen einen Ausschnitt des Hammers eines Cholesteatompatienten. Beide zeigen eine große Destruktionszone mit völlig aufgelöster Knocheninnenstruktur, Resorptionslakunen und erweiterten Havers'schen Kanälen im Bereich des Hammergriffes, wobei Cholesteatommassen selbst nicht abgebildet werden.

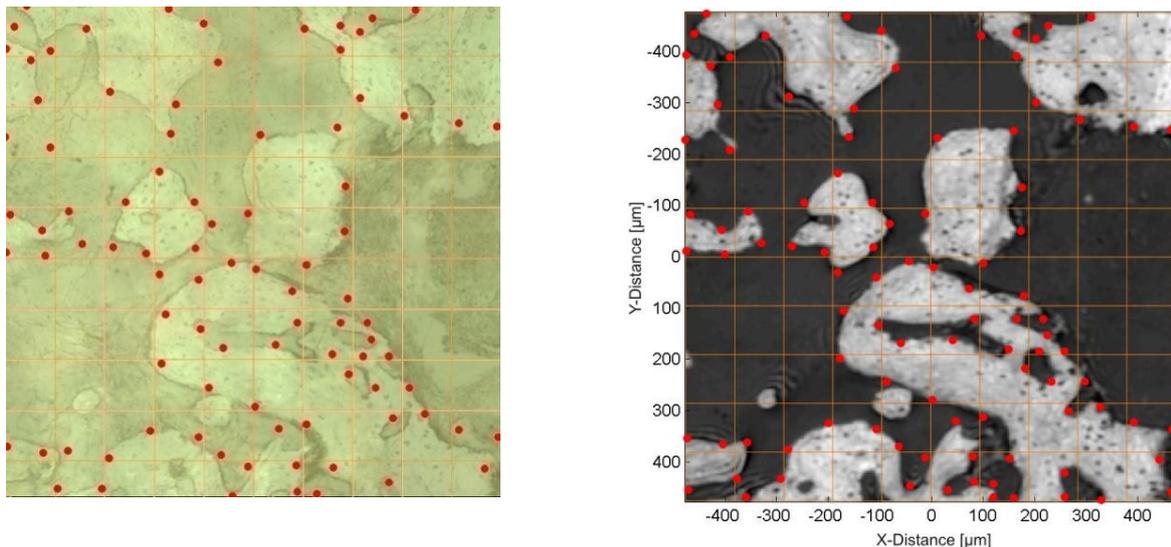


Abb. 35: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 200 MHz (rechts) eines Hammeranschnitts bei Otitis media chronica*

7.5.2 Gesunde Ambosse und Ambosse bei Otitis media chronica im Vergleich

Die Abb. 36 zeigt den gesamten Anschnitt eines gesunden Ambosses: einmal in auflichtmikroskopischer Darstellung bei einer 10-fachen Vergrößerung und einmal in ultraschallrastermikroskopischer Darstellung bei einer Frequenz von 50 MHz. Beide Bilder veranschaulichen den typischen anatomischen Aufbau eines Ambosses mit intakter Knochenoberfläche und homogener Knochentextur bei gleichem Maßstab. Bevorzugt aus Lamellenknochen aufgebaute Bezirke (Crus longum) von überwiegend aus Strahlenknochen bestehenden Regionen (Corpus, Crus breve) zu unterscheiden, gelingt bei beiden Vergrößerungen nicht.

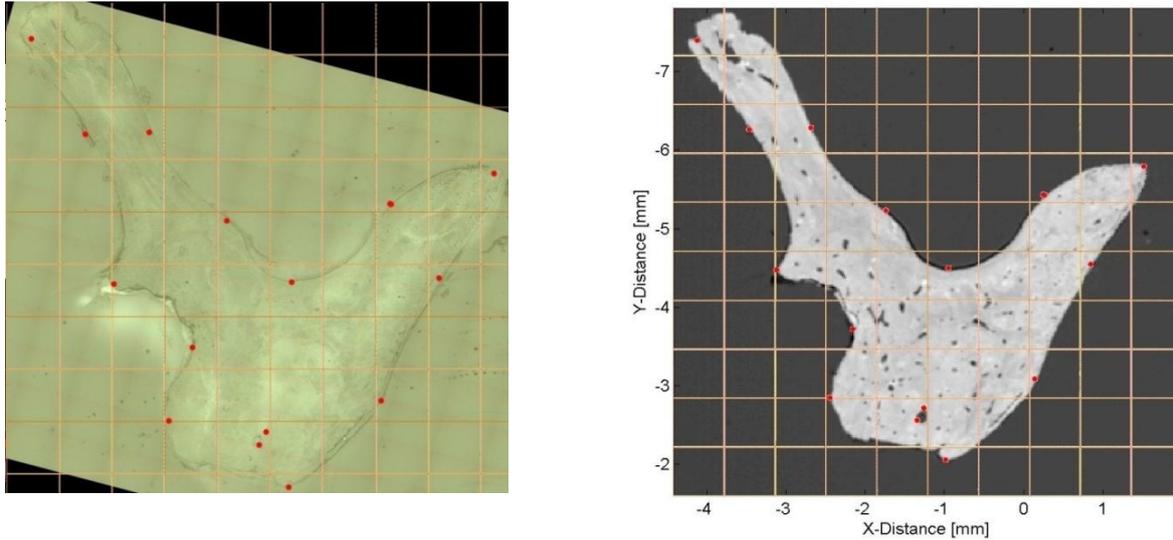


Abb. 36: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 50 MHz (rechts) eines gesunden Ambossanschnitts*

Die Abb. 37 veranschaulicht, dass sowohl auflichtmikroskopisch bei einer 10-fachen Vergrößerung als auch ultraschallmikroskopisch bei 50 MHz die typischen Veränderungen des Ambosses eines Cholesteatompatienten dargestellt werden können. Die Maßstäbe beider Bilder sind gleich. Zu sehen sind mehrere Destruktionszonen und ein arrodierter Knochenrand. Das Crus longum ist verkürzt und das Crus breve kommt überhaupt nicht mehr zur Darstellung. Die typischen Cholesteatomlamellen sind in beiden Abbildungen nicht zu sehen.

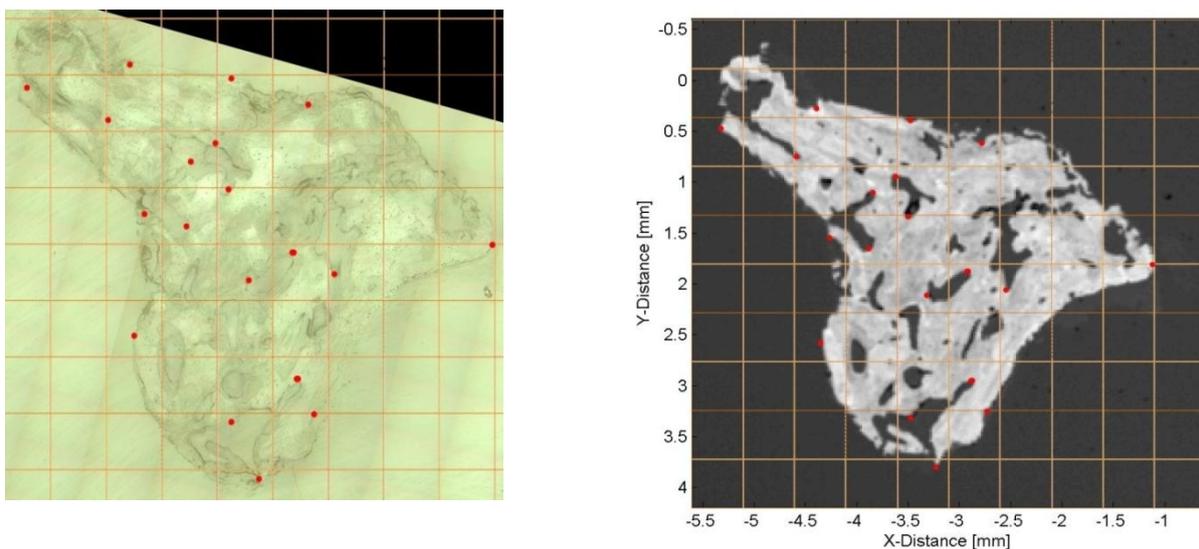


Abb. 37: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 50 MHz (rechts) eines Ambossanschnitts bei Otitis media chronica*

Den typischen auflicht- und ultraschallrastermikroskopischen (200 MHz) Ausschnitt eines gesunden langen Ambossfortsatzes verdeutlicht die Abb. 38. Die Maßstäbe beider Bilder sind gleich. Neben einer intakten Knochenoberfläche ist eine destruktionslose Knochenstruktur mit zahlreichen Gefäßanschnitten und Interglobularräumen zu erkennen.

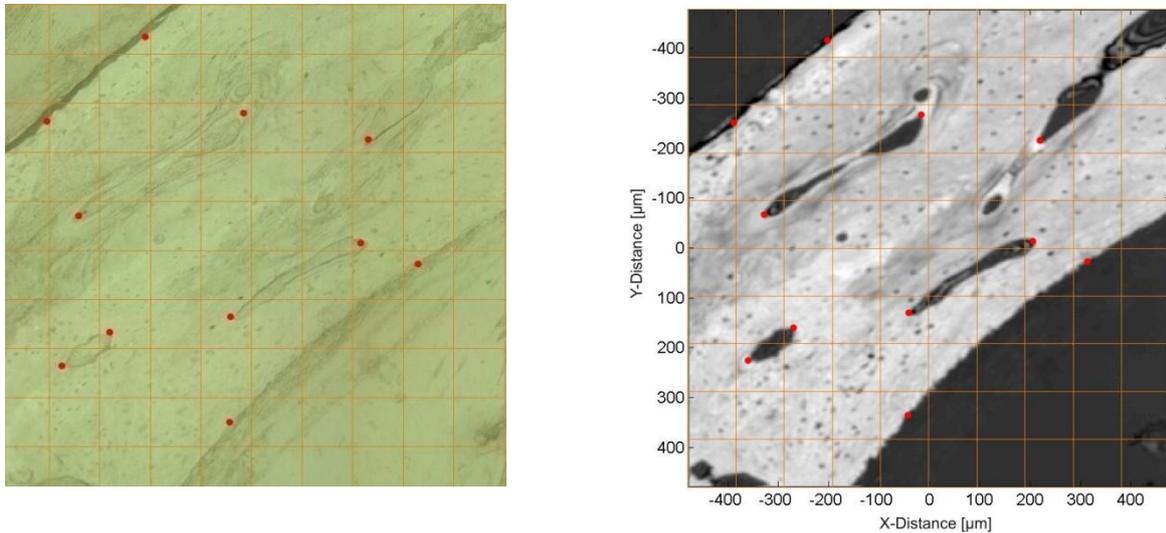


Abb. 38: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 200 MHz (rechts) eines gesunden Ambossanschnitts*

Entsprechend zeigt die Abb. 39 das typische auflicht- und ultraschallmikroskopische (200MHz) Bild eines Ambossauschnittes eines Patienten mit Cholesteatom bei gleichem Maßstab. Das Crus breve ist aufgrund des stark destruierten Knochens und des arrodierten Knochenrandes kaum noch zu erkennen. Es fallen wieder große Resorptionslakunen auf. Cholesteatommatrix kommt mit beiden Methoden nicht zur Darstellung.

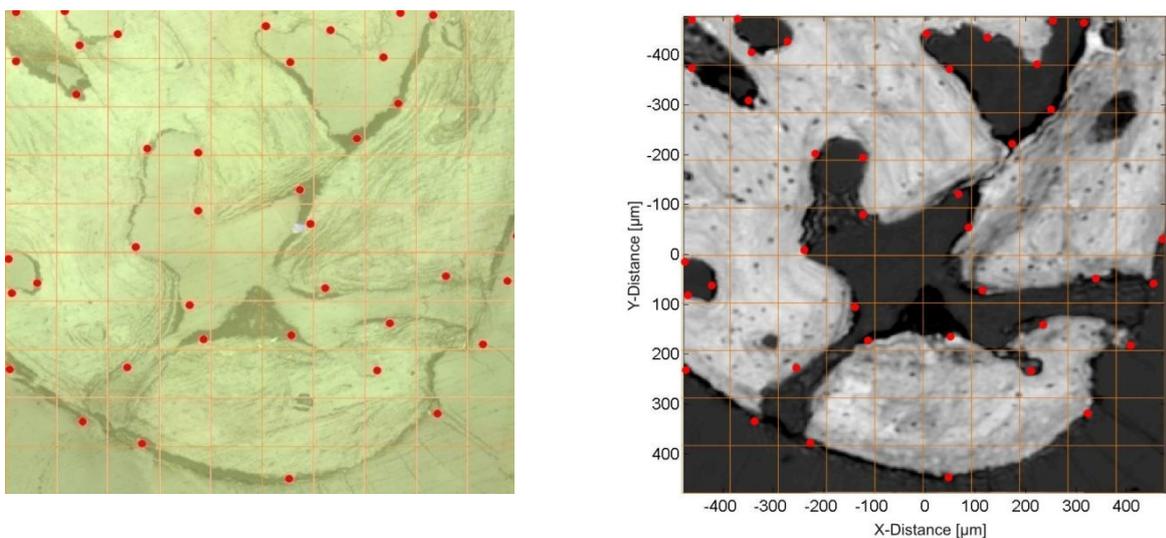


Abb. 39: *Auflichtmikroskopisches Bild (links) und Maximalwertbild bei 200 MHz (rechts) eines Ambossanschnitts bei Otitis media chronica*

8. Diskussion

8.1 EIGENE ERGEBNISSE IM ZUSAMMENHANG

Die Ultraschallrastermikroskopie (Synonym: akustische Rastermikroskopie, englisch: scanning acoustic microscopy, SAM) im Reflexionsmodus zeigte sich in dieser Arbeit als ein geeignetes Verfahren, die akustische Impedanz von Gehörknöchelchen und ihre Änderung bei entzündlichen Vorgängen im Mittelohr quantitativ zu bestimmen. Man unterscheidet niederfrequente (1 – 100 MHz) von mittel- (100 – 400 MHz) und hochfrequenten (400 MHz – 2 GHz) akustischen Mikroskopen. In Abhängigkeit der verwendeten Arbeitsfrequenz gelingt so die Abbildung oberflächlicher und oberflächennaher Strukturen in meso- und mikroskopischen Dimensionen.

Die von Gaihede et al. [24] benutzte Frequenz (25 MHz) und die unter anderem in den eigenen Untersuchungen verwendete Arbeitsfrequenz von 50 MHz erlaubt die Darstellung des gesamten Gehörknöchelchenschnitts und damit einen ersten Eindruck über dessen groben Aufbau. Gudziol [25] gelang es bei einer Frequenz von 900 MHz erstmals auch mikroskopische Strukturen von Gehörknöchelchen, wie Osteone mit dem Verfahren der Ultraschallrastermikroskopie darzustellen. Die Arbeitsfrequenz von 50 MHz eignet sich zur Darstellung mesoskopischer, nicht jedoch mikroskopischer Charakteristika der einzelnen Ossikel. So kommen Fortsätze, Interglobularräume und Markhöhlen gut, Bezirke von Lamellen, Geflecht- oder Strähnenknochen nicht zur Darstellung. Auch die in der eigenen Arbeit benutzte Arbeitsfrequenz von 200 MHz erlaubt noch keine exakte Darstellung mikrozellulärer Strukturen, kommt ihnen aber mittels Abbildung von Gefäßanschnitten, Osteonen und den Lacunae ossea, in welchen sich die Knochenzellen (Osteozyten) befinden, schon sehr nahe.

Erstmalig gelang in dieser Arbeit auch die bildliche Darstellung von entzündlichen Mittelohrprozessen bzw. deren Einfluss auf die Morphologie der knöchernen Strukturen des Mittelohres mittels hochfrequenter Ultraschallwellen. Die Untersuchung wurde neben Ossikeln von Patienten mit chronischer Otitis media mesotympanalis (6) überwiegend an Ossikeln von Patienten mit chronischer Otitis media epitympanalis (26) durchgeführt. Wenn auch Hauptmerkmal der Otitis media chronica epitympanalis, so ist doch bei beiden häufig eine Unterbrechung der Schallleitungskette durch Arrosion der Gehörknöchelchen gemein. Herrscht bei zuletzt genannter Form der Otitis media chronica in der Literatur Einigkeit bezüglich der Pathologie des Knochenabbaus, so stehen entsprechende Forschungen an der mesotympanalen Form der chronischen Otitis media noch aus. Inwieweit der Knochenabbau auch hier bedingt ist, durch die erhöhte biologische Aktivität des entzündlichen Gewebes mit vermehrter Chemotaxis und osteoklastärer Knochendestruktion, bleibt offen. Vereinfachend bezieht sich die Arbeit im Folgenden daher auf die Otitis media

chronica epitympanalis, das Cholesteatom. Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit nur Hämmer und Ambosse, da diese im Vergleich zum Stapes überzufällig häufig vom Knochenabbau betroffen sind und der Steigbügel, wenn möglich, bei Tympanoplastiken zur bessern Schallankopplung im Mittelohr belassen wird. Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz konnten Übersichtsabbildungen der intraoperativ gewonnenen Hämmer und Ambosse erstellt werden. Diese wiesen sowohl äußerlich als auch innerlich Spuren des cholesteatombedingten Knochenabbaus auf. Es zeigte sich, wie schon mittels anderer Untersuchungsverfahren (Rasterelektronenmikroskopie) [5] bestätigt, dass insbesondere die Knochenfortsätze aufgrund ihres geringen Durchmessers, wie Crus longum und breve des Ambosses oder Crus lateralis et anterior mallei, von der Knochendestruktion betroffen sind. Die Arbeitsfrequenz von 200 MHz erlaubte noch keine Einblicke in die destruktiven Veränderungen auf mikrozellulärer Ebene, jedoch gelang hiermit die bildmorphologische Darstellung erweiterter Havers'scher Kanäle und daraus resultierende Aushöhlung der Ossikel. Diese Beobachtung konnte bereits rasterlektronenmikroskopisch [5] gemacht werden und lässt den Schluß zu, dass der Knochenabbau nicht nur in direkter Nähe des Cholesteatom vorkommt, sondern auch perivaskulär in den Markräumen der betroffenen Gehörknöchelchen stattfindet. Da in den vorgenommenen Untersuchungen versucht werden musste, den Einfluss des Einbettungsmediums PMMA auf die Impedanzermittlung weitestgehend zu reduzieren, indem durch eine elektronische Ausschlussmaske nur Signale aus festen Knochenbezirken unter Ausschluss PMMA-gefüllter Zwischenräume mit geringeren Signalintensitäten in die Berechnung der akustischen Impedanz eingingen, gelang sowohl bei 50 MHz als auch bei 200 MHz keine Darstellung von Weichgeweben. Damit ließ sich die Abbildung der charakteristischen Cholesteatomlamellen mit dem SAM-Verfahren nicht realisieren.

Die Schnittbilder von Hammer und Amboss ohrgesunder Patienten wiesen bei einer 50 MHz qualitativ und quantitativ ein inhomogenes Verteilungsmuster der akustischen Impedanz auf. So findet man insbesondere in den Randbezirken von Hammerkopf und Ambosskörper Bereiche höherer Impedanz (akustische Impedanz $>8 \text{ Mrayl}$). Arbeiten von Gudziol 1999 [25] und Gaihede et al. 1997 [24] bestätigen diese Erkenntnisse bei ähnlichen Arbeitsfrequenzen. Es gelang der Arbeitsgruppe um Gaihede 1997 neben den ersten makroskopischen Darstellungen von Gehörknöchelchen auch der Nachweis inhomogen verteilter Impedanzbezirke mittels akustischer Rastermikroskopie bei einer Frequenz von 25 MHz. In der Literatur findet man viele systematische Untersuchungen über die qualitative und quantitative anisotrope Verteilung der akustischen Impedanz in Lamellenknochen [20, 84]. Hingegen gibt es nur wenige Arbeiten zur quali- und quantitativen Bestimmung der akustischen Impedanzverteilung in menschlichen Gehörknöchelchen. Gudziol bewies 1999 [25] in ihrer Arbeit erstmalig, dass auch bei höheren Frequenzen (900 MHz) die

Grauwertstufen und damit indirekt die akustische Impedanz in allen drei Gehörknöchelchen einer inhomogenen Verteilung unterliegen. Gehörknöchelchen bestehen aus unterschiedlichen Gewebearten. Schon Wustrow beschreibt 1954 [44], dass sich unter dem von einer dünnen Schleimhaut überzogenen Periost neben Geflecht-, auch Bezirke von Lamellen- und Strähnenknochen sowie Inseln verkalkter Knorpelreste befinden. In diesem anisotropen Aufbau vermutet man die Ursache für das inhomogene Verteilungsmuster der akustischen Impedanz. In der eigenen Arbeit wiesen die gesunden Hämmer bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz mit 8,13 Mrayl die größte akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die für die gesunden Ambosse bei 50 MHz ermittelte mittlere akustische Impedanz lag mit 8,00 Mrayl knapp darunter. Regionsbezogen fand sich im Hammergriff mit 7,96 Mrayl eine niedrigere akustische Impedanz als im Hammerkopf mit einer Impedanz von 8,23 Mrayl. Corpus und Crus breve des Ambosses wiesen bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz eine mittlere akustische Impedanz von 7,90 Mrayl auf. Mit 7,37 Mrayl hatte der lange Ambossfortsatz eine geringere akustische Impedanz. Diese Unterschiede waren, wie bereits 1999 durch Gudziol festgestellt, statistisch signifikant. Da es in der Literatur an vergleichbaren Werten der akustischen Impedanz von menschlichen Gehörknöchelchen fehlt, können nur Impedanzwerte anderer menschlicher Knochen zum Vergleich herangezogen werden. So fanden Weiss et al. [85] bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ähnliche Impedanzwerte ($7,69 \pm 0,18$ Mrayl) an humanen Femurknochen.

Die akustische Impedanz ist eine von der Arbeitsfrequenz abgängige Größe. An den untersuchten Gehörknöchelchen lagen die bei 50 MHz ermittelten akustischen Impedanzen zwischen 8,00 Mrayl und 8,13 Mrayl. Die mittlere akustische Impedanz, bestimmt bei 200 MHz, indessen bei 8,27 Mrayl bis 8,35 Mrayl. Vorangegangene Studien, wie von Gudziol et al. [25], hingegen zeigten, dass sich bei höheren Arbeitsfrequenzen (900 MHz) kleinere Werte für die akustische Impedanz (3-4 Mrayl) ergeben als bei niedrigeren Frequenzen (25 MHz, 5-7 Mrayl). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund könnte ein, im Vergleich zu den hohen Frequenzunterschieden (25 MHz vs. 900 MHz) bei vorangegangenen Studien [25, 82] nur geringer Frequenzunterschied (50 MHz vs. 200 MHz) in der aktuellen Arbeit sein. Nach Raum et al. [27] existiert vermutlich eine im Knochen verursachte Schalldispersion, welche sich auf hochfrequente Wellen stärker auswirkt als auf Ultraschallwellen niedrigerer Frequenzen. Diese strukturbedingte Dispersion der akustischen Impedanz könnte die im Vergleich um den Faktor 1,5 bis 2 niedrigeren Impedanzwerte bei geringeren Arbeitsfrequenzen erklären. Rho et al. [86] zeigten, dass hochfrequente Schallwellen (400 MHz bis 2 GHz) stärker durch die beugenden mikrostrukturellen Eigenschaften des Knochengewebes beeinflusst werden als mittel- (100 bis 400 MHz) bis niederfrequente (1 bis 100 MHz) Ultraschallwellen, welche eher dem Einfluss der Beugung an groben Gewebekomponenten, wie porösen Einschlüssen,

unterliegen. Daher kann mit nieder- und mittelfrequenter Ultraschall nur in begrenztem Umfang Informationen über den Knochenfeinbau gewonnen und kaum Aussagen zu den Materialeigenschaften auf mikrostruktureller Ebene getroffen werden. Erst mittels einer Untersuchungsfrequenz von 900 MHz ist man in der Lage, die elasto-mechanischen Eigenschaften von Knochengewebe auf Lamellenebene sensitiv zu erfassen.

In der Literatur sind noch keine Untersuchungen mittels Ultraschallmikroskopie an Gehörknöchelchen von Patienten mit chronisch entzündlichen Mittelohrprozessen zu finden. In der eigenen Arbeit gelang es durch Bestimmung der akustischen Impedanz an destruierten Gehörknöchelchen einen Wert für deren Weichheit und der damit verbundenen geringeren mechanischen Stabilität anzugeben. Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz bzw. 200 MHz wiesen die Hämmer der Patienten mit chronischer Otitis media eine mittlere Impedanz von 7,39 bzw. 7,83 Mrayl auf. Die akustische Impedanz war dabei in dem von Destruktion am häufigsten und stärksten betroffenen Hammergriff und den feinen Hammerfortsätzen niedriger (7,29 Mrayl bzw. 7,63 Mrayl) als im Hammerkopf (7,74 Mrayl bzw. 7,88 Mrayl). Statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht. In den Ambossen der Patienten zeigte sich ein ähnliches Impedanzverhalten. Die mittlere akustische Impedanz der Ambosse lag bei 7,45 Mrayl bzw. 7,60 Mrayl (50 MHz bzw. 200 MHz). Dabei waren Impedanzwerte häufig in Regionen wie dem langen Ambossfortsatz zu finden, die erfahrungsgemäß zuerst und am stärksten dem Knochenabbau unterliegen. Ein statistisch signifikanter Unterschied aber bestand zwischen den Regionen 1 und 2 nicht.

In den aktuellen Untersuchungen ließ sich sowohl bei 50 MHz als auch bei höheren Ultraschallfrequenzen (200 MHz) eine statistisch signifikant niedrigere akustische Impedanz in den Schnitten der pathologisch veränderten Hämmer (8,13 Mrayl/ 7,39 Mrayl bzw. 8,27 Mrayl/7,29 Mrayl) und Ambosse (8,00 Mrayl/7,45 Mrayl bzw. 8,37 Mrayl/7,60 Mrayl) verglichen mit den gesunden Proben nachweisen. So konnten niedrigere akustische Impedanzwerte besonders in Regionen hoher Knochenstrukturen, wie an der Ossikeloberfläche und in den Resorptionslakunen, bestimmt werden. Diese Beobachtung unterstützt die allseits anerkannte Theorie, dass im Rahmen des oberflächlichen Knochenabbaus zunächst eine Auflösung der regulären Kollagenstruktur durch Abbau der anorganischen (mineralischen) Knochentextur stattfindet, ehe es zu einer Resorption des organischen Materials (Kollagen) mit Ausbildung von Resorptionslakunen kommt [5, 87, 88]. Auch ließen sich in den erweiterten Havers'schen Kanälen Werte erniedrigter akustischer Impedanz finden. Dies spricht für eine von den Markhöhlen ausgehende perivaskuläre Knochenresorption, was die Vermutung untermauert, dass der Knochenabbau im Cholesteatom durch aus dem Blut stammende Zellen und Entzündungsmediatoren bedingt ist [89]. Ähnliche Beobachtungen machten Grippaudo 1958 und Pollock 1959 [90, 91]. Sie beschrieben Zeichen einer Osteomyelitis in Gehörknöchelchen bei chronischer Otitis media.

Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die lokal veränderten Gewebseigenschaften in den Gebieten der cholesteatombedingten Knochenresorption zu und korrelieren mit Ergebnissen anderer Arbeiten [5, 92]. Die Beobachtungen erniedrigter akustischer Impedanzwerte in Regionen starken Knochenabbaus sprechen gegen die Theorie der reinen Druckatrophie, wie sie von Erdheim (1905) [78] und Grünwald (1910) [79] vertreten wurde und unterstützen die These des osteoklastären Knochenabbaus in Rahmen des inflammatorischen Prozesses [93]. Bislang findet sich in der Literatur kein Maß für den verminderten Mineralisierungsgrad und den sich daraus abzuleitenden Elastizitätsverlust der Ossikel. Nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen ergibt sich durch Bestimmung der akustischen Impedanz an Gehörknöchelchen bei chronischer Otitis media die Möglichkeit, einen objektiven Parameter für die lokal veränderten elastischen Gewebemerkmale zu erhalten. Die in der vorliegenden Arbeit erfassten erniedrigten Impedanzwerte in Ossikeln im Cholesteatom und die Beobachtung, dass insbesondere der lange Ambossfortsatz primär vom Knochenabbauprozess betroffen war, sind bedeutende Hinweise auf einen Verlust der mechanischen Stabilität der Ossikel selbst sowie der Ossikelkette. Hieraus ergibt sich eine wichtige klinische Relevanz, denn die Beobachtungen korrelieren mit der klinischen Erfahrung, dass bedingt durch die verminderte Steifigkeit der Ossikel im Cholesteatom sowie durch die arrodierte Ossikelkette eine optimale Schalleitung nicht mehr gegeben ist. Audiologische Befunde von Patienten mit chronischer Mittelohrentzündung, bei denen insbesondere eine Schalleitungsschwerhörigkeit diagnostiziert wurde, unterstützen diese Ergebnisse.

8.2 VERGLEICH DER ANGEWENDETEN VERFAHREN

Die bildmorphologische Darstellung der meso- und mikroskopischen Veränderungen an Ossikeln im chronischen Entzündungsgeschehen gelang bisher nur an histologischen Schnitten mittels spezieller Färbetechniken oder rasterelektronenmikroskopisch. Um zu zeigen, dass man auch mittels der hochfrequenten Ultraschallrastermikroskopie in der Lage ist, die Morphologie der spezifischen pathologischen Abbauvorgänge darzustellen, wurden in der eigenen Arbeit alle Gehörknöchelchen zunächst auflicht- und später ultraschallrastermikroskopisch untersucht. In der Auflichtmikroskopie entsteht der Bildkontrast durch Wechselwirkung des eingestrahnten Lichts mit dem Objekt. Änderungen der Amplituden, der Phasen oder des Polarisationszustandes des Lichtes nach Wechselwirkung am Objekt werden durch optische Hilfsmittel in wahrnehmbare Amplitudendifferenzen überführt. Es handelt sich also im Wesentlichen um eine Bildentstehung durch Amplitudenkontraste. Im Gegensatz zur Auflichtmikroskopie entsteht das sogenannte Maximalwertbild in der akustischen Rastermikroskopie durch die lokalen Differenzen der Steifigkeit des Objektes.

Jedem Bildpunkt wird entsprechend der lokalen elasto-mechanischen Eigenschaften eine der 64 Graustufen zugewiesen. Somit liefert dieses Verfahren im Unterschied zur Auflichtmikroskopie neben Aussagen über bildmorphologische Charakteristika der lokalen Gewebestrukturen auch Angaben über deren elasto-mechanische Eigenschaften. Unter Anwendung bildverarbeitender Software wurden in der jeweiligen Vergrößerung des auflichtmikroskopischen Bildes sowie dem entsprechenden Ausschnitt des Ultraschallbildes ein Raster definierter Abstände positioniert und charakteristische anatomische Strukturen bzw. typische Resorptionszonen markiert. So konnten diese eindeutig einander zugeordnet werden. Die für den Knochenabbau im Cholesteatom typischen arrodieren Knochenfortsätze kamen sowohl im auflichtmikroskopischen Bild als auch im ultraschallrastermikroskopischen Bild genauso zur Darstellung wie die erweiterten Havers'schen Kanäle und Resorptionslakunen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Ultraschallmikroskopie ein der Lichtmikroskopie gleichwertiges Verfahren zur bildlichen Darstellung von biologischen Gewebeverbänden an der Knochenoberfläche und an oberflächennahen Strukturen ist und zusätzlich die Möglichkeit bietet, Aussagen über deren elasto-mechanische Eigenschaften zu treffen. Durch die Möglichkeit, die akustische Impedanz in definierten Untersuchungsarealen, anatomischen Leitstrukturen oder Knochenab- und -umbauregionen gezielt und systematisch erfassen zu können, erhält man genaue Erkenntnisse über die dortigen elasto-mechanischen Gewebeeigenschaften. Dies ist insbesondere in Regionen pathologisch veränderter Knochentextur interessant.

8.3 METHODIK

Da höherfrequente Schallwellen im Knochengewebe einer zu starken Abschwächung unterliegen und die zur Linse reflektierten Signale aus tiefergelegenen Knochenregionen daher energetisch zu gering sind, um einen verwertbaren elektrischen Spannungsimpuls am ZnO-Wandler zu erzeugen, ist die akustische Rastermikroskopie in Reflexion nicht geeignet, tief unter der Knochenoberfläche befindliche Areale zu untersuchen. Das Phänomen, dass Ultraschall an der Oberfläche von Feststoffen neben den reflektierten Wellenbündeln auch transversal verlaufende Scherwellen, die sogenannten Rayleigh-Wellen, welche das reflektierte Hauptsignal beeinflussen, erzeugt, kann nach Gardner et al. [94] für Messungen an Knochengewebe vernachlässigt werden. Durch die Eigenschaften der in der eigenen Untersuchungsreihe verwendeten Linse wird der kritische Einschallwinkel zur Erzeugung von Rayleigh-Wellen nicht erreicht. In der Literatur werden auch Kompressionswellen beschrieben, welche sich transversal an der Probenoberfläche ausbreiten, sobald ein gewisser kritischer Einschallwinkel überschritten wird. Deshalb wurden die Proben der aktuellen Messreihe nur in Normalrichtung zur Probenoberfläche untersucht. Hierdurch wurde gewährleistet,

dass der genannte kritische Einschallwinkel zur Erzeugung von Kompressionswellen nicht überschritten wurde und diese daher unberücksichtigt bleiben konnten.

Die Untersuchungen erfolgten zum einen an in PMMA eingebetteten postmortal gewonnenen Gehörknöchelchen, welche anamnestisch und dem lichtmikroskopischen Eindruck nach gesund waren. Zum anderen wurden Messungen an intraoperativ erworbenen Ossikeln von Cholesteatom-Patienten nach deren Einbettung in PMMA vorgenommen. Dass die Einbettung in PMMA und die dafür vorher notwendige Entwässerung der Präparate die elastischen Eigenschaften von Geweben und damit die akustische Impedanz verändern bzw. beeinflussen kann, wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen. So konnten Zimmermann et al. an eingebetteten Rinderknochen [95] zeigen, dass die Abwesenheit des interstitiellen Wassers nach Dehydrierung in Alkohol eine Impedanzerhöhung um ca. 5% im Vergleich zu nativen Knochenproben bewirkt. Um den Einfluss von PMMA auf die Bestimmung der akustischen Impedanz zu minimieren, wurden in den eigenen Analysen mittels einer elektronischen Ausschlussmaske die Reflexionssignale aus PMMA-Regionen selektiv erfasst und von den örtlichen $V(z)$ -Signalen digital subtrahiert. Dadurch wurde garantiert, dass nur Signalanteile aus Knochengewebe in die Impedanzermittlung eingingen. Da im PMMA im Vergleich zu Knochen durchschnittlich geringere Impedanzen vorliegen, erbrachte die Verwendung der Ausschlussmaske höhere Signalintensitäten für das selektive Reflexions-signal in Knochenarealen und damit höhere Werte für die akustische Impedanz als in Kombination mit PMMA-Arealen. Die Einbettung der winzigen Gehörknöchelchen in PMMA ist bis zum jetzigen Zeitpunkt leider die einzige Möglichkeit, um die für die hochfrequente Ultraschallrastermikroskopie erforderlichen plan geschliffenen und glatt polierten Probenoberflächen zu erreichen. Ziel muss es daher sein, Präparationsverfahren zu entwickeln, welche Ultraschallmessungen an Gehörknöchelchen in vivo ermöglichen.

In den eigenen Untersuchungen kam zum Ausgleich von Störeinflüssen unter anderem ein vom der Q-Bam-Group erarbeitetes Signalverarbeitungsprogramm (Multi-Layer-Analysis) zur Anwendung. Während des mechanischen Bearbeitungsprozesses lässt sich eine gewisse Oberflächenrauigkeit nicht vollständig vermeiden und eine exakte Planparallelität nicht immer erreichen. So werden harte und weiche Gewebebestandteile stärker bzw. schwächer aus dem Proben-Einbettungsmediumverbund gerissen, was zu Unterschieden im Oberflächenrelief führt. Das Multi-Layer-Verfahren erfasst die Oberflächentopographie und garantiert, dass nur Signalanteile in die Berechnungen eingehen, die bis zu einem Toleranzwinkel von maximal 10% zur Orthogonalen auf die Objektfläche eintreffen. Durch Begrenzung der Bildschirm-Kontrasttiefe auf 64 Grauwertstufen können sehr kleine Ungleichheiten im Probenmaterial nicht als Signalunterschiede des $V(z)$ -Signals wahrgenommen und abgebildet werden. Dies bedingt den falschen Eindruck einer höheren Homogenität der elasto-mechanischen Probeigenschaften. Luftblasen im Kopplungs-

medium führen zu einer Totalreflexion des Strahlenbündels mit der Folge, dass diese nicht mehr zur Signalgebung herangezogen werden. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde in der aktuellen Meßreihe nur bidestilliertes, entgastes Wasser verwendet. Die denkbaren Auswirkungen von Temperaturschwankungen während den Messungen wurden durch Verwendung eines beheizbaren Wassertanks und damit Wasser einer konstanten Temperatur verhindert. Ungenaue Signalamplituden und daraus resultierende verfälschte Impedanzwerte sind bedingt durch Störsignale, welche durch mehrfache Schallwellenreflexion innerhalb der Linse entstehen (Binnenechos), mit dem eigentlichen Probensignal interferieren und diese überlagern.

8.4 KLINISCHE RELEVANZ

Statistisch verwertbare Aussagen über einen möglichen Einfluss des Alters auf die akustische Impedanz der Gehörknöchelchen konnten in den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der geringen Fallzahlen nicht getroffen werden. Ambarda und Ferris [96] stellten in ihren Messungen an kortikalen Rinder- und Schafknochen eine Erhöhung der Steifigkeit des Knochengewebes mit zunehmendem Alter fest. Man erklärt sich diese Abnahme der Elastizität des Knochens durch einen sukzessiven Ersatz der Kollagentextur durch amorphes Gewebe [25]. Ob das Alter einen statistisch signifikanten Einfluss auf die elasto-mechanischen Eigenschaften von Gehörknöchelchen hat, müsste in kommenden Studien untersucht werden.

Basierend auf den vorliegenden *in vitro* Impedanzmessungen an Sektionsfällen ohne otologische Vorerkrankungen und Op-Präparaten von Patienten mit chronischer Mittelohrentzündung richtet sich das Interesse zukünftiger Arbeiten auf Untersuchungen vitaler, *in situ* befindlicher normaler und pathologisch veränderter Gehörknöchelchen. Hierzu wird es erforderlich sein, geeignete Präparationsverfahren zu entwickeln, welche zum einen den Anforderungen der Ultraschallrastermikroskopie gerecht werden und zum anderen die ultraschallrastermikroskopische Darstellung von Hart- und Weichgewebe nebeneinander ermöglichen. So wäre es denkbar, dass künftig auch die für das Cholesteatom typischen Cholesteatomlamellen und die Knochen-Cholesteatom-Grenzzonen mittels der akustischen Rastermikroskopie genauer analysiert werden könnten. Ein Problem der bisherigen Probenpräparation liegt in der durch die mechanische Bearbeitung bevorzugten Abtragung weicher Materialien. Leicht et al. gelang [26] es in ihren Untersuchungen an Operationsresektaten menschlicher Tibiaplateaus Präparationsschritte zu entwickeln, die es erstmalig ermöglichten, Knorpel- und Kochengewebe gemeinsam in einem Präparat und unter *in vivo* Bedingungen mittels niederfrequenter Ultraschallwellen zu untersuchen. Messungen bei höheren Frequenzen scheiterten aber auch hier daran, dass sich die Proben nicht

ausreichend gut präparieren ließen. Das von der orthopädisch orientierten Arbeitsgruppe um Leicht angewendete Präparationsverfahren kann bisher zur Bearbeitung der filigranen Gehörknöchelchen nicht herangezogen werden. Wünschenswert wären daher Weiterentwicklungen auf der Basis der bisher zur Anwendung kommenden in vivo Präparationstechniken.

Elektronenrastermikroskopische Untersuchungen an Ossikeln im Cholesteatom konnten bereits erste Aufschlüsse über die vorherrschenden Knochenabbauvorgänge erbringen. So konnte durch Darstellung von erhöhter Osteoklastenaktivität in Resorptionslakunen die bisherige These des allein auf Druckatrophie beruhenden Knochenabbaus widerlegt werden. Es ist denkbar, dass auch die Ultraschallrastermikroskopie für die Beurteilung der mikrostrukturellen Veränderungen in der an die Cholesteatomlamellen grenzenden Knochenstruktur zu nutzen. Hierzu sind jedoch höhere Arbeitsfrequenzen als in der vorliegenden Arbeit erforderlich, da mittels Frequenzen bis 200 MHz nur die grobe Darstellung von Osteonen, den umgebenden Lamellen und Lacunae osseae gelingt. Osteozyten oder Osteoklasten selbst konnten nicht dargestellt werden. Untersuchungsreihen an gesunden humanen Femura bei 900 MHz [82] konnten zeigen, dass das laterale Auflösungsvermögen des angewendeten akustischen Systems ausreicht, die Mikrostruktur von kortikalem Knochen, einschließlich einzelner Osteonlamellen der Größenordnung von 1-10 µm und Osteozyten abzubilden. Es wäre daher vorstellbar, dass es auch unter Anwendung der höherfrequenten Ultraschallmikroskopie ab 900 MHz durch Abbildung von Osteoklasten und zerstörten Kollagenfibrillen gelingt, den osteoklastären Knochenabbau im Cholesteatom darzustellen und seine Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften der mikroskopischen Aufbaukomponenten der Knochentextur zu untersuchen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der akustischen Rastermikroskopie ist die Untersuchung der Wirkungsweise von Knochenresorptionsinhibitoren auf den osteoklastären Knochenabbau im Cholesteatom. In der Literatur findet man Untersuchungen mit den unterschiedlichsten Substanzen. Ebmeyer [5] und andere Forschungsgruppen [92] untersuchten in ihren Arbeiten die Auswirkung von Zoledronat und Calzitonin auf die Knochenabbauvorgänge in Gehörknöchelchen mit Cholesteatom. Zoledronat, ein Biphosphonat der dritten Generation, bewirkt nachweislich durch Induktion von Apoptose eine Hemmung der Osteoklastengenese und führt sowohl in Zellkulturen als auch in Tiermodellen zu einer signifikant reduzierten Knochenresorption. Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass humanes Calzitonin in vitro eine dosisabhängige direkte Hemmung der Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten bewirkt. Es existieren bereits ausführliche Daten zur Anwendung des Polypeptidhormons Calzitonin im Rahmen der Osteoporosetherapie [97] und die Ergebnisse der elektronenrastermikroskopischen Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Ebmeyer [5] und Aschenbrenner [92] deuten darauf hin, dass die Behandlung

mit Zoledronat und Calcitonin, lokal oder systemisch, einzeln oder auch in Kombination durchaus einen Stellenwert in der adjuvanten Therapie des Cholesteatoms neben der Chirurgie haben könnte. Weiterführende Studien sollten sich mit dieser Möglichkeit auseinandersetzen. Ergebnisse zur Langzeitbehandlung mit Calcitonin oder Zoledronat und insbesondere Aussagen bezüglich möglicher nachhaltiger Auswirkungen auf den gesamten Knochenstoffwechsel und anderer unerwünschter Nebenwirkungen stehen noch aus, so dass die chirurgische Therapie nach wie vor in jedem Fall indiziert ist. Es ist durchaus denkbar, dass die Anwendung der hochfrequenten Ultraschallrastermikroskopie ebenfalls von großer Bedeutung für die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet sein könnte.

In der ohrsanierenden Cholesteatom-Chirurgie werden seit mehr als 30 Jahren neben Prothesen auch autologe Gehörknöchelchen zur Ossikelkettenrekonstruktion verwendet. Dies wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert. Miman et al. [98] führten histopathologische Untersuchungen an Gehörknöchelchen durch, nachdem diese sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch mittels Autoklavverfahren von adhären Cholesteatomgewebe befreit wurden. Hiernach ließen sich an der Gehörknöchelchenoberfläche keine neuen Entzündungsherde oder Cholesteatomlamellen finden, so dass man zu dem Schluß kam, dass die Autoklavierung von autologen Ossikeln vor einer Ossikuloplastik eine verlässliche Methode darstellt. Peng et al. [99] hingegen wiesen 1994 mit immunhistopathologischen Untersuchungen an 149 Gehörknöchelchen von Patienten mit chronischer Mittelohrentzündung nach, dass es nicht nur an der Ossikeloberfläche, sondern auch in seinem Inneren selbst zu entzündungsbedingten Knochenabbauvorgängen kommt und vertreten daher die Meinung, dass äußerlich von Cholesteatommatrix befreite autologe Ossikel nicht zur rekonstruierenden Chirurgie verwendet werden sollten. Diese Ansicht teilen auch Frese et al. [100]. Sie untersuchten autologe Ossikelimplantate, welche im Rahmen von Revisionsoperationen entfernt wurden (durchschnittliche Verweildauer von 12 Jahren), hinsichtlich der Existenz vitaler Zellen, Entzündungszellen und Knochenresorptionszonen. So fanden sie in mehr als der Hälfte der Proben, sogar bei klinisch unauffälligen Ohren, neben einer Lymphozyteninfiltration auch Zeichen des Knochenabbaus. Bis heute gelten die Gehörknöchelchen als cholesteatomfrei, welche aus Sicht des Operateurs keine Cholesteatomlamellen aufweisen und augenscheinlich frei von Knochenarrosion sind. Auch spielten ihre eventuell krankheitsbedingt veränderten elasto-mechanischen Eigenschaften bisher keine Rolle. Interessant wäre hier neben dem bildmorphologischen Nachweis von Resorptionslakunen und erhöhter Osteoklastenaktivität an den für die Kettenrekonstruktion in Betracht kommenden Gehörknöchelchenfragmenten auch die Bestimmung der akustischen Impedanz als Materialparameter zur Wiederherstellung eines optimalen Schallleitungsgefüges. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies jedoch intraoperativ noch nicht praktisch umsetzbar. Hierzu wäre die Entwicklung sehr kleiner hochfrequenter Ultraschallsonden erforderlich und

es müßten Lösungen für eine optimale Schallankopplung gefunden werden.

Es ist vorstellbar, die akustische Rastermikroskopie zur Beurteilung anderer pathologischer Mittelohrprozesse heranzuziehen. Bei der Otosklerose, einer seltenen stadienhaft ablaufenden Erkrankung des Mittel- und auch Innenohres, welche in erster Linie Frauen der weißen Bevölkerung im Alter zwischen 20 und 40 Jahren betrifft, kommt es durch einen otospongiosischen Umbau der knöchernen Labyrinthkapsel zu einer langsam progredienten Schallleitungsschwerhörigkeit und mitunter auch Schallempfindungsschwerhörigkeit. Topographisch gesehen können otosklerotische Umbauherde an jeder Stelle des knöchernen Labyrinths vorkommen. Häufigstes Phänomen ist die sog. Stapesankylose, eine zunehmende Fixierung der Steigbügelfußplatte im ovalen Fenster und eine dadurch bedingte Behinderung der Schallweiterleitung zum Innenohr. Hier vermutet man einen „Locus minoris resistentiae“, da in dieser Region überzufällig häufig hochvaskularisierte otosklerotische Herde zu finden sind [101]. Viele Ursachen wurden diskutiert. So kommen Vererbung, Autoimmunerkrankungen [102], Stoffwechselerkrankungen, eine lokalisierte Osteogenesis imperfecta, eine Infektion (Masern, [103]) oder hormonelle Einflüsse in Frage. Es ist bekannt, dass die phasenweise verlaufenden knöchernen Veränderungen bereits viele Jahre vor Auftreten der klinischen Symptomatik (progredienter Hörverlust, Tinnitus...) beginnen. Helms [104] beschreibt 1994 vier Otosklerose-Stadien und die entsprechenden histologischen Merkmale. Der ursprüngliche Geflechtknochen der Labyrinthkapsel wird durch unreifen Geflechtknochen mit ungeordnet verlaufenden Kollagenfasern ersetzt (Spongiosierung). Hieran schließt sich ein osteoklastärer Abbau des spongiösen Geflechtknochens, welcher durch unregelmäßigen Lamellenknochen ersetzt wird. Interessant wäre hier, ob die knöchernen Umbauprozesse mit einer Änderung der Knöchelchensteifigkeit einhergehen und sich diese in einer Veränderung der akustischen Impedanz des Stapes widerspiegeln lassen. Hierzu sind jedoch zunächst vergleichende Impedanzmessungen an gesunden Steigbügeln und an Steigbügeln, welche bei der Stapedektomie (neben der Stapedotomie bis heute die Methode der ersten Wahl in der Otosklerosechirurgie, entnommen werden) erforderlich.

9. Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle und elasto-mechanische Veränderungen, die durch chronische Entzündungsprozesse des Mittelohres, wie dem Cholesteatom, an den Gehörknöchelchen entstehen, mit der Ultraschallrastermikroskopie zu beschreiben und sie mit anerkannten Verfahren, wie der Auflichtmikroskopie, zu vergleichen.

Die eigenen Untersuchungen konnten zeigen, dass die akustische Rastermikroskopie ein zweckmäßiges Verfahren ist, gesunde und pathologisch veränderte Knochenstrukturen humaner Gehörknöchelchen ohne Anwendung von Färbetechniken bildlich darzustellen. Charakteristische und aus anerkannten Verfahren wie der Lichtmikroskopie bekannte Merkmale der Knochenresorptionsvorgänge im Cholesteatom konnten mit dem angewendeten Ultraschallverfahren qualitativ erfasst werden. Ferner ergibt sich die Möglichkeit, die akustische Impedanz als Kenngröße der lokalen elasto-mechanischen Eigenschaften an der Knochenschnittfläche zu bestimmen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es durch Untersuchungen mit der akustischen Rastermikroskopie möglich ist, objektive und vergleichbare Parameter zu erfassen, die die mechanischen Eigenschaften des Knochenverbundes repräsentieren und damit den bis heute subjektiven Beurteilungen cholesteatombedingter Veränderungen der Ossikel durch den Operateur überlegen sind. Es wäre also denkbar, dass sich das SAM-Verfahren als ein geeignetes Meßverfahren etabliert, wenn aus histologischen Proben (z.B. Biopsien) zusätzlich mechanische Informationen gewonnen und quantifiziert werden sollen. Die Anwendung von hochfrequentem Ultraschall könnte eine objektive Beurteilung der elasto-mechanischen Eigenschaften, der als autologes Prothesenmaterial zur Kettenrekonstruktion dienenden, operativ nicht entfernten Gehörknöchelchenfragmente, erlauben. Hierdurch würde erreicht werden, dass nur Ossikelreste zur Rekonstruktion verwendet werden, welche sowohl bezüglich ihrer strukturellen als auch bezüglich ihrer elasto-mechanischen Eigenschaften als cholesteatomfrei eingestuft werden.

Es ist außerdem denkbar, dass die ermittelten akustischen Impedanzen als Materialparameter zur Weiterentwicklung bestehender und Entwicklung neuer optimaler Prothesen für die rekonstruktive Mittelohrchirurgie herangezogen werden können.

In künftigen Studien könnte die akustische Rastermikroskopie zur Beurteilung anderer pathologischer Mittelohrprozesse genutzt werden. So kommt es bei der Otosklerose ebenfalls zu morphologischen und funktionellen Veränderungen an der Ossikelkette. Die Bestimmung lokaler Elastizitätsunterschiede im Vergleich zu gesundem Knochengewebe könnte Aufschluss über die mechanischen Veränderungen des Gewebeverbundes und der mikroskopischen Knochenkomponenten infolge des otosklerotischen Umbauprozesses geben.

10. Zusammenfassung

Unter Verwendung nieder-, mittel- und hochfrequenter fokussierter, gepulster Ultraschallwellen im Reflexionsmodus ermöglicht das hochauflösende Verfahren der Scanning Acoustic Microscopy die bildliche Darstellung von Gehörknöchelchengewebe ohne Einsatz von Färbetechniken. Darüber hinaus gelingt durch Berechnung akustischer Meßgrößen (akustische Impedanz) an humanen Gehörknöchelchen die Ableitung lokaler elasto-mechanischer Materialparameter. Die Anwendung hochfrequenter Schallwellen bedingt eine hohe Schalldämpfung, so dass ausschließlich Aussagen über die elastischen Merkmale an der Probenschnittfläche und in oberflächennahen Regionen getroffen werden können.

Wichtige Voraussetzung für die Messungen an den akustischen Rastermikroskopen SAM200Ex und KSI SAM2000 der Firma Krämer Scientific Instruments (Herborn, Deutschland) war die Herstellung glatter und planparalleler Probenoberflächen. Dazu wurden die Gehörknöchelchen der vorliegenden Untersuchungsreihen nach Einbettung in PMMA geschliffen und anschließend mit Diamantpaste der Körnungen 1 μm und 0,25 μm poliert. Die für die hochauflösenden Mikroskope zur Verfügung stehende Multi-Layer-Analyse erlaubt durch Berücksichtigung topographischer Einflüsse bei den Messungen auch eine quantitative Auswertung der akustischen Impedanz an leichtgradig geneigten oder rauhen Oberflächen.

Bedingt durch die Schallfeldparameter der zur Anwendung kommenden Ultraschallwandler (50 MHz und 200 MHz), ließen sich in den eigenen Untersuchungsreihen Aussagen über die mechanischen Eigenschaften des Knochenverbundes treffen. Die Ableitung der elastischen Eigenschaften der mikroskopischen Gewebekomponenten (Osteone, Lamellen) gelingt bei den angewandten Arbeitsfrequenzen nicht.

In den Schnittbildern von Hammer und Amboss ohrgesunder Patienten ließ sich bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ein inhomogenes Verteilungsmuster der akustischen Impedanz, bedingt durch den anisotropen Aufbau des Knochengewebes, feststellen. So findet man insbesondere in den Randbezirken von Hammerkopf und Ambosskörper Bereiche höherer Impedanz (>8 Mrayl). Diese Erkenntnisse bestätigen die Untersuchungsergebnisse von Gudziol 1999 [25] und Gaihede et al. 1997 [24] bei ähnlichen Arbeitsfrequenzen. Von den gesunden Gehörknöchelchen wiesen die mit 50 MHz untersuchten Ambosse mit 8,00 Mrayl die niedrigste akustische Impedanz auf. Die akustische Impedanz der untersuchten Hämmer lag mit 8,13 Mrayl knapp darüber. Im Hammergriff war mit 7,98 Mrayl eine niedrigere akustische Impedanz als im Hammerkopf (8,23 Mrayl) zu beobachten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Mit 7,37 Mrayl hatte der lange Ambossfortsatz bei 50 MHz eine statistisch signifikant geringere akustische Impedanz als Corpus und Crus breve mit

Impedanzwerten von 7,90 Mrayl. Die bei 200 MHz an den gesunden Ossikeln bestimmten akustischen Impedanzen lagen zwischen 8,27 Mrayl (Hämmer) und 8,35 Mrayl (Ambosse). Hier ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied für die ermittelten Impedanzwerte in den einzelnen Regionen feststellen.

Die Schnittbilder der pathologisch veränderten Hämmer (8,13 Mrayl/ 7,39 Mrayl bzw. 8,27 Mrayl/7,83 Mrayl) und Ambosse (8,00 Mrayl/7,45 Mrayl bzw. 8,37 Mrayl/7,60 Mrayl) zeigten, verglichen mit den gesunden Proben sowohl bei 50 MHz als auch bei 200 MHz eine annähernd statistisch signifikant niedrigere akustische Impedanz über die gesamte Ossikelschnittfläche. Des Weiteren ließ sich eine signifikant geringere akustische Impedanz in der Region 1 der Gehörknöchelchen feststellen. Eine aufschlussreiche Beobachtung war, dass speziell in Regionen hoher Knochendestruktion Werte niedrigerer Impedanz zu bestimmen waren. So konnten niedrigere akustische Impedanzwerte besonders in dem am häufigsten vom Knochenabbau betroffenen langen Ambossfortsatz sowie an der Ossikeloberfläche und in den Resorptionslakunen festgestellt werden. Damit gelang es in der eigenen Arbeit, einen akustischen Parameter anzugeben, mit dem sich eine verminderte Knöchelchensteifigkeit der Ossikel bei chronischer Otitis media ableiten lässt. Denkbar wäre es, die akustische Impedanz bzw. ihre Änderung als mikrostrukturellen Krankheitsindikator bei chronischen Mittelohrentzündungen heranzuziehen.

Künftig sind weiterführende Analysen an einem umfangreicheren Patientenkollektiv notwendig, um die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu validieren. Die Erkenntnisse der eigenen Untersuchungen zeigen das besondere Vermögen der hochauflösenden Ultraschalltechnologie zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung pathologischer Knochenumbauprozesse an Gehörknöchelchen von Patienten mit chronischen Mittelohrentzündungen auf.

11. Literaturverzeichnis

1. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H: Etiopathogenesis of cholesteatoma. *J Otorhinolaryngol* 261 (2004) 6-24.
2. Kazahaya K, Potsic W P: Congenital cholesteatoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12 (2004) 398-403.
3. Sudhoff H, Tos M: Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support of combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol* 21 (2000) 786-792.
4. Naim R, Linthicum FH, Jr: External auditory canal cholesteatoma. *Otology & Neurotology* 25 (2004) 412-413.
5. Ebmeyer J: Untersuchungen zum osteoklastären Knochenabbau im Cholesteatom. Dissertation (2002) Ruhr-Universität Bochum.
6. Atef A, Ayad EE: Ciliray count in chronic suppurative otitis media: comparative quantitative study between mucosal and squamous types using scanning electron microscopy and image analysis. *The Journal of Laryngology and Otology* 118 (2004) 343-347.
7. Krestan C, Czerny C, Gstöttner W, Franz P: CT und MRT des erworbenen Cholesteatoms: Prä- und postoperative Bildgebung. *Der Radiologe* 43 (2003) 207-212.
8. Williams MT, Ayache D, Alberti C, Héran F, Lafitte F, Elmaleh-Bergès M, Piekarski J-D: Detection of postoperative residual cholesteatoma with delayed contrast-enhanced MR imaging: initial findings. *Eur Radiol* 13 (2003) 169-174.
9. Holly A, Sittinger M, Bujia J: Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252 (1995) 366-369.
10. Adamczyk M, Sudhoff H, Jahnke K: Immunohistochemical investigations on external auditory canal cholesteatomas. *Otology & Neurotology* 24 (2003) 705-708.
11. Jung JY, Chole RA: Bone resorption in chronic otitis media: the role of osteoclast. *J Otorhinolaryngol* 64 (2002) 95-107.
12. Nair S, Watts S, Flood L: Fibroblast growth factor receptor expression in aural polyps: predictor of cholesteatoma?. *The Journal of Laryngology & Otology* 118 (2004) 338-342.
13. Kolosov OV, Levin VM, Maev RG: The use of acoustic microscopy for histological tissue characterization. *Ultrasound Med Biol* 13 (1987) 477-483.
14. Weiner S, Wagner HD: The material bone: structure-mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28 (1998) 271-298.

15. Bereiter-Hahn J, Karl I, Luers H et al.: Mechanical basis of cell shape: investigations with scanning acoustic microscope. *Biochem Cell Biol* 73 (1995) 337-348.
16. Bereiter-Hahn K: Scanning acoustic microscopy visualizes cytomechanical response to cytochalasin. *J Microsc* 146 (1987) 29-39.
17. Daft CM, Briggs GD: The elastic microstructure of various tissues. *Acoust Soc Am* 85 (1989) 416-422.
18. Pidaparti RMV, Chandran A, Takano Y, Turner CH: Bone mineral lies mainly outside collagen fibres: predictions of composite model for osteonal bone. *J Biomechanics* 29 (1996) 909-916.
19. Rietbergen B, Odgaard A, Kabel J, Huiskes R: Relationship between bone morphology and bone elastic properties can be accurately quantified using high-resolution constructions. *J Orthopaedic Research* 16 (1998) 23-28.
20. Turner CH, Chandran A, Pidaparti RMV: The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications. *Bone* 17 (1995) 85-89.
21. Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB: Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy. *Bone* 16 (1995) 85-90.
22. Sajio Y, Sasaki H, Okawai H: Acoustic properties of atherosclerotic of human aorta obtained with high-frequency ultrasound. *Ultrasound in Med and Biol* 24 (1998) 1061-1064.
23. Sajio Y, Tanaka M, Okawai H: The ultrasonic properties of gastric cancer tissues obtained with scanning acoustic microscopy system. *Ultrasound in Med and Biol* 17 (1991) 709-714.
24. Gaihede M, Joergensen C: Scanning acoustic microscopy of the middle ear ossicles. *UniMedia Dresden* (1996) 111-113.
25. Gudziol S: Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher Gehörknöchelchen. Dissertation (2001) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
26. Leicht S: Untersuchung mechanischer Parameter der degenerativen Veränderungen an Knorpel und subchondralem Knochen bei primärer Gonarthrose mit hochfrequenten Ultraschalltechniken. Dissertation (2007) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
27. Raum K, Brandt J, Klemenz A, Cobet U: Quantitative Ultraschallmikroskopie zur Bestimmung der akustischen Impedanz von kortikalem Knochengewebe. *Z Med Phys* 9 (1999) 246-253.

28. Sasaki H, Sajio Y, Tanaka M: Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy. *Nephrol Dial Transplant* 12 (1997) 2151-2154.
29. Sajio Y, Takana M, Okawai H: Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 23 (1997) 77-85.
30. Turner CH, Rho J, Takano Y, Tsui TY, Pharr GM: The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *Journal of Biomechanics* 32 (1999) 437-441.
31. Amprino A: Investigations in some mechanical properties of bone tissue. *Acta Anatomica* 34 (1958) 161-186.
32. Kwan Ng S, Yip WWL, Suen M, Abdullah VJ, van Hasselt CA: Autograft ossiculoplasty in cholesteatoma surgery: is it feasible? *The Laryngoscope* 113 (2003) 843-847.
33. Probst R: Anatomie und Physiologie des Ohres. In: Probst R, Grevers G, Iro H (Hrsg.): *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Thieme, Stuttgart, New York, 2008, S. 144-153.
34. Berghaus A, Böhme G, Pirsing W, Rettinger G: Ohr. In: Bob A, Bob K (Reihen-Hrsg.): *MLP-Duale Reihe Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Kap.1.2, Hippokrates, Stuttgart, 1996, S.27-28.
35. Hüttenbrink KB, Pfautsch M: Die Gelenke der Gehörknöchelchen im rasterelektronenmikroskopischen Bild. *Laryngol Rhinol Otol* 66 (1987) 176-179.
36. Koch T: Hör- und Gleichgewichtsorgan. In: Koch T, Berg R (Hrsg.): *Lehrbuch der Veterinäranatomie*, Fischer, Jena, 1993, S. 541-545.
37. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H-J, Kühnel W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E: Ohr, Hör- und Gleichgewichtsorgan. In: Schiebler T H, Schmidt W, Zilles K (Hrsg.): *Anatomie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 709.
38. Hüttenbrink KB: Ein Vergleich der Morphologie von Säugetier- und Vogelgehörknöchelchen und Überlegungen zur asymmetrischen Form des menschlichen Steigbügels. *Laryngorhinootologie* 75 (1996) 123-128.
39. Thorn L: Ohr. In: Helms J (Hrsg.): *Topographische Anatomie des Ohres*, Band 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994.
40. Fleischer G: Studien am Skelett des Gehörgangs der Säugetiere einschließlich des Menschen. *Säugetierkd Mitt.* 21 (1993) 131-239.
41. Sobotta J: Ohr, Auris. In: Putz R, Pabst R (Hrsg.): *Sobotta-Atlas der Anatomie des Menschen-Kopf, Hals, obere Extremität*, Band 1, 20. Aufl, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1993, S. 370.

42. Boenninghaus H-G, Lenarz T: Mittelohr. In: Boenninghaus H-G, Lenarz T (Hrsg.): Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten. 9. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1993, S. 7-16.
43. Benninghoff A, Drenckhahn D: Mittelohr. In: Drenckhahn D (Hrsg.): Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2, 16. Aufl., Kap. 13.2.3., Urban und Fischer, München, Wien, Baltimore, 2004, S. 714-721.
44. Wustrow F: Über den Knochenfeinbau in Hammer und Amboss. *Z Laryngol Rhinol Otol* 33 (1954) 206-223.
45. Linss W: Binde- und Stützgewebe. In: Linss W, Fanghänel J (Hrsg.): Histologie. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 1999, S. 61-66.
46. Hörmann T-ChA: Untersuchungen zur Verbindung zwischen Crus longum incudis und Processus lenticularis an den Gehörknöchelchen von Haussäugetieren. Dissertation (2006) Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
47. Hüttenbrink KB: Untersuchungen über die Festigkeit und knöcherne Struktur konservierter Gehörknöchelchen. *Laryngol Rhinol Otol* 67 (1988) 506-512.
48. Tonin M: Histologische und morphometrische Untersuchung der Gehörknöchelchen. Dissertation (1987) Universität Hamburg.
49. Oesterle F: Über den Feinbau der Gehörknöchelchen und seiner Entstehung. Dissertation (1932) Universität Würzburg.
50. König H, Liebig H: Gleichgewichts- und Gehörorgan. In: König H, Liebig H (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere. Schattauer, Stuttgart, 1999, S. 315-317.
51. Berghaus A, Böhme G, Pirsing W, Rettinger G: Mittelohrerkrankungen. In: Bob A, Bob K (Reihen-Hrsg.): MLP-Duale Reihe Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Kap. 6.5.8, Kap. 6.6, Hippokrates, Stuttgart, 1996, S. 140-147.
52. Boenninghaus H-G, Lenarz T: Chronische Otitis media. In: Boenninghaus H-G, Lenarz T (Hrsg.): Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten. 9. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New, 1993, S. 116-126.
53. Probst R: Mittelohr, Otitis media. In: Probst R, Grevers G, Iro H (Hrsg.): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Thieme, Stuttgart, New York, 2008, S. 208-229.
54. Schwarz M: Entstehungs- und Verlaufsformen des Mittelohrcholesteatoms. Einteilung und Nomenklatur. *Laryngorhinootologie* 21 (1962) 518-528.
55. Müller J: Über den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste. Reimer, Berlin, 1838, S. 50.
56. Cruveilhier J: Anatomie pathologique du corps humain. Baillière Vol 1 und 2, Paris, 1829.

-
57. DuVerney J G: Tractatus de organo auditus, continens structuram usum et morbos omnium auris partium. AE Normberg, 1684.
 58. Tos M: Manual of middle ear surgery. Thieme, Stuttgart, New York, 1993.
 59. Tran B, Huy P, Aisenberg N: Cholesteatoma and cholesteatomas. Kugler (1999) 19-35.
 60. Steinbach E: Pathogenese des Cholesteatoms. HNO 43 (1995) 1-2.
 61. Grundfast KM, Ahuja GS, Pariesier SC: Delayed diagnosis and fate of congenital cholesteatoma (keratoma). Arch Otolaryngol Head Neck Surgery 121 (1995) 903-907.
 62. Derlaki EL, Clemis D: Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. Otol Rhinol Laryngol 74 (1965) 706-727.
 63. Aimi K: Role of the tympanic ring in the pathogenesis of congenital cholesteatoma. Laryngoscope 93 (1983) 1140-1146.
 64. Northrop C, Piza J, Eavey RD: Histological observations of amniotic fluid cellular content in the ear of neonates and infants. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 11 (1986) 113-127.
 65. Otto HD, Gerhardt HJ: Kongenitale Epidermoide des Schläfenbeins. HNO 38 (1990) 43-49.
 66. Sadé J, Babiacki A, Pinkus G: The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. Arch Otolaryngol 96 (1983) 119-129.
 67. Michaels L: An epidermoid formation in the developing middle ear: possible source of cholesteatoma. J Otolaryngol 15 (1986) 169-174.
 68. Habermann J: Zur Entstehung des Cholesteatoms des Mittelohres. Arch Ohrenheilkd 27 (1888) 43-51.
 69. Rauchfuss A: Die myxomatösen Reste im menschlichen Mittelohr. Laryngorhinootologie 64 (1985) 441-445.
 70. Wendt H: Desquamative Entzündung des Mittelohres ("Cholesteatom des Felsenbeins"). Arch Ohr Nasen Kehlkopfheilkd 14 (1873) 428-446.
 71. Ruedi L: Pathogenesis and surgical treatment of the middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol Suppl 361 (1979) 1-45.
 72. Ruedi L: Pathogenesis and treatment of cholesteatoma of the middle ear. Praxis 57 (1968) 106-111.
 73. Sudhoff H, Hildmann H: Gegenwärtige Theorien zur Cholesteatomentstehung. HNO 51 (2003) 71-83.

74. Stark T, Sudhoff H, Fisseler-Eckhoff A et al.: Alterations of basement membrane in middle ear cholesteatoma. proceedings of the fifth international conference on cholesteatoma and mastoid surgery. M Sanna, Cic Edizioni Internazionali, Rome, 1997, S. 238-247.
75. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales A et al.: Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol* 21 (2000) 793-798.
76. Chole RA: Cellular and subcellular events of bone resorption in human and experimental cholesteatoma: the role of osteoclasts. *Laryngoscope* 94 (1984) 76-95.
77. Chole RA: Osteoclasts in chronic otitis media, cholesteatoma and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 97 (1988) 661-666.
78. Erdheim J: Über Schädelcholesteatome. *Z. Ohrenheilk.* 49 (1905) 281 – 298.
79. Grünwald L: Ein Fall von Dermoid der Mittelohrräume und seine Bedeutung für die Cholesteatomfrage. *Z. Ohrenheilkunde* 60 (1910) 270 –279.
80. Bonorden SW: Erste Mitteilung über Oberflächen- und Tiefenstrukturuntersuchungen an menschlichem Knochengewebe mit Hilfe der Raster-Scan-Akusto-Mikroskopie (R-SAM); Ein Vergleich zwischen licht- und ultraschallmikroskopischer Darstellung. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 11 (1987) 102-107.
81. Briggs A: An Introduction to Scanning Acoustic Mikroskopy. *Microscopy Handbooks* 12. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1995.
82. Smitmann F: Zur Bestimmung akusto-elastischer Eigenschaften von humanem, kortikalem Knochengewebe mit der akustischen Rastermikroskopie. Dissertation (2002) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
83. Meav RG, Levin VM: Principles of local sound velocity and attenuation measurements using transmission acoustic microscope. *IEEE Transactions on ultrasonics ferroelectrics and frequency control* 44 (1997) 1124-1231.
84. Hunt KD, Dean O`Loughlin V, Fitting DW, Adler L: Ultrasonic determination of the elastic modulus of human cortical bone. *Medical and Biological Engineering and Computing* 36 (1998) 51-56.
85. Weiss S, Zimmermann MC, Harten RD, Alberta FG, Meunier A: The acoustic and structural properties of the human femur. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME* 120 (1) (1998) 71-76.
86. Rho JY: An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone. *Ultrasonics* 34 (8) (1996) 777-783.
87. Uno Y, Saito R: Bone resorption in human cholesteatoma: morphological study with scanning electron microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104 (1995) 463-468.

88. Wong J, Stoney P, Hawke M: Ossicular erosion by cholesteatoma: investigation by scanning electron microscopy utilizing a new preparation technique. *J Otolaryngol* 20 (1991) 216-221.
89. Schilling V, Negri B, Bujía J, Schulz P, Kastenbauer E: Possible Role of Interleukin 1 alpha and Interleukin 1 beta in the pathogenesis of cholesteatoma of middle ear. *Am J Otol* 13 (1992) 350-355.
90. Grippaudo M: Histopathological studies of the ossicles in chronic otitis media. *J. Laryngol. Otol.* 72 (1958) 177 – 189.
91. Pollock FJ: Pathology of chronic otitis media. *Arch. Otolaryngol.* 70 (1959) 421-435.
92. Aschenbrenner J: Untersuchungen zum osteoklastären Knochenabbau und dessen medikamentöser Inhibition (Zoledronat) im Tiermodell. Dissertation (2008) Ruhr-Universität Bochum.
93. Ufuk G: Immunhistochemische Untersuchungen zum Knochenabbau im Rahmen der epitympanalen Otitis media. Dissertation (2001) Ruhr-Universität Bochum.
94. Gardner TN, Elliott JC, Sklar Z, Briggs AD: Acoustic microscope study of the elastic properties of fluorapatite and hydroxyapatite, tooth enamel and bone. *J Biomechanics* 25 (1992) 1265-1277.
95. Zimmermann MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H: The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (8) (1994) 931-938.
96. Ambarda A, Ferris CD: Compact anisotropic bone: Elastic constants, in vitro aging effects and numerical results of a mathematical model. *Acta biol Acad Sci Hung* 29 (1) (1978) 81-94.
97. Weber K, Hoffmann A, Leb G: Therapy of osteoporosis: strategies for individualized treatment. *Wien Med Wochenschr* 149 (1999) 489-492.
98. Miman MC, Aydin NE, Oncel S, Ozturan O, Erdem T: Autoclaving the ossicles provides safe autocrasts in cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx* 29 (2) (2002) 133-139.
99. Peng JC, Hoppe F: (1994): Ist die Wiederverwertung autologer Gehörknöchelchen beim Cholesteatom oder der chronischen Schleimhauteiterung gerechtfertigt? *Laryngol. Otol.* 73(7) (1994) 375-380.
100. Frese KA, Hoppe F: Morphologic studies of autologous and homologous ossicles after long-term implantation. *Laryngorhinootologie* 75(6) (1996) 330-334.
101. Ogilvie FR, Hall IS: Observations on the pathogenesis of otosclerosis. *J Laryngol Otol* 67 (1953) 497-535.
102. Yoo TJ, Shea JJ, Floyd RA: Enchondral cartilage rests collagen induces autoimmunity. *Am J Otolaryngol* 8 (1987) 317-324.

103. Arnold W: Untersuchungen zu einer möglichen Masernviruspersistenz in der Otosklerose. Otorhinolaryngol Nova 9 (1999) 87-91.
104. Helms J, Naumann HH, Herberhold C, Kastenbauer E: Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Bd. 1., Thieme, Stuttgart, 1994.

12. Anhang

12.1 MESSWERTE SAM200 EX

12.1.1 Ambosse und Hämmer (gesund)

Tab. 1: Akustische Impedanz (Mittelwerte) bei 50 MHz (gesunde Ambosse und Hämmer)

Präparat	Frequenz	Region	Impedanz in Mrayl (Mittelwert)
gesunde Ambosse	50 MHz	gesamt	8,00±0,41
		Region 1	7,90±0,66
		Region 2	7,37±0,97
gesunde Hämmer	50 MHz	gesamt	8,13±0,42
		Region 1	8,23±0,39
		Region 2	7,96±0,51

12.1.2 Ambosse und Hämmer (Otitis media chronica)

Tab. 2: Akustische Impedanz (Mittelwerte) bei 50 MHz (Ambosse und Hämmer bei Otitis media chronica)

Präparat	Frequenz	Region	Impedanz in Mrayl (Mittelwert)
Ambosse bei Otitis media chronica	50 MHz	gesamt	7,45±0,47
		Region 1	7,41±0,57
		Region 2	7,46±0,57
Hämmer bei Otitis media chronica	50 MHz	gesamt	7,39±0,57
		Region 1	7,74±0,67
		Region 2	7,29±0,39

12.2 MESSWERTE KSI SAM2000

12.2.1 Ambosse und Hämmer (gesund)

Tab. 3: Akustische Impedanz (Mittelwerte) bei 200 MHz (gesunde Ambosse und Hämmer)

Präparat	Frequenz	Region	Impedanz in Mrayl (Mittelwert)
gesunde Ambosse	200 MHz	gesamt	8,37±1,12
		Region 1	8,38±1,18
		Region 2	8,35±1,20
gesunde Hämmer	200 MHz	gesamt	8,27±1,06
		Region 1	8,63±1,25
		Region 2	8,09±1,10

12.2.2 Ambosse und Hämmer (Otitis media chronica)

Tab. 4: Akustische Impedanz (Mittelwerte) bei 200 MHz (Ambosse und Hämmer bei Otitis media chronica)

Präparat	Frequenz	Region	Impedanz in Mrayl (Mittelwert)
Ambosse bei Otitis media chronica	200 MHz	gesamt	7,60±1,13
		Region 1	7,27±1,20
		Region 2	7,65±1,45
Hämmer bei Otitis media chronica	200 MHz	gesamt	7,83±1,18
		Region 1	7,88±1,24
		Region 2	7,63±1,07

13. Thesen

1. Die Ultraschallrastermikroskopie (Synonym: akustische Rastermikroskopie, englisch: scanning acoustic microscopy, SAM) ist ein hochauflösendes bildgebendes Verfahren, mit dem die Bestimmung der akustischen Impedanz als elasto-mechanischen Gewebeparameter in Schnitten humaner Gehörknöchelchen im Matrixverbund und auf mikrostruktureller Ebene gelingt.
2. Die Ultraschallmikroskopie ist hinsichtlich der Auflösung ein der Auflichtmikroskopie gleichwertiges Verfahren zur bildlichen Darstellung von biologischen Gewebegefügen an Präparatoberflächen und oberflächennahen Strukturen. Zusätzlich erlaubt sie quantitative Aussagen über das Verteilungsmuster der akustischen Impedanz.
3. Bisher beschäftigen sich nur einzelne Forschungsgruppen mit mittel- und hochfrequenten Ultraschalluntersuchungen an gesunden humanen Gehörknöchelchen. Anhand der eigenen Messreihen an gesunden und arrodieren menschlichen Hämmern und Ambossen gelangen zum ersten Mal neue vergleichende Feststellungen auf sowohl qualitativer als auch quantitativer Ebene.
4. In dieser Arbeit wurde die akustische Impedanz als Parameter für die lokal veränderten mechanischen Gewebeeigenschaften in Schnitten pathologisch veränderter humaner Gehörknöchelchen durch systematische Untersuchungen mit dem SAM200 Ex und KSI SAM2000 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland) bei Arbeitsfrequenzen von 50 MHz und 200 MHz bestimmt.
5. Um die für Untersuchungen am SAM erforderliche plane und sehr glatte Probenoberfläche zu erreichen, wurden die Ossikel nach Einbettung in PMMA mit Schleifpapier und Diamantspray absteigender Körnung geschliffen und poliert. Das Präparationsverfahren bedingt eine geringe Erhöhung der akustischen Impedanz.
6. Mit Hilfe der im Q-Bam-Labor der Orthopädischen Klinik der Universität Halle für Untersuchungen mittels hochauflösender Ultraschallmikroskopie erarbeiteten Software für die Multi-Layer-Analyse und Impedanzkalibrierung wird für jeden Bildpunkt der entsprechende Impedanzwert bestimmt.
7. Bei 50 MHz wiesen die Ambosse mit 8,00 Mrayl (Mittelwert) die geringste akustische Impedanz unter den untersuchten gesunden Gehörknöchelchen auf. Die akustische Impedanz der Hämmer lag mit 8,13 Mrayl knapp darüber. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

8. Bei 200 MHz ließen sich für die gesunden Hämmer und Ambosse akustische Impedanzen von 8,27 Mrayl bzw. 8,35 Mrayl ermitteln. Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.
9. In den Untersuchungen an Ossikeln von Patienten mit chronischer Mittelohrentzündung konnte bei beiden Arbeitsfrequenzen eine statistisch signifikant geringere akustische Impedanz als in Schnitten gesunder Gehörknöchelchen nachgewiesen werden.
10. Die für die Schnittbilder der pathologisch veränderten Hämmer ermittelte akustische Impedanz lag bei 7,39 Mrayl (50 MHz) bzw. bei 7,83 Mrayl (200 MHz). Für die krankhaft veränderten Ambosse ließen sich Werte von 7,45 Mrayl (50 MHz) bzw. von 7,60 Mrayl (200 MHz) bestimmen.
11. In der Arbeit wird gezeigt, dass es mit Hilfe der Ultraschallrastermikroskopie möglich ist, einen akustischen Parameter (akustische Impedanz) zu ermitteln, der die veränderten elasto-mechanischen Eigenschaften von Gehörknöchelchen bei Otitis media chronica repräsentiert.
12. Die Beobachtung in den vorliegenden Untersuchungen, dass speziell in Regionen hoher Knochendestruktion, wie der Ossikeloberfläche, den Resorptionslakunen und Havers'schen Kanälen, Werte erniedrigter akustischer Impedanz zu bestimmen waren, unterstützt die in der Literatur nachzulesenden Cholesteatomstehungstheorien.
13. Die Darstellung der cholesteatominduzierten Knochenresorptionsvorgänge auf mikrostruktureller Ebene gelingt mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ultraschallfrequenzen nicht. Zukünftige SAM-Analysen bei höheren Arbeitsfrequenzen (>900 MHz) mit entsprechend kleineren Schallfelddimensionen könnten durch Abbildung von Osteoklasten in den bevorzugten Knochendestruktionszonen zur Klärung der Genese des Knochenabbaus im Cholesteatom im mikroskopischen Bereich beitragen.
14. Gegenstand künftiger Studien kann die Entwicklung geeigneter Präparations-techniken zur Untersuchung vitaler Gehörknöchelchen mit dem SAM-Verfahren sein.
15. Die Ultraschallrastermikroskopie kann die Weiterentwicklung bestehender und die Entwicklung neuer Prothesen für die rekonstruktive Mittelohrchirurgie unterstützen und auch zur Erforschung anderer pathologischer Mittelohrprozesse, wie der Otosklerose, herangezogen werden.

14. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. habil. E.-J. Haberland (Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Universität Halle) für die Überlassung des Dissertationsthemas und hilfreiche Beratung während der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. K. Raum vom Q-Bam-Labor der Klinik für Orthopädie der Universität Halle danke ich für die Einführung in die Methodik der akustischen Rastermikroskopie und die unermüdliche Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Messungen.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. Silke Burkert für ihre beständige Unterstützung und kritische Diskussion des Manuskriptes.

Außerdem danke ich den medizinisch-technischen Angestellten des HNO-Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Universität Halle, besonders Frau E. Wolfsteller, für die Einweisung in das Verfahren zur Herstellung von eingebetteten Ossikelpräparaten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau C. Vetter, medizinisch-technische Angestellte des Labors der Orthopädischen Klinik der Universität Halle, für die Hilfestellung bei der Erstellung planparalleler Proben.

Danken möchte ich Herrn S. Coiffier für seine zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen bei diversen Computerproblemen.

In besonderem Maße danke ich meiner Mutti, die mir mein Studium ermöglicht hat, für ihr stets offenes Ohr, ihr gutes Zureden und ihre Liebe.

Zuletzt gilt mein größter Dank meinem Mann für seine bedingungslose Unterstützung, unendliche Geduld und seine Liebe.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne die Benutzung anderer als der im Literaturverzeichnis angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle, den 14.08.2009

Susanne Liebhold

Veröffentlichungen von Ergebnissen

Konferenzbeiträge

2002 Burkert S, Liebhold S, Haberland EJ, Raum K, Brandt J, Berghaus A, „Tissue characterization of human septal cartilage by scanning acoustic microscopy.“, Internationale Fachtagung Polymerwerkstoffe, 25.-27.09.2002, Halle, Deutschland

2003 Burkert S, Liebhold S, Haberland EJ, Raum K, Brandt J, Bloching M, „Scanning acoustic microscopy of human septal cartilage.“, 7th Conference of the European Society of Engineering and Medicine (ESEM), Halle, Deutschland, 18.-21.09.2003

Haberland EJ, Burkert S, Liebhold S, Berghaus A, Raum K, Klemenz A, Brandt J, „Ultraschallmikroskopie an nativem und präpariertem Knorpel des Nasenseptums.“, 9. Tagung Deformation und Bruchverhalten von Kunststoffen, Merseburg, Deutschland, 25.-27.06.2003

Haberland EJ, Burkert S, Liebhold S, Berghaus A, Raum K, Klemenz A, Brandt J, „Akustische Rastermikroskopie an nativen und eingebetteten Septumknorpelpräparaten.“ 74. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Dresden, Deutschland, 28.04.-01.05.2003

2007 Burkert S., Liebhold S, Brandt J, Neumann K, Haberland EJ, „Scanning acoustic microscopy zur Impedanzbestimmung an Ossikelquerschnitten bei Otitis media chronica.“ 78. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., 16.-20.05.2007, München, Deutschland

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich weder zum vorliegenden Thema, noch zu einem anderem Thema einen Promotionsantrag gestellt habe.

Halle, den 14.08.20009

Susanne Liebhold

Lebenslauf

Zur Person

Name:	Susanne Liebhold
Geburtsdatum/-ort:	07.06.1979, Lutherstadt Eisleben
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, 1 Tochter
Religionszugehörigkeit:	Römisch-Katholisch

Schulbildung

09/1986 – 08/1991	POS Hans-Seidel, Lutherstadt Eisleben
09/1991 – 08/1998	Martin-Luther-Gymnasium, Lutherstadt Eisleben, Abitur

Hochschulbildung

10/1998 – 04/2005	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studium der Humanmedizin
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	Erstes Staatsexamen
03/2004	Zweites Staatsexamen
04/2005	Drittes Staatsexamen

Famulaturen

02/2001 – 03/2001	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/2003 – 08/2003	
02/2002 – 03/2002	Gemeinschaftspraxis für Orthopädie Hein / Bartels, Halle
02/2003 – 03/2003	Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Notfallmedizin, Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle

Praktisches Jahr

04/2004 – 07/2004	Klinik für Innere Medizin des St. Elisabeth und St. Barbara Krankenhauses, Halle
08/2004 – 11/2004	Klinik für Chirurgie des St. Elisabeth und St. Barbara Krankenhauses, Halle
12/2004 – 03/2005	Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Notfallmedizin der Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost, Halle

Berufliche Weiterbildung

seit 07/2005	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik 1 des St. Elisabeth und St. Barbara Krankenhauses, Halle
--------------	--

Halle, den 14.08.2009

Susanne Liebhold