

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
PROF. DR. MED. DENT. WOLFGANG BUCHALLA  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
  
*IN VITRO* UNTERSUCHUNGEN  
ZUR ULTRASCHALL-ANKOPPLUNG AN ZÄHNE  
UND  
ZUR ULTRASCHALL-MARKIERTEN BLUTFLUSSMESSUNG

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Andreas Hardt

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gottfried Schmalz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Mündliches Prüfungsdatum: 10. Juni 2015

In Erinnerung und Dank an meinen Bruder

Thomas Hardt

\* 6. Januar 1978

† 5. August 2014

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>2</b>
2.1	Anatomie der Zahnhartsubstanz und des umgebenden Weichgewebes .....	2
2.1.1	Der Zahnschmelz.....	2
2.1.2	Das Dentin-Pulpa Organ.....	3
2.1.3	Das Parodont .....	4
2.1.4	Unterschiede von humanem und bovinem Zahn .....	5
2.2	Ultraschall.....	5
2.2.1	Physikalische und Technische Grundlagen .....	5
2.2.2	Ultraschall in der Zahnmedizin .....	8
2.2.2.1	Überblick der Anwendungsmöglichkeiten .....	8
2.2.2.2	Anwendung zur Darstellung von Zähnen .....	9
2.2.2.3	Optimierung der Ultraschall-Ankopplung .....	10
2.3	Humanes Blut und humanes Erythrozytenkonzentrat .....	11
2.4	Diagnostische Verfahren zur Vitalitätsprüfung von humanen Zähnen.....	12
2.4.1	Bestimmung der Zahnsensibilität .....	12
2.4.2	Bestimmung der Zahndurchblutung .....	13
2.4.2.1	Photoplethysmographie und Photopulsographie.....	13
2.4.2.2	Laser-Doppler-Blutflussmessung .....	14
2.4.2.3	Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung .....	14
2.4.3	Weitere Methoden zur Blutflussmessung in der Medizin .....	15
2.4.3.1	Grundlagen des photoakustischen und des akustooptischen Effekts.....	15
2.4.3.2	Photoakustische-Doppler-Blutflussmessung .....	17
2.4.3.3	Ultraschall-markierte Blutflussmessung.....	18
<b>3</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
4.1	Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn .....	20
4.1.1	Entwicklung der Versuchsanordnung für die Untersuchung von Ultraschallgelen.....	20
4.1.2	Entwicklung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn .....	23
4.1.3	Untersuchungsgruppen .....	24
4.1.4	Durchführung.....	26
4.1.5	Datenverarbeitung und statistische Analyse .....	27
4.2	Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht <i>in vitro</i> .....	30
4.2.1	Entwicklung der Versuchsanordnung .....	30
4.2.2	Herstellung der Testmedien .....	33
4.2.3	Durchführung.....	34
4.2.4	Datenverarbeitung und statistische Analyse .....	35
4.2.5	Messung der Temperaturänderung der Testmedien.....	37

4.2.5.1	Entwicklung der Messeinrichtung .....	37
4.2.5.2	Durchführung .....	38
4.2.5.3	Datenverarbeitung und statistische Analyse.....	39
4.2.6	Exemplarische REM-Darstellung der Testmedien.....	39
4.2.6.1	Entwicklung der Messeinrichtung .....	39
4.2.6.2	Durchführung .....	39
4.2.6.3	REM-Aufnahmen .....	40
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
5.1	Ergebnisse der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn	41
5.2	Ergebnisse der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht <i>in vitro</i> ...	43
5.2.1	Frequenzdetektion.....	43
5.2.2	Temperaturänderung der Testmedien .....	47
5.2.3	REM-Darstellung der Testmedien.....	48
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
6.1	Diskussion der Methode.....	52
6.1.1	Methode der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn .....	52
6.1.2	Methode der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht <i>in vitro</i>	56
6.1.2.1	Frequenzdetektion.....	56
6.1.2.2	Temperaturänderung der Testmedien .....	58
6.1.2.3	REM-Darstellung der Testmedien.....	59
6.2	Diskussion der Ergebnisse .....	60
6.2.1	Ergebnisse der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn .....	60
6.2.2	Ergebnisse der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht <i>in vitro</i> .....	61
6.2.2.1	Frequenzdetektion.....	61
6.2.2.2	Temperaturänderung der Testmedien .....	63
6.2.2.3	REM-Darstellung der Testmedien.....	63
6.3	Ausblick.....	64
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>66</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	66
8.2	Danksagung .....	67
8.3	Lebenslauf.....	69
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>

## 1 Einleitung

Die Unterscheidung zwischen gesund und krank ist die tägliche Aufgabe eines Arztes, die er unter Zuhilfenahme von diagnostischen Methoden und Geräten treffen muss. Im klinischen Alltag der zahnärztlichen Tätigkeit spielt die Beurteilung der Vitalität der Pulpa eine wichtige Rolle bei Therapieentscheidungen. Derzeit werden in der Praxis Sensibilitätstests zur indirekten Beurteilung der Vitalität der Pulpa angewandt, die sich auf die subjektive Wahrnehmung des Patienten und des Arztes beziehen. Die Vitalitätsbestimmung ist daher aufgrund möglicher mangelnder Compliance bei Kindern, Behinderten und intensivpflichtigen Patienten schwierig bis unmöglich. Auch bei Zahntraumata führen derzeitige Methoden häufig zu Fehldiagnosen, die zu einer Behandlung mit unnötigem Verlust von Zahnhartsubstanz und vitalem Pulpagewebe führen kann. Deshalb hat es sich das Projekt „Entwicklung einer Methode zur Beurteilung der Vitalität von Zähnen mittels optischer Detektion der Pulpadurchblutung“ zur Aufgabe gemacht, objektive Vitalitätsbestimmungsmethoden zu erforschen. Dieses umfangreiche Projekt ist eine gemeinschaftliche Arbeit der Mechatronics Research Unit (MRU) der Ostbayerischen Technischen Hochschule, des Terahertz-Zentrums an der Fakultät für Physik der Universität Regensburg und der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Regensburg. Es wurden bereits von Niklas [167], Jaeger [105], Brandt [22] und Knörzer [117] *in vitro* Studien zur Anwendbarkeit der Photoplethysmographie zur Detektion des Blutflusses in der Zahnpulpa durchgeführt. Dabei wurde erkannt, dass diese zur Detektion des Blutflusses geeignet ist, jedoch Einflüsse des gingivalen Blutflusses nicht hinreichend abgeschirmt werden können [168]. Aufgrund der Tatsache, dass bei Licht durch die starke Streuung im Zahn keine Möglichkeit besteht, den Ursprung des Signals zu bestimmen, sollte eine Möglichkeit zur orts aufgelösten Blutflussmessung gefunden werden. Es wurde die Anwendung von Ultraschall in Betracht gezogen und in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da Ultraschall an der Zahnhartsubstanz angewandt werden sollte, jedoch kein kommerziell erhältliches, an den Zahn angepasstes Ankopplungsmedium existiert, ist das erste Ziel der Studie, einen Beitrag zur Lösung des Problems, der Übertragung von Ultraschallwellen auf die Zahnhartsubstanz, zu leisten. Das zweite Ziel ist es, ein *in vitro* Verfahren zur orts aufgelösten Blutflussmessung, basierend auf dem akustooptischen Effekt am Zahn, zu entwickeln und im Sinne eines Proof of Principle anzuwenden. Dazu wurden Untersuchungen zur Frequenzdetektion von gepulsten Erythrozytenkonzentraten an einem Durchblutungsmodell durchgeführt.

## 2 Literatur

### 2.1 Anatomie der Zahnhartsubstanz und des umgebenden Weichgewebes

#### 2.1.1 Der Zahnschmelz

Der Zahnschmelz (Abb. 1A) enthält 1,5 – 4 Gew.-% Wasser und kleine Mengen organischer Bestandteile in Form von Proteinen und Lipiden. Der anorganische Hauptbestandteil beträgt 93 – 98 Gew.-%; dazu gehören u. a. Kalzium, Phosphat, Magnesium, Natrium und Fluorid. Kristalle aus Kalziumphosphatverbindungen, das sogenannte Hydroxylapatit, weisen einen hexagonalen Querschnitt mit einem Durchmesser von ca. 40 nm auf und sind von einer Hydrationschale umgeben. Etwa 100 Apatitkristalle sind in Schmelzprismen angeordnet. Sie verlaufen sowohl in horizontaler, wie vertikaler Richtung geschwungen, sind im Längsschnitt als Hunter-Schreger-Faserstreifung erkennbar und zeigen sich als Vertiefungen (Perikymatien) an der Zahnoberfläche. Die Prismen sind in eine interprismatische Substanz eingebettet, die aus ungeordneten Schmelzkristallen besteht. Durch diese gleichförmige Anordnung des Zahnschmelzes, mit dicht gepackten Kristallen, dringt Licht durch ihn hindurch und wird vom Dentin absorbiert oder reflektiert. Der interkristalline Raum wird auch als Porenvolumen bezeichnet und ist maßgeblich an der Streuung und Reflexion des Lichtes beteiligt. Ein Milchzahn, dessen Porenvolumen größer ist als im bleibenden Zahn, erscheint dadurch weißer. Klinisch betrachtet, erscheint die Zahnoberfläche glatt, doch bei einer starken Vergrößerung weist die Oberfläche zahlreiche Unebenheiten, Risse und anatomische Merkmale, wie die Grübchen der Tomes-Fortsätze auf (Abb. 1B) [74,93,155]. So werden in der Literatur Oberflächenrauigkeiten von 0,03  $\mu\text{m}$  bis 4,5  $\mu\text{m}$  angegeben [20].

Abb. 1:

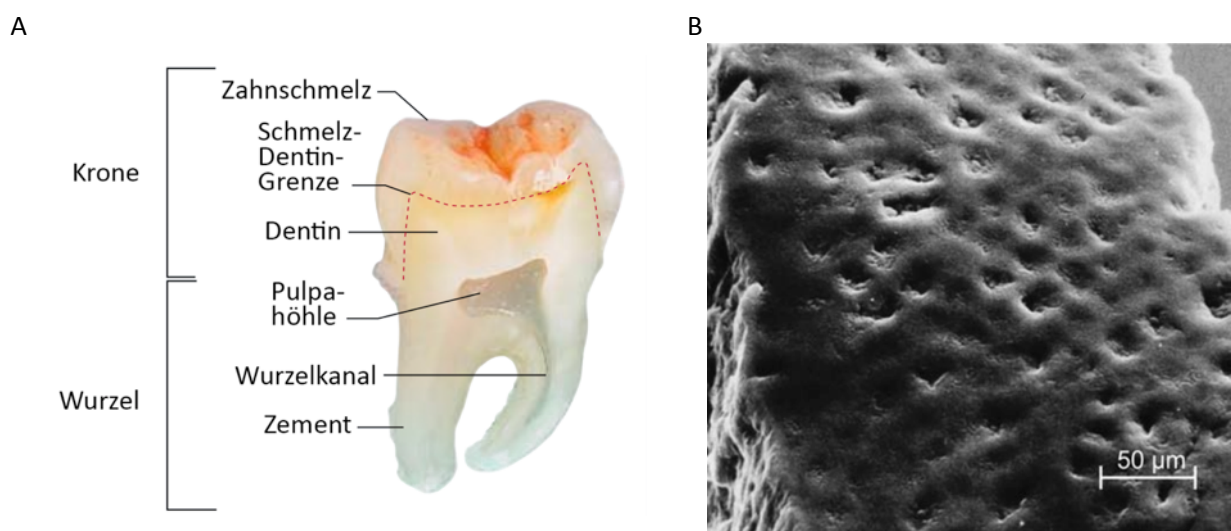


Abb. 1: A: Schnitt durch einen humanen Molar mit den Hauptbestandteilen des Zahns  
B: Rasterelektronenmikroskopaufnahme einer Schmelzoberfläche mit Entwicklungsdefekten in Form von Grübchen der Tomes-Fortsätze (Quelle: modifiziert nach [155])

Diese Oberflächeneigenschaften beeinflussen die Übertragung von Schallwellen auf den Zahn. Schallwellen im Schmelz breiten sich mit einer Geschwindigkeit von 5219 – 6450 m/s aus. Hierbei gibt es jedoch auch innerhalb eines Zahnes große Variationen. Die akustische Impedanz (Schallimpedanz) beträgt  $15,3 - 18,3 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$ . Die Dichte und der Elastizitätskoeffizient werden mit  $2900 \text{ kg/m}^3$  bzw.  $109,8 \cdot 10^9 \text{ N/m}^2$  angegeben [11,121,128,146,148,166,182,206]. Für viele Untersuchungen muss der Zahn nach der Extraktion vor Austrocknung geschützt werden, da es die physikalischen Eigenschaften beeinflusst [86,220]. Spektroskopische Untersuchungen am Schmelz zeigen eine starke Lichtstreuung bei Wellenlängen zwischen 400 nm und 700 nm, die jedoch ab 700 nm exponentiell abnehmen und Transmissionsmessungen im längeren Wellenlängenbereich begünstigen [71,105,108].

### 2.1.2 Das Dentin-Pulpa Organ

Das Dentin (Abb. 1A) steht in seiner Entwicklung und Funktion in engem Zusammenhang mit der Pulpa. Die für die Dentinbildung zuständigen Odontoblasten sind nur durch die zellfreie Weil'sche Zone von den Pulpazellen getrennt. Dentin ist ein lebendes Gewebe und wird im Gegensatz zum Schmelz als Sekundär- und Tertiärdentin nach Abschluss der Kronenentwicklung gebildet. Dies führt im Laufe des Lebens zu einer Verkleinerung der Pulpahöhle. Das Dentin enthält ca. 70 Gew.-% anorganisches Material, das wie auch beim Schmelz, aus Hydroxylapatitkristallen besteht. Sie sind allerdings kleiner und nicht in Prismenform angeordnet, sondern dicht gepackt. 20 Gew.-% bestehen aus organischem Material und der Rest (ca. 10 Gew.-%) ist Wasser. Der organische Anteil besteht aus meist kollagenartigen Verbindungen und bildet eine Dentinkanälchenstruktur aus, die von den Odontoblasten-Fortsätzen durchzogen wird. Die Dentinkanälchen verlaufen im koronalen Bereich s-förmig und im Wurzelbereich geradlinig. Der Durchmesser und das Volumen sinken mit dem Alter des Patienten; so werden Werte von  $3 - 5 \mu\text{m}$  als Durchmesser angegeben. Zudem sinkt die Querschnittsfläche des Tubulilumens von pulpanah nach pulpafern. Das gesamte Dentin besteht aus peritubulärem- und intertubulärem Dentin und wird in vier Zonen untergliedert: Die erste Zone, an der Schmelz-Dentin-Grenze (siehe Abb. 1A) liegend, ist das weniger mineralisierte Manteldentin. Es folgt das zirkumpulpale Dentin, eine Mineralisationszone – das Zwischendentin und das nicht vollständig ausgereifte, hypomineralisierte Prädentin an der Grenze zur Pulpa. Topographisch kann die Pulpa in zwei Bereiche untergliedert werden, die Kronen- und die Wurzelpulpa. Ihre Ausdehnung folgt in verkleinerter Form dem Zahnumriss. Der größte Anteil der Pulpa befindet sich meist auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze und des Zahnfleischrandes. Die Grundsubstanz der Pulpa besitzt eine gelartige Konsistenz, besteht aus Glykosaminoglykanen bzw. Proteoglykanen und ist mit einem Kollagenfasernetzwerk durchzogen. Darin sind Fibroblasten, pulpale Stammzellen und Abwehrzellen eingelagert. Das Gefäßsystem aus Arteriolen und Venolen mit zahlreichen Anastomosen ist für die Regulation des pulpalen Blutflusses verantwortlich. An der Peripherie der Pulpa wird eine dichter



Kapillarplexus gebildet, der vor allem für die Versorgung der Odontoblasten mit Nährstoffen und Sauerstoff benötigt wird [74,93,120,155]. Die Durchblutung der Pulpa beträgt für 100 g Pulpagewebe ca. 15 – 80 ml/min [16,114,152,243], bei einem Blutdruck von 43 mmHg im arteriellen, 35 mmHg im kapillaren und etwa 19 mmHg im venösen Stromgebiet [221]. Die sensorischen Funktionen werden über afferente Nervenfasern vermittelt. Diese werden in A-Beta-, A-Delta- und C-Fasern eingeteilt; sie unterscheiden sich in ihrem Myelinisierungsgrad und in der Leitungsgeschwindigkeit. So sind hauptsächlich die A-Delta-Fasern an der Reizweiterleitung für den schnell einschießenden, „hellen“ und die C-Fasern für den lang anhaltenden, dauerhaften Schmerz verantwortlich [74,93]. Durch die Nervenfasern werden auch Kälte- und Wärmereize vermittelt, die ab einer Temperatur von über 40 °C zu irreversiblen Schäden führen können [74]. Für ausführlichere Erläuterungen der pulpalen Anatomie wird auf die Dissertationen von Klingebiel, Niklas und Jaeger verwiesen [105,115,167]. Die Schallwellen im Dentin breiten sich mit einer Geschwindigkeit von 3200 – 4570 m/s aus. Die akustische Impedanz beträgt  $7,8 - 10,0 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$ . Die Dichte und der Elastizitätskoeffizient werden mit  $2140 \text{ kg/m}^3$  bzw.  $33,5 \cdot 10^9 \text{ N/m}^2$  angegeben [11,121,128,142,146,148,166,182,206]. In Bezug auf die Transmission von Licht zeigten sich in einer Studie unserer Arbeitsgruppe hohe Werte zwischen 900 nm und 1330 nm [94]. Strawn et al. [214] beobachteten einen Bereich erhöhter Transmission von 600 nm bis 1200 nm.

### 2.1.3 Das Parodont

Das Parodont – der Zahnhalteapparat – hat die Aufgaben, den Zahn im Knochen zu verankern, die Kaukräfte zu dämpfen, äußere Noxen abzuwehren und die Zahnwurzel vom Mundhöhlenmilieu zu trennen. Es besteht aus der Gingiva, dem Wurzelzement, dem Desmodont und dem Alveolarfortsatz. Die freie marginale Gingiva verläuft girlandenförmig, knapp oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze und geht in die befestigte Gingiva über. Diese ist 1 – 9 mm breit und mit dem Alveolarknochen und Wurzelzement über Bindegewebsfasern verbunden. Sie ist im Gegensatz zur apikal angrenzenden Alveolarmukosa unverschieblich. Die Blutversorgung der Gingiva erfolgt über Gefäßäste der A. alveolaris superior posterior und der A. alveolaris inferior, die durch das Desmodont, interdentale Knochensepten und das Periost ziehen [93,212]. Für die Durchblutung auf 100 g Gewebe werden Werte von 11 – 51 ml/min angegeben [52-54,77,172].

#### 2.1.4 Unterschiede von humanem und bovinem Zahn

Die bovinen Zahnhartsubstanzen entsprechen in vielen Eigenschaften und Zusammensetzungen den humanen Zahnhartsubstanzen [64]. Folgende Parameter zeigen im Schmelz ähnliche Werte: Zugfestigkeit, Elastizitätsmodul [189], Brechungsindex [210], Lumineszenz [209] und Transluzenz [18]. Die Anzahl, aber nicht der Durchmesser, der Dentintubuli unterscheiden sich [28]. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Streuung [245]. Bei der Dentinpermeabilität wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen [195]. Die Knoop-Härte im Dentin ist ähnlich, jedoch treten im Schmelz altersabhängige Variationen auf [239]. Zur Radioopazität im Schmelz und Dentin werden widersprüchliche Aussagen gemacht [68,69,218]. Die Schallgeschwindigkeiten, Dichte, akustische Impedanz und der Elastizitätskoeffizient im Schmelz und Dentin zeigen entsprechende Werte (5400 – 5800 m/s; 3600 m/s) [128]. Zur ausführlicheren Darstellung wird auf die Übersichtsarbeit von Yassen et al. verwiesen [239].

## 2.2 Ultraschall

### 2.2.1 Physikalische und Technische Grundlagen

Schallwellen sind mechanische Schwingungen, die sich in Form von Druckänderungen longitudinal und transversal in einem Medium ausbreiten können. Kenngrößen einer Schallwelle sind Amplitude, Frequenz, Wellenlänge und Schallgeschwindigkeit. Der Ablauf der Amplitude entspricht der Druckänderung, dadurch ist die Höhe der Amplitude die maximale Druckänderung. Die Frequenz ( $f$ ) beschreibt die Anzahl der Schwingungen pro Sekunde mit der Einheit Hertz (Hz). Die Wellenlänge ( $\lambda$ ) gibt den minimalen Abstand der Punkte gleicher Phase an, also z. B. zweier benachbarter Maxima. Die Schallgeschwindigkeit ( $c$ ) ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwelle im Medium und von dessen Eigenschaften abhängig [47].  $c$  wird von der Dichte ( $\rho$ ) und in Flüssigkeiten und Gasen von dem Kompressionsmodul ( $K$ ), bei Festkörpern vom Elastizitätsmodul ( $E$ ) beeinflusst ( $c_{\text{Flüssigkeit, Gas}} = \sqrt{K/\rho}$ ;  $c_{\text{Festkörper}} = \sqrt{E/\rho}$ ) [48]. Frequenz, Wellenlänge und Schallgeschwindigkeit sind voneinander abhängig:  $f = c/\lambda$ ; je höher die Frequenz, desto kürzer die Wellenlänge. Ultraschall (US), der für das menschliche Ohr nicht mehr wahrnehmbar ist, beginnt bei einer Frequenz von 20 kHz und reicht bis 1 GHz [47,88,118,265]. Im therapeutischen Bereich, z. B. bei der Behandlung von muskuloskelettalen Beschwerden [57] oder der Zahnsteinentfernung [260], werden Frequenzen von 20 kHz bis 4 MHz eingesetzt. Der verwendete Frequenzbereich in der medizinischen Diagnostik reicht von 1 MHz (z. B. transkranieller Ultraschall) bis ca. 200 MHz in der Ultraschallmikroskopie [118,265].

US-Wellen breiten sich in biologischen Weichgeweben in Form von Longitudinalwellen aus, deren Schwingungs- und Ausbreitungsrichtung identisch sind. In Festkörpern, wie z. B. Knochen oder Zähnen breiten sie sich zudem als Transversalwellen aus [88,265]. Um diese zu erzeugen, wird in der

medizinischen Diagnostik der piezoelektrische Effekt genutzt. Piezoelektrische Kristalle und Keramiken werden durch das Anlegen einer elektrischen Wechselspannung verformt und geraten so in periodische Schwingungen, die Schallwellen erzeugen. Dieser Effekt ist umkehrbar, so können Schallwellen durch Piezoelemente in ein elektrisches Signal umgewandelt werden und damit sowohl als US-Sender als auch -Empfänger verwendet werden [47]. Eine andere Möglichkeit zur Erzeugung von US-Wellen beruht auf dem Effekt der Magnetostraktion, bei dem es durch ein angelegtes Magnetfeld zur Deformation des Materials kommt. Diese kommt häufig bei zahnmedizinischen US-Scalern zum Einsatz [127]. Werden US-Wellen in ein Medium eingebracht, treffen sie auf Grenzflächen, an denen sie zum Teil reflektiert werden. Solche Grenzflächen entstehen durch die unterschiedlichen akustischen Eigenschaften von Medien, welche durch die akustische Impedanz ( $Z$ ), auch als Schallimpedanz bezeichnet, beschrieben werden [47]. Diese ist ein Maß für den Widerstand, den ein Medium einer Welle entgegensetzt und ergibt sich auch aus dem Produkt von Dichte ( $\rho$ ) und Schallgeschwindigkeit ( $c$ ):  $Z = \rho \cdot c$  [72,88]. In Tab. 1 sind akustisch relevante Werte von einigen Geweben und Materialien dargestellt.

Tab. 1:

Material	$c$ [m/s]	$\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]	$Z$ [10 <sup>6</sup> Ns/m <sup>3</sup> ]
Luft	330	1,2	0,0004
Wasser	1497	1000	1,497
Blut	1575	1055	1,66
Gehirn	1550	1030	1,60
Weichgewebe ( $\emptyset$ )	1561	1043	1,63
Knochen, kortikal	3476	1975	7,38
Knochen, trabekulär	1886	1055	1,45
Dentin	3800	2100	8,0
Schmelz	5700	2900	16,5
Pulpa	1570	1000	1,57
Glycerin	1923	1260	2,42
Aluminiumoxid	10520	3860	40,6
Siliziumdioxid	5900	2200	13
Aluminium	6420	2700	17,33
Magnesium	5800	1738	10,0
Ga-In-Legierung	2740	6350	17,4
Atemkalk (soda lime)	6000	2240	13,4

Tab. 1: Schallgeschwindigkeit ( $c$ ), Dichte ( $\rho$ ), akustische Impedanz ( $Z$ ) von verschiedenen Materialien (Quellen: [7,39,41,75,92,248-250])

Der Reflexionsgrad ( $R$ ) ist das Verhältnis aus der Intensität der reflektierten ( $I_r$ ) zur einfallenden ( $I_e$ ) Schallwelle und ist umso größer, je unterschiedlicher die Impedanzen der beiden Medien ( $Z_1, Z_2$ ) sind:  $R = \frac{I_r}{I_e} = \left( \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \right)^2$  [48]. Luft, die einen hohen Impedanzunterschied zu Gewebe aufweist, reflektiert fast 100 % der Schallwellen. Diese dünne Schicht, die zwischen einem US-Kopf und den

Unebenheiten der Haut eines Patienten vorhanden ist, muss mit einem Ankopplungsmedium überbrückt werden. Dieses sollte biokompatibel sein und eine geeignete Konsistenz besitzen, die sich durch Standfestigkeit und Gleitfähigkeit auszeichnet. Der Absorptionskoeffizient spielt bei diesen sehr dünnen Schichten eine zu vernachlässigende Rolle. Entscheidend ist, dass das Ankopplungsmedium eine ähnliche Impedanz hat, wie das zu untersuchende Gewebe. Da das biologische Gewebe größtenteils aus Wasser besteht, wird deshalb für diese Anwendung ein Gel auf Wasserbasis verwendet [31,208,252]. Breiten sich US-Wellen im Gewebe aus, unterliegen sie Streuungs- und Brechungsphänomenen und ihre Bewegungsenergie wird durch Absorption in Wärme umgewandelt [47]. Dieser Erwärmungseffekt wird unter anderem in der Ultraschall-Tumorthherapie gezielt verwendet [157]. Ultraschall besitzt auf flüssige Medien einen Kavitationseffekt, der sich durch Bläschenbildung auszeichnet. Beim Zerplatzen wird lokal Energie frei, was zu Gewebeschäden führen kann, aber auch bei der Plaqueentfernung eingesetzt wird [102,111,127]. Zusammen mit akustischen Mikroströmungen, die durch die Schwingungen einer Feile oder der Gasbläschen entstehen, machen sie die endodontische Ultraschallspülung sehr effektiv [187,222].

Es kann abhängig von Intensität, Dauer und Frequenz durch Kavitation und Erwärmung zu Thrombusbildung und Lyse von Erythrozyten kommen. Dieser Effekt wurde auch *in vivo* beobachtet [30,45,127,237]. Durch die Kraft des Schallfeldes einer stehenden Ultraschallwelle kann es zur bandförmigen Aggregation und Stillstand von Blut in Gefäßen kommen [56].

Eine weitere grundlegende Eigenschaft von Wellen stellt der von Christian Doppler im Jahr 1842 beschriebene Doppler-Effekt dar. Bewegen sich Schallsender und Schallempfänger relativ zueinander, kommt es zu einer Veränderung der Frequenz, wie es am Phänomen des vorbeifahrenden Rettungswagens bekannt ist. Aus dieser Frequenzverschiebung kann die Fließgeschwindigkeit von Blut errechnet und im gepulsten Blutkreislauf die Herz-Frequenz bestimmt werden [47,196].

Ein Erzeugungs-Prinzip, wie es in den Versuchen in Kapitel 4.2 zur Anwendung kam, ist das Continuous-Wave-Verfahren. In einem US-Kopf werden von piezoelektrische Kristallen oder Keramiken kontinuierlich Schallwellen erzeugt und ausgesendet [47,88].

Ein anderes Erzeugungs-Prinzip ist das Puls-Echo-Verfahren, das in der bildgebenden Diagnostik im sogenannten A-Mode verwendet wird. (Abb. 2A). Ein US-Puls wird von einem US-Kopf ausgesendet und die von den Grenzflächen reflektierten Echos (Reflexionen) empfangen. Die Intensitäten (Amplituden) der Reflexionen werden auf einer Zeitachse dargestellt und es lässt sich bei bekannter Schallgeschwindigkeit die Entfernung der einzelnen Echos bzw. der Grenzflächen von der US-Sonde bestimmen. Außerdem kann aus der Intensität eine Information über die Impedanz des Mediums an der Grenzfläche gewonnen werden [47]. Diese Technik wurde bei den Versuchen in Kapitel 4.1 verwendet. Im sogenannten B-Mode wird jedem Amplitudenwert ein Grauwert zugeordnet. Bei vielen einzelnen Piezokristallen entsteht so das bekannte Ultraschallbild (Abb. 2B).

Abb. 2:

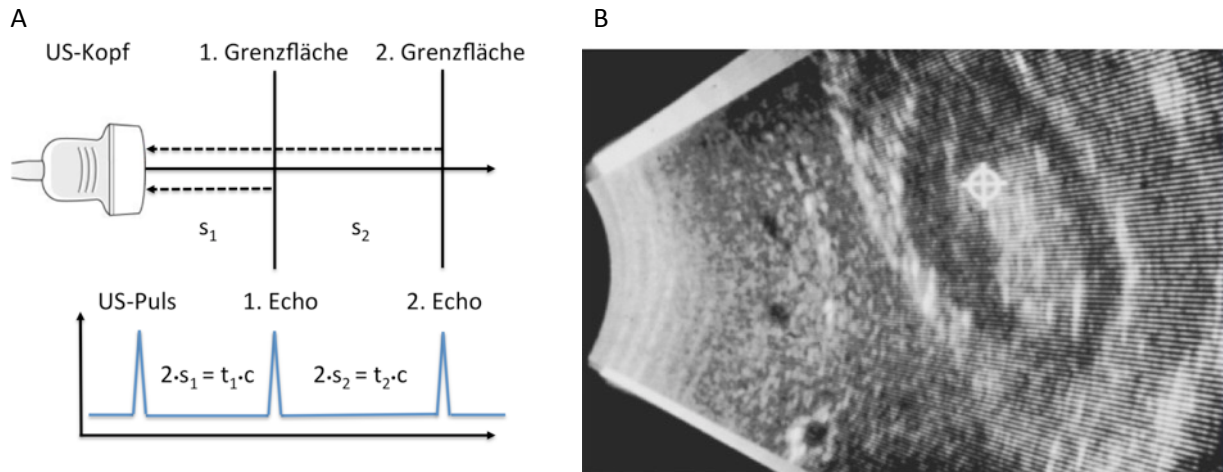


Abb. 2: A: Puls-Echo-Prinzip im A-Mode: US-Puls wird von US-Kopf ausgesendet und die von den Grenzflächen reflektierten Echos empfangen. Die Intensität der Reflexionen wird auf einer Zeitachse dargestellt; die Laufzeit ( $t$ ) entspricht der doppelten Wegstrecke ( $s$ ); bei bekannter Schallgeschwindigkeit lässt sich die Entfernung der Grenzflächen von der US-Sonde bestimmen. (Quelle: modifiziert nach [47])  
 B: Ultraschallbild eines älteren B-Mode-Gerätes; man erkennt deutlich, dass das Bild aus Grauwert-Linien zusammengesetzt wurde. (Quelle: modifiziert nach [47])

## 2.2.2 Ultraschall in der Zahnmedizin

### 2.2.2.1 Überblick der Anwendungsmöglichkeiten

Schall und Ultraschall finden in der Zahnmedizin häufig Verwendung. Einer der ersten Berichte zur Anwendung in der Zahnmedizin stammt aus dem Jahr 1953 von Catuna, der einen Ultraschall-Bohrer zur Kavitätenpräparation entwickelte [32]. Auch heutzutage werden diese Techniken in der prothetischen und konservierenden Zahnheilkunde angewendet, z. B. für die minimalinvasive Präparation [4,225], die Kariesexkavation [4,240] und dem Einsetzen von Zahnersatz [29,173]. Ferner werden Instrumente und Zahnersatz im Ultraschallreinigungsbad gesäubert [60,80,226]. In der Parodontologie kommen Schall- und Ultraschallinstrumente seit den sechziger Jahren zur Entfernung von Zahnstein und Konkrementen zum Einsatz [82]. Es wurden auch Studien zur Messung des Parodontalen Attachment Levels [141] und der Gingivastärke mittels Ultraschall durchgeführt [59]. Diese Techniken finden jedoch im zahnärztlichen Alltag keine Verwendung. In den achtziger Jahren wurden erstmals Ultraschallsysteme zur Aufbereitung und Desinfektion von Wurzelkanälen angewendet [149]. Heute wird Ultraschall zur Dentinpräparation, um einen verbesserten Zugang zum Wurzelkanalsystem zu erhalten, und für die Aktivierung von Spüllösungen eingesetzt [222,223]. Für die eigentliche Wurzelkanalaufbereitung wird er in der modernen Endodontie nicht mehr empfohlen [35]. Des Weiteren kommt er beim Entfernen von Stiften oder frakturierten Instrumenten und bei der Applikation von Sealern oder Mineral Trioxid Aggregaten (MTA) zum Einsatz [222]. Therapeutisch wird Ultraschall ebenfalls genutzt, da er einen stimulierenden Effekt auf den Knochenstoffwechsel zeigt, der in der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie [84,199], Parodontologie [83] und Kieferortho-

pädie [107] erforscht und angewendet wird. *In vitro* zeigte sich auch ein Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Odontoblasten-ähnlichen-Zellen, der möglicherweise zur Regeneration von Pulpa und Dentin dienen kann [144].

In der zahnärztlichen Chirurgie können mit piezoelektrischen, chirurgischen Instrumenten und Operationsverfahren präzise Osteotomien, Knochenaugmentationstechniken wie die Sinusbodenelevation und das Bone-Splitting, sowie retrograde Wurzelkanalpräparationen sicherer und leichter als mit den herkömmlichen Methoden durchgeführt werden [125,193]. Der Vorteil liegt in der Risikominimierung durch selektives Schneiden von Hartgewebe unter Schonung und Schutz des Weichgewebes [35]. Die klinische Anwendung der Ultraschallsonographie hat sich auf Speicheldrüsen, zervikale Lymphknoten und oberflächliche Weichgewebe, wie z. B. Muskulatur und Gefäße, beschränkt. In den letzten Jahren wurde aussichtsreich versucht, sie für die Darstellung von Zungenkarzinomen und periapikalen Läsionen, sowie für Untersuchungen bei Craniomandibulären Dysfunktionen (CMD) und Frakturen zu verwenden [38,43,46,91,124,145,165,181,204]. Die Vorteile dieser Bildgebung sind, dass keine ionisierenden Strahlen erforderlich sind, es eine non-invasive Technik ist und in Echtzeit angewendet werden kann. Das bedeutet, Bilderzeugung und Beurteilung kann unmittelbar am Patienten stattfinden [148]. Chen et al. [35] bieten einen ausführlichen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten und Entwicklungen von Ultraschall in der Zahnmedizin.

#### 2.2.2.2 Anwendung zur Darstellung von Zähnen

Salmon und Le Denmat [188] haben im Jahr 2012 ein intraorales B-Mode Ultraschall-Gerät, mit dem sie Zähne, Implantate und die umgebenden Gewebe darstellen konnten, entwickelt und an Patienten getestet. Komplexer ist die Untersuchung von Hartgewebe wie die Zahnhartsubstanz oder Knochen, da in diesen Geweben Schall sich mit einer höheren Geschwindigkeit ausbreitet und einer stärkeren Absorption unterliegt. Das erste Mal wurde im Jahr 1963 von Baum et al. [14] ein Bildgebungsverfahren aus der Augenheilkunde an Zähnen verwendet, das jedoch mit der Qualität der Signale noch nicht überzeugen konnte. Die Studiengruppe um Culjat [42] erstellten ein 2-D Bild eines dritten Oberkiefermolaren, in dem sich durch die komplexe Zahnanatomie Fehler und Verzerrungen in der Darstellung zeigten, da der Ultraschall reflektiert und gestreut wurde. Um diese Probleme und die Ausbreitung der Wellen im Zahn besser zu verstehen, haben Sun et al. [215] eine 3D Finite Element Simulation durchgeführt, die mit den Ergebnissen von *in vitro* Tests übereinstimmten und so für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Es wurden außerdem einige Studien zur Messung von Schmelzschichtstärken mit Ultraschallfrequenzen von 15 – 50 MHz gemacht, die Ergebnisse mit Abweichungen von bis zu 10 % der Gesamtdicke lieferten. Die Genauigkeit ist durch die Erkennung der Schallreflexion, der mangelhaften Anpassung des Schallkopfes an den Zahn und die nicht exakt bekannte Schallgeschwindigkeit

im Schmelz eingeschränkt [21,55,89,98,216,219]. Eine praktische Anwendung dieser Messungen wäre die Kontrolle von Erosionen, jedoch ist hierzu die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse noch nicht ausreichend [140].

Diese Möglichkeiten der Ultraschalluntersuchung von Zahnhartsubstanz werden auch in der Kariesdiagnostik verwendet. Tagtekin et al. [217] verglichen DIAGNOdent (KaVo, Deutschland) mit einem Karies-Ultraschallgerät (Nova Scope 4500, NDT, USA) *in vitro* mit dem Ergebnis einer hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit für beide Geräte. Pretty [178] beurteilte in einer Literatur-Übersichtsarbeit, dass aussichtsreiche Entdeckungen in der Karieserkennung gemacht wurden, die Studien jedoch unterschiedliche Erfolgsgrade aufwiesen [178]. Aufgrund der positiven Erfahrungen ihrer *in vitro* Studie wendeten Matalon et al. [150,151] einen Prototypen (Novadent Ltd., Israel) in einer klinischen Studie an und mussten feststellen, dass im Vergleich zur radiologischen Diagnose zwar eine höhere Sensitivität bestand, jedoch eine niedrigere Spezifität. Von den Autoren wurde vorgeschlagen, durch die Verbesserung der Signalverarbeitung die Anzahl der falsch positiven Befunde reduzieren zu können [150,151]. Mit demselben Prinzip, wie in der Schichtdickenmessung und der Kariesdetektion, können auch Frakturen und Risse am Zahnmodell und an Zähnen *in vitro* erkannt werden [40,190,205]. Für eine ausführlichere Erörterung der darstellenden Ultraschallanwendung in der Zahnmedizin wird an dieser Stelle auf die Übersichts-Arbeit von Marotti et al. [148] verwiesen, die unter anderem Studien zu weiteren Anwendungsmöglichkeiten verglichen haben: Untersuchungen von Weichgewebsläsionen, periapikale und parodontale Läsionen, Frakturen, CMD, in der Implantologie und zur Schichtstärkenmessung von Gingiva und Muskeln.

#### **2.2.2.3 Optimierung der Ultraschall-Ankopplung**

Ein Problem bei Ultraschallanwendungen am Zahn ist die Ankopplung, die durch hohe Schallimpedanz-Werte eingeschränkt ist. Wie in der Sonographie von Weichgewebe (siehe Kapitel 2.2.1) muss auch hier ein Ankopplungsmedium verwendet werden, das in der Schallimpedanz dem Untersuchungsgewebe ähnlich ist, um möglichst geringe Reflexionen an der Oberfläche zu erhalten. Es wurden hierzu verschiedene Lösungsmöglichkeiten für die Ankopplung am Zahn untersucht. Vor über 40 Jahren wurde von Reich und Porter [182] Quecksilber vorgeschlagen und getestet, welches von seinen physikalischen Eigenschaften, jedoch nicht von seinen biologischen und praktischen Eigenschaften, geeignet wäre. Neben Wasser bzw. auf wasser-basierendem, medizinischem Ultraschallgel [55,166,242] und Öl (Rizinusöl) [129] wurde in einigen Studien auch Glycerin als Ankopplungsmedium verwendet. Es hat eine höhere akustische Impedanz als Wasser und ist auch in der zerstörungsfreien Werkstoffprüfung im Einsatz [41,87,89,101,140]. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Ankopplung ist die Übertragung des Schalls mit einer Sondenspitze aus einem Material mit hoher Schallimpedanz, ähnlich dem Schmelz. So verwendeten

Barber et al. [11] und Lee et al. [130] eine Aluminiumspitze an humanen, bovinen und caninen Zähnen *in vitro*. Gegenstand der genannten Studien war jedoch nicht explizit die Verbesserung der Ankopplung. Erst 2005 haben Culjat et al. [41] dies gezielt versucht, indem sie die akustischen Eigenschaften von folgenden Materialien untersucht haben: Gallium-Indium-Legierung, Luft, Wasser, Quecksilber, medizinisches Ultraschallgel, Silikonöl und ein auf Glycerin basierendes, industrielles Ultraschallgel (High Z, Sonotech Inc., USA). Die Sondenspitze war aus Atemkalk (soda lime glass), das eine Impedanz von  $13,4 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$  hat (vgl. Schmelz  $16,5 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$ ). Zwischen dieser und einem 2 mm entfernten Glasblock (soda lime glass) wurden die Materialien eingebracht und anhand der Echos verglichen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich die Legierung, die wie Quecksilber bei Raumtemperatur flüssig ist, als Ankopplungsmedium am Zahn eignen würde, da die physikalischen Werte  $c = 2740 \text{ m/s}$ ;  $Z = 17,4 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$ ;  $\rho = 6350 \text{ kg/m}^3$  bestimmt wurden (Tab. 1).

Alle vorherigen Studien basieren auf dem Prinzip der direkten Ankopplung. Eine weitere Möglichkeit, die auch in der zerstörungsfreien Werkstoffprüfung verwendet wird, ist die Tauch-Technik. Es werden US-Sonde und Prüfkörper in ein Wasserbad getaucht, wobei kein direkter Kontakt vorhanden ist, da der Schall über die Vorlaufstrecke im Wasser auf den Prüfkörper fokussiert wird [49]. In einigen Studien wird das Prinzip bei Schichtdicken- [55,219] und Schallgeschwindigkeitsmessungen am Zahn verwendet [166]. Dwyser-Joyce et al. [55] verglichen diese Technik mit der direkten Ankopplung. Sie wurde unter Laborbedingungen am Zahn angewandt und ist in dieser Art nicht auf den Patienten übertragbar, aber sie erwies sich in dieser Studie als eine gute Ankopplungsmöglichkeit mit einer höheren Auflösung als die Direkte.

### 2.3 Humanes Blut und humanes Erythrozytenkonzentrat

Das Blut dient als Transport- und Kommunikationssystem im Körper und verteilt dabei Sauerstoff, Nährstoffe, Botenstoffe, Stoffwechselprodukte und Wärme. Es ist für die Abwehr von Pathogenen zuständig und schützt bei Verletzungen den Körper durch das Gerinnungssystem vor Blutverlust. Das Blutvolumen macht 6 – 8 % des Körpergewichts eines Erwachsenen aus. Die zellulären Bestandteile des Blutes sind Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Erythrozyten sind rote, kernlose, bikonkav-scheibenförmige Zellen mit einem Durchmesser von  $7,5 \mu\text{m}$  und haben den größten Volumenanteil am gesamten Blutvolumen. Durch ihre hohe Deformierbarkeit aufgrund ihrer flexiblen Membran können sie selbst durch kleinste Kapillaren fließen. Die Zahl der Erythrozyten beträgt bei der Frau ( $4,2 - 5,4 \cdot 10^6/\mu\text{l}$  Blut) und ist etwas niedriger als beim Mann ( $4,6 - 5,9 \cdot 10^6/\mu\text{l}$  Blut). Demnach variiert auch die Hämoglobinkonzentration ( $120 - 160 \text{ g/l}$ ;  $140 - 180 \text{ g/l}$ ). Das Blutplasma macht 46 – 63 % des Blutvolumens aus, besteht zu 90 % aus Wasser und enthält Proteine, Elektrolyte und niedermolekulare Stoffe [116,197].

Die Erythrozytenkonzentrate, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, befinden sich in einem sterilen Beutelsystem und enthalten CPD, eine Zusammensetzung aus Stabilisatoren und



Antikoagulanzen (Natriumcitrat, Citronensäuremonohydrat, Glucosemonohydrat, Natriumdihydrogenphosphatdihydrat). Um unerwünschte Wirkungen zu reduzieren, wird eine Abreicherung der Leukozyten durch Filterung (Leukozytendepletion) durchgeführt. Bei der empfohlenen Lagerung der Erythrozytenkonzentrate bei 4 °C ( $\pm 2$  °C) ist eine Haltbarkeit von bis zu 7 Wochen je nach Aufbereitungsverfahren gewährleistet. Dennoch bedingt die Lagerung einen morphologischen Formenwandel in Kugelzellen und Stechapfelformen (Abb. 3). Diese sind nach Transfusion innerhalb von 48 – 72 Stunden reversibel, haben aber bei schwerkranken Patienten nach neuesten Daten einen negativen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit [95,96,119,162].

Abb. 3:

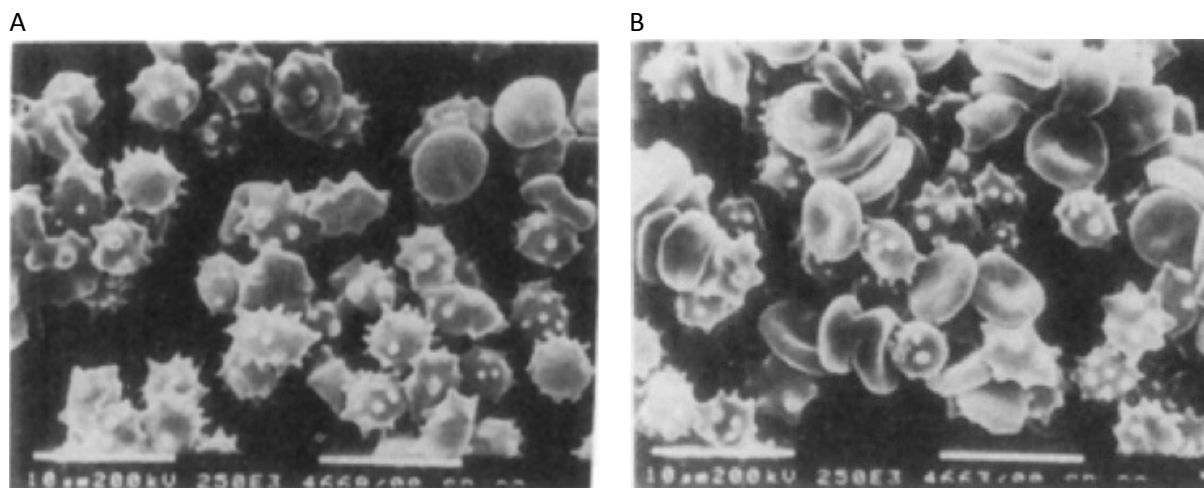


Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Erythrozytenkonzentrat nach 21 (A) und 35 Tagen (B) unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen; Vergrößerung original: 4400x (Quelle: [95])

Das Absorptionsverhalten von Blut zeigt im sichtbaren Bereich Maxima bei den Wellenlängen 420 nm und 540 nm [103,184]. Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe an humanem Blut ergaben für den Wellenlängenbereich von 600 nm bis 2500 nm zwei relative Transmissionsminima bei  $\lambda = 1450$  nm und  $\lambda = 1900$  nm, sowie drei relative Maxima bei  $\lambda = 1300$  nm, 1700 nm und 2200 nm. Das beste Verhältnis zwischen der Dentintransparenz und der Blutabsorption lag im Bereich zwischen 850 nm und 1380 nm [94].

## 2.4 Diagnostische Verfahren zur Vitalitätsprüfung von humanen Zähnen

### 2.4.1 Bestimmung der Zahnsensibilität

In der zahnmedizinischen Behandlung spielt die Beurteilung des Zustands und der Vitalität der Pulpa eine therapieentscheidende Rolle. Die derzeitigen Verfahren zur Bestimmung der Zahnvitalität beschränken sich auf die Überprüfung der Sensibilität durch thermische, elektrische oder mechanische Reize. Sie basieren auf den Beobachtungen, dass eine gesunde Pulpa auf die einwirkenden Reize normal reagiert, während eine entzündete Pulpa überempfindlich und eine nekrotische Pulpa unempfindlich reagiert. Dies beruht jedoch auf der subjektiven Schmerzsensation

des Patienten und ist mit den bekannten Einschränkungen verbunden [93]. Das Absterben der Pulpa geht mit dem Stillstand des Blutflusses einher, selbst wenn die sensorischen Funktionen noch vorhanden sind. Die Pulpa kann sich nur bei intakter Blutzirkulation in einem gesunden Zustand befinden. Die Schmerzsensation ist somit weit weniger bedeutend in der Bestimmung der Zahnvitalität als die Durchblutung der Pulpa, weshalb Techniken zur Blutflussmessung als direkte, objektive Methode vermehrt vorgeschlagen und im folgenden Kapitel vorgestellt werden [1].

## 2.4.2 Bestimmung der Zahndurchblutung

### 2.4.2.1 Photoplethysmographie und Photopulsographie

Die Photoplethysmographie (PPG) ist eine optische, non-invasive Technik, die zur Blutflussmessung eingesetzt wird. Das zu untersuchende Gewebe wird von Licht durchstrahlt und von einer Photodiode detektiert. Es wird durch das durchblutete Gewebe absorbiert, gestreut und reflektiert [33,110]. Das PPG-Signal enthält eine pulsierende AC-Komponente (Wechselspannungsanteil), die durch Druck-, Volumenänderung und der Ausrichtung der Erythrozyten zustande kommt [8,81,139,156]. Diese Komponente ist einer nichtpulsierenden, sich langsam verändernden DC-Komponente (Gleichstromanteil) aufgelagert, die maßgeblich durch das Blutvolumen des durchstrahlten Gewebes beeinflusst wird [33]. Auch ohne die Volumenänderung konnten Näslung et al. [164] ein pulsierendes AC-Signal in einem starren Gefäß nachweisen. Dies bekräftigt die Tatsache, dass die physikalischen Grundlagen des PPG-Signals noch nicht vollständig verstanden sind [3]. Auch die Anwendung der PPG in der Zahnmedizin wird von vielen untersucht und für aussichtsreich in Bezug auf die Durchblutungsmessung und die Vitalitätsbestimmung befunden [44,50,51,103,106,112,159,169].

Ein weiteres Messverfahren auf Grundlage der PPG ist die Pulsoximetrie, die in der Medizin in Form von Finger- und Ohr läppchensensoren breite Verwendung findet. Das Prinzip beruht auf dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin im roten (660 nm) und infraroten Bereich (850 – 940 nm), wodurch sich die Sauerstoffsättigung des Blutes und die Pulsfrequenz bestimmen lässt. Auch in der Zahnmedizin wird dieses Verfahren zur Bestimmung der Zahnvitalität empfohlen [27,78,106,112,158,160,163,169,198]. Die Arbeitsgruppe um Calil et al. [27] konnte bei 28 von 32, im Kältetest als vital bestimmte Zähne, eine Sauerstoffsättigung messen. Nebenbei zeigte sich, dass die in Zähnen gemessene Sauerstoffsättigung niedriger war, als die am Finger des Patienten gemessene Sättigung [27]. In einer Studie von Gopikrishnana et al. [79] wurde für die Pulsoximetrie eine höhere Sensitivität beschrieben als für den konventionellen Kältetest oder den elektrischen Vitalitätstest [79]. Es wurden keine Studien über den Einfluss des gingivalen Blutflusses gefunden. Die *in vitro* Studien von Niklas et al. [168] wurden ursprünglich der PPG zugeordnet, da die Zuordnung fraglich erschien wurden sie von Knörzer [117]

als Photopulsographie bezeichnet. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Abschirmung der gingivalen Durchblutungssignale nicht möglich war bzw. auch ohne pulpalen Blutfluss die Signale der Gingiva gemessen wurden. Für die genauere Darstellung wird auf die Arbeiten verwiesen. [22,105]

#### **2.4.2.2 Laser-Doppler-Blutflussmessung**

Die Laser-Doppler-Blutflussmessung (LDF) ist eine non-invasive, schmerzfreie und objektive Methode, die zur Messung des pulpalen Blutflusses (PBF) eingesetzt werden kann. Als Lichtquelle wird entweder eine Helium-Neon (HeNe; 632 nm; rot) oder eine Gallium-Aluminium (GaAlAs; 780 – 820 nm; infrarot) Laserdiode verwendet. Das Laserlicht wird über einen Lichtwellenleiter in die Zahnhartsubstanz und die Pulpa eingestrahlt und von einer Photodiode detektiert [186]. In Analogie zum Doppler-Effekt beim Ultraschall (siehe Kapitel 2.2.1) unterliegt das von den in den pulpalen Blutgefäßen zirkulierenden Erythrozyten zurückgestreute Licht einer Frequenzverschiebung, im Gegensatz zu den ruhenden Geweben, die keine Frequenzverschiebung verursachen [163]. Die Ergebnisse der Bestimmung des pulpalen Blutflusses sind widersprüchlich. Einige Autoren berichteten, vitale Zähne von nekrotischen unterscheiden zu können [170,171], während andere zeigten, dass zum Großteil die Durchblutung der umgebenden parodontalen Gewebe gemessen werden und es somit keine verlässliche Methode für die Vitalitätsbestimmung sei [175,207]. Eine Methode, den Einfluss der umgebenden Gewebe zu reduzieren, ist die Abschirmung der Gingiva mit Kofferdam [90,207] oder einer opaken Parodontalpaste [2]. Eine vollständige Abschirmung ist jedoch nicht möglich [176]. Ein weiterer Aspekt ist die Positionierung der Messsonde. Zum einen muss sie während der Messung starr fixiert werden, um Bewegungsartefakte zu vermeiden [153,171], zum anderen spielt auch die Position eine Rolle und so wurde ein Abstand von 2 – 3 mm zum Gingivarand empfohlen [90,163]. Diese Empfehlung beruht auf dem Aspekt, dass die Nähe der Gingiva das Signal verfälscht, aber genau dort die größte Ausdehnung des Pulpenkavums ist [183]. Die LDF kann nur den pulpalen Blutfluss des koronalen Anteils detektieren, der unter Umständen nicht den eigentlichen Blutfluss darstellt, da keine Ortsauflösung gegeben ist [163]. Die Streuung des Lichtes im Zahn bis in die umgebenden Weichgewebe und den Alveolarknochen spielt dabei eine entscheidende Rolle [2,90,104,175-177]. Nicht anwendbar ist die LDF bei Zähnen mit Kronen oder großen Füllungsrestorationen [163].

#### **2.4.2.3 Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung**

Wie in Kapitel 2.2.1 bereits erwähnt, kann der Doppler-Effekt zur Blutflussmessung verwendet werden (Ultrasonic Flowmetry, UFM). Hierbei wird ein Ultraschall-Sondensystem meist im Puls-Echo- oder seltener im Continuous-Wave-Verfahren verwendet. In Russland haben Wissenschaftler ein US-Doppler-Gerät (MM-D-K, Minimax, Russland) zur Diagnostik in der Prävention und Frühbehandlung

von Parodontalen Läsionen angewandt [122,161]. Yoon et al. [241] benutzten dieses Gerät, um den pulpalen Blutfluss zu bestimmen. Dazu verglichen sie in ihrer Studie vitale und wurzelkanalgefüllte Frontzähne von 11 Patienten. Eine 20-MHz US-Sonde, die bis zu einer Tiefe von 0,8 cm den Blutfluss bestimmen kann, wurde mit Ultraschallgel im 60° Winkel, zervikal an die Zähne angelegt und die Messungen durchgeführt. Sie erkannten auch die Schwierigkeit der Ankopplung, aber es zeigten sich dennoch Puls-Wellen bei den vitalen und nicht-gepulste Signale bei den wurzelkanalgefüllten Zähnen. In einer weiteren Studie untersuchten sie an 18 Patienten erfolgreich die Veränderung des pulpalen Blutflusses von Oberkiefer-Frontzähnen durch die Applikation eines adrenalin-haltigen Lokalanästhetikums. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das US-Doppler-Gerät die Änderung des pulpalen Blutflusses erkennen kann. In der klinischen Anwendung sollte zum Vergleich auch der kontralaterale Zahn als Kontrolle hinzugezogen werden, da aufgrund der Zahnanatomie eine Messung mit dem Gerät nicht möglich sein könnte [241,242]. Cho und Park [37] beschrieben in einem Fallbericht die Anwendung dieses Gerätes zur Vitalitätsbestimmung von verfärbten Zähnen nach einem Trauma. Kälte- und elektrische Vitalitätstests (EPT) waren negativ, mit der Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung konnten die Zähne als vital bestimmt werden. Zwei Fälle reagierten nach 10 Wochen positiv auf Kälte und EPT. Der dritte Fall zeigte nach 9 Monaten trotz positiver Vitalität im US-Doppler keine Antwort auf Kälte oder EPT. Falsch positive Tests der Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung wurden bis jetzt noch nicht untersucht und die Autoren schlagen weitere, umfangreichere Studien dazu vor [37]. Die Vorteile der Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung sind laut Orekhova und Barmasheva [171], dass eine lokalisierte Blutflussmessung in schwer zugänglichen Bereichen wie Zahn und Gingiva möglich ist, es keine Einschränkungen durch Metallrestorationen gibt und es eine kurze, gut vom Patienten tolerierte und wiederholbare Messmethode ist. Es sind dabei aber einige Regeln einzuhalten, so sollte der Patient in Ruhe bei Zimmertemperatur liegen oder sitzen, und nicht geraucht und gekaut haben. Die Sonde sollte während der Messungen ohne Druck in derselben Position gehalten werden. Jedoch empfehlen Orekhova und Barmasheva eine Kombination von LDF und Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung zur detaillierten und genaueren Untersuchung des pulpalen Blutflusses [171]. Ein Ultraschall-Doppler-Blutflussmessgerät zur Vitalitätsbestimmung ist am freien Markt noch nicht verfügbar.

## **2.4.3 Weitere Methoden zur Blutflussmessung in der Medizin**

### **2.4.3.1 Grundlagen des photoakustischen und des akustooptischen Effekts**

Beim photoakustischen Effekt, auch als optoakustischer Effekt bezeichnet, wird gepulstes Laserlicht in einem Medium absorbiert. Dabei kommt es lokal zu einem Temperaturanstieg und über die thermoelastische Ausdehnung zur Druckänderung, die sich in Form einer US-Welle ausbreitet und von einem US-Kopf detektiert werden kann (Abb. 4A). Diesen Effekt verwendet die Photoakustische Tomographie (PAT) zur Bildgebung [5,65,233,236]. In der akustooptischen Tomographie (AOT) wird

genau der umgekehrte Effekt zur Bildgebung genutzt. Eine US-Welle wird in ein Medium fokussiert und Licht, das durch diesen markierten Bereich strahlt, wird vom Ultraschall mit dessen Frequenz kodiert und moduliert (Abb. 4B) [113,132,147,229,232].

Abb. 4:

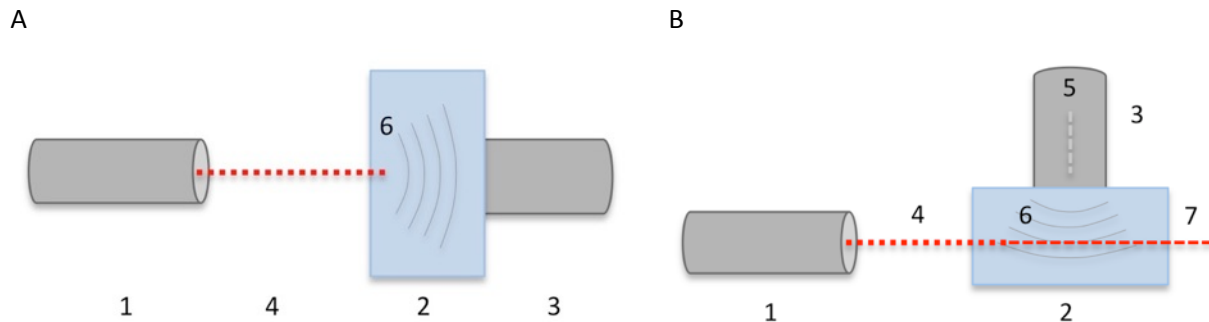


Abb. 4: A: Photoakustischer Effekt: Ein Laser (1) erzeugt ein gepulstes Laserlicht (4), das in ein Medium (2) fokussiert und absorbiert wird. Dadurch entstehen US-Wellen (6), die von einem US-Kopf detektiert werden können (3).

B: Akustooptischer Effekt: US-Wellen (6), die vom US-Kopf (3) erzeugt werden, werden in ein Medium (2) fokussiert. Ein vom Laser (1) erzeugtes Laserlicht (4), das durch den markierten Bereich strahlt, wird mit der Frequenz (5) des Ultraschalls moduliert (7).

Das Prinzip der Modulation kann anhand eines Beispiels aus der Rundfunktechnik erklärt werden (Abb. 5). Die Sprechfrequenzen eines Radiomoderators (Nutzsignal) verändern (modulieren) ein Trägersignal (Mittelwellenrundfunk mit Frequenzbereich von 526,5 – 1606,5 kHz [97]) das beim Empfänger demoduliert und daraus das Nutzsignal zurückgewonnen werden kann (Abb. 5) [67,76,235]. Die gerichtete Ultraschall-Markierung bietet somit auch eine räumliche Information über den Ort der Markierung [143]. Es wurden drei mögliche Mechanismen für diesen Effekt vorgeschlagen: Ultraschall führt zur Druck und Dichteänderung im Medium und verändert die optischen Eigenschaften des Mediums einschließlich des Absorptions- und Streukoeffizienten sowie des Brechungsindex. Der zweite Mechanismus basiert auf der Veränderung der optischen Phase aufgrund der ultraschallinduzierten Bewegungen der streuenden Partikel, der Dritte auf Veränderung der optischen Phase durch die Ultraschall-Modulation des Brechungsindex [228,232].

Abb. 5:

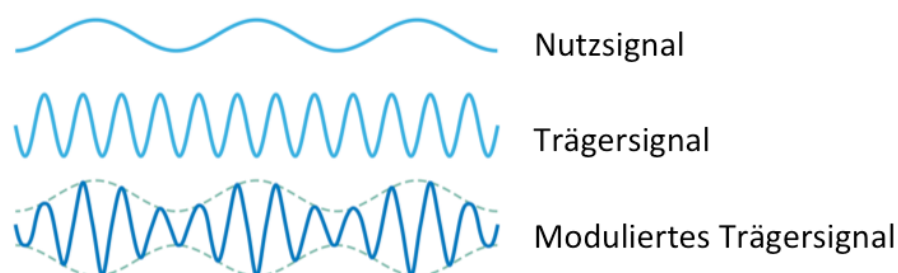


Abb. 5: Amplitudenmodulation: Ein Nutzsignal (Sprechfrequenzen eines Radiomoderators) wird mit einem Trägersignal (Mittelwellenrundfunk) durch Modulation der Amplitude verbunden (Moduliertes Trägersignal). (Quelle: modifiziert nach [76])

Ziel beider Methoden (PAT, AOT) ist es, die Vorteile des optischen Kontrasts von Licht und den Auflösungsvorteil durch die geringere Streuung des Ultraschalls zu kombinieren. Die Auflösung und die Darstellungstiefen können durch die Ultraschallfrequenz variiert werden. Es könnten sogar beide

Methoden simultan eingesetzt werden, um den diagnostischen Wert zusätzlich zu erhöhen. Ein Problem, das bei der Ultraschalltechnologie immer vorhanden ist, ist die akustische Ankopplung. Auch die akustische Heterogenität, wie sie beim menschlichen Knochen vorhanden ist, stellt eine Herausforderung dar [232]. Der Photoakustische Effekt wurde in den letzten Jahren bereits zur Bestimmung der akustischen Eigenschaften und Darstellung von Schmelz, Dentin, Karies und des Pulpenkavums verwendet. Abb. 6 zeigt einen möglichen klinischen Einsatz. [17,19,61-63,136,137,202,227]

Abb. 6:

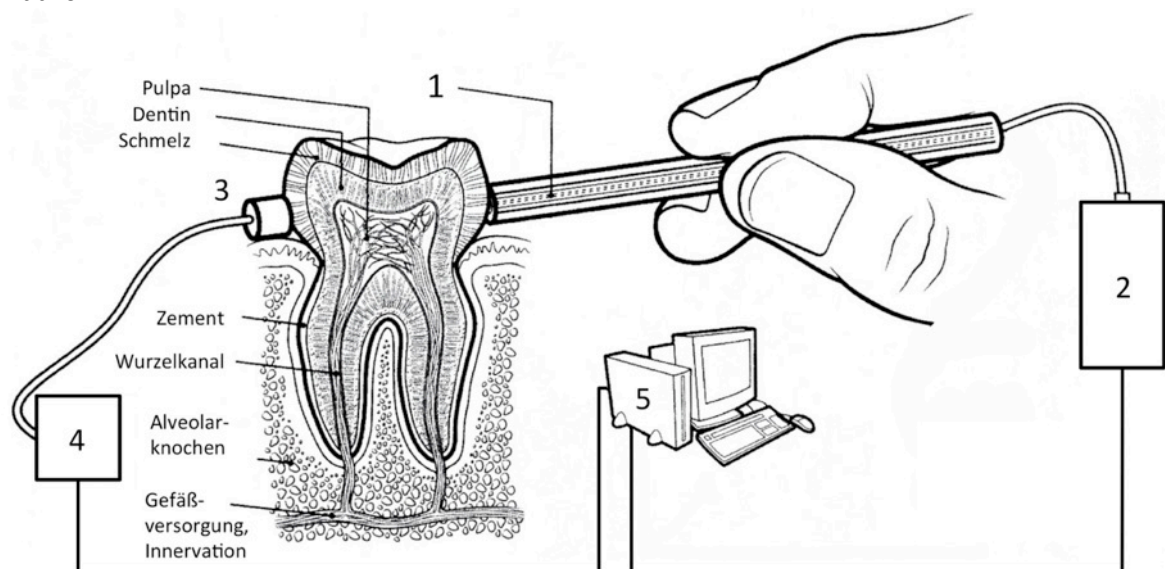


Abb. 6: Vision einer photoakustischen Bildgebung eines Zahnes: gepulstes Laserlicht (1) eines Lasers (2) erzeugt US-Wellen in der Pulpa, die von US-Kopf (3) und US-Gerät (4) und gemessen und mit Hilfe digitaler Signalaufbereitung analysiert werden (5) (Quelle: modifiziert nach [211])

#### 2.4.3.2 Photoakustische-Doppler-Blutflussmessung

Grundlage der Photoakustischen-Doppler-Blutflussmessung ist der Photoakustische Effekt. Die US-Wellen, die durch ein amplitudenmoduliertes Laserlicht in einem Medium erzeugt werden, entstehen mit dessen Amplituden-Frequenz. Wie beim US-Doppler-Effekt kommt es auch beim Photoakustischen-Doppler-Effekt (PAD) zum Doppler-Shift, der Frequenzverschiebung proportional zur Flussgeschwindigkeit. Wenn sich die Partikel bewegen, kommt es zur Frequenzänderung, die von einem US-Kopf detektiert werden kann. Im Gegensatz zur Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung ist es möglich, auch sehr niedrige Fließgeschwindigkeiten und im Gegensatz zur LDF die Fließrichtung zu messen [65,66]. Diese Technik wurde bereits *in vivo* an der Maus und am Hühnchenembryo erfolgreich getestet [238]. Eine Variation dieser Technik, die Kreuz-Korrelations-Methode, wendeten Brunner und Beard [23-26] *in vitro* an. Eine vereinfachte Erklärung soll das Prinzip erläutern: Ein US-Empfänger ist auf ein Blutgefäß fokussiert. Eine Gruppe von Erythrozyten tritt in diesen Fokus ein und es werden durch zwei aufeinander folgende Laserimpulse photoakustische Wellen erzeugt. Diese Wellen haben ein für die Gruppe von Erythrozyten charakteristisches Muster, das zeitversetzt



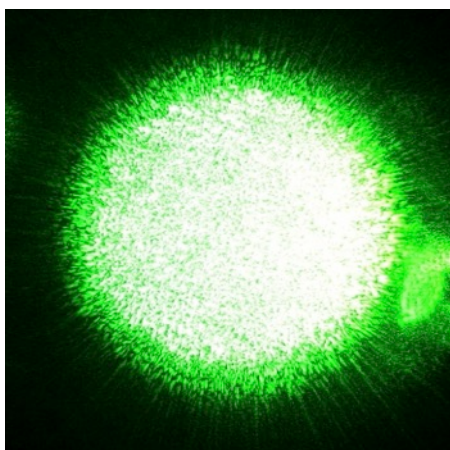
am US-Empfänger aufgezeichnet wird. Dadurch lässt sich mit Hilfe der Kreuz-Korrelations-Funktion und der Zeitdifferenz, der Ort und somit die Fließgeschwindigkeit errechnen [23-26]. Die Photoakustische-Doppler-Blutflussmessung bleibt jedoch in tieferen Gewebeschichten eine Herausforderung [230].

#### 2.4.3.3 Ultraschall-markierte Blutflussmessung

Die Studiengruppe um Racheli [180] und Ron [185] haben eine neue Methode basierend auf dem akustooptischen Effekt zur Messung von Blutfluss entwickelt. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Gewebe mit kohärentem Laserlicht und zugleich mit Ultraschall durchstrahlt. Der Ultraschall moduliert das Licht nach dem akustooptischen Effekt und markiert es damit (Ultrasonic tagging of light; UTL). Das aus dem Gewebe zurückgestrahlte Licht erzeugt ein Speckle-Muster, das mit einem Photodetektor registriert wird (Abb. 7). Das detektierte Speckle-Muster enthält einen Anteil, der mit der Ultraschallfrequenz moduliert ist. Bewegungen durch den Blutfluss innerhalb des untersuchten Gewebes verändern das Laserlicht und somit das Speckle-Muster. Der Kontrast im Speckle-Muster nimmt mit zunehmender Fließgeschwindigkeit ab, die über die Zeit integriert errechnet werden kann. Aufbauend auf dieser Technik wurde ein Gerät zur Messung des zerebralen Blutflusses durch die Schädelkalotte entwickelt, das Laserlicht im Nahinfrarotbereich und einen 1-MHz US-Kopf verwendet (Ornim Medical, Israel) [13,143,180,185]. Nach Studien am Schwein wurde dieses Gerät von Schytz et al. [201] an 10 Patienten angewandt und der veränderte zerebrale Blutfluss nach Gabe eines durchblutungsfördernden Medikamentes (Acetazolamid) gemessen und anschließend mit einem Standard-Messverfahren ( $^{133}\text{Xe}$ -SPECT) verglichen. Sie waren mit beiden Verfahren in der Lage, den Anstieg nach 15 Minuten zu messen und behaupteten, dass dies eine vielversprechende Technik für non-invasive Echtzeitmessungen ist. Es werden jedoch weitere, ausführlichere Studien benötigt, in welchen die Anwendung unter klinischen Bedingungen genauer untersucht werden [201].

Abb. 7:

A



B

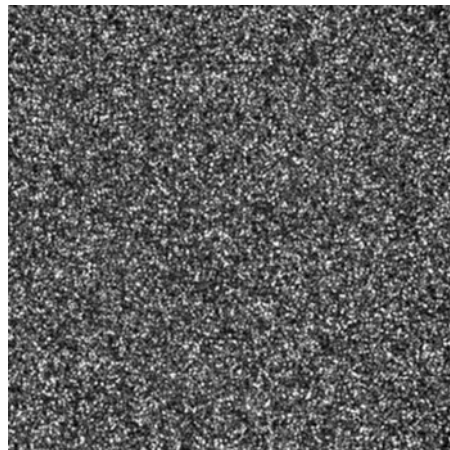


Abb. 7: A: Aufnahme eines an einer Oberfläche reflektierten Laserstrahls (Quelle: [258])  
B: Aufnahme eines Speckle Musters mit einem CCD-Sensor (Quelle: [12])

### 3 Fragestellung

Der erste Teil der vorgelegten Dissertation befasste sich mit der Ankopplung von Ultraschall an die Zahnhartsubstanz. Diese wird in der Literatur immer wieder als Problem beschrieben, da der Zahn aus Materialien mit hoher akustischer Impedanz besteht und somit einen Großteil des Ultraschalls an der Oberfläche reflektiert. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie Untersuchungen zur Verbesserung der Ultraschall-Ankopplung an die Zahnhartsubstanz durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Apparatur zur indirekten Messung von Ankopplungsmedien für die Zahnhartsubstanz entwickelt, um dann im zweiten Schritt gebrauchsfertige und individuell hergestellte, optimierte Medien untersuchen und vergleichen zu können.

Im zweiten Teil der vorgelegten Dissertation wurde versucht das Problem der Licht-Streuung in der Zahnhartsubstanz zu umgehen, das bei optischen Verfahren zur Vitalitätsbestimmung mittels Durchblutungsmessung der Pulpa zu einer starken Beeinflussung der Signale durch die ebenfalls durchbluteten parodontalen Strukturen führen kann. Eine Möglichkeit wäre Ultraschall, der im Zahn weniger gestreut wird, zur Vitalitätsbestimmung einzusetzen. In der Literatur [171] wird empfohlen die Laser-Doppler-Blutflussmessung und die Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung getrennt voneinander zur Diagnostik zu verwenden, um eine höhere Sensitivität und Spezifität bei der Beurteilung der Vitalität zu erzielen. Deshalb war die Grundlage der Untersuchungen ein neues Verfahren aus der Akustooptik, das die Vorteile von Laserlicht und Ultraschall, also der Laser-Doppler-Blutflussmessung und der Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung, vereint, in die Zahnheilkunde zur Vitalitätsbestimmung der Pulpa zu übertragen. Hierzu wurde ein Versuchsaufbau zur ultraschall-markierten Frequenzdetektion von gepulsten Erythrozytenkonzentraten in verschiedenen Konzentrationen an einem Durchblutungsmodell entwickelt und geprüft. Außerdem wurde der Einfluss des Ultraschalls auf die Erythrozyten hinsichtlich Temperatur und morphologischen Veränderungen bei den Versuchsbedingungen untersucht.

Die Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit sind Teil eines größeren Forschungsprojektes und stehen im Zusammenhang mit den Publikationen von Niklas et al. [168], Hirmer et al. [94] und Schulz et al. [200], der Bachelorarbeit von Plank [174], so wie den Dissertationen von Klingebiel [115], Niklas [167], Jaeger [105], Brandt [22] und Knörzer [117].



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn

#### 4.1.1 Entwicklung der Versuchsanordnung für die Untersuchung von Ultraschallgelen

Ein frisch extrahierter Frontzahn eines Rindes wurde mittels Paladur Kunststoff (Heraeus Kulzer, Deutschland) mit der Labialfläche horizontal auf der Halterung eines Sägemikrotoms (Leica SP 1600, S/N: 025.097.052, Leica, Wetzlar, Deutschland) fixiert und eine 2,0 mm dicke, planparallele Scheibe herausgeschnitten (Abb. 8B). Überprüft wurde die Dicke mit einem digitalen Mikrometer (Art.-Nr.: 293-521-30, Mitutoyo, Japan). In die Zahnscheibe mit einer Länge von 22 mm und einer Breite von 11 mm wurde mit einer Bohr-Fräse-Maschine (Emco Compact 5, Maier + Co. Austria, Österreich) eine Messstelle im Dentin (2; Abb. 8) in einer Tiefe von 1,25 mm mit einer Rest-Dicke von 0,75 mm, 8 mm von apikal entfernt in mesiodistaler Richtung gefräst (HOLEX VHM-Fräser 3 mm, Art.-Nr.: 202130-3, Hoffmann GmbH, München, Deutschland). Eine weitere Messstelle im Schmelz (Dicke 2,0 mm) wurde 6,5 mm ausgehend von apikal festgelegt (1; Abb. 8).

Diese Stelle wurde nach Abschluss der Messungen mit einer Trennscheibe (Standard, Henry Schein Dental Depot GmbH, Langen, Deutschland) und einem Multifunktionswerkzeug (Proxxon FBS 240/E, Föhren Deutschland) durchtrennt und unter dem Makroskop (Makroskop M420, S/N: 258994, Wild Heerbrugg, Schweiz; Leica KL 1500 electronic Lichtquelle; Leica EC3 Kamera, Best.-Nr.: 12730079, Leica Microsystems, Schweiz) anhand beider Schnittflächen die Schmelz und Dentinstärken gemessen. Daraus ergab sich eine mediane Dicke von 0,43 mm Schmelz und 1,60 mm Dentin. In den nachfolgenden Ausführungen wurden diese als Schmelz-Messstelle und Dentin-Messstelle bezeichnet.

Abb. 8:

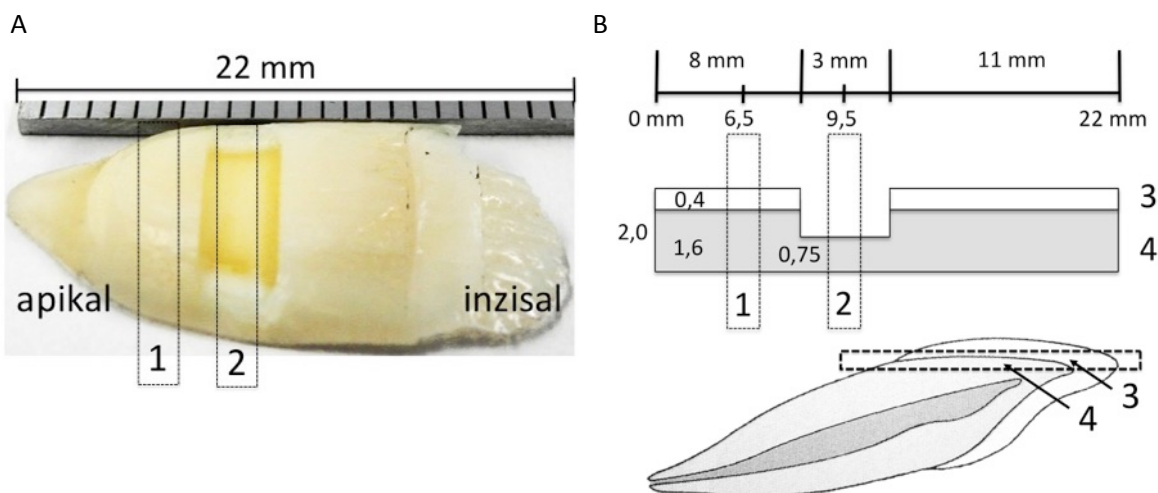


Abb. 8: A: Rinderzahnscheibe mit Schmelz- (1) und Dentin-Messstelle (2)  
B: Schematische Darstellung der Rinderzahnscheibe mit Lokalisation des Schnittbereichs (Quelle: modifiziert nach [131]). Schmelz- (1), Dentin-Messstelle (2), Schmelz (3) und Dentin (4). Maße in mm.

Die Zahnscheibe wurde in physiologischer Kochsalzlösung in einem Gefäß mit Schraubverschluss (BD Falcon 50 ml, Best.-Nr.: 352098, Becton Dickinson Biosciences, USA) bei 4 – 6 °C aufbewahrt.

Es kam ein indirektes Verfahren zur Messung der Testgele zum Einsatz, bei dem eine US-Sonde (Pencil Probe, T-481-4507, Checkline Europe, Gronau, Deutschland; Abb. 9) mit medizinischem Ultraschall-Kontakt-Gel (US-Gel, G1; Best.-Nr.: 7873, Caesar & Loretz, Hilden, Deutschland; siehe Tab. 3) an den Zahn angekoppelt wurde. Das zu untersuchende Testgel wurde an der gegenüberliegenden Grenzfläche Zahn – Luft aufgetragen, um den Übergang der Schallwellen von Zahn in Testgel zu untersuchen. Abb. 10 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung.

Abb. 9:

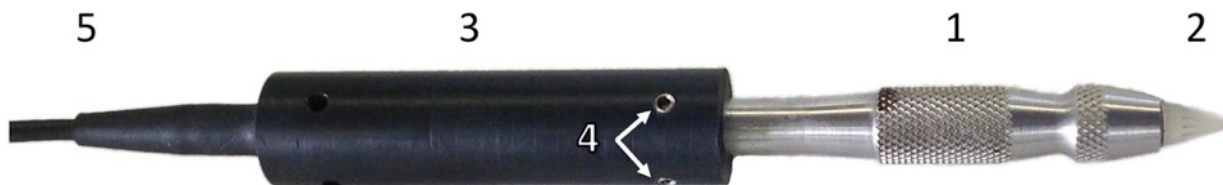


Abb. 9: US-Sonde (1) wurde mit 2 Madenschrauben (4) mit Kunststoff-Adapter (3) fixiert. Die Sonden-Spitze (2) war 7 mm lang und begann mit einer Breite von 1,6 mm. Das Anschlusskabel (5) der US-Sonde (1) führte zum Oszilloskop.

Abb. 10:

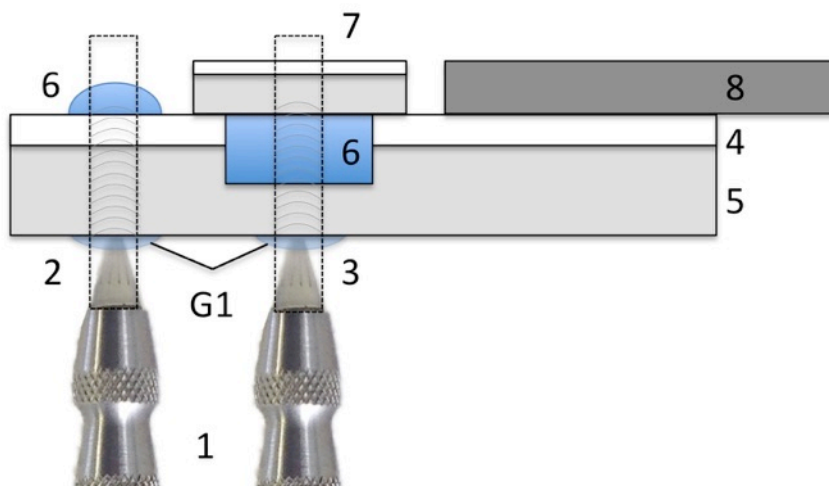


Abb. 10: Zahnscheibe bestehend aus Schmelz (4) und Dentin (5); US-Sonde (1; Abb. 9) wurde an der Schmelz-Messstelle (2) oder der Dentin-Messstelle (3) mit medizinischem US-Gel (G1) angekoppelt; Testgel (6) wurde auf der gegenüberliegenden Grenzfläche aufgetragen und bei (3) mit einer weiteren Zahnscheibe (7; 20 x 11 x 2 mm) abgedeckt; Halterung der Zahnscheibe (8).

Als Halterung der Zahnscheibe (Abb. 11) wurde ein Aluminiumblech auf die Maße 11 x 7,5 cm zugeschnitten und eine Aussparung von 6 x 15 mm eingefräst, um von unten Zugang zu der darauf befestigten Zahnscheibe zu erhalten. Die Zahnscheibe wurde mit der Ausfräsung nach oben, von inzisal (Position wie in Abb. 8A) mit einem Aluminiumblech (6 x 3,5 cm, Standard) und Flügelschrauben fixiert (Abb. 11). Die Fixierung reichte bis 2 mm vor die Ausfräsung. Um die Befestigung zu optimieren, wurde ein Schaumstoffstück zwischen die beiden Bleche eingebracht, um eine möglichst parallele Fixierung zu ermöglichen.

Abb. 11:

A

B

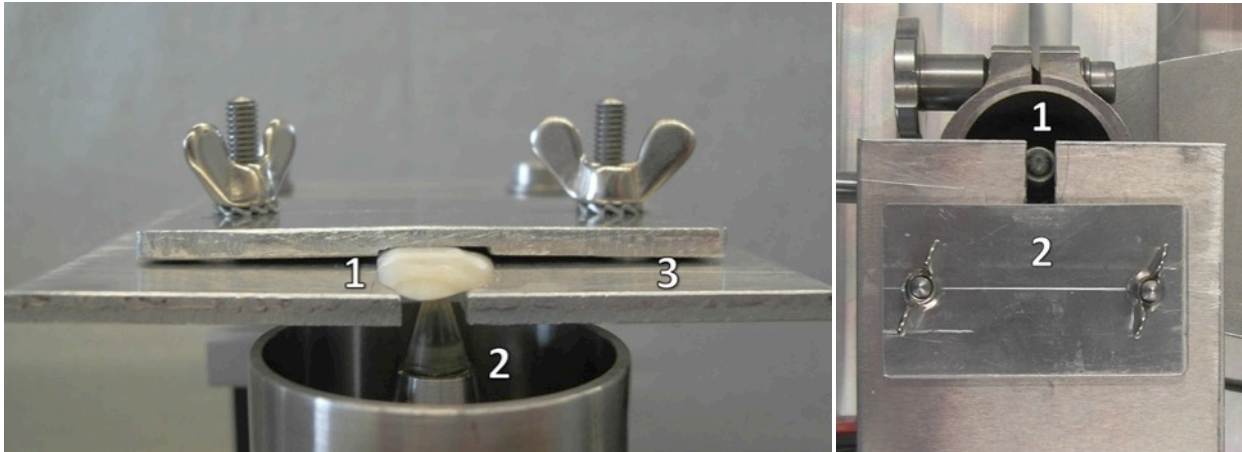


Abb. 11: A: Ansicht in positive x-Richtung; Zahnscheibe (1) wurde in Halterung (3) eingeklemmt und über ein Aluminiumblech mit 2 Flügelschrauben fixiert. Eine US-Sonde (2) wurde von unten an den Zahn angelegt (Beschreibung folgt).

B: Ansicht von oben; ohne Zahnscheibe. US-Sonde in Halterung (1); Zahnscheiben-Halterung (2).

Ein Bohrerständer (mechanische Werkstatt Physik, Universität Regensburg, Deutschland, Abb. 12), mit einer nach oben gerichteten Bohrerhalterung, wurde verwendet, um die US-Sonde zu befestigen. Diese wurde mit einem Adapter, der in der mechanischen Werkstatt Physik aus Kunststoff (15 mm Durchmesser; Abb. 9) hergestellt und mit 2 Madenschrauben mit der US-Sonde verbunden wurde, im Bohrerständer fixiert. Sie wurde so eingespannt, dass die PMMA-Spitze (7 mm Länge, 1,6 mm Breite an der Spitze) das Rohr der Halterung überragt (Abb. 11, Abb. 12), hierdurch konnte ein Anpressdruck von  $2,8 \text{ N/mm}^2$  auf der Zahnscheibe erreicht werden. Die wirkende Kraft auf die Spitze mit einer Fläche von  $2 \text{ mm}^2$  war 5,6 N.

Die Zahnscheiben-Halterung wurde über eine Winkel-Konstruktion (Abb. 12) an einem in x-Achse verschiebbaren und skalierten Tisch befestigt, um zwischen den Messstellen wechseln zu können. Durch die Winkel-Konstruktion wurde die Position der Zahnscheibe auf der y- und z-Achse festgelegt. Die Fixierung des Tisches erfolgte über eine Stativschiene. Der Bohrerständer und die Probenhalterung (Tisch mit Stativschiene und Zahnscheiben-Halterung) wurden mittels Schraubzwingen am Tisch befestigt.

Ein US-Gerät (Model 5077PR Square Wave Pulser/Receiver, S/N: 120211004, Olympus NDT Inc., USA; Abb. 12) in Kombination mit der US-Sonde diente gleichzeitig als Sender und Empfänger der US-Wellen. Die Daten des Geräts wurden über den BNC-Ausgang am Oszilloskop (Tektronix DPO2014, S/N: C000512, Tektronix, Inc., USA; Abb. 12) ausgelesen, notiert und auf einem USB-Wechseldatenträger gespeichert.

Abb. 12:

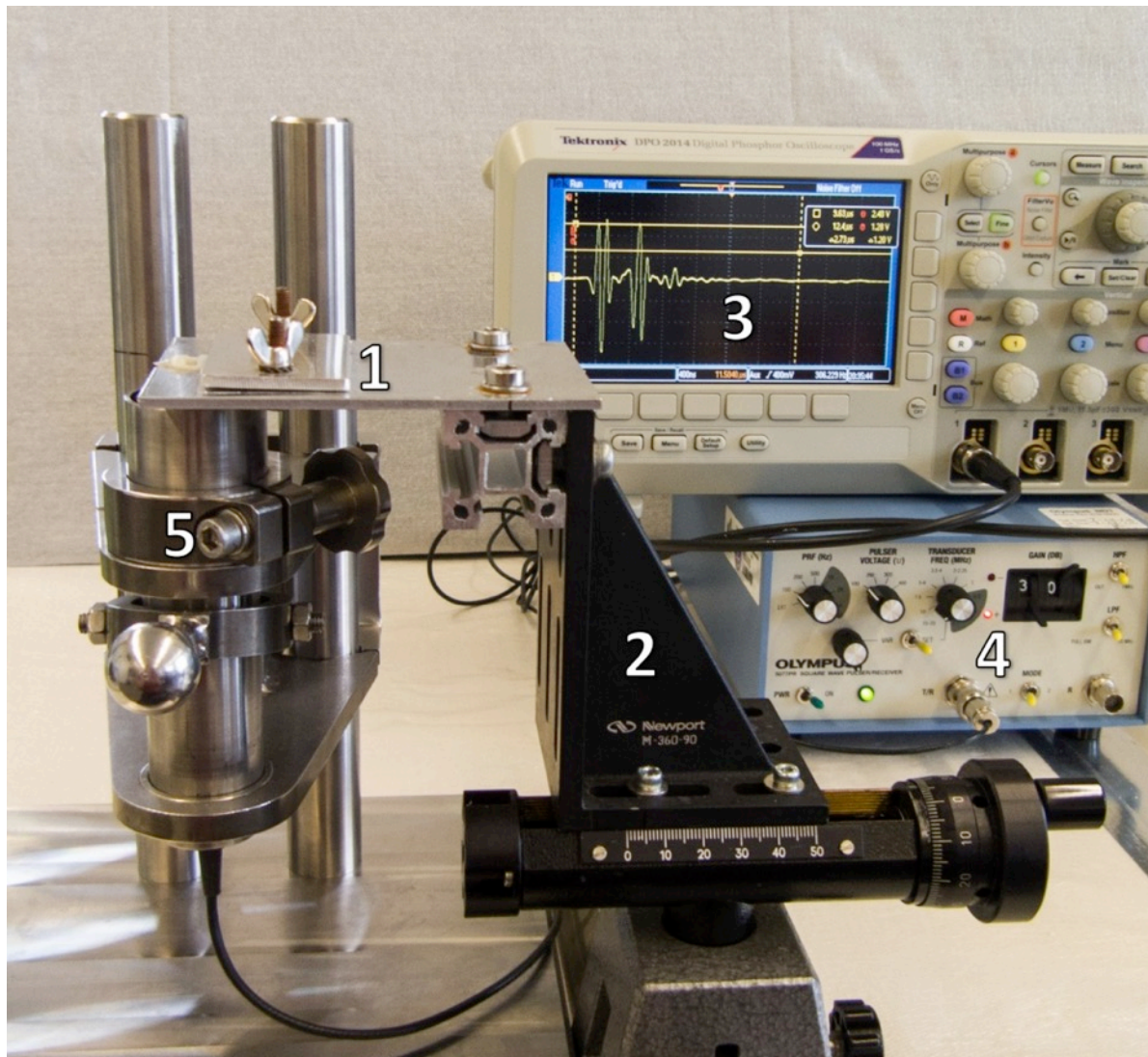


Abb. 12: Durch den skalierten Tisch (2) konnte die in der Halterung (1) befindliche Zahnscheibe auf der x-Achse verschoben werden. Die US-Sonde in der Bohrerhalterung (5) wurde über den Federmechanismus an die Zahnscheibe angekoppelt. Das US-Gerät (4), dessen Signale mit einem Oszilloskop (3) ausgelesen wurden, diente als Sender und Empfänger.

#### 4.1.2 Entwicklung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn

Die grundlegende Idee war, medizinisches US-Gel (G1) mit Pulvern, die eine höhere akustische Impedanz besitzen, zu vermischen, um die Impedanz zu erhöhen und somit näher an der Impedanz der Zahnhartsubstanzen zu sein. Damit wäre eine bessere Ankopplung von Ultraschall an den Zahn gewährleistet. Die Testgele wurden nach folgender Anleitung hergestellt:

Mit einer 1 ml Spritze (BD Plastipak 1,0 ml, LOT 0802023, Becton Dickinson Biosciences, USA) wurde das US-Gel (G1) in die auf einer Laborwaage (BP 3100 S, S/N: 50309336, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) befindlichen Eppendorf Tubes 1,5 ml (Best.-Nr.: 0030125.215, LOT A145640R, Eppendorf AG, Deutschland) zu jeweils 0,5 g eingebracht. Die Tubes wurden 5 Sekunden in einer Eppendorf Zentrifuge 5415C (S/N: B 65364, Gerätebau Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 1000 U/min zentrifugiert, um das US-Gel (G1) am Boden der Tubes zu sammeln. Auf der Laborwaage



wurden, die in der Tab. 2 genannten Pulver, zu 0,50 g und 0,25 g abgewogen und hinzugegeben. Mit einem Universalmischgerät (Silamat S6, S/N: 103899, Ivoclar vivadent, Austria) wurden die Testgele 5 x 30 Sekunden durchmischt und mit einer Pipettenspitze 200 µl (Best.-Nr.: 70.760.002, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zwischen den Vorgängen von Hand vermennt und abschließend durch kurzes zentrifugieren auf dem Boden gesammelt. Von den jeweiligen Konzentrationen wurden 2 Testgele hergestellt. Bei dem Buehler Micropolish II 0,05 µm Pulver (P9) wurden die Mischungsverhältnisse 0,5 g Gel + 0,1 g und 0,5 g Gel + 0,05 g Pulver verwendet.

Tab. 2:

Pulver	Ref.-ID
Spezial Edelkorund EW 60 (250 µm; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [255]; Harnisch+Rieth GmbH+Co.KG, Deutschland)	P1
Rocatec plus (110 µm; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + SiO <sub>2</sub> [246]; LOT 460283, 3M ESPE, Deutschland)	P2
Spezial Edelkorund 30B (50 µm; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [255]; Harnisch+Rieth GmbH+Co.KG, Deutschland)	P3
Glanzstrahlmittel Klasse 55A (50 µm; 72,5 % SiO <sub>2</sub> , 13,7 % Na <sub>2</sub> O, 9,8 % CaO, 3,3 % MgO, 0,4 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 0,2 % FeO/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 0,1 % K <sub>2</sub> O [256]; Harnisch+Rieth GmbH+Co.KG, Deutschland)	P4
Schott dentalglass (37,64 µm; 30 % SiO <sub>2</sub> , 30 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 15 % Fluoride, 10 % CaO, <10 % Na <sub>2</sub> O, <10 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [261]; ID1012242; Material GM35429, Schott AG, Deutschland)	P5
Rocatec soft (30 µm; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + SiO <sub>2</sub> [246]; Best.-Nr.: 06829, 3M ESPE, Deutschland)	P6
Buehler Micropolish II 1 µm (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [251]; 40-6321-016, LOT F401, Buehler, USA)	P7
Buehler Micropolish II 0,3 µm (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [251]; 40-6323-016, LOT H086, Buehler, USA)	P8
Buehler Micropolish II 0,05 µm (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [251]; 40-6325-008, LOT E701, Buehler, USA)	P9

Tab. 2: Übersicht und Zusammensetzung der Pulver nach absteigender Korngröße sortiert. Ref.-ID dient zur einfachen Identifizierung.

#### 4.1.3 Untersuchungsgruppen

In Tab. 3 werden alle gebrauchsfertigen Untersuchungsgruppen und die dazugehörigen Referenz-Identifikationsnummern (Ref.-ID) aufgeführt. Die Zusammensetzungen der Testgele sind, soweit bekannt, enthalten. In Tab. 4 sind die individuell hergestellten Untersuchungsgruppen und deren Zusammensetzung aufgeführt.

Tab. 3:

Testgel	Ref.-ID
Medizinisches Ultraschall-Kontakt-Gel (US-Gel; Best.-Nr.: 7873, LOT 11096301, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) Zusammensetzung: 74 % Aqua purificata, 25 % Propylenglykol, 1 % Natriumpolyacrylat [252]; Schallgeschwindigkeit Wasser: 1497 m/s bei 25 °C [92]	G1
Zahnpasta Elmex (LOT 03471K, GABA GmbH, Hamburg, Deutschland); Zusammensetzung: Aqua, Hydrated Silica, Sorbitol, Hydroxyethylcellulose, Olafur, Aroma, Limonene, Titanium Dioxide, Saccharin [254]	G2
Liquid Strip (LOT P56774, Ivoclar vivadent, Lichtenstein) Glycerin-Gel zur Vermeidung der sauerstoffinhibierten Schicht beim Einsetzen von Keramik-Restaurationen Zusammensetzung: wasserlös. Paste auf Glycerinbasis; Glycerinanteil 50 – 100 % [257]	G3

Sonotech Soundsafe (25-004 10222 A, US NSN: 6850-01-157-4348; Sonotech, USA); Zusammensetzung: 70 % Wasser, 10 – 30 % Propylene Glycol, 5 – 20 % Glycerin; Schallgeschwindigkeit laut Hersteller: 1600 – 1650 m/s [263,264]	G4
Hydroxylapatit 300 nm 10 % (C73-33-300 B00050 v. 29.08.12, DR. KURT WOLFF GMBH & CO. KG Bielefeld, Deutschland) Zusammensetzung: Die Hydroxylapatit-Gele sind in einem wässrigen Gel dispergiert mit dem Gelbildner Hydroxyethylcellulose	G5
Hydroxylapatit 300 nm 20 % (C73-33-300 B000104 v. 07.08.12, siehe G5)	G6
Hydroxylapatit 1000 nm 10 % (C73-33-1000 B000504 v. 30.08.12, siehe G5)	G7
Hydroxylapatit 1000 nm 20 % (C73-33-1000 B000503 v. 30.08.12, siehe G5)	G8
Glycerin 99 % (Glycerol, G5516-1L, LOT BCBH7875V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland); Schallgeschwindigkeit: 1923 m/s bei 25 °C [70]; 1904 m/s bei 20 °C [92]	G9
Glycerin 75 % (verdünnt mit aqua dest., 3 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> + 1 H <sub>2</sub> O)	G10
Glycerin 50 % (verdünnt mit aqua dest., 1 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> + 1 H <sub>2</sub> O)	G11
Glycerin 25 % (verdünnt mit aqua dest., 1 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> + 3 H <sub>2</sub> O)	G12

Tab. 3: Übersicht und Zusammensetzung der gebrauchsfertigen Untersuchungsgruppen (Testgele). Ref.-ID dient zur einfachen Identifizierung.

Tab. 4:

Testgel-Komponente 1 (Pulver)	Testgel-Komponente 2 (Gel)	Ref.-ID
EW 60 250 µm (P1); 0,5 g P1	0,5 g G1	G13
EW 60 250 µm (P1); 0,25 g P1	0,5 g G1	G14
Rocatec Plus 110 µm (P2); 0,5 g P2	0,5 g G1	G15
Rocatec Plus 110 µm (P2); 0,25 g P2	0,5 g G1	G16
30B 50 µm (P3); 0,5 g P3	0,5 g G1	G17
30B 50 µm (P3); 0,25 g P3	0,5 g G1	G18
55A 50 µm (P4); 0,5 g P4	0,5 g G1	G19
55A 50 µm (P4); 0,25 g P4	0,5 g G1	G20
Schott dentalglass 37,64 µm (P5); 0,5 g P5	0,5 g G1	G21
Schott dentalglass 37,64 µm (P5); 0,25 g P5	0,5 g G1	G22
Rocatec Soft 30 µm (P6); 0,5 g P6	0,5 g G1	G23
Rocatec Soft 30 µm (P6); 0,25 g P6	0,5 g G1	G24
Buehler Micropolish II 1 µm (P7); 0,5 g P7	0,5 g G1	G25
Buehler Micropolish II 1 µm (P7); 0,25 g P7	0,5 g G1	G26
Buehler Micropolish II 0,3 µm (P8); 0,5 g P8	0,5 g G1	G27
Buehler Micropolish II 0,3 µm (P8); 0,25 g P8	0,5 g G1	G28
Buehler Micropolish II 0,05 µm (P9); 0,1 g P9	0,5 g G1	G29
Buehler Micropolish II 0,05 µm (P9); 0,05 g P9	0,5 g G1	G30
Buehler Micropolish II 0,3 µm (P8); 0,5 g P8	0,5 g G9	G31
Buehler Micropolish II 0,3 µm (P8); 0,25 g P8	0,5 g G9	G32

Tab. 4: Übersicht und Zusammensetzung der individuell hergestellten Untersuchungsgruppen (Testgele) aus den Testgel-Komponenten. Ref.-ID dient zur einfachen Identifizierung.

#### 4.1.4 Durchführung

Das Prinzip der Messung beruhte auf einem indirekten Verfahren. Das zu untersuchende Testgel wurde an der gegenüberliegenden Grenzfläche Zahn – Luft aufgetragen, um den Übergang der Schallwellen von Zahn in Testgel zu untersuchen. Abb. 10 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung.

1. Vorbereitende Maßnahmen: Die in die Halterung eingespannte Zahnscheibe wurde mit Hilfe des verschiebbaren Tisches bis zur Dentin-Messstelle (6,5 mm Position, Abb. 8B) gefahren. Dies entsprach der Messstellen-Mitte in x- und z-Richtung. Am US-Gerät wurden folgende Einstellungen vorgenommen: PRF (Pulse Recurrence Frequency) 100 Hz, PulserVoltage 100 V, Transducer Freq 10 MHz, Gain 30 db, HPF (high-pass filter) off, LPF (low-pass filter) off.

2.: Die US-Sonde wurde vor jeder einzelnen Messung mit medizinischem US-Gel (G1) an der durch den Tisch definierten Messstelle der Zahnscheibe angekoppelt und durch Feinjustierung ein Signal ohne Testgel gegen Luft mit einer Amplitude von 2,48 V für Peak 1.1 ( $U_1$ ) und Peak 2 ( $U_{2_{Ref}}$ ) am Oszilloskop eingestellt (Abb. 13A). Diese Messung war eine Referenzmessung, die vor allen Messungen an der Dentin-Messstelle durchgeführt wurde.

3.: Das Testgel wurde mit Hilfe eines Spatels auf die Messstelle gebracht und mit einer weiteren Zahnscheibe (20 x 11 x 2 mm; Dentin – unten) abgedeckt. Diese diente dazu, um aufgrund der Reflexion an der Grenzfläche, eine Aussage über die Dämpfung im Testgel zu machen.

4.: Der Messwert  $U_2$  wurde bestimmt und daraus der Messparameter  $\Delta U_2$  errechnet. Dieser ergab sich aus der Differenz der Referenzmessung gegen Luft ( $U_{2_{Ref}}$ ) und der Testgel-Messung ( $U_2$ ). Alle Messwerte wurden im Oszilloskop markiert, gesichert und in eine Tabelle eingetragen.

5.: Abschließend wurde die Zahnscheibe beidseits mit einem feuchten Wattestäbchen (Bel Premium, Hartmann, Deutschland) gereinigt und befeuchtet.

Als zweite Messreihe wurden Messungen an der 2 mm Schmelz-Messstelle (9 mm Position; Abb. 8B) durchgeführt. Die Referenzmessung entsprach 2,48 V für Peak 1.1 ( $U_1$ ) und 1,76 V für Peak 2 ( $U_{2_{Ref}}$ ; Abb. 14A). Das Testgel wurde im Gegensatz zur ersten Messreihe nicht mit einer Zahnscheibe abgedeckt, sondern eine erbsengroße Menge Testgel aufgebracht. Das Vorgehen entsprach der ersten Messreihe.

#### 4.1.5 Datenverarbeitung und statistische Analyse

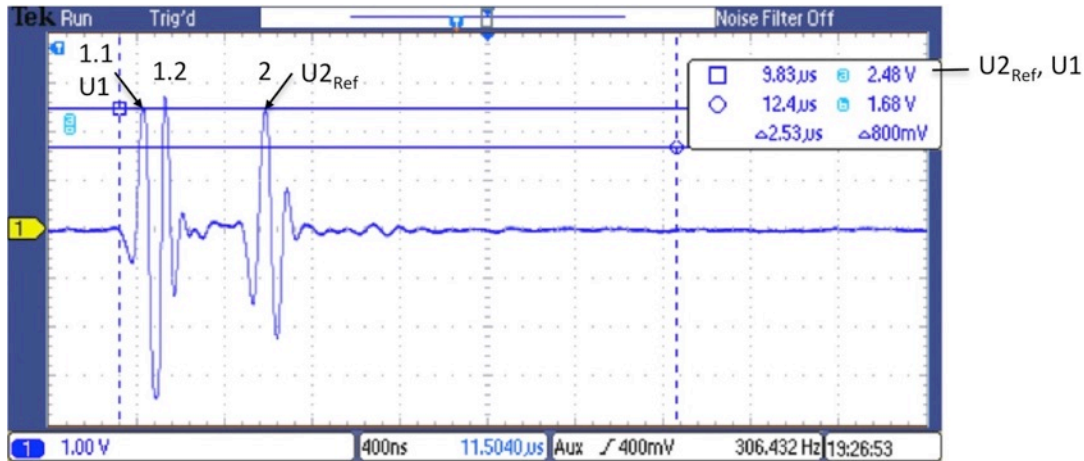
Die Abb. 13A und Abb. 14A zeigen die Referenzmessungen vor jeder Messung des Testgels. Gemessen wurde bei Peak 1 immer der erste Peak (1.1) und bei Peak 2 der Größte (2). Somit zeigte Peak 1 (U1) die Reflexion der US-Wellen am Übergang von der US-Sonde auf den Zahn. Dieser sollte möglichst gering sein, damit ein großer Anteil der Schallenergie auf den Zahn übertragen werden konnte. Peak 2 (U2) entspricht dem Übergang von Zahn auf Luft, welcher möglichst hohe Werte haben sollte, um eine große Differenz zwischen Referenzmessung und Testgel-Messung zu haben. Die Amplitude von Peak 2 war von Peak 1 abhängig. Mehr Schallenergie im Zahn entsprach höheren Reflexionen an den Grenzflächen. In Abb. 13B und Abb. 14B konnte die reduzierte Amplitude an Peak 2 gemessen werden, nachdem hier ein Testgel aufgebracht wurde. Die Grenzfläche bei U2 zeigte durch das Aufbringen eines Testgels eine geringere Reflexion der US-Wellen und somit ist die Zunahme von  $\Delta U2$  ein Maß für die Erhöhung der Schallimpedanz im Testgel. Der Peak 3 entstand durch den Übergang von Testgel auf die abdeckende Zahnscheibe, die nur bei den Dentin-Messungen verwendet wurde. Bei der Schmelz-Messung in den Abb. 14 weist Peak 2 eine andere Form auf (2a, 2b). Das war auf die Tatsache zurückzuführen, dass auch eine Reflexion durch den Übergang der US-Wellen von Dentin in den Schmelz entstand. Es zeigte sich hier, dass durch das Auftragen des Testgels Peak 2a und 2b keine Veränderungen aufwiesen, sondern nur Peak 2, welcher der Grenzfläche Schmelz – Testgel entsprach.

Auf diese Weise wurden von den in Tab. 3 genannten Untersuchungsgruppen 5 Stichproben gemessen, bei G1, G7, G13 – G32 wurden 10 Stichproben gemessen, da bei den individuell hergestellten Testgelen von jeder Konzentration zwei hergestellt wurden, um mögliche Fehler bei der Mischung zu kompensieren. In einer ersten Versuchsreihe wurden die Gele G1 bis G30 untersucht. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Testgele G31 und G32 entwickelt und zusammen mit G1 und G7 erneut vermessen. Der Messparameter war  $\Delta U2$ , das als Maß für die Reduktion der Reflexion der US-Wellen durch die Anpassung des Testgels an die Zahnhartsubstanzen galt. Diese Anpassung geschah durch eine Erhöhung der Schallimpedanz im Testgel, die zu einer geringeren Impedanz-Differenz der Medien (Testgel, Zahnhartsubstanzen) führte. Die statistische Analyse erfolgte gegen G1 non-parametrisch mit dem Mann-Whitney-Test auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  für die Untersuchungsgruppen, getrennt für Schmelz und Dentin.



Abb. 13:

A



B

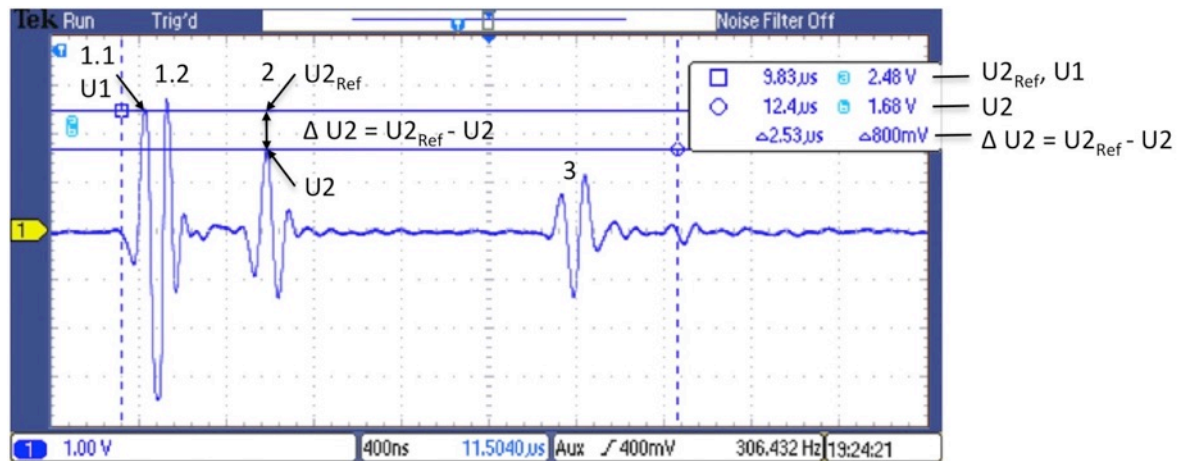
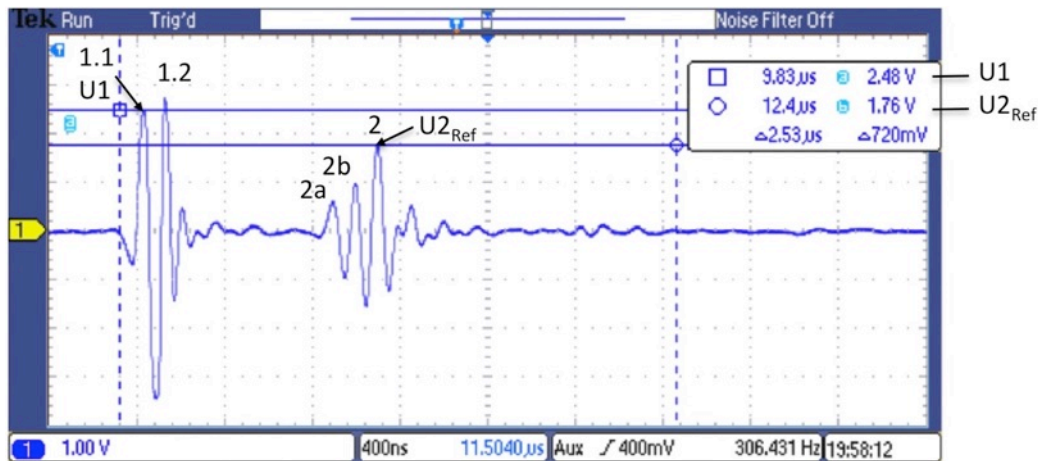


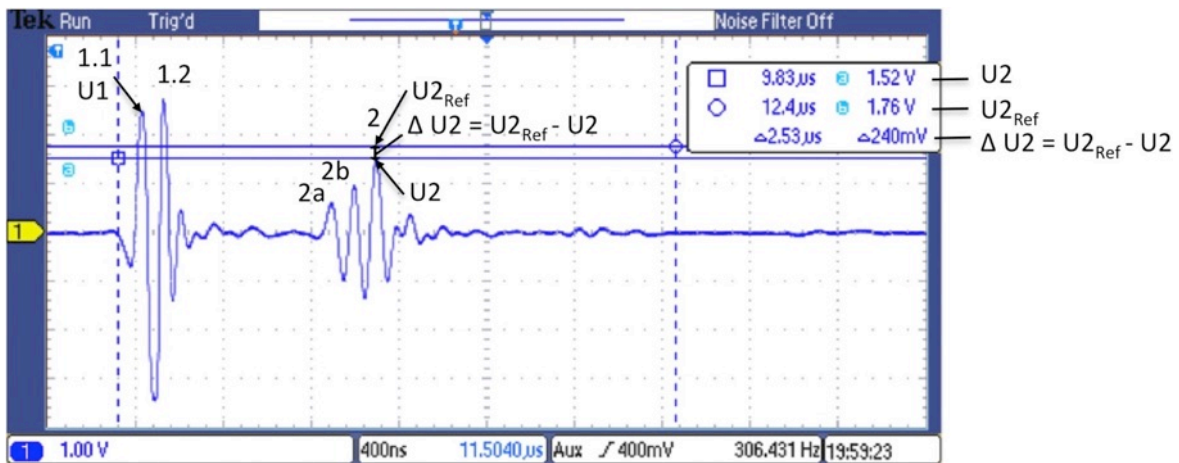
Abb. 13: A: Dentin-Referenzmessung (Dentin – Luft) mit einer Amplitude von 2,48 V für Peak 1.1 (U1) und Peak 2 (U2<sub>Ref</sub>). , die vor jeder Messung durchgeführt wurde und als Kalibrierung der Messung galt. Peak 1.2 wurde nicht berücksichtigt.  
B: Dentin-Testgel-Messung (Dentin – Testgel); Die Grenzfläche bei U2 zeigte durch das Aufbringen eines Testgels eine geringere Reflexion durch die Anpassung des Testgels an die Zahnhartsubstanz. Der Messparameter  $\Delta U2$  ergab sich aus der Differenz der Referenzmessung gegen Luft (U2<sub>Ref</sub>) und der Testgel-Messung (U2). Die Zunahme von  $\Delta U2$  ist ein Maß für die Erhöhung der Schallimpedanz im Testgel, aufgrund einer geringeren Impedanz-Differenz der Medien (Dentin, Testgel). Peak 3 entstand durch die Abdeckung des Testgels mit der Zahnscheibe.

Abb. 14:

A



B



- Abb. 14:
- A: Schmelz-Referenzmessung (Schmelz – Luft) mit einer Amplitude von 2,48 V für Peak 1.1 (U1) und 1,76 V für Peak 2 (U2<sub>Ref</sub>), die vor jeder Messung durchgeführt wurde und als Kalibrierung der Messung galt. Peak 1.2 wurde nicht berücksichtigt. Peak 2 weist eine andere Form auf (2a, 2b), diese entstand durch eine Reflexion beim Übergang der US-Wellen von Dentin in den Schmelz.
  - B: Schmelz-Testgel-Messung (Schmelz – Testgel); Die Grenzfläche bei U2 zeigte durch das Aufbringen eines Testgels eine geringere Reflexion durch die Anpassung des Testgels an die Zahnhartsubstanz. Der Messparameter  $\Delta U2$  ergab sich aus der Differenz der Referenzmessung gegen Luft (U2<sub>Ref</sub>) und der Testgel-Messung (U2). Die Zunahme von  $\Delta U2$  ist ein Maß für die Erhöhung der Schallimpedanz im Testgel, aufgrund einer geringeren Impedanz-Differenz der Medien (Dentin, Testgel). Die andere Form von Peak 2 (2a, 2b) zeigt durch das Aufbringen des Testgels keine Veränderung.

## 4.2 Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht *in vitro*

Die Ultraschall-Markierung von Licht soll am Durchblutungsmodell untersucht werden. Ziel ist es, mit Ultraschall im Testmedium ein Laserlicht zu markieren und im detektierten Lasersignal unterschiedliche Frequenzen eines pulsierend gepumpten Erythrozytenkonzentrats zu erkennen.

### 4.2.1 Entwicklung der Versuchsanordnung

Der Aufbau ist im Detail in Abb. 15 und in einer Übersicht in Abb. 16 dargestellt. Abb. 17 zeigt ein Bild des Versuchsaufbaus. Der Blutkreislauf wurde mit einer Pumpe (Ismatec ISK1078B, S/N: 211837-8, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland), Silikon Schläuche (Tygon T3303-23, 2,4 mm ID, 5,6 mm OD, Saint-Gobain Performance Plastics, Frankreich) und einer Küvette aus Kunststoff (VersaFlour Microcuvette, Art.-Nr.: 170-2416, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) simuliert. Ausgehend von einem Becherglas wurde das Testmedium über die Pumpe mit einem 120 cm langen Schlauch zur Küvette und mit einem 45 cm langen Schlauch zurück in das Becherglas transportiert. Der Pumpenschlauch hatte definierte Markierungen (Abstand 24 cm) zum Einbringen in die Pumpe, der Abstand Becherglas – Pumpe war 34 cm und Pumpe – Küvette 60 cm. Der Boden der Küvette wurde mit der Trennscheibe und dem Multifunktionswerkzeug abgetrennt. Die Höhe (y-Achse) der Küvette betrug 33 mm, sie war quadratisch mit einer äußeren Grundfläche von 4,8 mm (x- und z-Achse) und 0,9 mm Wanddicke; das Volumen war 0,3 ml. Die Verbindung von Schlauch und Küvette wurde durch Einführen der Küvette in die Schlauchenden mit Hilfe einer Sprengringzange vorgenommen. Es wurden Durchflussraten von ca. 48 ml/min bei Pumpeneinstellung 19 und ca. 69 ml/min bei 27 gemessen.

Ein Ultraschall-Generator (800 kHz, 16 W  $\pm$  1 W, Art.-Nr.: 1175.39, S/N: 531, PHYWE Systeme GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) erzeugte in einem US-Kopf (Durchmesser 27 mm) die US-Wellen. Die Küvettenmitte wurde über Glycerin 99 % als Ankopplungsmedium in Kontakt zum Zentrum des US-Kopfes gebracht und fixiert. Auf diese Weise wurden die US-Wellen auf das Testmedium übertragen. Die Wellenlänge im Testmedium betrug ca. 1,85 mm bei einer angenommen Schallgeschwindigkeit von 1497 m/s [92]).

Eine Continuous-Wave-Laserdiode (L785P025, 25 mW, 785 nm; Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) mit einem Transformator (Elektronikwerkstatt Physik, Universität Regensburg, Deutschland) emittierte ein Laserlicht, welches auf dem gegenüberliegenden, individuell hergestellten Detektor mit einer Photodiode (BPW34, Siemens, München, Deutschland) auftraf. Ausgelesen wurde das Signal mit einem Lock-in Verstärker (HF2LI, S/N: HF2-DEV321, Zurich Instruments AG, Schweiz) und der Software ziControl 12.02 auf einem Laptop (Acer Aspire 5830TG, S/N: LXRHK02044119349841601, China). In diesen Lock-in Verstärker wurde auch das Frequenzsignal des US-Generators eingespeist, das zur Datenverarbeitung benötigt wurde.

Die Laserhalterung, die Detektorhalterung und die Halterung für die Küvette und den US-Kopf

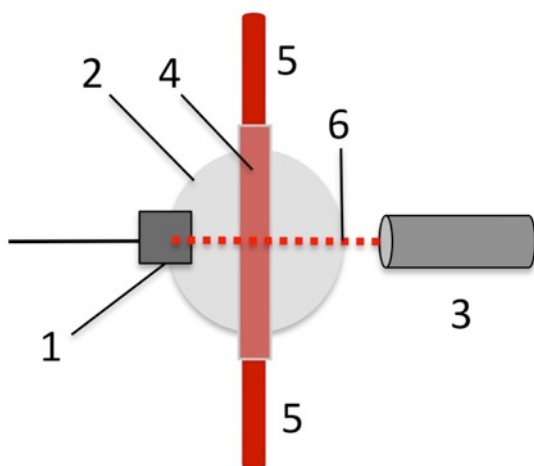
wurden mit drei Montageschlitten auf einem Alu-Profil (120 x 9 x 9 cm) montiert. Laser, Detektor und Küvette befanden sich auf der x-Achse. Die Küvette mit dem US-Kopf konnte durch die Montage auf einem skalierten Tisch in y- und z-Richtung mit Drehrädern bewegt und feinjustiert werden.

Die Laserposition wurde festgelegt, der Detektor auf den Laserstrahl ausgerichtet und die Küvette in den Strahlengang eingebracht. Der Abstand Detektor – Küvette betrug 5 mm, Küvette – Laser 28 mm. Für die Messungen wurden die y-z-Positionen 14,5 mm und 22,5 mm gewählt. Das Laserlicht durchstrahlte die Küvette in Höhe der US-Kopf-Mitte und 0,5 mm vor der distalen Küvettenwand. Das Testmedium floss in y-Richtung von oben nach unten, in z-Richtung wurde es von den US-Wellen durchdrungen und in x-Richtung wurde es vom Laserlicht durchstrahlt (Abb. 15A und B).

Zusätzlich wurden zu den gepumpten und stehenden Testmedien Untersuchungen mit konstantem Fluss durchgeführt. Hierzu musste ein veränderter Versuchsaufbau erstellt werden (Abb. 16B). Der Versuchsaufbau unterschied sich nur in der Art und Weise wie die Testmedien durch die Küvette flossen. Nach der Pumpe wurde an den vorhandenen Schlauch mit einem Schlauchverbinder (Rotilabo, Best.-Nr.: CT58.1, LOT 21021031, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) ein Schlauch (110 cm; VWR Peroxide Silicone Tubing, innen 1 mm, außen 3 mm, Best.-Nr.: 228-0700, LOT 738585, VWR Int. GmbH, Darmstadt, Deutschland) angeschlossen, der das Medium in eine 50 ml Bürette (Best.-Nr.: 13568, Brand GmbH + Co. KG, SILBERBRAND, Wertheim, Deutschland) transportierte. In der Bürette wurde ein Füllstand-Pegel von 37 ml gehalten, um einen konstanten Fluss zu erzeugen. Die Bürette wurde auf einem Ständer montiert und durch einen 15 cm Schlauch (Tygon T3303-23) mit der Küvette verbunden. Je nach Medium und Ausstopfung der Küvette wurden Durchflussraten von 28 ml/min bis 84 ml/min gemessen.

Abb. 15:

A



B

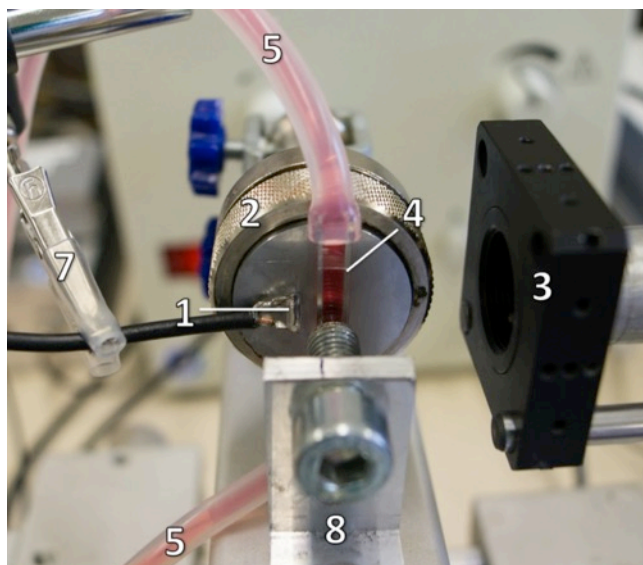
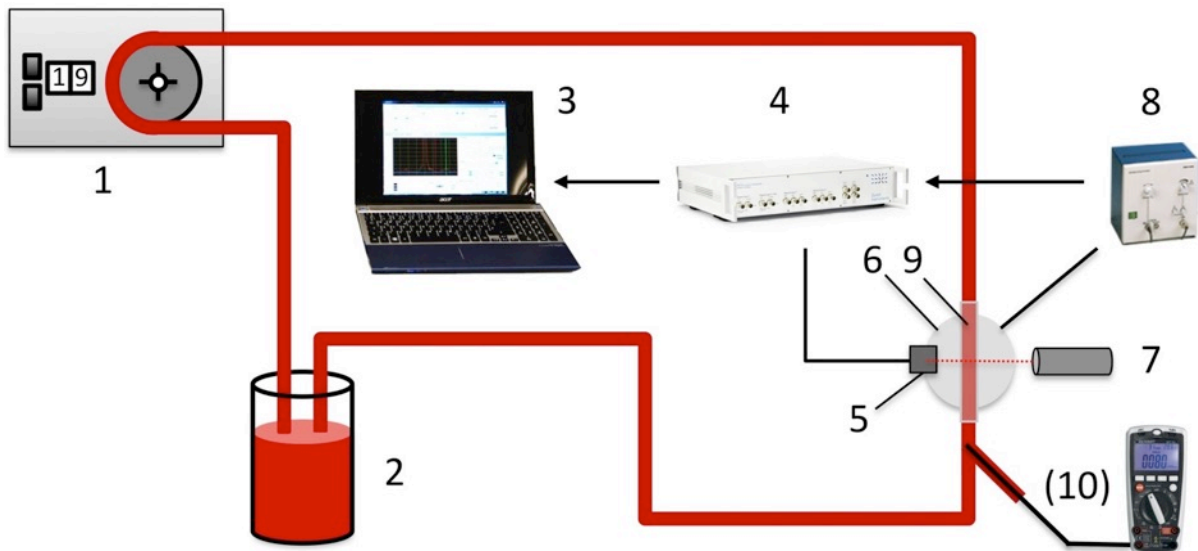


Abb. 15: A, B: Detailschema und -aufnahme: Photodiode (1) zur Detektion des vom Laser (3) in x-Richtung emittierten Lichts (6); US-Kopf (2) erzeugt in z-Richtung Ultraschallwellen im Testmedium, das über die Schläuche (5) und die Küvette (4) den Blutkreislauf in y-Richtung von oben nach unten simulierte; Befestigung der Küvette an US-Kopf und Tisch (8); Halterung der Photodiode (7), die auf das Laserlicht ausgerichtet wurde

Abb. 16

A



B

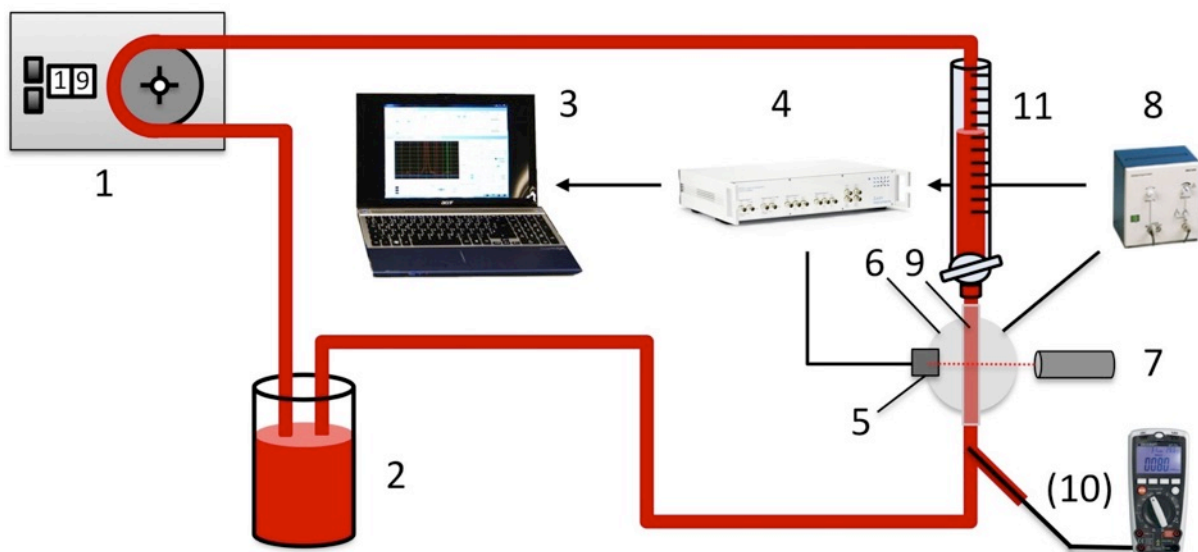


Abb. 16: A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der gepulsten und stehenden Testmedien: Pumpe (1) simulierte mit Testmedium (2) und Küvette (9) den Blut-Kreislauf. US-Generator (8) und US-Kopf (6) markierten Testmedium und Licht des Lasers (7). Photodiode (5) detektierte das Laserlicht und wurde über Lock-in Verstärker (4) und Laptop (3) ausgelesen. Optionaler Temperatur-Kontaktfühler (10) diente zur Temperaturmessung (siehe Kapitel 4.2.5).  
B: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Testmedien mit kontinuierlichem Fluss: Pumpe (1) sorgte für einen konstanten Füllstandspegel des Testmediums (2) in der Bürette (11), um einen kontinuierlichen Fluss in der Küvette (9) zu erzeugen. US-Generator (8) und US-Kopf (6) markierten Testmedium und Licht des Lasers (7). Photodiode (5) detektierte das Laserlicht und wurde über Lock-in Verstärker (4) und Laptop (3) ausgelesen. Optionaler Temperatur-Kontaktfühler (10) diente zur Temperaturmessung (siehe Kapitel 4.2.5).



Abb. 17:

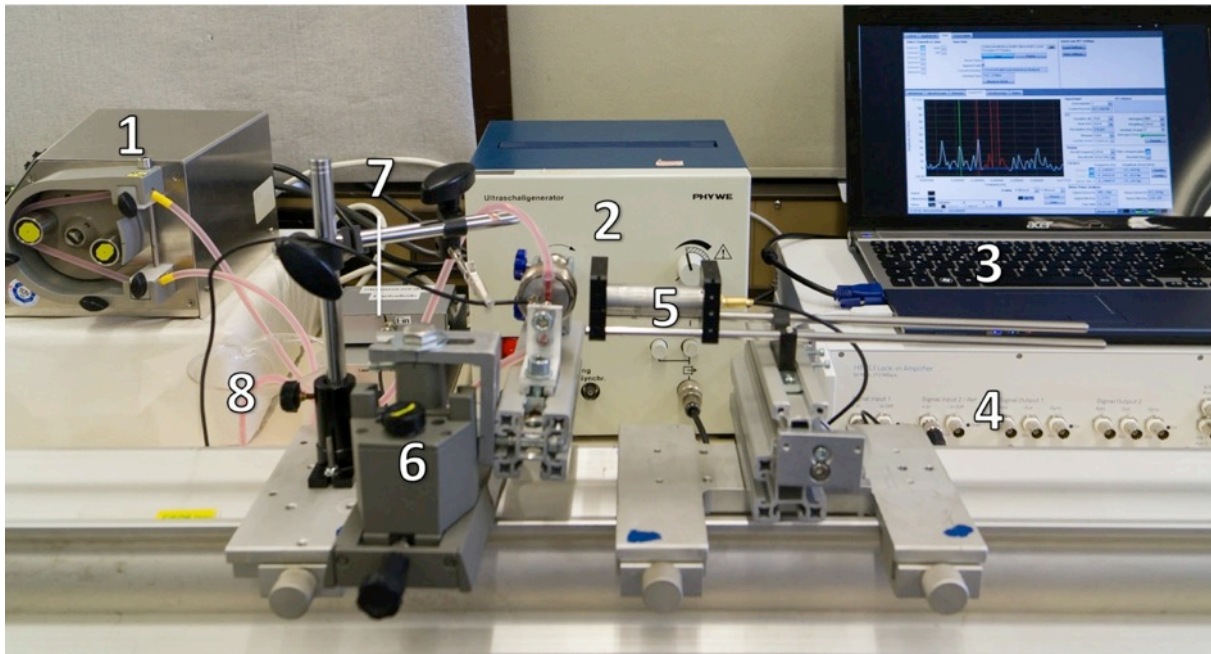


Abb. 17: Bild des Versuchsaufbaus: Pumpe (1) simulierte den Blutkreislauf. US-Generator (2) mit US-Kopf erzeugte US-Wellen. Laptop (3) diente mit Lock-in Verstärker (4) zur Signalverarbeitung. Laser (5) sendete Laserlicht durch die mit Testmedium befüllte Küvette. Der skalierte Tisch (6) ermöglichte Verschiebung der Küvette in y- und z-Richtung. Photodiodensteuerung und Laser-Transformator (7); Becherglas mit Testmedium (8)

#### 4.2.2 Herstellung der Testmedien

Die Testmedien wurden mit leukozytendepletiertem Human-Erythrozytenkonzentraten (EK; Blutbank Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland) hergestellt. Von jedem EK wurde die Anzahl der Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  standardmäßig mit einer Zählkammer (Typ Neubauer Improved, Tiefe  $0,1\text{ mm}$ ,  $0,0025\text{ mm}^2$ ; Laboroptik, UK) unter einem Durchlichtmikroskop bestimmt. Die resultierenden Erythrozytenkonzentrationen sind in Tab. 5 dargestellt. Die mechanische Zerstörung und Aggregation der Erythrozyten während der Versuchsdauer wurde in Anlehnung an Klingebiel [115] durch Zugabe von Synperonic F68 (Best.-Nr.: 35724, LOT 070431, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) reduziert.

Für die Untersuchungen wurden aus jeder Konserve drei Testmedien (EK 1:1 unverdünnt, EK 1:10 und EK 1:100) mit folgender Verdünnungsreihe [105,167] hergestellt:

1. 10%ige Synperonik/NaCl Lösung: 1 g Synperonik + 10 ml NaCl
2. EK 1:1 unverdünnt: 600  $\mu\text{l}$  10%ige Synperonik/NaCl Lösung + 59,4 ml EK
3. EK 1:10: 54 ml NaCl Lösung + 6 ml EK 1:1 unverdünnt
4. EK 1:100: 59,4 ml NaCl Lösung + 600  $\mu\text{l}$  EK 1:1 unverdünnt

Tab. 5:

EK-ID	EK-Nr.	Anzahl der Erythrozyten/ $\mu\text{l}$
1	3530931	$5,46 \times 10^6$
2	3739190	$4,73 \times 10^6$
3	3457864	$4,04 \times 10^6$
4	366328	$4,86 \times 10^6$
5	324008	$4,54 \times 10^6$
6	3354661	$5,20 \times 10^6$

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Erythrozytenkonzentrate mit der Anzahl der Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$ , der ID- und Blutkonserven-Nummer (EK-Nr.)

#### 4.2.3 Durchführung

Lock-in Verstärker werden auch als Trägerfrequenzverstärker bezeichnet und können sehr kleine Signale in einem tausendfach stärkeren Rauschen detektieren und messen. Sie können durch das Koppeln des gesuchten Signals mit einer Referenzfrequenz (Trägerfrequenz) das Rauschen auf alle anderen Frequenzen ausblenden und dadurch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreichen. Diese Verbindung von Signalen mit einem Trägersignal wird als Modulation bezeichnet [126,247] (siehe Kapitel 2.4.3.1). In unserem Versuchsaufbau wurde das gesuchte Nutzsignal (das gepulste Testmedium) mit Hilfe des Ultraschalls mit der gemessenen Referenzfrequenz von etwa 811 kHz moduliert und damit markiert. Die Information über die Referenzfrequenz stellte der US-Generator dem Lock-in Verstärker bereit, ohne die es ihm nicht möglich gewesen wäre ein Signal zu erkennen. Aus diesem Signal wurde zur weiteren Rauschunterdrückung ein Frequenzspektrum mit Hilfe der Fast Fourier Transformation (FFT) erstellt. Das Ergebnis einer solchen Frequenzanalyse zeigte die Intensität von Frequenzen im Signal (siehe Kapitel 4.2.4).

Der Lock-in Verstärker und die Software wurden mit folgenden Einstellungen betrieben: 225 Samples/s wurden vom Gerät aufgezeichnet, für die Frequenzanalyse mit Hilfe der FFT wurden 1024 Samples benötigt. Dem entsprach eine Dauer von 4,5 s für eine FFT. Durch die Anzahl (Number of Averages) von 5, 10 und 20 wurde die Messdauer angepasst, wodurch sich für EK 1:100, EK 1:10 und EK 1:1 Messdauern von 22,5 s, 45 s und 90 s ergaben. Als Einheit wurde  $V_{\text{rms}}^2/\text{Hz}$  gewählt.

Die Küvette wurde mit Glycerin 99 % angekoppelt, zentral auf den US-Kopf ausgerichtet und mit der Fixierschraube befestigt. Der US-Generator wurde eingeschaltet und der gepulste Kreislauf durch die Pumpe mit der Geschwindigkeit 19 ( $F1 \approx 2,2 \text{ Hz}$ ) gestartet ( $t_0$ ; Abb. 18A). Nach einer Zeit der Justierung und des Einschwingens des Systems (ca. 30 s) wurde der Messvorgang gestartet ( $t_1$ ). Nach der Messung F1 ( $t_2$ ) mit einer Dauer von 22,5 s bis 90 s wurde das Ergebnis mit Hilfe der Software gesichert und die Pumpe auf Geschwindigkeit 27 ( $F2 \approx 3,2 \text{ Hz}$ ) gestellt. Ca. 30 s nach  $t_2$  wurde der Messvorgang für F2 erneut gestartet ( $t_3$ ; Dauer 22,5 s – 90 s). Anschließend wurde die Pumpe abgeschaltet ( $F0 = 0 \text{ Hz}$ ) ( $t_4$ ) und nach 30 s die nächste Messung F0 durchgeführt ( $t_5$ ;

Dauer 22,5 s – 90 s). Nach den Messungen ( $t_6$ ) wurde der Kreislauf entleert, mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, die Küvette neu angekoppelt und das System mit dem nächsten Testmedium in absteigender Verdünnung befüllt.

Abb. 18:

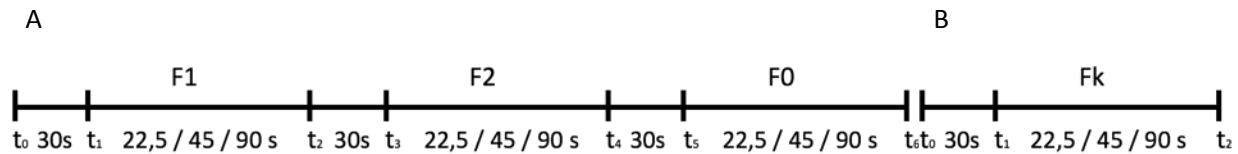


Abb. 18: A: Messablauf bei gepulstem (F1, F2) und stehendem Testmedium (F0)

B: Messablauf bei kontinuierlichem Fluss des Testmediums (Fk)

$t_0 - t_1, t_2 - t_3, t_4 - t_5$ : Dauer der Justierung und des Einschwingens des Systems (30 s).

$t_1 - t_2, t_3 - t_4, t_5 - t_6$ : Messdauern F1, F2, F0, Fk (je nach Testmedium 22,5 s, 45 s oder 90 s).

Zur weiteren Variation der Untersuchungsgruppen wurde eine Küvette mit Watte (Filterwatte; Assistent Glaswolle extrafein No. 1408/2, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) versehen, um die laminare Strömung zu stören und einen diffusen Fluss zu simulieren. Der Versuch wurde genauso wie vorher beschrieben durchgeführt. Im Versuch mit konstantem Fluss (Fk) wurden die Messungen der Testmedien in absteigender Verdünnung, abwechselnd mit und ohne Watte, gemacht. Das Vorgehen und die Einstellungen entsprachen  $t_0 - t_2$  der vorherigen Beschreibung (Abb. 18B). Auf diese Art und Weise wurden die Versuche mit den Pumpfrequenzen (F1, F2), stehend (F0) und mit kontinuierlichem Fluss (Fk) mit allen fünf Erythrozytenkonzentraten (EK-ID 1 – 5) in den unterschiedlichen Konzentrationen (EK 1:1, EK 1:10, EK 1:100) bei den beiden Versuchsbedingungen (mit und ohne Watte) durchgeführt.

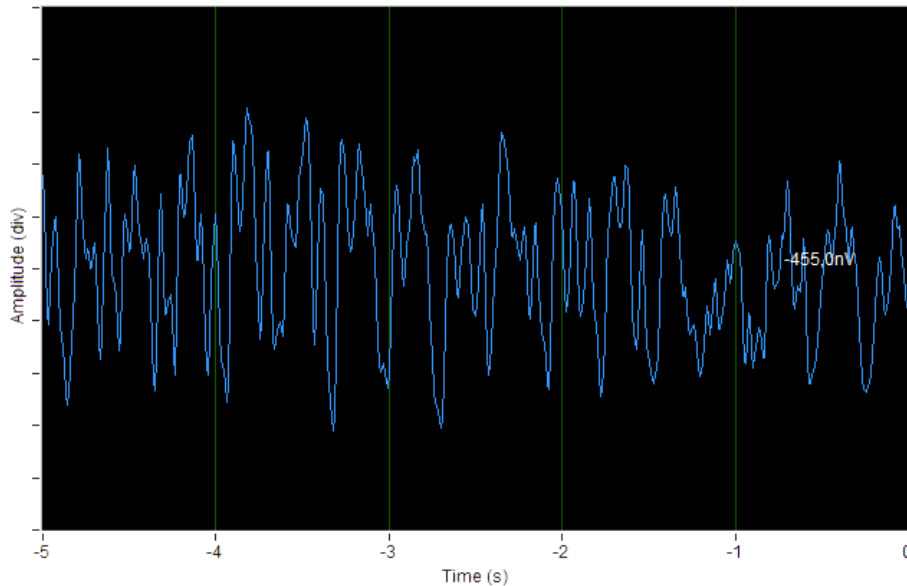
#### 4.2.4 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Durch den Ultraschall wurde das Laserlicht mit der Frequenz des Ultraschalls (811 kHz) amplitudenmoduliert. Die Pulsationen des Testmediums durch die Pumpe führten zu einer weiteren Amplitudenmodulation des 811 kHz Signals mit der Pulsfrequenz. Die 811 kHz entsprachen der Trägerfrequenz eines Radiosenders auf der nochmals die Sprechfrequenz (hier die Pulsation des Testmediums) aufmoduliert ist. Der Lock-In Verstärker führte eine frequenzselektive Amplitudenmodulation des 811 kHz Signals durch, ähnlich einem Radioempfänger. Durch die gewählte Zeitkonstante der Integration wurde die 811 kHz Modulation unterdrückt und die interessierende, niederfrequente Pulsation des Testmediums blieb erhalten. Um die Pulsationsfrequenz vom Rauschen durch turbulente Strömungen unterscheiden zu können, wurde das Ausgangssignal des Demodulators (Abb. 19A), in dem Periodizitäten erkannt werden können, einer Frequenzanalyse mit Hilfe der Fast Fourier Transformation (FFT) unterzogen. Abb. 19B zeigt das Ergebnis der Frequenzanalyse, in dem sich die Pulsationsfrequenz (3,2 Hz und Vielfache davon) als schmaler Peak vom Rauschuntergrund abhebt. Diese Frequenzanalyse stellt die Intensität der unterschiedlichen Frequenzen im Signal dar und wurde zur weiteren Analyse abgespeichert.



Abb. 19:

A



B

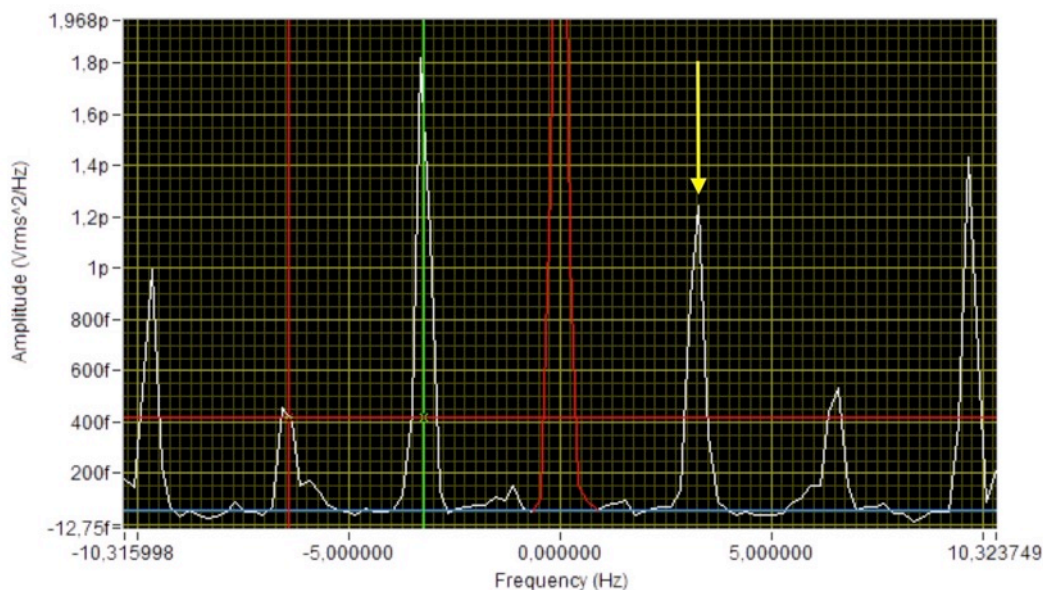


Abb. 19: A: Ausgangssignal des Demodulators im Lock-in Verstärker.

B: Darstellung des Frequenzanalyse-Ergebnisses des Demodulatorsignals mit Hilfe der Fast Fourier Transformation (FFT), in dem sich die Pulsationsfrequenz als schmaler Peak (gelber Pfeil) vom Rauschuntergrund abhebt.

Die Daten aus der Software des Lock-in Verstärkers wurden mit Hilfe von Microsoft Excel aufbereitet und sortiert. Anschließend wurden in SigmaPlot (Version 12.5, Systat Software GmbH, Deutschland) die einzelnen Graphen in 3D-Wasserfall-Plots (Abb. 20) zusammengefasst. Durch die Peaks, die sich auf einer Linie befinden und mit der Frequenz korrelieren, konnte die Konstanz der Frequenzsignale anschaulich dargestellt werden. Exemplarisch wurden die einzelnen Graphen in Abb. 20 zur besseren Unterscheidung in Farben dargestellt und nach der Amplitudenhöhe sortiert. Die y-Achse wurde logarithmisch dargestellt, da die einzelnen Graphen sehr unterschiedliche Amplitudenhöhen aufwiesen, die jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis hatten. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die verschiedenen Testmedien (EK 1:1, EK 1:10, EK 1:100) aus den Erythrozytenkonzentraten 1 – 5 (Tab. 5) in den Grafiken zu den verschiedenen Versuchsbedingungen zusammengefasst.

Abb. 20:

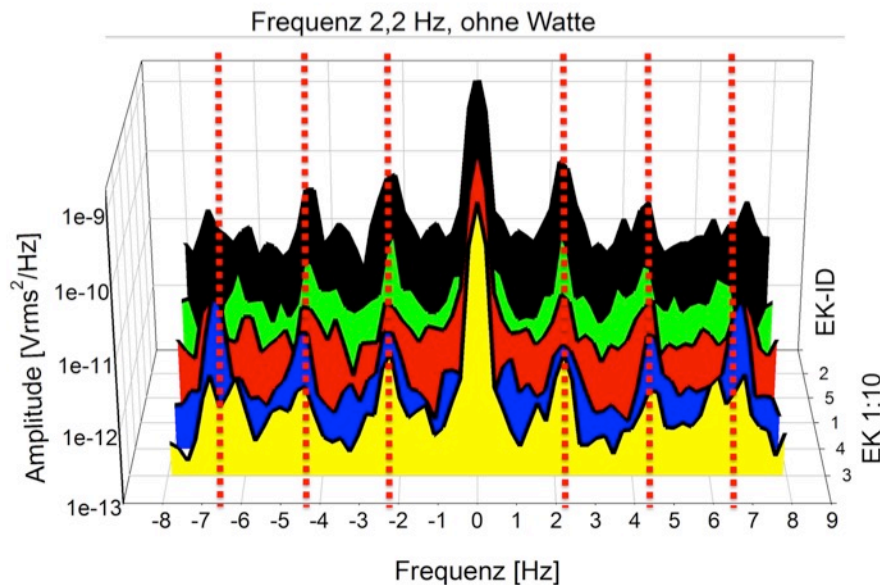


Abb. 20: 3D-Wasserfall-Plot von Testmedien aus den Erythrozytenkonzentraten mit der EK-ID 1 – 5 (Tab. 5) in der Verdünnung EK 1:10, mit der Frequenz 2,2 Hz ohne Watte; zur besseren Unterscheidung der einzelnen Signale wurden sie farblich markiert. Die Peaks befinden sich auf einer Linie (rot) bei 2,2 Hz und Vielfachen davon, sie stellen die Konstanz der Messungen dar.

Zudem wurden in Balkendiagrammen die maximalen Amplitudenhöhen dargestellt, die mit der Pumpenfrequenz korrelierten. Es wurden die Verdünnungen, jedoch ohne Berücksichtigung der einzelnen Erythrozytenkonzentrate (EK), mit und ohne Watte, in Untersuchungsgruppen zusammengefasst. Die statistische Analyse erfolgte non-parametrisch mit dem Mann-Whitney-Test auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  für die Untersuchungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von fünf.

#### 4.2.5 Messung der Temperaturänderung der Testmedien

Ziel dieser Untersuchung war es, die Temperaturänderung der Testmedien während der Frequenzmessungen zu untersuchen. Da durch die Schallabsorption von US-Wellen Energie in Wärme umgewandelt wird, sollte die Auswirkung dieses Effektes betrachtet werden.

##### 4.2.5.1 Entwicklung der Messeinrichtung

Es wurde jeweils der Aufbau der Frequenzmessungen für gepulsten und konstanten Fluss verwendet, der um eine Möglichkeit zur Temperaturmessung erweitert wurde (Abb. 16). Hierzu wurde 3 cm nach der Küvette ein Temperatur-Kontaktfühler (K-Typ) eines Multimeters (Abb. 16, S/N: 11048817, Voltcraft MT52, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland), mit einer Auflösung von  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  Genauigkeit ( $\pm 3\%$ ), in den Kreislauf über einen Y-Schlauchverbinder (4 mm, Best.-Nr.: 70464, Kartell, Italien) eingebracht. Zur Abdichtung wurde ein 3 cm Stück des Silikon-Schlauches verwendet, das zusätzlich mit Zahnseide (Oral-B Essential Floss, Procter & Gamble, USA) fixiert wurde (Abb. 21).

Abb. 21:

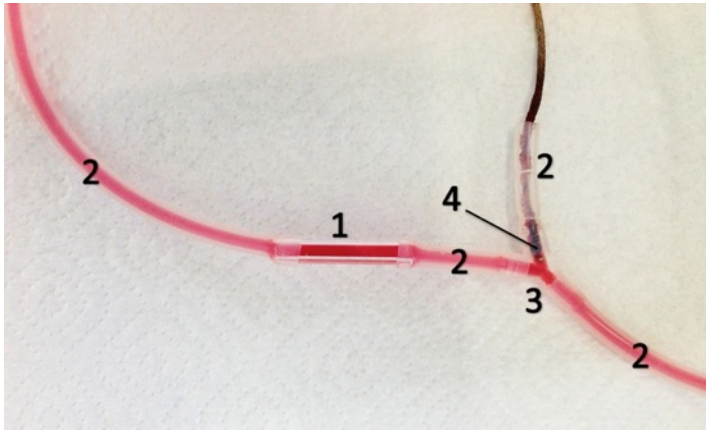


Abb. 21: Messeinrichtung zur Temperaturmessung: Der Temperatur-Kontaktfühler (4) wurde über einen Y-Verbinder (3) in den Kreislauf aus Küvette (1) und Schläuchen (2) eingebracht. Die Abdichtung erfolgte mit einem Schlauch (2).

Für die Temperaturmessung der stehenden Testmedien wurde eine Küvette mit Boden verwendet, in welche das zu untersuchende Testmedium über eine Spritze mit Kanüle (2 ml BD Discardit II Spritze, Becton Dickinson, USA; 0,9 x 22 mm Miraject PL Super, Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland) eingebracht wurde. Die Küvette wurde mit Glycerin 99 % an den US-Kopf angekoppelt. Die Pumpe und die Schläuche wurden in diesem Versuchsaufbau nicht benötigt. Der Temperatur-Kontaktfühler wurde vor und während der Beschallung außerhalb des Schallfeldes in der Küvette platziert und unmittelbar nach Ausschalten des Ultraschalls in die Küvetten-Mitte vorgeschoben, damit die Temperatur gemessen werden konnte.

#### 4.2.5.2 Durchführung

Das Vorgehen bei den Versuchen (F1, F2, Fk) entsprach dem Ablauf während den Frequenzmessungen. Einziger Unterschied war, dass die Messungen nach  $t_4$  endeten, da F0 getrennt untersucht werden musste (siehe Abb. 18). Bei F0 wurde eine Küvette mit Boden verwendet und mit der entsprechenden Zeit beschallt. Es wurde das EK-ID 6 in den Konzentrationen (1:1, 1:10, 1:100) verwendet. In Tab. 6 befindet sich eine Übersicht der Versuchsdurchführung.

Tab. 6:

Mit/ohne Watte	F1, F2	F0	Fk
EK 1:1 unverdünnt	240 s	120 s	120 s
EK 1:10	150 s	75 s	75 s
EK 1:100	105 s	52,5 s	52,5 s

Tab. 6: Übersicht der Untersuchungsgruppen, der Versuchsbedingungen und der Messdauern bei den Temperaturmessungen.

Die Testmedien wurden im Becherglas auf Raumtemperatur von 22 – 24 °C gebracht. Die Messdauern entsprachen den Zeiten, denen die Testmedien dem Ultraschall während der Frequenzmessung ausgesetzt waren. Vor jeder Messung wurde die Zeit von 30 s zur Vorbereitung der Messung berücksichtigt. Die Messdauer (240 s) von EK 1:1 bei gepulstem Testmedium (F1, F2)

setzte sich zusammen aus 30 s Vorbereitung für F1 mit 90 s Messdauer und weitere 30 s Vorbereitung für F2 mit 90 s Messdauer. Dies entsprach  $t_0 - t_4$ . Es schloss sich die Messung des stehenden Testmediums (F0) an. 30 s Vorbereitungszeit gehen der Messdauer von 90 s voraus ( $t_4 - t_6$ ). Die Temperatur wurde vor und nach Ultraschalleinfluss aufgezeichnet und die Differenz als Temperaturänderung notiert. Diese Versuche wurden für jede Frequenz (F1, F2, F0, Fk) dreimal wiederholt.

#### **4.2.5.3 Datenverarbeitung und statistische Analyse**

Von den Messwerten wurde der Medianwert der drei Messungen gebildet und in einem Balkendiagramm dargestellt. Maximale und minimale Messwerte wurden in Form von Fehlerbalken eingetragen.

#### **4.2.6 Exemplarische REM-Darstellung der Testmedien**

Ultraschall kann durch seine Effekte, akustische Mikroströmungen, Erwärmung und Kavitation, Veränderungen erzeugen (siehe Kapitel 2.2.1). Ziel war es, unter den Versuchsbedingungen den Einfluss des Ultraschalls auf das Testmedium und die darin enthaltenen Erythrozyten zu untersuchen.

##### **4.2.6.1 Entwicklung der Messeinrichtung**

Der Versuchsaufbau entsprach dem Aufbau aus den Frequenzmessungen bzw. den Temperaturmessungen. Bei den Messungen für F0 mussten auch Küvetten mit Boden verwendet werden, da aus dem Kreislauf die stehende EK nicht zur Untersuchung entnommen werden konnten.

##### **4.2.6.2 Durchführung**

Die Versuche wurden analog zu den Messungen der Temperaturänderung durchgeführt. Es wurde das Erythrozytenkonzentrat mit der EK-ID 4 verwendet (Tab. 5), jedoch ohne den Synperonik-Zusatz, da es im Rasterelektronenmikroskop (REM) zur Kristallbildung führt (siehe Brandt [22]). Die Verdünnungen wurden hergestellt und die Versuche nach obiger Beschreibung mit und ohne Ultraschall durchgeführt. Das Testmedium wurde mit einer Spritze mit Kanüle (siehe Kapitel 4.2.5.1) durchmischt und nach den Beschallungsdauern (Tab. 6) eine 1 ml Probe aus dem Becherglas in ein 15 ml Cellstar Tube (LOT E130905E, Greiner Bio-One Int. AG, USA) überführt. Danach wurden mit den bereits beschallten Testmedien die Messungen für die stehenden Testmedien durchgeführt. Diese wurden 120 s, 75 s und 52,5 s dem Ultraschall ausgesetzt (Tab. 6) und in einem 15 ml Cellstar Tube aufbewahrt. Tab. 7 zeigt eine Übersicht der Untersuchungsgruppen zu den Versuchsbedingungen.

Tab. 7:

Testmedium	Zeit [s]	US	Pumpe	Watte
EK 1:1	120	x		
EK 1:1	120	x		x
EK 1:1	240		x	
EK 1:1	240	x	x	
EK 1:1	240		x	x
EK 1:1	240	x	x	x
EK 1:10	75	x		
EK 1:10	75	x		x
EK 1:10	150		x	
EK 1:10	150	x	x	
EK 1:10	150		x	x
EK 1:10	150	x	x	x
EK 1:100	52,5	x		
EK 1:100	52,5	x		x
EK 1:100	105		x	
EK 1:100	105	x	x	
EK 1:100	105		x	x
EK 1:100	105	x	x	x

Tab. 7: Übersicht der Untersuchungsgruppen zu den verschiedenen Versuchsbedingungen. Mit und ohne Einwirkung von Ultraschall, stehende oder gepumpte Testmedien, sowie mit und ohne Watte („x“ bedeutet „mit“). Zeit entspricht der Versuchsdauer.

#### 4.2.6.3 REM-Aufnahmen

Es wurde jeweils 5 ml 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen-Puffer mit 5 ml Pipetten (Stripette 5 ml, Best.-Nr. CLS4487, Corning Costar USA; Accu-jet pro, S/N: 11F05711 Brand GmbH + Co KG, Wertheim Deutschland) unter einem Abzug zu den Testmedien hinzugegeben und die Tubes verschlossen. Die Einwirkzeit betrug 2 Stunden und alle 30 Minuten wurde der Inhalt mit der Pipette durchmischt. Anschließend wurden die Erythrozyten 10 Minuten bei 1000/min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotina 420R Typ 4706, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand verworfen. Die Testmedien wurden dreimal mit 5 ml Sörensen-Puffer gewaschen, jeweils 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde analog das Waschprotokoll mit aqua bidest. durchgeführt. Anschließend wurden 200 µl aus den Tubes mit Pipettenspitzen 200 µl aufgenommen und auf AL Deckgläser (20 x 20 mm, Standard) ausgestrichen. Die Deckgläser wurden mit leitenden Kohlenstoff-Klebestreifen (Leit-Tabs 12 mm, G3347, Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) auf Aluminium-Probenteller (G301D, Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) fixiert und im Rasterelektronenmikroskop (REM; FEI Quanta 400 FEG, Niederlande) im Low-Vacuum-Mode untersucht.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn

Der Messparameter  $\Delta U_2$  entsprach der Reduktion der Schallwellen-Reflexion an der Grenzfläche. Diese entstand durch eine geringere Schallimpedanz-Differenz der Medien (Zahnhartsubstanz, Testgel) durch eine Erhöhung der Schallimpedanz des Testgels. Die Ergebnisse wurden in den Abb. 22A und B grafisch dargestellt. Die Dentin-Messungen (Abb. 22A) wurden nach aufsteigendem  $\Delta U_2$  (Median mit 25 – 75 % Perzentile) sortiert. Die Werte von  $\Delta U_2$  befanden sich in einem Bereich von 0,68 V ( $\Delta U_{2\min}$ ) für G5 und 1,56 V für G31 ( $\Delta U_{2\max}$ ). Das Testgel G31 mit dem höchsten  $\Delta U_2$ -Wert war die Mischung von Buehler Micropolish II 0,3  $\mu\text{m}$  Pulver (P8) mit Glycerin 99 % (G9). Das medizinische US-Gel (G1) hatte einen Wert von 0,76 V, daraus folgte eine Zunahme von  $\Delta U_2$  auf G31 um 105 %. Bei G31 und G32 war Peak 3 (Abb. 13) nicht mehr zu erkennen. Es zeigte sich, dass Glycerin in zunehmender Konzentration eine Erhöhung von  $\Delta U_2$  aufwies (G12 = 0,72 V; G11 = 0,92 V; G10 = 1,00 V; G9 = 1,12 V) und die glycerinhaltigen Testgele (G4 = 0,84 V; G3 = 1,08 V) einen signifikant höheren Wert als G1 hatten. Auch die Pulver beeinflussten  $\Delta U_2$ , denn es ließ sich bei den individuell hergestellten Testgelen die Tendenz erkennen, je kleiner die Korngröße der Pulver und je höher der Pulveranteil war, desto stärker erhöhte sich  $\Delta U_2$ . Bei G31 und G32 sorgte die Erhöhung der Pulvermenge von 0,25 g auf 0,5 g für eine Zunahme um 30 % von 1,20 V auf 1,56 V. Es konnte erkannt werden, dass Korngrößen von 50  $\mu\text{m}$  und kleiner bei 0,5 g Pulver  $\Delta U_2$  zunehmend erhöhten (G17 = 0,92 V; G19 = 0,96 V; G21 = 0,98 V; G23 = 1,00 V; G25 = 1,02 V; G27 = 1,10 V). Eine Ausnahme bildete hier das Buehler Micropolish II 0,05  $\mu\text{m}$  Pulver (P9; G29), welches in anderen Konzentrationen zur Anwendung kam.

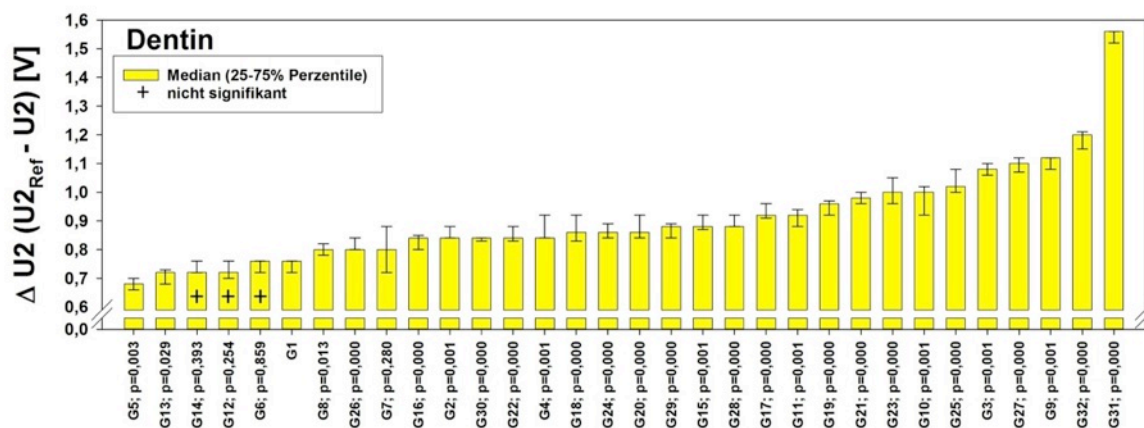
Bei der Darstellung der Schmelz-Messungen wurde die Sortierung der Dentin-Messungen übernommen. Man erkannte, im Vergleich zu den Dentin-Messungen, dass die gemessenen Werte ein geringeres  $\Delta U_{2\min}$  (0,26 V) und  $\Delta U_{2\max}$  (0,58 V) aufwiesen und der Werte-Bereich schmaler war (Schmelz-Messungen:  $\Delta U_{2\max} - \Delta U_{2\min} = 0,32$  V; Dentin-Messungen:  $\Delta U_{2\max} - \Delta U_{2\min} = 0,88$  V). Die Ergebnisse waren ähnlich. So war ebenfalls das Testgel G31, dasjenige mit dem größten  $\Delta U_2$ -Wert und auch Glycerin in zunehmender Konzentration zeigte die Zunahme von  $\Delta U_2$ .

Bei den Dentin-Messungen zeigten außer G6, G12 und G13 alle Testgele einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu G1. Dies galt auch für alle Schmelz-Messungen, außer G12 und G14. Die nicht signifikanten Messwerte wurden in den Grafiken gekennzeichnet (+).



Abb. 22

A



B

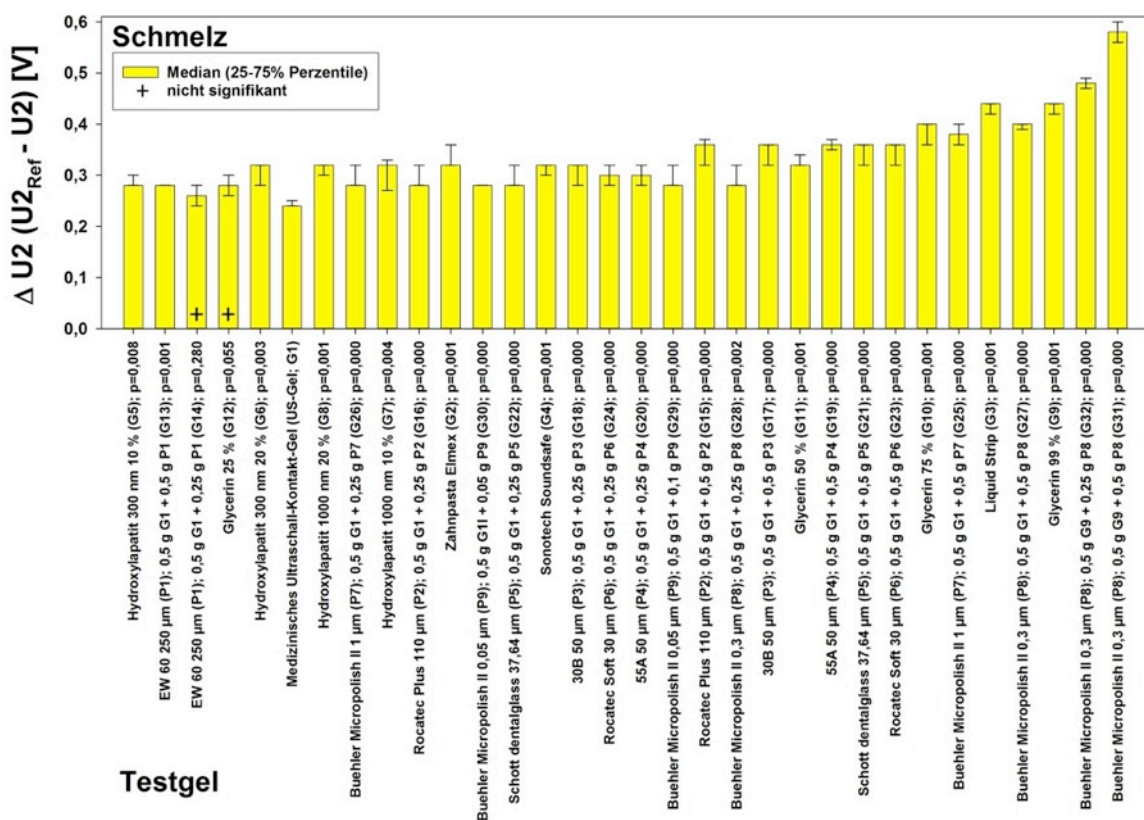


Abb. 22: A: Darstellung der Dentin-Messungen nach aufsteigendem  $\Delta U_2$  (Median mit 25 – 75 % Perzentile) sortiert.

B: Darstellung der Schmelz-Messungen  $\Delta U_2$  (Median mit 25 – 75 % Perzentile) nach Dentin-Messungen sortiert.

Irrtumswahrscheinlichkeit p ist den Grafiken zu entnehmen; mit „+“ markierte Werte waren nicht signifikant im Vergleich zu G1.



## 5.2 Ergebnisse der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht *in vitro*

### 5.2.1 Frequenzdetektion

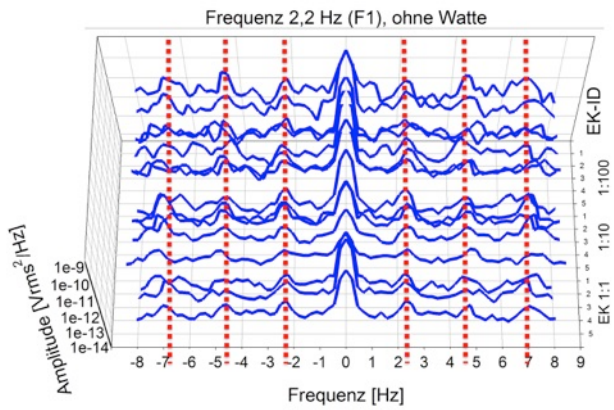
Die Grafiken in Abb. 23 und Abb. 24 zeigen die Ergebnisse der Frequenzdetektion in Form von 3D-Wasserfall-Plots. Die Beschreibung der Graphen kann aus Kapitel 4.2.4 entnommen werden.

In den Grafiken (Abb. 23 und Abb. 24) wurden alle Testmedien in den Testmedien-Konzentrationen aus den Erythrozytenkonzentraten zu den jeweiligen Versuchsbedingungen (Frequenzen, konstant-fließend, mit und ohne Watte) zusammengefasst. Der Frequenzbereich in den Abbildungen reicht von -8 Hz bis +8 Hz und die Amplitude wurde aufgrund der unterschiedlichen Werte logarithmisch dargestellt.

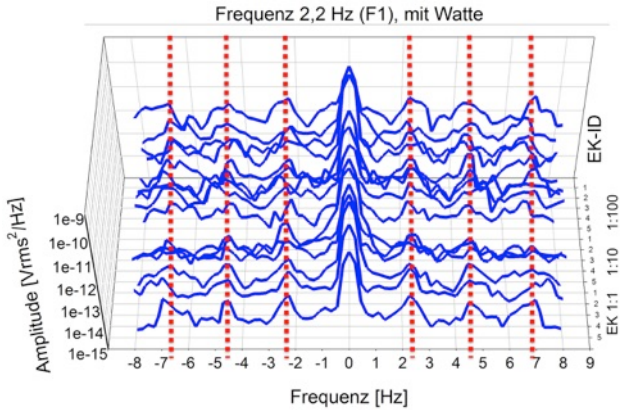
In allen Testmedien konnten, unabhängig von der Ausstopfung mit Watte, bei F1 und F2 die Frequenzen 2,2 Hz (F1) und 3,2 Hz (F2) oder Vielfache davon erkannt werden (rote Markierung; Abb. 23). Die Konstanz der Frequenzdetektion ist durch die auf den roten Linien befindlichen Peaks in den 3D-Wasserfall-Plots erkennbar (Abb. 23). Bei der Frequenz 0 Hz ist ebenfalls ein Peak erkennbar, der die Häufigkeit der Frequenz 0 Hz darstellt, aber keine Bedeutung für die Messungen hat. Von Pumpenstellung 19 zu 27 nahmen die gemessenen Frequenzen entsprechend mit dem 1,4-fachen zu und standen somit im direkten Zusammenhang. Bei Stillstand der Pumpe (F0) und bei konstantem Durchfluss konnte keine, der in den anderen Versuchen gemessenen Frequenzen bzw. deren charakteristischen Peaks (F1, 2,2 Hz; F2, 3,2 Hz), identifiziert werden (Abb. 24). Im Vergleich der 3D-Wasserfalls-Plots der beiden Abbildungen ist dies deutlich zu erkennen und diente als Negativkontrolle. Der Einfluss der 5 unterschiedlichen Erythrozytenkonzentrate (EK-ID 1 – 5), sowie die Verdünnungen (EK 1:1, EK 1:10, EK 1:100) spielten für die Frequenzdetektion keine Rolle.

Abb. 23:

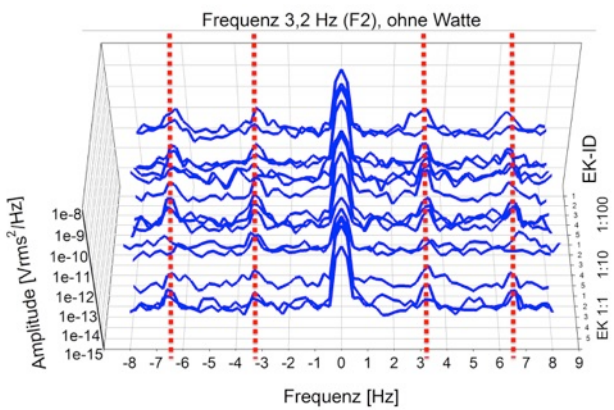
A



B



C



D

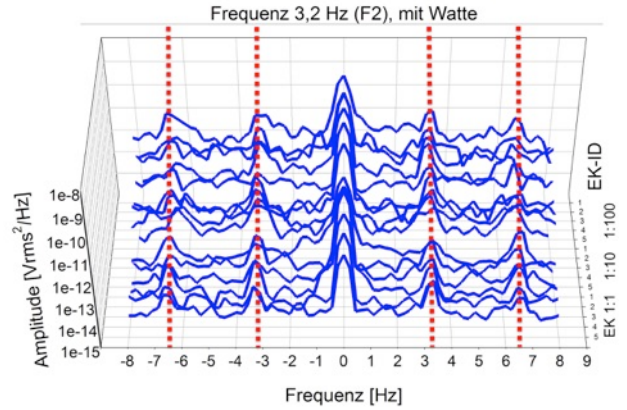
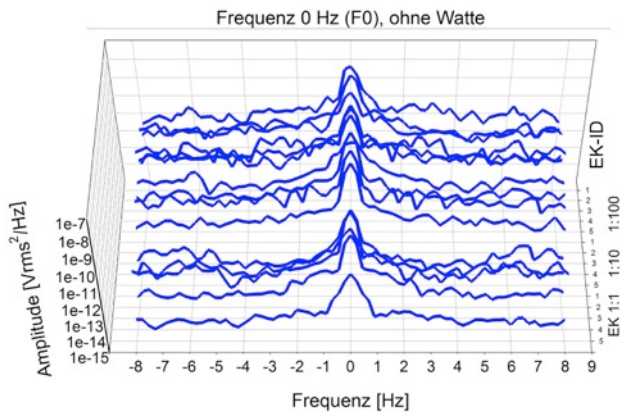


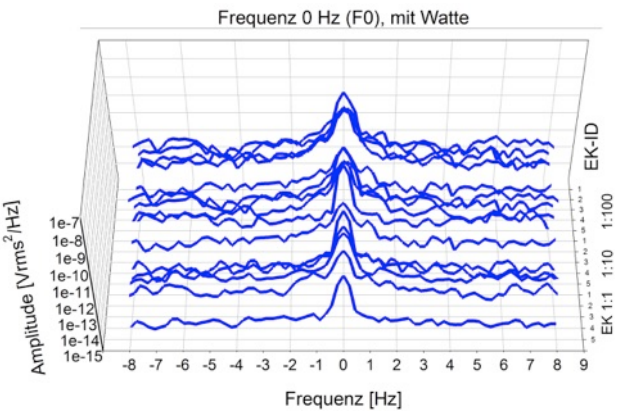
Abb. 23: Gepulste Testmedien mit den Frequenzen, 2,2 Hz (F1; A, B) und 3,2 Hz (F2; C, D) mit (B, D) und ohne (A, C) Watte; in unterschiedlichen Testmedien-Konzentrationen (EK 1:1, EK 1:10, EK 1:100) der Erythrozytenkonzentration (EK-ID 1 – 5). Die Peaks an den roten Markierungen zeigen die Frequenzen und Vielfache davon, die in allen Messungen in den 3D-Wasserfall-Plots zu erkennen sind.

Abb. 24:

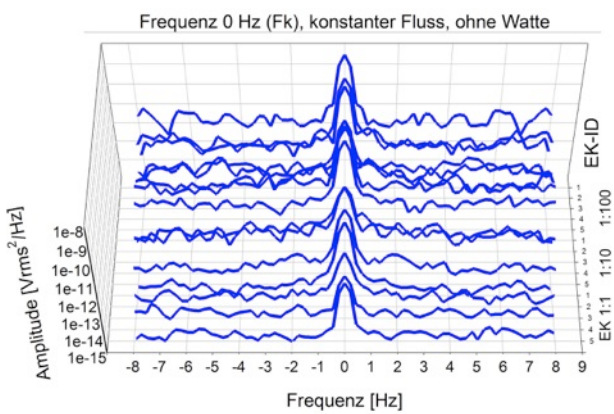
A



B



C



D

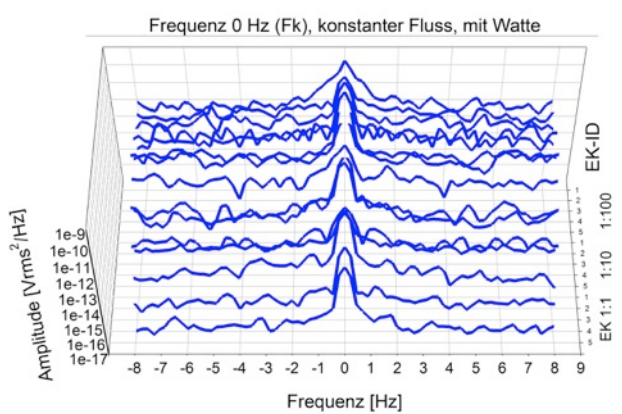


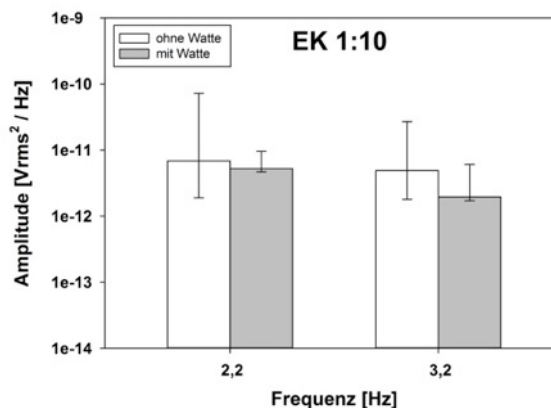
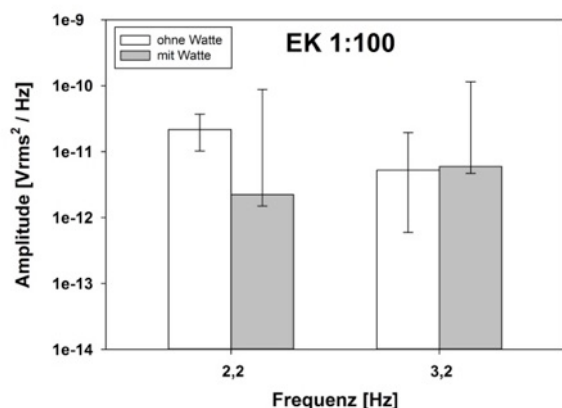
Abb. 24: Stehende (F0; A, B) und konstant-fließende (Fk; C, D) Testmedien mit (B, D) und ohne (A, C) Watte; in unterschiedlichen Testmedien-Konzentrationen (EK 1:1, EK 1:10, EK 1:100) der Erythrozytenkonzentration (EK-ID 1 – 5). Diese Messungen dienen als Negativkontrolle, um zu zeigen, dass die in den 3D-Wasserfall-Plots in Abb. 23 vorhandenen charakteristischen Frequenz-Peaks nicht zu erkennen sind.

Die Median-Werte der Amplitudenhöhe bei den Frequenzen 2,2 Hz und 3,2 Hz reichen in den Balkendiagrammen (Abb. 25) von  $1,23 \cdot 10^{-13}$  bis  $2,17 \cdot 10^{-11}$   $\text{Vrms}^2/\text{Hz}$ . Sie dienen der Darstellung des Einflusses von Verdünnung und Watte auf die Amplitudenhöhe. Die Perzentilen zeigen eine hohe Variabilität der Peak-Amplituden. Die Signifikanzanalyse ergab nur einen signifikanten Unterschied der Amplituden bei Frequenz 3,2 Hz, mit Watte, EK 1:100 im Vergleich zu EK 1:1 unverdünnt ( $p = 0,008$ ).

Abb. 25:

A

B



C

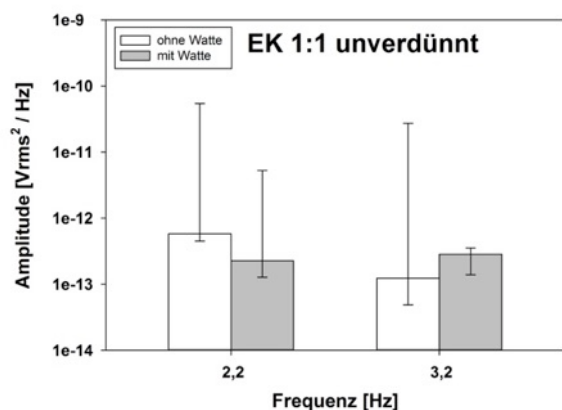


Abb. 25: Darstellung des Einflusses von Verdünnung und Watte auf die Amplitudenhöhe. Medianwerte mit 25% – 75% Perzentilen der Amplituden bei den Frequenzen 2,2 und 3,2 Hz zu den unterschiedlichen Versuchsbedingungen – mit und ohne Watte; EK 1:100 (A), EK 1:10 (B), EK 1:1 unverdünnt (C). Die Median-Werte reichen in den Balkendiagrammen von  $1,23 \cdot 10^{-13}$  bis  $2,17 \cdot 10^{-11}$   $\text{Vrms}^2/\text{Hz}$ . Die Signifikanzanalyse ergab nur einen signifikanten Unterschied der Amplituden bei Frequenz 3,2 Hz, mit Watte, EK 1:100 im Vergleich zu EK 1:1 unverdünnt ( $p = 0,008$ ).

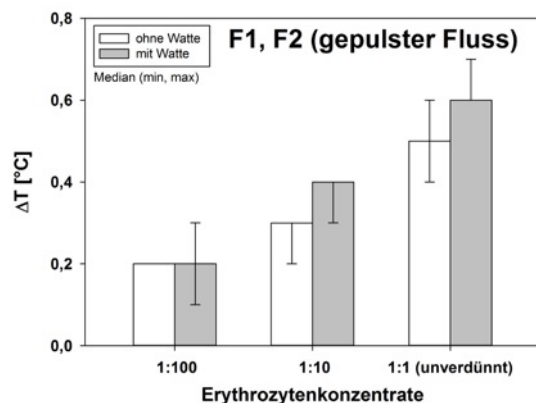
## 5.2.2 Temperaturänderung der Testmedien

Bei den Pumpfrequenzen F1, F2 und bei kontinuierlichem Fluss Fk konnte maximal eine Temperaturerhöhung von 0,8 °C gemessen werden, bei F0 wurden Temperaturänderungen von 22,9 °C beobachtet. Diese Veränderung wurde bereits visuell sichtbar (Markierungen in Abb. 26D), in dem eine Entmischung stattfand und sich fadenförmige Erythrozyten-Bänder ausbildeten. Ob dadurch eine Veränderung der Erythrozyten auftrat, wurde durch die REM-Darstellung untersucht und wird in Kapitel 5.2.3 erläutert.

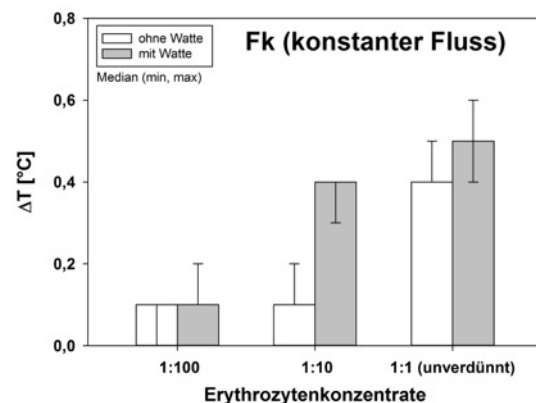
In den Ergebnissen zeigte sich, dass die verdünnten Testmedien geringere Temperaturänderungen aufwiesen als das Unverdünnte. Der Einfluss der Watte auf die Temperaturänderung ist gering, zeigte aber eine Tendenz zu einer zusätzlichen Temperaturerhöhung.

Abb. 26:

A



B



C

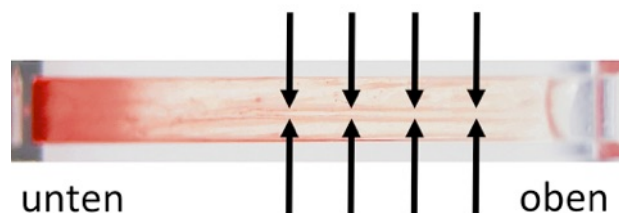
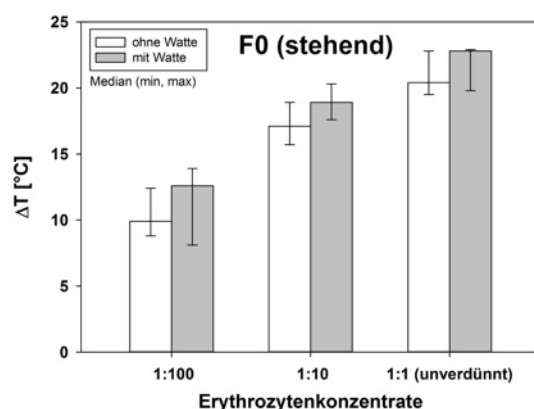


Abb. 26: Median-Werte mit minimaler und maximaler Temperaturänderung ausgehend von einer Raumtemperatur der Testmedien (EK 1:100, EK 1:10, EK 1:1) von 22 – 24 °C bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen – mit und ohne Watte; F1, F2 (A); Fk (B) und F0 (C).

D zeigt Veränderungen in Form von bandförmiger Anordnung der Erythrozyten (siehe Pfeile) durch die Einwirkung von US auf stehendes Testmedium EK 1:100

### 5.2.3 REM-Darstellung der Testmedien

Bei allen fließenden Testmedien konnten im REM Erythrozyten in Form von bikonkaven runden Scheiben und von Stechapfeln unterschieden werden. In fünf von sechs der stehenden Testmedien konnten in den REM-Bildern Veränderungen, die sich in verschiedenen großen Kugeln darstellten, erkannt werden (Abb. 27e – f, Abb. 28e – f, Abb. 29e – f). In den Abbildungen wurden solche Fragmente exemplarisch mit Pfeilen markiert. In den Proben, die während dem Durchfluss dem Ultraschall ausgesetzt waren, zeigten sich keinerlei derartige Veränderungen (Abb. 27a – d, Abb. 28a – d, Abb. 29a – d). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der Ultraschall unter den Versuchsbedingungen eine verändernde Wirkung auf die Erythrozyten hatte. In Tab. 8 befindet sich eine Übersicht der Versuchsbedingungen und die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tab. 8:

Testmedium	Zeit [s]	US	Pumpe	Watte	Abbildung	Beschreibung
EK 1:1	240		x		27a	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:1	240		x	x	27b	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:1	240	x	x		27c	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:1	240	x	x	x	27d	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:1	120	x			27e	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten, kugelförmige Veränderungen und Fragmente
EK 1:1	120	x		x	27f	Stechapfelförmige und wenig normale Erythrozyten, kugelförmige Veränderungen und Fragmente
EK 1:10	150		x		28a	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:10	150		x	x	28b	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:10	150	x	x		28c	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:10	150	x	x	x	28d	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:10	75	x			28e	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:10	75	x		x	28f	Stechapfelförmige und wenig normale Erythrozyten, kugelförmige Veränderungen und Fragmente
EK 1:100	105		x		29a	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:100	105		x	x	29b	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:100	105	x	x		29c	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:100	105	x	x	x	29d	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten
EK 1:100	52,5	x			29e	Stechapfelförmige und normale Erythrozyten, kugelförmige Veränderungen und Fragmente
EK 1:100	52,5	x		x	29f	Stechapfelförmige und wenig normale Erythrozyten, kugelförmige Veränderungen und Fragmente

Tab. 8: Übersicht der REM-Darstellung mit Beschreibung zu den verschiedenen Versuchsbedingungen. Mit und ohne Einwirkung von Ultraschall, stehende oder gepumpte Testmedien, sowie mit und ohne Watte („x“ bedeutet „mit“). Zeit ist die Versuchsdauer.



Abb. 27:

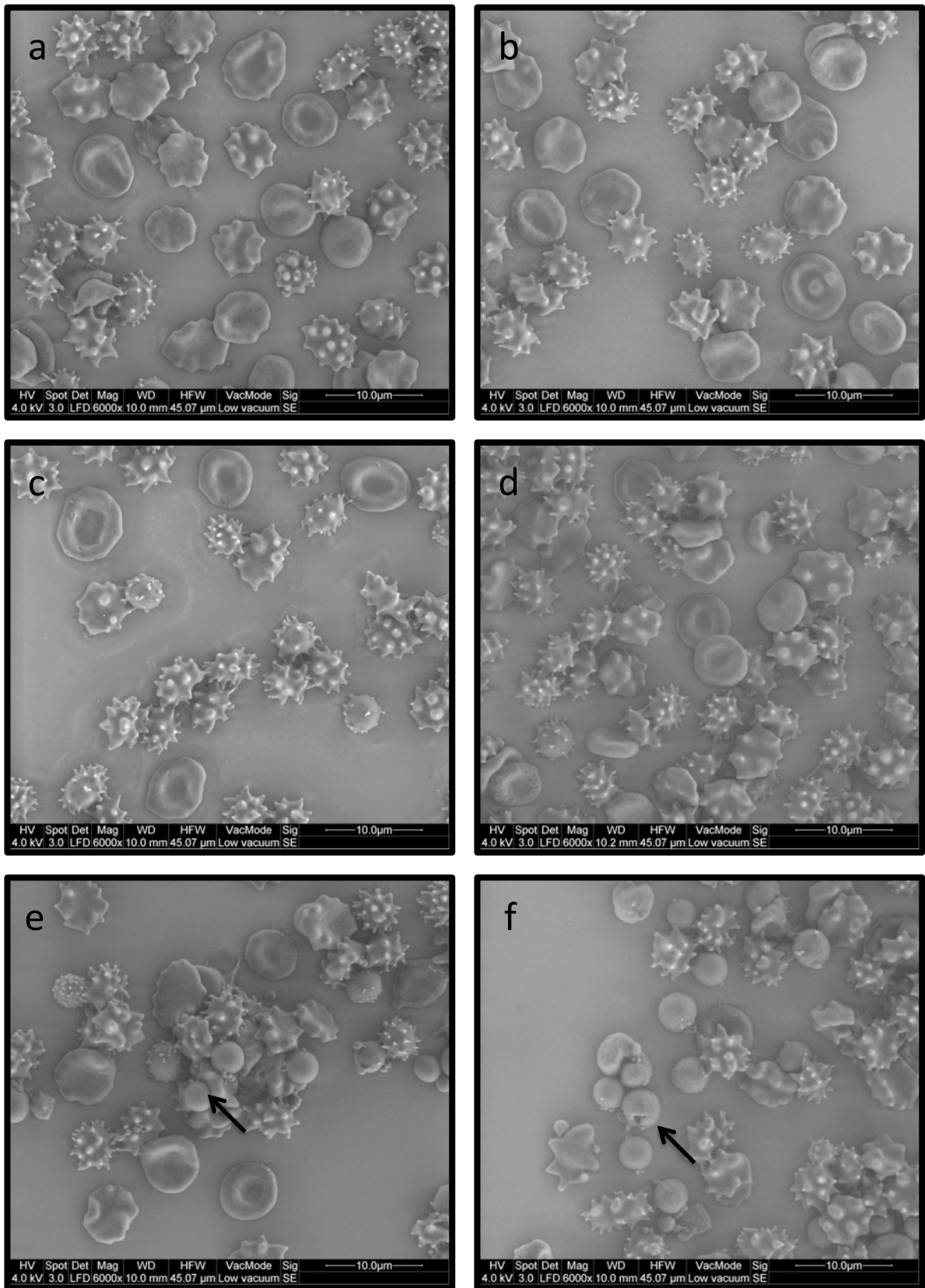


Abb. 27:	Medium	Zeit [s]	Ultraschall	Pumpe	Watte
a	EK 1:1	240		x	
b	EK 1:1	240		x	x
c	EK 1:1	240	x	x	
d	EK 1:1	240	x	x	x
e	EK 1:1	120	x		
f	EK 1:1	120	x		x

Abb. 27: REM-Darstellung EK 1:1 unter den Versuchsbedingungen; Versuchsdauer, Ultraschalleinwirkung, gepumpt und stehendes Testmedium, mit und ohne Watte („x“ bedeutet „mit“).



Abb. 28:

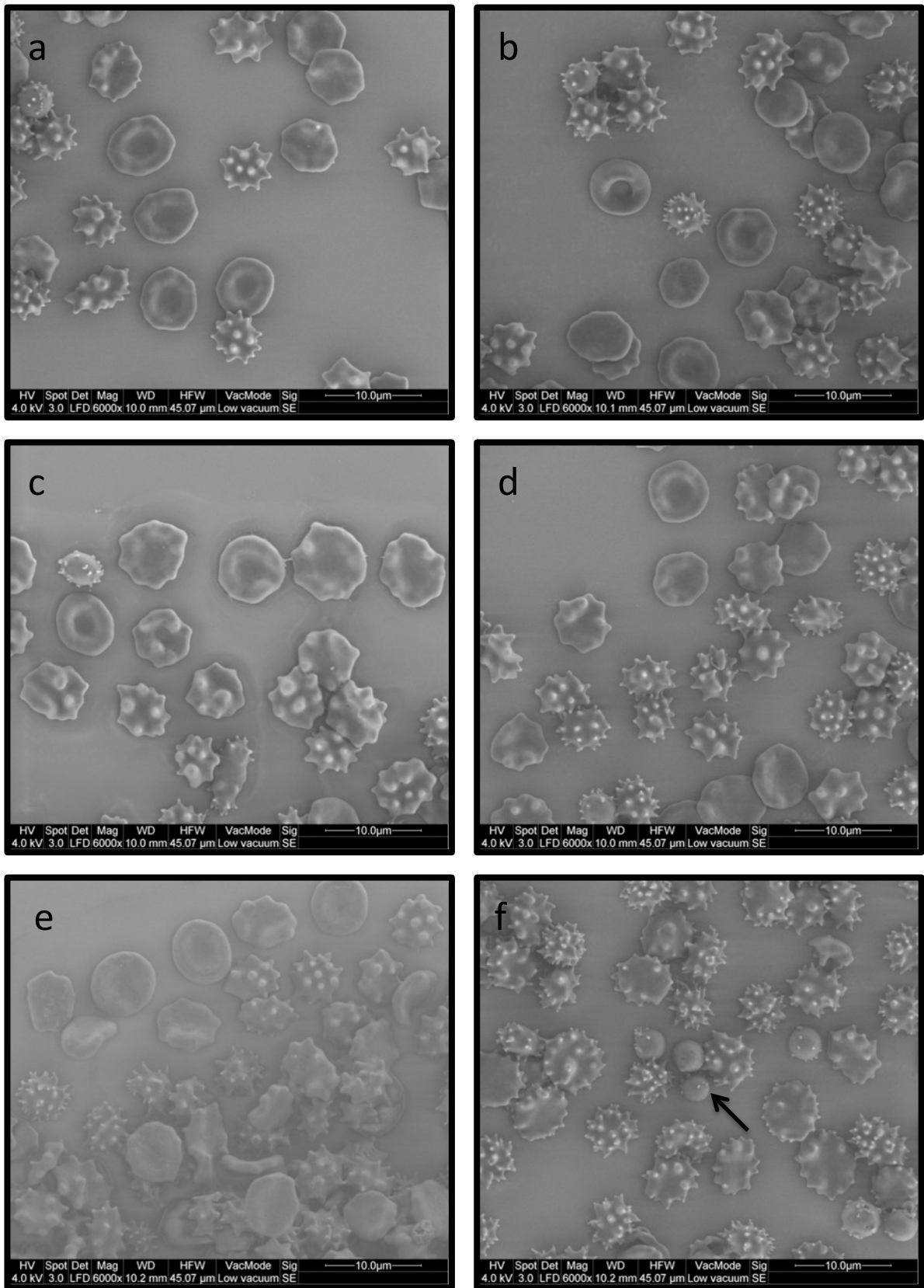


Abb. 28:	Medium	Zeit [s]	Ultraschall	Pumpe	Watte
a	EK 1:10	150		x	
b	EK 1:10	150		x	x
c	EK 1:10	150	x	x	
d	EK 1:10	150	x	x	x
e	EK 1:10	75	x		
f	EK 1:10	75	x		x

Abb. 28: REM-Darstellung EK 1:10 unter den Versuchsbedingungen; Versuchsdauer, Ultraschalleinwirkung, gepumpt und stehendes Testmedium, mit und ohne Watte („x“ bedeutet „mit“).

Abb. 29:

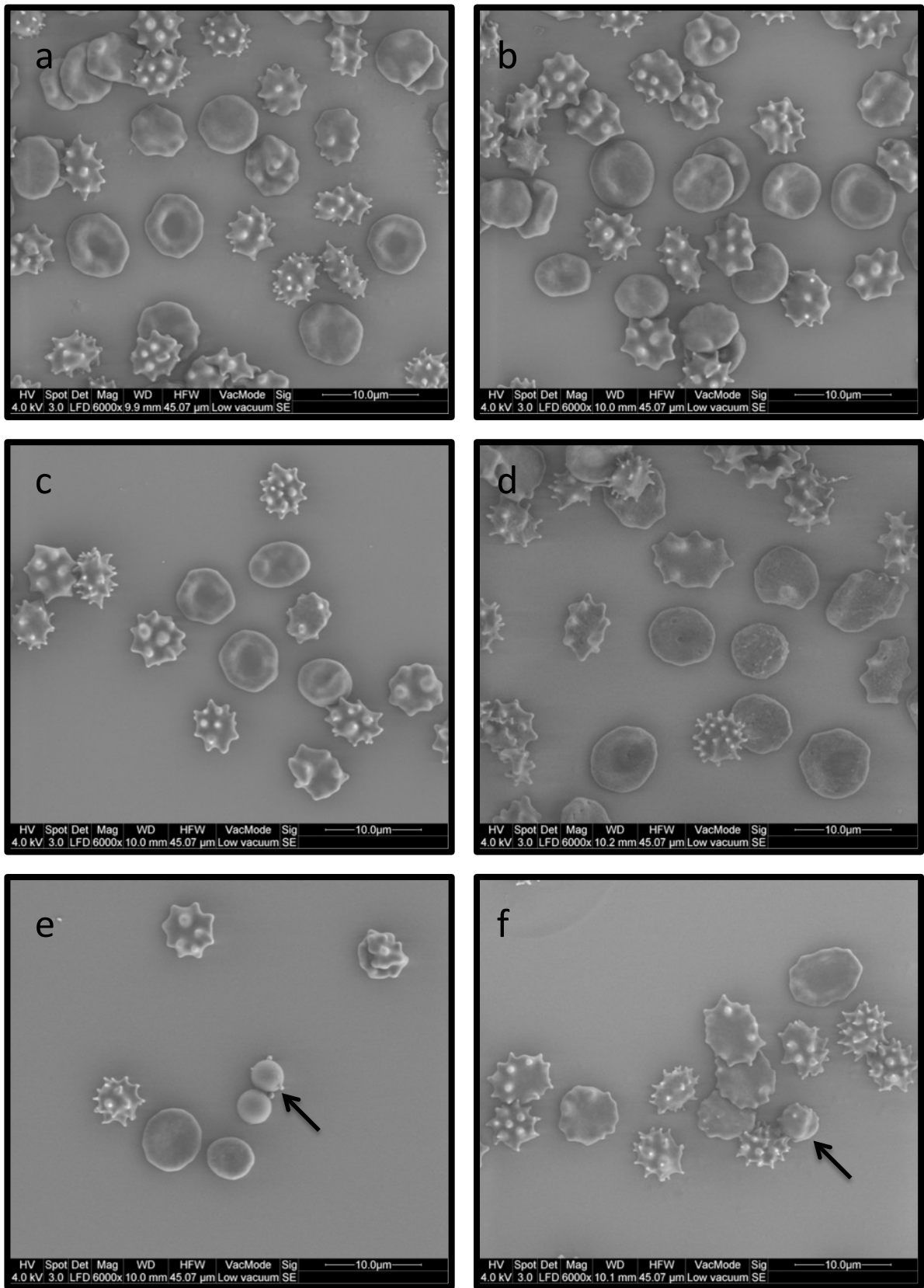


Abb. 29:	Medium	Zeit [s]	Ultraschall	Pumpe	Watte
a	EK 1:100	105		x	
b	EK 1:100	105		x	x
c	EK 1:100	105	x	x	
d	EK 1:100	105	x	x	x
e	EK 1:100	52,5	x		
f	EK 1:100	52,5	x		x

Abb. 29: REM-Darstellung EK 1:100 unter den Versuchsbedingungen; Versuchsdauer, Ultraschalleinwirkung, gepumpt und stehendes Testmedium, mit und ohne Watte („x“ bedeutet „mit“).

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methode

#### 6.1.1 Methode der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn

Ohne das passende Ankopplungsmedium kommt es zu großen Reflexionsverlusten der US-Wellen an der Oberfläche, deshalb war die Optimierung der Ultraschall-Ankopplung an die Zahnhartsubstanz ein Ziel dieser Arbeit. Dieser Anpassung lag die Idee zugrunde, dass man durch die Mischung eines flüssigen Materials mit niedriger akustischer Impedanz mit einem Pulver aus einem Material mit hoher akustischer Impedanz ein Ankopplungsmedium erhält, welches eine erhöhte akustische Impedanz aufweist. Bei den beschriebenen Mischungsverhältnissen musste bei Buehler Micropolish II 0,05  $\mu\text{m}$  Pulver (P9; G29) eine Veränderung der Konzentrationen vorgenommen werden: In den ursprünglichen Konzentrationen war keine Mischung möglich, da sie zur Verklumpung führte und das Testgel seine gelartige Form verlor, was für die Anwendung inakzeptabel war. Ein Vergleich der unterschiedlich konzentrierten Testgele bezüglich der Konzentrationen ist dadurch nicht mehr möglich. Bei der Vermischung der Gele mit der Spitze wurde darauf geachtet, möglichst keine Rückstände zu belassen, welche das Mischungsverhältnis verändern könnten. Außerdem wurde jede Spitze nur einmal verwendet, um Verunreinigungen der Testgele untereinander zu vermeiden.

Ein vorbereitender Versuch brachte die Erkenntnis, dass eine direkte Messung, bei der die unterschiedlichen Testgele zwischen US-Sonde und Zahnscheibe eingebracht wurden, nicht möglich war, da durch die Einflüsse von Anpressdruck und den Eigenschaften der unterschiedlichen Testgele die Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten. Deshalb wurde ein indirektes Verfahren entwickelt, bei dem die Sonde mit medizinischem Ultraschall-Kontakt-Gel (G1) an den Zahn angekoppelt und das zu untersuchende Testgel an der gegenüberliegenden Grenzfläche Zahn – Luft aufgetragen wurde, um den Übergang der Schallwellen vom Zahn in das Testgel zu untersuchen und Rückschlüsse auf die Anpassung des Ankopplungsmediums zu ziehen. Für die Reproduktion der Messungen schied eine freie Führung der US-Sonde per Hand aus. Deshalb wurde eine justierbare Montage über Bohrerständer und Probentisch gewählt, mit der die Messposition über den skalierten Tisch bestimmt werden konnte. Zudem wurde auch der Anpressdruck über den Federmechanismus standardisiert. Da die vielfältigen Einflüsse auf die Ultraschallausbreitung keine direkten, vergleichbaren Messungen zuließen, wurde dieses Problem durch Referenzmessungen gegen Luft anstatt Testgel vor jeder Messung gelöst. Hierdurch konnten standardisierte Ausgangsbedingungen gewährleistet werden. Das Prinzip einer indirekten Messmethode, bei der ein zu untersuchendes Testgel keinen direkten Kontakt zum US-Kopf hatte, wurde auch in Studien anderer Forschungsbereiche verwendet. [31,123].

Aufgrund der physikalischen Eigenschaften würde sich Glycerin wegen seiner höheren Impedanz für die Ankopplung der US-Sonde an den Zahn besser als medizinisches US-Gel (G1) eignen, da hierdurch

mehr Schallenergie in den Zahn übertragen werden könnte. Jedoch wurde in diesem Versuch bewusst G1 verwendet, da die höhere Viskosität von G1 den Vorteil einer besseren Handhabung hatte. G1, welches unten an den Zahn angebracht wurde, zeigte durch seine Viskosität eine erhöhte Ortständigkeit.

Im Versuchsaufbau wurde ein Rinderzahn verwendet, da aus einem humanen Zahn keine Scheibe in dieser Größe, Schichtdicke, mit Schmelz-Dentin-Anteilen und parallelen Flächen geschnitten werden konnte. Dies stellte kein Problem dar, da aus der Literatur bekannt ist, dass der bovine Zahn im Hinblick auf die akustischen Eigenschaften einem humanen Zahn ähnlich ist (siehe Kapitel 2.1.4). Die Schichtstärken der Messstellen entsprachen den in humanen Zähnen vorkommenden Maßen. Die Schmelz-Messstelle (2,0 mm) mit einem Dentin- (1,60 mm) und Schmelzanteil (0,43 mm) stimmte in etwa mit den anatomischen Gegebenheiten, knapp oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze, überein [6,15,109,203], die für die Vitalitätsbestimmung mit Ultraschalltechnik in Frage käme. Die Dentin-Messstelle (0,75 mm) könnte für Messungen am freiliegenden Zahnhals oder bei Restdentinstärke-Messungen während der Präparation oder Kariesexkavation stehen. Letztendlich kann anhand beider Messstellen ein Vergleich der Testgele durchgeführt werden. Idealerweise müsste aufgrund der unterschiedlichen Schallgeschwindigkeiten im Schmelz und Dentin für beide ein eigenes Ankopplungsmedium entwickelt werden. Jedoch wären hier auch die großen Variationen der intra- und interindividuellen Schallgeschwindigkeiten in Zähnen zu berücksichtigen (siehe Kapitel 2.1). Die Austrocknung des Zahnes ist unbedingt zu verhindern, da dies die physikalischen Eigenschaften der Zahnhartsubstanz beeinflusst, wie es auch Lee und Barber [129] berichtet haben. Sogar die Applikation von Fluoriden hat Auswirkung auf die Schallgeschwindigkeit im Zahn [224]. In der Versuchsanordnung und den Messungen beschrieben die unterschiedlichen Laufzeiten der Peaks die Schichtdicken der Zahnhartsubstanzen und die Schallgeschwindigkeiten. Die errechneten Schallgeschwindigkeiten aus den bekannten Größen waren 3125 m/s im Dentin und 5200 m/s im Schmelz. Diese Werte entsprachen in etwa der Literatur (siehe Kapitel 2.1; 3600 m/s; 5400 – 5800 m/s [128]).

Die Frequenz des Ultraschalls spielt bei der Ausbreitung, vor allem bei der Absorption und Dämpfung, eine Rolle, da mit zunehmender Frequenz mehr absorbiert wird und somit die Eindringtiefe, sowie die Amplitude der Reflexion sinkt. Im Versuchsaufbau wurde eine Frequenz von 10 MHz gewählt, die auch in anderen Studien verwendet wurde und am Rande der am Zahn in der Literatur verwendeten Frequenzen von 10 bis 50 MHz liegt [21,191,216,241]. Diese wurde verwendet, da trotz Absorptionsverlusten eine deutliche Signalamplitude der Reflexion zu erkennen war. Ebenso wird sie zur Vitalitätsbestimmung am Zahn mit der ultraschall-markierten Blutflussmessung vorgeschlagen (siehe Kapitel 6.1.2.1).

Bei der hier verwendeten Messmethode wurde die Anpassung der akustischen Impedanz an die Zahnhartsubstanz untersucht, jedoch wurde Konsistenz und praktische Handhabung der Testgele nicht bewertet. Um den Einfluss der Oberflächen auf die Messungen zu reduzieren und

reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, wurden an den Messstellen parallele Flächen durch Schneiden bzw. Fräsen erzeugt, um ein senkrechtes Auftreffen der US-Wellen zu ermöglichen. Wäre dies nicht beachtet worden, hätte die Neigung der Oberfläche einen möglichen Fehler der Ankopplungsposition verstärkt bzw. die Messung behindert, da bei zunehmender Neigung nur ein geringerer Anteil der reflektierten US-Welle von der US-Sonde detektiert werden kann.

Die Pulver mit sehr kleiner Korngröße (P7 – P9) könnten die Unebenheit und Oberflächenrauigkeit (siehe Kapitel 2.1.1) auffüllen, was ein Grund für die zunehmende Differenz ( $\Delta U_2$ ) bei kleineren Pulvern sein könnte. Das Pulver P1 (250  $\mu\text{m}$ ) würde im Praxiseinsatz wahrscheinlich daran scheitern, dass es durch die Korngröße zu einem relativ großen Abstand zwischen US-Sonde und Zahn und somit einer schlechten Ankopplung kommen würde. Der Einfluss der Korngröße im Zusammenhang mit der Oberfläche müsste weiter untersucht werden. Die Dämpfungseigenschaften der Testgele waren nicht explizit Gegenstand der Untersuchungen, allerdings konnte durch das Abdecken der Testgele mit der Zahnscheibe eine Veränderung der Dämpfung bei den unterschiedlichen Testgelen beobachtet werden. Die Dämpfung ist jedoch aufgrund der sehr geringen Schichtdicken, wie sie bei der Ankopplung verwendet werden, als vernachlässigbar zu betrachten.

Ein weiterer Schritt zu einer verbesserten Ankopplung ist die Wahl von Aluminium oder Magnesium (Al:  $c = 6240 \text{ m/s}$ ;  $\rho = 2700 \text{ kg/m}^3$ ;  $Z = 17,33 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$ ; Mg:  $c = 5800 \text{ m/s}$ ;  $\rho = 1738 \text{ kg/m}^3$ ;  $Z = 10,0 \cdot 10^6 \text{ Ns/m}^3$  [250]; siehe Tab. 1) als Material für die Sondenspitze, wie es auch von Barber et al. [11] beschrieben wurde. Die Wahl der Sondenspitze stellt keine große Herausforderung dar, da Aluminium kostengünstig und einfach in jegliche Form gebracht werden kann. Auch im beschriebenen Versuchsaufbau ließe sich eine Aluminiumspitze integrieren, da die verwendete Sondenspitze über ein Gewinde mit dem Schallkopfgehäuse verschraubt ist. Dies war im vorliegenden Fall nicht notwendig, da das Ziel der Untersuchung die Entwicklung eines angepassten Gels ist. Culjat et al. [41] verwendeten Atemkalk (soda lime glass;  $Z = 13,4 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ ), obwohl Aluminium von den akustischen Materialeigenschaften dem Zahn näher kommt. Ein Grund für die Wahl könnte sein, dass ihr vorgeschlagenes Ankopplungsmedium, die Gallium-Indium-Legierung, stark mit Aluminium reagiert. Es wurde zwar die Reaktivität der Legierung genannt, aber der Grund für die Materialwahl wurde nicht erklärt. Die Testgele wurden im Versuchsaufbau der Autoren zwischen US-Sonde und Atemkalk-Glasblock (Abstand 2 mm) eingebracht. Durch diesen Abstand spielte in diesem Versuchsaufbau die Dämpfung, die bei der Anwendung als dünnschichtiges Ankopplungsmedium vernachlässigbar ist, eine sehr große Rolle. Culjat et. al [41] konnten die Untersuchung der Dämpfung und des Übergangs der Schallwellen an den Grenzflächen nicht trennen. Das führte dazu, dass sie ein Glycerin-basiertes Gel (High Z), das ein sehr gutes und häufig verwendetes Ankopplungsmedium in der zerstörungsfreien Werkstoffprüfung ist, nicht untersuchen konnten. Aus der Publikation geht hervor, dass jede Messung nur einmal durchgeführt wurde, da sie bei der Legierungsmessung einen Fehler im Ergebnis bemerkten, der vermutlich der Ausrichtung der

US-Sonde zugrunde lag. Dieser Fehler geschah laut ihren Aussagen im Wesentlichen durch Beseitigung der Oxidschicht und Reinigung der chemischen Agenzien von der US-Sonde [41]. Auch die Möglichkeit der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist in Frage zu stellen, da keine Referenzmessung oder Wiederholungen durchgeführt wurden. So wäre der Fehler durch falsche Justierung und Ausrichtung der US-Sonde aufgefallen und zu verhindern gewesen.

Eine andere Methode zur Verbesserung der Ankopplung wäre die Fokussierung des Ultraschalls mit Hilfe einer wassergefüllten Vorlaufstrecke (Abb. 30), wie es in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben wurde [55,166,219]. Dieses Prinzip müsste jedoch an den Zahn und die Mundhöhle angepasst werden. Über einen Wasserstrahl werden die US-Wellen dabei auf den Zahn übertragen. Durch die Wahl einer geeigneten Schalllinse und der Vorlaufstrecke könnte eine genaue Fokussierung auf die Pulpa erreicht werden. Darüber hinaus könnte eine variable Vorlaufstrecke sogar die unterschiedlichen Schichtstärken der Zahnhartsubstanzen berücksichtigen. Das austretende Wasser in die Mundhöhle stellt kein Problem dar, denn an der zahnärztlichen Behandlungseinheit ist eine Absauganlage in der Regel integriert. Diese Möglichkeit wurde bereits zu *in vitro* Untersuchungen der Zahnhartsubstanzen eingesetzt [166,216].

Abb. 30:

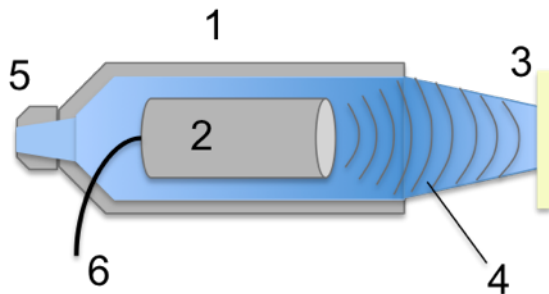


Abb. 30: Darstellung der Wasserstrahl-Ankopplung. Das Gehäuse (1) enthält eine Wasserzuführung (5). Innerhalb des Wasserstrahls erzeugt eine US-Sonde (2) US-Wellen (4), die über den Wasserstrahl auf den Zahn (3) fokussiert sind; Anschluss der US-Sonde (6)



## 6.1.2 Methode der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht *in vitro*

### 6.1.2.1 Frequenzdetektion

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau stellte ein stark vereinfachtes Durchblutungsmodell eines Zahnes dar und diente zur Darstellung und Überprüfung der angewandten Methode im Sinne eines Proof of Principle. Dieses Modell stellt nur sehr eingeschränkt die komplexe Anatomie eines Zahnes dar. So besaß die Küvette eine Wanddicke von 0,9 mm und die Maße des Lumens waren 3 x 3 mm. Im Zahn hingegen finden sich genau gegenteilige Dimensionen. Auch die raue Zahnoberfläche und die Streuung von Licht wurden im Durchblutungsmodell nur eingeschränkt simuliert. Der US-Kopf wurde mit Glycerin an die glatte Oberfläche der Küvette angekoppelt. Glycerin wurde aufgrund der Ergebnisse aus dem ersten Teil der Arbeit verwendet, da es kostengünstig und in großen Mengen verfügbar ist. Eine aufwendige Herstellung von G31 zur Ankopplung war nicht nötig, da aufgrund der anderen Grenzflächen auch mit Glycerin eine gute Schallübertragung auf die Küvette gewährleistet war. Die Transmission des Laserlichts war durch die sehr geringe Absorption des klaren Kunststoffes begünstigt. Eine kleinere Küvette mit vier klaren und glatten Seitenflächen war nicht erhältlich, obwohl es die Transmission des Laserlichts durch die geringere Schichtstärke des Testmediums zunehmend erleichtert hätte. Auch die Art und Menge der Durchblutung, die durch die starre Küvette geleitet wurde, unterschieden sich von einer anatomischen Pulpa, die aus einer Vielzahl kleiner Kapillaren besteht. So war das Volumen der Küvette mit  $297 \text{ mm}^3$  um ein Vielfaches größer als das durchschnittliche Pulpenvolumen von Zähnen ( $6,1 - 68,2 \text{ mm}^3$  [73]). Im Modell herrschten laminare Strömungsverhältnisse. Durch das Einbringen der Filterwatte wurde versucht diese zu stören und einen diffusen Fluss zu erzeugen, der den Durchblutungsverhältnissen in der Pulpa näher kommt. Die Durchflussmenge betrug je nach Frequenz 48 – 69 ml/min. Im Vergleich zur Pulpa mit einer Durchblutung von 0,15 – 0,8 ml/min pro Gramm Pulpagewebe entsprach dies jedoch keinen physiologischen Bedingungen. Sowohl im Volumen als auch in der Durchblutung ergab sich ein um den Faktor 50 – 100 abweichender Unterschied. Die verwendete Pumpe mit den Frequenzen F1 (2,2 Hz; 132 Schläge/Minute) und F2 (3,2 Hz; 192 Schläge/Minute) simulierte einen pulsierenden Blutfluss. Diese Frequenzen entsprachen in etwa physiologischen Werten, da die Herzfrequenz bei einem gesunden, erwachsenen Menschen in Ruhe etwa 60 – 80 Schläge/Minute beträgt und bei sportlicher Betätigung auf Werte bis zu 200 Schläge/Minute steigen kann. In Anlehnung an die Dissertationen von Niklas [167] und Jaeger [105] wurde die Pumpe auf die Frequenzen F1 (2,2 Hz) eingestellt, für F2 im Gegensatz zu Niklas [167] jedoch mit 3,2 Hz Werte im physiologischen Bereich gewählt. F0 entsprach dem Stillstand der Pumpe, welcher der fehlenden Durchblutung im devitalen Zahn gleich kommt. F0 und die Durchblutung mit konstantem Fluss (Fk) dienten als Negativkontrolle der Frequenzdetektion. Eine Negativkontrolle durch Ausschalten des Ultraschalls oder Laserlichts kam nicht in Frage, da im Lock-In-Messprinzip beide Signale zur Verarbeitung benötigt werden.



Die Testmedien EK 1:1 unverdünnt, EK 1:10 und EK 1:100 wurden nach der von Niklas [167] empfohlenen Verdünnungsreihe hergestellt. Die verwendeten Erythrozytenkonzentrate mit einem Erythrozytengehalt pro  $\mu\text{l}$  von  $4,04 \cdot 10^6$  bis  $5,46 \cdot 10^6$  entsprachen den physiologischen Werten, wie sie für Frauen und Männer in der Literatur angegeben werden (siehe Kapitel 2.3.) Die Erythrozytenkonzentrationen von EK 1:10 und EK 1:100 sind keinen physiologischen Bedingungen zuzuordnen, jedoch dienten diese durch eine Reduktion der Erythrozytenkonzentrationen als Kompensation des experimentell bedingten, großen Volumens. Ein weiterer Unterschied zum anatomischen Vorbild der Pulpa ist die Temperatur. Die Versuche sind bei einer Raumtemperatur von 22 bis 24 °C durchgeführt worden, im Körper hingegen herrscht bei gesunden Menschen eine orale Temperatur von 36,3 bis 37,1 °C [116]. Da die Temperatur Einfluss auf die Schallausbreitung hat, beträgt die Schallgeschwindigkeit in Wasser bei 20 °C 1483,2 m/s, bei 40 °C 1528,4 m/s [92]. Diese geringe Differenz konnte bei den Messungen vernachlässigt werden.

Es wurde eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 785 nm verwendet, die auch in der Dissertation von Jaeger [105] bei den PPG-Untersuchungen zum Einsatz kam und für geeignet befunden wurde. Bei der Wahl zur Anwendung von Laserlicht am Zahn wurden die Vorschläge, längere Wellenlängen als 600 nm zu verwenden, berücksichtigt [71,103,108,214]. Das beste Verhältnis zwischen Dentintransparenz und der Blutabsorption liegt im Bereich von 850 nm und 1380 nm [94]. Da der physikalische Effekt der Ultraschall-Markierung noch nicht hinreichend verstanden wurde, ist auch der Einfluss der Blutabsorption fraglich. Es wurde bewusst eine Wellenlänge im sichtbaren Bereich in den Versuchsaufbau integriert, da der Laser mit einer Leistung von 25 mW nach DIN EN 60825-1 [253] ein Produkt der Laserklasse 3B ist und eine mögliche Gefahr für Auge und Haut darstellt. Auch beim aktuellen Gerät „c-Flow“ von Ornim Medical zur zerebralen Blutflussmessung, wird ein ähnlicher Klasse-3B-Laser mit einer Wellenlänge von 808 nm benutzt [259].

Das Laserlicht wurde mit der Photodiode BPW34 detektiert. Diese besitzt eine hohe Fotoempfindlichkeit, mit dem Maximum bei einer Wellenlänge von 850 nm, und eine sehr kurze Schaltzeit von 20 ns. Letztere wurde benötigt, um die hohen Frequenzen (Ultraschall) zu detektieren. Die bestrahlungsempfindliche Fläche von  $7 \text{ mm}^2$  ist ausreichend, um das Laserlicht mit einem Durchmesser von 1 mm im Abstand der Photodiode zu detektieren. Eine weitere Verbesserung des Detektors könnte mit Hilfe der Speckle-Technik (siehe Kapitel 2.4.2.3) realisiert werden, da nur ein geringer Anteil des Laserlichts mit Ultraschall markiert wird. Hierbei wird das Speckle-Muster von einem CCD-Sensor aufgenommen, wodurch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bewerkstelligt wird. Die Veränderung der Fließgeschwindigkeit des Blutes geht mit einer Veränderung des Speckle-Musters einher. Diese Technik wird von vielen Autoren zur Signaldetektion verwendet und ist zudem in das „c-Flow“-Gerät integriert [13,36,133-135,138,180,213,231,234].

Die verwendete Größe des US-Kopfes mit einem Durchmesser von 27 mm ist, wie auch das „c-Flow“-Gerät, für die intraorale Messung am Zahn nicht geeignet, da die Schallkopfgröße auf einen Durchmesser von 1 bis 3 mm reduziert werden müsste. Auch die Frequenz von 811 kHz liegt im

Bereich des c-Flow-Geräts (1 MHz), eignet sich zwar für das Durchblutungsmodell, jedoch scheint sie, mit einer Wellenlänge von 1,85 mm, für die Zahngröße nicht geeignet zu sein, da eine hohe Ortsauflösung eines kleinen Volumens erst bei kürzerer Wellenlänge möglich ist. Eine hohe Ortsauflösung ermöglicht es, den markierten Bereich auf die Pulpa einzugrenzen. Hierzu wird eine Frequenz von 10 MHz vorgeschlagen. Diese liegt, wie in der Literaturübersicht beschrieben, im Randbereich der für die Bildgebung am Zahn verwendeten Frequenzen von 10 – 50 MHz. Welche Frequenz für die ultraschall-markierte Blutflussmessung am Zahn am optimalsten ist, muss noch genauer untersucht werden.

Die ultraschall-markierte Blutflussmessung ist unabhängig vom Umgebungslicht, da durch den Lock-in Verstärker das ultraschall-markierte Licht herausgefiltert wird. Dies erleichtert die Umsetzung in die praktische Anwendung erheblich, weil keine aufwändigen Vorkehrungen zur Abschirmung des Umgebungslichtes, wie bei anderen Studien [22,105,117,167], getroffen werden müssen. Ein Einfluss auf die Signale durch Bewegungsartefakte wurde nicht bemerkt, waren aber auch nicht explizit Gegenstand der Untersuchungen. Das hauptsächliche Problem aller auf Licht basierenden Verfahren sind die Einflüsse der umgebenden Gewebe durch die Streuung im Zahn. Dem kann durch die gezielte Markierung der Pulpa mit Ultraschall entgegengewirkt werden und ermöglicht so die Ortsauflösung des Signals. Dadurch ist auch eine Abschirmung der Gingiva mit Kofferdam oder Ähnlichem nicht notwendig.

Die Frequenzanalyse mit Hilfe der Fast Fourier Transformation (FFT) diente zur Überprüfung und ersten Anwendung der Technik, da häufig kein eindeutiges Frequenzsignal erkannt werden konnte. Mit zunehmender optischer Dichte der Testmedien, aufgrund ihrer unterschiedlichen Erythrozytenkonzentrationen, musste eine Anpassung der Messdauer durchgeführt werden, die durch die Anzahl der FFT's (Number of Averages) von 5, 10 und 20 vorgenommen wurde. Da eine FFT 4,5 s benötigte, ergaben sich die Messdauern von 22,5, 45 und 90 s. Im verwendeten Durchschnittsberechnungs-Modus „Peak Hold“ wurde die maximale Amplitude für jede einzelne Frequenz über die gesamte Messdauer dargestellt. Dies erhöhte zwar das Rauschen, jedoch konnten dadurch auch kurzzeitige Signale besser erkannt werden. Eine Pulsfrequenzdetektion im Zahn, die synchron mit dem Herzschlag ist, wäre für eine Vitalitätsbestimmung ausreichend. Für differenziertere Untersuchungen wäre jedoch eine Bestimmung der Fließgeschwindigkeit wünschenswert, die durch eine Veränderung der Signalverarbeitung erreicht werden könnte.

#### **6.1.2.2 Temperaturänderung der Testmedien**

Mit der im Versuchsaufbau verwendeten Methode konnte die Veränderung der Temperatur dokumentiert werden. Es muss festgehalten werden, dass sowohl bei den Messungen der fließenden als auch bei den stehenden Testmedien die tatsächliche Temperatur über der Gemessenen lag. Dies war messtechnisch bedingt, da innerhalb des Schallfeldes im Testmedium keine exakte

Temperaturmessung möglich war, da die Sonde durch den Ultraschall erwärmt worden wäre. Durch die zeitlich und räumlich versetzte Messung, konnte das Testmedium in geringem Maße abkühlen, was zu einer geringen Temperaturdifferenz führen kann. Eine Kontaktmessung an der Außenseite der Küvette schied ebenfalls aus, da die Küvette im Gegensatz zum Testmedium dem Ultraschall dauerhaft ausgesetzt war und somit eine höhere Temperatur hatte. Für die stehenden Testmedien musste auch der andere Aufbau mit einer Küvette samt Boden verwendet werden, da aus den genannten Gründen keine Möglichkeit bestand, die stehenden Testmedien direkt zu messen. Das vorherige Einbringen des Temperatur-Kontaktfühlers diente dazu, ihn an den Temperaturbereich anzupassen, um eine schnellere Messung der Temperatur zu bewerkstelligen und den Fehler durch die Temperaturdifferenz, bedingt durch Abschalt- und Messzeitpunkt, zu minimieren. Die Temperaturänderungen der Testmedien stellten nur die Veränderungen innerhalb des Versuchsaufbaus dar und erlauben keinerlei Aussage über die Vorgänge bei einer praktischen Anwendung. Für weitere Untersuchungen sollte diese Thematik berücksichtigt werden.

#### **6.1.2.3 REM-Darstellung der Testmedien**

Die eingesetzte Methode sollte mögliche morphologische Veränderungen der Erythrozyten durch den Ultraschall im Versuchsaufbau überprüfen und darstellen. Analog zu den Temperaturmessungen wurden fließende und stehende Testmedien in getrennten Versuchen untersucht, da eine Entnahme der stehenden Testmedien aus dem Kreislauf nicht möglich war. Die stehenden Testmedien wurden zuvor für die fließenden Versuche verwendet, um die Versuchsbedingungen eines Frequenzversuchs zu simulieren. Im Frequenzversuch wurden ebenfalls die Testmedien zuvor im Durchfluss beschallt (F1,F2), bevor die Messung F0 (stehendes Testmedium) durchgeführt wurde. Die angewandte Aufbereitung der Testmedien eignete sich für die Rasterelektronenmikroskopische Bildgebung der Erythrozyten im Niedrig-Vakuum. Das Niedrig-Vakuum ermöglichte die Aufnahmen von feuchten, nicht- bzw. schlecht-leitenden Proben, ohne Präparation mit einer Edelmetall- oder Kohlenstoffschicht [58,192].

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Ergebnisse der Entwicklung und Untersuchung von Ultraschallgelen zur Anwendung am Zahn

Die Ergebnisse der Gel-Untersuchung lassen auf eine Verbesserung der Ankopplung schließen, die eine erhöhte Schallübertragung auf den Zahn impliziert. Erste Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass die Mischung (G27) von Buehler Micropolish II 0,3 µm Pulver (P8) und medizinischem US-Gel (G1) das größte  $\Delta U_2$  aufwies. Ebenso konnte durch Glycerin 99 % (G9) eine hohes  $\Delta U_2$  beobachtet werden, was der Idee einer Mischung von P8 und G9 zu Grunde lag. Diese Mischung (G31) führte zum größten gemessenen  $\Delta U_2$ -Wert, der in den Abb. 22A und B zu erkennen ist. Das Fehlen von Peak 3 (Abb. 13) ist ein Hinweis auf die erhöhte Dämpfung im Testgel, was jedoch aufgrund der sehr geringen Schichtdicken, wie sie bei der Ankopplung verwendet werden, als vernachlässigbar zu betrachten ist. Die aus der Literatur bekannte (Tab. 1), höhere Schallimpedanz von Glycerin ( $G_9 = 1,12 \text{ V}$ ) im Vergleich zu Wasser ( $G_1 = 0,76 \text{ V}$ ), konnte durch das höhere  $\Delta U_2$  bestätigt werden. Es zeigte sich, dass Glycerin in zunehmender Konzentration eine Erhöhung von  $\Delta U_2$  aufwies. Dadurch konnte auch eine Einordnung, der oftmals nur grob vom Hersteller angegebenen Glycerin-Konzentrationen, bei den Glycerin-Gelen Sonotech Soundsafe (G4; auf Wasser-Basis) und Liquid Strip (G3; auf Glycerin-Basis) gemacht werden. G4 ließ aufgrund des Vergleichs mit den Glycerin-Konzentrationen 25%, 50%, 75% und 99% einen Glycerin-Gehalt von 25 – 50 % Prozent vermuten. Liquid Strip schien einen Glycerin-Gehalt von 75 – 99 % zu haben.

Bei den Schmelz-Messungen ergaben sich im Vergleich zu den Dentin-Messungen ein schmälerer Werte-Bereich (Schmelz-Messungen:  $\Delta U_{2\max} - \Delta U_{2\min} = 0,32 \text{ V}$ ; Dentin-Messungen:  $\Delta U_{2\max} - \Delta U_{2\min} = 0,88 \text{ V}$ ) und auch  $\Delta U_{2\max}$  war kleiner als  $\Delta U_{2\min}$  der Dentin-Messungen. Dies führte zu einer geringeren Differenzierung der Testgele und den nicht vollständig übereinstimmenden Ergebnissen bei den Schmelz-Messungen und war mit dem Verlust der Schallenergie auf Ihrem Weg durch den Zahn zu begründen. Bei den Dentin-Messungen konnten dagegen die Testgele besser unterschieden und eingeordnet werden. Für die Anwendung des Testgels als Ankopplungsmedium wären die Schmelz-Messungen die aussagekräftigeren Messungen, da sie den Übergang von Gel zu Schmelz beschreiben. Dennoch kann sowohl bei den Schmelz- als auch bei den Dentin-Messungen die Erhöhung der akustischen Impedanz des Testgels beobachtet werden.

Aufgrund der niedrigen Streuung der Messergebnisse lässt sich darauf schließen, dass die Versuche gut reproduziert werden konnten. Anzumerken ist auch, dass keine absoluten Werte gemessen wurden, sondern die Testgele relativ zueinander und in Bezug zu den Zahnhartsubstanzen verglichen wurden.

Der nächste Schritt wäre, die exakten akustischen Eigenschaften, wie Schallgeschwindigkeit, Dichte und akustische Impedanz zu bestimmen, um die Ergebnisse der Studie besser einordnen und vergleichen zu können. Als erste Verbesserung der Ultraschallankopplung an die Zahnhart-

substanzen, sind sowohl die Ergebnisse als auch die Methoden als sehr gut anzusehen. Ein weiterer Vorteil der gewählten Materialien liegt in der kostengünstigen und einfachen Herstellung. Auch die Zulassung zur intraoralen Anwendung am Patienten dürfte keine größeren Schwierigkeiten bereiten, da die Biokompatibilität der eingesetzten Stoffe gewährleistet ist [194,251,262].

Alternativ wurde vorgeschlagen eine Gallium-Indium Legierung, dessen Reaktivität mit anderen Materialien sehr hoch ist, als Ankopplungsmedium verwendet. Hinsichtlich der Biokompatibilität dürfte die Situation am Patienten kritisch zu beurteilen sein. Aluminium zum Beispiel zeigte bis zu einer Tiefe von 2,5 mm Veränderungen bei Kontakt mit der Gallium-Indium Legierung. In Verbindung mit Kupfer und Gold wurde es ebenfalls nicht empfohlen. Bei Silizium, Silber und Magnesium ist die chemische Reaktion der Legierung langsamer und kann so unter Umständen verwendet werden [99,100]. Aufgrund dessen empfahl Hulbert [99], jedes Material, das in Kontakt mit der Legierung kommt, auf unakzeptable, starke Veränderungen zu überprüfen. Auch in der Verwendung als Füllungsmaterialien standen Gallium-Legierungen als quecksilberfreie Alternative zu Amalgam-Legierungen zur Debatte. Die Biokompatibilität wurde in Studien untersucht und festgestellt, dass es eine ähnliche oder etwas geringere Zytotoxizität als Amalgam hat [34,154,179], aber weitere Untersuchungen nötig sind. Als Füllungsmaterialien konnten sie sich jedoch nicht durchsetzen, da Expansion, Korrosion und Ausfallraten zu hoch waren [154]. Vermutlich aufgrund der negativen Eigenschaften, schlugen Culjat et al. [40] selber vor, die Gallium-Indium-Legierung in der klinischen Anwendung als Ankopplungsmedium innerhalb einer dünnen Membran zu verwenden. Fraglich ist, inwieweit sich dies auf die Übertragung der Schallwellen auswirkt, wenn durch die Membran zusätzliche Grenzflächen entstehen. Auch ein Ausgleich der Unebenheiten des Zahns, der durch das Ankopplungsmedium geschehen soll, ist durch die Membran nicht möglich. Insgesamt ist die Verwendung der Gallium-Indium-Legierung trotz der ausgezeichneten akustischen Eigenschaften kritisch zu betrachten. Weitere Untersuchungen zur direkten Ankopplung von Ultraschall an die Zahnhartsubstanz wurden nicht gefunden.

## **6.2.2 Ergebnisse der Frequenzdetektion von Testmedien mit ultraschall-markiertem Licht *in vitro***

### **6.2.2.1 Frequenzdetektion**

Die Detektion der verschiedenen Frequenzen zeigte die Möglichkeiten der ultraschall-markierten Blutflussmessung auf. Es ließ sich eindeutig eine pulsierende Strömung der Testmedien feststellen und die dazugehörige Frequenz bestimmen. Das Ausstopfen mit Watte hatte ein höheres Rauschen durch mehr Verwirbelungen zur Folge, aber die Pulsfrequenzen waren nach wie vor erkennbar. Eine fehlende oder konstante Strömung erzeugte nur Rauschen und nicht die charakteristischen Frequenzen des gepumpten Testmediums.

Die unterschiedliche Transmission, die mit zunehmender optischer Dichte des Mediums sank und zu einer niedrigeren Signalamplitude führte, wurde über die Messdauer angepasst. Die

Signifikanzanalyse, die nur einen signifikanten Unterschied zu erkennen gab, ließ eine gute Anpassung der Signalamplituden zwischen den Messungen der unterschiedlich konzentrierten Testmedien erkennen. Die Signale wiesen dennoch sehr unterschiedliche Amplituden auf, die durch die Perzentilen (in Abb. 26) zu erkennen sind. Dies beeinflusste nicht die Frequenzerkennung im Sinne einer Ja-Nein-Entscheidung. Grund für die unterschiedlichen Amplituden sind sehr viele verschiedene Faktoren, die bei der verwendeten Technik und dem Versuchsaufbau eine Rolle spielten. Die Signalamplitude bezog sich auf den ultraschall-markierten Anteil des Lichtes. Veränderungen in der Schallübertragung, die von der Küvetten-Position, dem Ankopplungsmedium und dem Anpressdruck abhängig waren, wirkten sich unmittelbar auf die Amplitude aus. Die reproduzierbare Ankopplung war auch schon bei der Gelentwicklung eine Herausforderung, die über die Referenzmessung gelöst wurde. Als weiterer Einflussfaktor kam die exakte Messposition in Betracht. Diese konnte zwar sehr gut über die verschiebbaren Elemente eingestellt werden, doch zeigten minimale Veränderungen schon Auswirkungen auf die Messung. Zudem konnte auch die Strömung in der Küvette nicht als rein laminar betrachtet werden, sondern es könnten sich durch den Übergang von dem runden Schlauch auf die eckige Küvette Turbulenzen ausgebildet haben, die wiederum das Messergebnis beeinflussten. Bei der Ultraschallerzeugung wurden Frequenzveränderungen beobachtet, die bei erstmaligem Einschalten von ca. 810 kHz, in kurzer Zeit auf 811 kHz und auf bis zu 812 kHz nach längerer Betriebsdauer stiegen. Ebenso war das Frequenzsignal des Ultraschalls keine Konstante, sondern schwankte im 1/10 kHz-Bereich. Diese Änderungen hatten aufgrund des Lock-in-Messprinzips nur sehr geringe Bedeutung für die Messungen. Auch die Raumtemperatur könnte Einfluss auf die Messungen genommen haben, da sie mit der Schallgeschwindigkeit zusammenhängt. Als weiterer Faktor ist der Kavitationseffekt aufzuführen, der bei längerer Beschallungsdauer zu Gasbläschenbildung führte und so die Transmission verändert hätte. Jedoch konnte dieser Einfluss durch die Reinigungsvorgänge weitestgehend reduziert werden. Der Ursprung und die Entstehung der Signale sind mit diesem Messaufbau nicht vollständig zu erklären und bedürfen weiterer Untersuchungen. Mögliche Ursachen wären die Transmissionsänderung durch Streuung, Deformation der Erythrozyten oder Doppler-Effekt. Auch eine Kombination wäre denkbar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur ultraschall-markierten Blutflussmessung am Durchblutungsmodell sind im Hinblick auf die Anwendung dieser Technik zur Vitalitätsbestimmung am Zahn vielversprechend. Auch die Studiendaten des c-Flow-Geräts [201] bekräftigen dies, da am Schädel ähnliche Bedingungen anzutreffen sind, da hier ebenfalls Gefäße untersucht werden, die sich hinter einem für Licht und Schall eingeschränkt zugänglichen Bereich, dem Knochen, befinden. Trotz dieser Einschränkungen ist es mit diesem Messprinzip und dem vorgestellten Gerät der Firma Ornim möglich, Messungen durchzuführen. Dennoch bedarf es noch einiges an Entwicklungsarbeit, um diese Methode in der klinischen Anwendung in der Zahnmedizin zu erforschen.

### 6.2.2.2 Temperaturänderung der Testmedien

Durch die Schallabsorption, die in jedem Medium vorhanden ist, kommt es zu einer Erwärmung, die als Temperaturänderung angegeben werden kann. Die verdünnten Testmedien zeigten eine geringere Erwärmung als das unverdünnte Testmedium, was auf den reduzierten Anteil der korpuskulären Bestandteile (Erythrozyten) zurückgeführt werden könnte. Durch den Einfluss der Watte erhöhte sich geringfügig die Temperatur. Dies könnte darauf beruhen, dass sich die Watte über die gesamte Messdauer hinweg im Schallfeld befand und somit eine höhere Temperatur hatte, die sie an das Testmedium abgeben konnte. Zudem kam es bei den stehenden Testmedien zu einer starken Erwärmung, die eine Gefahr für die Pulpa darstellen könnte. Auch bei den fließenden Medien konnte eine geringe Temperaturänderung gemessen werden, die aber in diesem Versuchsaufbau keinen pathologischen Wert angenommen hat. Betrachtet man die Studien zum Einfluss der Temperatur auf die Pulpa, finden sich unterschiedliche Aussagen dazu. In einer älteren Studie am Rhesus Affen [244] trat ab einer Erwärmung von 5,5 °C bei 15 % der Zähne eine irreversible Pulpitis auf; bei 11,1 °C stieg die Rate auf 60 %. Eine neuere Studie [10] konnte jedoch keine histologischen Schäden bei einer Temperaturerhöhung um 11,2 °C erkennen. Jedoch handelt es sich nach Angaben der Autoren nur um eine „Preliminary Study“.

Allerdings muss angemerkt werden, dass sich die verwendeten Fließgeschwindigkeiten im Versuchsaufbau von den Durchflussmengen der Pulpa unterscheiden. In der Realität ist aber vermutlich auch in der Pulpa ein Abtransport der Wärme über das Blut gewährleistet. Über eine mögliche Erwärmung der Pulpa, die zu einer irreversiblen Pulpitis führen kann, kann anhand der Ergebnisse der Untersuchungen keine Aussage getroffen werden. Die Temperaturerhöhung bleibt ein Punkt, der weiter untersucht werden muss. Weder in den Studien zum c-Flow-Gerät noch bei der Ultraschall-Doppler-Blutflussmessung ist ein Hinweis auf eine mögliche Schädigung aufgrund der Ultraschallabsorption zu finden. Vermutlich würde in der beschriebenen Versuchsanordnung eine Senkung der Ultraschallintensität ausreichen, um die Temperaturveränderungen auf ein für die Pulpa nicht schädigendes Maß zu reduzieren. Inwieweit dies die Ultraschall-Markierung und damit die Messungen beeinflusst, ist zu klären.

### 6.2.2.3 REM-Darstellung der Testmedien

Die REM-Aufnahmen zeigten Erythrozyten in ihren sowohl physiologischen als auch lagerungsbedingten Stechapfel-Formen [95] (siehe Kapitel 2.3). Außerdem konnten Veränderungen bei den stehenden Testmedien, die sich in Form von verschiedenen großen Kugeln und Fragmenten darstellten, erkannt werden. Diese Ergebnisse passen gut zu den Temperaturmessungen, die bei stehenden Testmedien sowohl eine starke Temperaturerhöhung als auch visuelle Veränderungen ergaben. Unklar ist, ob die Temperaturerhöhung oder Effekte des Ultraschalls (Kavitation, Mikroströmung) für



die Veränderungen verantwortlich waren. Williams et al. [237] haben dazu eine Untersuchung durch Ultraschall-Beschallung von Ratten durchgeführt und sie kamen zu dem Ergebnis, dass in erster Linie der thermische Effekt, der von der Frequenz und der Intensität abhängig ist, die Zellen schädigt. Um diese Zellschäden zu verhindern, müsste, wie schon beschrieben, die Intensität des Ultraschalls reduziert werden. Eine weitere, makroskopische Beobachtung zeigte sich in Form einer Anordnung von feinen Erythrozyten-Bändern durch die Einwirkung des Ultraschalls, die bei EK 1:10 und EK 1:100 auftraten (siehe Abb. 26D). Dieser Effekt, der durch stehende Ultraschallwellen eines Continuous-Wave-Schallkopfes erzeugt wird, konnte auch von Dyson et al. [56] in Hühnchen-Embryonen beobachtet werden. Es kam zu einer bandförmigen Anordnung und einem Stillstand in den Blutgefäßen aufgrund der Druckverhältnisse der stehenden Ultraschallwelle und zu Endothelschäden [56,85]. Baker et al. [9] hielten diesen Effekt für klinisch irrelevant, weil er nur in homogenen Medien mit geringer Dämpfung (Wasser) entsteht und es für die Ausbildung der stehenden Welle zusätzlich eines senkrecht zum Ultraschallstrahl befindlichen Reflektors bedarf, was *in vivo* nicht der Fall sein dürfte. Diese Gefahren und Effekte, die durch Ultraschall unter Umständen auftreten können, müssen bei der weiteren Entwicklung zur Anwendung am Zahn berücksichtigt werden, stellen aber voraussichtlich kein Hindernis dar.

### 6.3 Ausblick

Es bleiben Fragen offen, die durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden müssen. So sollten die akustischen Eigenschaften der entwickelten Testgele, wie Schallgeschwindigkeit, Dichte und Impedanz, analysiert werden und im direkten Einsatz als Ankopplungsmedium in einem geeigneten Versuchsaufbau untersucht werden. Auch andere aussichtsreiche Verfahren, wie die Wasserstrahl-Ankopplung, könnten weiter auf ihre Anwendbarkeit am Zahn überprüft werden.

Die nicht völlig verstandenen Ursachen und physikalischen Vorgänge der ultraschall-markierten Blutflussmessung könnten weiter erforscht werden. Im Hinblick auf die Vitalitätsbestimmung sind einige Veränderungen des Versuchsaufbaus nötig. Das Durchblutungsmodell könnte in einem ersten Schritt auf allen Seiten mit Zahnscheiben versehen werden und in einem weiteren durch einen humanen Zahn ersetzt werden, wie er in den anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde. Ebenso sollte sowohl beim Detektor die Photodiode durch einen CCD-Sensor ersetzt werden, als auch der US-Kopf in Größe und Frequenz an den Zahn angepasst werden. Eine weitere Optimierung könnte durch Verbesserung der technischen Signalverarbeitung geschehen. Den *in vitro* Untersuchungen müssen dann *in vivo* Untersuchungen folgen, um Aussagen über die klinische Anwendung treffen zu können, da die umgebenden Weichgewebe und Durchblutungsbedingungen in der Pulpa nicht hinreichend simuliert wurden. Abschließend ist zu sagen, dass die Anwendung der ultraschall-markierten Blutflussmessung zu einer sehr vielversprechenden, objektiven Methode in der Vitalitätsbestimmung von Zähnen entwickelt werden könnte.

Im ersten Teil der vorliegenden *in vitro* Studie wurde ein Beitrag zur optimierten Ankopplung von Ultraschall an Materialien mit hoher akustischer Impedanz, wie der Zahnhartsubstanz, geleistet. In der medizinischen Ultraschalldiagnostik kommt ein Ultraschallgel auf Wasserbasis zum Ausgleich der Unebenheiten der Haut zum Einsatz, welches eine ähnliche akustische Impedanz hat, wie das zu untersuchende Gewebe. Wie auch bei der Haut, kommt es bei der Ankopplung eines Ultraschallkopfes an den Zahn durch die raue Oberfläche zu Lufteinschlüssen. Da an der Grenzfläche zwischen Luft und Zahn ein sehr hoher Impedanzunterschied herrscht, kommt es zu starken Reflexionen, die mit Hilfe eines an den Zahn angepassten Ankopplungsmediums reduziert werden können. Dazu wurde ein geeigneter Versuchsaufbau mit einer Zahnscheibe entwickelt, um gebrauchsfertige und individuell hergestellte Testgele zu untersuchen. Diese wurden durch das Mischen von Pulvern mit hoher akustischer Impedanz mit einem flüssigen oder gelartigen Medium niedriger Impedanz hergestellt. Diese Testgele führten zu einer reduzierten Reflexion an der Grenzfläche, was auf eine erhöhte Impedanz im Testgel und eine bessere Ankopplung schließen lässt. Die erhöhte akustische Impedanz von unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen konnte bestätigt werden. Die besten Ergebnisse lieferte, die Mischung (G31) von 0,5 g Buehler Micropolish II 0,3 µm Aluminiumoxid Pulver (P8) mit 0,5 g Glycerin 99% (G9). Im Vergleich zu medizinischem Ultraschall-Gel (G1) entspricht dies einer reduzierten Reflexion des Ultraschalls und somit einer Verbesserung der Ankopplung um 105 %.

Im zweiten Teil der Studie wurde ein Versuchsaufbau zur ultraschall-markierten Blutflussmessung entwickelt. Ein Problem der auf Licht basierenden Systeme (z. B. Photoplethysmographie, Laser-Doppler-Blutflussmessung) zur objektiven Vitalitätsbestimmung am Zahn, ist die Streuung. Ein Einfluss der umgebenden Gewebe kann häufig nicht ausreichend abgeschirmt werden, wodurch es zu fehlerhaften Messungen kommen kann. Um Sicherheit über den Ursprung des Signals zu haben, wurde die Markierung des Lichts mit Hilfe von Ultraschall und dem akustooptischen Effekt vorgeschlagen. Da Ultraschall im Zahn nur einer geringen Streuung unterliegt, kann durch gezieltes Markieren der Pulpa eine orts aufgelöste Messung erreicht werden. In einem Versuchsaufbau wurde das grundlegende Prinzip einer ultraschall-markierten Blutflussmessung durch die Frequenzdetektion von verschiedenen gepulsten, stehenden und fließenden Erythrozytenkonzentraten unterschiedlicher Verdünnung (1:1 unverdünnt, 1:10, 1:100), bei laminarem und diffusem Fluss, überprüft. Unter allen Versuchsbedingungen, die einen gepulsten Fluss aufwiesen, konnten die entsprechenden Frequenzen detektiert werden. Bei stehenden oder kontinuierlich fließenden Versuchsbedingungen konnten keine der charakteristischen Frequenzen erkannt werden. Im Hinblick auf ein späteres *in vivo* Verfahren sind die Ergebnisse der Untersuchungen als sehr aussichtsreich zu bewerten.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria	P	Pulver
Abb.	Abbildung	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Phosphorpentoxid
AC	Alternating current, Wechselstrom	PAD	Photoakustischen-Doppler-Effekt
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid	PAT	Photoakustische Tomographie
AOT	akustooptische Tomographie	PBF	Pulpaler Blutfluss
<i>c</i>	Schallgeschwindigkeit	PMMA	Polymethylmethacrylat
CaO	Kalziumoxid	PPG	Photoplethysmographie
CCD	Charged-coupled Device	<i>R</i>	Reflexionsgrad
CMD	Craniomandibuläre Dysfunktion	Ref.-ID	Reference Identification
DC	Direct current, Gleichstrom	REM	Rasterelektronenmikroskop
<i>E</i>	Elastizitätsmodul	S/N	Seriennummer
EK	Erythrozytenkonzentrat	SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
EK 1:1	Testmedium: EK 1:1 unverdünnt	Tab.	Tabelle
EK 1:10	Testmedium: EK 1:10 verdünnt	U	Spannung
EK 1:100	Testmedium: EK 1:100 verdünnt	UFM	Ultrasonic Flowmetry
EPT	Elektrischer Vitalitätstest	US	Ultraschall
et al.	und andere (lateinisch)	<i>Z</i>	Schallleitfähigkeit, akustische Impedanz
<i>f</i>	Frequenz		
F0	Frequenz F0 = 0 Hz, Stillstand	ΔU	Delta U = Signalamplitude in Volt
F1	Frequenz F1 ≈ 2,2 Hz	λ	Wellenlänge (Lambda)
F2	Frequenz F2 ≈ 3,2 Hz	ρ	Dichte (Rho)
Fk	Frequenz Fk = konstanter Fluss	<b>Physikalische Einheiten</b>	
FeO/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisenoxid	cm	Zentimeter
FFT	Fast Fourier Transformation	g	Gramm
G	Gel	GHz	Gigahertz
Ga	Gallium	Hz	Hertz, phys. Einheit für die Frequenz
Gew.-%	Gewichtsprozent	kg	Kilogramm
ID	Inside diameter; Innendurchmesser	kHz	Kilohertz
<i>I<sub>e</sub></i>	Intensität der einfallenden Schallwelle	l	Liter
In	Indium	MHz	Megahertz
<i>I<sub>r</sub></i>	Intensität der reflektierten Schallwelle	min	Minute
<i>K</i>	Kompressionsmodul	ml	Milliliter
K <sub>2</sub> O	Kaliumoxid	mm	Millimeter
LDF	Laser-Doppler-Blutflussmessung	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
LOT	Chargennummer	mW	Milliwatt
Lsg.	Lösung	nm	Nanometer
MgO	Magnesiumoxid	s	Sekunde
Na <sub>2</sub> O	Natriumoxid	V	Volt
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz	μl	Mikroliter
OD	Outside diameter; Außendurchmesser	μm	Mikrometer
		°C	Grad Celsius

## 8.2 Danksagung

Zuallererst danke ich vielmals Herrn Professor Dr. Gottfried Schmalz für die Überlassung und Betreuung dieser interessanten Dissertationsarbeit und die großzügige finanzielle und geistige Unterstützung der Versuche.

Ich danke ganz besonders Herrn Dr. Karl-Anton Hiller für die hervorragende, intensive Betreuung während der gesamten Arbeit. Er stand mir immer hilfsbereit mit seiner Diskussionsbereitschaft zur Seite und war sowohl bei der Versuchsplanung und Auswertung als auch beim Erstellen der schriftlichen Arbeit eine große Hilfe. Seine Motivationsfähigkeit und die aufbauenden Worte halfen mir sehr.

Den Herren Dr. Andreas Niklas, Dr. Andreas Jaeger, Max Brandt und Stephan Knörzer, die maßgeblich am Projekt mitgewirkt haben, möchte ich besonders für die produktive Zusammenarbeit danken.

Herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter des Forschungsbereichs der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie. Sie haben mich mit ihrer fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft sehr unterstützt.

Herrn Dipl. Phys. Jürgen Putzger bin ich für seinen fachlichen Beistand zu sehr großem Dank verpflichtet. Ohne ihn wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen, da er mit seinem physikalischen Fachwissen der kreative Kopf hinter der Arbeit war. Er hat mit den zur Verfügung gestellten Materialien und konstruktiven Anregungen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Gareth Monkman von der Fakultät für Elektro- und Informationstechnik der Hochschule Regensburg bedanken, der das Projekt mit viel Engagement unterstützt hat. Insbesondere gilt auch mein Dank seiner wissenschaftlichen Mitarbeiterin Frau Irene Schulz, die mir mit ihrem unermüdliche Engagement und Wissen zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich dem Team des Terahertz Zentrums Regensburg an der Fakultät für Physik der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Sergey Ganichev, die an diesem Projekt mitgearbeitet haben.

Mein Dank gilt auch Norbert Sommer und seinen Mitarbeitern der physikalischen Werkstatt der Universität Regensburg für die Einführung in die mechanische Werkstoffverarbeitung und die Unterstützung bei der Anfertigung der Versuchsaufbauten.

Ich möchte mich bei allen, die ich nicht ausdrücklich genannt habe und bei denen, die mir als Freunde zur Seite gestanden sind, herzlich bedanken. Sie haben durch ihre Unterstützung zu diesem Projekt und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihre Unterstützung und Liebe, besonders auch meinen Schwiegereltern für das Wecken des Interesses an diesem vielseitigen und schönen Beruf.

Auch meiner Frau Elisabeth danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe und Hilfe. Sie hat mich bei der umfangreichen Dissertationsarbeit und dem Studium immer unterstützt und begleitet.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg nie alleine gelassen haben. Sie haben mir geholfen, wo sie nur konnten und mir das Studium der Zahnmedizin überhaupt erst ermöglicht.

Über allem steht der Dank an Gott, für sein wunderbares Wirken und die Führung in meinem Leben.





- [1] Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: part 2. Current diagnostic tests to assess pulp vitality. *J Can Dent Assoc* 2009;75:139–143.
- [2] Akpinar KE, Er K, Polat S, Polat NT. Effect of gingiva on laser doppler pulpal blood flow measurements. *J Endod* 2004;30(3):138–140.
- [3] Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas* 2007;28(3):R1–R39.
- [4] Antonio AG, Primo LG, Maia LC. Case report: ultrasonic cavity preparation - an alternative approach for caries removal in paediatric dentistry. *Eur J Paediatr Dent* 2005;6(2):105–108.
- [5] Ardenne von M. Effekte der Physik und ihre Anwendungen. 2005. Frankfurt am Main, Harri Deutsch Verlag. ISBN: 9783817116829.
- [6] Atsu SS, Aka PS, Kucukesmen HC, Kilicarslan MA, Atakan C. Age-related changes in tooth enamel as measured by electron microscopy: Implications for porcelain laminate veneers. *J Prosthet Dent* 2005;94(4):336–341.
- [7] Azhari H. Basics of Biomedical Ultrasound for Engineers. 2010. John Wiley & Sons. ISBN: 9780470561461.
- [8] Babchenko A, Davidson E, Ginosar Y, Kurz V, Faib I, Adler D, Nitzan M. Photoplethysmographic measurement of changes in total and pulsatile tissue blood volume, following sympathetic blockade. *Physiol Meas* 2001;22(2):389–396.
- [9] Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther* 2001;81(7):1351–1358.
- [10] Baldissara P, Catapano S, Scotti R. Clinical and histological evaluation of thermal injury thresholds in human teeth: a preliminary study. *J Oral Rehabil* 1997;24(11):791–801.
- [11] Barber FE, Lees S, Lobene RR. Ultrasonic pulse-echo measurements in teeth. *Archs Oral Biol* 1969;14(7):745–760.
- [12] Barnard KJ, Anisimov I, Scheihing JE. Random laser speckle based modulation transfer function measurement of midwave infrared focal plane arrays. *Opt Eng* 2012;51(8):083601–1–083601–8.
- [13] Basak K, Manjunatha M, Dutta PK. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging. *Med Biol Eng Comput* 2012;50(6):547–558.
- [14] Baum G, Greenwood I, Slawski S, Smirnow R. Observation of internal structures of teeth by ultrasonography. *Science* 1963;139(3554):495–496.
- [15] Bayle P, Dean MC. New ways to think about enamel and dentine thickness in longitudinal tooth sections. *Bull Int Assoc Paleodont* 2013;7(1):29–37.
- [16] Berman LH, Hargreaves KM, Cohen SR. Cohen's Pathways of the Pulp Expert Consult. 2010. St. Louis, MO, USA, Mosby. ISBN: 9780323064897.
- [17] Bin Rao, Cai X, Favazza C, Yao J, Li L, Duong S, Liaw L-H, Holtzman J, Wilder-Smith P, Wang LV. Photoacoustic microscopy of human teeth. *SPIE BiOS* 2011;7884:78840U–1–78840U–7.

- [18] Bin Yu, Ahn J-S, Lee Y-K. Measurement of translucency of tooth enamel and dentin. *Acta Odontol Scand* 2009;67:57–64.
- [19] Blodgett DW. Applications of laser-based ultrasonics to the characterization of the internal structure of teeth. *J Acoust Soc Am* 2003;114(1):542.
- [20] Bollenl CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater* 1997;13(4):258–269.
- [21] Bozkurt FÖ, Tagtekin DA, Hayran O, Stookey GK. Accuracy of ultrasound measurement of progressive change in occlusal enamel thickness. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:101–105.
- [22] Brandt M. In Vorbereitung. Med. Diss.: Universität Regensburg.
- [23] Brunner J, Beard P. Acoustic resolution photoacoustic Doppler velocity measurements in fluids using time-domain cross-correlation. *SPIE BiOS* 2013;8581:85811U–1–85811U–11.
- [24] Brunner J, Beard P. Pulsed photoacoustic Doppler flow measurements in blood-mimicking phantoms. *SPIE BiOS* 2011;7899:78991K–1–78991K–10.
- [25] Brunner J, Beard P. Pulsed photoacoustic Doppler flowmetry using a cross correlation method. *BiOS* 2010;7564:756426–1–756426–8.
- [26] Brunner J, Beard P. Pulsed photoacoustic Doppler flowmetry using time-domain cross-correlation: accuracy, resolution and scalability. *J Acoust Soc Am* 2012;132(3):1780–1791.
- [27] Calil E, Caldeira CL, Gavini G, Lemos EM. Determination of pulp vitality in vivo with pulse oximetry. *Int Endod J* 2008;41(9):741–746.
- [28] Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, de Oliveira SHG, Carvalho CAT, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007;33(4):422–426.
- [29] Cantoro A, Goracci C, Coniglio I, Magni E, Polimeni A, Ferrari M. Influence of ultrasound application on inlays luting with self-adhesive resin cements. *Clin Oral Investig* 2011;15(5):617–623.
- [30] Carstensen EL, Kelly P, Church CC, Brayman AA, Child SZ, Raeman CH, Schery L. Lysis of erythrocytes by exposure to CW ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1993;19(2):147–165.
- [31] Casarotto RA, Adamowski JC, Fallopa F, Bacanelli F. Coupling agents in therapeutic ultrasound: acoustic and thermal behavior. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85(1):162–165.
- [32] Catuna MC. Sonic energy: A possible dental application, Preliminary report of an ultrasonic cutting method. *Ann Dent* 1953;12:100–101.
- [33] Challoner AV, Ramsay CA. A photoelectric plethysmograph for the measurement of cutaneous blood flow. *Phys Med Biol* 1974;19(3):317–328.
- [34] Chandler JE, Messer HH, Ellender G. Cytotoxicity of gallium and indium ions compared with mercuric ion. *J Dent Res* 1994;73(9):1554–1559.
- [35] Chen Y-L, Chang H-H, Chiang Y-C, Lin C-P. Application and development of ultrasonics in dentistry. *J Formos Med Assoc* 2013;112(11):659–665.

- [36] Cheng H, Luo Q, Liu Q, Lu Q, Gong H. Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation. *Phys Med Biol* 2004;49:1347–1357.
- [37] Cho Y-W, Park S-H. Use of ultrasound Doppler to determine tooth vitality in a discolored tooth after traumatic injury: its prospects and limitations. *Restor Dent Endod* 2014;39(1):68–73.
- [38] Cotti E, Campisi G, Garau V, Puddu G. A new technique for the study of periapical bone lesions: ultrasound real time imaging. *Int Endod J* 2002;35(2):148–152.
- [39] Culjat MO, Goldenberg D, Tewari P, Singh RS. A review of tissue substitutes for ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol* 2010;36(6):861–873.
- [40] Culjat MO, Singh RS, Brown ER, Neurgaonkar RR, Yoon DC, White SN. Ultrasound crack detection in a simulated human tooth. *Dentomaxillofac Radiol* 2005;34(2):80–85.
- [41] Culjat MO, Singh RS, White SN, Neurgaonkar RR, Brown ER. Evaluation of gallium-indium alloy as an acoustic couplant for high-impedance, high-frequency applications. *Acoust Res Lett Online* 2005;6(3):125.
- [42] Culjat MO, Singh RS, Yoon DC, Brown ER. Imaging of human tooth enamel using ultrasound. *IEEE Tran Med Imag* 2003;22(4):526–529.
- [43] Cvetinović M, Jović N, Mijatović D. Evaluation of ultrasound in the diagnosis of pathologic processes in the parotid gland. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49(2):147–150.
- [44] Daley J, Boyd E, Cooper J, O'driscoll P. Optical assessment of dental pulp vitality. *J Biomed Eng* 1988;10(2):146–148.
- [45] Daniels S, Kodama T, Price DJ. Damage to red blood cells induced by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* 1995;21(1):105–111.
- [46] de Bondt RBJ, Nelemans PJ, Hofman PAM, Casselman JW, Kremer B, van Engelshoven JMA, Beets-Tan RGH. Detection of lymph node metastases in head and neck cancer: a meta-analysis comparing US, USgFNAC, CT and MR imaging. *Eur J Radiol* 2007;64(2):266–272.
- [47] Delorme J, Debus S. *Sonographie*. 3. Auflage, 2012. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783131369536.
- [48] Demtröder W. *Experimentalphysik 1: Mechanik und Wärme*. 6. Auflage, 2012. Berlin, Springer. ISBN: 9783642254666.
- [49] Deutsch V, Platte M, Vogt M. *Ultraschallprüfung: Grundlagen und Industrielle Anwendungen*. 1997. Berlin, Springer. ISBN: 9783540620723.
- [50] Diaz-Arnold AM, Arnold MA, Wilcox LR. Optical detection of hemoglobin in pulpal blood. *J Endod* 1996;22(1):19–22.
- [51] Diaz-Arnold AM, Wilcox LR, Arnold MA. Optical detection of pulpal blood. *J Endod* 1994;20(4):164–168.
- [52] Dodson TB, Bays RA, Neuenschwander MC. Maxillary perfusion during Le Fort I osteotomy after ligation of the descending palatine artery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(1):51–55.
- [53] Dodson TB, Bays RA, Paul RE, Neuenschwander MC. The effect of local anesthesia with vasoconstrictor on gingival blood flow during Le Fort I osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54(7):810–814.

- [54] Dodson TB, Neuenschwander MC, Bays RA. Intraoperative assessment of maxillary perfusion during Le Fort I osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52(8):827–831.
- [55] Dwyer-Joyce RS, Goodman MA, Lewis R. A comparative study of ultrasonic direct contact, immersion, and layer resonance methods for assessment of enamel thickness in teeth. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology* 2010;224(6):519–528.
- [56] Dyson M, Pond JB, Woodward B, Broadbent J. The production of blood cell stasis and endothelial damage in the blood vessels of chick embryos treated with ultrasound in a stationary wave field. *Ultrasound Med Biol* 1974;1(2):133–148.
- [57] Ebenbichler G. Evidenzbasierte Medizin und Ultraschalltherapie des Skeletts. *Z Rheumatol* 2009;68(7):543–548.
- [58] Echlin P. *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 2009. New York, USA, Springer. ISBN: 9780387857312.
- [59] Eger T, Müller HP, Heinecke A. Ultrasonic determination of gingival thickness. *J Clin Periodontol* 1996;23(9):839–845.
- [60] Ehmer D. Ultrasonic cleaning of dental instruments. *Stomatol DDR* 1975;25(8):551–553.
- [61] El-Sharkawy YH, Badr Y, Gadallah M, Sherif El AF. Diagnostic of human teeth using photoacoustic response. *Proc of SPIE* 2006;6137:613701–613701–9.
- [62] El-Sharkawy YH, Sherif El AF. Human teeth model using photoacoustic frequency response. *SPIE BiOS* 2012;8221:82210J–1–82210J–9.
- [63] El-Sharkawy YH, Sherif El AF. Photoacoustic diagnosis of human teeth using interferometric detection scheme. *Opt Laser Technol* 2012;44(5):1501–1506.
- [64] Esser M, Tinschert J, Marx R. Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 1998;53(10):713–717.
- [65] Fang H, Maslov K, Wang L. Photoacoustic Doppler Effect from Flowing Small Light-Absorbing Particles. *Phys Rev Lett* 2007;99(18):184501.
- [66] Fang H, Maslov K, Wang LV. Photoacoustic Doppler flow measurement in optically scattering media. *Appl Phys Lett* 2007;91(26):264103.
- [67] Fischer W. *Digitale Fernsehtechnik in Theorie und Praxis*. 2009. Heidelberg, Springer. ISBN: 9783540881872.
- [68] Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppim-Rontani RM, Correr-Sobrinho L. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Archs Oral Biol* 2008;53(11):1023–1029.
- [69] Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Archs Oral Biol* 2004;49(11):919–922.
- [70] Freyer EB, Hubbard JC, Andrews DH. Sonic Studies of the Physical Properties of Liquids. I. the Sonic Interferometer. the Velocity of Sound in Some Organic Liquids and Their Compressibilities. *J Am Chem Soc* 1929;51(3):759–770.
- [71] Fried D, Glena RE, Featherstone JDB, Seka W. Nature of light scattering in dental enamel and dentin at visible and near-infrared wavelengths. *Appl Opt* 1995;34(7):1278–1285.

- [72] Fritsche O. Physik für Biologen und Mediziner. 2013. Berlin, Springer. ISBN: 9783642346651.
- [73] Garg N, Garg A. Textbook of Endodontics. 2013. JP Medical Ltd. ISBN: 9350909529.
- [74] Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. 3. Auflage, 2010. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783135937038.
- [75] Ghorayeb SR, Bertoncini CA, Hinders MK. Ultrasonography in dentistry. IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr 2008;55(6):1256–1266.
- [76] Giancoli DC. Physik. 3. Auflage, 2010. Pearson Education Deutschland GmbH. ISBN: 9783868940237.
- [77] Gleissner C, Kempfski O, Peylo S, Glatzel JH, Willershausen B. Local Gingival Blood Flow at Healthy and Inflamed Sites Measured by Laser Doppler Flowmetry. J Periodontol 2006;77(10):1762–1771.
- [78] Goho C. Pulse oximetry evaluation of vitality in primary and immature permanent teeth. Pediatr Dent 1999;21(2):125–127.
- [79] Gopikrishna V, Pradeep G, Venkateshbabu N. Assessment of pulp vitality: a review. Int J Paediatr Dent 2009;19(1):3–15.
- [80] Gordon P. An ultrasonic cleaner on trial. Dent Update 1973;1(2):125–126.
- [81] Graaff R, Dassel ACM, Koelink MH, de Mul FFM, Aarnoudse JG, Zijlstra WG. Optical properties of human dermis in vitro and in vivo. Appl Opt 1993;32(4):435–447.
- [82] Green GH, Sanderson AD. Ultrasonics and Periodontal Therapy--a Review of Clinical and Biologic Effects. J Periodontol 1965;36:232–238.
- [83] Gu X-Q, Li Y-M, Guo J, Zhang L-H, Li D, Gai X-D. Effect of low intensity pulsed ultrasound on repairing the periodontal bone of Beagle canines. Asian Pac J Trop Med 2014;7(4):325–328.
- [84] Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giardino R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. Clin Oral Implants Res 2003;14(2):226–232.
- [85] Haar Ter G, Wyard SJ. Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: A physical analysis. Ultrasound Med Biol 1978;4(2):111–123.
- [86] Haines DJ. Physical properties of human tooth enamel and enamel sheath material under load. J Biomech 1968;1:117–125.
- [87] Hall A, Girkin JM. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. J Dent Res 2004;83:C89–C94.
- [88] Halliwell M, Wells PNT. A tutorial on ultrasonic physics and imaging techniques. Proc IMechE 2009;224(2):127–142.
- [89] Harput S, Evans T, Bubb N, Freear S. Diagnostic ultrasound tooth imaging using fractional fourier transform. IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr 2011;58(10):2096–2106.
- [90] Hartmann A, Azérad J, Boucher Y. Environmental effects on laser Doppler pulpal blood-flow measurements in man. Archs Oral Biol 1996;41(4):333–339.

- [91] Hayashi T. Application of ultrasonography in dentistry. *Jpn Dent Sci Rev* 2012;48(1):5–13.
- [92] Haynes WM, Chemical Rubber Company. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94. Auflage, 2013. Boca Raton, FL, USA, CRC Press. ISBN: 9781466571143.
- [93] Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 6. Auflage, 2013. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH. ISBN: 9783769134483.
- [94] Hirmer M, Danilov SN, Giglberger S, Putzger J, Niklas A, Jaeger A, Hiller K-A, Löffler S, Schmalz G, Redlich B, Schulz I, Monkman G, Ganichev SD. Spectroscopic Study of Human Teeth and Blood from Visible to Terahertz Frequencies for Clinical Diagnosis of Dental Pulp Vitality. *J Infrared Milli Terahz Waves* 2012;33(3):366–375.
- [95] Hovav T, Yedgar S, Manny N, Barshtein G. Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage. *Transfusion* 1999;39(3):277–281.
- [96] Högman CF, Meryman HT. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfus Med Rev* 1999;13(4):275–296.
- [97] Hughes DA, Button TW, Cochran S, Elgoyhen J, Girkin JM, Hughes H, Longbottom C, Meggs C, Poland S. 5B-2 3D Imaging of Teeth Using High Frequency Ultrasound. 2007 IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings:327–330.
- [98] Hughes DA, Girkin JM, Poland S, Longbottom C, Button TW, Elgoyhen J, Hughes H, Meggs C, Cochran S. Investigation of dental samples using a 35MHz focussed ultrasound piezocomposite transducer. *Ultrasonics* 2009;49(2):212–218.
- [99] Hulbert SL. Interaction of InGa liquid alloy coolant with gold-coated optical materials. *Rev Sci Instrum* 1992;63(1):505–508.
- [100] Hunter WR, Williams RT. Grain boundary diffusion of liquid metal coolants in optical materials for use with high power synchrotron radiation. *Nucl Instr Meth Phys Res* 1984;222:359–363.
- [101] Huysmans M, Thijssen JM. Ultrasonic measurement of enamel thickness: a tool for monitoring dental erosion? *J Dent* 2000;28:187–191.
- [102] Iff M, Marinello CP. Ultraschallgeräte, Anwendung in der Parodontologie. Eine Literaturübersicht. *Acta Med Dent Helv* 1998;3:149–160.
- [103] Ikawa M, Horiuchi H, Ikawa K. Optical characteristics of human extracted teeth and the possible application of photoplethysmography to the human pulp. *Archs Oral Biol* 1994;39(10):821–827.
- [104] Ingólfsson ÆR, Tronstad L, Hersh EV, Riva CE. Efficacy of laser Doppler flowmetry in determining pulp vitality of human teeth. *Endod Dent Traumatol* 1994;10(2):83–87.
- [105] Jaeger A. *In vitro Untersuchungen an humanen Zähnen zur Ermittlung der Anwendbarkeit der Photoplethysmographie zur Detektion des Blutflusses in der Zahnpulpa unter Berücksichtigung des Blutflusses in der Gingiva*. Med. Diss.: Universität Regensburg; 2014.
- [106] Jafarzadeh H, Rosenberg PA. Pulse oximetry: review of a potential aid in endodontic diagnosis. *J Endod* 2009;35(3):329–333.
- [107] Jawad MM, Husein A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Overview of non-invasive factors (low level laser and low intensity pulsed ultrasound) accelerating tooth movement during orthodontic treatment. *Lasers Med Sci* 2014;29(1):367–372.



- [108] Jones R, Huynh G, Jones G, Fried D. Near-infrared transillumination at 1310-nm for the imaging of early dental decay. *Opt Express* 2003;11(18):2259–2265.
- [109] Jüde HD, Kühl W, Roßbach A. Einführung in die zahnärztliche Prothetik. 5. Auflage, 1997. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag. ISBN: 9783769110968.
- [110] Kamal A, Harness JB, Irving G, Mearns AJ. Skin photoplethysmography—a review. *Comput Meth Prog Bio* 1989;28:257–269.
- [111] Kaps M, Büdingen HJ. Ultraschall in der Neurologie. 2005. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783131367723.
- [112] Karayilmaz H, Kirzioğlu Z. Comparison of the reliability of laser Doppler flowmetry, pulse oximetry and electric pulp tester in assessing the pulp vitality of human teeth. *J Oral Rehabil* 2011;38(5):340–347.
- [113] Kempe M, Larionov M, Zaslavsky D, Genack AZ. Acousto-optic tomography with multiply scattered light. *J Opt Soc Am A* 1997;14(5):1151–1158.
- [114] Kim S. Microcirculation of the dental pulp in health and disease. *J Endod* 1985;11(11):465–471.
- [115] Klingebiel R. Entwicklung eines Modells zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf Blufussmessungen in vitro 2008. Med. Diss.: Universität Regensburg; 2008.
- [116] Klinker R, Pape H-C, Kurtz A. Physiologie. 6. Auflage, 2010. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 978137960065.
- [117] Knörzer S. In Vorbereitung. Med. Diss.: Universität Regensburg.
- [118] Knspik DA, Starkoski B, Pavlin CJ, Foster FS. A 100-200 MHz ultrasound biomicroscope. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2000;47(6):1540–1549.
- [119] Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, Blackstone EH. Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 2008;358(12):1229–1239.
- [120] Koçkapan C. Curriculum Endodontie. 2003. Berlin, Quintessenz Verlag. ISBN: 9783876522487.
- [121] Kossoff G, Sharpe CJ. Examination of the contents of the pulp cavity in teeth. *Ultrasonics* 1966;4:77–83.
- [122] Krechina EK, Rakhimova EN. Gingival tissue blood circulation in health and parodontal diseases as assessed by ultrasonic Dopplerography. *Stomatologija (Mosk)* 2005;84(5):24–27.
- [123] Kulmyrzaev A, McClements DJ. High frequency dynamic shear rheology of honey. *J Food Eng* 2000;45(4):219–224.
- [124] Kundu H, Basavaraj P, Kote S, Singla A, Singh S. Assessment of TMJ Disorders Using Ultrasonography as a Diagnostic Tool: A Review. *J Clin Diagn Res* 2013;7(12):3116–3120.
- [125] Labanca M, Azzola F, Vinci R, Rodella LF. Piezoelectric surgery: Twenty years of use. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46(4):265–269.
- [126] Laible M, Müller RK, Bill B, Gehrke K. Mechanische Größen, Elektrisch Gemessen. 7. Auflage, 2009. Renningen, expert verlag. ISBN: 9783816928928.

- [127] Laird WRE, Walmsley AD. Ultrasound in dentistry. Part 1—biophysical interactions. *J Dent* 1991;19(1):14–17.
- [128] Lees S. Specific acoustic impedance of enamel and dentine. *Archs Oral Biol* 1968;13(12):1491–1500.
- [129] Lees S, Barber FE. Looking into Teeth with Ultrasound. *Science* 1968;161(3840):477–478.
- [130] Lees S, Barber FE, Lobene RR. Dental enamel: detection of surface changes by ultrasound. *Science* 1970;169(3952):1314–1316.
- [131] Lehmann KM, Hellwig E, Wenz HJ. *Zahnärztliche Propädeutik*. 2009. Köln, Deutscher Ärzteverlag. ISBN: 9783769133707.
- [132] Leutz W, Maret G. Ultrasonic modulation of multiply scattered light. *Physica B* 1995;204(1-4):14–19.
- [133] Leveque S, Boccara AC, Lebec M, Saint-Jalmes H. Ultrasonic tagging of photon paths in scattering media: parallel speckle modulation processing. *Opt Lett* 1999;24(3):181–183.
- [134] Li J, Ku G, Wang LV. Ultrasound-Modulated Optical Tomography of Biological Tissue by Use of Contrast of Laser Speckles. *Appl Opt* 2002;41(28):6030–6035.
- [135] Li J, Wang L. Ultrasound-modulated laser speckle imaging of biological tissues. *Engineering in Medicine and Biology* 2002.
- [136] Li T, Dewhurst RJ. Photoacoustic imaging in both soft and hard biological tissue. *J Phys: Conf Ser* 2010;214(1):012028.
- [137] Li T, Dewhurst RJ. Photoacoustic Non-Destructive Evaluation and Imaging of Caries in Dental Samples. *AIP Conf Proc* 2010;1211:1574–1581.
- [138] Li Y, Hemmer P, Kim C, Zhang H, Wang LV. Detection of ultrasound-modulated diffuse photons using spectral-hole burning. *Opt Express* 2008;16(19):14862–14874.
- [139] Lindberg LG, Tamura T, Öberg PPÅ. Photoplethysmography. *Med Biol Eng Comput* 1991;29(1):40–47.
- [140] Louwerse C, Kjaeldgaard M, Huysmans MCDNJM. The reproducibility of ultrasonic enamel thickness measurements: an in vitro study. *J Dent* 2004;32(1):83–89.
- [141] Lynch JE, Hinders MK. Ultrasonic device for measuring periodontal attachment levels. *Rev Sci Instrum* 2002;73(7):2686–2693.
- [142] Maev RG, Denisova LA, Maeva EY, Denisov AA. New data on histology and physico-mechanical properties of human tooth tissue obtained with acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 2002;28(1):131–136.
- [143] Mahan GD, Engler WE, Tiemann JJ, Uzgiris E. Ultrasonic tagging of light: Theory. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(24):14015–14019.
- [144] Man J, Shelton RM, Cooper PR, Scheven BA. Low-intensity Low-frequency Ultrasound Promotes Proliferation and Differentiation of Odontoblast-like Cells. *J Endod* 2012;38(5):608–613.
- [145] Manfredini D, Guarda-Nardini L. Ultrasonography of the temporomandibular joint: a literature review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009;38(12):1229–1236.

- [146] Manly RS, Hodge HC, Ange LE. Density and Refractive Index Studies of Dental Hard Tissues II. Density Distribution Curves 1,2. J Dent Res 1939;18(3):203–211.
- [147] Marks FA, Tomlinson HW, Brooksby GW. Comprehensive approach to breast cancer detection using light: photon localization by ultrasound modulation and tissue characterization by spectral discrimination. Proc SPIE 1888, Photon Migration and Imaging in Random Media and Tissues 1993;500:500–510.
- [148] Marotti J, Heger S, Tinschert J, Tortamano P, Chuembou F, Radermacher K, Wolfart S. Recent advances of ultrasound imaging in dentistry – a review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2013;115(6):819–832.
- [149] Martin H, Cunningham W. Endosonic endodontics: the ultrasonic synergistic system. Int Dent J 1984;34(3):198–203.
- [150] Matalon S, Feuerstein O, Calderon S, Mittleman A, Kaffe I. Detection of cavitated carious lesions in approximal tooth surfaces by ultrasonic caries detector. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103(1):109–113.
- [151] Matalon S, Feuerstein O, Kaffe I. Diagnosis of approximal caries: bite-wing radiology versus the Ultrasound Caries Detector. An in vitro study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;95(5):626–631.
- [152] Matthews B, Andrew D. Microvascular architecture and exchange in teeth. Microcirculation 1995;2(4):305–313.
- [153] Matthews B, Vongsavan N. Advantages and limitations of laser Doppler flow meters. Int Endod J 1993;26(1):9–10.
- [154] McComb D. Gallium restorative materials. J Can Dent Assoc 1998;64(9):645–647.
- [155] Meyer-Lückel H, Ekstrand K, Paris S. Karies. 2012. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783131693211.
- [156] Millasseau SC, Guigui FG, Kelly RP, Prasad K. Noninvasive assessment of the digital volume pulse comparison with the peripheral pressure pulse. Hypertension 2000;36:952–956.
- [157] Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IRS, Bioeffects Committee of the American Institute of Ultrasound in Medicine. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. J Ultrasound Med 2012;31(4):623–634.
- [158] Mills RW. Pulse oximetry--a method of vitality testing for teeth? Br Dent J 1992;172(9):334–335.
- [159] Miwa Z, Ikawa M, Iijima H, Saito M, Takagi Y. Pulpal blood flow in vital and nonvital young permanent teeth measured by transmitted-light photoplethysmography: a pilot study. Pediatr Dent 2002;24(6):594–598.
- [160] Munshi AK, Hegde AM. Pulse oximetry: a diagnostic instrument in pulpal vitality testing. J Clin Pediatr Dent 2002;26:141–145.
- [161] Musaeva R, Barmasheva A, Orekhova L. Periodontal condition and microcirculation in patients with different number of metabolic syndrome components. J Clinical Periodontol 2012;39:115.
- [162] Müller-Eckhardt C, Kiefel V. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. 4. Auflage, 2010. Heidelberg, Springer. ISBN: 9783642127649.

- [163] Nair BG, Reddy A, Reddy G, Reddy NL, Pradesh A. A Review of Laser Doppler Flowmetry and Pulse Oximetry in Dental Pulp Vitality. *J Clin Diagn Res* 2011;5(4):903–905.
- [164] Näslund J, Pettersson J, Lundeberg T, Linnarsson D, Lindberg L-G. Non-invasive continuous estimation of blood flow changes in human patellar bone. *Med Biol Eng Comput* 2006;44(6):501–509.
- [165] Nezafati S, Javadrashid R, Rad S. Comparison of ultrasonography with submentovertex films and computed tomography scan in the diagnosis of zygomatic arch fractures. *Dentomaxillofac Radiol* 2010;39:11–16.
- [166] Ng SY, Payne PA, Cartledge NA, Ferguson M. Determination of ultrasonic velocity in human enamel and dentine. *Archs Oral Biol* 1989;34:341–345.
- [167] Niklas A. In Vitro Untersuchungen zur Photoplethysmographie an Zähnen und der Eignung von Terahertzstrahlung für die Entwicklung eines Gerätes zur Detektion des Blutflusses in der Zahnpulpa. *Med. Diss.: Universität Regensburg*; 2010.
- [168] Niklas A, Hiller K-A, Jaeger A, Brandt M, Putzger J, Ermer C, Schulz I, Monkman G, Giglberger S, Hirmer M, Danilov S, Ganichev S, Schmalz G. In vitro optical detection of simulated blood pulse in a human tooth pulp model. *Clin Oral Investig* 2013;;1–9.
- [169] Noblett WC, Wilcox LR, Scamman F, Johnson WT, Diaz-Arnold A. Detection of pulpal circulation in vitro by pulse oximetry. *J Endod* 1996;22(1):1–5.
- [170] Olgart L, Gazelius B, Lindh-Strömberg U. Laser Doppler flowmetry in assessing vitality in luxated permanent teeth. *Int Endod J* 1988;21(5):300–306.
- [171] Orekhova LY, Barmasheva AA. Doppler flowmetry as a tool of predictive, preventive and personalised dentistry. *EPMA J* 2013;4(1):21.
- [172] Ozcan G, Taner IL, Aras T, Ercan MT. Blood flow to human gingiva measured by the <sup>133</sup>Xe clearance technique. *J Nihon Univ Sch Dent* 1992;34(3):208–213.
- [173] Ozcan M, Mese A. Effect of ultrasonic versus manual cementation on the fracture strength of resin composite laminates. *Oper Dent* 2009;34(4):437–442.
- [174] Plank H. Infrarotspektroskopie von Zahnfüllmaterialien. *Bachelorarbeit Universität Regensburg*; 2012.
- [175] Polat S, Er K, Akpınar KE, Polat NT. The sources of laser Doppler blood-flow signals recorded from vital and root canal treated teeth. *Archs Oral Biol* 2004;49(1):53–57.
- [176] Polat S, Er K, Polat NT. Penetration depth of laser Doppler flowmetry beam in teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(1):125–129.
- [177] Polat S, Er K, Polat NT. The lamp effect of laser Doppler flowmetry on teeth. *J Oral Rehabil* 2005;32(11):844–848.
- [178] Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent* 2006;34(10):727–739.
- [179] Psarras V, Wennberg A, Dérand T. Cytotoxicity of corroded gallium and dental amalgam alloys: An in vitro study. *Acta Odontol Scand* 2009;50(1):31–36.
- [180] Racheli N, Ron A, Metzger Y, Breskin I, Enden G, Balberg M, Shechter R. Non-invasive blood flow measurements using ultrasound modulated diffused light. *SPIE BiOS* 2012;8223:82232A–1–82232A–8.

- [181] Rajendran N, Sundaresan B. Efficacy of Ultrasound and Color Power Doppler as a Monitoring Tool in the Healing of Endodontic Periapical Lesions. *J Endod* 2007;33(2):181–186.
- [182] Reich FR, Porter NS. Ultrasonic imaging of teeth. Report of Battelle Memorial Institute, Pacific Northwest Laboratory, Richland, WA, USA (privately issued 1967). Comment in: *Arch Oral Biol* 1969;14:745–760.
- [183] Roebuck EM, Evans DJP, Stirrups D, Strang R. The effect of wavelength, bandwidth, and probe design and position on assessing the vitality of anterior teeth with laser Doppler flowmetry. *Int J Paediatr Dent* 2000;10(3):213–220.
- [184] Roggan A, Friebel M, Dörschel K, Hahn A, Iler GM. Optical Properties of Circulating Human Blood in the Wavelength Range 400–2500 nm. *J Biomed Opt* 1999;4(1):36–46.
- [185] Ron A, Racheli N, Breskin I, Metzger Y, Silman Z, Kamar M, Nini A, Shechter R, Balberg M. Measuring tissue blood flow using ultrasound modulated diffused light. *SPIE BiOS* 2012;8223:82232J–1–82232J–7.
- [186] Roy E, Alliot-Licht B, Dajean-Trutaud S, Fraysse C, Jean A, Armengol V. Evaluation of the ability of laser Doppler flowmetry for the assessment of pulp vitality in general dental practice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(4):615–620.
- [187] Roy RA, Ahmad M, Crum LA. Physical mechanisms governing the hydrodynamic response of an oscillating ultrasonic file. *Int Endod J* 1994;27(4):197–207.
- [188] Salmon B, Le Denmat D. Intraoral ultrasonography: development of a specific high-frequency probe and clinical pilot study. *Clin Oral Investig* 2012;16(2):643–649.
- [189] Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res* 1994;73(6):1205–1211.
- [190] Santos Dos S, Prevorsevsky Z. Imaging of human tooth using ultrasound based chirp-coded nonlinear time reversal acoustics. *Ultrasonics* 2011;51(6):667–674.
- [191] Santos SD, Farova Z, Kus V, Prevorsevsky Z. Echodentography based on nonlinear time reversal tomography: Ultrasonic nonlinear signature identification. *AIP Conf Proc* 2012;1433:203–206.
- [192] Schatten H. *Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences*. Schatten H, editor 2013. Cambridge, UK, Cambridge University Press. ISBN: 9780521195997.
- [193] Schlee M, Steigmann M, Bratu E, Garg AK. *Piezosurgery: Basics and Possibilities*. *Implant Dent* 2006;15(4):334–340.
- [194] Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dental Materials*. 2008. Heidelberg, Springer. ISBN: 9783540777816.
- [195] Schmalz G, Hiller K-A, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001;27(1):23–30.
- [196] Schmidt GBD. *Kursbuch Ultraschall*. 2008. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783131191052.
- [197] Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen*. 31. Auflage, Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors 2010. Heidelberg, Springer. ISBN: 9783642016509.

- [198] Schnettler JM, Wallace JA. Pulse oximetry as a diagnostic tool of pulpal vitality. *J Endod* 1991;17(10):488–490.
- [199] Schortinghuis J, Stegenga B, Raghoobar GM, de Bont LGM. Ultrasound Stimulation of Maxillofacial Bone Healing. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):63–74.
- [200] Schulz I, Putzger J, Niklas A, Brandt M, Jäger A, Hardt A, Knörzer S, Hiller K-A, Löffler S, Schmalz G, Danilov S, Giglberger S, Hirmer M, Ganichev SD, Monkman G. PPG signal acquisition and analysis on in vitro tooth model for dental pulp vitality assessment. *ARC Submission* 16 2012;;:142–146.
- [201] Schytz HW, Guo S, Jensen LT, Kamar M, Nini A, Gress DR, Ashina M. A New Technology for Detecting Cerebral Blood Flow: A Comparative Study of Ultrasound Tagged NIRS and <sup>133</sup>Xe-SPECT. *Neurocrit Care* 2012;17(1):139–145.
- [202] Sherif El AF, El-Sharkawy YH. Laser-induced photothermal technique used for detection of caries in human tooth. *BiOS* 2008;6843:68430B–1–68430B–9.
- [203] Shillingburg HT Jr, Grace CS. Thickness of enamel and dentin. *J South Calif Dent Assoc* 1973;41(1):33–38.
- [204] Shintani S, Nakayama B, Matsuura H. Intraoral ultrasonography is useful to evaluate tumor thickness in tongue carcinoma. *Am J Surg* 1997;173:345–347.
- [205] Singh RS, Culjat MO, Cho JC, Neurgaonkar RR, Yoon DC, Grundfest WS, Brown ER, White SN. Penetration of radiopaque dental restorative materials using a novel ultrasound imaging system. *Am J Dent* 2007;20(4):221–226.
- [206] Singh RS, Culjat MO, Grundfest WS, Brown ER, White SN. Tissue mimicking materials for dental ultrasound. *J Acoust Soc Am* 2008;123(4):EL39–44.
- [207] Soo-ampon S, Vongsavan N, Soo-ampon M, Chuckpaiwong S, Matthews B. The sources of laser Doppler blood-flow signals recorded from human teeth. *Archs Oral Biol* 2003;48(5):353–360.
- [208] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology* 2001;40:1331–1336.
- [209] Spitzer D, Bosch JJ. The total luminescence of bovine and human dental enamel. *Calc Tis Res* 1976;(2):201–208.
- [210] Spitzer D, Bosch Ten JJ. The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel. *Calc Tis Res* 1975;17(2):129–137.
- [211] Splinter R, Hooper BA. An introduction to biomedical optics. 2007. Boca Raton, FL, USA, CRC Press. ISBN: 9780750309387.
- [212] Steiniger B, Schwarzbach H, Stachniss V. *Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts*. 2010. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783131471413.
- [213] Stoianovici C, Wilder-Smith P, Choi B. Assessment of pulpal vitality using laser speckle imaging. *Lasers Surg Med* 2011;43(8):833–837.
- [214] Strawn SE, White JM, Marshall GW, Gee L, Goodis HE, Marshall SJ. Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions — short term. *J Dent* 1996;24(6):417–423.



- [215] Sun X, Witzel EA, Bian H, Kang S. 3-D finite element simulation for ultrasonic propagation in tooth. *J Dent* 2008;36(7):546–553.
- [216] Ślak B, Ambroziak A, Strumban E, Maev RG. Enamel thickness measurement with a high frequency ultrasonic transducer-based hand-held probe for potential application in the dental veneer placing procedure. *Acta Bioeng Biomech* 2011;13(1):65–70.
- [217] Tagtekin DA, Ozyoney G, Baseren M, Ando M, Hayran O, Alpar R, Gokalp S, Yanikoglu FC, Stookey GK. Caries detection with DIAGNOdent and ultrasound. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(5):729–735.
- [218] Tanaka JLO, Medici Filho E, Salgado JAP, Salgado MAC, Moraes LC de, Moraes MEL de, Castilho JC de M. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz Oral Res* 2008;22(4):346–351.
- [219] Toda S, Fujita T, Arakawa H, Toda K. An ultrasonic nondestructive technique for evaluating layer thickness in human teeth. *Sens Actuators A* 2005;125(1):1–9.
- [220] Totah VP. Increase in Hardness of Dentin On Drying. *J Dent Res* 1942;21(1):99–101.
- [221] Tønder KJ. Blood flow and vascular pressure in the dental pulp. Summary. *Acta Odontol Scand* 1980;38(3):135–144.
- [222] van der Sluis LWM, Cristescu RC. Ultraschall in der Endodontie. *Quintessenz* 2009;60(11):1281–1292.
- [223] van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40(6):415–426.
- [224] Vieira APGF, Hancock R, Dumitriu M, Limeback H, Grynpas MD. Fluoride's effect on human dentin ultrasound velocity (elastic modulus) and tubule size. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):83–88.
- [225] Vieira AS, Santos Dos MP, Antunes LA, Primo LG. Preparation time and sealing effect of cavities prepared by an ultrasonic device and a high-speed diamond rotary cutting system. *J Oral Sci* 2007;49:207–211.
- [226] Walmsley AD. Applications of ultrasound in dentistry. *Ultrasound Med Biol* 1988;14(1):7–14.
- [227] Wang H-C, Fleming S, Lee Y-C, Law S, Swain M, Xue J. Laser ultrasonic surface wave dispersion technique for non-destructive evaluation of human dental enamel. *Opt Express* 2009;17(18):15592–15607.
- [228] Wang L. Mechanisms of Ultrasonic Modulation of Multiply Scattered Coherent Light: An Analytic Model. *Phys Rev Lett* 2001;87(4):043903.
- [229] Wang L, Jacques SL, Zhao X. Continuous-wave ultrasonic modulation of scattered laser light to image objects in turbid media. *Opt Lett* 1995;20(6):629–631.
- [230] Wang L, Xia J, Yao J, Maslov KI, Wang LV. Ultrasonically Encoded Photoacoustic Flowgraphy in Biological Tissue. *Phys Rev Lett* 2013;111(20):204301.
- [231] Wang LV. Mechanisms of Ultrasonic Modulation of Multiply Scattered Coherent Light: a Monte Carlo Model. *Opt Lett* 2001;26(15):1191–1193.
- [232] Wang LV. Ultrasound-Mediated Biophotonic Imaging: A Review of Acousto-Optical Tomography and Photo-Acoustic Tomography. *Dis Markers* 2004;19(2-3):123–138.

- [233] Wang LV, Wu H-I. Biomedical Optics. 2012. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons. ISBN: 9780471743040.
- [234] Wang LV, Zhao X, Jacques SL. Ultrasound-modulated optical tomography for dense turbid media. *Appl Opt* 1996;36(28):7277–7282.
- [235] Werner M. Nachrichten-Übertragungstechnik: Analoge und digitale Verfahren mit modernen Anwendungen. 2006. Wiesbaden, Vieweg & Sohn Verlag. ISBN: 9783528041267.
- [236] William N Sharpe J, Sharpe WN. Springer Handbook of Experimental Solid Mechanics. 2008. New York, Springer. ISBN: 9780387268835.
- [237] Williams AR, Miller DL, Gross DR. Haemolysis in vivo by therapeutic intensities of ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1986;12(6):501–509.
- [238] Yao J, Maslov KI, Shi Y, Taber LA, Wang LV. In vivo photoacoustic imaging of transverse blood flow by using Doppler broadening of bandwidth. *Opt Lett* 2010;35(9):1419–1421.
- [239] Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 2011;53(3):273–282.
- [240] Yip HK, Samaranayake LP. Caries removal techniques and instrumentation: a review. *Clin Oral Investig* 1998;2(4):148–154.
- [241] Yoon M-J, Kim E, Lee S-J, Bae Y-M, Kim S, Park S-H. Pulpal Blood Flow Measurement with Ultrasound Doppler Imaging. *J Endod* 2010;36(3):419–422.
- [242] Yoon MJ, Lee SJ, Kim E, Park SH. Doppler ultrasound to detect pulpal blood flow changes during local anaesthesia. *Int Endod J* 2012;45(1):83–87.
- [243] Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J* 2007;52(1 Suppl):S4–16.
- [244] Zach L, Cohen G. Pulp Response to Externally Applied Heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1965;19:515–530.
- [245] Zijp JR, Bosch Ten JJ. Angular dependence of HeNe-laser light scattering by bovine and human dentine. *Archs Oral Biol* 1991;36(4):283–289.
- [246] 3M ESPE - Rocatec Verbundsystem. 2014 Mar. 7.  
[http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UF6EVsSyXTtI8TcNxTaEVtQEVs6EVs6EVs6E666666--&fn=rocatoc\\_tp\\_de.pdf](http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UF6EVsSyXTtI8TcNxTaEVtQEVs6EVs6EVs6E666666--&fn=rocatoc_tp_de.pdf).
- [247] About Lock-In Amplifiers. 2014 Feb. 24.  
<http://www.thinksrs.com/downloads/PDFs/ApplicationNotes/AboutLIAs.pdf>.
- [248] Acoustic Properties of Gases. 2014 Mar. 21.  
<http://www.ondacorp.com/images/Gases.pdf>.
- [249] Acoustic Properties of Liquids. 2014 Mar. 21.  
<http://www.ondacorp.com/images/Liquids.pdf>.
- [250] Acoustic Properties of Solids. 2014 Feb. 24. <http://www.ondacorp.com/images/Solids.pdf>.
- [251] Buehler - MicroPolish II - Material Safety Data Sheet. 2014 Mar. 10.  
[http://www.buehler.com/sites/default/files/resources/9114304\\_1.pdf](http://www.buehler.com/sites/default/files/resources/9114304_1.pdf).

- [252] Caesar & Loretz - Ultraschall Kontaktgel. 2014 Feb. 27.  
[http://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb\\_en&cntry=en&num=7873](http://www.caelo.de/getfile.html?type=sdb_en&cntry=en&num=7873).
- [253] DIN EN 60825-1:2008-05. Sicherheit von Lasereinrichtungen - Teil 1: Klassifizierung von Anlagen und Anforderungen (IEC 60825-1:2007). Berlin, Beuth Verlag.
- [254] GABA - elmex Zahnpasta. 2014 Feb. 26. [http://www.gaba-dent.de/htm/575/de\\_DE/Produkte.pdf?Brand=elmex&Subnav=&Product=17896](http://www.gaba-dent.de/htm/575/de_DE/Produkte.pdf?Brand=elmex&Subnav=&Product=17896).
- [255] Harnisch+Rieth - EG-Sicherheitsdatenblatt Edelkorund. 2014 Mar. 10. [http://www.hr-dental.de/service/Edelkorund\\_150202.pdf](http://www.hr-dental.de/service/Edelkorund_150202.pdf).
- [256] Harnisch+Rieth - EG-Sicherheitsdatenblatt Glanzstrahlmittel. 2014 Mar. 10.  
[http://www.hr-dental.de/service/Glanzstrahlmittel\\_180202.pdf](http://www.hr-dental.de/service/Glanzstrahlmittel_180202.pdf).
- [257] Ivoclar Vivadent AG - Liquid Strip. 2014 Mar. 5. <http://www.ivoclarvivadent.de/zoolu-website/media/document/9831/Liquid+Strip>.
- [258] jurvetson - Laser Speckle\_1024x.jpg. 2014 Mar. 30.  
[www.flickr.com/photos/jurvetson/42066452/sizes/l/](http://www.flickr.com/photos/jurvetson/42066452/sizes/l/).
- [259] Ornim Medical - c-FLOW™. 2014 Feb. 23. <http://www.ornim.com/wp-content/uploads/2013/09/Ornim-C-FLOW-brochure-.pdf>.
- [260] Schall- und Ultraschallscaler in der Parodontitistherapie. 2014 Mar. 11.  
[http://www.dgzmk.de/uploads/tx\\_szdgzmkdocuments/Schall-\\_und\\_Ultraschallscaler\\_in\\_der\\_Parodontitistherapie.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Schall-_und_Ultraschallscaler_in_der_Parodontitistherapie.pdf).
- [261] Schott - DentalGlass Reactive (Ionomer). 2014 Mar. 10.  
<http://www.schott.com/epackaging/german/download/schott-dental-glass-ionomer-grainsizes-datasheet-eng-2013-02.pdf>.
- [262] Sigma-Aldrich - Glycerin - Material Safety Data Sheet. 2014 Apr. 3.  
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=G7893&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2Fg7893%3Flang%3Dde>.
- [263] Sonotech - Soundsafe - Material Safety Data Sheet. 2014 Mar. 5.  
<http://www.magnaflux.com/NewsDownloads/tabid/396/Default.aspx?EntryId=12455>.
- [264] Sonotech Soundsafe - Product Data Sheet. 2014 Mar. 5.  
<http://www.magnaflux.com/NewsDownloads/tabid/396/Default.aspx?EntryId=13068>.
- [265] Ultraschallanwendung am Menschen - Empfehlung der Strahlenschutzkommission. 2014 Mar. 11.  
[http://www.ssk.de/SharedDocs/Beratungsergebnisse\\_PDF/2012/Ultraschall.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.ssk.de/SharedDocs/Beratungsergebnisse_PDF/2012/Ultraschall.pdf?__blob=publicationFile).