

Quantitative Akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Phys.

Kay Raum

geb. am 01.03.1972 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Reiner Höche
2. Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn
3. Prof. Dr.-Ing. Helmut Ermert

Halle (Saale), 08. November 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004263

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004263>]

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungen	IV
Tabellen	X
Symbole	XI
Glossar	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Generelle Bedeutung	1
1.2 Spezielle Ziele	2
1.3 Aufbau der Arbeit	2
2 Knochenaufbau	4
2.1 Die hierarchischen Ordnungsebenen	4
2.1.1 Level 1: Die Hauptbestandteile	4
2.1.2 Level 2: Die mineralisierte Kollagenfibrille	5
2.1.3 Level 3: Fibrillenbündel	5
2.1.4 Level 4: Anordnung der Fibrillenbündel	6
2.1.5 Level 5: Osteone	7
2.1.6 Level 6: Compacta und Spongiosa	8
2.1.7 Level 7: Der ganze Knochen	8
3 Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung mechanischer Eigenschaften von Knochen	9
3.1 Klinische Verfahren	9
3.1.1 Dual Energy X-ray Absorption (DEXA)	10
3.1.2 Quantitative Computertomographie (QCT)	10
3.1.3 Broadband Ultrasound Absorption (BUA) und Speed of Sound (SOS)	11
3.2 Experimentelle Verfahren	11
3.2.1 Mikromechanische Techniken	11
3.2.2 Kernspinresonanz	12
3.2.3 Ultraschallmethoden	13
4 Wellenausbreitung	16

4.1	Transmission und Reflexion	16
4.2	Reflexion an einer flüssig-festen Grenzschicht	19
4.3	Schallfeld	20
4.4	Sphärische Aberration	22
4.5	Schallschwächung	23
4.5.1	Absorption	23
4.5.2	Streuung	24
4.6	Eigenschaften des Kopplungsmediums	26
4.7	Bestimmung der Materialkonstanten	28
5	Geräte	31
5.1	Aufbau und Funktionsweise des SAM100	31
5.2	Aufbau und Funktionsweise des SAM2000	35
5.2.1	Mechanischer Schwinger	35
5.2.2	HF-Ketten	35
5.2.3	Modifikationen am SAM2000	38
6	Probenpräparation	41
7	Zeitaufgelöste Methoden	42
7.1	Impedanzabbildung	43
7.1.1	Reproduzierbarkeit	47
7.1.2	Ergebnisse	48
7.1.3	Diskussion der Ergebnisse	50
7.2	Gleichzeitige Bestimmung von Impedanz, Schallgeschwindigkeit und Probendicke	52
7.2.1	Datenerfassung und -verarbeitung	58
7.2.2	Ergebnisse	60
7.3	Diskussion der Ergebnisse	70
8	V(z)-basierte Methoden	74
8.1	Datenauswertung	75
8.2	Ergebnisse	82

8.2.1 Artefakte	83
8.2.2 Reproduzierbarkeit	85
8.2.3 Untersuchungen an Knochen	85
8.2.4 Einfluss der Oberflächentopographie	88
8.3 Diskussion der Ergebnisse	93
9 Zusammenfassung	96
10 Literaturverzeichnis	98
Danksagung	110
Erklärung	111
Lebenslauf	112

ABBILDUNGEN

- Abb. 2-1 Mineralisierte Kollagenfibrille. Die Apatitkristalle liegen geordnet zwischen Kollagenfibrillenbündeln (aus [111]). _____ 5
- Abb. 2-2 Schematische Darstellung der am häufigsten vorkommenden Organisationsmuster: Parallel orientierte Fibrillen, Geflechtknochen, Lamellenknochen, rotierte sperrholzartige Struktur (in Uhrzeigerichtung; aus [111]). _____ 7
- Abb. 2-3 SAM-Aufnahmen von Compacta (a: 200 MHz) und Spongiosa (b: 25 MHz). Die blutversorgenden Gefäße (HAVERS-Kanäle) in (a) erscheinen dunkel und werden von den Osteonenlamellen umhüllt. Die kleinen dunklen Punkte sind Stellen, an denen die Knochenzellen (Osteozyten) sitzen. Zwischen den Osteonen füllen Schaltlamellen die Knochenmatrix komplett aus. Im Gegensatz dazu ist die Spongiosa (b) durch ein dünnes Geflecht von Knochentrabekeln und großen Hohlräumen charakterisiert. _____ 8
- Abb. 4-1 Transmission und Reflexion einer ebenen Welle an einer Grenzschicht bei senkrechtem Einfall. _____ 18
- Abb. 4-2 Transmission und Reflexion an einer flüssig-festen Grenzschicht bei schrägem Einfall. _____ 19
- Abb. 4-3 Amplitude (—) und Phase (·····) der reflektierten (a) und transmittierten Longitudinal- (b) und Scherwellen (c) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel für eine Wasser-Knochen-Grenzschicht. Werte aus Briggs [16]: $v_1 = 4000$ m/s, ____ 20
- Abb. 4-4 Die Kenngrößen eines sphärisch fokussierten Schallfeldes. _____ 21
- Abb. 4-5 Sphärische Aberration bei der Fokussierung unterhalb der Oberfläche eines Festkörpers, hervorgerufen durch Brechung an der Grenzfläche. _____ 22
- Abb. 4-6 Schallgeschwindigkeit und Dämpfung in Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur. _____ 26
- Abb. 5-1 Prinzipskizze des modifizierten SAM100. Alle Hardwarekomponenten werden von einem PC gesteuert. Die x- und y-Achsen des Scanners spannen eine Ebene parallel zur Probenoberfläche auf. Mit der z-Achse, die parallel zur Schallstrahlachse ist, lässt sich der Proben-Wandler-Abstand variieren. _____ 32
- Abb. 5-2 Die graphische Benutzeroberfläche der für das SAM100 entwickelten Software. Das linke Fenster dient der Darstellung der Maximalwerte der Echosequenzen, der Navigation sowie der Scanbereichsauswahl. Das rechte Fenster zeigt das aktuelle Puls-Echo. Die zu speichernde Sequenz wird per Maus markiert (heller

	Bereich). Außerdem können wichtige Parameter der A/D-Karte und des Pulser/Receivers über Popup-Menüs und -Fenster variiert werden. _____	34
Abb. 5-3	Prinzipschaltbild der heterodynen Sende-/ Empfangskette (aus KSI Betriebsanleitung [1]). _____	37
Abb. 5-4	Die graphische Benutzeroberfläche der für das SAM2000 entwickelten Software. Im linken Fenster erfolgt die Darstellung der Bilddaten und in den rechten Fenstern die Steuerung der Hardware. Das Fenster "Signal-Level" zeigt die aktuelle Messzeile (Zackenkurve) im Verhältnis zum Spannungsbereich der A/D-Karte. Der auf 8 bit konvertierte Bereich (dunkel) lässt sich per Mausklick festlegen. Das Popup-Fenster in der Mitte erlaubt die Einstellung der Messparameter für automatische Schichtbildmessungen. _____	39
Abb. 7-1	Die Echos einer homogenen Referenzprobe in Abhängigkeit vom Objekt-Wandler-Abstand (überlagert dargestellt). Die Verbindung der Amplituden der Einhüllenden ergibt die $V(z)$ -Kurve. Mit Hilfe der Laufzeitinformation wird eine Defokussierungskorrektur der Echoamplitude durchgeführt (Korrekturkurve). _	44
Abb. 7-2	Umrechnung der Echoamplituden in Werte des Reflexionskoeffizienten durch Polynomfit zweiter Ordnung. _____	45
Abb. 7-3	Puls-Echo Spektren der für die Untersuchung verwendeten Schallwandler. ____	46
Abb. 7-4	Impedanzbilder eines kortikalen Knochenschnittes mit 0° -Orientierung (die Oberflächennormale ist parallel zur Knochenlängsachse). Die Messungen wurden mit den drei oben beschriebenen Wandlern durchgeführt. Von links nach rechts: V324 (25 MHz), V605 (50 MHz), PT100 (100 MHz). _____	48
Abb. 7-5	Impedanzbilder eines kortikalen Knochenschnittes mit 90° -Orientierung (die Oberflächennormale ist senkrecht zur Knochenlängsachse). Die Messungen wurden mit den drei oben beschriebenen Wandlern durchgeführt. Von oben nach unten: V324 (25 MHz), V605 (50 MHz), PT100 (100 MHz). _____	49
Abb. 7-6	Fokussierung auf Vorder- und Rückseite einer dünnen Schicht. _____	53
Abb. 7-7	$V(z,t)$ – Bild (oben) einer dünnen PMMA-Schicht. Die Einhüllenden der Puls-Echo-Folgen (unten) werden in Abhängigkeit von der Defokussierung des Wandlers relativ zur Probenoberfläche aufgetragen. Die diagonalen Linien kennzeichnen die einzelnen Puls-Echos: L_1 - Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SSCW – Surface Skimming Compressional Wave, SL_2 und L_2 - Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche. Die Helligkeit der Linien ist proportional zur Echoamplitude in dB. Die z-	

	Position des unten dargestellten Puls-Echos ist im $V(z,t)$ -Bild durch eine vertikale Linie markiert. _____	54
Abb. 7-8	Bei Fokussierung auf die Vorderwand (a) heben sich alle Tangentialkomponenten auf (gepunktete Linien). Das gleiche gilt für die Schwingungskomponenten der transmittierten Longitudinal- (b) und Transversalwellen (c) bei Fokussierung auf die rückwärtige Seite der Probe, wodurch die verbleibenden Normalspannungen jeweils eine Longitudinalwelle generieren. _____	57
Abb. 7-9	$V(z)$ -Verläufe der zeitlich separierten Vorder- und Rückwandechos. _____	59
Abb. 7-10	Amplituden- und Phasenspektrum (a und b) eines separierten Echos innerhalb der Bandbreite des Sendepulses. _____	59
Abb. 7-11	Frequenzabhängige $V(z)$ -Verläufe eines separierten Echos (a). Die Bestimmung der Fokusposition z_{\max} wird nur für Mittenfrequenz $V_{fc}(z)$ durchgeführt (b). ____	60
Abb. 7-12	Separierte $V(z)$ -Verläufe der zur Validierung verwendeten Materialien: PTFE (a), Polystyren (b), Polykarbonat (c) und PMMA (d). Die Probendicken wurden jeweils auf die unterschiedlichen Schallgeschwindigkeiten und Dämpfungswerte angepasst. L_1 - Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SL_2 und L_2 - Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche. In der PTFE-Probe konnte keine Transversalwelle detektiert werden. _____	61
Abb. 7-13	Beispiel für die Selektion von Messpunkten zur Bestimmung der elastischen Kenngrößen an kortikalem Knochen. _____	64
Abb. 7-14	$V(z,t)$ – Bild (oben) und separierte $V(z)$ -Verläufe (unten) einer Messung an einer dünnen Knochenprobe. L_1 - Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SL_2 und L_2 - Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche. _____	65
Abb. 7-15	Beziehungen zwischen der akustischen Impedanz und den mechanischen Kenngrößen im kortikalen Knochen. _____	66
Abb. 7-16	Beziehungen der Longitudinalwellengeschwindigkeit zu Dichte (a), mechanischer Festigkeit (b) und Transversalwellengeschwindigkeit (c). Die elastischen Moduln und die Impedanz (d) waren mit v_l nicht korreliert. _____	67
Abb. 7-17	Beziehungen der Transversalwellengeschwindigkeit zur Dichte (a) und dem Schermodul (b). _____	68
Abb. 7-18	Abhängigkeit der Transversalwellengeschwindigkeit (a) und der elastischen Moduln (b-d) von der Poisson-Zahl. _____	69

-
- Abb. 7-19 Die Dichte ist positiv, jedoch nicht signifikant mit der Festigkeit c_{11} und dem Elastizitätsmodul korreliert. _____ 69
- Abb. 7-20 Vergleich der empirischen Korrelation von Meunier et al. [66] mit den eigenen Ergebnissen. _____ 72
- Abb. 8-1 Durch eine Linse wird ein fokussierter Schallstrahl in der xy-Ebene über die Probe gescannt (a). Für die Schichtbildanalyse werden C-Scan-Bilder mit abnehmendem Objekt-Linsen-Abstand gespeichert (b). Durch anschließende Signalauswertung kann in jedem Bildpunkt aus dem $V(z)$ -Verlauf auf Position und Betrag der Signalamplitude geschlossen werden (c). _____ 75
- Abb. 8-2 Maximalwertverteilung (a) und Topographie (b) einer Rasterplatte (alle Längenangaben in μm). Die Werte entlang der eingezeichneten Linien sind darunter dargestellt (c und d). Die z-Position in (b und d) wird durch die Position des Maximalwertes in jedem xy-Bildpunkt bestimmt. An Stellen, wo eine starke Oberflächenneigung bzw. Kanten auftreten, kommt es zu einer Abnahme der Signalamplitude (Bildkontrast im Maximalwertbild). _____ 76
- Abb. 8-3 Dreidimensionale Darstellung der Probenoberfläche einer Rasterplatte. Der Höhenunterschied zwischen erhabenen Quadraten und Tälern beträgt ca. $0,3 \mu\text{m}$. Die z-Achse ist zur besseren Visualisierung 50-fach gezoomt. _____ 77
- Abb. 8-4 Maximalwertverteilungen (a, c) und Topographiebilder (b, d) einer geätzten Rasterplatte, aufgenommen mit 900 MHz. Die Breite der Stege ist $2 \mu\text{m}$ und der Abstand benachbarter Stege $10 \mu\text{m}$. Die Zeilenlängen der Scanfelder sind jeweils 953 und $478 \mu\text{m}$ (von oben nach unten). Während im größten Bildausschnitt aufgrund der maximalen Datenmatrixgröße von 512×512 Bildpunkten Aliasing auftritt, wird die Struktur der Platte bei kleineren Scanfeldern korrekt rekonstruiert. Der Bildkontrast kommt im Amplitudenbild durch die Neigung der Oberfläche an Kanten zustande, während im Topographiebild die Höhe relativ zur Scanebene abgebildet wird. _____ 78
- Abb. 8-5 Häufigkeitsverteilung der lokalen Einfallswinkel der oben dargestellten Rasterplatte in Abhängigkeit von der Scanfeldgröße. Ohne Korrektur führt ein zunehmendes Inkrement sukzessive zu einer Unterbewertung des Neigungswinkels (a). Für Scanfeldgrößen oberhalb von $250 \mu\text{m}$ wurde deshalb eine Korrektur durchgeführt, was mit Ausnahme des 1 mm Scanfeldes zu einem einheitlichen Ergebnis führt (b). _____ 80

-
- Abb. 8-6 Mittelwert und Standardfehler der Spannungswerte des Maximalwertbildes aus Abb. 8-2 a in Abhängigkeit vom Einfallswinkel (a). Die Spannungswerte sind aufgrund des eingestellten Offsets von -5 V negativ. Bis zum Grenzwinkel der Totalreflexion ist ein kontinuierlicher Abfall der Signalamplitude zu verzeichnen (1,35 % bei 7°). Danach steigt die Amplitude aufgrund von Modenkonvertierungen erneut an. Für alle möglichen Scanfeldgrößen sind die Signalamplitude bei 0° sowie der winkelabhängige Verlauf (mit Ausnahme des größten Scanfeldes) bis zum kritischen Winkel annähernd identisch (b). _____ 81
- Abb. 8-7 Abhängigkeit der Reflexionsamplituden der Referenzproben von der RF-Verstärkung bei 900 MHz (a). Kalibrierkurven (b) sind nur in einem eingeschränkten Verstärkungsbereich sinnvoll (hier z.B. für RF-Verstärkungen 96 – 98). _____ 82
- Abb. 8-8 $V(z)$ -Verläufe einer Wasser-PMMA-Grenzfläche bei 900 (—) und 980 MHz (·····). Die Oszillationen in der gestrichelten Kurve entstehen vermutlich durch Interferenz des Nutzsignals mit parasitären Signalanteilen. _____ 83
- Abb. 8-9 Puls-Echo (Mitte) eines 100 MHz Pulses und Störsignale (Pfeile), die durch das Ein- und Ausschalten des Zeitfensters entstehen. _____ 83
- Abb. 8-10 $V(z)$ -Verläufe einer Wasser-PMMA-Grenzschicht bei 400 MHz und verschiedenen Gate-Einstellungen: (a) - das Nutzsignal wird vom Einschaltsignal überlagert, was zu einer Signalüberhöhung in der Nähe des Fokus führt; (b) - ein zu kleines Fenster führt dazu, dass die Überlagerung des Nutzsignals mit dem Ausschaltsignal zu einem erneuten Signalanstieg führt; (c) - korrekte Gatebreite und -position führen zu dem erwarteten $V(z)$ -Verlauf (c). _____ 84
- Abb. 8-11 Auswahl der Schnittebenen (a): 0° ist die Schnittebene senkrecht zur Knochenlängsachse. Die Bezeichnung folgt daraus, dass in dieser Ebene Knochenlängs- und Schallstrahlachse parallel zueinander sind. Drei Messregionen (b) wurden für jeden Schnitt ausgewählt: A- peripher, B- medial und C- zentral. Die separierten Struktureinheiten sind in (c) gekennzeichnet: 1- Osteon, 2- Schaltlamelle mit hoher Impedanz, 3- Schaltlamelle mit niedriger Impedanz. _____ 85
- Abb. 8-12 Winkelabhängigkeit der Impedanz (Mittelwert und Standardfehler) aller Proben (a), und der geschlechtsspezifischen Subgruppen (b). _____ 86
- Abb. 8-13 Mittelwert und Standardfehler für die einzelnen Altersgruppen (a). Winkelabhängigkeit der Mittelwerte morphologischer Auswahlregionen im Vergleich zum Gesamtmessfenster (b). _____ 87

-
- Abb. 8-14 Maximalwert- und Topographiebilder eines Osteons (a und b, alle Dimensionen in μm). Der HAVERS-Kanal (welcher vollständig mit dem Einbettungsmaterial gefüllt ist) in der Mitte ist von alternierenden mineralisierten Kollagenfaserlamellen umgeben. Angrenzend an das Osteon befinden sich mehrere Schaltlamellen. Die kleinen dunklen Punkte sind Kavitäten, in denen sich die Knochenzellen befanden. Die Werte entlang der markierten Linien sind unten dargestellt (c und d). _ 88
- Abb. 8-15 3D-Rekonstruktion der Knochenoberfläche aus Abbildung 8-14. Hauptsächlich in der Region des jungen Osteons ist eine beträchtliche Oberflächenrauigkeit festzustellen, wobei die erhabenen Lamellen eine erhöhte Reflexionsamplitude aufweisen. _____ 89
- Abb. 8-16 10° -Neigungsmaske (a) und segmentierte ROI's der Knochenoberfläche (b) aus Abbildung 8-14. Die Auswahlregionen sind: 1 - PMMA, 2 - Osteon, 2.1 (schwarz) - Lamellen mit hohem Reflexionsgrad, 2.2 (grau) - Lamellen mit niedrigem Reflexionsgrad, 2.3 (grau) - Innerste dicke Lamelle mit deutlich erhöhtem Reflexionsgrad, 3-Schaltlamelle. _____ 90
- Abb. 8-17 Winkelabhängige Impedanzverläufe (links) und Histogramme der Impedanz (rechts) der in Abbildung 8-16 markierten ROI's. Vor der Berechnung der dargestellten Histogramme wurde die 10° -Neigungsmaske angewendet. _____ 92

TABELLEN

Tab. 4-1	Polynomkoeffizienten der Schallgeschwindigkeit in Wasser (die Werte wurden unverändert aus [16] übernommen). _____	27
Tab. 4-2	Akustische Eigenschaften von reinem Wasser (aus [16]). _____	27
Tab. 7-1	Schallfeldparameter der verwendeten Wandler. Die mit einem Stern gekennzeichneten Größen sind Herstellerangaben, alle anderen sind experimentell ermittelt. 43	
Tab. 7-2	Dichte, longitudinale Schallgeschwindigkeit und akustische Impedanz der verwendeten Referenzproben (Standardfehler jeweils in %). _____	45
Tab. 7-3	Mittelwerte und Standardabweichungen für die Impedanz der in Abbildung 7-4 und Abbildung 7-5 abgebildeten PMMA- und Knochenbereiche. Nur die größeren PMMA-Bereiche an den Bildrändern wurden für eine Histogrammauswertung herangezogen. Die mit PMMA gefüllten Bereiche im Knochen (HAVERS-Kanäle) wurden durch eine Schwellwertmaske von der Auswertung ausgeschlossen. Für Knochen sind zusätzlich der Maximalwert sowie der 50 %-Bereich der Verteilung angegeben. _____	50
Tab. 7-4	Akustische und abgeleitete mechanische Materialkenngrößen der Referenzmaterialien (Mittelwert und Standardabweichung). Die separat ermittelten Proben-dicken, -dichten und Schallgeschwindigkeiten ¹ , sowie Hersteller ² - bzw. Tabellenangaben ³ [3,16] sind, soweit verfügbar, jeweils kursiv dargestellt. Für jede Probe wurden 20 Messungen an verschiedenen Stellen durchgeführt. _____	62
Tab. 8-1	Scanfeldgrößen und maximale Pixelauflösung am SAM2000. _____	79
Tab. 8-2	Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler der in Abbildung 8-16 markierten ROI's (alle Werte in Mrayl). _____	91

SYMBOLE

a	Wandler- oder Teilchenradius [m]
c_v	Wärmekapazität bei konstantem Volumen [Jmol/K]
c_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck [Jmol/K]
c_{ij}	Koeffizienten der Elastizitätsmatrix [Pa] = [kg/m ²]
c_{11}	Festigkeit [Pa] = [kg/m ²]
c_{44}	Schermodul [Pa] = [kg/m ²]
d	Probendicke [m]
f	Frequenz [Hz] = [1/s]
f_c	Mittenfrequenz [Hz] = [1/s]
$f^\#$	f-Nummer (=ROC/2a)
k	Wellenvektor [1/m]
n	Brechungsindex
$p=p(x,t)$	von Ort und Zeit abhängiger Überschuss- oder Schalldruck [Pa] = [kg/m ²]
t	Zeit [s]
\vec{u}	Teilchenverschiebungsgeschwindigkeit [m/s]
s	Kompression (= ρ_e/ρ)
s_{ij}	Komplianzmatrix
x,y,z	kartesische Koordinaten [m]. Die Schallstrahlachse ist üblicherweise auf der z-Achse, x und y sind die dazu orthogonalen Richtungen. Bei einem C-Scan wird die Richtung der kontinuierlichen Bewegung als x und die Richtung der schrittweisen Bewegung als y bezeichnet.
B	Bulk- oder Kompressionsmodul [Pa] = [kg/m ²]
$D_{lateral}$	Laterales Auflösungsvermögen [m]
E	Elastizitäts,- oder YOUNG-Modul [Pa] = [kg/m ²]
F	Fokusabstand [m]
F_z	Fokustiefe [m]
G	Schermodul [Pa] = [kg/m ²]
I	Schallintensität [W/m ²]
J_1	Bessel-Funktion erster Ordnung
K	Kompressibilität
L	Longitudinalwelle

<i>MLA</i>	Multi Layer Analysis - Sequenz von C-Scan-Bildern mit variablem Wandler-Proben-Abstand
<i>R</i>	Reflexionskoeffizient
<i>R(θ)</i>	komplexe Reflektanzfunktion
<i>ROC</i>	Radius of Curvature (Wandlerkrümmungsradius) [m]
<i>S</i>	Transversal- oder Scherwelle
<i>SL</i>	Transversalwelle auf dem Hin- und Longitudinalwelle auf dem Rückweg
<i>SSCW</i>	Surface Skimming Compressional Wave, Longitudinalwelle, die sich entlang der Oberfläche ausbreitet
<i>T</i>	Transmissionskoeffizient; Temperatur [K]
<i>T(θ)</i>	komplexe Transmissionsfunktion
<i>TOF</i>	Time of Flight (Puls-Echo-Laufzeit) [s]
<i>V(z)</i>	Echoamplitude in Abhängigkeit vom Wandler-Proben-Abstand [V]
<i>V(z,t)</i>	Puls-Echo-Sequenz in Abhängigkeit vom Wandler-Proben-Abstand [V]
<i>Z</i>	Akustische Impedanz [rayl] = [kgm ⁻² s ⁻¹]
<i>α</i>	Dämpfung [dB/MHz/m]; Einfallswinkel [°]
<i>β</i>	Ausfallswinkel [°]
<i>γ</i>	Verhältnis der spezifischen Wärmekapazitäten
<i>η</i>	Scherviskosität [Ns/m ²]
<i>κ</i>	Wärmeleitfähigkeit [W/m/K]
<i>λ</i>	Wellenlänge [m]
<i>v</i>	Schallgeschwindigkeit [m/s]
<i>v₀</i>	Schallgeschwindigkeit im Kopplungsmedium [m/s]
<i>v_l</i>	Longitudinalwellengeschwindigkeit [m/s]
<i>v_s</i>	Transversal- oder Scherwellengeschwindigkeit [m/s]
<i>θ</i>	Einfallswinkel [°]
<i>ρ</i>	Dichte [kg/m ³]
<i>σ</i>	Poisson-Zahl (Querkontraktionszahl)
<i>σ</i>	Mechanische Spannung [Pa] = [kg/m ²]
<i>σ_T</i>	Zugspannung [Pa] = [kg/m ²]
<i>τ</i>	Relaxationszeit [s]; Pulslänge [s]
<i>ω</i>	Kreisfrequenz [Hz]

GLOSSAR

- A-Scan Akquisition eines Puls-Echo-Signals ohne Bewegung des Schallwandlers.
- A(z)-Scan Sukzessive Akquisition einer Folge von Puls-Echo-Signalen, wobei der Schallwandler in Richtung der Schallstrahlachse bewegt wird. Die zweidimensionale Darstellung der Hüllkurven wird auch als $V(z,t)$ -Bild bezeichnet.
- B-Scan Sukzessive Akquisition einer Folge von Puls-Echo-Signalen, wobei der Schallwandler in einer Richtung senkrecht zur Schallstrahlachse (d.h. in der Regel parallel zur Oberfläche der untersuchten Probe) bewegt wird. Die zweidimensionale Darstellung der Hüllkurven wird auch als B-Bild bezeichnet.
- B(z)-Scan Kombination von B- und A(z)-Scan. Mehrere B-Scan-Akquisitionen werden mit unterschiedlichen Wandler-Proben-Abständen durchgeführt. Dieser Modus wird z.B. zur Schallfeldmessung oder der Erstellung von Compound-B-Bildern verwendet.
- C-Scan Der Wandler wird mäanderförmig in einer Ebene parallel zur Probenoberfläche geführt. Üblicherweise wird das Puls-Echo-Signal innerhalb eines wählbaren Zeitfensters (Gate) demoduliert und integriert, so dass pro Scanpunkt ein integraler Spannungswert zur Verfügung steht. Diese werden zu einem zweidimensionalen Grauwertbild zusammengesetzt. Im hier beschriebenen SAM100-System wird hingegen von jedem Scanpunkt das komplette Puls-Echo-Signal gespeichert.
- C(z)-Scan Kombination von C- und A(z)-Scan. Mehrere C-Scan-Akquisitionen werden mit unterschiedlichen Wandler-Proben-Abständen durchgeführt.
- V(z)-Scan Sukzessive Akquisition der Reflexionsamplitude, wobei der Schallwandler in Richtung der Schallstrahlachse bewegt wird. Bei der Verwendung von Wandlern mit großen Aperturwinkeln und schmalbandigen bzw. Burst-Pulsen kommt es bei Defokussierung unter die Oberfläche von Materialien mit hohen Schallgeschwindigkeiten zur Generierung von Oberflächenwellen (z.B.

RAYLEIGH-Wellen), welche Energie in das Kopplungsmedium verlieren und mit den reflektierten Wellen interferieren. Dadurch kommt es zu charakteristischen Oszillationen im $V(z)$ -Verlauf, woraus sich die Schallgeschwindigkeit der Oberflächenwelle ermitteln lässt. Durch die Verwendung von zylindrisch fokussierten Linsen ist eine quantitative Charakterisierung anisotroper elastischer Materialeigenschaften möglich.

V(z,t)-Scan zeitaufgelöster $V(z)$ -Scan, siehe A(z)-Scan.

1 EINLEITUNG

1.1 Generelle Bedeutung

Die Akustische Rastermikroskopie (Scanning Acoustic Microscope, SAM) ist eines der jüngeren heute zur Verfügung stehenden mikroskopischen Untersuchungsverfahren. Das erste Mikroskop dieser Art (Scanning Acoustic Microscope, SAM) wurde 1974 von Lemons und Quate [59] entwickelt. Seitdem haben sich verschiedene Variationen dieses Verfahrens zur zerstörungsfreien Werkstoffprüfung, aber auch zur Untersuchung von biologischen Weichgeweben und lebenden Zellen etabliert. Hochfrequenzmikroskope sind kommerziell jedoch erst seit Mitte der achtziger Jahre verfügbar und ihre Verbreitung liegt weit unter dem anderer Mikroskopiesysteme. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroskop KSI SAM2000 ist z.B. eines von momentan rund 30 weltweit verkauften Systemen.

Neben der Möglichkeit, optisch undurchsichtige Materialien durchdringen zu können, liegt ein besonderes Potenzial akustischer Wellen in der elastischen Wechselwirkung mit dem von ihr durchsetzten Medium, woraus sich unter geeigneten Umständen dessen elastische Eigenschaften ableiten lassen. Eine der wichtigsten mikroskopischen Methoden für die quantitative Charakterisierung akustischer und elastomechanischer Eigenschaften von Feststoffen ist die Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von RAYLEIGH-Wellen mit Hilfe sogenannter $V(z)$ -Messungen [16]. An Knochengewebe konnte diese Methode bisher jedoch aufgrund dessen komplexer, heterogener Struktur nicht erfolgreich angewendet werden. Es ist zwar ohne weiteres möglich, ein kontrastreiches Abbild einer Knochenoberfläche zu erzeugen, die Schwierigkeit liegt jedoch darin, die verschiedenen zur Bildentstehung beitragenden Faktoren von dem gewünschten, durch variierende Materialeigenschaften hervorgerufenen Kontrast, zu separieren.

Ein wesentlicher Vorteil gegenüber anderen mikromechanischen Untersuchungsverfahren liegt in der zweidimensionalen Abbildung morphologischer Strukturen, wobei Auflösungsvermögen und Abbildungsdimensionen nahezu kontinuierlich an die erforderlichen Bedingungen angepasst werden können.

Die Beurteilung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe ist in verschiedenen Disziplinen von Interesse. Eine Voraussetzung zur dauerhaften und stabilen Verankerung lasttragender Implantate, z.B. Gelenkendoprothesen, ist, dass der angrenzende Knochen zum Zeitpunkt der Implantation mechanisch belastbar ist. Zur Optimierung von Implantatwerkstoffen und Prothesendesign ist insbesondere eine quantitative Charakterisierung der Veränderung der elastischen Eigenschaften durch die Anpassung an veränderte Kraftübertragungsver-

hältnisse notwendig. Daneben liegen bis heute nur vereinzelte Erkenntnisse vor, wie Stoffwechselerkrankungen die mechanische Belastbarkeit des Knochens beeinflussen.

1.2 Spezielle Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war, quantitative akustische Mikroskopiemethoden zu entwickeln, mit denen die Charakterisierung der elastischen Eigenschaften der Knochenmikrostruktur möglich wird. Dafür standen am Institut für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) zwei kommerzielle Mikroskope zur Verfügung. Diese sind jedoch primär für qualitative Bildgebungszwecke und semiquantitative Anwendungen, hauptsächlich im Bereich der zerstörungsfreien Werkstoffprüfung entwickelt worden. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand deshalb in der Untersuchung der Systemübertragungseigenschaften sowie der Modifizierung von Hard- und Software, um eine quantitative, reproduzierbare Untersuchung von Knochen zu ermöglichen. Der zweite Schwerpunkt lag in der Entwicklung von Mess- und Datenverarbeitungsmethoden, mit denen akustische und elastische Parameter abgeleitet werden können. Diese Methoden sollten so weit wie möglich Einflüsse berücksichtigen, die sowohl durch die üblicherweise in der akustischen Rastermikroskopie eingesetzten stark fokussierten sphärischen Schallfelder als auch durch die strukturierte, hierarchische Struktur des Knochens entstehen.

1.3 Aufbau der Arbeit

In Kapitel 2 werden die einzelnen Organisationsebenen des Knochens beschrieben. Kapitel 3 stellt die momentan eingesetzten klinischen Diagnoseverfahren vor. Die Möglichkeiten und Limitationen werden diskutiert. Außerdem gibt dieses Kapitel einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung mit Fokus auf die Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe. Kapitel 4 beschreibt die physikalischen Gesetze der Schallausbreitung und -schwächung sowie prinzipielle Eigenschaften fokussierter Schallfelder. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels zeigt die Verknüpfung von akustischen und elastischen Größen in isotropen und anisotropen Materialien. In Kapitel 5 werden der jeweilige Ausgangszustand beider Mikroskope und die vorgenommenen Modifizierungen beschrieben. Die Darstellung der Probenpräparation erfolgt in Kapitel 6. Die Methoden zur quantitativen Knochencharakterisierung sind entsprechend der unterschiedlichen Konzepte und der Art der Datenerfassung in den beiden anschließenden Kapiteln zusammengestellt. Während Kapitel 7 zeitaufgelöste Methoden zur zweidimensionalen Abbildung der akustischen Impedanz und zur gleichzeitigen Bestimmung von Probendicke, akustischen und elastischen Materialkenngrößen im Frequenzbereich bis 100 MHz beschreibt, wird in Kapitel 8 eine Methode zur

quantitativen Bestimmung der akustischen Impedanz unter Berücksichtigung der Oberflächentopographie und der daraus resultierenden Oberflächenneigung bei einer Frequenz von 900 MHz und einer entsprechenden Ortsauflösung von ungefähr einem Mikrometer vorgestellt. Eine zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse sowie einen Ausblick auf die sich aus dieser Arbeit ergebenden Möglichkeiten enthält Kapitel 9.

2 KNOCHENAUFBAU

2.1 Die hierarchischen Ordnungsebenen

Knochen ist ein gegen Druck, Zug, Biegung und Torsion belastbares Gewebe, welches sich optimal an die gestellten Anforderungen anpassen und bei Veränderungen umbauen kann. Es besteht aus Knochenzellen, den sogenannten Osteozyten, und der extrazellulären Matrix. Nach Weiner et al. [111] lässt sich letztere in sieben hierarchisch geordnete Organisationsebenen einteilen. Die hauptsächlichen Bestandteile sind Kollagen, Mineralkristalle und Wasser, welche sich in einem wohlgeordneten Aufbaublock, der mineralisierten Kollagenfibrille, zusammenfügen. Die hohe funktionelle und mechanische Differenzierung verschiedener Knochengewebe wird durch eine variable konstitutionelle und strukturelle Zusammensetzung sowohl in einzelnen Fibrillen als auch in übergeordneten Organisationsverbänden erreicht.

2.1.1 Level 1: Die Hauptbestandteile

Neben vielen anderen Proteinen bildet das Kollagen vom Typ I den Hauptbestandteil der organischen Matrix des Knochens. Dieses ist charakterisiert durch seinen faserartigen Aufbau, wobei einzelne Fibrillen einen Durchmesser in der Größenordnung von 80 - 100 nm haben. Jede Fibrille besteht aus Polypeptidketten mit einer Länge von ungefähr 1000 Aminosäuren, die in Form einer Dreifachspirale zylindrisch geformte Moleküle mit einem Durchmesser von ungefähr 1,5 nm und einer Länge von 300 nm bilden. Zu bemerken ist, dass die Anordnung in allen drei orthogonalen Richtungen verschieden ist.

Der zweite Hauptbestandteil ist das als Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) bekannte Mineralkristall. Trotz der hexagonalen Kristallsymmetrie findet man im Knochengewebe plättchenförmige Kristalle mit einer erstaunlich gleichmäßigen Größe von $50 \times 25 \text{ nm}^2$, ihre Dicke variiert von 1,5 bis 4 nm. Messungen des YOUNG-Moduls an synthetisch hergestelltem Hydroxylapatitpulver ergaben 109 GPa, wohingegen im Einkristall ein Wert von 114 GPa ermittelt wurde [111]. Von der im Knochen vorkommenden Kristallstruktur sind aufgrund der Größenverhältnisse keine Messwerte bekannt.

Die dritte Komponente des Knochenverbundes ist Wasser. Dieses befindet sich in den Fibrillen, den Hohlräumen, zwischen den Triple-Helix-Molekülen, aber auch zwischen Fibrillen und größeren Faserverbänden. Das Wasser hat einen bedeutenden Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Verbundes. Mechanische Tests an trockenen Knochen unterscheiden sich daher von denen am feuchten Knochen [21].

Das Volumenverhältnis der einzelnen Komponenten zeigt einen relativ konstanten Anteil an organischer Kollagenmatrix, während unterschiedliche Mineralisierungsgrade auf Kosten des Wasseranteils gehen. Das mittlere Verhältnis ist für einen bestimmten Knochentyp durch einen komplizierten und nur teilweise verstandenen Aufbaumechanismus gegeben. Außerdem wachsen die Mineralkristalle mit der Zeit, was zu einem Anstieg der Mineralisierung in älteren Geweben führt. Bei einer Untersuchung der daraus resultierenden mechanischen Auswirkung fand z.B. Currey [21] eine starke Korrelation zwischen Mineralanteil und dem ermittelten YOUNG-Modul von kompaktem Knochen unterschiedlicher Tierarten.

2.1.2 Level 2: Die mineralisierte Kollagenfibrille

Aufgrund des Arrangements von plättchenförmigen Apatitkristallen in Kollagenfibrillen kann die auf dieser Organisationsebene gebildete Aufbaueinheit als orthotrop betrachtet werden. Eine wichtige Rolle bei der Modellierung von Kompressions- und Scherverhalten sowie der Bruchfestigkeit dieser Kompositstruktur spielt die Grenzfläche zwischen organischer Matrix und mineralischer Phase. Obwohl dies bisher kaum untersucht wurde, ist aufgrund der Tatsache, dass die organische Matrix die Form und Orientierung der Apatitkristalle bestimmt, anzunehmen, dass es sich um eine Grenzfläche mit starker Bindung handelt. Während sich die Mineralplättchen in jüngeren Entwicklungsstadien in den Zwischenräumen der Kollagenmatrix befinden, führt das Kristallwachstum schließlich zur Verdrängung der Peptidketten und zum Zusammenschluss größerer Kristallverbände, was natürlich die mechanischen Eigenschaften des Verbundes beträchtlich beeinflusst.

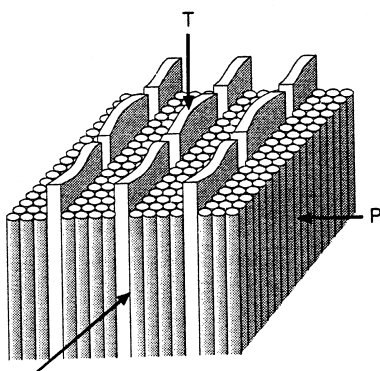


Abbildung 2-1 Mineralisierte Kollagenfibrille. Die Apatitkristalle liegen geordnet zwischen Kollagenfibrillenbündeln (aus [111]).

2.1.3 Level 3: Fibrillenbündel

Mineralisierte Kollagenfibrillen kommen im Knochen nahezu immer in größeren parallelen Verbänden vor, wobei ein typisches Merkmal das teilweise Verschmelzen benachbarter Fibrillen ist. Eine Kernfrage ist, inwieweit sich die orthotrope Ordnungsstruktur der

einzelnen Fibrillen in diesen Verbänden fortsetzt, was letztlich entscheidet, ob die Materialeigenschaften makroskopischer Organisationsverbände orthotrop oder transversal isotrop sind.

2.1.4 Level 4: Anordnung der Fibrillenbündel

Betrachtet man größere Arrayverbände, so findet man verschiedene Muster sich wiederholender Strukturen. *Parallel orientierte Fibrillen* kommen z.B. in mineralisierten Sehnen, in Fischschuppen und den Skeletten verschiedener Fisch- und Amphibienarten, aber auch in sehr frühen Entwicklungsstadien der Skelette größerer Tiere vor. Durch die nahezu identische Ausrichtung sind die mechanischen Eigenschaften eindeutig anisotrop. Unterschiedliche elastische Moduln in den drei orthogonalen Richtungen konnten z.B. von Ziv et al. [115] an parallel gefasertem Knochen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist *Geflechtknochen* gekennzeichnet durch eine geringe Packungsdichte und Orientierung von Faserbündeln unterschiedlicher Durchmesser (bis zu 30 μm). Sowohl die Kollagenmatrix als auch die Mineralphase sind wenig bis gar nicht organisiert. Ein Merkmal ist die große Mineralisierungsrate. Man findet dieses Muster in den Skeletten von Amphibien, Reptilien und im Skelett von embryonalen Säugetieren. Dies ist auch die erste gebildete Knochenstruktur nach einer Fraktur bzw. pathologischen Veränderungen, wenn eine schnelle Knochenformation stattfindet. Su et al. [99] haben an humanen fötalen Femurknochen gezeigt, dass mit zunehmender Entwicklung eine komplexe Ordnungsstruktur entsteht, wodurch die resultierenden Eigenschaften eindeutig anisotrop werden.

Die komplexeste Organisationsform findet man im *Lamellenknochen*, welcher durch alternierende Lagen von Faserbündeln unterschiedlicher Orientierung gekennzeichnet ist. In der einfachsten Form sind die Faserbündel in alternierenden Schichten orthogonal zueinander orientiert, z.B. im sogenannten Cementum, einer knochenähnlichen Hartschicht, welche ab der Zahnschmelzgrenze das Dentin überzieht und somit eine Verbindung zwischen Dentin und Kieferknochen schafft. In wesentlich komplexerer Form bildet es die Basis aller lamellären Knochenstrukturen. Ein markantes Merkmal ist hierbei die unterschiedliche Dicke und Orientierung der einzelnen Lamellen. Jüngere Modelle gehen von einer sich wiederholenden Einheit von fünf Schichten aus, die sukzessive jeweils um ungefähr 30° gegeneinander verdreht sind. Daraus ergibt sich eine nicht symmetrische Aufbaueinheit. Die Dicke einzelner Lagen kann beträchtlich variieren, wodurch der klassische Eindruck der aus dicken und dünnen aufgebauten Sperrholzstruktur vermittelt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Orientierung der Kristallplättchen innerhalb der einzelnen Sub-Schichten kontinuierlich ändert, von einer Orientierung parallel zur Lamellengrenze in der ersten Schicht bis hin zu

einem steilen Winkel in der fünften Schicht. Von Ziv et al. [115] wurde die Anisotropie dieser **rotierten sperrholzartigen Struktur** durch Mikrohärte-Eindrücke an Rattentibia-Präparaten untersucht. Im Vergleich zu parallel gefasertem Knochen ist der Grad der Anisotropie deutlich geringer, was auf die Adaptation des Knochens auf multidirektionale Belastungsrichtungen schließen lässt.

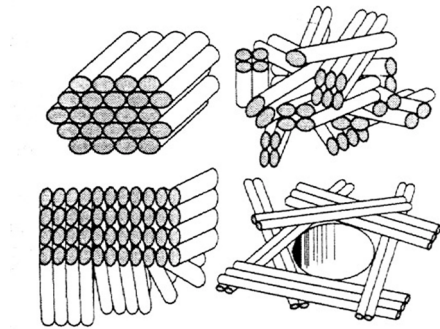


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der am häufigsten vorkommenden Organisationsmuster: Parallel orientierte Fibrillen, Geflechtknochen, Lamellenknochen, rotierte sperrholzartige Struktur (in Uhrzeigerrichtung; aus [111]).

2.1.5 Level 5: Osteone

Im Gegensatz zu anderen mineralisierten Kollagenstrukturen wie z.B. Dentin oder mineralisierten Sehnen ist Knochen einem ständigen Umbauprozess unterworfen. Bei diesem als *Remodeling* bezeichneten Prozess werden von knochenabbauenden Zellen, den Osteoklasten, große Röhren in die Knochenmatrix gegraben. Osteoblasten sorgen im Anschluss für den Aufbau neuer Strukturen, indem beginnend von der "Tunnelwand" zunächst eine dünne kollagenfaserarme Zementschicht und danach Schichten von lamellärem Knochen aufgebaut werden. Dieser Prozess endet, wenn nur noch ein kleiner Kanal verbleibt, in dem ein Blutgefäß für den Stoffwechsel sorgt. Außerdem enthält der Kanal Nerven und lockeres Bindegewebe. Zwischen den Lamellen befinden sich in Knochenhöhlen, den Lacunae ossea, die als Osteozyten bezeichneten Knochenzellen. Diese sind flach und haben in feinen Kanälchen verlaufende lange Fortsätze, welche durch adhäsive Kontakte (gap-junctions) mit den Fortsätzen benachbarter Zellen in Verbindung stehen. Die Versorgung der Knochenzellen erfolgt von dem Zentralgefäß aus durch Diffusion. Diese als Osteone oder Havers-Systeme bezeichneten zylindrischen Strukturen bilden die wichtigste Aufbaueinheit des kompakten Knochens bei zahlreichen höheren Tieren. Die Orientierung der Längsachsen ist sehr häufig annähernd parallel zur Hauptbelastungsrichtung, z.B. parallel zur Längsachse des Femurschafts. Daneben gibt es sehr viel kleinere Kanalsysteme (Canaliculi), welche benachbarte Osteone miteinander verbinden. Der Zwischenraum der zylindrischen Röhren wird durch nicht abgebaute Reste ehemaliger Osteone, den sogenannten Schaltlamellen, ausgefüllt.

2.1.6 Level 6: Compacta und Spongiosa

Als Compacta wird das in den Diaphysen der Röhrenknochen gebildete, dichtgepackte Knochengewebe bezeichnet. Es besteht aus Osteonen und Schaltlamellen. An der äußeren und inneren Oberfläche schließen Generallamellen den Knochen ab. Während die äußeren Generallamellen geschlossen sind, werden die zur Knochenhöhle hin gelegenen Lamellen häufig unterbrochen. Als Spongiosa oder trabekulärer Knochen wird der in den Epi- und Metaphysen und kurzen Knochen vorkommende schwammartige Knochen bezeichnet. Charakteristisch sind die auf Leichtbauweise optimierten dünnen Knochen trabekel, welche hauptsächlich parallel und senkrecht zu den auftretenden Kräftetrajektorien verlaufen.

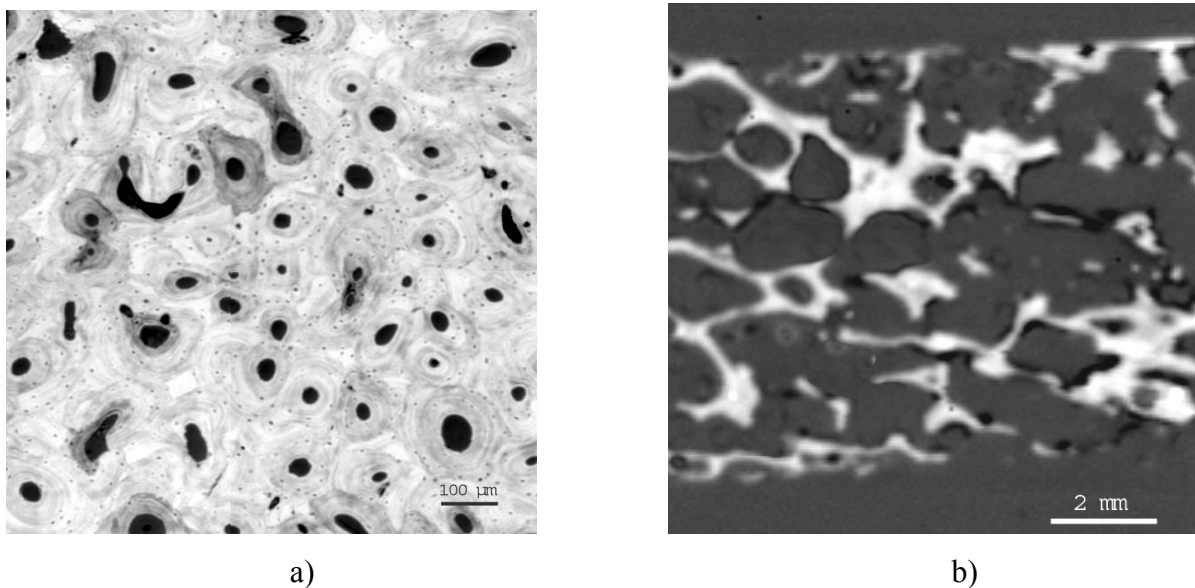


Abbildung 2-3 SAM-Aufnahmen von Compacta (a: 200 MHz) und Spongiosa (b: 25 MHz). Die blutversorgenden Gefäße (Havers-Kanäle) in (a) erscheinen dunkel und werden von den Osteonlamellen umhüllt. Die kleinen dunklen Punkte sind Stellen, an denen die Knochenzellen (Osteozyten) sitzen. Zwischen den Osteonen füllen Schaltlamellen die Knochenmatrix komplett aus. Im Gegensatz dazu ist die Spongiosa (b) durch ein dünnes Geflecht von Knochen trabekeln und großen Hohlräumen charakterisiert.

2.1.7 Level 7: Der ganze Knochen

Durch die Vielzahl der Variationsmöglichkeiten in den einzelnen Baueinheiten können Knochen mit den unterschiedlichsten mechanischen und funktionellen Eigenschaften gebildet werden. Die belastungsoptimierte Ausrichtung der Baueinheiten und die damit verbundene ausgeprägte Inhomogenität und Anisotropie machen daher eine eindeutige Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften recht kompliziert.

3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG MECHANISCHER EIGENSCHAFTEN VON KNOCHEN

Eine ganze Reihe von Testmethoden hat sich etabliert, mit der die mechanischen Eigenschaften des Verbundmaterials Knochen (makroskopische Volumeneigenschaften) untersucht werden. Die mechanisch-funktionellen Eigenschaften ergeben sich jedoch maßgeblich durch Zusammensetzung und Orientierung der mikrostrukturellen Komponenten (Wagner et al. [106]). Keines der bisher klinisch eingesetzten Verfahren ist in der Lage, das komplexe Zusammenspiel von Zusammensetzung, Struktur und mikromechanischen Eigenschaften zu erfassen und daraus die Bauteileigenschaften eines Knochens abzuleiten. Daher muss bei der Interpretation der Messergebnisse und der Abschätzung makroskopischer Eigenschaften zum großen Teil von empirisch gefundenen Zusammenhängen zwischen den zu erfassenden Messgrößen und mechanischen Größen ausgegangen werden.

Für ein besseres Verständnis der Einflussfaktoren auf die makroskopischen Knocheneigenschaften besteht ein klinisches Interesse, quantitative experimentelle Untersuchungen im mikrostrukturellen Bereich durchzuführen (Weiner et al. [111]). Verschiedene Verfahren, welche das dafür nötige Auflösungsvermögen aufweisen, sind getestet worden (Lichtmikroskopie, TEM, SEM [Transmission und Scanning Elektron Microscopy], SAXS [Small Angle X-ray Scattering], AFM [Atomic Force Microscopy], Mikrohärte, Nanoindenter). Obwohl diese Verfahren erfolgreich zur Aufklärung einzelner struktureller und elastischer Parameter eingesetzt werden [110,115], erscheinen sie jedoch für eine quantitative elastomechanische Beschreibung der komplexen Mikrostruktur des Verbundmaterials Knochen nicht ausreichend. In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Ergebnisse einzelner Untersuchungsmethoden dargestellt. Umfassende Übersichtsarbeiten dazu sind z.B. von Lang et al. [56], Genant et al. [31] sowie von Weiner und Wagner [111] erschienen.

3.1 Klinische Verfahren

Die wichtigste klinische Messgröße zur Diagnostik von metabolischen Knochenveränderungen sowie der quantitativen Beurteilung des Frakturrisikos ist die sogenannte Knochenmineraldichte (**Bone Mineral Density**, BMD), welche ein Maß für die hydroxylapatitäquivalente Dichte in mg/cm^3 (mgHA/cm^3) ist. Die wichtigsten Methoden zur Bestimmung des BMD-Wertes sind: **Radiographische Absorptiometrie (RA)**, **Photodensitometrie**, **Single- und Dual- Photon Absorptiometry (SPA, DPA)**, **Dual Energy X-ray Absorptiometrie (DEXA)** und

die **Quantitative Computertomographie (QCT)**. Die beiden letztgenannten Verfahren haben heute die größte Bedeutung und werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

3.1.1 Dual Energy X-ray Absorption (DEXA)

Dieses 1987 eingeführte Diagnoseverfahren basiert auf der Messung der Schwächung der Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energien durch ein Medium, welches sich aus zwei Komponenten zusammensetzt (Knochen und Weichgewebe). Durch die separate Auswertung der Absorptionsspektren lässt sich die durch das Weichgewebe hervorgerufene Schwächung eliminieren und aus dem Verhältnis der abgeschwächten und nicht abgeschwächten Photonflussraten der Schwächungskoeffizient des Knochengewebes ermitteln. Letzterer wird maßgeblich durch den Mineralanteil bestimmt.

3.1.2 Quantitative Computertomographie (QCT)

Knochenmineralphantome werden verwendet, um die bei der Computertomographie erhaltenen Grauwerte (Hounsfieldwerte) in BMD-Werte umzurechnen. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, nichtinvasiv und zweidimensional die BMD-Verteilung im Volumen zu bestimmen, was insbesondere bei der Untersuchung des vertebrealen trabekulären Knochens zur Beurteilung von Frakturrisiko, altersbedingtem Knochenschwund und den Folgen von Osteoporose und anderen metabolischen Knochenkrankheiten dient. Dreidimensionale Rekonstruktionstechniken aus Serien von 2D-Aufnahmen erlauben jedoch eine bessere Diagnose. Mit Hilfe von Spiral-CT-Systemen ist es möglich, z.B. die komplexe Struktur des Femurkopfes darzustellen. Biomechanische Untersuchungen *in vitro* ergaben eine zwar signifikante, jedoch auch moderate Abhängigkeit zwischen Trabekelmineraldichte und der Femurfestigkeit bei Versuchen, die eine Fraktur nach Belastung im einbeinigen Stand simulieren. In Tests, die eine Fraktur nach Fall zur Seite simulieren, konnte eine hohe Korrelation zwischen BMD und Femurfestigkeit nachgewiesen werden [56]. Die Verwendung der Standardabweichung der BMD als zusätzlichen Parameter zur Beurteilung des Osteoporosegrades erwies sich als nicht geeignet [27]. Ein limitierender Faktor an klinisch eingesetzten QCT-Geräten ist das räumliche Auflösungsvermögen ($> 0,5$ mm). Ultrahochauflösende *in vivo* CT-Scanner erreichen eine örtliche Diskriminierung von 100 - 200 μm bei akzeptabler Röntgenexposition. Auf der Basis dieser Daten haben Engelke et al. [28] ein dreidimensionales digitales Trabekelknochenmodell entwickelt, mit dem sowohl histomorphologische Untersuchungen an realen Daten durchgeführt als auch die Präzision von QCT-Analysealgorithmen überprüft werden können. Seit einigen Jahren sind sogenannte 3D- μCT -Scanner mit Ortsauflösungen von bis zu 20 μm verfügbar, mit denen *in vitro* neben den klassischen histomorphologischen

Parametern Trabekeldicke und -abstand auch topologische Messgrößen, wie z.B. die räumliche Vernetzung zu erfassen sind.

3.1.3 Broadband Ultrasound Absorption (BUA) und Speed of Sound (SOS)

Eines der wichtigsten klinisch eingesetzten In-vivo-Ultraschallverfahren zur quantitativen Charakterisierung von Osteoporosegrad und Frakturrisiko ist die Bestimmung der Schallgeschwindigkeit (Speed Of Sound, SOS) und der frequenzabhängigen Dämpfung (Broadband Ultrasonic Attenuation, BUA) im Frequenzbereich von 500 kHz bis 2 MHz am Fersenbein. Verschiedene Modelle, wie die 1956 von Biot [12,13] aufgestellte Theorie zum Durchgang von Schall durch poröse Medien sowie Schoenbergs Theorie [91] zur Schallausbreitung in geschichteten Medien sind herangezogen worden, um strukturelle Informationen aus den experimentellen Daten zu gewinnen (Hughes et al. [46]). Der Nachteil dieser Methoden besteht im allgemeinen jedoch darin, dass von sehr vereinfachenden Annahmen ausgegangen werden muss. Biot's Theorie z.B. verlangt bis zu 14 Parameter, u.a. die Dichten, Scherviskositäten, Volumenmoduln, Poissonverhältnisse der einzelnen beteiligten Komponenten sowie strukturelle Größen, wie Porosität, Permeabilität etc., welche größtenteils mit makroskopischen Methoden nicht zugänglich sind. So sind zwar zahlreiche Arbeiten zur In-vivo-Erfassung von Knocheneigenschaften erschienen, die empirische Korrelationen zwischen akustischen und einzelnen mechanischen Parametern zeigen [14,31]. Eine hinreichend gute Modellierung unter Einbeziehung aller beeinflussenden Größen konnte jedoch bis jetzt nicht gefunden werden [111].

3.2 Experimentelle Verfahren

3.2.1 Mikromechanische Techniken

Die Vickers-Mikrohärteindentation und die Nanoindentation sind die wichtigsten mikromechanischen Untersuchungsmethoden. Mikrohärteversuche werden seit langer Zeit zur Untersuchung der Festigkeit von Knochen durchgeführt [4]. Die Mikrohärte ist zwar ein zuverlässiger Parameter, um mechanisch relevante Veränderungen, wie z.B. den Mineralisierungsgrad zu messen, aus dem Grad der plastischen Verformung können aber nur bedingt Aussagen zum elastischen Verhalten gemacht werden. Außerdem ist das Auflösungsvermögen nicht ausreichend, um die Mikrostruktur zu untersuchen.

Die Nanoindentation hat sich aus der konventionellen Mikrohärte-Technik entwickelt und eignet sich aufgrund der Verwendung von sehr feinen Spitzen und geringen Eindrücktiefen (im Submikrometerbereich) zur Untersuchung dünner Filme und Schichten mit hoher

Ortsauflösung. Oliver und Pharr [68] haben für eine ganze Reihe von Materialien nachgewiesen, dass sich aus der Kraft-Verschiebungskurve der Elastizitätsmodul ableiten lässt. Die Ableitung setzt jedoch unter anderem voraus, dass die plastische Verformung zeitinvariant, das Material isotrop und die Poisson-Zahl bekannt ist. Unter der Annahme einer Poisson-Zahl von 0,3 wurden zahlreiche Untersuchungen an nassen, trockenen, kortikalen und trabekulären sowie pathologischen Knochenproben durchgeführt [45,48,82-86,104,117]. Die ermittelten elastischen Moduln lagen im Bereich von ungefähr 15 bis 27 GPa für kortikalen sowie 10 bis 18 GPa für trabekulären Knochen.

Andere mikromechanische Biegeversuche an nassen Proben ergaben Moduln von 5,4 GPa in kortikalem und 4,3 GPa in trabekulärem Knochen [19]. An einzelnen Osteonen wurden elastische Moduln von 12 GPa durch Zug [8], 6 GPa durch Druck [9], 2 GPa durch Biegung [6] und 20 GPa durch Verdrillung [7] bestimmt.

Die Varianz der Ergebnisse spiegelt zum einen die große natürliche Schwankungsbreite der elastischen Eigenschaften im Knochen wider. Andererseits hängen die Ergebnisse jedoch wesentlich von Probenpräparation, Versuchsdurchführung und den zur Ableitung gemachten Annahmen und Vereinfachungen ab. So werden mit allen Verfahren zwar mechanische Veränderungen detektiert, es ist jedoch nicht zweifelsfrei geklärt, inwieweit die abgeleiteten absoluten Werte des Elastizitätsmoduls den tatsächlichen Materialwerten entsprechen.

3.2.2 Kernspinresonanz

Mit der Entwicklung von (μ MR)-Magnetresonanztomographen steht ein weiteres Verfahren zur Untersuchung trabekulärer Strukturen zur Verfügung. In vitro wurden Ortsauflösungen von 33 μm erreicht. Das Signal-Rausch-Verhältnis und die Messzeit limitieren bei In-vivo-Messungen das Auflösungsvermögen. In Abhängigkeit von der untersuchten Struktur sind minimale Voxelgrößen von 78 x 78 x 300 μm^3 in Fingergliedern und bis zu 200 x 234 x 1000 μm^3 am Fersenbein dokumentiert [56]. Typischerweise werden die Bilder in Knochen und Knochenmark segmentiert und eine histomorphometrische Analyse an den resultierenden Binärbildern durchgeführt. Stereologische Parameter, wie z.B. Trabekelfläche und -volumenanteil, mittlere Länge, Dicke und Abstand können berechnet werden [109]. Das schlechtere In-vivo-Auflösungsvermögen limitiert die Aussagekraft der oben genannten Parameter. Studien, in denen μ MR-Techniken mit Standardverfahren verglichen wurden, ergaben zum Teil gute Übereinstimmungen [20], aber auch Diskrepanzen in den Ergebnissen [5]. Dies ist mitunter auf nicht standardisierte Messbedingungen zurückzuführen, da die Darstellung der Trabekelstruktur neben dem Auflösungsvermögen von der Wahl der Pulssequenz, dem Aufnahmemodus, der Echozeit und der magnetischen Grundfeldstärke abhängen [64].

Eine Möglichkeit der Quantifizierung ergibt sich aus dem Umstand, dass Knochen und Knochenmark unterschiedliche diamagnetische Suszeptibilitäten haben, wodurch Feldinhomogenitäten entstehen. Dadurch verändern sich die Relaxationseigenschaften. Eine messbare Kenngröße für die Verschmierung des Grundfeldes ist die Relaxationszeit $T2^*$. Es konnte gezeigt werden, dass $T2^*$ korreliert mit dem Abstand der Trabekel, welche senkrecht zum Grundfeld orientiert sind [93]. In osteoporotischem Gewebe ist dadurch $T2^*$ signifikant erhöht [29,107]. Eine weitere Messgröße ist die transversale Relaxationszeit $R2^*$. Wehrli et al. [108] konnte am vertebralen Knochen zeigen, dass $R2^*$ des Knochenmarks mit der BMD korreliert und in osteoporotischem Gewebe niedriger als in normalem Gewebe ist.

3.2.3 Ultraschallmethoden

Mit akustischen Methoden können generell zwei Wege beschritten werden, um die strukturellen und mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe zu untersuchen (Dunn et al. [25]): Verwendet man Schallfelddurchmesser und Wellenlängen, die wesentlich größer als die Dimensionen der Substrukturen des Knochens sind, werden die akustischen Ausbreitungseigenschaften, wie z.B. Reflexionskoeffizient, Schallgeschwindigkeit und Dämpfung auf makroskopischer Ebene durch Streuung, Beugung und Interferenz bestimmt. Man erhält akustische Volumeneigenschaften, die maßgeblich von der Zusammensetzung und Struktur des Gewebes abhängen. Wenn jedoch die Dimensionen von Schallfeld und Wellenlänge klein genug sind gegenüber den Dimensionen der Substrukturen des Knochens, dann können die individuellen mikroskopischen Gewebeeigenschaften untersucht werden. Diese Voraussetzung lässt sich mit den in der akustischen Rastermikroskopie eingesetzten, stark fokussierenden Hochfrequenzwandlern erfüllen. Daraus ergeben sich gegenüber den oben genannten Methoden zahlreiche Vorteile, welche SAM-Methoden für einen Einsatz zur Untersuchung biologischer Gewebe prädestinieren. Bei entsprechender Frequenz erhält man ein dem Lichtmikroskop vergleichbares Auflösungsvermögen. Bis auf die Herstellung einer glatten, ebenen Oberfläche ist keine präparative Bearbeitung notwendig. Messungen sind daher prinzipiell an frischem Gewebe, ebenso aber an histologisch eingebetteten Proben möglich, die bereits mit anderen Methoden untersucht worden sind oder anschließend untersucht werden sollen. SAM-Verfahren wären also als Messverfahren denkbar, wenn aus üblichen histologischen Proben (z.B. Biopsien) zusätzliche mechanische Informationen gewonnen und quantifiziert werden sollen. Durch die Verwendung von Frequenzen bis 2 GHz erreicht man Ortsauflösungen, die in der Größenordnung zellulärer und überzellulärer Organisationsstrukturen liegen. Akustisch bestimmbare Größen, wie Impedanz, Schallgeschwindigkeit und Dämpfung hängen direkt von mechanischen und strukturellen Eigenschaften des untersuchten Objektes ab, wo-

durch sich letztere unter geeigneten Bedingungen ableiten lassen. Arbeiten anderer Gruppen [11,22,23,25,30,32,33,55,62,71,88-90,112,116] haben gezeigt, dass man mit Hilfe der akustischen Mikroskopie in der Lage ist, sowohl morphologische als auch quantitative akustische Eigenschaften mit einer Auflösung bis in den Mikrometerbereich zu erfassen.

Die meisten mikroskopischen Untersuchungen am Knochen wurden in einem Frequenzbereich von 20 bis 50 MHz durchgeführt, wobei zur Charakterisierung zumeist die qualitative [113] oder quantitative Erfassung der akustischen Impedanz diente [94,114]. In Abhängigkeit von Spezies, Mineralisierung und Orientierung sind Impedanzwerte im Bereich von ungefähr 6 bis 10 Mrayl dokumentiert. Zum Teil wurde auch die Schallgeschwindigkeit ermittelt, um daraus die elastischen Koeffizienten in Richtung der Schallausbreitung abzuleiten [39,102,104]. Signifikante Unterschiede wurden z.B. zwischen pre- und postmenopausalen sowie osteoporotischen Knochenproben kaukasischer Frauen [40], zwischen verschiedenen präparierten Proben [101] und in Abhängigkeit von der Probenorientierung gefunden [103]. Die häufig am Femurknochen ermittelten Longitudinalwellengeschwindigkeiten lagen im Bereich von 3300 bis 4250 m/s in Richtung parallel zur Femurlängsachse und 3528 bis 3818 m/s in der radialen Richtung. Die beschriebenen Methoden berücksichtigen jedoch nicht die Eigenschaften fokussierter Schallfelder und wichtige Parameter, wie Probendicke und -dichte, müssen mit externen Methoden makroskopisch ermittelt werden.

Die Frequenzabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit wurde in einem Bereich von 5 bis 100 MHz von Lees et al. [57] mit nicht fokussiertem Schall am Rinderknochen untersucht. Die Ergebnisse weisen auf eine Dispersion der radialen und axialen Schallgeschwindigkeiten hin, wobei die Maxima von 3620 m/s beziehungsweise 4470 m/s jeweils bei 70 MHz auftraten.

Bisher mit Hochfrequenzmikroskopen (oberhalb von 100 MHz) durchgeführte Untersuchungen haben einen eher qualitativen oder semiquantitativen Charakter. Die an anderen harten Materialien erfolgreich angewendete Methode der Bestimmung der RAYLEIGH-Wellengeschwindigkeiten mit Hilfe von $V(z)$ -Messungen [16] konnte bisher nicht auf Knochengewebe übertragen werden [50]. Es ist anzunehmen, dass durch die stark heterogene Mikrostruktur eventuell generierte Oberflächenwellen zum einen stark gedämpft werden und sich zum anderen aufgrund der richtungsabhängigen Ausbreitungsgeschwindigkeiten nicht konstruktiv überlagern können. Wenngleich vereinzelt über $V(z)$ -Messungen an Knochen berichtet wurde [42,87], so sind die durch RAYLEIGH-Wellen hervorgerufenen Oszillationen im $V(z)$ -Verlauf normalerweise nicht zu beobachten. Aus diesem Grund wurden gewöhnlich die Grauwerte konventioneller C-Scan-Bilder entweder qualitativ unterschiedlicher Mineralisie-

rung bzw. Festigkeit zugeordnet [50,51], oder mit Hilfe von Kalibrierwerten in Reflexionskoeffizienten, Impedanzen oder gar Elastizitätsmoduln umgerechnet [49]. Andere Einflüsse auf die Signalentstehung als die durch die Reflexionskoeffizienten repräsentierten Materialeigenschaften wurden dabei nur qualitativ berücksichtigt.

4 WELLENAUSBREITUNG

Schallwellen, die sich in einem Medium ausbreiten, verursachen eine zeitlich und örtlich periodische Änderung von Dichte, Druck und Temperatur. Die allgemeine Wellengleichung beschreibt die Ausbreitung einer Welle in einem ungedämpften Medium:

$$\Delta p = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2}. \quad (4-1)$$

$p=p(x,t)$ ist der von Ort x und Zeit t abhängige Überschuss- oder Schalldruck und v die Schallgeschwindigkeit. Die Herleitung erfolgt mit Hilfe von Zustands-, Kontinuitäts- und Bewegungsgleichung. Dichteänderungen werden durch die Zustandsgleichung beschrieben:

$$p = \rho_e v^2. \quad (4-2)$$

ρ_e ist die durch die Komprimierung hervorgerufene Überschussdichte. Die Kontinuitätsgleichung basiert auf dem Gesetz der Erhaltung der Masse und beschreibt die Bewegung der Teilchen, welche die Dichteänderung verursachen:

$$\frac{\partial s}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{u} = 0, \quad (4-3)$$

wobei $s = \rho_e / \rho$ die Kompression und \vec{u} der Vektor der Teilchenverschiebungsgeschwindigkeit sind. Die Kopplung von Dichteänderung und Teilchenbewegung erfolgt durch die Bewegungsgleichung:

$$\rho_0 \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\nabla p. \quad (4-4)$$

ρ_0 ist die Gleichgewichtsdichte. Die räumliche Ausbreitung der periodischen Dichte-, Druck- und Temperaturschwankungen ist durch die Schallausbreitungsgeschwindigkeit bestimmt:

$$v = \lambda \cdot f. \quad (4-5)$$

λ ist die Wellenlänge und f die Frequenz.

4.1 Transmission und Reflexion

Die Phänomene beim Übergang einer ebenen akustischen Welle zwischen zwei verschiedenen Medien lassen sich am einfachsten mit Hilfe der akustischen Impedanz beschreiben. Diese ist definiert als das negative Verhältnis von Zugspannung zur Teilchenverschiebungsgeschwindigkeit:

$$Z = -\frac{\sigma_T}{\partial u / \partial t}. \quad (4-6)$$

Die Zugspannung σ_T ist die senkrecht auf die Oberfläche wirkende Kraft pro Flächeneinheit. Daraus ergibt sich die Einheit $1 \text{ rayl} = 1 \text{ kgm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die üblicherweise verwendete Einheit ist das Mrayl. Die Impedanz ist gleich dem Produkt aus Massendichte ρ und der longitudinalen Schallausbreitungsgeschwindigkeit v_l in diesem Medium:

$$Z = \rho \cdot v_l. \quad (4-7)$$

Trifft eine ebene Welle senkrecht auf eine Grenzfläche, dann müssen die Bedingungen der Stetigkeit von Zugspannung und Verschiebung an der Grenzfläche erfüllt sein. Wenn die normierte Amplitude der auf die Oberfläche wirkenden Zugspannung der einfallenden Welle 1 und die Spannungsamplituden von transmittierter und reflektierter Welle T und R sind, dann erfordert die Stetigkeit der Zugspannung, dass

$$1 + R = T, \quad (4-8)$$

und aus der Stetigkeit der Verschiebungsgeschwindigkeit folgt, dass

$$\frac{1 - R}{Z_1} = \frac{T}{Z_2}, \quad (4-9)$$

wobei Z_1 und Z_2 die akustischen Impedanzen der beiden Medien sind. Die Vorzeichenumkehr kommt durch die entgegengesetzte Ausbreitungsrichtung der reflektierten Welle zustande. Setzt man (4-8) in (4-9) ein, so ergibt sich ein Reflexionskoeffizient der Spannungsamplitude:

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1}, \quad (4-10)$$

und ein Transmissionskoeffizient der Spannungsamplitude:

$$T = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1}. \quad (4-11)$$

Der Energiefluss ist das Skalarprodukt aus Verschiebungsgeschwindigkeit und Zugspannung. In einem isotropen Medium ohne Viskosität sind diese parallel zueinander, und der mittlere Energiefluss ist

$$\langle P \rangle = \left\langle \frac{\partial \bar{u}}{\partial t} \cdot \sigma_T \right\rangle = Z \left\langle \left(\frac{\partial \bar{u}}{\partial t} \right)^2 \right\rangle = \frac{1}{Z} \langle \sigma_T^2 \rangle. \quad (4-12)$$

Aus (4-10) - (4-12) ergeben sich die Koeffizienten für die reflektierten und transmittierten Wellenintensitäten

$$\langle P_R \rangle = \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2, \quad (4-13)$$

$$\langle P_T \rangle = \frac{4Z_2 Z_1}{(Z_2 + Z_1)^2}. \quad (4-14)$$

4. Wellenausbreitung

Lässt man eine ebene Welle mit der Intensität I_0 aus einem Medium mit der Impedanz Z_1 senkrecht auf einen Körper der Dicke d und der Impedanz Z_2 einfallen (Abbildung 4-1), so sind die Intensitäten der transmittierten und reflektierten Wellen

$$I_{R1} = I_0 \cdot \langle P_{R_{12}} \rangle, \quad (4-15)$$

$$I_{T1} = I_0 \cdot \langle P_{T_{12}} \rangle, \quad (4-16)$$

$$I_{R2} = I_0 \cdot \langle P_{T_{12}} \rangle \cdot \langle P_{R_{21}} \rangle \cdot \langle P_{T_{21}} \rangle \cdot e^{-2\alpha d}. \quad (4-17)$$

Die Indizes kennzeichnen die Richtung des Überganges, und α ist der Schwächungskoeffizient.

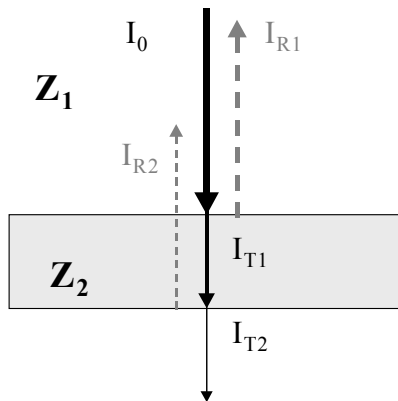


Abbildung 4-1 *Transmission und Reflexion einer ebenen Welle an einer Grenzschicht bei senkrechtem Einfall.*

Fällt die Welle nicht senkrecht auf die Grenzfläche, so wird sie gemäß dem SNELL'schen Brechungsgesetz gebrochen:

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{v_1}{v_2}, \quad (4-18)$$

θ_1 und θ_2 sind die Ein- und Ausfallswinkel. Dieses Gesetz kann auch in der Form aufgefasst werden, dass die tangentielle Komponente des Wellenvektors an der Grenzfläche erhalten bleibt, so dass

$$k_1 \cdot \sin\theta_1 = k_2 \cdot \sin\theta_2. \quad (4-19)$$

Die akustische Impedanz in Richtung der Oberflächennormalen ist dann

$$Z \equiv -\frac{\sigma_T}{\partial u_z / \partial t} = \frac{\rho v}{\cos\theta} \quad (4-20)$$

Wenn ein oder zwei der angrenzenden Medien Festkörper sind, folgt daraus, dass jede beliebige einfallende Welle prinzipiell eine longitudinale und ein oder zwei transversale Wellen im Festkörper erzeugen kann. Von besonderer Bedeutung in der akustischen Mikroskopie ist der Fall, dass eine longitudinale Welle aus einem flüssigen Kopplungsmedium auf einen festen Körper trifft.

4.2 Reflexion an einer flüssig-festen Grenzschicht

Die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten lassen sich mit Hilfe der Winkel θ , θ_l und θ_s ausdrücken, welche einfallende sowie die transmittierten Longitudinal- und Scherwellen mit der Oberflächennormalen bilden (Abbildung 4-2).

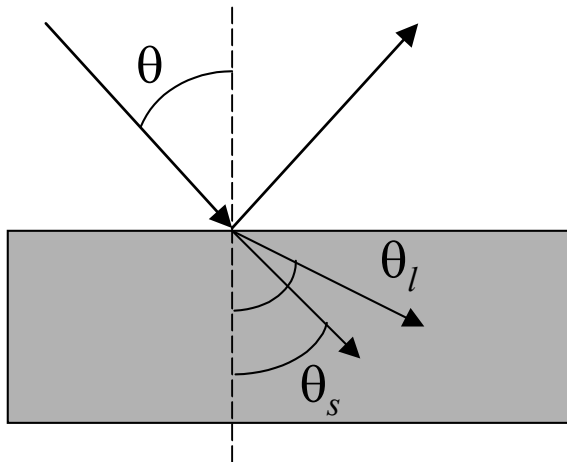


Abbildung 4-2 Transmission und Reflexion an einer flüssig-festen Grenzschicht bei schrägem Einfall.

Aus dem SNELL'schen Brechungsgesetz folgt

$$k \cdot \sin\theta = k_l \cdot \sin\theta_l = k_s \cdot \sin\theta_s. \quad (4-21)$$

Die Impedanzen in Richtung der Oberflächennormalen sind dann

$$Z = \frac{\rho_0 v_0}{\cos\theta}, \quad Z_l = \frac{\rho_l v_l}{\cos\theta_l}, \quad Z_s = \frac{\rho_s v_s}{\cos\theta_s}, \quad (4-22)$$

und die resultierenden Reflexions- und Transmissionskoeffizienten sind

$$R(\theta) = \frac{Z_l \cos^2 2\theta_s + Z_s \sin^2 2\theta_s - Z}{Z_l \cos^2 2\theta_s + Z_s \sin^2 2\theta_s + Z}, \quad (4-23)$$

$$T_l(\theta) = \frac{2Z_l \cos^2 2\theta_s}{Z_l \cos^2 2\theta_s + Z_s \sin^2 2\theta_s + Z}, \quad (4-24)$$

$$T_s(\theta) = \frac{-2Z_s \sin^2 2\theta_s}{Z_l \cos^2 2\theta_s + Z_s \sin^2 2\theta_s + Z}. \quad (4-25)$$

(4-23) bis (4-25) sind komplexwertige Funktionen und werden im Folgenden als komplexe Reflektanzfunktion sowie komplexe Transmissionsfunktionen für die Longitudinal- bzw. Transversalwelle bezeichnet.

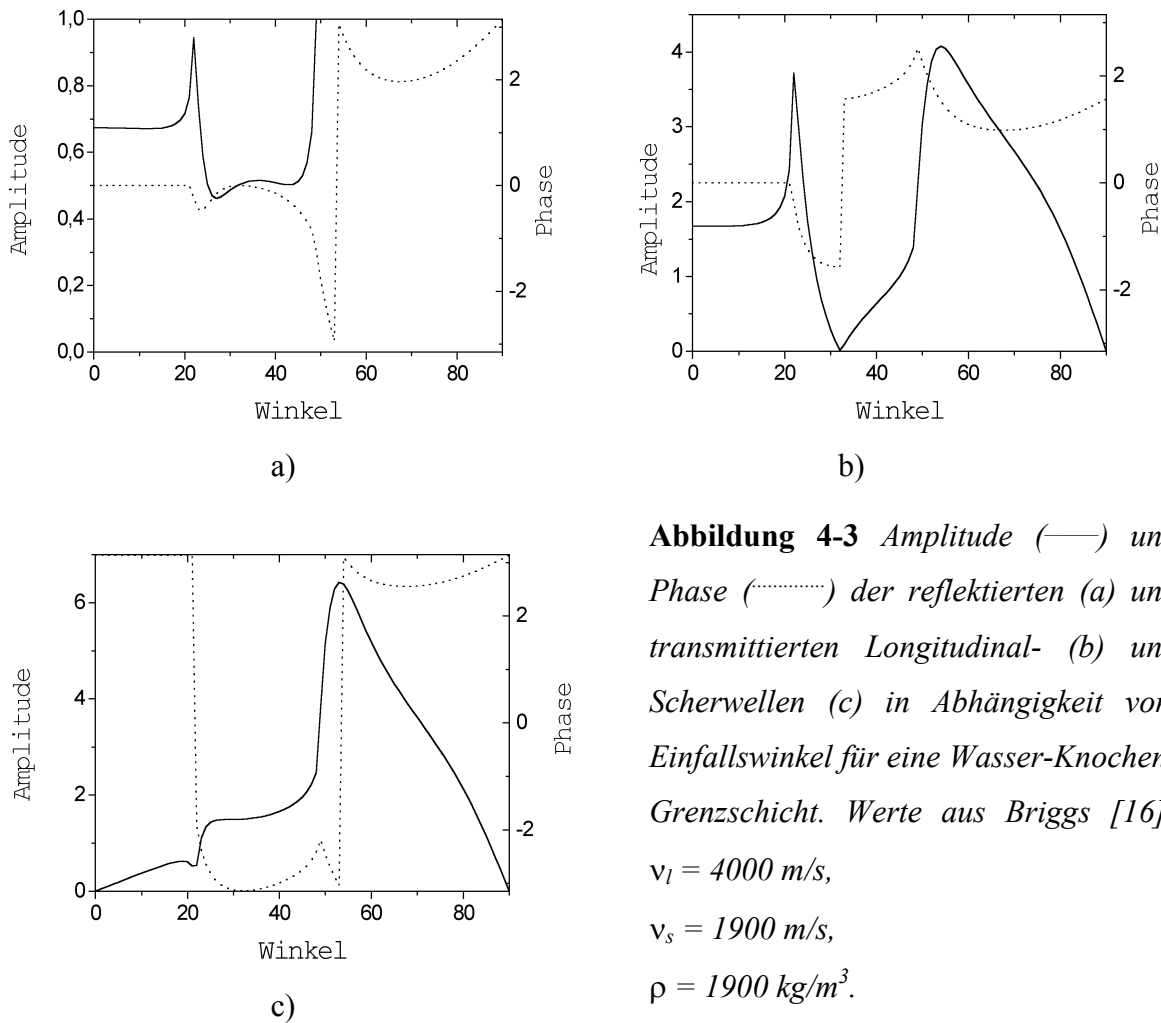


Abbildung 4-3 Amplitude (—) und Phase (·····) der reflektierten (a) und transmittierten Longitudinal- (b) und Scherwellen (c) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel für eine Wasser-Knochen-Grenzschicht. Werte aus Briggs [16]:
 $v_l = 4000 \text{ m/s}$,
 $v_s = 1900 \text{ m/s}$,
 $\rho = 1900 \text{ kg/m}^3$.

Das Verhältnis der von der Grenzfläche wegtransportierten Energie zur Energie der einfallenden Welle ist:

$$\frac{E_r}{E} = |R(\theta)|^2, \tag{4-26}$$

$$\frac{E_l}{E} = \frac{\rho_0 \tan \theta}{\rho_1 \tan \theta_l} |T_l(\theta)|^2, \tag{4-27}$$

$$\frac{E_s}{E} = \frac{\rho_0 \tan \theta}{\rho_1 \tan \theta_s} |T_s(\theta)|^2. \tag{4-28}$$

Die Indizes r , l und s bezeichnen die reflektierte Longitudinal- sowie transmittierte Longitudinal- und Scherwellen.

4.3 Schallfeld

Das laterale Auflösungsvermögen hängt maßgeblich vom Schallfelddurchmesser ab. Deshalb werden in der akustischen Mikroskopie in der Regel runde Einzelelementwandler mit starker sphärischer oder zylindrischer Fokussierung eingesetzt. Die Fokussierung erreicht man

durch eine Phasenverschiebung zwischen zentralen und peripheren Wellenteilen des runden Kolbenschwingers, entweder durch gekrümmte Wandleroberflächen oder den Einsatz einer akustischen Linse. Betrachtet man einen Wandler mit dem Radius a und einem Krümmungsradius ROC (**R**adius **O**f **C**urvatur), dessen Mittelpunkt sich im Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems befindet, so strahlt dieser ein Schallfeld entsprechend Abbildung 4-4 aus.

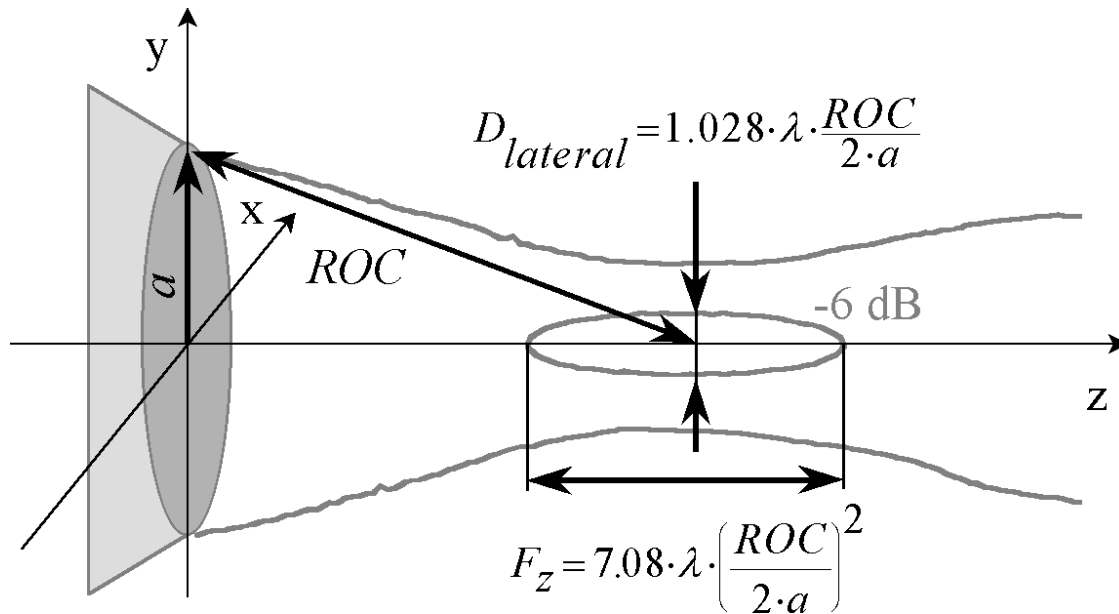


Abbildung 4-4 Die Kenngrößen eines sphärisch fokussierten Schallfeldes.

Unter der Voraussetzung, dass $a^2 \ll ROC^2$ ist, lässt sich das emittierte Schallfeld mit Hilfe der paraxialen Wellentheorie (FRESNEL-Näherung) beschreiben. Die laterale Druckverteilung in der Fokusebene ist nach [53]

$$\left| \frac{p(r)}{p(0)} \right| = \left| \frac{2J_1\left(\frac{kar}{ROC}\right)}{\frac{kar}{ROC}} \right|, \quad (4-29)$$

wobei $p(0)$ der Maximaldruck auf der Schallstrahlachse an der Stelle $z = ROC$ ist. J_1 ist die Besselfunktion erster Ordnung und r ist der laterale Abstand von der Schallstrahlachse (z -Achse). ROC wird auch als Fokusabstand oder geometrischer Fokus bezeichnet. Der wahre Fokus F liegt aufgrund von Beugungseffekten immer näher am Wandler [53]. Das laterale Auflösungsvermögen $D_{lateral}$ wird durch den Schallfelddurchmesser in der geometrischen Fokusebene definiert, an dem die Druckamplitude um -3 dB abgefallen ist:

$$D_{lateral} = 1.028 \cdot \lambda \cdot f^\# . \quad (4-30)$$

Die f -Nummer $f^\# (= ROC/2a)$ beschreibt das Verhältnis von Krümmungsradius zu Wandlerdurchmesser. Die axiale Druckverteilung ist nach [53]

$$\left| \frac{p(z)}{p(0)} \right| = \frac{ROC}{z} \operatorname{sinc} \left(\frac{a^2}{2\lambda ROC} \left(\frac{ROC}{z} - 1 \right) \right). \quad (4-31)$$

Die Fokustiefe, welche die Entfernung zwischen Punkten auf der Schallstrahlachse vor und hinter der Fokusposition beschreibt, an denen die Druckamplitude um -3 dB relativ zum Maximum abgefallen ist, ergibt sich aus (4-31):

$$F_z = 7.08 \cdot \lambda \cdot f^{\#2}. \quad (4-32)$$

4.4 Sphärische Aberration

Aufgrund der hohen Schallgeschwindigkeitsunterschiede zwischen Wandler (z.B. Saphir-Vorlaufstrecke) und dem Kopplungsmedium ist die sphärische Aberration im Kopplungsmedium zu vernachlässigen [16]. Der entgegengesetzte Effekt tritt jedoch auf, wenn die Schallwellen aus der Flüssigkeit in den Festkörper eintreten.

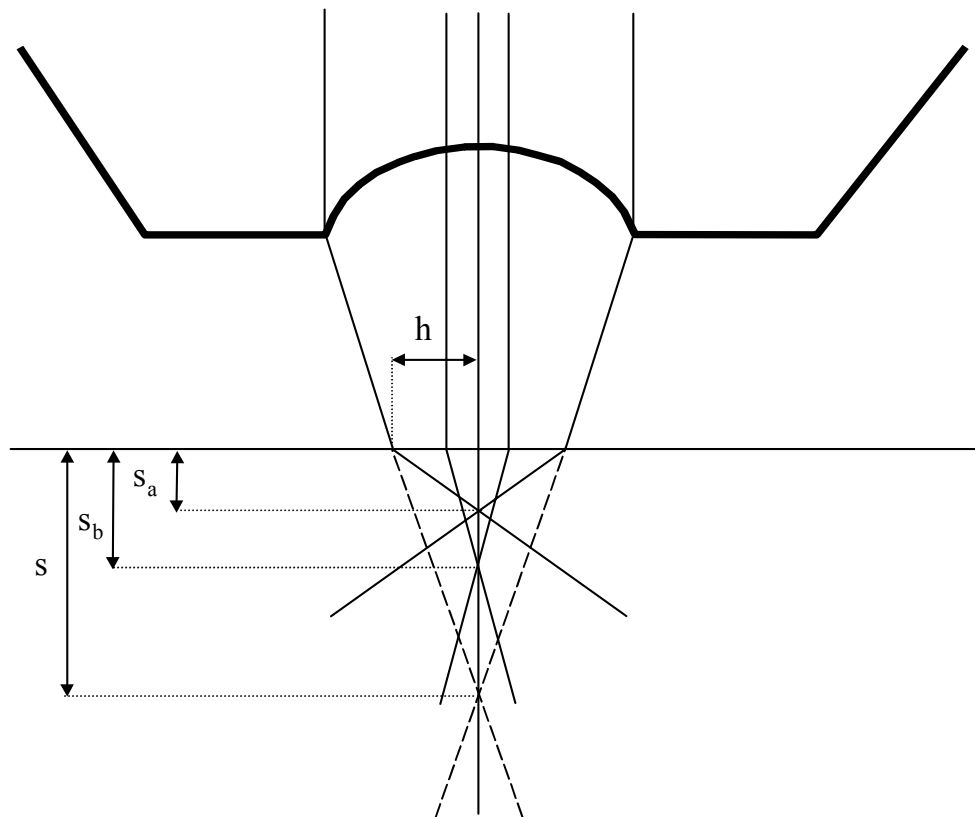


Abbildung 4-5 Sphärische Aberration bei der Fokussierung unterhalb der Oberfläche eines Festkörpers, hervorgerufen durch Brechung an der Grenzfläche.

Strahlen mit dem virtuellen Fokus im Abstand s werden an der Oberfläche gebrochen, so dass Strahlen, welche im Abstand h von der Schallstrahlachse die Grenzfläche passieren, die Achse im Abstand s_a kreuzen, während sich der Fokus der paraxialen Strahlen im Abstand s_b befindet (Abbildung 4-5). Unter Verwendung des Brechungsindex n (Verhältnis der

Schallgeschwindigkeiten von Kopplungsmedium und Festkörper) und den Gesetzen der geometrischen Optik sind diese Größen verknüpft durch

$$\frac{1}{s} + \frac{n}{s_a} = \frac{h^2(1-n)^2}{2} \frac{1}{s^3}, \quad (4-33)$$

$$\frac{1}{s} + \frac{n}{s_b} = 0. \quad (4-34)$$

Unter der Annahme, dass die Größenordnung der Beugungseffekte vergleichbar mit der geometrischen Aberration sind, liegt der wahre Fokus auf der halben Strecke zwischen paraxialem Fokus s_b und dem Fokus der Strahlen mit dem größten Einfallswinkel s_a [16]. Unter Verwendung von (4-33), (4-34) und

$$\tan \alpha = \frac{h}{s} \quad (4-35)$$

erhält man

$$s_a - s_b = n \cdot s \left[1 - \frac{1}{1 - \frac{(1-n)^2 \tan^2 \alpha}{2}} \right]. \quad (4-36)$$

Die Verschiebung der wahren Fokusposition relativ zum paraxialen Fokus hängt demnach sowohl vom Verhältnis der Schallgeschwindigkeiten als auch vom Öffnungswinkel und dem Abstand zur Oberfläche ab.

4.5 Schallschwächung

Die Dämpfung einer Schallwelle setzt sich hauptsächlich aus zwei Mechanismen zusammen, der Schallabsorption und der Streuung.

4.5.1 Absorption

Die Herleitung der verlustfreien Wellengleichung vernachlässigt Absorptionseffekte, bei denen akustische Energie in Wärme umgewandelt wird. Die hauptsächlichsten Absorptionsmechanismen sind viskose Verluste, Wärmeleitung und Relaxationsprozesse. Viskose Verluste werden dadurch verursacht, dass Flüssigkeiten der durch Kompression und Expansion hervorgerufenen Störung einen Widerstand entgegensetzen, was man als Viskosität bezeichnet. Die so hervorgerufene Absorption α wird bestimmt durch

$$\alpha = \frac{\omega}{v} \frac{1}{\sqrt{2}} \left[\frac{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2} - 1}{1 + (\omega\tau)^2} \right]^{1/2}, \quad (4-37)$$

$$v_p = v \sqrt{2} \left[\frac{1 + (\omega\tau)^2}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2 + 1}} \right]^{1/2}, \quad (4-38)$$

wobei ω die Kreisfrequenz der Welle, v_p die Phasengeschwindigkeit und τ die Relaxationszeit sind. Jeder Absorptionsprozess ist durch eine Relaxationszeit charakterisiert. Die Abhängigkeit der Phasengeschwindigkeit v_p von der Frequenz ist ein Indiz dafür, dass dissipative Medien dispersiv sind. Ein weiterer Absorptionsmechanismus entsteht durch Wärmeleitung. Der klassische Absorptionskoeffizient setzt sich aus der Summe der beiden von STOKES und KIRCHOFF abgeleiteten Koeffizienten zusammen und berücksichtigt folglich Verluste durch Scherviskosität und Wärmeleitung:

$$\alpha_{\text{klassisch}} = \frac{\omega^2}{2\rho_0 v^3} \left[\frac{4}{3}\eta + (\gamma - 1) \frac{\kappa}{v_p} \right]. \quad (4-39)$$

η ist die Scherviskosität, κ die Wärmeleitfähigkeit und γ das Verhältnis der spezifischen Wärmekapazitäten bei konstantem Druck c_p und bei konstantem Volumen c_v . Experimentelle Daten zeigen jedoch eine Diskrepanz zum klassisch berechneten Absorptionskoeffizienten, der z.B. im Falle von Azeton bis zum einem Faktor von 4,3 abweicht [54]. Der größte Teil der nicht durch klassische Absorption zu beschreibenden Energieverluste wird durch strukturelle, thermische und chemische Relaxationsprozesse verursacht, welche man auch als Volumenviskosität bezeichnet.

4.5.2 Streuung

Streuung kann als eine Änderung von Amplitude, Frequenz, Phasengeschwindigkeit und/oder Ausbreitungsrichtung aufgrund einer Störung oder Unregelmäßigkeit im Ausbreitungsmedium definiert werden. Die für die Streuprozesse notwendige Energie wird der einfallenden Primärwelle entnommen, und es kommt es zur Schallschwächung. Eine Abhandlung der Streutheorie ist in einer Reihe herausragender Texte umfassend diskutiert [65,67,73,95,100]. Das grundlegende Konzept beschreibt die Streuwelle, die sich ergibt aus der Differenz der tatsächlichen Druckwelle und der Welle, die ohne die Störung vorhanden gewesen wäre. Ausgehend von diesem Punkt kann die Behandlung in verschiedene Richtungen führen. Die Form des Streufeldes hängt von der Form des Streuers, seiner Kompressibilität und Dichte sowie der Größe relativ zur Wellenlänge ab. Für große Teilchen ist $ka \gg 1$ ($k = 2\pi / \lambda$ ist die Wellenzahl und a der Radius des Teilchens), und man kann die Streuung gemäß den Gesetzen der geometrischen Akustik betrachten, die im Abschnitt 4.1 behandelt

werden. Der Begriff Streuung im engeren Sinne bezieht sich auf die Fälle, bei denen $ka \approx 1$ (MIE-Streuung) oder wesentlich kleiner als 1 (RAYLEIGH - Streuung) ist.

Als Maß zur Charakterisierung der Streuung verwendet man häufig das Verhältnis von gesamter gestreuter Leistung D_{Str} zur Intensität der einfallenden Welle I_0 :

$$\sigma_{eff} = D_{Str}/I_0, \quad (4-40)$$

was die Dimension einer Fläche hat und deshalb auch als effektiver Streuquerschnitt bezeichnet wird. Für den Fall der geometrischen Streuung an einer Kugel ist dieser gleich der doppelten Fläche des diametralen Kugelschnittes [100]:

$$\sigma_{eff} = 2\pi a^2. \quad (4-41)$$

Für den Fall $kr \gg 1$ (große Entfernung zum Beobachtungspunkt r) und $ka \ll 1$ (RAYLEIGH-Streuung) ergibt sich für die Intensität der an einer Kugel gestreuten Welle die Form

$$I_{Rayleigh} = I_0 \frac{\omega^4 a^6}{9\nu^4 r^2} \left(\frac{K_1 - K_2}{K_1} + 3 \frac{\rho_2 - \rho_1}{2\rho_2 + \rho_1} \cos\theta \right)^2. \quad (4-42)$$

Charakteristisch hierfür sind das Überwiegen der Rückstreuung und die Proportionalität der Intensität der Streuung zur vierten Potenz der Frequenz sowie zur sechsten Potenz des Radius der Kugel. Die Kompressibilitäten K_i und Dichten ρ_i beeinflussen lediglich den Winkel θ , bei dem die Streuung Null ist. Der effektive Streuquerschnitt ist

$$\sigma_{eff} = \frac{4\pi\omega^4 a^6}{9\nu^4 r^2} \left(\left| \frac{K_1 - K_2}{K_1} \right|^2 + \frac{1}{3} \left| \frac{3\rho_2 - 3\rho_1}{2\rho_2 + \rho_1} \right|^2 \right). \quad (4-43)$$

Für $ka \ll 1$ ist demzufolge σ_{eff} nur ein Bruchteil der Kugelquerschnittsfläche.

Die MIE-Streuung lässt sich nicht einfach beschreiben. Die einfachste Lösung erhält man für den Fall der nichtkomprimierbaren Kugel für $ka \gg 1$ und $kr \gg 1$:

$$I_{Mie} = I_0 \frac{a^2}{4r^2} \left(1 + \cot \frac{\theta}{2} J_1^2(ka \sin\theta) \right), \quad (4-44)$$

wobei J_1 die BESSEL-Funktion erster Ordnung ist. Im Unterschied zur RAYLEIGH-Streuung ist hier die Frequenzabhängigkeit durch eine komplizierte Form im Quadrat der BESSEL-Funktion enthalten. Auch der Streuparameter ka hat entscheidenden Einfluss auf die Form des Streufeldes. Während es für kleine Werte von ka noch annähernd der Form der Rayleigh-Streuung entspricht, wächst mit steigenden Werten von ka auch der Anteil in Richtung der einfallenden Welle. Eine wichtige Besonderheit für den Fall der komprimierbaren Kugel ist die Möglichkeit der Resonanzanregung von Eigenschwingungen der elastischen Kugel, was für charakteristische Werte von ka zu einem starken Anstieg des effektiven Streuquerschnittes führt.

Die Beschreibung unter Berücksichtigung von Vielfachstreuung, das heißt der Streuung einer Streuwelle an einem weiteren Streuteilchen, ist außerordentlich kompliziert. Unter den Annahmen, dass das Streufeld klein ist im Vergleich zum anregenden Primärfeld, die Anzahl der streuenden Teilchen nicht allzu groß und deren Abstände nicht allzu klein sind, lässt sich das Gesamtfeld aus der Überlagerung der Einzelstreufelder finden (BORN-Näherung).

4.6 Eigenschaften des Kopplungsmediums

Die durch dissipative Prozesse hervorgerufene Dispersion nimmt einen relativ kleinen Frequenzbereich ein, so dass die Größe v_0 als praktisch unabhängig von der Frequenz betrachtet werden kann. Während jedoch in den meisten Flüssigkeiten eine monotone Abnahme der Schallgeschwindigkeit bei steigender Temperatur zu verzeichnen ist, wächst sie im Wasser bis zu einem maximalen Wert von 1550 m/s bei 67°C an und fällt erst danach wieder ab [16].

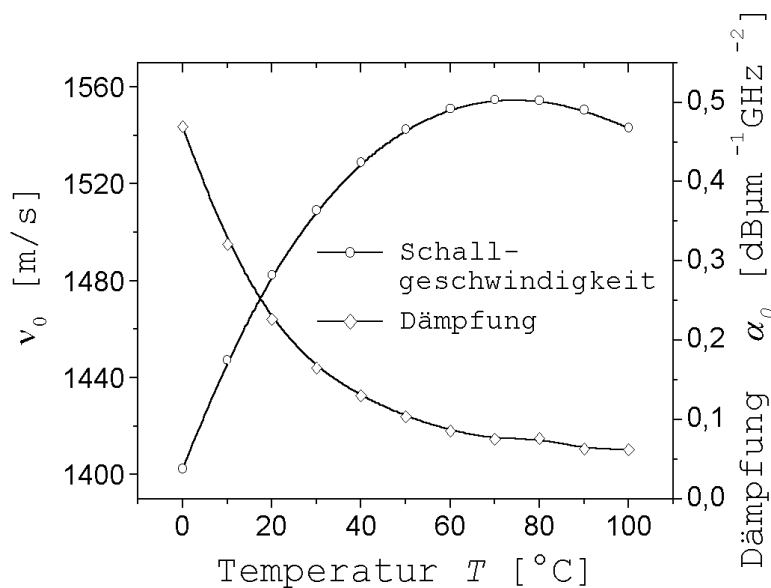


Abbildung 4-6 Schallgeschwindigkeit und Dämpfung in Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

In diesem Verhalten zeigt sich die bekannte Anomalie des Wassers, die mit den besonderen Struktureigenschaften verbunden ist. Diese führen zu einer höheren Packungsdichte der Moleküle bei Temperaturerhöhung. Man kann die Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Temperatur sehr gut durch ein Polynom fünfter Ordnung beschreiben [24]:

$$v_0 = \sum_{i=0}^5 k_i T^i, \tag{4-45}$$

wobei T die Temperatur in °C darstellt. Die Koeffizienten k_i sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1 Polynomkoeffizienten der Schallgeschwindigkeit in Wasser (die Werte wurden unverändert aus [16] übernommen).

i	k_i
0	$0,140238754 \times 10^4$
1	$0,503711129 \times 10^1$
2	$-0,580852166 \times 10^{-1}$
3	$0,334198834 \times 10^{-3}$
4	$-0,147800417 \times 10^{-5}$
5	$0,314643091 \times 10^{-8}$

Experimentelle Messungen des Absorptionskoeffizienten haben gezeigt, dass in einem großen Frequenzbereich das Verhältnis α_0/v_0^2 einen konstanten Wert beibehält. Das liegt daran, dass die Relaxationszeiten sehr viel kleiner als die typischerweise verwendeten Periodendauern der Wellen sind ($\omega\tau \ll 1$). In guter Näherung ergibt sich für die Dämpfung im Wasser:

$$\alpha \approx \frac{\omega^2 \tau}{2v_0} . \quad (4-46)$$

Bei steigender Temperatur verringert sich die Dämpfung, wobei der Abfall bei größeren Temperaturen geringer wird (Abbildung 4-6). In Tabelle 4-2 sind die wichtigsten akustischen Eigenschaften des Wassers in Abhängigkeit von der Temperatur zusammengefasst.

Tabelle 4-2 Akustische Eigenschaften von reinem Wasser (aus [16]).

T (°C)	v_0 (µm/ns)	Z (Mrayl)	α_0 (dB/µm/GHz ²)
0	1,40239	1,402	0,469
10	1,44727	1,447	0,321
20	1,48234	1,480	0,226
30	1,50913	1,503	0,165
40	1,52886	1,517	0,130
50	1,54255	1,524	0,104
60	1,55099	1,525	0,086
70	1,55480	1,520	0,075
80	1,55449	1,511	0,076
90	1,55048	1,497	0,063
100	1,54311	1,479	0,062

Eine Erhöhung des statischen Druckes bewirkt ebenfalls eine Geschwindigkeitszunahme. Im Wasser beträgt der Anstieg 10^{-6} m/(s·Pa) [100]. Für die bei Normaldruck durchgeführten Messungen kann dieser Einfluss allerdings vernachlässigt werden.

4.7 Bestimmung der Materialkonstanten

Obwohl kortikaler Knochen inhomogen, anisotrop und viskoelastisch ist, können seine elastischen Eigenschaften in guter Näherung durch ein linear elastisches, anisotropes Modell beschrieben werden [81,105]. Das HOOKE'sche Gesetz für ein solches Material ist:

$$\sigma_i = c_{ij}\varepsilon_j, \quad (4-47)$$

wobei σ_i und ε_j Komponenten von Spannungs- und Dehnungstensor bezeichnen. i und j kennzeichnen die orthogonalen Richtungen eines Koordinatensystems ($i, j = 1, 2, 3$), c_{ij} ist die Matrix der elastischen Koeffizienten, welche für ein orthotropes Material die folgende Form hat:

$$[c_{ij}] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{22} & c_{23} & 0 & 0 & 0 \\ c_{13} & c_{23} & c_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{66} \end{bmatrix}. \quad (4-48)$$

Die Matrix hat zwölf von Null verschiedene Komponenten, wovon neun unabhängig sind. Das Reziproke dieser Matrix wird als Komplianzmatrix s_{ij} bezeichnet und enthält die Elastizitäts- und Schermoduln E_i und G_{ij} , sowie die Poisson-Zahlen σ_{ij} :

$$[c_{ij}]^{-1} = [s_{ij}] = \begin{bmatrix} \frac{1}{E_1} & -\frac{\sigma_{21}}{E_2} & -\frac{\sigma_{31}}{E_3} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\sigma_{12}}{E_1} & \frac{1}{E_2} & -\frac{\sigma_{32}}{E_3} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\sigma_{13}}{E_1} & -\frac{\sigma_{23}}{E_2} & \frac{1}{E_3} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G_{23}} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G_{31}} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{G_{12}} \end{bmatrix}. \quad (4-49)$$

4. Wellenausbreitung

E_i sind die Elastizitätsmoduln in Richtung i , σ_{ij} die Poisson-Zahlen für die durch eine Spannung in i -Richtung hervorgerufene Dehnung in j -Richtung, und G_{ij} sind die Schermoduln in der ij -Ebene. Da die Matrix symmetrisch ist, folgt:

$$\frac{\sigma_{ij}}{E_i} = \frac{\sigma_{ji}}{E_j}, \quad (4-50)$$

Die Lösung der Bewegungsgleichung für elastische Wellen ergibt die Beziehungen zu den Wellengeschwindigkeiten [41]:

$$c_{11} = \rho v_{1/1}^2, \quad (4-51)$$

$$c_{22} = \rho v_{2/2}^2, \quad (4-52)$$

$$c_{33} = \rho v_{3/3}^2, \quad (4-53)$$

$$c_{44} = \rho v_{2/3}^2 = \rho v_{3/2}^2, \quad (4-54)$$

$$c_{55} = \rho v_{1/3}^2 = \rho v_{3/1}^2, \quad (4-55)$$

$$c_{66} = \rho v_{1/2}^2 = \rho v_{2/1}^2, \quad (4-56)$$

$$c_{12} = \sqrt{(c_{11} + c_{66} - 2\rho v_{12/12}^2) + (c_{22} + c_{66} - 2\rho v_{12/12}^2)} - c_{66}, \quad (4-57)$$

$$c_{13} = \sqrt{(c_{11} + c_{55} - 2\rho v_{13/13}^2) + (c_{33} + c_{55} - 2\rho v_{13/13}^2)} - c_{55}, \quad (4-58)$$

$$c_{23} = \sqrt{(c_{22} + c_{44} - 2\rho v_{23/23}^2) + (c_{33} + c_{44} - 2\rho v_{23/23}^2)} - c_{44}. \quad (4-59)$$

Unter orthotropen Bedingungen gelten außerdem folgende Beziehungen:

$$c_{55} + c_{66} = 2\rho v_{23/1}^2, \quad (4-60)$$

$$c_{44} + c_{66} = 2\rho v_{13/2}^2, \quad (4-61)$$

$$c_{44} + c_{55} = 2\rho v_{13/3}^2, \quad (4-62)$$

v_{ij} : Geschwindigkeit einer Welle in Richtung i mit der Teilchenbewegung in Richtung j .

$v_{ij/k}$: Geschwindigkeit einer Welle in Richtung $(i+j)$ mit Teilchenbewegung in Richtung k .

$v_{ij/kl}$: Geschwindigkeit einer Welle in Richtung $(i+j)$ mit Teilchenbewegung in der durch k und l aufgespannten Ebene.

v_{ij} sind Longitudinalwellen, wenn $i = j$, und ansonsten Transversalwellen. $v_{ij/kl}$ können entweder Quasi-Longitudinal- oder Quasi-Transversalwellen sein. $v_{ij/k}$ kennzeichnen Transversalwellen.

Zur Bestimmung der elastischen Moduln anhand der richtungsabhängigen Schallgeschwindigkeiten sind die Verhältnisse von Strukturgrößen und Querschnitt zur Wellenlänge von Bedeutung. Generell müssen die charakteristischen Strukturgrößen wesentlich kleiner als die Wellenlänge sein, damit das Material von der Welle als homogen "angesehen" wird. Unter der Voraussetzung, dass auch der Querschnitt der Probe kleiner als die Wellenlänge ist, spricht man vom Stab-Modus (engl.: bar). Dies ist in analog zu dem Fall, dass auf die gesamte Oberfläche eines an den Enden eingespannten Stabes eine mechanische Spannung ausgeübt wird. Die Moduln ergeben sich dann aus den elastischen Koeffizienten [81]:

$$E_i = c_{ii} = \rho v_i^2 \quad (4-63)$$

$$G_{ij} = c_{ij} = \rho v_{ij}^2 \quad (4-64)$$

Ist der Querschnitt der Probe wesentlich größer als die Wellenlänge, so bezeichnet man die Wellenausbreitung als Volumen-Modus (engl.: bulk). Die Analogie zur Mechanik ist der Fall, dass die mechanische Spannung nur an einer im Vergleich zur gesamten Oberfläche kleinen Fläche angreift (Punktlast). Das Spannungs-Dehnungs-Verhalten wird dann durch die Möglichkeit der Kräfteableitung verändert. Zur Bestimmung der Moduln ist daher zusätzlich die Kenntnis der einzelnen Poisson-Verhältnisse notwendig. Oft sind diese mit akustischen Methoden nicht zu bestimmen. Daher werden zur Charakterisierung der anisotropen elastischen Eigenschaften von Knochen zumeist die direkt aus den Schallgeschwindigkeiten abzuleitenden Konstanten des Elastizitätstensors herangezogen.

Stoffe mit kubischer Symmetrie haben nur noch drei unabhängige Konstanten, die als c_{11} ($= c_{22} = c_{33}$), c_{44} ($= c_{55} = c_{66}$) und c_{12} ($= c_{ij}$, für $i \neq j$; i und $j \leq 3$) bezeichnet werden. c_{44} ist in diesem Fall identisch mit dem Schermodul G . In isotropen Feststoffen gilt:

$$c_{11} - 2c_{44} = c_{12}, \quad (4-65)$$

Daraus lassen sich unter anderem die folgenden technischen Materialgrößen ableiten:

Dichte: $\rho = \frac{Z_l}{v_l}, \quad (4-66)$

Festigkeit: $c_{11} = \rho v_l^2 \quad (4-67)$

Schermodul: $G = c_{44} = \rho v_s^2 \quad (4-68)$

Poissonzahl: $\sigma = \frac{1 - 2c_{44}/c_{11}}{2(1 - c_{44}/c_{11})} \quad (4-69)$

Elastizitätsmodul: $E = c_{11} \frac{(1 + \sigma)(1 - 2\sigma)}{(1 - \sigma)} \quad (4-70)$

Kompressionsmodul: $B = c_{11} - \frac{4}{3}c_{44} \quad (4-71)$

5 GERÄTE

Für die Untersuchungen standen am Institut für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) die zwei akustischen Rastermikroskope KSI SAM100 und KSI SAM2000 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland) zur Verfügung. Beide Geräte arbeiten nach dem von Lemons und Quate [59] erfundenem Prinzip der Puls-Echo-Mikroskopie mit einem fokussierenden Schallwandler, der mäanderförmig über die zu untersuchende Probenoberfläche geführt wird. Vom Wandler werden kurze Schallimpulse ausgesendet und durch eine akustische Linse sphärisch fokussiert. Die Ankopplung zur Probe erfolgt über eine Wasser- vorlaufstrecke. Sowohl die Oberfläche der Probe als auch innere Inhomogenitäten führen nach den oben behandelten Gesetzen der Schallausbreitung dazu, dass ein Teil der Welle zum Wandler zurück reflektiert oder gestreut wird, wo dieser Anteil wiederum in ein elektrisches Signal umgewandelt und zur bildlichen Darstellung verwendet werden kann.

Beide Mikroskope sind für qualitative Routineuntersuchungen, z.B. in der Materialwissenschaft zur Untersuchung von Fehlstellen bzw. der Güte von integrierten Schaltkreisen entwickelt worden. Die aus dem Ultraschallbereich bekannten quantitativen Untersuchungsmethoden sind in dem ursprünglichen Zustand nicht realisierbar. In den folgenden Abschnitten werden der vom Hersteller gelieferte Ausgangszustand sowie die für die vorliegende Arbeit notwendigen Modifizierungen beschrieben.

5.1 Aufbau und Funktionsweise des SAM100

Das SAM100 ist ein modulartig aufgebautes System, bestehend aus mechanischem Scanner inklusive Motorcontroller, einem Pulser/Receiver, einem fokussierten Schallwandler und einer von KSI entwickelten Videoscanplatine (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland) zur Visualisierung des Empfangssignals. Die Hardwarekomponenten werden mit einem PC über eine DOS-Software von KSI gesteuert.

Das mechanische Scansystem (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) arbeitet mit 2-Phasen-Mikroschrittmotoren, die durch einen MC2000 3-Achsen-Motorcontroller (ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnu, Deutschland) mit 32 Bit Risc-Prozessor gesteuert werden. Dadurch ist eine sehr schnelle und hochgenaue Positionierung möglich. Die Kommunikation mit dem PC erfolgt über eine RS-232 Schnittstelle mit der vom Controller unterstützten Programmiersprache VENUS-1 (ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnu, Deutschland). Insgesamt kann in xy -Richtung ein Scanbereich von $60 \times 60 \text{ mm}^2$ abgefahren werden, wobei die minimale Schrittweite und damit die Positioniergenauigkeit $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ beträgt. Die x -Achse ist mit einem opti-

schen Inkrementalgeber ausgestattet, der bei Bewegung aller 4 μm ein TTL-Signal erzeugt, mit dem eine Synchronisation und Positionszuordnung im kontinuierlichen Scanmodus erreicht wird. Das vorhandene Scansystem wurde um eine motorisch gesteuerte z-Achse (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) erweitert. Der Scanbereich dieser Achse beträgt 26 mm und hat ebenfalls eine Positioniergenauigkeit von 0,1 μm .

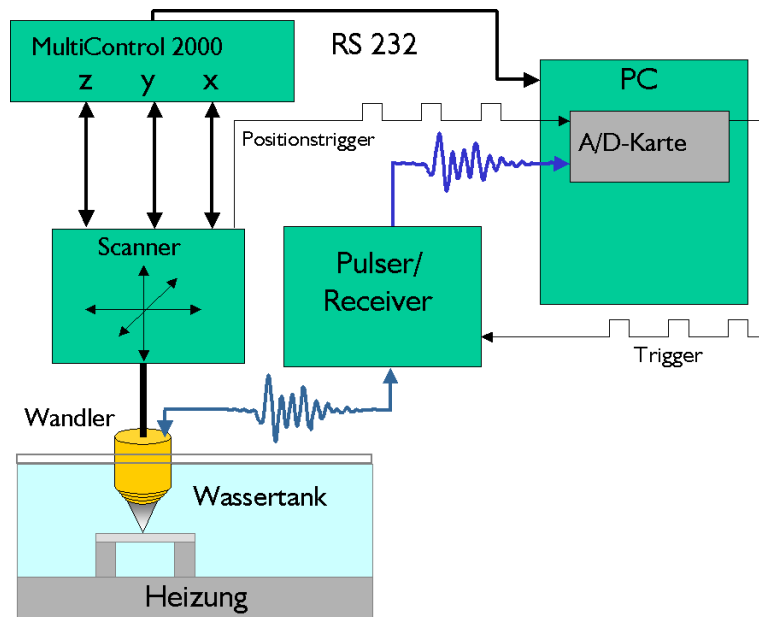


Abbildung 5-1 *Prinzipische Skizze des modifizierten SAM100. Alle Hardwarekomponenten werden von einem PC gesteuert. Die x- und y-Achsen des Scanners spannen eine Ebene parallel zur Probenoberfläche auf. Mit der z-Achse, die parallel zur Schallstrahlachse ist, lässt sich der Proben-Wandler-Abstand variieren.*

Wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, hat die temperaturabhängige Dämpfung bei hohen Frequenzen einen wesentlichen Einfluss auf die Ermittlung des Reflexionskoeffizienten. Deshalb wurde am IMPB ein temperierbarer Probentank entwickelt und gebaut, welcher von der Bodenplatte aus über einen Regelkreis mit Hilfe von Thermowiderständen beheizt wird. Der Wandler und die zu untersuchende Probe werden im Kopplungsmedium eingetaucht und dadurch Temperatureffekte durch Wärmeleitung, -strömung und Konvektion minimiert. Mit diesem Tank lassen sich Temperaturen von 20°C bis 60°C mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ K einstellen.

Das Mikroskop war ursprünglich mit einem SR9000 Pulser/Receiver (Matec Instruments Inc., Northboro, MA, USA) mit einer analogen Bandbreite von 50 MHz ausgestattet. Dieser wurde durch einen externen Panametrics PR5900 Pulser/Receiver (Panametrics, Waltham, MA, USA) mit einer Empfangsbandbreite von 200 MHz ersetzt, welcher kurze negative Spikepulse mit einer Anstiegszeit von 1,1 bis 2 ns und einer Spannungsamplitude von 77 bis 175 V erzeugt. Dadurch ist der Einsatz von hochfrequenten Breitbandwandlern möglich. Diese werden im Kapitel 7 näher beschrieben.

Das vom Empfänger verstärkte und konditionierte Empfangssignal wurde im ursprünglichen System zeitlich gefenstert, demoduliert, integriert und die resultierende Gleichspannung durch abschließende A/D-Wandlung erfasst. Anstelle der Amplitudendetektion kommt im umgerüsteten System zur Akquisition der HF-Echosignale eine Gage CompuScope 8500 Karte (Gage Applied Sciences Inc., Montreal, QC, Kanada) mit Trigger-Out Option zum Einsatz. Diese PCI-Karte war zum Zeitpunkt der Umrüstung mit einer analogen Bandbreite von 250 MHz und einer Abtastrate von 500 MS/s und 8 bit Speichertiefe die schnellste auf dem Markt erhältliche PC-Karte. Der Vorteil gegenüber Digitaloszilloskopen mit eventuell höheren Bandbreiten liegt in der schnellen Datenübertragung von bis zu 100 MS/s zum PC, was für schnelle Scanroutinen unerlässlich ist.

Um eine zeitliche Synchronisation und maximale Positioniergenauigkeit bei der Datenerfassung während eines kontinuierlichen Scanvorganges zu erreichen, wurde eine Triggerkarte entwickelt, welche während der Bewegung der x -Achse das von dem optischen Inkrementalgeber kommende TTL-Signal an die A/D-Karte weiterleitet. Dadurch wird sichergestellt, dass unabhängig von der Momentangeschwindigkeit aller 4 μm ein Triggerereignis stattfindet. Beim nächsten möglichen Abstereignis der A/D-Karte wird die Datenakquisition gestartet und zeitgleich ein Triggersignal für den Pulser/Receiver ausgesendet. Auf diese Weise wird eine maximale Autonomie vom Zeitmanagement des Betriebssystems realisiert. Für den Fall des Stillstandes setzt die Triggerkarte, unabhängig vom Status des Einganges, den Ausgang auf Null. Die A/D-Karte erzeugt dann per Software zeitgleich mit dem Start der Datenakquisition einen Trigger für den Pulser/Receiver.

Von der KSI-Software werden lediglich quadratische Scanflächen mit Kantenlängen von 1 bis 60 mm in ganzzahligen Schritten unterstützt. In z -Richtung ist nur eine manuelle Positionierung möglich. Die Anzahl der Messpunkte pro Linie kann in festen Abständen von 32 bis 256 Punkten eingestellt werden. Abgespeichert wird, unabhängig von der gewählten Auflösung oder Vergrößerung, eine Datenmatrix von 250 x 256 Punkten mit einer Speichertiefe von 6 bit. Die A/D-Wandlung erwies sich als thermisch instabil. Durch die Integration des demodulierten Empfangssignal ist die Graustufe wesentlich von der gewählten Fensterbreite und der Position des Echos innerhalb dieses Fensters abhängig. Eine Auswertung des HF-Signals ist überhaupt nicht möglich. Die Integration aller Hardwarekomponenten in einer neuen, den wissenschaftlichen Ansprüchen genügenden Steuersoftware erfolgte im Rahmen einer Diplom-Arbeit durch Herrn Marco Stein von der Fachhochschule Merseburg, Fachbereich Informatik [97]. Alle variierbaren Parameter der Hardware lassen sich im Rahmen des stabilen Zusammenspiels der Komponenten beliebig einstellen. Fundamentale Größen, wie

z.B. das Scaninkrement der einzelnen Achsen, sind nicht von der Scanfeldgröße abhängig, sondern werden vom Bediener per Software in Vielfachen der minimalen Schrittweite eingestellt. Alle gängigen Scanmodi (A-, B-, C-, A(z)-, B(z)-, C(z)-Scan, siehe Glossar) wurden realisiert. Von jedem abgerasterten Punkt wird immer das komplette Empfangssignal innerhalb eines vom Benutzer eingestellten zeitlichen Fensters digitalisiert. Für die Modi ohne kontinuierliche Bewegung der x -Achse (A-, A(z)-Scan) werden jeweils 256 Echosignale gemittelt, die anderen Modi arbeiten im Single-Shot Betrieb. Die Auswahl der Hardwareparameter, der Scanfelder sowie des zu akquirierenden Zeitbereichs erfolgt über eine graphische Benutzeroberfläche (Abbildung 5-2). Das digitalisierte Empfangssignal wird zusammen mit sämtlichen einstellbaren Parametern gespeichert.

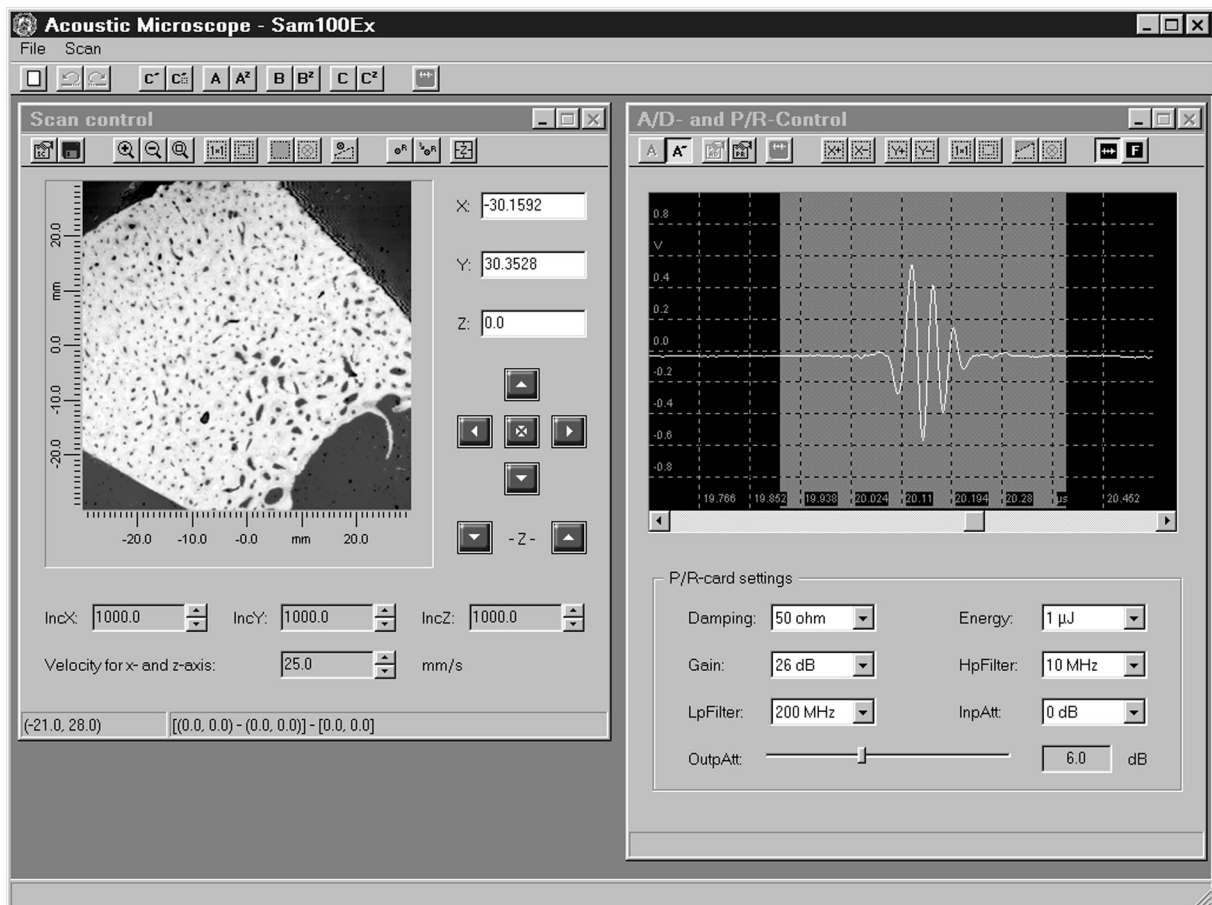


Abbildung 5-2 Die graphische Benutzeroberfläche der für das SAM100 entwickelten Software. Das linke Fenster dient der Darstellung der Maximalwerte der Echosequenzen, der Navigation sowie der Scanbereichsauswahl. Das rechte Fenster zeigt das aktuelle Puls-Echo. Die zu speichernde Sequenz wird per Maus markiert (heller Bereich). Außerdem können wichtige Parameter der A/D-Karte und des Pulser/Receivers über Popup-Menüs und -Fenster variiert werden.

5.2 Aufbau und Funktionsweise des SAM2000

Das SAM2000 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland) ist das derzeit einzige kommerziell erhältliche Hochfrequenzmikroskop. Spezielle akustische Linsen, bestehend aus einem Zinkoxidwandler und einer Saphirlinse, sind in einem Frequenzbereich von 60 MHz bis 2 GHz mit verschiedenen Öffnungswinkeln erhältlich. Die wesentlichen Besonderheiten des Systems werden im Folgenden aufgeführt.

5.2.1 Mechanischer Schwinger

In x - und y -Richtung dienen Schwingpulensysteme zur mechanischen Verstellung der akustischen Linse in der Ebene parallel zur Probenoberfläche. Die Pixelzuordnung des SAM-Bildes erfolgt über optische Wegmeßsysteme. Die Auslenkung der Achsen kann in 6 Stufen von ca. 65 bis 1000 μm verändert werden. In z -Richtung (parallel zur Schallstrahlachse) ist neben elektrischen und mechanischen Schnellhubeinrichtungen für die Grobpositionierung eine Feinverstellung entweder manuell oder per Software möglich. Diese besteht aus einem Keil und einer Platte, welche über eine Spindel gegeneinander verschoben werden. Damit wird eine Positioniergenauigkeit von 0,1 μm erreicht [1].

5.2.2 HF-Ketten

Das Mikroskop ist mit zwei voneinander separaten Sende/Empfangsketten ausgestattet. Im Frequenzbereich bis 400 MHz werden schmalbandige Wandler mit 1 ns kurzen elektrischen Pulsen einer Amplitude von ungefähr 30 V angeregt. Das Empfangssignal wird über einen Begrenzer zur Signalamplitudenbegrenzung und einen Breitbandverstärker mit einer Bandbreite von 50 - 400 MHz geführt. Durch einen Mischer erfolgt eine zeitliche Fensterung und danach eine nochmalige Verstärkung.

Oberhalb von 400 MHz kommt ein heterodyner Schaltkreis zum Einsatz. Dieser besteht aus den in Abbildung 5-3 dargestellten Komponenten. Durch den abstimmbaren Hochfrequenzsendeoszillator wird eine sinusförmige Schwingung mit der gewünschten Frequenz generiert. Ein nachgeschalteter Pindiodenschalter erzeugt einen Burst mit einer Impulsbreite von 16 ns (OSZI). Dieser wird verstärkt und regt den Wandler an (SEVE). Ein synchron zum Pindiodenschalter arbeitender HF-Schalter (SEEM) sorgt dafür, dass nur das Empfangssignal an die Empfangskette weitergegeben wird. Die Empfangsseite besteht aus Probensignalzweig und Referenzsignalzweig. Das Prinzip der Heterodynstufe beruht darauf, dass das Empfangssignal $i_N(t)$ mit dem Referenzsignal $i_H(t)$ (OSLO) durch Amplitudenmodulation gemischt wird (VOMI). Die beiden Signale können als sinusförmige Schwingungen unterschiedlicher Amplitude und Frequenz angenommen werden:

$$i_N(t) = a \sin(\omega t), \quad (5-1)$$

$$i_H(t) = A \sin(\Omega t), \quad (5-2)$$

wobei a und A die Amplituden und ω und Ω die Kreisfrequenzen sind. Die Modulation der Amplitude der hochfrequenten Schwingung führt zu

$$i_{Hm}(t) = (A + a \sin \omega t) \sin \Omega t, \quad (5-3)$$

bzw.

$$i_{Hm}(t) = A \left(1 + \frac{a}{A} \sin \omega t\right) \sin \Omega t. \quad (5-4)$$

Das Verhältnis $\frac{a}{A}$ wird als Modulationsgrad m , die maximale Änderung der Amplitude a als Amplitudenhub bezeichnet. Durch weitere Umformung findet man das Frequenzspektrum

$$i_{Hm}(t) = A \sin \Omega t + a \sin \omega t \sin \Omega t. \quad (5-5)$$

Mit dem Additionstheorem für die Sinusfunktion folgt

$$i_{Hm}(t) = A \sin \Omega t + \frac{a}{2} \cos(\Omega - \omega)t + \frac{a}{2} \cos(\Omega + \omega)t. \quad (5-6)$$

Die modulierte Welle enthält keinen Anteil der ursprünglichen Niederfrequenz. Statt dessen treten zusätzlich zur ursprünglichen Trägerfrequenz die Summe und die Differenz von Niederfrequenz und ursprünglicher Frequenz auf.

Die nachgeschalteten Bandpassfilter lassen nur die Differenzfrequenz passieren, während sowohl Hochfrequenz als auch Summenfrequenz gesperrt werden. Auf diese Weise ist es möglich, bei variabler Sendefrequenz durch Abstimmen des Lokaloszillators immer die gleiche Zwischenfrequenz zu erhalten. Prinzipiell lassen sich durch ein zusätzliches 90°-Phasenglied sowohl Amplitude als auch Phase des ursprünglichen Empfangssignals rekonstruieren [33]. Im vorliegenden Gerät wird die Zwischenfrequenz auf 400 MHz eingestellt. An die Modulationseinheit schließt sich lediglich eine kaskadenförmig angeordnete Verstärkereinheit (ZWIF I und II) an, welche über die Steuersoftware kontrolliert wird. Sämtliche Schalter, Modulatoren und Verstärker werden über eine Prozessorplatine zeitlich synchronisiert und nur dann aktiviert, wenn dies erforderlich ist. Damit werden unerwünschte Störsignale unterdrückt und das Signal-Rauschverhältnis verbessert.

Das aus einer der beiden Sende/Empfangsketten kommende Empfangssignal wird im Videoteil der Mikroprozessorplatine demoduliert und integriert. Nach weiterer Verstärkung über drei Tiefpassfilter (0-40 kHz) kann die resultierende Gleichspannung durch Variation von Videoverstärkung und Offset per Software für die abschließende A/D-Wandlung angepasst werden.

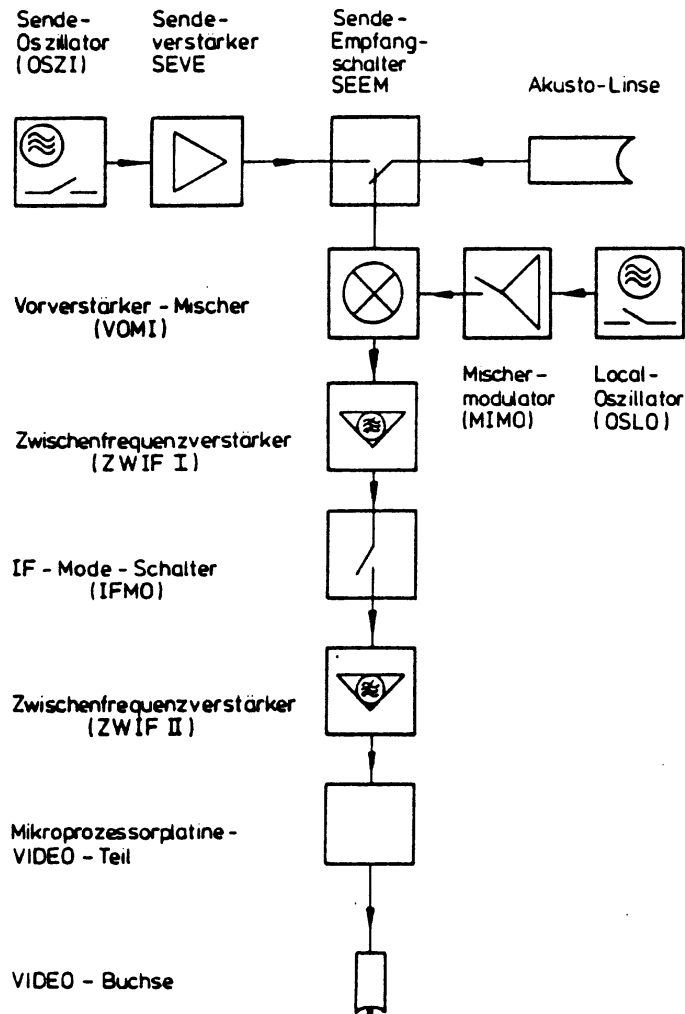


Abbildung 5-3 Prinzipschaltbild der heterodynen Sende-/Empfangskette (aus KSI Betriebsanleitung [1]).

Durch die digitale Datenerfassung ist die Anzahl der dargestellten Zeilen in 4 Stufen variierbar. Die Staffelung beträgt 64, 128, 256 und 512 Zeilen. Abgespeichert wird, unabhängig von der gewählten Auflösung oder Vergrößerung, eine Datenmatrix von 500 x 512 Punkten mit einer Speichertiefe von 6 bit. Die grundsätzliche Schwierigkeit bei diesem Mikroskop ist die Tatsache, dass zwar qualitativ hochwertige Aufnahmen ohne weiteres möglich sind, eine quantitative Zuordnung der gemessenen digitalen Werte (Grauwertbild mit 6 bit Auflösung) zu den zugrundeliegenden physikalischen Größen (z.B. Reflexionskoeffizient) aufgrund der Komplexität der Signalentstehung und -verarbeitung bzw. der Instabilität des Systems gegenüber äußeren Einflüssen umfassende Kenntnisse der einzelnen Komponenten des Systems erfordert. In der vom Hersteller ausgelieferten Version lieferte das Mikroskop zwar kontrastreiche, jedoch nicht reproduzierbare Ergebnisse.

Die wesentlichen Mängel sind im Folgenden zusammengefasst:

- thermische Instabilität,
- nicht eindeutig nachvollziehbare Einstellparameter (Anzeige von gerundeten Werten),
- unzureichender Eingangsspannungsbereich (0 - 2 V),
- unzureichende Auflösung bei der Digitalisierung (6 bit),
- umständliche, zeitaufwendige Bedienung,
- keine Möglichkeit der Automatisierung von Messroutinen.

5.2.3 Modifikationen am SAM2000

Die Untersuchung der Hardware ergab, dass ein maßgeblicher Grund für die thermische Instabilität in der Temperaturabhängigkeit der Betriebsspannung eines HF-Verstärkers lag. Der Verstärkungsfaktor dieses Verstärkers wird über dessen Betriebsspannung variiert. Die Steuerspannung kommt von einem DAC und gelangt auf die Basis eines Transistors, um den erforderlichen Strom zu treiben. Da sich in Abhängigkeit von der Steuerspannung der Ausgangsstrom ändert, entsteht Nichtlinearität zwischen Eingangs- und Ausgangsspannung gemäß dem statischen Kennlinienfeld eines Transistors. Alle Parameter sind außerdem temperaturabhängig. Den Hauptanteil hat dabei die Basis-Emitter-Spannung. Die Temperaturabhängigkeit eines pn-Si-Übergangs liegt bei ca. 2,2 mV/K, was z.B. bei einfachen Temperaturmessgeräten Anwendung findet. Aus diesem Grund ist der Verstärkungsfaktor temperaturabhängig. Dies konnte durch Hinzufügen eines Regelverstärkers in Form eines OPV AD712 beseitigt werden. Aufgrund der hohen Verstärkung des OPV ergibt sich eine lineare und von der Temperatur unabhängige Korrelation zwischen Steuerspannung und Betriebsspannung des HF-Verstärkers. Die Temperaturabhängigkeit des AD712 ist unter normalen Betriebsbedingungen zu vernachlässigen. Die Stromversorgung erfolgt mit dem vorhandenen Netzteil aus den Spannungsebenen ± 15 V. Der Regelverstärker wurde auf einer kleinen Leiterplatte innerhalb der Steuerbox montiert.

Wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, hat die temperaturabhängige Dämpfung bei hohen Frequenzen einen wesentlichen Einfluss bei der Ermittlung des Reflexionskoeffizienten. Das SAM2000 verfügt zwar über eine Vorrichtung zur Beheizung der Linse, was die Temperierung des Kopplungsmediums bewirken soll, diese wurde allerdings als nicht ausreichend angesehen, um für konstante Temperaturbedingungen zu sorgen. Deshalb wurde ebenfalls ein temperierbarer Proben tank eingesetzt. Die zu untersuchende Probe wird so vollständig im

Kopplungsmedium eingetaucht und damit Temperatureffekte durch Wärmeleitung, -strömung und Konvektion minimiert. Um durch Verdunstung des Kopplungsmediums hervorgerufene Temperaturgradienten zu vermeiden, wird der Tank durch eine Platte abgedeckt, die einen kleinen Öffnungsspalt für die Linse aufweist.

Die anderen Mängel lagen ausschließlich in der vom Hersteller bereitgestellten Hard- und Software für die Mikroskopsteuerung und Datenakquisition. In Kooperation mit dem Centre for Imaging Research and Advanced Materials Characterization (CIRAMC, University of Windsor, Kanada) wurden diese Komponenten deshalb ersetzt. Für die Akquisition des gleichgerichteten Videosignals kam eine Eagle PC30F (Eagle Technology, Cape Town, South Afrika) 16-Kanal-A/D-Karte mit einer Samplingrate von 330 kHz und 12 bit Speichertiefe zum Einsatz. Für die Steuerung der Hardwarekomponenten des Mikroskops und die Datener-

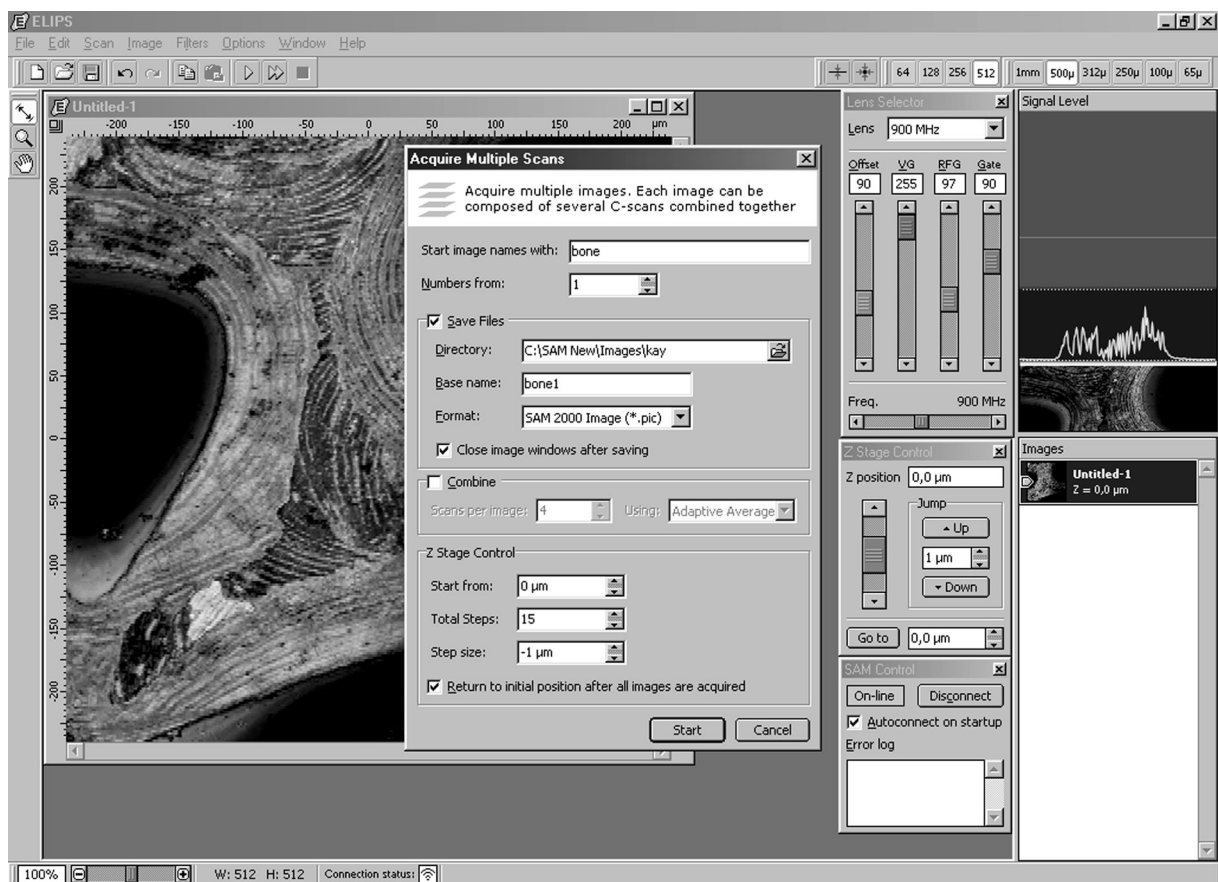


Abbildung 5-4 Die graphische Benutzeroberfläche der für das SAM2000 entwickelten Software. Im linken Fenster erfolgt die Darstellung der Bilddaten und in den rechten Fenstern die Steuerung der Hardware. Das Fenster "Signal-Level" zeigt die aktuelle Messzeile (Zackenkurve) im Verhältnis zum Spannungsbereich der A/D-Karte. Der auf 8 bit konvertierte Bereich (dunkel) lässt sich per Mausclick festlegen. Das Popup-Fenster in der Mitte erlaubt die Einstellung der Messparameter für automatische Schichtbildmessungen.

fassung und Bildgenerierung wurde eine eigene, auf WinXX basierende Software (ELIPS) von Herrn A. Denissov (CIRAMC, University of Windsor, Kanada) entwickelt (Abbildung 5-4). Eine spezielle Messroutine ermöglicht die automatisierte Datenerfassung nach dem in Kapitel 8 beschriebenen *Multi Layer Analysis* Verfahren. Diese akquiriert und speichert automatisch in vom Benutzer frei wählbaren z -Abständen eine ebenfalls beliebige Anzahl von C-Scan-Bildern. Zusammengefasst sind die Vorteile gegenüber dem Ausgangszustand:

- ein ausreichender Eingangsspannungsbereich (-5 bis 5 V),
- eine optimale Auflösung bei der Digitalisierung (12 bit),
- die Anpassung des gespeicherten Eingangsspannungsbereiches an die Signaldynamik, die Möglichkeit der Messung mit festen Einstellparametern,
- die Integration von Averaging- und Korrekturalgorithmen zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses sowie zur Beseitigung von Verzerrungs- und Störungsartefakten während der Akquisition,
- die größtmögliche Kontrolle und Flexibilität durch eigene Programmierung,
- eine einfache und komfortable Bedienung und
- die Implementierung von schnellen und automatisierten Messroutinen.

6 PROBENPRÄPARATION

Für die Untersuchungen werden in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettete Knochenschnitte angefertigt. Dies ermöglicht die Herstellung von haltbaren, stabilen Präparaten mit hinreichend glatter Oberfläche.

Zunächst erfolgt für jeweils 24 Stunden im Schüttelgerät in aufsteigender Alkoholreihe (70, 96 und 100 % Ethanol) und abschließend für 12 Stunden in HistoClear™ (Xylol-Ersatz, 1,4-Dimethylbenzol) eine Fixation und Entwässerung der Knochenprobe. Die langsame Infiltration des Einbettungsmediums geschieht jeweils für 24 Stunden im Kühlschrank (ca. 4°C) mit reinem Methylmethacrylat (MMA) und danach mit einer Lösung von 95 % MMA, 5 % Weichmacher (Dibutylphthalat) unter Zusatz von 1 g/100 ml Benzoylperoxid. Die Polymerisation erfolgt in einer Lösung aus 95 % MMA, 5 % Weichmacher und Zusatz von 3 g/100 ml Benzoylperoxid in einem Wasserbad bei konstanter Temperatur von 24°C. Nach dem Aushärten, was in der Regel 2 bis 4 Wochen dauert, werden mit Hilfe einer Diamant-Trennschleifeinrichtung (Exakt - Trennschleifsystem Makro, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) planparallele Knochenschnitte mit der gewünschten Orientierung und Dicke hergestellt. Die für die mikroskopischen Untersuchungen notwendige Oberflächengüte wird durch Schleifen mit sukzessiv feinerer Körnung an einem Exakt-Mikroschleifsystem (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) und Schleifpapier der Körnung 1200, 2400 und 4000 sowie durch Polieren an einem Planopol-V Drehpoliertisch (Struers Tech, Kopenhagen, Dänemark) mit Poliertuch und Diamantspray einer Körnung von 1 und 0,25 µm erreicht.

Zur Herstellung der in Kapitel 7 beschriebenen Dünnschnittproben wird die Schleifprozedur auf der Rückseite der Probe bis zum Erreichen der gewünschte Probendicke und Oberflächengüte wiederholt.

7 ZEITAUFGELÖSTE METHODEN

Das im Abschnitt 5.1 beschriebene Mikroskop erlaubt die Akquisition der hochfrequenten Puls-Echo-Signale. Damit ist neben der normalerweise zur Verfügung stehenden räumlichen Verteilung der Echoamplituden die Auswertung des zeitlichen und spektralen Signalinhaltes möglich. In diesem Kapitel wird zum einen die Bestimmung von zweidimensionalen Abbildungen der akustischen Impedanz unter Berücksichtigung der Schallfeldeigenschaften beschrieben und zum anderen eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Impedanz, Longitudinal- und Scherwellengeschwindigkeiten sowie der Probendicke demonstriert. Mit dieser Methode ist die Ableitung der Massendichte sowie der elastischen Parameter c_{11} und c_{44} möglich, woraus sich wiederum für isotrope Materialien Elastizitäts- und Schermoduln sowie die Poisson-Zahl ergeben.

Für eine quantitative Analyse der Ultraschalldaten ist eine genaue Kenntnis der wesentlichen Schallfeldparameter erforderlich. Diese wurden deshalb zunächst durch das von Raum und O'Brien [79, 80] beschriebene Verfahren der Schallfeldmessung für hochfrequente fokussierte Ultraschallwandler mit Hilfe eines dünnen Wolframdrahtes bestimmt. Alle Messungen sind bei einer Wasser- und Probentemperatur von 25°C in destilliertem, entgastem Wasser durchgeführt worden. Zur Auswertung der mit dem SAM100 erfassten Daten diente eine auf der Basis von Matlab® entwickelte Software. Für die Untersuchungen wurden sphärisch fokussierte Einzelelementwandler von Panametrics (Modell: V324), Valpey Fisher (Modell: V605) und KSI (Modell: PT100) verwendet. Die wesentlichen Schallfeldparameter dieser Wandler sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

Tabelle 7-1 Schallfeldparameter der verwendeten Wandler. Die mit einem Stern gekennzeichneten Größen sind Herstellerangaben, alle anderen sind experimentell ermittelt.

Wandler (Hersteller, Bezeichnung)	Panametrics V324	Valpey Fisher V605	KSI PT100
Mittenfrequenz*	25 MHz	50 MHz	100 MHz
Wandlerdurchmesser*	6 mm	6,35 mm	1,2 mm
Krümmungsradius*	15 mm	6,35 mm	1,5 mm
f-Nummer*	2,5	1	1,25
Laufzeit (Fokus)	20,4 μ s	17,0 μ s ¹	2,14 μ s
Pulslänge	119,0 ns	46,0 ns	31,7 ns
Mittenfrequenz (Spitze/Mitte)	29,54 MHz 28,95 MHz	49,00 MHz 44,95 MHz	74,95 MHz 76,86 MHz
f_1 (-6 dB)	21,90 MHz	26,00 MHz	51,46 MHz
f_2 (-6 dB)	36,00 MHz	63,90 MHz	102,26 MHz
rel. Bandbreite (Spitze/Mitte)	47,73 % 48,70 %	77,35 % 84,31 %	67,78 % 66,10 %
Fokustiefe	2100 μ m	169 μ m	320 μ m
Schallfelddurchmesser	142 μ m	23 μ m	32 μ m

¹inklusive 10 μ s Vorlaufstrecke

7.1 Impedanzabbildung

Da sich das axiale Schallfeld von dem $V(z)$ -Verlauf bei der Reflexion an einer ebenen Grenzfläche unterscheidet, wurden zusätzlich $V(z)$ -Kurven von Referenzmaterialien erfasst, die zur Korrektur der Defokussierung bei der Impedanzbestimmung von C-Scan-Daten dienen. Dies geschieht durch die Bestimmung von Laufzeit TOF (Time Of Flight) und Amplitude der durch HILBERT-Transformation [58] gewonnenen Einhüllenden des Oberflächenechos in Abhängigkeit vom Abstand des Wandlers zur Probenoberfläche. Die Amplituden werden in Dezibel-Werte überführt, wobei 0 dB der Amplitude im Fokus entspricht. Durch eine Table-Lookup-Interpolation kann dann für kleine Abweichungen von der konfokalen Puls-Echo-Laufzeit der entsprechende dB-Wert ermittelt werden, der von der Echoamplitude (in dB) subtrahiert werden muss, um die Signalamplitude im Fokus zu erhalten (Abbildung 7-1). Da sich die normierten $V(z)$ -Verläufe innerhalb der Fokustiefe für die verschiedenen Referenzmaterialien nur unwesentlich unterscheiden, wurde für jeden Wandler der Mittelwert aus den Referenzkurven für die Fokussierungskorrektur verwendet.

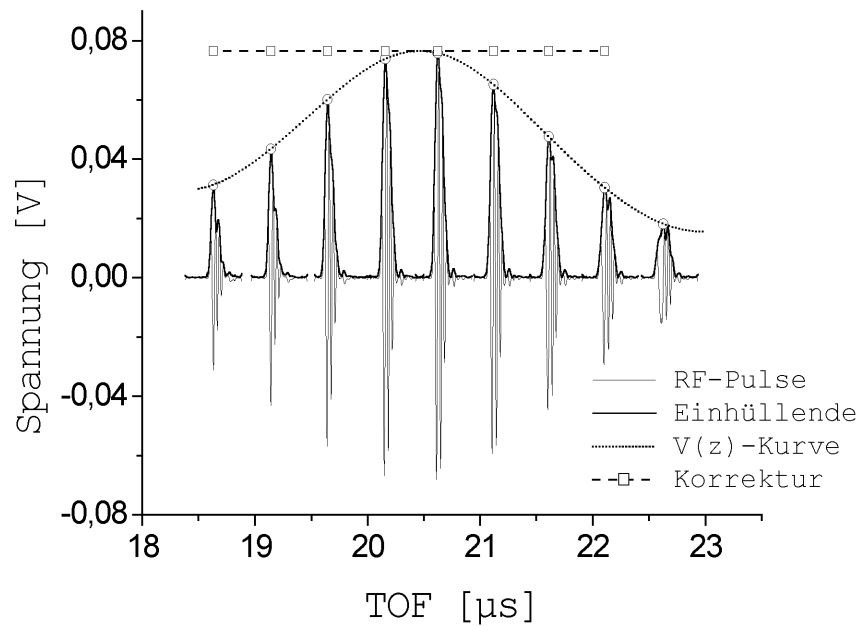


Abbildung 7-1 Die Echos einer homogenen Referenzprobe in Abhängigkeit vom Objekt-Wandler-Abstand (überlagert dargestellt). Die Verbindung der Amplituden der Einhüllenden ergibt die $V(z)$ -Kurve. Mit Hilfe der Laufzeitinformation wird eine Defokussierungskorrektur der Echoamplitude durchgeführt (Korrekturkurve).

Die Fokus-Amplituden der Referenzmaterialien sind außerdem Grundlage für die Impedanzkalibrierung. Unter der Voraussetzung, dass die elektronischen Übertragungseigenschaften des akustischen Systems linear sind, ist die gemessene Spannungsamplitude im Fokus proportional zum Reflexionskoeffizienten [16,43,44]. Als Referenzmaterialien dienen homogene Stoffe, deren akustische Impedanzen einen weiten Bereich sowohl oberhalb als auch unterhalb des in Knochen zu erwartenden Impedanzbereiches abdecken (Tabelle 7-2). Die separate Bestimmung der Dichten und Longitudinalwellengeschwindigkeiten erfolgte nach der Auftriebsmethode bzw. einer niederfrequenten Ultraschall-Substitutionsmethode [98].

Tabelle 7-2 Dichte, longitudinale Schallgeschwindigkeit und akustische Impedanz der verwendeten Referenzproben (Standardfehler jeweils in %).

Material	Dichte ρ [g/cm ³]	Schallgeschwindigkeit v_l [m/s]	Impedanz Z_l [Mrayl]
TPX [®]	0,83 (0,01)	2060 (0,10)	1,71 (0,11)
Polystyren	1,05 (0,01)	2250 (0,16)	2,36 (0,17)
Polykarbonat	1,20 (0,01)	2310 (0,37)	2,77 (0,38)
PMMA	1,18 (0,01)	2730 (0,27)	3,22 (0,28)
Suprasil [®]	2,21 (0,01)	6050 (0,08)	13,37 (0,09)
Aluminium	2,81 (0,01)	5940 (0,12)	16,69 (0,13)
Titan	4,43 (0,01)	5900 (0,09)	26,14 (0,10)

Die Reflexionskoeffizienten der Referenzmaterialien sind als Funktion der konfokalen Echoamplitude für die einzelnen Wandler in Abbildung 7-2 dargestellt.

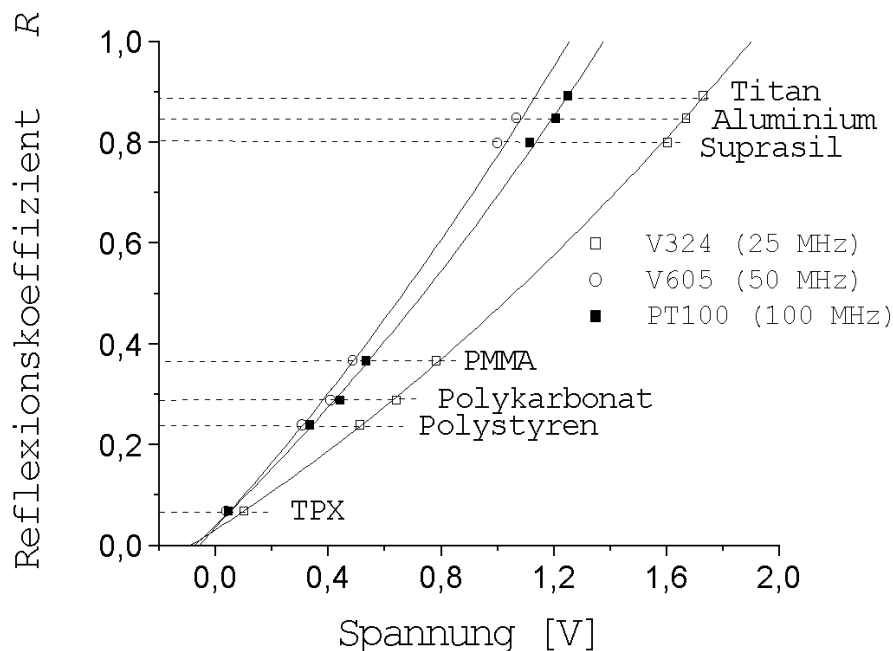


Abbildung 7-2 Umrechnung der Echoamplituden in Werte des Reflexionskoeffizienten durch Polynomfit zweiter Ordnung.

Regressionen zweiter Ordnung wurden verwendet, um aus beliebigen Echoamplituden den entsprechenden Reflexionskoeffizienten abzuleiten. Damit ist die Bestimmung der akustischen Impedanz nach Gleichung (4-10) möglich.

Anhand der Frequenzspektren der verwendeten Wandler (Abbildung 7-3) wurden die Grenzfrequenzen für Bandpassfilter definiert. Diese sind so gewählt, dass sie außerhalb der Bandbreite der zur Messung verwendeten Wandler liegen. Um den Amplituden- und Phaseninhalt der Signale nicht zu verfälschen, wurden Chebyshev Filter vom Typ 2 verwendet, welche durch ein monotonen Verhalten im Passband charakterisiert sind [70]. Die Filterordnungen für Tief- und Hochpass betragen 14 bzw. 7 und die Dämpfung zwischen Stop- und Passband jeweils 40 dB. Die Filterung erfolgt mit einer in Matlab[®] implementierten zero-phase-Filterfunktion in beide Richtungen, wodurch das gefilterte Signal exakt die gleiche Phaseninformation wie das Rohsignal hat [69]. Die Filterung dient der Beseitigung von Gleichspannungskomponenten, harmonischen Signalanteilen sowie der Reduzierung von elektronischen Störungen außerhalb der Bandbreite der Wandler und damit der Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses.

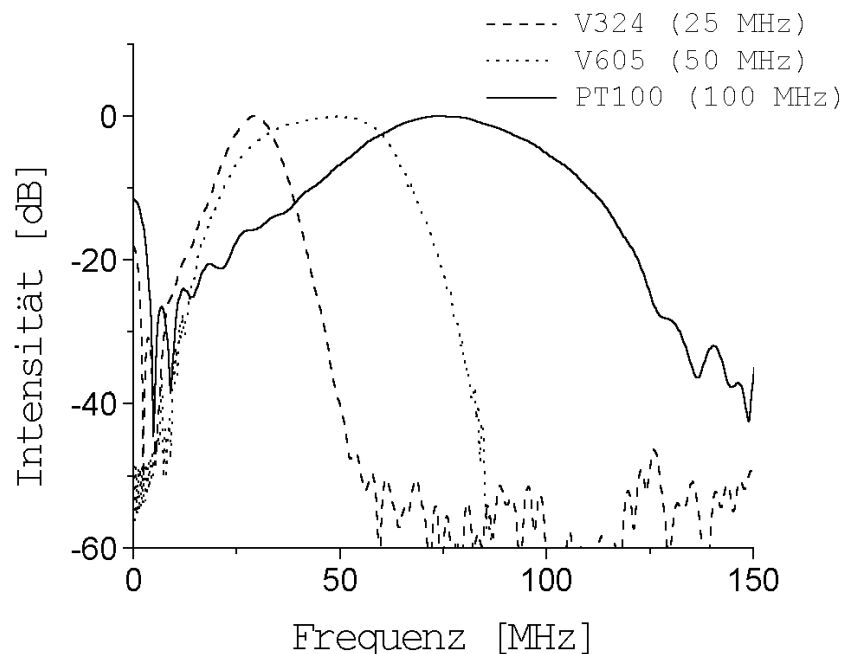


Abbildung 7-3 Puls-Echo Spektren der für die Untersuchung verwendeten Schallwandler.

Zweidimensionale Impedanzmessungen der Probenoberfläche werden im C-Scanmodus realisiert. Die Probe wird so positioniert, dass die Oberfläche ungefähr in der Fokusebene des Wandlers liegt. Für Pulser/Receiver sowie A/D-Wandler werden vom Wandler abhängige Standardeinstellungen verwendet, die eine optimale Digitalisierung der Echos garantieren. Die Schrittweiten in x - und y -Richtung sollten höchstens halb so groß wie das laterale Auflösungsmaß sein.

sungsvermögen des Wandlers sein, um Aliasing zu vermeiden. Die Grenzen des Zeitfensters werden so gewählt, dass das Puls-Echo an jedem Scanpunkt vollständig erfasst wird.

Um die Impedanz zu bestimmen, werden die Echo-Signale nach der oben beschriebenen Methode mit einem Bandpass gefiltert. Laufzeit und Amplitude des Maximalwertes der durch HILBERT-Transformation gewonnenen Hüllkurve dienen der Bestimmung der Fokusamplitude. Die korrigierten Spannungswerte können dann mit Hilfe von Kalibrierkurven in Werte der akustischen Impedanz umgerechnet werden.

7.1.1 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden die Impedanzen der Probekörper mit jedem Wandler mindestens 10-mal an verschiedenen Tagen bestimmt. Die maximale relative Messunsicherheit betrug 0,42 %.

7.1.2 Ergebnisse

Der Einfluss von Frequenz und lateralem Auflösungsvermögen auf die Bestimmung der akustischen Impedanz wurde durch Messungen mit den drei verschiedenen Wandlern an jeweils einem 0°- und an einem 90°-Schnitt einer Knochenprobe untersucht (Abbildung 7-4 und Abbildung 7-5).

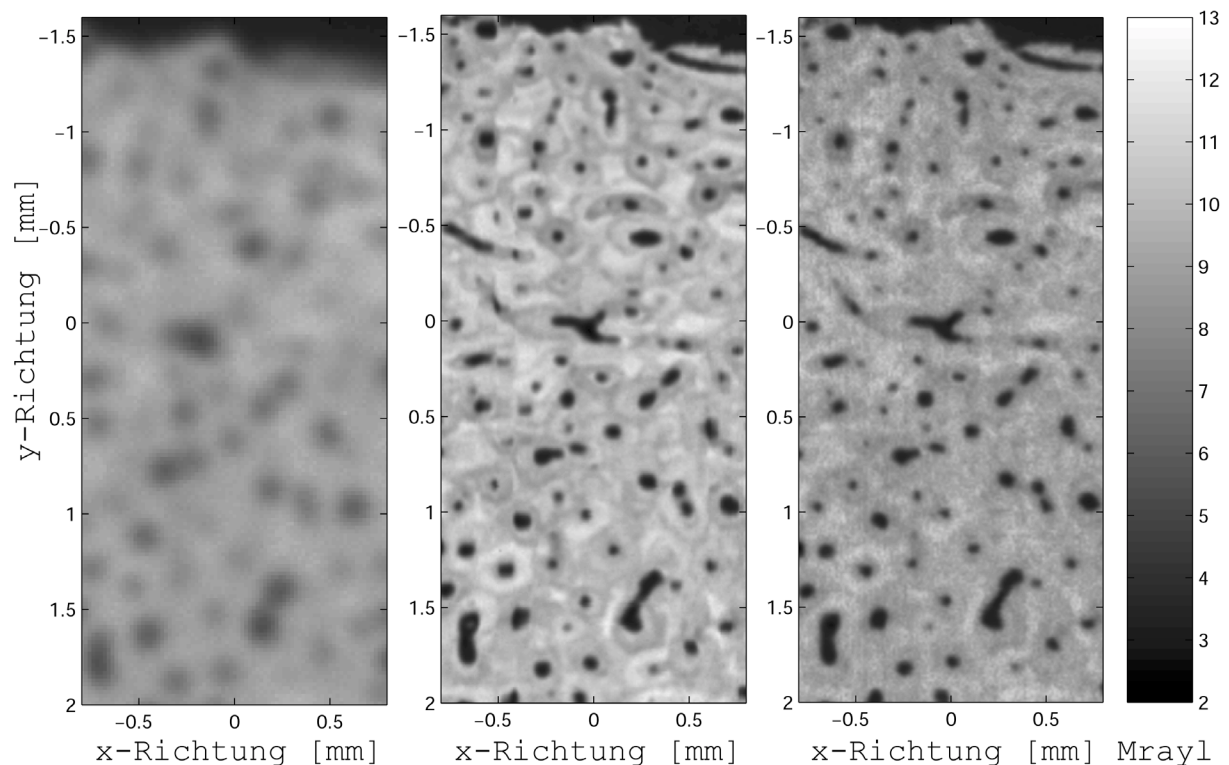


Abbildung 7-4 Impedanzbilder eines kortikalen Knochenschnittes mit 0°-Orientierung (die Oberflächennormale ist parallel zur Knochenlängsachse). Die Messungen wurden mit den drei oben beschriebenen Wandlern durchgeführt. Von links nach rechts: V324 (25 MHz), V605 (50 MHz), PT100 (100 MHz).

Es überrascht nicht, dass das geringe Auflösungsvermögen des 25 MHz-Wandlers (142 μm) eine verminderte Differenzierung der kortikalen Knochenstruktur zur Folge hat. Die mit PMMA gefüllten HAVERS-Kanäle sind zwar als Gebiete mit geringer Impedanz zu erkennen, die Werte von 5 bis 8 Mrayl in den Kanälen lagen aber deutlich über dem gemessenen Wert vom PMMA außerhalb der Kortikalis ($3,17 \pm 0,05$ Mrayl). Das geringe Auflösungsvermögen wirkt wie ein räumliches Mittelwertfilter, was wiederum am Knochen in der Nähe von Strukturgrenzen zu einer verminderten Impedanzbestimmung führt. Das gleiche ist auch in den mit den höher auflösenden Wandlern gemessenen Impedanzbildern zu sehen, jedoch ist der Fehler entsprechend kleiner.

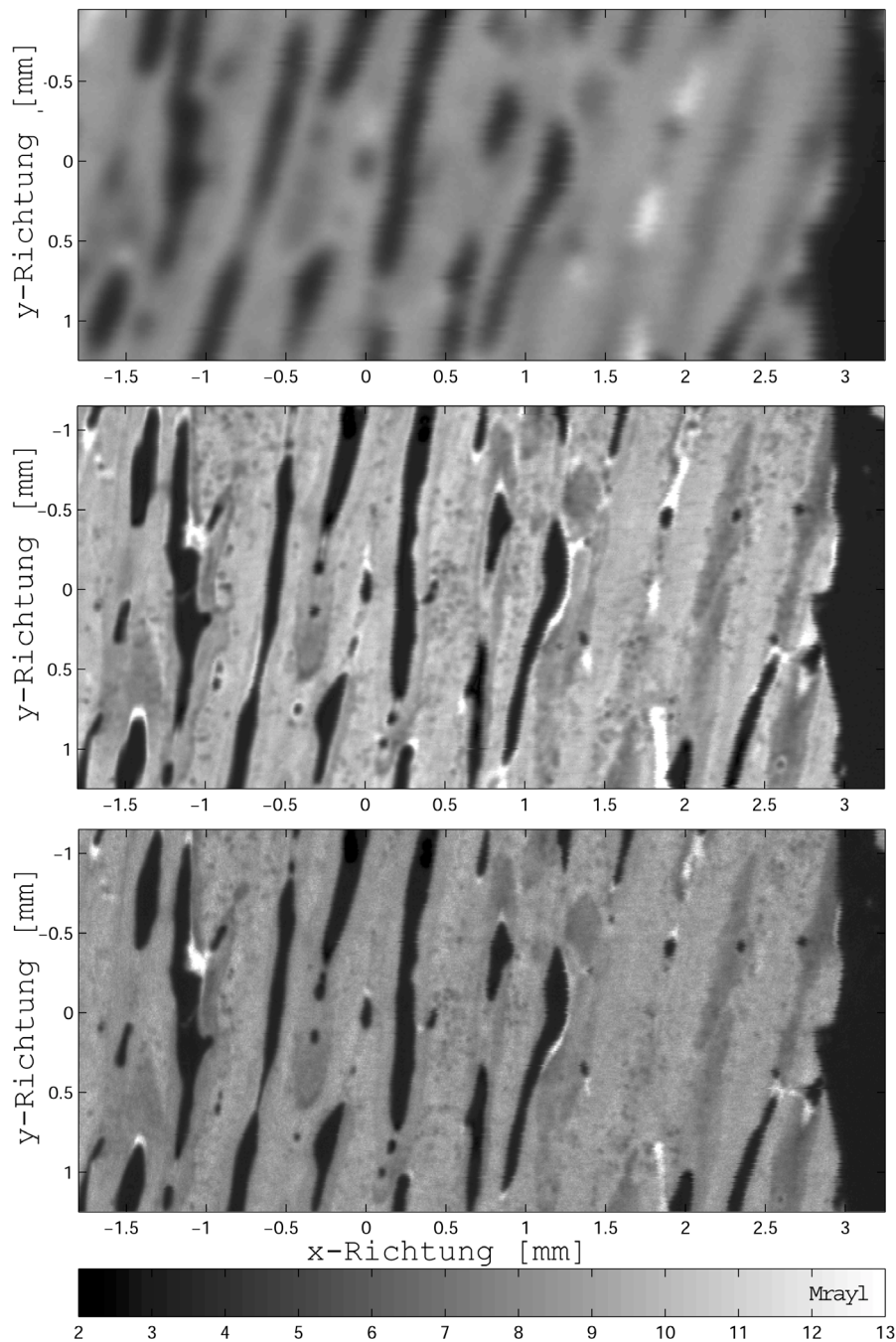


Abbildung 7-5 Impedanzbilder eines kortikalen Knochenschnittes mit 90° -Orientierung (die Oberflächennormale ist senkrecht zur Knochenlängsachse). Die Messungen wurden mit den drei oben beschriebenen Wandlern durchgeführt. Von oben nach unten: V324 (25 MHz), V605 (50 MHz), PT100 (100 MHz).

Während in den großen PMMA-Bereichen an den Bildrändern mit allen Wandlern innerhalb der Standardabweichung die gleiche Impedanz bestimmt wurde, wichen die Impedanzwerte im Knochen signifikant voneinander ab (Tabelle 7-3). Die höchsten Impedanzmittelwerte wurden mit dem 50 MHz-Wandler ermittelt. Dieser hat mit $23\ \mu\text{m}$ auch das beste laterale Auflösungsvermögen. Die großen Standardabweichungen weisen auf die

beste Differenzierung der heterogenen Knochenstruktur hin. Die Maximalwerte der Histogramme lagen jeweils annähernd in der Mitte der 50 % - Bereiche. Im Gegensatz dazu waren die Maximalwerte der Histogramme für die beiden anderen Wandler mehr oder weniger deutlich zur oberen 50 % - Grenze hin verschoben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass der Einfluss der Strukturgrenzen mit großen Impedanzunterschieden zu einer Verfälschung der Impedanzbestimmung führt.

Die Impedanzmittelwerte waren in der 90°-Probe im Vergleich zur 0°-Probe für alle Wandler signifikant kleiner. Die relativen Unterschiede variierten jedoch von 5,15 % für den 50 MHz Wandler über 7,13 % für den 100 MHz Wandler bis zu 9,29 % für den 25 MHz Wandler.

Tabelle 7-3 Mittelwerte und Standardabweichungen für die Impedanz der in Abbildung 7-4 und Abbildung 7-5 abgebildeten PMMA- und Knochenbereiche. Nur die größeren PMMA-Bereiche an den Bildrändern wurden für eine Histogrammauswertung herangezogen. Die mit PMMA gefüllten Bereiche im Knochen (HAVERS-Kanäle) wurden durch eine Schwellwertmaske von der Auswertung ausgeschlossen. Für Knochen sind zusätzlich der Maximalwert sowie der 50 %-Bereich der Verteilung angegeben.

Auswahl\Wandler	V324 (25 MHz)	V605 (50 MHz)	PT100 (100 MHz)
PMMA (0°) [Mrayl]	3,18 ± 0,05	3,20 ± 0,05	3,18 ± 0,07
PMMA (90°) [Mrayl]	3,17 ± 0,05	3,19 ± 0,05	3,19 ± 0,08
Knochen (0°) [Mrayl]	8,67 ± 0,64	9,74 ± 0,96	8,85 ± 0,80
	9,0 [8,4 – 9,3]	9,8 [9,05 – 10,7]	8,9 [8,2 – 9,7]
Knochen (90°) [Mrayl]	7,90 ± 0,76	9,25 ± 1,08	8,24 ± 0,78
	8,2 [7,4 – 8,7]	9,8 [8,9 – 10,4]	8,5 [7,5 – 9,2]

7.1.3 Diskussion der Ergebnisse

Die zweidimensionale Erfassung und Abbildung der Reflexionsamplitude von Knochengewebe unter Berücksichtigung einer möglichen Defokussierung ist mit Hilfe des in Abschnitt 5.1 beschriebenen SAM ohne weiteres möglich. Da die Impedanzunterschiede innerhalb des Knochengewebes wesentlich kleiner als die zum Kopplungsmedium sind, treten außer der Oberflächenreflexion normalerweise keine weiteren Echos auf. Selbst die kleinsten

verwendeten Wellenlängen sind wesentlich größer als die durch die Osteonenlamellen bestimmte Dimension der Mikrostruktur, so dass die Knochenmatrix von der Welle nicht als Schichtstruktur, sondern als homogenes Medium "angesehen" wird.

Bei der Ableitung der akustischen Impedanz sind jedoch die in diesem Frequenzbereich limitierten lateralen Schallfelddimensionen zu berücksichtigen. Die Anwendung von Gleichung (4-10) setzt voraus, dass sich die Impedanz innerhalb des vom Schallfeld durchsetzten Querschnittes der Grenzfläche nicht ändert. Die in kortikalem Knochen typischen HAVERS-Kanäle haben in der Regel einen Durchmesser zwischen 10 und 150 μm und stellen damit Strukturen mit großen Impedanzsprüngen dar, deren Dimensionen z.T. unterhalb des Auflösungsvermögens liegen. Die dadurch hervorgerufene räumliche Tiefpassfilterung führt zu einer Unterbewertung der mittleren akustischen Impedanz im Knochen, die sowohl vom Impedanzunterschied und dem Schallfelddurchmesser als auch von der Größe, Anzahl und Verteilung dieser Struktur Grenzen abhängt. In dem 90° -Schnitt ist die von den HAVERS-Kanälen eingenommene Fläche deutlich größer als im 0° -Schnitt. Dies spiegelt sich in der größeren Abnahme der mittleren Impedanz bei den Messungen mit niedrigerem Auflösungsvermögen wider.

Vermutlich den gleichen Effekt fanden Zimmerman et al. [114] bei der Untersuchung von nativem und eingebettetem Knochen bei einer Frequenz von 50 MHz und einem approximierten lateralen Auflösungsvermögen von 75 μm . Dort wurde ein signifikanter Anstieg der Impedanz um 0,4 Mrayl (4,2 %) nach der Einbettung der Proben festgestellt. Wenngleich die Erhöhung auf eine Veränderung der Materialeigenschaften durch die chemische Behandlung zurückgeführt wurde, kann die Impedanzerhöhung auch durch die höhere Impedanz des Einbettungsmediums (ca. 3 Mrayl) im Vergleich zum Wasser (ca. 1,5 Mrayl) erklärt werden.

7.2 Gleichzeitige Bestimmung von Impedanz, Schallgeschwindigkeit und Probendicke

Im Folgenden wird ein Verfahren beschrieben, welches die Prinzipien der Fokussierung sowie der Anregung von Transversalwellen gezielt ausnutzt, um an dünnen Proben-schnitten die akustischen Größen zu bestimmen, mit denen sich die korrespondierenden elastischen Größen ableiten lassen. Es ist angelehnt an eine von Hänel et al. [37,38] beschriebene Methode zur gleichzeitigen Messung von Schallgeschwindigkeit und Dicke dünner Proben sowie den von Maev et al. [62] beschriebenen Prinzipien der lokalen Schallgeschwindigkeits- und Dämpfungsmessung mittels akustischer Transmissionsmikroskopie. Im Gegensatz zu diesen Methoden wird hier jedoch mit sehr breitbandigen Pulsen gearbeitet, was zum einen den Vorteil des hohen zeitlichen Auflösungsvermögens hat, zum anderen aber auch zusätzliche Schwierigkeiten durch die Frequenzabhängigkeit von Schallfeldparametern und Dämpfung mit sich bringt. Im Gegensatz zu vielen anderen Arbeiten zur Bestimmung der Schallgeschwindigkeit an biologischen Hartgeweben im Frequenzbereich bis 100 MHz [61,101-104] werden die durch die Fokussierung hervorgerufenen Einflüsse auf die Schallausbreitung berücksichtigt. Außerdem erübrigt sich die sonst notwendige Bestimmung von Probendicke und -dicke mit sekundären Messverfahren.

Das primäre Ziel des Einsatzes großer Aperturwinkel in SA-Mikroskopen ist eine möglichst hohe laterale Ortsauflösung. Die damit verbundene gekrümmte Schallwellenfront führt zu schwer beschreibbaren Veränderungen der Pulsform reflektierter Wellenanteile sowie zur Modenkonvertierung (Generierung von Transversal- und Oberflächenwellen), sobald auf Bereiche unterhalb der Oberfläche fokussiert wird.

Das Prinzip der Messung ist in Abbildung 7-6 verdeutlicht. Ein sphärisch fokussiertes Schallfeld wird entweder auf die Vorder- oder Rückwand einer dünnen Probe fokussiert. Die Laufzeiten der Echos hängen aufgrund der gekrümmten Wellenfront nicht nur vom Wandlerabstand, der Probendicke und dem Verhältnis der Schallgeschwindigkeiten, sondern auch von den Phasenverhältnissen der einzelnen Wellenanteile mit verschiedenen Einfallswinkeln ab, was eine analytische Beschreibung schwierig macht. Lediglich in den Fokusebenen haben alle Wellenanteile die gleiche Phase, wodurch sich die Verhältnisse vereinfachen.

Im ersten Fall wird die Laufzeit TOF_1 des Vorderwandechos durch den Fokussierungsabstand F und die Schallgeschwindigkeit v_0 im Kopplungsmedium bestimmt:

$$TOF_1 = \frac{2F}{v_0}. \quad (7-1)$$

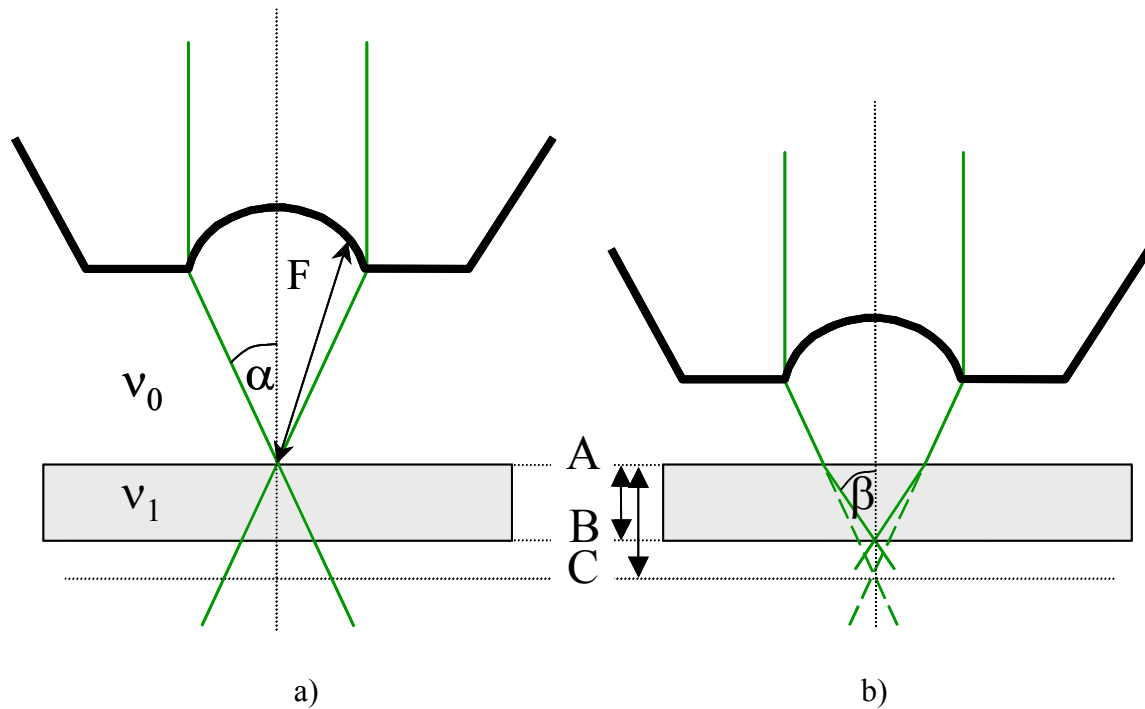


Abbildung 7-6 Fokussierung auf Vorder- und Rückseite einer dünnen Schicht.

Im Fokus heben sich alle lateralen Schwingungskomponenten eines sphärisch fokussierten Schallfeldes auf, wodurch die Approximation der Reflexions- und Transmissionsgesetze für eine ebene Wellenfront zulässig ist [16,43,44]. Führt man den Fokus des Wandlers unter die Probenoberfläche, so werden in der Probe aufgrund der lateralen Schwingungskomponenten der gekrümmten Wellenfront neben Longitudinalwellen auch Transversalwellen generiert (Abbildung 7-7). Beide Wellen werden an der Rückseite der Probe reflektiert. Da die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwellen SL_2 kleiner als die der Longitudinalwellen L_2 ist, ist der Laufzeitunterschied zwischen dem Vorder- und Rückwandecho für die Transversalwelle entsprechend größer. Andererseits werden aufgrund der unterschiedlichen Brechungszahlen durch die Bewegung des Schallwandlers in Richtung Probe nacheinander die Fokusebenen der transmittierten Transversal- und Longitudinalwellen an die Grenzfläche der Rückwand geführt. Wenn der Aperturwinkel des Wandlers entsprechend groß ist, können in Materialien mit hoher Schallgeschwindigkeit außerdem verschiedene Oberflächenwellen generiert werden. In dem Beispiel in Abbildung 7-7 ist eine Kompressionswelle (*SSCW*, Surface Skimming Compressional Wave) zu sehen, die sich entlang der Oberfläche ausbreitet und Energie in das Kopplungsmedium verliert.

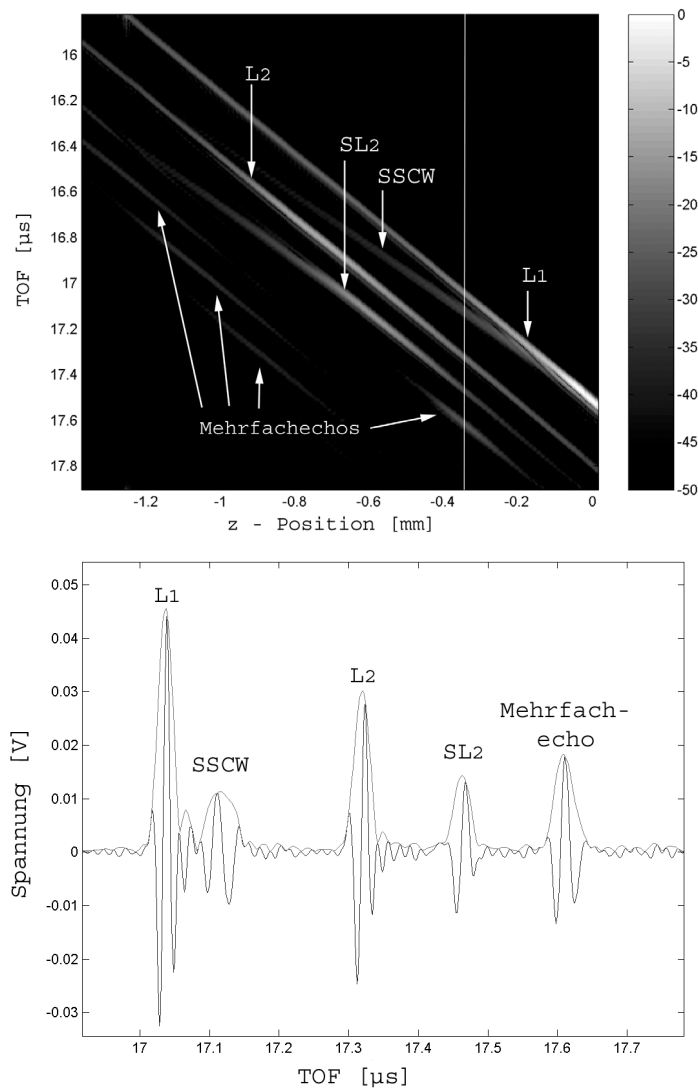


Abbildung 7-7 $V(z,t)$ – Bild (oben) einer dünnen PMMA-Schicht. Die Einhüllenden der Puls-Echo-Folgen (unten) werden in Abhängigkeit von der Defokussierung des Wandlers relativ zur Probenoberfläche aufgetragen. Die diagonalen Linien kennzeichnen die einzelnen Puls-Echos: L_1 – Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SSCW – Surface Skimming Compressional Wave, SL_2 und L_2 – Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche. Die Helligkeit der Linien ist proportional zur Echoamplitude in dB. Die z -Position des unten dargestellten Puls-Echos ist im $V(z,t)$ -Bild durch eine vertikale Linie markiert.

Diese Arten von Wellen lassen sich in einem $V(z,t)$ -Bild von den Reflexionen an der rückwärtigen Seite der Probe einfach unterscheiden, da sie ein deutlich unterschiedliches Laufzeitverhalten aufweisen und das laufzeitabhängige Signal des Oberflächenechos in dessen konfokaler Position schneiden.

Da Oberflächenwellen in Knochen in der Regel nicht zu beobachten sind, wird auf eine nähere Betrachtung hier verzichtet. Statt dessen wird die Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der transmittierten Longitudinal- und Scherwellen beschrieben.

Für den Fall der Fokussierung der Longitudinalwelle auf die Rückwand ergibt sich die Laufzeit TOF_2 der Welle mit dem größten Einfallswinkel α , indem man die Laufzeit von der Probenoberfläche zum virtuellen Fokus im Kopplungsmedium durch die Laufzeit in der Probe ersetzt:

$$TOF_2 = \frac{2F}{v_0} - \frac{2\overline{AC}_l}{v_0 \cos \alpha} + \frac{2\overline{AB}}{v_1 \cos \beta_l}. \quad (7-2)$$

Die Strecke \overline{AC}_l (siehe Abbildung 7-6) ist gleich der für die Fokussierung von Vorder- auf Rückwand notwendigen Verschiebung des Schallwandlers in z -Richtung, \overline{AB} ist die Probendicke d und β_l der Brechungswinkel. Mit Hilfe des SNELL'schen Brechungsgesetzes (4-18) und der Beziehung

$$\frac{\tan \alpha}{\tan \beta_l} = \frac{\overline{AB}}{\overline{AC}_l} \quad (7-3)$$

ergibt sich aus (7-2)

$$TOF_2 = \frac{2F}{v_0} - \frac{2\overline{AC}_l}{v_0 \cos \alpha} + \frac{2\overline{AC}_l \cdot v_0}{v_1^2 \cos \alpha}. \quad (7-4)$$

Die Differenz der beiden Laufzeiten ist

$$TOF_1 - TOF_2 = \frac{2\overline{AC}_l}{v_0 \cos \alpha} - \frac{2\overline{AC}_l \cdot v_0}{v_1^2 \cos \alpha} = \frac{2\overline{AC}_l}{v_0 \cos \alpha} \left[1 - \frac{v_0^2}{v_1^2} \right] \quad (7-5)$$

und die longitudinale Schallwellengeschwindigkeit

$$v_1 = \left[\frac{v_0^2}{1 - \frac{(TOF_1 - TOF_2) \cdot v_0 \cdot \cos \alpha}{2\overline{AC}_l}} \right]^{1/2}. \quad (7-6)$$

Nach Maev et al. [62] ist die Verschiebung z_0 zur erneuten Einstellung der konfokalen Position nach Einbringen einer Probe in das Schallfeld eines Transmissionsmikroskops:

$$z_0 = d \left[1 - \frac{v_1}{v_0} + \frac{1}{2} \frac{v_1}{v_0} \left(1 - \frac{v_1^2}{v_0^2} \right) \cdot (1 - \cos \alpha) \right]. \quad (7-7)$$

Diese Verschiebung entspricht im Reflexionsbetrieb der Strecke $-\overline{BC}$. Die Probendicke d ist

$$d = \overline{AC}_l - \overline{BC}, \quad (7-8)$$

und durch Einsetzen von (7-7) in (7-8) erhält man

$$d = \frac{\overline{AC}_l}{\frac{1}{2} \frac{v_1}{v_0} \left(1 - \frac{v_1^2}{v_0^2} \right) \cdot (1 - \cos \alpha) - \frac{v_1}{v_0}}. \quad (7-9)$$

Wenn die Schallgeschwindigkeit in der Probe wesentlich größer als die des Kopplungsmediums ist, sind zusätzlich Effekte durch die komplexe Reflektanzfunktion und die sphärische Aberration (Abschnitt 4.4) zu berücksichtigen. Die von der Longitudinalwelle in das Material transportierte Energie sinkt mit zunehmendem Einfallswinkel. Dabei spielt das Verhältnis der Schallgeschwindigkeiten eine große Rolle. Bei größeren Schallgeschwindigkeiten verkleinert sich der effektive Aperturwinkel zunehmend und der wahre Fokus verschiebt sich zur paraxialen Fokusposition hin. Dies führt zu einer Unterbewertung der Schallgeschwindigkeit und einer Überbewertung der Probendicke. Zur Korrektur wurde eine iterative Prozedur auf der Grundlage von Gleichungen (4-27) und (4-36) entwickelt. Zunächst wird geprüft, ob der kritische Winkel für die Transmission der Longitudinalwelle kleiner als der Aperturwinkel ist. Für diesen Fall wird der kritische Winkel als neuer Aperturwinkel verwendet. Unter Annahme eines konstanten Transmissionskoeffizienten wird dann die Winkelabhängigkeit der transmittierten Energie bestimmt und über den "illuminierten" Querschnitt der Oberfläche integriert. Aus dem Verhältnis der integralen Energien mit und ohne Berücksichtigung der Winkelabhängigkeit lassen sich ein effektiver Aperturwinkel und die Fokusverschiebung zum paraxialen Fokus hin abschätzen. Mit der korrigierten Fokusposition und dem effektiven Aperturwinkel wird die Schallgeschwindigkeit erneut ermittelt. Die Iteration wird abgebrochen, wenn sich der abgeschätzte Aperturwinkel nicht mehr ändert.

Die Transmission der Transversalwellen verhält sich analog. Eine Besonderheit der Transversalwellenfront ist jedoch, dass sich die radial zur Schallstrahlachse gerichteten gegenüberliegenden Schwingungskomponenten in der Fokusnähe auslöschen, wodurch die verbleibenden Komponenten parallel zur Schallstrahlrichtung an der rückwärtigen Grenzfläche eine Longitudinalwelle generieren (Abbildung 7-8). Die fokussierte Transversalwelle ruft also an der rückwärtigen Grenzfläche die Reflexion einer Longitudinalwelle hervor.

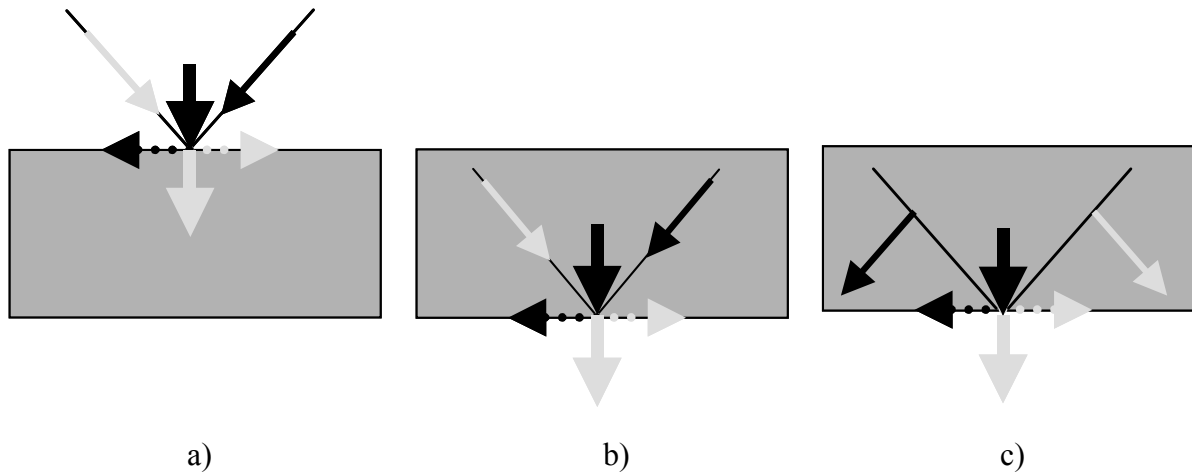


Abbildung 7-8 Bei Fokussierung auf die Vorderwand (a) heben sich alle Tangentialkomponenten auf (gekennzeichnete Linien). Das gleiche gilt für die Schwingungskomponenten der transmittierten Longitudinal- (b) und Transversalwellen (c) bei Fokussierung auf die rückwärtige Seite der Probe, wodurch die verbleibenden Normalspannungen jeweils eine Longitudinalwelle generieren.

Da die Fokusebene der Transversalwelle jedoch wesentlich tiefer als die der Longitudinalwelle liegt, ist dort die Empfangsempfindlichkeit bereits beträchtlich abgesunken. Das Maximum des Puls-Echos der Welle, welche sich auf dem Hinweg als Transversal- und auf dem Rückweg als Longitudinalwelle ausbreitet, liegt demzufolge irgendwo zwischen den Fokusebenen der Sende- (Transversalwelle) und der Empfangsapertur (Longitudinalwelle) und erreicht nach dem Echo der reinen Longitudinalwelle den Wandler (Abbildung 7-7). Die Laufzeit dieses Echos ist:

$$TOF_3 = \frac{2F}{v_0} - \frac{2\overline{AC}_s}{v_0 \cos \alpha} + \frac{\overline{AB}}{v_1 \cos \beta_s} + \frac{\overline{AB}}{v_s \cos \beta_s}, \quad (7-10)$$

und die Transversalwellengeschwindigkeit v_s :

$$v_s = \frac{d}{\left(\frac{2\overline{AC}_s}{v_0 \cdot \cos \alpha} - \frac{d}{v_l \cdot \cos \beta_s} - (TOF_1 - TOF_3) \right) \cdot \cos \beta_s}, \quad (7-11)$$

wobei \overline{AC}_s die zum Erreichen der maximalen Echoamplitude notwendige Verschiebung und β_s Brechungswinkel der Transversalwellen sind. Der Winkel β_s hängt von der Transversalwellengeschwindigkeit ab, ergibt sich aus dem Brechungsgesetz und wird wiederum iterativ ermittelt.

Prinzipiell können unter realen Messbedingungen natürlich weitere Modenkonvertierungen auftreten. Deren Echoamplituden sind jedoch verhältnismäßig klein und treten zeitlich nach den beiden oben beschriebenen auf. In anisotropen Medien hängt die Ausbreitungsge-

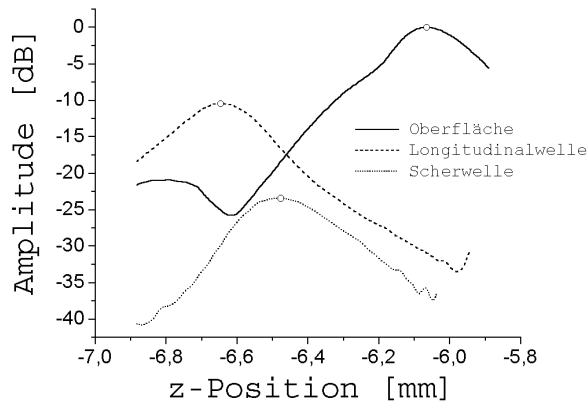
schwindigkeit der Transversalwellen außerdem von der Schwingungsrichtung ab. Falls sich erstere für die verschiedenen Richtungen nur unwesentlich unterscheiden, ist die Bestimmung einer mittleren Geschwindigkeit möglich. Anderenfalls wird durch die fehlende Überlagerung die detektierte Echoamplitude ohnehin nicht ausreichend für eine Auswertung sein.

Die Probenimpedanz erhält man schließlich nach dem in Abschnitt 7.1 beschriebenen Verfahren aus der Amplitude des Oberflächenechos im Fokus.

7.2.1 Datenerfassung und -verarbeitung

Der $A(z)$ -Scanmodus wird verwendet, um an einer Stelle Dicke, Impedanz, Schallgeschwindigkeit und Dämpfung einer dünnen Probe zu bestimmen. Die Proben werden auf Objektträgern fixiert, die mit einem 4 mm Loch versehen sind. Dies verhindert zum einen eine Wölbung der Probe und garantiert zum anderen eine definierte Grenzfläche auf der Rückseite. Zur Ankopplung wird entweder Wasser oder Luft verwendet. Wie oben beschrieben, wird nach der Auswahl der Messposition der Wandler in z -Richtung bewegt. Man beginnt an einer Position, wo der Fokus oberhalb der Probenoberfläche ist und endet, wenn der Fokus der Longitudinalwelle die zweite Grenzfläche deutlich überschritten hat. Das zu akquirierende Zeitfenster muss entsprechend groß gewählt sein, um die einzelnen Echos in jeder z -Position zu erfassen (siehe Abbildung 7-7). Zur Auswertung werden die Rohdaten zunächst mit einem Bandpass, wie in Abschnitt 7.1 beschrieben, gefiltert. Anschließend wird in der Echosequenz einer beliebigen z -Position ein Echo markiert und durch Kreuzkorrelation [58] der Einhüllenden (Betrag der HILBERT-Transformierten) benachbarter Echosequenzen der zeitliche Versatz bestimmt. Daraus ergibt sich für jede z -Position die ungefähre Laufzeit $T(z)$ und Amplitude $V(z)$ des selektierten Pulses. Zur Glättung des $V(z)$ -Verlaufes dient ein räumliches Tiefpass-Filter, wobei als Grenzfrequenz ein Zehntel der für den jeweiligen Wandler bestimmten Fokustiefe F_z gewählt wird. Auf diese Weise werden die Laufzeiten und Amplituden für Oberflächen- sowie Longitudinal- und Scherwellenechos von der rückwärtigen Seite der Proben in Abhängigkeit von der z -Position grob bestimmt (Abbildung 7-9).

Abbildung 7-9 $V(z)$ -Verläufe der zeitlich separierten Vorder- und Rückwandechos.



Zur Eliminierung der bei der Ermittlung der Fokuspositionen und Echolauftzeiten auftretenden Einflüsse durch die frequenzabhängige Dämpfung sowie der daraus resultierenden veränderten Pulsform wird ein frequenzselektives Verfahren eingesetzt. Innerhalb der halben Fokustiefe F_z werden die einzelnen Pulse mit Hilfe eines HANNING-Fensters mit der doppelten Pulslänge des Wandlers isoliert. Durch eine FOURIER-Transformation erhält man die frequenzabhängige Amplitude und Phase des einzelnen Pulses (Abbildung 7-10).

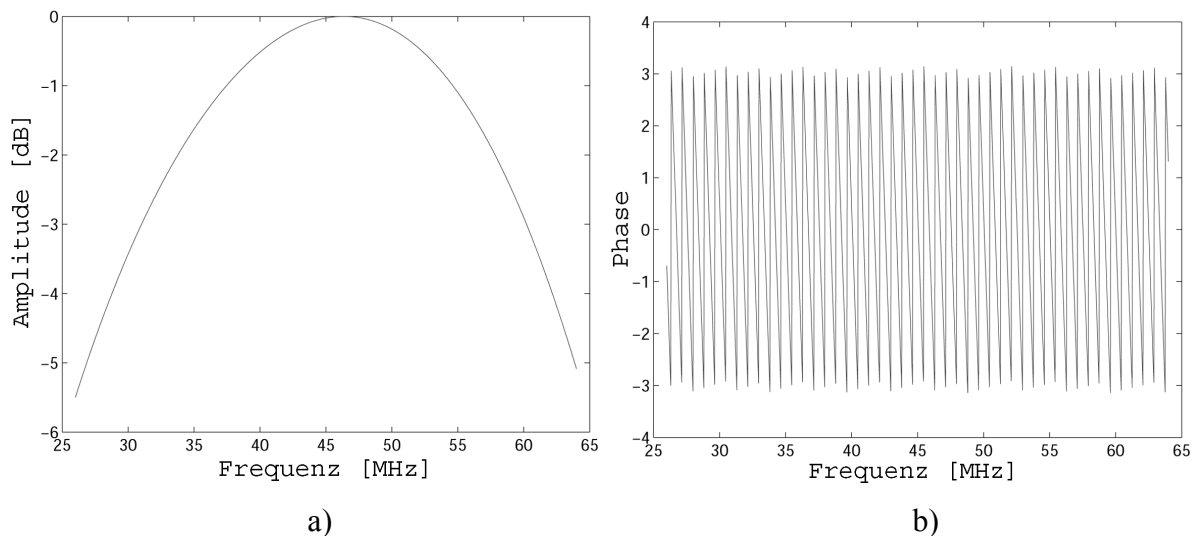


Abbildung 7-10 Amplituden- und Phasenspektrum (a und b) eines separierten Echos innerhalb der Bandbreite des Sendepulses.

Aus der Änderung der Phase ϕ mit der Kreisfrequenz ω ergibt sich die Laufzeit des Pulses t_{ph} relativ zum Startzeitpunkt t_0 der Sequenz [52]:

$$TOF = t_0 + t_{ph} = t_0 + \frac{\partial \phi}{\partial \omega} = t_0 + \frac{\partial N}{\partial f}. \quad (7-12)$$

N ist die Anzahl der Phasensprünge in Abhängigkeit von der Frequenz f . Die Messung von t_{ph} erfolgt durch lineare Regression zwischen der linearisierten Phase und der Frequenz innerhalb

der Bandbreite des Pulses. Aus der Amplitude der Spektren ergeben sich die $V(z)$ -Verläufe in Abhängigkeit von der Frequenz (Abbildung 7-11 a). Die Bestimmung der Fokusposition z_{max} wird nur für die Mittenfrequenz V_{fc} durchgeführt (Abbildung 7-11 b). Die Fokusposition ergibt sich nach Tiefpassfilterung aus der Nullstelle der Ableitung von $V_{fc}(z)$ nach z und die Laufzeit TOF_{max} durch Interpolation zwischen $TOF(z)$ und z an der Stelle z_{max} .

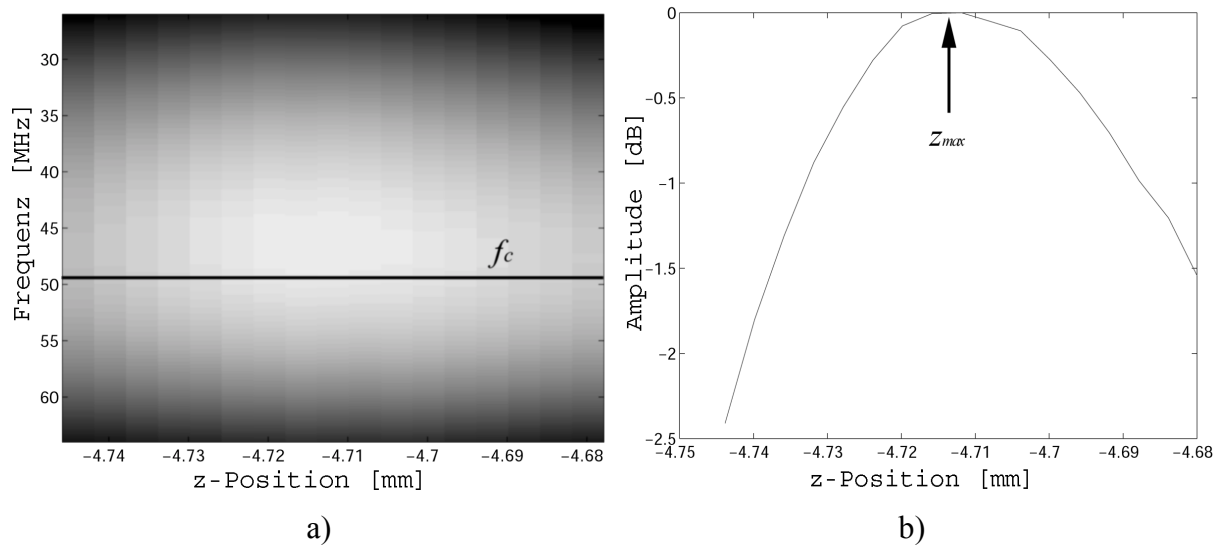


Abbildung 7-11 Frequenzabhängige $V(z)$ -Verläufe eines separierten Echos (a). Die Bestimmung der Fokusposition z_{max} wird nur für Mittenfrequenz $V_{fc}(z)$ durchgeführt (b).

Aus den ermittelten Laufzeit- und Wegdifferenzen lassen sich Schallgeschwindigkeit und Probendicke nach (7-6) und (7-9) unter Berücksichtigung der sphärischen Aberration sowie den winkelabhängigen Transmissionseigenschaften bestimmen.

7.2.2 Ergebnisse

Die Schallgeschwindigkeitsmessungen wurden mit dem 50 MHz Wandler durchgeführt, da dieser die besten Eigenschaften im Hinblick auf Auflösungsvermögen, Fokussierung und Bandbreite aufweist. Zur Verifizierung der Methode dienten Messungen an Standardmaterialien, deren longitudinale Schallwellengeschwindigkeiten sowohl kleiner als auch annähernd doppelt so groß wie die des Kopplungsmediums sind. Die separierten $V(z)$ -Verläufe der einzelnen Echos sind in Abbildung 7-12 dargestellt und sowohl die akustischen als auch die daraus abgeleiteten elastischen Größen sind in Tabelle 7-4 zusammengefasst.

Von allen Proben wurde die Probendicke mit einer Mikrometerschraube ermittelt. Die Polystyren- und Polykarbonat-Proben stammten vom gleichen Material, an denen die Bestimmung von Schallgeschwindigkeit und Dichte mit alternativen Methoden (Abschnitt 7.1) erfolgte. Die Referenz-Dichte der PTFE-Folie (Polytetrafluorethylen, Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) ist aus den Herstellerspezifikationen [2] entnommen. Aufgrund

der niedrigen Schallgeschwindigkeit und der großen Dämpfung konnte in dieser Probe keine Transversalwelle beobachtet werden.

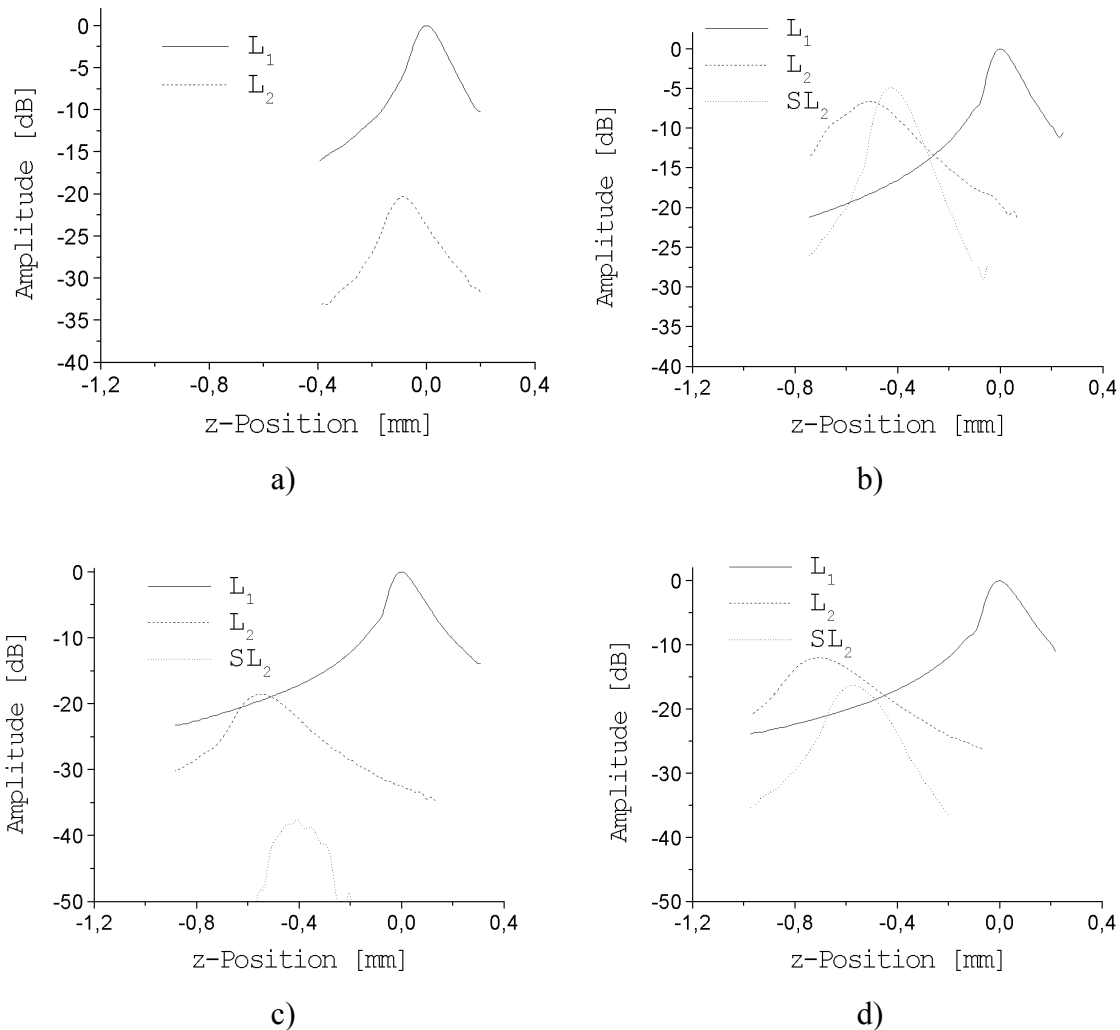


Abbildung 7-12 Separierte $V(z)$ -Verläufe der zur Validierung verwendeten Materialien: PTFE (a), Polystyren (b), Polykarbonat (c) und PMMA (d). Die Probendicken wurden jeweils auf die unterschiedlichen Schallgeschwindigkeiten und Dämpfungswerte angepasst. L_1 - Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SL_2 und L_2 - Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche. In der PTFE-Probe konnte keine Transversalwelle detektiert werden.

Da die untersuchte PMMA-Probe im Labor unter Zusatz eines Weichmachers polymerisiert wurde (siehe Kapitel 6), weichen die gemessenen Werte etwas von publizierten Werten von industriell hergestelltem PMMA ab. Zum Teil erhebliche Diskrepanzen traten zwischen publizierten Werten der Schallgeschwindigkeiten [16] und den hier gemessenen Werten auf. Die in Transmission gemessenen Longitudinalwellengeschwindigkeiten der Referenzproben (Polykarbonat und Polystyren, siehe Abschnitt 7.1) stimmen jedoch mit den an den dünnen

Proben in Reflexion ermittelten Werten überein. Auch die aus Impedanz und longitudinaler Schallgeschwindigkeit abgeleiteten Dichten sind in guter Übereinstimmung mit den Herstellerangaben bzw. den nach der Auftriebsmethode bestimmten Dichten. Für die Transversalwellengeschwindigkeiten sind im Gegensatz zu den Elastizitätsmoduln kaum Werte publiziert. Aus dem Umstand, dass die abgeleiteten Moduln in den für die Materialien typischen Bereichen lagen, lässt sich auch auf die Korrektheit der ermittelten Transversalwellengeschwindigkeiten schliessen.

Tabelle 7-4 *Akustische und abgeleitete mechanische Materialkenngrößen der Referenzmaterialien (Mittelwert und Standardabweichung). Die separat ermittelten Proben-dicken, -dichten und Schallgeschwindigkeiten¹, sowie Hersteller²- bzw. Tabellenangaben³ [3,16] sind, soweit verfügbar, jeweils kursiv dargestellt. Für jede Probe wurden 20 Messungen an verschiedenen Stellen durchgeführt.*

Material	PTFE	Polystyren	Polykarbonat	PMMA
Dicke d [μm]	$96,05 \pm 1,08$ <i>[98,2 \pm 4,3]¹</i>	$337,3 \pm 1,9$ <i>[338,4 \pm 5,2]¹</i>	$352,1 \pm 1,5$ <i>[349,2 \pm 3,9]¹</i>	$392,2 \pm 2,2$ <i>[387,8 \pm 4,8]¹</i>
Impedanz Z [Mrayl]	$2,94 \pm 0,02$	$2,40 \pm 0,02$	$2,81 \pm 0,05$	$3,17 \pm 0,01$
v_l [m/s]	$1383,5 \pm 15,6$ <i>[1390]³</i>	$2266,2 \pm 12,2$ <i>[2250]¹</i>	$2319,0 \pm 7,2$ <i>[2310]¹</i>	$2684,5 \pm 6,2$ <i>[2700]³</i>
v_s [m/s]	- <i>[700]³</i>	$913,6 \pm 3,8$ <i>[1150]³</i>	$852,4 \pm 7,1$	$1036,9 \pm 6,0$ <i>[1320]³</i>
Dichte ρ [kg/m^3]	$2129,2 \pm 13,9$ <i>[2140 – 2200]²</i>	$1060,0 \pm 9,94$ <i>[1050]¹</i>	$1210,8 \pm 20,1$ <i>[1200]¹</i>	$1179,4 \pm 4,4$ <i>[1185-1190]³</i>
c_{11} [GPa]	$4,07 \pm 0,07$	$5,44 \pm 0,06$	$6,51 \pm 0,12$	$8,50 \pm 0,05$
c_{44} [GPa]	-	$0,88 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,01$
E-Modul [GPa]	- <i>[0,3 - 0,8]²</i>	$2,48 \pm 0,02$ <i>[1,9 - 3,2]²</i>	$2,50 \pm 0,06$ <i>[1,9 - 2,4]²</i>	$3,58 \pm 0,03$ <i>[2,9 - 3,4]²</i>
Poisson-Zahl σ	-	$0,403 \pm 0,001$	$0,422 \pm 0,001$	$0,412 \pm 0,001$

Die Standardabweichungen wurden zur Abschätzung der Messunsicherheiten der Methode herangezogen (Tabelle 7-4).

Parameter	Messunsicherheit
Dicke d [μm]	0,66 %
Impedanz Z [Mrayl]	0,90 %
v_l [m/s]	0,55 %
v_s [m/s]	0,61 %
Dichte ρ [kg/m^3]	0,91 %
c_{11} [GPa]	0,8 %
c_{44} [GPa]	2,2 %
E-Modul [GPa]	3,0 %

Tabelle 7-5 *Messunsicherheiten der einzelnen akustischen und der abgeleiteten mechanischen Parameter.*

Zur Anwendung der Methode an kortikalem Knochen wurden Dünnschnitte mit einer Dicke von 200 bis 300 μm angefertigt. Ausgewählt wurden zwei Proben mit einer Orientierung der Oberflächennormalen von 0° und eine Probe mit einer Orientierung 90° relativ zur Knochenlängsachse. An jeder Probe wurden mindestens 30 Messungen an unterschiedlichen Stellen durchgeführt. Bei der Selektion der Messpunkte wurde darauf geachtet, dass der Abstand zu umliegenden Strukturgrenzen möglichst groß ist, um Effekte durch heterogene Ausbreitungseigenschaften während der Defokussierung zu vermeiden. (Abbildung 7-13).

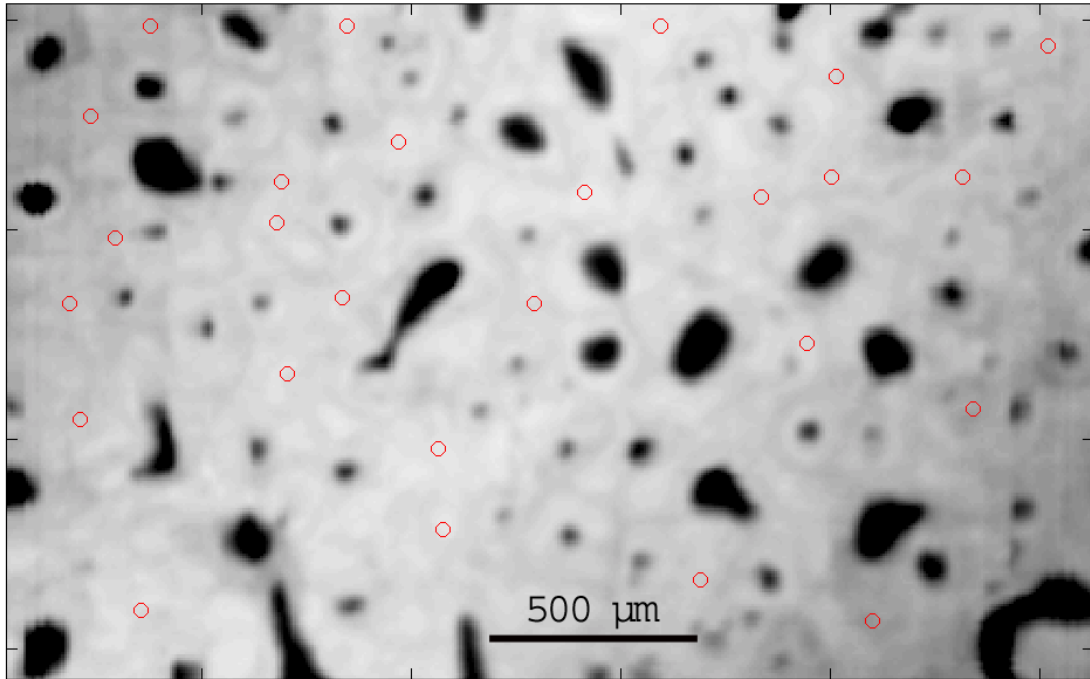


Abbildung 7-13 Beispiel für die Selektion von Messpunkten zur Bestimmung der elastischen Kenngrößen an kortikalem Knochen.

Ein Beispiel einer Messung ist in Abbildung 7-14 zu sehen. Die Reflexion der Longitudinalwelle von der unteren Probenseite ist gut zu detektieren, während das Echo der Transversalwelle sehr klein ist. In einigen Fällen ist die Auswertung des letztgenannten überhaupt nicht möglich. Der zeitliche Abstand der Pulse ist für eine stabile Separation gerade ausreichend. Eine Verringerung der Probendicke zur Erhöhung der Signalamplituden von der rückwärtigen Seite ist daher nicht sinnvoll, da dies zu Messartefakten durch eine zeitliche Überlappung der Signale führen könnte. Es ist weiterhin zu erwähnen, dass in keiner der bisher durchgeführten Messungen an Knochen messbare Anzeichen von Oberflächenwellen zu sehen waren.

Die relativen Standardabweichungen der gemessenen Parameter lagen bei 5,2 % für die Probendicke, 8,1 % für die Impedanz ($7,49 \pm 0,60 \text{ Mrayl}$) und 6,0 % für die Longitudinalwellengeschwindigkeit ($3519 \pm 210 \text{ m/s}$). Die daraus abgeleitete Dichte variierte um 13,1 % ($2141 \pm 281 \text{ kg/m}^3$) und der Festigkeitskoeffizient c_{11} um 7,7 % ($26,3 \pm 2,0 \text{ GPa}$). Bei der Angabe des Parameters c_{11} ist im Gegensatz zu der häufig in der Literatur verwendeten Indizierung von Knochengewebe immer die Richtung der Schallstrahlachse gemeint. Die Bestimmung der Transversalwellengeschwindigkeit war nur in 63 von insgesamt 96 Messungen möglich. Die Standardabweichung lag bei 8,8 % ($1197 \pm 106 \text{ m/s}$). Die abgeleiteten Elastizitätsmoduln lagen in der Größenordnung von 6,1 bis 12,4 GPa ($8,5 \pm 1,4 \text{ GPa}$), die Kompress-

sionsmoduln zwischen 18,2 und 26,4 GPa ($22,1 \pm 1,8$ GPa) und die Schermoduln zwischen 2,1 und 4,4 GPa ($3,0 \pm 0,5$ GPa). Die Poisson-Zahlen variierten zwischen 0,409 und 0,453 ($0,435 \pm 0,010$).

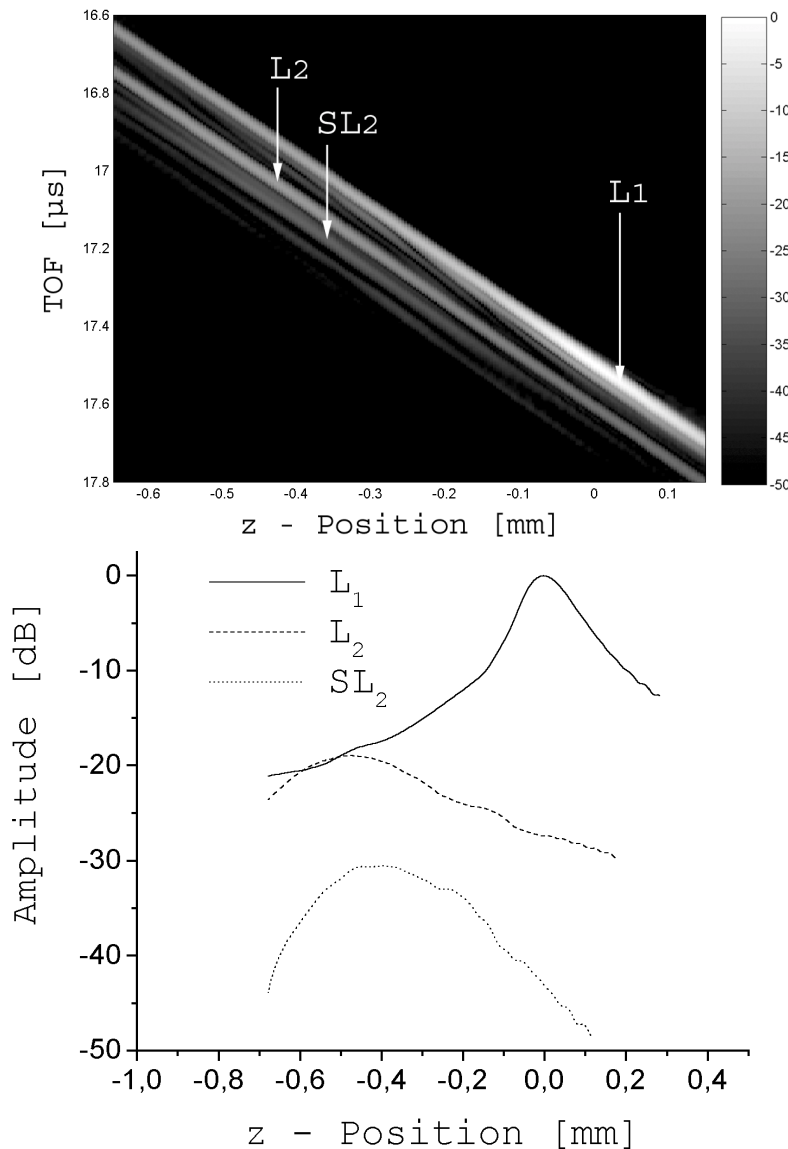


Abbildung 7-14 $V(z,t)$ – Bild (oben) und separierte $V(z)$ -Verläufe (unten) einer Messung an einer dünnen Knochenprobe. L_1 - Reflexion der Longitudinalwelle an der oberen Grenzfläche, SL_2 und L_2 - Reflexionen der Transversal- und Longitudinalwellen an der unteren Grenzfläche.

Zwischen den einzelnen Probenorientierungen waren die Unterschiede der einzelnen Parameter mit Ausnahme von Impedanz, Kompressionsmodul und Poisson-Zahl signifikant. Da die Schnitte von unterschiedlichen Knochenproben stammten, konnten daraus aber keine Aussagen über die Anisotropie gemacht werden. Unabhängig von der Probe und der Orientie-

ung ergab sich eine direkte lineare Proportionalität zwischen der akustischen Impedanz Z und der mechanischen Dichte ρ ($R = 0,857$, $p < 0,0001$) sowie der mechanischen Festigkeit c_{11} ($R = 0,767$, $p < 0,0001$) (Abbildung 7-15).

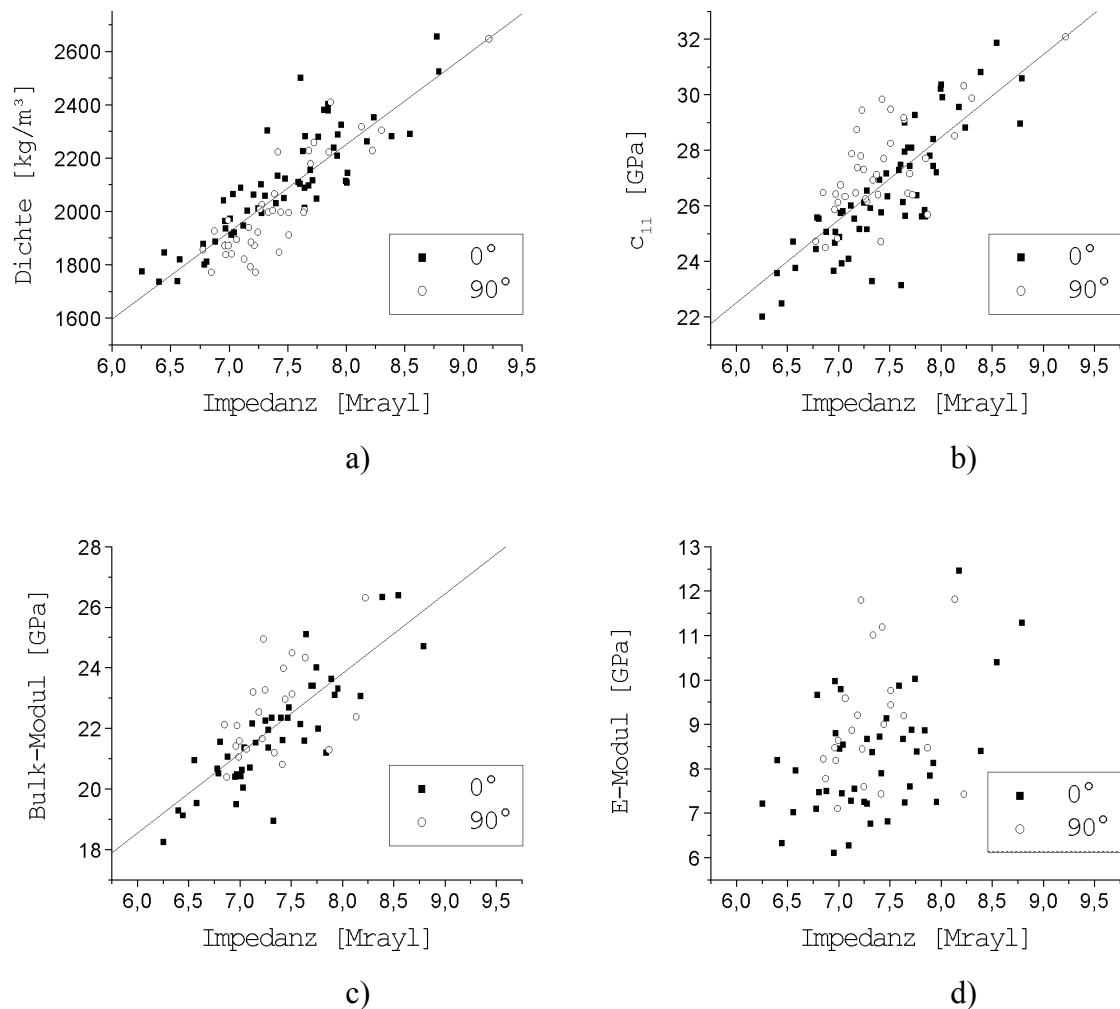


Abbildung 7-15 Beziehungen zwischen der akustischen Impedanz und den mechanischen Kenngrößen im kortikalen Knochen.

Von den abgeleiteten technischen Moduln war nur der Kompressionsmodul korreliert ($R = 0,759$, $p < 0,0001$). Eine Impedanzerhöhung war zwar mit einer Vergrößerung des E-Moduls verbunden, eine signifikante Korrelation war jedoch nicht vorhanden. Auch die Korrelationen zum Schermodul, der Poisson-Zahl und den Schallgeschwindigkeiten waren nicht signifikant. Die wichtigsten Beziehungen sind in Abbildung 7-15 dargestellt.

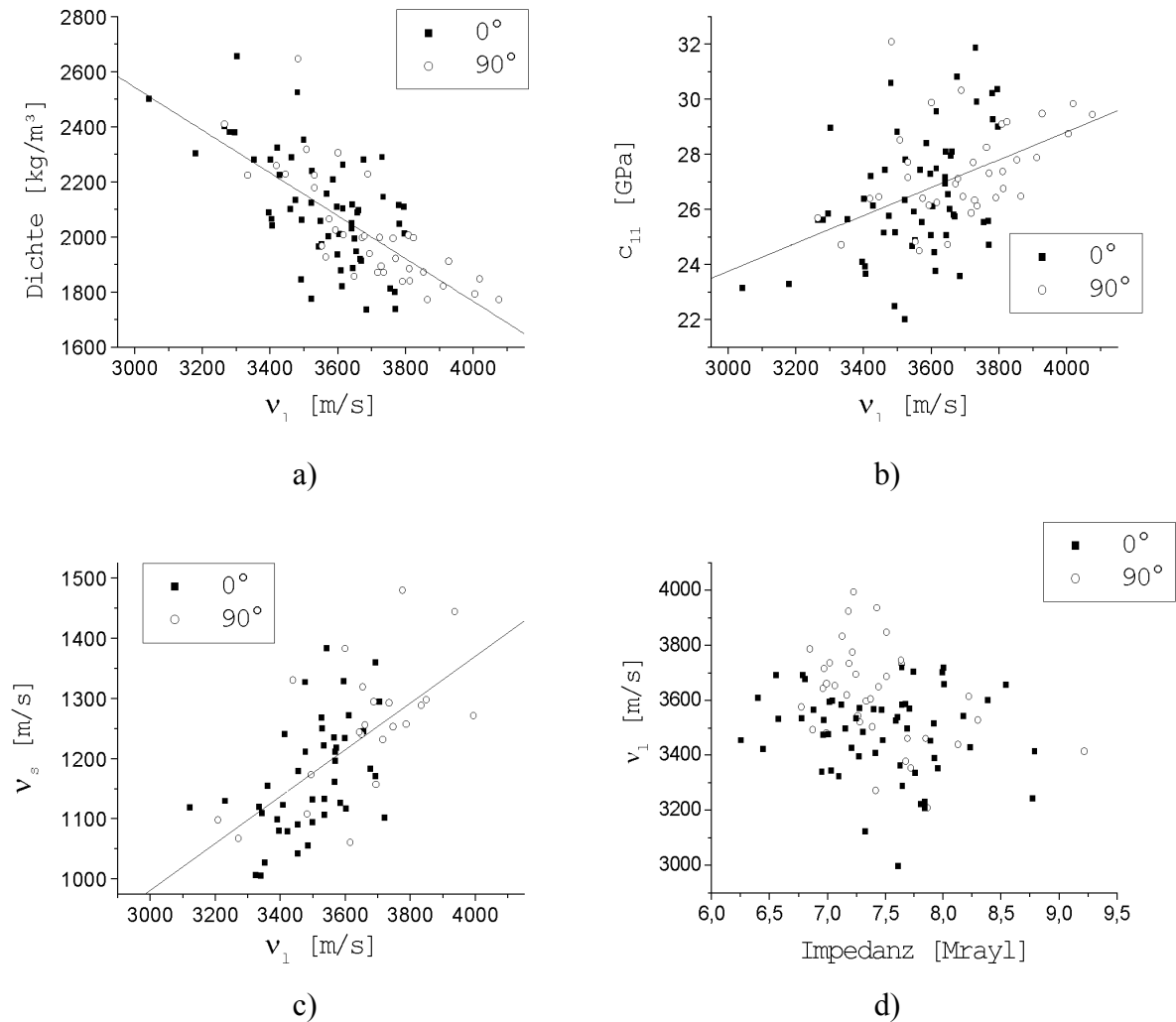


Abbildung 7-16 Beziehungen der Longitudinalwellengeschwindigkeit zu Dichte (a), mechanischer Festigkeit (b) und Transversalwellengeschwindigkeit (c). Die elastischen Moduln und die Impedanz (d) waren mit v_l nicht korreliert.

Abbildung 7-16 zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Longitudinalwellengeschwindigkeit. Eine Erhöhung von v_l ist mit einer Verminderung der Dichte verbunden ($R = -0,697$, $p < 0,0001$), während die mechanische Festigkeit steigt ($R = 0,445$, $p < 0,0001$). Der Korrelationskoeffizient zwischen Schallgeschwindigkeit und Festigkeit ist jedoch deutlich geringer als der zwischen akustischer Impedanz und Festigkeit. Während zwischen Longitudinal- und Transversalwellengeschwindigkeit eine positive Korrelation besteht ($R = 0,623$, $p < 0,0001$), gab es zur akustischen Impedanz und den anderen elastischen Größen keine signifikanten Zusammenhänge.

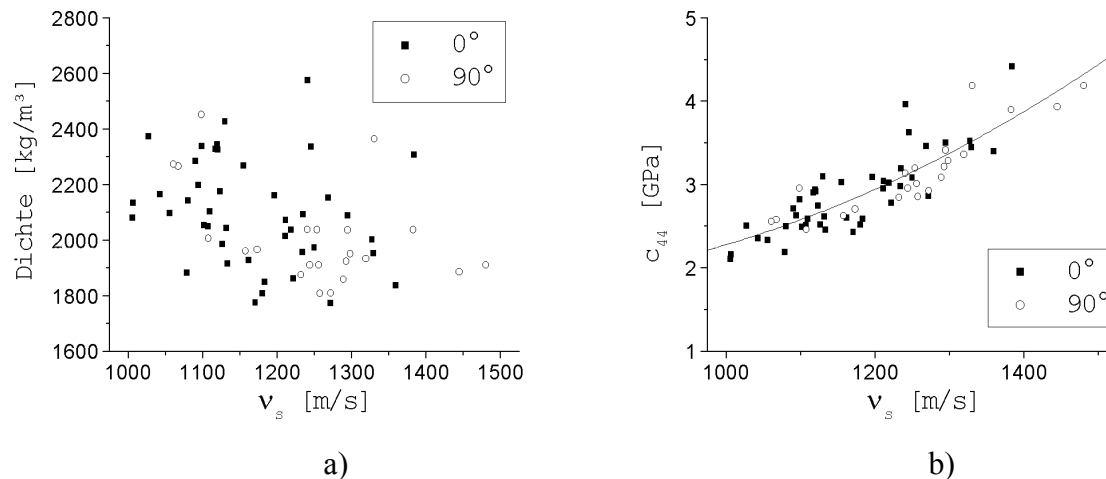


Abbildung 7-17 Beziehungen der Transversalwellengeschwindigkeit zur Dichte (a) und dem Schermodul (b).

Die ermittelten Transversalwellengeschwindigkeiten v_s können als unabhängig von der Dichte angesehen werden (Abbildung 7-17). Es besteht jedoch eine quadratische Abhängigkeit zum Elastizitätskoeffizienten c_{44} (hier wie im isotropen Fall bezeichnet). Die Regression zweiter Ordnung ergab einen Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,7458$, $p < 0,0001$. Eine Folge ist, dass die Poisson-Zahl nicht konstant ist. Diese ist mit der Transversalwellengeschwindigkeit korreliert ($R = -0,840$, $p < 0,0001$) und hat daher auch einen großen Einfluss auf den Schermodul ($R = -0,892$, $p < 0,0001$) und den Elastizitätsmodul ($R = -0,882$, $p < 0,0001$), während der Einfluss auf den Kompressionsmodul nicht signifikant ist ($R = 0,220$, $p = 0,078$) (Abbildung 7-18).

Ein Vergleich der Abhängigkeit zwischen Dichte und Festigkeit sowie dem E-Modul in Abbildung 7-19 zeigt zwar einen linearen Trend, beide Größen sind jedoch nicht signifikant korreliert ($c_{11}(\rho)$: $R = 0,338$, $p = 0,0013$; $E(\rho)$: $R = 0,161$, $p = 0,2004$).

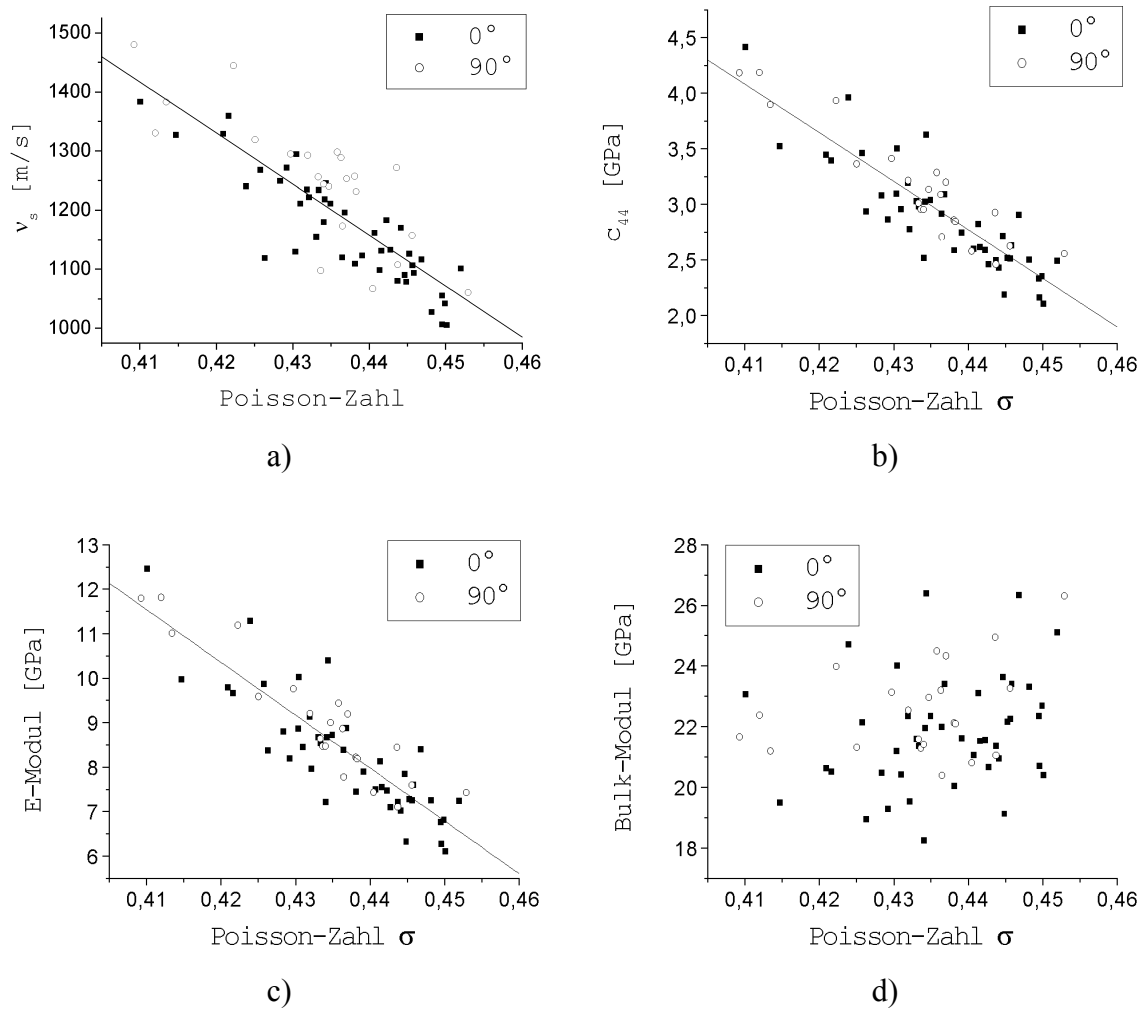


Abbildung 7-18 Abhängigkeit der Transversalwellengeschwindigkeit (a) und der elastischen Moduln (b-d) von der Poisson-Zahl.

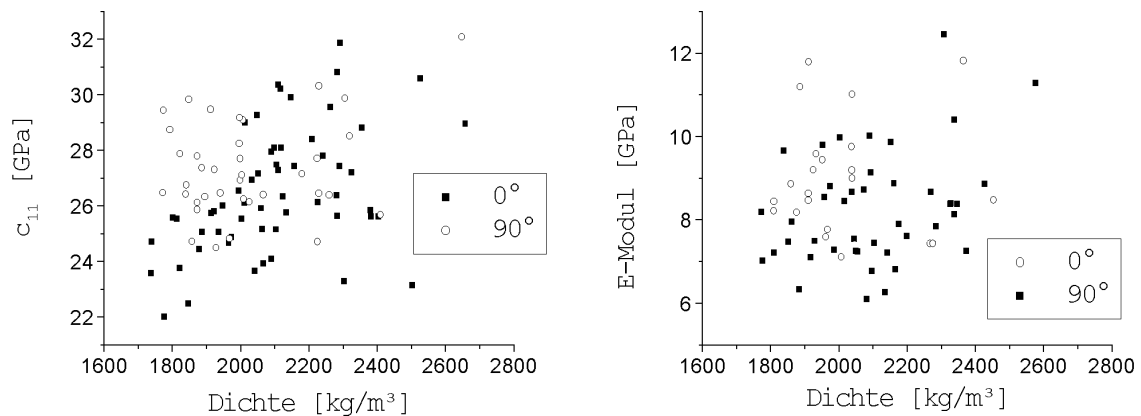


Abbildung 7-19 Die Dichte ist positiv, jedoch nicht signifikant mit der Festigkeit c_{11} und dem Elastizitätsmodul korreliert.

7.3 Diskussion der Ergebnisse

Mit der gleichzeitigen Bestimmung von akustischer Impedanz, longitudinalen und transversalen Wellengeschwindigkeiten sowie der Probendicke ist eine ortsaufgelöste Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochen möglich. Obwohl die exemplarische Auswahl der Knochenproben eine umfassende Auswertung noch nicht zulässt, lassen sich aus den Ergebnissen die folgenden grundsätzlichen Erkenntnisse ableiten.

1. In den Knochenproben war eine Schwankung der Probendicke von über 5 % zu verzeichnen. Der Grund liegt in den unterschiedlichen Möglichkeiten der heterogenen Proben, den bei der mechanischen Präparation wirkenden Kräften auszuweichen. Eine alternative Bestimmung einer mittleren Probendicke mit Hilfe einer Mikrometerschraube ist daher mit einer großen Messunsicherheit verbunden.
2. Die Variation der Knochendichte von annähernd 10 % innerhalb eines Knochens ist ein fundamentales Merkmal der heterogenen Mikrostruktur. Es ist allgemein anerkannt, dass die Mineralisierung des Knochens ein bedeutender Faktor zur Einstellung seiner elastischen Eigenschaften ist. Dies ist die Grundlage aller momentan klinisch eingesetzten makroskopischen Untersuchungsverfahren. Die große Varianz zeigt, dass die Dichte in der mikroskopischen Knochenstruktur eine noch bedeutendere Rolle spielt. Eine üblicherweise angewandte Methode, die mikroskopisch ermittelten Laufzeitunterschiede unter Annahme ebener Wellenausbreitung mit Hilfe von makroskopisch ermittelter Probendicke und –dichte in Schallgeschwindigkeit und Festigkeit umzurechnen [17,101-104], erscheint aus diesen Gründen nicht ausreichend, um die elastischen Eigenschaften der Knochenmatrix zu untersuchen.
3. Da auch alle anderen elastischen Größen variieren, ist deren Erfassung für eine zuverlässige Ableitung der technischen Moduln notwendig. Insbesondere ist es bedenklich, eine makroskopisch ermittelte Poisson-Zahl zur Bestimmung des E-Moduls der Mikrostruktur zu verwenden.
4. Der Vergleich der Korrelationskoeffizienten zeigt, dass die Dichte zwar einen wesentlichen Einfluss auf die akustischen Messgrößen hat, jedoch nicht allein für die elastischen Materialeigenschaften verantwortlich ist. Weder zum Elastizitätskoeffizienten c_{11} noch zu den abgeleiteten Moduln war die Dichte signifikant korreliert.
5. Viel Anlass für Spekulationen gibt die Frage, inwieweit die mikroskopisch ermittelten akustischen Größen mit dem elastischen Koeffizienten c_{11} oder dem Elastizitätsmodul verknüpft sind. Die Ergebnisse zeigen, dass eine gute Korrelation zwischen der akustischen Impedanz und c_{11} besteht. Die Korrelation der longitudinalen Schallgeschwin-

digkeit mit c_{11} ist zwar auch signifikant, jedoch weitaus schlechter. Aus keiner akustischen Größe allein lässt sich der E-Modul ableiten. Dies ist eigentlich auch nicht verwunderlich, da dieser sowohl von den Kompressions- als auch von den Schereigenschaften bestimmt wird. Die akustische Impedanz (in der hier definierten Form) und die longitudinale Wellengeschwindigkeit werden jedoch maßgeblich von den Kompressionseigenschaften bestimmt, was sich in der Korrelation zwischen Impedanz und Kompressionsmodul manifestiert. Eine Korrelation zum E-Modul würde voraussetzen, dass sich das Poisson-Verhältnis nicht ändert. Diese Annahme ist aber aufgrund der heterogenen Eigenschaften der Mikrostruktur recht unwahrscheinlich und wird durch die gezeigten Ergebnisse widerlegt.

6. Eine wichtige Frage ist, ob die Ableitung der Elastizitätsmoduln unter der Annahme von Isotropie zulässig ist. Im makroskopischen Bereich ist femuraler kompakter Knochen durch eine orthotrope Anisotropie gekennzeichnet [81,105,111]. Auch die mikroskopische Aufbaueinheit, die mineralisierte Kollagenfaser, ist orthotrop. In den von ihnen geformten Osteonenlamellen herrscht zwar ebenfalls eine hohe Ordnungsstruktur, diese erlaubt jedoch innerhalb eines Osteons das Auftreten von jeder möglichen Faserorientierung [111]. Bei den hier vorgestellten Messungen haben die vom Schallfeld durchsetzten Volumina die Form sich nach oben öffnender stumpfer Kreiskegel. Unter Berücksichtigung der effektiven Apertur ist bei der Fokussierung auf die rückwärtige Probenseite der effektive Kegelradius an der Oberfläche in der Größenordnung von mindestens 100 μm . Man kann deshalb davon ausgehen, dass die Orientierung der mineralisierten Kollagenfasern in einem solchen Messvolumen nicht uniform ist und sich die anisotrope Struktur der einzelnen Fasern nicht unbedingt widerspiegelt. Die Annahme der Isotropie erscheint daher eine nicht unrealistische Approximation zu sein. Dies muss allerdings durch weitere Untersuchungen fundiert werden.

Makroskopisch ermittelte elastische Größen wurden häufig mit dem mikroskopisch leicht zugänglichen Reflexionskoeffizienten korreliert, um daraus wiederum die mikroskopischen elastischen Größen abzuleiten [66,94,114]. Ein Vergleich der von Meunier et al. [66] vorgeschlagenen empirischen Korrelation zwischen Reflexions- und Elastizitätskoeffizient c_{11} (dort als c_{33} bezeichnet, da in Richtung der Knochenlängsachse gemessen wurde) konnte mit den hier vorgestellten Daten nicht bestätigt werden, wenngleich eine gewisse Ähnlichkeit besteht (Abbildung 7-20). Die in dieser Studie gemessenen Reflexionskoeffizienten sind prinzipiell größer. Da die von Meunier et al. bestimmten Reflexionskoeffizienten bei einer

Frequenz von 20 MHz gemessen wurden, führte mit großer Wahrscheinlichkeit der in Abschnitt 7.1 demonstrierte Effekt der räumlichen Tiefpassfilterung zu einer Unterbewertung. Abgesehen davon erscheint das Vorgehen bedenklich, die innerhalb der Knochenmatrix bestimmten mikroskopischen akustischen Messgrößen mit makroskopischen elastischen Größen zu vergleichen, da letztere maßgeblich durch die große Anzahl stark orientierter Kavitäten (HAVERS-Kanäle) beeinflusst werden.

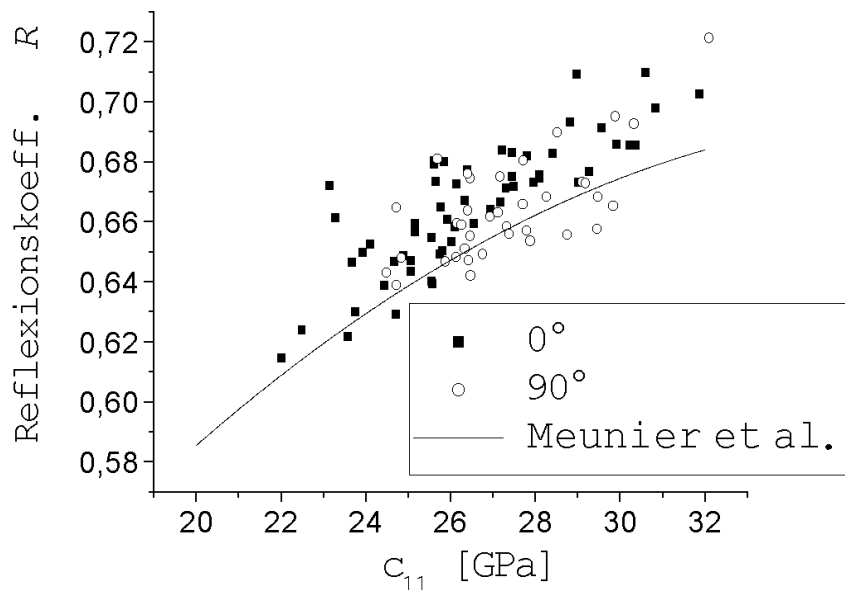


Abbildung 7-20 Vergleich der empirischen Korrelation von Meunier et al. [66] mit den eigenen Ergebnissen.

Beim Vergleich der hier vorgestellten technischen Moduln mit publizierten Werten muss zunächst wieder betont werden, dass es momentan kein vergleichbares Verfahren gibt, welches ohne zusätzliche, makroskopisch ermittelte Parameter auskommt. In einer von Turner et al. [104] durchgeführten Untersuchung wurde der E-Modul sowohl mit akustischer Mikroskopie als auch mit Nanoindentation ermittelt. Die akustisch bestimmten Moduln von jeweils 3 Messungen lagen zwischen $14,91 \pm 0,22$ GPa in lateraler Richtung (90°-Orientierung zur Knochenlängsachse) und $20,55 \pm 1,12$ GPa in longitudinaler Richtung (0°-Orientierung). Dabei wurden Dichte und Probendicke makroskopisch erfasst und Poisson-Zahlen im Bereich von 0,222 bis 0,422 aus einer 1984 veröffentlichten Studie von Ashman et al. [10] verwendet. Um aus den Nanoindenter-Messungen einen YOUNG-Modul abzuleiten, wurde eine mittlere Poisson-Zahl von 0,3 angenommen. Die so bestimmten Moduln lagen etwas höher ($16,58 \pm 0,32$ GPa in lateraler und $23,45 \pm 0,21$ GPa in longitudinaler Richtung). Andere mit dem Verfahren der Nanoindentation gemessenen Werte in kortikalem Knochen lagen

im Bereich von 15 bis 27 GPa [48,82-86,104,117]. Ein direkter Vergleich dieser Werte mit den hier vorgestellten Moduln ist jedoch nicht möglich. Zum einen wurden die Messungen mit dem Nanoindenter in sehr kleinen Volumina ($< 1 \mu\text{m}^2$) und oberflächennah (einige 100 nm), in der Regel in den dicken und stärker mineralisierten Osteonenlamellen durchgeführt. Diese Messvolumen sind daher eher mit der in Kapitel 8 vorgestellten Methode der Impedanzbestimmung bei einer Frequenz von 900 MHz und einer entsprechenden Ortsauflösung von weniger als $2 \mu\text{m}$ vergleichbar. Zum anderen ist die Gültigkeit der für die Ableitung des E-Moduls gemachten Annahmen von Isotropie und fester Poisson-Zahl nach wie vor nicht geklärt [45,84].

Mit der hier vorgestellten Methode konnte gezeigt werden, dass im mesoskopischen Bereich sowohl der elastische Koeffizient c_{11} sehr gut als auch Dichte und Kompressionsmodul gut mit der akustischen Impedanz korrelieren. Letztere ist auch die mit dem besten Ortsauflösungsvermögen und am einfachsten flächenhaft zu erfassende akustische Messgröße. Zweidimensionale Impedanzmessungen mit hochauflösenden Wandlern sind daher sicherlich für eine Vielzahl von Fragestellungen zur Charakterisierung der elasto-mechanischen Mikrostruktur von Knochengewebe ausreichend.

Zur Klärung grundsätzlicher Zusammenhänge zwischen akustischen und elastischen Parametern liefert das Verfahren der gleichzeitigen Bestimmung von Impedanz, Longitudinal- und Transversalwellengeschwindigkeiten die notwendigen Informationen. Die Anwendung an einer größeren Anzahl von verschiedenen Knochenproben wird zeigen, ob sich die gefundenen Beziehungen zwischen Impedanz und den elastischen Größen sowie der Dichte verallgemeinern lassen. Für diesen Fall wäre es möglich, mit speziellen, an das Gewebe angepassten Kalibrierungen zweidimensionale Abbilder von Mikrodichte, Festigkeit oder dem Kompressionsmodul zu erstellen.

8 V(z)-BASIERTE METHODEN

Mit dem in Abschnitt 5.2 beschriebenen Mikroskop SAM2000 sind Messungen in einem Frequenzbereich von 100 MHz bis zu 2 GHz möglich. Für eine Interpretation der mittels Amplitudendetektion erfassten C-Scan-Bilder ist eine eindeutige Zuordnung der Herkunft des Signals notwendig. Anhand eines einzelnen Bildes lässt sich z.B. nicht nachvollziehen, in welcher Entfernung und Orientierung relativ zur Fokusebene des Wandlers sich die reflektierende Grenzschicht befindet. Bei akustischen Linsen mit moderaten Frequenzen (bis etwa 200 MHz) und entsprechend großen Fokuszonen sowie sehr gut präparierten, planen Proben kann man durch sorgfältige Positionierung erreichen, dass sich die gesamte zu untersuchende Probenoberfläche im Fokus der Linse befindet. Hochfrequenzlinsen haben jedoch sehr kleine Fokuszonen (z.B. 7 μm bei 900 MHz), wodurch Oberflächenrauigkeiten bzw. eine leichte Neigung der Probe relativ zur Scanebene zu einer erheblichen Beeinflussung der Signalintensität aufgrund der Schallfeldeigenschaften führen. Oft ist es überhaupt nicht möglich, einen Scanbereich einheitlich zu "illuminieren". Andererseits ist eine quantitative Zuordnung materialbeschreibender Kenngrößen, wie z.B. der akustischen Impedanz, nur im Fokus und bei senkrechtem Einfall möglich, da unter diesen Bedingungen die komplexe Reflektanzfunktion durch den Reflexionskoeffizienten ersetzt werden kann. Aus diesen Gründen wurde die sogenannte Schichtbildanalyse (*Multi Layer Analysis, MLA*, Raum et al. [74-78]) entwickelt (Abbildung 8-1).

Bei der Erfassung der C-Scan-Bilder beginnt man mit deutlich positiver Defokussierung aller Bildpunkte (Fokus des Wandlers befindet sich oberhalb der Probenoberfläche, und das Messsignal hat im gesamten Scanbereich eine deutlich verminderte Signalamplitude). In z -Abständen, die etwa einem Zehntel der Fokustiefe entsprechen, werden solange Bilder aufgenommen, bis an jedem Bildpunkt eine deutlich negative Defokussierung auftritt. Dadurch wird sichergestellt, dass sich jeder Objektpunkt einmal im oder Nahe am Fokus der Linse befindet. Die Erfassung des Datensatzes geschieht mit Hilfe der ELIPS-Software (siehe Abschnitt 5.2.3) automatisch. Das Videosignal wird mit einer Speichertiefe von 12 bit digitalisiert und der selektierte Eingangsspannungsbereich in ein 8 bit Grauwertbild umgewandelt. Sowohl der z -Abstand zwischen den einzelnen Bildern wie auch der gesamte zu scannende Bereich sind vom Benutzer frei wählbar. Die Speicherung der einzelnen Bilder inklusive der eingestellten Hardwareparameter erfolgt in einem eigenem Binärdatenformat, welches sowohl die Rohdaten als auch sämtliche Informationen über die variablen Hardwareeinstellungen enthält.

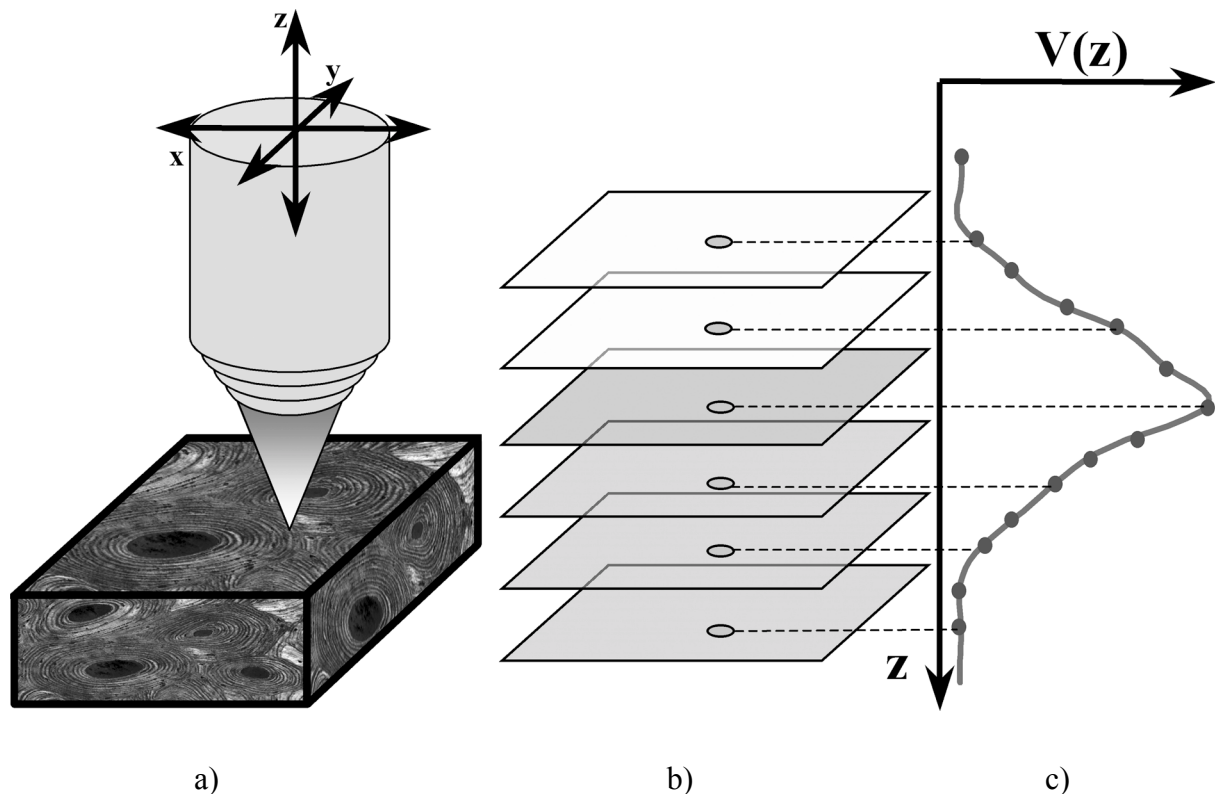


Abbildung 8-1 Durch eine Linse wird ein fokussierter Schallstrahl in der xy -Ebene über die Probe gescannt (a). Für die Schichtbildanalyse werden C-Scan-Bilder mit abnehmendem Objekt-Linsen-Abstand gespeichert (b). Durch anschließende Signalauswertung kann in jedem Bildpunkt aus dem $V(z)$ -Verlauf auf Position und Betrag der Signalamplitude geschlossen werden (c).

8.1 Datenauswertung

Für die Auswertung der mit dem SAM2000 erfassten Daten wurde die auf Matlab[®] basierende *Multi Layer Analysis*-Software (*MLA*) entwickelt. Neben der Darstellung der Rohbilder erlaubt die Software ein-, zwei und dreidimensionale Darstellungen von aus dem Datensatz erzeugten Parameterbildern sowie eine quantitative Impedanzauswertung. Letztere berücksichtigt sowohl Schallfeld- und Scanparameter als auch die aus der Messung gewonnene Oberflächenstruktur der Probe, um unerwünschte Signaleinflüsse entweder zu kompensieren oder auszuschließen. Alle im Folgenden vorgestellten Untersuchungen (mit Ausnahme einiger in Abschnitt 8.2.1 demonstrierten Artefakte) wurden bei einer Frequenz von 900 MHz mit einem KSI-Wandler (0,8-1,3 GHz, 100° Öffnungswinkel, KSI, Herborn, Deutschland) durchgeführt.

Das Verfahren wird am Beispiel einer geätzten Rasterplatte demonstriert [78]. Die Platte hat ein Rastermaß von $10\ \mu\text{m}$ sowie eine Stegbreite von $2\ \mu\text{m}$ (Abbildung 8-4). Der Höhenunterschied zwischen den Plateaus und den Tälern beträgt ca. $0,3\ \mu\text{m}$.

Zunächst wird der dreidimensionale Datensatz in z -Richtung interpoliert. Durch die Verwendung eines Anti-Aliasing FIR-Tiefpassfilters erreicht man, dass keine räumlichen Frequenzanteile entstehen, die größer als die der ursprünglichen Abtastfrequenz in z -Richtung sind. Die Schrittweite der Interpolation wird so gewählt, dass sie mindestens eine Größenordnung kleiner als die verwendete Wellenlänge ist.

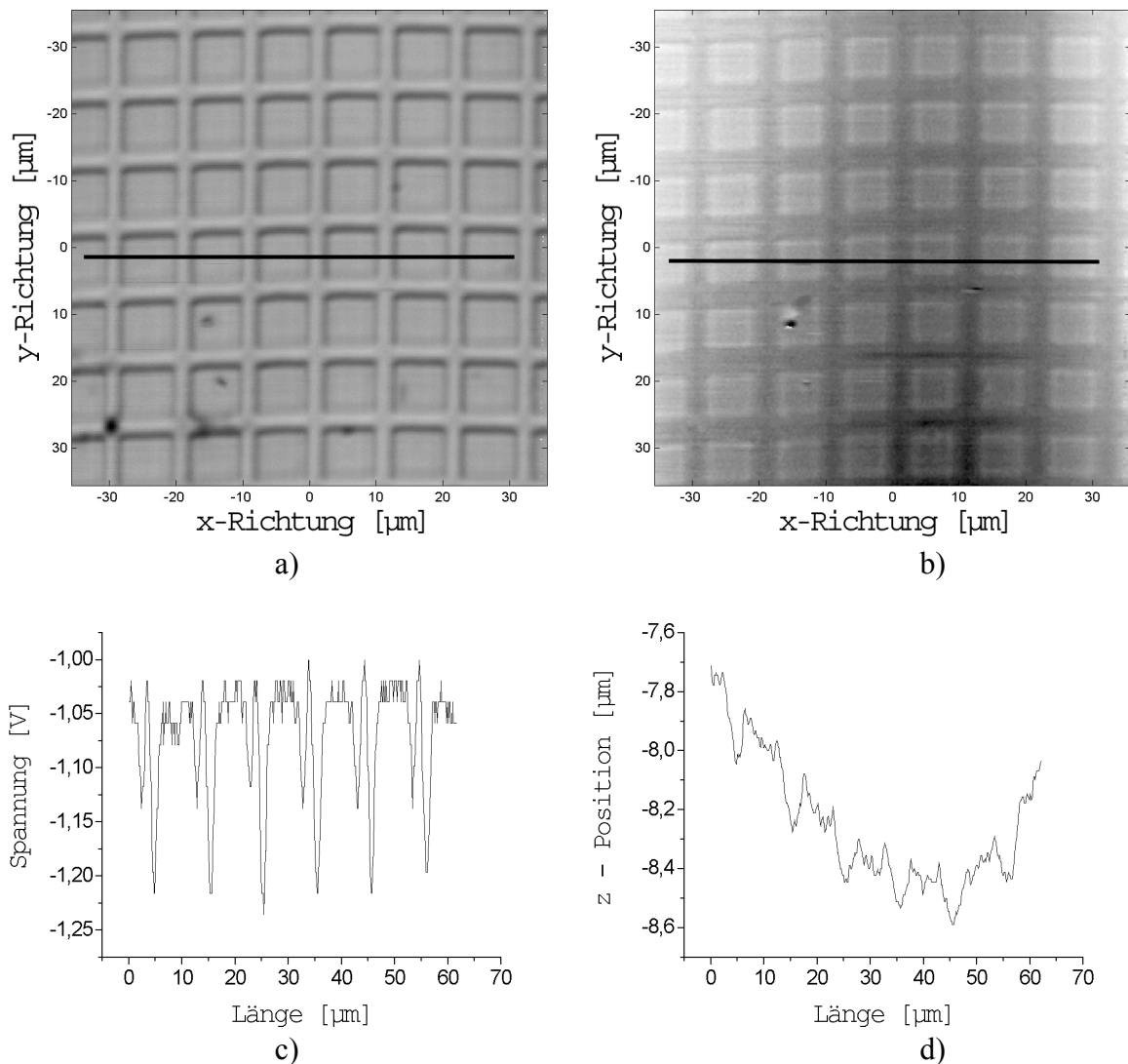


Abbildung 8-2 Maximalwertverteilung (a) und Topographie (b) einer Rasterplatte (alle Längenangaben in μm). Die Werte entlang der eingezeichneten Linien sind darunter dargestellt (c und d). Die z -Position in (b und d) wird durch die Position des Maximalwertes in jedem xy -Bildpunkt bestimmt. An Stellen, wo eine starke Oberflächenneigung bzw. Kanten auftreten, kommt es zu einer Abnahme der Signalamplitude (Bildkontrast im Maximalwertbild).

Aus dem Maximum des $V(z)$ -Verlaufes ergeben sich z -Position und Amplitude im Fokus für jeden Bildpunkt. Durch die Bestimmung der konfokalen z -Position an allen Bildpunkten erhält man die Topographie der Probenoberfläche sowie eine topographiekorrigierte Maximalwertverteilung (Abbildung 8-2). Zur Beseitigung von Rausch-Artefakten im Topographiebild, die z.B. an Stellen entstehen, wo die Signalamplitude den Rauschpegel nicht übersteigt, wird das berechnete Topographiebild mit einem adaptiven Wiener-Filter [60] geglättet. Außerdem dient ein zirkuläres Mittelwertfilter, dessen Durchmesser dem Auflösungsvermögen des Wandlers entspricht, der Erhöhung der Messgenauigkeit. Der resultierende Bildkontrast ergibt sich aus dem Abstand der Probenoberfläche relativ zur xy -Scanebene des Mikroskops. In Abbildung 8-2 d ist zu erkennen, dass diese nicht absolut eben ist, wodurch die berechnete Topographie leicht gekrümmt erscheint.

Maximalwert- und Topographiebilder können zur Rekonstruktion eines dreidimensionalen akustischen Abbildes der Probenoberfläche verwendet werden (Abbildung 8-3).

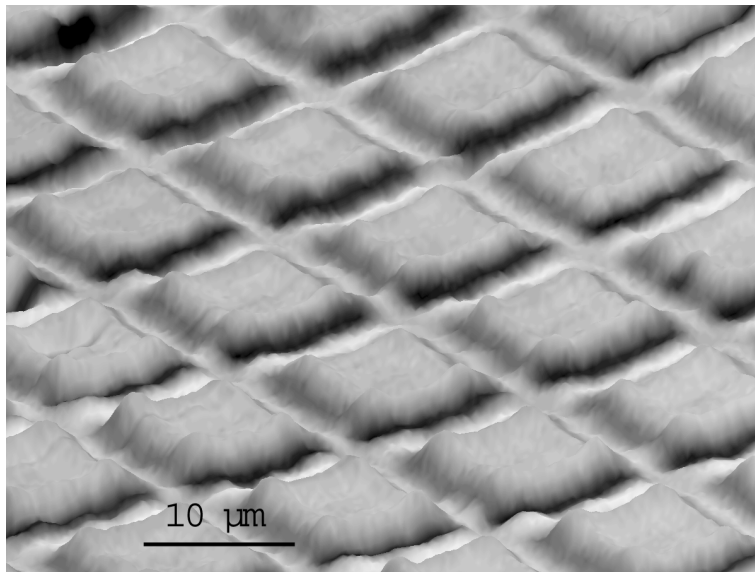


Abbildung 8-3 *Dreidimensionale Darstellung der Probenoberfläche einer Rasterplatte. Der Höhenunterschied zwischen erhobenen Quadraten und Tälern beträgt ca. $0,3 \mu\text{m}$. Die z -Achse ist zur besseren Visualisierung 50-fach gezoomt.*

Die vom Hersteller angegebenen Scanfeldgrößen weichen von den tatsächlichen ab. In der ELIPS-Software ist deshalb die Möglichkeit implementiert, die Zeilenlänge in x -Richtung an die Auslenkung in y -Richtung anzupassen. Außerdem ist es möglich, das tatsächliche Scaninkrement für jede Scanfeldgröße einzustellen.

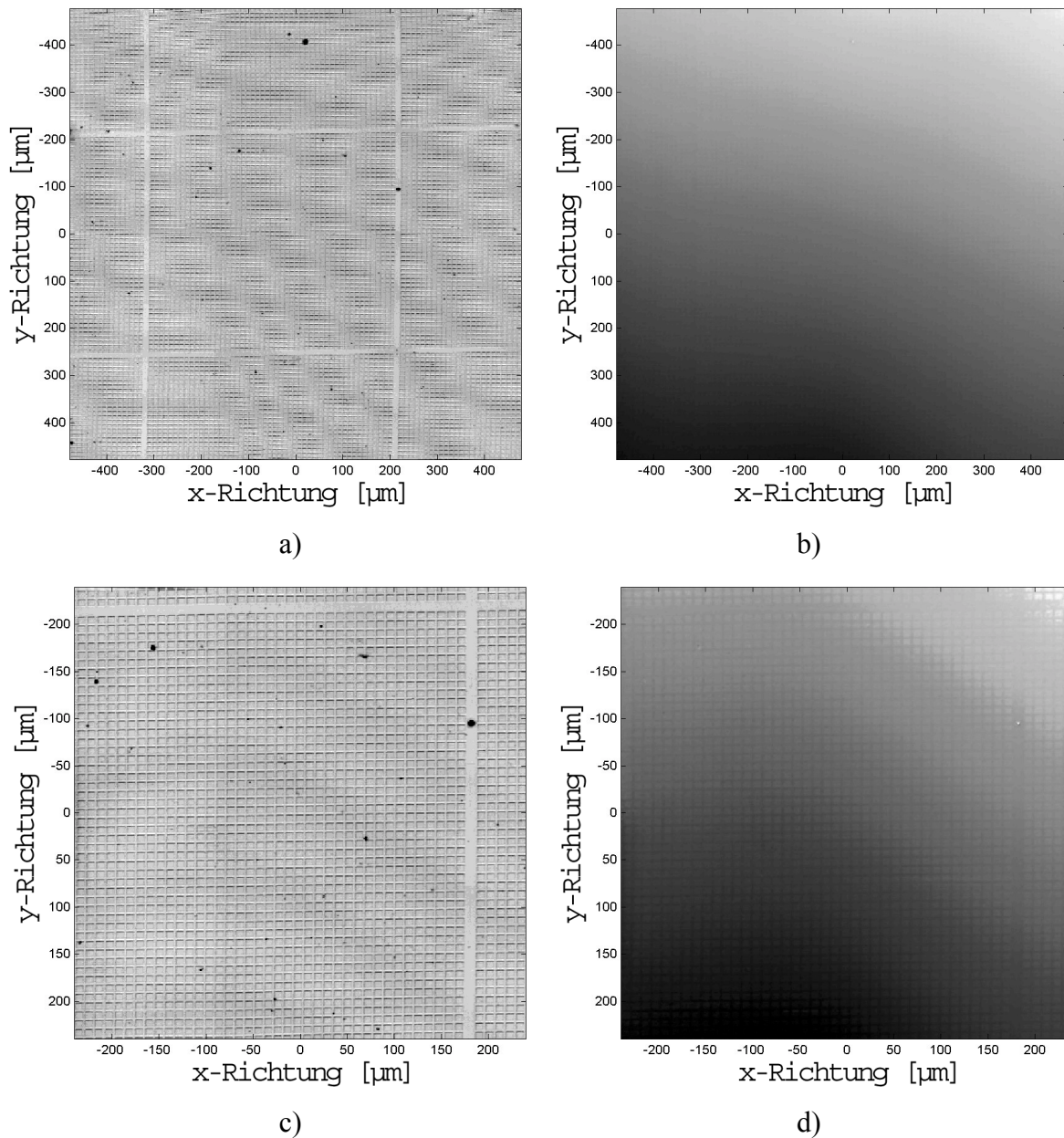


Abbildung 8-4 Maximalwertverteilungen (a, c) und Topographiebilder (b, d) einer geätzten Rasterplatte, aufgenommen mit 900 MHz. Die Breite der Stege ist $2\ \mu\text{m}$ und der Abstand benachbarter Stege $10\ \mu\text{m}$. Die Zeilenlängen der Scanfelder sind jeweils 953 und 478 μm (von oben nach unten). Während im größten Bildausschnitt aufgrund der maximalen Datenmatrixgröße von 512×512 Bildpunkten Aliasing auftritt, wird die Struktur der Platte bei kleineren Scanfeldern korrekt rekonstruiert. Der Bildkontrast kommt im Amplitudenbild durch die Neigung der Oberfläche an Kanten zustande, während im Topographiebild die Höhe relativ zur Scanebene abgebildet wird.

Die tatsächlichen Scanfeldgrößen sowie die resultierenden minimalen Inkremente (bei 512 Punkten/Zeile) sind in Tabelle 8-1 angegeben.

Tabelle 8-1 *Scanfeldgrößen und maximale Pixelauflösung am SAM2000.*

Stufe	Zeilenlänge [μm] (Herstellerangabe)	Zeilenlänge [μm] (gemessen)	Pixel/ μm
1	1000	953,4	0,54
2	500	478,5	1,07
3	312	301,2	1,70
4	250	225,5	2,27
5	100	113,8	4,50
6	65	71,1	7,20

In Abbildung 8-4 ist zu erkennen, dass die Scanebene des mechanischen Schwingers nicht absolut plan und leicht verzerrt ist. Da die absolute Topographiebestimmung nicht primäres Ziel der Messung ist, wurde auf eine Korrektur verzichtet. Auch die Bildverzerrung hat keinen Einfluss auf die beabsichtigten Messungen am biologischen Gewebe und bleibt deshalb unkorrigiert. Bei entsprechender Indikation wäre dies jedoch ohne größeren Aufwand möglich.

Das laterale Auflösungsvermögen der verwendeten Linse liegt bei 900 MHz unterhalb von 2 Mikrometern, da die einzelnen Stege deutlich aufgelöst sind. Eine absolute Aussage über das Auflösungsvermögen ist aber nicht möglich, da geeignete Messverfahren in diesem Frequenzbereich nicht existieren.

Ein systembedingtes Problem ist, dass bei der Messung pro Bildzeile maximal 512 Bildpunkte gespeichert werden. Bei einem Auflösungsvermögen von ungefähr einem Mikrometer ergibt sich, dass bei größeren Scanfeldern das Abtastinkrement nicht ausreicht, um die höchsten auflösbaren Ortsfrequenzen zu erfassen (Aliasing). Bei einer Zeilenlänge von 500 μm ist das Scaninkrement vergleichbar mit dem physikalischen Auflösungsvermögen der 900 MHz-Linse, und die Oberflächentopographie ist gerade noch korrekt zu erfassen. Bei Linsen mit niedrigerer akustischer Frequenz ist das laterale Auflösungsvermögen deutlich schlechter, wodurch selbst bei der größten möglichen Zeilenlänge von 1 mm Aliasing nicht auftritt.

Das axiale Auflösungsvermögen wird bei dem beschriebenen *MLA*-Verfahren nicht durch die Pulslänge, sondern durch den Fokusbereich bestimmt. Dieser ist aufgrund von Phaseneffekten im $V(z)$ -Verlauf immer etwas kleiner als der des Schallfeldes. An dicken Proben mit einem hohen Impedanzunterschied im Vergleich zum Kopplungsmedium wird der Schall jedoch ohnehin nur an der Oberfläche reflektiert. Für die quantitative Auswertung ist daher

die Genauigkeit der Bestimmung der axialen Position dieser Reflexion von Bedeutung. Eine hochaufgelöste Abtastung in z -Richtung bei der Messung ist nicht sinnvoll, da das $V(z)$ -Signal keine Ortsfrequenzen enthält, die wesentlich größer als das Reziproke des Fokusbereiches sind. Die oben beschriebene Methode der nachträglichen Interpolation in z -Richtung sowie der räumlichen Mittelwertbildung innerhalb des Schallfeldbreite ist daher ausreichend, um eine Genauigkeit zu erreichen, die mindestens eine Größenordnung besser als die verwendete Wellenlänge ist (siehe Abbildung 8-2 d).

Der Betrag des Maximalwertes ist ein Maß für den Anteil der Welle, welcher im Fokus zur Linse zurück reflektiert wird. Die Spannungswerte im Maximalwertbild hängen deshalb nur noch vom Reflexionsgrad sowie der lokalen Oberflächenneigung ab. Bei schrägem Einfall wird zum einen ein Teil der reflektierten Welle vom Wandler weg reflektiert. Zum anderen sinkt der Reflexionsfaktor in Abhängigkeit vom Einfallswinkel kontinuierlich bis zum kritischen Winkel für die Totalreflexion der Longitudinalwelle ab. Wird dieser Winkel überschritten, dominieren durch Modenkonvertierung hervorgerufene Reflexions- und Transmissionseffekte. Eine quantitative Ermittlung des Reflexionskoeffizienten ist daher nur für Winkel sinnvoll, die wesentlich kleiner als der kritische Winkel sind.

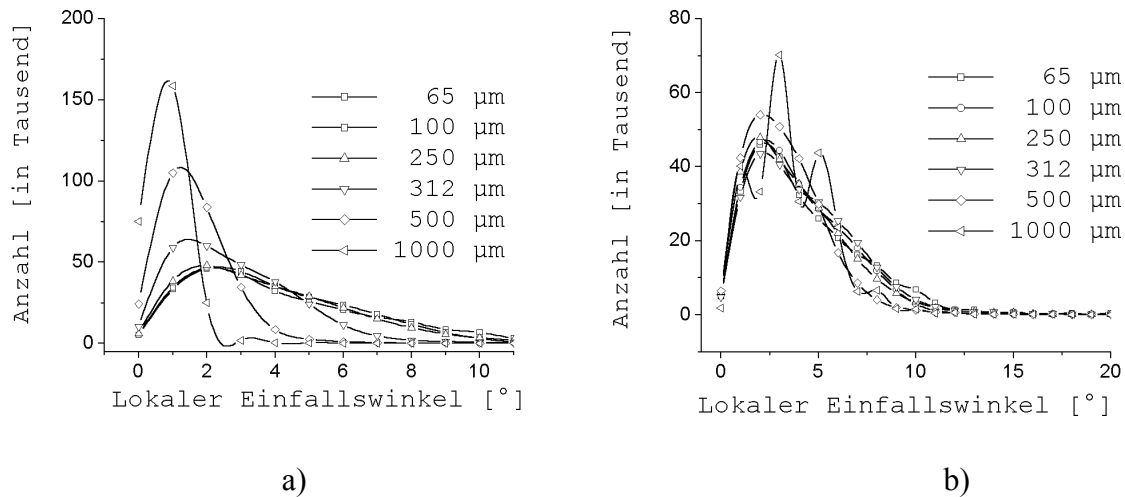


Abbildung 8-5 Häufigkeitsverteilung der lokalen Einfallswinkel der oben dargestellten Rasterplatte in Abhängigkeit von der Scanfeldgröße. Ohne Korrektur führt ein zunehmendes Inkrement sukzessive zu einer Unterbewertung des Neigungswinkels (a). Für Scanfeldgrößen oberhalb von 250 µm wurde deshalb eine Korrektur durchgeführt, was mit Ausnahme des 1 mm Scanfeldes zu einem einheitlichen Ergebnis führt (b).

Die lokale Oberflächenneigung wird deshalb aus der Topographie der Probe für jeden Bildpunkt bestimmt. Auch hier müssen die durch die Diskretisierung hervorgerufenen Effekte berücksichtigt werden. Größere Scaninkremente führen zu einer Unterbewertung der lokalen

Neigung, was sich jedoch durch multiplikative Korrekturfaktoren mit Ausnahme des größten Scanfeldes einfach ausgleichen lässt (Abbildung 8-5). Die Abhängigkeit der Signalamplitude vom Einfallswinkel der in Abbildung 8-2 dargestellten Rasterplatte ist in Abbildung 8-6 zu sehen. Aufgrund der sehr hohen Schallgeschwindigkeit fällt die Signalamplitude bis zu einem Winkel von ungefähr 7° kontinuierlich ab. Dies entspricht dem Winkel der Totalreflexion. Der Unterschied zwischen Minimal- und Maximalwert beträgt 1,35 %. Danach ist ein erneuter Anstieg zu verzeichnen, wobei jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Messwerten mit größeren Einfallswinkeln der Standardfehler auch entsprechend steigt. Abgesehen vom größten Scanfeld ist der winkelabhängige Verlauf der Spannung für alle Scanfeldgrößen annähernd gleich.

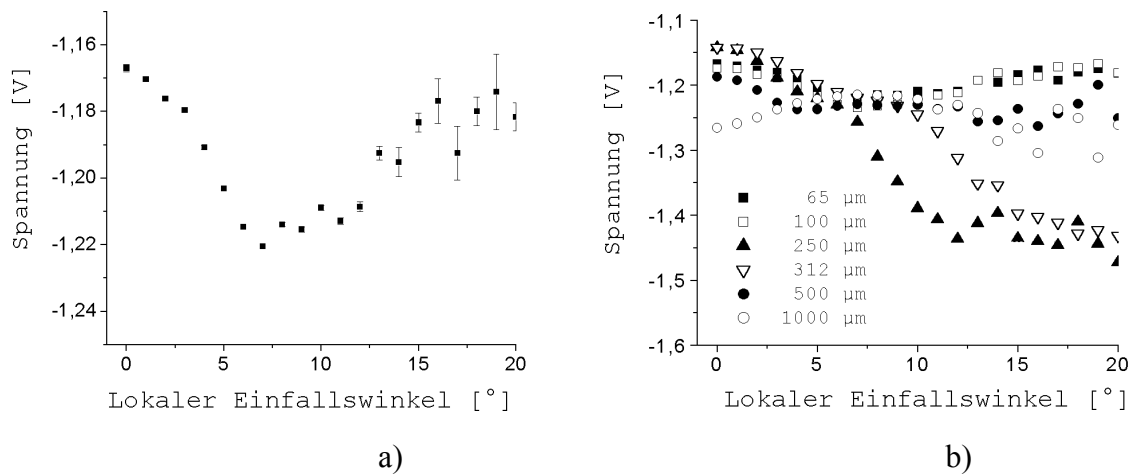


Abbildung 8-6 Mittelwert und Standardfehler der Spannungswerte des Maximalwertbildes aus Abbildung 8-2 a in Abhängigkeit vom Einfallswinkel (a). Die Spannungswerte sind aufgrund des eingestellten Offsets von -5 V negativ. Bis zum Grenzwinkel der Totalreflexion ist ein kontinuierlicher Abfall der Signalamplitude zu verzeichnen (1,35 % bei 7°). Danach steigt die Amplitude aufgrund von Modenkonvertierungen erneut an. Für alle möglichen Scanfeldgrößen sind die Signalamplitude bei 0° sowie der winkelabhängige Verlauf (mit Ausnahme des größten Scanfeldes) bis zum kritischen Winkel annähernd identisch (b).

Letztlich ist die Umrechnung der zur Impedanzbestimmung geeigneten Spannungswerte in Werte des Reflexionskoeffizienten unter Berücksichtigung aller elektronischen Einflüsse notwendig. Zur Anpassung des demodulierten Videosignals an den Eingangsspannungsbereich der A/D-Karte ($\pm 5\text{ V}$) wird dieses mit einem Offset versehen und anschließend mit einem regelbaren Videoverstärker nochmals verstärkt. Beide Regelungen erwiesen sich als linear. Mit dem Einsatz der in 5.2.3 beschriebenen Datenerfassung ist die Variation des Video-Verstärkers jedoch nicht mehr notwendig und wird deshalb immer fest auf 100 % be-

lassen. Der Offset wird in Abhängigkeit von der verwendeten Linse und der entsprechenden RF-Verstärkung so eingestellt, dass bei vollständiger Defokussierung der Signalrauschpegel gerade größer als das untere Limit des Spannungseingangsbereiches der A/D-Karte ist. Idealerweise sollte die gemessene Spannung im Fokus der Linse proportional zum Reflexionskoeffizienten R sein. Der limitierte dynamische Bereich des RF-Verstärkers führt jedoch zur Sättigung bei höheren Spannungsamplituden und dadurch zu Nichtlinearitäten. Die Amplituden der Reflexionen von Referenzmaterialien (siehe Tabelle 7-2) wurden bei verschiedenen RF-Verstärkungen gemessen und die Einstellungen ermittelt, bei denen eine Korrelation zum Reflexionskoeffizienten sinnvoll ist (Abbildung 8-7). Somit lassen sich die gemessene Spannung in Werte der akustischen Impedanz umrechnen.

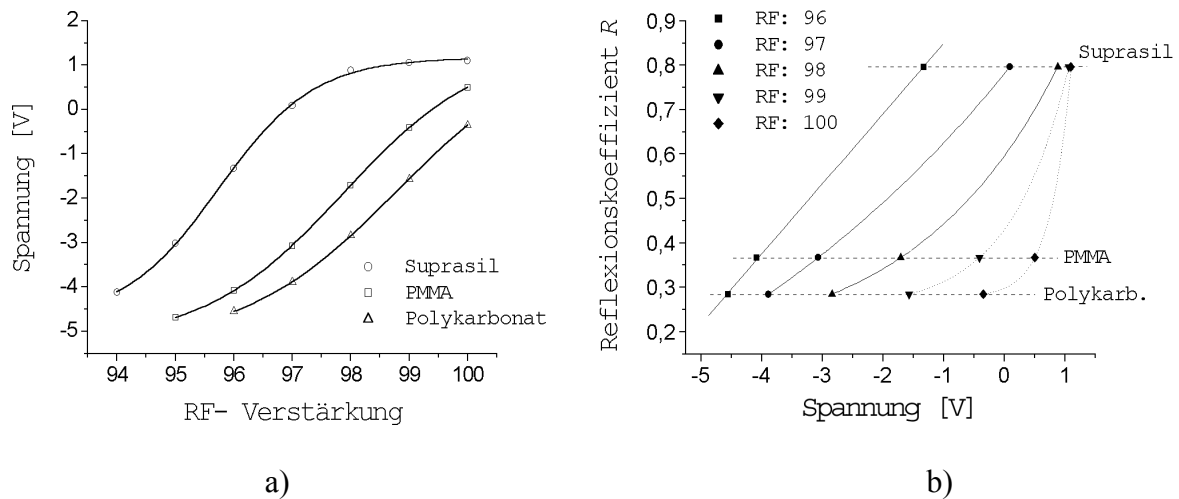


Abbildung 8-7 Abhängigkeit der Reflexionsamplituden der Referenzproben von der RF-Verstärkung bei 900 MHz (a). Kalibrierkurven (b) sind nur in einem eingeschränkten Verstärkungsbereich sinnvoll (hier z.B. für RF-Verstärkungen 96 – 98).

8.2 Ergebnisse

Die Methode der Impedanzbestimmung setzt voraus, dass andere als die oben beschriebenen Einflüsse auf die Signalentstehung zu vernachlässigen sind. In den folgenden Abschnitten werden Artefakte diskutiert, die aufgrund der Komplexität des Systems auftreten können und sich nur schwer als solche identifizieren lassen. Außerdem werden einige physikalischen Effekte gezeigt, deren Einflüsse zu vernachlässigen sind. Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit sowie Ergebnisse der Untersuchung von Knochen werden dargestellt.

8.2.1 Artefakte

Systembedingte Artefakte können z.B. dadurch auftreten, dass durch den Wandler parasitäre Pulse erzeugt werden, die zu zusätzlichen Echos führen, welche unter Umständen mit dem Nutzsignal interferieren können. Bei der verwendeten Breitbandlinse (800 - 1300 MHz) erscheinen ab einer Frequenz von etwa 950 MHz Interferenzen, die vermutlich von der Überlagerung von fokussierten und nicht fokussierten Wellenanteilen des Pulses stammen. Dies führt zu starken Oszillationen im $V(z)$ -Verlauf der gemessenen Echoamplitude, wodurch eine sinnvolle Auswertung nicht möglich ist (Abbildung 8-8). Die Messungen wurden deshalb bei einer Frequenz von 900 MHz durchgeführt, bei der dieser Effekt zu vernachlässigen ist.

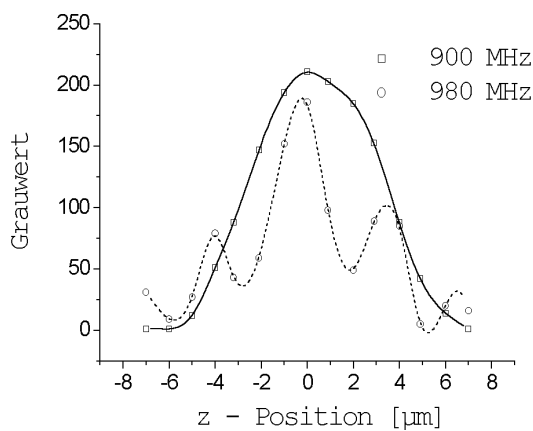


Abbildung 8-8 $V(z)$ -Verläufe einer Wasser-PMMA-Grenzfläche bei 900 MHz (—) und 980 MHz (-----). Die Oszillationen in der gestrichelten Kurve entstehen vermutlich durch Interferenz des Nutzsignals mit parasitären Signalanteilen.

Die Einstellung des Zeitfensters, in dem das Echosignal verstärkt und digitalisiert wird, hat ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf das Ergebnis. In der niederfrequenten HF-Kette des Mikroskops (bis 400 MHz) entstehen durch das Ein- und Ausschalten des Zeitfensters elektronische Störsignale (Abbildung 8-9).

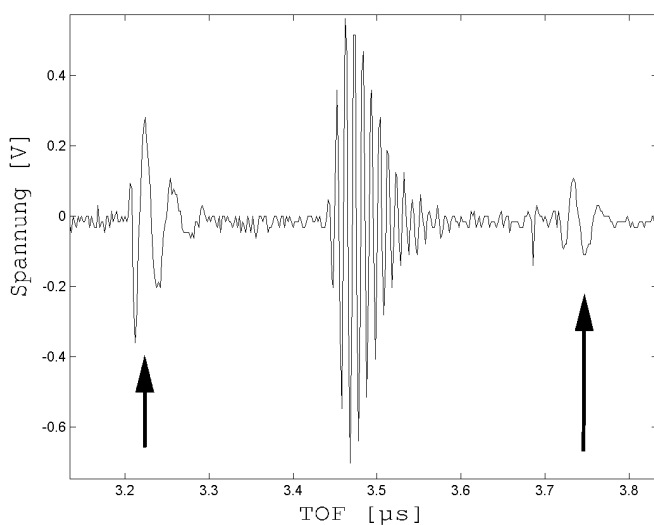


Abbildung 8-9 Puls-Echo (Mitte) eines 100 MHz Pulses und Störsignale (Pfeile), die durch das Ein- und Ausschalten des Zeitfensters entstehen.

Wird das Zeitfenster zu klein gewählt oder nicht richtig positioniert, so kommt es zur Überlagerung dieser Störsignale mit dem Nutzsignal (Abbildung 8-10). Die durch diesen Artefakt

hervorgerufenen Oszillationen können leicht z.B. mit der Generierung von RAYLEIGH-Wellen fehlinterpretiert werden.

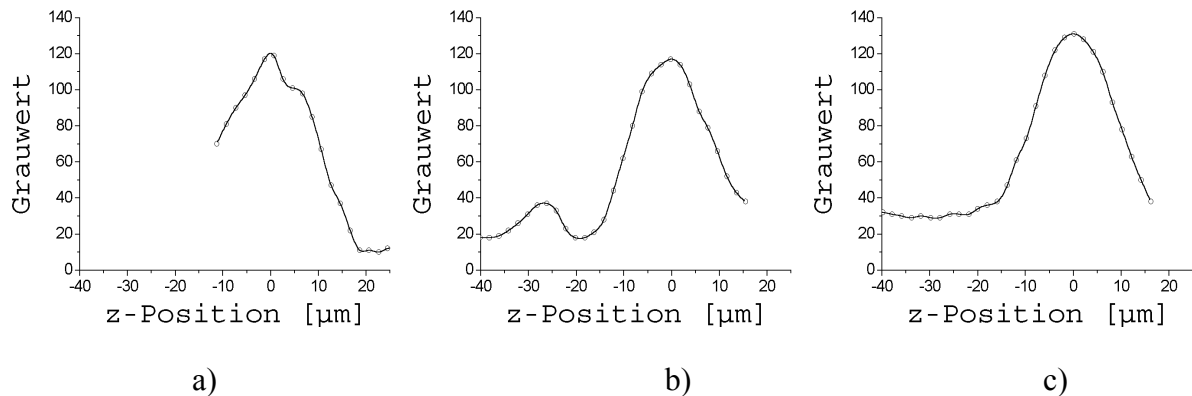


Abbildung 8-10 $V(z)$ -Verläufe einer Wasser-PMMA-Grenzschicht bei 400 MHz und verschiedenen Gate-Einstellungen: (a) - das Nutzsignal wird vom Einschaltsignal überlagert, was zu einer Signalüberhöhung in der Nähe des Fokus führt; (b) - ein zu kleines Fenster führt dazu, dass die Überlagerung des Nutzsignals mit dem Ausschaltsignal zu einem erneuten Signalanstieg führt; (c) - korrekte Gatebreite und -position führen zu dem erwarteten $V(z)$ -Verlauf (c).

Aufgrund der Abhängigkeit der Dämpfung des Kopplungsmediums vom Quadrat der Frequenz wird gerade bei hochfrequenten Systemen ein großer Teil der akustischen Energie in Wärme überführt. Es ist deshalb denkbar, dass die starke Bündelung der Schallenergie und deren Schwächung durch Absorption zu einer Erwärmung der Probe führen könnte. Diese Möglichkeit wurde von Maev und Maslov [63] untersucht. Die elektrische Ausgangsleistung des Systems ist 30 dBm. Durch die Umwandlung und Fortleitung geht ein großer Teil dieser Energie verloren, nämlich ca. 10 dB bei der Umwandlung der elektrischen in akustische Energie, 10 dB durch Illuminierungsverluste und weitere 6 dB durch Linsenreflexionen. Weitere 12 dB gehen durch die Dämpfung im Wasser verloren. Die verbleibende Energie im Fokus beträgt folglich -8 dBm, was z.B. bei einer illuminierten Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ einer maximalen Intensität von $0,16 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ entspricht. Dies ist eine verhältnismäßig große Intensität. Die Pulsdauer beträgt jedoch lediglich 20 ns bei einer Pulswiederholrate von 512 kHz. Dies entspricht einem Ein/Aus-Verhältnis von ungefähr 1 %. Außerdem ist die Linse in ständiger Bewegung. Eine Bildakquisition dauert ca. 5 s, bei einer Bildmatrix von 512×512 verweilt das Schallbündel an einem Punkt für ungefähr $1/250000$ s. Aus diesen Gründen ist die zu erwartende Erwärmung weniger als 1 K, in der Regel jedoch sehr viel weniger. Da die Messungen in einem großen temperierten Wassertank durchgeführt werden, wo die permanente Bewegung der Linse eine Durchmischung der vom Schallfeld durchsetzten Kopplungsflüssigkeit

mit einem sehr viel größeren Wärmereservoir ermöglicht, sinkt die Wahrscheinlichkeit eines durch Erwärmung hervorgerufenen Effektes weiter. In der Praxis konnte ein solcher Effekt auch nicht beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die Oberflächenrauigkeit erhabene Stellen tiefergelegene Regionen eventuell abschatten können, was zu einer zusätzlichen Schallschwächung und folglich Unterbewertung der akustischen Impedanz in diesen Tälern führt. Diese Möglichkeit wird bei der Darstellung der Ergebnisse der Messungen am Knochen diskutiert.

8.2.2 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde die Impedanz eines PMMA-Probekörpers 20-mal innerhalb einer Woche zu verschiedenen Tages- und Betriebszeiten sowie mit unterschiedlichen Verstärkereinstellungen bestimmt. Die mittlere Impedanz und der Standardfehler betragen $3,26 \pm 0,13$ Mrayl.

8.2.3 Untersuchungen an Knochen

Eine umfassende Studie wurde von Smitmans et al. [96] durchgeführt. Proximale kortikale Knochenproben wurden von 26 humanen Femura (17 männlich, 9 weiblich, Alter zwischen 20 und 79 Jahren, ohne pathologischen Befund) ungefähr 10 cm unter dem Femurkopf gewonnen. Die Probenpräparation erfolgte gemäß Kapitel 6. Von allen Proben wurden

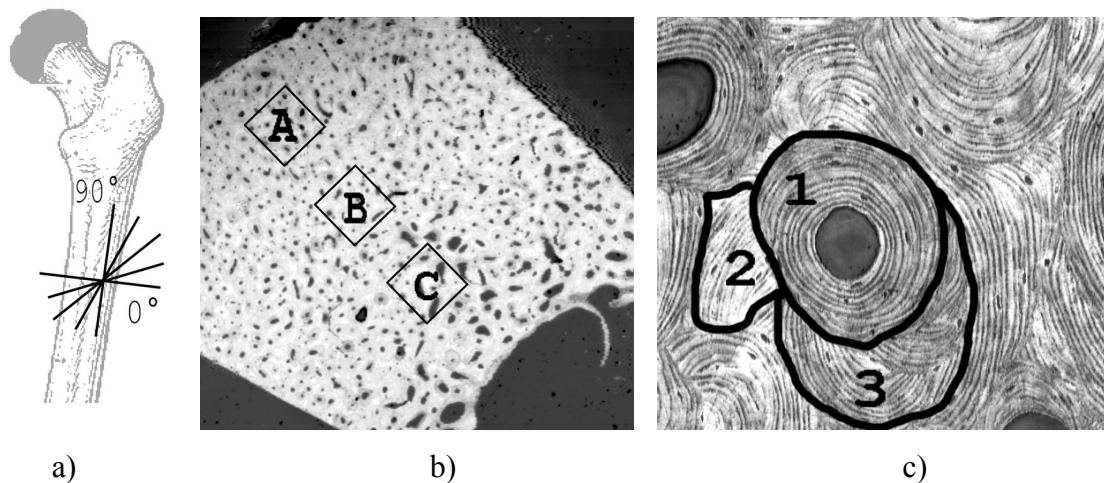


Abbildung 8-11 Auswahl der Schnittebenen (a): 0° ist die Schnittebene senkrecht zur Knochenlängsachse. Die Bezeichnung folgt daraus, dass in dieser Ebene Knochenlängs- und Schallstrahlachse parallel zueinander sind. Drei Messregionen (b) wurden für jeden Schnitt ausgewählt: A- peripher, B- medial und C- zentral. Die separierten Struktureinheiten sind in (c) gekennzeichnet: 1- Osteon, 2- Schaltlamelle mit hoher Impedanz, 3- Schaltlamelle mit niedriger Impedanz.

Dickschnitte in verschiedenen Orientierungen zur Längsachse des Femurs angefertigt (0, 10, 15, 30, 45, 60 und 90°), um die Abhängigkeit der akustischen Impedanz vom Winkel relativ zur Hauptbelastungsrichtung (parallel zur Längsachse) zu untersuchen.

Das oben beschriebene *MLA*-Verfahren wurde an jedem Schnitt an jeweils einem peripheren, medialen und zentralen Gebiet angewendet, wobei immer Scanfeldgrößen von ca. (0,5 mm)² ausgewählt wurden (Abbildung 8-11).

Sowohl die kompletten Impedanzbilder als auch ausgewählte morphologische Regionen, nämlich ein komplett ausgebildetes Osteon, eine Schaltlamelle mit hoher Impedanz und eine Schaltlamelle mit niedriger Impedanz dienten einer statistischen Auswertung, indem von den entsprechenden Histogrammen jeweils charakteristische Parameter, wie Median, Mittelwert, Standardabweichung und die Extremwerte gespeichert wurden. Die lokale Oberflächenneigung wurde in dieser Studie durch die Anwendung einer 10°-Ausschlussmaske berücksichtigt. Der Mittelwert aller Proben ergab 3,38 Mrayl (std.: 0,37 Mrayl). Die Messungen zeigten eine signifikante Winkelabhängigkeit, wobei das Maximum bei 10° (3,54 Mrayl, std: 0,35 Mrayl) und das Minimum bei 90° (3,22 Mrayl, std: 0,30 Mrayl) auftraten (Abbildung 8-12).

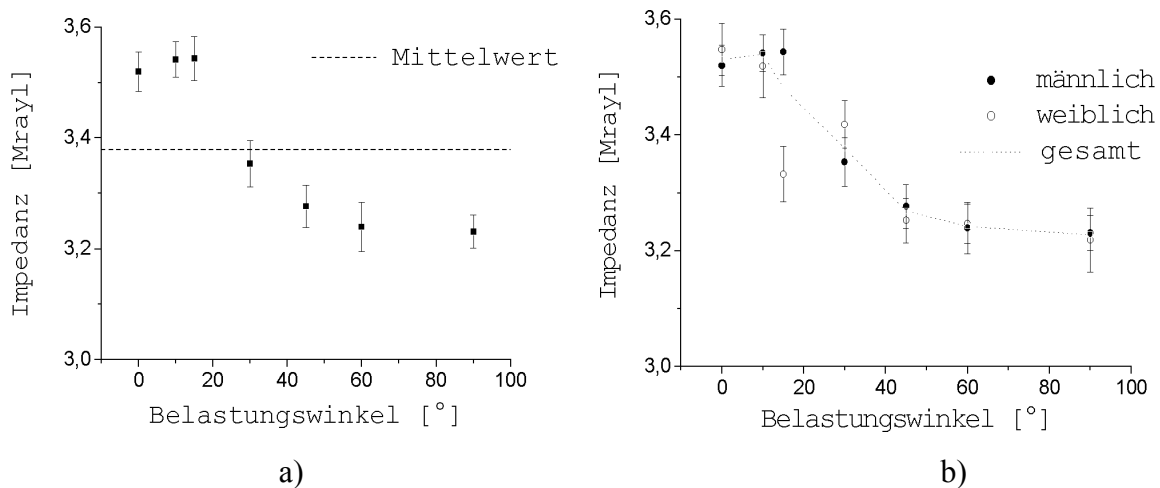


Abbildung 8-12 Winkelabhängigkeit der Impedanz (Mittelwert und Standardfehler) aller Proben (a), und der geschlechtsspezifischen Subgruppen (b).

Die Unterschiede waren mit Ausnahme direkt benachbarter Winkelkombinationen signifikant (z.B. 10° vs. 90°, $p < 0,001$, gepaarter t-Test), sowohl im Gesamtensemble als auch in den nach dem Geschlecht geteilten Untergruppen. Die weibliche Gruppe zeigte außerdem einen statistisch signifikanten Abfall der Impedanz bei einem Winkel von 15° (ungepaarter t-Test, $p < 0,002$). Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten mit Hilfe eines ein-

seitigen ANOVA Tests bei 10° ($p = 0,001$), 15° ($p = 0,006$) und 60° ($p = 0,006$) festgestellt werden. Zur Untersuchung der Abhängigkeit vom Alter wurden die Proben in die folgenden für Frauen charakteristische Altersgruppen eingeteilt: Premenopausal (unter 40 Jahre), Perimenopausal (zwischen 40 und 60 Jahre), Postmenopausal (zwischen 60 und 70 Jahre) und Senium (über 70 Jahre). Mit Ausnahme der Senium-Gruppe war eine generelle Zunahme der Impedanz mit dem Alter (Korrelationskoeffizient $R = 0,981$) zu verzeichnen, wobei die Werte bei den weiblichen Proben geringfügig geringer als bei den männlichen Proben ausfielen (1,1 - 2,7 %). In der Senium-Gruppe kam es in der männlichen Gruppe zu einem Abfall der Impedanz, während in der weiblichen Gruppe die Impedanz weiter zunahm (Abbildung 8-13 a).

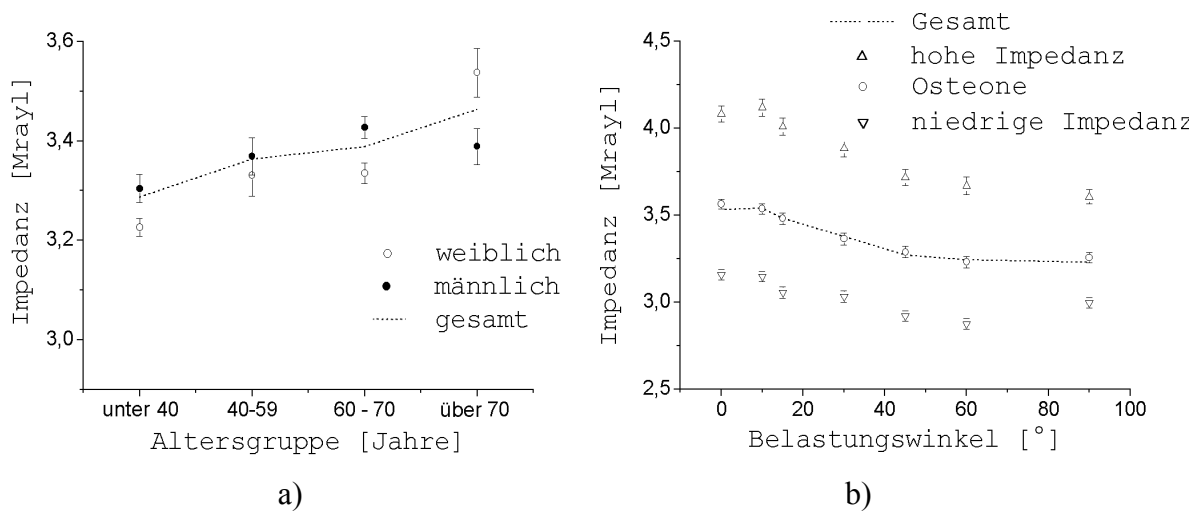


Abbildung 8-13 Mittelwert und Standardfehler für die einzelnen Altersgruppen (a). Winkelabhängigkeit der Mittelwerte morphologischer Auswahlregionen im Vergleich zum Gesamtmessfenster (b).

Ein Vergleich der drei morphologischen Auswahlregionen zeigte ein gleichartiges anisotropes Verhalten. Der einzige Unterschied bestand in den absoluten Impedanzwerten. Während die winkelabhängige Impedanz der Osteone sehr gut mit den Werten der Gesamtmessfenster übereinstimmte (Abweichung weniger als 1 %), wichen die Werte in den Schaltlamellen mit hoher und niedriger Impedanz jeweils um ca. 21 % nach oben bzw. 12 % nach unten ab (Abbildung 8-13 b).

8.2.4 Einfluss der Oberflächentopographie

Die Ergebnisse der Smitmans-Studie zeigten deutlich geringere Impedanzen im Vergleich zu publizierten Werten aus Messungen bei niedrigen Frequenzen. Der Einfluss der durch die Oberflächentopographie verursachten lokalen Neigung wurde deshalb genauer untersucht [78]. Abbildung 8-14 zeigt einen typischen kortikalen Knochenschnitt.

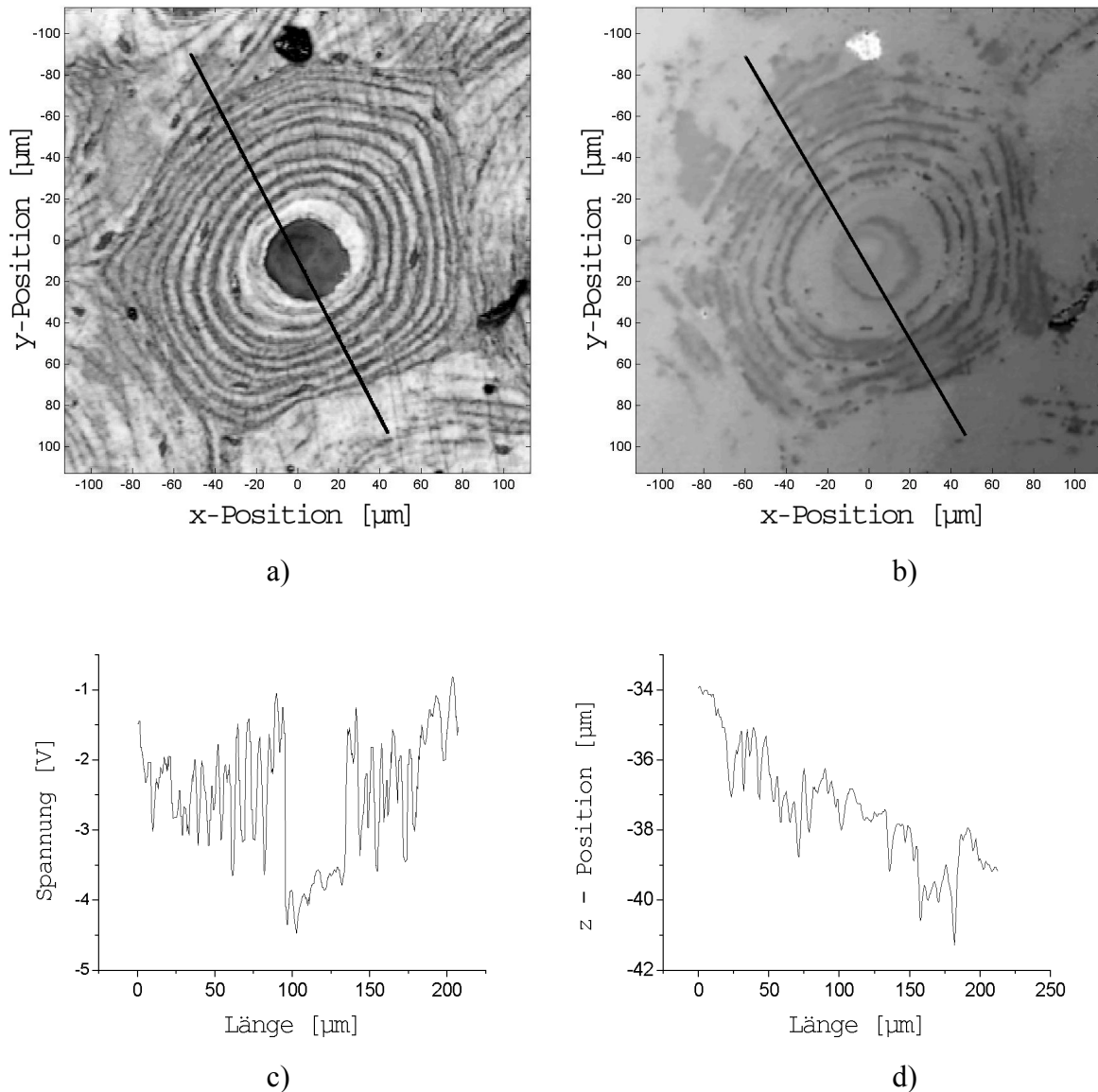


Abbildung 8-14 Maximalwert- und Topographiebilder eines Osteons (a und b, alle Dimensionen in μm). Der HAVERS-Kanal (welcher vollständig mit dem Einbettungsmaterial gefüllt ist) in der Mitte ist von alternierenden mineralisierten Kollagenfaserlamellen umgeben. Angrenzend an das Osteon befinden sich mehrere Schalllamellen. Die kleinen dunklen Punkte sind Kavitäten, in denen sich die Knochenzellen befanden. Die Werte entlang der markierten Linien sind unten dargestellt (c und d).

Die Maximalwert- und Topgraphiebilder wurden aus 17 Einzelbildern rekonstruiert. In der Mitte befindet sich ein Osteon mit dem Havers-Kanal (welches jetzt vollständig mit dem Einbettungsmaterial gefüllt ist) und den alternierenden Lamellen aus mineralisierten Kollagenfasern. In der Umgebung des Osteons sind mehrere Schaltlamellen. Starke Variationen der Maximalwertamplitude sind insbesondere zwischen den alternierenden Lamellen des Osteons zu verzeichnen.

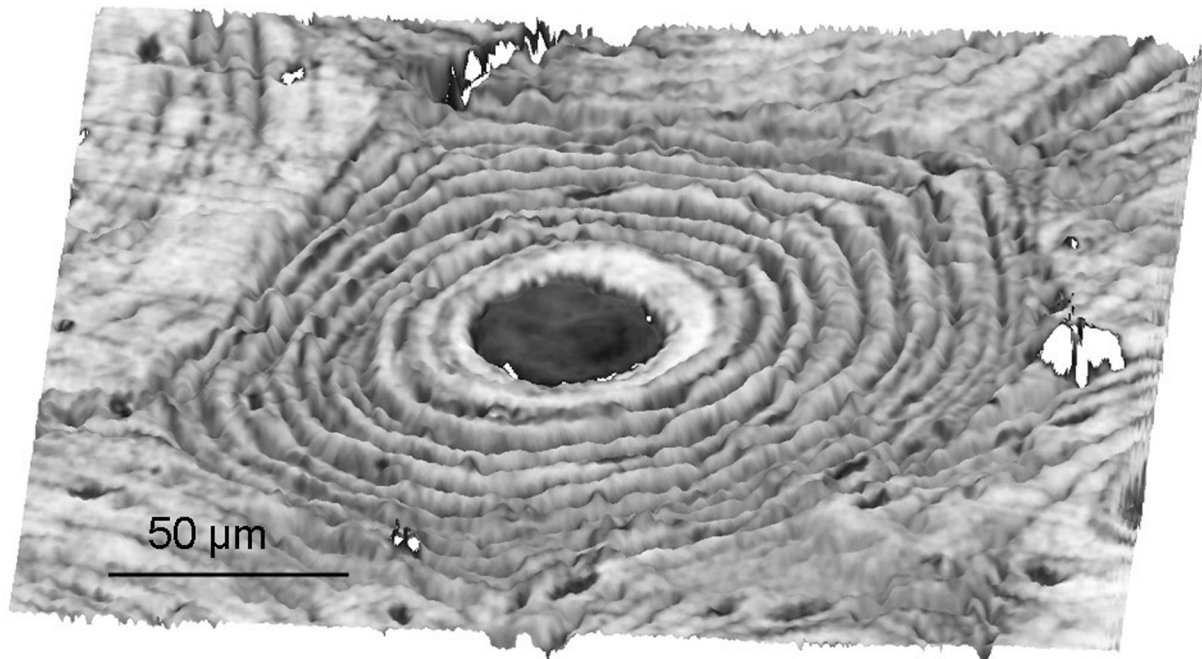


Abbildung 8-15 3D-Rekonstruktion der Knochenoberfläche aus Abbildung 8-14. Hauptsächlich in der Region des jungen Osteons ist eine beträchtliche Oberflächenrauigkeit festzustellen, wobei die erhabenen Lamellen eine erhöhte Reflexionsamplitude aufweisen.

Der mittlere Abstand zwischen zwei erhabenen Lamellen ist ungefähr $8\ \mu\text{m}$, und der Höhenunterschied zwischen alternierenden Lamellen liegt zwischen einem und zwei Mikrometern. In der 3D-Rekonstruktion (Abbildung 8-15) ist deutlich zu sehen, dass die erhabenen Lamellen durch einen erhöhten Reflexionsgrad gekennzeichnet sind. Außerdem ist solch eine hohe Oberflächenrauigkeit in den homogenen Bereichen, z.B. in der Schaltlamelle im unteren rechten Bildbereich oder im zentralen, mit PMMA gefüllten Bereich, nicht zu finden. Die Gesamtneigung der Probe entlang der in Abbildung 8-14 markierten Linie beträgt $1,2$ Grad.

Nach der Umrechnung der Spannungswerte in Impedanzwerte wurde der Einfluss der lokalen Oberflächenneigung in verschiedenen Auswahlbereichen (ROI, Region Of Interest) untersucht.

Die Mittelwerte wurden zunächst ohne Berücksichtigung des Einfallswinkels, dann unter Ausschluss der Pixel mit einem Einfallswinkel von mehr als 10 Grad (Abbildung 8-16 a) und schließlich durch Extrapolation aus dem winkelabhängigen Impedanzverlauf bestimmt. Für die letzte Methode wird der abgeschätzte Wert für den senkrechten Einfall als die nach (4-10) definierte Impedanz angenommen. Die Histogramme und winkelabhängigen Impedanzverläufe sind in Abbildung 8-17 dargestellt und die Ergebnisse in Tabelle 8-2 zusammengefasst.

In der PMMA-Region konnte kein Unterschied bei der Mittelwertbestimmung mit Methode 1 und 2 festgestellt werden (jeweils $2,90 \pm 0,002$ Mrayl), während der extrapolierte Wert mit der winkelabhängigen Methode etwas höher ausfiel ($2,93 \pm 0,01$ Mrayl). In der Schaltlamelle ergaben die Mittelwerte der Histogramme $4,98 \pm 0,004$ Mrayl ohne und $5,13 \pm 0,004$ Mrayl mit Verwendung der 10° -Neigungsmaske. Der mit Methode 3 ermittelte Wert war mit $5,50 \pm 0,05$ Mrayl beträchtlich höher. Die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden traten jedoch im Osteon auf, wo die Werte zwischen $3,94 \pm 0,01$ mit Methode 1 und $5,1 \pm 0,05$ Mrayl mit Methode 3 lagen.

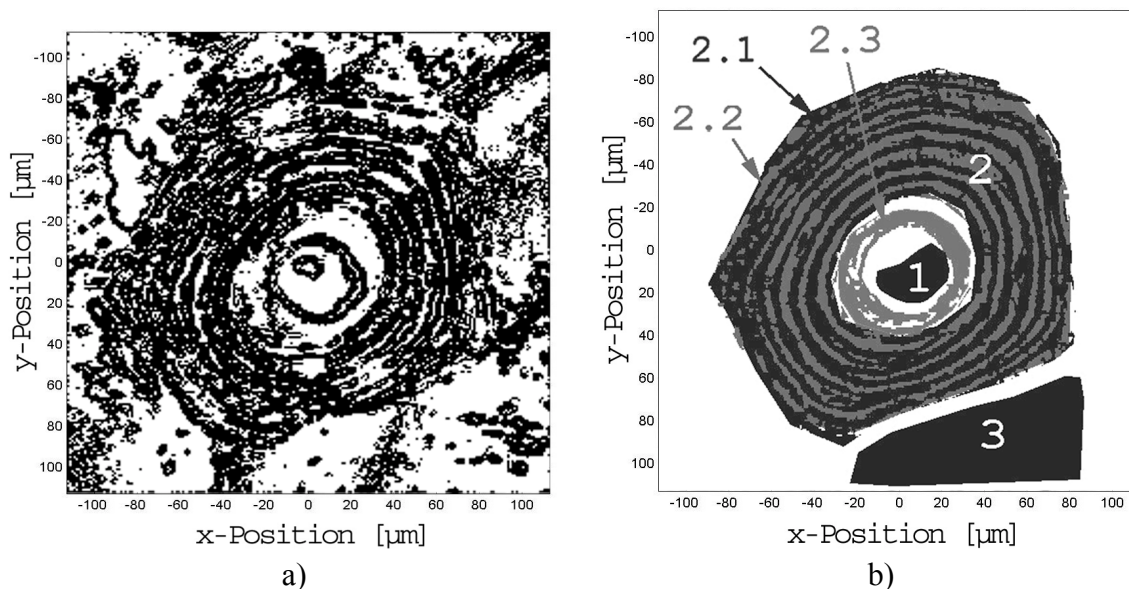


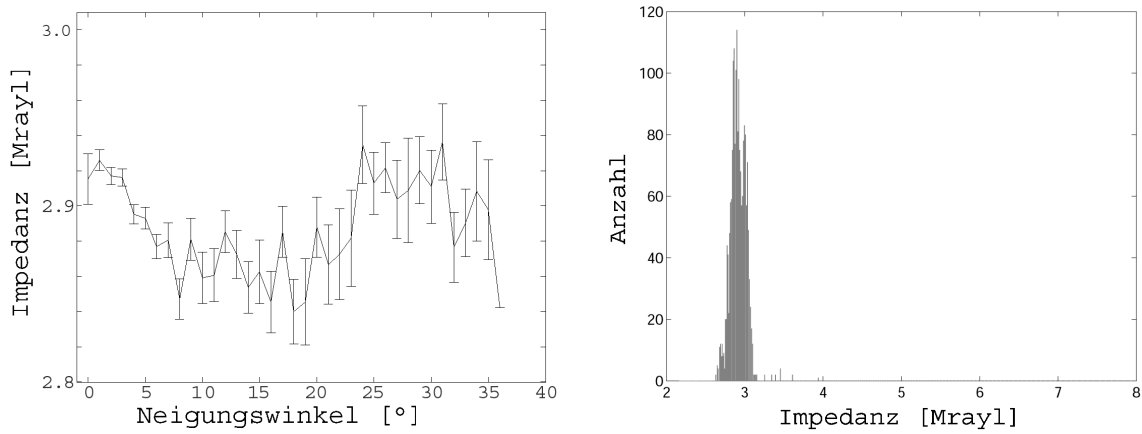
Abbildung 8-16 10° -Neigungsmaske (a) und segmentierte ROI's der Knochenoberfläche (b) aus Abbildung 8-14. Die Auswahlregionen sind: 1 - PMMA, 2 - Osteon, 2.1 (schwarz) - Lamellen mit hohem Reflexionsgrad, 2.2 (grau) - Lamellen mit niedrigem Reflexionsgrad, 2.3 (grau) - Innerste dicke Lamelle mit deutlich erhöhtem Reflexionsgrad, 3-Schaltlamelle.

Tabelle 8-2 Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler der in Abbildung 8-16 markierten ROI's (alle Werte in Mrayl).

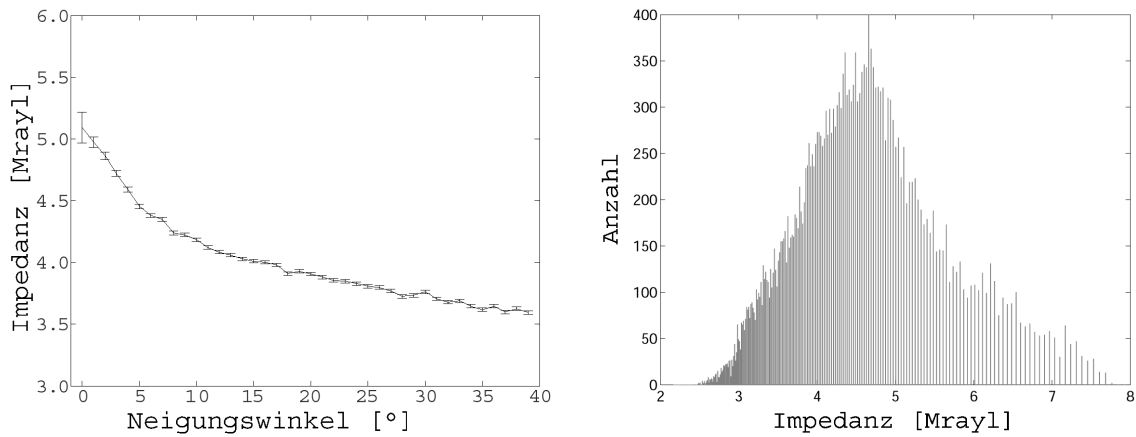
ROI	Methode 1 (Alle Pixel)	Methode 2 (Alle Pixel mit kleinerem Einfallswinkel als 10°)	Methode 3 (0° Wert aus dem winkelabhängigen Impedanzverlauf)
1. PMMA	2,90 ± 0,10 (0,002)	2,90 ± 0,10 (0,002)	2,93 (0,01)
2. Osteon	3,94 ± 0,77 (0,001)	4,43 ± 0,91 (0,001)	5,10 (0,05)
2.1 Lamellen mit kleiner Reflektanz	3,42 ± 0,34 (0,001)	3,51 ± 0,33 (0,003)	3,55 (0,03)
2.2 Lamellen mit großer Reflektanz	4,51 ± 0,40 (0,002)	4,64 ± 0,44 (0,004)	4,68 (0,03)
2.3 Innerste Lamelle	5,45 ± 0,89 (0,01)	5,59 ± 0,92 (0,12)	6,40 (0,02)
3. Schaltlamelle	4,98 ± 0,79 (0,004)	5,13 ± 0,71 (0,004)	5,50 (0,05)

Die Ermittlung von Impedanzverteilungen ist mit der winkelabhängigen Methode aufgrund der durch die Separation hervorgerufenen geringen Anzahl von Messwerten nicht für jeden Winkel sinnvoll. Um dennoch die individuellen Eigenschaften der heterogenen Struktur zu ermitteln, muss das Impedanzbild zunächst segmentiert werden. Dies wird mit Hilfe von Grenzwerten erreicht. Für das Osteon wurde auf diese Weise die Impedanzberechnung für drei verschiedene Unterstrukturen wiederholt, und zwar für die Lamellen mit niedrigem bzw. hohem Reflexionsgrad und für die innerste Lamelle, welche durch eine deutlich erhöhte Dicke und Reflexion gekennzeichnet ist (Abbildung 8-16 b). Die Berechnung der Impedanz mit Hilfe der winkelabhängigen Methode ergab wiederum die höchsten Werte (siehe Tabelle 8-2). Andererseits ist zu bemerken, dass der winkelabhängige Verlauf der Struktur mit der höchsten Impedanz im Vergleich zu den Strukturen mit geringerer Impedanz einen wesentlich größeren Gradienten aufweist (Abbildung 8-17).

1. PMMA



2. Osteon



3. Schaltlamelle

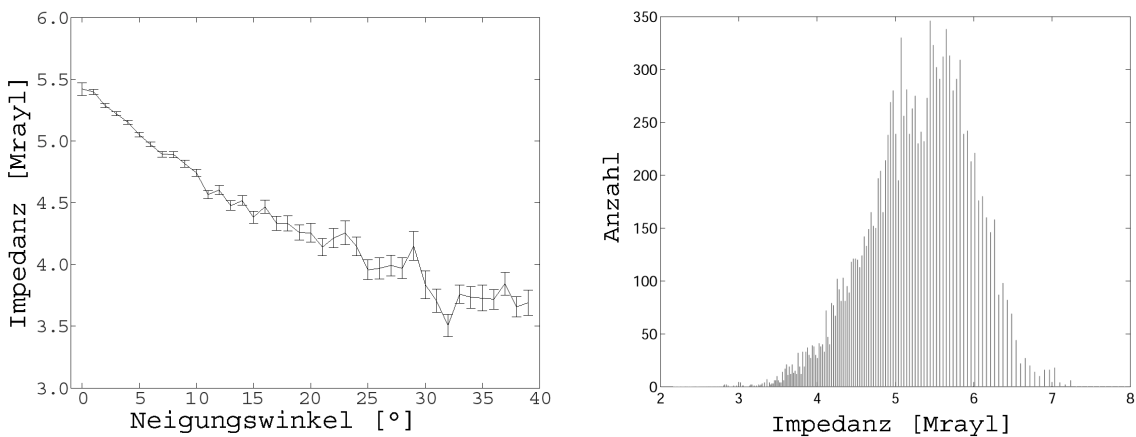


Abbildung 8-17 Winkelabhängige Impedanzverläufe (links) und Histogramme der Impedanz (rechts) der in Abbildung 8-16 markierten ROI's. Vor der Berechnung der dargestellten Histogramme wurde die 10°-Neigungsmaske angewendet.

8.3 Diskussion der Ergebnisse

Das laterale Auflösungsvermögen des benutzten akustischen Systems ist ausreichend, um die Mikrostruktur des kortikalen Knochens abzubilden. Einzelne Osteonenlamellen, deren Dicke in der Größenordnung von 1 bis 10 μm liegt, können örtlich aufgelöst dargestellt werden. Die heterogene Struktur biologischer Materialien stellt jedoch in dieser Größenordnung ein Problem bei der Probenpräparation dar, da die mechanische Bearbeitung zum bevorzugten Abtrag weicherer Materialien führt. Die verbleibende topographische Struktur hat beträchtliche Auswirkungen auf den Bildkontrast, zum einen aufgrund des sehr begrenzten Fokusbereiches hochfrequenter Linsen und zum anderen wegen des zunehmenden Einflusses der lokalen Oberflächenneigung auf die Transmissions- und Reflexionseigenschaften. Jegliche Art der quantitativen Datenauswertung mit Hilfe konventioneller C-Scan-Bilder muss von der Annahme ausgehen, dass die Probenoberfläche eben ist und sich genau in der Fokusebene des Mikroskops befindet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Voraussetzung mit einer sehr hoch auflösenden Linse nicht mehr zu erfüllen ist. Die Vernachlässigung oder unzureichende Berücksichtigung der lokalen Oberflächenneigung führt zu einer signifikant verringerten Impedanzbestimmung, insbesondere in Regionen mit hoher Heterogenität. Der durch die lokale Neigung hervorgerufene Fehler hängt sowohl von der Häufigkeitsverteilung der Winkel als auch von der absoluten Größe der akustischen Impedanz ab. Das sicherste Ergebnis erhält man durch Extrapolation aus winkelabhängigen Impedanzverläufen. Dabei wird ausgenutzt, dass die reflektierte Signalamplitude für kleine Einfallswinkel stetig abfällt. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Darstellung der winkelabhängigen Impedanzverläufe in keinem direkten Zusammenhang mit der Amplitude der komplexen Reflektanzfunktion steht, da für einfallende und reflektierte Wellen die gleiche Linse benutzt wird. Es wird auch nicht die akustische Impedanz des Materials als Funktion des Einfallswinkels abgebildet. Vielmehr dient diese Darstellungsform der Quantifizierung des durch die Oberflächenneigung hervorgerufenen Abfalls der Echoamplitude. Aus dem Kurvenverlauf kann so auf die Reflexionsamplitude bei senkrechtem Schalleinfall geschlossen werden. Die Berechnung wird nicht an einzelnen Messpunkten durchgeführt, sondern über größere Auswahlbereiche gemittelt, wobei die Orientierung der lokalen Neigung unberücksichtigt bleibt. Charakteristische Eigenschaften der Reflektanzfunktion, wie z.B. die starke Schwankung des Reflexionsverhaltens in der Nähe des kritischen Winkels, konnten deshalb in den winkelabhängigen Impedanzverläufen am Knochengewebe bisher nicht beobachtet werden.

Die Verwendung einer 10° -Ausschlussmaske führte in den untersuchten Regionen mit hoher Impedanz zu einem Abfall der ermittelten Impedanz von bis zu 13 %. In Regionen

mit niedriger Impedanz fiel die Differenz mit ca. 1 % deutlich geringer aus. Insbesondere der Unterschied zwischen dem extrapolierten 0° -Wert und dem mit der 10° -Maske ermittelten Wert ist mit einem Prozent in guter Übereinstimmung mit dem abgeschätzten Abfall der Reflektanzfunktion von 1,35 % bei 10° Neigung. Der im Vergleich zum Referenzmaterial (3,19 Mrayl) etwas niedrigere Wert von 2,93 Mrayl ist durch den Zusatz des Weichmachers bei dem zur Einbettung verwendeten PMMA zu erklären.

Für höhere Impedanzen ist der Abfall der winkelabhängigen Impedanz deutlich größer. Demzufolge steigt auch der Fehler bei der Verwendung einer Ausschlussmaske. Die gänzliche Vernachlässigung der lokalen Neigungswinkel hatte in dem stark strukturierten Osteon einen maximalen Fehler von 22,7 % zur Folge.

In der von Smitmans et al. [96] durchgeführten Studie erfolgte die Impedanzauswertung mit Hilfe der 10° -Ausschlussmaske. Die dort konstatierte Feststellung, dass die Impedanzwerte insgesamt wesentlich niedriger ausfielen als publizierte Ergebnisse im niederfrequenten Bereich, lässt sich mit den oben dargestellten Ergebnissen zumindest teilweise auf die unzureichende Berücksichtigung des lokalen Einfallswinkels zurückführen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die mikroskopisch ermittelten Impedanzverteilungen signifikant von der Orientierung relativ zur Längsachse des Femurs abhängen. Der charakteristische Kurvenverlauf mit einem Maximum bei ungefähr $10 - 15^\circ$ ist konform mit dem von Wagner und Weiner [106] beschriebenen winkelabhängigen Verlauf des Elastizitätsmoduls eines orthotropen, alternierenden Zwei-Lamellen-Osteonen Modells, wenn man die variierenden Orientierungen der rotierten Lamellen relativ zur Belastungsrichtung berücksichtigt [77].

Experimentelle Daten der Abhängigkeit der Materialeigenschaften vom Belastungswinkel existieren nur im niederfrequenten Bereich bis 50 MHz [72,103]. Obwohl auch hier eine maximale Anisotropie in einem Winkelbereich von 0 bis 30° ermittelt wurde, ist ein Vergleich nur bedingt möglich, da zum einen die Schallgeschwindigkeit anstelle der Impedanz mit einer sehr viel niedrigeren Frequenz und entsprechend schlechterem Auflösungsvermögen ermittelt und zum anderen die Untersuchungen an Kaninchen-, bzw. Hundefemura durchgeführt wurden, wo im Vergleich zum humanen Femurknochen andere Lastverhältnisse und -richtungen auftreten.

Ein fortwährende Frage ist, in welchem Verhältnis die akustische Impedanz zu den mechanischen Kenngrößen, wie z.B. dem Elastizitätsmodul steht. Obwohl im niederfrequenten Bereich empirische Korrelationen zwischen dem Reflexionskoeffizienten R und mechanischen Größen existieren (siehe Kapitel 7), sind diese nicht ohne Verifizierung auf den hochfrequenten Bereich zu übertragen. Grund dafür ist der hierarchische Aufbau des Kno-

chens aus anisotropen und heterogenen Komponenten. Solange es nicht gelingt, alle notwendigen akustischen Größen zur Berechnung der gesuchten mechanischen Parameter zu ermitteln, ist daher eine empirische Korrelation der akustischen Messgröße mit einem adäquaten mechanischen Messverfahren der gleichen Ortsauflösung notwendig. Geeignet ist hierfür das Verfahren der Nanoindentation. Erste eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass durchaus eine Korrelation zwischen der an einzelnen Osteonenlamellen gemessenen akustischen Impedanz und dem mit dem Nanoindenter ermittelten Elastizitätsmodul existiert [15]. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um insbesondere den Einfluss der Orientierung der Kollagenlamellen zu berücksichtigen. Auch andere Gruppen haben vergleichbare Ergebnisse der mit SAM und Nanoindenter bestimmten Materialparameter erhalten [104], wobei jedoch wieder zu bemerken ist, dass das Auflösungsvermögen der akustischen Methode mindestens eine Größenordnung schlechter als das der mechanischen Methode war. Der Vollständigkeit halber ist noch zu bemerken, dass einige Autoren mittlerweile die mit dem SAM gemessenen Reflexionskoeffizienten von Referenzmaterialien direkt mit in der Literatur veröffentlichten Elastizitätsmoduln korrelieren, um anhand dieser Kalibrierung das C-Scan-Bild in ein zweidimensionales Abbild des YOUNG-Moduls zu konvertieren [18,49]. Ohne experimentelle Verifizierung ist dieses Vorgehen jedoch bedenklich, da kein direkter physikalischer Zusammenhang zwischen Impedanz und dem E-Modul besteht.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Stabile und ausreichend genaue Messapparaturen sind prinzipiell eine wesentliche Voraussetzung für quantitative Untersuchungen. Durch die Modifizierungen am SAM2000 konnten die Elektronik stabilisiert und die abschließende Datendigitalisierung optimiert werden. Die einfache und effiziente Bedienung erlaubt zudem eine schnelle und standardisierte Messwerterfassung. Mit dem Neuaufbau des SAM100 wurden die Voraussetzungen geschaffen, nahezu alle Möglichkeiten der Datenerfassung und -auswertung auszunutzen. Die Erweiterung der Systembandbreite von 50 auf 200 MHz erlaubt den Einsatz von Hochfrequenzwandlern, wodurch axiales und laterales Auflösungsvermögen im Vergleich zum ursprünglichen System jeweils um den Faktor 4 verbessert wurden.

Die beiden vorgestellten Systeme erlauben die quantitative Bestimmung der akustischen Impedanz über einen sehr großen Frequenzbereich. Die Ergebnisse sowohl im mesoskopischen als auch im mikroskopischen Bereich belegen, dass dieser verhältnismäßig einfach zu ermittelnde akustische Parameter sehr gut die korrespondierenden elastischen Eigenschaften des untersuchten Materials repräsentiert. In Abhängigkeit von den verwendeten Schallfelddimensionen (Schallfelddurchmesser, Wellenlänge) lassen sich so entweder die Eigenschaften des Matrixverbundes oder die individuellen Eigenschaften der mikroskopischen Aufbaukomponenten der heterogenen Knochenstruktur untersuchen. Die Anwendung des Reflexionsgesetzes zur Ableitung der Impedanz aus der im Fokus reflektierten Schallamplitude setzt jedoch voraus, dass die Strukturdimensionen der reflektierenden Schicht entweder wesentlich größer oder wesentlich kleiner als die Schallfelddimensionen sind. Im Übergangsbereich entstehen Artefakte, die zumindest teilweise durch eine räumliche Mittelung zu erklären sind. Die sorgfältige Anpassung des Schallfeldes an die zu untersuchende Struktur ist daher für eine zuverlässige Ableitung der akustischen Impedanz unerlässlich.

In kortikalem Knochen stellen die von den HAVERS-Kanälen gebildeten Kavitäten, individuelle Osteone und Schaltlammellen sowie die alternierenden Osteonenlamellen die wesentlichen Strukturen dar. Deren Größenordnung kann mit Ausnahme der letztgenannten stark variieren, wodurch eine absolute Aussage über entsprechende optimale Schallfeldparameter nicht ohne weiteres möglich ist. Mit den hier vorgestellten Ergebnissen lässt sich abschätzen, dass das Auflösungsvermögen zur Untersuchung der mesoskopischen Eigenschaften (kompakter Knochenmatrix ohne Kavitäten) im Bereich zwischen 30 und 10 Mikrometern liegen sollte. Für die Untersuchung mikroskopischer Eigenschaften (individueller Osteonenlamellen) sollte das Auflösungsvermögen nicht wesentlich schlechter als ein Mikrometer sein. Eine der-

zeit durchgeführte Studie, in der zweidimensionale Impedanzverteilungen in Abhängigkeit vom Belastungswinkel im Frequenzbereich von 25 MHz bis 2 GHz gemessen werden, soll zur endgültigen Klärung dieser Frage beitragen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ableitung elastischer Größen an kleinen Volumina im Knochen mit Hilfe zeitaufgelöster akustischer Mikroskopie möglich ist. Da die vorgestellte Methode keine sekundären Messgrößen benötigt, eröffnet dies eine neue Dimension in der orts aufgelösten akustischen Mikroskopie harter biologischer Gewebeproben. Neben der Klärung grundsätzlicher Zusammenhänge zwischen akustischen Messgrößen und elastischen Materialparametern gibt es eine Vielzahl von Fragestellungen, zu deren Beantwortung dieses Verfahren in Zukunft beitragen kann. Technisch ist es kein Problem, auch höhere Frequenzen mit entsprechend kleineren Schallfelddimensionen einzusetzen, um somit das Untersuchungsvolumen weiter zu minimieren. Die zu lösende Schwierigkeit liegt primär darin, entsprechend dünne und dennoch stabile Proben herzustellen, welche den adhäsiven und osmotischen Kräften im Kopplungsmedium widerstehen.

Die für das hochauflösende Mikroskop entwickelte Schichtbildanalyse ist das derzeit einzige mit Amplitudendetektion arbeitende Verfahren, welches die topographischen Einflüsse bei der Messung berücksichtigt. Aus diesem Grund wird diese Methode mittlerweile von den meisten Gruppen angewendet, die mit diesem oder vergleichbaren Mikroskopen biologische Proben untersuchen. Das bisherige Anwendungsspektrum reicht dabei von kortikalem und trabekulärem Knochen [26] über Gehörknöchelchen [34-36], Knorpelgewebe und subchondralen Knochen [47] bis hin zu Knochenzellen und Alginat-Mikrokapseln [92]. Die bisher notwendige Voraussetzung einer planen, glatten Oberfläche wird durch die dreidimensionale Datenakquisition entschärft und eine quantitative Auswertung ist auch für leicht gekrümmte oder raue Oberflächen möglich.

Der prädestinierte Weg, um in dieser Größenordnung elastische Parameter abzuleiten, scheint die empirische Korrelation der akustischen Impedanz mit mikromechanischen Vergleichsmethoden, wie z.B. der Nanoindentation zu sein. Die Kombination akustischer und mechanischer Parameter an den gleichen Messorten und -volumina lässt darauf hoffen, bisher getroffene Annahmen zur Ableitung von Impedanz und E-Modul entweder zu fundieren bzw. zu widerlegen. Sollte sich die Korrelation zwischen diesen beiden Messgrößen bestätigen, dann ließen sich mit verifizierten Kalibrierwerten aus den mit dem *Multi Layer Analysis* Verfahren ermittelten Impedanzbildern tatsächlich zweidimensionale Verteilungsbilder des Elastizitätsmoduls mit mikroskopischer Auflösung ermitteln.

10 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] SAM2000 - Betriebsanleitung. 1990. Herborn, Deutschland, Krämer Scientific Instruments. Katalog.
- [2] Goodfellow - Technische Informationen. 2002. Goodfellow. Katalog.
- [3] TPX - Technische Informationen. 2002. Mitsui. Katalog.
- [4] Amprino,A., "Investigations on some mechanical properties of bone tissue," *Acta Anatomica*, vol. 34, pp. 161-186, 1958.
- [5] Antich,P.P., Mason,R.M., Zerwech,J., und Pak,C., "Trabecular architecture studies by 3D MRI microscopy in bone biopsies," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 9, pp. 327, 1994.
- [6] Ascenzi,A., Baschieri,P., und Benvenuti,A., "The bending properties of single osteons," *J. Biomech.*, vol. 23, pp. 763-771, 1990.
- [7] Ascenzi,A., Baschieri,P., und Benvenuti,A., "The torsional properties of single selected osteons," *J. Biomech.* , vol. 27, pp. 875-884, 1994.
- [8] Ascenzi,A. und Bonucci,E., "The tensile properties of single osteons," *Anat. Rec.*, vol. 158, pp. 375-386, 1967.
- [9] Ascenzi,A. und Bonucci,E., "The compressive properties of single osteons," *Anat. Rec.*, vol. 161, pp. 377-391, 1968.
- [10] Ashman,R.B., Cowin,S.C., Rho,J.Y., Van Buskirk,W.C., und Rice,J.C., "A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone," *J. Biomech.*, vol. 17, pp. 349-361, 1984.
- [11] Bereiter-Hahn,J., Karl,I., Luers,H., und Voth,M., "Mechanical basis of cell shape: investigations with the scanning acoustic microscope," *Biochem. Cell. Biol.*, vol. 73, pp. 337-348, 1995.
- [12] Biot,M.A., "Theory of propagation of elastic waves in a fluid saturated porous solid. I. Low frequency range," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 28, pp. 168-178, 1956.

- [13] Biot, M.A., "Theory of propagation of elastic waves in a fluid saturated porous solid. II. High frequency range," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 28, pp. 179-191, 1956.
- [14] Blake, G.M., Gluer, C.C., und Fogelman, I., "Bone densitometry: current status and future prospects," *Br. J. Radiol.*, vol. 70 Spec No, pp. 177-186, 1997.
- [15] Brandt, J., Raum, K., Seidler, S., und Klemenz, A., "Experimental measurement of elastomechanical properties of lamellar bone structures – comparison of SAM with nanoindentation results," *Proc. ICCE*, vol. 6, pp. 85-86, 1999.
- [16] Briggs, G.A., *Acoustic Microscopy*. Oxford, Clarendon Press, 1992.
- [17] Broz, J.J., Simske, S.J., und Greenberg, A.R., "Material and compositional properties of selectively demineralized cortical bone," *J. Biomech.*, vol. 28, pp. 1357-1368, 1995.
- [18] Bumrerraj, S. und Katz, J.L., "Scanning acoustic microscopy study of human cortical and trabecular bone," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 29, pp. 1034-1042, 2001.
- [19] Choi, K., Kuhn, J.L., Ciarelli, M.J., und Goldstein, S.A., "The elastic moduli of human subchondral and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus," *J. Biomech.*, vol. 23, pp. 1103-1113, 1990.
- [20] Chung, H.W., Wehrli, F.W., Williams, J.L., Kugelmass, S.D., und Wehrli, S.L., "Quantitative analysis of trabecular microstructure by 400 MHz nuclear magnetic resonance imaging," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 10, pp. 803-811, 1995.
- [21] Currey, J.D., "Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone," *J. Biomech.*, vol. 23, pp. 837-844, 1990.
- [22] Daft, C.M. und Briggs, G.A., "The elastic microstructure of various tissues," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 85, pp. 416-422, 1989.
- [23] Daft, C.M., Briggs, G.A., und O'Brien, W.D., "Frequency dependence of tissue attenuation measured by acoustic microscopy," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 85, pp. 2194-2201, 1989.
- [24] Del Grosso, V.A. und Mader, C.W., "Speed of sound in pure water," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 52, pp. 1442-1446, 1972.

- [25] Dunn,F., Tanaka,M., Ohtsuki,S., und Saijo,Y., "Ultrasonic Tissue Characterization," 1996.
- [26] Eckhardt,I., Hennig,S., Syrowatka,F., Gerlach,R., und Hein,H.J., "Mechanische Veränderungen des Knochens nach Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen," *Radiologe*, vol. 41, pp. 695-699, 2001.
- [27] Engelke,K., Grampp,S., Gluer,C.C., Jergas,M., Yang,S.O., und Genant,H.K., "Significance of QCT bone mineral density and its standard deviation as parameters to evaluate osteoporosis," *J. Comput. Assist. Tomogr.*, vol. 19, pp. 111-116, 1995.
- [28] Engelke,K., Song,S.M., Gluer,C.C., und Genant,H.K., "A digital model of trabecular bone," *J. Bone Miner. Res.* , vol. 11, pp. 480-489, 1996.
- [29] Ford,J.C. und Wehrli,F.W., "In vivo quantitative characterization of trabecular bone by NMR interferometry and localized proton spectroscopy," *Magn. Reson. Med.*, vol. 17, pp. 543-551, 1991.
- [30] Gardner,T.N., Elliott,J.C., Sklar,Z., und Briggs,G.A., "Acoustic microscope study of the elastic properties of fluorapatite and hydroxyapatite, tooth enamel and bone," *J. Biomech.*, vol. 25, pp. 1265-1277, 1992.
- [31] Genant,H.K., Engelke,K., Fuerst,T., Gluer,C.C., Grampp,S., Harris,S.T., Jergas,M., Lang,T., Lu,Y., Majumdar,S., Mathur,A., und Takada,M., "Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 11, pp. 707-730, 1996.
- [32] Gracewski,S.M., Waag,R.C., und Schenk,E.A., "High-frequency attenuation measurements using an acoustic microscope," *J. Acoust. Soc. Amer.*, vol. 83, pp. 2405-2409, 1988.
- [33] Grill,W., Hillmann,K., Würz,U., und Wesner,J., "Scanning Ultrasonic Microscopy with Phase Contrast," in *Advances in Acoustic Microscopy, Vol. 2*, Briggs, G. A. and Arnold, W. (eds.) New York: Plenum Press, pp. 167-218, 1996.
- [34] Gudziol,S., "Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der Verteilung der akustischen Impedanz in Schnitten menschlicher Gehörknöchelchen."

- Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- [35] Gudziol,S., Haberland,E.J., Brandt,J., Klemenz,A., Raum,K., und Berghaus,A., "Scanning acoustic microscopy (SAM) of the human auditory ossicles," *Laryngo-Rhino-Otology*, vol. 79, Suppl. 1, p. 96, 2000.
- [36] Haberland,E.J., Gudziol,S., Klemenz,A., Raum,K., Brandt,J., und Mir-Salim,P., "High-frequency scanning acoustic microscopy in middle ear research," *Laryngo-Rhino-Otology*, vol. 79 Suppl. 1, p. 98, 2000.
- [37] Haenel,V., "Measurement of sound velocity and thickness of thin samples by time-resolved acoustic microscopy," *J. Appl. Phys.*, vol. 84, pp. 668-670, 1998.
- [38] Haenel,V. und Kleffner,B., "Double focus technique for simultaneous measurement of sound velocity and thickness of thin samples using time-resolved acoustic microscopy," in *Acoustical Imaging*. Lee, H. (ed.), New York, Plenum Press, pp. 187-192, 2000.
- [39] Hasegawa,K., Turner,C.H., und Burr,D.B., "Contribution of collagen and mineral to the elastic anisotropy of bone," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 55, pp. 381-386, 1994.
- [40] Hasegawa,K., Turner,C.H., Recker,R.R., Wu,E., und Burr,D.B., "Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy," *Bone*, vol. 16, pp. 85-90, 1995.
- [41] Hearmon,R.F.S., *An introduction to Applied Anisotropic Elasticity*. Oxford, 1961.
- [42] Hein,H.J. und Engler,T., "Estimating the elastic anisotropy of bone by $V(z)$ measurements," *Biomed. Tech.*, vol. 42 Suppl, pp. 87-88, 1997.
- [43] Hirsekorn,S., Pangraz,S., Weides,G., und Arnold,W., "Measurement of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 67, pp. 745-747, 1995.
- [44] Hirsekorn,S., Pangraz,S., Weides,G., und Arnold,W., "Erratum: Measurement of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 69, pp. 2138-2138, 1996.

- [45] Hoffler,C.E., Moore,K.E., Kozloff,K., Zysset,P.K., Brown,M.B., und Goldstein,S.A., "Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli," *Bone*, vol. 26, pp. 603-609, 2000.
- [46] Hughes,E.R., Leighton,T.G., Petley,G.W., und White,P.R., "Ultrasonic propagation in cancellous bone: a new stratified model," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 25, pp. 811-821, 1999.
- [47] Jaffré,B., Raum,K., Brandt,J., Klemenz,A., Netter,P., Laugier,P., und Saied,A., "Assessment of changes occurring in subchondral bone during rat skeletal maturation using 400 MHz quantitative ultrasound," *Proc. ASBMR*, vol. 24, im Druck, 2002.
- [48] Jamsa,T., Rho,J.Y., Fan,Z., MacKay,C.A., Marks,S.C., Jr., und Tuukkanen,J., "Mechanical properties in long bones of rat osteopetrotic mutations," *J. Biomech.*, vol. 35, pp. 161-165, 2002.
- [49] Katz,J.L., Bumrerraj,S., Dreyfuss,J., Wang,Y., und Spencer,P., "Micromechanics of the dentin/adhesive interface," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, pp. 366-371, 2001.
- [50] Katz,J.L. und Meunier,A., "Scanning acoustic microscope studies of the elastic properties of osteons and osteon lamellae," *J. Biomech. Eng.*, vol. 115, pp. 543-548, 1993.
- [51] Katz,J.L. und Meunier,A., "Scanning Acoustic Microscopy of human and canine cortical bone microstructure at high frequencies," *Stud. Health Technol. Inform.*, vol. 40, pp. 123-137, 1997.
- [52] Kim,T.J. und Grill,W., "Determination of the velocity of ultrasound by short pulse switched sinusoidal excitation and phase-sensitive detection by a computer-controlled pulse-echo system," *Ultrasonics*, vol. 36, pp. 233-238, 1998.
- [53] Kino,G.S., *Acoustic Waves: Devices, Imaging and Analog Signal Processing*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, Inc., 1987.
- [54] Kinsler,L.E., *Fundamentals of acoustics*. 4 ed., New York, Wiley, 2000.

- [55] Kolosov,O.V., Levin,V.M., Maev,R.G., und Senjushkina,T.A., "The use of acoustic microscopy for biological tissue characterization," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 13, pp. 477-483, 1987.
- [56] Lang,T., Augat,P., Majumdar,S., Ouyang,X., und Genant,H.K., "Noninvasive assessment of bone density and structure using computed tomography and magnetic resonance," *Bone*, vol. 22, pp. 149-153, 1998.
- [57] Lees,S. und Klopholz,D.Z., "Sonic velocity and attenuation in wet compact cow femur for the frequency range 5 to 100 MHz," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 18, pp. 303-308, 1992.
- [58] Leisk,G.G. und Saigal,A., "Digital computer algorithms to calculate ultrasonic wave speed," *Materials Evaluation*, vol. 6, pp. 840-843, 1996.
- [59] Lemons,R.A. und Quate,C.F., "Acoustic microscope - scanning version," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 24, pp. 163-165, 1974.
- [60] Lim,J.S., *Two-Dimensional Signal and Image Processing*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, pp. 536-540, 1990.
- [61] Maev,R.G., Denisova,L.A., Maeva,E.Y., und Denisov,A.A., "New data on histology and physico-mechanical properties of human tooth tissue obtained with acoustic microscopy," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 28, pp. 131-136, 2002.
- [62] Maev,R.G. und Levin,V.M., "Principles of local sound velocity and attenuation measurements using transmission acoustic microscope," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 44, pp. 1224-1231, 1997.
- [63] Maev,R.G. und Maslov,K.I., "Temperature effects in the focal region of the acoustic microscope," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 38, pp. 166-171, 1991.
- [64] Majumdar,S., Newitt,D., Jergas,M., Gies,A., Chiu,E., Osman,D., Keltner,J., Keyak,J., und Genant,H.K., "Evaluation of technical factors affecting the quantification of trabecular bone structure using magnetic resonance imaging," *Bone*, vol. 17, pp. 417-430, 1995.
- [65] Mason,W.P. und Thurston,R.N., *Physical Acoustics*. Academic Press, 1982.

- [66] Meunier,A., Riot,O., Christel,P., und Katz,J.L., "Characterization of local anisotropic elastic properties of femoral and tibial diaphysis using acoustic transmission measurements and acoustic microscopy," in *Interfaces in medicine and mechanics II*, Middleton, T. J. and Palotti, G. (eds.) London: Elsevier Applied Science, pp. 454-463, 1991.
- [67] Morse,P.M. und Ingard,K.U., *Theoretical acoustics* Princeton, NJ: University Press, 1987.
- [68] Oliver,W.C. und Pharr,G.M., "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments," *J. Mat. Res.*, vol. 7, pp. 1564-1583, 1992.
- [69] Oppenheim,A.V. und Schafer,R.W., *Discrete-Time Signal Processing*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, pp. 311-312, 1989.
- [70] Parks,T.W. und Burrus,C.S., *Digital Filter Design*. New York, 1987.
- [71] Peck,S.D., Rowe,J.M., und Briggs,G.A., "Studies on sound and carious enamel with the quantitative acoustic microscope," *J. Dent. Res.*, vol. 68, pp. 107-112, 1989.
- [72] Pidaparti,R.M., Chandran,A., Takano,Y., und Turner,C.H., "Bone mineral lies mainly outside collagen fibrils: predictions of a composite model for osteonal bone," *J. Biomech.*, vol. 29, pp. 909-916, 1996.
- [73] Pierce,A.D., *Acoustics: an introduction to its physical principals and applications*. New York, McGraw-Hill, 1981.
- [74] Raum,K., Brandt,J., Klemenz,A., und Cobet,U., "Quantitative Akustische Rastermikroskopie zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften von kortikalem Knochengewebe," *Tagungsband Medizinische Physik*, pp. 199-200, 1998.
- [75] Raum,K., Brandt,J., Klemenz,A., und Cobet,U., "Advanced measurement techniques for a quantitative characterization of the microstructure of bone using a scanning acoustic microscope," in *Proc. ICCE*, pp. 691-692, 1999.
- [76] Raum,K., Brandt,J., Klemenz,A., und Cobet,U., "Quantitative Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der akustischen Impedanz von kortikalem Knochengewebe," *Z. Med. Phys.*, vol. 9, pp. 246-253, 1999.

- [77] Raum,K., Cobet ,U., Smitmans,L., und Brandt,J., "Quantitative Scanning Acoustic Microscopy of Cortical Bone Using a Multi Layer Analysis Method," in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.*, pp. 593-596, 1999.
- [78] Raum,K., Jenderka,K.V., Klemenz,A., und Brandt,J., "Multi layer analysis - quantitative scanning acoustic microscopy for tissue characterization at a microscopic scale," zur Publikation eingereicht in *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, 2002.
- [79] Raum,K. und O'Brien,W.D., "Pulse-echo field distribution measurement technique for high-frequency ultrasound sources," *Proc. IEEE Ultrason. Symp.*, pp. 1747-1750, 1997.
- [80] Raum,K. and O'Brien,W.D., "Pulse-echo field distribution measurement technique for high-frequency ultrasound sources." *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 44, pp. 810-815, 1997.
- [81] Rho,J.Y., "An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone," *Ultrasonics*, vol. 34, pp. 777-783, 1996.
- [82] Rho,J.Y., Currey,J.D., Zioupos,P., und Pharr,G.M., "The anisotropic Young's modulus of equine secondary osteones and interstitial bone determined by nanoindentation," *J. Exp. Biol.*, vol. 204, pp. 1775-1781, 2001.
- [83] Rho,J.Y., Mishra,S.R., Chung,K., Bai,J., und Pharr,G.M., "Relationship between ultrastructure and the nanoindentation properties of intramuscular herring bones," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 29, pp. 1082-1088, 2001.
- [84] Rho,J.Y., Roy,M.E., Tsui,T.Y., und Pharr,G.M., "Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, pp. 48-54, 1999.
- [85] Rho,J.Y., Zioupos,P., Currey,J.D., und Pharr,G.M., "Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation," *Bone*, vol. 25, pp. 295-300, 1999.

- [86] Rho,J.Y., Zioupos,P., Currey,J.D., und Pharr,G.M., "Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation," *J. Biomech.*, vol. 35, pp. 189-198, 2002.
- [87] Riede,U., Hein,H.J., Eysel,P., und Reichel,H., "Elastomechanische Eigenschaften des diaphysären Knochens nach Kallusdistraktion: Eine Untersuchung an der Schafttibia mit dem akustischen Rastermikroskop," *Osteologie*, vol. 9, pp. 103-113, 2000.
- [88] Saijo,Y., Tanaka,M., Okawai,H., Sasaki,H., Nitta,S.I., und Dunn,F., "Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 23, pp. 77-85, 1997.
- [89] Sasaki,H., Saijo,Y., Tanaka,M., Nitta,S.I., Terasawa,Y., Yambe,T., und Taguma,Y., "Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 12, pp. 2151-2154, 1997.
- [90] Sasaki,H., Saijo,Y., Tanaka,M., Nitta,S.I., Yambe,T., und Terasawa,Y., "Characterization of renal angiomyolipoma by scanning acoustic microscopy," *J. Path.*, vol. 181, pp. 455-461, 1997.
- [91] Schoenberg M., "Wave propagation in alternating solid and fluid layers," *Wave Motion*, vol. 6, pp. 303-320, 1999.
- [92] Schwinger,C., Klemenz,A., Raum,K., Koch,S., Rainov,N., und Kressler,J., "Comparison of different encapsulation strategies for living cells and mechanical characterization of microspheres by scanning acoustic microscopy," *Proceedings of the workshop "Practical Aspects of Encapsulation Technologies"*, im Druck, 2002.
- [93] Sebag,G.H. und Moore,S.G., "Effect of trabecular bone on the appearance of marrow in gradient-echo imaging of the appendicular skeleton," *Radiology*, vol. 174, pp. 855-859, 1990.
- [94] Shieh,S.J., Zimmerman,M.C., und Langrana,N.A., "The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodeling study," *J. Biomech. Eng.*, vol. 117, pp. 286-292, 1995.
- [95] Skudrzyk,E., *The foundations of acoustics*. Wien, Springer, 1971.

- [96] Smitmans,L., Raum,K., Brandt,J., und Klemenz,A., "Variations in the microstructural acousto-mechanical properties of cortical bone revealed by a quantitative acoustic microscopy study," in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.*, pp. 1379-1382, 2001.
- [97] Stein,M., "Scanning Acoustic Microscope: Programmierung eines akustischen Rastermikroskops zur quantitativen, zeitaufgelösten Akquisition, Visualisierung und Analyse von hochfrequenten Puls-Echo-Daten." Diplomarbeit, Fachhochschule Merseburg, FB Informatik und Angewandte Naturwissenschaften, 2000.
- [98] Strelitzki,R., Clarke,A.J., und Evans,J.A., "The measurement of the velocity of ultrasound in fixed trabecular bone using broadband pulses and single-frequency tone bursts," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, pp. 743-753, 1996.
- [99] Su,X.W., Feng,Q.L., Cui,F.Z., und Zhu,X.D., "Microstructure and micromechanical properties of the mid-diaphyses of human fetal femurs," *Conn. Tissue Res.*, vol. 36, pp. 271-286, 1997.
- [100] Sutilov,V.A., *Physik des Ultraschalls*. Berlin, Akademie-Verlag, 1984.
- [101] Takano,Y., Turner,C.H., und Burr,D.B., "Mineral anisotropy in mineralized tissues is similar among species and mineral growth occurs independently of collagen orientation in rats: results from acoustic velocity measurements," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 11, pp. 1292-1301, 1996.
- [102] Takano,Y., Turner,C.H., Owan,I., Martin,R.B., Lau,S.T., Forwood,M.R., und Burr,D.B., "Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependent on the mechanical strain distribution," *J. Orthop. Res.*, vol. 17, pp. 59-66, 1999.
- [103] Turner,C.H., Chandran,A., und Pidaparti,R.M., "The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications," *Bone*, vol. 17, pp. 85-89, 1995.
- [104] Turner,C.H., Rho,J.Y., Takano,Y., Tsui,T.Y., und Pharr,G.M., "The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques," *J. Biomech.*, vol. 32, pp. 437-441, 1999.

- [105] Van Buskirk,W.C., Cowin,S.C., und Ward,R.N., "Ultrasonic measurement of orthotropic elastic constants of bovine femoral bone," *J. Biomech. Eng.*, vol. 103, pp. 67-72, 1981.
- [106] Wagner,H.D. und Weiner,S., "On the relationship between the microstructure of bone and its mechanical stiffness," *J. Biomech.*, vol. 25, pp. 1311-1320, 1992.
- [107] Wehrli,F.W., Ford,J.C., Attie,M., Kressel,H.Y., und Kaplan,F.S., "Trabecular structure: preliminary application of MR interferometry," *Radiology*, vol. 179, pp. 615-621, 1991.
- [108] Wehrli,F.W., Ford,J.C., und Haddad,J.G., "Osteoporosis: clinical assessment with quantitative MR imaging in diagnosis," *Radiology*, vol. 196, pp. 631-641, 1995.
- [109] Wehrli,F.W., Hwang,S.N., Ma,J., Song,H.K., Ford,J.C., und Haddad,J.G., "Cancellous bone volume and structure in the forearm: noninvasive assessment with MR microimaging and image processing," *Radiology*, vol. 206, pp. 347-357, 1998.
- [110] Weiner,S., Traub,W., und Wagner,H.D., "Lamellar bone: structure-function relations," *J. Struct. Biol.*, vol. 126, pp. 241-255, 1999.
- [111] Weiner,S. und Wagner,H.D., "The material bone: Structure mechanical function relations," *Ann. Rev. Mat. Sci.* , vol. 28, pp. 271-298, 1998.
- [112] Yu,Z.L. und Boseck,S., "Scanning acoustic microscopy and its applications to material characterization," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 67, pp. 863-891, 1995.
- [113] Zimmerman,M.C., Meunier,A., Katz,J.L., und Christel,P., "The evaluation of cortical bone remodeling with a new ultrasonic technique," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 37, pp. 433-441, 1990.
- [114] Zimmerman,M.C., Prabhakar,A., Chokshi,B.V., Budhwani,N., und Berndt,H., "The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 28, pp. 931-938, 1994.
- [115] Ziv,V., Wagner,H.D., und Weiner,S., "Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone," *Bone*, vol. 18, pp. 417-428, 1996.

- [116] Zoller,J., Brandle,K., und Bereiter-Hahn,J., "Cellular motility in vitro as revealed by scanning acoustic microscopy depends on cell-cell contacts," *Cell Tissue Res.*, vol. 290, pp. 43-50, 1997.
- [117] Zysset,P.K., Guo,X.E., Hoffler,C.E., Moore,K.E., und Goldstein,S.A., "Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur," *J. Biomech.*, vol. 32, pp. 1005-1012, 1999.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Cobet, der bis zu seinem unerwarteten Tod im April 2000 die Arbeit betreut hat, verdanke ich neben der Überlassung des Themas eine Vielzahl an wertvollen Hinweisen und kritischen Diskussionen. Sein Vertrauen sowie seine beständige, fördernde Unterstützung haben ganz wesentlich dazu beigetragen, dass diese Arbeit fertig gestellt werden konnte. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Reiner Höche danke ich dafür, dass er die Betreuung der Arbeit von Seiten des Fachbereiches Physik übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Jörg Brandt von der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Cornelia Vetter aus dem Labor der Orthopädischen Klinik für ihren Einsatz und ihre Sorgfalt bei der Präparation der Proben.

Die Arbeit wäre ohne die vielseitige Zusammenarbeit mit unseren Partnerinstitutionen nicht denkbar gewesen. Ich danke Dr. Kristian Poulsen für die vielen Lehrstunden in SAM-Technik, Prof. Roman Maev und Alex Denisov für die gemeinsame Entwicklung der Elips-Software und Dipl.-Informatiker Marco Stein für die Programmierung der SAM100-Software. Des weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei den ehemaligen Mitarbeitern der mechanischen und elektrischen Werkstätten des Institutes bedanken, auf deren hochqualifizierte Unterstützung jederzeit Verlass war. Mit unermüdlichem Ehrgeiz haben Lüdger Smitmans, Dr. med. Silke Gudziol und Britta Jaffré mit dem *Multi Layer Analysis* Verfahren unzählige Messungen durchgeführt und somit zur stetigen Weiterentwicklung beigetragen.

Das Interesse am hochfrequenten Ultraschall hat in mir Herr Prof. William D. O'Brien geweckt. Sein Enthusiasmus und seine mitreißende Art haben in mir die Begeisterung für den hochfrequenten Ultraschall geweckt.

Für die kritische Überarbeitung des Manuskriptes bedanke ich mich bei den Herrn Dr. rer. nat. Klaus-Vitold Jenderka und Dr. rer. nat. Andreas Christ.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Kay Raum

Halle, den 8. Mai 2002

LEBENS LAUF

Name: Kay Raum
Geburtsdatum: 01. März 1972
Geburtsort: Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: BRD
Familienstand ledig

Schulbildung

1978-1986 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Bernard Koenen“ in Halle-Neustadt
1986-1988 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Frohe Zukunft“ in Halle/Saale
1988-1990 Erweiterte Oberschule „Thomas Münzer“ in Halle, Abschluss mit Abitur

Zivildienst

1990-1991 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinikum Kröllwitz, Hautchirurgie

Studium

1991-1997 Physikstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss mit Diplom
1995-1996 Visiting Scholar und Research Assistant am Bioacoustics Research Laboratory der University of Illinois at Urbana-Champaign
1997-1999 berufsbegleitendes Studium Medizinische Physik an der Hochschule für Technik und Wirtschaft Mittweida, Abschluss mit Zertifikat

Berufliche Tätigkeit

1997-2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg