

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein)

**Die Bestimmung anisotroper elastischer Eigenschaften von
spongiösem Knochen mittels quantitativer akustischer Mikro-
skopie bei verschiedenen Stadien der Osteoporose**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Titels

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Franke

geboren am 19.06.1979 in Merseburg

Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. W. Hein

Prof. Dr. med. habil. W. Mittelmeier (Rostock)

02.09.2008

15.04.2010

Referat:

Die Osteoporose ist eine Stoffwechselerkrankung des Skeletts, die einen Funktionsverlust durch Minderung der Knochensubstanz und -struktur nach sich zieht. Es resultiert eine erhöhte Frakturgefahr bei Unfällen und Minimaltraumen, die neben einem Verlust an Lebensqualität mit volkswirtschaftlich immensen Kosten einhergeht.

Zur quantitativen und qualitativen Untersuchung der Knochenbelastbarkeit existieren diverse Verfahren wie konventionelles Röntgen, Single-Photon-Absorptiometrie (SPA), Dual-Photon-Absorptiometrie (DPA), Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA), quantitative Computertomographie (QCT), Schallgeschwindigkeitsmessungen und die akustische Rastermikroskopie. Die akustische Mikroskopie bietet die Möglichkeit, gleichzeitig morphologische und mechanische Eigenschaften einer Probe zu bestimmen.

In der vorliegenden Studie wurde mit verschiedenen Ultraschallfrequenzen die Veränderung der akustischen Eigenschaften an Knochenproben bei verschiedenen histopathologischen Stadien der Osteoporose ermittelt. Zur Untersuchung kamen n=100 Knochenbiopsien des Beckenkammes, die Patienten in den Jahren 1989 bis 1992 zu diagnostischen Zwecken an der Universitätsklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen wurden. Zielgröße der Messungen war die mittlere akustische Impedanz des trabekulären Knochens, die mit den mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes korreliert. Es zeigte sich bei allen Frequenzen eine Verminderung der mittleren akustischen Impedanz mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung. Die Studie zeigt auf, dass das Verfahren des quantitativen Ultraschalls eine aussagekräftige und reproduzierbare Methode ist, um histologische Strukturen des untersuchten Knochengewebes selektiv zu untersuchen, Änderungen der elastischen Eigenschaften zu quantifizieren und Aufschluss über die mikroskopische und makroskopische Struktur des spongiösen Knochens zu bekommen.

Bibliographische Beschreibung:

Franke, Andreas: Die Bestimmung anisotroper elastischer Eigenschaften von spongiösem Knochen mittels quantitativer akustischer Mikroskopie bei verschiedenen Stadien der Osteoporose.

Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fakultät, Diss., 80 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlagen-----	1
1.1	Aufbau des Knochens -----	1
1.1.1	Organisationsebene 1: Die Hauptkomponenten-----	1
1.1.2	Organisationsebene 2: Die mineralisierte Kollagenfibrille -----	2
1.1.3	Organisationsebene 3: Fibrillenbündel -----	2
1.1.4	Organisationsebene 4: Verschiedene Anordnung der Fibrillenbündel -----	2
1.1.5	Organisationsebene 5: Osteone-----	4
1.1.6	Organisationsebene 6: Kompakter und spongiöser Knochen -----	5
1.1.7	Organisationsebene 7: Der gesamte Knochen-----	5
1.2	Definition, Einteilung und Pathophysiologie der Osteoporose-----	6
1.3	Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der Eigenschaften des Knochens-----	10
1.3.1	Konventionelles Röntgen -----	10
1.3.2	Single-Photon-Absorptiometrie (SPA)-----	11
1.3.3	Dual-Photon-Absorptiometrie (DPA) -----	12
1.3.4	Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA)-----	13
1.3.5	Quantitative Computertomographie (QCT)-----	14
1.3.6	Akustische Rastermikroskopie -----	16
1.3.7	Schallgeschwindigkeit / Breitband-Ultraschallabschwächung-----	18
1.3.8	Axiale Transmission am peripheren Skelett -----	19
2	Material und Methodik -----	21
2.1	Probengewinnung -----	21
2.2	Einbettung und Bearbeitung -----	23
2.3	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 100-----	24
2.4	Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 2000 -----	25
2.5	Durchführung der Messungen -----	29
2.6	Die Akustische Impedanz -----	29
3	Ergebnisse-----	31
3.1	Akustische Impedanzmessung bei 50 MHz-----	31
3.1.1	Knochenbiopsien ohne generalisierte Osteopathie -----	31
3.1.2	Knochenbiopsien mit leichter Osteoporose-----	33
3.1.3	Knochenbiopsien mit mäßiger Osteoporose -----	35
3.1.4	Knochenbiopsien mit schwerer Osteoporose -----	37
3.1.5	Native Knochenbiopsien -----	41
3.1.6	Native Knochenbiopsien in PMMA eingebettet -----	44
3.2	Akustische Impedanzmessung bei 200 MHz -----	46
3.2.1	Knochenbiopsien ohne generalisierte Osteopathie -----	47
3.2.2	Knochenbiopsien mit leichter Osteoporose-----	48
3.2.3	Knochenbiopsien mit mäßiger Osteoporose -----	50
3.2.4	Knochenbiopsien mit schwerer Osteoporose -----	52
3.2.5	Native Knochenbiopsien -----	56
3.2.6	Native Knochenbiopsien in PMMA eingebettet -----	58
3.3	Einfluss des Alters auf den Schweregrad der Erkrankung-----	60
4	Diskussion-----	62
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen-----	71
6	Thesen -----	80

1 Grundlagen

1.1 Aufbau des Knochens

Knochen ist ein aus organischer und anorganischer Matrix bestehendes Gewebe, das während der gesamten Lebenszeit einer strukturellen und metabolischen Anpassung an die funktionellen Ansprüche des Körpers unterliegt. Dabei spielen sowohl eine Stützfunktion als auch die Homöostase des Mineralhaushaltes die wichtigsten Rollen. Weiner und Wagner [89] teilen in Zusammenfassung der Arbeiten früherer Autoren die komplexe Struktur des Knochens in 7 hierarchisch geordnete Organisationsebenen:

1.1.1 Organisationsebene 1: Die Hauptkomponenten

Hydroxylapatit, Kollagen Typ 1 und Wasser sind die Hauptbestandteile des Knochens. Dabei ist Hydroxylapatit das einzige Mineral im Knochen, während neben Kollagen Typ 1 noch etwa 200 andere Proteine darin vorkommen, letztere machen insgesamt aber weniger als 10% des Gesamtproteingehalts aus. Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) findet man im Knochen als dünne, hexagonal-symmetrische, plättchenförmige Kristalle, die eine Größe von 50 x 25 nm sowie eine Dicke von 1,5 nm bis 4,0 nm besitzen. Damit stellen die Hydroxylapatitkristalle die kleinsten bekannten natürlichen Kristalle dar. Messungen der mechanischen Eigenschaften am einzelnen Kristall haben bisher noch nicht stattgefunden. Die zweite Komponente bildet die Fibrille des Kollagen Typ 1. Jede der faserartig angeordneten Fibrillen besitzt einen Durchmesser von 80 nm bis 100 nm. Die Längen der Fibrillen sind unbekannt, da diese mit den Nachbarfibrillen verschmelzen, was eine Abgrenzung der einzelnen Fibrille unmöglich macht. Eine einzelne Fibrille besteht aus einer Polypeptidkette von etwa 1000 Aminosäuren, die in einer Tripelhelix miteinander verwunden sind. Diese Spirale ist zylinderförmig, mit einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Länge von 300 nm. Benachbarte Fibrillenspiralen sind gegeneinander jeweils um 68 nm zueinander verschoben, während die aufeinander folgenden Spiralen durch Freiräume von 35 nm voneinander getrennt sind. Der dritte Bestandteil des Knochens ist Wasser, dessen Bedeutung im Hinblick auf die mechanische Funktion des Knochens nicht vernachlässigt werden darf. So unterscheiden sich Messungen am nativen Knochen von denen am entwässerten und fixierten Knochen [13]. Das Wasser befindet sich sowohl in den einzelnen Fibrillen als auch in

ihren Zwischenräumen. Das Verhältnis der einzelnen Bestandteile variiert. Dabei bleibt der Anteil an Kollagen Typ 1 relativ konstant, während eine Zunahme der mineralisierten Anteile eine Abnahme des Wassergehaltes nach sich zieht. Darüber hinaus nimmt der mineralisierte Anteil im Laufe der Individualentwicklung durch ein Größenwachstum der Mineralkristalle zu [35, 59, 89].

1.1.2 Organisationsebene 2: Die mineralisierte Kollagenfibrille

Die Verbindung zwischen den plättchenförmigen Mineralkristallen und den Kollagenfibrillen ist bis jetzt wenig untersucht. Die Verbindung zwischen organischer und mineralisierter Phase an deren Grenzfläche spielt eine wichtige Rolle bei den mechanischen Eigenschaften des Knochens. Dabei variiert diese Verbindung je nach spezifischer Funktion des Knochens, da zum einen elastische Bindungen zwischen beiden Bestandteilen, zum anderen auch sehr steife Verbindungen benötigt werden. Letztendlich bestimmt jedoch die Anordnung der organischen Anteile in hohem Maße die Ausrichtung der Hydroxylapatitkristalle [35, 59, 87, 89].

1.1.3 Organisationsebene 3: Fibrillenbündel

Mineralisierte Kollagenfibrillen kommen nahezu immer in Faserbündeln vor, die entlang der Längsachse ausgerichtet sind. Die einzelnen Bündel tendieren dazu, untereinander zu verschmelzen. Es ist noch unbekannt, ob der orthotrope Aufbau der Einzelfibrille auf die Bündelstruktur zu übertragen ist. Nach Nysten et al. [57] sind die Fibrillenbündel mineralisierter Truthahnsehnen in zwei Dimensionen regelmäßig angeordnet, während Traub et al. [83] ebenfalls an Truthahnsehnen eine Anordnung in allen drei Raumrichtungen erkannte. Daher kann man eine anisotrope Struktur annehmen, deren höchste mechanische Festigkeit parallel zu den Längsachsen der Fibrillenbündel zu finden ist [35, 59, 89].

1.1.4 Organisationsebene 4: Verschiedene Anordnung der Fibrillenbündel

Die einzelnen Fibrillenbündel können in vielfacher Weise zueinander angeordnet sein. Dabei gibt es Muster sich wiederholender Strukturen. Parallel angeordnete Fibrillen kommen in mineralisierten Sehnen, in Fischgräten, Fischschuppen und Knochen von Amphibien vor.

Die elastischen Eigenschaften sind dadurch optimiert, dass die Fibrillen nahezu in einer Richtung ausgerichtet sind. Daher resultieren viel höhere Steifigkeitswerte parallel zu den Fibrillen als senkrecht dazu [62]. Geflechtknochen stellt das Gegenteil dazu dar. Darin sind die Fibrillen in locker gepackten und kaum orientierten Bündeln unterschiedlicher Durchmesser angeordnet. Der Anteil von mineralisierten Bestandteilen und nicht-kollagenem Material ist im Geflechtknochen relativ hoch. Diese Bestandteile zeigen eine geringe Organisation der Fasern und Kristalle. Geflechtknochen kommt in Skeletten von Amphibien und Reptilien und im Skelett embryonaler Säugetiere vor, wo er im Laufe der Entwicklung von anderen Knochentypen ersetzt wird. Geflechtknochen ist der erste Knochen, der nach einer Fraktur oder anderen Situationen, die eine schnelle Knochenregeneration erfordern, gebildet wird. Mit zunehmender Reifung wird dieser Knochen durch eine komplexere Struktur ersetzt, was eine zunehmende Anisotropie zur Folge hat [81]. Das so genannte Sperrholzmodell des Knochens nimmt verschiedene Lagen von Fibrillenbündeln an. Im Cementum des Zahnes sind die Faserbündel der Fibrillen in den aufeinander folgenden Schichten orthogonal zueinander ausgerichtet. In komplexerer Form kehrt dieses Muster im lamellären Knochen wieder. Darin sind die Schichten der Fibrillenbündel jeweils um 30° zur vorherigen verdreht und es wiederholt sich eine Folge von jeweils 5 Schichten unterschiedlicher Dicke, die im Ganzen eine unsymmetrische Einheit bilden [88]. Daher resultieren bei lamellärem Knochen ähnliche elasto-mechanische Eigenschaften für Messungen parallel und orthogonal zur Längsachse [96]. Dies zeigt, dass diese Art Knochen isotroper ist, als die Bausteine aus denen er besteht, was eine Anpassung an Kompressionskräfte aus verschiedenen Richtungen darstellt. Dieser Knochentyp herrscht daher bei Säugetieren und insbesondere beim Menschen vor.

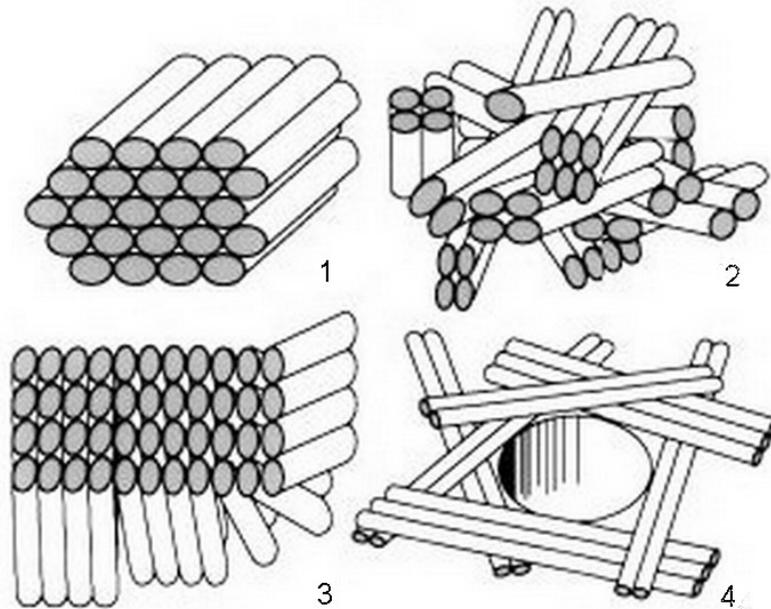


Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier am häufigsten vorkommenden Organisationsmuster: parallel ausgerichtete Fibrillen (1), Geflechtknochen (2), Lamellenknochen (3), sperrholzartiges Organisationsmuster der Fibrillen (4) [89].

Die vierte Organisationsebene repräsentiert die strukturelle Vielfalt, die an die jeweilige Funktion gebunden ist. So müssen mineralisierte Sehnen hauptsächlich Zugkräften widerstehen, Dentin Kompressionskräften und lamellärer Knochen verschiedenen Kräften in mehreren Richtungen [35, 59, 89].

1.1.5 Organisationsebene 5: Osteone

Knochen unterliegen im Gegensatz zu Dentin, Cementum, Fischschuppen und den meisten mineralisierten Sehnen einem ständigen Umbauprozess, dem so genannten Remodeling. Dabei entstehen durch knochenabbauende Osteoblasten lange Tunnel, die von knochenbildenden Osteoblasten mit einer dünnen Zementschicht und anschließend mit mehreren Schichten lamellären Knochens aufgefüllt werden. Es verbleibt nur ein kleiner zentraler Kanal, in dem Blutgefäße und Nerven verlaufen. Die Osteocyten befinden sich in Lakunen zwischen den einzelnen Lamellen. Kapillar-ähnliche Canaliculi verlaufen von den Lakunen weg und beherbergen die langen Fortsätze der Osteocyten, die untereinander über gapjunctions verbunden sind. Durch diese Fortsätze erfolgt die Versorgung der Osteocyten über

Diffusion. Die Osteone werden auch Havers-Systeme genannt und sind entlang der Hauptbelastungsrichtungen des Knochens orientiert [35, 59, 89].

1.1.6 Organisationsebene 6: Kompakter und spongiöser Knochen

Die Hauptbestandteile des Skeletts sind die Substantia compacta und die Substantia spongiosa. Während der kompakte Knochen nahezu alleiniger Bestandteil der Diaphysen der langen Röhrenknochen ist, bestehen die epimetaphysären Anteile der langen Röhrenknochen, die Wirbelsäule, das Becken sowie das Sternum überwiegend aus Spongiosa. Die spongiöse Knochenkonstruktion verfolgt das Leichtbauprinzip, gekennzeichnet dadurch, dass die Trabekel entlang der Zug- und Druckbelastungslinien angeordnet sind, während an Regionen geringerer Belastung eine rarefizierte Trabekelstruktur zu finden ist. Im spongiösen Knochen bestehen 20% des Gesamtvolumens aus mineralisierten Anteilen, während 80% des Gesamtvolumens auf das Hohlraumsystem und Markräume entfallen [76]. Den Hauptbestandteil der Substantia compacta bilden die Osteone oder Havers-Systeme. Zwischen den Havers-Systemen, dessen ringförmigen Lamellen auch als Speziallamellen bezeichnet werden, liegen Schaltlamellen als Residuen älterer, mehrfach umgebauter Osteone. Zur äußeren und inneren Oberfläche wird die kompakte Schicht von durchgehenden Knochenlamellen ummantelt, die als Generallamellen bezeichnet werden [35, 59, 89].

1.1.7 Organisationsebene 7: Der gesamte Knochen

In seiner Gesamtheit bildet der Knochen ein lebendes und dynamisches Gewebe, welches sich optimal an permanente aber auch wechselnde Zug-, Druck-, Biege- und Torsionsbelastungen anpassen kann. Durch eine überaus heterogene Form und Größe der einzelnen Knochen sowie eine an die jeweilige Belastung adaptierte Mikroarchitektur mit daraus folgender Inhomogenität lassen sich eindeutige Aussagen über die elasto-mechanischen Eigenschaften nur schwer treffen. Darüber kommt dem Knochen über Prozesse wie Knochenanbau, Resorption und Mineralisation eine entscheidende Rolle in der Kalziumhomöostase des Plasmas und der Extrazellulärflüssigkeit zu [35, 59, 89].

1.2 Definition, Einteilung und Pathophysiologie der Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des Skeletts, die mit einer Verminderung der Knochenmasse und einer Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes einhergeht, was zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit mit verstärktem Frakturrisiko führt [41]. Diese Definition trägt der Erkenntnis Rechnung, dass es bei der Osteoporose nicht nur zum Knochenabbau, sondern im Rahmen des Massenverlustes zu einer grundsätzlichen Änderung der Mikroarchitektur kommt. Gemeint sind die Dicke, Ausrichtung, Vernetzung von Spongiosatrabekeln und deren Beziehung zur Kortikalis. Damit ändern sich Tragfähigkeit und Biegungs- sowie Kompressionsfestigkeit der betroffenen Knochen grundlegend [69]. Ätiopathologisch liegt der Osteoporose ein multifaktorieller Prozess zu Grunde. Um einen einheitlichen Bewertungsmaßstab zu haben, bezieht man sich auf die „peak bone mass“, die maximale Knochenmasse, die nach Abschluss der skelettalen Wachstumsphase erreicht wird. Diese unterliegt später einem physiologischen Verlust im Rahmen des Skelettremodelling, geht in den peri- und postmenopausalen Jahren in eine Phase des beschleunigten Knochensubstanzverlustes über und endet bei körperlicher Inaktivität in einem noch schnelleren Verlust parallel zur Involution der Muskulatur und anderer Organsysteme. Die WHO unterscheidet in Relation zur „peak bone mass“ drei Stadien der Osteoporose [91].

1. Eine Osteopenie liegt vor, wenn die Abweichung im Rahmen des physiologischen Knochenmasseverlustes 1,0 bis 2,5 Standardabweichungen zum Mittelwert der peak bone mass beträgt.
2. Eine präklinische Osteoporose liegt dann vor, wenn die Abweichung mehr als 2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert der peak bone mass beträgt.
3. Eine manifeste Osteoporose liegt vor, wenn zusätzlich zu Punkt 2. Frakturen hinzukommen, die auf die Umbauprozesse am Knochen zurückzuführen sind.

Weicht der Knochenmineralgehalt weniger als eine Standardabweichung vom Mittel der peak bone mass ab, liegen physiologische Knochenverhältnisse vor.

Unter ätiopathologischen Gesichtspunkten verbinden Ringe et al. [68] die im internationalen Schrifttum überwiegende Einteilung in primäre und sekundäre Osteoporose mit deren eigener Einteilung in Typ I und Typ II Osteoporose. Dabei beschreibt die primäre Form die ätiologisch ungeklärten, die sekundäre Form die Osteoporosen, die auf eine Begleiterkran-

kung zurückzuführen sind, während der Typ I die postmenopausalen und idiopathischen Osteoporosen sowie der Typ II die senile Osteoporose beschreibt.

I. Primäre Osteoporose

1. Idiopathische Osteoporose (juvenil, adult, prämenopausal, präsenil)
2. Postmenopausale Osteoporose (Typ I)
3. Senile Osteoporose (Typ II)

II. Sekundäre Osteoporose

1. Endokrin/metabolisch (Cushing Syndrom, Hyperthyreose, Hypogonadismus, Hyperparathyreoidismus, Akromegalie, Diabetes mellitus)
2. Iatrogen/medikamentös (Glukokortikoide, Heparine, Schilddrüsenhormone, LH-RH-Analoga, Tamoxifen, Danazol, Gluthetimid, Laxantien, Cholestyramin)
3. Myelogen/onkologisch (Multiples Myelom, Mastocytose, lymphoproliferative Erkrankungen, diffuse Knochenmarkskarzinose)
4. Parainfektös/immunogen (chronische Polyarthrit, Morbus Crohn)
5. Inaktivität/Immobilisation (Bettruhe, Paraplegie, Hemiplegie, Raumfahrt)
6. Hereditäre Bindegewebserkrankungen (Osteogenesis imperfecta, Marfan Syndrom, Ehlers Danlos Syndrom, Menkes Syndrom, Homocystinurie)
7. Im Rahmen komplexer Osteopathien (renale Osteopathie (chronische Niereninsuffizienz), intestinale Osteopathie (chronische Malabsorption))

Die eindeutige Zuordnung einer Osteoporose zu den oben genannten Erkrankungsgruppen ist nicht immer einfach. Durch die multifaktorielle Genese bestehen fließende Übergänge. Alle osteokatabolen Einwirkungen auf das Skelett im Rahmen dieser multifaktoriellen Genese, bestimmte Faktoren, die per se zur Osteoporose führen können und Faktoren, die bei Osteoporosepatienten immer wieder identifizierbar sind, bezeichnet man im engeren Sinn als Risikofaktoren. Es werden sechs Hauptfaktoren angeführt, die durch weitere Faktoren erläutert und ergänzt werden. Häufig findet sich eine Koinzidenz mehrerer Faktoren.

Risikofaktoren:

1. Bewegungsmangel, sitzende Tätigkeit, kein Sport, Immobilität
2. Calciumarme Kost, Laktoseintoleranz, Phosphat- und faserreiche Kost
3. Genetische Disposition, positive Familienanamnese
4. Östrogenmangel, frühe Menopause, sekundäre Amenorrhoe, Nulipara
5. Schlanker Habitus, helle, dünne Haut, blonde Haarfarbe, graziler Skelettbau
6. Starkes Rauchen, Alkohol, Koffein

Knochenmatrix wird ausschließlich von Osteoblasten gebildet. Diese sind histologisch als kubische, epithelartig angeordneter Zellbelag auf der Knochenoberfläche zu erkennen. Die Osteoblasten stellen ein leistungsfähiges Zellsystem dar, das bestimmten Steuerungsmechanismen unterliegt. Dabei sind vor allem das Parathormon, Kalzitriol ($1,25(\text{OH})\text{D}_3$) und Kalzitinin, das Wachstumshormon (GH) und die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 zu nennen, die osteotrope Wirkung zeigen. Beim erwachsenen Menschen sind etwa 20-25% der Spongiosa endostal von Osteoblasten besetzt. Die Phase der Knochenreifung beginnt mit der Bildung eines unmineralisierten Osteoidsaums, der unter der Wirkung von Kalzitriol mineralisiert wird. Nach einigen Tagen Osteoidproduktion haben sich die Osteoblasten in ihrer eigenen Matrix eingemauert. Es sind damit Osteocyten, die nicht mehr in der Funktion des Knochenanbaus, sondern nur noch der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase dienen. Die Osteocyten stehen untereinander über das erwähnte kanaliculäre System in Verbindung. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich vom Makrophagensystem ableiten. Mittels lysosomaler Enzyme resorbieren diese muldenförmigen Oberflächendefekte, sogenannte Howship-Lakunen. Das Parathormon stellt den größten Stimulationsreiz für diese Zellen dar, während Kalzitinin eine Stimulationsminderung verursacht. Die gesamte Knochenmasse wird durch die Bilanz von An- und Abbauvorgängen bestimmt. Diese unterliegen einem genauen Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten. Die Regulationsmechanismen der Zellen untereinander werden in der Coupling-Hypothese sowie dem Quantum-Konzept erklärt. Die Coupling-Hypothese beschreibt die parallele Änderung der Knochenanbau- und Resorptionsraten, um die Knochenmasse aufrecht zu erhalten. Dabei werden die Kopplungssignale (Prostaglandine, Interleukine, Parathormon) [58] von Osteoblasten auf Osteoklasten übertragen, während Osteoklasten über freigesetzte Knochenmatrixproteine Osteoblasten direkt stimulieren. Das Quantum-Konzept stellt das Remodeling des Knochens in den Vordergrund, bei dem es weniger um Formveränderungen des Knochens denn um den Ersatz eines Abbauvorgangs am selben Ort in selber Quantität geht. Demzufolge besteht die Knochenoberfläche aus einer großen Zahl kleinster Knochenbaueinheiten, die alle für sich eine Resorptions- und Anbauphase durchlaufen. Diese Ein-

heit, die dem Zusammenspiel einer bestimmten Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten entspricht, nennt man „basic multicellular unit“ (BMU). Der Knochenumsatz auf Ebene der „basic multicellular units“ lässt sich in 4 Phasen einteilen.

1. Resorptionsphase, eine Resorptionslakune entsteht
2. Umschaltphase, Austausch der Osteoklasten gegen Osteoblasten
3. Anbauphase, Auffüllen der Lakune mit Knochenmatrix
4. Ruhephase

Die neu abgelagerte Knochenmatrix lässt sich vom alten Knochen durch eine mikroskopisch sichtbare Kittlinie abgrenzen. Die neue Matrix bezeichnet man als „bone structure unit“ (BSU). Bei der Osteoporose vom postmenopausalen Typ und von Glukokortikoid-Typ kommt es zu einem schnellen, osteoklastär verursachten Knochenverlust (high turnover). Trotz normaler Syntheseleistung wird das Substanzdefizit von den Osteoblasten nicht ausgeglichen. Die senile Osteoporose dagegen zeichnet sich durch eine verlangsamte Osteoblastentätigkeit aus. Bei normaler Osteoklastendynamik entstehen dadurch Substanzverluste. Beide Zustände bezeichnet man als uncoupling. Im Ergebnis erhält man einen Knochen mit ausgedünnter, rarefzierter Spongiosa, perforierten Trabekeln und Substanzverlusten auch im kortikalen Anteil [27].

1.3 Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der Eigenschaften des Knochens

1.3.1 Konventionelles Röntgen

Die Röntgenaufnahme des Achsenskelettes in zwei Ebenen steht meist am Beginn der klinischen Diagnostik bei Osteoporoseverdacht. Grobe Abnormalitäten im Sinne von Frakturen stellen das härteste Kriterium zur klinischen Beurteilung der Osteoporose dar, da erst bei Verlusten ab 30% der Knochenmasse Veränderungen auf der Röntgenaufnahme sichtbar sind. Dabei stellen jedoch die Weichteilüberlagerung, verschiedene Aufnahmetechniken sowie Patientenpositionierungen erhebliche Störfaktoren für die qualitative Auswertung von Röntgenaufnahmen dar. Charakteristisch für das Vorliegen einer Osteoporose sind eine erhöhte Strahlentransparenz der Knochen aufgrund des geringeren Mineralsalzgehaltes, eine ausgedünnte Trabekelarchitektur und Änderungen von Form und Größe einzelner Wirbelkörper, was in der Ausbildung von Fisch- und Keilwirbeln resultiert. Verschiedene Klassifikationen der Osteoporose orientieren sich an Strahlentransparenz und Wirbelveränderungen bei Osteoporotikern. Dabei unterscheiden Ringe et al. [68] 4 Schweregrade der Erkrankung:

Index 0: kein sicherer pathologischer Befund

Index 1: erhöhte Strahlentransparenz ohne eindeutige Wirbelkörperdeformierungen

Index 2: Deformierung bzw. Einbruch von ein bis drei Wirbeln

Index 3: deutliche Deformierung von mehr als 3 Wirbeln

Dieser Index erlaubt eine Feststellung des Gleichbleibens oder einer Verschlechterung der Erkrankung.

Der Singh-Index stellt eine semi-quantitative Beurteilung des Trabekelverlustes und der Trabekelarchitektur am proximalen Femur dar. Der Röntgenbefund wird anhand der Verteilung der Spongiosatrajektorien im Oberschenkelhals einer Vorlage von sieben definierten Stadien zugeteilt. Dabei gelten Grad 5-7 als altersabhängiger Normalbefund, während Grad 4-0 verschiedene Schweregrade der Osteoporose markieren. Der Singh-Index ist von großer

Bedeutung in Ländern, denen moderne Meßmethoden des Knochenmineralgehaltes zu kostenintensiv sind.

Ein früher gebräuchlicher Parameter zur quantitativen Auswertung von Röntgenbildern der Wirbelsäule ist der „Lumbar Spine Score“ (LSC). Dabei wird der Quotient von mittlerer und Vorderkantenhöhe des 3. Lendenwirbelkörpers gebildet und mit 100% multipliziert. Werte unterhalb von 80% werden als pathologisch eingestuft. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die Brustwirbelsäule, die ebenfalls Ausgangspunkt einer Osteoporose sein kann, nicht miterfasst wird. Unter Berücksichtigung dieser Schwächen wurde von Kleerekoper und Mitarbeitern ein „Vertebral Deformation Score“ (VDS) beschrieben. Dieser wurde modifiziert [67] und findet als Wirbeldeformationsscore (WDS) weiterhin Verwendung. Dabei wird die anteriore, mittlere und posteriore Höhe der Wirbelkörper Th4 bis L5 vermessen. Liegt eine der Höhen unter 85%, ist der WDS 1. Liegen zwei der Höhen unter 85% oder eine Höhe unter 70%, beträgt der WDS 2. Im Stadium 3 sind alle Höhen unter 85% des Ausgangswertes vermindert [68].

1.3.2 Single-Photon-Absorptiometrie (SPA)

Es lag nahe, die vom Mineralgehalt abhängig Schwächung ionisierender Strahlung durch den Knochen nicht indirekt über vergleichende Schwärzungsmethoden photometrisch zu bestimmen, sondern die Absorption monochromatischer Strahlung mittels Szintillationsdetektoren direkt zu messen. Grundlage dieser Absorptiometrie ist das Schwächungsgesetz für monochromatische Strahlung:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot d} \quad \text{oder} \quad I = I_0 \cdot e^{-(\mu \cdot \sigma) \cdot d}$$

I	Strahlungsintensität ohne Absorber	
I_0	Strahlungsintensität nach Durchstrahlung eines Absorbers	
d	Schichtdicke des Absorbers	(cm)
σ	Dichte des Absorbers	(g/cm ³)
μ	linearer Schwächungskoeffizient	(1/cm)
μ/σ	Massenschwächungskoeffizient	(cm ² /g)
$\sigma \cdot d$	Flächenbelegungsdichte	(g/cm ²)

Der lineare Schwächungskoeffizient und der Massenschwächungskoeffizient hängen dabei stark von der Quantenenergie der benutzten Strahlung und der Ordnungszahl des Absorbers ab [68]. Bei niedrigen Quantenenergien von 20 bis 40 KeV ist die durch den Knochen verursachte Schwächung etwa fünfmal so groß wie die Schwächung hervorgerufen durch Luft, Muskelgewebe oder Wasser. Bei höheren Quantenenergien ist der Unterschied zwischen Knochen und Weichteilgewebe kaum noch vorhanden. Cameron und Sorenson [12] entwickelten einen Translationsscanner mit einer I-125 Strahlungsquelle für Messungen am Unterarm. Da die Weichteile der Knochen nicht an jeder Stelle mit derselben Schichtdicke überlagern, wird der Arm in einem Wassertank positioniert, da Wasser eine weichteil-äquivalente Schwächung aufweist. Die Strahlungsquelle und der gegenüber liegende Detektor werden mit konstanter Schreibgeschwindigkeit quer zur Längsachse des Armes bewegt und die gemessene Schwächung zur Bestimmung des Knochenmineralgehaltes herangezogen. Dabei zu beachten ist der so genannte Fettfehler, der bei adipösen Patienten zu einer Unterschätzung des Mineralgehaltes um bis zu 30% führen kann [36]. Die SPA geht von einem Zweikompartmentsystem bestehend aus Knochen und Weichteilgewebe/Wasser aus, mit einer zu vernachlässigenden intra- und interindividuellen Variabilität für das dritte Kompartiment, das Fettgewebe. Nimmt der Fettgehalt im Weichteilgewebe oder dem Markraum nun erheblich zu, kommt es aufgrund der geringeren Absorption im Fett zu einer geringeren Schwächung des Photonenstrahls. Wiederholungsmessungen am Radius verlangen ein präzises Wiederfinden der Messstelle, was mit heutiger Computerunterstützung kein großes Problem mehr darstellt. Von Börner und Mitarbeitern wurde das beschriebene Verfahren zur Vermessung der Spongiosa und Kompakta an der Mittelphalanx III verwendet [9]. Die Single Photon Absorptiometrie stellt ein kostengünstiges Verfahren mit einer relativ geringen Strahlenbelastung von 20-100 μ S dar.

1.3.3 Dual-Photon-Absorptiometrie (DPA)

Die Dual-Photon-Absorptiometrie wurde Ende der 60er Jahre entwickelt. Dabei kommt eine Radionuklid-Quelle mit zwei Energiepeaks, wie z. B. Gd 153 zum Einsatz. Damit wird die störende Überlagerung des Achsenskeletts durch Weichteile methodisch eliminiert. Dabei kann im Gegensatz zur SPA auf das Wasserbad verzichtet werden. Die Photonenquelle ist bei der DPA starr mit dem Detektor verbunden. Die DPA erlaubt Messungen an der Lendenwirbelsäule, am Schenkelhals sowie Ganzkörpermessungen [24, 36]. Zur Messung des Mineralgehaltes wird die interessierende anatomische Region von kranial nach kaudal ges-

cannt und die Flächenwerte über das gesamte Messfeld werden summiert. Daraus resultiert ein Flächenwert (g/cm^2), die sogenannte Bone Mineral Density (BMD) sowie das Äquivalent des Flächenmineralgehaltes (g/cm) des durchstrahlten Knochens, der Bone Mineral Content (BMC). Beide Werte erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf die wirkliche Knochendichte (g/cm^3). Störgrößen sind Weichteilverkalkungen, lokale Inhomogenitäten des Mineralgehaltes des Knochens und erneut der Fettfehler [24]. Die Strahlenexposition beträgt ca. $50 \mu\text{S}$ bei Wirbelsäulenmessungen [40].

1.3.4 Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA)

Bei der Dual Energy X-Ray Absorptiometrie wird eine Röntgenröhre anstelle natürlicher Radionuklide zur Erzeugung der benötigten Strahlung verwendet. Das erforderliche Energiespektrum kann auf unterschiedlichen Wegen erzeugt werden:

1. Einsatz von Filtern, die aus polychromatischem Röntgenspektrum zwei Energiepeaks herausfiltern (z.B. bei 40 und 70 KeV)
2. Alternierender Betrieb der Röhre mit zwei verschiedenen Spannungen (z.B. 70 und 140 KeV)

Der entscheidende Vorteil einer Röntgenröhre liegt in einem wesentlich höheren Photonfluss (Faktor 500-1000), was sich - bei zur DPA vergleichbarer Strahlenbelastung - in einer verkürzten Messdauer und einem höheren Auflösungsvermögen widerspiegelt [68]. Es werden jedoch niedrigere Flächendichten als bei Vergleichsmessungen mit DPA beschrieben [79]. Gleichzeitig zur Absorptionsmessung des Knochens wird die Absorption durch das umliegende Weichteilgewebe gemessen, was den Absorptionswert für Knochengewebe beeinflusst. Dieses Verfahren ist sehr gerätespezifisch und benötigt eine Reihe von Kalibrierungen mit standardisierten Referenzproben. Daher ist bei quantitativen Aussagen immer die Angabe des Gerätetyps nötig [25]. Zur objektiven Vergleichbarkeit verschiedener Messmethoden wurde als international einheitliche Bewertung der T- und der Z-score der Knochendichtemessung eingeführt. Der T-score ergibt sich aus der Standardabweichung der gemessenen Knochendichte vom Mittelwert einer Gruppe 30jähriger, gesunder Personen gleichen Geschlechts. Der T-score liefert damit eine Information über das echte Ausmaß des Knochenverlustes einer Person, er gibt genaue Erkenntnisse darüber, ob jemand an einer Osteopathie leidet. Vergleicht man die gemessene Knochendichte mit den durchschnitt-

lichen Messwerten von Personen aus dergleichen Altersgruppe und demselben Geschlecht, erhält man den Z-score. Er liefert lediglich eine Information darüber, ob es einer Person genauso gut oder genauso schlecht geht wie den Referenzpersonen der Altersgruppe. Wenn also in der Bezugsgruppe viele Patienten an Osteoporose leiden, kann der Z-score aufgrund der anderen Relation unauffällig sein, obwohl eine schwere Osteopathie vorliegt. Deswegen gründet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) ihre Diagnose einer Osteoporose im Wesentlichen auf den T-score der Knochendichtemessung. Im klinischen Alltag findet man häufig nur die Angabe des Z-scores und die Interpretation, dass sich der gemessene Wert im Bereich der Werte der entsprechenden Altersgruppe von Personen gleichen Geschlechts befände und daher keine Osteopathie vorläge. Allerdings lassen bestimmte Knochendichtemessungen aus methodischen Gründen die Angabe eines T-scores nicht zu. Deshalb sollten zur Knochendichtemessung nur Methoden verwendet werden, die eine entsprechende Aussage oder zumindest einen vergleichbaren Wert ermöglichen.

1.3.5 Quantitative Computertomographie (QCT)

Bei der Computertomographie werden unter Zuhilfenahme eines Transmitters mit zugehörigem Flächendetektor Querschnittsbilder aus möglichst vielen Winkelansichten aufgenommen. Aus diesen Querschnittsbildern wird ein dreidimensionales Modell der untersuchten Region erstellt. Jedes Bildelement repräsentiert dabei den lokalen Schwächungskoeffizienten, der mit einem Hydroxylapatitphantom als Eichstandard verglichen wird. Der Schwächungskoeffizient kann jedoch nicht direkt gemessen werden, deshalb gibt man relative Größen der Schwächung, die sogenannten Hounsfield-Einheiten an, die in Dichtewerte verrechnet werden. Die Computertomographie bietet damit die Möglichkeit, komplexe dreidimensionale Strukturen darzustellen [17]. Man unterscheidet Messungen mit einer Strahlenenergie (SEQCT) von Messungen mit zwei Strahlenenergien (DEQCT). Bei Einenergimessungen tritt erneut das Phänomen des Fettfehlers auf. Um diesen zu umgehen, greift man auf das Prinzip der Zweienergimessung zurück. Dabei werden Messungen mit zwei verschiedenen Röhrenspannungen auf verschiedene Arten durchgeführt. Beim so genannten „post-processing“ werden zwei Scans nacheinander aufgenommen. Dabei wirken sich Bewegungsartefakte stark auf das Messergebnis aus. Beim „pre-processing“ werden die Messwerte der unterschiedlichen Spannung durch ein rasches Umschalten der Röhrenspannung simultan ermittelt. Dieses Verfahren ist besser reproduzierbar, bringt aber eine um den Faktor 2 höhere Strahlenexposition mit sich [3, 22, 40, 63]. Daher hat sich bei der

Erstuntersuchung von Patienten die Zweienergiemethode und bei Verlaufskontrollen die günstigere und strahlungsärmere Einenergiemethode etabliert [68]. Dennoch sind die Methoden der SPA, DPA, DEXA und QCT bezüglich ihrer Strahlenbelastung bei klinischer Anwendung akzeptabel [50]. Zur Risikoabschätzung der Strahlenbelastung dienen Dosiswerte [75]. Für die Beurteilung der Strahlenbelastung dient die Hautdosis oder die effektive Dosis, früher auch als Ganzkörper-Äquivalentdosis bezeichnet. Nach Herstellerangaben betragen die Werte der Hautdosis für die DEXA 10-50 μSv , für die QCT liegen die Angaben bei 5 mSv für ein Computertomogramm des Schädels und bis zu 8,6 mSv für ein Computertomogramm des Abdomens. Es muss berücksichtigt werden, dass die DEXA meist von konventionellen Röntgenaufnahmen begleitet wird. Zu einem korrekten Vergleich dieser Methoden sollten diese Zusatzbelastungen addiert werden. Es ergeben sich Belastungen von weiteren 500 bzw. 900 μSv bei Einbezug einer konventionellen Röntgenaufnahme des Beckens bzw. der LWS [29, 34, 39]. Um eine sinnvolle Risikoabschätzung vornehmen zu können, sollte die natürliche Strahlenbelastung in Betracht gezogen werden, welche pro Monat bis 350 μSv betragen kann. Diese ist jedoch starken geographischen Schwankungen unterlegen. Als Beispiel sei die Strahlenbelastung einer Transatlantikflugreise genannt, welche ca. 80 μSv beträgt [86].

Als Weiterentwicklung der quantitativen Computertomographie stellte die Arbeitsgruppe im Rügsegger 1976 die periphere Computertomographie (pQCT) dar [17, 73], mit deren Hilfe hochaufgelöste Bilder an peripheren Messorten, wie dem distalen Radius, gemacht wurden. Die Strahlenbelastung ist mit 100 μS relativ gering [3, 40]. Der Fettfehler kann sich auch bei der pQCT auswirken, da nur mit einer Photonenenergie gemessen wird [23].

1.3.6 Akustische Rastermikroskopie

Die Grundlage von Ultraschalluntersuchungen bildet die Wechselwirkung der akustischen Wellen mit dem zu untersuchenden Objekt. Bei akustischen Wellen handelt es sich um mechanische Wellen, die sich durch Schwingung von Teilchen um ihre Ruhelage fortpflanzen und im untersuchten Medium örtliche und zeitliche Druck- und Dichteschwankungen hervorrufen. Man unterscheidet Longitudinalwellen, deren Partikelauslenkung in Richtung der Wellenausbreitung erfolgt von Transversalwellen, deren Partikelauslenkung senkrecht zur Wellenausbreitung erfolgt. Longitudinalwellen breiten sich in festen, flüssigen und gasförmigen Medien aus, während sich Transversalwellen nur in Feststoffen ausbreiten können. Im Ultraschallmikroskop erzeugt ein Schallwandler mit einem piezoelektrischen Kristall aus einem elektrischen Impuls eine akustische Welle, die die Linse und das Kopplungsmedium durchläuft, von der Probenoberfläche reflektiert wird und im Wandler wieder in einen elektrischen Impuls gewandelt wird. Durch ein Zeitfenster wird gewährleistet, dass die an der Probe entstandenen Reflexionen von Störsignalen anderer Laufzeiten getrennt werden können. Dies verhindert Interferenzen mit mehrfach reflektierten Wellen. Der Ultraschallwandler arbeitet somit als Sender und Empfänger von akustischen Wellen. Die axiale Auflösung ist abhängig von Impulsdauer und Frequenz des Signals. Je höher die Frequenz, umso höher ist die axiale Auflösung, umso geringer ist jedoch die Eindringtiefe der akustischen Welle in die Probe. Die hochauflösende akustische Rastermikroskopie eignet sich daher nicht zur Untersuchung dicker Objekte, da die Eindringtiefe in die Probe dafür unzureichend ist. Die laterale Auflösung ist definiert als der Abstand zweier Reflexionspunkte, die gerade noch getrennt voneinander detektiert werden können. Das laterale Auflösungsvermögen wird von der Breite des Schallfeldes bestimmt. Da die Geometrie des Wandlers und der piezoelektrischen Keramik keine hohen lateralen Auflösungen erlaubt, wird eine sphärische Kalotte benutzt. Diese sitzt auf der Linse aus Saphirkristall und bildet die brechende Fläche der Linse. Damit werden die vom Wandler ausgesendeten planaren Wellen beim Übertritt in das Kopplungsmedium fokussiert. Es wird ein Fokus erzeugt, der viel kleiner als der eigentliche Wandlerdurchmesser ist und eine viel höhere Intensität als ein unfokussierter Wandler aufweist. Zwischen dem Saphir und Wasser besteht ein hoher Impedanzunterschied, was zu einer relativ geringen Schalltransmission an der Grenzschicht führen würde. Aus diesem Grund ist eine Anpassungsschicht aus SiO_2 oder Kalk-Glas auf der Oberfläche der Linse zwischen beiden Medien angebracht.

Mit akustischen Messverfahren können generell zwei Wege beschritten werden, um die akusto-mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe zu beschreiben [14]. Mit Schallfelddurchmessern und Wellenlängen, die wesentlich größer als die Dimensionen der Substrukturen des Knochens sind, werden akustische Ausbreitungseigenschaften, wie Reflexionskoeffizienten, Schallgeschwindigkeit und Dämpfung auf makroskopischer Ebene durch Streuung, Beugung und Überlagerung bestimmt. Man erhält damit akustische Volumeneigenschaften, die von der Zusammensetzung und Struktur des untersuchten Gewebes abhängen. Sind jedoch Schallfelddurchmesser und Wellenlängen klein gegenüber den Substrukturen des Knochens, so können die individuellen mikroskopischen Eigenschaften des Gewebes untersucht werden. Diese Voraussetzung erfüllen die in der akustischen Rastermikroskopie benutzten stark fokussierten Hochfrequenzwandler. Die meisten bisher veröffentlichten mikroskopischen Untersuchungen am Knochen fanden im Frequenzbereich von 20 MHz bis 50 MHz statt. Die Messergebnisse wurden durch qualitative [93] und quantitative [77, 94] Bestimmung der akustischen Impedanz charakterisiert. In Abhängigkeit von Spezies, Mineralisierung und Orientierung des Knochens wurden Impedanzwerte von 6 bis 10 Mrayl dokumentiert. Desweiteren wurden Schallgeschwindigkeitsmessungen durchgeführt, um daraus die elastischen Koeffizienten in Richtung der Schallausbreitung abzuleiten [30, 82, 85]. Signifikante Unterschiede wurden z.B. zwischen pre- und postmenopausalen sowie osteoporotischen Knochenproben kaukasischer [31] Frauen und in Abhängigkeit von der Probenorientierung [84] gefunden. Von Raum [59] wurde ein Verfahren entwickelt und an kortikalem Knochen angewendet, welches die Ableitung von Probendichte und elastischen Konstanten durch Messung der Impedanz, Longitudinal- und Transversalwellengeschwindigkeit an dünnen Proben erlaubt. Dabei konnten sehr gute Korrelationen der Impedanz zu Knochendichte, Festigkeit und Kompressionsmodul nachgewiesen werden. Er beschrieb eine signifikante Korrelation der Longitudinalwellengeschwindigkeit zu Dichte und Festigkeit, jedoch nicht so stark wie die der akustischen Impedanz. Von Turner et al. [85] sowie Brandt et al. [7] liegen dazu Arbeiten vor, die die Korrelation der Impedanz mit dem durch Nanoindentation ermittelten Elastizitätsmodul untersuchten und eine gute Korrelation beider Messgrößen nachweisen konnten. Alle bisherigen Messungen belegen damit, dass mit der Messung der akustischen Impedanz die elastischen Eigenschaften des untersuchten Materials gut wiedergegeben werden. An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg laufen Untersuchungen, die die Dispersion der Impedanz an kortikalem Knochen in Abhängigkeit von der Belastungsrichtung untersuchen [61]. Smitmans [78] stellte bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz ein Maximum der Impedanzverteilung von kortikalem Knochen bei einem Belastungswinkel von 10° zur Längsachse des Femurs dar. Weiterhin zeigte Smit-

mans eine statistisch jedoch nicht signifikante Zunahme der akustischen Impedanz mit zunehmendem Alter auf [8, 35, 59].

1.3.7 Schallgeschwindigkeit / Breitband-Ultraschallabschwächung

Bei dieser, auf dem Transmissionsverfahren basierenden Technik, werden mit Hilfe zweier sich gegenüber stehender Schallwandler, einem Sender und einem Empfänger, die Veränderungen von Ultraschallwellen beim Durchtritt durch den Kalkaneus erfasst. Die Schallgeschwindigkeit (speed of sound - SOS) stellt eine Materialkonstante mit der Einheit Meter/Sekunde (m/s) dar und hängt primär von der Dichte und Steifigkeit des zu durchdringenden Gewebes ab. Die Schallwelle bewegt sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch flüssige (Knochenmark) und feste Strukturen (Trabekel) des Knochens. Aufgrund der anisotropen Mikrostruktur des Knochens unterliegt der Schallimpuls dabei Reflexions-, Brechungs- und Beugungsphänomenen. Dies bewirkt eine räumliche und zeitliche Veränderung der Energieverteilung der Schallwelle. Weiterhin schließt die Messung den Schalldurchtritt durch das bedeckende Weichteilgewebe sowie das Kopplungsmedium ein. Die Schalleinkopplung wird je nach Verfahren durch ein Wasserbad oder Gel realisiert.

Die Schallwelle erfährt beim Knochendurchtritt eine von der Menge fester Substanz abhängige Beschleunigung [5]. Die Geschwindigkeit des Ultraschalls (V) wird dabei wie folgt abgeschätzt [56]:

$$V = \sqrt{E/\rho}$$

E stellt das Elastizitätsmodul, ein Maß für die Steifigkeit des Knochens und ρ die Dichte des entsprechenden Mediums dar. In verschiedenen Studien wurde unter Verwendung dieser Formel eine enge Korrelation zwischen dem mechanisch und sonographisch ermittelten Elastizitätsmodul beschreiben [1, 4]. Trotz der komplexen Ausbreitung von Ultraschallwellen im anisotropen Knochen, erlaubt diese Gleichung eine näherungsweise Abschätzung der Beziehung von SOS und Materialeigenschaften [55].

Als zweiter Messparameter existiert die so genannte Breitband-Ultraschallabschwächung (BUA). Durch Streuung und Absorption kommt es beim Durchtritt durch den Knochen zu einer Amplitudenverringerng sowie zu einer Verbreiterung eines applizierten Breitbandimpulses (0,2 MHz - 1 MHz). Während im kortikalen Knochen die Absorption überwiegt, dominiert im Kalkaneus als vorwiegend trabekulären Knochen die Streuung des Ultraschalls.

Die erfahrene Abschwächung des Ultraschallsignals variiert in Abhängigkeit von der Frequenz des Schalles. Im Bereich bis ca. 1 MHz ist die Abschwächung annähernd proportional zur Frequenz des verwendeten Ultraschalls. Beim Knochengesunden steigt die Abschwächung dabei stärker an als im osteoporotisch veränderten Knochen [46, 90]. Hans und Mitarbeiter [28] wiesen einen Zusammenhang zwischen BUA und Frakturrisiko nach.

Die momentan gebräuchlichsten kalkanearen Meßsysteme sind Achilles (Firma Lunar, USA), CUBAClinical (Firma McCue, UK) und UBA 575+ (Firma Hologic, USA). Zusätzlich zur SOS und BUA verwendet die Firma Lunar einen weiteren Parameter als Index für die Knochenqualität, die so genannte Steifigkeit (Stiffness). Dabei handelt es sich jedoch nicht um den in der Biomechanik verwendeten Begriff der Steifigkeit, sondern um einen nach folgender Formel errechneten Kombinationswert:

$$\text{Stiffness} = 0,67 * \text{BUA} + 0,28 * \text{SOS} - 420$$

Vergleichende Untersuchungen erbrachten jedoch keine weitere diagnostischen Aussage über die Knochenqualität gegenüber den primären Indices SOS und BUA [92].

Die mangelnde Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Messsysteme stellt im klinischen Alltag ein großes Problem dar. Bei verschiedenen Firmen variieren die Frequenzbreite des applizierten Ultraschalls, Sender-Empfänger-Abstand sowie das verwendete das Ankopplungsmedium (Wasser – Gel). Einen entscheidenden Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hat die Positionierung des Untersuchungsobjektes. Evans und Mitarbeiter [15] untersuchten in Wiederholungsmessungen den Einfluss von Messlokalisation und Wassertemperatur auf die Transmissionsgeschwindigkeit. Dabei wurde konstatiert, dass vor allem eine differente Positionierung des Fußes bei wiederholter Messung eine Änderung der BUA um bis zu 9% mit sich führt, während die Wassertemperatur nur geringen Einfluss auf Messungen hat. Da auch Weichteilgewebe die Ausbreitung des Ultraschalls beeinflusst, ist momentan der leicht zugängliche Kalkaneus mit ebenen, gering weichteilgedeckten Flächen die bevorzugte Messlokalisation. Aussagekräftige Messungen an statisch relevanten Knochenbereichen im Wirbelkörper oder Schenkelhals existieren bis dato noch nicht.

1.3.8 Axiale Transmission am peripheren Skelett

Bei der axialen Transmission wird die Längsausbreitung einer Ultraschallwelle in der äußeren Knochenmatrix erfasst. Während die Längstransmission nur an Strukturen eingesetzt werden kann, die von zwei gegenüberliegenden Seiten zugänglich sind, kann die axiale

Transmission prinzipiell an allen Stellen des Skeletts mit geringer Weichteildeckung angewandt werden. Gebräuchliche Messorte sind distale Phalangen, Tibia, Radius und Metatarsalia.

Werden Schallwellen über ein Weichteilgewebe in den Knochen eingekoppelt, so wird ein Teil an der Knochenoberfläche reflektiert, ein anderer Teil tritt unter verschiedenen Brechungswinkeln in den Knochen ein. Schallwellen, die in einem bestimmten Winkel in den Knochen eintreten, breiten sich parallel zur Knochenoberfläche aus. Durch die dichte Kortikalis bewegt sich der Ultraschall erheblich schneller als durch die tiefer liegenden trabekulären Strukturen. Zeitunterschiede beim Auftreffen des Ultraschallimpulses am Empfänger werden verrechnet und unter Berücksichtigung der Geometrie des vermessenen Knochens sowie der vom Schall zurückgelegten Strecke kann die Schallgeschwindigkeit ermittelt werden. Großen Einfluss auf die Messgenauigkeit haben dabei die Dicke des umgebenden Weichteilmantels, Abstand von Wandler und Knochen sowie Kortikalisdicke. Die Eindringtiefe der axial verlaufenden Ultraschallwellen beträgt in Abhängigkeit vom verwendeten Frequenzbereich (am gebräuchlichsten ist der Frequenzbereich um 1,25 MHz) 2-6 mm, so dass dieses Verfahren nur Aussage über die Elastizität der peripheren Knochenstrukturen geben kann [5].

2 Material und Methodik

2.1 Probengewinnung

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Knochen wurden n=100 postmenopausalen Frauen in den Jahren 1989 bis 1992 aus dem Os ilium zu diagnostischen Zwecken an der Universitätsklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen. Die Knochenbiopsien wurden entsprechend der strukturellen Spongiosaveränderungen in 4 Schweregrade der Osteoporose eingeteilt. Die histologische Diagnose stützt sich dabei auf die quantitative Einschätzung der wichtigsten morphologischen Parameter wie Struktur der einzelnen Knochen trabekel, trabekulärer Durchmesser und Abstand, Anzahl der Trabekel pro Flächeneinheit, intertrabekuläre Vernetzung sowie fokale Resorption und Ausdehnung von Howship-Lakunen. Nach Adler [2] wird die Knochenprobe ohne mikroskopisch erkennbare Osteopathie als Grad 0 bezeichnet. Das Spongiosagerüst ist gleichmäßig strukturiert und die trabekuläre Vernetzung engmaschig. Osteoporose Grad 1 führt diejenigen Knochenproben an, die bereits beginnende Aufhellungen der Bälkchenstruktur zeigen. Die Spongiosa ist stellenweise rarefiziert, die einzelnen Trabekel weisen unterschiedliche Breiten auf. In statisch belasteten Skelettregionen wie dem Oberschenkelhals oder den Wirbelkörper kommt es in diesem Anfangsstadium der Erkrankung zu einer Abnahme der statisch weniger belasteten Querspongiosa während die Trabekel in den Zug- und Drucklinien zunächst noch erhalten bleiben. Dadurch werden die Trägerstrukturen bei beginnender Osteoporoseerkrankung prononciert hervorgehoben. Bei der Osteoporose Grad 2 ist die Netzstruktur nur noch partiell erhalten, die Aufhebung der intertrabekulären Vernetzung wird durch die Entwicklung von freien Trabekelenden deutlich. Die verbliebenen Spongiosabalken sind stark verschmälert, es treten vermehrt Einzeltrabekel auf, der Abstand der Trabekel zueinander nimmt zu. Die Osteoporose Grad 3 zeichnet sich durch einen weitgehenden Schwund der Trabekelstruktur und der trabekulären Knochenmasse aus. Die intertrabekuläre Konnektion ist fast vollständig aufgehoben, so dass die verbleibenden Knochenbälkchen vorwiegend punkt- und strichförmig erscheinen. Spongiosalücken und hochgradig verminderte Einzeltrabekel bestimmen das Bild. Im statisch belasteten Knochen sind sowohl die Querstrukturen als auch die Trägerspongiosa betroffen, die Kortikalis wird in den Atrophieprozess mit einbezogen.

Die vorgenommene Einteilung der Beckenkammbiopsien in verschiedene Stadien der Osteoporose wurde in dieser Studie übernommen

Vom untersuchten Biopsiematerial wiesen n=22 Proben einen unauffälligen Knochenbefund auf. Bei n=25 Patienten konnte eine leichte Osteoporose festgestellt werden. N=28 Patienten litten an mäßiger Osteoporose und bei n=25 Patienten wurde eine starke Osteoporose diagnostiziert. Weiterhin gelangten n=6 Knochenproben zur Untersuchung, die 2003 aus den Beckenkämmen von zufällig ausgewählten Verstorbenen im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen wurden. Die Knochenproben wurden in transiliacaler Entnahmetechnik mit einer Hohlfräse von 2,5 mm im Innendurchmesser 2 cm dorsal und 2 cm caudal der Spina iliaca anterior entnommen.

Grad der Osteoporose	Morphologie	Anzahl der Patienten
0	<ul style="list-style-type: none"> - unauffälliger Knochenbefund - gleichmäßig strukturiertes Spongiosagerüst - engmaschiges Spongiosanetz 	n=22
1	<ul style="list-style-type: none"> - beginnende Aufhellung der Trabekelstruktur - stellenweise rarefizierte Spongiosa - vergrößerter intertrabekulärer Abstand 	n=25
2	<ul style="list-style-type: none"> - nur noch partiell erhaltene trabekuläre Vernetzung - freie Trabekelenden werden sichtbar - starke Verschmälerung der verbliebenen Trabekel 	n=28

Grad der Osteoporose	Morphologie	Anzahl der Patienten
3	<ul style="list-style-type: none"> - weitgehender Schwund der Trabekel - verbleibende Trabekel erscheinen punkt- und strichförmig - zahlreiche Spongiosalücken durch Reduktion der Trabekelstruktur und –vernetzung 	n=25

2.2 Einbettung und Bearbeitung

Direkt nach der Entnahme wurden die Proben in Ethanol 70% fixiert, danach aufsteigend in Ethanol 96% und Ethanol 100% entwässert, in HistoClear®-Lösung (1,4-Dimethylbenzol) über 24 Stunden gereinigt, entfettet und zur Polymerisation in Methylmethacrylat folgender Zusammensetzung eingebettet: Mehrere Tage wurden die Knochenproben in 100 Vol.% Polymethylmethacrylat eingebettet, anschließend 24 Stunden in 90 Vol.% Polymethylmethacrylat mit 10Vol.% Dibutylphtalat und dem Zusatz von 1g Benzoylperoxid pro 100ml Ansatz gegeben. Bis zur vollständigen Aushärtung erfolgte die Einbettung in 90 Vol.% Polymethylmethacrylat mit 10Vol.% Dibutylphtalat sowie dem Zusatz von 3g Benzoylperoxid pro 100ml Ansatz. Dibutylphtalat fungiert bei der Polymerisation als Weichmacher, um Brüche bei der späteren Weiterverarbeitung zu vermeiden. Benzoylperoxid dient dabei als Initiator der Polymerisation des für die Lagerung mit Hydrochinon stabilisierten flüssigen Methylmethacrylats. In einem Zeitraum zwischen 1 und 3 Monaten erfolgte die Aushärtung in Einbett Röhrchen aus Glas im temperaturkontrollierten Wasserbad, um eine luftblasenfreie Polymerisation zu gewährleisten. Das beschriebene Verfahren führt zu haltbaren, nicht entkalkten Knochenproben [70]. Nach der Aushärtung wurden die Proben aus den Einbettgläsern gelöst und die entstandenen Blöcke mit dem rotierenden Nassschleifgerät (EXAKT®, Norderstedt), welches über eine horizontal oszillierende Probenhalterung verfügt, mit Schleifpapier in absteigender Körnung 800-1200-2400-4000 bearbeitet. Es entstehen planparallele Knochenproben der gewünschten Dicke und Orientierung. Unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung am Ultraschallmikroskop wurden die Proben mit Diamant-

paste der Körnung 1 μm und 0,25 μm poliert und die noch vorhandenen Schleifmittelreste mittels einem in Wasser und Ethanol getränkten Tupfer entfernt.

Die 6 von zufällig ausgewählten Verstorbenen ohne Skeletterkrankungen untersuchten Knochenproben wurden sofort nach Entnahme auf einem Probenträger fixiert und mittels Ultrafräse planparallel oberflächenbearbeitet. Nach Untersuchung mit dem Akustischen Rastermikroskop KSI SAM 100 sowie KSI SAM 2000 mit der Steuersoftware ELIPS wurden die Knochenproben entsprechend den dargestellten Schritten in PMMA eingebettet und weiterverarbeitet.

2.3 Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 100

Das KSI SAM 100 der Firma Krämer Scientific Instruments (Herborn, Deutschland) arbeitet nach dem von Lemons und Quate entwickelten Prinzip der Puls-Echo-Mikroskopie [49]. Dabei sendet ein Schallwandler kurze Schallimpulse aus, die über eine akustische Linse fokussiert werden. Die Kopplung erfolgt über destilliertes und entgastes Wasser, in dem die Probe vollständig eingetaucht ist. Sowohl an der Oberfläche der Probe als auch an deren Binnenstrukturen werden die auftreffenden Schallwellen gestreut und reflektiert. Der reflektierte Anteil wird vom Wandler empfangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Das KSI SAM 100 ist ein modulartig aufgebautes System, bestehend aus einer mechanischen Scanner, einem Pulser/Receiver, einem fokussierenden Schallwandler und einer 8 Bit A/D Wandlerkarte. Das mechanische Scansystem arbeitet mit 2-Phasen Mikroschrittmotoren, die über einen Motorcontroller mit 32 Bit Risc-Prozessor gesteuert werden. Der Motorcontroller wird vom PC aus über eine RS232 Schnittstelle in der Programmiersprache Venus 1 gesteuert. In der x-y-Ebene kann damit ein Scanbereich von $60 \times 60 \text{mm}^2$ erfasst werden. Die Positioniergenauigkeit beträgt $0,1 \mu\text{m}$. Um den temperaturabhängigen Einfluss auf Signaldämpfung und Schallgeschwindigkeit bei allen Messungen konstant zu halten, wurde vom IMPB (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) ein temperierbarer Proben tank entwickelt, dessen Bodenplatte über Thermowiderstände beheizt wird. In diesem Tank lassen sich Wassertemperaturen von 20°C bis 60°C mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1^\circ\text{C}$ einstellen. Ein Panametrics PR 5900 Pulser/Receiver mit einer Empfangsbreite von 200 MHz erzeugt kurze negative Spikeimpulse mit einer Anstiegszeit von 1,1 bis 2 ns und einer Spannungsamplitude von 77 bis 175 V. Das empfangene Echosignal wird darauf von einer Gage CompuScope 8500 Karte mit einer

analogen Bandbreite von 250 MHz, einer Abtastrate von 500 MS⁷S und einer Speichertiefe von 8 Bit erfasst. Der verwendete Wandler war in allen Messungen ein V605 50 MHz Wandler der Firma Valpey Fisher mit einer Impulsdauer von 49ns und einem Schallfeld-durchmesser von 23 μ m. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde durch Stein [80] eine eigens entwickelte Software unter Windows 98/NT implementiert, welche die Einstellung fundamentaler Parameter, wie z. B. des Scaninkrementes der einzelnen Achsen, ermöglicht [8, 59].

2.4 Akustische Rastermikroskopie mit dem KSI SAM 2000

Das KSI SAM 2000 der Firma Krämer Scientific Instruments (Herborn, Deutschland) besteht sowohl aus einem Lichtmikroskop, einem akustischen Rastermikroskop und einer Datenauswertungseinheit. In der vorliegenden Studie kam eine 200 MHz Linse zum Einsatz, das KSI SAM 2000 erlaubt jedoch je nach verwendeter akustischer Linse Messungen in einem Frequenzbereich von 60 MHz bis 2 GHz. Die Linse besteht aus einem Saphirkristall mit konkaver sphärischer Kalotte. Über diese erfolgt die Fokussierung der vom Schallwandler ausgesendeten planaren Schallwellen. Der Schallwandler arbeitet nach dem piezoelektrischen Effekt. Dabei wird im Wandler mittels einer hochfrequenten Wechselspannung ein Schallimpuls generiert, der die Saphirlinse in axialer Richtung durchläuft, an der sphärischen Kalotte fokussiert wird und das Kopplungsmedium Wasser durchläuft. Nach Reflexion an der Probenoberfläche und deren Binnenstrukturen durchquert das Schallsignal Kopplungsmedium und Linse in gegenläufiger Richtung und wird vom Wandler in ein elektrisches Signal umgesetzt. Der Schallwandler dient somit als Sende- und Empfangseinheit. Gesendete und reflektierte Anteile des Schallsignals werden durch ein Zeitfenster voneinander getrennt. Der Schallwandler kann über ein Schwingpulensystem in der x-y-Ebene, also parallel zur Probenoberfläche, in 6 Stufen von etwa 65 μ m bis 1000 μ m mechanisch verstellt werden. In z-Richtung, parallel zur Schallausbreitung, stehen eine elektrische und mechanische Schnellhubeinrichtung zur Grobpositionierung und eine Feinjustierung sowohl manuell als auch über Software zur Verfügung. Damit wird eine Positioniergenauigkeit von 0,1 μ m erreicht. Zur Datenerfassung bewegt sich der Wandler mäanderförmig über die zu untersuchende Probe. Durch die digitale Datenerfassung ist die Anzahl der dargestellten Zeilen in 4 Stufen variierbar (64, 128, 256, 512 Zeilen). Unabhängig von der gewählten Auflösung wird eine Datenmatrix von 512x512 Bildpunkten gespeichert. Jedes empfangene Echosignal wird entsprechend seiner Amplitude in einen Grauwert überführt und am angeschlossenen Monitor als Bildpunkt dargestellt. Gleichzeitig wird das digitale Signal zur

späteren Berechnung und Bearbeitung der Impedanzwerte gespeichert. Somit erhält man sowohl eine Darstellung der anatomisch-morphologischen Struktur als auch eine Darstellung der akustischen Eigenschaften der Knochenprobe.

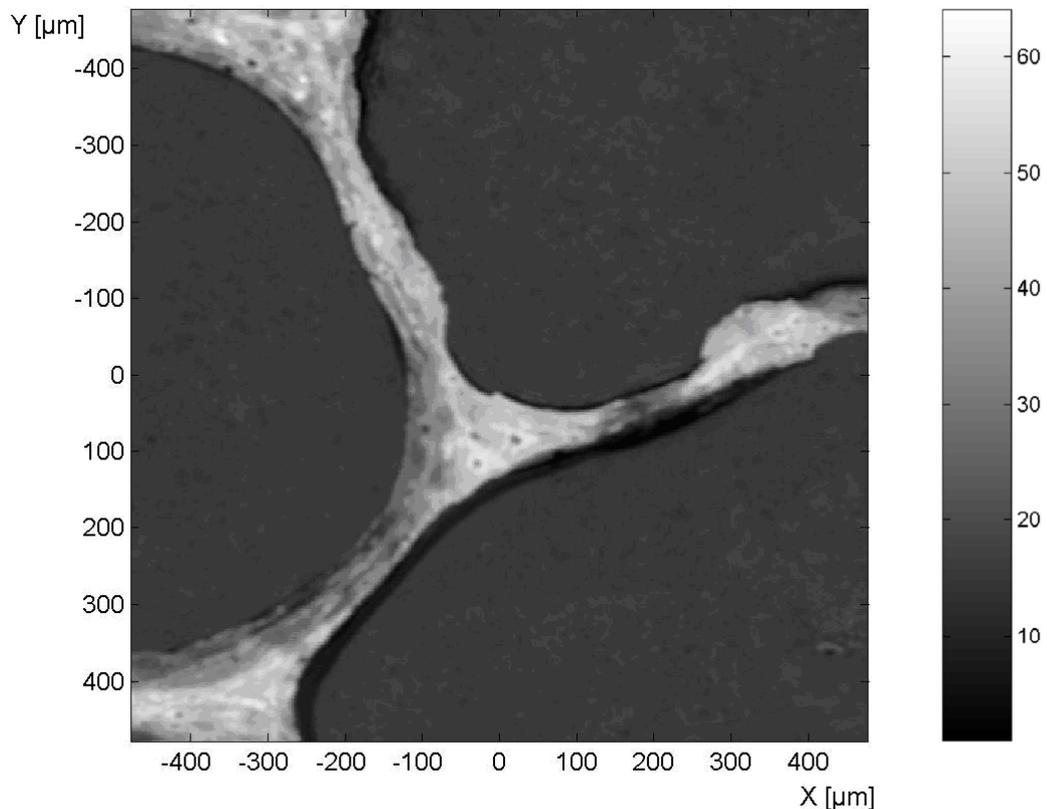


Abbildung 2: Typische Verteilung der Maximalwerte des reflektierten Schalls einer humanen Knochenprobe. Bereiche von hoher Reflexion sind heller dargestellt als Bereiche geringerer Reflexion, die dunkler wiedergegeben werden (willkürliche Skala). Das Einbettungsmedium PMMA wird homogen mit einem Grauwert dargestellt.

Für die akustische Rastermikroskopie in Reflexion ist es unabdingbar, dass die Oberfläche der Probe sich in jedem vermessenen Bildpunkt im Fokus des Wandlers befindet. Dieser Anforderung wird die Probe jedoch nicht immer gerecht, da bei der Probenanfertigung und -bearbeitung mit dem rotierenden Nassschleifgerät (EXAKT®, Norderstedt) zwar planparallele Oberflächen entstehen, in diesen aber aufgrund unterschiedlich harter Knochenregionen und PMMA-Bezirke weicherer Material in größerem Maß aus dem Kollagenverbund gerissen wird, was zu unterschiedlich großen mikroskopischen Exkavationen führt.

Um sicherzustellen, dass sich jeder der an der Oberfläche vermessenen Bildpunkte im Fokus des Wandlers befindet, wurde in der Arbeitsgruppe „Akustische Mikroskopie“ des IMPB eine Schichtbildanalyse (Multi-Layer-Analysis) entwickelt, die Einflüsse der Topographie auf die Messung der Impedanz der Knochenprobe kompensiert. Durch die Schichtaufnahme der Bilder wird garantiert, dass jeder Messpunkt der Probenoberfläche, auch bei unebenen und geringfügig geneigten Oberflächen, einmal im Fokus der Linse vermessen wurde. Die entwickelte Software zur Schichtbildanalyse kontrolliert, welcher Bildpunkt der Schichtanalyse im Fokusabstand aufgezeichnet wurde und errechnet eine topographiekorrigierte Verteilung der Maximalwerte, ein Maximalwertbild. Die Spannungsamplitude des reflektierten Signals ist abhängig vom Abstand des Fokus der Linse zur Probenoberfläche. Die Spannungsamplitude des reflektierten Wellenbündels zeigt daher bei veränderten Abständen des Wandlers zur Probe einen typischen oszillierenden Verlauf mit dem Spannungsmaximum im Linsenfokus und abnehmenden Spannungswerten bei positiver und negativer Defokussierung. Für jeden Messpunkt wird das Signal mit der höchsten Spannungsamplitude zur quantitativen Bestimmung der elasto-mechanischen Eigenschaften verwendet, da der Fokusbereich in diesem Fall am geringsten ist und somit das laterale Auflösungsvermögen ein Maximum erreicht. Dabei wird davon ausgegangen, dass die einfallenden Schallwellen senkrecht auf die Probe einfallen und reflektiert werden. Durch die beschriebene heterogene Struktur der Osteone sowie eine geringfügige Abweichungen von der Planparallelität der Oberfläche nach der Politur kann aber nicht immer von einer absolut ebenen Oberfläche ausgegangen werden. Dadurch werden neben Longitudinalwellen auch Scherwellen angeregt, die zu Überlagerungsphänomenen und Interferenzen führen können. Das reflektierte Signal würde in diesem Fall mit zu geringen Werten gemessen werden. Nach Raum et al. [59] ist bis zu einem Einfallswinkel von 10° gewährleistet, dass keine Scherwellen angeregt werden. Alle Anteile des Reflexionssignals, deren Einfallswinkel jedoch größer als 10° ist, werden durch eine Ausschlussmaske von der weiteren Datenverwertung ausgeschlossen. Gleichzeitig findet durch Vermessen der Probe in z-Richtung die Erfassung der Oberflächenreliefs statt.

Jedem gemessenen Impedanzwert wird am Bildschirm eine Farbe zugeordnet, wobei Bildbereiche, die keinen Knochen enthalten bzw. jenseits vorgegebener Schwellenwerte liegen, über eine entsprechende Software von der Messung ausgeschlossen werden.

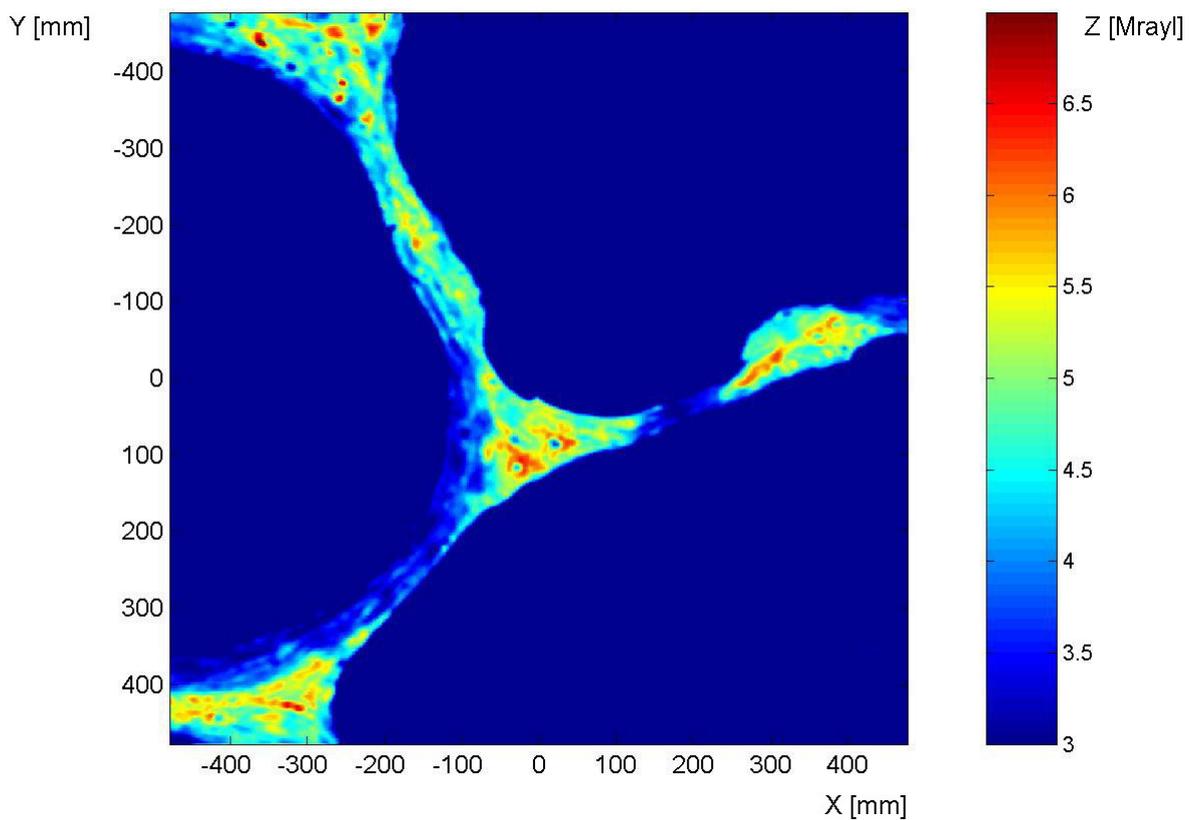


Abbildung 3: Aus den Maximalwerten berechnete Verteilung der akustischen Impedanzwerte. Regionen hoher akustischer Impedanz sind rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Zur Kalibrierung des Ultraschallmikroskopes KSI SAM 2000 wurden Referenzproben (PMMA, Quarzglas, Polycarbonat) verwendet, deren Impedanzen zuvor über Dichtebestimmung mittels Auftriebmethode und Schallgeschwindigkeitsmessung über Puls-Echo-Laufzeiten bestimmt wurden. Weiterhin wurden Messkurven erstellt, die Reflexionssignale bekannter Proben für das Kopplungsmedium Wasser temperaturabhängig erfassen, um den Einfluss der Temperatur des Kopplungsmediums auf Signaldämpfung und Schallgeschwindigkeit zu minimieren. Die Impedanzen werden analog zur Messung mit dem KSI SAM 100 bei einer Kontrolltemperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1 \text{ C}^{\circ}$ vermessen. Diese Kalibrierungskurven wurden in Standardeinstellungen bezüglich Gerätetemperatur und Verstärkereinstellungen eingerechnet [60].

2.5 Durchführung der Messungen

Die Probe wird im Proben tank fixiert und zunächst mit Hilfe eines schwenkbaren Auflichtmikroskops die Oberfläche fokussiert. Diese wird auf von der Probenpräparation stammende Schleifspuren untersucht. Mit Hilfe des horizontal in x- und y-Richtung verschiebbaren Proben tisches werden zur Untersuchung relevante Bezirke der Knochen spongiosa ausgewählt. Bidestilliertes und entgastes Wasser wird als Kopplungsmedium über die Probe gegeben, bis diese vollständig bedeckt ist. Anschließend wird die akustische Linse über den ausgewählten Probenbereich geschwenkt, in das Kopplungsmedium eingetaucht, unter visueller Kontrolle des Reflexsignals der Probe angenähert und in z-Richtung fokussiert. Die Bildposition der akustischen Linse stimmt dabei relativ genau mit der des Auflichtmikroskopes überein. Das erste Bild wird bei deutlich positiver Defokussierung aufgenommen. Mit abnehmendem Linsen-Objekt-Abstand werden die ausgewählten Knochenbezirke in einer Serie von Schichtbildern einer Seitenlänge von 1mm mit einem z-Abstand von $5\mu\text{m}$ aufgenommen, bis an jedem vermessenen Bildpunkt eine deutlich negative Defokussierung auftritt. Somit wird garantiert, dass für jeden Punkt der Probenoberfläche das Reflexionssignale einmal im Schallfokus des Wandlers vermessen wird. Jedem vermessenen Punkt der Probe wird sowohl ein Datenwert zur anatomisch-morphologischen Darstellung als auch zur quantitativen Beschreibung der akustischen Eigenschaften zugeordnet [35, 59].

2.6 Die Akustische Impedanz

Die akustische Impedanz (Z) ist eine materialspezifische Größe für die elasto-mechanischen Eigenschaften des Knochens und gibt formal das Produkt aus der Massendichte (ρ) und der Schallausbreitungsgeschwindigkeit (v) im jeweiligen Medium wider.

$$Z = \rho * v$$

$$Z = \text{kg/m}^2\text{s} = \text{rayl}$$

Die am häufigsten verwendete Einheit ist Mrayl.

Die Amplitude des empfangenen Reflexionssignals hängt vom Reflexionskoeffizienten (R) der Probe an der jeweiligen untersuchten Stelle ab.

$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2}$$

Z_1 = Impedanz des Kopplungsmediums (Wasser)

Z_2 = Impedanz des untersuchten Mediums (Knochen)

Daraus ergibt sich, dass der Reflexionskoeffizient bei konstantem Z_1 ausschließlich eine von der Impedanz des Untersuchungsmaterials abhängige Kenngröße ist. Diese Annahme ist unter der Prämisse gültig, dass keine Scherwellen angeregt werden, wie es bei senkrecht auf die Knochenprobe auftreffenden Schallwellen der Fall ist.

3 Ergebnisse

3.1 Akustische Impedanzmessung bei 50 MHz

Für die in PMMA eingebetteten n=100 Proben wurde bei einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz die Maximalwert- und Impedanzverteilung ermittelt. Die Entnahmezylinder unterscheiden sich in der der Untersuchung zugänglichen Spongiosamenge, da die Spongiosageometrie und –architektur in jeder der Knochenproben variiert. Abhängig davon wurden die Impedanzen an zwei bis vier Messfenstern im spongiosen Anteil bestimmt, so dass sich n=284 Einzelmessungen ergaben. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

3.1.1 Knochenbiopsien ohne generalisierte Osteopathie

Bei den Knochenbiopsien von n=22 Patienten wurde histopathologisch ein unauffälliger Knochenbefund ohne generalisierte Osteopathie diagnostiziert. Dargestellt sind Knochen-trabekel von regelrechter Architektur und Struktur. Die einzelnen Trabekel zeigen eine altersentsprechende Struktur und Dicke. In n=62 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung in dieser Gruppe ermittelt.

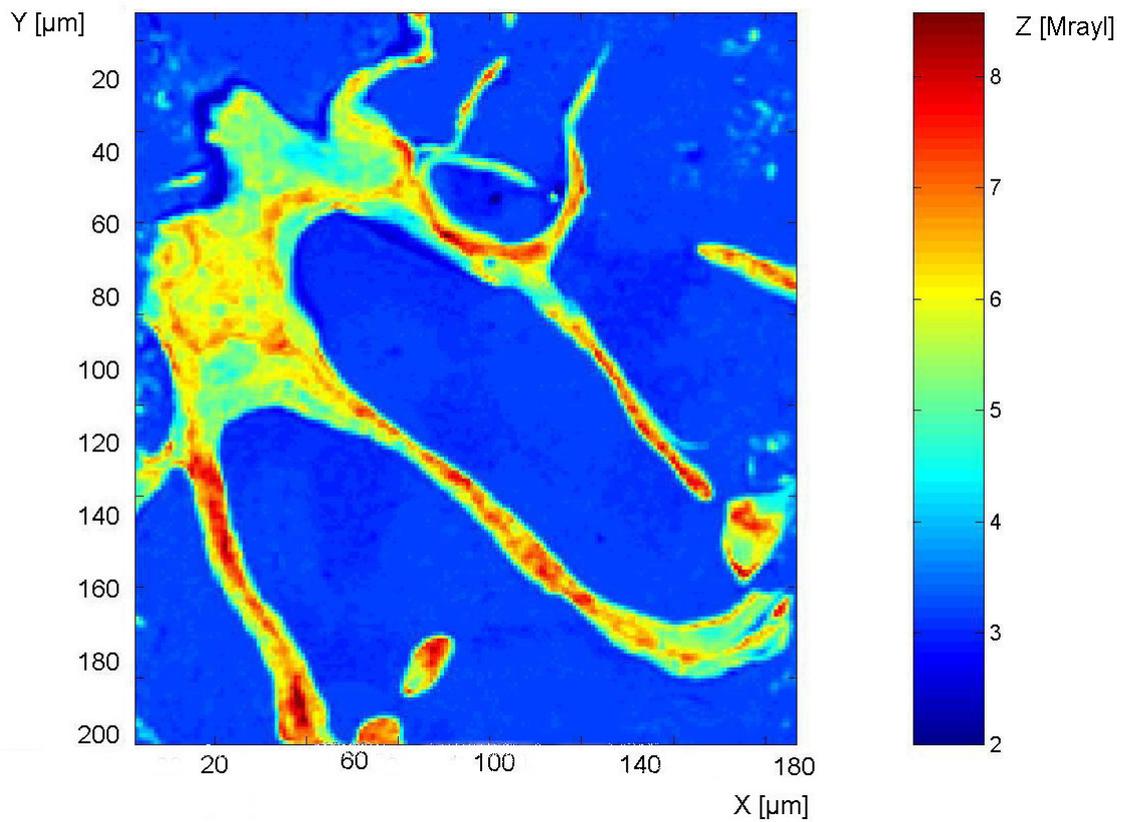


Abbildung 4: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe ohne generalisierte Osteopathie. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_0 = 6,14 \pm 1,14 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 5 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der gesunden Knochenproben dar.

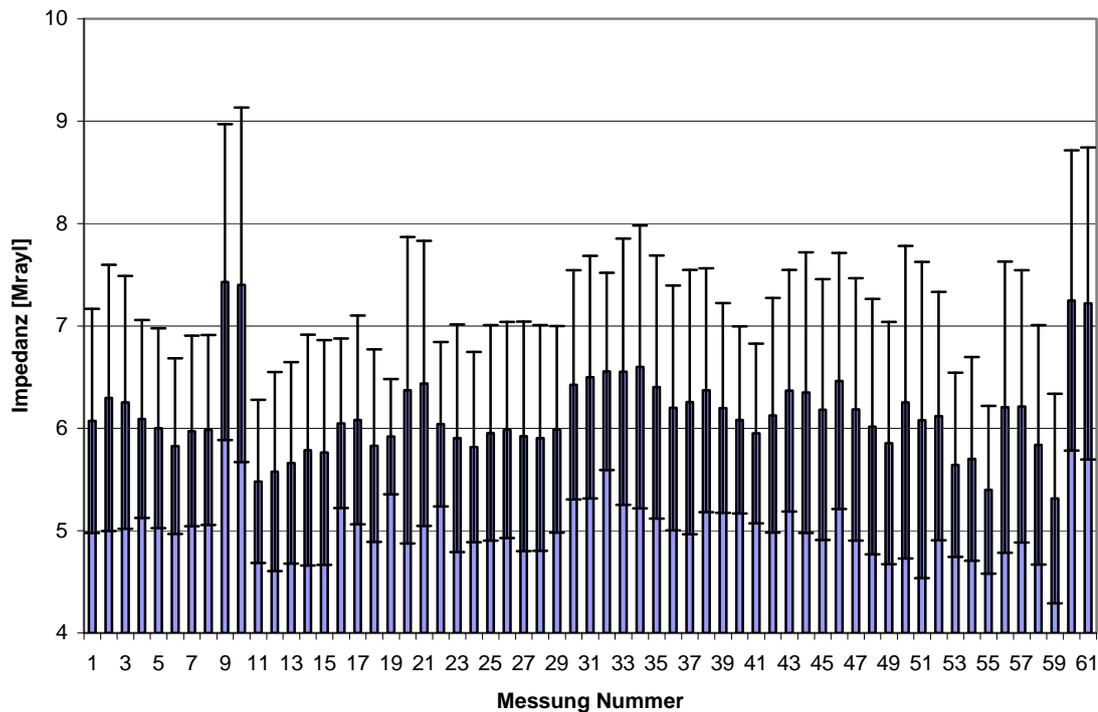


Abbildung 5: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten ohne generalisierte Osteopathie.

3.1.2 Knochenbiopsien mit leichter Osteoporose

Die Knochenbiopsien von n=25 Patienten wiesen eine leichte Osteoporose auf. Abgebildet sind Knochentrabekel, die geringfügig verschmälert erscheinen und deren Netzstruktur teilweise unterbrochen ist. In n=73 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung in dieser Gruppe ermittelt.

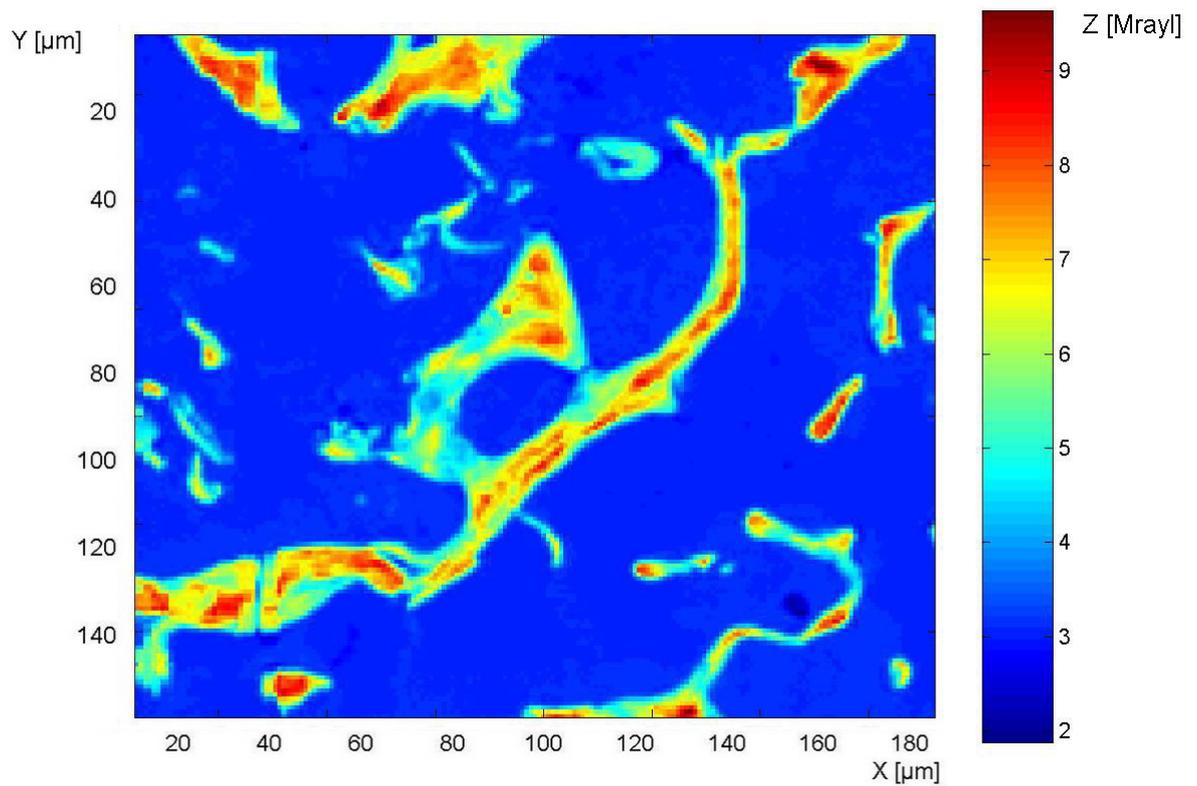


Abbildung 6: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit leichter Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_1 = 6,01 \pm 1,09 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 7 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der leicht osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

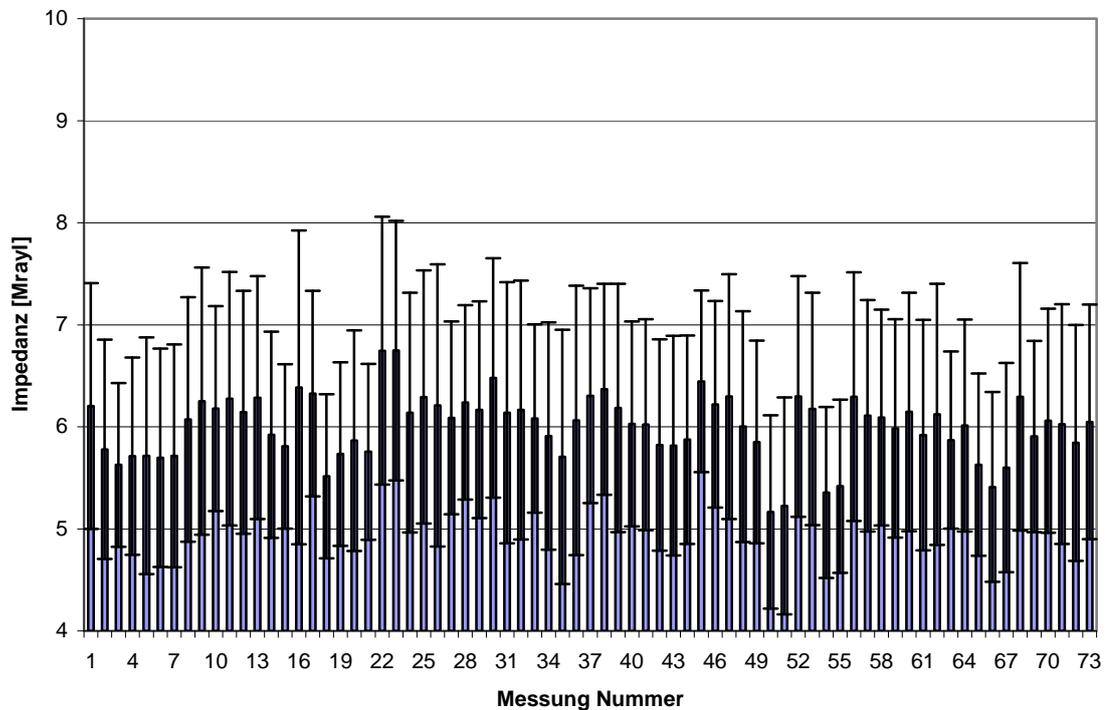


Abbildung 7: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit leichter Osteoporose.

3.1.3 Knochenbiopsien mit mäßiger Osteoporose

N=28 Patienten wurde eine mäßige Osteoporose diagnostiziert. Die Knochentrabekel dieser Probe sind deutlich verschmälert und rarefiziert, die Quervernetzungen sind zum Teil unterbrochen. In n=81 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung in dieser Gruppe ermittelt.

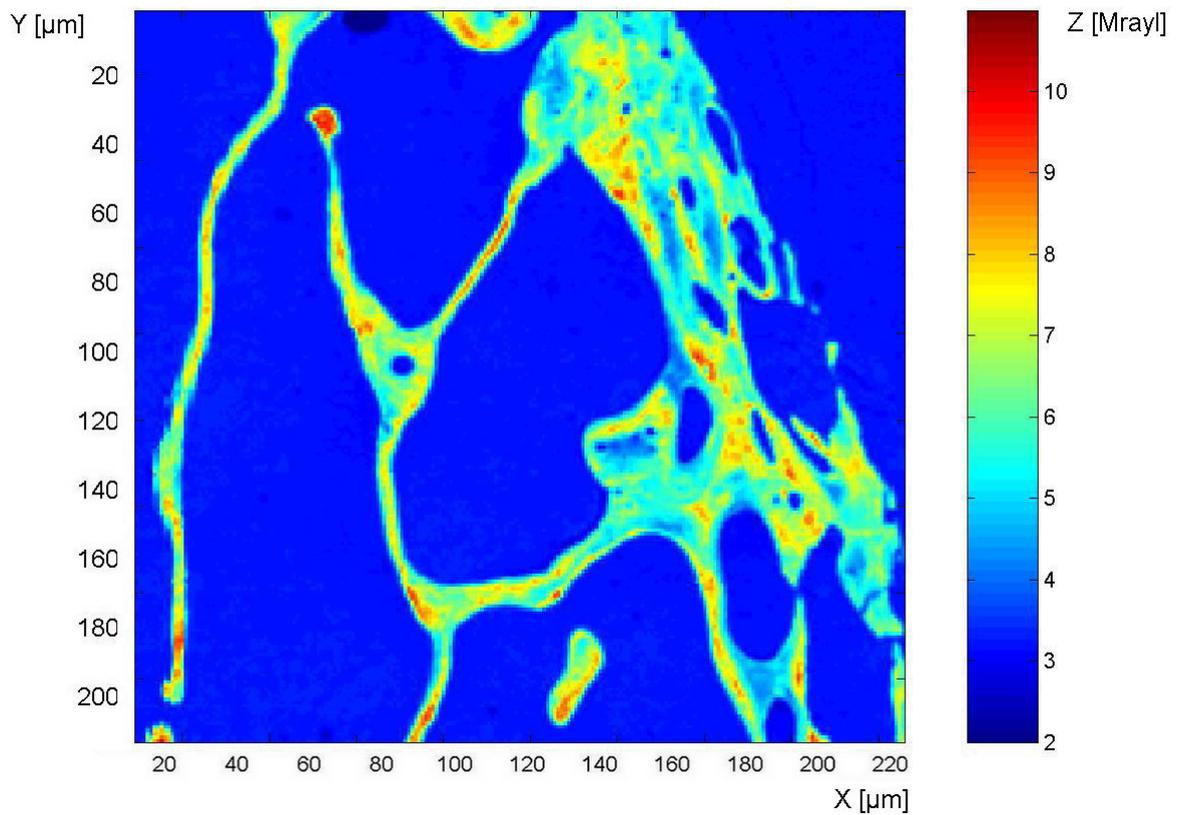


Abbildung 8: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit mäßiger Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_2 = 6,00 \pm 1,08 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 9 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der mäßig osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

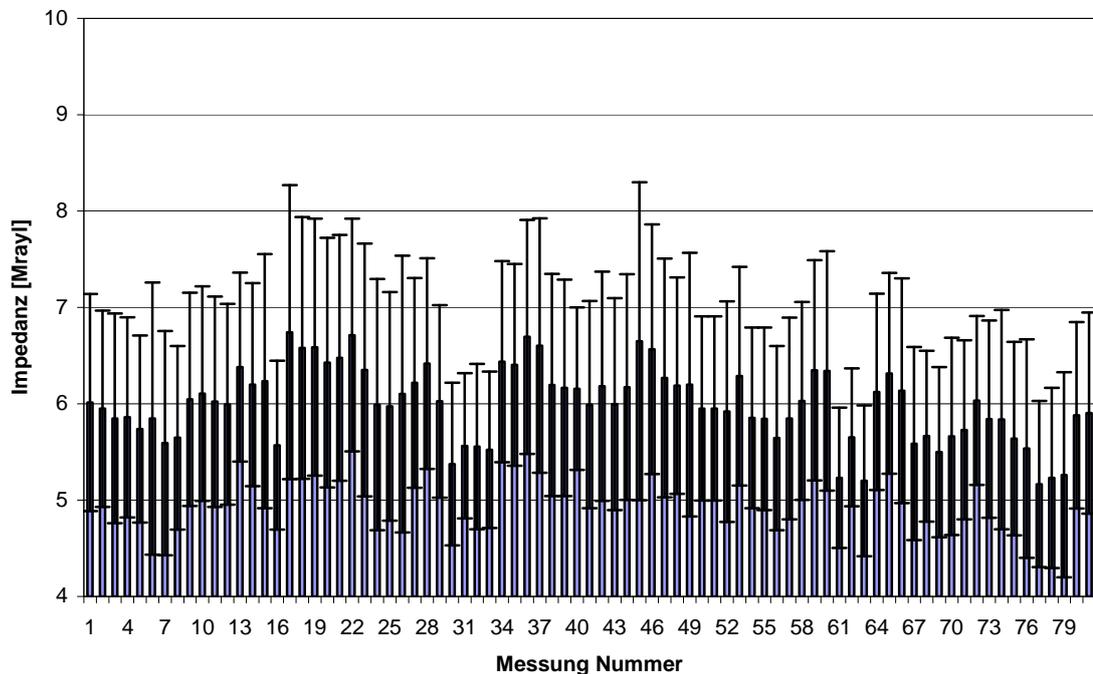


Abbildung 9: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit mäßiger Osteoporose.

3.1.4 Knochenbiopsien mit schwerer Osteoporose

Eine schwere Osteoporose lag bei $n=25$ Patienten vor. Zu sehen sind einzelne Trabekel-fragmente ohne erkennbare Netzstruktur. Die einzelnen Trabekel sind deutlich verschmälert und verkürzt. Typisch sind zahlreiche unverbundene, im Querschnitt punktförmig erscheinende Trabekel. In $n=68$ Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung in dieser Gruppe ermittelt.

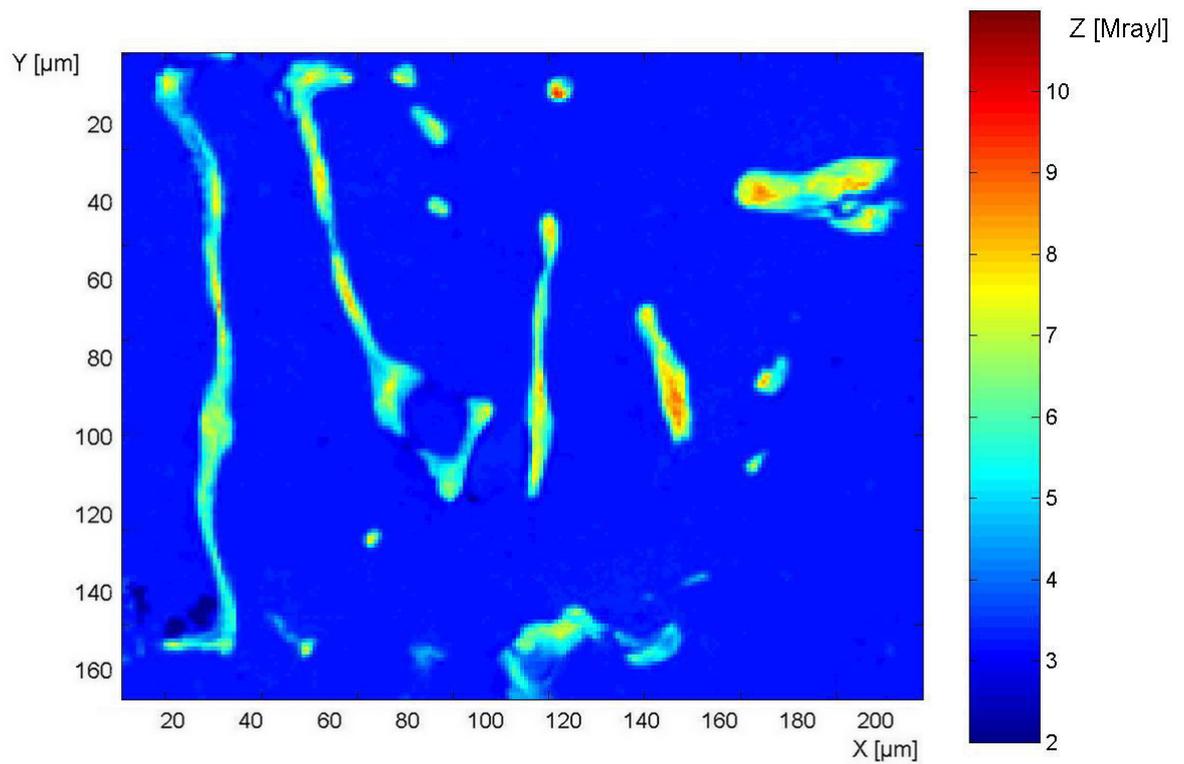


Abbildung 10: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit schwerer Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_3 = 5,91 \pm 1,05 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 11 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der schwer osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

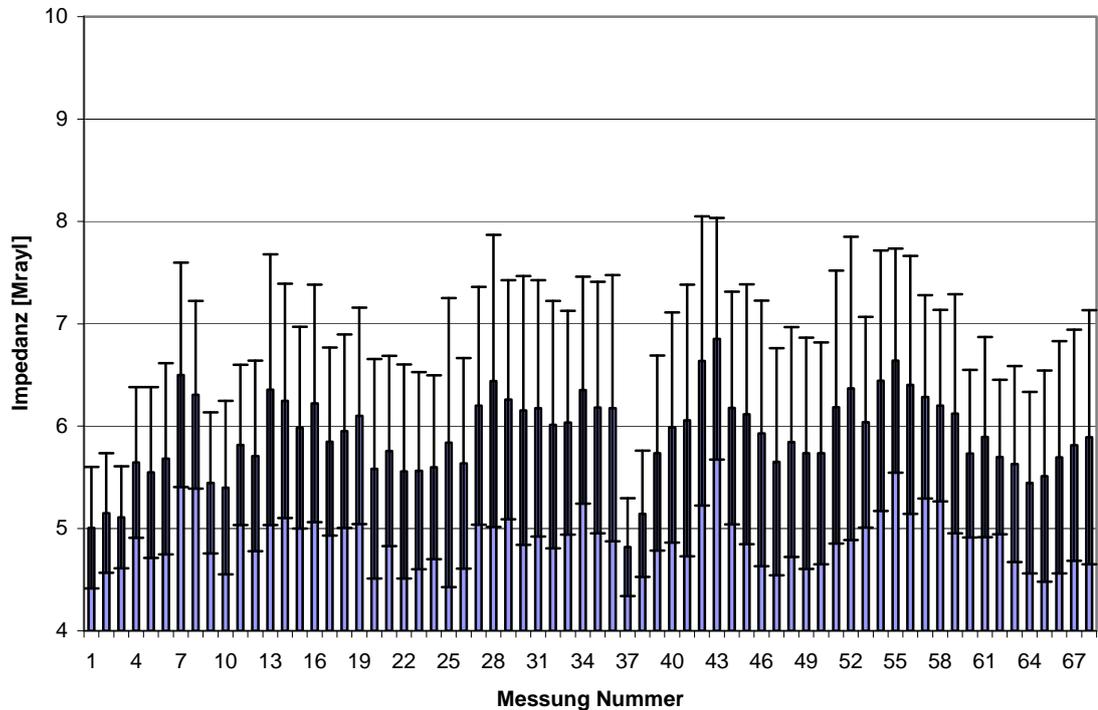


Abbildung 11: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit schwerer Osteoporose.

Die aufgeführten Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurden in einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre statistische Aussagekräftigkeit hin untersucht.

Abbildung 12 stellt alle mit dem akustischen Rastermikroskop KSI SAM 100 gemessenen mittleren Impedanzwerte dar. Das arithmetische Mittel der vermessenen Impedanzen sank von $Z_0 = 6,14 \pm 1,14$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei den Proben gesunder Knochen auf $Z_3 = 5,91 \pm 1,05$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei Proben von Knochen mit schwerer Osteoporose. Die Werte der Proben mit leichter und mäßiger Osteoporose lagen mit $Z_1 = 6,01 \pm 1,09$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) und $Z_2 = 6,00 \pm 1,08$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) absteigend dazwischen.

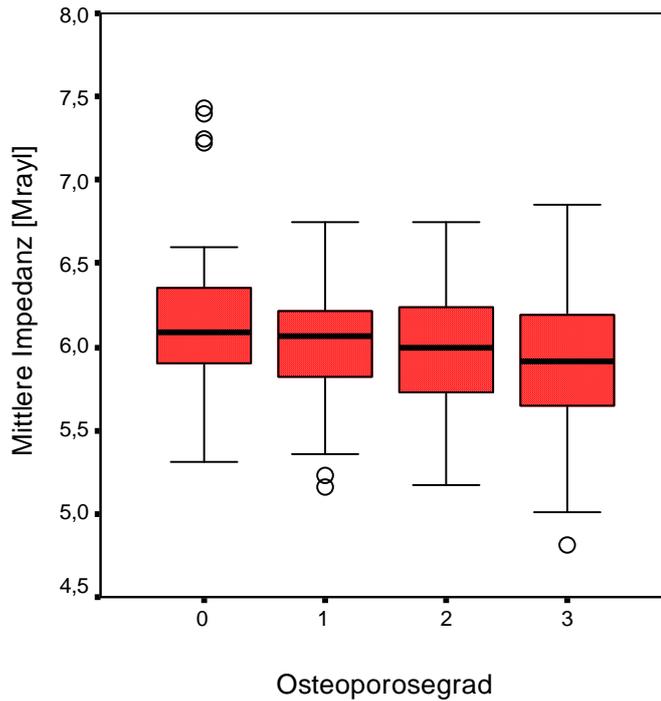


Abbildung 12: Übersicht der Maximalwertverteilung bei verschiedenen Schweregraden der Osteoporose.

In der statistischen Untersuchung zeigt sich, dass der Grad der Osteoporoseerkrankung insgesamt einen statistisch signifikanten Einfluss auf die gemessenen Impedanzwerte hat.

Für die Messungen bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ergibt sich, dass die ermittelten mittleren Impedanzwerte der Proben mit starker Osteoporose signifikant von denen der gesunden Knochen abweichen. Die gemessenen Impedanzwerte der Proben mit leichter und mäßiger Osteoporose hingegen weisen mit sinkenden Messwerten einen Einfluss des Grades der Erkrankung auf die Impedanz, jedoch keine statistische Signifikanz auf. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der gemessenen mittleren Impedanzwerte.

(I) OPGRAD	(J) OPGRAD	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0	1	,1368	,06608	,236	-,0388	,3123
	2	,1463	,06458	,145	-,0252	,3179
	3	,2309(*)	,06717	,004	,0524	,4094
1	0	-,1368	,06608	,236	-,3123	,0388
	2	,0096	,06147	1,000	-,1538	,1729
	3	,0942	,06420	,861	-,0764	,2648
2	0	-,1463	,06458	,145	-,3179	,0252
	1	-,0096	,06147	1,000	-,1729	,1538
	3	,0846	,06265	1,000	-,0819	,2511
3	0	-,2309(*)	,06717	,004	-,4094	-,0524
	1	-,0942	,06420	,861	-,2648	,0764
	2	-,0846	,06265	1,000	-,2511	,0819

Abbildung 13: Statistischer Vergleich der Messwerte aller Grade der Osteoporose bei 50 MHz.

3.1.5 Native Knochenbiopsien

Weiterhin kamen die Beckenkammbiopsien von n=6 zufällig ausgewählten Verstorbenen zur Untersuchung, bei denen keine generalisierte Osteopathie bestand. Dabei handelte es sich um n=3 Frauen sowie n=3 Männer.

Patient Nr.	Sektions-Nr.	Geschlecht	Alter	Todesursache
1	198/03	Männlich	72 Jahre	Septisches Multiorganversagen
2	199/03	Männlich	76 Jahre	Septischer Schock
3	201/03	Männlich	38 Jahre	Herz-Kreislauf-Versagen
4	208/03	Weiblich	83 Jahre	Herzinsuffizienz
5	211/03	Weiblich	76 Jahre	Koronare Herzkrankheit
6	215/03	Weiblich	68 Jahre	Guillain-Barré-Syndrom

Die Knochenbiopsien wurden mit der Ultrafräse bis zu einer Oberflächenrauigkeit von 1 μm plan gefräst und in diesem Zustand mit einer Ultraschallfrequenz von 50 MHz vermessen, um die entsprechende Maximalwert- und Impedanzverteilung zu bestimmen. Abhängig von Spongiosageometrie und -architektur wurden die Impedanzen an zwei bis vier Messfenstern im spongiösen Anteil bestimmt, so dass sich n=23 Einzelmessungen ergaben. Die abgebildete Knochenbiopsie weist Spongiosatrabekel von regelrechter Dicke und vollständig erhaltener Netzstruktur auf. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

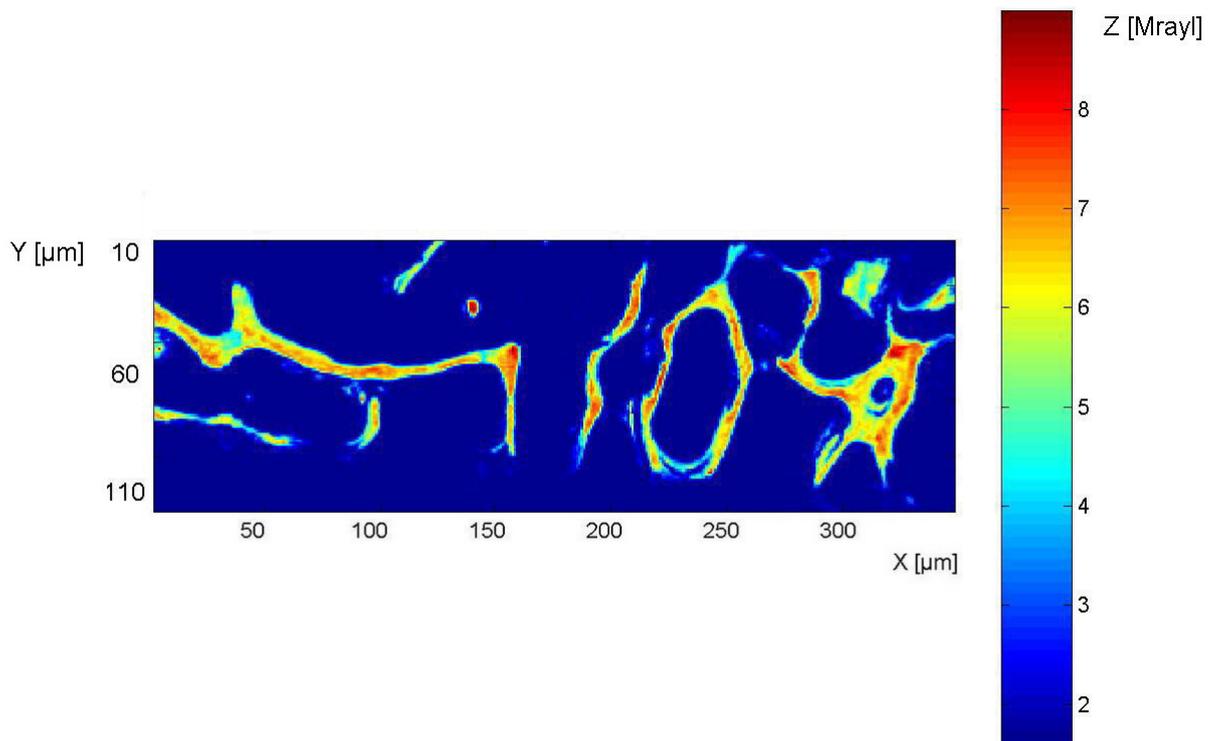


Abbildung 14: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer nativen Knochenprobe. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$\mathbf{Z_n = 5,62 \pm 0,79 \text{ Mrayl}}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 15 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der nativen Knochenproben dar.

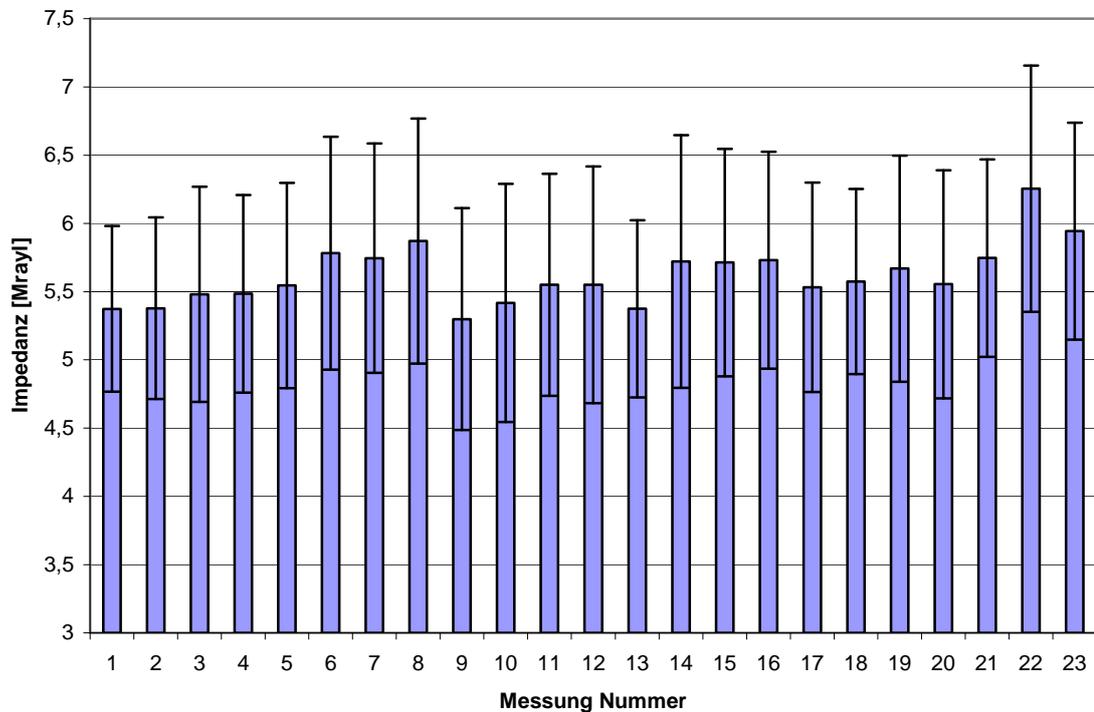


Abbildung 15: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der nativ gemessenen Präparate.

3.1.6 Native Knochenbiopsien in PMMA eingebettet

Nach der Vermessung wurden die nativen Knochenbiopsien entsprechend dem unter 2.1.2 geschilderten Verfahren in PMMA eingebettet und erneut vermessen. Durch erneutes Schleifen und Polieren der Präparate nach deren Einbettung in PMMA mit entsprechendem Substanzverlust, war es nicht möglich, dieselben Messlokalisationen der Probe aufzusuchen, die unter 3.1.5 zur Untersuchung kamen.

Abhängig von Präparatgröße und -zustand wurden die Impedanzen an zwei bis vier Messlokalisationen im spongiösen Anteil bestimmt, so dass sich n=21 Einzelmessungen ergaben. Wiederum zeigen sich in Dicke und Quervernetzung regelrechte Trabekel. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

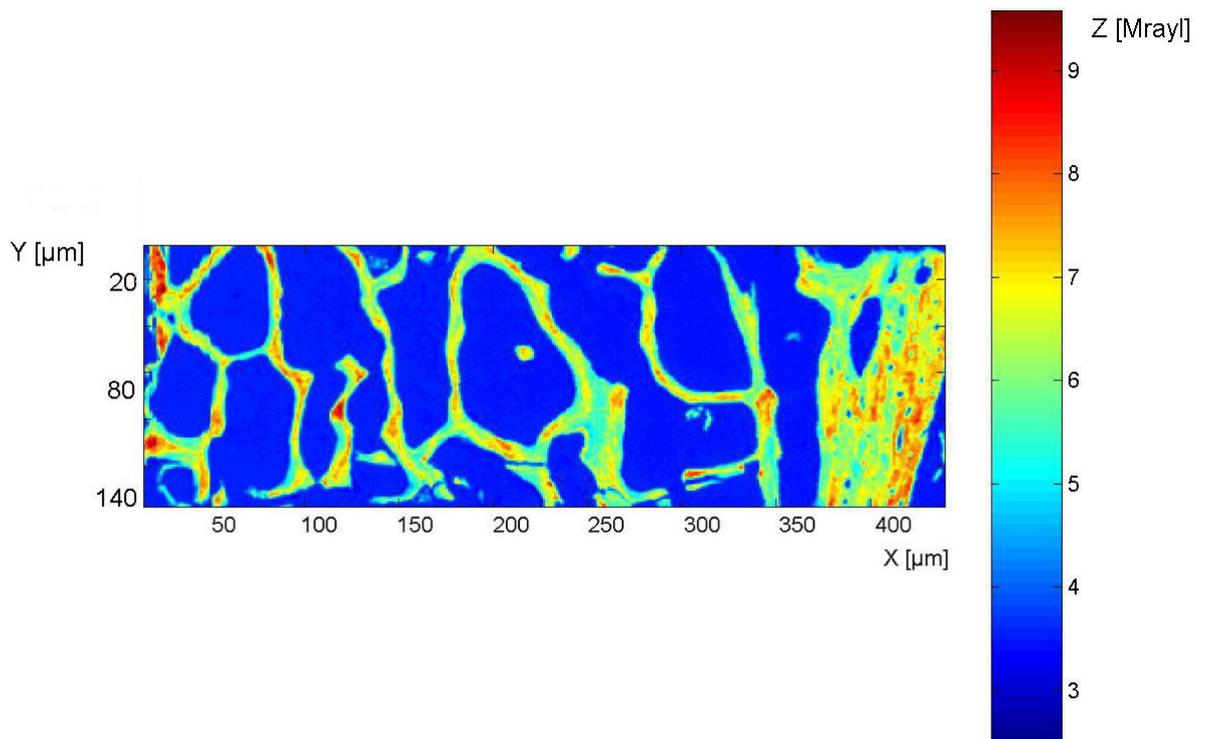


Abbildung 16: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer in PMMA eingebetteten nativen Knochenprobe. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_{ne} = 5,83 \pm 0,87 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 17 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der in PMMA gebetteten nativen Knochenproben dar.

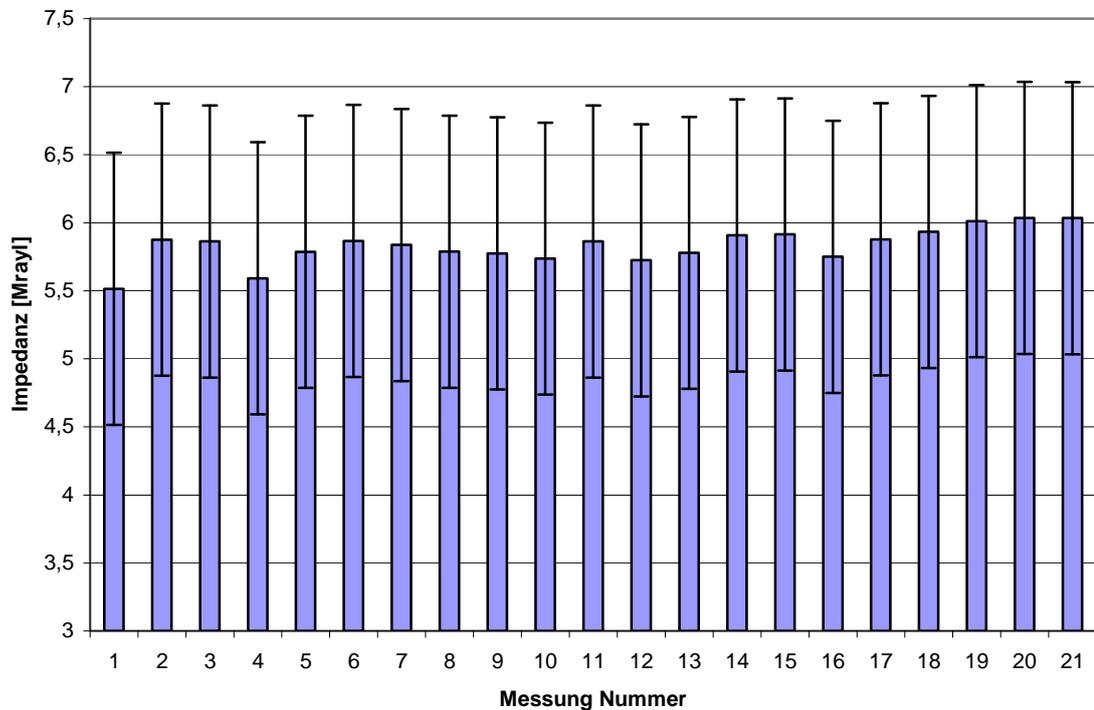


Abbildung 17: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von in PMMA gebetteten Präparaten.

3.2 Akustische Impedanzmessung bei 200 MHz

Eine Anzahl von $n=20$ der in PMMA eingebetteten Knochenbiopsien wurde mit dem KSI SAM 2000 bei einer Arbeitsfrequenz von 200MHz vermessen. Dabei wurden einzelne Trabekel vermessen. Abhängig von Spongiosageometrie und -architektur wurden die Impedanzen von drei bis fünf Trabekeln bestimmt, so dass sich $n=96$ Einzelmessungen ergaben. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

3.2.1 Knochenbiopsien ohne generalisierte Osteopathie

N=11 Knochenbiopsien, bei denen histopathologisch ein unauffälliger Knochenbefund diagnostiziert wurde, kamen zur Untersuchung. Der abgebildete Knochen zeigt eine regelrechte Trabekelstruktur mit zahlreichen kräftigen Vernetzungen. In n=47 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung an verschiedenen Knochen trabekeln ermittelt.

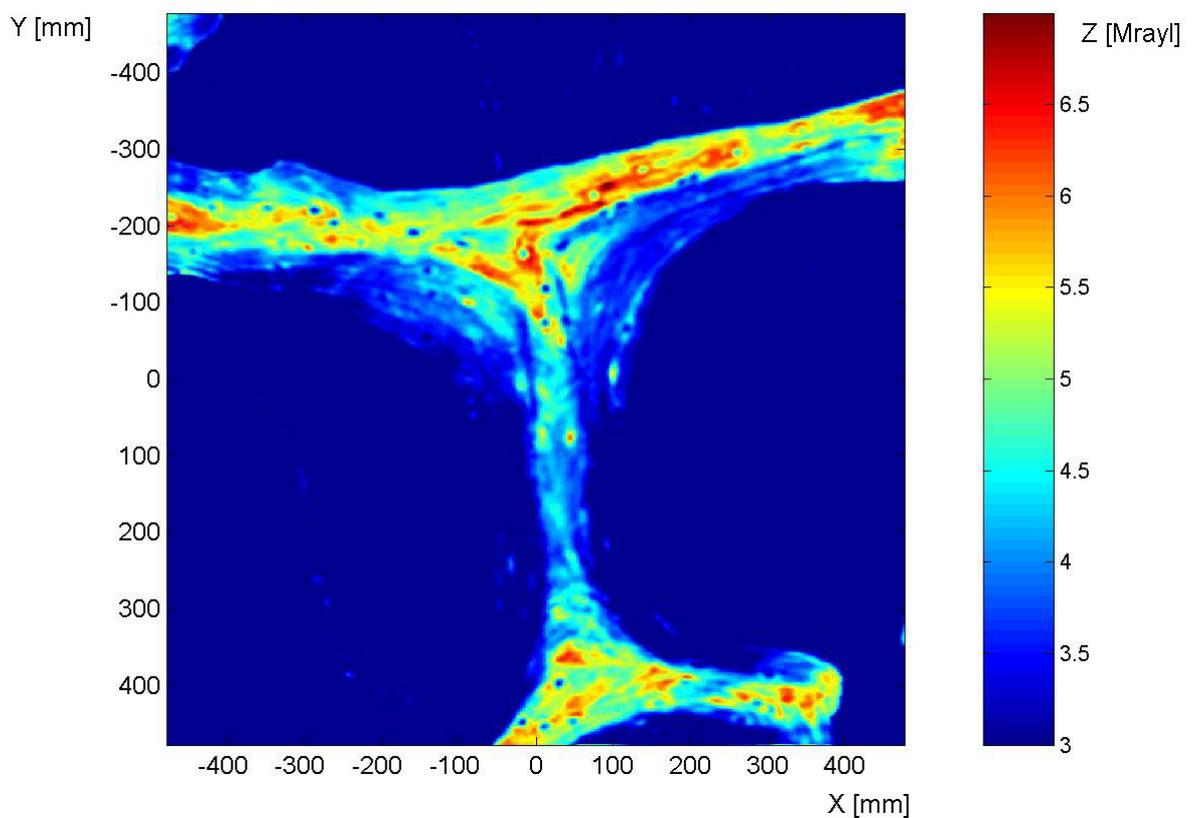


Abbildung 18: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe ohne generalisierte Osteopathie. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_0 = 4,52 \pm 0,70 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 19 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der gesunden Knochenproben dar.

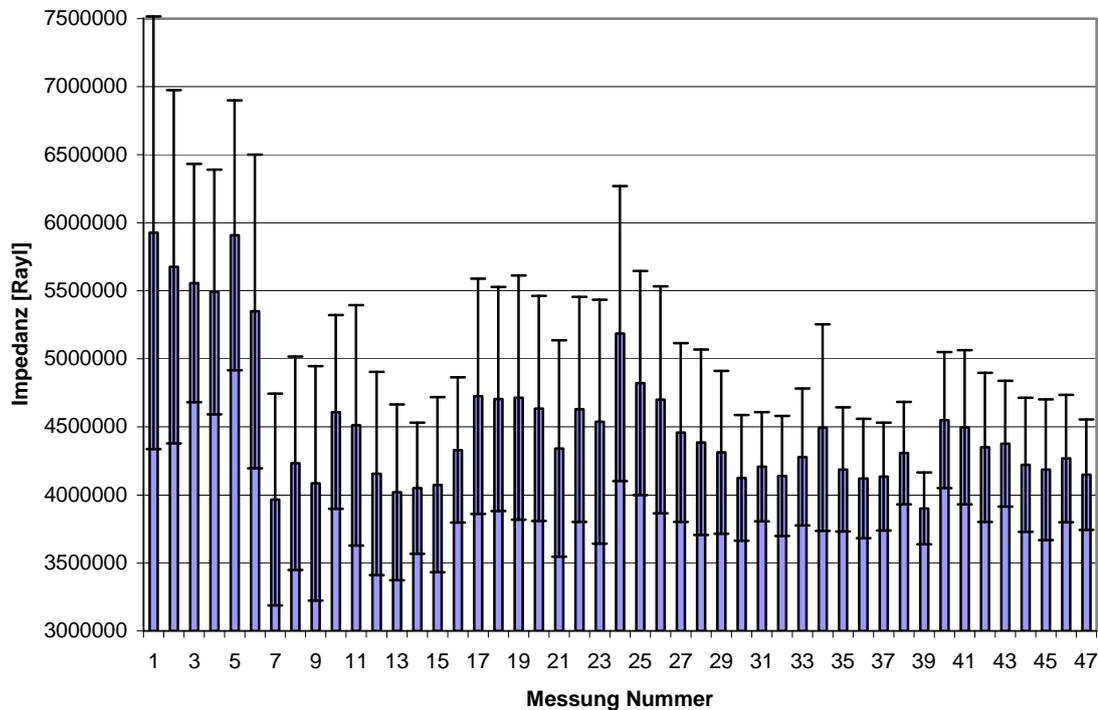


Abbildung 19: Mittlere Impedanz, mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten ohne generalisierte Osteopathie.

3.2.2 Knochenbiopsien mit leichter Osteoporose

N=11 Knochenbiopsien, bei denen histopathologisch eine leichte Osteoporose diagnostiziert wurde, kamen zur Untersuchung. In der Abbildung ist eine pathologische Ausdünnung des Trabekels zu erkennen. In n=49 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung der einzelnen Knochen trabekel ermittelt.

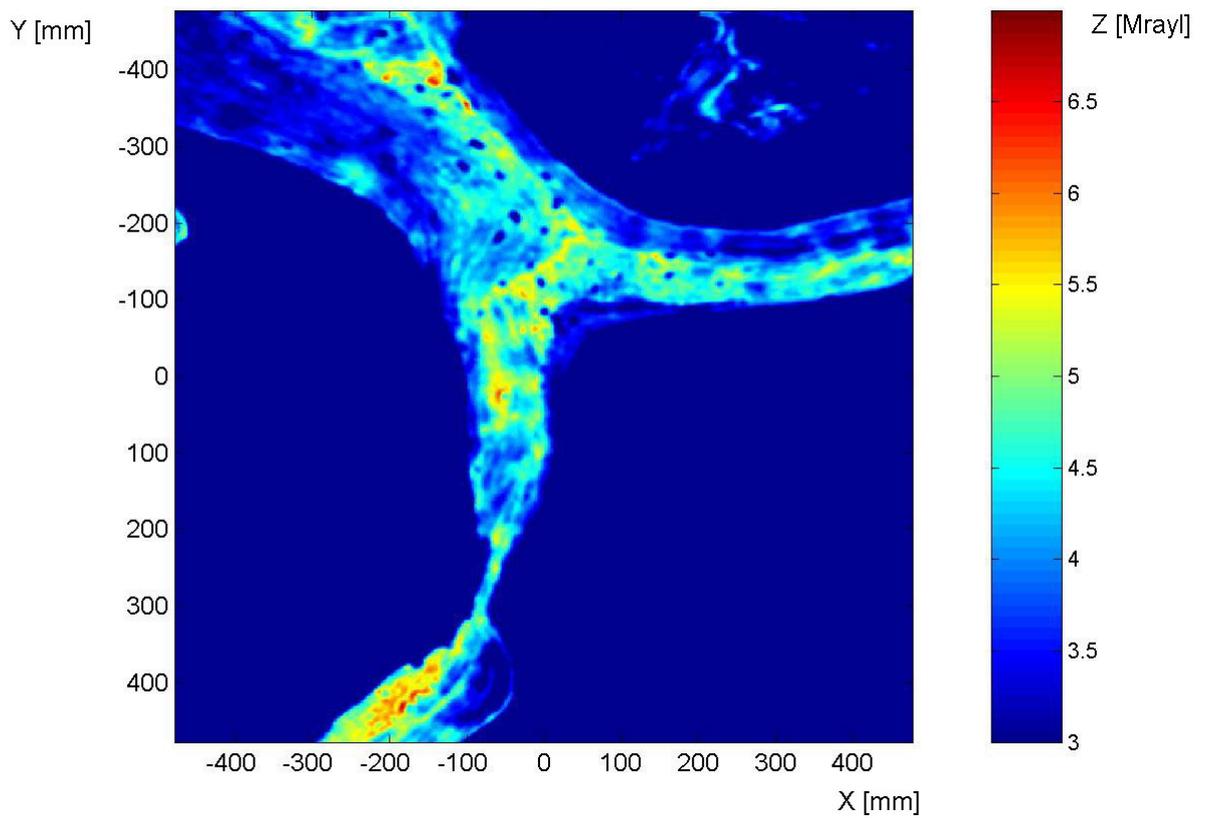


Abbildung 20: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit leichter Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_1 = 4,46 \pm 0,69 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 21 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der leicht osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

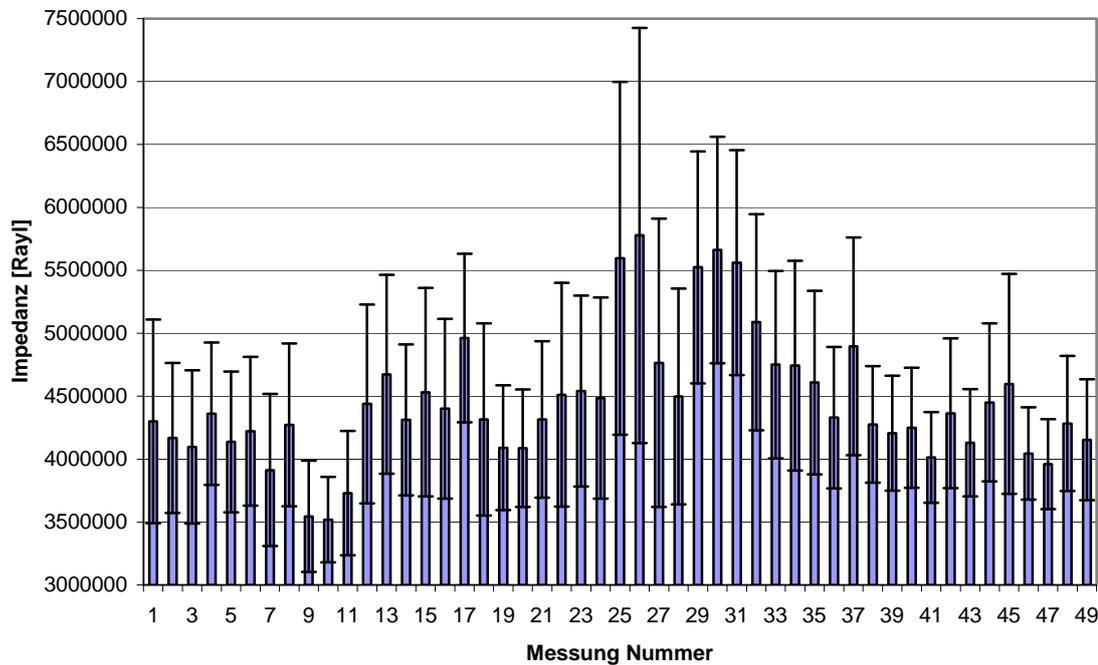


Abbildung 21: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit leichter Osteoporose.

3.2.3 Knochenbiopsien mit mäßiger Osteoporose

N=11 Knochenbiopsien, bei denen histopathologisch eine mäßige Osteoporose diagnostiziert wurde, kamen zur Untersuchung. Die Trabekel zeigten sich bei diesen Proben erheblich ausgedünnt und in ihrer Netzstruktur aufgelockert. In n=48 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung der einzelnen Knochen trabekel ermittelt.

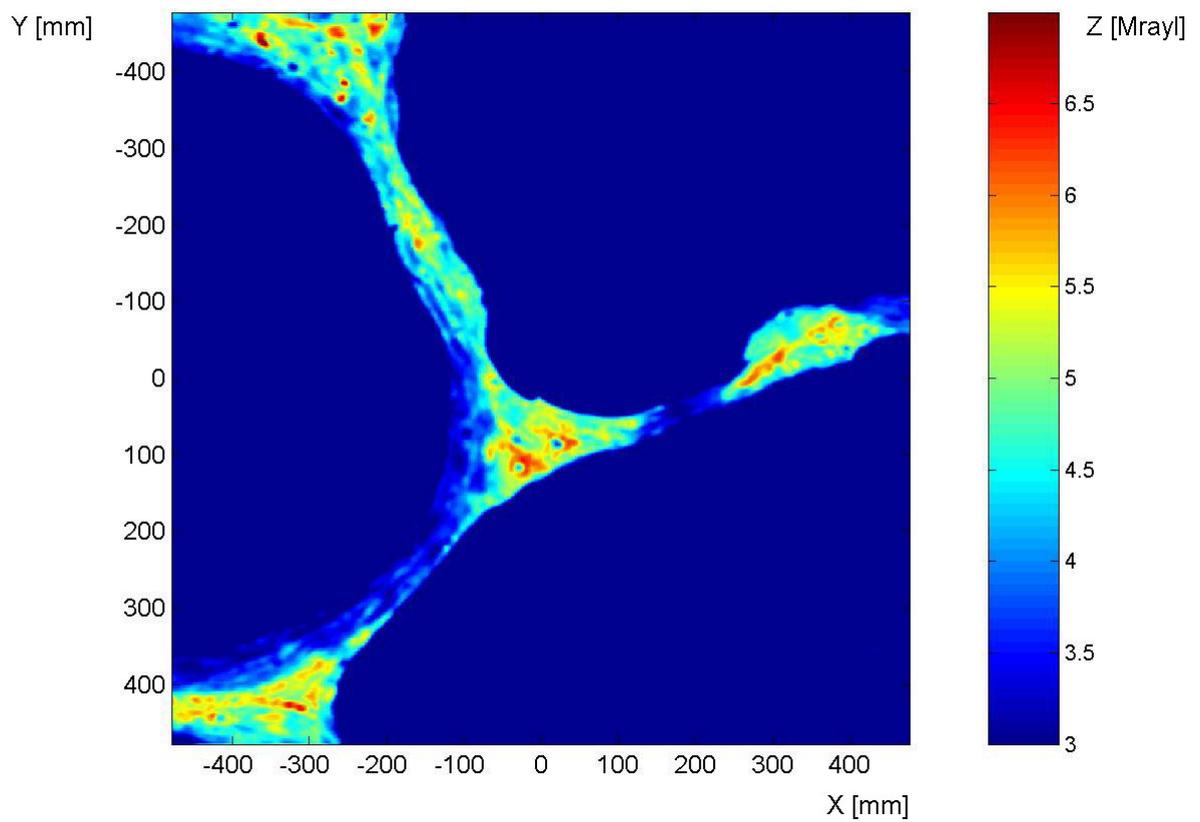


Abbildung 22: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit mäßiger Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_2 = 4,25 \pm 0,59 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 23 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der mäßig osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

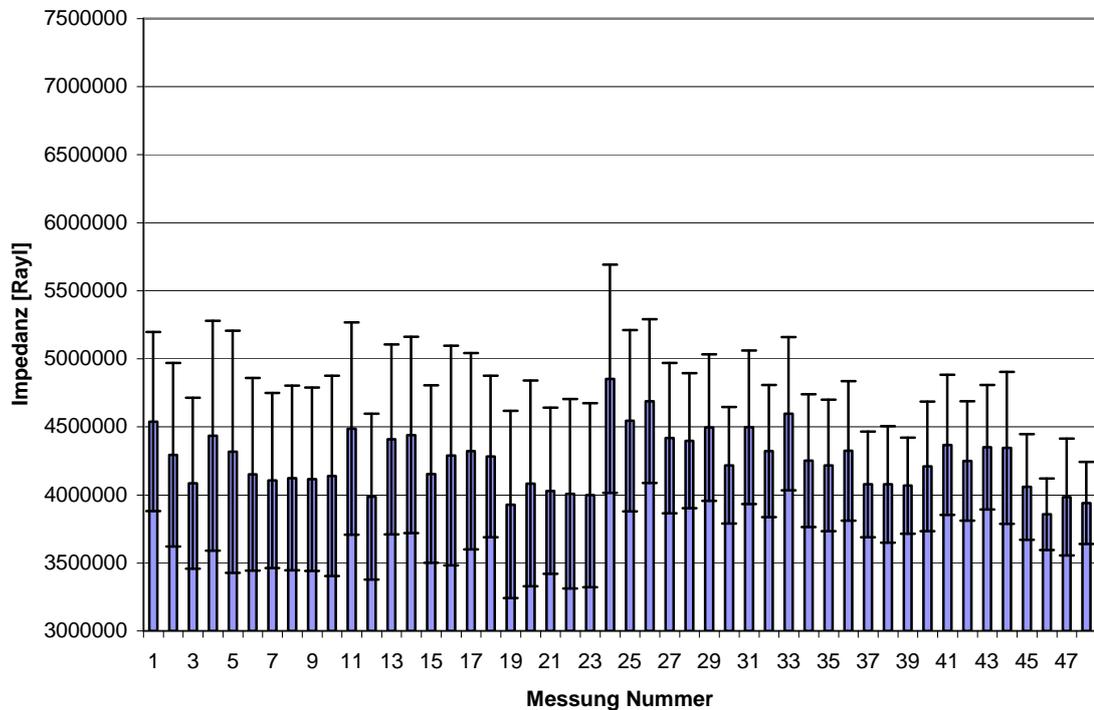


Abbildung 23: Mittlere Impedanz, mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit mäßiger Osteoporose.

3.2.4 Knochenbiopsien mit schwerer Osteoporose

N=10 Knochenbiopsien, bei denen histopathologisch eine schwere Osteoporose diagnostiziert wurde, kamen zur Untersuchung. Dargestellt sind hochgradig rarefizierte Knochenbälkchen mit ausgedünnter Verbindung untereinander. In n=24 Einzelmessungen wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung der einzelnen Knochen trabekel ermittelt.

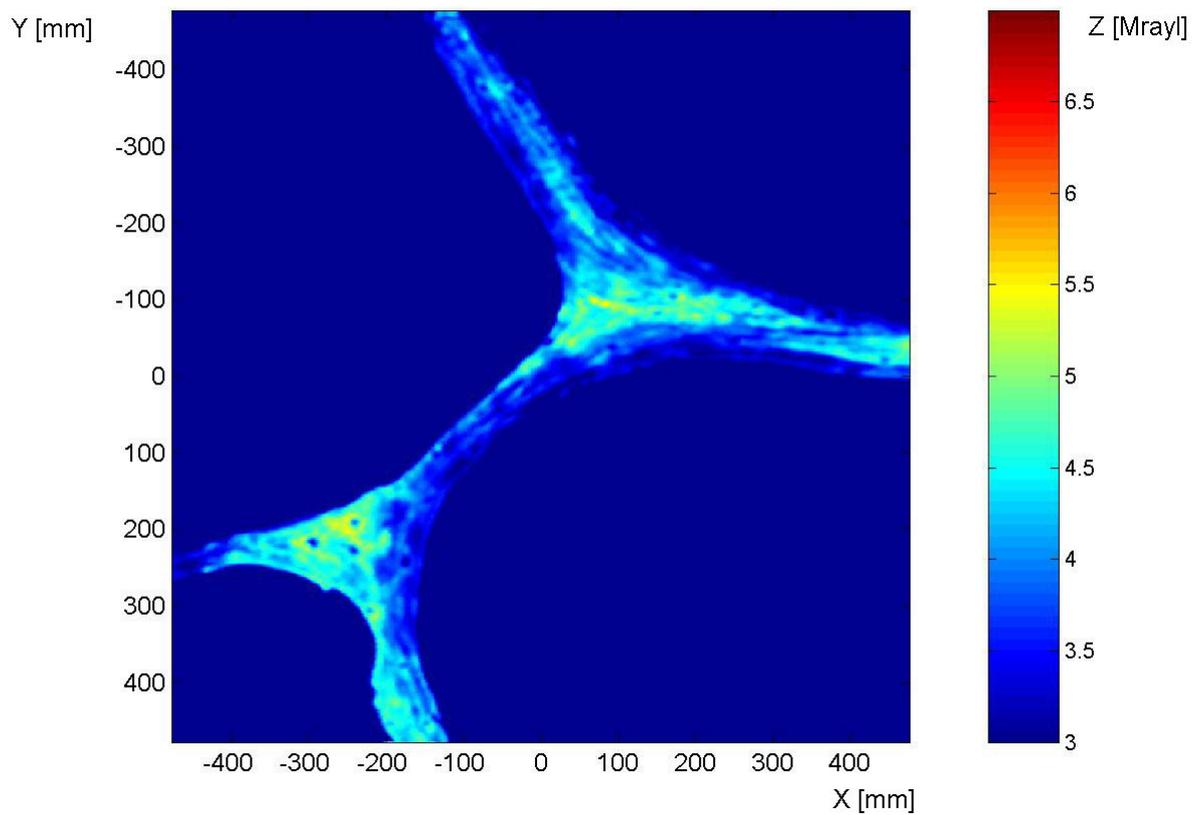


Abbildung 24: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer Probe mit schwerer Osteoporose. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_3 = 4,06 \pm 0,68 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 25 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der schwer osteoporotisch veränderten Knochenproben dar.

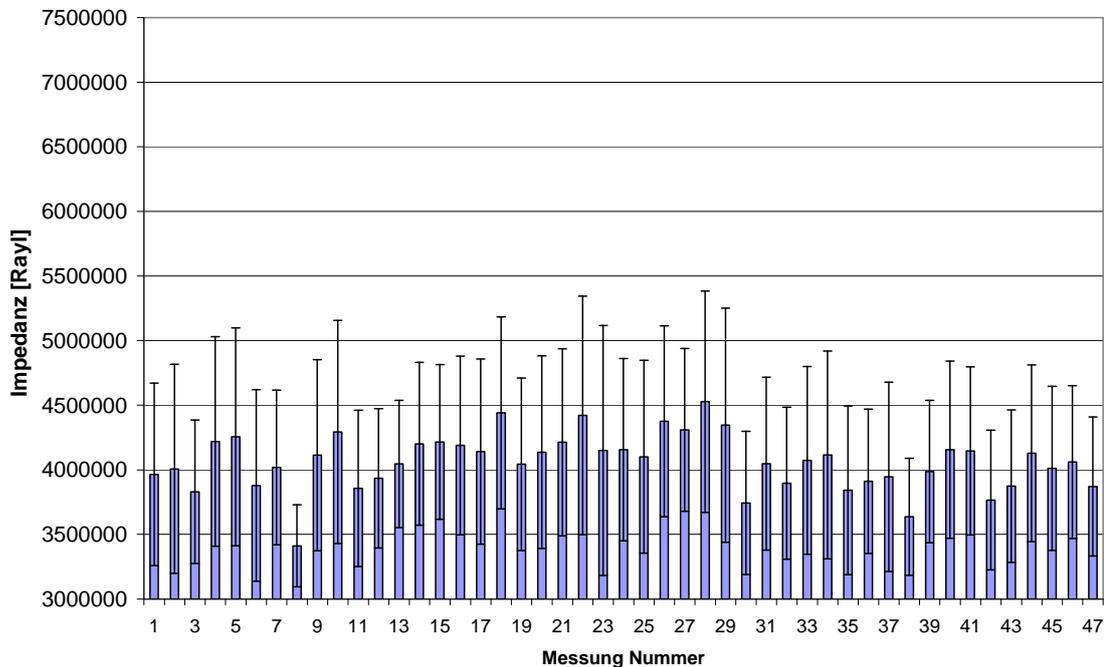


Abbildung 25: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von Präparaten mit schwerer Osteoporose.

Die angeführten Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurden erneut in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre statistische Aussagekräftigkeit hin untersucht. Abbildung 26 stellt alle mit dem akustischen Rastermikroskop KSI SAM 2000 gemessenen mittleren Impedanzwerte dar. Die höchsten Impedanzwerte von $Z_0 = 4,52 \pm 0,70 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) wiesen die Knochenproben ohne Osteopathie auf, während die Proben mit schwerer Osteoporose erneut die niedrigsten Werte von $Z_3 = 4,06 \pm 0,68 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) aufzeigten. Die Knochenproben mit leichter und mäßiger Osteoporose lagen mit $Z_1 = 4,46 \pm 0,69 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) und $Z_2 = 4,25 \pm 0,59 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) zwischen diesen Werten.

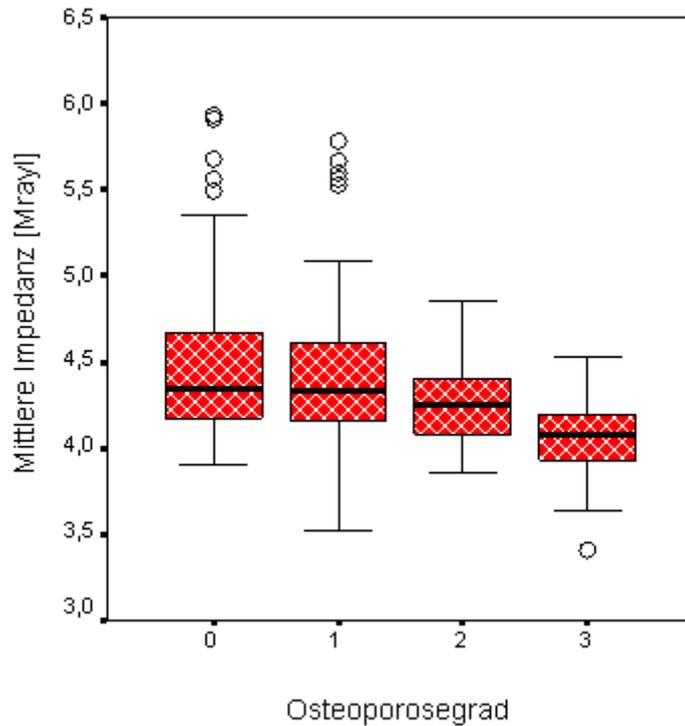


Abbildung 26: Übersicht der Maximalwertverteilung bei verschiedenen Schweregraden der Osteoporose.

In der statistischen Untersuchung kommt wiederum zum Ausdruck, dass der Grad der Osteoporoseerkrankung insgesamt einen statistisch signifikanten Einfluss auf die gemessenen Impedanzwerte hat.

Bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der mittleren Impedanzen der Proben mit mäßiger und schwerer Osteoporose von den Proben gesunder Knochen dargestellt werden. Die vermessenen Impedanzen der Biopsien mit leichter Osteoporose zeigen im Mittel eine geringe Erniedrigung der Impedanz im Vergleich zum gesunden Knochen. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant nachweisbar. Beim Vergleich zwischen den Biopsien mit leichter Osteoporose und denen mit schwerer Osteoporose konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied der mittleren Impedanzen aufgezeigt werden.

Abbildung 27 zeigt den statistischen Vergleich der Messwerte aller Grade der Osteoporose bei 200 MHz auf.

(I) OPGRAD	(J) OPGRAD	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfeh- ler	Signifi- kanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0	1	,0646	,07984	1,000	-,1483	,2775
	2	,2704(*)	,08025	,005	,0564	,4844
	3	,4595(*)	,08067	,000	,2444	,6746
1	0	-,0646	,07984	1,000	-,2775	,1483
	2	,2057	,07942	,062	-,0060	,4175
	3	,3949(*)	,07984	,000	,1819	,6078
2	0	-,2704(*)	,08025	,005	-,4844	-,0564
	1	-,2057	,07942	,062	-,4175	,0060
	3	,1891	,08025	,117	-,0249	,4031
3	0	-,4595(*)	,08067	,000	-,6746	-,2444
	1	-,3949(*)	,07984	,000	-,6078	-,1819
	2	-,1891	,08025	,117	-,4031	,0249

Abbildung 27: Statistischer Vergleich der Messwerte aller Grade der Osteoporose bei 200 MHz.

3.2.5 Native Knochenbiopsien

Die Beckenkammbiopsien der n=6 zufällig ausgewählten Verstorbenen, bei denen zum Zeitpunkt des Todes keine generalisierte Osteopathie bestand, wurden bei einer Frequenz von 200 MHz vermessen. An mehreren ausgewählten Trabekeln der Knochenprobe wurde die Maximalwert- und Impedanzverteilung bestimmt, so dass sich n=48 Einzelmessungen ergaben. Der spongöse Knochen ist in seinem Erscheinungsbild morphologisch regelrecht entwickelt. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

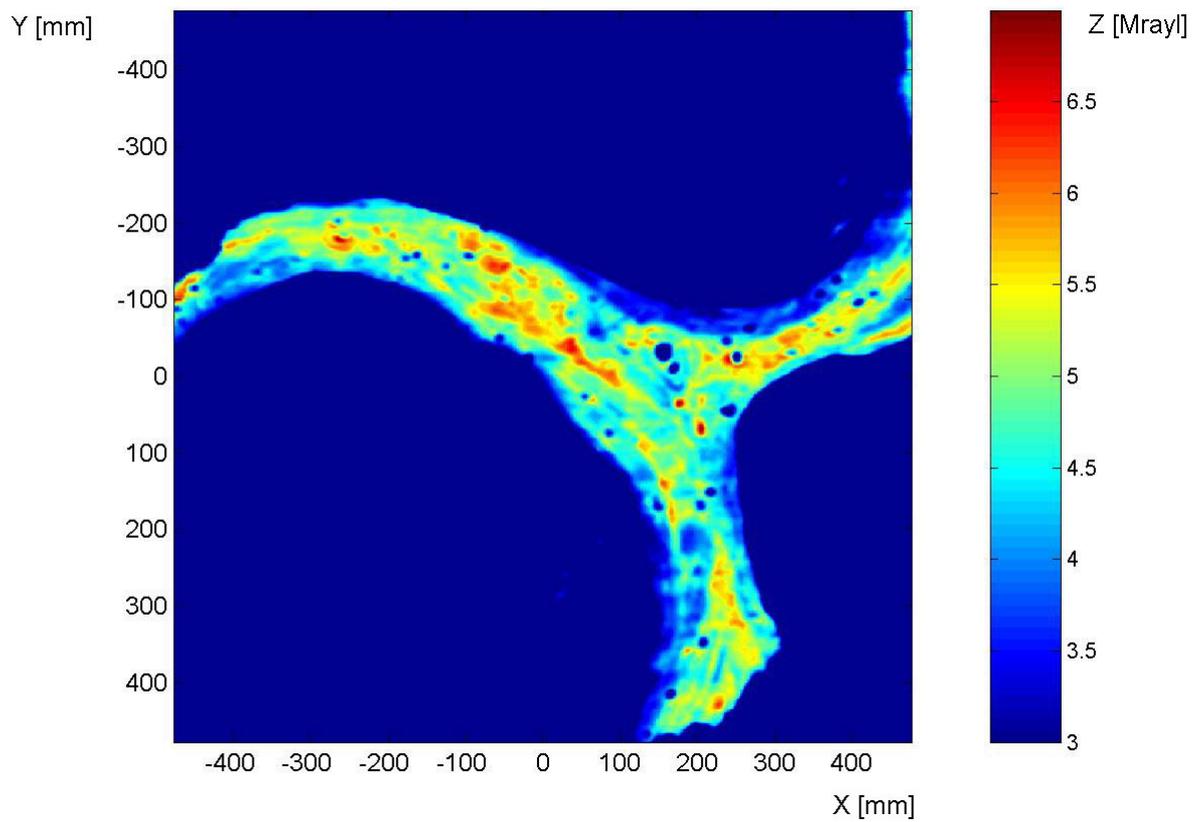


Abbildung 28: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer nativen Knochenprobe. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$\mathbf{Z_n = 4,52 \pm 0,62 \text{ Mrayl}}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 29 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der nativen Knochenproben dar.

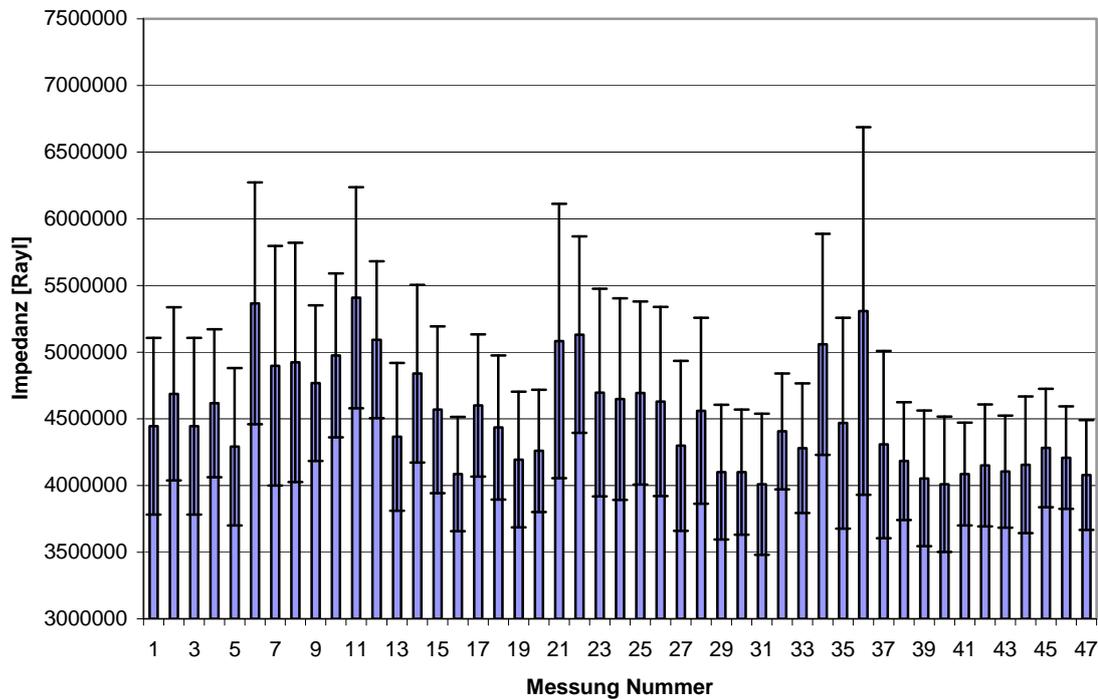


Abbildung 29: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der nativ gemessenen Präparate.

3.2.6 Native Knochenbiopsien in PMMA eingebettet

Nach der Vermessung wurden die nativen Knochenbiopsien entsprechend dem geschilderten Verfahren in PMMA eingebettet und erneut vermessen. Durch erneutes Schleifen und Polieren der Präparate nach deren Einbettung in PMMA mit entsprechendem Substanzverlust, war es nicht möglich, dieselben Messlokalisationen der Probe aufzusuchen, die unter 3.2.5 zur Untersuchung kamen.

Nach der Einbettung ergaben sich $n=40$ Einzelmesswerte für die Maximalwert- und Impedanzverteilung an ausgesuchten Knochen trabekeln. Dargestellt ist ein in Größe und Dicke unauffälliger Trabekel. Die statistische Auswertung der ermittelten Impedanzwerte erfolgte mit der Software SPSS Version 11.5.

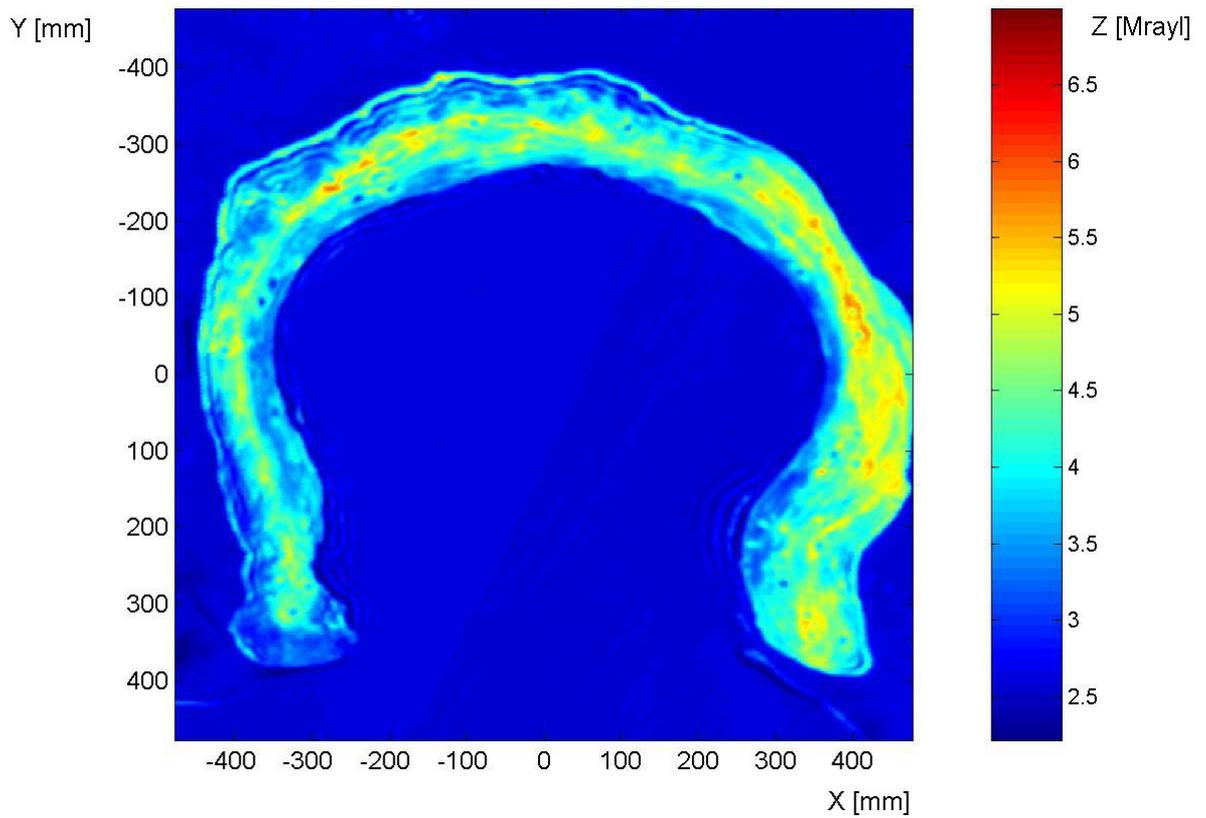


Abbildung 30: Maximalwertverteilung der akustischen Impedanzwerte einer in PMMA eingebetteten nativen Knochenprobe. Dabei sind Regionen hoher akustischer Impedanz rot dargestellt, Regionen niedriger Impedanzwerte hingegen blau.

Für die mittlere akustische Impedanz der ausgewerteten Proben dieser Gruppe ergibt sich:

$$Z_{ne} = 4,82 \pm 0,57 \text{ Mrayl}$$

(Mittelwert \pm Standardabweichung)

Abbildung 31 stellt die Verteilung der ermittelten Mittelwerte der in PMMA gebetteten nativen Knochenproben dar.

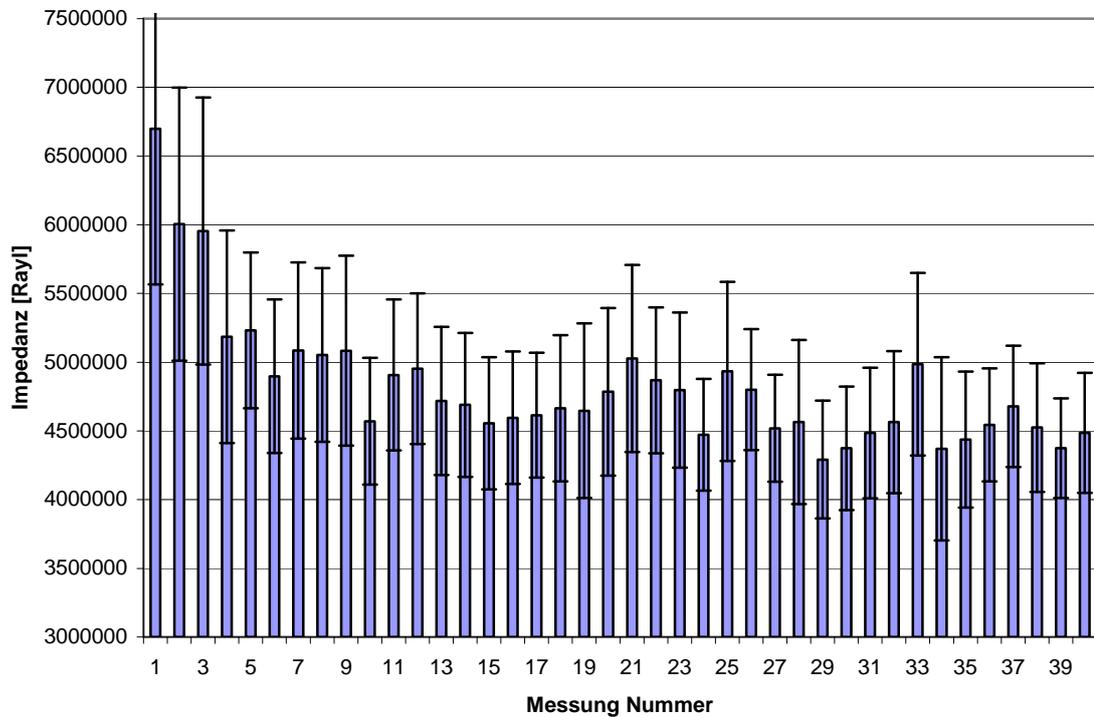


Abbildung 31: Mittlere Impedanz mit Standardabweichung der Messungen von in PMMA gebetteten Präparaten.

3.3 Einfluss des Alters auf den Schweregrad der Erkrankung

Um den Einfluss des Alters auf den Schweregrad der Osteoporose zu untersuchen, wurde das Patientenkollektiv in 2 Altersgruppen eingeteilt. Frauen, die zum Entnahmezeitpunkt 51 bis 60 Jahre alt waren, wurden der Altersgruppe 1 zugeordnet, während Frauen im Alter von 61 bis 70 Jahren der Altersgruppe 2 zugeordnet wurden. Die Vermessung der Knochenproben der verschiedenen Altersgruppen zeigte in den Messungen mit 50 MHz in mit zunehmendem Alter sinkenden Impedanzwerten einen vorhandenen Einfluss des Alters auf die knöchernen Mikroarchitektur, ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht belegen.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,277	1	,277	1,855	,174
Innerhalb der Gruppen	41,952	281	,149		
Gesamt	42,229	282			

Abbildung 32: Statistischer Vergleich der Messwerte aller Grade der Osteoporose verschiedener Altersgruppen bei 50 MHz.

Die Messungen mit 200 MHz zeigen eine Abnahme der gemessenen mittleren Impedanzen mit zunehmendem Schweregrad der Osteopathie und belegen einen statistisch signifikanten altersspezifischen Unterschied der gemessenen Impedanzwerte der verschiedenen Altersgruppen.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	2,506	1	2,506	14,676	,000
Innerhalb der Gruppen	32,272	189	,171		
Gesamt	34,778	190			

Abbildung 33: Statistischer Vergleich der Messwerte aller Grade der Osteoporose verschiedener Altersgruppen bei 200 MHz.

4 Diskussion

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, von der in Deutschland etwa 7,8 Millionen Menschen betroffen sind. In den westlichen Industrienationen sind aktuell ca. 75 Millionen Menschen erkrankt, nach Schätzungen der WHO wird diese Zahl bis zum Jahr 2020 aufgrund der längeren Lebensdauer und zunehmender Immobilität im Alter auf bis zu 200 Millionen ansteigen. Zu Recht hat die WHO die Osteoporose damit in die Liste der zehn wichtigsten Volkskrankheiten aufgenommen.

Die Osteoporose zeichnet sich durch eine Minderung der Knochensubstanz, eine Demineralisierung der Knochenmatrix und einen schleichenden Funktionsverlust aus. Die defizitäre Entwicklung betrifft jedoch nicht nur das knöcherne Skelett, sondern den gesamten Bewegungsapparat. So führen ein unterschiedliches Ausmaß an Muskelatrophie, mangelnde Koordination bei nachlassender kognitiver Leistungsfähigkeit oder auch schmerzbedingte Gelenkimmobilisation zu einer nennenswerten Beeinflussung der Sturzneigung und Sturzfolgen [74]. Durch erhöhte Frakturgefahr bei Unfällen und Mikrotraumen resultieren vermehrt Wirbelkörper-, Unterarm-, Schenkelhals- und Hüftfrakturen. Es treten weltweit jährlich etwa 2 Millionen Schenkelhalsfrakturen auf, im Jahr 2050 wird die erwartete Anzahl auf mehr als 6 Millionen geschätzt. Neben einem Verlust an Lebensqualität geht die Osteoporose mit immensen volkswirtschaftlichen Kosten einher. Im Jahr 2003 beliefen sich allein in Deutschland die direkten Kosten osteoporoseassoziiierter Therapie auf 5,4 Milliarden Euro [33]. Dabei belaufen sich die Behandlungskosten europaweit ähnlich von ca. 900 Euro pro Person bei distalen Radiusfrakturen bis zu 9900 Euro für komplizierte Hüftfrakturen [11]. Die USA verzeichneten im Zeitraum von 2001 bis 2005 etwa 2,39 Millionen auf Osteoporose zurückzuführende Knochenbrüche. Die dadurch verursachten Kosten für das nationale Versicherungssystem belaufen sich auf etwa 10 Milliarden Euro [38]. Bis zum Jahr 2025 wird dort ein Anstieg der jährlichen Kosten um 50% erwartet [10]. Allein diese Zahlen verdeutlichen, dass die Identifizierung einer Osteoporoseerkrankung und eine suffiziente Osteoporoselangzeittherapie sowohl unter medizinischen als auch ökonomischen Gesichtspunkten essentiell sind.

Zur Diagnostik der Osteoporose stehen verschiedene radiologische Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Am gebräuchlichsten ist die konventionelle Röntgenaufnahme in 2 Ebenen, die in der Regel am Anfang jeglicher Diagnostik steht. Dieses Verfahren erlaubt selbst fachfremden Untersuchern eine sofort verfügbare, kostengünstige, orientierende Untersuchung

des Skelettes. Sie besitzt jedoch nur eine geringe Sensitivität und Spezifität. Größter Nachteil des konventionellen Röntgens sind Projektionsphänomene bei unterschiedlichen Dicken des die Zielstruktur umgebenden Weichteilmantels. Eine Quantifizierung der Osteoporose ist mit konventionellen Röntgenuntersuchungen nicht möglich. Erst ab einem Mineralsalzverlust von ca. 30% zeigen sich Veränderungen der abgebildeten knöchernen Strukturen. Diese sind zumeist unspezifisch und können nur einen Hinweis zu weiter gehender Diagnostik geben. Eine verbesserte Aussagefähigkeit konventioneller Röntgenaufnahmen lässt sich mit dem Singh-Index erreichen, der mit relativ einfacher Ausstattung eine semiquantitative Beurteilung des Knochengerüsts zulässt. Bei diesem Index werden Spongiosaverlauf und -architektur am proximalen Femur als Beurteilungsparameter einer Osteopenie verwendet. Er ist jedoch stark von der subjektiven Erfahrung des Untersuchers abhängig und liefert ein nur schwer reproduzierbares Ergebnis. In Ländern, in denen moderne Meßmethoden zur Knochendichtemessung nicht verfügbar sind, findet der Singh-Index noch häufig Anwendung. Dieser wurde mehrfach mit unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich seines klinischen Nutzens bewertet. Verglichen mit Dual Energy X-Ray Absorptiometrie-Resultaten konstatieren Hauschild et al. den fraglichen Charakter des Singh-Index [32]. Ein zufriedenstellender Zusammenhang mit Ergebnissen digitaler Bildgebung konnte nicht aufgedeckt werden und betont den subjektiven Charakter der Untersuchung. Krischak et al. hingegen stellen enge Beziehungen beim Vergleich von Singh-Index und Dual Energy X-Ray Absorptiometrie-Resultaten dar. Es korrelieren in ihren Untersuchungen Elastizitätsmodul und Singh-Index, so dass dieses Verfahren trotz des subjektiven Charakters eine annähernde Abschätzung über die mechanischen Eigenschaften des Femur erlaubt [44]. Objektivere Ergebnisse sind mittels Single-Photon-Absorptiometrie, Dual-Photon-Absorptiometrie und Dual Energy X-Ray Absorptiometrie zu erwarten. Die weit verbreitete Dual Energy X-Ray Absorptiometrie bietet bei relativ geringer Strahlenbelastung in einer kurzen Messung ein reproduzierbares Ergebnis. In zahlreichen prospektiven Studien wurde gezeigt, dass die Knochendichtemessung mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometrie hinsichtlich des Frakturrisikos bei Osteoporose gut validiert ist und wesentlich zur quantitativen Abschätzung der individuellen Frakturgefährdung beiträgt. Dennoch sind auch hierbei die Untersuchungsergebnisse am aussagekräftigsten, wenn sie in Synopsis mit übrigen klinischen Parametern interpretiert werden [74]. Eine Einschränkung der Dual Energy X-Ray Absorptiometrie besteht in der fehlenden Differenzierung von trabekulären und kortikalen Strukturen. Bei Messungen am Schenkelhals ist die Sensitivität des Verfahrens wegen des umgebenden Weichteilmantels eingeschränkt. Aufgrund der niedrigen Strahlenbelastung eignet sich die Dual Energy X-Ray Absorptiometrie, die vorwiegend am Schenkelhals und

an der Lendenwirbelsäule vorgenommen wird, zu wiederholten Messungen in regelmäßigen Intervallen. Die quantitative Computertomographie ist momentan die sensitivste Methode zur Bestimmung der Knochenmineraldichte. In überlagerungsfreien Schnittbildern können ausgewählte Messregionen volumetrisch untersucht und über verschiedene Kalibrierungsstandards der Kalzium-Hydroxylapatit-Gehalt pro Volumeneinheit bestimmt werden. Die quantitative Computertomographie ist der Dual Energy X-Ray Absorptiometrie in der Erkennung osteoporotischer Veränderungen und der Einschätzung des Frakturrisikos überlegen. Diese Vorteile gehen jedoch mit höheren Kosten, vermehrtem Personal- und Materialaufwand sowie einer weitaus höheren Strahlenbelastung einher [21, 25].

Aus diesem Grund gewinnt der quantitative Ultraschall als preiswertes Verfahren, welches ohne ionisierende Strahlung auskommt, zunehmend an Bedeutung. Mit dieser Methode sind Aussagen über Trabekelstruktur und organischen Aufbau der Knochenmatrix möglich, die mit radiologischen Verfahren bisher nicht untersucht werden konnten. In verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls und der Trabekelarchitektur spongiösen Knochens beschrieben. Sowohl Schallgeschwindigkeit, Schallreflexion als auch Schallabschwächung stellen hilfreiche Parameter zur Charakterisierung trabekulären Knochens dar [66]. Sie erlauben eine Einschätzung des Frakturrisikos und bieten die Möglichkeit, in Zukunft die Strahlendosis durch konventionelle Röntgenuntersuchungen, CT oder Dual Energy X-Ray Absorptiometrie-Untersuchungen zu vermeiden [26]. Eine realistische Abschätzung des Frakturrisikos gelingt jedoch nur, wenn neben der Knochendichte auch anthropometrische und anamnestiche Risikofaktoren miterhoben werden. Ein wichtiger Parameter ist die Knochenumbaurate. Im gesunden Knochen kontrolliert ein fein balanciertes Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteocyten den ständigen Umbau des Gewebes. Osteoklasten resorbieren muldenförmige Oberflächendefekte der Knochensubstanz, die entstandenen Lücken werden durch einen unmineralisierten, durch Osteoblasten produzierten Osteoidsaum aufgefüllt. Im Laufe der Zeit kommt es zu einer Mineralisation des Osteoides und die Osteoblasten differenzieren sich zu Osteocyten, die zu keiner Zellteilung mehr befähigt sind. Während die Knochenresorption durch Osteoklasten in Tagen bis Wochen bewerkstelligt ist, dauert die vollständige Mineralisation des Osteoids zum vollständig mineralisierten Knochen mehrere Monate. Eine erhöhte Knochenumsatzrate geht folglich mit einem Nettoverlust an Knochenmasse einher [6]. Da Östrogen den Hauptproliferationsreiz für Osteoblasten darstellt, verschiebt sich bei der postmenopausalen Frau aufgrund des relativ abrupten Öströgendefizites das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Osteogenese zu Ungunsten der Syntheseleistung. Die

Anzahl von Resorptionslakunen, die nicht mit mineralisiertem Knochengewebe gefüllt werden, steigt und führt zum Nettoverlust von Knochensubstanz. Patientinnen mit niedrigem Knochenmineralgehalt und erhöhtem Knochenumsatz weisen daher ein wesentlich höheres Frakturrisiko auf als Frauen mit niedriger Knochendichte und normalem Knochenstoffwechsel [20, 74].

Alternde Männer hingegen erfahren diesen abrupten Hormonverlust nicht. Charakteristisch für die Knochenmikrostruktur des alten Mannes sind daher eher gleichmäßig ausgedünnte, rarefizierte trabekuläre Strukturen ohne punktuelle Knochenstrukturdefizite [42]. Zusätzlich verfügen Männer in jüngeren Jahren über dicker ausgebildete Knochentrabekel, was in Verbindung mit einer geringeren Ausdünnung zu einem vermindertem Frakturrisiko im Alter führt. Trotz eines biologisch geringeren Gesamtrisikos, eine osteoporotisch bedingte Fraktur zu erleiden, treten ca. 20 % aller Hüftfrakturen und ca. 30 % aller Wirbelkörperfrakturen bei Männern auf. Indikatoren für ein erhöhtes Frakturrisiko stellen sowohl die Verminderung des Knochenmineralsalzgehaltes als auch des trabekulären Volumens dar [45, 47, 48, 64].

Die akustische Mikroskopie ist eine Untersuchungsmethode, die es erlaubt, die akustische Impedanz am peripheren Skelett oder an Knochenbiopsien im nanomikroskopischen Bereich sowohl quantitativ als auch qualitativ zu bestimmen. Die Größe der akustischen Impedanz ist frequenzabhängig. Nach Rho [65] werden hochfrequente Ultraschallwellen stärker durch die Materialeigenschaften des untersuchten Gewebes beeinflusst als niederfrequente Schallwellen. Damit werden die niedrigeren Messwerte bei höheren Frequenzen erklärt. Niederfrequente Schallwellen wiederum unterliegen einer stärkeren Beugung an physiologischen Grenzen oder Mikrodefekten. Sie sind daher nur in begrenztem Maße zur Darstellung mechanischer Materialeigenschaften verwendbar. Diese Frequenzabhängigkeit konnte in unseren Messungen deutlich aufgezeigt werden. Während das arithmetische Mittel in den Messungen mit 50 MHz $Z_0 = 6,14 \pm 1,14$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei den Proben gesunder Knochen bis $Z_3 = 5,91 \pm 1,05$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei Proben von Knochen mit schwerer Osteoporose betrug, wiesen dieselben Proben in den Messungen mit 200 MHz arithmetische Mittelwerte von $Z_0 = 4,52 \pm 0,70$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei Proben ohne generalisierte Osteopathie bis $Z_3 = 4,06 \pm 0,68$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) für die Proben mit schwerer Osteoporose auf. Es zeigt sich deutlich eine Abnahme der gemessenen Impedanzwerte mit zunehmender Frequenz des Ultraschallwandlers. Raum et al. [61] stellen fest, dass unzureichende Ortsauflö-

sung bei 25 MHz-Messungen am kortikalen Femur die Beurteilung der anisotropen Materialeigenschaften einschränkt. Havers-Systeme werden bei dieser Frequenz nicht einzeln aufgelöst und von der umgebenden Knochenmatrix getrennt dargestellt. Erst ab einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz erhöht sich die Ortsauflösung derart, dass die einzelne Osteocytenhöhlen selektiv dargestellt und unabhängig von der umgebenden Matrix analysiert werden können. Zwischen Messungen bei 50 MHz und 100 MHz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Darstellbarkeit der einzelnen Lakunen. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie Messungen bei jeweils 50 MHz und 200 MHz durchgeführt. Erschwert werden die Messungen mit höherer Frequenz durch die limitierte Focustiefe, die eine sorgfältigere und aufwändigere Probenpräparation mit hoher Parallelität der Oberfläche erfordert.

Die vorliegenden Messungen wurden an Biopsien des Beckenkammes durchgeführt, die zur klinischen Routinediagnostik entnommen und zum Entnahmezeitpunkt in PMMA eingebettet wurden. Zimmerman et al. [94] konstatieren Einflüsse der Einbettung auf die Impedanz der histologischen Präparate. Daher wurden durch uns vergleichende Messungen an postmortal gewonnenen Knochenproben sowohl vor als auch nach Einbettung in PMMA durchgeführt. Nach Zimmerman et al. [94] verändern sich die mechanischen und akustischen Eigenschaften von in PMMA eingebetteten Geweben durch die Art der Probenpräparation. Durch Dehydrierung der Probe wird eine signifikante Erhöhung der akustischen Impedanz um ca. 5% im Vergleich zu nativ vermessenen Knochenproben bewirkt. Dies können wir auch in den hier durchgeführten Messungen bestätigen. Unsere in PMMA gebetteten Proben wiesen bei der Untersuchung mit 50 MHz eine um 3,7% höhere mittlere Impedanz auf als im nativen Zustand, während die Messung mit 200 MHz eine Erhöhung der mittleren Impedanz um 13,1% für das selektive Reflexionssignal des Knochens nach Einbettung in PMMA aufzeigte. Eine statistische Signifikanz besteht aufgrund des geringen Umfangs der Messreihe nicht. Es zeigt sich analog zu den Ergebnissen von Zimmerman et al. eine Verschiebung der Impedanzwerte hin zu insgesamt höheren Messwerten, die individuellen Unterschiede bleiben jedoch erhalten.

Mit der akustischen Rastermikroskopie können Materialeigenschaften einzelner Trabekel selektiv bestimmt und veränderte Materialeigenschaften quantitativ dargestellt werden. Hunt et al. [37] zeigen die anisotrope Verteilung der akustischen Impedanz an verschiedenen Stellen von Tibia und Femur auf. Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz wurden die höchsten Werte für den Elastizitätsmodul im antero-lateralen Bereich von Femur und im antero-medialen Bereich der Tibia gemessen. Als Ursache dafür sahen Hunt et al. die unter-

schiedliche Verteilung der Kräfte beim Gehen an. Ähnliche Ergebnisse zeigen unsere Messungen. Unsere Proben weisen geringfügige intraindividuelle Schwankungen der gemessenen Impedanzwerte bei Vermessung verschiedener an einer Person entnommener Biopsien auf. Zurückführen lässt sich dieser Effekt auf das Trajektorienmuster entlang der Zug- und Druckbelastungslinien im knöchernen Becken, ebenfalls bedingt durch die unterschiedliche Kraftverteilung beim Gehen. Im osteoporotisch veränderten Knochen stellten Li und Aspden [51] mit mechanischen Belastungsversuchen einen vornehmlichen Verlust an Knochenvolumen und einen Knochenumbau fest, während bezüglich Dichte und Steifheit der untersuchten Proben kaum Veränderungen festgestellt wurden. Das verminderte Volumen in Verbindung mit veränderter Kräfteverteilung auf die verbliebenen Knochenstrukturen mit höheren punktuellen Belastungen führt zur hohen Frakturgefahr, insbesondere bei postmenopausalen Frauen und immobilisierten Patienten. Zioupos et al. [95] stellten mit Belastungsversuchen an Knochenwürfeln des humanen Femur eine Abnahme der Elastizitätsmoduln mit steigendem Alter fest. In ihren Untersuchungen verringert sich der Elastizitätsmodul nach dem 35. Lebensjahr um 2,3% in jeweils 10 Jahren. Die mit zunehmendem Alter sinkenden elastischen Eigenschaften des untersuchten Knochenmaterials führen zu einer verminderten Elastizität, einer verminderten Biege- und Torsionsfestigkeit sowie einem vermehrten Auftreten von Mikrofrakturen. In unseren Messungen konnte sowohl der Knochenverlust im osteoporotisch veränderten Knochen als auch eine daraus resultierende Veränderung der elasto-mechanischen Eigenschaften festgestellt werden. Mit zunehmender Schwere der Osteoporose kommt es zu einer fortschreitenden Atrophie des untersuchten Knochenmaterials mit rarefizierten, ausgedünnten Trabekeln, geringerer Quervernetzung, also einem Knochensubstanzverlust, der eine Änderung der elasto-mechanischen Eigenschaften bewirkt. Die gemessenen Impedanzwerte verringern sich mit zunehmendem Schweregrad der Osteoporoseerkrankung. So sank das arithmetische Mittel bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz von $Z_0 = 6,14 \pm 1,14$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei den Proben gesunder Knochen auf $Z_3 = 5,91 \pm 1,05$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei Proben von Knochen mit schwerer Osteoporose. Bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz wiesen die Knochenproben ohne Osteopathie die höchsten Impedanzwerte von $Z_0 = 4,52 \pm 0,70$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf, während die Proben mit schwerer Osteoporose erneut die niedrigsten Werte von $Z_3 = 4,06 \pm 0,68$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) aufzeigten.

Des Weiteren stellen wir eine Abnahme der elastischen Eigenschaften mit zunehmendem Alter fest. In unseren Messungen sinkt die akustische Impedanz in den Messungen mit 50 MHz von $Z_A = 6,49 \pm 1,01$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Altersgruppe

von 51-60 Jahren auf $Z_B = 6,36 \pm 0,79$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Altersgruppe von 61-70 Jahren. Dies entspricht einem Prozentsatz von 2%. Die Messungen bei 200 MHz stützen die Aussagen von Zioupos ebenfalls. Hier ist mit zunehmendem Alter eine Verminderung der akustischen Impedanz von 5,9% zu verzeichnen. Diese sank von $Z_A = 4,53 \pm 0,51$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Altersgruppe von 51-60 Jahren auf $Z_B = 4,26 \pm 0,38$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Altersgruppe von 61-70 Jahren.

Mit Hilfe der akustischen Rastermikroskopie werden elasto-mechanische Eigenschaften von Knochenbiopsien zerstörungsfrei und jederzeit reproduzierbar vermessen. Einzelne Untersuchungsareale können gezielt aufgesucht und deren elasto-mechanische Eigenschaften selektiv bestimmt werden. Turner et al. [85] verglichen Nanoindentationsmessungen und akustische Rastermikroskopie bei 50 MHz. Kortikaler und trabekulärer Knochen vom menschlichen Femur wurden zuerst mit einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz vermessen und die selbe Probe danach mittels Nanoindentation untersucht. Beide Untersuchungsmethoden zeigen danach dasselbe Anisotropieverhältnis des Knochens, wobei sich das Nanoindenterverfahren als die sensitivere Untersuchungsmethode aufgrund der höheren Ortsauflösung erwies. Dabei ist zu beachten, dass die Auflösung in der akustischen Rastermikroskopie wie oben beschrieben eine Funktion der Frequenz des verwendeten Ultraschallwandlers ist. Turner et al. untersuchten die Proben bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz mit entsprechend begrenzter Ortsauflösung. Durch die Verwendung eines höherfrequenten Wandlers lässt sich die laterale Auflösung in der akustischen Mikroskopie derart steigern, dass einzelne lamelläre Strukturen dargestellt werden können. Damit erhält man eine im Gegensatz zur Nanoindentation strukturbezogene Abbildung der elastischen Eigenschaften auf nanostruktureller Ebene. Ebenso wie Turner et al. bewerten Zysset et al. [97] die akustische Rastermikroskopie als weniger präzise zur Quantifizierung der elasto-mechanischen Knocheneigenschaften, da die ermittelten Elastizitätsmodulen aus Nanoindenterverfahren eher mit Referenzwerten aus der Literatur korrelierten. Der Rückschluss von Massendichte und Schallausbreitungsgeschwindigkeit auf elastische Parameter einer Probe wird kritisch betrachtet, dennoch ziehen die Autoren Ultraschallmessungen [4, 62] zum Vergleich mit den eigenen Werten heran. In den Untersuchungen von Zysset et al. wurden mittels Nanoindentation an kortikaler und interstitieller Position der Femurdiaphyse sowie an kortikaler, interstitieller und lamellärer Position des Femurhalses Elastizitätsmoduln gemessen und eine große Heterogenität der Mikrostruktur des Knochens abhängig von Messlokalisation und von Patient beschrieben. Zysset et al. stellen fest, dass die mechanischen Eigenschaften

lamellären Knochens signifikant niedriger sind als die von kompaktem Knochen. Zugleich erkennen sie verminderte mechanische Eigenschaften der Knochenproben vom Femurhals im Vergleich zu denen des Femurschaftes. Dies korreliert mit unseren Messungen, die eine intra- und interindividuelle Anisotropie der elastischen Knocheneigenschaften, ebenfalls abhängig von Messlokalisation und vom Patienten, aber auch dem Grad der Osteoporoseerkrankung aufzeigen. Aussagen über die Knochenqualität von Osteoporosekranken treffen Zysset et al. jedoch nicht, da deren 8 Knochenspender anamnestisch weder Knochenbrüche noch Osteopathien jeglicher Art aufwiesen. Vorteile der akustischen Rastermikroskopie gegenüber dem Nanoindenterverfahren werden von Ziv et al. [96] beschrieben, die die Anisotropie der Mikrostruktur lamellären Knochens untersuchten. Durch die Erfassung der Eigenschaften einzelner Knochenlamellen mittels akustischer Rastermikroskopie werden die Eigenschaften des gesamten Lamellengefüges weitaus besser beschreiben als mittels Nanoindentation. Dabei müssten aufgrund der Inhomogenität der elastischen Eigenschaften einzelner Lamellen wiederholt Messungen durchgeführt und die Ergebnisse arithmetisch gemittelt werden, um für die untersuchten Proben repräsentative Werte zu erhalten. Bei der akustischen Rastermikroskopie werden die elasto-mechanischen Eigenschaften eines bestimmten Messfensters nach einmaliger Messung wiedergegeben. In diesem Messfenster können, wie in unseren Versuchreihen durchgeführt, mehrere Teilmessungen an separat ausgewählten Teilregionen zerstörungsfrei und jederzeit reproduzierbar durchgeführt werden. Dadurch können die Messwerte einfacher auf die Gesamtprobe bezogen werden.

Eine andere Methode zur Charakteristik der Knochenfeinstruktur nutzt die Gruppe um Klaushofer. Seit mehreren Jahren untersucht diese Beckenkammbiopsien von an Osteoporose erkrankten Frauen mittels Rückstreuetelektronen im Rasterelektronenmikroskop. Auch mit dieser Methode konnte über den Parameter Knochenmineralisationsdichte ein Verlust an biomechanischer Qualität bei unterschiedlichem Erkrankungsausmaß gezeigt werden [43, 71]. Darüber hinaus konnten Einflüsse verschiedener medikamentöser Behandlungen auf die Homogenität der Mineralisation beobachtet werden. So steigert eine antiresorptive Therapie die Homogenität der Knochenmineralisation [19, 72], während unter einer Parathormon-Therapie eine Zunahme der Heterogenität der Knochenmineralisation beobachtet wurde [54]. Die Untersuchungsergebnisse können jedoch aufgrund der Unterschiede in den Meßmethoden nur bedingt mit unseren eigenen Untersuchungsergebnissen verglichen werden. Mit Ultraschallmikroskopie werden elastische Eigenschaften der gemessenen Proben direkt abgebildet, während die Rasterelektronenmikroskopie ein Verfahren mit indirekter Messung der Strahlenabschwächung ist, welches über Oberflächenabbildung vorwiegend

Rückschlüsse auf die Verteilung verschiedener Materialien im Messfeld erlaubt, jedoch keine originären mechanischen Eigenschaften erfasst.

Insgesamt unterliegt der Knochenstoffwechsel erheblichen inter- und intraindividuellen Schwankungen, die es bisher nicht erlauben, aus der Messung eines einzelnen Parameters eine therapeutische Konsequenz zu ziehen. Essentiell ist eine Synopsis verschiedener Untersuchungen und klinischer Parameter unter Berücksichtigung der jeweiligen Vorteile und Nachteile. Die hier vorgelegten Daten sind nach jetzigem Kenntnisstand der erste systematische Vergleich zwischen histomorphologischen und mittels quantitativen Ultraschall erfassten akusto-mechanischen Eigenschaften an jeweils denselben Knochenproben in verschiedenen Stadien der Osteoporoseerkrankung. Sie sind nicht allumfassend, können jedoch die Grundlage für weiterführende Untersuchungen darstellen, die die Mikromechanik des Knochens näher betrachten und unser Verständnis für die Einflüsse von Krankheit und Alter auf die mechanische Integrität des Knochens verbessern. Langfristig wird der quantitative Ultraschall mehr Bedeutung in der klinischen Praxis erlangen und seinen Haupteinsatz als Ergänzung zu den bekannten Standarddiagnostiken finden.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Das Verfahren der akustischen Rastermikroskopie erlaubt die Bestimmung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe und ergänzt bekannte Methoden zur Untersuchung der Mikrostruktur von Geweben. Durch die Verwendung fokussierter Schallwellen gelingt eine visuelle Darstellung nativer Knochenbestandteile ohne vorherige histologische Präparataufarbeitung mittels spezieller Anfärbung. Die Ultraschallwelle interagiert mit den Knochenstrukturen und gibt durch die Reflexionen Auskunft über lokale Unterschiede elastischer Eigenschaften. Die von uns favorisierte Messgröße des Ultraschalls zur quantitativen Analyse von Knochen ist die akustische Impedanz, das Produkt aus der Massendichte (ρ) und der Schallausbreitungsgeschwindigkeit (v) im jeweiligen Medium. Für die akustische Rastermikroskopie ist eine planparallele und glatte Probenoberfläche nötig. Daher wurden die Knochenproben nach der Einbettung in PMMA mit dem rotierenden Nassschleifgerät in absteigender Körnung bearbeitet und unmittelbar vor der rastermikroskopischen Untersuchung mit Diamantpaste poliert. Die nativen Knochenproben wurden mittels Ultrafräse planparallel bearbeitet und nach der nativen Untersuchung ebenfalls in PMMA gebettet.

Insgesamt wurden an 100 Knochenproben 284 Messungen mit dem KSI SAM 100 (Arbeitsfrequenz 50 MHz) sowie 168 Messungen mit dem KSI SAM 2000 (Arbeitsfrequenz 200 MHz) durchgeführt. Weiterhin kamen die Knochenproben von 6 zufällig gewählten Autopsiepräparaten zur Untersuchung, die mit beiden Mikroskopen jeweils nativ und nach Einbettung in PMMA untersucht wurden. Mit farbcodierten Impedanzbildern wurde die zweidimensionale Verteilung der elasto-mechanischen Eigenschaften untersuchter Proben qualitativ und quantitativ dargestellt. Es erfolgte eine getrennte Auswertung der Impedanzen entsprechend der histopathologischen Einteilung der Knochenbiopsien in Proben ohne, mit leichter, mäßiger und schwerer Osteoporose. Aus den Messwerten von einer Knochenprobe wurde der Mittelwert gebildet und der statistischen Auswertung zu Grunde gelegt.

In unseren Untersuchungen konnte erstmals eine Abhängigkeit der akustischen Impedanz vom histopathologisch bestimmten Schweregrad der Osteoporose aufgezeigt werden. Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz sank das arithmetische Mittel von $Z_0 = 6,14 \pm 1,14$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei den Proben gesunder Knochen auf $Z_3 = 5,91 \pm 1,05$ Mrayl (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei Proben von Knochen mit schwerer Osteoporose.

Die Messungen mit einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz zeigen ein vergleichbares Ergebnis. Die höchsten Impedanzwerte von $Z_0 = 4,52 \pm 0,70 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden bei den Knochenproben ohne Osteopathie gemessen, während die Proben mit schwerer Osteoporose erneut die niedrigsten Werte von $Z_3 = 4,06 \pm 0,68 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) aufzeigten.

In der statistischen Untersuchung ließ sich nachweisen, dass der Grad der Osteoporoseerkrankung insgesamt einen statistisch signifikanten Einfluss auf die gemessenen Impedanzwerte hat. Bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz ergibt sich, dass die ermittelten mittleren Impedanzwerte der Proben mit starker Osteoporose signifikant von denen der gesunden Knochen abweichen. Bei Proben mit leichter und mäßiger Osteoporose zeigen sinkende Impedanzwerte einen tendenziellen Zusammenhang mit dem Osteoporosegrad auf, eine statistische Signifikanz lässt sich jedoch nicht beweisen.

Bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz unterscheiden sich die Proben mit mäßiger und schwerer Osteoporose signifikant von den Proben gesunder Knochen. Die Impedanzen der Biopsien mit leichter Osteoporose sind im Mittel geringer als die des Normalkollektives, der Unterschied war statistisch aber nicht signifikant. Ein Grund dafür kann in der Methodik der Einteilung in die verschiedenen Osteoporosestadien liegen. Die Knochenbiopsien wurden unter dem Auflichtmikroskop anhand subjektiver morphologischer Kriterien einem Osteoporosegrad zugeteilt. Bei diesem Verfahren kann es bei Grenzbefunden zwischen den einzelnen Gruppen zur Zuordnung in verschiedene Gruppen führen, da gerade Grenzwerte den subjektiven Befund des Untersuchers erschweren. Aus diesem Grunde nähern sich die Unterschiede dem Signifikanzniveau, je weiter die Osteoporoseerkrankung voranschreitet, also je stärker der Osteoporosegrad vom gesunden Knochen abweicht. Bei histopathologisch benachbarten Gruppen ist meist nur eine Tendenz erkennbar, die statistisch jedoch nicht signifikant ist.

Weiterhin wurde der Einfluss des Alters auf den Schweregrad der Osteopathie untersucht. Nach Zuordnung des Patientenkollektives zu 2 Altersgruppen konnte sowohl durch die Messungen mit 50 MHz als auch mit 200 MHz ein Absinken der mittleren Impedanzwerte mit zunehmendem Alter aufgezeigt werden. Damit bestätigen die Messungen die Ergebnisse von Ziopus et al. [95], die in ihrer Arbeit eine Abnahme der elastischen Eigenschaften menschlichen Knochens mit zunehmendem Lebensalter postulieren.

Die nativen Knochenproben wurden vermessen, um den Einfluss der Einbettung in PMMA auf die Messwerte zu veranschaulichen. Daher kamen Proben aus dem Sektionsgut zur Anwendung, bei denen keine Osteopathie bestand. Bei den Messungen mit einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz zeigte sich eine Erhöhung der gemessenen Impedanzwerte von $Z_n = 5,62 \pm 0,79 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf $Z_{ne} = 5,83 \pm 0,87 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Einbettung der Proben im PMMA. Bei der Arbeitsfrequenz von 200 MHz stiegen die Impedanzwerte von $Z_n = 4,52 \pm 0,62 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) im nativen Zustand auf $Z_{ne} = 4,82 \pm 0,57 \text{ Mrayl}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) eingebettet in PMMA. Dies korreliert mit den Aussagen von Zimmerman et al. [94], nach denen die Einbettung der Knochen in PMMA eine Erhöhung der Reflexionswerte von ca. 5% nach sich zieht. Weiterhin zeigte sich in allen Messreihen, dass die Untersuchung der einzelnen Probe mit 200 MHz Arbeitsfrequenz geringere Impedanzwerte aufwies als bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz. Dies unterstützt die Aussagen von Rho [65], nach denen höherfrequente Schallwellen mehr durch die Materialeigenschaften des untersuchten Gewebes beeinflusst werden, als Schallwellen niedriger Frequenz.

Die Inhomogenität des untersuchten Knochengewebes und dessen mechanische Anisotropie lassen sich mittels akustischer Rastermikroskopie anhand von Impedanzunterschieden der gewählten Knochenfenster beurteilen. Dabei zeigt sich mit zunehmendem histologischen Stadium einer Osteoporoseerkrankung neben dem quantitativen Verlust an Knochenmasse eine qualitative Minderung des Gewebes. Durch Quantifizierung der akustischen Impedanz wird aufgezeigt, dass die elasto-mechanischen Eigenschaften der verbliebenen Grundsubstanz im Vergleich zur Grundsubstanz eines Knochens ohne Osteopathie signifikant verändert sind. Die verminderte mechanische Belastbarkeit eines osteoporotischen veränderten Knochens resultiert nach unseren Ergebnissen nicht nur aus dem für die Erkrankung typischen Substanzverlust und der Schwächung der Knochenarchitektur, sondern auch aus veränderten elasto-mechanischen Eigenschaften der Knochengrundstruktur.

Die akustische Rastermikroskopie ist ein Verfahren, das es erlaubt, die Materialeigenschaften einzelner Knochen trabekel in mikroskopischer Auflösung zuverlässig darzustellen. Bisher existierten diesbezüglich kaum hinreichende Methoden, die Anisotropie des Knochens auf lamellärer Ebene zerstörungsfrei und reproduzierbar darzustellen und davon auf die Gesamtprobe zu schließen. Mit der akustischen Rastermikroskopie lassen sich einzelne Trabekel hinsichtlich Morphologie und mechanischer Qualität beschreiben sowie wiederholt und zerstörungsfrei untersuchen. Das zukünftige Potential der akustischen Rastermik-

roskopie liegt in der Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Mikroarchitektur, die eine Prognose von Frakturrisiken bei ossären Erkrankungen liefern könnte. Bei steigender Inzidenz der Osteoporose bietet die Rastermikroskopie geeignete Ansätze zur Beurteilung pathologischer Umbauprozesse am Knochen sowie der Klärung der veränderten Belastbarkeit des Skelettsystems bei verschiedenen Osteopathien.

Literaturverzeichnis

1. Abendschein W, Hyatt GW: Ultrasonics and selected physical properties of bone; Clin Orthop 69 (1970), 294-301
2. Adler CP: Knochenkrankheiten – Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts; 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998), S. 68-74
3. Allolio B, Lehmann R, Reinicke M: Densitometrie und Ultraschall in der osteologischen Diagnostik; Intensivkurs für klinische Endokrinologie 02 (1993), 192-198
4. Ashman RB, Corin JD, Turner CH: Elastic properties of cancellous bone measurement by an ultrasound technique; J Biomech 20 (1987), 319-386
5. Barkmann R, Heller M, Glüer CC: Methoden der in vivo-Ultraschallmesstechnik am Skelett: Grundlagen der technischen Realisierung; J Miner Stoffwechs 4 (1999), 22-27
6. Becker C: Pathophysiology and Clinical Manifestations of Osteoporosis; Clinical Cornerstone (2006), 19-27
7. Brandt J, Klemenz A, Raum K, Seidler S.: Scanning acoustic microscopy for micromerements of elastomechanical bone properties - comparison with nanoindentation results; Proceedings on International Acoustical Imaging Symposium, vol. 26 (2001), pp. 10
8. Bodi A: Bestimmung der mikromorphologischen und anisotropen elastischen Eigenschaften von kortikalen Knochenstanzproben mit Hilfe quantitativer akustischer Mikroskopie; Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003
9. Börner W, Grehn S, Moll E: Altersphysiologie und pathologische Veränderungen der Dichte und Dicke des Fingerknochens, Radiologische Messung mit einem I-125-Profilscanner an 223 Frauen; Fortschr Röntgenstr 116 (1972), 552-558
10. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A: Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States 2005-2025; J Bone Miner Res 22(3) (2007), 465-475
11. Bouee S, Lafuma A, Fagnani F, Meunier PJ, Reginster JY: Estimation of direct unit costs associated with non-vertebral osteoporotic fractures in five European countries; Rheumatol Int 26(12) (2006), 1063-1072
12. Cameron JR, Sorenson J: Measurement of bone mineral in vivo; an improve method; Science 142 (1963), 230-232
13. Currey JD: Physical characteristics affecting the tensile properties of compact bone; J Biomech 23 (1990), 837-844
14. Dunn F, Tanaka M, Ohtsuki S, Saijo Y: Ultrasonic tissue characterisation (1996)
15. Evans WD, Jones EA, Owen GM: Factors affecting the in vivo precision of broadband ultrasonic attenuation; Phys Med Biol 40 (1995), 137-151
16. Fassbender WJ, Stumpf UC: DVO guideline 2006. What changes have there been in the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis; Z Rheumatol 65 (5) (2006), 364-369
17. Felsenberg D, Gowin W: Knochendichtemessung mit Zwei-Spektren-Methoden; Radiologie 39, (1999), 186-193
18. Felsenberg D, Kalender W, Rügsegger P: Osteodensitometrische Untersuchungsverfahren: Osteologie 2 (1993), 123-138
19. Fratzl P, Roschger P, Fratzl-Zelman N, Paschalis EP, Phipps R, Klaushofer K: Evidence that treatment with risedronate in women with postmenopausal osteoporosis affects bone mineralization and bone volume; Calcif Tissue Int 81 (2) (2007), 73-80
20. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD: Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis; J Bone Miner Res 11 (3) (1996), 337-349

21. Glüer CC: The use of bone densitometry in clinical practice; *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 14 (2) (2000), 195-211
22. Glüer CC, Engelke K, Faulkner KG, Genant K: Aktueller Stand der Knochendensitometrie II, Methodik der quantitativen Computertomographie; *Z Med Phys* 3 (1993), 64-70
23. Glüer CC, Engelke K, Faulkner KG, Genant K: Aktueller Stand der Knochendensitometrie III, Vergleich der Standardverfahren; *Z Med Phys* 3 (1993) 116-123
24. Gotfredsen A, Podenphant J, Norgaard H: Accuracy of lumbar spine bone mineral content by dual photon absorptiometry; *J Nucl Med* 29 (1988), 248-254
25. Grampp S, Henk CB, Imhof H: Die klinische Anwendung der Densitometrie; *Radiologie* 39 (1999), 222-227
26. Grampp S, Henk C, Lu Y, Krestan C, Resch H, Kainberger F, Youssefzadeh S, Vorbeck F, Imhof H: Quantitative US of the calcaneus: cutoff levels for the distinction of healthy and osteoporotic individuals; *Radiology* (2001), 400-405
27. Grote HJ, Roessner A.: Pathomorphologie der Osteoporose. In: Weiske R, Lingg G, Glüer CC: *Osteoporose*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck (1998), S. 19-30
28. Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM, Sebert JL, Cormier C, Kotzki PO, Delmas PD, Pouilles JM, Breart H, Meunier PJ: Ultrasonographic heel measurement to predict hip fracture in elderly women, the EPIDOS prospective study; *Lancet* 348 (1996), 511-514
29. Hart D, et al.: Doses to patients from medical x-ray examinations in the UK - 1995 review; NRPB-R289, London, HMSO (1996)
30. Hasegawa K, Turner CH, Burr DB: Contribution of collagen and mineral to the elastic anisotropy of bone; *Calcif Tissue Int* 55 (1994), 381-386
31. 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
32. Hauschild O, Niemeyer P, Oberst M, Ghanem N, Baumann T, Südkamp NP: Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 92. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und 47. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie. Berlin, 02.-06.10.2006.
33. Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D: Epidemiology, treatment and cost of osteoporosis in Germany – The BoneEVA Study; *Osteoporosis Int* 18(1) (2006), 77-84
34. Havlik E: Diagnostic reference levels in nuclear medicine. In: *European Association of Nuclear Medicine Annual Congress*, Napoli (2001)
35. Hofmann T: Untersuchung von kortikalem Knochengewebe mit akustischer und Raman-Mikroskopie; Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2004
36. Huddleston AL: *Quantitative methods in bone densitometry*; Kluwer, Boston-Dodrecht-London (1988)
37. 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
38. The International Osteoporosis Foundation: *The Adherence Gap: Why Osteoporosis Patients Don't Continue With Treatment*; (2006)
39. Kalender WA: Die effektive Dosis bei Knochenmineralmessung mit Absorptiometrie und Computertomographie; *Fortschr Röntgenstr* 155 (1991), 149-154
40. Kann P, Piepkorn B: Stellenwert von Densitometrie und Ultraschall in der Osteoporosediagnostik. In: Braun B, Günther R, Schwerk WB: *Ultraschall diagnostik* -

- Lehrbuch und Atlas, 7. Auflage, 19. Erg.Lfg.; ecomed Verlag, Landsberg, München, Zürich (1998), S. 59-65
41. Keck E: Das Ergebnispapier der „Consensus Development Conference 1993 über Diagnose, Prophylaxe und Behandlung der Osteoporose“; *Osteologie* 2 (1993), 181-184
 42. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM, Metlon LJ: Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment; *J Bone Miner Res* (2006), 124-131
 43. Klaushofer K, Roschger P, Nader A, Glantschnig H, Varga F: Osteoporosis and metabolic bone diseases; clinical relationship; *Wien Med Wochenschr* 149 (1999), 463-471
 44. Krischak GD, Augat P, Wachter NJ, Kinzl L, Claes LE: Predictive value of bone density and Singh-Index for the in vitro mechanical properties of cancellous bone in the femoral head; *Clin Biomech* (1999), 346-351
 45. Kudlacek S, Schneider B, Resch H, Freudenthaler O, Willvonseder R: Gender differences in fracture risk and bone mineral density; *Maturitas* 36 (3) (2000), 173-180
 46. Langton CM, Palmer SB, Porter RW: The measurement of broadband ultrasound attenuation in calcaneus bone; *Eng Med* 13 (1984), 89-91
 47. Legrand E, Audran M, Gengenbuhl P, Lévassieur R, Chalès G, Baslé MF, Chappard D: Trabecular bone microarchitecture is related to the number of risk factors and etiology in osteoporotic men; *Microsc Res Tech* 70 (11) (2007), 952-959
 48. Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Baslé MF, Audran M: Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density and vertebral fractures in male osteoporosis; *J Bone Miner Res* 16 (7) (2001), 1374-1375
 49. Lemons RA, Quate CF: Acoustic Microscope – scanning Version; *Appl Phys Lett* 24 (1974), 163-165
 50. Lewis MK, Blake GM, Fogelman I: Patient dose in dual x-ray absorptiometry; *Osteoporosis Int* (1994), 11-15
 51. Li B, Aspden RM: Material properties of bone from the femoral neck and calcaneus of patients with osteoporosis or osteoarthritis; *Osteoporosis Int* 7 (1997), 450-456
 52. McDonald F, Ford TRP: The effect of blood flow on the material properties of bone; *Ann Biomed Engineer* 22 (1994), 194-201
 53. Meissner J: Über radiologische Verfahren zur Bestimmung des Mineralsalzgehaltes im Knochen; *Radiologie* 9 (1969), 90-99
 54. Misof BM, Roschger P, Cosman F, Kurland ES, Tesch W, Messmer P, Dempster DW, Nieves J, Shane E, Fratzl P, Klaushofer K, Bilezikian J, Lindsay R: Effects of intermittent parathyroid hormone administration on bone mineralization density in iliac crest biopsies from patients with osteoporosis: a paired study before and after treatment; *J Endocrinol Metab* 88 (3) (2003), 1150-1156
 55. Njeh CF: The dependence of ultrasound velocity and attenuation on the material properties of cancellous bone; PhD thesis, Sheffield Hallam University, UK 1995
 56. Njeh CF, Boivin CM, Langton CM: The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis: a review; *Osteoporosis Int* 17 (1997), 7-22
 57. Nylen MU, Scott DB, Nosley VM: In *Calcification in Biological Systems*, ed. RF, Sognnaes, 129-142, Washington DC, Am. Assoc. Adv. Sci. (1960)
 58. Raisz LG: Prostaglandins and other local factors regulating bone metabolism. In: Sen A, Thornhill T: *Development and diseases of cartilage and bone matrix*, New York (1987)

59. Raum K: Quantitative akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002
60. 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
61. Raum K, Reißhauer J, Brandt J: Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy; *J Biomed Mater Res* 71 (2004), 430-438
62. Reilly DT, Burnstein AH, Martens M: Aging of bone tissue: mechanical properties; *J Biomech* 12 (1979), 459-469
63. Reisinger W, Kirschner S: Indikation und Wertigkeit der radiologischen Verfahren bei der Osteoporosediagnostik; *Z Ärztl Fortb* 88 (1998), 873-880
64. Resch A, Schneider B, Bernecker P, Battmann A, Wergedal J, Willvonseder R, Resch H: Risk of vertebral fractures in men: relationship to mineral density of the vertebral body; *AJR Am J Roentgenol* 164 (6) (1995), 1447-1450
65. Rho JY: An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone; *Ultrasonics* 34 (1996), 777-783
66. Riekkinen O, Hakulinen MA, Lammi MJ, Jurvelin JS, Kallioniemi A, Töyras J: Acoustic properties of trabecular bone-relationships to tissue composition; *Ultrasound Med Biol* (2007), 1438-1444
67. Ringe JD: Crush fractures and bone pain. In: Peck WA: Trends and perspectives in diagnosis and management of osteoporosis; Parthenon Publishing, Casteron Hall, New Jersey (1989), S. 41-50
68. Ringe JD: Klinik und Diagnose. In: Ringe JD: Osteoporose: Pathogenese, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten; de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1991), S. 109-235
69. Ringe JD: Epidemiologie der Osteoporose. In: Schild HH, Heller M: Osteoporose; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992), S. 20-24
70. Romeis B: Einbettung in Methacrylat. In: Böck P: Mikroskopische Technik; 17. Neubearb. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (1989), S. 145-147
71. Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K: Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies; *Bone* 24 (6) (1999), 619-621
72. Roschger P, Rinnerthaler S, Yates J, Rodan GA, Fratzl P, Klaushofer K: Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women; *Bone* 29 (2) (2001), 185-191
73. Rüeeggsegger P, Durand E, Dambacher MA: Localization of regional forearm loss from high resolution computed tomographic images; *Osteoporosis Int* 1 (1991), 76-80
74. Seibel MJ: Evaluation des osteoporotischen Frakturrisikos; *Deutsches Ärzteblatt* (2001), A-1681, B-1443, C1337
75. Schild HH, Heller M: Osteoporose, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1992), S. 27-51
76. Schulz A: Morphologische Grundlagen generalisierter Osteopathien; *Akt Endokr Stoffw* 6 (1985)
77. Shieh SJ, Zimmerman MC, Langrana NA: The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodelling study; *J Biomech Eng* 117 (1995), 286-292

78. Smitmans LF: Zur Bestimmung akusto-elastischer Eigenschaften von humanem, kortikalem Knochengewebe mit der akustischen Rastermikroskopie; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002)
79. Sorenson JA, Duke PR, Smith SW: Simulation studies of dual-energy x-ray absorptiometry; *Z Med Phys* 16 (1989), 75-80
80. Stein M: Scanning acoustic microscope: Programmierung eines akustischen Rastermikroskops zur quantitativen, zeitaufgelösten Akquisition, Visualisierung und Analyse von hochfrequenten Puls-Echo-Daten; Diplomarbeit, FH Merseburg, 2000
81. Su XW, Feng QL, Cui FZ, Zhu XD: Microstructure and micromechanical properties of the mid-diaphyses of human fetal femurs; *Conn Tissue Res* 36 (1997), 271-286
82. Takano Y, Turner CH, Owan I, Martin RB, Lau ST, Forwood MR, Burr DB: Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependant on the mechanical strain distribution; *J Orthop Res* 17 (1999), 59-66
83. Traub W, Arad T, Weiner S: Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibres; *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989), 9822-9826
84. Turner CH, Chandran A, Piparti RM: The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications; *Bone* 17 (1995), 85-89
85. Turner CH, Rho J, Takano Y, Tsui TY, Pharr GM: The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques; *J Biomech* 32 (1999), 437-441
86. Vogel H: Strahlendosis und Strahlenrisiko in der bildgebenden Diagnostik; Ecomed, Landsberg (1989)
87. Wagner HD, Weiner S: On the relationship between the microstructure of bone and its mechanical stiffness; *J Biomech* 25 (1992), 1311-1320
88. 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
89. Weiner S, Wagner HD: The material bone: structure-mechanical function relations; *Annu Rev Mater Sci* 28 (1998), 271-298
90. Wendt B, Cornelius A, Otto R: Osteoporosediagnostik mit Ultraschalldensitometrie am Kalkaneus; *Radiologie* 36 (1996), 58-63
91. World Healing Organisation: Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis; WHO Technical Report Series 843, Genf (1994)
92. Wüster C, Pereira-Lima J, Beck C, Götz M, Paetzold W, Brandt K, Scheidt-Nave C, Ziegler R: Quantitative Ultraschall-Densitometrie (QUS) zur Osteoporose-Risiko-Beurteilung: Referenzdaten für verschiedene Messstellen - Grenzen und Einsatzmöglichkeiten; *Der Frauenarzt* 36 (1995), 1304-1314
93. Zimmerman MC, Meunier A, Katz JL, Christel P: The evaluation of cortical bone remodelling with a new ultrasonic technique; *IEEE Trans Biomed Eng* 37 (1990), 433-441
94. Zimmerman MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H: The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy; *J Biomed Mater Res* 28 (1994), 931-938
95. Zioupos P, Currey JD: Changes in the stiffness, strength and toughness of human cortical bone with age; *Bone* 22 (1998), 57-66
96. Ziv V, Wagner HD, Weiner S: Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone; *Bone* 18 (1996), 417-428
97. 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; *J Biomech* 32 (1999), 1005-1012

6 Thesen

1. Mit Hilfe der akustischen Rastermikroskopie lässt sich über hochfrequente reflektierte Schallwellen die räumliche Verteilung der akustischen Impedanz von Knochenproben spongiösen Knochens darstellen. Damit können die akusto-elastischen Materialeigenschaften der untersuchten Probe quantifiziert werden.
2. Die mikroskopische Darstellung der Grundsubstanz des Knochens erfolgt im Gegensatz zur Lichtmikroskopie ohne die Anwendung von Färbetechniken.
3. Die akustische Rastermikroskopie zeigt die anisotrope Verteilung der elastischen Eigenschaften einer Knochenprobe. Dabei ist es erstmals möglich, die mechanischen Eigenschaften einzelner Knochen trabekel selektiv zu bestimmen.
4. Mit Hilfe der Schichtbildanalyse (Multi-Layer-Analysis) wird garantiert, dass jeder Punkt der Probe im Fokus des Wandlers vermessen und damit ein topographiekorrigiertes Maximalbild der Probe generiert wird.
5. Durch die Einbettung der nativen Knochenproben in PMMA kommt es zu einer mäßigen Erhöhung der akustischen Impedanz der Präparate.
6. Bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz waren die ermittelten Impedanzen geringer als bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz. Die kleineren Messwerte sind auf die höhere Schallfrequenz zurückzuführen.
7. Ein Impedanzvergleich der in PMMA eingebetteten Knochenpräparate verschiedener Osteoporosegrade zeigt bei einer Arbeitsfrequenz von 50 MHz abnehmende Impedanzwerte der verbliebenen spongiösen Knochengrundstruktur mit zunehmendem Grad der Osteoporoseerkrankung.
8. Ein Impedanzvergleich der in PMMA eingebetteten Knochenpräparate verschiedener Osteoporosegrade zeigt bei einer Arbeitsfrequenz von 200 MHz abnehmende Impedanzwerte der verbliebenen spongiösen Knochengrundstruktur mit zunehmendem Grad der Osteoporoseerkrankung.
9. Die Osteoporose ist eine metabolische Osteopathie, die durch Veränderungen der Mikroarchitektur und einem Knochensubstanzverlust zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt.
10. Der QUS kann als strahlungsfreies Verfahren zur Beurteilung der Knochen Materialeigenschaften dienen und mit Verlaufs- und Kontrolluntersuchungen den Krankheitsverlauf dokumentieren.

Curriculum Vitae

Name: Andreas Franke
Geburtsdatum: 19.06.1979
Geburtsort: Merseburg
Staatsangehörigkeit: BRD
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1986-08/1991 Wilhelm-Pieck-Oberschule Braunsbedra
09/1991-07/1998 Geiseltalgymnasium Mücheln, Abitur

Wehrdienst

09/1998-12/1998 allgemeiner Grundwehrdienst
01/1999 Übernahme in das Dienstverhältnis eines Soldaten auf Zeit

Hochschulbildung

10/1999-12/2005 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang Humanmedizin

Famulaturen

03/2002-04/2002 Abteilung I für Innere Medizin
Bundeswehrkrankenhaus Leipzig
09/2002-10/2002 Abteilung II für Chirurgie/Handchirurgie Bundeswehrkrankenhaus
Berlin

02/2003-03/2003	Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/2003-08/2003	Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr

10/2004-01/2005	Klinik I für Innere Medizin Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg
01/2005-05/2005	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg
05/2005-09/2005	Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

berufliche Weiterbildung

12/2005-09/2006	Assistenzarzt Bundeswehrkrankenhaus Leipzig, FU 8 / Radiologie
10/2006-12/2007	Assistenzarzt Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Abt. 8 / Radiologie
seit 01/2008	Truppenarzt Kyffhäuser-Kaserne Bad Frankenhausen

Braunsbedra, 14.07.2008

Andreas Franke

Selbständigkeitserklärung

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

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Braunsbedra, 14.07.2008

Andreas Franke

Folgende Veröffentlichung ist auf der Basis dieser Arbeit erstellt worden:

Brandt J, Franke A, Raum K: Acoustic Microscopy for Detection of Osteoporotic Bone Properties; Proc. IEEE Ultrason. Symp. 2004

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Hein, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, möchte ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen an seiner Klinik danken. Mein außerordentlicher Dank gilt dem Ideengeber und Mentor dieser Arbeit Herrn Dr. med. J. Brandt für dessen engagierte Mitwirkung an den wissenschaftlichen Untersuchungen sowie die vielen hilfreichen fachlichen Hinweise bei der Entstehung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. K. Raum, Herrn Dipl.-Ing. A. Bodi sowie Herrn Dipl.-Ing. T. Hofmann für die kompetente und geduldige Unterstützung auf dem Gebiet der Ultraschallmikroskopie.

Dank gebührt den Mitarbeiterinnen des Labors der Orthopädischen Klinik Frau Vetter, Frau Rosemeier und Frau Schneider für deren Sorgfalt bei der Erstellung und Bearbeitung der eingebetteten Knochenproben.

Abschließend möchte ich ganz besonderen Dank meinen Eltern gegenüber zum Ausdruck bringen, die mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mir stets Hoffnung und Rückhalt gegeben haben.