

3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG MECHANISCHER EIGENSCHAFTEN VON KNOCHEN

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

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

3.1 Klinische Verfahren

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

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

3.1.1 Dual Energy X-ray Absorption (DEXA)

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

3.1.2 Quantitative Computertomographie (QCT)

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

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

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

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

3.2 Experimentelle Verfahren

3.2.1 Mikromechanische Techniken

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

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

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

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

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

3.2.2 Kernspinresonanz

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

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

3.2.3 Ultraschallmethoden

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

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

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

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

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

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