

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Zur Bestimmung akusto-elastischer Eigenschaften  
von humanem, kortikalem Knochengewebe  
mit der akustischen Rastermikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ludger Franz Smitmans

geboren am 14.02.1971 in Geldern

Eröffnungsdatum: 04.09.2001

Verteidigungsdatum: 04.12.2002

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hein (Halle/ Saale)

2. Prof. Dr. Ascherl (Leipzig)

3. Prof. Dr. Venbrocks (Jena)

**urn:nbn:de:gbv:3-000004455**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004455>]

Meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet

## Referat

In der vorliegenden Studie werden die anisotropen akustischen Eigenschaften von kortikalem Knochengewebe aus humanem Femurknochen nach Einbettung in Polymethylmethacrylat ermittelt. Dazu werden Knochengewebe von 17 männlichen und 9 weiblichen Sektionsfällen, deren Autopsieberichte keine Vorerkrankungen mit Beteiligung des Knochengewebes beinhalten, mit Hilfe der hoch auflösenden akustischen Rastermikroskopie untersucht. Die Proben werden in Schnittwinkeln von  $0^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $60^\circ$  und  $90^\circ$  zur Horizontalen präpariert, um über die Amplituden der an der Probenoberfläche reflektierten Ultraschallwellen Aussagen zu den richtungsabhängigen akusto-elastischen Eigenschaften des Knochengewebes zu machen. Die verwendete Frequenz von 900 MHz des akustischen Rastermikroskops (SAM 2000, Krämer Scientific Instrument, Herborn) ermöglicht die Signalgewinnung in einer lateralen Auflösung von etwa  $1\ \mu\text{m}$ .

Die Quantifizierung des akustischen Reflexionssignals erfolgt durch eine Bildanalyse der Grauwerte des mit dem Mikroskop erzeugten Bildes, das entsprechend der Signalamplitude des Reflexionssignals jeden gescannten Objektpunkt als Grauwert des zugehörigen Bildpunktes darstellt. Ein zur quantitativen Auswertung an der Orthopädischen Klinik und dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickeltes Verfahren ermöglicht neben der Quantifizierung der Reflexionssignale gleichzeitig eine Artefaktunterdrückung zur Reduzierung von Sekundäreinflüssen, die durch die mechanische Präparation der untersuchten Proben sowie durch wechselnde Umgebungseinflüsse bedingt sind.

Dabei wird eine Beziehung des Reflexionskoeffizienten zur akustischen Impedanz des untersuchten Objektes und des Kopplungsmediums Wasser genutzt, um aus dem Reflexionssignal die akustische Impedanz der untersuchten Proben zu bestimmen. Durch die Bestimmung der akustischen Impedanz ist es möglich, richtungsabhängige Elastizitätsunterschiede des untersuchten Knochengewebes anhand der repräsentativ gewählten Schnittwinkel darzustellen. Weiterhin können geschlechts- und altersspezifische Elastizitätsunterschiede über die akustische Impedanz gemessen werden. Schließlich ermöglicht die hohe Auflösung den Impedanzvergleich histologischer Substrukturen innerhalb einer Ausschnittsfläche von  $500\ \mu\text{m}$  bzw.  $1\ \text{mm}$  des untersuchten Knochengewebes. Die gemessenen richtungsabhängigen akustischen Impedanzen im mikroskopischen Bereich sollen Aufschluss über das elasto-mechanische Verhalten kortikalen Knochens in dieser Dimension liefern und Rückschlüsse auf die makroskopische Elastizität ermöglichen.

Smitmans, Ludger F.: Zur Bestimmung akusto-elastischer Eigenschaften von humanem, kortikalem Knochengewebe mit der akustischen Rastermikroskopie.

Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fakultät, Diss., 65 Seiten, 2002

1	Einleitung .....	1
2	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1	Eigenschaften des kortikalen Knochengewebes.....	3
2.1.1	Modelle der funktionellen Knochenadaption .....	6
2.2	Untersuchungsverfahren zu Knochenstruktur und -mineralgehalt .....	11
2.2.1	Verfahren zur in-vivo-Messung (makroskopische Messungen).....	11
2.2.2	Verfahren zur in-vitro-Messung (mikroskopische Messungen) .....	13
2.2.3	Bild gebende Verfahren .....	13
3	Untersuchungsmaterial und Methodik.....	16
3.1	Die akustische Impedanz.....	16
3.2	Probengewinnung .....	16
3.2.1	Stichproben und Auswahlkriterien.....	16
3.2.2	Probenaufbereitung .....	17
3.2.3	Akustische Eigenschaften des Einbettungsmediums .....	18
3.3	Methodik zur Messung der akustischen Impedanz .....	19
3.3.1	Aufbau und Eigenschaften des akustischen Rastermikroskops.....	19
3.3.2	Kalibrierung des akustischen Mikroskops .....	26
3.3.3	Signalverarbeitung zur Impedanzbestimmung .....	27
3.3.4	Durchführung der Messungen.....	27
4	Ergebnisse .....	29
4.1	Messung der akustischen Impedanz der Proben .....	29
4.2	Impedanzbestimmung über die Gesamtmessfenster .....	29
4.3	Winkelabhängige Impedanzbestimmung .....	30
4.4	Geschlechtsabhängigkeit der Impedanz .....	32
4.5	Altersabhängigkeit der Impedanz.....	33
4.6	Impedanzbestimmung ausgewählter histologischer Strukturen .....	35
4.7	Impedanz bei proximaler und distaler Meßlokalisation .....	38
4.8	Intraindividuellem Impedanzvergleich .....	38
4.9	Impedanzbestimmung in unterschiedlicher Distanz zur Diaphysenmitte .....	39
5	Diskussion .....	40
5.1	Impedanzmessung und Modelle der Knochenmikrostruktur .....	41
5.2	Bewertung des Vergleiches mit mechanischen Belastungsversuchen .....	43
5.3	Geschlechtsspezifische Impedanzuntersuchung .....	44
5.4	Ergebnisse aus Nanoindenterversuchen .....	48
6	Fehlerbetrachtung.....	51
6.1	Dispersion .....	51
6.2	Temperaturänderungen im Kopplungsmedium .....	52
6.3	Bildartefakte durch Luftbläschen im Kopplungsmedium .....	52
6.4	Höhenunterschiede der Probenoberfläche durch Präparationsartefakte .....	52
6.5	Kontrasttiefe der Bildverarbeitung.....	53
6.6	Überlagerung durch Mehrfachechos.....	53
6.7	Sekundärbeeinflussung des Reflexionssignals durch Scherwellen.....	53
6.8	Inhomogenitäten des Knochenmaterials .....	54
6.9	Einbettungsverfahren.....	54
7	Zusammenfassung .....	55
8	Literatur.....	59
9	Thesen.....	65

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

al.	alii
ANOVA	Analysis of variance
BUA	Breitband-Ultraschall-Absorption
C	Steifigkeit
CT	Computer-Tomographie
DXA	Zwei-Spektren-Röntgenabsorptiometrie
E	Elastizitätsmodul (= Young'scher Modul)
GPa	Giga-Pascal
IMPB	Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Kap.	Kapitel
Mrayl	Mega-Rayl
MHz	Mega-Hertz
NA	numerische Apertur
ns	Nanosekunden
PMMA	Polymethylmethacrylat
$P(\theta)$	Pupillenfunktion der Linse
$R(\theta)$	Reflektanzfunktion
QCT	Quantitative Computer-Tomographie
R	Reflexionskoeffizient
RF	rapid frequency
s.	siehe
SAM	scanning acoustic microscope/ scanning acoustic microscopy
SOS	Speed of Sound [Schallgeschwindigkeit]
vgl.	vergleiche
$V(z)$	Amplitudenfunktion für das Reflexionssignal
Z	akustische Impedanz
z	Linse-Probenabstand in Vertikalrichtung
$\lambda$	Wellenlänge der Schallwellen
v	Schallgeschwindigkeit
$\rho$	Massendichte
$\sigma$	Poissonverhältnis
$\theta$	Einschlusswinkel zwischen Wellennormalen und Oberflächennormalen
$\psi_1$	Richtungswinkel zwischen Kristalllängsachse u, Lamellenaußenfläche
$\psi_2$	Richtungswinkel zwischen Kollagenlängsachse und Transversalebene

# 1 Einleitung

In den experimentellen Untersuchungen von Knochengewebe richtet sich das Interesse neben der Erfassung makroskopischer und mikroskopischer Strukturmerkmale zunehmend auf seine funktionellen und mechanischen Eigenschaften, über die es nur wenige Aussagen auf mikroskopischer Ebene gibt. Die Entwicklung von biokompatiblen Implantatwerkstoffen sowie die Notwendigkeit einer frühzeitigen Erfassung pathologischer Veränderungen, die die mechanische Knochenstabilität beeinflussen können, erfordern die Quantifizierung von elastomechanischen Eigenschaften des Knochens im mikroskopischen Bereich.

Eine Quantifizierung der elastomechanischen Eigenschaften am gesunden Knochen führt zu einer Datengrundlage, die man nutzen kann, um anhand von Abweichungen zu diesen Referenzwerten Skelettveränderungen bei Risikogruppen mit einem erhöhten Frakturrisiko frühzeitig erkennen zu können.

Die bisherigen, vor allem aus der Werkstoffprüfung übernommenen Verfahren zur Ermittlung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochen beruhen weitgehend auf mechanischen Belastungstests, welche die Kräftewirkungen am Knochen durch Einwirkung von Verformungsarbeit messen und in-vitro die Resistenz des Knochenmaterials gegenüber provozierten Frakturgeschehnissen beurteilen. Diese mechanischen Tests zur Wirkung von Biege- und Torsionsbelastungen sind an die Verwendung von Proben einer Größe von mehreren Millimetern gebunden; ihre Resultate werden durch die Art der Probenherstellung und die Probengröße sehr stark beeinflusst. Außerdem sind die angewendeten Prüfverfahren aus der Werkstoffkunde nur bedingt aussagekräftig im Hinblick auf die Beurteilung der mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe [2, 9, 54, 76].

Die in der Literatur beschriebenen mechanischen Knocheneigenschaften in mikroskopischer Dimension wurden bis zur Auflösung von 400 nm durch Härtebestimmungen mit dem Nanoindenter-Verfahren ermittelt [30, 60, 62, 63, 76, 87, 89]. Die Mikrohärtigkeit gilt als ein Parameter für die Beurteilung des plastischen Deformationsverhaltens des Knochengewebes, der Elastizitätsmodul für dessen elastisch-reversibles Verhalten. Die Aussage dieser beiden Parameter ist wegen der Heterogenität des Knochengewebes nur repräsentativ für die jeweils untersuchten Anteile der Gewebsprobe. In den aufgeführten Studien unter Verwendung von Nanoindentern wurde die mechanische Anisotropie auf Lamellenebene bislang nicht durch eine richtungsabhängige Betrachtung berücksichtigt, die Mikrohärtigkeit wurde lediglich aus Mehrfachmessungen an gleicher Stelle als Mittelwert [30] oder an unterschiedlichen Positionen im Transversalquerschnitt eines einzelnen Osteons bestimmt [62].

Auch mit radiologischen Verfahren sind direkte Messungen elastomechanischer Eigenschaften nicht möglich. Quantitative Werte können bislang nur indirekt mit Elastizitätskonstanten aus anderen Untersuchungsverfahren errechnet werden, die jedoch nach Sasaki et al. [67] noch nicht in ausreichender Form für unterschiedliche Richtungen des anisotropen Knochenmaterials bestimmt wurden.

Als nicht-destruktive und daher beliebig wiederholbare Untersuchungstechnik ist die akustische Rastermikroskopie, die vor etwa 40 Jahren zunächst für die Werkstoffprüfung in der industriellen Produktion entwickelt wurde, seit etwa 15 Jahren zu experimentellen Untersuchungen an nativen biologischen Geweben verwendet worden. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an Knochengewebe mit dieser Technik beruhen vorwiegend auf der Bestimmung von Laufzeiten des Ultraschalls im Präparat [29], um mit unterschiedlichen Laufzeiten bei bekannter Laufstrecke auf das anisotrope elasto-mechanische Verhalten von Teilarealen des Knochens Rückschlüsse ziehen zu können [55, 77].

Die hierarchische Strukturebene der Osteonenlamelle stellt gemäß früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen die mechanische Basiseinheit des kortikalen Knochengewebes dar und hat die größte Bedeutung für die Bestimmung der individuellen mechanischen Knocheneigenschaften [82]. Bislang wurden am humanen Knochen Untersuchungen bis zu einer Auflösung von  $1,7\ \mu\text{m}$  mit der Ultraschallmikroskopie durchgeführt [39, 40]. Untersuchungen zur mechanischen Anisotropie in anderen als den drei Orthogonalrichtungen fanden bislang nur am tierischen Knochenmodell des Hundes [55, 77] mit relativ niedrigen Schallfrequenzen von 50 MHz und daher mit vergleichsweise geringer Auflösung statt.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die anisotropen elastomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes durch eine Bestimmung der akustischen Impedanz von humanen Leichenfemora in unterschiedlichen Richtungen zur Femurlängsachse zu erfassen. An 17 männlichen und 9 weiblichen Sektionsfällen wurde der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die akustische Impedanz analysiert. Neben der richtungs-, geschlechts- und altersabhängigen Impedanzbeurteilung werden die elastomechanischen Eigenschaften mikroskopischer Substrukturen in der Dimension weniger Lamellen sowie die Eigenschaften einzelner Osteone und umliegender, hoch und niedrig mineralisierter Gewebsregionen untersucht. Die Untersuchung soll der quantitativen Beschreibung der anisotropen Elastizitätseigenschaften von humanem Knochengewebe dienen, um aus den gefundenen Daten mit Hilfe der gemessenen elastischen Parameter die bestehenden theoretischen Modelle zur Beschreibung des mechanischen Knochenverhaltens zu ergänzen und eine genauere Beschreibung der Biomechanik und Mikrostruktur von kortikalem Knochen zu ermöglichen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Eigenschaften des kortikalen Knochengewebes

Das kortikale Knochengewebe des Menschen wird wegen seiner erst in späteren embryologischen Entwicklungsabschnitten ausgebildeten hierarchischen Struktur als sekundärer Knochen bezeichnet. Dieser geht nach Umbildungsvorgängen aus einer transienten, weniger strukturierten Vorstufe, dem Geflechtknochen hervor. Typisch für den kortikalen Knochen ist der Aufbau aus Lamellenstrukturen und darin verlaufenden Gefäßverbindungen. Lamellen sind voneinander abgrenzbare Laminae der Knochensubstanz mit einer Dicke von 3 - 7  $\mu\text{m}$  und werden als Verbund von drei bis 20 weiteren Lamellen, den so genannten Speziallamellen, konzentrisch um einen zentralen Gefäßkanal angeordnet. Sie entstehen durch eine gerichtete Ablagerung von Kollagenfasern in der Umgebung von Osteozyten, die konzentrisch um den Zentralkanal liegen. Dadurch bilden sie eine Funktionseinheit des kortikalen Knochens, die als Osteon oder Havers'sches System bezeichnet wird. Eine Kittsubstanz (Linea cementalis) grenzt jedes Osteon nach peripher zum interstitiellen Gewebe aus Schaltlamellen hin ab. Der Zentralkanal der Osteone ist ca. 20 - 300  $\mu\text{m}$  dick und wird durch quer verlaufende Gefäße in den so genannten Volkmann-Kanälen mit der inneren und äußeren Oberfläche des Knochens (Endost und Periost) sowie mit anderen Osteonen verbunden [36].

Die Osteozyten sorgen für eine ständige strukturelle und metabolische Anpassung des Knochengewebes an die funktionellen und metabolischen Ansprüche des Körpers. Sie haben die Funktion, die Knochenmatrix als Grundgerüst des Knochengewebes zu erhalten und übernehmen nach Umwandlung aus Osteoblasten eine anabole Funktion. Die Osteoblasten sind mit einer Mantelschicht aus interstitieller Substanz umgeben. Diese interstitielle Substanz ist das Osteoid, in das nachfolgend mit zunehmendem Alter des Gewebes Hydroxylapatitkristalle eingelagert werden. Diese Hydroxylapatitkristalle bestehen aus Kalziumphosphatverbindungen ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; Größe ca. 20 x 5 x 1,5 nm) und formen Raumgitterstrukturen. Nach Junqueira [36] liegt dieses Hydroxylapatit in hexagonaler räumlicher Anordnung in stabförmiger Gestalt vor, während andere Autoren die Kristalle hauptsächlich als flache, lange Plättchen ansehen [75].

Die genannten Osteoblasten haben im Mineralstoffwechsel des Knochens neben ihrer anabolen Funktion die Aufgabe zur Speicherung von Kalziumphosphaten in protein- und glykoproteingebundener Form als körpereigene Reserve. Knochen besteht zu 50 bis 69 % aus Mineralen, wovon etwa die Hälfte durch anorganisches Phosphat, 35 % durch Kalzium und weitere 6 - 7 % durch Zitrat und Karbonat abgedeckt werden. Der Rest besteht aus



Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelementen. Etwa 22 bis 25 % des Knochens bestehen aus organischem Material, an dem Kollagen vom Typ I als Grundgerüst den größten Anteil mit 90 – 96 % stellt [74]. Die übrigen organischen Komponenten werden aus Osteonektin (ein Phosphoprotein), Osteocalcin, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (Chondroitin-4-sulfat; Chondroitin-6-sulfat; Keratansulfat, Hyaluronsäure) aufgebaut. Proteoglycane binden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen; Glycosaminoglycane binden Wassermoleküle, wodurch der Knochen seine hohe Druckfestigkeit erhält. Im Gleichgewicht enthält die Knochensubstanz zu 9 - 25 % Wasser, das vor allem als Hydratationsmantel die Hydroxylapatitkristalle umgibt. Seine Zugfestigkeit wird dem Knochen in erster Linie durch Proteinverbindungen zwischen Kollagenfasern und der Mineralphase aus Hydroxylapatit verliehen [38].

Die Hydroxylapatitkristalle sind nach Weiner und Wagner [82] in Längsrichtung innerhalb von Kollagenfasern mit ovalem Querschnitt von 80 – 100 nm eingelagert. Von diesen Kristallen liegen ca. 25% in Abständen von 60 - 70 nm in 45 nm langen Lücken zwischen den streng parallel ausgerichteten und je um eine viertel Faserlänge gegeneinander versetzten Kollagenfibrillen. Die anderen 75 % der Kristalle ordnen sich nach Pidaparti et al. [55] frei in paralleler Ausrichtung seitlich zu den Kollagenfasern an. Nach Hasegawa [28] wird die Orientierung der freien Kristalle vermutlich infolge der einwirkenden mechanischen Knochenbelastung unabhängig von der Kollagenstruktur bestimmt, während die Richtung der interfibrillär gelegenen Kristalle durch den Richtungsverlauf des Kollagens vorgegeben ist.

Anhand von Schallgeschwindigkeitsmessungen bei 50 MHz im Transmissionsverfahren an Hundefemora in Axial- und Transversalrichtung vor und nach einer Demineralisation bzw. Mazeration des Knochengewebes stellten Hasegawa et al. [28] die These auf, dass allein die extrafibrillären Kristalle entsprechend der dominierenden Krafteinwirkung auf den Knochen ausgerichtet und zum größten Teil für dessen elastische Anisotropie verantwortlich sind, während die Kollagenkomponente keine bevorzugte Verlaufsrichtung besitzt und nur wenig zur Anisotropie beiträgt. Dieser letzte Aspekt wurde inzwischen von Turner et al. [77] aus der gleichen Arbeitsgruppe korrigiert, da die Autoren, wie an anderer Stelle beschrieben, in späteren Versuchen die Anisotropie auch für Kollagen festgestellt haben.

Die Stoffwechselleistung im kortikalen Knochen ist geringer als im Geflecht- oder spongiösen Knochen. Kortikaler Knochen macht 80 % des Skelettvolumens aus, ist aber am Stoffwechsel des gesamten menschlichen Knochengewebes nur zu 50 % beteiligt. Insgesamt wird die hohe Stoffwechselleistung des Knochengewebes durch seine gute Durchblutung gewährleistet. Die Gefäße in den Zentralkanälen der Havers'schen Systeme stehen an

der inneren Osteonbegrenzung in Kontakt mit den durch die Lamellenschichten nach peripher ziehenden Knochenkapillaren. Die Osteozyten sind ebenfalls durch zahlreiche Fortsätze miteinander verbunden und ernähren über diese Fortsätze die peripher liegenden Zellen aus den Zentralgefäßen. Zwischen Plasmalemm der Osteozyten und umgebender Knochenmatrix verbleibt ein kleiner, mit Flüssigkeit gefüllter Raum, der wahrscheinlich zusätzlich dem Stofftransport im Knochen dient.

Die großen Gefäße des Röhrenknochens verlaufen vor allem im Bereich von Endost und Periost, was zur Folge hat, dass Umbauprozesse in erster Linie an den endostalen bzw. periostalen Oberflächen des kortikalen Knochens erfolgen [14]. Der Umbau mit ständiger Resorption und nachfolgender Ablagerung neuer Knochensubstanz wird als Remodeling bezeichnet und erfolgt beim gesunden kortikalen Extremitätenknochen am stärksten im subperiostalen Bereich. Es werden dabei zylindrische Resorptionskanäle parallel zur Längsachse des Schaftes angelegt und nach einer amorphen Interimsphase mit konzentrisch geschichtetem, lamellärem Knochen aufgefüllt.

Eine Dehnung des Knochens in Längsrichtung in der Größenordnung von 0,2 - 0,3 % führt vor allem im subperiostalen Bereich intrazellulär zu einer Aktivierung der Phospholipase. Dadurch wird im Osteoblast ein Anstieg von Inositoltriphosphat induziert, der eine verstärkte Syntheseleistung der Osteoblasten bewirkt und die Mineralisation fördert [12]. Das ständige Remodeling führt zur Ausbildung eines mosaikartigen Musters aus Fragmenten von Osteonen verschiedener Generationen. Nach einem partiellen Abbau von Lamellen durch die Aktivität der Osteoklasten verbleiben als Folge des Remodelings Fragmente von älteren Osteonen als so genannte Schaltlamellen (*Lamellae interstitiales*) zwischen jüngeren Speziallamellen. Schaltlamellen zeichnen sich in Abhängigkeit von ihrem Alter durch einen höheren Mineralisationsgrad aus [36]. Im kortikalen Knochen schließen ganz außen und innen einhüllende Generallamellen das Gewebe zum Periost bzw. Endost hin ab.

Bei fehlender funktioneller Beanspruchung überwiegen im Knochenmetabolismus katabole Umbauprozesse: Osteoklasten bauen das Knochengewebe verstärkt ab, das Remodeling führt dann zu einem Umbau mit negativer Substanzbilanz. Osteoklasten wirken außerdem an der Homöostase des Mineralhaushaltes mit und werden bei Kalziummangel im Serum und bei Erhöhung des Parathormons im Serum zur Mobilisation von Kalzium aus der Knochensubstanz aktiviert.

### 2.1.1 Modelle der funktionellen Knochenadaptation

Das humane Femur zählt zu den langen Röhrenknochen und hat durch den aufrechten Gang des Menschen den Hauptanteil des Körpergewichtes zu tragen. Es wird nach Li und Aspden [43] durch diese funktionelle Belastung in seiner Struktur beeinflusst. Nach Ascenzi [2] ist die Kräfteverteilung im Femurschaft eng korreliert mit der Gewebetextur im mikrostrukturellen Bereich, da die Kollagenfaseranordnung das biomechanische Verhalten der Osteone gegenüber einwirkenden Zug- und Kompressionskräften bestimmt und sich in optimaler Ausrichtung an die vorherrschend einwirkenden Kräfte anpasst.

Die biomechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens werden maßgeblich durch die Anordnung und Struktur der Lamellen bestimmt. Im Femur sind die Kollagenfasern benachbarter Lamellen so ausgerichtet, dass sie gegeneinander einen Winkel einschließen, der je nach Lokalisation und funktioneller Beanspruchung des Knochens variieren kann und über dessen Betrag zwischen benachbarten Lamellen unterschiedliche Vorstellungen bestehen:

Nach der Auffassung von Ascenzi [2] treten horizontal angeordnete Kollagenfasern in Bereichen von axial wirkenden Kompressions- und Torsionskräften auf, während die Zugkräfte in Longitudinalrichtung bei Biegeblastung des Femurs zu einer longitudinal-parallelen Ausrichtung der Kollagenfasern führen. Die Zugfestigkeit der Tripel-Helix-Struktur der Kollagenfasern in Longitudinalrichtung wird dabei insbesondere durch Querverbindungen aus Glycin-Resten zwischen den Kollagenmonomeren erreicht.

Durch in-vivo-Untersuchungen an Radiusknochen von Hunden haben Takano et al. [71] mit verschiedenen bildgebenden Verfahren gezeigt, dass die von Ascenzi festgestellten Zusammenhänge zwischen Kollagenfaserorientierung und der damit verbundenen Anisotropie in der Hauptsache eine Folge der Einwirkung von Zugkräften in Longitudinalrichtung des Knochens sind. Eine induzierte Zunahme von Zugkräften durch eine veränderte mechanische Belastung nach definierter Osteotomie an vorgegebener Lokalisation des Hunderadius führte in polarisationsmikroskopischen Untersuchungen und in der akustischen Rastermikroskopie zu einer gleichartigen Zunahme des Anisotropieverhältnisses in nativen sowie in demineralisierten Vergleichsproben des Hundeknochens, so dass von den Autoren der Anisotropiezuwachs in erster Linie als Eigenschaft der Kollagenfasern angesehen wurde, was auf Remodelingprozesse im Kollagen als Ursache für die Anisotropieerhöhung hinweist. Nach Takano et al. [73] entstehen aber auch durch einen Teil der Kristalle im Gewebsverbund anisotrope elastische Eigenschaften. Dieses anisotrope Verhalten wurde von ihnen durch Messungen an dekollagenisierten Proben gezeigt.

Weiterhin haben auch Riggs et al. [64] den Zusammenhang von Richtungsverläufen der Kollagenkomponente des Knochens und seiner mechanischen Belastung am Tiermodell untersucht und festgestellt, dass der Knochen vom Pferde-Radius an der am stärksten durch Zugkräfte belasteten kranialen Seite einen höheren Anteil longitudinal ausgerichteter Kollagenfasern im Vergleich zu kompressionsbelasteten Knochenarealen besitzt.

Auf die belastungsabhängige Ausrichtung der Kollagenfasern weisen auch Studien von Fratzl et al. [18] hin, die mit dem Verfahren der quantitativen Röntgenstrukturanalyse an Radius-Knochen vom Pferd durchgeführt wurden. Auch diesen Studien zufolge liegen die Kollagenfasern in Bereichen hoher Zugbelastung in Longitudinalrichtung, während durch Kompression belastete Anteile im Diaphysenquerschnitt vorrangig transversal oder schräg ausgerichtete Kollagenfasern haben. Die Autoren gehen davon aus, dass die Mineralkomponente des Knochens, die Hydroxylapatitkristalle, als gebündelte Plättchenformation in Lücken zwischen den hintereinander gelagerten Kollagenfasern liegt und von dort aus nach lateral hin bis auf eine Breite von etwa 3 nm auswächst. Durch die sukzessive Anlagerung von Kristallen in den Zwischenräumen des Kollagens werden neu angelegte Osteone mit zunehmendem Alter fortlaufend weiter kalzifiziert.

Die in Longitudinalrichtung liegenden Hydroxylapatitkristalle haben nach dieser Modellvorstellung eine langgestreckte, stab- oder plättchenartige Form, wobei unter der Annahme einer plättchenartigen Struktur entsprechend der Röntgenstrukturanalyse eine Seite die beiden anderen in ihrer Länge deutlich überragt. Die unter Zugkräften stehenden Kristalle haben einen signifikant höheren Querdurchmesser als die Kristallplättchen innerhalb von kompressionsbelasteten Bereichen.

Die Kollagenfasern sind in diesem Modell im Winkel von  $30^\circ$  zur Längsachse der Osteone angeordnet, während die in kompressionsbelasteten Arealen liegenden Kollagenfasern eine uneinheitliche Ausrichtung besitzen und sich in einem vorherrschenden Winkel von  $45^\circ$  zur Osteonlängsachse gruppieren. Gemäß dieser Röntgenstrukturanalyse unterscheiden sich die longitudinal ausgerichteten Kristalle zwischen den Kollagenfasern in ihrer Richtung von der Richtung der Kollagenfasern um  $10^\circ$ , innerhalb der transversal orientierten Kollagenfasern richten sich die Kristalle in Winkeln von  $40^\circ$  bis  $50^\circ$  zur Longitudinalachse der Osteone aus [18].

Auch nach Gebhardt [20] besitzen die Kollagenfasern und der Havers'sche Kanal in den Lamellen voneinander abweichende Orientierungen. Die Kollagenfasern benachbarter Lamellen stehen jeweils in alternierender Folge senkrecht (orthogonal) zueinander, wobei nicht geklärt ist, ob die Faserrichtung jeweils um  $0^\circ$  und  $90^\circ$  oder, wie bei Pidaparti et al. [54] beschrieben, um  $45^\circ$  in beide Richtungen von der Longitudinalrichtung des Knochens verläuft.

Wagner und Weiner [78] unterscheiden im Tibiaknochen der Ratte dicke und dünne Lamellenschichten, für die die Hauptrichtung der Kollagenfasern innerhalb der dicken Schichten von der Longitudinalachse des Knochens in einem mutmaßlichen Winkel von  $30^\circ$  abweicht, während in den dünnen Lamellen die Richtung der Fasern fast senkrecht zur Longitudinalachse des kortikalen Knochens verläuft. Jede einzelne Lamelle besitzt dadurch deutlich anisotrope Elastizitätseigenschaften, während aus dem Verbund mehrerer benachbarter Lamellen ein Gefüge mit einem nur leicht anisotropen elastomechanischen Verhalten resultiert. In jedem dieser Lamellengefüge besitzen die benachbarten Kollagenfasern zueinander graduell veränderliche Neigungs- und Rotationswinkel im Bezug auf die Knochenlängsachse, wodurch dem Knochen eine sehr hohe, universale Stabilität gegenüber Kräftewirkungen aus unterschiedlichen Richtungen verliehen wird [78].

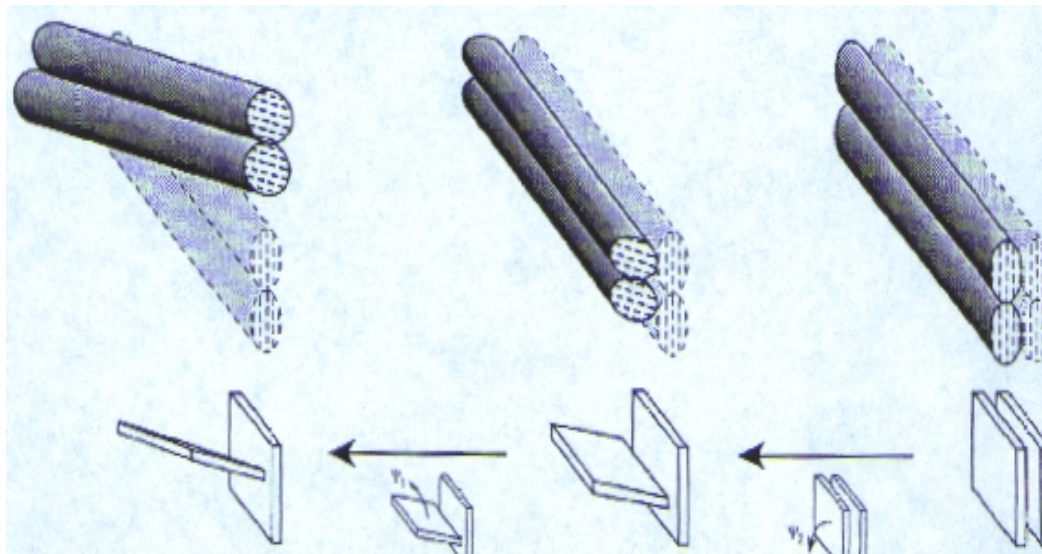
In einer genaueren Analyse haben Weiner und Wagner [82] elektronenmikroskopisch die Struktur innerhalb der dominanten dicken und dünnen Lamellenschichten weiter untersucht und zwei markante Hauptschichten aus gebündelten mineralisierten Kollagenfasern von drei weiteren dünnen Unterschichten aus einzelnen Fibrillenlagen morphologisch unterscheiden können, die sich jeweils in ihrer Hauptorientierung zur benachbarten Fibrillenlage durch einen Winkelzuwachs von  $30^\circ$  unterscheiden. Zwischen diesen Schichten führen die Fasern eine fortlaufende Lageänderung im Sinne einer Rotation durch, um mit einer sich graduell ändernder Orientierung von einer in die nächste dominante Lamellenrichtung überzugehen. Dadurch erhält jede Lamelle eine unidirektional verlaufende Spiralarchitektur, die ihr asymmetrische Eigenschaften verleiht und den Knochen gegenüber Kompressionsbelastungen aus diversen Richtungen optimal stabilisiert.

Weiner et al. [81] basieren diese Beobachtungen auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Oberflächen von Kryoschnitten aus demineralisierten Rattenfemora, in denen jeweils fünf Kollagenfaserschichten unterschiedlicher Fibrillenausrichtung eine Lamelle aufbauen. Jede Lamelle hat eine Dicke von durchschnittlich  $3,2 \mu\text{m}$  und besteht aus etwa 40 Lagen von  $80 \text{ nm}$  dicken Kollagenfibrillen, die sich in fünf unterschiedlich dicken Fibrillenlagen asymmetrisch zur Knochenlängsachse organisieren. Als besonderes Merkmal beschreiben die Autoren dabei die Ausrichtung einer dicken Kollagenschicht etwa in Richtung der Knochenlängsachse und einer dünnen Fibrillenschicht orthogonal dazu in Transversalrichtung, die sich in Winkeln von  $70^\circ$  bis  $90^\circ$  zur Longitudinalachse ausrichtet. Zwischen diesen markanten Lamellenelementen liegen weitere Schichten, die als Übergangszonen mit graduell veränderlichem Winkelmaß zwischen den Hauptlamellen angeordnet sind (Prinzip des „Sperrholz“-Modells).

Ziv et al. [88] haben das frühe Modell von Wagner und Weiner mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen am humanen Femurknochen verglichen. Im Ergebnis stellte sich heraus, dass eine exakte und allgemeingültige mikrostrukturelle Darstellung von Knochen mit der Rasterelektronenmikroskopie nicht möglich ist, da Knochengewebe eine zu komplexe Struktur aus Proteinen und Mineralkristallen besitzt.

Als nahezu gesichert erscheint die Aussage, dass sich die Kollagenfasern der Lamellen immer in tangentialen Ebenen zu den Lamellenoberflächen mit veränderlicher Longitudinalorientierung ausrichten. Auch die Kristallplättchen ordnen ihre Längsachsen parallel zu den Lamellenoberflächen an und ändern innerhalb dieser Ebenen zwischen den Kollagenfasern schrittweise ihre Longitudinalrichtung im Sinne des „Sperrholz“-Modells von Weiner et al. [81], bis durch diese sukzessive Richtungsänderung ihre Längsachse fast in orthogonaler Ausrichtung zur Grundebene eingestellt ist. Dabei ist kein Symmetrieverhalten feststellbar, da die einzelnen Übergangszonen eine unterschiedliche Breite annehmen können. Die Ausbildung dieser Übergangszonen zwischen den Lamellen erfolgt schichtweise im Zuge der Knochenneubildung durch eine zeitlich aufeinander folgende Einlagerung neuer Kollagen-Kristall-Komposite. Die kontinuierlichen Übergangsbereiche basieren auf der Aktivität aufeinander folgender Osteoblastengenerationen, die jeweils für eine bestimmte Periode simultan Kollagenstrukturen und Mineralsubstanz produzieren. In der Grundsicht dieser Übergangszonen liegen die Kollagenfasern und Kristalle nach der Hypothese von Ziv et al. [88] völlig parallel zu den Lamellenflächen. In den darauf folgenden Schichten neigen sich zunächst nur die Kristalle durch eine Rotation um ihre Longitudinalachse aus der Grundebene der Lamellen heraus [vgl. Abbildung 1; Schema 2], bevor sich schließlich auch die Kollagenfasern zusammen mit den Kristallen in den folgenden Übergangsschichten auf die Orthogonale der Grundebene hin orientieren und letztendlich einen Winkel von  $70^\circ$  bis  $90^\circ$  zu den Kollagenfasern der Grundebene einschließen [vgl. Abbildung 1; Schema 3].

Somit besitzt das Modell von Ziv et al. sowohl Erklärungsmöglichkeiten für Modelle, die eine orthotrope Grundstruktur für den Knochen postulieren, als auch für Modelle, die eine spiralförmig verlaufende Kollagenorientierung als wichtigstes Strukturmerkmal ansehen [81].



**Abbildung 1** Kollagen- und Kristall-Orientierung im Bezug zu den Lamellenaußenflächen im Modell von Ziv et al.; Abb. aus [88].

$\psi_1$ : Winkelunterschied der Kollagenfaserrichtung zur Transversalebene;  
 $\psi_2$ : Winkelunterschied der Kristallachse zur Lamellenaußenfläche.

Pidaparti et al. [55] haben kortikalen Hundeknochen und Walzahn im Hinblick auf die Orientierung der Kollagenfasern und ihren Gehalt an mineralisierter Grundsubstanz mittels Laufzeiten für Ultraschall der Frequenz 50 MHz bei Auflösungen um  $60 \mu\text{m}$  vor und nach Demineralisation sowie auf die nativ vorliegende Knochendichte hin untersucht. Ihren Ergebnissen nach liegen die Kollagenfasern in einem Winkel von  $30^\circ$  zur Longitudinalachse der Osteone. Die Autoren stellen einen Bezug zu vorangegangenen mechanischen Belastungstests an Menschen- und Schimpansenfemora her, bei denen die höchste Stabilität gegenüber Biegung und Torsion erreicht wurde, wenn die Kollagenfasern in einem Winkel von  $30^\circ$  zur Longitudinalachse ausgerichtet waren. Ihrem Modell nach lässt sich kortikales Knochengewebe als Gefüge aus zwei Komponenten beschreiben, die zusammen anisotrope Elastizitätseigenschaften im Mikrostrukturbereich besitzen. In der ersten Komponente sind die Mineralkristalle an Kollagen gebunden, liegen in Lücken zwischen den Enden der Kollagenfasern und weisen in die gleiche Richtung wie diese. In der zweiten Komponente liegen die Kristalle frei außerhalb des Kollagens in Longitudinalrichtung der Osteone. Die mit Hilfe der Schallgeschwindigkeiten errechneten Elastizitätsmoduln ergaben winkelabhängige Unterschiede, bei denen die größten Moduln bei einem Winkel von  $30^\circ$  zur Longitudinalachse und die kleinsten Moduln bei einem Winkel von  $60^\circ$  zur Longitudinalachse gemessen wurden, während sich wiederum eine Zunahme nach  $90^\circ$  hin zeigte. Pidaparti geht von einer Beeinflussung der Belastbarkeit des Knochens außer durch die Kollagenstruktur auch durch die Geometrie der

Osteone aus. Unter Bezugnahme auf Cohen und Harris [10] nimmt er einen Winkel von  $11^\circ$  zur Longitudinalachse an, in dem die Zug- und Kompressionskräfte im humanen Femur in-vivo einwirken. Darum sei die günstigste Anordnung der Kollagenfasern bei Winkeln zwischen  $0^\circ$  und maximal  $15^\circ$  zur Longitudinalachse erreicht, um den mechanischen Widerstand gegenüber Kräften aus unterschiedlichen Richtungen zu optimieren.

In einer Untersuchung an Hundefemora mit einem Ultraschallmikroskop bei 50 MHz haben Turner et al. [77] demineralisierte und mazerierte Proben gleicher Versuchstiere verglichen und die Laufzeiten des Ultraschalls im Transmissionsverfahren vor und nach der Dekollagenisierung durch Mazeration bestimmt. Durch die Dekollagenisierung veränderten sich die Anisotropieeigenschaften allein bei einem Winkel von  $30^\circ$  zur Longitudinalachse signifikant, so dass auch bei diesen Autoren die Hauptausrichtung des Kollagens im Winkel von  $30^\circ$  zur Longitudinalachse vermutet wird.

Evans und Bang [15] stellten bei der Korrelation makromechanischer Tests zu biologischen Strukturen in histologischen Untersuchungen fest, dass die in Richtung der Longitudinalachse verlaufenden Osteone das Femur am besten gegenüber Zugbelastungen stabilisieren, während die intermediären Osteone ohne definierte Faserrichtung gegenüber Kompressionskräften eine höhere mechanische Belastbarkeit zeigen.

Nach Martin und Ishida [46] hat das mineralisierte Kollagen in der Knochensubstanz den größten Einfluss auf die mechanische Belastbarkeit gegenüber Zugkräften. Ihrer Ansicht nach hat die Richtung der Kollagenfasern eine größere Bedeutung für die mechanische Belastbarkeit des Knochens als strukturelle oder mechanische Merkmale wie Porosität und Knochendichte.

## 2.2 Untersuchungsverfahren zu Knochenstruktur und -mineralgehalt

### 2.2.1 Verfahren zur in-vivo-Messung (makroskopische Messungen)

Um die Frakturgefährdung von Patienten mit Hilfe von in-vivo-Messungen abzuschätzen, haben sich in den vergangenen Jahrzehnten im klinischen Gebrauch vor allem die Röntgenabsorption als radiologische Methode sowie sonographische Verfahren zur Messung der Ultraschallschwächung im Transmissionsmodus etabliert. Beide Methoden sind indirekte Verfahren, die über einen Vergleich mit Messstandards nur globale Aussagen über den Mineralgehalt liefern können. Quantitative Aussagen über mechanische Eigenschaften des Knochengewebes können dagegen nur bei gleichzeitiger Anwendung weiterer Verfahren gewonnen werden [16, 21 – 23].



Der Wert von Ultraschallmessungen in-vivo als Alternative zu radiologischen Verfahren liegt darin, dass neben Informationen zu anatomisch-strukturellen Eigenschaften des Knochens aufgrund der physikalischen Wechselwirkung des Schalls mit dem Untersuchungsmaterial auch Informationen über dessen mechanische Eigenschaften gewonnen werden können. Die im klinischen Gebrauch verwendeten Verfahren sind auf dem Prinzip der Schallschwächung im Transmissionsverfahren sowie auf die Bestimmung von Schallgeschwindigkeiten aufgebaut und können mechanische Eigenschaften nur für die makroskopische Dimension beurteilen. [21, 22].

Im Transmissionsmodus wird die jeweilige Schallintensität nach dem Schalldurchtritt durch den zu untersuchenden Knochen ermittelt (BUA: Breitband-Ultraschall-Absorption), oder es wird die Änderung der Schallgeschwindigkeit im Knochen bestimmt (SOS: Speed of sound). Die Komplexität der Knochenstruktur erlaubt mit den bisher entwickelten Verfahren lediglich eine grobe Abschätzung eines bestehenden Frakturrisikos über eine Verminderung der Schallschwächung [21, 22].

Schallgeschwindigkeiten werden im klinischen Gebrauch vor allem am Os calcaneus als Hauptlokalisierung für trabekulären Knochen sowie an Fingerphalangen, Tibia und Radius als Messorte für kortikalen Knochen bestimmt. Es werden summarische Aussagen zu Masse, Struktur oder Qualität des Knochens gewonnen. Quantitativ fassbare Veränderungen über die elastomechanischen Knocheneigenschaften z. B. zur Verlaufskontrolle von Therapieerfolgen lassen sich mit den bisher gebräuchlichen Ultraschallverfahren nicht sensitiv genug oder nur in einem späten Krankheitsstadium bzw. nach langen Therapieperioden gewinnen [21].

Aussagen über Dichte- und Elastizitätseigenschaften können, insbesondere bei hoher Knochenmineraldichte, nur mit hochfrequentem Ultraschall ermittelt werden, bei dem die Sekundärbeeinflussung der Schallgeschwindigkeit durch Strukturelemente gering bleibt [26]. Daher ist es erforderlich, ein sonographisches Verfahren zu entwickeln, das im mikrostrukturellen Bereich die Eigenschaftsänderungen von Knochenmechanik und -struktur zu einem frühen Zeitpunkt sowohl unabhängig vom Gerätetyp als auch von populationsspezifischen Referenzwerten mit hoher Sensitivität quantitativ erfassen kann [22].

## 2.2.2 Verfahren zur in-vitro-Messung (mikroskopische Messungen)

- Mikro-mechanische Verfahren

Für den mikrostrukturellen Bereich hat sich bislang nur das Nanoindenterverfahren zur Bewertung der elastomechanischen Eigenschaften von Lamellenstrukturen bewährt, da über die Eindringtiefe einer normierten Sonde Aussagen über die Mikrohärtigkeit des Knochens in Auflösungen unterhalb eines Mikrometers gewonnen werden können [62, 63]. Es liegen bislang aber keine richtungsabhängigen Untersuchungen an humanem Knochengewebe mit dieser Methode vor, da die von Rho et al. [62] durchgeführten Messungen allein an Transversalschnitten erfolgten. Turner et al. [76] haben ihre Nanoindenter-Versuche in den orthogonalen Hauptrichtungen horizontal und vertikal zur der Knochenlängsachse ausgeführt. Durch Zysset et al. [89] liegen weitere Ergebnisse aus Indenteruntersuchungen am kortikalen Diaphysenknochen in Longitudinalrichtung vor. Ziv et al. [87] haben dagegen bereits detaillierte richtungsabhängige Mikrohärtigkeitsbestimmungen mit dem Nanoindenterverfahren am Femur der Ratte durchgeführt. Vergleichsuntersuchungen für humanen Knochen sind aus der Literatur nicht bekannt.

## 2.2.3 Bild gebende Verfahren

- Knochendichtemessung per Zwei-Spektren-Röntgenabsorptiometrie (DXA)

Die Zwei-Spektren-Röntgenabsorptiometrie (DXA) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Knochenmineraldichte durch eine integrale absorptiometrische Bestimmung der Röntgenstrahlschwächung über ein bestimmtes Messareal. Das Verfahren gibt lediglich Auskunft über den Knochenmineralgehalt und ist nur bedingt zur Abschätzung von Frakturrisiken geeignet, da neben der Absorption im Knochen immer gleichzeitig auch Absorption durch das umgebende Weichteilgewebe stattfindet und somit den Absorptionswert für das Knochengewebe mit beeinflusst. Es handelt sich um ein sehr gerätespezifisches Verfahren, bei dem die zur Kalibrierung notwendigen Referenzproben und die herangezogenen Normalwerte populationspezifisch sehr differieren, so dass eine Standardisierung schwierig ist. Quantitative Aussagen können immer nur unter Angabe des Gerätetyps sowie unter Bezugnahme auf die vorliegende Bevölkerungsstruktur getroffen werden [23].

## Verfahren zur Röntgenstrukturanalyse

Direkte Messungen elasto-mechanischer Eigenschaften sind mit radiologischen Verfahren nicht möglich. Quantitative Werte können nur indirekt unter gleichzeitiger Bestimmung von Elastizitätskonstanten mit anderen Untersuchungsmethoden errechnet werden.

### Quantitative Computertomographie (QCT)

Die quantitative Computertomographie liefert in-vivo neben der Knochendichte gleichzeitig auch dreidimensionale Schnittbilder und damit Strukturaussagen [16]. Aus den ermittelten Knochendichtewerten können Struktur- und Dichteänderungen nur anhand von Verlaufsmessungen in Longitudinaluntersuchungen am jeweils gleichen Objekt bestimmt werden. Das Verfahren wird aufgrund der nicht standardisierbaren, subjektiven Interpretation der Knochendichte durch den Untersucher in seiner Aussagekraft begrenzt. Am kortikalen Knochen begrenzt außerdem das zu geringe Auflösungsvermögen der quantitativen Computertomographie die Erfassung von Dichte- und Mikrostrukturunterschieden sehr stark [57]. Kanis et al. [37] sehen einen weiteren Nachteil in der hohen Strahlenenergie der QCT, die erforderlich ist, um detaillierte Aussagen über die Knochenmorphologie in einer hinreichenden Auflösung zu treffen.

Engelke et al. [13] bewerten die Technik der Untersuchungsmethoden DXA und QCT als ausgereift genug, um über die Knochendensitometrie allgemeine Aussagen über den Verlauf einer Osteoporose und über den Erfolg von Therapiekonzepten zu machen, nicht hingegen für die Abschätzung des individuellen Frakturrisikos, da dieses neben der Knochenmasse auch durch die Knochenstruktur bestimmt wird, die auch nach diesen Autoren nicht in ausreichender Auflösung mit dem QCT-Verfahren untersucht werden kann.

### Mikro-Computertomographie (Mikro-CT)

Das Mikro-CT-Verfahren liefert einen guten dreidimensionalen Überblick über die Knochenstruktur – vor allem für trabekulären Knochen – kann aber ebenfalls keine quantitativen elasto-mechanischen Parameter liefern. Die Ortsauflösung von 10 – 30 µm ist zu gering für eine mikrostrukturelle Analyse [13].

## Magnetresonanztomographie

Magnetresonanzverfahren eignen sich als nicht strahlenbelastende Techniken gut für strukturelle Darstellungen insbesondere von trabekulärem Knochen, wohingegen keine Aussagen über die Knochenmineraldichte gemacht werden können [37]. Die Auflösung der Magnetresonanztomographie liegt im Bereich von Millimetern.

## Sonographische Verfahren

Für die Untersuchung der mikroskopischen Basisstrukturen des kortikalen Knochens und die Entwicklung theoretischer Modelle zur Erklärung von makroskopischen Eigenschaften aus der Mikrostruktur wurden in den letzten Jahren verschiedene experimentelle Methoden entwickelt, von denen aber noch keine für die Klinik relevante Bedeutung erlangt hat.

Nach Weiner und Wagner [82] ist die Ermittlung der mechanischen Eigenschaften des Knochens durch Messungen auf der hierarchischen Ebene mehrerer Lamellen am besten geeignet, um aus dem Datenmaterial mikroskopischer Untersuchungstechniken die makroskopischen Eigenschaften des Knochens zu beschreiben. Gleichzeitig ist nach Aussagen der Autoren gerade die hierarchische Ebene des Lamellenbündels aufgrund der geringen Größe der Strukturen bislang am wenigsten auf seine mechanischen Besonderheiten hin untersucht worden. Da die grundlegenden Strukturelemente der Knochenlamelle, die mineralisierten Kollagenfasern, im Verband eines Lamellengefüges eine sehr viel geringere mechanische Anisotropie zeigen als in der Form einer isolierten Kollagenfaser, haben Messungen in der Dimension mehrerer Lamellen die beste Aussagekraft für die Beschreibung des mechanischen Verhaltens des kortikalen Knochengewebes und für die Gewinnung von Daten zur Erstellung von beschreibenden Modellen des mechanischen Knochenverhaltens auf mikrostruktureller Ebene [82, 87].

## Die akustische Rastermikroskopie

Die akustische Rastermikroskopie wurde vor etwa 15 Jahren erstmals zur Beurteilung biologischer Gewebe angewendet. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in der Möglichkeit, aus transmittierten oder reflektierten Ultraschallwellen Aussagen über elastomechanische Eigenschaften von biologischen Geweben mit variablen Auflösungen bis in den Bereich eines Mikrometers zu gewinnen. Dies führte zu Überlegungen, die akustische Rastermikroskopie zur Bestimmung der elastomechanischen Größen von Knochengewebe einzusetzen. Das Verfahren eignet sich für Fragestellungen der experimentellen Orthopädie, z. B. um eine quan-

titative Beurteilung der elastomechanischen Eigenschaften von Knochengewebe an der Grenzfläche zu implantierten Gelenkendoprothesen durchzuführen, wobei eine steigende Anzahl von Implantatoperationen in der orthopädischen Chirurgie eine umfangreiche interdisziplinäre Grundlagen- und angewandte Forschung zum System Prothese-Knochen erfordert.

Die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Beurteilung von Knochengewebe durch die akustische Rastermikroskopie wurden unter anderem von der Arbeitsgruppe um Katz und Zimmerman [39, 84] durchgeführt. Sie konnten bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz Auflösungen bis etwa 140  $\mu\text{m}$  erzielen [83] bzw. bei einer Arbeitsfrequenz von 600 MHz bis zu 1,7  $\mu\text{m}$  [40]. Frühere Untersuchungen von Turner et al. [77] konnten mit der akustischen Rastermikroskopie bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz und einer erreichten Auflösung von 60  $\mu\text{m}$  bereits anisotrope akustische Eigenschaften von Hundefemora zeigen.

### 3 Untersuchungsmaterial und Methodik

#### 3.1 Die akustische Impedanz

Die akustische Impedanz ( $Z$ ) ist eine materialspezifische Größe und gibt das Verhältnis der aufzuwendenden Auslenkkraft oszillierender Teilchen zu ihrer Ortsänderungsgeschwindigkeit an. Sie ist formal aufzufassen als Produkt aus der Schallgeschwindigkeit der Dichtewelle des Schalls in Longitudinalrichtung ( $v$ ) und der lokalen mechanischen Dichte ( $\rho$ ) der untersuchten Knochenprobe (Gleichung 1):

$$Z = v \cdot \rho \quad [Z] = \frac{\text{kg}}{\text{m}^2\text{s}} = \text{rayl} \quad \text{Gleichung 1}$$

#### 3.2 Probengewinnung

##### 3.2.1 Stichproben und Auswahlkriterien

In der vorliegenden Studie werden die in Polymethylmethacrylat eingebetteten Knochenproben aus  $n = 26$  humanen Leichenfemora mit Ultraschall bei einer Frequenz von 900 MHz untersucht. Die Proben stammen aus humanem Femur, das routinemäßig im Verlauf von Autopsien am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen wird. Für die Präparation wurden die Proben vornehmlich proximal aus der diaphysären

anterioren Femurkortikalis im Abstand von etwa 10 cm distal des rechten Femurkopfes gewonnen. Dazu standen 17 männliche und 9 weibliche, zufällig ausgewählte Sektionsfälle im Alter von 20 bis 79 Jahren zur Verfügung. Vor der Auswertung des Probenmaterials wurden anhand der Autopsieberichte Krankheiten des Skelettsystems und metabolische Störungen mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausgeschlossen.

Die Proben eines vorliegenden Sektionsfalles mit histologisch gesichertem Plasmozytom im Bereich der Femurkortikalis wurden in einer zusätzlichen Betrachtung getrennt ausgewertet und später mit den Ergebnissen der Untersuchungsgruppe ohne Skeletveränderungen verglichen.

### 3.2.2 Probenaufbereitung

Aus den transversal geteilten rechten Femora wurden die proximalen anterioren Anteile beginnend etwa in einer Höhe von 10 cm unterhalb des Caput femoris mit einer Trennschleifeinrichtung (EXAKT, Norderstedt) in etwa 1 cm breite Probenblöcke in Schnittwinkeln von 0°, 10°, 15°, 30°, 45°, 60° und 90° zur Horizontalebene geschnitten.

Die Proben wurden entweder direkt nach der autoptischen Entnahme des Knochens oder nach mehrtägiger Lagerung bei -70 ° C weiter bearbeitet, wobei das Tieffrieren keinen Einfluss auf die mechanischen Knocheneigenschaften hat [4]. Die jeweils antero-lateralen Quadranten wurden in Ethanol 70% fixiert und unter wiederholter Durchtränkung in Ethanol 70%, dann aufsteigend in Ethanol 96% und 100% entwässert, in Histoclear®-Lösung (1,4-Dimethylbenzol) über 24 Stunden entfettet und zur Polymerisation in Methylmethacrylat folgender Zusammensetzung eingebettet:

- über mehrere Tage: 100 Vol.% Methylmethacrylat;
- anschließend über 24 h: 90 Vol.% Polymethylmethacrylat mit 10 Vol.% Dibutylphthalat  
+ Zusatz von 1 g Benzoylperoxid/ 100 ml Ansatz (Katalysator)
- bis zur Aushärtung: 90 Vol.-% Polymethylmethacrylat mit 10 Vol.% Dibutylphthalat  
+ 3 g Benzoylperoxid/ 100 ml Ansatz.

Dabei diene Dibutylphthalat als Weichmacher, um spröde Bruchereignisse bei der späteren Anfertigung von Schnitten zu vermeiden. Der Katalysator Benzoylperoxid initiiert die Polymerisation des für die Lagerung mit Hydrochinon stabilisierten flüssigen Methylmethacrylats.

Die Aushärtung erfolgte in Einbettröhrchen aus Glas im Wasserbad bei Raumtemperatur und verlief bei diesem Verfahren langsam in einem variablen Zeitraum zwischen einem und drei Monaten, wodurch ein luftblasenfreier Einschluss der Proben erreicht wurde. Das beschriebene Verfahren führte zu haltbaren, nicht entkalkten Knochenpräparaten [65].

Nach der Aushärtung der Proben wurden diese aus den Einbettgläschen gelöst und erneut mit der o. g. Trennschleifeinrichtung in planparallele Scheiben von ca. 5 mm Dicke gesägt. Dabei erfolgte die Schnitfführung entlang der späteren Messfläche sowie planparallel dazu auf der Gegenseite, mit der die Proben während der Messung auf dem Objektisch fixiert wurden. Nach dem Schneiden wurden die Proben auf einem Planschleifgerät (Struers, Dänemark) mit Nassschleifpapier vorbehandelt und auf einem rotierenden Nassschleifgerät (EXAKT®, Norderstedt) in absteigender Körnung (800 - 1200 - 2400 - 4000) weiter bearbeitet. Unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung wurden die Präparate noch einmal mit Diamantpaste der Körnung 1 und 0,25 µm poliert und von Schleifmittelresten mit Wasser und Ethanol gereinigt.

Als wesentliches Problem stellte sich bei der Probenanfertigung die Schaffung einer horizontalen und ebenen Oberfläche dar, da die diversen und unterschiedlich harten Knochenbereiche und PMMA-Bezirke verschieden stark durch die mechanischen Präparationsschritte abgetragen werden, wodurch an der Oberfläche in mechanisch weichen Zonen größere Exkavationen und Absenkungen entstehen konnten als in harten Arealen.

Es zeigte sich, dass nach dem maschinellen Schleifen bis zu einer Körnung von 4000 das manuelle Polieren im Handschleifgerät nahezu glatte Oberflächen mit nur geringfügigen Schleifspuren lieferte (bessere Ergebnisse als bei maschineller Politur), jedoch war die manuelle Schleiftechnik nicht immer befriedigend im Hinblick auf den Erhalt der erforderlichen Planparallelität der Proben, so dass der auswertbare Bildausschnitt bei einigen Proben begrenzt blieb und daher die Zahl der auswertbaren Messfelder je Probenkörper schwankte.

### 3.2.3 Akustische Eigenschaften des Einbettungsmediums

Polymethylmethacrylat (PMMA) ist eine in der Histologie gebräuchliche Substanz für die Einbettung von Hartgeweben. Es liegt vor der Polymerisation als flüssiges Monomer vor und härtet exotherm zu einem festen Polymer aus. Die akustische Impedanz von PMMA variiert bei der gewählten Schallfrequenz aufgrund der unterschiedlichen mittleren Molmasse des Polymers im Bereich von 3,0 bis 3,3 Mrayl. In der vorliegenden Untersuchung wurde mit einer Referenzprobe der Impedanz 3,198 Mrayl gearbeitet, auf die sich sämtliche für die Impedanzbestimmung der Knochenproben verwendeten Kalibrierungskurven beziehen. Diese Kalibrierungskurven stammen aus Voruntersuchungen von Raum et al. [58] und wurden bei unterschiedlichen Umgebungs- und Betriebstemperaturen der Messeinrichtung erstellt. In Voruntersuchungen ergab sich auch, dass die in PMMA eingebetteten Proben eine um

durchschnittlich 5 % geringere Impedanz als Nativproben besitzen. Für die Darstellung der anisotropen elastischen Eigenschaften des Knochengewebes hat die Einbettung in PMMA keine Veränderung im Hinblick auf die winkelabhängigen Impedanzunterschiede ergeben, so dass eine rechnerische Korrektur der negativen Signalverschiebung („off-set“) durch die PMMA-Einbettung vorgenommen werden konnte.

### 3.3 Methodik zur Messung der akustischen Impedanz

#### 3.3.1 Aufbau und Eigenschaften des akustischen Rastermikroskops



**Abbildung 2:** Akustisches Rastermikroskop SAM 2000 der Firma KSI, Herborn

Das akustische Rastermikroskop besteht im Wesentlichen aus einer akustischen Linse aus Saphir ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), die Ultraschallimpulse fokussieren kann und die mit Hilfe einer elektronisch gesteuerten Scan-Einrichtung mäanderförmig über die zu untersuchende Probe geführt wird. Die Form der Linse ist ein Zylinder, der an der probenfernen Seite flach ist und an der probennahen Seite eine sphärische Kalotte aufweist.



Ein ZnO-Kristall als streng piezoelektrischer Halbleiter dient an der planaren Seite der Linse als Schallgeber und gleichzeitig als Empfänger für die reflektierten Wellen, deren Energie in ein Spannungssignal überführt wird. ZnO eignet sich als Piezokeramik für Frequenzen oberhalb von 200 MHz [7].

Der Krümmungsradius der Kugelkalotte der Linse beträgt ca. 0,1 mm. Diese Kalotte fokussiert die von dem ZnO-Wandler ausgesendeten planaren Wellen aufgrund der unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Saphir und dem angrenzenden Kopplungsmedium Wasser auf eine Fokuszone unterhalb der Kalotte, deren ungefähre Durchmesser eine Wellenlänge (etwa 1,7  $\mu\text{m}$ ) beträgt. Der relevante Brechungsindex am Übergang von Saphir zu Wasser beträgt dabei etwa  $n = 0,135$ . Trotz dieser starken Fokussierung wird ein großer Winkel für die numerische Apertur der Linse eingeschlossen (numerische Apertur:  $NA \approx 0,77$ ): der halbe Öffnungswinkel beträgt bei der verwendeten akustischen Linse  $50^\circ$ . Über destilliertes und entgastes Wasser als Kopplungsflüssigkeit wird bei Raumtemperatur schließlich ein Schallkontakt zur beobachteten Probe hergestellt. Die Angaben über die vorliegenden akustischen Eigenschaften des Wassers beziehen sich auf eine Temperatur von  $20^\circ\text{C}$ , bei der sich die Ultraschallwellen im Kopplungsmedium bei 900 MHz mit einer Geschwindigkeit von 1485 m/s ausbreiten.

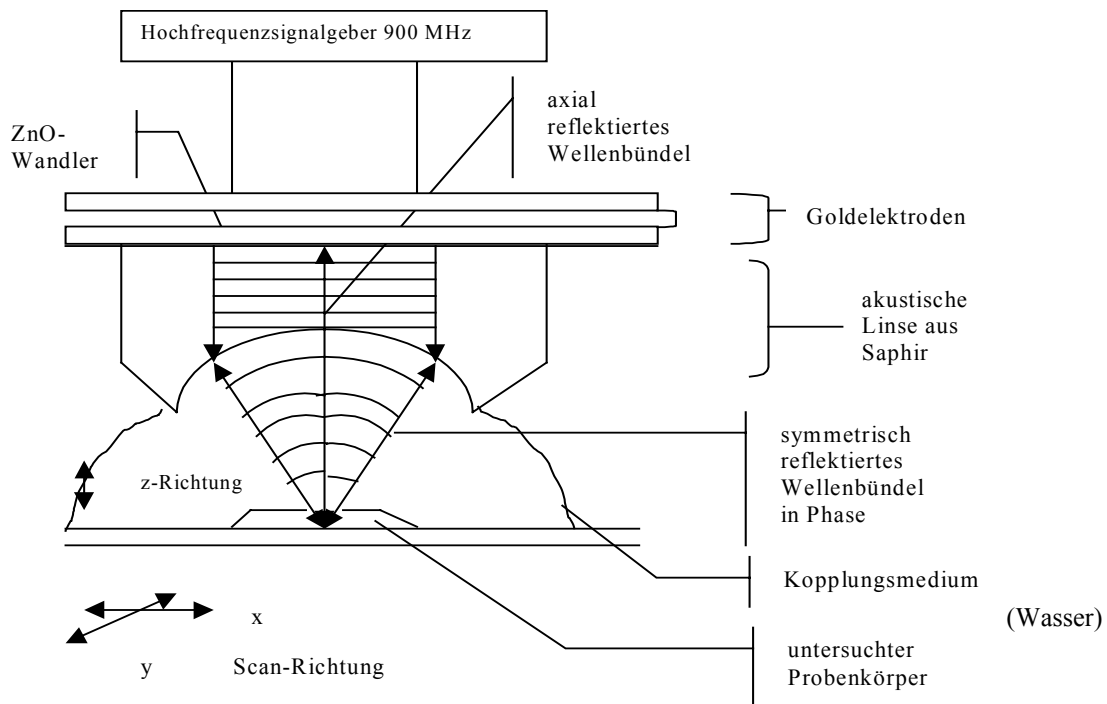
Neben der Wellengeschwindigkeit ist auch die Dämpfung im Kopplungsmedium eine temperaturabhängige Größe. Dadurch wird die maximal erreichbare Auflösung begrenzt, da die Sendefrequenz bei konstanter Temperatur des Kopplungsmediums nicht beliebig erhöht werden kann. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wird eine laterale Auflösung von etwa 1  $\mu\text{m}$  erreicht.

Um die Reflexion zwischen Linse und Kopplungsmedium aufgrund ihrer hohen Impedanzunterschiede zu reduzieren, ist die Linse mit einer Beschichtung aus Kalk-Glas ausgestattet, deren Dicke im Bereich einer viertel Wellenlänge liegt. Die gewählte Dicke der Kalk-Glas-Schicht verringert Reflexionen an der Grenzfläche von Saphir und Kalk-Glas bzw. Kalk-Glas und Wasser und erleichtert ebenso die Transmission der zur Linse reflektierten Signale.

Das Mikroskop wird im Puls-Modus betrieben, wobei die Linse sowohl als Sender als auch als Empfänger von reflektierten Wellen verwendet wird und die gesendeten und reflektierten Anteile des Schalls zeitlich voneinander durch ein elektronisches Zeitfenster getrennt werden können. Die Sendedauer beträgt 20 ns. Um die nach der Reflexion an der Probe entstehenden Messsignale von Störsignalen, die andere Laufzeiten haben, trennen zu können, wird die Empfangszeit durch das elektronisch veränderbare Zeitfenster auf eine Dauer von 30 ns begrenzt. Dadurch werden Interferenzen des Empfangssignals mit Wellen, die innerhalb der Linse nach Mehrfachreflexion verzögert zum ZnO-Wandler zurückkehren, reduziert.

Das reflektierte Signal wird in einem Verstärker mit großer Bandbreite aufgenommen, der vor einer Übersteuerung durch das starke Sendesignal und gegen Signale aus Schaltereignissen elektronisch geschützt ist [5, 7].

Das für jeden Bildpunkt gewonnene Echosignal wird seiner Amplitude entsprechend auf dem angeschlossenen Monitor als Bildpunkt mit einem spezifischen Grauwert bei einer Auflösung von 64 Graustufen in 512 x 512 Bildpunkten dargestellt und gleichzeitig als digitalisiertes Signal für die spätere Berechnung der Impedanz gespeichert. Das Prinzip eines akustischen Rastermikroskops im Reflexionsbetrieb zeigt Abbildung 3.



**Abbildung 3:** Prinzip eines Akustischen Rastermikroskops im Reflexionsbetrieb

Durch eine geeignete Signalauswertung erhält man mit dem akustischen Rastermikroskop eine gleichzeitige Darstellung der Struktur sowie der akusto-mechanischen Merkmale der Probe. In dieser zweidimensional gerasterten Abbildung der Probenoberfläche werden durch die mäanderförmige Bewegung der Linse in der Horizontalen jedem Probenpunkt in x- und y-Richtung spezifische Bildsignale entsprechend den vorliegenden elastomechanischen Eigenschaften des Probenmaterials zugeordnet.

Die Spannungsamplitude des reflektierten Wellenbündels von einem Probenpunkt wird bestimmt durch eine charakteristische  $V(z)$ -Funktion, die bei Änderung der Linsen-Proben-Abstände in  $z$ -Richtung für das Spannungssignal einen materialtypischen oszillierenden Verlauf annimmt und während dieser Defokussierung periodisch mehrere Nebenmaxima sowie in der Fokusweite der Linse ein Hauptmaximum aufweist. Im Fokus beträgt der Linsen-Probenabstand etwa  $46 \mu\text{m}$ . Für die quantitative Bestimmung der elastomechanischen Knocheneigenschaften wird jeweils das maximal reflektierte Spannungssignal  $V(z)$  im Fokusabstand verwendet.

$V(z)$  lässt sich angeben durch die **Gleichung 2** [7]:

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

**Gleichung 2**

$R(\theta)$ : Reflektanzfunktion

$P(\theta)$ : Pupillenfunktion der Linse

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

$z$  : Linsen-Probenabstand in Vertikalrichtung

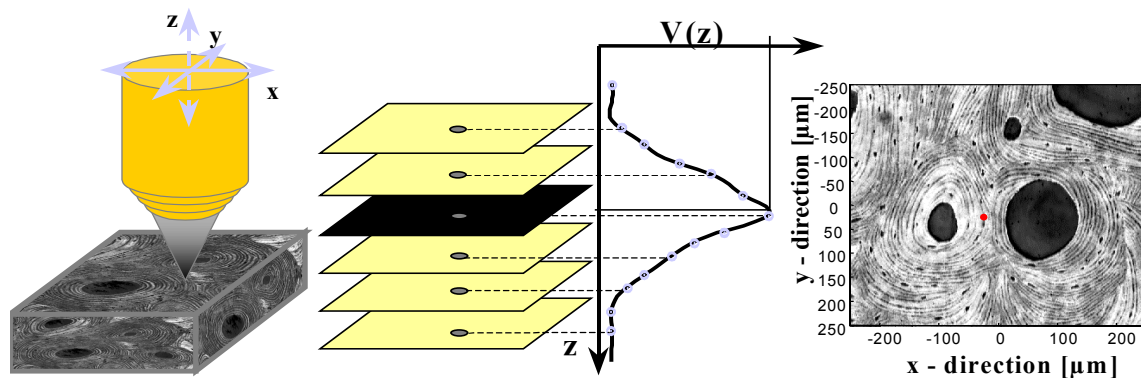
$\theta$  : Einfallswinkel des Wellenbündels zur Probenoberflächennormalen

Die Amplitude des  $V(z)$ -Signals ist abhängig von den lokalen Materialeigenschaften der untersuchten Knochenprobe. Sie wird in ihrer Höhe bestimmt durch die Intensität der an der Probenoberfläche reflektierten Ultraschallwellen. Durch den geringen Schallfelddurchmesser im Fokusbereich (ca.  $1,7 \mu\text{m}$ ) kann das Signal mit hoher Auflösung den lokalen mechanischen Eigenschaften an der Probenoberfläche zugeordnet werden.

Wellenbündel, die in axialer (gleich normaler) Richtung auf die Probe auftreffen, werden wieder in gleicher Richtung entlang der Linsenachse reflektiert. Wellenbündel aus weiter lateral gelegenen Anteilen der Linse, die so reflektiert werden, dass die Verlaufsrichtung des reflektierten Bündels symmetrisch zum Verlauf des einfallenden Bündels ist, tragen ebenfalls durch konstruktive Interferenz zum  $V(z)$ -Signal bei, da sie mit dem axialen Wellenanteil in Phase interferieren, soweit sich die Probe im Fokus der Linse befindet (vgl. Abbildung 3). Bei einer Abstandsänderung der Linse in  $z$ -Richtung (Defokussierung) nimmt die Signalamplitude ab, da die verschiedenen Wellenanteile durch die Abstandsveränderung destruktiv interferieren

können, bis mit noch weiterer  $z$ -Änderung wieder eine Phasendifferenz von ganzzahligen Vielfachen von  $\lambda$  erreicht ist und sekundäre Maxima für  $V(z)$  auftreten. Dies erklärt den charakteristischen periodischen Verlauf der  $V(z)$ -Kurven. Die Abhängigkeit des  $V(z)$ -Signals vom Probenabstand  $z$  führt zu unterschiedlichen Grauwerten des entstehenden Bildausschnitts bei der Defokussierung mit maximalen Grauwerten in der Fokusebene.

Die in der Abbildung 4 dargestellte Umsetzung von Reflexionssignalen in Grauwerte wird zur Ermittlung der Knochenimpedanzen verwendet und ermöglicht in einem durch Raum et al. [59] entwickelten Verfahren (Multi Layer Analysis) die automatische Erkennung des auszuwertenden Fokussignals für jeden Bildpunkt. Dabei wird, ausgehend von einer positiven Defokussierung (Fokus oberhalb der Probe), eine Serie von Bildern mit jeweils kleiner werdendem Probenabstand aufgenommen, bis eine negative Defokussierung eintritt. Durch dieses Verfahren der Messwertaufnahme in mehreren Schichten wird garantiert, dass auch bei unebenen oder geringfügig geneigten Oberflächen von jedem Probenpunkt einmal ein Reflexionssignal im Fokusabstand der Linse aufgezeichnet wird.



**Abbildung 4:** Multi-Layer-Analysis-Verfahren [59]

Der Grauwert des entstehenden Rasterbildes korreliert mit der Intensität des elektronischen Eingangssignals, das die reflektierte Ultraschallwelle erzeugt, und hängt von dem Reflexionsfaktor  $R$  für die Probe an jeder gescannten Stelle ab.

Der Reflexionsfaktor  $R$  für ebene Wellen an der Grenzfläche zweier Medien mit den akustischen Impedanzen  $Z_1$  und  $Z_2$  berechnet sich aus Gleichung 3:

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

Setzt man  $Z_1$  für die Impedanz der Probe und  $Z_2$  für die Impedanz des Kopplungsmediums (Wasser,  $Z_2 \approx 1,5 \text{ Mrayl}$ ), so kann bei bekanntem Reflexionsfaktor die Probenimpedanz berechnet werden. Zur Bestimmung des Reflexionsfaktors wird das Mikroskop mit Substanzen bekannter akustischer Impedanz kalibriert (s. Kapitel 3.3.2.).

Die Gleichung 3 gilt nur für den senkrechten Einfall der Schallwellen auf die Probenoberfläche unter der Voraussetzung, dass keine Scherwellen angeregt werden.

Von dieser Voraussetzung kann ausgegangen werden, wenn die Wellenfront senkrecht auf die Probenoberfläche auftrifft. Für diesen Fall wird das resultierende Reflexionssignal nur durch die Wechselwirkung der longitudinalen Schallwelle mit der Probenoberfläche an der Grenzfläche zum Kopplungsmedium Wasser bestimmt. Sobald man bei Abweichungen vom senkrechten Einfallswinkel einen kritischen Winkel überschreitet, können zusätzlich zu der longitudinalen Welle auch Scherwellen an der Probenoberfläche erzeugt werden, die aufgrund einer destruktiven Interferenz bei entsprechenden Phasenunterschieden zu Auslöschungsphänomenen der einzelnen Anteile des Wellenbündels führen. Das reflektierte Signal würde daher fälschlicherweise zu geringe Werte annehmen.

Bei einem Einfallswinkel von weniger als  $10^\circ$  zum Lot ist hingegen gewährleistet, dass in den untersuchten Proben keine Scherwellen angeregt werden. Raum et al. [58] weisen dazu nach, dass Gleichung 3 auch für kleine Einfallswinkel ( $< 10^\circ$ ) näherungsweise angewendet werden kann. Für die Proben der vorliegenden Studie konnte die Bedingung eines Einfallswinkels kleiner als  $10^\circ$  aufgrund von Unregelmäßigkeiten an der Probenoberfläche nicht immer erfüllt werden. Für diesen Fall ermöglichte eine topographische Oberflächenanalyse unter Anwendung des von Raum et al. [58] entwickelten Multi-Layer-Analysis-Verfahrens eine selektive Auswertung allein derjenigen Reflexionssignale, für die die genannten Bedingungen zutrafen. Mit dieser Signalanalyse wurde jeweils ein Topographiebild berechnet, in dem stark geneigte Flächen und Kanten, an denen ein Einfallswinkel größer als  $10^\circ$  auftrat, erkannt wurden. Signale von diesen Flächen und Kanten wurden von der weiteren Signalverarbeitung ausgeschlossen.

Zusammen mit der Kenntnis der Pupillenfunktion  $P(\theta)$  und unter Berücksichtigung der Einstellungen der Geräteelektronik lässt sich die akustische Impedanz  $Z_1$  für den Knochen bei geringen Einfallswinkeln quantitativ angeben.

In dieser materialabhängigen Kenngröße der akustischen Impedanz sind die akustischen Eigenschaften des Knochens über die Beziehung der Gleichung 4 bestimmbar:

$$Z_1 = \rho v$$

Gleichung 4

$\rho$ : Massendichte;

$v$ : Schallgeschwindigkeit

Für isotrope Materialien lassen sich aus der Kenntnis der Impedanz die mechanischen Größen Steifigkeit  $C$  und Young'scher Modul  $E$  nach den folgenden Gleichungen bestimmen:

$$C = \rho v^2 = Z v$$

Gleichung 5

$$E = C \frac{(1+\sigma)(1-2\sigma)}{(1+\sigma)} = \rho v^2 \frac{(1+\sigma)(1-2\sigma)}{(1+\sigma)}$$

Gleichung 6

$\sigma$ : Poissonverhältnis

Raum et al. [58] beschreiben, dass die Beziehung für  $C$  und  $E$  von isotropen auf anisotrope Materialien ausgeweitet werden kann, wie es für kortikales Knochengewebe notwendig ist.

Kennt man die Impedanz und die im Mikrostrukturbereich nach dem Beispiel von Maev [47] ermittelte Schallgeschwindigkeit im Zielgebiet des Knochens, kann man daraus die in der Biomechanik gebräuchliche Größe der Steifigkeit  $C$  berechnen. Bei bekannter Poisson-Zahl  $\sigma$  (für homogenes Knochengewebe 0,3) kann dann auch der Elastizitätsmodul  $E$  angegeben werden.

### 3.3.2 Kalibrierung des akustischen Mikroskops

Zur Kalibrierung des verwendeten Ultraschallmikroskops SAM 2000 wurden als Referenz neben Polymethylmethacrylat weiterhin die bekannten Impedanzen von Quarzglas (Suprasil<sup>®</sup>) und Polycarbonat verwendet.

Diese Referenzimpedanzen waren zuvor durch Bestimmung der Dichte und Messung der Schallgeschwindigkeit mit Hilfe von Puls-Echo-Laufzeitmessungen bestimmt worden.

Um den Einfluss der Umgebungstemperatur und der Temperatur des Kopplungsmediums auf Signaldämpfung und Schallgeschwindigkeit zu erfassen, wurden am IMPB (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durch Raum et al. [58] die Reflexionssignale einer homogenen PMMA-Probe von bekannter Impedanz und für das Kopplungsmedium Wasser temperaturabhängig bestimmt und daraus Messkurven erstellt.

Bei der Impedanzberechnung der Proben wurde die temperaturabhängige Dämpfung der Schallwellen dadurch berücksichtigt, dass die ermittelten Impedanzen der PMMA-Bezirke jeder Messserie mit einer unter konstanten Temperaturbedingungen ermittelten Referenzimpedanz für PMMA verglichen wurden. Diese Referenzimpedanz wurde zuvor mit einer Fehlertoleranz von etwa einem Prozent an einem zweiten akustischen Rastermikroskop bei einer Arbeitsfrequenz von 25 MHz bestimmt. Dadurch konnte die Impedanz der Proben jeweils auf eine Standardtemperatur bezogen werden.

Um Verstärkerdriften und temperaturabhängige Einflüsse der Messelektronik auszuschalten, wurde das nach jeder Messreihe aufgezeichnete Reflexionssignal von der Linsenoberfläche mit einem Referenzsignal abgeglichen und auf Standardbedingungen bezüglich Gerätetemperatur und Verstärkereinstellungen umgerechnet. Auch dazu war zuvor von Raum et al. [58] über einen relevanten Temperaturbereich und bei bekannten Verstärkereinstellungen eine Messkurve erstellt worden. Die Korrektur der Umgebungseinflüsse bei der Impedanzbestimmung erfolgte in der Auswertung halbautomatisch mit Hilfe eines am IMPB entwickelten Analyseprogramms unter Verwendung der Kalibrierungskurven der PMMA-Referenzprobe und des Referenzsignals von der Linsenoberfläche [58].

### 3.3.3 Signalverarbeitung zur Impedanzbestimmung

Eine am IMPB entwickelte Software zur Analyse der Messbilder ermöglicht neben der Impedanzbestimmung aus den aufgezeichneten Reflexionssignalen eine kontrollierte Erfassung und Kompensation von Artefakten. Da für die quantitative Bestimmung der Probenimpedanzen alle Bildpunkte im Fokus aufgezeichnet werden müssen, ist die Erfassung des Oberflächenreliefs zur Lokalisation der Fokustiefe in z-Richtung erforderlich.

Die Software kontrolliert dabei aus den Bilddaten der Schichtaufnahmen, ob das Signalmaximum jeweils aus der Fokusebene des gescannten Bereiches in z-Richtung stammt. Die Beeinflussung des Reflexionssignals durch wechselnde Oberflächeneigenschaften und -neigungswinkel (aufgrund von Seitenkanten der Proben sowie Präparationsartefakten) wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Software zur Schichtbildanalyse (Multi Layer Analysis, Raum et al. [58]) kompensiert.

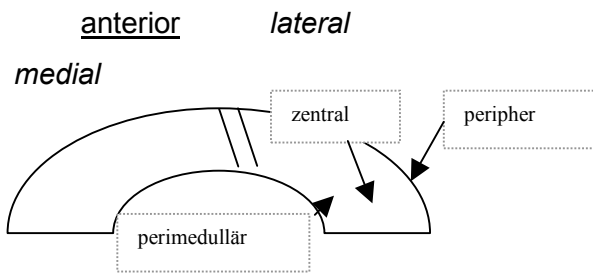
Weiterhin wurde mit der Software verhindert, dass eine elektronische Über- oder Untersteuerung des Signals eintreten konnte. Bereiche, in denen Bildausschnitte nur aus PMMA aufgebaut waren (z. B. mit PMMA aufgefüllte Volkmann'sche und Havers'sche Kanäle sowie Randzonen), wurden automatisch erkannt und von der Berechnung der mittleren Impedanz des gesamten Messfensters sowie der selektierten Messregionen ausgeschlossen.

### 3.3.4 Durchführung der Messungen

Die Proben wurden mit der zu untersuchenden Fläche linsenwärts auf dem Probenstisch fixiert. Anschließend wurde jeder Probenblock mit Hilfe des Auflichtmikroskops nach möglichen Schleifspuren aus der Präparation untersucht und es erfolgte eine Registrierung der Koordinaten des horizontal verschiebbaren Probenstisches für geeignete Areale. Dazu wurden jeweils ein peripheres, ein perimedulläres sowie ein dazwischen liegendes drittes Areal (als „zentral“ im weiteren Text bezeichnet, vgl. **Abbildung 5**) eingestellt.

Als Kopplungsmedium wurde destilliertes und entgastes Wasser von Raumtemperatur auf die Probe aufgetragen.





**Abbildung 5** Messlokalisierung für die unterschiedliche Impedanzbestimmung am anterioren Femurknochen

Die akustische Linse wurde über die Probe geschwenkt und in z-Richtung fokussiert. Die letzte Strecke der Annäherung erfolgte unter visueller Beurteilung der Amplitude des Reflexionssignals. Die Linse musste so weit an die Probe angenähert werden, dass sich innerhalb des dynamischen Bereiches des Videosignals eine maximale Signalamplitude einstellte. Für die meisten Proben ergab sich als Richtwert eine maximale Amplitude des reflektierten Signals bei einer RF-Verstärkung von 42 – 43 % und einer Videoverstärkung zwischen 60 und 75 %.

Da die Signalamplitude den vorgegebenen Bereich des Videosignals nicht überschreiten durfte, um eine Signalverfälschung durch Übersteuerung zu vermeiden, mussten jeweils die Hochfrequenzverstärkung (RF) des Signals und die Videoverstärkung vor jeder Messung neu eingestellt werden.

Es wurden entsprechend den zuvor optisch ermittelten Koordinaten Schichtbilder der Seitenlänge 1 mm bzw. 500 µm jeweils an entsprechender peripherer, zentraler und perimedullärer Position aufgenommen.

Die den elastischen Eigenschaften entsprechenden Signalamplituden der reflektierten Wellen wurden für jeden Messpunkt im gewählten Messfenster aufgezeichnet. Dadurch ergab sich aus jedem gescannten Punkt der Probe ein Datenwert sowohl für eine histomorphologische Darstellung des Gewebes auf dem Bildschirm als auch für eine quantitative Beschreibung der lokalen Elastizitätseigenschaften über das Reflexionssignal [5].

Die geringe Eindringtiefe der Ultraschallwellen bei der verwendeten Arbeitsfrequenz von 900 MHz erlaubte gezielte Impedanzmessungen unmittelbar an der Probenoberfläche, nicht aber in tiefer gelegenen Probenanteilen.

Aus den Signalamplituden der gewonnenen Schichtbilder wurden für jede Probe mit Hilfe des Multi-Layer-Analysis-Verfahrens die lokalen Intensitätsmaxima des Reflexionssignals erfasst sowie die Oberflächentopographie bestimmt. Zusätzlich wurde nach jeder Messserie durch eine definierte Veränderung der Signalempfangszeit (Gate-Zeit) ein Reflexionssignal von der Linsenoberfläche zum Zwecke der Kalibrierung der Systemelektronik aufgenommen.

Dadurch erfolgte eine Erfassung der temperaturabhängigen Arbeitszustände der Messelektronik und der Linse [Kapitel 3.3.2], die bei der späteren Impedanzberechnung berücksichtigt werden mussten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Messung der akustischen Impedanz der Proben

Für die in PMMA als Einbettungsmedium angefertigten Proben aus der antero-lateralen Femurkortikalis wurden die Impedanzen an je drei Messlokalisationen (peripher, zentral und perimedullär) bestimmt. Durch die Messungen in zwei unterschiedlich großen Bildfenstern (500  $\mu\text{m}$  und 1 mm Seitenlänge) ergaben sich dabei für jede untersuchte Knochenprobe sechs Messwerte. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS 8.0. Im Einzelnen wurden neben den richtungsabhängigen Impedanzunterschieden die Impedanzen für alters- und geschlechtsspezifische Untergruppen und für einzelne histologische Strukturen innerhalb der Gesamtmessfenster bestimmt.

### 4.2 Impedanzbestimmung über die Gesamtmessfenster

Insgesamt wurden  $n = 998$  Mehrschichtanalysen von 17 männlichen und 9 weiblichen Autopsiefällen ausgewertet (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1** Anzahl, Altersspanne und Geschlechtsverteilung der untersuchten Autopsiefälle

Geschlecht	Altersspanne in Jahren	Anzahl der Femora	Anzahl der Biopsien	Anzahl der gewonnenen Datensätze
weiblich	20 - 77	9	63	356
männlich	24 - 79	17	119	642

Für die mittlere Impedanz aller ausgewerteten Proben ergibt sich:

$$\mathbf{Z_m = 3,38 \pm 0,379 \text{ Mrayl}} \quad (\text{Mittelwert} \pm \text{Standardabweichung}).$$

Die Streuung der Impedanz kann in grober Näherung als normal verteilt betrachtet werden. Nach Überprüfung mit dem  $\chi^2$ -Test ( $p < 0,001$ ) und dem Kolmogorov-Smirnov-Test ( $p < 0,001$ ) kann man die Nullhypothese, dass die mittleren Impedanzen aus allen Messungen ohne Berücksichtigung von Winkel-, Alters- oder Geschlechtsunterschieden einer Normalverteilung unterliegen, nicht verwerfen, d. h. die mittleren Impedanzen werden als normal verteilt angenommen.

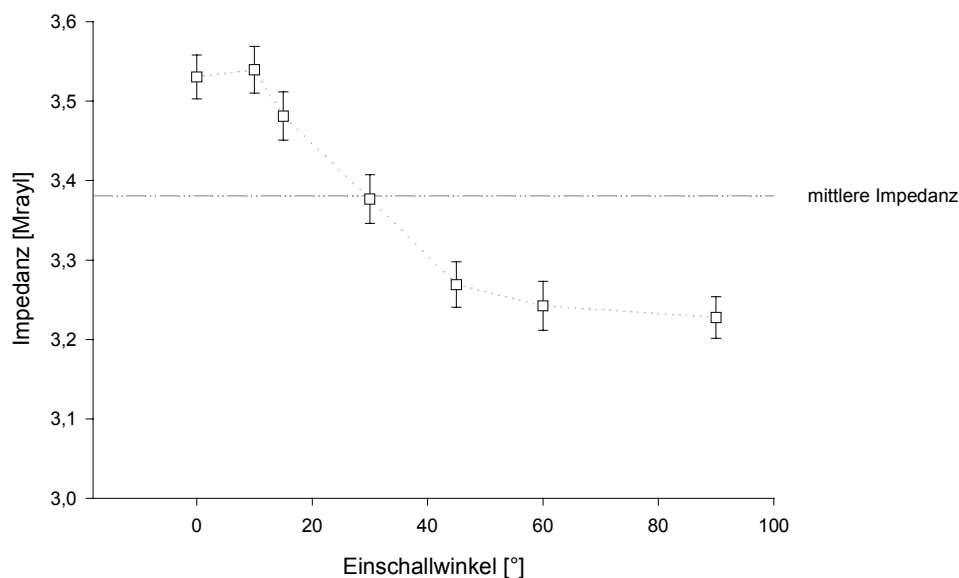
#### 4.3 Winkelabhängige Impedanzbestimmung

Die Winkelabhängigkeit der Impedanz analysiert die Anisotropie des akusto-elastischen Verhaltens des untersuchten Knochengewebes. Alle Winkelangaben beziehen sich hier auf die Horizontalebene:  $0^\circ$  entspricht einem Schnittwinkel senkrecht zur Longitudinalachse des Femurs und einem Einschallwinkel mit dem Ultraschallmikroskop in Longitudinalrichtung des Knochens. Mit einer Zunahme des Schnittwinkels durchläuft die auftreffende Schallwelle die Strukturkomponenten des Gewebes in unterschiedlichen Richtungen und bewirkt dadurch bei mechanisch anisotropen Proben eine Änderung des Reflexionskoeffizienten und damit der ermittelten Impedanz.

Eine winkelabhängige Betrachtung der mittleren Impedanzen ergibt die höchsten Werte bei Einschallrichtungen nahe des Richtungsverlaufes der Knochenlängsachse. Die niedrigsten Impedanzen liegen dagegen bei Messungen in Schnittwinkeln von  $60^\circ$  und  $90^\circ$  vor, d.h. annähernd transversal zur Longitudinalachse des Femurs. Die mittlere Impedanz ist

für Proben vom Schnittwinkel  $10^\circ$  am höchsten ( $Z = 3,54 \pm 0,35$  Mrayl), während bei  $90^\circ$  die niedrigsten mittleren Impedanzen gemessen werden ( $Z = 3,227 \pm 0,3$  Mrayl). Die Impedanzen für diese beiden Messwinkel unterscheiden sich signifikant im t-Test für verbundene Stichproben ( $p = 0,007$ ). Hoch signifikante Impedanzunterschiede ( $p < 0,001$ ) ergeben sich im t-Test für verbundene Stichproben zwischen den Proben der Winkel  $0^\circ$  und  $45^\circ$ ,  $0^\circ$  und  $60^\circ$ ,  $10^\circ$  und  $45^\circ$  sowie  $10^\circ$  und  $60^\circ$ . Signifikant unterscheiden sich auch die mittleren Impedanzen bei den Winkeln  $0^\circ$  und  $30^\circ$  sowie  $10^\circ$  und  $30^\circ$  ( $p = 0,002$ ) (vgl. Abbildung 6). Bei diesem Vergleich liegen für den Schnittwinkel von  $90^\circ$  wegen der unbrauchbaren Präparation eines Präparates sechs Messwerte weniger vor als für die anderen Winkel. Dennoch ergibt sich basierend auf die übrigen Präparate vom Winkel  $90^\circ$  der gezeigte signifikante Impedanzunterschied zu Proben vom Winkel  $10^\circ$ .

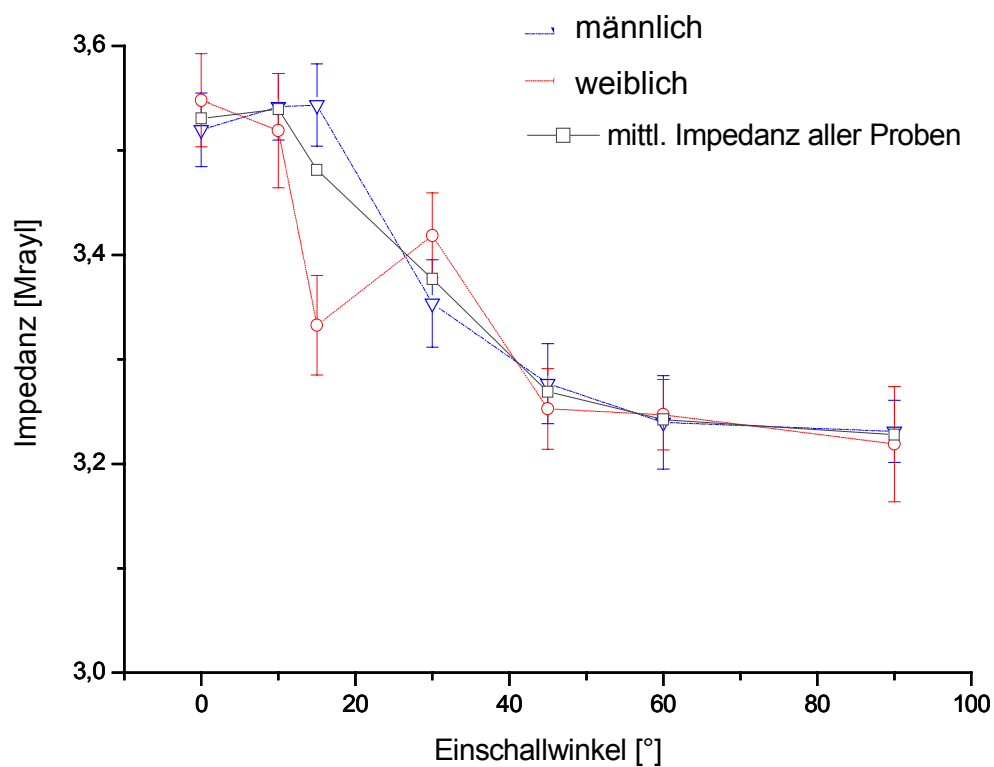
Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigt ebenfalls die Änderung des Einschallwinkels als hoch signifikanten Einflussfaktor an - sowohl für die mittlere Impedanz der Messfenster ( $p < 0,001$ ) als auch für die in jedem Messfenster erreichten Maximalwerte der Impedanz ( $p < 0,001$ ). Für die in jedem Messfenster auftretenden Minimalwerte der Impedanz ergibt sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,085$ ) bei Änderung der Einschallrichtung.



**Abbildung 6** Mittlere Impedanzen und Standardfehler in Abhängigkeit vom Einschallwinkel

#### 4.4 Geschlechtsabhängigkeit der Impedanz

Auch das Geschlecht erweist sich als ein signifikanter Einflussfaktor auf die gemessenen Impedanzen. Der geschlechtsspezifische Impedanzvergleich zeigt signifikante Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Sektionsfällen jedoch nur für bestimmte Einschallwinkel. Der markanteste Impedanzunterschied findet sich bei Proben des Schnittwinkels  $15^\circ$  (unabhängiger t-test;  $p = 0,002$ ). In der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ergeben sich für die geschlechtsspezifischen Impedanzwerte außerdem signifikante Unterschiede bei  $10^\circ$  ( $p < 0,001$ ) und  $60^\circ$  ( $p = 0,006$ ) (vgl. Abbildung 7).



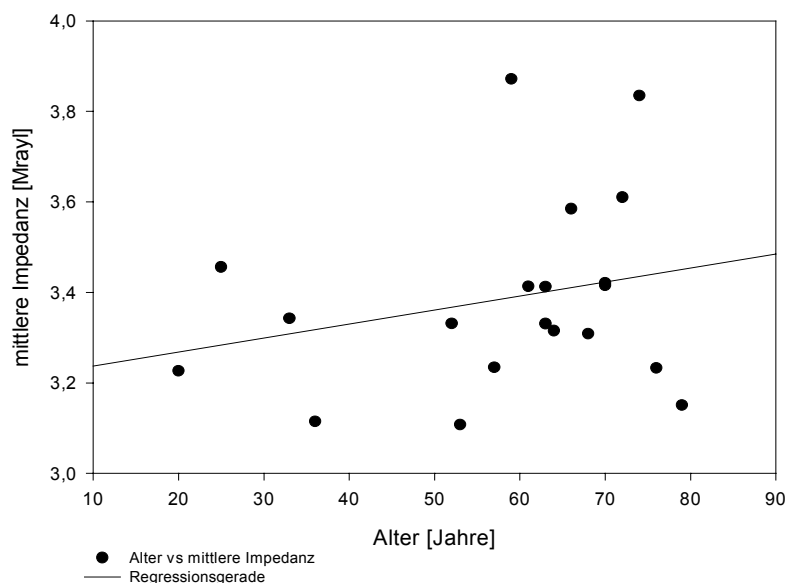
**Abbildung 7** Winkelabhängigkeit der Impedanzen für jedes Geschlecht im Vergleich zur mittleren winkelabhängigen Impedanz aller Messproben

In einer patientenunabhängigen multivariaten Analyse ohne Berücksichtigung der Schnittwinkel erkennt man, dass sowohl die innerhalb der Messfenster auftretenden Mittelwerte als auch die Minimalwerte der Impedanzen durch das Geschlecht hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) beeinflusst werden. Für die Maximalwerte der Impedanzen in den Gesamtmessfenstern ist der geschlechtsspezifische Unterschied nicht signifikant.

Wertet man den Einfluss des Geschlechtes auf die mittleren, maximalen und minimalen Impedanzwerte unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Einschallwinkel aus, zeigt sich in der multivariaten Analyse ein hoch signifikanter Impedanzunterschied zwischen beiden Geschlechtern in allen winkelspezifischen Vergleichsgruppen ( $p < 0,001$ ).

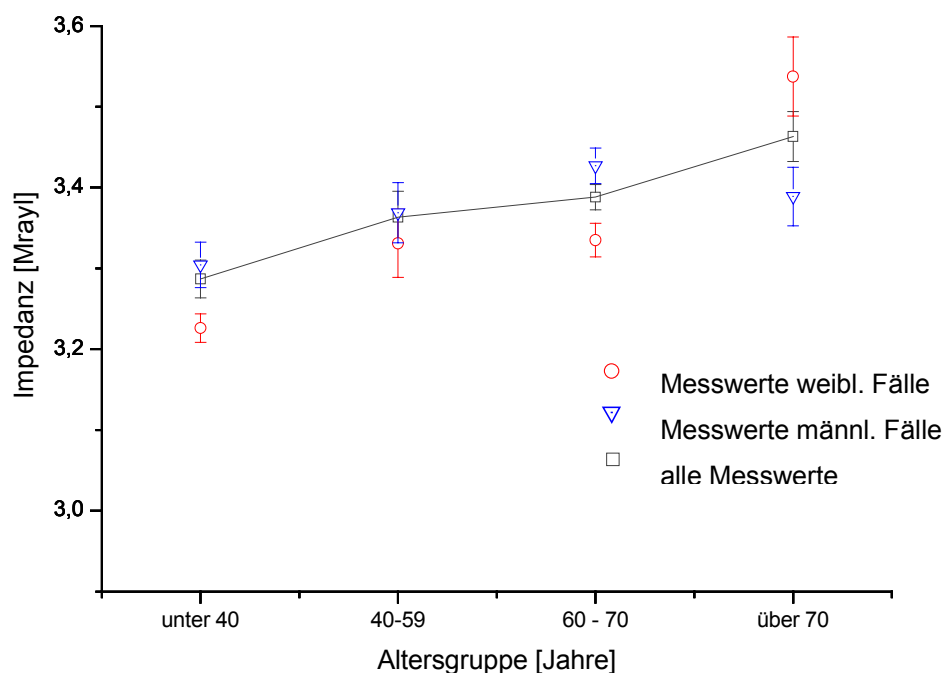
#### 4.5 Altersabhängigkeit der Impedanz

Im Streudiagramm beschreibt die Regressionsgerade eine positive Korrelation zwischen mittlerer Impedanz und Lebensalter (Abbildung 8). Der dargelegte Trend zu höheren mittleren Impedanzwerten mit steigendem Lebensalter ist aufgrund der großen Streuung und der begrenzten Anzahl der untersuchten Sektionsfälle jedoch nicht statistisch signifikant nachweisbar. Für das Maß des Zusammenhangs zwischen Lebensalter und mittlerer Impedanz errechnet sich als Bestimmtheitsmaß der Wert  $r^2 = 0,06269$ , d. h. nur etwa 6,3 % der Varianz der mittleren Impedanz wird durch die Regressionsgerade erklärt und lässt sich auf eine Abhängigkeit vom Lebensalter zurückführen.



**Abbildung 8** Korrelation der mittleren Impedanz zum Lebensalter der Sektionsfälle

Unterteilt man die untersuchten Knochenproben beider Geschlechter dagegen in vier Altersklassen, die auf einer in erster Linie für die weiblichen Sektionsfälle zutreffende Einteilung in Lebensabschnitte in Bezug auf das Klimakterium beruhen (prälimakterisch, periklimakterisch, postklimakterisch sowie Senium), so erkennt man bei der nicht personenbezogenen Zuordnung aller Schichtbilder zu den einzelnen Altersstufen eine Tendenz zu höheren Impedanzwerten mit dem Alterszuwachs. Die mittlere Impedanz der Schichtbilder liegt für Präparate von Sektionsfällen im Alter unter 40 Jahren bei  $Z = 3,28 \text{ Mrayl} \pm 0,299 \text{ Mrayl}$  (Mittelwert und Standardabweichung) und für Präparate von Sektionsfällen über 70 Jahren bei  $Z = 3,46 \text{ Mrayl} \pm 0,398 \text{ Mrayl}$ . Der Korrelationskoeffizient für den Zusammenhang zwischen Altersklasse und Impedanzanstieg beträgt hierbei  $r = 0,98$ . Im unabhängigen t-Test ergeben sich schwach signifikante Impedanzunterschiede zwischen den Messungen für Proben der prälimakterischen Altersklasse unter 40 Jahren und der periklimakterischen Altersklasse zwischen 40 und 59 Jahren ( $p = 0,02$ ) sowie hoch signifikante Unterschiede zwischen der prälimakterischen Probengruppe und Proben der beiden höchsten Altersklassen ( $p < 0,001$ ). Außerdem unterscheiden sich die Impedanzwerte zwischen der postklimakterischen Altersklasse (60 – 70 Jahre) und dem Senium (über 70 Jahre) im t-Test schwach signifikant ( $p = 0,04$ ) (Abbildung 9). Eine geschlechtsspezifische Aussage zur Abhängigkeit der mittleren Impedanz vom Lebensalter lässt sich wegen der geringen Anzahl von nur vier Sektionsfällen für die Altersklassen unter 40 Jahren und über 70 Jahren nicht mit statistisch signifikanter Sicherheit treffen.



**Abbildung 9** Impedanzwerte für alle Proben eingeteilt in vier Altersklassen

Die folgende Tabelle gibt die Verteilung der für die einzelnen Altersklassen vorliegenden Probanden wieder sowie die Anzahl der durchgeführten Messungen und die altersabhängigen Messergebnisse (**Tabelle 2**).

**Tabelle 2** Altersklassen der Sektionsfälle mit Bezug auf den für Proben weiblicher Sektionsfälle gewählten Bezugszeitraum des Klimakteriums [40. –59. Lebensjahr]

Nr	Alter	Anzahl der Sektionsfälle	Anzahl der Mehrschichtanalysen	mittlere Impedanz [Mrayl]	Std.-Abw. [Mrayl]	Relation zum Klimakterium für weibl. Fälle
1	< 40 Jahre	4 Probanden	162 Messungen	3,29	0,299	präklimakterische Phase
2	40 – 59 Jahre	5 Probanden	192 Messungen	3,36	0,446	periklimakterische Phase
3	60 – 70 Jahre	13 Probanden	475 Messungen	3,39	0,341	postklimakterische Phase
4	> 70 Jahre	4 Probanden	166 Messungen	3,46	0,398	Senium

In der multivariaten Analyse findet man ebenfalls die zuvor im t-Test gezeigten, signifikanten Unterschiede der mittleren Impedanzen ( $p = 0,004$ ) sowie der selektiv untersuchten minimalen Impedanzen der Gesamtmessfenster ( $p < 0,001$ ) für die einzelnen Altersklassen, jedoch gibt es keinen signifikanten Einfluss der Altersklasse auf die Maximalwerte der Impedanzen im Gesamtmessfenster.

Werden zusätzlich für die vier einzelnen Altersklassen winkel- und geschlechtsabhängige Impedanzvergleiche durchgeführt, so unterscheiden sich für alle Altersklassen die Impedanzen bei  $15^\circ$  zwischen beiden Geschlechtern signifikant.

#### 4.6 Impedanzbestimmung ausgewählter histologischer Strukturen

Die selektive Untersuchung einzelner Osteone zeigt, dass deren akusto-elastische Eigenschaften weitgehend an die Eigenschaften des umliegenden Gewebes adaptiert sind. Der Vergleich der Impedanzen selektierter Osteone mit den mittleren Impedanzen der Gesamtmessfenster, in denen die Osteone liegen, zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den mittleren Impedanzwerten der Einzelosteone und den mittleren Impedanzen des gesamten Messfensters.

Auch das elastische Anisotropieverhalten einzelner Osteone entspricht etwa dem des umgebenden Gewebes im Gesamtmessfenster, wobei zwischen den einzelnen Osteonen und dem umgebenden Gewebe des gleichen Messfensters für alle Schnittwinkel keine signifikanten Unterschiede der mittleren Impedanz auftreten.



Für die winkelabhängige Impedanzbestimmung einzelner Osteone ergibt sich lediglich das Impedanzmaximum abweichend von dem Maximum für das gesamte Messfenster beim Schnittwinkel  $0^\circ$  ( $3,56 \text{ Mrayl} \pm 0,337 \text{ Mrayl}$ ), während ihr Minimum ebenfalls beim Schnittwinkel  $60^\circ$  ( $3,23 \text{ Mrayl} \pm 0,401 \text{ Mrayl}$ ) auftritt.

Für alle Winkel liegen die mittleren Impedanzen der Osteon-Areale innerhalb der Standardabweichung der mittleren Impedanzen des Gesamtmessfensters. Die Impedanzen der einzelnen Osteone entsprechen außer bei den Winkeln  $0^\circ$  und  $10^\circ$  (dort reziprokes Verhalten im Vergleich zum Gesamtmessfenster) den Impedanzen des Gesamtmessfensters und besitzen nur leicht höhere mittlere Impedanzen als die Gesamtmessfenster.

Die höchsten Impedanzen im Gesamtmessfenster ergeben sich im Bereich der Schaltlamellen, während histologisch wenig strukturierte Areale mit wenigen Lamellenanteilen sowie junge Osteone die niedrigsten Impedanzwerte aufweisen.

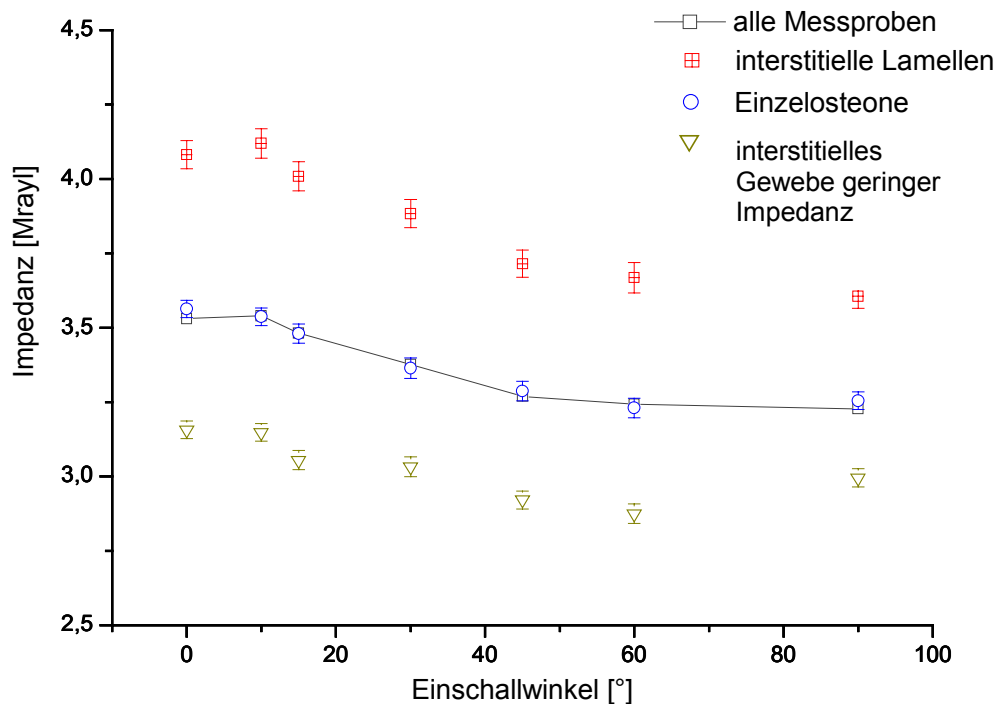
Diese selektiv untersuchten Bereiche besonders hoher und besonders niedriger Impedanz zeigen zur Impedanz des Gesamtmessfensters analoge, anisotrope akusto-elastische Eigenschaften, d. h. der winkelabhängige Verlauf ist für alle Betrachtungen sigmoid mit Maximalimpedanzen bei den Winkeln  $0^\circ$  bzw.  $10^\circ$  und Minimalimpedanzen bei  $60^\circ$  bzw.  $90^\circ$ .

Das analoge winkelabhängige akusto-elastische Verhalten auch für die selektierten Bereiche mit Maximal- und Minimalimpedanzen lässt sich in der graphischen Darstellung an analogen Kurvenverläufen in y-Richtung erkennen (Abbildung 10). Abweichend zur Auswertung der Gesamtmessfenster liegt für die selektierten Areale mit hohen Impedanzen der winkelabhängige Minimalwert bei  $90^\circ$  statt bei  $60^\circ$ , der Maximalwert tritt aber bei gleichem Winkel von  $10^\circ$  auf. Die selektiv ausgewerteten Maximalimpedanzen zeigen eine höhere Streuung als die Mittel- und Minimalwerte (vgl. Tabelle3).

In den selektiv untersuchten Arealen zwischen den Osteonen mit nur geringen Impedanzwerten liegt die winkelabhängige Höchstimpedanz wie bei den einzelnen Osteonen bei  $0^\circ$ , das relative Impedanzminimum dagegen wie für die Gesamtmessfenster bei  $60^\circ$ .

**Tabelle 3** Gemittelte winkelabhängige Impedanzwerte und Standardabweichung a) für das gesamte Messfenster, b) für das Areal einzelner Osteone, c) über Arealen mit hoher Impedanz innerhalb des Messfensters; d) für Areale mit niedriger Impedanz innerhalb des Messfensters. SD = Standardabweichung

Winkel [°]	a) mittlere Impedanz des gesamten Messfensters [Mrayl]	SD [Mrayl]	b) Impedanz einzelner Osteone [Mrayl]	SD [Mrayl]	c) selektive Areale mit hohen Impedanzen [Mrayl]	SD [Mrayl]	d) selektive Areale mit niedrigen Impedanzen [Mrayl]	SD [Mrayl]
0	<b>3,53</b>	0,32	<b>3,56</b>	0,34	<b>4,08</b>	0,55	<b>3,16</b>	0,34
10	<b>3,54</b>	0,35	<b>3,54</b>	0,36	<b>4,12</b>	0,59	<b>3,15</b>	0,36
15	<b>3,48</b>	0,37	<b>3,48</b>	0,39	<b>4,01</b>	0,59	<b>3,05</b>	0,39
30	<b>3,38</b>	0,37	<b>3,36</b>	0,41	<b>3,88</b>	0,58	<b>3,03</b>	0,41
45	<b>3,27</b>	0,34	<b>3,29</b>	0,39	<b>3,72</b>	0,54	<b>2,92</b>	0,35
60	<b>3,24</b>	0,38	<b>3,23</b>	0,40	<b>3,67</b>	0,63	<b>2,86</b>	0,39
90	<b>3,23</b>	0,30	<b>3,25</b>	0,34	<b>3,61</b>	0,47	<b>2,99</b>	0,35



**Abbildung 10** Winkelabhängiger Impedanzverlauf und Standardfehler für das gesamte Messfenster, für einzelne Osteone, für selektive Areale mit hoher Impedanz (interstitielle Lamellen) und für selektive Areale mit niedriger Impedanz innerhalb der Messfenster

#### 4.7 Impedanz bei proximaler und distaler Messlokalisierung

Da nur bei wenigen Autopsiefällen (etwa 10 %) auch das distale Femur zu Messungen zur Verfügung stand, konnte nur für wenige Fälle ein Vergleich zwischen proximal und distal ermittelten Impedanzen durchgeführt werden.

Für die distalen Proben liegen die Impedanzwerte geringfügig höher als für die proximalen. Dieser Unterschied ist in der einfaktoriellen Varianzanalyse unter Berücksichtigung der Messlokalisierung nur für die mittleren Impedanzen signifikant ( $p = 0,01$ ), die maximalen und minimalen Impedanzen in den Messfenstern unterscheiden sich nicht signifikant.

#### 4.8 Intraindividueller Impedanzvergleich

Neben den Impedanzunterschieden zwischen den winkelabhängigen Untergruppen aus allen Proben wurde die Winkelabhängigkeit der Impedanzen gesondert für die einzelnen Sektionsfälle untersucht, um eventuelle, fallbezogene Sekundäreinflüsse zu berücksichtigen. Auch für diesen fallbezogenen Vergleich unter Zuordnung der ausgewerteten Messbilder zu den einzelnen Sektionsfällen ist die Abhängigkeit der Impedanzen vom Einschallwinkel im t-Test für die mittleren, maximalen und minimalen Impedanzen ( $p < 0,001$ ) als hoch signifikant nachzuweisen. Die Winkelabhängigkeit der mittleren Impedanz zeigt sich beim intraindividuellen Vergleich sowohl für das Gesamtmessfenster als auch für die mittleren Impedanzen einzelner Osteone.

Der für den gesamten Probensatz zuvor im t-Test für unabhängige Stichproben gezeigte Einfluss des Geschlechtes auf die Impedanz beim Schnittwinkel von  $15^\circ$  bestätigte sich beim intraindividuellen Vergleich lediglich bei denjenigen Messungen, die an zentraler Position innerhalb des Probenquerschnittes, d. h. etwa in der Mitte zwischen Periost und Endost durchgeführt wurden (unabhängiger t-Test;  $p = 0,019$ ). Der zuvor für den gesamten Probensatz im t-Test gefundene Einfluss von Altersklassen auf die Impedanz konnte im intraindividuellen Vergleich bei einer analogen Einteilung in Altersklassen nur am perimedullären Messort und nur für Proben vom Schnittwinkel  $90^\circ$  festgestellt werden (unabhängiger t-Test;  $p = 0,002$ ).

Eine multivariate Analyse zur getrennten Prüfung von Alters- und Geschlechtseinflüssen auf die mittlere Impedanz von peripher, zentral und perimedullär gemessenen Proben ergab, dass die signifikanten Impedanzunterschiede durch Alter und Geschlecht vor allem bei Proben der Schnittwinkel  $45^\circ$  bis  $90^\circ$  zum Ausdruck kommt, wobei Messbilder vom perimedullären Messort am häufigsten signifikante Alters- und Geschlechtseinflüsse anzeigten.

Es wurden weiterhin bei Proben der Schnittwinkel  $10^\circ$  und  $30^\circ$  anhand der statistischen Auswertung (Kovarianzanalyse) signifikante Varianzunterschiede festgestellt, die neben dem Einfluss durch Alter und Geschlecht einem weiteren, in dieser Studie nicht fassbaren Einflussfaktor unterlagen. Darum empfiehlt es sich, die Proben, auf deren Oberfläche der Schall in transversaler Richtung zur Femurlängsachse auftrifft, zur spezifischen Untersuchung von Alters- und Geschlechtseinflüssen zu wählen, da für diese der bislang unbekannte Sekundärfaktor aus der Kovarianzanalyse statistisch nicht relevant zu sein scheint.

#### 4.9 Impedanzbestimmung in unterschiedlicher Distanz zur Diaphysenmitte

Der Vergleich der Impedanzen für unterschiedliche Messorte im Diaphysenquerschnitt an peripherer, zentraler und perimedullärer Stelle ergibt in einer einfaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede für die mittlere Impedanz der Gesamtmessfenster.

Lediglich für die Mittelwerte einzelner Osteone (ANOVA,  $p = 0,008$ ) sowie für die mittlere Impedanz über Arealen mit besonders niedriger Impedanz (wenig mineralisierte Bereiche), die sich in der Bildanalyse meist innerhalb von jungen Osteonen oder in Arealen mit geringer Lamellenstruktur darstellen, kann man hoch signifikante Unterschiede feststellen (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Dies bedeutet, dass die Knochenimpedanzen im anterioren Femurquerschnitt an beliebiger Stelle repräsentativ gemessen werden können.

Nur für intraindividuelle Vergleiche der Impedanzen aus selektierten Messregionen (wie etwa zum Impedanzvergleich einzelner Osteone) muss man den Messort angeben. Dagegen sind die interindividuellen Schwankungen an den einzelnen Messlokalisationen so stark, dass beim Vergleich der Impedanzwerte verschiedener Probanden kein Zusammenhang von Messlokalisation und Impedanz zu erwarten ist, so dass für interindividuelle Vergleiche die Messungen an beliebiger Stelle im anterioren Femurquerschnitt durchgeführt werden können.

Auch in einer multifaktoriellen Analyse unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Einflusses durch das Patientenalter und –geschlecht konnte kein einheitlicher Zusammenhang zwischen Messlokalisation im Diaphysenquerschnitt und Impedanz gefunden werden.

## 5 Diskussion

Die Bestimmung der akustischen Impedanz von humanem, kortikalem Femurknochen mit der akustischen Rastermikroskopie ergibt bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz einen mittleren Wert von  $Z = 3,38 \pm 0,379$  Mrayl. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Schnittwinkeln der Proben tritt eine Schwankungsbreite für die mittlere Impedanz zwischen 3,23 und 3,54 Mrayl auf. Zusammen mit den Werten für die Minimal- und Maximalimpedanzen aus selektierten Arealen beträgt die Schwankungsbreite 2,1 und 5,8 Mrayl. Einzelne Messwerte überragen diese Eckwerte und müssen als Ausreißer gewertet werden.

Bei der verwendeten Frequenz von 900 MHz ergeben sich für die mittlere Impedanz geringere Werte als bei früheren Arbeitsgruppen, die in ihren Studien bei einer Arbeitsfrequenz von bis zu 600 MHz für die Impedanzen von kortikalem Hundefemur und humanem Femur Werte um 8 Mrayl angeben [40].

Weiss et al. [83] fanden bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ähnliche Impedanzwerte wie Katz et al. ( $7,69 \pm 0,18$  Mrayl) am humanen Femurknochen in Transversalschnitten. Ashman et al. [4] geben für die Impedanz von kompaktem Knochen den Wert  $Z = 6,12$  Mrayl ebenfalls für die Schallfrequenz von 50 MHz bei einer Arbeitstemperatur von  $20^\circ$  C an. Die vorangegangenen Studien basieren weitgehend auf Messungen von Wellenlaufzeiten. Diese Laufzeitbestimmungen erfolgten unter Verwendung des Ultraschallmikroskops entweder im Reflexions- oder im Transmissionsverfahren.

Nach Raum et al. [58] werden die in der eigenen Arbeit ermittelten Werte, die im Vergleich zu den früheren Bestimmungen an Knochen um den Faktor 1,5 bis 2 niedriger sind, durch eine strukturabhängige Dispersion des Schalls im Knochen verursacht, die sich auf die hochfrequenten Wellen von 900 MHz stärker auswirkt als auf Ultraschallwellen im Bereich der bei Voruntersuchungen verwendeten Frequenzen von 3,5 bis 600 MHz.

Hochfrequente Schallwellen werden nach Rho [60] stärker durch die beugenden mikrostrukturellen Merkmale des Knochengewebes beeinflusst als mittel- bis niederfrequente Schallwellen; letztere unterliegen stärker dem Einfluss der Beugung an größeren Strukturkomponenten wie porösen Einschlüssen, Mikrodefekten und unterschiedlichen Anordnungen der groben Gewebstextur. Für niederfrequenten Ultraschall kann man auf der Basis der Ausbreitungsgeschwindigkeit daher nur in begrenztem Umfang Informationen zur Knochenstruktur gewinnen und keine Aussagen zu mechanischen Materialeigenschaften auf mikrostruktureller Ebene. Die Schallfrequenz von 900 MHz ist jedoch ausreichend hoch für eine sensitive Erfassung der richtungsabhängigen elastomechanischen Eigenschaften im Knochengewebe [60].

## 5.1 Impedanzmessung und Modelle der Knochenmikrostruktur

In bisherigen Untersuchungen zur Mikrostruktur des Knochens konnte man zeigen, dass die Struktur des kortikalen Knochengewebes deutlich durch seine funktionelle Beanspruchung beeinflusst wird. Basierend auf licht-, polarisations- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie auf verschiedenen radiologischen Verfahren nimmt man an, dass die Kollagenfasern im kortikalen Knochengewebe vornehmlich in der Richtung von Zugkräften entlang der Longitudinalachse liegen. In kompressionsbelasteten Bereichen des Knochens ordnen sich die Kollagenfasern dagegen zu einem größeren Anteil von der Longitudinalachse abgewandt in der Transversalrichtung an [2].

Hunt et al. [32] haben in ihrer Untersuchung mittels Geschwindigkeitsmessungen von Schallwellen bei einer Frequenz von 50 MHz festgestellt, dass der humane kortikale Knochen die höchsten Elastizitätsmodulen im antero-lateralen Femur sowie im antero-medialen Bereich der Tibia besitzt. Die Elastizitätsmoduln in Longitudinalrichtung sind in seiner Studie im Mittel um den Faktor 1,07 höher als in Transversalrichtung. Diesem Verhältnis entspricht auch das Verhältnis der in dieser Arbeit gemessenen mittleren Impedanz für den Schnittwinkel  $0^\circ$  ( $3,54 \text{ Mrayl} \pm 0,35 \text{ Mrayl}$ ) zur Impedanz bei einem Schnittwinkel von  $90^\circ$  ( $3,23 \text{ Mrayl} \pm 0,3 \text{ Mrayl}$ ) (akusto-elastischen Anisotropie demnach: 1,1). Hunt führt die Unterschiede der Elastizitätsmodulen auf die Kräfteverteilung beim Gang zurück und hat in der antero-lateralen Zone des Femurs vor allem Traktionsbelastungen nachgewiesen.

Die in der vorliegenden rastermikroskopischen Ultraschalluntersuchung verwendeten Proben stammen gerade aus solchen Arealen des Femurs, die nach Gebhardts Theorie [20] in-vivo einer hohen Zugbelastung ausgesetzt waren und einen hohen Mineralisationsgrad besitzen. Es ist ungeklärt, in welchem Ausmaß die Kollagen- und die Mineralanteile jeweils zum gemessenen Anisotropieverhältnis beisteuern.

Entsprechend dem Modell von Pidaparti et al. [55] erreicht das kortikale Femur bei Hunden eine maximale Belastbarkeit durch Zugkräfte, wenn sich die Kollagenfasern in Winkeln zwischen  $10^\circ$  und  $30^\circ$  zur Femurlängsachse einstellen, da dann die Elastizitätsmodulen am größten werden. Bezieht man diese Kraft-Struktur-Beziehung auf das humane Femur und auf die im eigenen Versuch gemessenen Impedanzen, die beim Einschallwinkel von  $10^\circ$  und damit in Richtung der mutmaßlich höchsten Zugbelastung im Femur [10] am größten waren, läßt sich ein Bezug zwischen der winkelabhängigen Impedanzänderung und der richtungsabhängigen Kollagenfaserverteilung herstellen.

Zusätzlich nehmen auch die in den Kollagenfasern eingelagerten Mineralkristalle in dieser Hauptbelastungsrichtung ihren größten Einfluss auf die Impedanz.

Weiterhin liegen nach der Theorie von Fratzl et al. [17] und Hasegawa et al. [28] die extrafibrillären, freien Mineralkristalle mit ihrer c-Achse (Longitudinalachse) bevorzugt in Richtung

der Longitudinalachse des Femurs und weichen dabei bis zu einem Winkel von  $10^\circ$  von der dominierenden Kollagenrichtung ab, weil die Richtung der Längsachse der freien Kristalle wahrscheinlich unabhängig vom Kollagen durch einen noch nicht erfassten Mechanismus von den vorherrschenden Zugkräften im Femur beeinflusst wird [28].

Fratzl et al. [17] haben aus hochauflösenden Röntgenstrukturuntersuchungen geschlossen, dass das in Osteonen mit geringer Remodeling-Aktivität eingelagerte Kalziumphosphat die gesamten Freiräume zwischen den Kollagenfasern einnimmt, und dadurch den hohen Gehalt an Mineralkristallen in diesen Osteonen bestimmt. Vor allem die longitudinal orientierten Fasern sind demnach reich kalzifiziert und weisen eine geringe Remodeling-Frequenz auf, was von den Autoren als Zeichen der Ausreifung des Knochens interpretiert wird. Gemäß diesem Modell würden die freien Kristalle mit ihrer c-Achse somit in einem Winkel etwa zwischen den streng longitudinal-axial orientierten Anteilen der Kollagenfasern und den im Modell Pidapartis beschriebenen Fasern von Winkeln bis zu  $30^\circ$  zur Längsachse verlaufen, d. h. etwa in einem Winkel im Bereich von  $10^\circ$  zur Longitudinalachse des Femur. Für die eigenen Proben des Schnittwinkels  $10^\circ$  würden demnach in den Regionen mit geringer Remodelingrate sehr viele Kristalle in ihrer c-Achse beschallt und zu einer relativen Erhöhung der akustischen Impedanz beitragen im Vergleich zu Proben anderer Schnittwinkel oder zu Arealen hoher Remodelingaktivität.

Gemäß dieser Interpretation könnte man die signifikant geringeren Impedanzwerte bei  $15^\circ$  für die weiblichen Sektionsfälle als Folge eines geringen Einflusses der Mineralkristallkomponente interpretieren, da ein bis zum Abschluss des Klimakteriums fortbestehendes Remodeling eine akusto-elastisch wirksame Kristalleinlagerung innerhalb der Kollagenstruktur in der weiblichen Untersuchungsgruppe verhindert [25, 52, 69].

Im Impedanzvergleich für die Altersgruppen beider Geschlechter zeigt die weibliche Gruppe bis zum Alter von 70 Jahren qualitativ jeweils niedrigere mittlere Impedanzen im Vergleich zur männlichen Gruppe (Abb. 9). Auch dieser Unterschied könnte als Ausdruck der bei Frauen noch bis nach der Menopause höheren Remodelingaktivität interpretiert werden [25].

Die niedrigeren Impedanzwerte für die männliche Untergruppe oberhalb von 70 Jahren ließe sich durch ein erst spät einsetzendes Remodeling bei Männern erklären, da nach Iwamoto et al. [34] ein spät einsetzender Testosteronabfall bei Männern analog zu den perimenopausalen Veränderungen bei Frauen zu Umbauprozessen im Knochengewebe führt.

Einschränkend muss bei dieser Interpretation der alters- und geschlechtsspezifischen Impedanzunterschiede auf die geringe Anzahl der untersuchten Sektionsfälle oberhalb von 70 Jahren hingewiesen werden, die keinen statistisch signifikanten Nachweis von geschlechtsspezifischen Impedanzunterschieden in dieser Altersklasse der untersuchten Fälle ermöglicht.

Weiterhin muss im Hinblick auf die Knochenmodelle früherer Studien beachtet werden, dass die Überlegungen und Modelle zur belastungsadaptierten Ausrichtung von Kollagenfasern und eingelagerten Hydroxylapatitkristallen weitgehend auf früheren Untersuchungen an Tieren basieren.

Diese Modelle stehen daher unter dem Vorbehalt einer nicht gesicherten Übertragbarkeit der an Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse über die Knochenstruktur auf die humane Knochenstruktur. Man kann die ermittelten winkelabhängigen Impedanzunterschiede nicht unmittelbar mit den Aussagen zu den elastomechanischen Eigenschaften von Pidaparti et al. [54] und Hasegawa et al. [28] für Hundeknochen bzw. mit den Strukturaussagen von Fratzl et al. [18] für Pferdeknochen vergleichen. Im Hunde- und Pferdeknochen liegen andere Hauptbelastungskräfte und Osteonanordnungen vor. Für die von Fratzl et al. [18] am Pferdeknochen festgestellte markante Häufung von Kollagenfasern im Winkel von  $45^\circ$  zur Longitudinalachse gibt es in der vorliegenden Impedanzbestimmung für das humane Femur kein entsprechendes Korrelat.

Mehta et al. [49] haben neben strukturellen Unterschieden auch artspezifische Unterschiede in der Proteinzusammensetzung des Knochens festgestellt, weshalb ebenfalls von einem unterschiedlichen artspezifischen akusto-mechanischen Verhalten humaner und tierischer organischer Grundsubstanz ausgegangen werden muss. Mit den eigenen Impedanzwerten konnte das durch Pidaparti et al. [55] für Hundeknochen bei  $30^\circ$  zur Longitudinalrichtung festgestellte Maximum für die Steifheit nicht durch ein entsprechendes Impedanzmaximum für Proben dieses Schnittwinkels bestätigt werden.

## 5.2 Bewertung des Vergleiches mit mechanischen Belastungsversuchen

Nach Wang et al. [79] besteht eine große Ähnlichkeit des humanen Knochens zu den Strukturen des im Tiermodell untersuchten Pavianknochens. Für das Modell des Pavianknochens haben Liu et al. [45] mechanische Strukturuntersuchungen im mikrostrukturellen Bereich an Tibiaproben der Kantenlängen  $150\ \mu\text{m}$  bzw.  $2\ \text{mm}$  durchgeführt und die Verformungsarbeit über den Young'schen Modul im Biegeversuch bestimmt. Als Resultat ergab sich das Modell einer anisotrop-elastischen Knochenstruktur, in der gemäß der Kräfteverteilung und des Verlaufes der Kollagenfasern an den untersuchten Frakturoberflächen  $80\ \%$  aller Fasern in einem Winkel von bis zu  $30^\circ$  zur Longitudinalachse des Knochens liegen. Weitere Untersuchungen an Affenknochen von Liu et al. [44] durch ein Drei-Punkt-Biegesystem zeigten ebenfalls diese richtungsabhängigen Elastizitätsunterschiede.



Die anisotropen elastomechanischen Eigenschaften, die mit der akustischen Rastermikroskopie ermittelt wurden, zeigen ein ähnliches Verhalten wie diese mechanischen Gewebeeigenschaften.

Bei diesem Vergleich muss die Einschränkung gemacht werden, dass nach Aussagen Pidakpartis [55] keine unmittelbare Analogie zwischen den Ergebnissen aus makromechanischen Experimenten sowie den aus den erwähnten mikrostrukturellen Belastungstests und den durch Ultraschall ermittelten Impedanzen aufgestellt werden kann, da nach Choi et al. [9] mechanische Belastungsversuche in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Probengröße zu unterschiedlichen Aussagen über die elastischen Anisotropieeigenschaften führen.

Bei der akustischen Rastermikroskopie dagegen führt die Auswahl einer unterschiedlichen Messfenstergröße nicht zu unterschiedlichen Aussagen bezüglich des richtungsabhängigen Impedanzverlaufes. Die mittleren Impedanzen der Messfenster mit Seitenlängen von  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  bzw.  $1 \times 1 \text{mm}^2$  und die Impedanzen einzelner Osteone zeigen keine bedeutenden Unterschiede bei entsprechenden Einschallwinkeln.

Die Impedanzmaxima für die Gesamtmessfenster und für die einzelnen Osteonen ergeben geringfügige Lageunterschiede innerhalb des Bereiches der Schnittwinkel zwischen  $0^\circ$  und  $15^\circ$  [vgl. Kap. 4.6]. Diese lassen sich am ehesten durch den individuell variablen Verlauf der longitudinal ausgerichteten Osteone im kortikalen Femurknochen erklären.

Petryl et al. [72] haben in humanen Femurpräparaten mit Hilfe einer Tintenperfusionstechnik eine belastungsabhängige Varianz der Verläufe der Havers'schen Kanäle nachgewiesen, wonach die Osteone, bedingt durch unterschiedliche Zug- und Biegekräfte, individuell in Winkeln zwischen  $6^\circ$  und  $10^\circ$  zur Diaphysenachse angeordnet sein können.

### 5.3 Geschlechtsspezifische Impedanzuntersuchung

Hasegawa et al. [29] fanden bei Messungen mit einem akustischen Rastermikroskop der Frequenz 400 MHz am kortikalen Knochen aus einer Beckenkammbiopsie einer prämenopausalen Patientin im Vergleich zu einer Probe einer postmenopausalen Probandin und einer an Osteoporose erkrankten Patientin eine geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit für den Ultraschall als Ausdruck eines geringeren Elastizitätsmoduls. Von den Autoren wird dieses Ergebnis als nicht erklärbares Paradoxon zur üblicherweise hohen Belastungsstabilität des jungen kortikalen Knochens angesehen. Daraus ziehen die Autoren den Schluss, dass die elastischen Eigenschaften allein kein hinreichender Parameter zur Abschätzung des individuellen Frakturrisikos sind [29].

Die in der vorliegenden Untersuchung bei Frauen im jungen und mittleren Alter gemessenen niedrigen Impedanzen könnten auf eine erhöhte Anzahl von Resorptionszonen und auf eine nicht abgeschlossene Mineralisation infolge einer hohen Remodelingaktivität zurückzuführen sein, die nach Haapasalo et al. [25] bereits ab der dritten Lebensdekade einsetzt und bis über die Menopause hinaus andauert.

Nach Seeman [69] hingegen bleibt der im veraschten Knochen ermittelte Mineralisationsgrad je Volumeneinheit reinen Knochengewebes weitgehend für alle Altersstufen gleich, lediglich der höhere Anteil poröser Areale sei verantwortlich für die in der Klinik durch Densitometrie bestimmten niedrigeren Knochendichtewerte im Alter. Nach Seeman beginnt bei Frauen im mittleren Lebensalter eine verstärkte Perforation des kortikalen Knochens und eine verstärkte endostale Remodeling-Aktivität bis zum Eintritt der Menopause, die vom Parathormon induziert wird und im Gegensatz zu Männern kaum durch eine periostale Knochenneubildung ausgeglichen wird. Eine postmenopausale Abnahme der Remodeling-Aktivität nach perimenopausaler Neuorganisation der Kollagenstrukturen und sukzessiver Mineralisation der umgebildeten Kollagenfasern könnte für den ansteigenden Impedanzverlauf in den höheren Altersgruppen verantwortlich sein [69].

Nyssen-Behets et al. [52] beschreiben als Resultat einer alters- und geschlechtsabhängigen histologischen Untersuchung von humanem, kortikalem Tibiaknochen, dass für beide Geschlechter ab dem vierten Lebensjahrzehnt eine erhöhte Porosität des Knochengewebes in umschriebenen Resorptionszonen erkennbar wird, wobei durch den Abbau von Osteozyten und von umgebendem Osteoid ein Substanzverlust entsteht, der nur teilweise durch neu gebildete, wenig mineralisierte Osteone von kleinem Durchmesser in den entstehenden Lücken kompensiert wird. Dabei bleiben bei Männern im Verhältnis zur Querschnittsfläche mehr hoch mineralisierte Areale bis ins Alter bestehen, und die Bildung von wenig mineralisierten Ersatzosteonen findet bei Männern in geringerem Ausmaß als bei Frauen statt. Nach Nyssen-Behets reduziert sich die Remodelingrate im Alter aufgrund einer verminderten Osteoblastenaktivität bei erhaltener Osteoklastenfunktion und fördert die Entstehung von Knochenarealen mit Mikrodefekten. Warum die Impedanzen in der vorliegenden rastermikroskopischen Bestimmung bei Männern oberhalb des 70. Lebensjahres wieder im Vergleich zur Gruppe der Männer zwischen 60 und 70 Jahren abnehmen, lässt sich durch einen Vergleich mit Nyssen-Behets Beobachtungen nicht erklären.

Zu einem ähnlichen Ergebnis wie Seeman [69] kamen auch Iwamoto et al. [34] mit Hilfe der Mikrodensitometrie. Sie stellten eine erhöhte Porosität in den Randlamellen der Havers'schen Kanäle mit zunehmendem Alter fest, die bei Frauen stärker ausgeprägt ist als bei Männern. Die Autoren führen die erhöhte Resorption bei verminderter Neubildung auf die altersabhängige Abnahme der Sexualhormonkonzentration und auf niedrigere Spiegel des

Wachstumshormons (growth hormone) und des Wachstumsfaktors I (insulin-like growth factor) zurück. Die geschlechtsabhängigen Unterschiede der Substanzverluste an Knochengewebe erklären die Autoren durch den abrupten Abfall des Östrogens bei Frauen nach der Menopause im Gegensatz zu dem erst spät einsetzenden Rückgang der Testosteronkonzentration bei Männern [34].

Bei der weiblichen Untergruppe sind die mittleren Impedanzen daher bereits früh vor dem 70. Lebensjahr geringer als bei der männlichen Untergruppe, bei der männlichen Untergruppe nehmen die Impedanzwerte erst in späteren Lebensabschnitten nach dem 70. Lebensjahr geringere Werte an als Ausdruck spät einsetzender Strukturveränderungen des Knochens.

Eine erhöhte Porosität des Knochens im höheren Lebensalter wird auch von McCalden et al. [48] beschrieben, die ebenfalls wie Seeman einen gleichzeitig unveränderten Mineralisationsgrad des Knochengewebes im Alter aufzeigen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung basieren auf Zugversuchen, nach denen mit dem Alter der relative Anteil von Havers'schen Systemen am Knochenmaterial sowie deren Einzeldurchmesser zunimmt. Die im Alter zunehmende Porosität bei proportionaler Verminderung der radiologisch ermittelten Dichte führt zur Abnahme der Belastbarkeit des Knochens und zur Häufung von Frakturereignissen, wobei die Zunahme der Porosität im kortikalen Knochen bei beiden Geschlechtern gleich ist. Zudem kommt als strukturelle Besonderheit im Alter eine höhere Quervernetzung durch Strukturproteine der Kollagenfasern zum Tragen, die bewirkt, dass die plastische Verformbarkeit des Knochens reduziert ist und somit schon bei geringerer Belastung Frakturereignisse auftreten. Der volumenabhängige Mineralgehalt des Knochens bleibt dabei lange unverändert.

Li und Aspden [43] sind in mechanischen Belastungsversuchen an proximalen Femurknochen zu dem Ergebnis gekommen, dass durch osteoporotische Veränderungen vornehmlich ein Verlust an Knochenvolumen und ein geometrischer Umbau erfolgen, weniger aber Änderungen bezüglich der Dichte und Steifheit des Knochens. Davon betroffen sind vor allem immobilisierte Patienten und Frauen im höheren Lebensalter. Für sie findet aufgrund der höheren Porosität des osteoporotischen Knochens eine veränderte Kräfteverteilung statt, wobei die verbliebenen Knochenareale stärker punktuellen Spitzenbelastungen ausgesetzt sind, was deren Frakturgefährdung erhöht. Diese Aussagen beruhen in erster Linie auf Beobachtungen an spongiösen Femuranteilen.

Eine erhöhte Mineralisation des reinen Knochengewebes im Alter postulieren wiederum Boyce und Bleobaum [6] als Ergebnis von elektronenmikroskopischen Untersuchungen am humanen Femurknochen.

In Anlehnung an die oben beschriebenen Studien zur Kollagenausrichtung und -mineralisation lässt sich mit der akustischen Rastermikroskopie der Unterschied im Mineralisationsgrad der Kollagenfasern anhand des Impedanzverhältnisses der Proben der Schnittwinkel  $0^\circ - 30^\circ$  zu den transversal ( $90^\circ$ ) geschnittenen Proben erkennen.

Qualitativ weisen die Impedanzbestimmungen über Schaltlamellen durch höhere Impedanzwerte auf eine geringere Remodelingaktivität im alten, metabolisch inaktiven Femurknochen hin. Durch den verminderten Umbau im Bereich der Schaltlamellen wird der stark mineralisierte Lamellenknochen nicht mehr durch junges, geringer mineralisiertes Knochengewebe ersetzt.

In den sonographischen Untersuchungen am Narwal-Dentin durch Pidaparti [55] et al., das als Gewebe mit völlig isotroper Anordnung der Kollagenfasern angesehen werden kann, zeigte die demineralisierte Form gegenüber dem mineralisierten Dentin ein um ein Drittel reduziertes Anisotropieverhältnis, so dass die Mineralkomponente als wichtiger Einflussfaktor die elastomechanische Anisotropie und damit die akustische Impedanz mit bestimmt.

Zioupos et al. [86] haben in makromechanischen Belastungsversuchen durch statische Belastungs- und Dehnungstests am männlichen humanen Femur eine Abnahme der Elastizitätsmodulen des Knochengewebes nach dem 35. Lebensjahr festgestellt. Der Elastizitätsmodul verringert sich nach Zioupos et al. um 2,3% pro Dekade zwischen dem 35. Lebensjahr und dem Senium. Die Elastizitätsmoduln können nach der Gleichung 6 in Korrelation zur akustischen Impedanz gesetzt werden. d. h. die in der vorliegenden rastermikroskopischen Studie ermittelte akustische Impedanz und der Elastizitätsmodul nehmen in diesem Zeitraum zu. Der Anstieg der Impedanz von Vergleichsproben beträgt zwischen dem 40. bis zum 59. Lebensjahr (zwei Dekaden) etwa 7%, vom 60. bis zum 70. Lebensjahr (eine Dekade) ca. 3 %. Diese gegenläufige Aussage lässt sich damit erklären, dass in der Studie von Zioupos et al. [86] die Elastizitätsmodulen makromechanisch aus Proben der Größe 2,9 – 4,9 mm bestimmt wurden, in denen bereits Mikrofrakturen Einfluss auf die mechanisch bestimmten Elastizitätsmodulen nehmen. Die akustische Rastermikroskopie bewertet dagegen selektiv die elastomechanischen Materialeigenschaften unabhängig von makroskopischen Strukturunterschieden.

## 5.4 Ergebnisse aus Nanoindenterversuchen

Mit Hilfe von Nanoindenterversuchen an humanem Tibiaknochen konnten Rho et al. [62] zeigen, dass sowohl der Young'sche Modul als auch die Mikrohärtigkeit von Osteonen und Schaltlamellen signifikant voneinander abweichen. In einem weiteren Versuch wurden durch Turner et al. [76] das Nanoindenterverfahren (laterale Auflösung: 1 – 5  $\mu\text{m}$ ) und die akustische Rastermikroskopie der Frequenz 50 MHz (laterale Auflösung: 30 – 60  $\mu\text{m}$ ) an humanen Femurdiaphysen daraufhin verglichen, wie genau beide Messverfahren die mechanische Knochenanisotropie darstellen können. Hier zeigten sich wie auch in vorangegangenen mechanischen Belastungsversuchen in Longitudinalrichtung um 40% höhere Werte für den Young'schen Modul im Vergleich zur Transversalrichtung ( $E_L = 20 - 22 \text{ GPa}$ ;  $E_T = 12 - 14 \text{ GPa}$ ).

Es konnte von Turner eine gute Korrelation der ermittelten Elastizitätsmodule anhand des Nanoindenterverfahrens zu den Messungen der Schallgeschwindigkeiten in Longitudinal- und Transversalrichtung hergestellt werden, da beide Verfahren das gleiche Anisotropieverhältnis zeigten. Das Nanoindenterverfahren erwies sich in seinen Versuchen als sensitiver zur Unterscheidung der mechanischen Eigenschaften von kortikalem und trabekulärem Knochen, wobei Turner aber einen bedeutenden Grund im unterschiedlichen Auflösungsvermögen beider Verfahren sieht [76].

Ziv et al. [87] überprüften mit dem Mikroindenterverfahren in detaillierten Untersuchungen die von Wagner und Weiner [78] postulierte Sperrholzstruktur im kortikalen Knochengewebe. Diese Autoren betonen, dass die elektronenmikroskopisch an Frakturflächen ermittelte strukturelle Anisotropie der einzelnen Kollagenfasern höher ist als das mit der Mikrohärtigkeitsbestimmung über Bereiche von 15 – 30  $\mu\text{m}$  gemessene Verhältnis der Mikrohärtigkeit in Longitudinal- und Transversalrichtung.

Durch die richtungsverschiedene Kollagenfasernanordnung in benachbarten Lamellen eines Osteons besitzt das resultierende Gewebe über Areale der Breite 15 – 30  $\mu\text{m}$  eine weniger ausgeprägte Anisotropie als das von anderen Autoren in Nanoindentermessungen über den Bereich von einzelnen Lamellen gemessene mechanische Anisotropieverhältnis von 1,4 [76].

Das in der vorliegenden Studie über die Impedanzmessung ermittelte Anisotropieverhältnis ist mit etwa 1,1 ebenfalls geringer als das genannte Verhältnis von 1,4.

Das Verhältnis der akustischen Impedanzen für die Longitudinal- und Transversalrichtung korreliert jedoch gut mit dem elastischen Anisotropieverhältnis von 1,14 für Kollagen, das Takano et al. [71] für demineralisierten Ulnaknochen von Hunden durch Messung von Schalllaufzeiten bei 50 Hz ermittelt haben. Demnach würden bei der Messung von Im-

pedanzen mit dem akustischen Rastermikroskop vor allem die Elastizitätsmerkmale des Kollagens erfasst, wobei die Mineralkristalle, vor allem in den männlichen Proben, lediglich einen additiven Einfluss auf die mechanische Anisotropieeigenschaften haben.

Zysset et al. [89] bewerten das Verfahren der akustischen Rastermikroskopie als unpräziser für die Quantifizierung der elastischen Knocheneigenschaften als das Nanoindenterverfahren, da die mit dem Nanoindenterverfahren ermittelten Elastizitätsmodule nach Hoffler et al. [31] eine bessere Korrelation zu Referenzwerten aus der Literatur zeigen. Nachteilig sei nach Zysset et al. [89], dass in die Berechnung des Elastizitätsmoduls aus der akustischen Impedanz zwei variable Parameter (Knochendichte und Wellengeschwindigkeit) eingehen müssen. Zur Berechnung des Elastizitätsmoduls müsse dabei die Knochendichte als homogen angenommen werden, was zu Ungenauigkeiten führe [31, 89].

Gegenüber dieser Argumentation von Zysset lässt sich einwenden, dass auch bei der Berechnung der Elastizitätsmoduln aus der Mikrohärtigkeit ein theoretisch als homogen angenommenes Poissonverhältnis von 0,3 für Knochen verwendet werden muss [31]. Da in der vorliegenden Studie mit der akustischen Rastermikroskopie die Anisotropieeigenschaften des kortikalen Knochengewebes direkt durch einen Vergleich relativer Impedanzunterschiede in hoher Auflösung bestimmt wurden, braucht die von Zysset und Hoffler angeführte Heterogenität der Knochendichte nicht berücksichtigt zu werden, denn die lokalen Dichteunterschiede gehen in die hoch aufgelösten lokalen Reflexionssignale und damit in die ortsspezifisch bestimmten Einzelimpedanzen für das Rasterbild ein (vgl. Gleichung 1).

Hoffler et al. [30] betonen, dass eine Korrelation von Elastizitätsmodulen und Mikrohärtigkeit problematisch ist, da beide Größen unterschiedliche physikalische Eigenschaften beschreiben: der Elastizitätsmodul beschreibt ein reversibles mechanisches Verhalten, während die Härte die Resistenz gegenüber plastischer Deformation ausdrückt. Eine exakte Beschreibung der Heterogenität der kortikalen Knochenlamellen sei nur durch eine gleichzeitige Betrachtung der Ergebnisse aus Härtebestimmungen sowie der strukturellen Untersuchungen von Kollagen und nicht kollagenösen Proteinen in den Lamellen möglich.

Auch für die akustische Rastermikroskopie ist eine Korrelation zu anderen bildgebenden Referenzverfahren (z. B. Röntgenstrukturanalysen) oder zum Nanoindenterverfahren notwendig, um exakte elastomechanische Eigenschaften des Knochengewebes zu beschreiben, da nicht geklärt werden kann, zu welchen Anteilen die Kollagen- und die Mineral Komponente das Impedanzsignal bestimmen.

Rho et al. [63] haben am humanen Femur innerhalb einzelner Osteone die Elastizitätsmodule der Lamellen für verschiedene transversale Messdistanzen vom Havers'schen Kanal

bestimmt. Sie stellten abnehmende Elastizitätsmodule für die weiter vom Havers'schen Kanal nach peripher liegenden Lamellen fest, während die unmittelbar perikanalikulär gelegenen Lamellen höhere Elastizitätsmodule zeigten.

In der vorliegenden Impedanzuntersuchung mit dem akustischen Rastermikroskop dagegen wurden die Impedanzen nicht an unterschiedlicher Stelle innerhalb einzelner Osteone bestimmt, sondern in verschiedenen Entfernungen zur Knochenhöhle, so dass ein direkter Impedanzvergleich mit den Nanoindenterwerten von Rho nicht möglich ist. Die eigene Untersuchung zeigt lediglich geringfügige Impedanzunterschiede zwischen perimedullär und periostal gelegenen Osteonen, also über die größere Dimension des gesamten Femurquerschnittes.

Dabei ergaben sich für Probanden unter 50 Jahren die höheren Impedanzen in den perimedullären Osteonen, während in der Gruppe der über 50-jährigen Probanden relativ geringe Impedanzen im perimedullären Bereich und höhere Werte im Areal nahe des Periostes gemessen wurden. Dies könnte durch Beobachtungen von Iwamoto et al. [34] erklärt werden, die mit der Mikrodensitometrie für Probanden ab dem 40. Lebensjahr anhand einer endostalen Abnahme der Knochendichte zunehmende endostale Resorptionsprozesse postuliert haben. Dagegen scheint die bei sehr jungen Probanden noch erhaltene endostale Speicherung von Kalziumphosphaten zu den höheren Mikrodensitometriewerten in Iwamotos Studie und zu den höheren perimedullären Impedanzen der vorliegenden Studie beizutragen.

Nach Haapasalo et al. [25] sowie Ruff und Hayes [66] beginnt aber bereits bei Frauen nach dem 20. Lebensjahr eine kontinuierliche Demineralisation des kortikalen Knochengewebes im Femur, die prä- und perimenopausal ihren höchsten Grad erreicht. Die Impedanzabnahme in der perimedullären Zone mit zunehmendem Alter könnte demnach als Folge einer Veränderung der elasto-mechanischen Eigenschaften durch Demineralisation im Zusammenhang mit Strukturveränderungen des Knochens im Alter angesehen werden.

Ein großer Vorteil der akustischen Rastermikroskopie gegenüber dem Nanoindenterverfahren wird durch die Ausführungen von Ziv et al. [87] sowie Weiner und Wagner [82] hervorgehoben. Darin wird beschrieben, dass die resultierende Gesamtelastizität eines Lamellengefüges besser als die Elastizität einzelner Lamellen die charakteristischen Elastizitätseigenschaften des Knochengewebes widerspiegelt. Die Eigenschaften des Lamellengefüges werden bei gleich hoher Auflösung einfacher durch die akustische Rastermikroskopie erfasst als durch das Nanoindenterverfahren, da die Rastermikroskopie die Elastizitätseigenschaften eines Lamellenbündels in einer einmaligen Messung wiedergibt, während beim Nanoindenterverfahren wegen der Heterogenität der Mikrohärtigkeit im Lamellengefüge nach Zysset et al.

[89], Ziv et al. [87] sowie Rho et al. [63] zahlreiche Messungen durchgeführt und arithmetisch gemittelt werden müssen, um repräsentative Werte für das vorliegende Gewebe zu erhalten.

## 6 Fehlerbetrachtung

### 6.1 Dispersion

Als Dispersion bezeichnet man die Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der Wellenlänge. Je höher die benutzte Ultraschallfrequenz ist, desto geringer ist die Schallgeschwindigkeit im Knochen. Wellen mit hoher Frequenz werden stärker durch Dämpfungsphänomene beeinflusst. Daher weisen Turner et al. [77] auf die begrenzten Möglichkeiten zu Messungen mit hohen Frequenzen hin, da die Dispersion der Schallwellen bei sehr hohen Frequenzen zunimmt, wodurch ab einer oberen Grenzwelle für die Frequenz kein auswertbares Reflexionssignal mehr erzeugt werden kann.

Lees und Klopholz [42] haben die Abschwächung des Ultraschalls bei einer Frequenzzunahme im Bereich von 5 bis 50 MHz ermittelt. Den ermittelten Schallgeschwindigkeitsverlust aufgrund der Dispersion geben sie mit 3 – 5 % am Rinderknochen bei einer Verzehnfachung der Frequenz von 5 auf 50 MHz an. Für hochfrequenten Ultraschall liegen dagegen keine Angaben vor.

Schallwellen unterschiedlicher Frequenz ergeben aufgrund des unterschiedlichen Auflösungsvermögens verschiedene Aussagen über die elasto-mechanischen Eigenschaften des untersuchten Knochengewebes. Während niedrige Frequenzen ( $< 2$  MHz) nur Wellenlängen liefern, die größer als die Havers'schen Systeme sind und damit in erster Linie durch die größeren Struktureinheiten des Knochens beeinflusst werden, kann man nach Rho [61] mit genügend kleinen Wellenlängen, die sich entlang der Mikrostrukturen der Havers'schen Systeme ausbreiten, Aussagen über lokale Materialeigenschaften wie das akusto-elastische Verhalten des Trägermaterials machen. Die von Rho angeführte Möglichkeit der Schallbeeinflussung durch grobe Gewebsstrukturen kann bei den vorliegenden rastermikroskopischen Messungen vernachlässigt werden, da die Schallwellen frequenzbedingt nicht tief in das Knochengewebe eindringen. Somit ist eine Sekundärbeeinflussung des hochfrequenten Ultraschallsignals durch Strukturunterschiede geringer als bei bestehenden Ultraschallverfahren im Transmissionsmodus oder bei Messungen mit niedriger Schallfrequenz.



## 6.2 Temperaturänderungen im Kopplungsmedium

Eine konstante Temperatur des Kopplungsmediums sowie der Geräteelektronik konnte während der durchgeführten Versuche nicht gewährleistet werden. Zur Kompensation dieses Sekundäreinflusses auf das Signal durch Temperaturunterschiede dient ein am IMPB erarbeitetes Verfahren, bei dem Kalibrierungskurven für Reflexionssignale unter verschiedenen Temperaturbedingungen zur Gewinnung erstellt wurden, anhand derer die aktuell gemessenen Impedanzwerte mit unter Standardbedingungen ermittelten Impedanzwerten abgeglichen werden konnten (dynamische Kalibrierung).

Zur dynamischen Kalibrierung dienten Reflexionssignale von der Linsenoberfläche, die im Zusammenhang mit jeder Probenmessung gemacht wurden, als Informationssignal für die bei jeder Messung vorliegenden Temperaturbedingungen der Messelektronik. Die aufgezeichneten Signale aus PMMA-Bereichen im Abgleich mit einem Referenzwert aus der dynamischen Kalibrierung geben Aufschluss über die jeweils vorliegenden Temperaturen von Probe und Kopplungsmedium. Die gemessenen Impedanzen für Knochen wurden entsprechend den vorliegenden Umgebungsbedingungen im Abgleich mit den Referenzwerten korrigiert [58].

## 6.3 Bildartefakte durch Luftbläschen im Kopplungsmedium

Sobald Luftbläschen im Kopplungsmedium Wasser auftreten, werden Bereiche des Wellenbündels vor Erreichen der Probe oder nach der Reflexion an der Probenoberfläche total reflektiert oder gestreut, so dass sie nicht mehr zur Signalentstehung des Bildsignals beitragen. Im Versuch wurde zur Minderung dieses Fehlers entgastetes und destilliertes Wasser verwendet. Dadurch konnte ein annähernd homogenes Dämpfungsverhalten des Kopplungsmediums Wasser für alle Messungen gewährleistet werden, so dass keine relevante Sekundärbeeinflussung der winkelabhängigen Impedanzunterschiede durch unterschiedliche Dämpfungseinflüsse während der Messungen anzunehmen ist.

## 6.4 Höhenunterschiede der Probenoberfläche durch Präparationsartefakte

Unterschiede im Oberflächenrelief mit unterschiedlichen Neigungswinkeln im Bezug zur Horizontalen lassen sich aufgrund von mechanischen Bearbeitungsfehlern während der Probenanfertigung nicht komplett vermeiden. Das verwendete Signalanalyseprogramm (Multi-Layer-Analysis, Raum et al. [58]) gewährleistet eine topographische Erfassung des Oberflä-

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

### 6.5 Kontrasttiefe der Bildverarbeitung

Sehr geringfügige Unterschiede in den Materialeigenschaften können wegen der begrenzten Bildschirm-Kontrasttiefe von 64 Graustufen nicht mehr als Signalunterschiede des  $V(z)$ -Signals dargestellt und darum nicht weiter kontrastiert werden. Dadurch wird fälschlich eine geringfügig höhere Homogenität des elasto-mechanischen Verhaltens der Proben vorgegeben.

### 6.6 Überlagerung durch Mehrfachechos

Störsignale, die aus vorangegangenen Schallimpulsen durch mehrfache Reflexion innerhalb der Linse fortbestehen (Binnenechos), können das aktuelle Probensignal durch Interferenz überlagern und somit zu ungenauen Signalamplituden und verfälschten lokalen Impedanzwerten führen.

### 6.7 Sekundärbeeinflussung des Reflexionssignals durch Scherwellen

Ultraschall kann in Feststoffen an deren Oberfläche neben reflektierten Wellenbündeln auch nach transversal verlaufende Rayleigh-Wellen erzeugen, die nach ihrer Reflexion in Transversalrichtung eine Sekundärbeeinflussung des reflektierten Hauptsignals bewirken können. Diese Rayleigh-Wellen können nach Gardner et al. [19] für die Messungen am Knochenmaterial vernachlässigt werden, da die kritischen Einschallwinkel zur Erzeugung von Rayleigh-Wellen in Knochen bei den Eigenschaften der verwendeten Linse nicht erreicht werden.

Es können sich theoretisch auch Kompressionswellen nach transversal an der Probenoberfläche ausbreiten, sobald ein bestimmter kritischer Einschallwinkel überschritten wird. Diese Überlegungen waren Anlass, die Proben nur in der Normalrichtung zur Probenoberfläche zu untersuchen. Dadurch blieb gewährleistet, dass der genannte kritische Einschallwinkel zur Erzeugung von Kompressionswellen nicht überschritten wurde und daher nicht berücksichtigt zu werden brauchte. Auch die Abhängigkeit der Gleichung für den Reflexionskoeffizienten vom Einschallwinkel konnte bei den in Normalrichtung erfolgten Impedanzmessungen unbeachtet bleiben.

## 6.8 Inhomogenitäten des Knochenmaterials

Die Anisotropie des Knochengewebes erlaubt nur bedingt Rückschlüsse aus den ermittelten lokalen Oberflächensignalen auf die Gesamteigenschaften des Knochens. Zysset et al. [89] betonen, dass sie in ihren Messungen mit dem Nanoindenterverfahren in Abhängigkeit von der Probenlokalisierung im Femur und für beide Geschlechter deutliche Unterschiede in den ermittelten Mikrohärten gefunden haben. In der vorliegenden Studie wurden dagegen keine signifikanten Impedanzunterschiede innerhalb des Querschnittes durch die Femurkortikalis bzw. beim Vergleich proximaler und distaler Proben gemessen. Eventuell sind diese verschiedenen Aussagen damit zu erklären, dass die Nanoindenterbestimmungen von Zysset et al. [89] in einer höheren Auflösung (500 nm) erfolgten als die Impedanzbestimmung mit der akustischen Rastermikroskopie (1  $\mu\text{m}$ ). Zu beachten ist dabei, dass lokalisationspezifische Unterschiede der Mikrohärte von Knochen bei anderen Autoren bereits innerhalb eines einzelnen Osteons mit dem Nanoindenter gezeigt werden konnten [63]. Darum werden die Mikrohärtebestimmungen mit dem Nanoindenter sowohl durch die Lokalisation der Mikrohärtetemessung innerhalb des Gesamtfemurs als auch durch unterschiedliche Lokalisationen innerhalb eines Osteons beeinflusst [63].

In der vorliegenden rastermikroskopischen Studie wurden die resultierenden elasto-mechanischen Eigenschaften innerhalb von größeren Messfenstern über mehrere Lamellen oder über die gesamten Substrukturen der gewählten Gesamtmessfenster bestimmt und keine Impedanzbestimmung von Einzellamellen nach dem Ansatz von Zysset et al. [89], da nach Weiner et al. [82] der Verbund aus mehreren Lamellen die für das elasto-mechanische Verhalten des Knochengewebes maßgebliche Baueinheit darstellt.

## 6.9 Einbettungsverfahren

Durch die Präparation der Proben erfolgte eine Entwässerung der Präparate, da diese nur entwässert in PMMA fixiert werden konnten. Zimmerman et al. [85] haben an Rinderknochen gezeigt, dass die Einbettung in PMMA beim Vergleich einer sonographischen Messung im Transmissions- sowie im Reflexionsmodus für das Reflexionsverfahren eine um etwa 5 % höhere Impedanz bewirkt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde versucht, den Einfluss von PMMA bei der Impedanzbestimmung zu reduzieren, indem eine elektronische Ausschlussmaske die Reflexionssignale aus PMMA-Bezirken selektiv registrierte und von den lokalen  $V(z)$ -Signalen digital subtrahierte, so dass nur Signalanteile aus Knochengewebe in die Impedanzbestimmung

eingingen. Die Anwendung der Ausschlussmaske erbrachte erwartungsgemäß und im Gegensatz zu Zimmermans Ansatz [85] für die selektiven Signale aus Knochenarealen höhere Impedanzwerte als in Kombination mit PMMA-Arealen, da im PMMA im Vergleich zu Knochen durchschnittlich geringere Impedanzen vorliegen ( $Z_{\text{PMMA}} = 3,198 \text{ Mrayl}$ ).

Aus dem gleichen Grund ist wahrscheinlich das gemessene Reflexionssignal für die vorgefertigten Proben im Vergleich zu Nativproben höher, da durch den Entzug des interstitiellen Wassers aus dem Knochengewebe während der Präparation dessen Einfluss auf die Impedanz wegfällt ( $Z_{\text{H}_2\text{O}} \approx 1,48 \text{ Mrayl}$ ). Nach Takano et al. [73] ist aber die Einbettung in PMMA unbedeutend für die akustische Bestimmung der elasto-mechanischen Anisotropie im Knochengewebe.

## 7 Zusammenfassung

Das hoch auflösende Verfahren der akustischen Rastermikroskopie ermöglicht die Bestimmung von Elastizitätseigenschaften von Gewebeproben aus eingebettetem, humanem Femurknochen unter Benutzung fokussierter, gepulster Schallwellen hoher Frequenz im Reflexionsmodus. Gleichzeitig erlaubt die akustische Rastermikroskopie im Vergleich zur Lichtmikroskopie eine visuelle Darstellung von submikroskopischen Knochenstrukturen ohne Anwendung von Färbetechniken.

Wegen der hohen Schalldämpfung bei der angewendeten Schallfrequenz von 900 Mhz werden ausschließlich akusto-elastische Oberflächenmerkmale der Proben untersucht. Aus den reflektierten Ultraschallsignalen lässt sich als Zielgröße die akustische Impedanz der humanen Femurkortikalis im proximalen anterioren Diaphysenquerschnitt mit einer Auflösung von bis zu  $1 \mu\text{m}$  ermitteln. Damit werden Aussagen über die elastomechanischen Knocheneigenschaften in der Dimension weniger Lamellen möglich.

Die Impedanzen werden aus insgesamt 998 Messungen für vorgegebene Schnittwinkel der eingebetteten Proben bestimmt, um die elasto-mechanische Anisotropie des Knochens darzustellen. Weiterhin werden ausgewählte anatomisch-histologische Strukturen in den Gesamtmessfenstern auf ihre Impedanz hin untersucht und mit dem umgebenden Gewebe verglichen. Zusätzlich erfolgt eine getrennte Auswertung der Impedanzen unter Berücksichtigung von Lebensalter und Geschlecht der Sektionsfälle.

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen Impedanzen von den Schnittwinkeln der untersuchten Proben, die auf richtungsabhängige Elastizitätsunterschiede des Knochens hinweist und auf die im Femurschaft wirkenden Kräfte in verschiedenen Richtungen schließen lässt. Die gefundene Richtungsabhängigkeit der Impedanzen steht im

Einklang mit vorhandenen Modellvorstellungen über die elastische Anisotropie von kortikalem Knochengewebe.

Die für einzelne Osteone gemessenen mittleren Impedanzen sind dabei repräsentativ für die mechanischen Eigenschaften des umliegenden kortikalen Gewebes im gleichen Messfenster und lassen sich für interindividuelle Vergleiche von Elastizitätseigenschaften heranziehen. Die Verwendung von Proben der Schnittwinkel  $60^\circ$  und  $90^\circ$  sowie die Positionierung des Schallkopfes im perimedullären Areal ist am besten geeignet für den Vergleich von Alters- und Geschlechtseinflüssen.

Die vorliegende Studie zeigt signifikante geschlechtsabhängige Impedanzunterschiede für Proben des Schnittwinkels  $15^\circ$ , die vermutlich in erster Linie auf eine unterschiedliche Knochenmineralisation und auf eine unterschiedlich hohe Remodelingaktivität beider Geschlechter zurückzuführen sind.

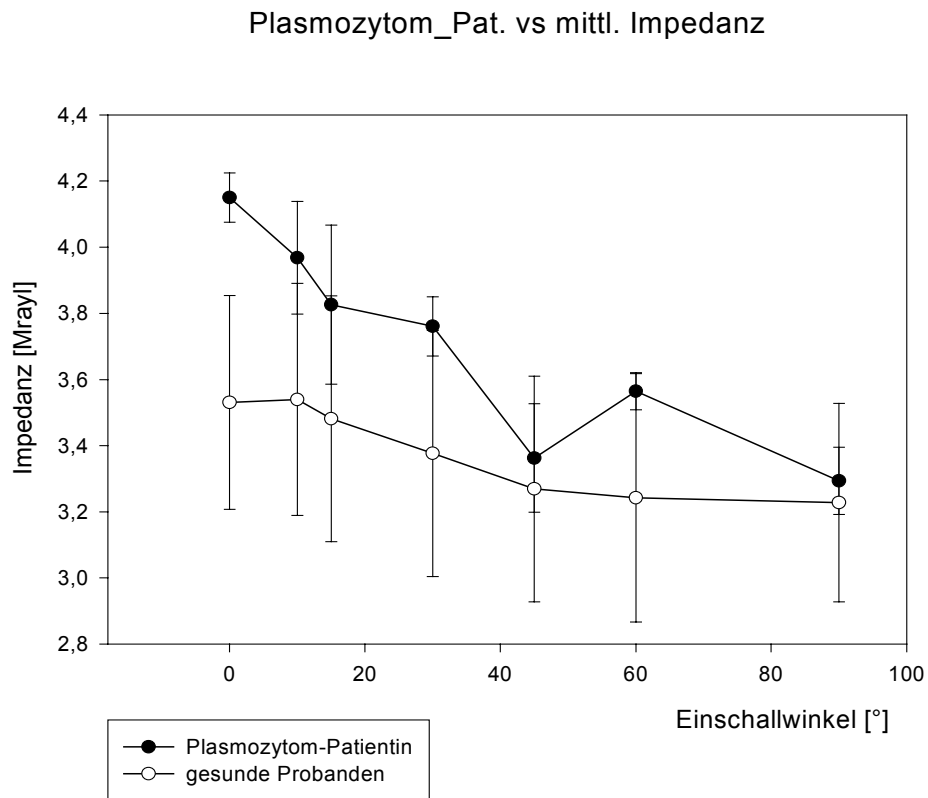
Das Ausmaß der elasto-mechanischen Inhomogenität des Knochengewebes lässt sich repräsentativ anhand von Impedanzunterschieden einzelner Strukturen in den Messfenstern beurteilen, wodurch indirekt Rückschlüsse auf die mechanische Belastbarkeit des Knochens gezogen werden können. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass im Alter gleichzeitig Areale mit hoher Porosität neben stark mineralisierten Arealen auftreten, wobei letztere eine reduzierte Elastizität besitzen [52].

Die Koexistenz von Arealen unterschiedlicher Elastizität fördert die Entstehung und Ausbreitung von Mikrofrakturen, die man als Vorläufer von späteren, klinisch manifesten Frakturen des Röhrenknochens ansehen kann [11]. Dagegen findet man beim jüngeren, mechanisch homogen gestalteten Knochengewebe eine hohe mechanische Resistenz gegenüber Frakturereignissen vor, die das junge Knochengewebe durch ein kontinuierliches Remodeling zur Gewebssubstitution in den Arealen mit Mikrofrakturen erreicht. Diese Remodelingareale werden im jungen Alter wieder durch neues osteonales Gewebe ersetzt [86].

Katz und Meunier [39, 40] haben mit der akustischen Rastermikroskopie für Osteone eine einhüllende Randlamelle mit geringerer Impedanz im Vergleich zu den zentralen Lamellen dargestellt. Diese Randlamelle zeigt Impedanzhomogenität mit den benachbarten Außenlamellen. Nach Guo et al. [24] sowie Norman und Wang [51] haben solche einhüllenden Lamellen eine schützende Wirkung für die Osteone vor der Ausbreitung von Mikrofrakturen, da sie die einwirkenden Frakturkräfte umleiten und somit vor allem innerhalb der Bereiche hoch mineralisierter Schaltlamellen eingrenzen können. Die Quantifizierung von elastisch-homogenen Arealen im kortikalen Knochengewebe mit Hilfe der akustischen Rastermikroskopie könnte somit als ein Diagnostikum zur Prognose von Frakturrisiken eingesetzt werden.

Über die Impedanzuntersuchungen mit der akustischen Rastermikroskopie lassen sich auch Hinweise auf metabolische Skeletveränderungen gewinnen.

Eine außerhalb der vorliegenden Studie vorgenommene Impedanzmessung an Femurpräparaten eines weiblichen Sektionsfalles, für den histologisch ein Plasmozytom in der Femurkortikalis nachgewiesen wurde, ergab qualitativ höhere Impedanzwerte im Vergleich zum Durchschnitt der bezüglich ihres Skelettsystems gesunden Sektionsfälle (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11** mittlere Impedanz und Standardabweichung eines Sektionsfalles mit histologisch nachgewiesenem Plasmozytom in der Femurkortikalis im Vergleich zur mittleren Impedanz der untersuchten gesunden Probanden

Basierend auf den vorliegenden Impedanzmessungen an Sektionsfällen ohne ossäre Vorerkrankungen richtet sich das Interesse in künftigen Untersuchungen auf den Vergleich der Impedanzwerte von pathologisch verändertem zu normalem Knochengewebe, wobei die steigende Inzidenz der Osteoporose speziell die Untersuchung von Probandinnen und Probanden mit dieser Erkrankung nahe legt.

Als Methode zur quantitativen Angabe von Elastizitätsmodulen kann die akustische Rastermikroskopie nur im Zusammenhang mit anderen Verfahren (z. B. Mikrodensitometrie) ange-

wendet werden, da in das Impedanzsignal zwei mechanische Größen (Ultraschallgeschwindigkeit und physikalische Dichte des Knochens) eingehen, von denen eine mit einem anderen Verfahren bestimmt werden muss, um die Elastizitätsmodulen für quantitative Vergleiche berechnen zu können.

Andere bildgebende Verfahren (mikroradiographische Röntgenstrukturanalyse; Mikro-CT; Elektronenmikroskopie) müssen parallel angewendet werden, um zusätzlich Aussagen zur Mikrostruktur des Knochens zu gewinnen, da mit der akustischen Rastermikroskopie nicht eindeutig nachgewiesen werden kann, ob die festgestellten Elastizitätsmerkmale auf Kollagenstrukturen oder auf die Mineralkomponente zurückzuführen sind.

Zur Darstellung der mechanischen Anisotropie des Knochengewebes ist der in der vorliegenden Studie durchgeführte Impedanzvergleich jedoch ein geeigneter Ansatz, um die Richtungsabhängigkeit der akusto-elastischen Eigenschaften von humaner Femurkortikalis zu quantifizieren.

## 8 Literatur

- [1] Ambardar A, Ferris CD: Compact anisotropic bone: Elastic constants, in vitro aging effects and numerical results of a mathematical model. *Acta Biol Acad Sci Hung* 29 (1) (1978) 81 – 94.
- [2] Ascenzi A.: The micromechanics versus the macromechanics of cortical bone – A comprehensive presentation. *Journal of Biomechanical Engineering* 110 (4) (1988) 357 – 363.
- [3] Ascenzi A, Baschieri P, Benvenuti A: The torsional properties of single selected osteons. *J Biomechanics* 27 (7) (1994) 875-884.
- [4] Ashman RB, Cowin SC, Van Buskirk WC, Rice JC: A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomechanics* 17 (1984) 349 – 361.
- [5] Bonorden, SW: Erste Mitteilung über Oberflächen- und Tiefenstrukturuntersuchungen an menschlichem Knochengewebe mit Hilfe der Raster-Scan-Akusto-Mikroskopie (R-SAM); Ein Vergleich zwischen licht- und ultraschallmikroskopischer Darstellung. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 11 (1987) 102 – 107.
- [6] Boyce TM, Bloebaum RD: Cortical ageing differences and fracture implications for the human femoral neck. *Bone* 14 (1993) 769-778.
- [7] Briggs, A: *Microscopy Handbooks 12: An Introduction to Scanning Acoustic Microscopy*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1995.
- [8] Broulik P, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F: Osteon cross sectional size in the iliac crest. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 90 (5) (1982) 339 – 344.
- [9] Choi K, Kuhn JL, Ciarelli MJ, Goldstein SA: The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *J Biomech* 23 (11) (1990) 1103-1113
- [10] Cohen J, Harris WH: The three-dimensional anatomy of Haversian systems. *J Bone Jt Surg* 40 A (1958) 419 – 434.
- [11] Currey JD, Brear K, Zioupos P: The effect of aging and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J of Biomech* 29 (2) (1996) 257 – 260.
- [12] Deetjen P, Speckmann EJ: *Physiologie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1994, S. 145 – 149.
- [13] Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W: Mikro-CT: Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Radiologe* 39 (1999) 203 – 212.
- [14] Eriksen EF: Bone remodeling and bone structure. In: Mundy GR, Martin TJ (Hrsg): *Physiology and Pharmacology of Bone - Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol 107). Library of Congress Cataloging in Publication Data, Berlin, Heidelberg, 1993.
- [15] Evans FG, Bang S: Differences and relationships between the physical properties and the microscopic structure of human femoral, tibial and fibular cortical bone. *Amer J Anat* 120 (1967) 79-88.
- [16] Felsenberg D, Gowin W: Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden. *Radiologe* (39) (1999) 186 – 193.



- [17] Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Vogl G, Koller K: Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int* 48 (6) (1991) 407 – 413.
- [18] Fratzl P, Schreiber S, Boyde A: Characterization of bone mineral crystals in horse radius by small-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int* 58 (1996) 341 – 354.
- [19] Gardner TN, Elliot JC, Sklar Z, Briggs GAD: Acoustic microscope study of the elastic properties of fluorapatite and hydroxyapatite tooth enamel and bone. *J Biomechanics* 25 (11) (1992) 1265 – 1277.
- [20] Gebhardt W: Über funktionell wichtige Anordnungsweisen der feineren und gröberen Bauelemente des Wirbeltierknochens. II. Spezieller Teil. I. Der Bau der Havers'schen Lamellensysteme und seine funktionelle Bedeutung. *Arch f Entwicklungsmechanik der Organismen* 20 (1905) S. 187 – 322.
- [21] Glüer CC, Barkman R, Heller M: Ultraschall – schon praxisreif? *Therapeutische Umschau* 55 (11) (1998) 667 – 675.
- [22] Glüer CC, Barkmann R, Heller M: Quantitativer Ultraschall, Status 1999. *Radiologe* 39 (1999) 213 – 221.
- [23] Grampp S, Henk CB, Imhof H: Die klinische Anwendung der Densitometrie. *Radiologe* 39 (1999) 222 – 227.
- [24] Guo XE, Liang LC, Goldstein SA: Micromechanics of osteonal cortical bone fracture. *Journal of Biomechanical Engineering* 120 (1) 1998 112 – 117.
- [25] Haapasalo H, Kannus P, Sievänen H, Pasanen M, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Oja P, Vuori I: Development of mass, density and estimated mechanical characteristics of bones in caucasian females. *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (11) (1996) 1751 – 1760.
- [26] Han S, Rho J, Medige J, Ziv I: Ultrasound velocity and broadband attenuation over a wide range of bone mineral density. *Osteoporosis International* 6 (1996) 291 – 296.
- [27] Handschin RG, Stern WB: Crystallographic and chemical analysis of human bone apatite (crista iliaca). *Clin Rheumatol* 13 (Suppl 1) (1994) 75 – 90.
- [28] Hasegawa K, Turner CH, Burr DB: Contribution of collagen and mineral to the elastic anisotropy of bone. *Calcif Tissue Int* 55 (5) (1994) 381 – 386.
- [29] Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB: Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy. *Bone* 16 (1995) 85 – 90.
- [30] Hoffer CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA: Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone* 26 (6) (2000) 603 – 609.
- [31] Hoffer CE, Zhang N, Kozloff KM, Grimm MJ, Goldstein SA: Comparison of scanning acoustic microscopy and nanoindentation measures of the elastic properties of human bone lamellae. Internet- Publikation, URL: <http://asme.pinetec.com/bio1999/data/pdfs/a0041997.pdf> (1999).
- [32] Hunt KD, Dean O'Loughlin V, Fitting DW, Adler L: Ultrasonic determination of the elastic modulus of human cortical bone. *Medical & Biological Engineering & Computing* 36 (1998) 51 – 56.
- [33] Ito M: Analysis of trabecular microstructure using micro-computed tomography. *Nippon Rinsho – Japanese Journal of Clinical Medicine* 56 (6) (1998) 1484 - 90.
- [34] Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Tsukimura Y, Toyama Y: Age-related changes in cortical bone in men: metacarpal bone mass measurement study. *Journal of Orthopaedic Science* 5 (2000) 4 – 9.

- [35] Jergas M, Schmid G: Konventionelle Radiologie der Osteoporose und Röntgenabsorptiometrie. *Osteoporose* 39 (1999) 174 – 185.
- [36] Junqueira LC, Carneiro J: Histologie – Zytologie. Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. – übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebler TH. 4. korrigierte und aktualisierte Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1996, S. 190 – 217.
- [37] Kanis JA, McCloskey EV, De Taktas D, Pandle K: Clinical assessment of bone mass, quality and architecture. *Osteoporosis International (Suppl 2)* (1999) S 24 – S 28.
- [38] Karlson P, Doenicke D, Koolman J: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Neubearb. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1994, S. 518 – 522.
- [39] Katz JL, Meunier A: Material properties of single osteons and osteonic lamellae using high frequency scanning acoustic microscopy. In: Odgaard A, Weinans H (Eds): *Bone Structure and Remodeling*. World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1994, S. 157 – 165.
- [40] Katz JL, Meunier A: Scanning acoustic microscope studies of the elastic properties of osteons and osteon lamellae. *J Biomech Eng* 115 (4B) (1993) 543 – 548.
- [41] Landis WJ, Song MJ, Leith A, McEwen L, McEwen B: Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. *Journal of Structural Biology* 110 (1) (1993) 39-54.
- [42] Lees S, Klopholz DZ: Sonic velocity and attenuation in wet compact cow femor for the frequency range of 5 to 100 MHz. *Ultrasound Med Biol* 18 (1992) 303 – 308.
- [43] Li B, Aspden RM: Material properties of bone from the femoral neck and calcare femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporosis International* (7) (1997) 450 – 456.
- [44] Liu D, Wagner HD, Weiner S: Bending and fracture of compact circumferential and osteonal lamellar bone of the baboon tibia. *J Mater Sci Mater Med* 11 (1) (2000) 49 - 60.
- [45] Liu D, Weiner S, Wagner HD: Anisotropic mechanical properties of lamellar bone using miniature cantilever bending specimens. *Journal of Biomechanics* 32 (1999) 647 – 654.
- [46] Martin RB, Ishida J: The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *J Biomech* 22 (5) (1989) 419-426.
- [47] Maev RG, Levin VM: Principles of local sound velocity and attenuation measurements using transmission acoustic microscope. *IEEE Transactions on ultrasonics, ferroelectrics and frequency control*. 44 (1997) 1224 – 1231.
- [48] McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM: Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume*. 75 A(8) (1993) 1193 – 1205.
- [49] Mehta S, Oz OK, Antich PP: Bone elasticity and ultrasound velocity are affected by subtle changes in the organic matrix. *J Bone Miner Res* 13 (1) (1998) 114 – 211.
- [50] Meunier A, Riot O, Christel P, Katz JL: Characterization of Local Anisotropic Elastic Properties of Femoral and Tibial Diaphysis Using Acoustic Transmission Measurements and Acoustic Microscopy. In: Williams KR, Toni A, Middleton J, Palotti G (Ed.): *Interfaces in Medicine and Mechanics II*. Elsevier Applied Science, London, 1991.

- [51] Norman TL, Wang Z: Microdamage of human cortical bone: incidence and morphology in long bones. *Bone* 20 (4) (1997) 375 – 379.
- [52] Nyssen-Behets C, Duchesne Y, Dhem A: Structural changes with aging in cortical bone of the human tibia. *Gerontology* 43 (1997) 316 – 325.
- [53] Peacock M, Liu G, Carey M, Ambrosius W, Turner CH, Hui S, Johnston CC Jr: Bone mass and structure at the hip in men and women over the age of 60 years. *Osteoporosis International* 8 (1998) 231 – 239.
- [54] Pidaparti RMV, Burr DB: Collagen fiber orientation and geometry effects on the mechanical properties of secondary osteons. *J Biomechanics* 25 (8) (1992) 869 – 880.
- [55] Pidaparti RMV, Chandran A, Takano Y, Turner CH: Bone mineral lies mainly outside collagen fibrils: predictions of a composite model for osteonal bone. *J Biomechanics* 29 (7) (1996) 909 – 916.
- [56] Poss R: Natural factors that effect the shape and strength of the aging human femur. *Clin Orthop* 274 (1992) 194-201.
- [57] Prevrhal S, Genant HK: Quantitative Computertomographie. *Radiologe* 39 (1999) 194 – 202.
- [58] Raum K, Brandt J, Klemenz A, Cobet U: Quantitative Ultraschallrastermikroskopie zur Bestimmung der akustischen Impedanz von kortikalem Knochengewebe. *Z Med Phys* 4 (1999) 246 – 253.
- [59] Raum K, Cobet U, Smitmans L, Brandt J: Quantitative scanning acoustic microscopy investigation of cortical bone using a multi layer analysis method. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering. Proceedings of the 1999 IEEE Ultrasonics Symposium* (1999) 593 – 596.
- [60] Rho JY: An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone. *Ultrasonics* 34 (8) (1996) 777-783.
- [61] Rho JY: Ultrasonic characterisation in determining elastic modulus of trabecular bone material. *Medical & Biological Engineering & Computing* 36 (1998); 57-59.
- [62] Rho JY, Tsui TY, Pharr GM: Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* 18 (20) (1997) 1325-1330.
- [63] Rho JY, Zioupos P, Currey JD, Pharr GM: Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation. *Bone* 25 (3) (1999) 295 – 300.
- [64] Riggs CM, Vaughan LC, Evans GP, Lanyon LE, Boyde A: Mechanical implications of collagen fibre orientation in cortical bone of the equine radius. *Anat Embryol (Berl)* 187 (3) (1993) 239-248.
- [65] Romeis B: Einbettung in Methacrylat. In: Böck P (Hrsg): *Mikroskopische Technik*. 17. neubearb. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989, S. 145 – 147.
- [66] Ruff CB, Hayes WC: Sex differences in age-related remodeling of the femur. *Journal of Orthopaedic Research*. 6 (1988) 886 – 896.
- [67] Sasaki N, Ikawa T, Fukuda A: Orientation of mineral in bovine bone and the anisotropic mechanical properties of plexiform bone. *J Biomechanics* 24 (1) (1991) 57 – 61.
- [68] Schulz G, Manns M: Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Osteoporose. in: Schild HH, Heller M (Hrsg): *Osteoporose*. Thieme, Stuttgart, New York, 1992, S. 27 – 51.

- [69] Seeman E: From density to structure: Growing up and growing old on the surfaces of bone. *Journal of bone and mineral research* 12 (4) (1997) 509 - 521.
- [70] Shieh SJ, Zimmerman MC, Langrana NA: The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodeling study. *Journal of Biomechanical Engineering. Transactions of the ASME* 117 (1995) 286 – 292.
- [71] Takano Y, Turner CH, Owan I, Martin RB, Lau ST, Forwood MR, Burr DB: Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependent on the mechanical strain distribution. *Journal of orthopaedic research* 17 (1) (1999) 59 – 66.
- [72] Petrtyl M, Hert J, Fiala P: Spatial organization of the haversian bone in men. *J Biomech* 29 (2) (1996) 161 – 169.
- [73] TakanoY, Turner CH, Burr DB: Mineral anisotropy in mineralized tissues is similar among species and mineral growth occurs independently of collagen orientation in rats: results from acoustic velocity measurements. *Journal of bone and mineral research* 11 (9) (1996) 1292 – 1301.
- [74] Tiffit JT: *The Organic Matrix of Bone Tissue*. In: Urist MR (Hrsg): *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1980.
- [75] Traub W, Arad T, Weiner S: Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 9822 – 9826.
- [76] Turner CH, Rho J, TakanoY, Tsui TY, Pharr GM: The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *Journal of Biomechanics* 32 (1999) 437 – 441.
- [77] Turner CH, Chandran A, Pidaparti, RMV: The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications. *Bone* 17 (1) (1995) 85 – 89.
- [78] Wagner HD, Weiner S: On the relationship between the microstructure of bone and its mechanical stiffness. *J Biomechanics* 25 (1992) 1311 – 1320.
- [79] Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM: An interspecies comparison of bone fracture properties. *Bio-Medical Materials & Engineering*. 8 (1) (1998) 1 – 9.
- [80] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y: A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomechanics* 27 (3) (1994) 339 - 360.
- [81] Weiner S, Arad T, Sabanay I, Traub W: Rotated plywood structure of primary lamellar bone in the rat: Orientations of the collagen fibril arrays. *Bone* 20 (6) (1997) 507 – 514.
- [82] Weiner S, Wagner HD: The material bone: Structure mechanical function relations. *Annual Review Of Materials Science* 28 (1998) 271 – 298.
- [83] Weiss S, Zimmerman MC, Harten RD, Alberta FG; Meunier A: The acoustic and structural properties of the human femur. *Journal of Biomechanical Engineering – Transactions of the ASME* 120 (1) (1998) 71 – 76.
- [84] Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P: The evaluation of cortical bone remodeling with a new ultrasonic technique. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 37 (5) (1990) 433 – 441.
- [85] Zimmerman MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H: The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (8) (1994) 931-938.
- [86] Zioupos P, Currey JD: Changes in the stiffness, strength, and toughness of human

cortical bone with age. *Bone* 22 (1) (1998) 57 – 66.

[87] Ziv V, Wagner HD, Weiner S: Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone* 18 (5) (1996) 417 – 428.

[88] Ziv V, Sabany I, Arad T, Traub W, Weiner S: Transitional structures in lamellar bone. *Microscopy research and technique*. 33 (1996) 203 – 213.

[89] Zysset PK, Guo XE, Hoffler CE, Moore KE, Goldstein SA: Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of Biomechanics* 32 (1999) 1005 – 1012.

## 9 Thesen

1. Mit der akustischen Rastermikroskopie lassen sich über hoch frequente reflektierte Schallwellen die histomorphologischen Merkmale von Gewebepräparaten in mikroskopischer Auflösung als Bildpunkte mit einer definierten Grauskalierung entsprechend den lokalen akusto-elastischen Präparateigenschaften wiedergeben. Die Bestimmung der Amplituden dieser akustischen Reflexionssignale ermöglicht die quantitative Erfassung der lokalen akusto-elastischen Probeneigenschaften. Darum lässt sich mit dem Verfahren der akustischen Rastermikroskopie mit hoher Auflösung das akusto-elastische Verhalten von humanem, kortikalem Knochengewebe quantifizieren.
2. Die hochfrequente akustische Rastermikroskopie weist die elastische Anisotropie des kortikalen Knochens durch Messung der akustischen Impedanz mit einer lateralen Auflösung von nahezu 1  $\mu\text{m}$  nach, indem bei jeweils senkrechter Einschallrichtung die vorpräparierten Proben mit unterschiedlichen Schnittwinkeln zur Horizontalen ( $0^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ) untersucht werden.
3. Nach Aufzeichnung von Mehrschichtbildern durch eine schrittweise Abstandsvergrößerung der akustischen Linse ober- und unterhalb der Fokusebene wird durch eine softwaregesteuerte Analyse der Oberflächentopographie der Proben (Multi Layer Analysis) die Kompensation von Oberflächenartefakten sowie die automatische Detektion von fokussierten Scan-Bildern ermöglicht.
4. Im Ergebnis von etwa 1000 Einzelmessungen an rund 180 Proben ergibt sich für die gemittelte akustische Impedanz bei einer im Experiment technisch vorgegebenen Ultraschallfrequenz von 900 MHz der Wert  $3,38 \pm 0,379$  Mrayl. Die gemittelten winkelabhängigen Impedanzen nehmen Werte zwischen 3,23 und 3,54 Mrayl an.
5. Ein geschlechtsspezifischer Vergleich der Impedanzen zeigt einen hoch signifikanten Impedanzunterschied zwischen beiden Geschlechtern bei Proben des Schnittwinkels  $15^\circ$  in Bezug auf die Horizontalebene.
6. Ein altersabhängiger Impedanzvergleich zeigt einen Trend zu höheren Impedanzwerten bei ansteigendem Lebensalter der untersuchten Sektionsfälle.
7. Die gemittelten Impedanzen in willkürlich gewählten Messfenstern der Flächengröße  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  bzw.  $1 \times 1 \text{mm}^2$  zeigen den gleichen vom Schnittwinkel abhängigen Verlauf wie die an gewählten Einzelosteonen in entsprechenden Messfenstern bestimmten Impedanzen, d. h. das akustische Anisotropieverhalten biologischer Substrukturen unterscheidet sich nicht signifikant vom Verhalten der stichprobenartig ausgewählten umgebenden Gewebsregionen.
8. Die höheren Impedanzen bei Messung in Richtung der Longitudinalachse des Femurs gegenüber der transversalen Einschallrichtung korrelieren mit der in der Literatur beschriebenen histomorphologischen Struktur von Kollagenfasern und den in nahezu paralleler Anordnung eingelagerten Hydroxylapatitkristallen im osteonalen Knochengewebe.
9. Die Richtungsabhängigkeit der akustischen Impedanz ist Ausdruck einer in der Literatur beschriebenen funktionellen Adaptation des Knochengewebes an vorherrschende Belastungskräfte auf das Femur; die geschlechtsabhängigen Unterschiede der Impedanzen sind Ausdruck einer in der Literatur verzeichneten unterschiedlichen Remodelingaktivität in entsprechenden Lebensabschnitten beider Geschlechter.



## Erklärung:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Promotionsschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Promotionsschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Folgende Veröffentlichungen sind auf der Basis dieser Arbeit erstellt worden:

- [1] Raum, K., Cobet, U., Smitmans, L., Brandt, J.: Quantitative Scanning Acoustic Microscopy of Cortical Bone Using a Multi Layer Analysis Method. Proceedings of 1999 IEEE Ultrasonics Symposium (1999) 593-596.
- [2] Smitmans, L., Raum, K., Brandt, J., Klemenz, A.: Variations in the Microstructural Acousto-Mechanical Properties of Cortical Bone Revealed by a Quantitative Acoustic Microscopy Study. Proceedings of 2000 IEEE Ultrasonics Symp., 2001, pp. 1379-1382.

Halle, den 31. August 2001



## Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Hein, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, sowie vor allem dem Initiator und Mentor dieser Arbeit, Herrn Dr. med. J. Brandt, Leiter des Forschungsbereiches der Orthopädischen Klinik, der die wissenschaftliche Betreuung übernahm und für das Manuskript dieser Arbeit in mehrfacher Prüfung hilfreiche Korrekturvorschläge vorstellte.

Mein besonderer Dank gilt dem Engagement des ehemaligen Direktors des Institutes für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Cobet für die Einrichtung und die Bereitstellung des akustischen Rastermikroskops sowie der notwendigen Räumlichkeiten für die Messungen. An dieser Stelle möchte ich voll Hochachtung an seine Gewährleistung einer kontinuierlichen Weiterführung des Forschungsprojektes bis zu seinem bedauerlichen frühen Tod im Frühjahr 2000 erinnern.

Für seine kompetente fachliche Unterstützung auf dem Gebiet der Ultraschallmikroskopie bei allen technischen Problemlösungen sowie für die Korrektur der entsprechenden Kapitel zu den physikalischen Grundlagen in dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. rer. nat. A. Klemenz vom IMPB ganz herzlich.

Im besonderen Maße danke ich Herrn Dr. rer. nat. K. Raum vom IMPB für seine stets freundliche und geduldige Hilfestellung bei der Einarbeitung in das Messverfahren der akustischen Rastermikroskopie, für die Erstellung der Eichkurven und die Durchführung der Messungen an Referenzproben, für die Entwicklung der Analysesoftware für das Mehrschicht-Analyse-Verfahren, für die Unterstützung bei der Datenverwaltung sowie für die hilfreichen Hinweise bei der statistischen Aufarbeitung des Datenmaterials.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. habil. F.-W. Rath, Herrn Oberarzt Dr. sc. med. H. Wessel sowie Herrn F. Wustmann vom Institut für Pathologie für die freundliche Bereitstellung der nativen Femurschäfte.

Außerdem danke ich den Mitarbeiterinnen des Labors der Orthopädischen Klinik Frau Dr. rer. nat. A. Bernstein sowie ihrer medizinisch-technischen Angestellten Frau Vetter für die Einweisung in das Verfahren zur Erstellung von eingebetteten Femurproben.