

Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)



## **Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher Gehörknöchelchen**

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Silke Gudziol

geboren am 28.01.1973 in Jena

Tag der Verteidigung: 03.12.2001

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. E.J. Haberland
2. Prof. Dr. med. H. W. Pau
3. Prof. Dr. med. E. Beleites

**urn:nbn:de:gbv:3-000002847**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002847>]

## Referat

Die akustische Rastermikroskopie (Scanning Acoustic Microscopy - SAM) ist ein Verfahren zur Untersuchung der Mikrostruktur von Geweben, das die herkömmlichen Verfahren der Licht- und Elektronenmikroskopie ergänzt. Bei der akustischen Rastermikroskopie entsteht der Bildkontrast durch lokale Unterschiede der akustischen Impedanz.

Für die SAM ist eine plane und extrem glatte Oberfläche der Untersuchungspräparate erforderlich. 41 Gehörknöchelchen wurden in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet, anschließend geschliffen und poliert. Die Messungen wurden mit den akustischen Rastermikroskopen KSI 100 und KSI 2000 der Firma Krämer Scientific Instruments (Herborn) bei einer Arbeitsfrequenz von 25 und 900 MHz durchgeführt.

Die mittlere akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz war für die untersuchten Hämmer mit 7,13 Mrayl am größten. Die Steigbügel (4,67 Mrayl) wiesen die geringste akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die Ambosse lagen mit 6,74 Mrayl dazwischen.

In den eigenen Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass auch bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz die Verteilung der akustischen Impedanz in den Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel inhomogen ist. Die bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ermittelte akustische Impedanz der untersuchten Gehörknöchelchen lag bei 3,2 bis 4,0 Mrayl. Die niedrigeren Impedanzwerte sind Folge der höheren Arbeitsfrequenz.

Die praktische Anwendung dieser Untersuchungen besteht darin, dass die ermittelten akustischen Impedanzen der Gehörknöchelchen Parameter für neu zu entwickelnde Mittelohrprothesen und auch Eingangsgrößen für Finite Elemente Modelle liefern können. Gegenstand weiterer Studien kann die Bestimmung richtungsabhängiger Elastizitätsunterschiede der Gehörknöchelchen sein, die sich in unterschiedlichen Impedanzen bei verschiedenen Schnittwinkeln widerspiegeln. Mit der akustischen Rastermikroskopie können außerdem pathologische Prozesse im Mittelohr untersucht werden. Dabei könnten eventuell schon vor einer funktionellen Störung Impedanzänderungen als mikrostruktureller Krankheitsindikator nachweisbar sein.

Gudziol, Silke: Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher Gehörknöchelchen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2001

---

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1	Abkürzungen und Symbole ..... 0
2	Einleitung und Zielsetzung ..... 1
3	Grundlagen des Mittelohres ..... 3
3.1	Anatomie des Mittelohres ..... 3
3.2	Histologie des Mittelohres ..... 5
3.3	Physiologie des Mittelohres ..... 7
4	Grundlagen der akustischen Rastermikroskopie ..... 9
4.1	Akustische Rastermikroskopie im Überblick ..... 9
4.2	Ultraschallmikroskopie in Reflexion ..... 9
4.3	Materialeigenschaften des Einbettungsmediums ..... 16
5	Material und Methoden ..... 17
5.1	Probengewinnung ..... 17
5.2	Einbettung in PMMA und Bearbeitung ..... 17
5.3	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 100 ..... 18
5.4	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 2000 ..... 19
5.5	Bestimmung der Messpunkte für die akustische Rastermikroskopie ..... 20
5.6	OFF-line Signalverarbeitung ..... 21
6	Ergebnisse ..... 23
6.1	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 100 ..... 23
6.1.1	Untersuchungen am Hammer ..... 23
6.1.1.1	Qualitative Analyse ..... 23
6.1.1.2	Quantitative Analyse ..... 24
6.1.2	Untersuchungen am Amboss ..... 26
6.1.2.1	Qualitative Analyse ..... 26
6.1.2.2	Quantitative Analyse ..... 28

---

6.1.3	Untersuchungen am Steigbügel .....	30
6.1.3.1	Qualitative Analyse.....	30
6.1.3.2	Quantitative Analyse .....	32
6.2	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 2000 .....	33
6.2.1	Untersuchungen am Hammer .....	33
6.2.1.1	Qualitative Analyse.....	33
6.2.1.2	Quantitative Analyse .....	36
6.2.2	Untersuchungen am Amboss .....	36
6.2.2.1	Qualitative Analyse.....	36
6.2.2.2	Quantitative Analyse .....	40
6.2.3	Untersuchungen am Steigbügel .....	40
6.2.3.1	Qualitative Analyse.....	40
6.2.3.2	Quantitative Analyse .....	43
6.3	Vergleich der Gehörknöchelchenimpedanz .....	44
6.3.1	KSI SAM 100 .....	44
6.3.2	KSI SAM 2000 .....	45
7	Diskussion .....	46
8	Schlussfolgerungen.....	54
9	Zusammenfassung.....	56
10	Literaturverzeichnis .....	58
11	Anhang .....	65
11.1	Präparatedaten.....	65
11.2	Messwerte KSI SAM 100.....	66
11.2.1	Hammer.....	66
11.2.2	Amboss .....	67
11.2.3	Steigbügel .....	68
11.3	Messwerte KSI SAM 2000.....	69

---

11.3.1	Hammer.....	69
11.3.2	Amboss .....	70
11.3.3	Steigbügel .....	71
11.4	Akustische Parameter ausgewählter Materialien .....	72
12	Thesen .....	73
13	Danksagung .....	76

## 1 Abkürzungen und Symbole

$\rho$	lokale Massendichte
$\mu$	Poissonverhältnis aus Lateral- und Axialdehnung
$\lambda_0$	Wellenlänge des verwendeten Ultraschalls
c	Ausbreitungsgeschwindigkeit
dB	Dezibel
FEM	Finite Elemente Modell
k	Wellenzahl in der Flüssigkeit
KSI SAM 100	Krämer Scientific Instruments Scanning Acoustic Microscope 100
KSI SAM 2000	Krämer Scientific Instruments Scanning Acoustic Microscope 2000
IMPB	Institut für Medizinische Physik und Biophysik
m	Masse
N.A.	numerische Apertur der Linse
$P(\theta)$	Pupillenfunktion der Linse
PMMA	Polymethylmethacrylat
R	Reflexionskoeffizient
$R(\theta)$	Reflektanzfunktion
SAM	Scanning Acoustic Microscopy
SLAM	Scanning Laser Acoustic Microscope
Stabw	Standardabweichung
V	Volumen
Z	akustische Impedanz
z	Linsen-Probenabstand in Vertikalrichtung
$Z_1, Z_2$	Impedanz vom Kopplungsmedium Wasser und von Knochen

## 2 Einleitung und Zielsetzung

Zur Rehabilitation des Hörvermögens bei einer Schalleitungsschwerhörigkeit wird die Gehörknöchelchenkette häufig operativ mit Knochenersatzmaterialien rekonstruiert. Die Vielfalt der verwendbaren Materialien macht es schwer, das günstigste auszuwählen [21]. Ersatzmaterialien für diese kleinen Knochen müssen oft über Jahrzehnte ihre Funktion erfüllen. Neben der Auswahl nach Gesichtspunkten der Biokompatibilität [6] ist eine Auswahl hinsichtlich einer optimalen Schwingungsankopplung zwischen biologischem und Prothesenmaterial erforderlich. Der zweite Punkt spielte bisher nur eine untergeordnete Rolle.

Für das Verständnis der Materialeigenschaften von Gehörknöchelchen ist die Charakterisierung der komplexen Mikrostruktur essentiell. Die Strukturen der Gehörknöchelchen sind mit vielfältigen Methoden untersucht worden, wie z.B. der Lichtmikroskopie [48], [76], der Elektronenmikroskopie [47], [71], [28], der Mikroradiographie [34], [77], der chemischen Analytik [2] und der Osteomikropneumographie [19].

Die akustische Rastermikroskopie (Scanning Acoustic Microscopy-SAM) ist ein modernes Verfahren für die Untersuchung der Mikrostruktur von Geweben, das die herkömmlichen Verfahren der Licht- und Elektronenmikroskopie ergänzt. Besonders geeignet ist es für Untersuchungen an Knochengewebe, weil mit ihm Aufschluss über die Verteilung mechanischer Kennwerte der mikroskopischen Bausteine erlangt werden kann [11], [13], [36]. Eine ganze Reihe von Arbeiten hat gezeigt, dass SAM-Verfahren neue Erkenntnisse über die mechanischen Eigenschaften und den mikrostrukturellen Aufbau u.a. von Zellen und Hartgewebe geben können [7],[8], [13], [14], [22], [20], [42], [43], [50], [58], [61], [62], [64]. Bisher sind vorwiegend Arbeiten orthopädisch orientierter Gruppen bekannt geworden [70], [51], [56], [73], [24]. An Gehörknöchelchen gibt es nur erste Untersuchungen von Gaihede [17]. Bei der Anwendung der akustischen Rastermikroskopie für Oberflächenuntersuchungen entsteht der Bildkontrast durch die lokalen Unterschiede der akustischen Impedanz im Knochen.

Die akustische Impedanz  $Z$  ist eine materialspezifische Größe. Sie gibt das Verhältnis von einwirkendem Schalldruck und der daraus resultierenden Ortsänderungsgeschwindigkeit der Teilchen an. Sie ist auch aus der lokalen Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  der Dichtewelle des Schalls in Longitudinalrichtung und der lokalen Massendichte  $\rho$  des untersuchten Areals der Knochenprobe zu berechnen ( $Z=c \cdot \rho$ ). Zur quantitativen Angabe von Impedanzwerten wird das rayl mit  $1 \text{ rayl} = 1 \text{ Ns/m}^3$  als Einheit verwendet. Als Schall wird hochfrequenter Ultraschall

---

verwendet, weil seine Wellenlänge kurz genug ist zur Abbildung feiner Einzelheiten bis in den Mikrometerbereich hinein. Der Begriff Ultraschallrastermikroskopie wird deshalb synonym für den Begriff akustische Rastermikroskopie verwendet. Als Koppelmedium zwischen der Ultraschalllinse und dem Objekt dient Wasser. Das Verfahren ist prädestiniert für die Untersuchung biologischer Proben und wird auch zunehmend in diesem Zusammenhang angewendet [59], [60], [75], [25], [74].

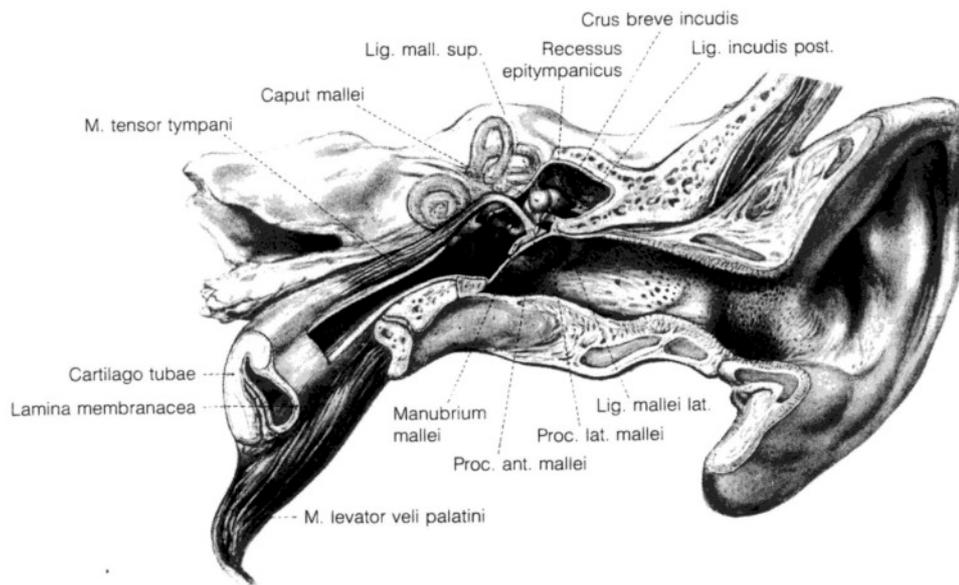
Ein besonderes Potential der akustischen Rastermikroskopie an Gehörknöchelchen liegt in der Ermittlung der akustischen Impedanz mit unterschiedlicher Ortsauflösung. Daraus sind Erkenntnisse über die mechanische Belastbarkeit des Knochengewebes und für die Entwicklung von Werkstoffen für die rekonstruktive Mittelohrchirurgie zu gewinnen.

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der akustischen Rastermikroskopie auf die systematische Untersuchung von menschlichen Gehörknöchelchen in größerer Anzahl und mit statistischer Absicherung. Es sollte die Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel bei Arbeitsfrequenzen von 25 und 900 MHz qualitativ ermittelt werden. Desweiteren bestand die Aufgabe, die akustische Impedanz bei Arbeitsfrequenzen von 25 MHz und 900 MHz quantitativ zu bestimmen und mit der akustischen Impedanz von Ersatzmaterialien, die in der Mittelohrchirurgie Verwendung finden, zu vergleichen.

### 3 Grundlagen des Mittelohres

#### 3.1 ANATOMIE DES MITTELOHRES

Es wird zwischen dem äußeren Ohr, Auris externa, dem Mittelohr, Auris media, und dem Innenohr, Auris interna, unterschieden (Abbildung 1).

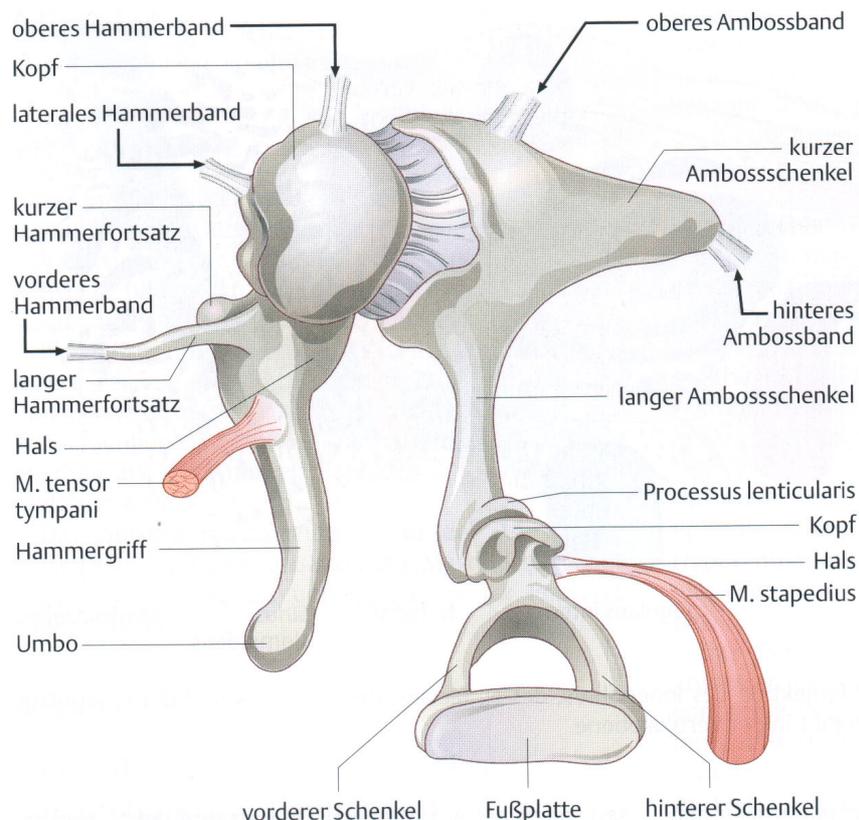


*Abbildung 1: Schematische Übersicht der Anatomie des äußeren Ohres, des Mittelohres und des Innenohres [5]*

Das Trommelfell hat die Form eines Trichters. Die Spitze erscheint als Einziehung und wird als Umbo membranae tympanicae bezeichnet. Es wird eine Pars tensa, welche mittels des Anulus fibrocartilagineus in den Sulcus tympanicus eingefalzt ist, von einer Pars flaccida unterschieden.

Das Mittelohr stellt sich als System mit Schleimhaut ausgekleideter, lufthaltiger Räume dar, bestehend aus der Paukenhöhle, den pneumatisierten Nebenräumen und der Ohrtrompete. Die Paukenhöhle wird in Mesotympanon, Recessus epitympanicus und Recessus hypotympanicus unterteilt und enthält die drei Gehörknöchelchen (Abbildung 2). Die Gehörknöchelchen sind durch Gelenke miteinander verbunden und bilden eine Kette, die vom Trommelfell bis zur Fenestra vestibuli reicht. Sie übertragen die Bewegungen des Trommelfells auf das Innenohr.

Der Hammer, malleus, artikuliert mit seinem Kopf, Caput mallei, mit dem Körper des Ambosses. Er liegt im Recessus epitympanicus und wird durch Ligamente gehalten. Der Handgriff, Manubrium mallei, und der Processus lateralis sind mit dem Trommelfell verwachsen. Der Processus anterior verläuft vom Hammerhals nach vorn unten zur Fissura petrotympanica. Der Amboss, incus, besteht aus dem Körper, Corpus incudis, und zwei Schenkeln, einem langen, Crus longum incudis, und einem kurzem, Crus breve incudis. Das freie Ende des langen Schenkels biegt nach innen um und trägt ein ovales Köpfchen, den Processus lenticularis, das sich mit dem Steigbügelköpfchen verbindet. Der Steigbügel, stapes, stellt mit seinem lateralwärts gerichteten Kopf, Caput stapedis, die Verbindung mit dem Processus lenticularis des Ambosses her. Der kürzere Schenkel, Crus anterius, weist nach vorn, der längere Schenkel, Crus posterius, nach hinten. Die Steigbügelplatte, Basis stapedis, ist in das ovale Fenster eingelassen [72]. Die Anatomie der Ossikel wird durch die durch den Lebensraum vorgegebenen Belastungen bestimmt. Bei Meereslebewesen ergeben sich u.a. durch wesentlich höhere statische Drücke massivere Ausführungen der Gehörknöchelchen [31].



**Abbildung 2:** Ossikelkette, bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel mit Darstellung der Ansätze der Mittelohrmuskeln (M. tensor tympani, M. stapedius) [53]

### 3.2 HISTOLOGIE DES MITTELOHRES

Das Trommelfell ist eine dünne Membran, welche außen von mehrschichtigem Plattenepithel und innen von der Mukosa der Paukenhöhle überzogen ist. Im Umbo laufen die radiären Kollagenfasern der Lamina propria der Pars tensa zusammen. Verbunden werden radiäre und zirkuläre Fasern durch parabelförmig angeordnete Kollagenfasern. In der Pars flaccida verlaufen die hauptsächlich elastischen Fasern ungerichtet.

Die Schleimhaut des Mittelohrs trägt im hinteren Paukenabschnitt endothelartiges Epithel mit längsgestellten Kernen und einer schmalen Tunica propria, in der Gegend der tympanalen Tubenöffnung ein mehrschichtiges kubisches Epithel mit breiter, gefäßreicher Submucosa [3]. Die Schleimhaut kleidet das gesamte Tympanon aus und dringt in die Cellulae mastoideae ein. Bei den Gehörknöchelchen finden sich unter einem zarten Schleimhautüberzug und einem dünnen Periost Strähnenknochen, geflechtartiger Knochen und verkalkte Knorpelreste, während Lamellenknochen im Gegensatz zum übrigen Skelett nur spärlich vorhanden ist [3], [76]. In Abbildung 3 ist beispielhaft der Aufbau eines kurzen Ambosschenkels dargestellt.

Knochengewebe besteht grundsätzlich aus Zellen und Interzellulärsubstanz.

Diese werden unterteilt in Vorläuferzellen, an der äußeren Knochenoberfläche liegende proliferative Zellen und basophile Osteoblasten, welche die organische Grundsubstanz des Knochens (Osteoid: bestehend u.a. aus Kollagen Typ I, Proteoglykane, Osteopontin) bilden und an der Mineralisation beteiligt sind. Desweiteren findet man von Knochengrundsubstanz umgebene Osteozyten, welche in Lagunen liegen und über zahlreiche Fortsätze untereinander in Verbindung stehen.

Die Interzellulärsubstanz setzt sich aus anorganischen (u.a. Calcium und Phosphat in Form von Apatit), organischen (Osteoid) Bestandteilen und ca. 10% Wasser zusammen, wobei der Wassergehalt im Geflechtknochen höher als im Lamellenknochen ist.

Nach der Anordnung von Osteozyten und Kollagenfasern lassen sich in den Gehörknöchelchen Bezirke mit Geflecht- und Lamellenknochen unterscheiden.

Der Lamellenknochen zeichnet sich durch eine parallele Anordnung von Kollagenfasern in den Einzellamellen aus. Mehrere konzentrisch um ein Gefäß (Havers-Kanal) angeordnete Einzellamellen bilden eine Grundlamelle. Über zwischen den Lamellen befindliche Osteozyten erfolgt der Stofftransport vom und zum Havers-Kanal. Reste abgebauter Osteone (Einheit aus Grundlamelle und Havers-Kanal) werden als Schaltlamelle bezeichnet.

Geflechtknochen ist zellreicher als Lamellenknochen und weniger mineralisiert. Ungeordnete

Bündel von Kollagenfasern und in der Größe, Orientierung und Verteilung sehr variable Osteozyten zeichnen den Geflechtknochen aus. Die Mineralisierung ist ebenfalls sehr unregelmäßig, und es finden sich sehr variable Mineraldepots [41].

In Knorpelresten und den Gehörknöchelchenverbindungen kann man typisches Knorpelgewebe bestehend aus Chondrozyten, elastischen und kollagenen Fasern und Interzellulärsubstanz finden [15].

Das den Knochen umhüllende Periost besteht aus einem äußeren Stratum fibrosum und einem inneren Stratum cellulare und dient der Ernährung und Knochenneubildung.

Die Gehörknöchelchen sind über Gelenke miteinander verbunden. Die Verbindung zwischen Hammer und Amboss besteht aus einem Sattelgelenk. Amboss und Steigbügel sind durch ein flaches Kugelgelenk verbunden. Die Gelenke sind von einer aus reichlich elastischen Fasern bestehenden Kapsel umgeben. Die Gelenkfläche besteht innen aus einer Knochenlage. Nach außen folgt eine Zone verkalkten Knorpels, hyalinen Knorpels und eine Terminallage. Diese kann sich aus Bindegewebe, Faserknorpel, Endothel und homologen Substanzen zusammensetzen und enthält reichlich elastische Fasern [15], [3].

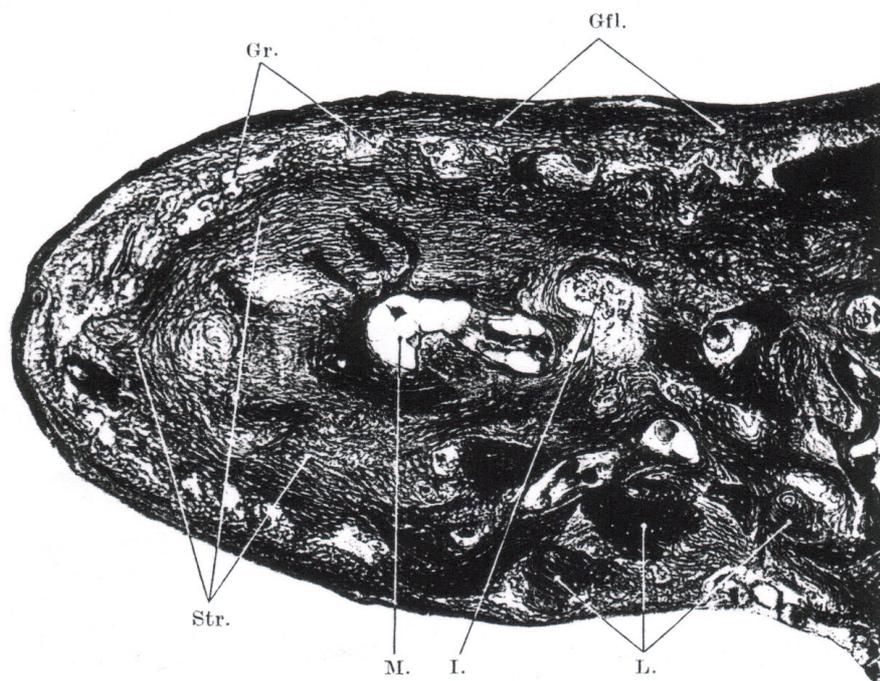


Abbildung 3: Kurzer Ambossschenkel. Str. -Strahlenknochen; M. -Markhöhle; I. – Interglobularraum; L. -kleine Lamellen; L. -kleine Lamellen; Gr. -Grenze zwischen periostalem und enchondralem Knochen mit Knorpelresten, Gfl. -geflechtartiger Knochen [48]

### 3.3 PHYSIOLOGIE DES MITTELOHRES

Das Mittelohr hat die Aufgabe, vom äußeren Ohr aufgenommene Schallwellen an die sensiblen Strukturen des Innenohres weiterzuleiten. Dazu müssen die Schwingungen der Luft (Kennimpedanz  $Z_0$  von  $390 \text{ Ns/m}^3$ ) in Schwingungen der cochleären Flüssigkeit (Perilymphe) umgesetzt werden. Die Kennimpedanz von Perilymphe entspricht ca. der Kennimpedanz von Wasser ( $1500000 \text{ Ns/m}^3$ ). Auf Grund dieses Impedanzsprunges würde bei einem direkten Übergang von Luft auf Perilymphe ca. 99,9 % der Schallenergie reflektiert werden. Durch das Mittelohr findet eine Anpassung der Impedanzen statt. Hierfür sind die Flächentransformation vom Trommelfell auf die Steigbügelfußplatte und die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen die entscheidenden Mechanismen.

Das Trommelfell empfängt Schalldrücke in einem weiten Dynamikbereich mit hoher Empfindlichkeit und setzt sie in effektive Bewegungen der Ossikel um. Es kompensiert Veränderungen des atmosphärischen Luftdruckes und schützt damit das Ohr vor einer übermäßigen Druckbelastung.

Die Ossikelkette stellt das zentrale Element für die Druckverstärkung zur Impedanzanpassung dar. Das geschieht im Wesentlichen durch zwei Mechanismen: Der schwingende Anteil des Trommelfells beträgt im Mittel  $60 \text{ mm}^2$ . Die Stapesfußplatte wird mit ca.  $3 \text{ mm}^2$  angegeben. Durch dieses Verhältnis wird der durch das Mittelohr aufgenommene Druck 20-fach verstärkt. Außerdem bewirken die Hebelarme der Gehörknöchelchenkette und die Form des Trommelfells eine weitere Druckerhöhung, die aber eher eine untergeordnete Rolle spielt, denn die Gehörknöchelchen sind bis zu hohen Schalldruckpegeln funktionell fixiert, und die Kette schwingt praktisch kolbenförmig als Einheit [32]. Für die Hebelwirkung der Kette werden beim Menschen Werte von ca. 1,4:1 angesetzt [39]. Das Manubrium ist über seine gesamte Länge mit dem Trommelfell gekoppelt, so dass das Hebelverhältnis wahrscheinlich noch kleiner ist. Es wird angenommen, dass dieser Faktor mit nur etwa 55% bis 65 % des oben angegebenen Wertes in die Transformation eingeht [35]. In Modellrechnungen wurde die Mittelohrverstärkung mit 20 dB bei 500 Hz auf 25 dB bei 1 kHz ansteigend und anschließend um 6 dB pro Oktave abfallend angegeben [46]. Zur Frequenzabhängigkeit tragen sowohl die Massen als auch die Nachgiebigkeiten des Trommelfells, der Ossikelkette, des Stapesringbandes, der Innenohrflüssigkeit sowie das als Luftpolster wirkende Pauken- und Mastoidvolumen bei.

Nicht umfassend ist die Funktion der Bänder und Muskeln des Mittelohres geklärt. Es wird vermutet, dass diese weniger eine akustomechanische als vielmehr stabilisierende Aufgabe im Bereich der Gelenke übernehmen. Akustisch ist nur eine Kontraktion des M. stapedius und nicht des M. tensor tympani auslösbar [30]. Die Funktion des M. stapedius besteht

möglicherweise darin, bei Autophonien die durch die Vokale erzeugte tieffrequente Schallenergie abzusenken. Dadurch können akustische Informationen aufgenommen werden, die sonst verdeckt würden [30].

## 4 Grundlagen der akustischen Rastermikroskopie

### 4.1 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE IM ÜBERBLICK

1936 demonstrierte Sokolov ein akustisches Mikroskop bei 1 MHz. 1959 verwendeten Dunn und Fry ein 12 MHz Ultraschallabsorptionsmikroskop und 1972 entwickelte Kessler ein Scanning Laser Acoustic Microscope (SLAM). Die akustische Mikroskopie erhielt neue Impulse in den siebziger Jahren mit der Entwicklung eines mechanischen akustischen Rastermikroskops von Lemons und Quate [38]. Dieses erste Ultraschallmikroskop bestand aus zwei konfokal angeordneten akustischen Linsen, in deren gemeinsamem Brennpunkt sich die Probe befindet. Diese wird mit dem Scanner in der Brennebene der Ultraschalllinsen so bewegt, dass sich aus den Messpunkten ein zweidimensionales Bild zusammensetzen lässt (SAM, Scanning Acoustic Microscopy).

Je höher die Ultraschallfrequenz, desto größer ist die laterale Auflösung und um so geringer die Eindringtiefe. Die hochauflösende akustische Rastermikroskopie in Transmission eignet sich nicht für die Untersuchung dickerer Objekte, da die Abschwächung der Ultraschallstrahlen zu groß ist. Dies führte zur Entwicklung der akustischen Rastermikroskopie in Reflexion. Das akustische Rastermikroskop zur Untersuchung von Probenoberflächen und oberflächennahen inneren Strukturen in Reflexion hat Anwendung u.a. in der Medizin, der Biologie, den Materialwissenschaften und der zerstörungsfreien Werkstoffprüfung gefunden [11], [26], [40].

### 4.2 ULTRASCHALLMIKROSKOPIE IN REFLEXION

Im Puls-Echo-Verfahren (Abbildung 4) werden durch eine stark fokussierende akustische Linse kurze Impulse in die Probe eingestrahlt. Dafür erzeugt ein Schallwandler mit dem umgekehrten piezoelektrischen Effekt aus einer hochfrequenten Wechselspannung eine mechanische Schwingung, die annähernd ebene Schallwellen in axialer Richtung in die Saphirlinse sendet. Der Schallwandler ist elektrisch an das HF-Sende- und Empfangsteil angeschlossen. Dieses Teil überträgt für die gewünschte Frequenz ein Maximum an elektrischer Energie auf den Wandler. Ein elektrischer Puls löst eine akustische Welle aus, welche die Linse durchläuft, am Untersuchungsobjekt reflektiert und nach Durchlaufen der Linse im Wandler wiederum in einen elektrischen Puls umgewandelt wird. Die Linse des akustischen Rastermikroskops in Reflexion arbeitet gleichzeitig als Ultraschallsender und –empfänger. Sie besteht z.B. aus einem Saphirkristall mit geringer Dämpfung und hoher Schallgeschwindigkeit in der Grundform eines Zylinders, dessen Achse parallel zur

Zylinderachse verläuft. Eine konkave sphärische Kalotte bildet die brechende Fläche der Linse. Die Linsenkonkavität fokussiert die vom Wandler ausgesendeten Wellen beim Übertritt in das Kopplungsmedium (meist Wasser) im Richtungsverlauf des Krümmungsradius. Der Impedanzunterschied zwischen Saphir und dem Kopplungsmedium Wasser ist sehr hoch, wodurch die Schallwellentransmission an der Saphir-Wasser-Grenzschicht mit ca. 3% sehr gering ausfällt. Diese akustische Fehlanpassung kann mit einer dritten Schicht zwischen den beiden Medien verringert werden. Verwendung finden Entspiegelungsschichten u.a. aus  $\text{SiO}_2$  oder Kalk-Glas. Die Linse muss nah an das Objekt herangebracht werden, weil die Dämpfung in den Kopplungsmedien groß ist und mit der benutzten Schallgeschwindigkeit quadratisch ansteigt. Dieser geringe Arbeitsabstand und die Schwierigkeit, hochauflösende Transduceranordnungen herzustellen, erzwingen eine rasternde Mikroskopie, bei der die Probe Punkt für Punkt untersucht wird.

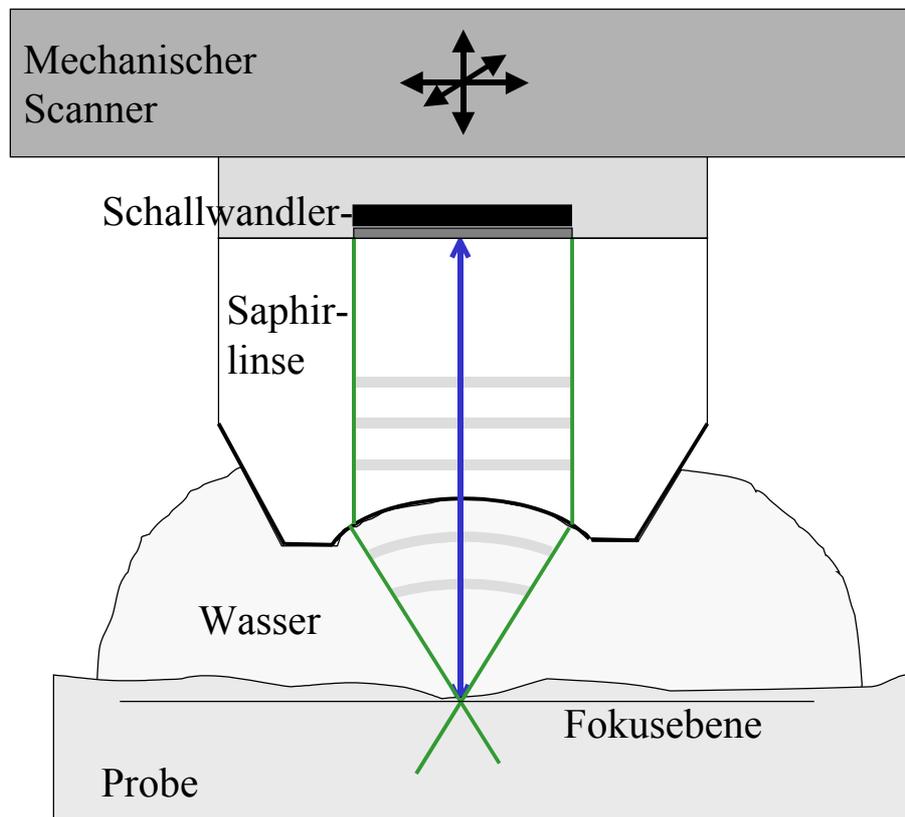


Abbildung 4: Das Prinzip des Puls-Echo-Verfahrens [54]

Die von der Probe reflektierten Echos werden von dem gleichen Wandler empfangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Den prinzipiellen elektronischen Aufbau eines akustischen Rastermikroskops zeigt Abbildung 5.

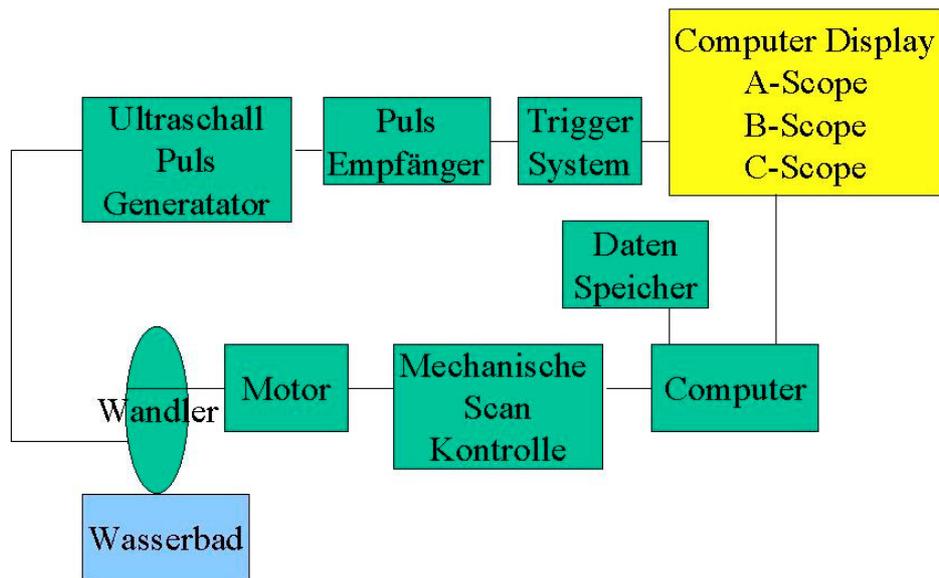


Abbildung 5: Stark vereinfachtes Blockdiagramm des Aufbaus eines akustischen Rastermikroskopes

Der Schallwandler befindet sich auf der ebenen Rückseite des Saphirkörpers. Die kurze Pulsdauer erlaubt die Trennung des reflektierten vom gesendeten Signal. Um die nach Reflexion an der Grenzfläche zum Kopplungsmedium entstehenden Echosignale von der Linsenoberfläche und die aus der Probe stammenden Empfangssignale auf Grund der unterschiedlichen Laufzeit trennen zu können, wird die Empfangszeit durch ein Zeitfenster begrenzt. Dadurch werden Interferenzen des Empfangssignals mit Wellen, die innerhalb der Linse nach mehrfacher Binnenreflexion verzögert zum Wandler zurückkehren, reduziert. Das reflektierte Signal wird in einem Echo-Verstärker aufgenommen [10], [9].

Die Helligkeitsintensität des Rasterbildes ist proportional zur Höhe des elektrischen Eingangssignals der reflektierten Schallwelle und hängt von dem Reflexionskoeffizienten  $R$  für die Probe an der gescannten Stelle ab. Bei der Knochenuntersuchung erhält man mit dem akustischen Rastermikroskop eine gleichzeitige Darstellung der Struktur sowie der akusto-mechanischen Merkmale der Probe, indem die Linse in der Horizontalen mechanisch durch eine computergesteuerte Scaneinrichtung in x- und y-Richtung rasterförmig über das zu untersuchende Material bewegt wird. Dadurch erhält man ein Einzelmerkmal für jeden gescannten Punkt der Probe sowohl bezüglich der Probenmorphologie als auch im Hinblick auf die lokalen Elastizitätseigenschaften [54].

Die laterale Auflösung beschreibt die Trennfähigkeit des Ultraschallgerätes für zwei Reflexionspunkte, die nebeneinander in gleicher Entfernung vom Transducer liegen. Eine bessere laterale Auflösung kann man durch Fokussierung erreichen, bei welcher der Durchmesser des Strahlenbündels verringert wird. In der akustischen Rastermikroskopie im Reflexionsmodus errechnet sich die laterale Auflösung nach Gleichung 1.

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

Wobei N.A. die numerische Apertur der Linse des akustischen Rastermikroskopes und  $\lambda_0$  die Wellenlänge des verwendeten Ultraschalls darstellen [11].

Die Ausgangsspannung  $V$  am Wandler ist abhängig von dem Abstand  $z$  der Oberfläche des Objektes vom Fokus der Linse. Die Spannungsamplitude des reflektierten Wellenbündels wird bestimmt durch eine charakteristische  $V(z)$ -Funktion, die bei veränderten Linsen-Probenabständen  $z$  für das Spannungssignal einen materialtypischen oszillierenden Verlauf besitzt und bei Defokussierung periodisch mehrere Nebenmaxima sowie in der Fokusweite der Linse ein Hauptmaximum aufweist. Dieser  $V(z)$ -Verlauf ist charakteristisch für jedes Material. Nach [11] kann das  $V(z)$ -Verhalten mit der von der Linse abhängigen Pupillenfunktion  $P(\theta)$  und dem Abstand  $z$  der Materialoberfläche zum Fokus der Linse mit Gleichung 2 beschrieben werden.

$V(z)$  lässt sich angeben durch die

$$\text{Gleichung 2: } V(z) = \int_0^{\pi/2} P(\theta) R(\theta) e^{-i2zk \cos \theta} \sin(\theta) \cos(\theta) d\theta$$

$R(\theta)$  Reflektanzfunktion

$P(\theta)$  Pupillenfunktion der Linse

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

$z$  Linsen-Probenabstand in Vertikalrichtung

$\theta$  Einfallswinkel des Wellenbündels zur Probenoberflächennormalen

Die Amplitude des  $V(z)$ -Signals ist abhängig von den lokalen Materialeigenschaften der untersuchten Knochenprobe. Sie wird bestimmt durch die Intensität der an der

Probenoberfläche reflektierten Ultraschallwelle. Deren Energie erzeugt nach dem rückwärtigen Auftreffen auf den Saphirkörper der Linse am piezoelektrischen ZnO-Wandler ein elektrisches Spannungssignal, das zur quantitativen Auswertung im Fokusabstand der Linse zur Probe selektiv aufgezeichnet wird. Im Fokusabstand ist am ehesten gewährleistet, dass sich die Mehrzahl der auf die Probe eintreffenden und nach der Reflexion zum Wandler zurücklaufenden Wellen in Phase befinden und die gleiche Frequenz haben, also monochromatisch sind. Auch stammen diese reflektierten Wellen dann aus einem Fokusbereich von geringem Durchmesser, so dass das Signal mit hoher Auflösung den lokalen mechanischen Eigenschaften an der Probenoberfläche zugewiesen werden kann.

Wellenbündel, die in axialer Richtung auf die Probe auftreffen, werden wieder in gleicher Richtung entlang der Linsenachse reflektiert. Wellenbündel aus weiter peripher gelegenen Anteilen der Linse, die so reflektiert werden, dass die Verlaufsrichtung des reflektierten Bündels symmetrisch ist zum Verlauf des einfallenden Bündels, tragen ebenfalls bei entsprechendem Phasenverhältnis zum  $V(z)$ -Signal bei, da sie konstruktiv mit dem axialen Wellenanteil interferieren, soweit sie sich im Fokus in Phase mit diesem befinden. Diese Voraussetzung ist maximal für die symmetrischen Wellenverläufe im Linsenfokus gewährleistet. Bei einer Abstandsveränderung der Linse in axialer Richtung ( $z$ -Richtung) nehmen die positiven Interferenzen kontinuierlich ab, da die unterschiedlichen Wellenanteile durch die Abstandsveränderung in ein Phasenverhältnis destruktiver Interferenz zueinander geraten, bis mit noch weiterer  $z$ -Veränderung wieder ein relatives Phasenverhältnis von ganzzahligen Vielfachen von  $2\pi$  erreicht ist und sekundäre Nebenmaxima das Amplitudensignal bestimmen. Dies erklärt den charakteristischen periodischen Verlauf der  $V(z)$ -Kurven mit Abstandsänderung  $z$ .

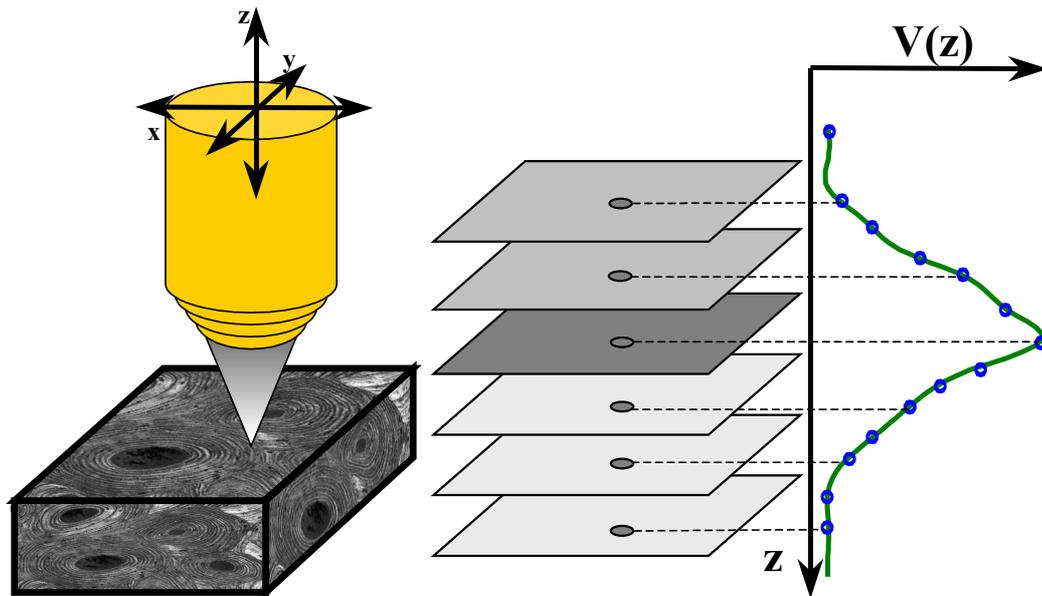


Abbildung 6: Bildentstehung durch den Scanvorgang in der Fokusebene und Signalabschwächung des  $V(z)$  Signals bei Defokussierung in  $z$ -Richtung [54]

Die Helligkeitsintensität des entstehenden Rasterbildes stellt die Intensität des elektronischen Eingangssignals dar, das die reflektierte Ultraschallwelle erzeugt, und hängt von dem Reflexionskoeffizienten  $R$  für die Probe an jeder gescannten Stelle ab. Nach Gleichung 3

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

$Z_1$ : Impedanz des Kopplungsmediums Wasser

$Z_2$ : Impedanz des Untersuchungsmediums Knochen

ist der Reflexionskoeffizient hier bei angenommener Konstanz für  $Z_1$  eine allein vom Untersuchungsmaterial abhängige Größe.

Die Gleichung 3 gilt unter der Voraussetzung, dass keine Scherwellen angeregt werden; von dieser Voraussetzung kann ausgegangen werden, wenn die Wellenfront senkrecht auf die Probenoberfläche auftrifft. Für diesen Fall wird das resultierende Reflexionssignal nur durch die Wechselwirkung der longitudinalen Schallwelle mit der Probenoberfläche an der Grenzfläche zum Kopplungsmedium Wasser bestimmt. Sobald man bei Abweichungen vom senkrechten Einfallswinkel einen kritischen Winkel überschreitet, werden zu der

longitudinalen Welle auch Scherwellen an der Probenoberfläche erzeugt, die zu Auslöschungsphänomenen führen aufgrund einer destruktiven Interferenz bei Phasenunterschieden der einzelnen Anteile des Wellenbündels. Das reflektierte Signal würde daher fälschlicherweise zu geringe Werte annehmen. Bei einem Einfallswinkel von weniger als  $10^\circ$  zum Lot ist hingegen gewährleistet, dass die in transversaler Richtung wirkende Komponente des Wellenvektors noch keine ausreichende Energie zur Erzeugung von Scherwellen besitzt und daher nicht berücksichtigt zu werden braucht.

Zusammen mit der Kenntnis der Pupillenfunktion und der Einstellungen für die Verstärkergrößen lassen sich die elastomechanischen Eigenschaften der untersuchten Probe bei geringen Einfallswinkeln dann quantitativ angeben. Die Erfüllung dieser Bedingung war bei den durchgeführten Messungen dadurch gewährleistet, dass mit Hilfe einer topographischen Mehrschichtbildanalyse [54] mit einem dazu entwickelten Bildanalyseprogramm nur die den genannten Bedingungen entsprechenden Anteile des Reflexionssignals in die quantitative Auswertung einbezogen wurden [54].

Aus diesen Bedingungen läßt sich schließlich die zu bestimmende Impedanz  $Z_1$  für den Knochen ermitteln. In dieser materialabhängigen Kenngröße sind die elastomechanischen Eigenschaften des Knochens über die Beziehung

$$\text{Gleichung 4: } Z_1 = \rho c \quad (\rho: \text{Massendichte; } c: \text{Schallgeschwindigkeit})$$

enthalten. Bei senkrechtem Einfall der Welle kann keine Scherwellenanregung erfolgen. Für isotrope Materialien lassen sich aus der Kenntnis der Impedanz die mechanische Größen Steifigkeit  $C$  und Young'scher Modul  $E$  nach den folgenden Gleichungen bestimmen:

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

$$\text{Gleichung 6: } E = \frac{C(1+\mu)(1-2\mu)}{(1-\mu)} = \rho c^2 \frac{(1+\mu)(1-2\mu)}{(1-\mu)}$$

$\mu$ : Poissonverhältnis aus Lateral- und Axialdehnung

In [54] beschreiben Raum et al., dass die Beziehungen für  $C$  und  $E$  von isotropen auf anisotrope Materialien ausgeweitet werden kann, wie es für kortikales Knochengewebe notwendig ist. Kennt man die Impedanz und die im Mikrostrukturbereich zum Beispiel nach [43] ermittelte Schallgeschwindigkeit im Zielgebiet des Knochens, kann man daraus die in

der Biomechanik gebräuchlichen Größen Steifigkeit  $C$  und Elastizitätsmodul  $E$  berechnen.

### **4.3 MATERIALEIGENSCHAFTEN DES EINBETTUNGSMEDIUMS**

Die Anfertigung planparalleler Untersuchungsobjekte ist durch die Einbettung in Methacrylat und anschließendes Schneiden, Schleifen und Polieren gewährleistet. Flüssiges monomeres Methylmethacrylat durchdringt Gewebe sehr gut. Durch Polymerisation entsteht daraus Plexiglas (Polymethylmethacrylat), dessen Härtegrad durch die Zugabe von Weichmachern variierbar ist. Dadurch eignet es sich zu weiteren Bearbeitung. Die Präparateimpedanz wird durch die Einbettung in PMMA nur gering erhöht [79].

## 5 Material und Methoden

### 5.1 PROBENGEWINNUNG

Die zur Untersuchung gelangten Gehörknöchelchen entstammen von Felsenbeinen, die bei Sektionen des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg entnommen wurden. Bei den zufällig ausgewählten Verstorbenen (17 Männer, 8 Frauen) im Alter von 38 bis 85 Jahren (mittleres Alter = 65,4 Jahre) konnte aufgrund der Autopsieberichte eine systemische Knochenerkrankung ausgeschlossen werden (Tabelle 1). Die Präparation der Felsenbeine mit Entnahme der Gehörknöchelchen erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle über einen enauralen bzw. retroaurikulären Zugang. Es wurden nur solche Gehörknöchelchen als gesund betrachtet, bei denen die mikroskopische Inspektion des Gehörganges, des Trommelfells und der Pauke ohne pathologischen Befund war.

### 5.2 EINBETTUNG IN PMMA UND BEARBEITUNG

Die Proben wurden direkt nach der Entnahme aus dem Felsenbein in 70%-tigem Ethanol fixiert, unter wiederholter Durchtränkung mit 70 %-tigem Ethanol dann aufsteigend in 96%igem und 100%igem Ethanol entwässert, in HistoClear®-Lösung (Xylol-Ersatz, 1,4-Dimethylbenzol) über 24 Stunden gereinigt und zur Polymerisation in Polymethylmethacrylat folgender Zusammensetzung eingebettet.

Über mehrere Tage erfolgte die Einbettung in 100 Vol.% Polymethacrylat mit 100 ppm Hydrochinon (Merck®). Danach wurden die Gehörknöchelchen über 24 Stunden in 90 Vol.% Polymethacrylat mit 10 Vol.% Dibutylphthalath und Zusatz von 1g Benzoylperoxid je 100 ml Ansatz gegeben. Bis zur Aushärtung erfolgte die Einbettung in 90 Vol.% Polymethacrylat mit 10 Vol.% Dibutylphthalath mit Zusatz von 3 g Benzoylperoxid je 100 ml Ansatzlösung.

Dibutylphthalath diente dabei als Weichmacher für die Proben, um Brüche bei der späteren Verarbeitung zu vermeiden. Benzoylperoxid initiiert die Polymerisation des für die Lagerung mittels Hydrochinon stabilisierten flüssigen Polymethacrylats.

Die langsame Aushärtung erfolgte im Glasröhrchen im Wasserbad bei Raumtemperatur in einem variablen Zeitraum zwischen 1 und 3 Monaten, um eine luftfreie Polymerisation zu gewährleisten. Das beschriebene Verfahren führt zu haltbarem, nicht entkalktem Knochengewebe [57].

Die aus dem Glasröhrchen gelösten Blöcke wurden mit einem rotierenden EXAKT®-Schleifgerät, das über eine horizontal oszillierende Vakuumprobenhalterung verfügt, mit

Schleifpapier der Körnung 1200-2400-4000 bearbeitet. Dadurch wurde eine weitgehende Planparallelität der Präparate erreicht. Unmittelbar vor der Ultraschalluntersuchung wurde die Probenoberfläche mit Diamantpaste der Körnung 1  $\mu\text{m}$  und 0,25  $\mu\text{m}$  am Handschleifgerät der Firma Stuers, Dänemark, poliert und mit einem in Wasser und Ethanol getränkten Tupfer gereinigt (Abbildung 7).

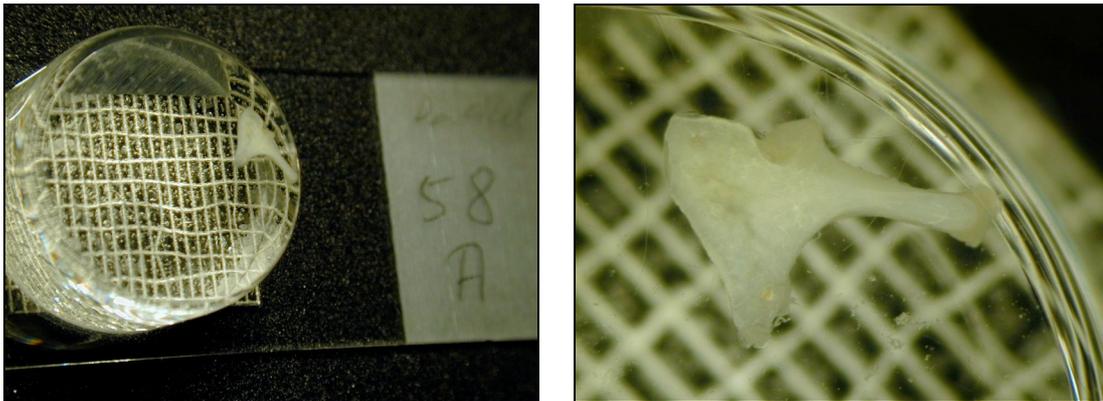


Abbildung 7: In PMMA eingebetteter Amboss

### 5.3 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM 100

Die Probe wird mit einer im temperierbaren Wasserbad befindlichen Haltevorrichtung fixiert. Die akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 100 (Abbildung 8) erfolgt in Reflexion mit einer sphärischen Linse, die mit einer elektronisch gesteuerten Scaneinrichtung (Scanner) in einem bidestillierten entgasten Wasserbad über die Probe geführt wird. Das Signal wird von einem Panametricswandler V2324 im Puls-Mode ausgesendet. Die Pulsdauer beträgt ca. 200 ns. Die Fokussierung erfolgt unter Kontrolle des Reflexsignals auf dem Bildschirm. Das reflektierte Signal wird in einem Echoverstärker mit großer Bandbreite aufgenommen. Es wurde eine Messung im Fokus durchgeführt. Die mit diesem Gerät erreichte laterale Auflösung liegt bei 25 MHz und 25 °C bei ca. 150  $\mu\text{m}$ . Die Bildgröße beträgt dabei 10x10 mm.



Abbildung 8: Das akustische Rastermikroskop KSI SAM 100

#### 5.4 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM 2000

Die akustische Rastermikroskopie in Reflexion erfolgte bei dem KSI SAM 2000 mit einer Saphir ( $\text{SnO}_2$ )-Linse, die mit Hilfe einer elektronisch gesteuerten Scaneinrichtung rasterförmig über die zu untersuchende Probe geführt wird (Abbildung 9.)

Die Linse hat eine Bandbreite von 0,8-1,2 GHz und einen halben Öffnungswinkel von  $50^\circ$ . Der Linsenkrümmungsradius beträgt 0,1 mm. Die Linse ist mit einer Kalk-Glas-Schicht versehen, um den Impedanzsprung und damit die Wellenreflexion von Linse zu Kopplungsmedium zu verringern. Ein ZnO-Kristall dient als piezoelektrischer Wandler an der planaren Gegenseite der Linse. Das Signal wird im Burst-Mode ausgesendet. Die Pulsdauer beträgt dabei ca. 20 ns. Die Empfangszeit ist durch ein Zeitfenster auf 30 ns begrenzt. Das reflektierte Signal wird in einem Echoverstärker (Dioden-Detektor) mit großer Bandbreite, der gegen emittierte RF-Signale aus Umschaltvorgängen abgeschirmt ist, aufgenommen.

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wird die Probe auf dem horizontal verschiebbaren Probentisch fixiert und anschließend die akustische Linse über die Probe geschwenkt. Die Fokussierung erfolgt unter Amplitudenkontrolle des Reflexsignals auf dem Bildschirm. Im Fokus beträgt der Linsen-Probenabstand etwa  $46 \mu\text{m}$ . Die Messungen wurden in ca.  $1 \mu\text{m}$  Abständen in positiver und negativer z-Position vom Fokus (Multi-Layer-Analysis [54]) bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz und  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt. Unter diesen Untersuchungsbedingungen wird eine laterale Auflösung von ca.  $1,1 \mu\text{m}$  erreicht. Die Bildgröße beträgt dabei  $1 \times 1 \text{ mm}$ .

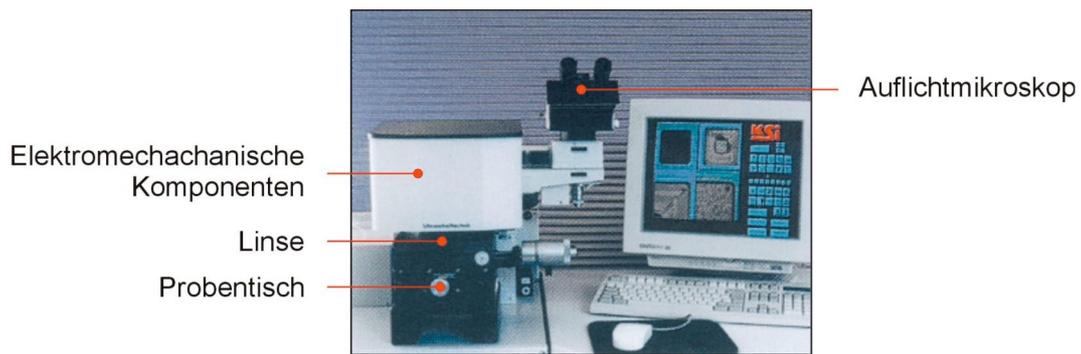


Abbildung 9: Das akustische Rastermikroskop KSI SAM 2000

### 5.5 BESTIMMUNG DER MESSPUNKTE FÜR DIE AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE

Das akustische Rastermikroskop KSI SAM 2000 gestattet einen maximalen Messbereich von 1x1 mm pro Messung. Die Präparatoberfläche wurde in 1 mm<sup>2</sup> großen Messflächen systematisch abgescannt. Bei Messungen mit dem akustischen Rastermikroskop KSI SAM 100 konnte die gesamte Präparatoberfläche bei einem Messbereich von 10x10 mm im Ganzen untersucht werden.

Es erfolgte die Bestimmung der akustischen Impedanz vom gesamten Gehörknöchelchenanschnitt und von definierten Regionen. Die Einteilung in Regionen erfolgte aufgrund von anatomischen Strukturen (Abbildung 10). Der Hammer wurde in Region 1 (Caput) und in Region 2 (Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium) unterteilt. Die Messwerte vom Amboß wurden ebenfalls 2 Regionen zugeordnet. Region 1 entsprach dem Corpus und Crus breve, Region 2 dem Crus longum und Processus lenticularis. Im Steigbügel entsprachen jeweils Caput, Crus anterior, Crus posterior und Basis einer Region.

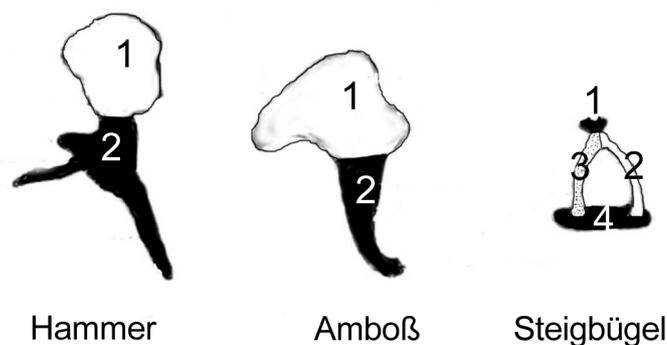


Abbildung 10: Einteilung der Gehörknöchelchen in Regionen

---

<i>Hammer</i>	<i>Region 1</i>	<i>Caput</i>
	<i>Region 2</i>	<i>Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium</i>
<i>Amboss:</i>	<i>Region 1</i>	<i>Corpus, Crus breve</i>
	<i>Region 2</i>	<i>Crus longum, Processus lenticularis</i>
<i>Steigbügel</i>	<i>Region 1</i>	<i>Caput</i>
	<i>Region 2</i>	<i>Crus posterius</i>
	<i>Region 3</i>	<i>Crus anterior</i>
	<i>Region 4</i>	<i>Basis</i>

## 5.6 OFF-LINE SIGNALVERARBEITUNG

Die quantitative Bestimmung der Knochenimpedanzen erfolgte mit der durch Raum et al. [54] am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelten Software unter Matlab 5.2.

Für die quantitative Impedanzbestimmung ist es erforderlich, dass sich die Oberfläche des Objektes an jedem Bildpunkt im Fokus befindet, damit die komplexe Reflektanzfunktion durch den Reflexionskoeffizienten ersetzt werden kann. Diese Bedingungen werden bei der Herstellung der Proben nicht immer erreicht, da durch die mechanische Behandlung (Schleifen, Polieren) z.B. weichere Materialien stärker abgetragen werden und Apatitkristalle aus dem Kollagenverbund herausgerissen werden können. Dies kann zu einer stärkeren Oberflächenunebenheit führen.

Um sicherzustellen, dass sich die Oberfläche an jedem zur Auswertung herangezogenen Objektpunkt im Fokus befindet, wurde eine Schichtbildanalyse (Multi-Layer-Analysis) vom IMPB entwickelt und damit die topographischen Einflüsse auf die Messung der Probenimpedanz kompensiert. Bei deutlich positiver Defokussierung aller Messpunkte wurden in Abständen von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  Bilder aufgenommen, bis an jedem Bildpunkt eine deutlich negative Defokussierung auftrat. Dadurch war sichergestellt, dass jeder Objektpunkt

---

durch den Fokus der Linse (Maximalwert) gewandert ist. Durch die Bestimmung dieser Werte an allen Objektpunkten kann man die Topographie und die topographiekorrigierte Maximalwertverteilung (sogenanntes Maximumbild) erhalten. Die so ermittelten Werte wurden für die Impedanzbestimmung nach Gleichung 3 herangezogen. Durch Algorithmen der Software konnten die Impedanzwerte Punkt für Punkt berechnet und Effekte durch Kanten, lokale Oberflächenneigungen, Störungen an Grenzflächen mit hohen Impedanzunterschieden und Über- oder Untersteuerung des Signals ausgeschlossen werden. Jedem Impedanzwert wurde in der bildlichen Darstellung eine Farbe zugeordnet. Bildbereiche, die nur aus dem Einbettungsmedium PMMA bestanden (z.B. Randzonen, mit PMMA aufgefüllte Volkmann- und Havers-Kanäle) wurden durch eine Ausschlussmaske bei der Knochenimpedanzberechnung nicht berücksichtigt [54]. Zur Kalibrierung der temperaturabhängigen Schalldämpfung erfolgte an Referenzproben (PMMA, Suprasil®, Polycarbonat) die Dichtebestimmung nach der Auftriebsmethode und Bestimmung der Schallgeschwindigkeit durch Puls-Echo-Laufzeitmessungen. Diese Werte wurden zur Impedanzberechnung verwendet. Als Referenzsignal wurde das Linsenecho bei bekannten Verstärkereinstellungen über einen relevanten Temperaturbereich erfasst und in einer Kalibrierungskurve aufgezeichnet.

Die statistische Auswertung (einfaktorielle Varianzanalyse) erfolgte mit Origin 6.0 OG Professional .

## 6 Ergebnisse

### 6.1 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM 100

#### 6.1.1 Untersuchungen am Hammer

##### 6.1.1.1 Qualitative Analyse

Es wurde von 17 Hämmern die Maximalwert- und Impedanzwertverteilung bei einer Ultraschallfrequenz von 25 MHz ermittelt. Abbildung 11 veranschaulicht die typische Verteilung der Maximalwerte des reflektierten Schalls in einem Hammerschnitt. Bereiche mit einer starken Reflexion der Ultraschallwellen sind hell und Abschnitte mit einer geringeren Reflexion dunkel dargestellt. Der Hintergrundgrauton ist ein Maß für die akustische Reflexion des Einbettungsmediums PMMA. Abbildung 12 zeigt die aus den Maximalwerten berechnete Verteilung der akustischen Impedanzwerte. Bereiche höherer akustischer Impedanz, z.B. im Bereich des Hammerkopfes, sind im roten Farbton dargestellt. Im Bereich des Hammergriffes sind Abschnitte mit niedriger akustischer Impedanz sichtbar (hellblauer Farbton).

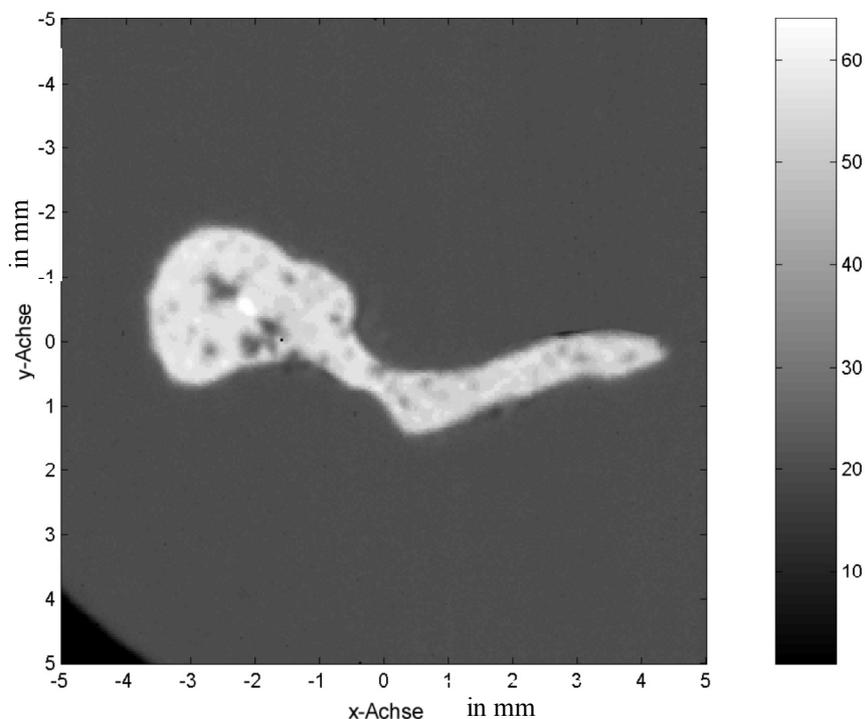


Abbildung 11: *Maximalwertverteilung in einem Hammerschnitt in Grauwerten (willkürliche Skala)*

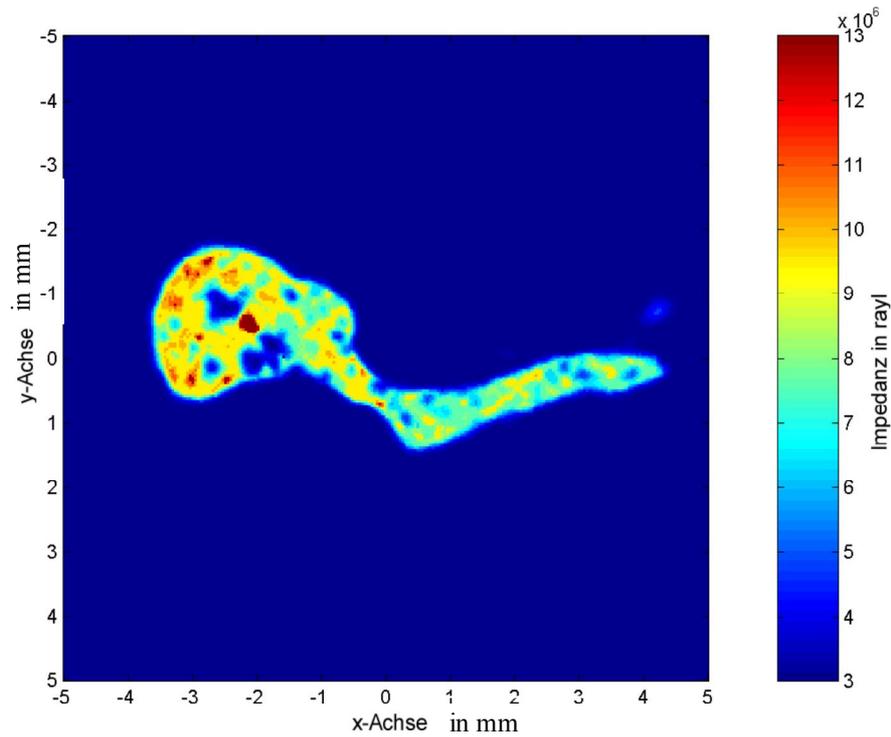


Abbildung 12: Impedanzwertverteilung in einem Hammerschnitt

### 6.1.1.2 Quantitative Analyse

Mit Hilfe der vom IMPB entwickelten Software wurden die Impedanzmittelwerte für die Schnittflächen durch den gesamten Hammeranschnitt, Region 1 (Caput) und Region 2 (Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium) ermittelt. In Diagramm 1 ist die Verteilung der Messwerte für die einzelnen Regionen dargestellt.

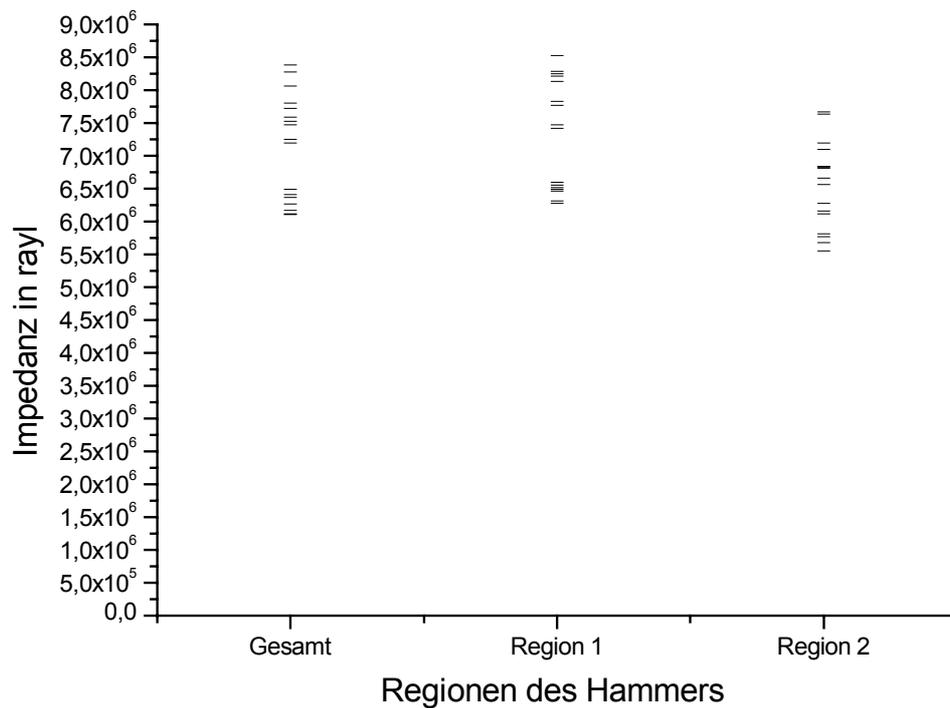


Diagramm 1: Punktdiagramm der Hammermesswerte

Die mittlere akustische Impedanz der gesamten Hammerschnittfläche betrug  $(7,13 \pm 0,80)$  Mrayl. Für Region 1 wurde eine mittlere akustische Impedanz von  $(7,42 \pm 0,91)$  Mrayl und für Region 2 eine mittlere akustische Impedanz von  $(6,5 \pm 0,65)$  Mrayl ermittelt. Der Unterschied der Impedanzmittelwerte für Region 1 und 2 war statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p=0,003$ ). In Diagramm 2 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für den gesamten Hammeranschnitt und die verschiedenen Regionen des Hammers dargestellt.

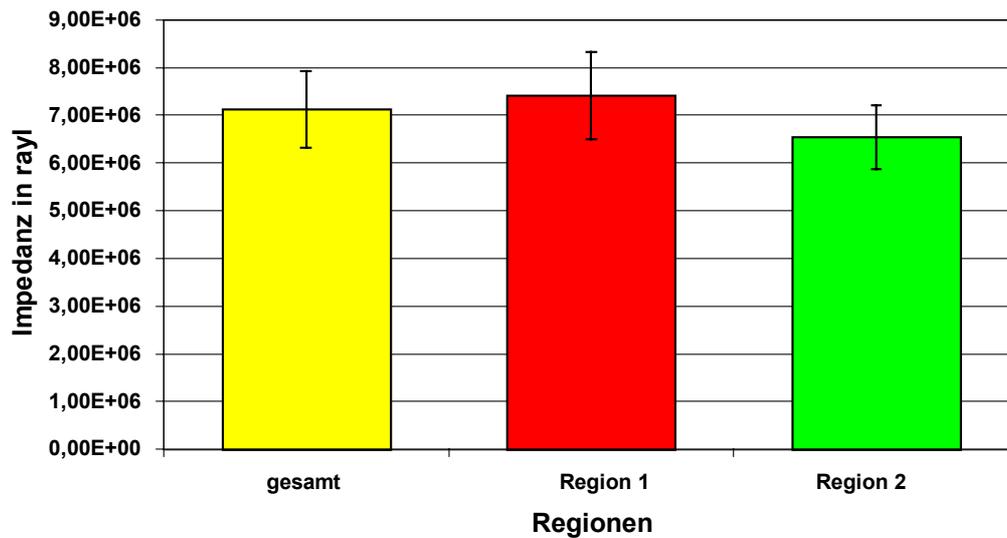


Diagramm 2: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Hammers ( $n=17$ )

Zur Untersuchung einer Altersabhängigkeit der akustischen Impedanz erfolgte die Einteilung in drei Altersklassen.

Klasse I:	< 60 Jahre	7 Messungen
Klasse II:	60-70 Jahre	6 Messungen
Klasse III:	>70 Jahre	3 Messungen

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen den Altersklassen war nicht feststellbar (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p>0,1$ ).

## 6.1.2 Untersuchungen am Amboss

### 6.1.2.1 Qualitative Analyse

Es wurde von 19 Ambossen die Verteilung der Maximal- und Impedanzwerte bei einer Ultraschallfrequenz von 25 MHz ermittelt. Abbildung 13 verdeutlicht die Maximalwertverteilung des reflektierten Schalls in einem typischen Ambosslängsschnitt. Bereiche mit einer starken Reflektion der Ultraschallwellen sind hell und Abschnitte mit einer geringeren Reflektion dunkel dargestellt, wie sie z. B. im Bereich des Crus breve und Corpus zu sehen sind. Der Hintergrundgrauon wird durch das Einbettungsmedium PMMA

hervorgehoben. Abbildung 14 zeigt das aus dem Maximalwertbild ermittelte Impedanzverteilungsbild. Bereiche höherer Impedanz (roter Farbton, akustische Impedanz ca. 12 Mrayl) finden sich z. B. im Bereich des Crus breve.

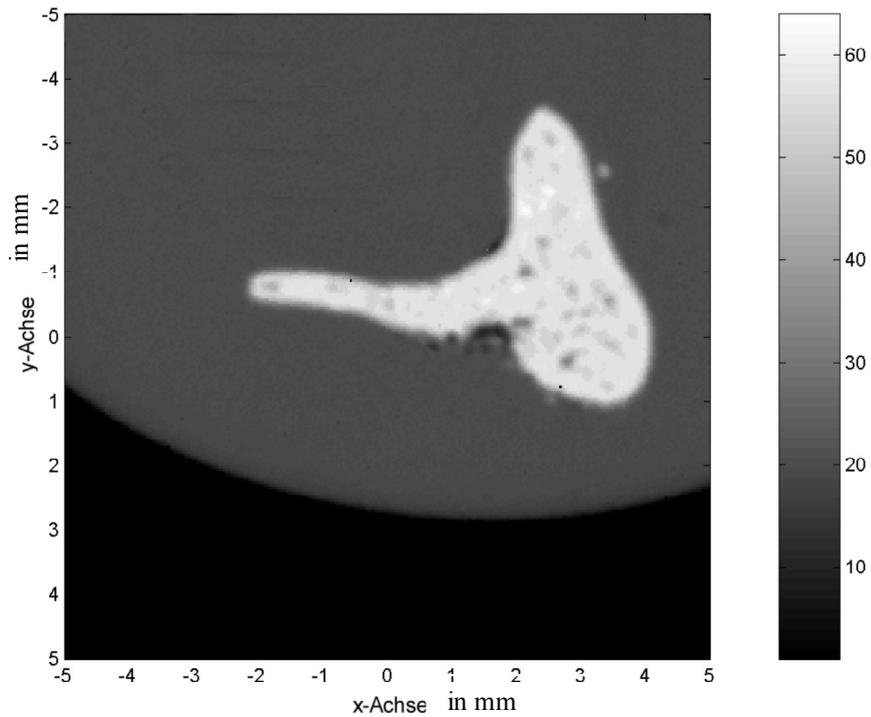


Abbildung 13: *Maximalwertverteilung in einem Ambosschnitt in Grauwerten (willkürliche Skala)*

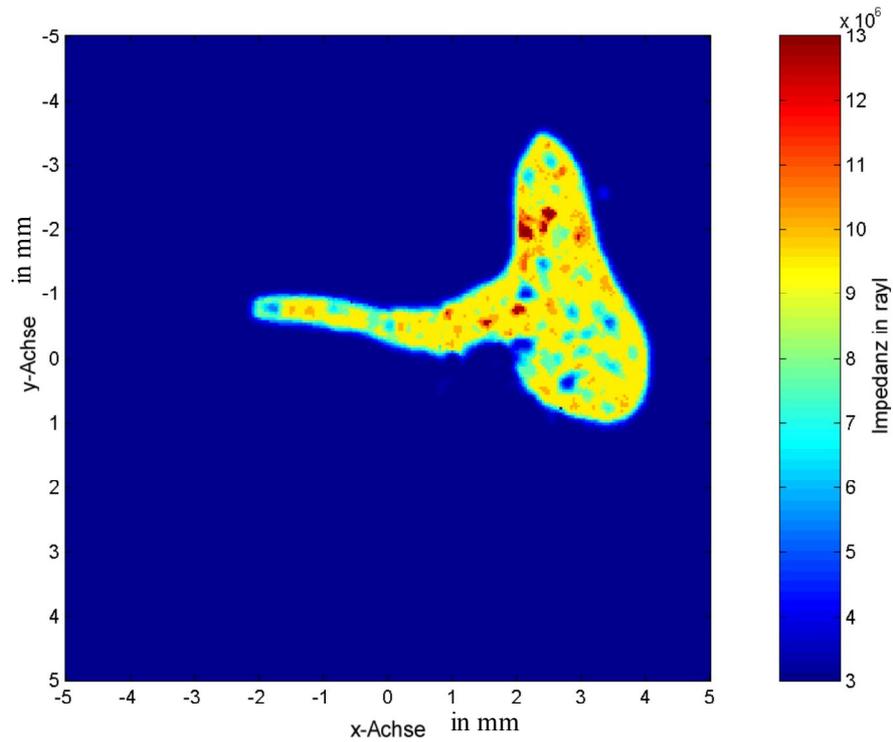


Abbildung 14: Impedanzverteilung in einem Ambossschnitt

### 6.1.2.2 Quantitative Analyse

Es wurden von 19 Ambossen die Impedanzmittelwerte bei einer Ultraschallfrequenz von 25 MHz ermittelt. In Diagramm 3 ist für die einzelnen Präparate die akustische Impedanz in rayl als Punktdiagramm dargestellt.

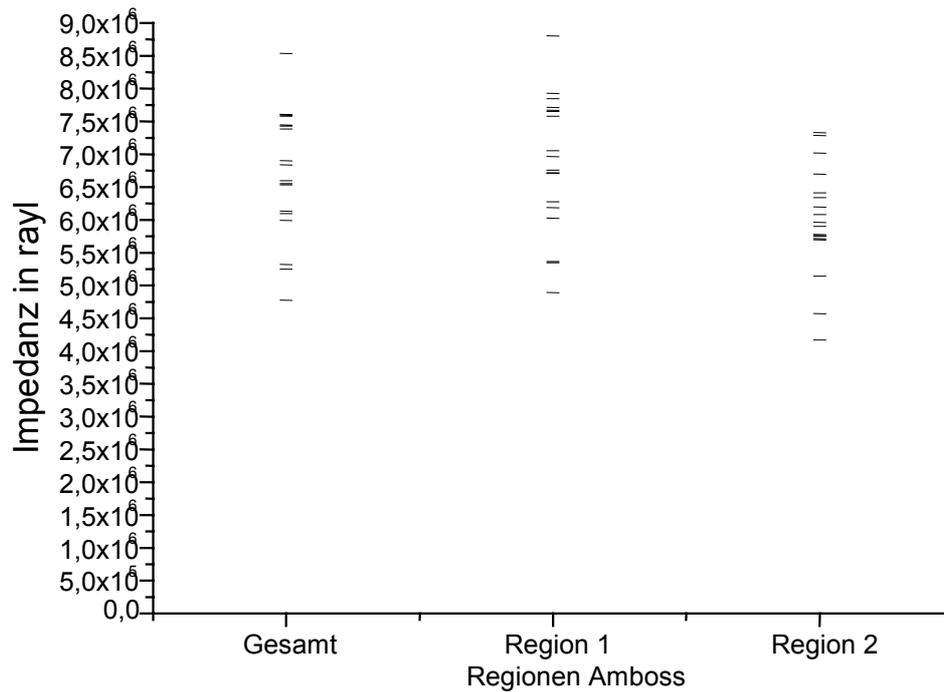


Diagramm 3: Punktdiagramm der Ambossmesswerte

Die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung von 19 Ambossen zeigt Diagramm 4. Dabei betrug der Mittelwert der akustischen Impedanz der gesamten Ambossschnittfläche ( $6,74 \pm 0,97$ ) Mrayl, für Region 1 (Corpus, Crus breve) ( $6,90 \pm 1,03$ ) Mrayl und für Region 2 (Crus longum, Processus lenticularis) ( $6,04 \pm 0,84$ ) Mrayl. Der Unterschied der Impedanzmittelwerte von Region 1 und Region 2 war statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p=0,008$ ).

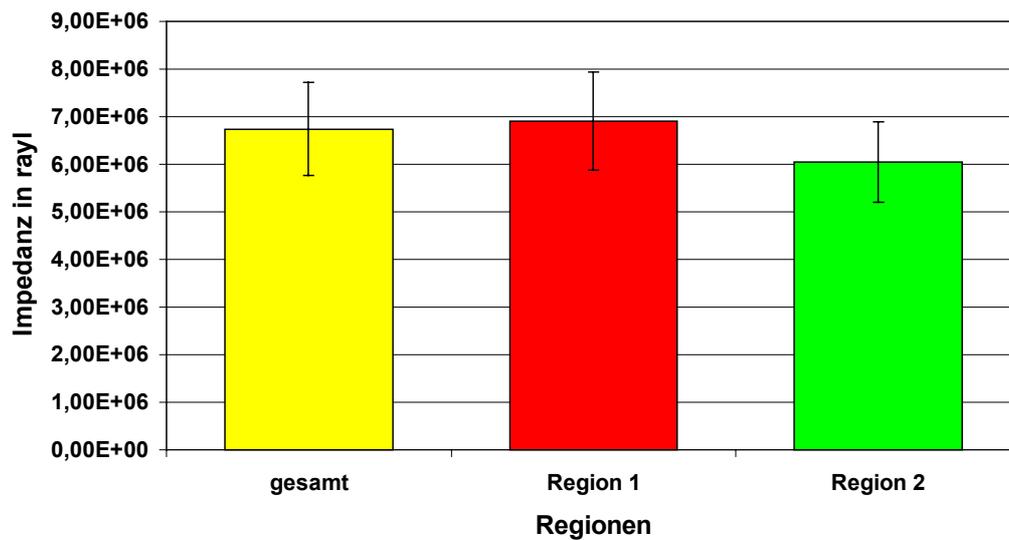


Diagramm 4: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Amboss (n=19)

Zur Untersuchung einer Altersabhängigkeit der akustischen Impedanz erfolgte die Einteilung in drei Altersklassen.

Klasse I:	< 60 Jahre	8 Messungen
Klasse II:	60-70 Jahre	7 Messungen
Klasse III:	>70 Jahre	5 Messungen

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen den Altersklassen war nicht feststellbar (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p > 0,6$ ).

### 6.1.3 Untersuchungen am Steigbügel

#### 6.1.3.1 Qualitative Analyse

Es wurde von 5 Steigbügeln die Maximalwert- und Impedanzwertverteilung ermittelt und graphisch dargestellt. In Abbildung 15 ist die Maximalwertverteilung eines typischen Steigbügels zu sehen. Hellere Farbtöne findet man im Bereich der Fußplatte, welche dort auf eine starke Reflexion der Schallwellen hinweisen. In Abbildung 16 sieht man die Impedanzwertverteilung in diesem Steigbügel. Höhere akustische Impedanzen (gelber Farbton, ca. 10 Mrayl) findet man z.B. im Bereich der Fußplatte.

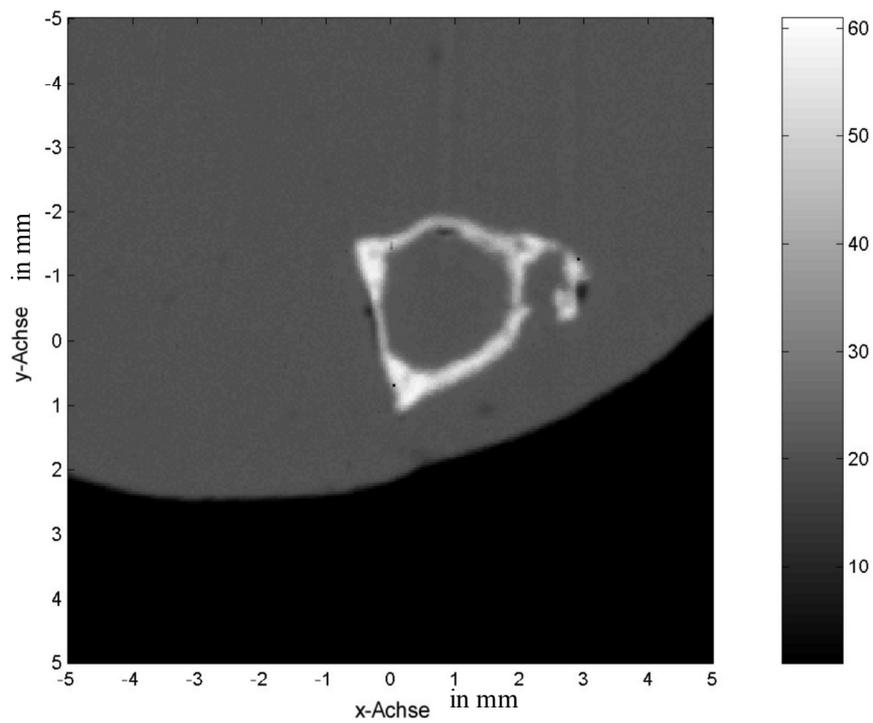


Abbildung 15: Maximalwertverteilung in einem Steigbügelschnitt in Grauwerten (willkürliche Skala)

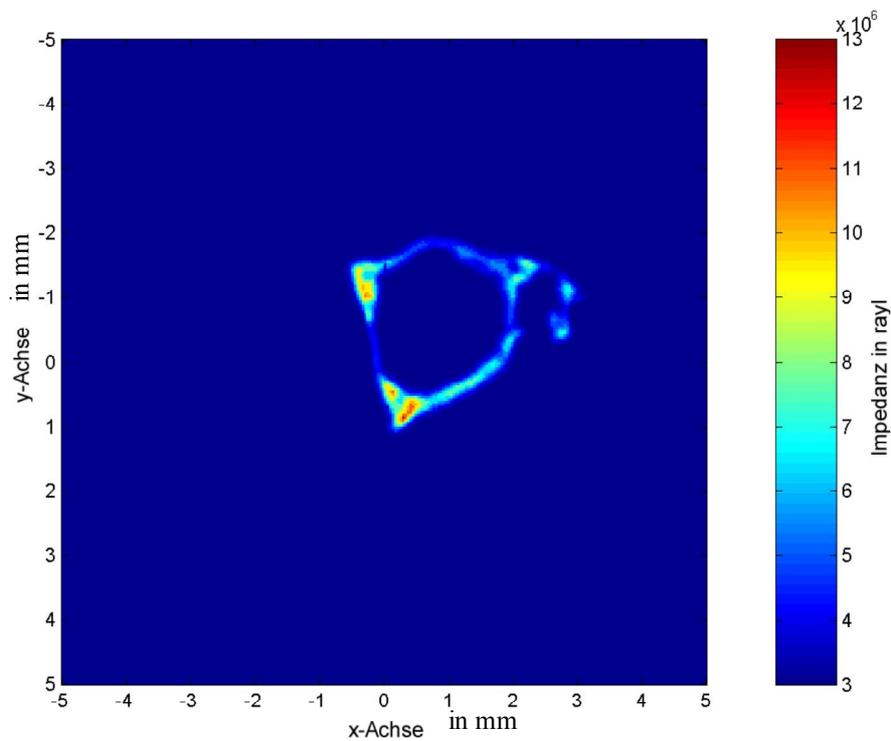


Abbildung 16: Impedanzverteilung in einem Steigbügelschnitt

### 6.1.3.2 Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte von 5 gesunden Steigbügelschnitten ermittelt. In Diagramm 5 ist die akustische Impedanz in rayl für die einzelnen Präparate als Punktdiagramm dargestellt.

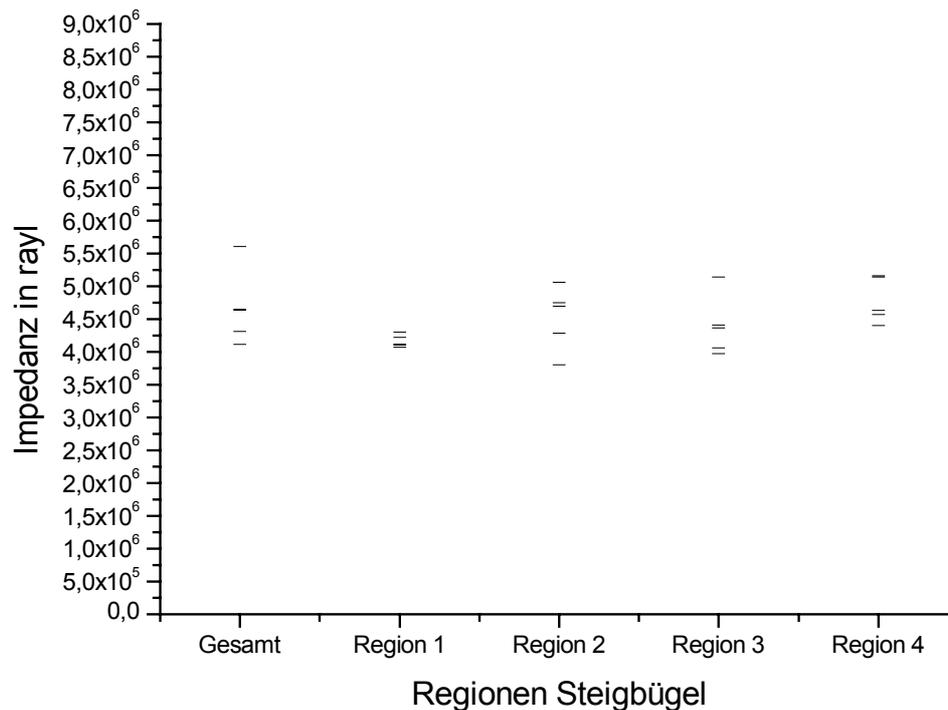


Diagramm 5: Punktdiagramm der Steigbügelmesswerte

Die daraus errechneten Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die einzelnen Regionen des Steigbügels zeigt Diagramm 6. Für die gesamten Steigbügelschnitte wurde eine mittlere akustische Impedanz von  $(4,67 \pm 0,57)$  Mrayl ermittelt. Für Region 1 (Caput) betrug die mittlere akustische Impedanz  $(4,16 \pm 0,01)$  Mrayl, für Region 3 (Crus anterior)  $(4,39 \pm 0,65)$  Mrayl, für Region 2 (Crus posterior)  $(4,52 \pm 0,65)$  Mrayl und für Region 4 (Basis)  $(4,78 \pm 0,54)$  Mrayl. Statistisch signifikant war nur der Unterschied der akustischen Impedanz zwischen Region 1 (Caput) und Region 4 (Basis) (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p=0,005$ ). Eine Untersuchung der Altersabhängigkeit der akustischen Impedanz war aufgrund der geringen Präparateanzahl nicht möglich.

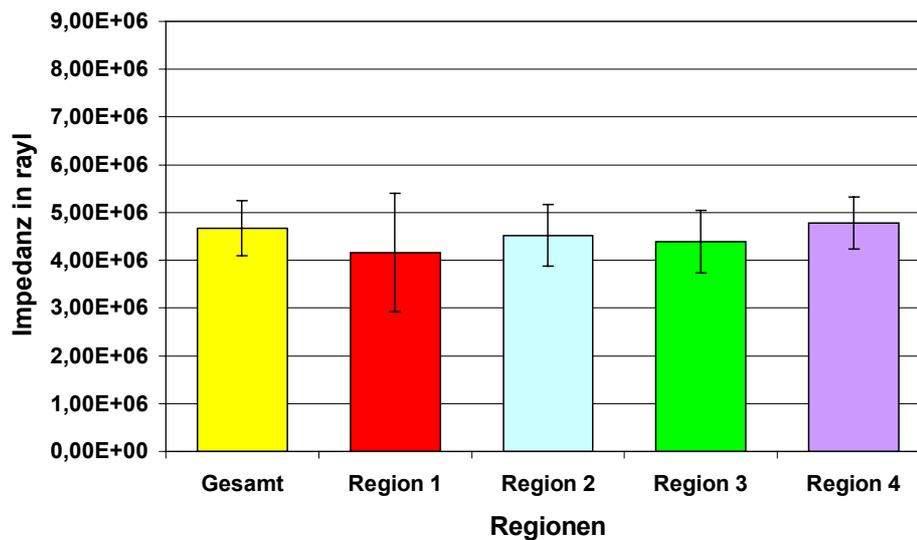


Diagramm 6: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Steigbügels ( $n=5$ )

## 6.2 AKUSTISCHE RASTERMIKROSKOPIE MIT DEM KSI SAM 2000

### 6.2.1 Untersuchungen am Hammer

#### 6.2.1.1 Qualitative Analyse

Es wurde mit dem Multi-Layer-Verfahren die Impedanzwertverteilung in einem Hammer bei 900 MHz ermittelt. Abbildung 17 bis Abbildung 20 zeigen repräsentative Bereiche (Caput, Collum, Hammer-Amboss-Gelenk und Manubrium) als Impedanzverteilungsbild. Bereiche höherer akustischer Impedanz sind im gelben und roten Farbton abgebildet (akustische Impedanz von ca. 4 Mrayl). Das Einbettungsmedium PMMA, welches am Rand und in den Lakunen sichtbar ist, weist eine akustische Impedanz von ca. 2,7 Mrayl auf.

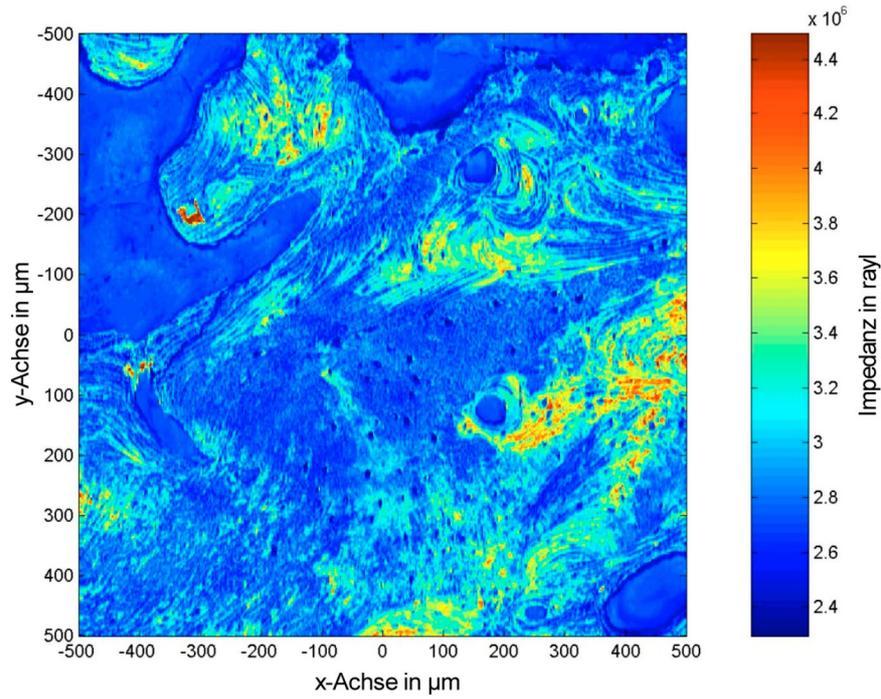


Abbildung 17: Impedanzverteilung, Ausschnitt Caput

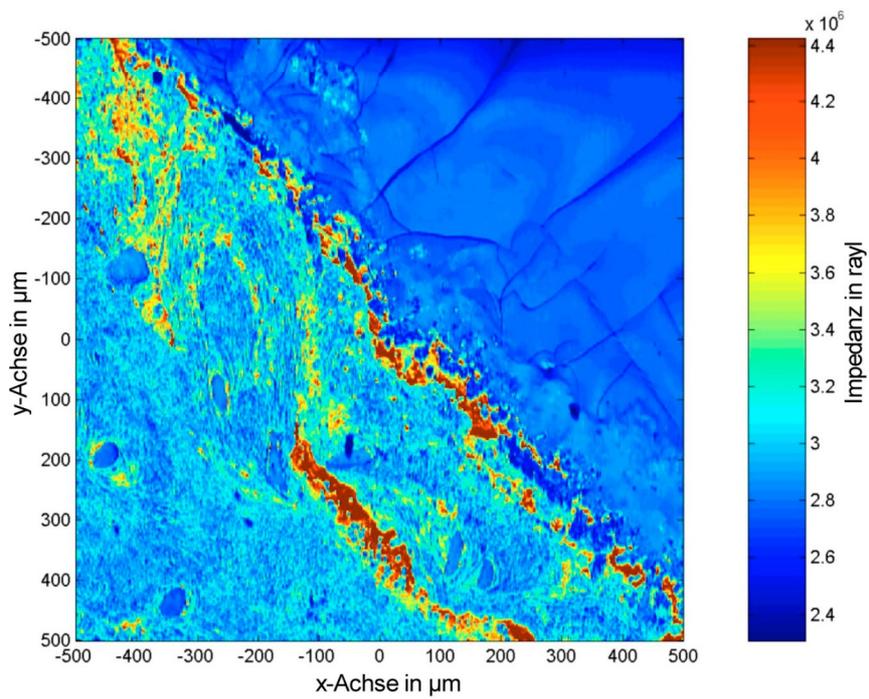


Abbildung 18: Impedanzverteilung, Articulatio incudomallearis

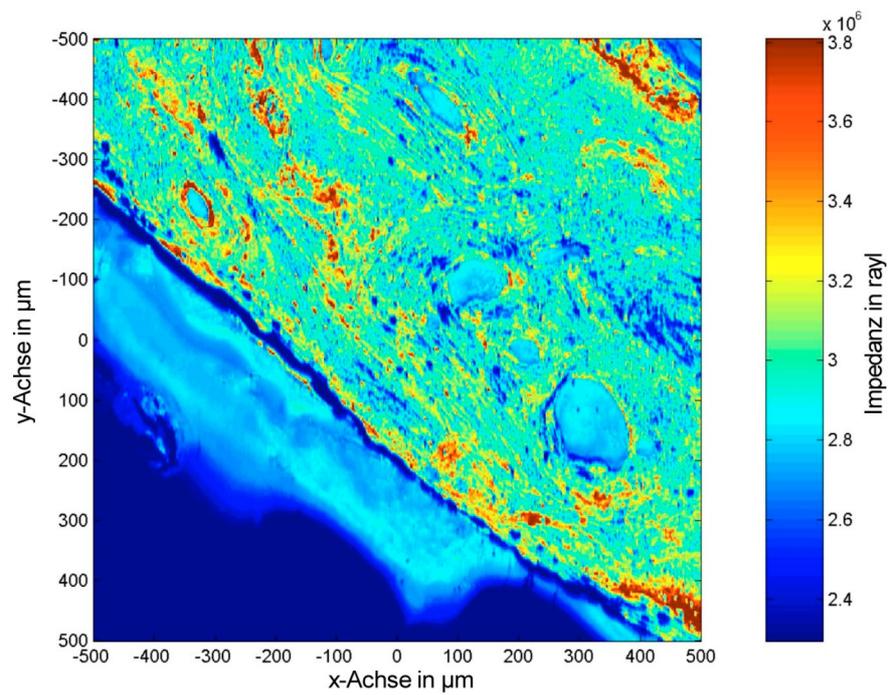


Abbildung 19: Impedanzverteilung, Ausschnitt Collum

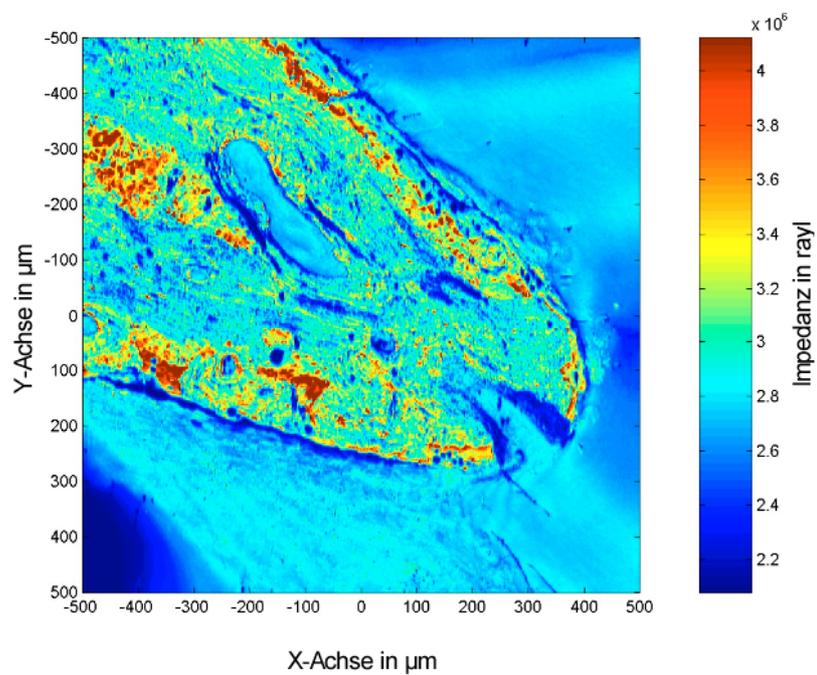


Abbildung 20: Impedanzverteilung, Ausschnitt Manubrium

### 6.2.1.2 Quantitative Analyse

Mit Hilfe der am IMPB entwickelten Software wurden die Impedanzmittelwerte für die Schnittflächen durch den gesamten Hammer, Region 1 (Caput) und Region 2 (Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium) ermittelt. In Diagramm 7 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Hammers dargestellt. Dabei betrug die akustische Impedanz der gesamten Hammerlängsschnittfläche ( $3,23 \pm 0,28$ ) Mrayl. Für Region 1 wurde ein Mittelwert der akustischen Impedanz von ( $3,42 \pm 0,30$ ) Mrayl und für Region 2 von ( $3,06 \pm 0,12$ ) Mrayl ermittelt. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen Region 1 und Region 2 (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p < 0,05$ ).

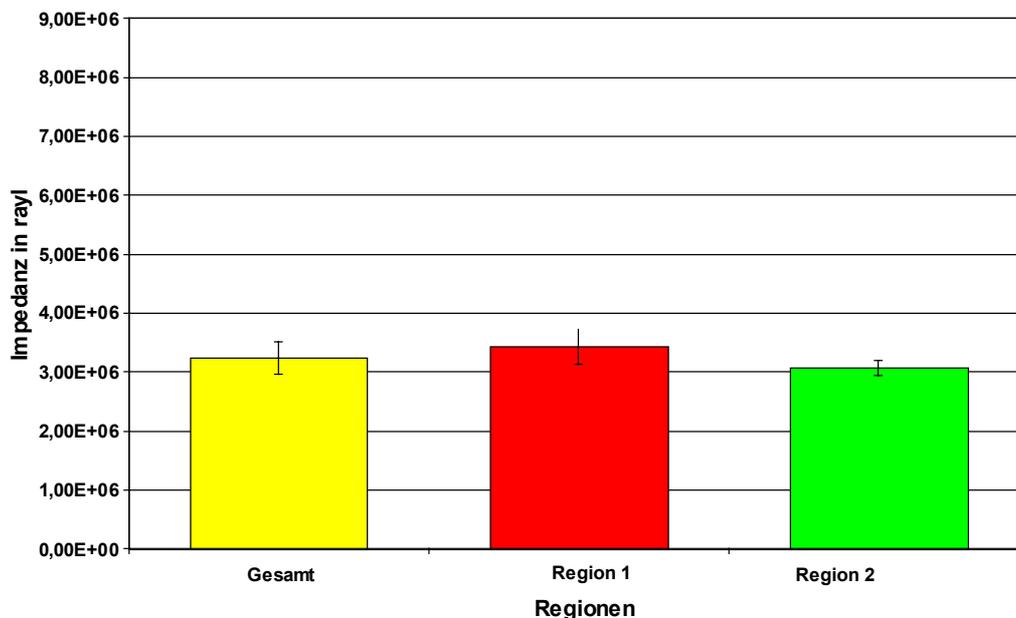


Diagramm 7: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Hammers (bei 900 MHz)

## 6.2.2 Untersuchungen am Amboss

### 6.2.2.1 Qualitative Analyse

Es wurde mit dem Multi-Layer-Verfahren die Impedanzwertverteilung in einem Amboss bei 900 MHz ermittelt.

Abbildung 21 bis Abbildung 24 zeigen die Verteilung der akustischen Impedanzwerte. Bereiche höherer akustischer Impedanz sind im gelben und roten Farbton abgebildet

---

(akustische Impedanz von ca. 4 Mrayl). Das Einbettungsmedium PMMA, welches am Rand in den Lakunen sichtbar ist, weist eine akustische Impedanz von ca. 2,7 Mrayl auf.

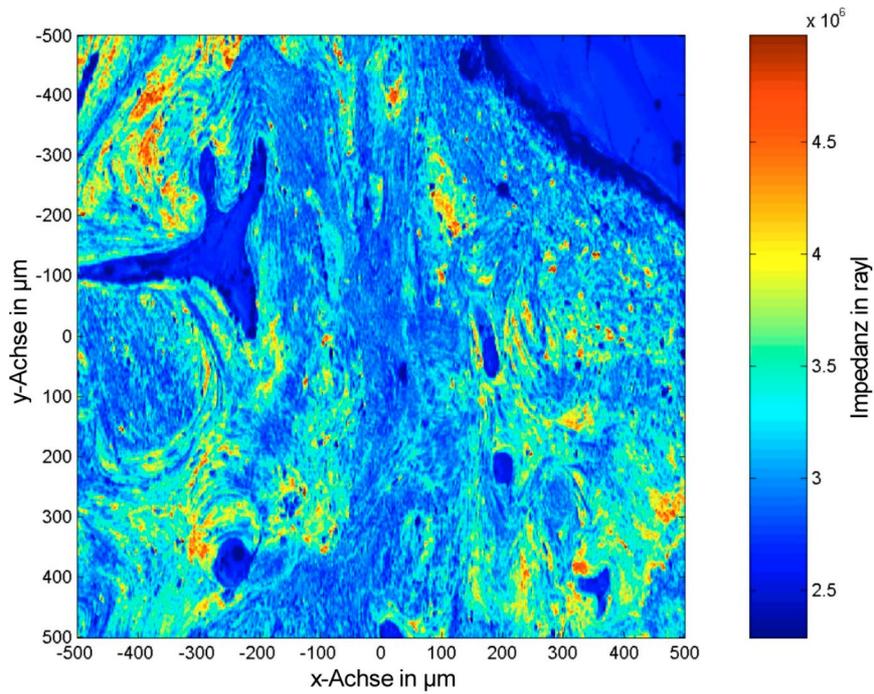


Abbildung 21: Impedanzverteilung, Ausschnitt Corpus

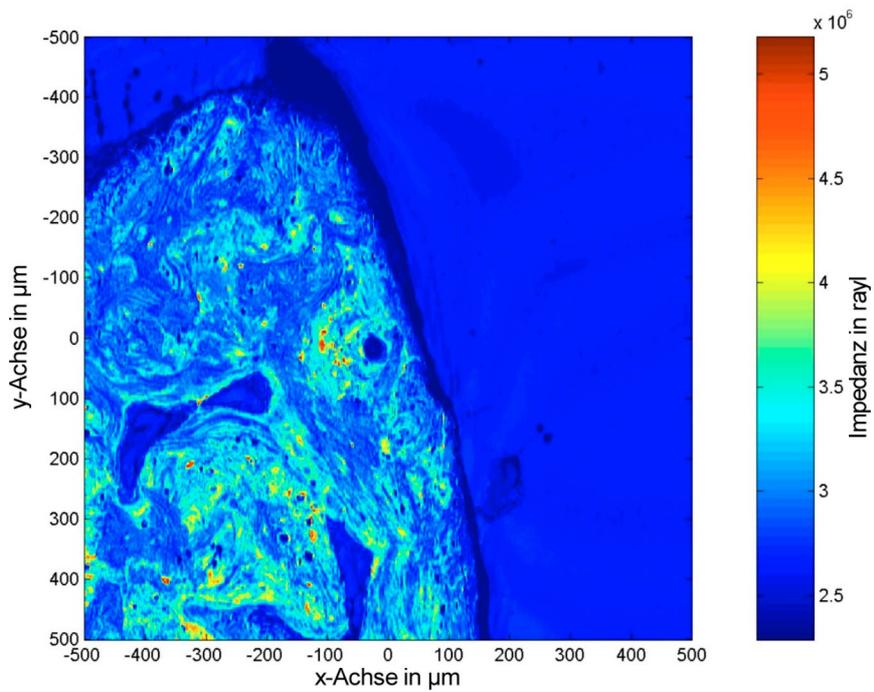


Abbildung 22: Impedanzverteilung, Ausschnitt Crus breve

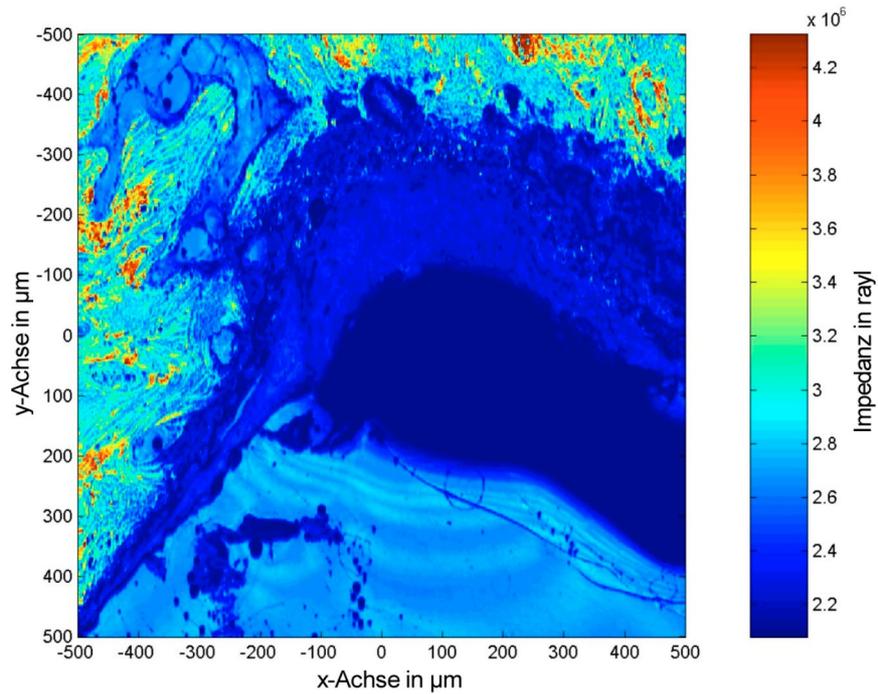


Abbildung 23: Impedanzverteilung, Ausschnitt Articulatio incudomallearis

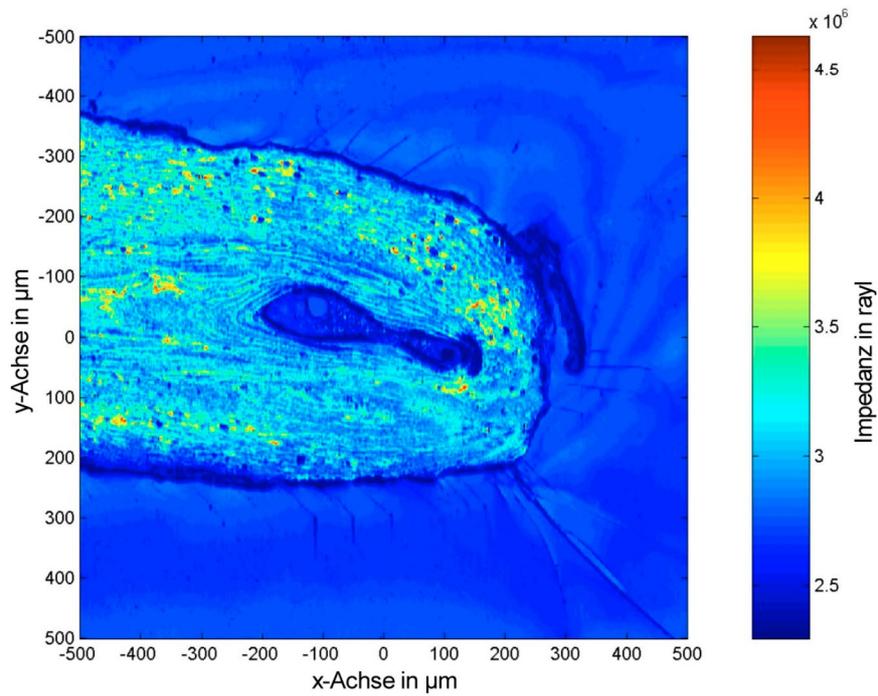


Abbildung 24: Impedanzverteilung, Ausschnitt Crus longum

### 6.2.2.2 Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte für die Schnittfläche durch den gesamten Amboss, Region 1 (Corpus, Crus breve) und Region 2 (Crus longum, Processus lenticularis) bestimmt.

In Diagramm 8 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Amboss dargestellt. Die akustische Impedanz betrug bei 900 MHz für die gesamte Ambossschnittfläche ( $3,66 \pm 0,37$ ) Mrayl. Für Region 1 wurde eine akustische Impedanz von ( $3,87 \pm 0,27$ ) Mrayl und für Region 2 von ( $3,31 \pm 0,03$ ) Mrayl ermittelt. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte zwischen Region 1 und 2 festgestellt (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p < 0,001$ ).

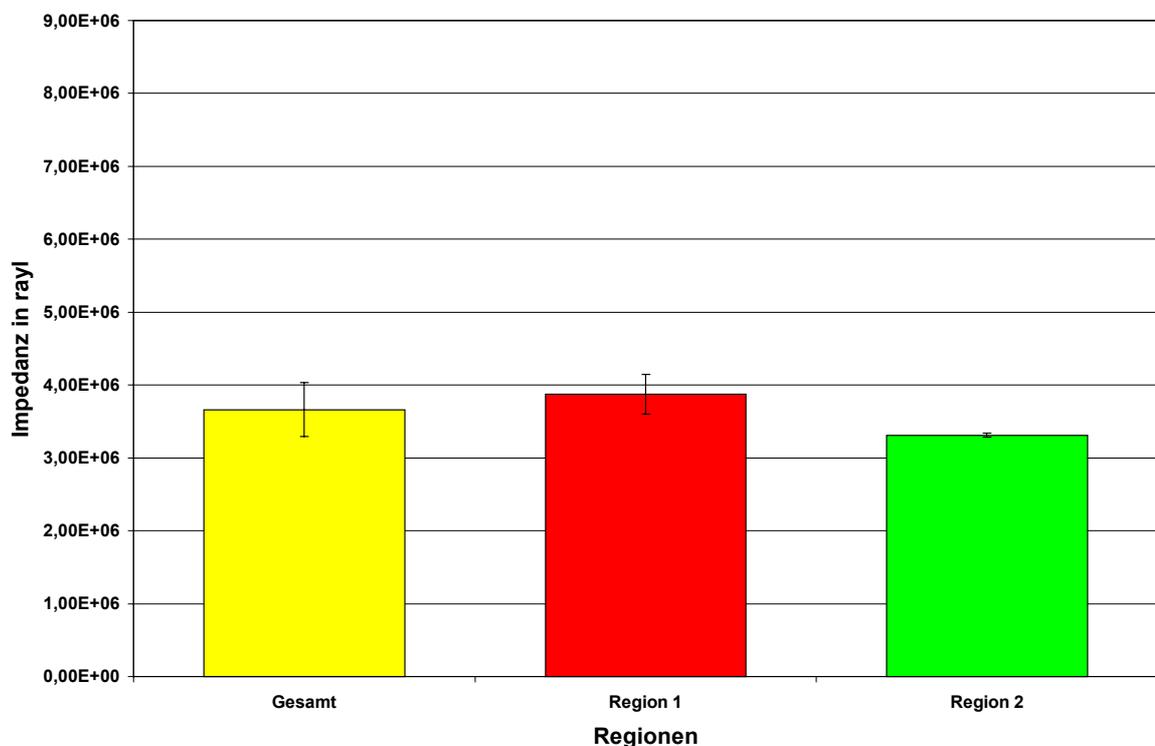


Diagramm 8: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Ambosses (bei 900 MHz)

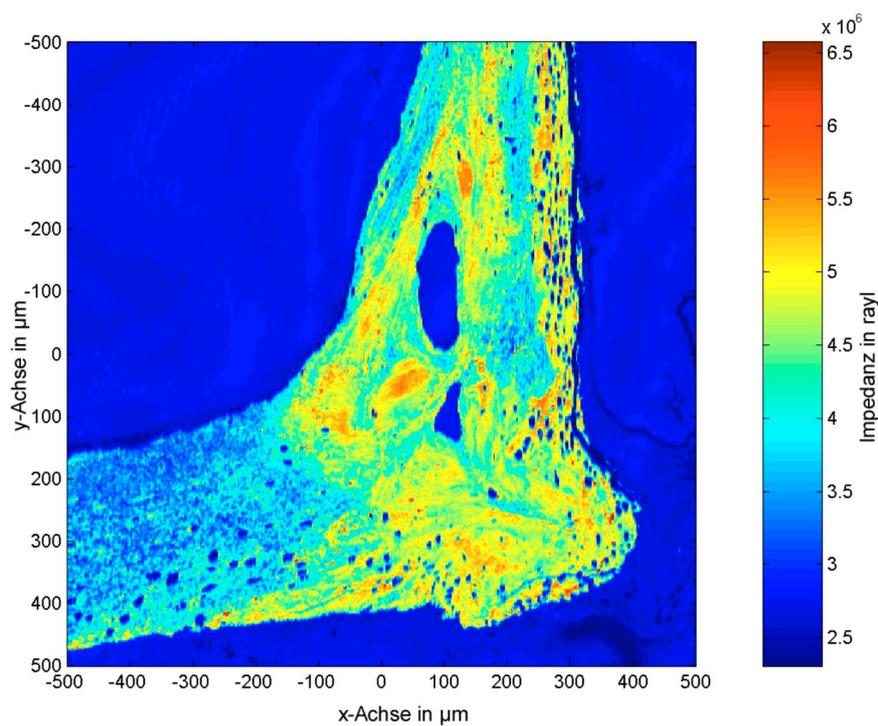
## 6.2.3 Untersuchungen am Steigbügel

### 6.2.3.1 Qualitative Analyse

Die Untersuchungen am Steigbügel erfolgten mit 900 MHz, was einer lateralen Auflösung

von ca. 1  $\mu\text{m}$  entspricht. Der Messbereich betrug 1x1 mm. Die Impedanzverteilung im Mikrostrukturbereich wird an repräsentativen Ausschnittsbildern deutlich. Sie wurde mit dem Multi-Layer-Analysis-Verfahren bei 900 MHz ermittelt.

Abbildung 25 bis Abbildung 28 zeigen die Verteilung der akustischen Impedanzwerte. Bereiche höherer akustischer Impedanz sind im gelben und roten Farbton abgebildet (akustische Impedanz von ca. 4 Mrayl). Das Einbettungsmedium PMMA, welches am Rand in den Lakunen sichtbar ist, weist eine akustische Impedanz von ca. 2,7 Mrayl auf.



*Abbildung 25: Impedanzverteilung, Ausschnitt Übergang Steigbügel Fussplatte zum Steigbügelbogen*

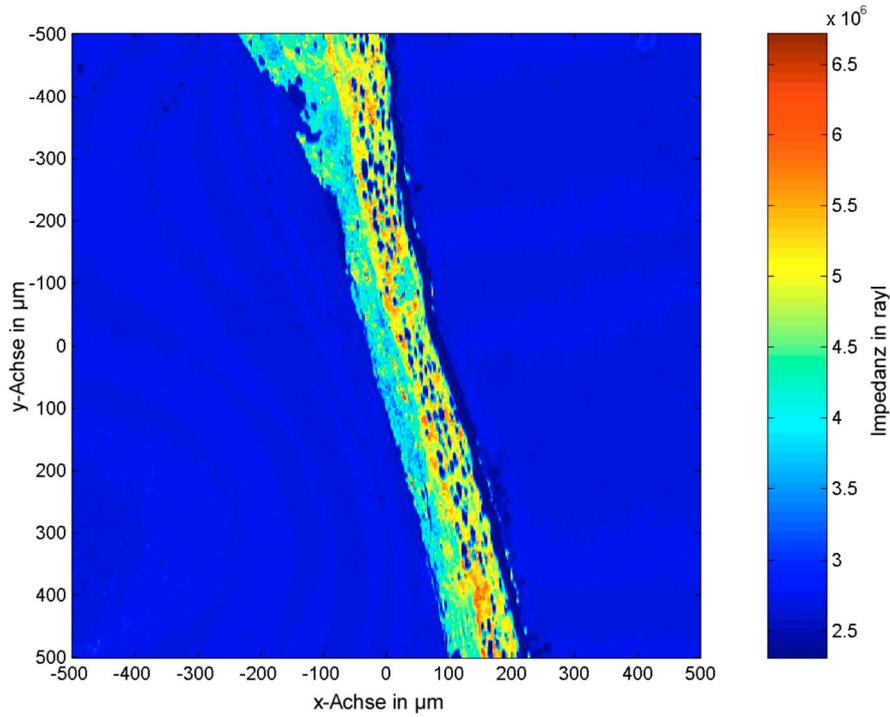


Abbildung 26: Impedanzverteilung, Ausschnitt Steigbügelplatte

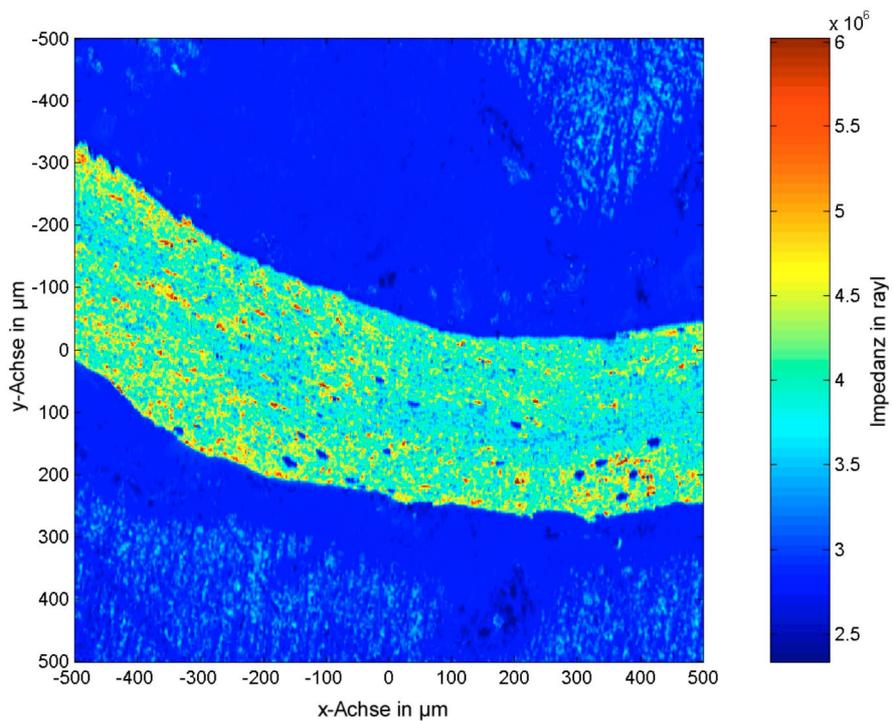


Abbildung 27: Impedanzverteilung, Ausschnitt Steigbügelbogen

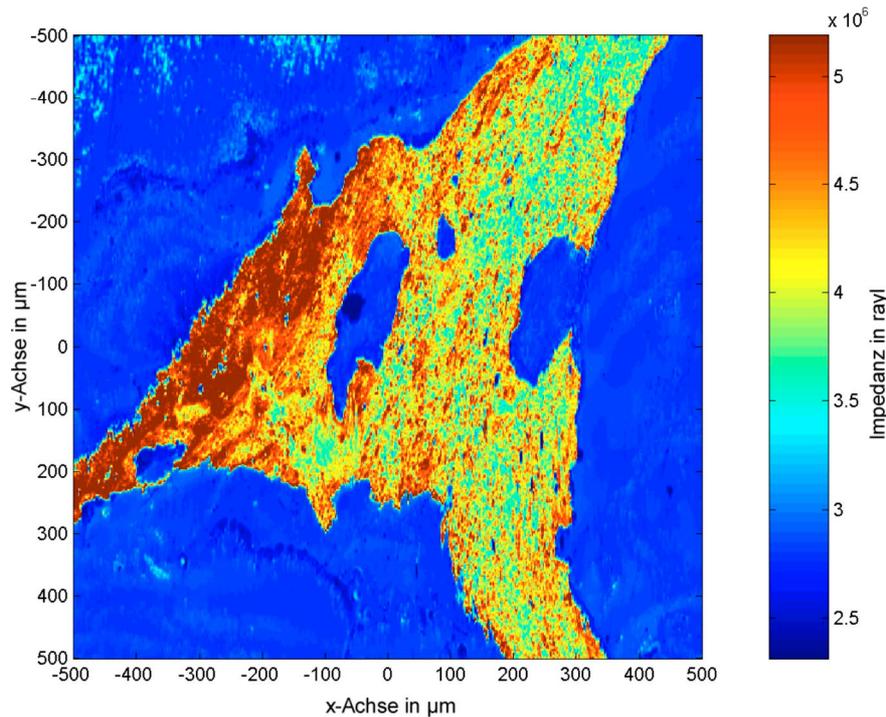


Abbildung 28: Impedanzverteilung, Steigbügelköpfchen

### 6.2.3.2 Quantitative Analyse

Es wurden die Impedanzmittelwerte für die Schnittfläche durch den gesamten Steigbügel, den Steigbügelkopf, den vorderen und hinteren Bogen und die Steigbügel Fussplatte ermittelt. In Diagramm 9 sind die Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Steigbügels dargestellt. Die akustische Impedanz beträgt für die gesamte Steigbügelschnittfläche ( $3,96 \pm 0,32$ ) Mrayl. Für Region 1 (Caput) wurde eine akustische Impedanz von ( $3,65 \pm 0,05$ ) Mrayl, für Region 2 (Crus posterius) von ( $3,71 \pm 0,10$ ) Mrayl, für Region 3 (Crus anterius) von ( $3,69 \pm 0,05$ ) Mrayl und für Region 4 (Basis) von ( $4,30 \pm 0,14$ ) Mrayl ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte war zwischen Region 4 und Region 1-3 nachweisbar (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p < 0,005$ ). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Caput, Crus anterius und Crus posterius bestand nicht (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p > 0,4$ ).

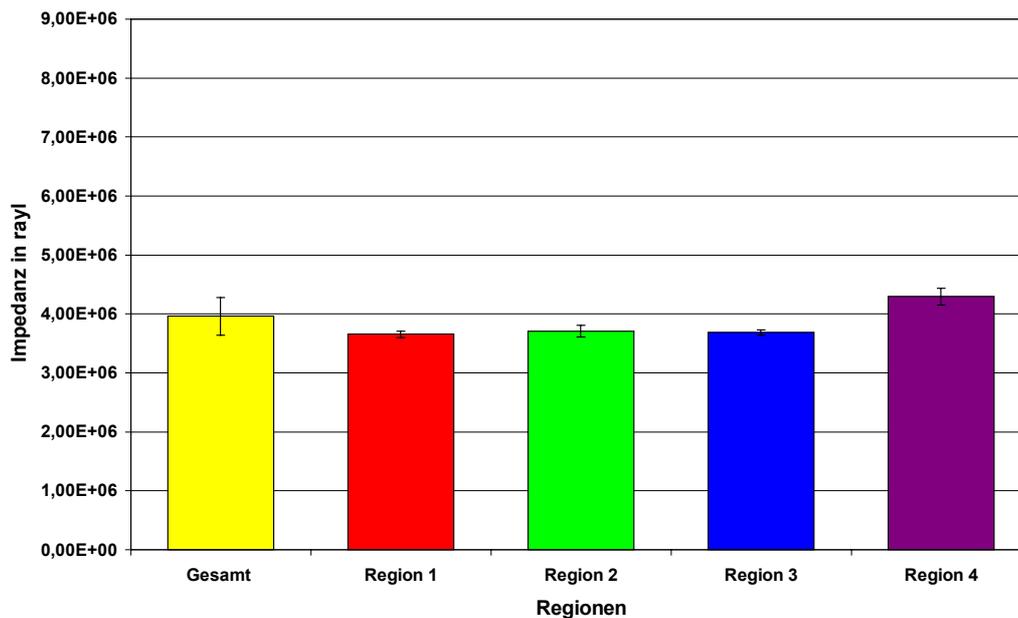


Diagramm 9: Impedanzmittelwerte mit Standardabweichung für die verschiedenen Regionen des Steigbügels (bei 900 MHz)

## 6.3 VERGLEICH DER GEHÖRKNÖCHELCHENIMPEDANZ

### 6.3.1 KSI SAM 100

Es erfolgte ein Vergleich der akustischen Impedanz der gesamten Hammer-, Amboss- und Steigbügelschnitte, die bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz ermittelt wurde (Diagramm 10). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied der Impedanzmittelwerte der Hämmer (7,13 Mrayl) und der Ambosse (6,74 Mrayl) (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p=0,2$ ).

Der Unterschied der Impedanzmittelwerte von Hammer und Steigbügel (4,66 Mrayl) war statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p<0,001$ ). Ebenfalls waren die Impedanzmittelwerte von Amboss und Steigbügel statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p<0,001$ ).

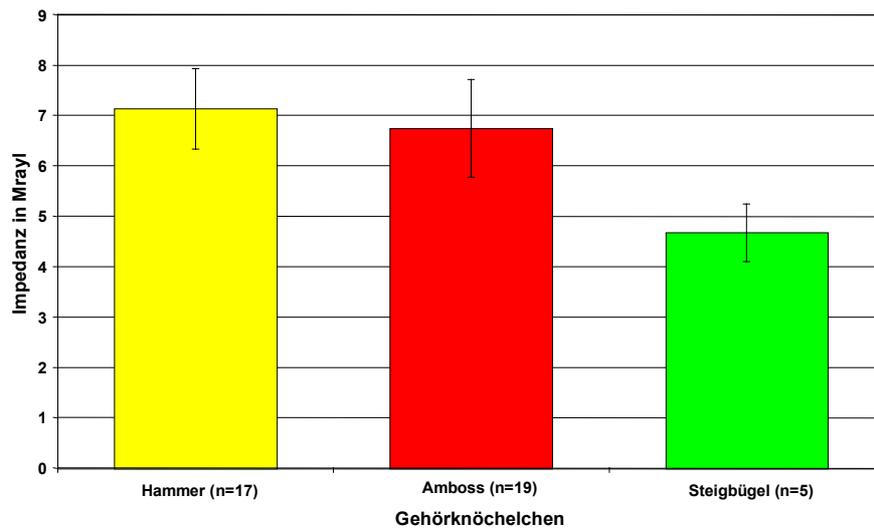


Diagramm 10: Mittlere akustische Impedanz von Gehörknöchelchen mit Standardabweichung bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz

### 6.3.2 KSI SAM 2000

Es erfolgte ein Vergleich der mittleren akustischen Impedanz zwischen den einzelnen Gehörknöchelchen bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz. Der Unterschied zwischen Hammer, Amboss und Steigbügel war statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse,  $p < 0,02$ ) (Diagramm 11).

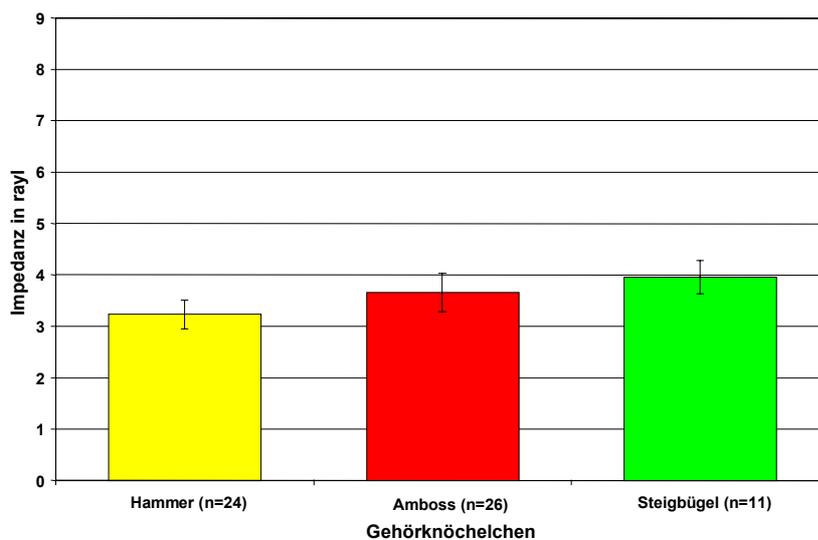


Diagramm 11: Mittlere akustische Impedanz mit Standardabweichung von Gehörknöchelchen bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz

---

## 7 Diskussion

Mit der akustischen Rastermikroskopie ist es möglich, die akustische Impedanz von Gehörknöchelchen in makroskopischer und mikroskopischer Auflösung qualitativ und quantitativ im Ultraschallbereich zu bestimmen.

In den Schnittbildern von Hammer, Amboss und Steigbügel zeigte sich in der akustischen Rastermikroskopie bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine inhomogene Verteilung der akustischen Impedanz. Gaihede et al. [17] wiesen 1997 bei der akustischen Rastermikroskopie und gleicher Arbeitsfrequenz im Grauwertbild von Hammer, Amboss und Steigbügel ebenfalls eine inhomogene Verteilung der Grauwertstufen und damit indirekt der akustischen Impedanz nach. Im Ambosskörper und Hammerkopf befanden sich in den eigenen Untersuchungen Areale erniedrigter Impedanz (akustische Impedanz  $< 7 \text{ Mrayl}$ ). Der Übergang von der Steigbügelfussplatte zum vorderen und hinteren Schenkel wies hingegen Bereiche höherer akustischer Impedanz auf (akustische Impedanz  $> 9 \text{ Mrayl}$  bei 25 MHz). Damit wurden die Untersuchungen von Gaihede et al. [17] am Steigbügel bestätigt, in denen ebenfalls qualitative Unterschiede der akustischen Impedanz in diesen Bereichen festgestellt wurden. In der Literatur gibt es keine Angaben über die Verteilung der akustischen Impedanz in Gehörknöchelchen bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz. In den eigenen Untersuchungen konnte erstmals an Gehörknöchelchen gezeigt werden, dass auch bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz die Verteilung der akustischen Impedanz in den Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel inhomogen ist. Die Ursache dafür liegt vermutlich an dem anisotropen Aufbau der Gehörknöchelchen aus verschiedenen Gewebekomponenten. Wie u.a. von Beck und Wustrow [3], [76] beschrieben, befinden sich in den Gehörknöchelchen unter einem zarten Schleimhautüberzug und einem dünnen Periost Strähnenknochen, geflechtartiger Knochen, Lamellenknochen und auch verkalkte Knorpelreste.

In Lamellenknochen des Skeletts wurde in zahlreichen Untersuchungen die anisotrope Verteilung der akustischen Impedanz nachgewiesen. So fand z.B. Hunt [33] bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz die höchsten Elastizitätsmoduln im antero-lateralen Bereich des Femurs sowie im antero-lateralen Bereich der Tibia. Hunt führte diese Unterschiede des Elastizitätsmoduls auf die Kräfteverteilung beim Gang zurück. Systematische Untersuchungen der qualitativen Verteilung der akustischen Impedanz in Gehörknöchelchen fehlen in der Literatur.

Ebenfalls sind in der Literatur keine Angaben über eine quantitative Bestimmung der

akustischen Impedanz von Gehörknöchelchen zu finden.

Die in den eigenen Untersuchungen ermittelte mittlere akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz war für die untersuchten Hämmer mit 7,13 Mrayl am größten. Die Steigbügel wiesen mit 4,67 Mrayl die geringste akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die akustische Impedanz der Ambosse lag mit 6,74 Mrayl dazwischen. In Bezug auf die untersuchten Regionen der Hämmer wies der Hammerkopf mit 7,42 Mrayl eine statistisch signifikant höhere Impedanz als das Manubrium mit einer akustischen Impedanz von 6,5 Mrayl auf. Der Ambosskörper und der kurze Ambossfortsatz hatten in den geschilderten Untersuchungen bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine akustische Impedanz von 6,9 Mrayl. Der lange Ambossfortsatz wies dagegen eine geringere akustische Impedanz von 6,04 Mrayl auf. Dieser Unterschied der akustischen Impedanz ist statistisch signifikant. Diese Werte werden an dieser Stelle mangels vergleichbarer quantitativer Untersuchungen mit dem akustischen Rastermikroskop an Gehörknöchelchen mit Werten der mechanischen Festigkeit von Gehörknöchelchen verglichen, die Glaninger [18] und Hüttenbrink [29] in Bieigungs- und Bruchversuchen ermittelten. Glaninger stellte eine auffallend große Bruchfestigkeit des langen Ambossschenkels fest. Bei einer Kompression fand er eine Berstung der Gehörknöchelchenkörper erst bei Kräften von ca. 150 N. Zur Prüfung der mechanischen Festigkeit von Gehörknöchelchen führte Hüttenbrink Bruchmessungen mit einer anatomischen Klemme durch. Er beobachtete das Zerbrechen der Ossikelkörper, unabhängig von der Aufbewahrung, ebenfalls bei einer Belastung von ca. 150 N (entsprechend einer Belastung mit 15 kg). Die trockenen Knochen zerbrachen bei Erreichen der Berstungsbelastung. Die feuchten Gehörknöchelchen wurden hingegen eher zerquetscht. In der daraufhin durchgeführten Röntgenuntersuchung ließen sich keine reproduzierbaren, regelmäßigen Verläufe der Bruchlinien feststellen. Die Untersuchung der Gehörknöchelchen mit dem akustischen Rastermikroskop bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz erbrachte eine erhöhte akustische Impedanz (vergleichbar mit der mechanischen Steifigkeit) im Bereich der Körper von Hammer und Amboss gegenüber den Fortsätzen. Eine Übereinstimmung mit den Schlussfolgerungen von Glaninger und Hüttenbrink konnte hier festgestellt werden, obwohl natürlich beachtet werden muss, dass die akustische Impedanz und die mechanische Bruchfestigkeit verschiedene Messgrößen darstellen.

Die mit einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz ermittelten mittleren akustischen Impedanzen lagen bei den untersuchten Gehörknöchelchen bei 4,7 bis 7,1 Mrayl, die bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ermittelte akustische Impedanz der untersuchten Gehörknöchelchen hingegen bei 3,2 bis 4,0 Mrayl. Die akustische Impedanz ist abhängig von der Arbeitsfrequenz. Hochfrequente Wellen werden nach Rho [55] stärker durch

---

beugende Materialeigenschaften des Knochens im mikroskopischen Bereich beeinflusst als Schallwellen im mittel- bis niederfrequenten Ultraschallbereich. Es existiert offenbar eine strukturbedingte Dispersion der akustischen Impedanz des Knochengewebes, welche die niedrigeren Impedanzwerte bei höheren Frequenzen erklären könnte. Mangels Vergleichswerten der akustischen Impedanz von Gehörknöchelchen wurden die ermittelten Impedanzwerte der Gehörknöchelchen mit den Impedanzwerten anderer menschlicher Knochen verglichen. Im Frequenzbereich bis 100 MHz sind mittlere Impedanzen an kortikalem Knochen im Bereich von 7 bis 10 Mrayl ermittelt worden [67], [78], [79]. Bei einer Arbeitsfrequenz von ca. 50 MHz fanden Weiss et al. [75] am menschlichen Femur eine mittlere akustische Impedanz von ca. 7,7 Mrayl. Bei einer Frequenz von 70 MHz fand Lees et al. [37] eine Schallgeschwindigkeit von 4,47 km/s. Cusack et al. [12] ermittelten in nicht mineralisierten kollagenen Fasern bei 7 GHz eine Geschwindigkeit von 1,89 km/s in radialer und 2,64 km/s in axialer Richtung. Ähnliche Resultate erzielten Maev et al. [43] bei einer Frequenz von 450 MHz. Direkt vergleichbar sind nur die von Raum und Smitmans et al. [54], [68] mit dem gleichen Gerät und unter gleichen Versuchsbedingungen an menschlichen Femurknochen ermittelten Impedanzwerte von 2,5 bis 5,5 Mrayl bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz. Die mittleren Impedanzwerte der Gehörknöchelchen (3,2 Mrayl – 4,0 Mrayl) liegen in dem für den Femurknochen ermittelten Impedanzbereich. Dies kann darauf hindeuten, dass die akustische Impedanz der Gehörknöchelchen ähnlich der des kortikalen Bereichs des Femurs ist.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit von niederfrequentem Ultraschall (bei 25 MHz laterale Auflösung ca. 150  $\mu\text{m}$ ) kann nur Aussagen über eine grobe Anisotropie der Gehörknöchelchen ermöglichen. Messungen mit 900 MHz und einer lateralen Auflösung von ca. 1  $\mu\text{m}$  lassen eine sensitivere Erfassung von richtungsabhängigen Unterschieden der Schallausbreitung im Knochen zu. Höherfrequente Ultraschallwellen haben eine kürzere Wellenlänge und ermöglichen damit eine bessere Auflösung.

Die Messungen wurden an postmortal entnommenen und in PMMA eingebetteten Gehörknöchelchen vorgenommen. Durch die Art der Präparation können sich die mechanischen und damit ebenso die akustischen Eigenschaften von Gewebe verändern [63], [67]. Der Frage, inwieweit die Dehydrierung und Einbettung in PMMA die akustische Impedanz beeinflussen, gingen Zimmermann et al. [79] in einer Studie nach. Demzufolge bewirkt die Einbettung bei Rinderknochen eine signifikante Erhöhung der akustischen Impedanz um ca. 5% im Vergleich zu nativem Knochen. Durch den Wegfall des interstitiellen Wassers (Impedanz ca. 1,48 Mrayl) nach Dehydrierung mit Alkohol ist das selektive Reflexsignal für die Gehörknöchelchen in-vitro wahrscheinlich größer als in natura. In einer

---

Arbeit von Mc Donald [44] wird auf die Erhöhung der Knochenfestigkeit durch die Durchblutung des Knochens hingewiesen. Die akustische Impedanz der Gehörknöchelchen wird möglicherweise ebenfalls von der Durchblutung beeinflusst. In der eigenen Untersuchung wurde versucht, die Einwirkung von PMMA bei der Impedanzbestimmung zu reduzieren, indem eine elektronische Ausschlussmaske den Eingang der Reflexionssignale aus PMMA-Bezirken für die Impedanzbestimmung registrierte und von dem lokalen  $V(z)$ -Signal digital subtrahierte, so dass nur Signalanteile aus festen Knochengewebebezirken bei Ausschluss der dazwischen liegenden PMMA- gefüllten Hohlräume in die Impedanzbestimmung eingingen. Die Anwendung der Ausschlussmaske erbrachte für die selektiven Signale aus Knochenarealen höhere Impedanzwerte als in Kombination mit PMMA-Reflexionssignalen, da im PMMA im Vergleich zu Knochen durchschnittlich geringere Signalintensitäten für das Reflexionssignal erzeugt werden.

Im Vergleich zu nativem Knochen ist aus dem gleichen Grund durch den Wegfall des interstitiellen Wassers (Impedanz ca. 1,48 Mrayl) nach Abschluss der Einbettung in Alkohol das selektive Reflexionssignal für Knochen vermutlich höher als in natura. Nach Takano [69] ist die Einbettung in PMMA jedoch unbedeutend für die Bestimmung der Anisotropie des Knochens mittels akustischer Rastermikroskopie.

Die für die akustische Rastermikroskopie gerade in hohen Frequenzen erforderliche exakt glatte und plane Oberfläche wird durch Schleifen und Polieren erreicht. Diese Bearbeitung der filigranen Gehörknöchelchen wurde erst durch die Einbettung in PMMA möglich.

Eine Messung vitaler, in situ befindlicher Gehörknöchelchen wäre wünschenswert, ist aus technischen Gründen aber bisher nicht möglich.

Ein statistisch signifikanter Einfluss des Alters auf die akustische Impedanz der Gehörknöchelchen war in den geschilderten Versuchen bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz nicht nachweisbar. Ein altersbedingter Einfluss auf die elastischen Knocheneigenschaften wurde in verschiedenen Versuchen jedoch bei kortikalem Knochen festgestellt [1], [68], [80]. Bezüglich der Alterseinflüsse auf die elastischen Eigenschaften von kortikalem Knochen haben Ambardar und Ferris [1] Untersuchungen an Femora von Rindern und Schafen durchgeführt und eine Zunahme der Steifigkeit des Knochengewebes mit zunehmendem Alter festgestellt. Dabei soll ein Ersatz von Kollagenstrukturen durch amorphes Gewebe auftreten, wobei es durch die sukzessive Einlagerung von Kristallen zu einer Abnahme der Elastizität kommen soll. Handschin und Stern [23] stellen ab dem 50. Lebensjahr eine signifikante Änderung der Kristallisationsrate von menschlichem Knochen (Christa iliaca) fest. Das mittlere Alter der Gehörknöchelchen dieser Untersuchungsreihe lag bei 65,4 Jahren mit einem überwiegenden Anteil von Ossikeln älterer Menschen. Eine

---

systematische Untersuchung von Gehörknöchelchen junger Menschen war auf Grund der Entnahme von Felsenbeinen von hauptsächlich älteren Verstorbenen am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität nicht gegeben. Die akustische Impedanz von juvenilen Gehörknöchelchen müsste in nachfolgenden Untersuchungen ermittelt werden.

Die Ultraschalltechnik ermöglicht im Gegensatz zur Lichtmikroskopie die visuelle Darstellung von Knochenstrukturen ohne Anwendung von Färbetechniken und zusätzlich die Erfassung der akustischen Impedanz der Knochenoberfläche. Tief unter der Knochenoberfläche gelegene Regionen können mit der hochfrequenten akustischen Rastermikroskopie nicht untersucht werden. Die benutzten Schallfrequenzen sind dazu zu hoch, um ein zur Linsenrückfläche reflektiertes Ultraschallsignal zu erhalten, da die hochfrequenten Schallwellen eine zu starke Abschwächung im Knochengewebe erfahren.

Die Auswertung aller Proben zeigt, dass einzelne Untersuchungsareale gezielt aufgesucht werden können, um die dort vorliegenden charakteristischen Impedanzwerte zu bestimmen. Dies kann für die systematische Ermittlung der akustischen Impedanz von bestimmten anatomischen Strukturen (z.B. Steigbügelköpfchen, Hammer- und Ambosskörper u.s.w.) genutzt werden.

Zur Kompensation von Sekundäreinflüssen auf das Signal diente ein am IMPB erarbeitetes Verfahren, bei dem Kalibrierungen für Reflexionssignale unter verschiedenen Temperaturbedingungen zur Gewinnung von Referenzkurven durchgeführt wurden (dynamische Kalibrierung). Dabei dienten Reflexionssignale von der Linsenoberfläche, die im Zusammenhang mit jeder Probenmessung aufgenommen wurden, als Informationssignal über die aktuell bei jeder Messung vorliegenden Temperaturbedingungen. Die Linsenreflexionssignale wurden mit den Referenzwerten aus der dynamischen Kalibrierung abgeglichen. Die Messwerte der Gehörknöchelchen wurden entsprechend den vorliegenden Umgebungsbedingungen im Abgleich mit den Referenzwerten korrigiert [54].

Sobald Luftbläschen im Kopplungsmedium Wasser auftraten, wurden Bereiche des Wellenbündels vor Erreichen der Probe oder nach der Reflexion an der Probenoberfläche total reflektiert, so dass sie nicht mehr zur Signalgebung für das Bildsignal beitrugen.

Im Versuch wurde zur Minderung dieses Fehlers entgastes und destilliertes Wasser verwendet. Dadurch wurde eine annähernd analoge Dämpfung der Schallwellenausbreitung durch das Kopplungsmedium für alle Messungen gewährleistet.

Unterschiede im Oberflächenrelief mit einem Neigungswinkel im Bezug zur Horizontalen ließen sich aufgrund von mechanischen Bearbeitungsfehlern während der Probenanfertigung nicht komplett vermeiden. Das verwendete Signalanalyseprogramm (Multi-Layer-Analysis, Kay Raum, IMPB Halle, [54]) gewährleistete eine topographische Erfassung des

Oberflächenreliefs der Probe und ließ nur diejenigen Anteile des Reflexionssignals in die Auswertung einfließen, die bis zu einem Toleranzwinkel von maximal  $10^\circ$  zur Orthogonalen auf die Probenoberfläche auftrafen.

Sehr geringfügige Unterschiede in den Materialeigenschaften konnten wegen der begrenzten Bildschirm-Farbtiefe von 64 Farben nicht mehr als Signalunterschiede des  $V(z)$ -Signals dargestellt werden.

Störsignale, die durch wiederholte Echos von mehrfach innerhalb der Linse reflektierten Schallwellen entstehen, können das aktuelle Probensignal durch Interferenz überlagern und somit zu ungenauen Signalamplituden und zu verfälschten lokalen Impedanzwerten führen.

Ultraschall kann in Feststoffen an deren Oberfläche neben den reflektierten Wellenbündeln auch nach transversal verlaufende Rayleigh-Wellen erzeugen, die nach Reflexion eine Sekundärbeeinflussung des reflektierten Schallsignals zur Folge haben können. Diese können nach Gardner et al. [20] für die Messungen am Knochenmaterial vernachlässigt werden, da der kritische Einstrahlwinkel zur Erzeugung von Rayleigh-Wellen in Knochen den halben Öffnungswinkel der Linse überschreiten müsste, was in der vorliegenden Messreihe nicht erfolgte. Es könnten sich theoretisch auch Kompressionswellen transversal an der Probenoberfläche ausbreiten, sobald ein bestimmter kritischer Einstrahlwinkel überschritten wird. Diese Überlegungen waren Anlass, die Proben nur in orthogonaler Richtung mit dem Schall zu bestrahlen, so dass der genannte kritische Einstrahlwinkel zur Erzeugung von Scherwellen nicht erreicht wurde und diese unberücksichtigt bleiben konnten.

Die praktische Anwendung der in diesen Untersuchungen ermittelten akustischen Impedanzen von Gehörknöchelchen könnte möglicherweise in der Entwicklung neuer Mittelohrprothesen liegen. Bisher hat die Kenntnis der Gehörknöchelchenimpedanz für die Entwicklung von Mittelohrprothesen keine Rolle gespielt. Der in Tabelle 8 dargestellte Überblick zeigt, wie verschieden die Impedanzen von einigen ausgewählten Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates sind. Unter den Metallen weist Gold mit 64,2 Mrayl eine weitaus größere Impedanz als Titan mit 27,6 Mrayl auf. Polyethylen, Polycarbonat und Teflon haben eine kleinere akustische Impedanz als Knochen. Die in dieser Arbeit ermittelten Impedanzen der Gehörknöchelchen lagen frequenzabhängig zwischen 3,2 und 7,2 Mrayl. In wieweit die Impedanz der Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates eine Rolle bezüglich der Funktionsfähigkeit des rekonstruierten Mittelohres spielt, lässt sich anhand dieser Untersuchungen nicht sagen. Standardisierte Messungen zeigten jedoch, dass Mittelohrprothesen für eine optimale Übertragung der höheren Frequenzen des Hörbereichs möglichst leicht sein sollten. Titan weist hier einen deutlichen Vorteil gegenüber Gold auf [45]. Die akustische Impedanz wird durch die

---

Ultraschallgeschwindigkeit und die Dichte des Materials bestimmt. Es lässt sich daraus schlußfolgern, dass die akustische Impedanz als Materialparameter für die Herstellung einer optimalen Mittelohrprothese genutzt werden könnte.

Die ermittelten akustischen Impedanzen der Gehörknöchelchen könnten möglicherweise auch Eingangsgrößen für Finite Elemente Modelle liefern. Zur Simulation des dynamischen Verhaltens des Mittelohres wird das reale System auf ein Ersatzsystem (FEM) abgebildet [49], [66], [16]. Physikalische Eigenschaften des mechanischen Systems „Ohr“ können unmittelbar durch Elemente des Ersatzsystems modelliert werden. Masse, Elastizität und Dämpfungseigenschaften von Gehörknöchelchen werden auf die gleichen physikalischen Eigenschaften im Modell abgebildet [16]. Die akustische Rastermikroskopie könnte hier das Bindeglied zwischen makroskopischen Messverfahren und theoretischen mikromechanischen Modellen sein. Die akustische Rastermikroskopie könnte auf diesem Weg die gezielte Entwicklung neuer Mittelohrprothesen unterstützen.

Es ist denkbar, dass die akustische Rastermikroskopie ein geeignetes Hilfsmittel sein kann, um die Arrosion und Nekrose des langen Ambossfortsatzes an der Prothesenanhaftungsstelle zu untersuchen.

Nach einer Otoskleroseoperation kommt es im Kontaktbereich der Prothese mit dem langen Ambossschenkel in bestimmten Fällen zu Arrosionen und Nekrosen. Die Nekrose wird häufig an einer erneut auftretenden, dauerhaften Schallleitungsschwerhörigkeit erkannt. Die Nekrosen treten normalerweise nicht auf, wenn eine Operationstechnik unter Verwendung von autologem Steigbügelersatz gewählt wird oder bei der Verwendung eines zurecht geschliffenen allogenen Gehörknöchelchens [27]. Die zahlreichen Publikationen, die sich mit der Häufigkeit von Arrosionen und Nekrosen nach Otoskleroseoperation beschäftigen, lassen keine Rückschlüsse zu, ob die Ambossschenkelzerstörung alleiniger pathologischer Befund, Zweit- bzw. Nebenbefund oder Folge z.B. einer Fixation der Prothese durch Re-Obliteration oder Verlagerung war [65]. Ein anderer Aspekt, die Anpassung der Materialeigenschaften von Knochen und Implantat, wird dabei noch unzureichend berücksichtigt. Gerade diese Abstimmung beeinflusst die Funktionsdauer des Systems Implantat-Knochen. Abbauprozesse des Knochens an der Koppelstelle werden u.a. der mangelnden Blutversorgung angelastet. Bei Verwendung autologer Implantate werden keine Abbauprozesse beobachtet. Durch Entwicklung neuer Interfaces zwischen Implantat und Knochen könnte sich die Funktionsdauer der Implantate möglicherweise erhöhen. Der Impedanzanpassung durch geeignete Zwischenschichten oder der Verwendung von Prothesenmaterial gleicher Impedanz wie Gehörknöchelchen kann eine besondere

---

Bedeutung zukommen. Entsprechend der Impedanzdefinition ruft bei gleicher Impedanz der gleiche Druck eine gleich schnelle Bewegung der Teilchen in den Materialien hervor. Dieser als Impedanzanpassung bezeichnete Effekt sorgt für eine adäquate Belastung der koppelnden Flächen.

In der experimentellen Beurteilung von Knochen-Implantat-Grenzzone (Amboss-Piston-Grenzzone) ist die akustische Rastermikroskopie wegen der hohen Sensitivität zur Beurteilung von elastomechanischen Eigenschaften geeignet, die Fähigkeit der Anpassung des Knochens an das Prothesenmaterial zu beurteilen. In der Othopädie ist bekannt, dass sich der Knochen nach der Prothesenimplantation in einem beginnenden Remodeling-Prozess auf die neue Kräfteverteilung einstellen muss [67]. Interessant wäre hier der Nachweis eines Remodelings im Schalleitungssystem bei der Verwendung einer alloplastischen Ossikelprothese.

Es ist ebenfalls denkbar, die akustische Rastermikroskopie für die Beurteilung von pathologischen Prozessen im Mittelohr zu nutzen. Bei chronischen Mittelohrentzündungen kommt es häufig auch zu funktionellen Störungen an der Gehörknöchelchenkette. Von Interesse wäre, ob bei einer Mittelohrentzündung schon vor einer funktionellen Störung eine Änderung der akustischen Impedanz in der akustischen Rastermikroskopie des Knochens eintritt. Bei Beeinträchtigung der Einheit von Hammer, Amboss und Steigbügel ist eine verlustarme Weiterleitung des Schalls zum Innenohr nicht mehr gewährleistet [4]. Eine mögliche Anwendung der akustischen Rastermikroskopie ist die Untersuchung der mikrostrukturellen Veränderungen bei chronischer Schleimhauteiterung und bei Cholesteatom. Dabei könnten eventuell schon vor einer funktionellen Störung Impedanzänderungen als mikrostruktureller Krankheitsindikator nachweisbar sein.

## 8 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die akustische Rastermikroskopie geeignet ist, die akustische Impedanz von Gehörknöchelchen zu bestimmen.

Die Ultraschalltechnik ermöglicht im Gegensatz zum Lichtmikroskop die visuelle Darstellung von Knochenstrukturen ohne Anwendung von Färbetechniken und zusätzlich die Erfassung der akustischen Impedanz von der Knochenoberfläche.

In den Schnittbildern von Hammer, Amboss und Steigbügel zeigte sich in der akustischen Rastermikroskopie bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine inhomogene Verteilung der akustischen Impedanz. Damit wurden die Resultate von Gaihede et al. [17] bestätigt. In den zentralen Anteilen des Ambosskörpers und des Hammerkopfes befanden sich Areale erniedrigter Impedanz (akustische Impedanz  $< 7$  Mrayl). Im Bereich des Übergangs von der Steigbügelfussplatte zum vorderen und hinteren Schenkel waren hingegen Bereiche höherer akustischer Impedanz nachweisbar (akustische Impedanz  $> 9$  Mrayl bei 25 MHz). Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Gaihede et al. 1997 [17] überein.

Die mittlere akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz war für die untersuchten Hämmer mit 7,13 Mrayl am größten. Die Steigbügel wiesen mit 4,67 Mrayl die geringste akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die akustische Impedanz der Ambosse lag mit 6,74 Mrayl dazwischen. In Bezug auf die untersuchten Regionen der Hämmer wies der Hammerkopf mit 7,42 Mrayl eine statistisch signifikante höhere Impedanz als das Manubrium mit einer akustischen Impedanz von 6,5 Mrayl auf. Der Ambosskörper und der kurze Ambossfortsatz hatten in den geschilderten Untersuchungen bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine akustische Impedanz von 6,9 Mrayl. Der lange Ambossfortsatz wies dagegen eine geringere akustische Impedanz von 6,04 Mrayl auf. Dieser Unterschied der akustischen Impedanz war statistisch signifikant.

In den eigenen Untersuchungen konnte erstmals an Gehörknöchelchen gezeigt werden, dass auch bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz die Verteilung der akustischen Impedanz in den Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel inhomogen ist.

Die mit einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ermittelte akustische Impedanz der untersuchten Gehörknöchelchen lag bei 3,2 bis 4,0 Mrayl. Die geringeren Impedanzwerte sind Folge der höheren Arbeitsfrequenz.

Die praktische Anwendung dieser Untersuchungen könnte darin bestehen, dass die ermittelten akustischen Impedanzen der Gehörknöchelchen neben Parametern für neu zu entwickelnde Mittelohrprothesen möglicherweise auch Eingangsgrößen für Finite Elemente Modelle liefern.

Es ist ebenfalls denkbar, die akustische Rastermikroskopie für die Beurteilung von pathologischen Prozessen im Mittelohr zu nutzen. Bei chronischen Mittelohrentzündungen kommt es häufig auch zu funktionellen und morphologischen Störungen an der Gehörknöchelchenkette. Eine mögliche Anwendung der akustischen Rastermikroskopie ist die Untersuchung der mikrostrukturellen und elastischen Veränderungen in Folge von Umbauprozessen bei chronischer Schleimhauteiterung und bei Cholesteatom. Dabei könnten eventuell schon vor einer funktionellen Störung Impedanzänderungen als mikrostruktureller Krankheitsindikator nachweisbar sein.

In weiteren Studien können richtungsabhängige Elastizitätsunterschiede der Gehörknöchelchen, die sich in den unterschiedlichen Impedanzen bei verschiedenen Untersuchungswinkeln widerspiegeln, Aufschluss über vom Schall bevorzugte Wege in den Ossikeln geben. So könnten richtungsabhängige Elastizitätsparameter bestimmt und mit Hilfe bestehender Modelle über die Knochenstruktur im mikrostrukturellen Bereich die Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates optimiert werden.

---

## 9 Zusammenfassung

Die Ultraschall-Rastermikroskopie (auch: akustische Rastermikroskopie, Scanning Acoustic Microscopy, SAM) ergänzt die herkömmlichen Verfahren für die Untersuchung der Mikrostruktur von Geweben.

Der Bildkontrast hängt von der Interaktion des Knochens mit Ultraschallwellen ab und gibt daher Auskunft über lokale Unterschiede der akustischen Impedanz im makroskopischen und mikroskopischen Bereich.

Für die SAM ist eine plane und extrem glatte Oberfläche der Untersuchungspräparate erforderlich. 41 Gehörknöchelchen wurden in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet, anschließend geschliffen und mit Diamantspray absteigender Körnung bis 0,25 µm poliert. Die Messungen wurden im Puls-Burst-Modus in Reflexion mit den akustischen Rastermikroskopen KSI 100 und KSI 2000 der Firma Krämer Scientific Instruments (Herborn) durchgeführt.

Mit einer neuen Software wurden die Mikroskope kalibriert, so dass quantitativ farbkodierte Impedanzbilder der Gehörknöchelchenschnitte hergestellt werden konnten. Auch bei der hohen Arbeitsfrequenz von 900 MHz konnte mit Hilfe der Schichtbildanalyse die Verteilung der akustischen Impedanz quantitativ angegeben werden.

In den Schnittbildern von Hammer, Amboss und Steigbügel zeigte sich in der akustischen Rastermikroskopie bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine inhomogene Verteilung der akustischen Impedanz und bestätigen damit die Untersuchungen von Gaihede et al. 1997 [17]). In den zentralen Anteilen des Amboss befanden sich in den geschilderten Untersuchungen Areale erniedrigter Impedanz (akustische Impedanz < 7 Mrayl). Im Bereich des Übergangs von der Steigbügelfussplatte zum vorderen und hinteren Bogens waren hingegen Bereiche höherer akustischer Impedanz nachweisbar (akustische Impedanz > 9 Mrayl bei 25 MHz). Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Gaihede et al. [17] überein.

In den geschilderten Untersuchungen konnte erstmals an Gehörknöchelchen gezeigt werden, dass auch bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz die Verteilung der akustischen Impedanz in den Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel inhomogen ist. Die mittlere akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz war für die untersuchten Hämmer mit 7,13 Mrayl am größten. Die Steigbügel wiesen mit 4,67 Mrayl die geringste

---

akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die akustische Impedanz der Ambosse lag mit 6,74 Mrayl dazwischen. In Bezug auf die untersuchten Regionen der Hämmer wies der Hammerkopf mit 7,42 Mrayl eine statistisch signifikante höhere Impedanz als das Manubrium mit einer akustischen Impedanz von 6,5 Mrayl auf. Der Ambosskörper und der kurze Ambossfortsatz hatten in den geschilderten Untersuchungen bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine akustische Impedanz von 6,9 Mrayl. Der lange Ambossfortsatz wies dagegen eine geringere akustische Impedanz von 6,04 Mrayl auf. Dieser Unterschied der akustischen Impedanz war statistisch signifikant.

Die mit einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz ermittelte mittlere akustische Impedanz lag bei den untersuchten Gehörknöchelchen bei 4,7 bis 7,1 Mrayl, die bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ermittelte akustische Impedanz der untersuchten Gehörknöchelchen hingegen bei 3,2 bis 4,0 Mrayl.

Ein besonderes Potential der akustischen Rastermikroskopie liegt in der Ermittlung der akustischen Impedanz von menschlichen Gehörknöchelchen. Es ist denkbar, Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen für die Entwicklung von Werkstoffen der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie und zur Abklärung der Pathogenese von krankhaften Mittelohrprozessen zu nutzen.

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Ambardar A, Ferris CD (1978). **Compact anisotropic bone: Elastic constants, in vitro aging effects and numerical results of a mathematical model.** Acta biol Acad Sci Hung 29 (1) 81 – 94.
- [2] Bagger-Sjöbäck D, Haverling M, Hjerpe A, Mendel L (1987). **The mineral content of the middle ear ossicles. A radiologic and chemical study on normal and diseased ossicles.** Am J Otol 8: 8-13
- [3] Beck C (1979). **Anatomie und Histologie des Ohres (Abschnitt Mittelohr).** Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Praxis und Klinik. Berendes J, Zöllner F. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2. neu bearbeitete und erweiterte Auflage. **5 (Ohr I):** Kapitel 2.32-2.37.
- [4] Begall K, Zimmermann H (2000). **Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette mit Titanimplantaten.** HNO 79: 139-145
- [5] Benninghoff A (1994). **Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen,** Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, Band 2 . 15 Aufl. Kap. 16.25
- [6] Berghaus A, Mulch G, Handrock M (1984). **Porous polyethylene and Proplast: their behavior in a bony implant bed.** Arch Otolaryngol 240:115-123
- [7] Bereiter-Hahn J (1987). **Scanning acoustic microscopy visualizes cytomechanical response to cytochalasin.** D J Microsc 146: 29-39
- [8] Bereiter-Hahn J, Karl I, Luers H et al. (1995). **Mechanical basis of cell shape: investigations with scanning acoustic microscope.** Biochem Cell Biol 73: 337-348
- [9] Bonorden SW (1987). **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: 102 – 107.
- [10] Briggs, A: Microscopy Handbooks 12: **An Introduction to Scanning Acoustic Microscopy.** Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1995

- 
- [11] Briggs A (1992). **Acoustic Microscopy**. Oxford, Clarendon Press. S. 102-103
- [12] Cusack S, Miller A (1979). **Determination of the elastic constants of collagen by Brillouin light scattering**. J Mol Biol 135: 39-51
- [13] Daft CM, Briggs GD (1989). **The elastic microstructure of various tissues**. J Acoust Soc Am 85: 416-422
- [14] Daft CM, Briggs GD, O'Brien WD (1989). **Frequency dependence of tissue attenuation measured by acoustic microscopy**. J Acoust Soc Am 85: 2194-2201
- [15] Druss JG (1928). **Zur Histologie und Pathologie der Verbindungen der Gehörknöchelchen**. Monatsschrift f. Ohrenheilk u Lar Rhin 62: 257-267
- [16] Eiber A, Kauf A (1994). **Berechnete Verschiebungen der Mittelohrknochen unter statischer Belastung**. HNO 42: 754-759
- [17] Gaihede M, Joergensen C (1997). **Scanning Acoustic Microscopy of the Middle Ear Ossicles** in: Middle ear mechanics in research and otosurgery: proceeding of the International Workshop on Middle Ear Mechanics in Research and Otosurgery, Dresden, Germany, September 19-22, 1996 / ed. by Karl-Bernd-Hüttenbrink.- Dresden: Dept. Of Oto-Rhino-Laryngology, Univ. Hospital Carl Gustav Carus, Univ. of Technology S. 111-113
- [18] Glaninger J (1961). **Untersuchungen zur Festigkeit der Gehörknöchelchen und ihrer Gelenke**. Mschr Ohrenheilkde. 95: 353-375
- [19] Galioto G-B, Marley A (1965). **Structure of human auditory ossides as shown by osteo-micropneumography and radiology**. Acta Otolaryngol 60: 347-359
- [20] Gardner TN, Elliot JC, Sklar Z, Briggs GAD (1992). **Acoustic microscope study of the elastic properties of fluorapatite and hydroxyapatite, tooth enamel and bone**. J Biomech 25: 1265-1277
- [21] Geyer G (1999). **Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates**. HNO 47:77-91
- [22] Gracewski SM, Waag RC, Schenk EA (1988). **High-frequency attenuation measurements using an acoustic microscope**. J Acoust Soc Am 83: 2405-2409
- [23] Handschin RG, Stern WB (1994). **Crystallographic and chemical analysis of human bone apatite (crista iliaca)**. Clin Rheumatol 13 (Suppl 1) 75 – 90.

- 
- [24] Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB (1995). **Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy.** Bone 16: 85-90
- [25] Hein H-J, Czurratis P, Schroth D, Bernstein A (1995). **A comparative study of the application of scanning acoustic microscopy and confocal laser scanning microscopy to the structural assessment of human bones.** Ann Anat 177: 427-430
- [26] Hoppe M, Bereiter-Hahn J (1985). IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics, SU-32, 289
- [27] Hough JVD, Dyer Jr RK (1993). **Stapedectomy- causes of failures and revision surgery in otosclerosis.** Otolaryngol Clin North Am 26: 453-470
- [28] Hüttenbrink KB (1987). **Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bei arthrotischen Veränderungen des Hammer-Amboss-Gelenks und Überlegungen zur Funktion der Mittelohrmuskeln.** Laryng Rhinol Otol 66: 180-185
- [29] Hüttenbrink KB (1988). **Untersuchungen über die Festigkeit und knöcherne Struktur konservierter Gehörknöchelchen.** Laryng Rhinol Otol 67:506-512
- [30] Hüttenbrink KB (1995). **Die Funktion der Gehörknöchelchenkette und der Muskeln des Mittelohres.** Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Suppl 1: 1-52
- [31] Hüttenbrink KB (1997). **The middle ear as a pressure receptor.** In Middle ear mechanics in reseach and otosurgery (Ed. KB Hüttenbrink), S. 15-19
- [32] Hüttenbrink KB (2000). **Zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates unter biomechanischen Gesichtspunkten.** Laryngo Rhino Otol 79 Suppl 2: 23-51
- [33] Hunt KD, Dean O`Loughlin V, Fitting DW, Adler L (1998). **Ultrasonic determination of the elastic modulus of human cortical bone.** Medical & Biological Engineering & Computing 36:51 – 56
- [34] Karlsson K, Engström A, Engström H (1954). **Microradiographic studies of the auditory ossieles ( malleus and incus) and of the osseus labyrinth.** Acta radiologica 42:381-390
- [35] Khanna SM, Tonndorf J (1972). **Tympanic membrane vibrations in cats studied by time-averaged holography.** J Acoust Soc Am 51: 1904-1920
- [36] Kolosov OV, Levin VM, Maev RG et al. (1987). **The use of acoustic microscopy for histological tissue characterization.** Ultrasound Med Biol 13: 477-483

- 
- [37] Lees S, Klopholz DZ (1992). **Sonic velocity and attenuation in wet compact cow femur for the frequency range 5 to 100 MHz.** Ultrasound Med Biol 18: 303-308
- [38] Lemons RA, Quate CF (1974). Appl Phys Lett 24, 163
- [39] Letens U (1988) **Über die Interpretation von Impedanzmessungen im Gehörgang anhand von Mittelohr-Modellen.** Dissertation Ruhruniversität Bochum
- [40] Li B, Aspden RM (1997) **Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis.** Osteoporosis International (7) 450 – 456.
- [41] Linss W (1999). **Binde- und Stützgewebe.** In: Histologie. Linss W, Fanghänel J. Berlin, New York, Walter de Gruyter Verlag. S. 61-66
- [42] Litniewski J, Bereiter-Hahn J (1990). **Measurements of cells in culture by scanning acoustic microscopy.** J Microsc 158: 95-107
- [43] Maev RG, Levin VM (1997). **Principles of local sound velocity and attenuation measurements using transmission acoustic microscope.** IEEE Transactions on ultrasonics ferroelectrics and frequency control. 44: 1224 – 1231
- [44] Mc Donald F, Ford TRP (1994). **The effect of blood flow on the material properties of bone.** Ann Biomed Engineer 22:194-201
- [45] Meister H, Stennert E, Walger M, Klünter HD, Mickenhagen A (1997). **Ein Messsystem zur Überprüfung des akustomechanischen Übertragungsverhaltens von Mittelohrprothesen.** HNO 45: 81-85
- [46] Merchant SN, Ravicz ME, Voss SE, Peake WT, Rosowski JJ (1998). **Middle ear mechanics in normal, diseased and reconstructed ears.** J Laryng Otol 112: 715-731
- [47] Möller P (1982). **Incus in normal ears and in chronic otitis media.** Acta otolaryngol Suppl 386: 64-67
- [48] Oesterle F (1933). **Über den Feinbau der Gehörknöchelchen und seine Entstehung.** Archiv für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde 135: 311-327
- [49] Onchi Y (1961). **Mechanism of the middle ear.** J Acoust Soc Am 33: 794-805
- [50] Peck SD, Briggs GD (1987). **The caries lesion under the scanning acoustic microscope.** Adv Dent Res 15: 1-63

- 
- [51] Pidaparti RMV, Chandran A, Takano Y, Turner CH (1996). **Bone mineral lies mainly outside collagen fibres: Predictions of composite model for osteonal bone.** J Biomechanics 29: 909-916
- [52] Poss R (1992). **Natural factors that affect the shape and strength of the aging human femur.** Clin Orthop 274: 194-201
- [53] Hrsg. Von Jürgen Strutz und Wolf Mann. Bearb. Von O. Arndt. (2001). **Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie** Stuttgart, New York: Thiemeverlag S. 14
- [54] Raum K, Brandt J, Klemenz A, Cobet U (1999). **Quantitative Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der akustischen Impedanz von kortikalem Knochengewebe.** Z Med Phys 9:246-253
- [55] Rho JY. (1996) **An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone.** Ultrasonics 34 8: 777-783.
- [56] Rietbergen B, Odgaard A, Kabel J, Huiskes R (1998). **Relationship between bone morphology and bone elastic properties can be accurately quantified using high-resolution constructions.** J Orthopaedic Reseach 16: 23-28
- [57] Romeis B (1989). **Einbetten in Methacrylat.** Mikroskopische Technik. 17. Neubearb. Auflage, U&S, München, Wien, Baltimore. S. 145-147
- [58] Saijo Y, Tanaka M, Okawai H (1997). **Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy.** Ultrasound Med Biol 23: 77-85
- [59] Saijo Y, Tanaka M, Okawai H (1991). **The ultrasonic properties of gastric cancer tissues obtained with scanning acoustic microscopy system.** Ultrasound in Med & Biol 17: 709-714
- [60] Saijo Y, Sasaki H, Okawai H (1998). **Acoustic properties of atherosclerotic of human aorta obtained with high-frequency ultrasound.** Ultrasound in Med & Biol 24: 1061-1064
- [61] Sasaki H, Saijo Y, Tanaka M (1997). **Characterization of renal angiomyolipoma by scanning acoustic microscopy.** J Path 181: 455-461
- [62] Sasaki H, Saijo Y, Tanaka M (1997). **Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy.** Nephrol Dial Transplant 12: 2151-2154
- [63] Sasaki, H, Saijo Y., Tanaka M (1996). **Influence of tissue preparation on the high-**

- frequency acoustic properties of normal kidney tissue.** Ultrasound Med Biol 22: 1261-1265
- [64] Schenk EA., Waag RC, Schenk AB et al. (1988). **Acoustic microscopy of red blood cells.** J Histochem Cytochem 36: 1341-1351
- [65] Schimanski G (1997). **Die Arrosion und Nekrose des langen Ambossschenkels nach Otoskleroseoperation.** HNO 45: 682-689
- [66] Schirm W (1989). **Mechanik des Hörens, Zwischenbericht ZB-45.** Institut B für Mechanik Universität Stuttgart
- [67] Shieh, SJ, Zimmerman MC, Langrana NA (1995). **The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodeling study.** J Biomech Eng 117: 256-292
- [68] Smitmans L, Raum K, Brandt J, Klemenz A (2000). **Variations in the microstructural acousto-mechanical properties of cortical bone revealed by a quantitative acoustic microscopy study.** 2000 IEEE International Ultrasonics Symposium, San Juan, Puerto Rico, Proceedings, in press
- [69] Takano Y, Turner CH, Burr DB (1996). **Mineral anisotropy in mineralized tissues is similar among species and mineral growth occurs independently of collagen orientation in rats: results from acoustic velocity measurements.** Journal of bone and mineral research 11 (9) 1292 – 1301.
- [70] Takano Y, Turner CH, Owan I, Martin RB, Lau ST, Forwood MR, Burr DB (1999). **Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependent on the mechanical strain distribution.** Journal of Orthopaedic Research 17: 59-66
- [71] Terrahe K, Fromme H-O, Schulz J (1970). **Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen am Knochenfeinbau der Gehörknöchelchen.** Z Laryng Rhinol 49 733-742
- [72] Thorn L (1994). **Topographische Anatomie des Ohres.**, Herausgegeben von Jan Helms, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag. Band 1 (Ohr)
- [73] Turner CH, Chandran A, Pidaaparti RMV (1995). **The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications.** Bone 17: 85-89
- [74] Turner CH, Rho J, Takano Y, Tsui TY, Pharr GM (1999) **The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques.** Journal of Biomechanics 32:437 – 441.

- 
- [75] Weiss S, Zimmerman MC, Harten RD, Alberta FG, Meunier A (1998). **The acoustic and structural properties of the human femur.** Journal of Biomechanical Engineering – Transactions of the ASME 120 1: 71 – 76
- [76] Wustrow F (1954). **Über den Knochenfeinbau in Hammer und Amboss.** Z Laryng Rhinol 33: 206-223
- [77] Yuasa R (1981). **The significance of keratinisation in the mechanism of bone destruction in cholesteatoma.** Proc. II. Int. Conference, Cholesteatoma and Mastoid Surg. Tel Aviv
- [78] Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P (1990). **The evaluation of cortical bone remodeling with a new ultrasonic technique.** IEEE Trans Biomed Eng 37: 433-441
- [79] Zimmerman MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H (1994). **The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy.** J Biomed Mat Reseach 28:931-938
- [80] Zioupos P, Currey JD (1998) **Changes in the stiffness, strength and toughness of human cortical bone with age.** Bone 22(1):57 – 66

## 11 Anhang

### 11.1 PRÄPARATEDATEN

Probe #	Geschlecht	Alter in Jahren	Ossikelbefund	Todesursache	Seite
48	männlich	61	gesund	Z.n. Bypass-OP	rechts
56	männlich	71	gesund	Z.n. Amputaton	rechts
46	männlich	38	gesund	Herzinfarkt	rechts
47	männlich	62	gesund	Ösophaguskarzinom	rechts
49	männlich	70	gesund	Bronchialkarzinom	rechts
50	weiblich	64	gesund	Leukämie	rechts
51	weiblich	67	gesund	Schock	rechts
52	männlich	74	gesund	Myocardinfarkt	rechts
53	männlich	67	gesund	Hypertonus, Leberverfettung	rechts
54	männlich	51	gesund	Bronchialkarzinom, Myocardinfarkt	rechts
55	männlich	56	gesund	Schock	rechts
57	männlich	61	gesund	Herzinfarkt	rechts
58	männlich	57	gesund	Bronchialkarzinom	rechts
p15	männlich	84	gesund	Bronchialkarzinom	rechts
p16	männlich	84	gesund	Bronchialkarzinom	rechts
p18	weiblich	77	gesund	Magenkarzinom	rechts
p19	männlich	75	gesund	Bauchaortenruptur	rechts
p20	männlich	85	gesund	Pneumonie	rechts
p21	weiblich	57	gesund	Thymuskarzinom	rechts
p22	weiblich	59	gesund	Ösophaguskarzinom	rechts
p23	weiblich	55	gesund	Leberversagen	rechts
p24	männlich	69	gesund	Kardiomyopathie	rechts
p25	männlich	51	gesund	Myocardinfarkt, Bronchialkarzinom	rechts
p26	männlich	67	gesund	Bronchialkarzinom	rechts
p27	weiblich	76	gesund	Herzinfarkt, Z.n. Bypass-Op	rechts

Tabelle 1: Präparatedaten

## 11.2 MESSWERTE KSI SAM 100

### 11.2.1 Hammer

Region 1 Caput

Region 2 Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium

Probe #	Gesamt	Region 1	Region 2
Hammer	Imp. in rayl	Imp. in rayl	Imp. in rayl
46a	7,80E+06	8,29E+06	7,10E+06
49a	8,38E+06	9,06E+06	7,67E+06
50a	7,72E+06	8,13E+06	6,84E+06
51b	8,06E+06	8,21E+06	7,20E+06
52a	7,53E+06	7,83E+06	6,81E+06
53a	7,20E+06	7,42E+06	6,83E+06
54b	7,47E+06	7,47E+06	6,67E+06
55c	7,25E+06	7,77E+06	6,66E+06
57a	8,28E+06	8,53E+06	7,63E+06
58b	7,59E+06	8,25E+06	6,56E+06
p19a	6,12E+06	6,46E+06	5,68E+06
p20a	6,37E+06	6,52E+06	6,12E+06
p21a	6,27E+06	6,49E+06	5,77E+06
p22a	6,17E+06	6,31E+06	5,55E+06
p23a	6,11E+06	6,28E+06	5,81E+06
p24a	6,41E+06	6,55E+06	6,16E+06
p25a	6,49E+06	6,60E+06	6,28E+06

Tabelle 2: Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz (Hämmer)

### 11.2.2 Amboss

Region 1      Corpus, Crus breve

Region 2      Crus longum, Processus lenticularis

Probe #	Region 1	Region 2
Amboß	Imp. in rayl	Imp. in rayl
48	7,71E+06	7,02E+06
46b	7,71E+06	7,33E+06
47a	5,35E+06	4,57E+06
49b	5,37E+06	5,14E+06
50b	7,85E+06	6,70E+06
51a	7,67E+06	5,78E+06
52b	7,65E+06	6,08E+06
53c	7,93E+06	6,20E+06
54a	4,89E+06	4,17E+06
55b	8,80E+06	7,29E+06
58a	7,58E+06	7,02E+06
p18b	6,03E+06	5,76E+06
p19b	6,19E+06	5,70E+06
p20b	6,28E+06	5,75E+06
p21b	7,05E+06	6,34E+06
p22b	6,71E+06	5,90E+06
p23b	6,71E+06	5,96E+06
p24b	6,76E+06	5,71E+06
p25b	6,96E+06	6,41E+06

Tabelle 3:      *Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 Hz (Ambosse)*

### 11.2.3 Steigbügel

Region 1	Caput
Region 2	Crus posterius
Region 3	Crus anterior
Region 4	Basis

Probe #	Gesamt	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4
Steigbügel	Imp. in rayl				
53b	4,64E+06	4,30E+06	4,70E+06	4,06E+06	5,16E+06
54c	4,64E+06	4,12E+06	3,80E+06	5,14E+06	5,14E+06
55a	4,31E+06	4,07E+06	5,06E+06	3,97E+06	4,40E+06
p20c	4,12E+06	4,11E+06	4,75E+06	4,41E+06	4,63E+06
p23c	5,61E+06	4,22E+06	4,29E+06	4,37E+06	4,57E+06

Tabelle 4: Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz (Steigbügel)

### 11.3 MESSWERTE KSI SAM 2000

#### 11.3.1 Hammer

Region 1 Caput

Region 2 Collum, Processus lateralis, Processus anterior, Manubrium

Probe #		
Hammer	Imp. in rayl	Region
b55c1s1	3,77E+06	Region 1
b55c1s2	3,71E+06	Region 1
b55c1s4	3,68E+06	Region 1
b55c1s5	3,80E+06	Region 1
b55c2s1	3,65E+06	Region 1
b55c2s2	3,28E+06	Region 1
b55c2s3	3,11E+06	Region 1
b55c2s4	3,33E+06	Region 1
b55c3s1	3,03E+06	Region 1
b55c3s2	3,13E+06	Region 1
b55c3s3	3,19E+06	Region 1
b55c4s1	3,09E+06	Region 1
b55c4s2	3,22E+06	Region 1
b55c4s3	3,05E+06	Region 1
b55c5s1	3,22E+06	Region 1
b55c5s2	3,14E+06	Region 2
b55c5s3	3,20E+06	Region 2
b55c7s1	3,09E+06	Region 2
b55c7s2	3,10E+06	Region 2
b55c8s1	3,07E+06	Region 2
b55c8s2	2,95E+06	Region 2
b55c9s1	2,89E+06	Region 2
b55c9s2	2,91E+06	Region 2
b55c9s3	2,91E+06	Region 2

Tabelle 5: Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz (Hammer)

### 11.3.2 Amboss

Region 1      Corpus, Crus breve

Region 2      Crus longum, Processus lenticularis

Probe #		
Amboß	Imp. in rayl	Region
b20b1s1	3,60E+06	Region 1
b20b1s2	3,69E+06	Region 1
b20b1s3	3,82E+06	Region 1
b20b2s1	3,70E+06	Region 1
b20b2s2	4,05E+06	Region 1
b20b2s3	4,34E+06	Region 1
b20b2s4	4,08E+06	Region 1
b20b2s5	3,90E+06	Region 1
b20b2s6	3,79E+06	Region 1
b20b3k8	3,27E+06	Region 1
b20b3s1	3,60E+06	Region 1
b20b3s2	3,88E+06	Region 1
b20b3s3	4,25E+06	Region 1
b20b3s4	3,83E+06	Region 1
b20b3s5	4,13E+06	Region 1
b20b3s6	4,04E+06	Region 1
b20b5s1	3,39E+06	Region 2
b20b5s2	3,46E+06	Region 2
b20b5s3	3,49E+06	Region 2
b20b5s4	3,44E+06	Region 2
b20b5s5	3,49E+06	Region 2
b20b5s6	2,76E+06	Region 2
b20b6s1	3,32E+06	Region 2
b20b6s2	3,34E+06	Region 2
b20b7s1	3,30E+06	Region 2
b20b8s1	3,29E+06	Region 2

Tabelle 6:      *Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz (Amboss)*

### 11.3.3 Steigbügel

Region 1	Caput
Region 2	Crus posterius
Region 3	Crus anterius
Region 4	Basis

Probe #		
Steigbügel	Imp. in rayl	Region
b53b1s1	4,25E+06	Region 4
b53b1s2	4,21E+06	Region 4
b53b1s3	4,22E+06	Region 4
b53b1s4	4,50E+06	Region 4
b53b2s1	3,82E+06	Region 2
b53b2s2	3,65E+06	Region 2
b53b2s3	3,65E+06	Region 1
b53b2s4	3,65E+06	Region 1
b53b2s5	3,65E+06	Region 3
b53b2s6	3,72E+06	Region 3
b53b2s7	4,19E+06	Region 4

*Tabelle 7: Akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz (Steigbügel)*

#### 11.4 AKUSTISCHE PARAMETER AUSGEWÄHLTER MATERIALIEN

Material	Dichte	longitudinale Geschwindigkeit	Impedanz
	kg m <sup>-3</sup>	m s <sup>-1</sup>	Mrayl
Silber	10500	3704	38,9
Gold	19281	3240	64,2
Platin	21450	3260	69,9
Titan	4508	6130	27,6
Polyethylen	920	1950	1,8
Polycarbonat	1190	2220	2,6
Teflon	2140	1390	3,0
Knochen (Tibia Mensch)	1900	4000	7,6

*Tabelle 8: Übersicht über akustische Parameter ausgewählter Materialien [11]*

## 12 Thesen

1. Die akustische Rastermikroskopie (Scanning Acoustic Microscopy – SAM) ist ein bildgebendes Ultraschallverfahren, mit dem die Verteilung der akustischen Impedanz in biologischen Präparaten in mikroskopischen Dimensionen gemessen werden kann. Die vorliegenden Untersuchungen weisen die Brauchbarkeit der SAM im sogenannten Reflexionsmodus für die Untersuchung von Schnittflächen der Gehörknöchelchen nach.
2. Das Ultraschallverfahren ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie die visuelle Darstellung von Knochenstrukturen ohne Anwendung von Färbetechniken. Das Bild korreliert in hoher Ortsauflösung mit mechanischen In-vitro-Gewebeeigenschaften.
3. In der Literatur sind nur einzelne Berichte über qualitative SAM-Untersuchungen von Gehörknöchelchen mit einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz zu finden. Die vorliegenden systematischen Untersuchungen fanden mit Arbeitsfrequenzen von 25 MHz und 900 MHz statt und führten zu neuen qualitativen und erstmals auch quantitativen Ergebnissen.
4. Präparate für die SAM müssen eine plane und, besonders bei 900 MHz, extrem glatte Oberfläche haben. Diese Forderung wird durch Einbetten der Gehörknöchelchen in Polymethylmethacrylat (PMMA) mit einer anschließenden Schleif- und Polierprozedur erreicht. Durch die Einbettung kommt es zu einer geringfügigen Erhöhung der akustischen Impedanz der Präparate.
5. Mit Hilfe einer neuen, im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelten Software für die Schichtbildanalyse und Impedanzkalibrierung waren eine Bildschärfenkorrektur und eine Zuordnung von Bildsignal und Impedanzwert möglich.
6. In den Schnittbildern von Hammer, Amboss und Steigbügel zeigte sich in der akustischen Rastermikroskopie bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz eine inhomogene Verteilung der akustischen Impedanz. Damit werden die Untersuchungen von Gaihede et al. bestätigt.
7. In den zentralen Anteilen der Ambosse und der Hämmer befanden sich bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz Areale niedriger Impedanz (akustische Impedanz  $< 7$

Mrayl). Im Bereich des Übergangs von der Steigbügelfußplatte zum vorderen und hinteren Schenkel waren hingegen Bereiche höherer akustischer Impedanz nachweisbar (akustische Impedanz  $> 9$  Mrayl bei 25 MHz).

8. Die mittlere akustische Impedanz bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz war für die untersuchten Hämmer mit 7,13 Mrayl am größten. Die Steigbügel wiesen mit 4,67 Mrayl die geringste akustische Impedanz unter den Gehörknöchelchen auf. Die akustische Impedanz der Ambosse lag mit 6,74 Mrayl dazwischen.
9. In Bezug auf die untersuchten Regionen der Hämmer weist der Hammerkopf mit 7,42 Mrayl eine statistisch signifikante höhere akustische Impedanz als das Manubrium (6,5 Mrayl) bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz auf.
10. Der Ambosskörper und der kurze Ambossfortsatz haben eine akustische Impedanz von 6,9 Mrayl. Der lange Ambossfortsatz (6,04 Mrayl) weist dagegen eine statistisch signifikant geringere akustische Impedanz auf.
11. Die Steigbügelfußplatte (4,78 Mrayl) hat eine statistisch signifikant höhere akustische Impedanz als das Steigbügelköpfchen (4,16 Mrayl).
12. In den eigenen Untersuchungen konnte erstmals an Gehörknöchelchen gezeigt werden, dass auch bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz die Verteilung der akustischen Impedanz in den Schnitten von Hammer, Amboss und Steigbügel inhomogen ist.
13. Die bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ermittelte akustische Impedanz der untersuchten Gehörknöchelchen lag bei 3,2 bis 4,0 Mrayl. Die geringeren Impedanzwerte sind Folge der höheren Arbeitsfrequenz.
14. Eine Messung vitaler, in situ befindlicher Gehörknöchelchen wäre wünschenswert, ist aus technischen Gründen aber bisher nicht möglich.
15. Die praktische Anwendung dieser Untersuchungen besteht darin, dass die ermittelten akustischen Impedanzen der Gehörknöchelchen Parameter für neu zu entwickelnde Mittelohrprothesen und auch Eingangsgrößen für Finite Elemente Modelle liefern können.

16. Gegenstand weiterer Studien kann die Bestimmung richtungsabhängiger Elastizitätsunterschiede der Gehörknöchelchen sein, die sich in unterschiedlichen Impedanzen bei verschiedenen Schnittwinkeln widerspiegeln. Vom Schall bevorzugte Wege in den Ossikeln könnten damit aufgezeigt werden.
  
17. Mit der akustischen Rastermikroskopie können pathologische Prozesse im Mittelohr untersucht werden. Dabei könnten eventuell schon vor einer funktionellen Störung Impedanzänderungen als mikrostruktureller Krankheitsindikator nachweisbar sein.

---

## 13 Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat. habil. E.-J. Haberland (Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Beratung während der Arbeit.

Herrn Diplomphysiker Raum und Dr. rer. nat. Klemenz (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Betreuung am akustischen Rastermikroskop

Herrn Dr. med. J. Brandt für die methodische Beratung und Frau Vetter (Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Herstellung der Präparate

Herrn Wustmann (Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Entnahme der Felsenbeine

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Härting (Direktor des Instituts für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Beratung in Fragen der Statistik

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

- Name: Gudziol
- Vorname: Silke
- Geburtsdatum: 28.01.1973
- Geburtsort: Jena
- Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

- 09/1979 - 08/1989: Polytechnische Oberschule Jena
- 09/1989 - 08 1991: Erweiterte Oberschule Jena, Abitur

### Hochschulbildung

---

- 09/1991 - 03/1997: Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Studiengang Humanmedizin
- 04/1997 - 05/1998: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Studiengang Humanmedizin

### Berufliche Weiterbildung

---

- 06/1998-11/1999: ÄiP an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg
- seit 12/1999: Assistenzärztin an der gleichen Klinik

### Famulaturen

---

- 02/1994 - 03/1994: Intensivmedizin / Klinik für Innere Medizin  
der Universität Erlangen-Nürnberg
- 02/1995 - 03/1995: Poliklinik der HNO-Klinik der Universität Jena
- 08/1995: HNO-Klinik der Universität Kuopio/Finnland

---

Stipendium des DFA

- 09/1995 - 10/1995: Innere Medizin am Royal Infirmary Blackburn/England  
Stipendium der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung

Praktisches Jahr

---

- 04/1997 - 08/1997: Klinik für Innere Medizin der  
Universität Nottingham/England
- 08/1997 - 11/1997: Klinik für Chirurgie der Universität Erlangen-Nürnberg
- 12/1997 - 03/1998: HNO-Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg

Halle, den 25.12.2000

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und nur unter Hinzuziehung der im Literaturverzeichnis angeführten Hilfsmittel verfaßt habe.

Halle, den 06.03.2001

Silke Gudziol

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich weder zum vorliegenden Thema, noch zu einem anderen Thema einen Promotionsversuch unternommen habe.

Halle, den 06.03.2001

Silke Gudziol