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

**Multimodale mikroelastische Untersuchungen
von kortikalem Knochen**

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat., rer. medic. habil.

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. rer. nat. Kay Raum
geboren am 01.03.1972 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Georg Schmitz (Bochum)
2. Prof. Dr. Michael Amling (Hamburg)
3. Prof. Dr. Philippe Zysset (Wien)

Verteidigung am 17.03.2009 in Halle (Saale)

REFERAT

Knochen besteht aus einem hierarchisch aufgebauten, heterogenen Gewebe, dessen Eigenschaften sich kontinuierlich verändern. Der hierarchische Aufbau und die hohe Ordnungsstruktur verursachen anisotrope (richtungsabhängige) elastische Eigenschaften, die in jeder Organisationsebene unterschiedlich sein können. Pathologien, z.B. Osteoporose führen zum Verlust mechanisch-funktioneller Eigenschaften bis hin zum Organversagen. Eine individuelle Erhöhung des Frakturrisikos wird nicht nur durch einen Verlust von Knochenmasse, sondern auch durch eine Vielzahl von kompositionellen und ultrastrukturellen Veränderungen der mineralisierten Knochenmatrix verursacht, welche durch die klinisch etablierte Knochenmineraldichtemessung nicht erfasst werden. Ultraschall erlaubt die Untersuchung funktionaler elastischer Eigenschaften von Knochengewebe. Quantitative Ultraschallmethoden haben sich als viel versprechende Alternativen zur radiologischen Erfassung der Knochenfragilität und der Osteoporosediagnostik etabliert. Zur Validierung dieser Methoden ist jedoch eine präzise Beschreibung struktureller und elastischer Eigenschaften auf der Gewebeebene notwendig.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Methoden, mit denen die heterogenen und anisotropen Struktur- und Materialeigenschaften von kortikalem Knochen hochaufgelöst quantifiziert werden können. Ultraschallmethoden mit Frequenzen von 25 MHz - 1 GHz stellten im Rahmen der Untersuchungen einen Schwerpunkt dar, da sie sich durch Variation von Frequenz und Schallfeldgeometrie optimal an die hierarchischen Strukturebenen anpassen lassen. Hochauflösende quantitative akustische Impedanzverteilungsmessungen wurden für die Ableitung elastischer Parameter der Knochenmeso- und -mikrostruktur entwickelt. Der Einfluss der Gewebemineralisierung auf elastische Parameter wurde durch Kombination akustischer Messungen mit Ramanspektroskopie und Synchrotron-Mikrocomputertomographie untersucht und es wurden Modelle entwickelt, welche die Beziehungen zwischen Gewebemineralisierung, Massendichte, akustischer Impedanz, Schallgeschwindigkeit und anisotropen elastischen Parametern beschreiben.

Das Potential der kombinierten Erfassung von Struktur- und Elastizitätsparametern wurde in mehreren Studien gezeigt, z.B. zur Untersuchung des Einflusses frakturrelevanter Struktur- und elastischer Parameter auf die mit *in-vivo* Systemen ableitbare Ultraschallausbreitungsgeschwindigkeit am Radius, zur Untersuchung des Einflusses von Struktur- und Elastizitätsmerkmalen auf die Frakturresistenz an einem Kallusdistraktionsmodell und zur elastischen Phänotypisierung des kortikalen Knochens am Kleintiermodell. Darüber hinaus wurde durch die Kombination der experimentellen mikroelastischen Daten mit Finite-Elemente-Modellen die Basis für realitätsnahe numerische mikromechanische Deformationsanalysen geschaffen.

INHALTSVERZEICHNIS

Symbole	I
1 Einleitung	1
1.1 BEDEUTUNG MIKROELASTISCHER EIGENSCHAFTEN FÜR DIE MUSKULOSKELETTALE FORSCHUNG	1
1.2 BIOMECHANISCHE MODELLIERUNG VON KORTIKALEM KNOCHEN	2
1.3 MESSUNG VON ELASTISCHEN PARAMETERN MIT ULTRASCHALL	4
1.4 QUANTITATIVER IN-VIVO ULTRASCHALL (QUS)	5
1.5 NUMERISCHE METHODEN	5
1.6 ZIELSTELLUNGEN	5
2 Untersuchungsmethoden	7
2.1 QUANTITATIVE AKUSTISCHE MIKROSKOPIE	7
2.2 BIDIREKTIONALE AXIALE ULTRASCHALLTRANSMISSION	11
2.3 SYNCHROTRON RADIATION μCOMPUTER TOMOGRAPHIE (SR-μCT)	13
2.4 2D - RAMAN SPEKTROSKOPIE	14
2.5 NANOINDENTATION	15
2.6 NUMERISCHE DEFORMATIONSANALYSEN MIT SAM-EINGANGSDATEN	16
3 Originalarbeiten	18
3.1 MULTI LAYER ANALYSIS - QUANTITATIVE SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY FOR TISSUE CHARACTERIZATION AT A MICROSCOPIC SCALE.	18
3.2 FREQUENCY AND RESOLUTION DEPENDENCE OF THE ANISOTROPIC IMPEDANCE ESTIMATION IN CORTICAL BONE USING TIME-RESOLVED SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY.	18
3.3 BONE MICROSTRUCTURE AND ELASTIC TISSUE PROPERTIES ARE REFLECTED IN QUS AXIAL TRANSMISSION MEASUREMENTS.	18
3.4 SPATIAL DISTRIBUTION OF ANISOTROPIC ACOUSTIC IMPEDANCE ASSESSED BY TIME-RESOLVED 50-MHZ SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY AND ITS RELATION TO POROSITY IN HUMAN CORTICAL BONE.	18
3.5 SITE-MATCHED ASSESSMENT OF STRUCTURAL AND TISSUE PROPERTIES OF CORTICAL BONE USING SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY AND SYNCHROTRON RADIATION μCT.	18
3.6 DERIVATION OF ELASTIC STIFFNESS FROM SITE-MATCHED MINERAL DENSITY AND ACOUSTIC IMPEDANCE MAPS.	18
3.7 ASSESSMENT OF MICROSTRUCTURE AND ANISOTROPIC TISSUE ELASTICITY OF CORTICAL BONE FROM HIGH RESOLUTION ANGULAR ACOUSTIC MEASUREMENTS.	18
3.8 ASSESSMENT OF COMPOSITION AND ANISOTROPIC ELASTIC PROPERTIES OF SECONDARY OSTEON LAMELLAE.	19

3.9 PREDICTION OF BIOMECHANICAL STABILITY AFTER CALLUS DISTRACTION BY HIGH RESOLUTION SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY.	19
3.10 ASSESSMENT OF BONE STRUCTURE AND ELASTICITY IN B6/C3H MICE USING HIGH RESOLUTION SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY.	19
3.11 VARIATIONS OF MICROSTRUCTURE, MINERAL DENSITY AND TISSUE ELASTICITY IN B6/C3H MICE.	19
3.12 DERIVATION OF THE MESOSCOPIC ELASTICITY TENSOR OF CORTICAL BONE FROM QUANTITATIVE IMPEDANCE IMAGES AT THE MICRON SCALE.	19
3.13 MICROELASTIC IMAGING OF BONE.	19
4 Diskussion	20
4.1 ABLEITUNG VON STRUKTUR UND GEWEBEELASTIZITÄT DER MAKRO-, MESO- UND MIKROSTRUKTUR MIT HILFE AKUSTISCHER MIKROSKOPIE	20
4.2 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEWEBEMINERALISIERUNG UND ELASTIZITÄT	21
4.2.1 MIKROSKOPISCHE (LAMELLÄRE) EBENE	21
4.2.2 MESOSKOPISCHE (GEWEBE-) EBENE	22
4.3 EINFLUSS FRAKTURRELEVANTER KNOCHENEIGENSCHAFTEN AUF DIE AXIALE ULTRASCHALLTRANSMISSION	24
4.4 EINFLUSS VON STRUKTUR UND GEWEBEELASTIZITÄT AUF DIE FRAKTURRESISTENZ NACH KALLUSDISTRAKTION	25
4.5 ELASTISCHE KNOCHENPHÄNOTYPISIERUNG	26
5 Zusammenfassung	27
6 Ausblick	29
7 Literaturverzeichnis	30
Thesen	37
Curriculum Vitae	39
Eidesstattliche Erklärung	41
Danksagung	42

SYMBOLE

a	Wandler- oder Teilchenradius [m]
c_{ij}	Koeffizienten der Elastizitätsmatrix [Pa] = [kg/m ²]
BMD	Bone Mineral Density (Knochenmineraldichte) [g/cm ²]
c_{ij}, C_{ijkl}	Koeffizienten des Elastizitätstensors in abgekürzter und vollständiger Notation [Pa] = [kg/m ²]
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CT	Computertomographie
$Ct.Wi$	Cortical Width (Kortikalisdicke) [m]
DEXA	Dual Energy X-ray Attenuation (Zwei-Energie Röntgenschwächung)
$[C]$	Elastizitätstensor in abgekürzter Notation [GPa]
CCD	Charge-Coupled Devive (elektronischer Lichtsensor)
d	Probendicke [m]
dpi	dots per inch (Punkte pro Inch)
$D_{lateral}$	Laterales Auflösungsvermögen [m]
DMB	Degree of Mineralization of Bone (Gewebemineralisierung) [g/cm ³]
E	Elastizitäts-, oder Young-Modul [Pa] = [kg/m ²]
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
f	relativer Volumenanteil
FAS	First Arriving Signal (schnellstes Ultraschallsignal bei der axialen Transmissionsmethode)
FE	Finite Elemente
IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
NIH	National Institutes of Health
MLA	Multi Layer Analysis Methode: Aufnahme und Auswertung einer Sequenz von C-Scan-Bildern mit variablem Wandler-Proben-Abstand
PDLLA	Poly(D,L)-Laktid Membran
QUS	Quantitative UltraSound (Quantitativer Ultraschall) am Knochen
Q-BAM	Quantitative B-Bildsonographie und Akustische Mikroskopie
R^2	Korrelationskoeffizient
ROC	Radius of Curvature (Wandlerkrümmungsradius) [m]
SAM	Scanning Acoustic Microscopy (Akustische Rastermikroskopie)
S_0	Plattenschwingungsmodus der so genannten symmetrischen Lambwelle
SOS	Speed of Sound (Schallgeschwindigkeit) [m/s]
SR- μ CT	Synchrotron Radiation Micro Computed Tomography (μ CT unter Verwendung von monochromatischer Synchrotronstrahlung)

Symbole

TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
<i>TOF</i>	Time of Flight (Puls-Echo-Laufzeit) [s]
UMR	Université Pierre et Marie Curie
<i>V(z)</i>	Echoamplitude in Abhängigkeit vom Wandler-Proben-Abstand [V]
WHO	World Health Organization
<i>x,y,z</i>	kartesische Koordinaten [m]
<i>Z</i>	Akustische Impedanz [rayl] = [kgm ⁻² s ⁻¹]
σ_{ij}	mechanischer Spannungstensor [Pa] = [kg/m ²]
ε_{ij}	Dehnungstensor
λ	Wellenlänge [m]
ρ	Massendichte [kg/m ³]
ν	Querkontraktions- oder Poissonzahl

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung mikroelastischer Eigenschaften für die muskuloskeletale Forschung

Knochen besteht aus einem hierarchisch aufgebauten, heterogenen und elastisch anisotropen Gewebe. Seine mechanischen Eigenschaften verändern sich mit dem Lebensalter, durch mechanische Beanspruchung bzw. Entlastung und insbesondere als Folge von Osteopathien [1] oder während der Knochenheilung. Für die *in-vitro* Untersuchung mechanischer Eigenschaften stehen verschiedene standardisierte makroskopische Testmethoden zur Verfügung (mechanische Kompressions- und Biegetests, Ultraschalltransmission). Die gemessenen makroskopischen Eigenschaften werden durch eine Vielzahl von Faktoren, z.B. Porosität, Gewebekomposition, Orientierung von Kollagenfasern und Mineralkristallen und der Kollagenvernetzung beeinflusst. Osteopathien, z.B. Osteoporose, führen zum Verlust mechanisch-funktioneller Eigenschaften bis hin zum Organversagen (Fraktur). Klinisch wurde von der WHO Osteoporose durch eine Reduktion der Knochenmineraldichte (*BMD*) relativ zu einer jungen oder gleichaltrigen Vergleichspopulation definiert. Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass *BMD* nur eine moderate Aussagekraft für ein individuelles Frakturrisiko hat [2]. Besonders deutlich zeigt sich das Problem der *BMD*-basierten Diagnose daran, dass die durch eine erfolgreiche Therapie erzielte Reduzierung des Frakturrisikos nur zu 4 – 40 % in einer *BMD*-Veränderung reflektiert wird [3]. Vom NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis wurde daher 2001 eine klinisch relevantere Definition erarbeitet: “Osteoporose ist definiert als eine skeletale Störung, die durch eine reduzierte Knochenfestigkeit charakterisiert ist und zu einem erhöhtem Frakturrisiko führt“ [1]. Diese etwas vage Formulierung trägt der Erkenntnis Rechnung, dass ein erhöhtes Frakturrisiko nicht nur durch einen Verlust von Knochenmasse, sondern auch durch eine Vielzahl von kompositionellen und ultrastrukturellen Veränderungen der mineralisierten Knochenmatrix verursacht werden, welche durch die *BMD*-Messung nicht erfasst werden.

Mit der Entwicklung genetisch modifizierter Kleintiermodelle haben sich auch in der muskuloskelettalen Forschung neue Perspektiven erschlossen, um systematische Untersuchungen von Knochenentwicklung, Osteopathien und therapeutischen Ansätzen durchzuführen. Insbesondere Inzuchtmausstämme haben sich als relevantes Tiermodell etabliert. Jüngere Studien haben gezeigt, dass sowohl die Knochenstruktur als auch die Knochenfestigkeit durch eine limitierte Anzahl von Genen reguliert wird [4-10]. Diese aus Studien genetisch modifizierter Mäuse abgeleitete Hypothese wird durch Untersuchungen an humanen Zwillingen unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass 70% der Variabilität der maximalen Knochenmasse genetisch bestimmt ist [11-14]. Konventionelle biomechanische Methoden stoßen aufgrund der Größenverhältnisse und der variablen Geometrie verschiedener Inzuchtstämme an ihre Grenzen. Beim 3-Punkt Biegetest zum Beispiel, nach wie vor als “Gold-Standard” zur Bestimmung der Knochenelastizität im langen Röhrenknochen angesehen, geht die zur Ableitung des Elastizitätsmoduls verwendete

Euler-Bernoulli Theorie von einer einfachen und bekannten (z.B. zylindrischen) Geometrie aus. Mausstämme weisen jedoch teilweise erhebliche Variationen der Knochengeometrie auf. Lente *et al.* [15] haben gezeigt, dass dadurch der ermittelte Elastizitätsmodul stark von der Knochengeometrie abhängt. Ohne Kompensation dieser Einflussgrößen ist eine absolute Bestimmung des Elastizitätsmoduls mit diesem Verfahren, insbesondere für den Vergleich verschiedener Genotypen, ungeeignet.

Eine besondere Herausforderung stellt die biomechanische Beschreibung der Frakturheilung dar. Eine präzise Abschätzung der mechanischen Belastbarkeit des nach einer Fraktur gebildeten Kallus erfordert ein komplexes Verständnis struktureller und elastischer Eigenschaften des neu gebildeten Gewebes und des frakturierten Knochens. Ein wesentliches Forschungsziel auf dem Gebiet der Frakturheilung besteht darin, die biomechanischen Rahmenbedingungen für die Kallusbildung zu optimieren und somit den Prozess der Knochenheilung zu beschleunigen. Eine wichtige regulierende Rolle während verschiedener Stadien der Osteogenese und Frakturheilung wird Knochenwachstumsfaktoren zugesprochen [16]. Verschiedene Studien haben eindeutig demonstriert, dass z.B. die lokale Administration von IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) und TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) die Osteotomieheilung beschleunigen können [17-19]. Klinisch werden hauptsächlich radiologische Verfahren angewendet, um den Heilungsprozess zu beurteilen. Das derzeit verfügbare räumliche Auflösungsvermögen limitiert jedoch die Beurteilung der Kallusstruktur. Außerdem ist die quantitativ erfassbare Knochenmineraldichte nur ein indirekter Indikator für die mechanische Knochenstabilität. Der in bisherigen Studien ermittelte Zusammenhang zwischen *BMD* und der mit biomechanischen Tests ermittelten Frakturfestigkeit ist moderat (R^2 : 0,60 [20, 21] bis 0,70 [22]).

Aus den oben aufgeführten diagnostischen Limitationen und der zunehmenden Fokussierung auf Untersuchungen am Kleintiermodell folgt die Notwendigkeit, hochauflösende Methoden zu entwickeln, die eine direkte Analyse von Knochenmikrostruktur, Komposition und mechanischen Eigenschaften auf der Gewebeebene erlauben. Nur dadurch lassen sich die Mechanismen der durch physiopathologische Konditionen, natürlicher Alterung, aber auch die durch therapeutische Maßnahmen hervorgerufenen spezifischen Effekte verstehen und gezielt manipulieren.

1.2 Biomechanische Modellierung von kortikalem Knochen

Die mineralisierte Gewebematrix von kortikalem Knochen kann man in guter Näherung durch drei elementare Bestandteile beschreiben. Mineralkristalle (hauptsächlich Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$), Kollagen vom Typ I und Wasser bilden mineralisierte Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von ca. 0,2 μm . Diese Fibrillen aggregieren zu so genannten lamellären Einheiten, welche den Grundbaustein lamellären Knochens bilden. Die resultierenden mechanischen Eigenschaften der mineralisierten Knochenmatrix hängen sowohl von den Eigenschaften der Aufbaukomponenten, aber auch von einer Vielzahl anderer konstitutioneller und struktureller Faktoren, wie z.B. Gewebemineralisierung, Größe und Komposition der

Mineralkristalle, Kollagenvernetzung, Alter des Gewebes, Anordnung und Orientierung der Fibrillen ab. Zudem ist der kortikale Knochen im peripheren Skelett ausgewachsener Säugetiere und Menschen durch ein stark orientiertes Gefäßsystem aus Havers- und Volkmannkanälen durchsetzt. Die Durchmesser dieser Kanäle liegen zwischen 10 µm und 200 µm. Außerdem findet man Kanaliculi (Durchmesser: 0,2 – 0,3 µm) und andere Poren, z.B. Osteozyten- und Resorptionslakunen mit charakteristischen Ausmaßen von 2-8 µm bzw. bis zu 200 µm.

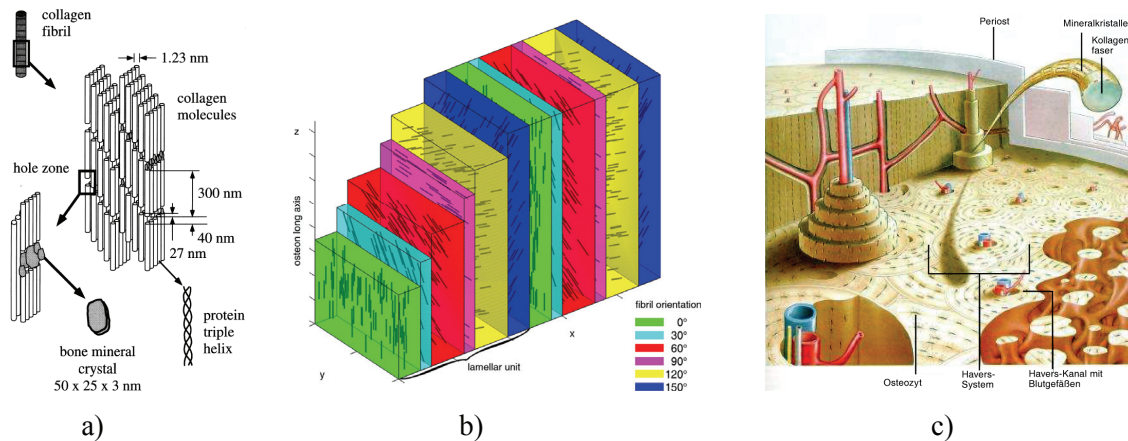


Abbildung 1-1 Schematischer Aufbau des kortikalen Knochens. a) In die Zwischenräume der aus Triple-Helix-förmigen Polypeptidketten aufgebauten Kollagenfibrille werden plättchenförmige Mineralkristalle eingelagert (aus [23]). b) Modell der aus 6 unterschiedlich dicken Schichten aufgebauten lamellären Einheit (aus [24]). Eine Schicht besteht aus einer variablen Anzahl parallel orientierter mineralisierter Kollagenfibrillen. Die Fibrillen benachbarter Schichten sind jeweils um einen festen Betrag (30°) zueinander gekippt. c) Die kortikale Struktur wird hauptsächlich durch ein Netzwerk von Osteonen mit Havers-Kanälen und Osteozytenlakunen und interstitiellem Gewebe gebildet.

Osteone und deren zentral verlaufende Havers-Kanäle sind im kortikalen Gewebe des peripheren Skeletts hauptsächlich parallel zur Knochenlängsachse orientiert. Die Zwischenräume sind durch Reste ehemaliger, bereits teilweise abgebauter Osteone, dem so genannten interstitiellen Gewebe, oder den ursprünglich gebildeten Generallamellen gefüllt (Abbildung 1-1). Die mechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens ergeben sich aus der heterogenen Verteilung von Eigenschaften der mineralisierten Knochenmatrix und der durch die Kanäle und Lakunen gebildeten porösen Struktur.

Sowohl aus den elastischen Eigenschaften der elementaren Bestandteile als auch aus der hohen Ordnungsstruktur resultieren sowohl auf mesoskopischer als auch auf makroskopischer Ebene anisotrope (richtungsabhängige) elastische Eigenschaften. Das linear elastische Verhalten wird durch das Hookesche Gesetz beschrieben. Für beliebige feste Körper hat dieses Gesetz die Form:

$$\sigma_{ij} = C_{ijkl} \varepsilon_{kl} , \quad (1-1)$$

wobei σ_{ij} und ε_{ij} die Spannungs- und Dehnungstensoren und C_{ijkl} die Komponenten des Elastizitätstensors 4. Ordnung sind. Für Knochen wird allgemein eine orthotrope bzw. transversal isotrope (hexagonale) Symmetrie angenommen [25, 26]. Daraus folgt, dass für die eindeutige

Beschreibung des Materialverhaltens 9 bzw. 5 unabhängige elastische Koeffizienten bekannt sein müssen. Der transversal isotrope Elastizitätstensor hat in der üblicherweise verwendeten abgekürzten Notierung die Form:

$$[C] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & 0 & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{13} & 0 & 0 & 0 \\ c_{13} & c_{13} & c_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & (c_{11} - c_{12})/2 \end{bmatrix}. \quad (1-2)$$

In der Literatur entsprechen die Indizes 1 und 3 in der Regel den Richtungen senkrecht bzw. parallel zur Längsachse der langen Röhrenknochen. So ist z.B. die bei einer Kompression parallel zur Längsachse zu beobachtende Deformation in dieser Richtung proportional zum Koeffizienten c_{33} .

Zur experimentellen Bestimmung mikrostruktureller Parameter in 2 oder 3 Dimensionen sind bereits eine Vielzahl von Methoden, z.B. Histologie, Mikroradiographie, Rasterelektronenmikroskopie und Mikrocomputertomographie (μ CT) etabliert. Elastische Parameter hingegen lassen sich aufgrund der heterogenen und hierarchisch geordneten Knochenstruktur, aber auch durch die limitierten Messmethoden nur bedingt ermitteln. Die Nanoindentation (2.5) ist eine mikromechanische Methode, die unter der Annahme von homogenen und isotropen Eigenschaften die Ableitung des Elastizitätsmoduls mit einer örtlichen Auflösung bis zu 1 μ m erlaubt [27-29]. Aufgrund der punktförmigen destruktiven Messung ist dieses Verfahren jedoch nur bedingt geeignet, um die heterogene räumliche Verteilung von elastischen Eigenschaften der Knochenmatrix zu erfassen.

1.3 Messung von elastischen Parametern mit Ultraschall

Ultraschallwellen sind elastische Wellen, die sich aufgrund der Skalierbarkeit der akustischen Wellenlänge sowohl für makroskopische als auch für mikroskopische Untersuchungen einsetzen lassen. Aufgrund der elastischen Natur tragen Schallwellen nach der Wechselwirkung mit einem Medium Informationen über dessen strukturelle und elastische Eigenschaften. Niedrige Frequenzen (< 2 MHz) werden seit langem *in vitro* eingesetzt, um die makroskopischen anisotropen elastischen Koeffizient kleiner kortikaler Knochenproben zu bestimmen [30-32]. Untersuchungen mit hohen Frequenzen (> 10 MHz) haben das Potenzial dieser Methode gezeigt, quantitative Informationen der anisotropen Gewebeelastizität ableiten zu können [33-35]. Der Einfluss von Strukturgrößen zur verwendeten Wellenlänge wurde bei der Abschätzung elastischer Parameter jedoch nicht hinreichend berücksichtigt.

1.4 Quantitativer in-vivo Ultraschall (QUS)

Obwohl QUS seit vielen Jahren klinisch, z.B. am Kalkaneus zur Abschätzung des Frakturrisikos eingesetzt wird, liegen Verbreitung und klinische Akzeptanz momentan noch weit hinter konkurrierenden radiographischen Methoden. Die Entwicklung neuer Verfahren und deren Anwendung an verschiedenen anatomischen Regionen (Tibia, Radius, Fingerphalangen, Femurhals und Trochanter) in Kombination mit theoretischen und numerischen Schallausbreitungsmodellen haben in den letzten Jahren zu einer markanten Intensivierung der Forschung und einer substantiellen Verbesserung unseres Verständnisses der Ultraschallausbreitung im Knochen und den Beziehungen zwischen ableitbaren akustischen und frakturrelevanten Parametern geführt [36-38]. Ultraschallbasierten Technologien wird momentan das größte Entwicklungspotenzial zugesprochen, da sie

- an verschiedenen frakturrelevanten anatomischen Regionen angewendet werden können,
- unabhängige Informationen über trabekulären und kortikalen Knochen liefern,
- sensitiv auf frakturrelevante Parameter, z.B. anisotrope Matrixelastizität, Porosität, Makrostruktur und Mikroriss-Akkumulation sind [39],
- preiswert, nichtinvasiv und nichtionisierend sind.

1.5 Numerische Methoden

Alle momentan verfügbaren mikromechanischen Messmethoden erlauben aufgrund ihrer spezifischen Messprinzipien maximal die Bestimmung einzelner elastischer Größen. Mit numerischen Finite-Elemente (FE) Deformationsanalysen lassen sich hingegen quasi beliebige Deformationsszenarien realisieren und daraus orts aufgelöste Dehnungs-, bzw. Spannungszustände im gesamten Untersuchungsvolumen berechnen. Diese Methode hat daher ein eminentes Potenzial, um komplexe statische und dynamische Probleme, z.B. an Knochen-Implantat Grenzflächen oder bei der Frakturheilung zu studieren. Eine notwendige Voraussetzung für valide Simulationsmodelle sind jedoch auch hier realistische Eingangsdaten, die nur mit mikromechanischen Messungen gewonnen werden können.

1.6 Zielstellungen

Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Methoden, mit denen die heterogenen und anisotropen Struktur- und Materialeigenschaften von kortikalem Knochen hochaufgelöst quantifiziert werden können. Ultraschallmethoden stellten im Rahmen der Untersuchungen einen Schwerpunkt dar, da sie sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einsetzen lassen und sich durch Variation von Frequenz und Schallfeldgeometrie optimal an die hierarchischen Strukturebenen anpassen lassen. Quantitative akustische Mikroskopiemethoden wurden für die Ableitung elastischer Parameter der Knochenmeso- und -mikrostruktur etabliert. Um aus akustischen Messgrößen elastische Materialparameter ableiten zu können, war es notwendig, den Einfluss der Gewebemineralisierung zu berücksichtigen und Modelle zu entwickeln, welche die Beziehungen zwischen

Gewebemineralisierung, Massendichte, akustischer Impedanz, Schallgeschwindigkeit und anisotropen elastischen Parametern beschreiben.

Hochaufgelöste akustische Impedanzverteilungsbilder wurden in einer Reihe von Studien eingesetzt, z.B. zur Untersuchung des Einflusses frakturrelevanter Struktur- und elastischer Parameter auf die mit *in-vivo* Systemen ableitbare Ultraschall-ausbreitungsgeschwindigkeit am Radius, zur Untersuchung des Einflusses von Struktur- und Elastizitätsmerkmalen auf die Frakturresistenz an einem Kallusdistraktionsmodell und zur elastischen Phänotypisierung des kortikalen Knochens am Kleintiermodell.

Darüber hinaus sollte durch die Kombination der experimentellen mikroelastischen Daten mit Finite-Elemente-Modellen die Basis für realitätsnahe numerische mikromechanische Deformationsanalysen geschaffen werden.

2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

2.1 Quantitative Akustische Mikroskopie

Eine Reihe von hochfrequenten Ultraschallmethoden sind in der letzten Dekade mit der Intention entwickelt worden, elastische Eigenschaften von Knochengewebe auf der Gewebeebene abzuleiten. Alle Verfahren beruhen auf dem 1974 von Lemons und Quate [40] erfundenen Prinzip der akustischen Rastermikroskopie, bei dem ein sphärisch fokussierter Ultraschallwandler über die zu untersuchende Probe gescannt wird (Abbildung 2-1).

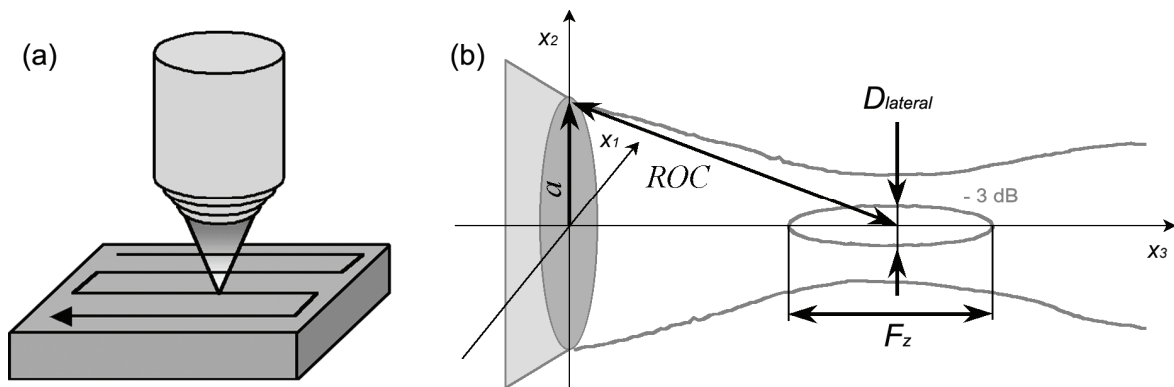


Abbildung 2-1 Bei dem von Lemons und Quate [40] erfundenen Prinzip der akustischen Rastermikroskopie wird ein sphärisch fokussierender Ultraschallwandler mäanderförmig über die zu untersuchende Probe gescannt (a). Das laterale Auflösungsvermögen $D_{lateral}$ und die Fokustiefe F_z werden durch den Wandlerradius a , dem Krümmungsradius ROC der fokussierenden akustischen Linse und der akustischen Wellenlänge λ bestimmt (b). Aus [41].

Fast alle am Knochen angewendeten Verfahren beruhen auf dem Puls-Echo Prinzip. In Abhängigkeit von den abgeleiteten akustischen Parametern lassen sich drei wesentliche Methoden unterscheiden:

- Bestimmung der akustischen Impedanz aus der konfokalen Reflexionsamplitude an dicken Proben (Abbildung 2-1a).
- Messung der Kompressionswellengeschwindigkeit in dünnen Gewebeschnitten (Abbildung 2-2),
- Messung von akustischen Oberflächenwellen an dicken Proben mit Hilfe der $V(z)$ -Messung (Abbildung 2-3).

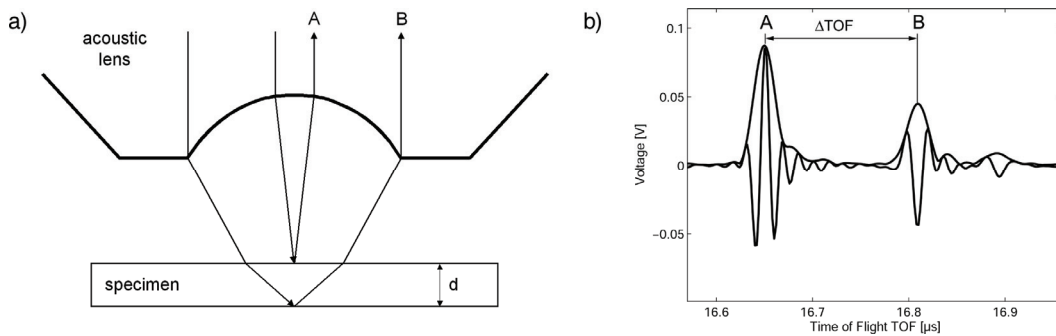


Abbildung 2-2 Messung der Kompressionswellengeschwindigkeit an dünnen Proben (a). Aus dem Laufzeitunterschied zwischen Vorder- und Rückwandechos (A und B) kann bei bekannter Probendicke die Kompressionswellengeschwindigkeit bestimmt werden. Bei fokussierten Schallfeldern können außerdem weitere Wellen, z.B. Scherwellen generiert werden, die aufgrund einer niedrigeren Schallgeschwindigkeit größere Laufzeitdifferenzen aufweisen (b). Aus [41].

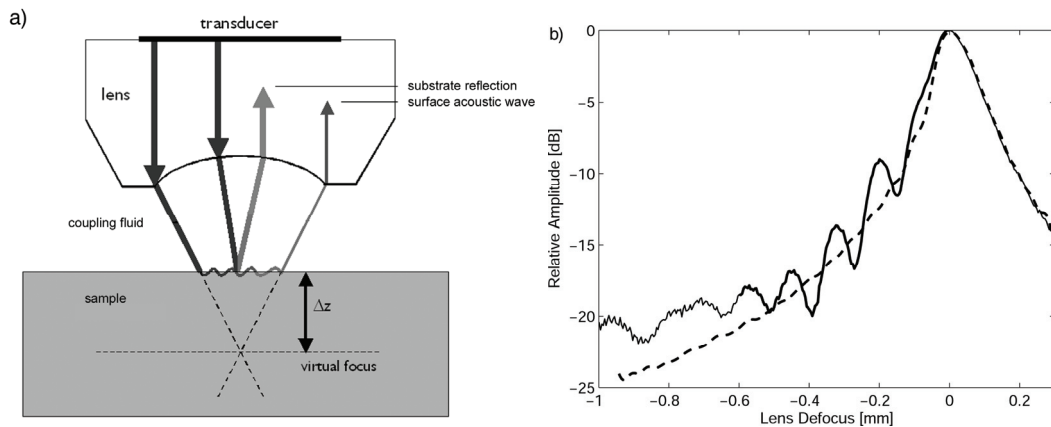


Abbildung 2-3 Prinzip der $V(z)$ -Messung zur Bestimmung der Oberflächenwellengeschwindigkeit an dicken Proben (a). Ein Teil der schräg einfallenden Wellen führt zur Generierung von Oberflächenwellen. Bei der Ausbreitung dieser Wellen wird ein Teil der Energie zurück ins Kopplungsmedium gesendet. Dieser Anteil kann mit den normal reflektierten Wellen interferieren. Bei monochromatischer Anregung kommt es bei zunehmender Defokussierung zu einer charakteristischen Oszillation der Empfangsamplitude (b). Die Positionen der Maxima und Minima hängen von Sendefrequenz, Defokussierung und der Oberflächenwellengeschwindigkeit ab. Aus [42].

Alle vorliegenden SAM-Untersuchungen wurden mit den am Labor für Quantitative B-Bild Sonographie und akustische Mikroskopie (Q-BAM) des Zentrums für Erkrankungen und Verletzungen der Haltungs- und Bewegungsorgane (ZHBO) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelten akustischen Mikroskopen durchgeführt. Die beiden Mikroskope arbeiten nach dem Puls-Echo Prinzip, unterscheiden sich aber sowohl im nutzbaren Frequenzbereich und dem daraus resultierenden Auflösungsvermögen als auch in der Art der Signalgenerierung und Datenakquisition. Das SAM200Ex ist ein zeitaufgelöstes Mikroskop mit einer Bandbreite von 250 MHz. Mit einem Messfeld von 60 x 60 mm und einem minimalen Messinkrement von 4 μm erlaubt das Mikroskop Untersuchungen großer Probenareale mit hoher

örtlicher Diskriminierung (bis zu 6350 dpi). In Abhängigkeit von Frequenz und Apertur des verwendeten Schallwandlers lassen sich lateral Ortsauflösungen bis zu 8 μm realisieren.

Das SAM2000 arbeitet mit Frequenzen zwischen 60 MHz und 2 GHz. Das Scanfeld ist auf maximal 1 x 1 mm limitiert. Im Gegensatz zum SAM200Ex wird nicht das gesamte von der Probe reflektierte Signal, sondern nur die innerhalb eines bestimmten Zeitfensters integrierte Echoamplitude digitalisiert.

Für die im Folgenden beschriebenen Studien wurden Ultraschallwandler mit Frequenzen zwischen 25 MHz und 1223 MHz angeregt. Die nominalen Schallfelddurchmesser im Fokus dieser Wandler lagen zwischen 142 μm und 1 μm .

Einer der Schwerpunkte der Arbeit bestand darin, die Möglichkeiten und Limitationen der oben genannten Methoden in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit an kortikalem Knochen unter besonderer Berücksichtigung des Verhältnisses von verwendeter Wellenlänge (und dem daraus resultierenden physikalischen Auflösungsvermögen) zu den charakteristischen Strukturdimensionen zu untersuchen. Schallgeschwindigkeitsmessungen, insbesondere $V(z)$ -Messungen stellen für homogene Materialien eine einfache und robuste Messmethode dar, zumal die Theorie der Wellenausbreitung auch für anisotrope Stoffe seit langem etabliert ist [43]. Für homogene mineralisierte Gewebe, wie z.B. Dentin und Zahnschmelz, konnten sowohl Messungen an dünnen Schnitten [44] als auch $V(z)$ -Messungen [42, 45, 46] erfolgreich durchgeführt werden.

Kortikaler Knochen ist im Gegensatz zu Dentin und Zahnschmelz durch eine starke Heterogenität auf mehreren hierarchischen Organisationsebenen charakterisiert. Um die daraus resultierende örtliche Variation elastischer Eigenschaften des Gewebes erfassen zu können, ist eine Maximierung der örtlichen Auflösung, bzw. eine Minimierung des Messvolumens notwendig. Bei der akustischen Impedanzmessung wird die Probe senkrecht zur Schallstrahlachse in der Fokusebene des Schallwandlers positioniert. Bei dieser konfokalen Anordnung der Probe im Schallfeld ist der Schallfelddurchmesser (für eine gegebene Wandlergeometrie und Sendefrequenz) minimal. Die Reflexionsamplitude hängt von den Eigenschaften der Probe innerhalb einer Tiefe ab, die vergleichbar mit der Wellenlänge im untersuchten Material ist. Die zur Generierung von Oberflächenwellen notwendige Defokussierung bzw. die zur Separation der Vorder- und Rückwandechos notwendige Probendicke führen zu einer deutlichen Vergrößerung der Messvolumens und einer damit verbundenen Verschlechterung des örtlichen Auflösungsvermögens. Ein umfassender Vergleich der Methoden und Potenzial und Limitationen zur Anwendung an kortikalem Knochen ist in 3.13 beschrieben.

In allen anderen Arbeiten wurde die Methode der konfokalen Messung der Reflexionsamplitude und Ableitung der akustischen Impedanz mit Frequenzen zwischen 25 MHz und 1,2 GHz angewendet. Die in diesem Frequenzbereich erzeugten Wellenlängen liegen in der Größenordnung 60 μm bis 1.2 μm (in Wasser bei 25°C). In diesem Wellenlängenbereich werden mehrere hierarchische Strukturdimensionen des kortikalen Knochens überschritten (Abbildung 2-4).

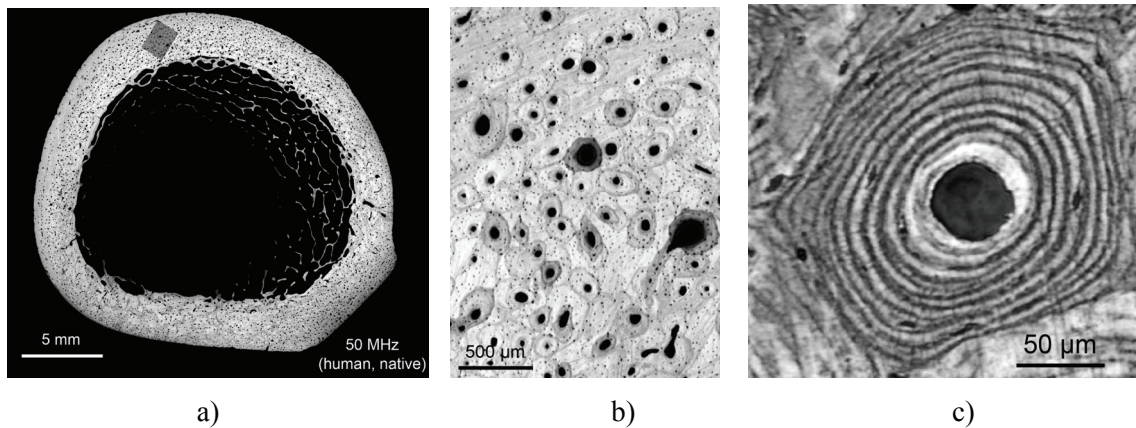


Abbildung 2-4 Akustische Impedanzverteilungsbilder von humanen, nativ präparierten Femurquerschnitten. Bei einer Frequenz von 50 MHz (a) können die Havers-Kanäle gut vom mineralisierten Gewebe unterschieden werden. Das kleine rechteckige Fenster wurde nochmals mit einer Frequenz von 200 MHz gemessen (b). Im oberen linken Teil des Bildes können Reste der äußeren Generallamelle gut von osteonalem und interstitiellem Gewebe unterschieden werden. Die großen dunklen Areale sind Havers-Kanäle, die kleinen Punkte entsprechen Osteozytenlakunen. Bei einer Frequenz von 900 MHz stellt sich das den Havers-Kanal umgebende osteonale Gewebe als lamelläre Struktur mit einer charakteristischen periodischen Impedanzvariation dar. Die Osteozytenlakunen erscheinen als kleine, elliptisch geformte Areale. Aus [47] und [48].

Die Verwendung von Ultraschallfrequenzen im GHz-Bereich und die damit verbundene Reduzierung der Schallfeldfokustiefe führen zu einem zunehmenden Einfluss der mikroskopischen Oberflächenrauigkeit. Letztere lässt sich bei der Präparation heterogener Gewebe nicht vollständig vermeiden. In 3.1 wird die Entwicklung des Multi-Layer-Analysis Verfahrens beschrieben, welches die quantitative Ableitung der akustischen Impedanz an einzelnen Osteonenlamellen unter Berücksichtigung der Oberflächentopographie erlaubt. Dieses Verfahren wird in einer zweiten Studie verwendet, um die anisotropen elastischen Eigenschaften von Osteonenlamellen zu bestimmen (3.8).

Trotz der Auflösung im Mikrometerbereich eignen sich GHz-Messungen nur bedingt für systematische Studien an kortikalem Knochengewebe. Gründe dafür sind neben der limitierten Messfeldfläche von 500 µm (für quantitative Auswertungen), der erheblichen Anfälligkeit für Messartefakte bei unzureichender Oberflächenpräparation und dem Messaufwand die Komplexität der erhaltenen Informationen. Selbst mit den höchsten praktisch einsetzbaren Frequenzen (< 2 GHz) ist die Wellenlänge eine Größenordnung größer als der Durchmesser einer einzelnen mineralisierten Kollagenfaser (ca. 0,2 µm). Dies bedeutet, dass die einzelnen Schichten der im kortikalen Knochen angenommenen rotierten Sperrholzstruktur (englisch: „twisted plywood“) in der Regel nicht örtlich aufgelöst sind und die Interpretation der gewonnenen Daten zusätzliche Modellannahmen erfordert (siehe 3.13).

Experimenteller Aufwand und Messdauer lassen sich durch die Verwendung niedrigerer Ultraschallfrequenzen erheblich reduzieren. Der Informationsgehalt ist hingegen durch die

Möglichkeit, große Probenareale zu untersuchen, oft um ein Vielfaches höher. Sofern die Wellenlänge größer als die Dicke einer lamellären Einheit ist, werden die Ausbreitungseigenschaften der Welle durch die effektiven Verbundeigenschaften des Materials bestimmt. Um diese jedoch genau messen zu können, darf der Schallfelddurchmesser nicht größer als die Dimension der zu untersuchenden Struktur sein. Im kortikalen Knochen wird die mineralisierte Gewebematrix durch ein poröses Netzwerk aus Havers- und Volkmannkanälen, sowie Resorptions- und Osteozytenlakunen durchsetzt (Abbildung 2-4). Die in 3.2 - 3.8 beschriebenen Arbeiten und die Übersichtsarbeit in 3.13 beschäftigen sich deshalb mit der Etablierung der für die Ableitung effektiver Materialeigenschaften der mineralisierten Gewebematrix optimalen Mess- und Datenauswertungsmethoden.

Die Verwendung hoch fokussierender Wandler mit Frequenzen zwischen 50 MHz und 200 MHz hat sich für die Ableitung elastischer Eigenschaften der mineralisierten Knochenmatrix als am besten geeignet herausgestellt. Durch spezielle Segmentierungsalgorithmen lassen sich Gewebematrix und Poren sicher voneinander separieren und damit sowohl Struktur- als auch Elastizitätsparameter ableiten. Um letzteres zu beweisen, wurden einerseits durch vergleichende SAM und Synchrotron- μ CT Messungen in 3.4 und 3.11, andererseits durch die Entwicklung eines Kompositmodells in 3.6 die Beziehungen zwischen akustischer Impedanz, Gewebemineralisierung, Massendichte und den elastischen Koeffizienten c_{11} bzw. c_{33} untersucht. Außerdem wurde in 3.7 eine spezielle Untersuchungsmethode entwickelt, um an kleinen Knochenstanzbiopsien den gemittelten effektiven (transversal isotropen) elastischen Tensor $[C]$ abzuleiten.

2.2 Bidirektionale axiale Ultraschalltransmission

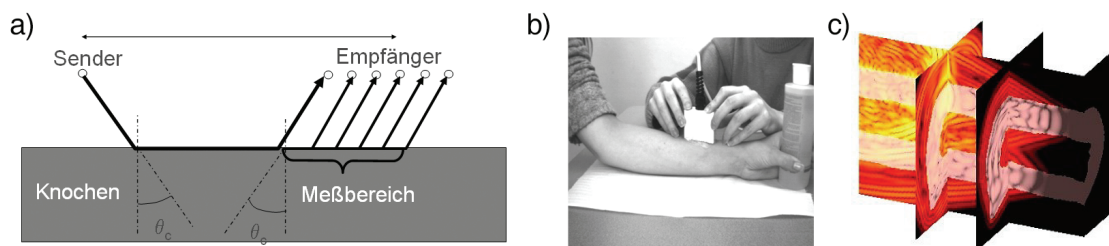


Abbildung 2-5 Prinzip der axialen Ultraschalltransmission (a). In-vivo Applikation am Radius (b). 3-D Momentaufnahme (Simulation) einer Ultraschallwelle, die sich in einer realistischen (aus 3D CT-Daten rekonstruierten) kortikalen Knochengeometrie ausbreitet (c).

Diese Technik wurde am Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, CNRS/Université Paris 6, UMR entwickelt. Ultraschall mit Frequenzen von 1 MHz oder 2 MHz wird über die Haut und Weichgewebe in den kortikalen Knochen eingekoppelt (Abbildung 2-5). Die axiale Ausbreitungsgeschwindigkeit (*SOS*: Speed Of Sound) des schnellsten Signals (*FAS*: First Arriving Signal) wird in zwei Richtungen gemessen, um eine automatische Korrektur der durch Weichgewebe und Wandlerneigung hervorgerufenen Artefakte zu ermöglichen [49].

Sowohl in experimentellen als auch in Simulationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit des *FAS* von frakturrelevanten Parametern, z.B. der kortikalen Dicke als auch der makroskopischen Knochenelastizität bestimmt wird [49-52]. Der Einfluss der kortikalen Dicke $Ct.Wi$ wird durch eine Änderung der Ausbreitungsart verursacht. Für große Dicken (d.h. $Ct.Wi/\lambda > 0,5$) wird das *FAS* durch Kompressionswellen gebildet, während für kleine Dicken ($Ct.Wi/\lambda < 0,25$) das *FAS* durch eine Plattenschwingung (der so genannten symmetrischen Lambwelle S_0) verursacht wird. Im Übergangsbereich beobachtet man ein durch Überlagerung der beiden Ausbreitungsmodi gebildetes Signal, wobei die gemessene Geschwindigkeit des *FAS* einen kontinuierlichen, nichtlinearen Anstieg vom Wert des S_0 -Modus (~ 3650 m/s) zum Wert des Kompressionsmodus (~ 4000 m/s) beschreibt [50]. Am humanen distalen Radius variiert $Ct.Wi$ typischerweise zwischen 1 mm und 3,5 mm [52, 53]. Bei einer Frequenz von 1 MHz ist die Wellenlänge in Knochen ca. 4 mm. Demzufolge ist bei dieser Frequenz *SOS* nur für relativ große Dicken ($Ct.Wi > 2$ mm) von der Dicke unabhängig. Bei 2 MHz ($\lambda \sim 2$ mm) hingegen sollte *SOS* primär von den effektiven elastischen Eigenschaften des kortikalen Knochens abhängen.

Theoretisch hängen die Ausbreitungsgeschwindigkeiten von S_0 -Wellen und Kompressionswellen (P -Wellen) von den effektiven elastischen Eigenschaften des Materials ab:

$$SOS_P = \sqrt{\frac{c_{33eff}}{\rho_{eff}}}, \quad (2-1)$$

wobei ρ_{eff} die Massendichte und c_{33eff} der elastische Koeffizient in Richtung der Knochenlängsachse sind. ρ_{eff} und c_{33eff} ergeben sich aus den effektiven Verbundeigenschaften innerhalb einer Volumenzelle, deren Größe vergleichbar mit der Wellenlänge ist. Daraus ergibt sich, dass in beide Größen sowohl Variationen der Gewebemineralisierung und Elastizität, aber auch der Mikrostruktur, z.B. der Porosität eingehen. Die Geschwindigkeit der S_0 -Welle kann mathematisch durch die Kombination mehrerer elastischer Koeffizienten c_{ijeff} eines transversal isotropen Materials beschrieben werden [50]:

$$SOS_{S_0} = \sqrt{\frac{c_{33eff}}{\rho_{eff}} \times \left(1 - \frac{c_{13eff}^2}{c_{11eff} \times c_{33eff}}\right)}. \quad (2-2)$$

Daraus folgt, dass die Geschwindigkeit der S_0 -Wellen im Gegensatz zu denen der Kompressionswellen von der elastischen Anisotropie und insbesondere auch dem elastischen Koeffizienten in der Richtung senkrecht zur Knochenlängsachse bestimmt wird.

Ziel der Studie 3.3 war, die relativen Beiträge von kortikaler Mikrostruktur, Gewebemineralisierung, und –Elastizität auf die mit einem klinischen Ultraschallgerät *in-vivo* messbare axiale Ausbreitungsgeschwindigkeit experimentell zu überprüfen. Dazu wurde eine *in-vitro* Studie an 10 humanen Radiusproben durchgeführt. Nach den axialen Transmissionsmessungen wurden Mikrostrukturparameter und Dicke des kortikalen Knochens sowie lokale Verteilungen von Gewebemineralisierung und –Elastizität mit Hilfe hochauflösender SR- μ CT und

50-MHz SAM erfasst. Mit Hilfe multivariater nichtlinearer Regressionsanalysen wurde ein Modell entwickelt, welche die gemessenen Ausbreitungsgeschwindigkeiten des *FAS* als Funktion von frakturelevanten Parametern beschreibt.

2.3 Synchrotron Radiation μ Computer Tomographie (SR- μ CT)

Hochauflösende Mikrocomputertomographie (μ CT) erlaubt eine schnelle und zerstörungsfreie Erfassung der dreidimensionalen Knochenmikrostruktur. Bei den mittlerweile weit verbreiteten μ CT-Systemen wird wie bei konventionellen CT-Systemen das Bremsspektrum einer Röntgenröhre als Strahlungsquelle verwendet. Da die Strahlungsschwächung sowohl vom Material als auch von der Wellenlänge abhängt, ist aus der bei der Messung rekonstruierten breitbandigen Strahlungsschwächung nur bedingt auf den Mineralgehalt des Knochengewebes zu schließen. Im Unterschied dazu kann die an Teilchenbeschleunigern erzeugte Synchrotronstrahlung über Monochromatoren auf eine einzige Wellenlänge mit ausreichender Intensität reduziert werden. Dies erlaubt über die Messung der Schwächung die eindeutige dreidimensionale Rekonstruktion der Mineralisierungsverteilung (*DMB*: Degree of Mineralization of Bone).

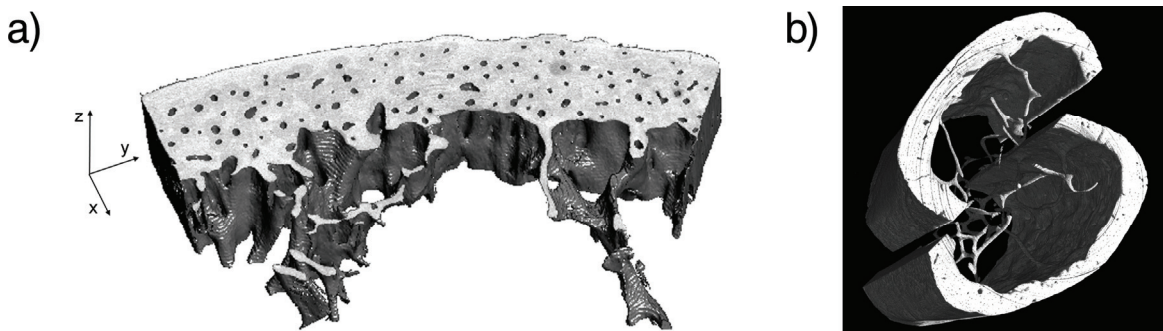


Abbildung 2-6 3D Rekonstruktionen von SR- μ CT Daten eines humanen Radiussegments (a) und middiaphysärer Femursegmente einer Maus (b).

Hochlösende SR- μ CT Messungen wurden am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Mit dem an Beamline ID19 entwickelten SR- μ CT System können dreidimensionale CT-Datensätze mit Voxelgrößen zwischen $15\ \mu\text{m}$ und $0.28\ \mu\text{m}$ rekonstruiert werden [54]. Für die Untersuchungen an humanen Radiusproben in 3.3 - 3.6 und 3.12, sowie Mäusefemora 3.11 wurde eine Voxelgröße von $4.91\ \mu\text{m}$ gewählt. Die einzelnen Schwächungsbilder mit einem Sichtfeld von $10 \times 10\ \text{mm}^2$ wurden mit einem CCD Detektor (2048×2048 Pixel) digitalisiert. Die Akquisitionszeit für eine Aufnahme betrug 2 sec. Insgesamt wurden 900 Ausnahmen aus unterschiedlichen Raumrichtungen (0.4° Abstand) für die tomographische Rekonstruktion akquiriert (Abbildung 2-6). In Abhängigkeit von der verwendeten Strahlungsenergie entspricht der gemessene Voxel-Grauwert dem relativen Anteil an Hydroxylapatitkristallen in dem Volumenelement [55].

Aus den Volumendatensätzen wurden zweidimensionale *DMB*-Verteilungsbilder von den Oberflächen extrahiert, die vorher akustisch untersucht worden sind. Die Ziele dieser Untersuchungen bestanden darin,

- die Genauigkeit der Ableitung von Mikrostrukturparametern aus SAM-Messungen zu validieren (3.3, 3.5, 3.11),
- den Einfluss der Gewebemineralisierung auf die Massendichte zu klären (3.6),
- die Gewebeelastizität durch die unabhängige und lokal aufgelöste Bestimmung von Massendichte und akustischer Impedanz zu bestimmen (3.6),
- den Einfluss von Komposition (Mineralisierung), Gewebeelastizität (c_{33}) Mikrostruktur (Anzahl, Größe und lokaler Verteilung von Havers-Kanälen) und Makrostruktur (Dicke des kortikalen Knochens) auf die *in-vitro* gemessene axiale Ultraschallausbreitungsgeschwindigkeit zu bestimmen (3.3),
- den Einfluss genetischer Variationen auf den elastischen Knochenphänotyp zu untersuchen (3.11).

2.4 2D - Raman Spektroskopie

Durch Spektroskopie inelastisch gestreuter optischer Wellen lassen sich Komposition und Konstitution anorganischer und organischer Bestandteile des mineralisierten Knochens separat und zerstörungsfrei untersuchen. Eine Vielzahl von Studien sind mit optischen Wellenlängen im Infrarotbereich durchgeführt worden. Das örtliche Auflösungsvermögen ist durch die verwendete Optik und die Wellenlänge auf 10 bis 20 μm begrenzt [56]. Raman-Spektroskopie kann mit Wellenlängen im roten bzw. nah-infraroten Bereich arbeiten. Das mit kommerziellen Systemen erreichte Auflösungsvermögen liegt im Mikrometerbereich. Somit lässt sich im kortikalen Knochen eine Strukturauflösung bis in den lamellären Bereich erzielen. Durch die örtlich aufgelöste Erfassung von Raman-Spektren und deren Auswertung mit Hilfe von multivariaten statistischen Verfahren konnten kleine lokale Schwankungen der chemischen Komposition innerhalb einzelner Osteone nachgewiesen werden [56, 57]. Timlin et al. [58] haben z.B. Phosphat- und Monohydrogenphosphat-Gradienten in trabekulärem, aber nicht in kortikalem Knochen nachweisen können. Von Akkus et al. [59] sind altersabhängige Veränderungen der Kollagen/Mineral- und Karbonat/Phosphat-Verhältnisse in sekundären Osteonen beschrieben worden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mechanische Deformationen und durch Ermüdungsmikrofrakturen ultrastrukturelle Veränderungen verursachen, die sich in Veränderungen von Form, Position und Amplituden der Amid-I und Phosphat- ν_1 Banden im Raman Spektrum widerspiegeln [60, 61].

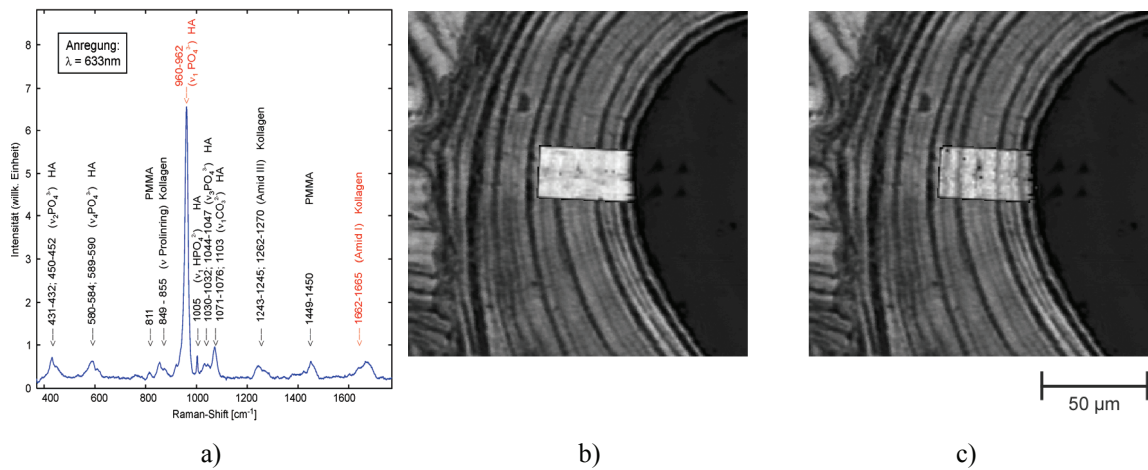


Abbildung 2-7 In humanem kortikalen Knochen detektierte Raman-Banden (a). Die rot markierten Banden wurden zur Darstellung der relativen örtlichen Verteilung von Mineral (b) und Kollagen (c) verwendet. Die Raman-Verteilungsbilder wurden hochauflösenden (911 MHz) Impedanzbildern überlagert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein LABRAM Mikrospektrometer (Jobin Yvon GmbH, München, Germany) mit Helium-Neon Laseranregung (632 nm) verwendet. Die durch die optische Fokussierung (Olympus BX40, Apertur: 0,9) erreichte laterale Ortsauflösung lag bei ca. 1 μm und die Fokustiefe betrug 1.6 μm . Ein Autofokus System (PIFOC, Physik Instrumente) stellte eine definierte Defokussierung von 1 μm unterhalb der Probenoberfläche für alle Messungen sicher. Durch ein Mikropositioniersystem konnten Messfelder mit einer Abmessung von ca. 20 x 65 μm mit einem Inkrement von 1 μm vermessen werden. Die Phosphat- ν_1 (961 cm^{-1}) und Amid-I (1665 cm^{-1}) Banden wurden als Indikatoren für die relativen Mineral- und Kollagenkonzentrationen verwendet [56]. Die hochaufgelösten Verteilungsbilder wurden in 3.8 mit akustischen Impedanzbildern kombiniert (siehe Abbildung 2-7), um den Einfluss der Gewebekomposition auf die resultierenden anisotropen elastischen Eigenschaften einzelner Osteonlamellen zu untersuchen.

2.5 Nanoindentation

Die von Oliver und Pharr [62] entwickelte Nanoindentation ist momentan die am weitesten verbreitete mikromechanische Messmethode. Dabei wird das klassische Prinzip angewendet, mit Hilfe eines harten Stempels das zu untersuchende Material zu deformieren und die dafür notwendige Kraft zu messen. Als Stempelgeometrie haben sich pyramidenförmige Diamantspitzen (sogenannte Berkovich-Indenter) etabliert. Obwohl die Indentation destruktiv ist, kann aus dem linearen Bereich der Kraft-Deformationskurve unter bestimmten Annahmen der Elastizitätsmodul (Young-Modul) abgeleitet werden. Die Tiefe der Eindrücke liegt typischerweise im Submikrometerbereich (einige 100 nm). In Abhängigkeit von Eindruckkraft und der Härte des untersuchten Materials ergibt sich eine Indentationsfläche, die für Knochen zwischen 1 und < 100 μm^2 betragen kann.

Die Nanoindentations-Messungen wurden am Fachbereich Physik der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg mit einem Nano Indenter® II (MTS Systems Corp., Oak Ridge, TN) durchgeführt. Die mechanische Härte H_{IT} und der elastische Indentationsmodul E_{IT} wurden nach ISO Norm 14577 bestimmt. Für die Ableitung von E_{IT} wurde das Material als isotrop mit einer Querkontraktionszahl $\nu = 0,3$ angenommen.

2.6 Numerische Deformationsanalysen mit SAM-Eingangsdaten

Die experimentelle Bestimmung elastischer Parameter von Knochen ist aufgrund dessen komplexer, hierarchisch geordneter Struktur, aber auch durch die limitierten Messmethoden nur bedingt möglich. Mit numerischen Finite-Elemente (FE) Deformationsanalysen lassen sich hingegen quasi beliebige Deformationsszenarien realisieren und Dehnungs-, bzw. Spannungszustände im gesamten Untersuchungsvolumen bestimmen.

Mit kontinuumsmechanischen Methoden wird jeder Materialpunkt eines *makroskopischen* Materials als ein Volumen beschrieben, welches mit einem homogenen Material gefüllt ist. Aus mathematischer Sicht ist dieses Volumen unendlich klein. Dennoch hat dieses *mesoskopische* Volumen eine endliche (finite) *mikroskopische* Dimension und eine Mikrostruktur. Die mechanischen Eigenschaften der *mesoskopischen* Volumenelemente bestimmen maßgeblich das *makroskopische* mechanische Verhalten des Materials. In homogenen Materialien sind die *mesoskopischen* Materialeigenschaften an jeder Stelle gleich. Daraus ergibt sich, dass die *makroskopischen* und *mesoskopischen* Materialeigenschaften identisch sind. Heterogene Materialien, wie z.B. Knochen, lassen sich durch Volumenelemente mit variablen Materialeigenschaften beschreiben, wobei der minimale Abstand zwischen zwei Punkten mit unterschiedlichen Eigenschaften größer als die Dimension des Volumenelements sein sollte. Unter diesen Umständen lassen sich die *makroskopischen* Eigenschaften numerisch durch räumliche Anordnung der *mesoskopischen* Volumenelemente beschreiben.

In der Studie 3.12 wird ein neues Konzept beschrieben, um den *mesoskopischen* elastischen Tensor von kortikalem Knochen (Volumen: 1 mm³) durch *mikroskopische* elastische Bilder zu bestimmen. Die Daten wurden durch zweidimensionale 50-MHz SAM-Messungen an humanen Radiusquerschnitten mit einem örtlichen Auflösungsvermögen von 23 µm gewonnen (siehe 3.3). Die akustischen Impedanzwerte konnten mit der in 3.6 gefundenen Korrelation zum elastischen Koeffizienten c_{33} direkt als Eingangswerte für ein isotropes FE-Modell verwendet werden. Darüber hinaus wurde aus den lokal bestimmten c_{33} Werten der transversal isotrope Elastizitätstensor mit Hilfe eines von Hellmich *et al.* [63, 64] vorgeschlagenen mikromechanischen Modells abgeschätzt. Letzteres beschreibt den elastischen Tensor als Funktion der relativen Volumenanteile von Kollagen (f_{col}), Hydroxylapatit (f_{HA}) und Wasser (f_w):

$$C_{IJ}(x_1, x_2, x_3; f_{col}, f_w, f_{ha}). \quad (2-3)$$

In (3.6) wurde gezeigt, dass die einzelnen Volumenanteile in einer direkten Beziehung zueinander stehen:

$$\frac{f_{col}}{f_w} = 0.36 + 0.084 \exp(6.7 f_{ha}). \quad (2-4)$$

Mit (2-3) und (2-4) wurden aus den gemessenen Impedanzwerten c_{33}, f_{HA} und letztlich der elastische Tensor C_{IJ} für jedes Volumenelement abgeschätzt. Um den *mesoskopischen* elastischen Tensor zu bestimmen, wurde

- ein FE-Netz generiert (1 x 1 mm) und jedem Knotenpunkt des Netzes ein gemessener Impedanzwert zugeordnet (Abbildung 2-8),
- den mit Poren (Havers-Kanälen) besetzten Netzpunkten ein fester isotroper Tensor C_{IJ} zugewiesen,
- den mit mineralisierter Gewebematrix besetzten Netzpunkten ein durch den Impedanzwert bestimmter isotroper oder transversal isotroper Tensor zugewiesen,
- durch definiertes Aufbringen von Kompressions- und Scherspannungen der homogenisierte anisotrope elastische Tensor berechnet,
- durch Tensorrotation der „am nächsten“ liegende Tensor mit hexagonaler (transversal isotroper) Symmetrie abgeschätzt.

Die Analyse wurde an 58 einzelnen Volumenelementen durchgeführt. Der Einfluss von *mikroskopischer* Gewebeanisotropie und mechanischen Eigenschaften der mit Flüssigkeit gefüllten Poren (Havers-Kanäle) auf die mesoskopischen anisotropen elastischen Eigenschaften wurde untersucht und mit experimentellen Daten verglichen.

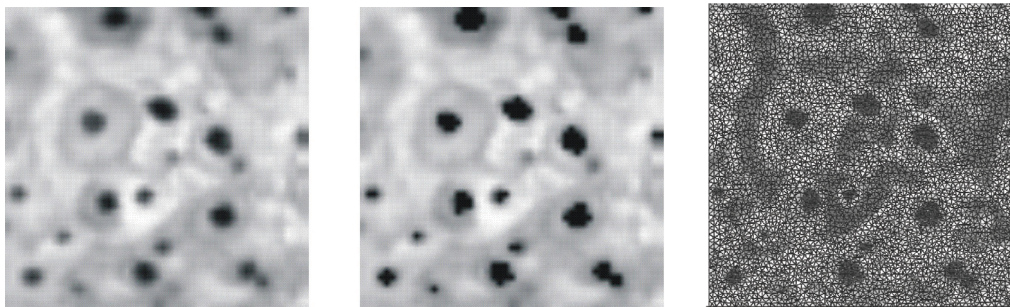


Abbildung 2-8 Ein typisches Volumenelement vor (links) und nach (mitte) Segmentierung der Poren. Die Poren sind schwarz dargestellt. Die Grauwerte im mineralisierten Knochengewebe entsprechen einer variablen akustischen Impedanz bzw. elastischem Koeffizienten c_{33} . Darstellung des Elastizitätsmoduls nach Projektion und Konditionierung der Messdaten in ein FE-Netz (rechts). Aus [65].

3 ORIGINALARBEITEN¹

3.1 Multi layer analysis - quantitative scanning acoustic microscopy for tissue characterization at a microscopic scale.

Raum K, Jenderka KV, Klemenz A, Brandt J, IEEE Trans.Ultrason., Ferroelect., Freq.Contr. 50:507-516, 2003.

3.2 Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy.

Raum K, Reissbauer J, Brandt J, J. Biomed. Mat. Res. 71A:430-438, 2004.

3.3 Bone microstructure and elastic tissue properties are reflected in QUS axial transmission measurements.

Raum K, Leguerney I, Chandelier F, Bossy E, Talmant M, Saied A, Peyrin F, Laugier P, Ultrasound Med. Biol. 31:1225-1235, 2005.

3.4 Spatial distribution of anisotropic acoustic impedance assessed by time-resolved 50-MHz scanning acoustic microscopy and its relation to porosity in human cortical bone.

Saïed A, Raum K, Leguerney I, Laugier P, Bone, 43:187-194, 2008.

3.5 Site-matched assessment of structural and tissue properties of cortical bone using scanning acoustic microscopy and synchrotron radiation μ CT.

Raum K, Leguerney I, Chandelier F, Talmant M, Saied A, Peyrin F, Laugier P, Phys. Med. Biol. 51:733-746, 2006.

3.6 Derivation of elastic stiffness from site-matched mineral density and acoustic impedance maps.

Raum K, Cleveland RO, Peyrin F, Laugier P: Phys. Med. Biol. 51:747-758, 2006.

3.7 Assessment of microstructure and anisotropic tissue elasticity of cortical bone from high resolution angular acoustic measurements.

Lakhsmanan S, Bodi A, Raum K, IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr. 54:1560-1570, 2007.

¹ Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der veröffentlichten Version der Habilitationsschrift nicht enthalten

3.8 Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae.

Hofmann T, Heyroth F, Meinhard H, Franzel W, Raum K, J. Biomech. 39:2284-2294, 2006.

3.9 Prediction of biomechanical stability after callus distraction by high resolution scanning acoustic microscopy.

Hube R, Mayr H, Hein W, Raum K, Ultrasound Med. Biol. 32:1913-1921, 2006.

3.10 Assessment of bone structure and elasticity in B6/C3H mice using high resolution scanning acoustic microscopy.

Hofmann T, Raum K, Leguerney I, Saied A, Peyrin F, Vico L, Laugier P, Ultrasonics, 44S:e1307-e1311, 2006.

3.11 Variations of microstructure, mineral density and tissue elasticity in B6/C3H mice.

Raum K, Hofmann T Leguerney I, Saied A, Peyrin F, Vico L, Laugier P, Bone, 41: 1017-1024. 2007.

3.12 Derivation of the mesoscopic elasticity tensor of cortical bone from quantitative impedance images at the micron scale.

Grimal Q, Raum K, Gerisch A, Laugier P, Computer Methods Biomech. Biomed. Eng. 11:147-158, 2008.

3.13 Microelastic imaging of bone.

Raum K, IEEE Trans.Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr., 55:1417-1431, 2008.

4 DISKUSSION

4.1 Ableitung von Struktur und Gewebeelastizität der Makro-, Meso- und Mikrostruktur mit Hilfe akustischer Mikroskopie

Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der kortikalen Knochenstruktur sind ein hohes örtliches Diskriminierungsvermögen und die Möglichkeit der flächenhaften Ableitung von Eigenschaften für Untersuchungen am Knochen essentiell. In 3.13 wurde gezeigt, dass sich die in Abschnitt 2.1 vorgestellten Methoden zur Bestimmung von Schallgeschwindigkeiten aufgrund der notwendigen Defokussierung nicht oder nur sehr bedingt für die Anwendung am Knochen eignen. Für ein beliebiges Schallfeld ist der Schallfelddurchmesser im Fokus minimal. Die Ableitung der akustischen Impedanz aus der konfokalen Reflexionsamplitude ermöglicht somit für ein gegebenes Setup, d.h. durch das von einem bestimmten Wandler erzeugte Schallfeld, prinzipiell das optimale laterale Auflösungsvermögen.

In 3.2 und 3.13 wurden die Abhängigkeit von Ultraschallfrequenz und Schallfeldfokussierung auf die Ableitung von Strukturparametern und akustischer Impedanz an humanen kortikalen Knochenschnitten im Frequenzbereich von 25 MHz bis 1.2 GHz untersucht. Elastische Anisotropie des Gewebes konnte bei allen verwendeten Frequenzen festgestellt werden. Eine eindeutige Separation der Havers-Kanäle vom mineralisierten Gewebe war jedoch bei niedrigen Frequenzen (< 30 MHz) und schwacher Fokussierung nicht möglich, was zu einer signifikanten Reduzierung der gemessenen Impedanz und Fehlern bei der Abschätzung von Strukturparametern führte. Dieser Fehler war von Größe, Dichte und Verteilung der Kanäle abhängig. Die Verwendung hoch fokussierender Wandler erlaubte schon bei relativ geringen Frequenzen (~ 50 MHz) eine robuste Separierung von Havers-Kanälen und Gewebe. Aufgrund des Schallfelddurchmessers von $23 \mu\text{m}$ bei dem verwendeten 50-MHz Schallwandler kam es jedoch an den Strukturgrenzen zu einer räumlichen Tiefpassfilterung, die bei der Auswertung berücksichtigt werden musste. Ein entsprechender adaptiver Segmentierungsalgorithmus zur Minimierung dieses Artefaktes wurde in 3.7 beschrieben.

Aufgrund der Wellenlänge ist im Bereich bis 100 MHz eine Detektierung der Osteozytenlakunen nicht möglich. Ab einer Mittenfrequenz von 180 MHz konnten diese detektiert und durch spezielle Segmentierungsverfahren von der Gewebematrix separiert werden (siehe 3.4). Die im akustischen Bild dargestellten Lakunen erscheinen jedoch durch den Schallfelddurchmesser von ca. $8 \mu\text{m}$ wesentlich größer als in der Realität. Für eine exakte Darstellung dieser kleinen Strukturen eignen sich Frequenzen im GHz-Bereich (siehe 3.1, 3.7, und 3.13).

Der bemerkenswerteste Unterschied zwischen Messungen im 50-200 MHz Bereich und Messungen ab 400 MHz besteht in der Abbildung der mineralisierten Kollagenmatrix (siehe Abbildung 2-4). Während die Matrix im unteren Frequenzbereich als heterogen, aber innerhalb einzelner Osteone bzw. separater Bereiche interstitiellen Gewebes homogen dargestellt wird,

erkennt man bei höheren Frequenzen eine deutlich ausgeprägte lamelläre Struktur. Die Interpretation dieses periodischen Bildkontrastes ist seit langer Zeit Anlass für Spekulationen über die elastische Mikrostruktur lamellären Knochens. Durch den Vergleich mit hochauflösenden und örtlich überlagerten Messungen der Gewebemineralisierung in (3.4) und (3.7), sowie der Kombination mit mikromechanischen Messungen (3.7) und der Entwicklung eines knochenspezifischen Verbundmodells (3.6) konnten die Beziehungen zwischen Gewebemineralisierung, Struktur und den mit Hilfe akustischer Mikroskopie gemessenen elastischen Eigenschaften geklärt werden.

4.2 Beziehungen zwischen Gewebemineralisierung und Elastizität

4.2.1 Mikroskopische (lamelläre) Ebene

Durch die Kombination von Verteilungsbildern der akustischen Impedanz und der Gewebemineralisierung mit mikroskopischer Auflösung konnte gezeigt werden, dass das charakteristische lamelläre Muster innerhalb eines Osteons (Abbildung 2-4) nicht durch eine Variation der Mineralisierung benachbarter Kollagenfibrillen, sondern vielmehr durch deren elastische Anisotropie hervorgerufen wird.

Des Weiteren wurden in dieser Studie die akustische Impedanz und der mikromechanisch (durch Nanoindentation) gemessene Elastizitätsmodul E_{IT} mit vergleichbarer örtlicher Auflösung gemessen. Eine lineare Regressionsanalyse ergab zwar einen signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern, der Regressionskoeffizient ($R^2 = 0,61$) deutete jedoch auf eine eher moderate Abhängigkeit. Neben den bei beiden Methoden auftretenden Messunsicherheiten und Artefakten bei der örtlichen Überlagerung der Messwerte ist zu vermuten, dass ein beträchtlicher Anteil der nicht durch das Regressionsmodell erklärten Varianz durch die für die Ableitung des Elastizitätsmoduls gemachten Annahmen hervorgerufen wurde. Die Beziehung zwischen elastischem Koeffizienten und Elastizitätsmodul in der x_3 Symmetrierichtung ist exemplarisch für ein orthotropes Material in Gleichung (3-1) gezeigt:

$$E_3 = \frac{(1 + \nu_{12})(1 - \nu_{12} - 2\nu_{13}\nu_{31})}{1 - \nu_{12}^2} \cdot c_{33}, \quad (3-1)$$

wobei ν_{ij} die anisotropen Querkontraktionszahlen sind. Wie in (3.7) theoretisch gezeigt wurde, korreliert die akustische Impedanz mit dem elastischen Koeffizienten c_{ii} , wobei i die Orientierung der elastischen Symmetrieachse ist. Ist die Schallstrahlachse nicht parallel zu einer Symmetrieachse, so erhält man den Koeffizienten durch entsprechende Tensorrotation. Für die Ableitung des Elastizitätsmoduls müssen sowohl für die akustische als auch für die Nanoindentationsmessung die Querkontraktionszahlen bekannt sein. Da letztere bisher experimentell nicht bestimmt werden konnten, wird in der Regel eine konstante, isotrope Querkontraktionszahl von $\nu = 0,3$ angenommen, was für die Nanoindentationsmessung zu einem Fehler von $< 10 \%$ bei der Ableitung von E_{IT} führen kann [66, 67]. Aus Gleichung (3-1) folgt, dass

experimentell eine perfekte Korrelation zwischen akustischer Impedanz nur bei konstanten Querkontraktionszahlen erwartet werden kann, was biomechanisch jedoch nicht sehr wahrscheinlich und durch neue Untersuchungen widerlegt ist [68].

Die Ergebnisse unterstützen das von Giraud-Guille [69, 70] beschriebene „twisted plywood“ Modell, welches aufgrund von Selbstorganisationsmechanismen dicht gepackter Makromoleküle zu einer regulären Ordnungsstruktur führt, in dem benachbarte Kollagenfibrillen entweder parallel oder in einem relativ konstantem Winkel von ca. 30° verdreht zueinander stehen. In Anlehnung an das Modell wird eine lamelläre Einheit aus 6 aufeinander folgenden Schichten mit sukzessiver Verkippung gebildet (Abbildung 1-1b), wobei die Dicke der einzelnen Schichten variabel ist („asymmetric twisted plywood“). Da die einzelnen Kollagenfibrillen aufgrund des geordneten Einbaus von Hydroxylapatitkristallen transversal isotrope Eigenschaften aufweisen, repräsentieren die mit hochauflösenden akustischen Messungen sichtbaren alternierenden Impedanzwerte die in verschiedenen Richtungen gemessenen anisotropen Eigenschaften transversal isotroper Kollagenfibrillen (siehe 3.13). Durch Kombination mit mikromechanischen Deformationsanalysen können so die resultierenden Verbundeigenschaften auf der nächsthöheren (mesoskopischen) Gewebeebene realistisch modelliert werden [24].

4.2.2 Mesoskopische (Gewebe-) Ebene

200-MHz Impedanzverteilungsbilder humaner Knochenschnitte wurden mit hochauflösenden SR- μ CT Mineralisierungsbildern überlagert, um ortsaufgelöst den elastischen Koeffizienten c_{33} abzuleiten (3.4). Dazu war die Entwicklung eines Kompositmodells notwendig, welches die Abhängigkeit der Massendichte ρ vom Mineralisierungswert DMB erklärt (3.6). Mit dem Modell konnte gezeigt werden, dass die Massendichte sehr gut den Volumenanteil der Mineralphase (repräsentiert durch den gemessenen DMB Wert) korreliert ($R^2 = 0,999$):

$$\rho_{tissue} = 1.12 \text{ g cm}^{-3} + 0.73 \cdot DMB - 0.033 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \cdot DMB^2, \quad (3-2)$$

Die Gültigkeit des Modells konnte anhand eines Vergleichs mit Literaturdaten verschiedener mineralisierter Gewebe, die einen weiten Bereich unterschiedlicher Mineralisierungsgrade aufwiesen, verifiziert werden.

Der abgeleitete elastische Koeffizient c_{33} korrelierte wesentlich stärker mit der akustischen Impedanz ($R^2 = 0.996$) als mit der Massendichte ($R^2 = 0,310$). Daraus folgt, dass c_{33} direkt aus der akustischen Messung abgeleitet werden kann (Abbildung 4-1):

$$c_{33} = 1.31 + 0.075Z + 0.50Z^2. \quad (3-3)$$

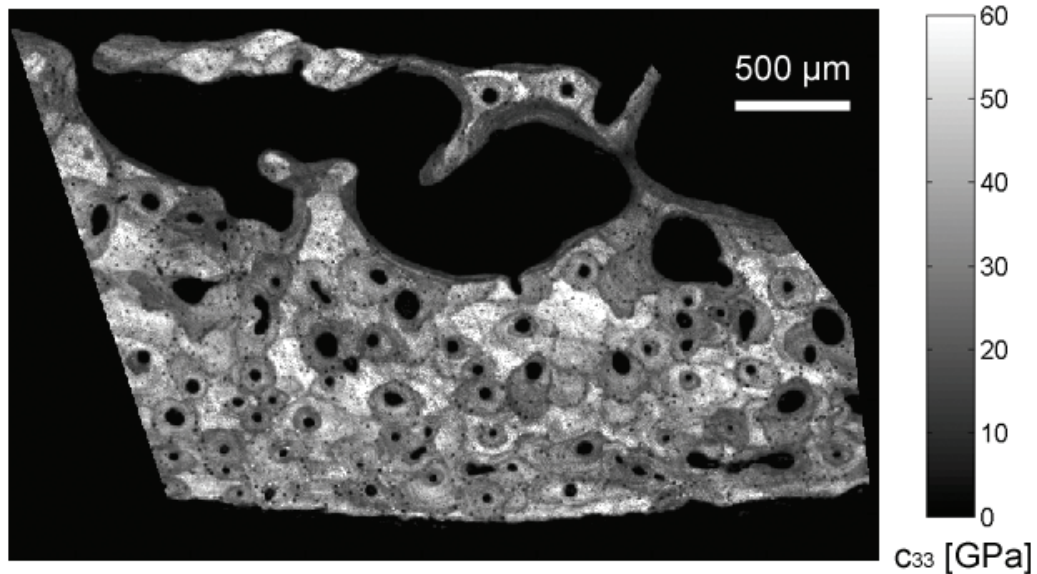


Abbildung 4-1 Ein aus einer 200-MHz Messung abgeleitetes Verteilungsbild des elastischen Koeffizienten c_{33} . Die Messung zeigt einen Ausschnitt eines nativ gemessenen humanen Radiusquerschnitts.

Das in Abbildung 4-1 dargestellte c_{33} -Verteilungsbild repräsentiert pro Bildpunkt nur einen von fünf elastischen Koeffizienten, die zur korrekten Beschreibung des mechanischen Verhaltens notwendig sind. Eine experimentelle lokal aufgelöste Erfassung aller Koeffizienten ist mit keiner der derzeit verfügbaren Methoden möglich. Um dennoch eine Abschätzung über die elastische Anisotropie zu machen, wurden in der Vergangenheit oft Proben mit verschiedenen Schnittorientierungen untersucht [33, 35, 71-75]. Dieser Ansatz birgt jedoch eine Vielzahl von Limitationen. Neben dem erheblichen Messaufwand kann prinzipiell nur eine begrenzte Anzahl von Schnittwinkeln untersucht werden, die zudem nicht aus dem gleichen Probenareal stammen. Um verlässlichere Informationen aus möglichst kleinen Untersuchungsvolumen zu erhalten, wurde eine spezielle Messmethode entwickelt, bei der die Oberfläche von Knochenstanzzyllindern (Durchmesser: 4,4 mm) mit einer Frequenz von 50 MHz abgetastet wird (3.7).

Für Messwinkel, die parallel zu den elastischen Symmetrieachsen verlaufen, ist die gemessene Impedanz proportional zum entsprechenden elastischen Koeffizienten, d.h. in longitudinaler (x_3)-Richtung: $Z_3 \sim c_{33}$, und in radialer (x_1) bzw. tangentialer (x_2)-Richtung: $Z_1 \sim c_{11}$ und $Z_2 \sim c_{22}$. Für osteonales Gewebe (ohne Havers-Kanäle) gibt es im Gegensatz zu den äußeren und inneren Generallamellen aufgrund der Rotation der Lamellen um die Kanalachse keine Vorzugsorientierung in x_1 und x_2 Richtung, so dass man transversal isotrope Eigenschaften mit ($c_{11} = c_{22} < c_{33}$) annehmen kann. Theoretisch konnte gezeigt werden, dass die bei der Rotation der Probe gemessene winkelabhängige Impedanz auch für beliebige Winkel mit entsprechenden durch Tensorrotation gewonnenen elastischen Koeffizienten korreliert. Anders als die elastische Deformation bei einer Kompression parallel zu einer Symmetrieachse wird eine Deformation in beliebiger Richtung in der Regel durch mehrere elastische Koeffizienten bestimmt. Für ein

transversal isotropes Material ergibt sich der „scheinbare“ elastische Koeffizient $c(\theta)$ bei Änderung der Belastungsrichtung um den Winkel θ von der x_3 Richtung in die x_1x_2 Ebene:

$$c(\theta) = c_{33} \cos^4 \theta + 2(c_{13} + 2c_{44}) \sin^2 \theta \cos^2 \theta + c_{11} \sin^4 \theta. \quad (3-3)$$

Aus (3-3) folgt, dass der winkelabhängige Impedanzverlauf auch durch die Koeffizienten c_{13} und c_{44} bestimmt wird. Durch zusätzliche Kontinuumsmechanische Modellrestriktionen für die kortikale Mikrostruktur [63] konnten erstmals experimentell alle 5 Koeffizienten des transversal isotropen elastischen Tensors (siehe Gleichung 1-2) des Knochengewebes innerhalb kleiner Knochenstanzbiopsien und zusätzlich mikrostrukturelle Parameter abgeschätzt werden.

Die *mesoskopischen* Eigenschaften des kortikalen Knochens ergeben sich aus den heterogenen und anisotropen elastischen Eigenschaften der mineralisierten Gewebematrix und der durch Kavitäten gebildeten porösen Mikrostruktur (siehe Abbildung 4-1). Diese wurden in 3.12 mit Hilfe eines numerischen Deformationsmodells bestimmt.

4.3 Einfluss frakturrelevanter Knocheneigenschaften auf die axiale Ultraschalltransmission

In 3.3 wurden die Einflüsse von Gewebemineralisierung und –elastizität sowie Strukturparametern (Kortikalisdicke, Anzahl, Größe und Verteilung von Havers-Kanälen) auf die axiale Ausbreitungsgeschwindigkeit bei 1 und 2 MHz am humanen Radius *in vitro* untersucht. Wie in einer vorausgegangenen numerischen Untersuchung vorhergesagt [50], gab es einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des „First Arriving Signal“ (SOS_{FAS}) und dem Verhältnis von Kortikalisdicke zur Wellenlänge aufgrund des Übergangs von einer Kompressionswellenausbreitung (bei großen Dicken) zu einer S_0 -Plattenschwingung (bei kleinen Dicken). Außerdem waren insbesondere die Material- und Struktureigenschaften in Periostnähe für die gemessene Geschwindigkeit des FAS verantwortlich. Signifikante lineare multivariate Regressionsmodelle ($R^2 = 0,65 - 0,84$) wurden für Kombinationen von Kortikalisdicke und Porosität mit akustischer Impedanz, aber nicht mit DMB gefunden. Ein nichtlineares Modell wurde entwickelt, mit dem SOS_{FAS} als Funktion der oben genannten Parameter beschrieben wird. Bemerkenswert ist, dass die akustische Impedanz des Gewebes den stärksten Einfluss auf die Varianz von SOS_{FAS} hatte. Nach Kompensation der Einflüsse von Porosität und der nichtlinearen Abhängigkeit von der Kortikalisdicke konnten 70 % der verbleibenden Varianz von SOS_{FAS} durch Schwankungen der akustischen Impedanz (d.h. der Gewebelastizität) erklärt werden.

Wie in 2.2 gezeigt, wird die Kompressionswellenausbreitung durch den mesoskopischen elastischen Koeffizienten c_{33eff} bestimmt. Die Geschwindigkeit der S_0 -Welle hängt nach Gleichung (2-2) von mehreren elastischen Koeffizienten ab. Diese Koeffizienten lassen sich wiederum durch Kenntnis der mikroskopischen heterogenen, anisotropen Matrixelastizität und der porösen Mikrostruktur durch numerische Homogenisierungsmodelle abschätzen (siehe 3.12). In einer weiteren Studie (3.4) wurden deshalb systematisch die regionale Verteilung und Anisotropie der

akustischen Impedanz und verschiedener Mikrostrukturparameter im Radius untersucht. Diese Daten bilden momentan die Basis für eine Verbesserung der bereits mit hochauflösenden SR- μ CT Datensätzen realisierten Schallausbreitungssimulationsstudien [76].

4.4 Einfluss von Struktur und Gewebeelastizität auf die Frakturresistenz nach Kallusdistraktion

In einer tierexperimentellen Studie wurde an 26 Merino-Schafen eine middiaphysäre Kallusdistraktion der Tibia durchgeführt. Untersucht wurde der Erfolg verschiedener Therapiestrategien nach inhibierter Kallusbildung und Distraktion durch ein externes Fixateursystem. Die Folgenden Therapiestrategien wurden randomisiert in 4 Untersuchungsgruppen appliziert:

- A – Implantation einer mit humanen IGF-I und TGF- β 1 beschichteten Poly(D,L)-Laktid (PDLLA) Membran im Zentrum der Distraktionszone,
- B – unbeschichtete (PDLLA) Membran im Zentrum der Distraktionszone (Kontrolle),
- C – Behandlung mit autologer Spongiosa aus dem Humeruskopf (Goldstandard),
- D – Kombination von B und C.

Acht Wochen nach Abschluss der Distraktionsphase wurden die Tiere geopfert. Sowohl die behandelten als auch die kontralateralen Tibiaschäfte wurden einem biomechanischen 4-Punkt-Biegetest unterzogen. Anschließend wurden die behandelten Schäfte repositioniert und in PMMA eingebettet. Abschließend wurden an eingebetteten Schnittpräparaten mit Hilfe von 50-MHz Impedanzmessungen sowohl anisotrope elastische als auch mikro- und makrostrukturelle Parameter des neu gebildeten Kallusgewebes und des angrenzenden kortikalen Knochens analysiert und mit der gemessenen Frakturkraft korreliert.

Wie bereits zuvor an Kleintiermodellen gezeigt [18, 19, 77], führte die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 zu einer Verbesserung der Kallusheilung. Sowohl die absoluten Impedanzwerte als auch die Anisotropieverhältnisse waren zum Untersuchungszeitpunkt im Kallusgewebe im Vergleich zum benachbarten kortikalem Knochen signifikant niedriger. Insbesondere die erniedrigte Anisotropie lässt darauf schließen, dass sich das neugebildete Kallusgewebe nicht nur durch eine geringere Mineralisationsrate, sondern auch durch eine unterschiedliche Ultrastruktur unterscheidet. Im Verlauf des Heilungsprozesses durchläuft das Gewebe eine Reihe von Knochenneubildungs-, -resorptions- und -umbauphasen, an deren Ende kortikales Gewebe mit charakteristischen elastischen Eigenschaften entsteht, die an die lokalen mechanischen Bedingungen perfekt angepasst sind. Die akustische Impedanz und insbesondere das elastische Anisotropieverhältnis kann deshalb als ein quantitativer Indikator dafür angesehen werden, inwieweit das neugebildete Gewebe seine funktionale Kompetenz wiedererlangt hat.

Neben den elastischen Materialparametern wurden verschiedene Mikro- und Makrostrukturparameter aus den hochaufgelösten Impedanzbildern abgeleitet. Mit Hilfe von schrittweiser Regressionsanalysen konnte ein Satz von Parametern identifiziert werden, mit dem

die im biomechanischen Biegeversuch ermittelte Frakturkraft mit einer wesentlich höheren Genauigkeit beschrieben werden konnte als in früheren Studien ($R^2 = 0,86$, $p < 0.0005$). Durch das Modell wurden 37,5 % der Varianz der Frakturkraft durch strukturelle Parameter und 48,5 % elastische Parametervariationen erklärt. Bemerkenswert war, dass einzelne Parameter zu keinem signifikanten Modell führten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Komplexität von strukturellen und elastischen Eigenschaften, welche die makroskopischen mechanischen Eigenschaften des gesamten Organs bestimmen. So trugen nicht nur die Eigenschaften des Kallus, sondern auch die des angrenzenden kortikalen Gewebes maßgeblich zu der resultierenden Frakturresistenz bei. Interessanterweise war der Korrelationskoeffizient für die akustische Impedanz in der transversalen Richtung negativ, was bedeutet, dass ein flexibleres kortikales Gewebe bei einer Biegung zu einer Ableitung der aufgetragenen Spannung und damit zu einer Reduzierung der mechanischen Spannung im Kallus führt.

4.5 Elastische Knochenphänotypisierung

In 3.10 und 3.11 wurden Femurproben von 5,5-Monate alten C3H/HeJ@Ico (C3H) und C57BL/6J@Ico (B6) Mäusen mit SR- μ CT und 200-MHz SAM untersucht. Die beiden verwendeten Mausstämme weisen deutliche Unterschiede in der Mikrostruktur und der maximalen Knochenmineraldichte auf [7, 9, 78, 79] und sollten sich daher gut eignen, um Variationen von Knochenmineralisierung und Elastizität auf der Gewebeebene nachzuweisen. Verteilungsbilder der akustischen Impedanz Z und Gewebemineralisierung DMB transversaler Femurschnitte wurden räumlich überlagert. Innerhalb kleiner manuell ausgewählter Regionen verschiedener anatomischer Regionen (distale Epiphyse, distale Metaphyse, trabekulärer Knochen) wurden aus den gemessenen Z und DMB Werten Massendichte ρ , elastischer Koeffizient c_{11} und Elastizitätsmodul E_l lokal abgeleitet und in Abhängigkeit von anatomischer Messregion und Mausstamm verglichen.

Beide Messmethoden haben eine ausreichende Auflösung, um Strukturparameter präzise abzuleiten. Sowohl DMB als auch Z waren in den B6-Mäusen signifikant niedriger als in C3H-Mäusen. Die relativen DMB -Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen waren jedoch wesentlich geringer ($\leq 3,8\%$) als die Impedanzunterschiede ($\leq 13,2\%$). Analog zur den Untersuchungen am humanen Radius war auch hier der elastische Koeffizient c_{11} sehr stark mit Z ($R^2 = 0,99$) korreliert. Eine Korrelation zwischen DMB und c_{11} konnte hingegen nicht festgestellt werden ($R^2 = 0,13$).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ultraschall bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Untersuchung funktionaler elastischer Eigenschaften von Knochengewebe. Durch Variation der Wellenlänge über vier Größenordnungen lässt sich das Messvolumen an die verschiedenen hierarchischen Strukturebenen anpassen. Ableitbare akustische Parameter, wie z.B. die akustische Impedanz, Schallgeschwindigkeiten verschiedener Wellenausbreitungsmodi und Dämpfung sind mit elastischen und strukturellen Parametern des Gewebes verknüpft. Aufgrund des hierarchischen Aufbaus von lamellärem Knochen ergeben sich die elastischen Eigenschaften auf jeder Strukturebene aus den resultierenden Verbundeigenschaften der jeweils tieferen Strukturebene. Die mechanische Funktion und Frakturfestigkeit von kortikalem Knochen werden hauptsächlich durch die heterogenen elastischen Eigenschaften des Gewebes und die poröse Mikrostruktur bestimmt.

Die Methode der hochauflösenden zweidimensionalen Abbildung der akustischen Impedanz wurde von einem semiquantitativen Verfahren zu einem attraktiven mikromechanischen Untersuchungsverfahren für mineralisierte Gewebe weiterentwickelt. Eine zuverlässige Abschätzung der konfokalen Reflexionsamplitude unter Berücksichtigung der Oberflächentopographie (Rauigkeit, lokale Neigung) und Defokussierung wurde sowohl für zeitaufgelöste Messungen als auch für Messungen mit Amplitudendetektion erreicht. Durch eine Anpassung der Ultraschallfrequenz an die zu untersuchende Strukturebene können schnell elastische Verteilungsbilder der Mesostruktur als auch die anisotropen elastischen Eigenschaften der lamellären Mikrostruktur gewonnen werden. Die hochauflösende bildliche Darstellung elastischer Parameter erlaubt darüber hinaus die genaue Bestimmung mikrostruktureller Parameter. Für anisotrope Materialien wird die akustische Impedanz durch einen Tensor Z^n beschrieben. Dessen Koeffizienten ergeben sich aus Massendichte und den Koeffizienten des elastischen Tensors C_{IJ} . Momentan ist keine der momentan verfügbaren experimentellen Methoden in der Lage, das komplexe Zusammenspiel von Komposition, Struktur und den daraus resultierenden anisotropen elastischen Eigenschaften zu erfassen. eingesetzt. Durch die Kombination mit komplementären Methoden (Synchrotron- μ CT, Ramanspektroskopie, Nanoindentation) konnte jedoch gezeigt werden, dass aus der in anisotropen Materialien gemessenen konfokalen Ultraschallreflexionsamplitude direkt elastische Koeffizienten abgeleitet werden können. Messungen in Richtung elastischer Symmetrieebenen (z.B. parallel und senkrecht zur Knochenlängsachse) im kortikalen Gewebe waren hoch korreliert ($R^2 > 0,99$) mit den korrespondierenden elastischen Koeffizienten c_{11} und c_{33} . Für beliebige Orientierungen ergibt sich die Reflexionsamplitude durch entsprechende Rotation des elastischen Tensors. Aus winkelabhängigen Messungen der Reflexionsamplitude an kleinen Knochenstanzzyklindern konnten durch zusätzliche kontinuumsmechanische Modellannahmen alle Koeffizienten des elastischen Tensors der Gewebematrix bestimmt werden.

Quantitative akustische Mikroskopie ist momentan das einzige Verfahren, mit dem die heterogene Verteilung anisotroper elastischer Parameter schnell und zerstörungsfrei bestimmt werden kann. Diese Daten liefern realistische Eingangsgrößen für numerische Deformations- oder Schallausbreitungsanalysen [65]. Solche Modelle sind essentiell, um neue nichtinvasive diagnostische Methoden zu entwickeln, die z.B. eine bessere Vorhersage des individuellen Frakturrisikos oder des Therapieerfolges erlauben.

Die Untersuchung anisotroper elastischer Eigenschaften auf der lamellaren Ebene mit Ultraschall im GHz-Bereich kann zudem neue Erkenntnisse über den natürlichen Knochenumbau, z.B. während der Frakturheilung, oder im Verlauf von pathologischen Veränderungen, natürlicher Alterung und Anpassung an veränderte Lastverhältnisse an Knochen-Implantatgrenzen nach endoprothetischen Therapien liefern.

Das Potential der kombinierten Erfassung von Struktur- und Elastizitätsparametern wurde in verschiedenen Studien gezeigt. In der in 3.3 vorgestellten *in-vitro* Studie wurden die zuvor theoretisch postulierten Einflüsse von Struktur, Gewebemineralisierung und –elastizität auf die bei der diagnostisch (*in vivo*) eingesetzten axialen Ultraschalltransmission abgeleitete Geschwindigkeit des „First Arriving Signals“ am humanen Radius experimentell bestätigt. Darüber hinaus konnte basierend auf den SAM-Daten ein neues Modell entwickelt werden, welches *FAS* als nichtlineare Funktion der frakturbestimmenden Parameter, Porosität, kortikaler Dicke und Gewebeimpedanz beschreibt. Die Erkenntnisse über die nichtlineare Dispersionsbeziehung zwischen *FAS* und kortikaler Dicke bilden momentan die Basis für die Entwicklung neuer Multi-Frequenz Systeme, mit denen in Zukunft die kortikale Dicke separat von Porosität und Elastizität abgeleitet werden soll.

Hochaufgelöste mikroelastische Impedanzbilder bieten insbesondere für die Untersuchung von De- und Regeneration, Pathologien, und des Erfolgs neuer Therapiekonzepte an Tiermodellen bisher nicht mögliche neue Einblicke. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die kombinierte Erfassung von Mikrostruktur und anisotropen elastischen Parametern in einem Kallusdistraktionsmodell die zur Fraktur führende Kraft mit einer sehr hohen Genauigkeit abgeschätzt werden kann. Andererseits wurde gezeigt, dass genetische Einflüsse auf den elastischen Knochenphänotyp am Mausmodell diskriminiert werden können [80, 81]. Die Sensitivität akustischer Mikroskopie auf elastische Gewebeveränderungen in Verbindung mit der hohen örtlichen Diskriminierung lassen in Zukunft Studien zu, welche eine Quantifizierung des elastisch-funktionalen Verlaufs und Erfolges von pathologiespezifischen Behandlungsstrategien auf der Gewebeebene erlauben [82].

Sowohl SAM als auch SR- μ CT erfüllen die Voraussetzung, die kortikale Mikrostruktur und heterogenen Materialeigenschaften auf der Gewebeebene bestimmen zu können. Während die akustische Messung ein direktes Abbild anisotroper elastischer Eigenschaften repräsentiert, erlauben mikroradiographische Verfahren eine Beurteilung der Gewebemineralisierung. Diese

komplementären Materialeigenschaften liefern in Abhängigkeit von der spezifischen Fragestellung einzeln oder in Kombination ein komplexes Bild der Zusammenhänge zwischen Komposition, Struktur und resultierender mechanischer Funktion des kortikalen Knochens.

6 AUSBLICK

In den letzten Jahren haben sich quantitative Ultraschallmethoden (QUS) als viel versprechende Alternativen zur radiologischen Erfassung der Knochenfragilität und der Osteoporosediagnostik etabliert. Die Möglichkeit, mit QUS zwischen gesundem und osteoporotisch verändertem Knochen zu unterscheiden, wurde in einer Reihe von Studien gezeigt. Die QUS-Methoden nutzen die Eigenschaft, dass die Ultraschallausbreitung durch Knochen sowohl von den elastischen Eigenschaften des Knochengewebes, aber auch von mikro- und makrostrukturellen Eigenschaften abhängen, welche wiederum maßgeblich die biomechanischen Eigenschaften des gesamten Organs bestimmen. Wenngleich eine prognostische Gleichwertigkeit der etablierten Ultraschallverfahren gegenüber DEXA belegt wurde (beide Verfahren ermitteln, jeweils für sich betrachtet, vergleichbare relative Risiken für Frakturen innerhalb eines Beobachtungszeitraums von $\frac{1}{2}$ bis $5\frac{1}{2}$ Jahren), verhindern eine Reihe von Faktoren bisher eine allgemeine Akzeptanz der QUS-Methoden. Die wissenschaftliche Fundierung der Korrelation gemessener US-Signale mit elastischen Eigenschaften stellt gegenwärtig einen Schwerpunkt des Deutsch-Französischen Forschungsnetzwerkes „Ultrasound assessment of bone strength from the tissue level to the organ level“ dar. Neben der Fortführung und Fokussierung physikalischer Grundlagen- und krankheitsbezogenen Forschung ist eine Translation der entwickelten Methoden in die klinische Forschung notwendig. Dazu zählt insbesondere die Einbindung von QUS zur Beurteilung der Effizienz neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Osteopathien. Hochauflösende akustische Mikroskopie ist zur Validierung dieser Methoden, aber auch zur Beantwortung einer Vielzahl von anderen mechanisch funktionellen Fragestellungen an verschiedenen muskuloskelettalen Systemen (Knochen, Knorpel, Muskel, Zellen) ein wertvolles Tool.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Consensus development conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, *American Journal of Medicine* **1993** (94), 1993, 646-650.
- [2] Gluer,C.C., Quantitative ultrasound techniques for the assessment of osteoporosis: expert agreement on current status. The International Quantitative Ultrasound Consensus Group, *J Bone Miner. Res.* **12** (8), 1997, 1280-1288.
- [3] Chen,P., Miller,P.D., Recker,R., Resch,H., Rana,A., Pavo,I., Sipos,A.A., Increases in BMD correlate with improvements in bone microarchitecture with teriparatide treatment in postmenopausal women with osteoporosis, *J Bone Miner. Res* **22** (8), 2007, 1173-1180.
- [4] Judex,S., Garman,R., Squire,M., Donahue,L.R., Rubin,C., Genetically based influences on the site-specific regulation of trabecular and cortical bone morphology, *J Bone Miner. Res.* **19** (4), 2004, 600-606.
- [5] Turner,C.H., Hsieh,Y.F., Muller,R., Bouxsein,M.L., Rosen,C.J., McCrann,M.E., Donahue,L.R., Beamer,W.G., Variation in bone biomechanical properties, microstructure, and density in BXH recombinant inbred mice, *J Bone Miner. Res.* **16** (2), 2001, 206-213.
- [6] Akhter,M.P., Iwaniec,U.T., Covey,M.A., Cullen,D.M., Kimmel,D.B., Recker,R.R., Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice, *Calcif. Tissue Int.* **67** (4), 2000, 337-344.
- [7] Turner,C.H., Hsieh,Y.F., Muller,R., Bouxsein,M.L., Baylink,D.J., Rosen,C.J., Grynpas,M.D., Donahue,L.R., Beamer,W.G., Genetic regulation of cortical and trabecular bone strength and microstructure in inbred strains of mice, *J Bone Miner. Res.* **15** (6), 2000, 1126-1131.
- [8] Akhter,M.P., Cullen,D.M., Pedersen,E.A., Kimmel,D.B., Recker,R.R., Bone response to in vivo mechanical loading in two breeds of mice, *Calcif. Tissue Int.* **63** (5), 1998, 442-449.
- [9] Beamer,W.G., Donahue,L.R., Rosen,C.J., Baylink,D.J., Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice, *Bone* **18** (5), 1996, 397-403.
- [10] Akhter,M.P., Fan,Z., Rho,J.Y., Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains, *Calcif. Tissue Int.* **75** (5), 2004, 416-420.
- [11] Slemenda,C.W., Turner,C.H., Peacock,M., Christian,J.C., Sorbel,J., Hui,S.L., Johnston,C.C., The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density, *Osteoporos. Int.* **6** (2), 1996, 178-182.
- [12] Slemenda,C.W., Christian,J.C., Reed,T., Reister,T.K., Williams,C.J., Johnston,C.C., Jr., Long-term bone loss in men: effects of genetic and environmental factors, *Ann. Intern. Med.* **117** (4), 1992, 286-291.
- [13] Slemenda,C.W., Christian,J.C., Williams,C.J., Norton,J.A., Johnston,C.C., Jr., Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the

- potential importance of gene interaction on heritability estimates, *J Bone Miner. Res.* **6** (6), 1991, 561-567.
- [14] Pocock,N.A., Eisman,J.A., Hopper,J.L., Yeates,M.G., Sambrook,P.N., Eberl,S., Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study, *J Clin. Invest* **80** (3), 1987, 706-710.
- [15] van Lenthe,H., Voide,R., Muller,R., Beam theory strongly underestimates bone tissue properties in a murine model of bone genetics, *J. Biomech.* **39** (Suppl. 1), 2006, S18.
- [16] Trippel,S.B., Growth factors as therapeutic agents, *Instr. Course Lect.* **46** 1997, 473-476.
- [17] Mehrara,B.J., Most,D., Chang,J., Bresnick,S., Turk,A., Schendel,S.A., Gittes,G.K., Longaker,M.T., Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1 expression in the developing dura mater correlates with calvarial bone formation, *Plast Reconstr. Surg.* **104** (2), 1999, 435-444.
- [18] Schmidmaier,G., Wildemann,B., Heeger,J., Gabelein,T., Flyvbjerg,A., Bail,H.J., Raschke,M., Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1, *Bone* **31** (1), 2002, 165-172.
- [19] Wildemann,B., Bamdad,P., Holmer,C., Haas,N.P., Raschke,M., Schmidmaier,G., Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats, *Bone* **34** (5), 2004, 862-868.
- [20] Reichel,H., Lebek,S., Alter,C., Hein,W., Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep, *Clin. Orthop. Relat Res.* (357), 1998, 237-246.
- [21] Markel,M.D., Chao,E.Y., Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties, *Clin. Orthop Relat Res* (293), 1993, 37-45.
- [22] Augat,P., Merk,J., Genant,H.K., Claes,L., Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography, *Calcif. Tissue Int.* **60** (2), 1997, 194-199.
- [23] Rho,J.Y., Kuhn-Spearing,L., Zioupos,P., Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Med. Eng Phys.* **20** (2), 1998, 92-102.
- [24] Raum,K., Grimal,Q., Gerisch,A., A finite element model of the lamellar osteonal structure based on ultrahigh frequency acoustic impedance data, *J Acoust. Soc. Am.* **123** (5), 2008, 3635.
- [25] Katz,J.L., Yoon,H.S., The structure and anisotropic mechanical properties of bone, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **31** (12), 1984, 878-884.
- [26] Yoon,H.S., Katz,J.L., Ultrasonic wave propagation in human cortical bone-I. Theoretical considerations for hexagonal symmetry, *J. Biomech.* **9** (6), 1976, 407-412.
- [27] Hoffler,C.E., Moore,K.E., Kozloff,K., Zysset,P.K., Brown,M.B., Goldstein,S.A., Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli, *Bone* **26** (6), 2000, 603-609.

- [28] Rho, J.Y., Zioupos, P., Currey, J.D., Pharr, G.M., Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation, *J. Biomech.* **35** (2), 2002, 189-198.
- [29] Zysset, P.K., Guo, X.E., Hoffler, C.E., Moore, K.E., Goldstein, S.A., Mechanical properties of human trabecular bone lamellae quantified by nanoindentation, *Technol. Health Care* **6** (5-6), 1998, 429-432.
- [30] Ashman, R.B., Cowin, S.C., Rho, J.Y., Van Buskirk, W.C., Rice, J.C., A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone, *J. Biomech.* **17** (5), 1984, 349-361.
- [31] Rho, J.Y., An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone, *Ultrasonics* **34** (8), 1996, 777-783.
- [32] Pithioux, M., Lasaygues, P., Chabrand, P., An alternative ultrasonic method for measuring the elastic properties of cortical bone, *J. Biomech.* **35** (7), 2002, 961-968.
- [33] Hasegawa, K., Turner, C.H., Burr, D.B., Contribution of collagen and mineral to the elastic anisotropy of bone, *Calcif. Tissue Int.* **55** (5), 1994, 381-386.
- [34] Hasegawa, K., Turner, C.H., Recker, R.R., Wu, E., Burr, D.B., Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy, *Bone* **16** (1), 1995, 85-90.
- [35] Turner, C.H., Rho, J.Y., Takano, Y., Tsui, T.Y., Pharr, G.M., The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques, *J. Biomech.* **32** (4), 1999, 437-441.
- [36] Laugier, P., Wear, K.A., Waters, K.R., Introduction to the Special Issue on diagnostic and therapeutic applications of ultrasound in bone - Part II, *IEEE Trans. Ultrason. , Ferroelect. , Freq. Contr.* **55** (7), 2008, 1415-1416.
- [37] Laugier, P., Wear, K.A., Waters, K.R., Introduction to the special issue on diagnostic and therapeutic applications of ultrasound in bone - Part I, *IEEE Trans. Ultrason. , Ferroelect. , Freq. Contr.* **55** (6), 2008, 1177-1178.
- [38] Laugier, P., Instrumentation for in vivo ultrasonic characterization of bone strength, *IEEE Trans. Ultrason. , Ferroelect. , Freq. Contr.* **55** (6), 2008, 1179-1196.
- [39] Muller, M., Mitton, D., Talmant, M., Johnson, P., Laugier, P., Nonlinear ultrasound can detect accumulated damage in human bone, *J Biomech.* **41** (5), 2008, 1062-1068.
- [40] Lemons, R.A., Quate, C.F., Acoustic microscope - scanning version, *Appl. Phys. Lett.* **24** 1974, 163-165.
- [41] Raum K. Ultrasonic characterization of hard tissues. In: Kundu T (ed.), *Ultrasonic Nondestructive Evaluation: Engineering and Biological Material Characterization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2003: 761-781.

- [42] Raum,K., Kempf,K., Hein,H.J., Schubert,J., Maurer,P., Preservation of microelastic properties of dentin and tooth enamel in vitro--a scanning acoustic microscopy study, *Dent. Mater.* **23** (10), 2007, 1221-1228.
- [43] Briggs GA. *Acoustic Microscopy*. Oxford: Clarendon Press; 1992.
- [44] Maev,R.G., Denisova,L.A., Maeva,E.Y., Denissoy,A.A., New data on histology and physico-mechanical properties of human tooth tissue obtained with acoustic microscopy, *Ultrasound Med. Biol.* **28** (1), 2002, 131-136.
- [45] Peck,S.D., Rowe,J.M., Briggs,G.A., Studies on sound and carious enamel with the quantitative acoustic microscope, *J. Dent. Res.* **68** (2), 1989, 107-112.
- [46] Peck,S.D., Briggs,G.A., A scanning acoustic microscope study of the small caries lesion in human enamel, *Caries Res.* **20** 1986, 356-360.
- [47] Raum,K., Microelastic imaging of bone, *IEEE Trans. Ultrason. , Ferroelect. , Freq. Contr.* **55** (7), 2008, 1417-1431.
- [48] Raum,K., Jenderka,K.V., Klemenz,A., Brandt,J., Multilayer analysis: Quantitative scanning acoustic microscopy for tissue characterization at a microscopic scale, *IEEE Trans. Ultrason. , Ferroelect. , Freq. Contr.* **50** (5), 2003, 507-516.
- [49] Bossy,E., Talmant,M., Defontaine,M., Patat,F., Laugier,P., Bidirectional axial transmission can improve accuracy and precision of ultrasonic velocity measurement in cortical bone: a validation on test materials, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **51** (1), 2004, 71-79.
- [50] Bossy,E., Talmant,M., Laugier,P., Three-dimensional simulations of ultrasonic axial transmission velocity measurement on cortical bone models, *J. Acoust. Soc. Am.* **115** (5 Pt 1), 2004, 2314-2324.
- [51] Bossy,E., Talmant,M., Laugier,P., Effect of bone cortical thickness on velocity measurements using ultrasonic axial transmission: a 2D simulation study, *J. Acoust. Soc. Am.* **112** (1), 2002, 297-307.
- [52] Bossy,E., Talmant,M., Peyrin,F., Akrouy,L., Cloetens,P., Laugier,P., An in vitro study of the ultrasonic axial transmission technique at the radius: 1-MHz velocity measurements are sensitive to both mineralization and intracortical porosity, *J. Bone Miner. Res.* **19** (9), 2004, 1548-1556.
- [53] Sievanen,H., Cheng,S., Ollikainen,S., Uusi-Rasi,K., Ultrasound velocity and cortical bone characteristics in vivo, *Osteoporos. Int.* **12** (5), 2001, 399-405.
- [54] Salome,M., Peyrin,F., Cloetens,P., Odet,C., Laval-Jeantet,A.M., Baruchel,J., Spanne,P., A synchrotron radiation microtomography system for the analysis of trabecular bone samples, *Med. Phys.* **26** (10), 1999, 2194-2204.

- [55] Nuzzo,S., Peyrin,F., Cloetens,P., Baruchel,J., Boivin,G., Quantification of the degree of mineralization of bone in three dimensions using synchrotron radiation microtomography, *Med. Phys.* **29** (11), 2002, 2672-2681.
- [56] Carden,A., Morris,M.D., Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review), *J. Biomed. Opt.* **5** (3), 2000, 259-268.
- [57] Timlin,J.A., Carden,A., Morris,M.D., Chemical microstructure of cortical bone probed by Raman transects, *Applied Spectroscopy* **53** (11), 1999, 1429-1435.
- [58] Timlin,J.A., Carden,A., Morris,M.D., Bonadio,J.F., Hoffler,C.E., Kozloff,K.M., Goldstein,S.A., Spatial distribution of phosphate species in mature and newly generated mammalian bone by hyperspectral Raman imaging, *Journal of Biomedical Optics* **4** (1), 1999, 28-34.
- [59] Akkus,O., Polyakova-Akkus,A., Adar,F., Schaffler,M.B., Aging of microstructural compartments in human compact bone, *J. Bone Miner. Res.* **18** (6), 2003, 1012-1019.
- [60] Timlin,J.A., Carden,A., Morris,M.D., Rajachar,R.M., Kohn,D.H., Raman spectroscopic imaging markers for fatigue-related microdamage in bovine bone, *Anal. Chem.* **72** (10), 2000, 2229-2236.
- [61] Carden,A., Rajachar,R.M., Morris,M.D., Kohn,D.H., Ultrastructural changes accompanying the mechanical deformation of bone tissue: a Raman imaging study, *Calcif. Tissue Int.* **72** (2), 2003, 166-175.
- [62] Oliver,W.C., Pharr,G.M., An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mat. Res.* **7** 1992, 1564-1583.
- [63] Hellmich,C., Ulm,F.J., Dormieux,L., Can the diverse elastic properties of trabecular and cortical bone be attributed to only a few tissue-independent phase properties and their interactions? Arguments from a multiscale approach, *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2** (4), 2004, 219-238.
- [64] Hellmich,C., Barthelemy,J.F., Dormieux,L., Mineral-collagen interactions in elasticity of bone ultrastructure - a continuum micromechanics approach, *European Journal of Mechanics A-Solids* **23** (5), 2004, 783-810.
- [65] Grimal,Q., Raum,K., Gerisch,A., Laugier,P., Derivation of the mesoscopic elasticity tensor of cortical bone from quantitative impedance images at the micron scale, *Comput. Methods Biomech. Biomed Engin.* **11** (2), 2008, 147-157.
- [66] Rho,J.Y., Tsui,T.Y., Pharr,G.M., Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation, *Biomat.* **18** (20), 1997, 1325-1330.
- [67] Zysset,P.K., Guo,X.E., Hoffler,C.E., Moore,K.E., Goldstein,S.A., Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur, *J. Biomech.* **32** (10), 1999, 1005-1012.

- [68] Rupin,F., Saied,A., Dalmas,D., Peyrin,F., Hauptert,S., Barthel,E., Boivin,G., Laugier,P., Experimental determination of Young modulus and Poisson ratio in cortical bone tissue using high resolution scanning acoustic microscopy and nanoindentation, *J Acoust. Soc. Am.* **123** (5), 2008, 3785.
- [69] Giraud-Guille,M.M., Besseau,L., Martin,R., Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems, *J. Biomech.* **36** (10), 2003, 1571-1579.
- [70] Giraud-Guille,M.M., Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons, *Calcif. Tissue Int.* **42** (3), 1988, 167-180.
- [71] Pidaparti,R.M., Burr,D.B., Collagen fiber orientation and geometry effects on the mechanical properties of secondary osteons, *J. Biomech.* **25** (8), 1992, 869-880.
- [72] Pidaparti,R.M., Chandran,A., Takano,Y., Turner,C.H., Bone mineral lies mainly outside collagen fibrils: predictions of a composite model for osteonal bone, *J. Biomech.* **29** (7), 1996, 909-916.
- [73] Takano,Y., Turner,C.H., Burr,D.B., Mineral anisotropy in mineralized tissues is similar among species and mineral growth occurs independently of collagen orientation in rats: results from acoustic velocity measurements, *J. Bone Miner. Res.* **11** (9), 1996, 1292-1301.
- [74] Takano,Y., Turner,C.H., Owan,I., Martin,R.B., Lau,S.T., Forwood,M.R., Burr,D.B., Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependent on the mechanical strain distribution, *J. Orthop. Res.* **17** (1), 1999, 59-66.
- [75] Turner,C.H., Chandran,A., Pidaparti,R.M., The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications, *Bone* **17** (1), 1995, 85-89.
- [76] Baron,C., Talmant,M., Laugier,P., Effect of porosity on effective diagonal stiffness coefficients (cii) and elastic anisotropy of cortical bone at 1 MHz: a finite-difference time domain study, *J Acoust. Soc. Am.* **122** (3), 2007, 1810.
- [77] Schmidmaier,G., Wildemann,B., Gabelein,T., Heeger,J., Kandziora,F., Haas,N.P., Raschke,M., Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1, *Acta Orthop Scand.* **74** (5), 2003, 604-610.
- [78] Martin-Badosa,E., Elmoutaouakkil,A., Nuzzo,S., Amblard,D., Vico,L., Peyrin,F., A method for the automatic characterization of bone architecture in 3D mice microtomographic images, *Comput. Med. Imaging Graph.* **27** (6), 2003, 447-458.
- [79] Wergedal,J.E., Sheng,M.H., Ackert-Bicknell,C.L., Beamer,W.G., Baylink,D.J., Genetic variation in femur extrinsic strength in 29 different inbred strains of mice is dependent on variations in femur cross-sectional geometry and bone density, *Bone* **36** (1), 2005, 111-122.
- [80] Raum,K., Hofmann,T., Leguerney,I., Saied,A., Peyrin,F., Vico,L., Laugier,P., Variations of microstructure, mineral density and tissue elasticity in B6/C3H mice, *Bone* **41** (6), 2007, 1017-1024.

- [81] Hofmann,T., Raum,K., Leguerney,I., Saied,A., Peyrin,F., Vico,L., Laugier,P., Assessment of bone structure and acoustic impedance in C3H and BL6 mice using high resolution scanning acoustic microscopy, *Ultrasonics* **44S** 2006, e1307-e1311.
- [82] Schulz,M., Raum,K., Brandt,J., Brehme,K., Quantitative assessment of bone properties during defect healing in an animal defect model after augmentation with different bone graft materials using scanning acoustic microscopy, *J Acoust. Soc. Am.* **123** (5), 2008, 3780.

THESEN

1. Knochen besteht aus einem hierarchisch aufgebauten, heterogenen und elastisch anisotropen Gewebe, dessen Eigenschaften sich kontinuierlich verändern.
2. Der hierarchische Aufbau und die hohe Ordnungsstruktur verursachen anisotrope (richtungsabhängige) elastische Eigenschaften, die in jeder Organisationsebene unterschiedlich sein können.
3. Pathologien, z.B. Osteoporose führen zum Verlust mechanisch-funktioneller Eigenschaften bis hin zum Organversagen (Fraktur).
4. Eine individuelle Erhöhung des Frakturrisikos wird nicht nur durch einen Verlust von Knochenmasse, sondern auch durch eine Vielzahl von kompositionellen und ultrastrukturellen Veränderungen der mineralisierten Knochenmatrix verursacht, welche durch die klinisch etablierte Knochenmineraldichtemessung nur bedingt oder nicht erfasst werden.
5. Akustische Mikroskopie und Synchrotron- μ CT erfüllen die Voraussetzung, die kortikale Mikrostruktur und heterogene Materialeigenschaften auf der Gewebeebene bestimmen zu können.
6. Aufgrund der elastischen Natur tragen Schallwellen nach der Wechselwirkung mit einem Medium Informationen über dessen strukturelle und elastische Eigenschaften.
7. Die akustische Impedanz ist direkt mit elastischen Koeffizienten verknüpft. Unter geeigneten Bedingungen lassen sich einzelne Koeffizienten in Richtung elastischer Symmetrieebenen abbilden bzw. alle Koeffizienten innerhalb kleiner Probenvolumen ableiten.
8. Durch Variation von Frequenz und Schallfeldgeometrie lassen sich Ultraschallwellen optimal an die hierarchischen Strukturebenen anpassen.
9. Mit hochauflösenden quantitativen akustischen Impedanzverteilungsmessungen können Mikrostrukturparameter und anisotrope elastische Parameter der Gewebematrix abgeleitet werden.
10. Hochauflösende akustische Impedanzmikroskopie ist momentan das einzige zerstörungsfreie mikroelastische bildgebende Verfahren.
11. Die Gewebemineralisierung bestimmt maßgeblich die Massendichte der mineralisierten Gewebematrix.

12. Auf lamellärer Ebene wird das charakteristische alternierende Muster elastischer Eigenschaften nicht durch eine Variation der Mineralisierung benachbarter Kollagenfibrillen, sondern durch deren elastische Anisotropie hervorgerufen.
13. Die Korrelation zwischen Gewebemineralisierung und den elastischen Materialparametern ist im kortikalen Knochen in der Regel gering.
14. Durch Kombination hochauflösender Verteilungsbilder der akustischen Impedanz mit mikromechanischen Deformationsanalysen können die resultierenden Verbundeigenschaften auf der nächsthöheren Gewebeebene realistisch modelliert werden.
15. Die kombinierte Erfassung von Struktureigenschaften und anisotropen elastischen Materialparametern erlaubt eine genaue Abschätzung des makroskopischen elastischen Materialverhaltens, z.B. der Frakturresistenz nach Kallusdistraktion.
16. Die mit *in-vivo* Systemen ableitbare Ausbreitungsgeschwindigkeit des schnellsten Ultraschallsignals am Radius lässt sich durch das Verhältnis von kortikaler Dicke zur Wellenlänge, der Porosität und der akustischen Impedanz der mineralisierten Gewebematrix im periostnahen Bereich des kortikalen Knochens beschreiben.
17. Klassische biomechanische Testmethoden sind ohne zusätzliche Modellannahmen im Gegensatz nur bedingt zur elastischen Phänotypisierung des Knochens am Kleintiermodell geeignet.
18. Die Messung und räumliche Überlagerung komplementärer Materialeigenschaften (Gewebemineralisierung, anisotrope elastische Koeffizienten) liefert ein komplexes Bild der Zusammenhänge zwischen Komposition, Struktur und resultierender mechanischer Funktion des kortikalen Knochens.

CURRICULUM VITAE

Name: **Kay Raum**

Geburtsdatum: 01. März 1972

Geburtsort: Halle/Saale

Staatsangehörigkeit: BRD

Familienstand: in Lebensgemeinschaft mit
Frau Dr.rer.nat. Karen Ruschke

Kinder: Helene Ruschke, geb. 28.09.2004
Leonore Ruschke, geb. 10.04.2009

Adresse: Hegelstraße 73, 06114 Halle/Saale, BRD

Ausbildung

1991-1997 Physikstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss mit Diplom

1997-1999 berufsbegleitendes Studium Medizinische Physik an der Hochschule für Technik und Wirtschaft Mittweida, Abschluss mit Zertifikat

1998-2002 Promotion Physik am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Thema: Quantitative Akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe
Abschluss mit *magna cum laude*

Wissenschaftlicher Werdegang

1995-1996 Visiting Scholar und Research Assistant am Bioacoustics Research Laboratory, University of Illinois at Urbana-Champaign

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

Curriculum Vitae

2003-2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Leiter der Q-BAM Gruppe an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
März - November 2004	Chercheur Associé, Laboratoire d'Imagerie Parametrique UMR CNRS 7623, Université Paris 6
2006-2009	Forschungsleiter des Zentrums für Erkrankungen der Haltungs- und Bewegungsorgane (ZHBO), Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit Mai 2009	W2-Professur „Engineering Basis of Regeneration“ in der Berlin-Brandenburg School for Regenerative Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsleistung selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Gleichzeitig erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren anhängig ist bzw. jemals anhängig gewesen ist.

Halle/S., 15. August 2008

Dr. rer. nat. Kay Raum

DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Institutsdirektor Professor Dr. Werner Hein, der mich seit Beginn meiner Arbeit an der Klinik für Orthopädie großzügig unterstützt und mir stets mit vollem Vertrauen zur Seite gestanden hat. Sehr wichtig war für mich die Freiheit, die er mir für die Entwicklung meiner Ideen und Projekte eingeräumt hat, verbunden mit dem Vertrauen in mein fachliches Können, dass er in mich gesetzt hat, um das Labor für Quantitative B-Bild Sonographie und Akustische Mikroskopie (Q-BAM) aufzubauen.

Ein wesentlicher Initiator für viele der vorliegenden und aktuellen Arbeiten ist Pascal Laugier. Die langjährige intensive Kooperation mit den Mitarbeitern seines Institutes und die Zeit als Gastwissenschaftler in seinem Labor (Laboratoire d'Imagerie Parametrique) haben nicht nur zu einer Reihe von erfolgreichen Publikationen, sondern auch zur gemeinsamen Initiierung des Deutsch-Französischen Forschungsnetzwerkes „Ultrasound assessment of bone strength from the tissue level to the organ level“ und des „European Symposiums for Ultrasonic Characterization of Bone“ geführt. Sein Ehrgeiz und Enthusiasmus waren und sind ein großer Ansporn für mein eigenes wissenschaftliches Schaffen.

Wichtig für die Etablierung der Arbeitsgruppe war die Förderung meiner Juniorgruppe durch das NBL-3 Roux-Programm der Medizinischen Fakultät. Zu großem Dank verpflichtet bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ra1380/1, Ra1380/3, Ra1380/6) und anderen öffentlichen und privaten Förderinstitutionen (CNRS, ESRF, Deutsche Arthrose Hilfe e.V., Glaxo-Smith-Kline Stiftung, DGOOC, SAM TEC GmbH, KSI), die meine Arbeit finanziell unterstützt haben.

Zu den Ergebnissen dieser Arbeit haben eine Vielzahl von hervorragenden Wissenschaftlern, Doktoranden und Studenten beigetragen. Allen Koautoren und anderweitig an den Arbeiten beteiligten Kollegen ein herzliches Dankeschön. Nicht möglich wären die experimentellen Ergebnisse ohne die hervorragenden Probenpräparationsleistungen der medizinisch-technischen Assistenten der Forschungslabors der Klinik, insbesondere von Frau Bettina Schneider gewesen. Darüber hinaus danke ich allen Kolleginnen und Kollegen meiner Klinik für das Verständnis für die mitunter recht unkonventionelle Arbeitsweise der Q-BAM Gruppe und die Unterstützung unserer Arbeit in vielfältiger Weise.

Viele hier nicht namentlich erwähnte haben die Arbeit meines Labors mit Wort und Tat unterstützt bzw. überhaupt erst ermöglicht.

Für ihre familiäre „Absicherung“ danke ich vom ganzen Herzen meinen Eltern Lilo und Bernd Raum, sowie meinen Schwiegereltern Karin und Uwe Ruschke.

Meiner Frau Karen Ruschke und meiner Tochter Helene danke ich für die stete Kompromissbereitschaft und vor allem dafür, mir immer wieder zu zeigen, dass es neben der Arbeit noch wichtigere Dinge im Leben gibt.