



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Olinjärt ultraljud för undersökning av sprickor i skelettet hos häst, en pilotstudie

Katarina Sandelin

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:11*

Olinjärt ultraljud för undersökning av sprickor i skelettet hos häst, en pilotstudie.

Nonlinear ultrasound for investigation of cracks in the equine skeleton, a pilot study

Katarina Sandelin

Handledare: Kerstin Hansson, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Charles Ley, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Marie Rhodin, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:11

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: skelettskada, NAW, sidband, mikrosprickor, fraktur, fissur

Key words: micro cracks, fracture, fissure, side band

Stort tack till pappa, som kom med idén att olinjärt ultraljud kan väl användas till hästben likaväl som i kärnkraftverken.

Tack till mina fantastiska handledare, Kerstin och Charles, som verkligen delat med sig av sin erfarenhet och visat stort engagemang.

Tack Kristian Haller och Acoustic Agree AB. Utan dig hade det inte blivit några experiment och ingen uppsats.

SAMMANFATTNING

Fissurer och odislocerade frakturer hos häst kan ibland vara svåra att upptäcka utan avancerad bilddiagnostik. Det är dock viktigt att diagnostisera dem i tid för att hindra att skadorna förvärras. Röntgen, datortomografi, magnetresonanstomografi och scintigrafi kan ge bra information men metoderna är relativt dyra, inte alltid tillgängliga, innebär en del säkerhetsrisker och kräver erfarna tolkare. Ultraljud är en mobil metod som anses ofarlig men dagens teknik är inte så användbar för att undersöka skelett.

Inom industrin har nya ultraljudsmetoder utvecklats som tar hänsyn till olinjära egenskaper hos ljudvågorna. Dessa metoder kan användas för att detektera mycket små sprickor i diverse material och objekt. Metoderna utnyttjar att ultraljudsvågor distorderas (ändrar form) då de träffar på olinjäriteter i materialet som undersöks. Distortionen innebär att nya frekvenser bildas, övertoner och sidband, vars egenskaper kan användas för att beskriva materialets strukturkvalitet. Biologiska material har en inneboende olinjäritet p.g.a. sin atomstruktur, men defekter i form av sprickor ger ett ännu högre olinjärt respons hos ultraljudet.

I denna studie har en olinjär ultraljudsmetod kallad NAW (Nonlinear Acoustic Wavemodulation) använts för att undersöka åtta kotben från häst före och efter traumatisering av benen samt med och utan mjukdelar. Resultatet fås i form av ett skadevärde efter beräkningar på egenskaper hos sidband som bildas då ultraljudsvågorna interagerar i områden med sprickor. Metoden och beräkningarna är utvecklade av Acoustic Agree AB i Ronneby, Sverige.

Resultatet visar att NAW kan detektera sprickor i kotben från häst. Mjukdelarna dämpar signalen men utifrån denna studie går det ej att dra några slutsatser om hur mjukdelarnas tillstånd påverkar skadevärdet. Metoden har potential att göra nytta i veterinärmedicinen men för att nå dit krävs mycket mer forskning, bl.a. om hur skador i mjukdelar påverkar mätningen samt hur mycket mikrosprickor som finns i ett friskt hästben. Utrustningen behöver också anpassas till häst och användning i fält.

SUMMARY

Diagnosis of fissures and non-displaced fractures in horses may require advanced medical diagnostic imaging at a veterinary hospital. An early diagnosis is however important in preventing progression of a fissure or fracture injury. Radiography, computed tomography, magnetic resonance imaging, and scintigraphy are good diagnostic methods for fissures and non-displaced fractures, but these methods are relatively costly, may have limited availability, are usually not mobile, involve safety risks and require training and experience to accurately interpret the resulting images. Ultrasound is a mobile method which is considered harmless, but today's technology is not very useful for the examination of bone for fissures or non-displaced fractures.

New ultrasound methods have been developed, using nonlinear properties of sound waves. These methods are used in industry for detection of very small cracks in various materials and objects. The methods utilise the distortion of sound waves as they meet nonlinearities in the

material examined. This distortion creates new frequencies, harmonics and sidebands, and the properties of these may be used in describing structural qualities of the material. Biological materials have an inherent nonlinearity due to their atomic structures, but defects such as cracks give an even greater nonlinear response from the ultrasound.

This study utilised a nonlinear ultrasound method called Nonlinear Acoustic Wave modulation (NAW) for examination of eight equine proximal phalanges before and after the induction of fissures/non-displaced fractures. The bones were examined with NAW with and without soft tissue. Results are given as damage values after calculation of sidebands resulting from sound wave interactions in cracked areas. The method and calculations have been developed by Acoustic Agree AB in Ronneby, Sweden.

The result shows that NAW may detect fissures/non-displaced fractures in equine proximal phalanges. Soft tissue dampens the signal, but this study did not investigate details of how the physical state of the tissue affects the damage value. The NAW method has potential for use in fissure and fracture diagnosis but more research is needed. Further studies should investigate the effects of damaged soft tissue on NAW values, and the normal level of micro-cracks that occur in equine bones in horses without lameness. Additionally, the ultrasound equipment needs to be customized for equine and field use.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
BENSTRUKTUR	2
REGENERATION OCH REMODELLERING	4
FRAKTURER HOS HÄST	4
BILDDIAGNOSTISKA METODER VID DIAGNOSTIK AV FRAKTURER/FISSURER HOS HÄST	5
OLINJÄRT ULTRALJUD	10
MATERIAL OCH METODER	19
FÖRSÖKSUPPLÄGG	19
KOTBEN FRÅN HÄST	19
OLINJÄRT ULTRALJUD - "NONLINEAR ACOUSTIC WAVEMODULATION, NAW"	22
RESULTAT	26
SKADEVÄRDEN	26
TEMPERATURMÄTNING	31
DISKUSSION	32
DATORTOMOGRAFI	32
DETEKTION AV SPRICKOR	33
MJUKDELARNAS PÅVERKAN PÅ RESULTATET	34
METOD	34
MATERIAL	35
SÄKERHET	35
KONKLUSION	36
REFERENSER	36

INLEDNING

Frakturer hos häst är inte alltid stora och dramatiska, det handlar också om fissurer, icke dislocerade frakturer och om stressfrakturer i mm-storlek. De senare kan dock utvecklas till kompletta frakturer om de ej diagnostiseras i tid och hanteras varsamt, något som kan få förödande konsekvenser för hästen. Ofta behövs en bilddiagnostisk metod för att utreda om en fissur/fraktur är orsaken till hälta.

Idag används röntgen, datortomografi (DT), magnetresonanstomografi (MRT), scintigrafi och ultraljud för att diagnostisera fissurer/frakturer inom veterinärmedicinen. Alla dessa metoder har sina fördelar men även nackdelar. Röntgenbilder har problem med summationseffekter och att de måste tas i rätt vinklar för att upptäcka en fissur/fraktur. DT ger mycket bra upplösning för benpatologier men kräver vanligen allmän anestesi och kan ej användas i fält. MRT ger också bra bilder och kan numera göras även stående under sedering men är inte heller det en mobil metod. Scintigrafi har hög känslighet för förändrad benmetabolism men dålig spatiell upplösning och kan inte användas i fält. Alla metoderna kräver dessutom en erfaren tolkare av undersökningen. Ultraljud är mobilt, snabbt och ofarligt men dagens ultraljudsmetoder kan inte lokalisera fissurer som ej går ut genom kortex, endast de som syns på ytan av ett ben hittas. Det kan även vara svårt att nå djupt liggande strukturer med diagnostiskt ultraljud.

Inom industrin används något som kallas olinjärt ultraljud för att leta materialdefekter som t.ex. sprickor (Jhang, 2009). Storlek eller form hos objektet spelar ingen roll och flera olika material har provats (Broda *et al.*, 2014). Försök har gjorts på preparat av bovint och humant ben där man undersökt om olinjärt ultraljud kan användas för att hitta mikrosprickor (Hauptert *et al.*, 2014, Zacharias *et al.*, 2009, Muller *et al.*, 2005 och 2008). Målet för dessa studier var att bidra till forskningen om osteoporos samt undersöka möjligheten att uppskatta frakturrisken hos olika individer. Forskarna anser att metoderna är lovande och bör undersökas vidare för att kunna användas *in vivo* (Zacharias *et al.*, 2009, Muller *et al.*, 2008).

Metoder med olinjärt ultraljud bygger på att ljudvågorna ändrar form samt att nya frekvenser genereras när de stöter på olinjäriteter i material (Björnö, 2010). Det kan vara inneboende olinjäriteter i materialets atomstruktur eller olinjäriteter från defekter som t.ex. sprickor (Guyer *et al.*, 1999). Skadade material uppvisar en mycket hög olinjäritet vilket gör att dessa metoder förutspås ha hög känslighet för att detektera även väldigt små sprickor (Jhang, 2009, Guyer *et al.*, 1999). Detta har också visats experimentellt av t.ex. Muller med kollegor (2008).

Ett möjligt framtida användningsområde inom veterinärmedicinen och djurslaget häst vore att i fält snabbt kunna diagnostisera om det finns en skelettskada, vilket påverkar fortsatt utredning och behandling. En annan framtidsvision är att i tid kunna upptäcka även mindre belastningsskador på skelettben hos t.ex. galoppörer. Detta skulle kunna möjliggöra att man minskar eller lägger om träningen för att undvika stressfrakturer.

Examensarbetet består av en litteraturöversikt och en experimentell del. Den experimentella delen är en pilotstudie där kotben från häst undersöktes med och utan mjukdelar, före samt

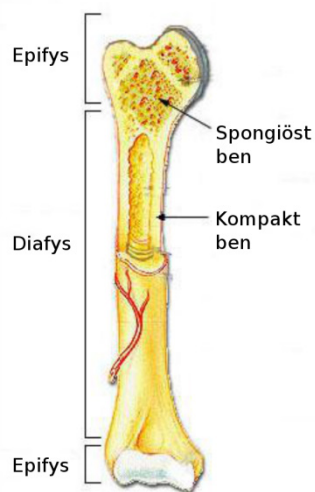
efter traumatisering av benet med målet att skapa en eller flera sprickor. Den olinjära ultraljudsmetoden som användes kallas Nonlinear Acoustic Wavemodulation (NAW) och är utvecklad av Acoustic Agree AB i Ronneby. Försöken utfördes hos Acoustic Agree AB med deras utrustning och beräkningsalgoritmer. Författaren har inte för avsikt att i detalj beskriva fysiken bakom metoden, ej heller beskriva eller härleda de matematiska beräkningar som ger resultatet i form av ett skadevärde för det undersökta preparatet.

Syftet med studien är att undersöka metoden *in vitro* för att få en uppfattning om det är möjligt att använda den *in vivo*. Hypoteser som prövades var om olinjärt ultraljud kan detektera sprickor i kotben hos häst samt om resultatet påverkas om benen undersöks med eller utan omgivande mjukdelar.

LITTERATURÖVERSIKT

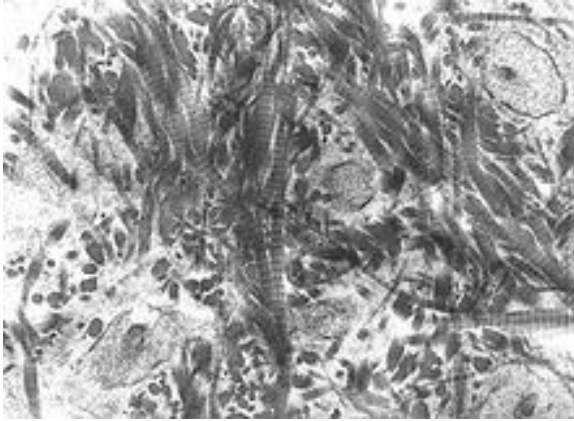
Benstruktur

Skelettben är uppbyggt av yttre kompakt (kortikalt) ben och inre spongiöst (trabekulärt) ben (Sjaastad *et al.*, 2003). Båda typerna består av tre celltyper: osteoblaster, osteocyter och osteoklaster. Benmatrix innehåller framför allt kollagen typ 1 och kalcium-hydroxyapatit. De långa rörbenens diafys består av ett yttre, tjockare lager kompakt ben och ett inre, mycket tunt lager spongiöst ben som omger en märghåla. Epifyserna består av spongiöst ben täckta av ett tunt lager kompakt ben (Figur1).



Figur1. *Spongiöst och kompakt ben i ett långt rörben.*

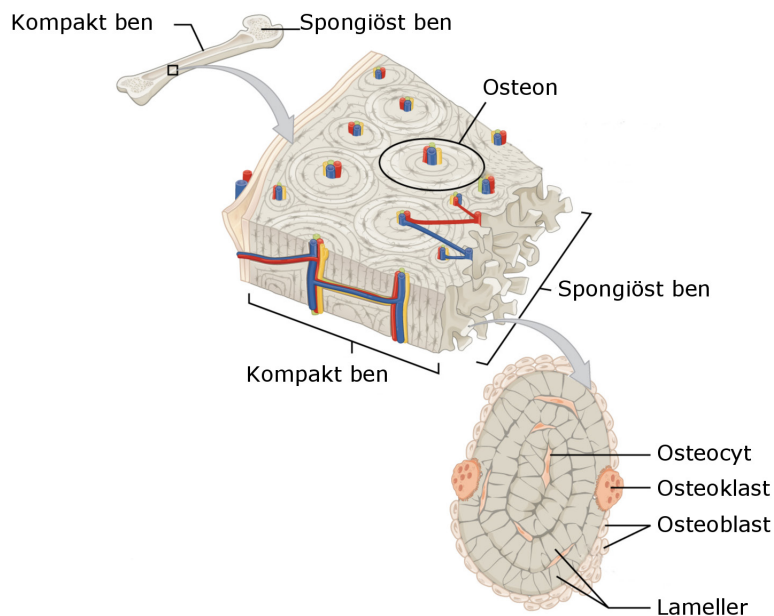
I fosterutvecklingen bildas först primärt ben som karakteriseras av grova kollagenfibrer i oordning (Figur 2) (Junqueira & José, 2003). Detta ersätts efter hand av sekundärt ben där finare kollagenfibrer ligger i en strukturerad ordning.



Figur 2. Primärt ben med oordnade kollagenfibrer.

Även vid en frakturläkning ses först primärt ben då detta bildas mycket snabbare än det sekundära som kommer senare i läkningsprocessen.

Mikrostrukturen i sekundärt ben visas i Figur 3. I kompakt ben är de kollagena fibrerna ordnade i osteon i benets längsaxel samt inre-, yttre- och interstitiella lameller. Mellan lamellerna ligger enstaka celler och i mitten av osteonen går kanaler för kärl och nerver. Det finns även kärlkanaler mellan de olika osteonen. Spongiöst ben består av ett nätverk av 0,2-2 mm tjocka bentrabekler som bildar kaviteter som innehåller gul eller röd benmärg.

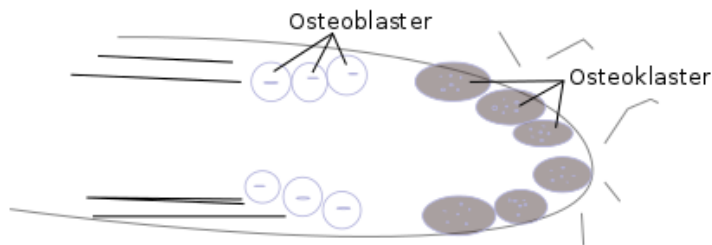


Figur 3. Mikrostrukturen i kompakt och spongiöst ben (nederst). (modifierad efter Rice University 2009-2014)

Strukturen varierar mellan olika skelettben och även inom ett och samma ben beroende på hur benet belastas och hur mycket remodelering som sker. Det finns även artskillnader i mikrostrukturen hos ben (Zedda *et al.*, 2008, Martiniaková *et al.*, 2006). T.ex. skiljer sig häst från ko, råtta, gris, människa och kanin. Skillnaderna består t.ex. av storlek och form på osteon samt andel primärt och sekundärt ben.

Regeneration och remodellering

Ben är en av de vävnader som kan regenerera sig, d.v.s. nybildas. Det pågår en ständig förnyelse med osteoklaster som resorberar och osteoblaster som bildar nytt ben, en process som kallas remodellering (Sjaastad *et al.*, 2003). Osteoklaster och osteoblaster bildar tillsammans en "basic multicellular unit", BMU (Taylor *et al.*, 2007). Osteoklasterna i fören på en BMU lämnar en resorptionskavitet bakom sig som efterhand fylls med nytt ben längs kanterna av osteoblasterna (Figur 4). En BMU rör sig framåt i humant ben med ca 40 µm/dag. Hos en färdigvuxen människa är den totala benomsättningshastigheten ett par procent per år. Mekanisk belastning orsakar mikrosprickor i ben vilket stimulerar BMU till bennybildning och därmed reparation (Burr *et al.*, 1985). Mikrosprickorna är i storleksordningen 20-100 µm i spongiöst ben och 500-1000 µm i kortikalt ben (Donahue & Galley, 2006). Osteoklasterna rör sig något snabbare än osteoblasterna vilket ger en tillfällig försvagning av benet i tiden mellan resorption och nysyntes (Ross & Dyson, 2011).



Figur 4. Osteoklaster resorberar ben, i detta fall ben innehållande mikrosprickor. Detta skapar en resorptionskavitet som fylls med nytt ben (streck i bilden) av osteoblaster. (Med tillstånd. Modifierad efter Taylor *et al.*, 2007)

Remodelleringsprocessen gör att ben kan anpassa sin mikrostruktur efter aktuell belastning (Sjaastad *et al.*, 2003).

Frakturer hos häst

Frakturer hos häst uppstår många gånger p.g.a. trauma som fall eller sparkar. Situationen kan vara mycket dramatisk för både ägare och häst. Om ett ben har fel vinkel eller benpipor sticker ut ur ett sår är det uppenbart att det handlar om en fraktur. En fissur, spricka som går från ytan in i men inte genom benet, kan däremot vara svårare att diagnostisera och behöver inte ge mer symptom än en hälta där hästen fortfarande stödjer på benet. Fissurer är relativt vanligt och beror ofta på sparkar från andra hästar (Schwarz & Saunders, 2011). Många fissurer är längsgående och vanliga lokaliseringar är i falangerna, särskilt den proximala ledytan på kotbenet. Det är också vanligt i distala kondylerna på metakarpal- /metatarsalben III.

Stress- eller utmattningsfrakturer är frakturer som inte är relaterade till något enstaka trauma utan beror på upprepad hög belastning (Ross & Dyson, 2011). Belastningen orsakar mikrosprickor som ej hinner repareras utan propagerar och går ihop till makrosprickor, stressfrakturer. Detta är en vanlig orsak till hälta hos hästar som tävlar i galopp eller trav och bör finnas med som differentialdiagnos hos en halt tävlingshäst. Stressfrakturer hittas ofta på specifika lokaliseringar, exempelvis dorsalsidan av metakarpal-/metatarsalben III, troligen är detta platser med maximal belastning.

Majoriteten av stressfrakturer ses hos hästar som nyligen gått ett hårt träningspass eller tävlingslopp (Ross & Dyson, 2011). Karakteristiskt är att den akuta hältn blir bättre av vila. Hältn kan senare gradvis försämrans, bli intermitterent eller subklinisk men leda till en längre tids nedsatt prestationsförmåga.

Stressrelaterad benpatologi orsakar hälla, fissurer, frakturer och osteoartrit (Ross & Dyson, 2011). Att ställa rätt diagnos i ett tidigt skede är viktigt för både djurskyddet och för galopp- och travsporten som industri, men detta kan vara svårt. Frakturer i kondylerna på metakarpal-/metatarsalben III ger en akut kraftig hälla men vid en fissur kan ibland inget onormalt kännas vid palpation. Allmän svullnad, smärta och hög stresspåverkan hos hästen kan göra det svårt att avgöra om det är ledpåverkan eller ett punkttryck över en fissurlinje som smärtar. Vid stressfrakturer i humerus syns oftast ingen svullnad eller palpationsömhet alls. Diagnos kan sällan ställas med enbart klinisk undersökning utan denna måste kompletteras med bilddiagnostik.

Hantering av häst vid frakturmisstanke

Varje häst med akut uppkommen kraftig hälla bör behandlas som en frakturpatient tills man kunnat utesluta fissur/fraktur (Orsini & Divers, 2014). Benet ska immobiliseras med kraftiga bandage och skenor av material som helst ej ska synas på röntgen. Om ingen mobil röntgen finns måste hästen transporteras till klinik för bilddiagnostik. Om ingen fissur-/frakturlinje hittas i det akuta stadiet, vilket inte är ovanligt, bör man fortsätta hantera hästen som en frakturpatient tills ny röntgen tas efter 7-10 dagar då frakturlinjen vidgats p.g.a. benresorption eller efter 3-4 veckor då kallus (nytt ben) bildats. Ett annat alternativ är att fortsätta utredningen med skelettscintigrafi.

Dessa försiktighetsåtgärder bör tas för att förhindra att en fissur utvecklas till en komplett fraktur eller att en fraktur förvärras och blir t.ex. komminut eller dislocerad.

Bilddiagnostiska metoder vid diagnostik av frakturer/fissurer hos häst

Röntgen

Röntgen är den vanligaste metoden idag för att diagnostisera fissurer och frakturer hos häst. Röntgenröret sänder ut fotoner som delvis absorberas i patienten innan de träffar en filmkassett eller digital detektor. Hur mycket av strålningen som absorberas respektive när kassetten beror på vävnadens densitet och tjocklek. Röntgen ger tvådimensionella bilder av tredimensionella strukturer. Det är därför viktigt att ta minst två projektioner som är vinkelräta mot varandra. Bilderna måste tolkas med hänsyn till att densiteten av flera strukturer summeras ovanpå varandra.

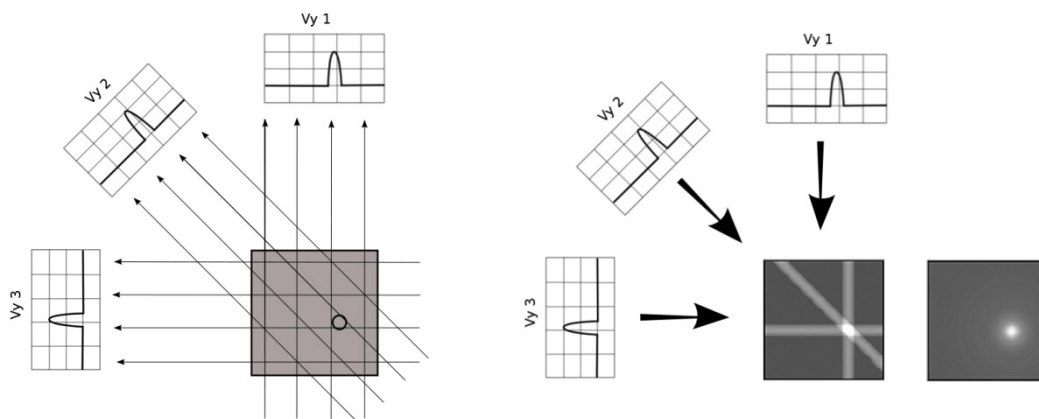
Det finns standardprojektioner för alla kroppsdelar för att tolkningen av bilderna ska underlättas. En frakturlinje kommer att ses bäst om röntgenstrålarna kommer in parallellt mot denna, detta kommer inte alltid ske då standardprojektionerna används. För att t.ex. se frakturer lateropalmart i hovbenet eller i patellas mediala del kan speciella vinklade projektioner behöva användas (Ross & Dyson, 2011). För att t.ex. upptäcka en fissur/fraktur i kotbenet kan man behöva ta flera projektioner med endast ca 10 graders skillnad i vinkling lateralt eller medialt från den dorsopalmara/dorsoplantara standardprojektionen.

Det finns idag mobil röntgen som kan tas med ut i fält. Dock måste försiktighetsåtgärder alltid vidtas med tanke på strålningsexponering av omgivningen då man röntgar med horisontell strålrättning i lokaler som inte är blyskyddade.

Datortomografi

Datortomografi, DT, eller skiktröntgen, har överlägsen upplösning jämfört med vanlig röntgen och ger mycket bra bilder av ben. DT är en röntgenmetod där ett tunt röntgenstrålnippe går igenom ett tvärsnitt av patienten (Schwarz & Saunders, 2011). Röntgenrör och detektor rör sig runt patienten så att strålarna går igenom det undersökta planet från flera håll. Detektorn registrerar intensiteter på strålarna som gått igenom patienten, det blir en kombination av alla vävnader i det aktuella planet. Olika rekonstruktionsalgoritmer används för att omvandla dessa till en tvådimensionell bild av snittytan (Figur 5). Genom att patienten samtidigt sakta förs framåt genom strålplanet fås många tvärsnittsbilder som sedan sätts ihop av en dator till en tredimensionell bild. På detta sätt undviks summationseffekterna som fås i vanlig röntgen.

Intensiteten mäts i Hounsfieldenheter efter datortomografins grundare. Olika vävnader har olika värde på Hounsfielddskalan vilket gör att man kan skilja ut ben och olika mjukdelar från varandra när man studerar bilderna.

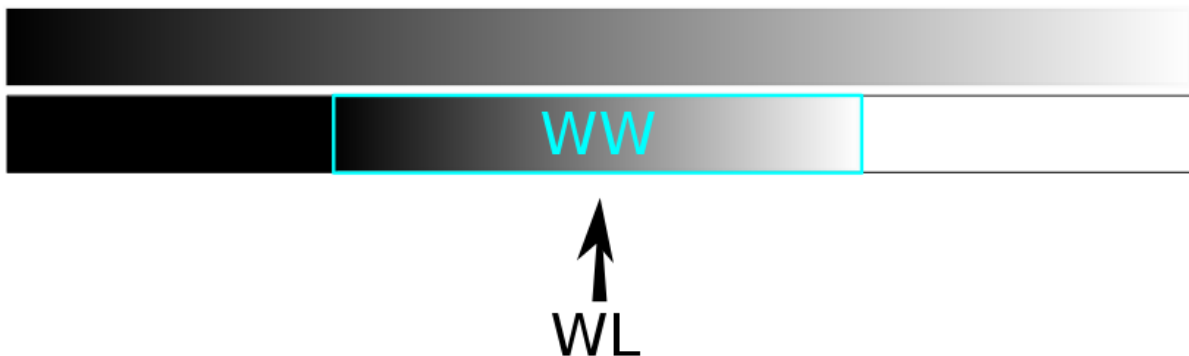


Figur 5. Röntgenstrålarna går igenom ett tunt tvärsnitt av det man vill undersöka från många olika vinklar; detta ger ett stort antal vyer (hundratals). Alla vyer från undersökningen används i olika rekonstruktionsalgoritmer för att skapa en tvådimensionell bild av tvärsnittet.

Beroende på vad man önskar bäst upplösning på, ben eller mjukdelar, används olika algoritmer för att konstruera bilderna. Beräkningarna görs i efterhand så endast en scanning av patienten behövs för att ge både ben- och mjukdelbilder.

De digitala bilderna från en DT-scanning kan ha mellan 4000-65000 olika nyanser av grått och moderna datorskärmar kan visa upp till 1024 grå nyanser (Kimpe & Tuytschaever, 2006). Traditionellt har man sagt att det mänskliga ögat kan se mellan 20-50 grå nyanser men nyare studier talar för att vi kan skilja på upp mot 900 nyanser på optimala skärmar (Kimpe & Tuytschaever, 2006). Klarlagt är i alla fall att vi inte ser lika många nyanser som en DT-undersökning genererar. När man studerar bilderna ska man därför välja inställningar

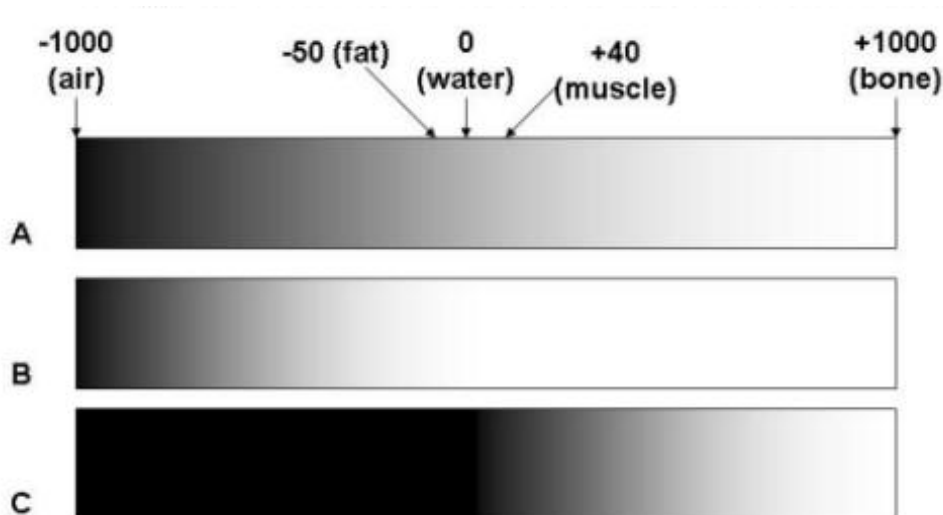
som ger bäst kontrastupplösning av det man vill undersöka (ben eller mjukdel). Detta görs genom att ställa in önskat Hounsfieldvärde i ”window width” (WW) och ”window level” (WL). WW anger hur många nyanser man vill ska visas (avgör kontrasten) och WL anger nyansen i mitten av det angivna WW, dvs var på den totala skalan man vill fokusera, detta avgör ljusstyrkan (figur 6). Hounsfieldvärden högre än WW visas som vitt och lägre än WW visas som svart. På Hounsfieldskalan har luft värdet -1000 och vatten 0. Hounsfieldvärdet för ben varierar med benets grad av mineralisering, Dykgraaf *et al.* (2007) skriver om värden mellan 750 och 2000. Vilka grå nyanser som dessa värden motsvarar beror på hur man ställer in WL och WW (Figur 7).



Figur 6. *Window Width* anger hur många nyanser av grått som visas och *Window Level* bestämmer var på den totala gråskalan som det fönstret ska placeras. Den övre stapeln visar alla möjliga gråskalor, den undre visar hur WW och WL avgör vilka gråskalor som syns. Värden högre än WW (till höger i bilden) visas som vitt, värden lägre än WW (till vänster i bilden) visas som svart.

I dag finns bara datortomografer gjorda för humant bruk vilket ställer till en del problem då hästen har en minst sagt annorlunda kroppsform och storlek än människan. Det innebär att på häst kan endast huvud och ben upp till armbåge/knä undersökas. Hästen ligger på ett specialanpassat bord under undersökningen och måste alltså vara under allmän anestesi. Stående DT som kan utföras under sedering finns för undersökning av hästens huvud och är under utveckling för distala ben.

Mobil DT är ovanligt men finns faktiskt, dock inte för att användas i fält utan som en service till kliniker som inte har en egen DT (Mobile Animal CT). Utrustningen är densamma som beskrivits ovan men befinner sig i en anpassad lastbil.



Figur 7. Inställningar av WW och WL avgör vilka grå nyanser som representerar vilka Hounsfieldvärden. I A är inställningarna gjorda för att man ska kunna skilja olika mjukdelar. I B har fönstret flyttats mot lägre Hounsfieldvärden vilket gör att man kan studera lungvävnad. I C fokuseras på högre Hounsfieldvärden för att kunna studera ben.

Magnetresonanstomografi

Undersökningar med magnetresonanstomografi, MRT, ger bilder med mycket bra möjlighet att utvärdera både skelett och mjukdelar (Murray, 2011). MRT har hög känslighet för stressfrakturer och ofullständiga fissurer.

Metoden bygger på att ett mycket starkt magnetfält interagerar med väteatomerna i kroppen. Radiosignaler från en spole mellan magneten och patienten stör väteatomernas position. Samma spole tar emot signaler från vävnaden när denna återgår till sitt ursprungsläge i magnetfältet. MRT har använts på häst sedan sent 90-tal. I början fanns endast samma utrustning som inom humanmedicinen vilket innebar att liksom med DT endast huvud och ben kunde undersökas och detta måste ske under allmän anestesi. Anestesiapparat liksom all annan utrustning i MRT-rummet måste vara anpassad för att inte störa radiosignalerna eller riskera att dras in i magnetfältet. Metoden är inte mobil.

På senare tid har MRT med lägre magnetstyrka börjat användas och detta har möjliggjort utrustning som är mer anpassad till häst. Nu finns det möjlighet att undersöka distala ben på stående, sederad häst. Noggrann planering av undersökningen och exakt positionering av hästen är mycket viktigt för att få diagnostisk kvalitet på bilden av området man vill undersöka. Bildens detaljupplösning blir dock inte lika hög som i högfälts-MRT.

När man utför undersökningar i en högfältsmagnet måste man ha ett mycket stort säkerhetstänk. Metallföremål i rummet kan med hög hastighet dras in i magnetfältet och orsaka stor skada på både patient och personal. Skaderisken är inte ett lika stort problem när man arbetar med en lågfältsmagnet. Man måste dock alltid tänka på att inte föra in metallföremål mellan magnetens skänklar så hästen måste vara barfota och det är viktigt att ingen liten sömrest finns kvar.

Scintigrafi

Scintigrafi används till häst främst för att undersöka benpatologier (Dyson *et al.*, 2003). Metoden innebär att en radioaktiv isotop bunden till en bärarmolekyl injiceras intravenöst. Bärarmolekylen väljs så att den kan tas upp i vävnaden man vill undersöka. Gammastrålning från den sönderfallande isotopen detekteras av en gammakamera och man får en bild av upptaget i vävnaden. I ben beror upptaget på blodflödet och på aktiviteten hos osteoblasterna, båda dessa ökar vid olika sorters skador. Scintigrafi ger information om fysiologiska processer i målorganet men den anatomiska upplösningen är låg.

Scintigrafi är känsligare än röntgen när det gäller att detektera stressfrakturer och möjliggör även undersökning av för röntgen otillgängliga områden som t.ex. bäcken. Då metoden är mycket känslig kan den även användas för att följa läkningen av frakturer för att inte skicka tillbaka hästen till träning för tidigt. Dock finns en möjlighet att ökat upptag släpar efter lite när skadan är läkt (Murray, 2011).

Undersökningen kan göras på stående häst men metoden är inte mobil i och med att gammakameran är mycket tung och speciell hantering av radioaktiv gödsel och urin krävs (Dyson *et al.*, 2003). Personalen måste vara utbildad i att hantera radioaktiva ämnen och strålskyddet måste beaktas då patienten strålar kontinuerligt i cirka ett dygn efter undersökningen.

Diagnostiskt ultraljud

Diagnostiskt ultraljud är framför allt en mjukdelsteknik. Det används till häst främst för att utvärdera senor, ligament och synoviala strukturer samt för dräktighetsundersökning (Nyland & Mattoon, 1995). Ultraljud kan användas för att leta frakturer hos häst i områden där en röntgenundersökning är svår att utföra, t.ex. manke, skapula, humerus, revben, pelvis, femur och tibia (Ross & Dyson, 2011). Ytan på ben kan ses tydligt och genom att följa benets konturer kan man upptäcka frakturer. Fissurer som ej går ut genom kortex kan däremot inte upptäckas med traditionellt diagnostiskt ultraljud.

Ultraljudsvågorna alstras av piezoelektriska kristaller som finns i ultraljudsproben (Brnjas-Kraljevic, 2009). Dessa kristaller har egenskapen att de börjar svänga då en spänning läggs över dem. Svängningarna fortplantas i vävnaden som proben ligger an mot. Kristallerna alternerar mellan att skicka ut pulser av ultraljudsvågor och att ta emot de ljudvågor som reflekterats av gränssytor i vävnaden. Hur mycket som reflekteras beror på skillnader mellan vävnadernas akustiska impedans (ljudets hastighet i vävnaden multiplicerat med vävnadens densitet) (Thrall, 2013). Även vinkeln mellan infallande vågor och gränssytan påverkar hur mycket som reflekteras tillbaka till proben respektive sprids åt andra håll.

De reflekterade signalerna används för att bygga upp en tvådimensionell bild. Tiden det tar för ljudvågen att komma tillbaka till proben anger läget/djupet i vävnaden och den reflekterade vågens intensitet/amplitud avgör hur ljus bildpunkten blir. I en gränssyta mellan mjukdel och ben kommer nästan hela signalen att reflekteras och inget eller mycket lite av ljudvågorna går vidare djupare i vävnaden. Det ger en mycket ljus bild av benytan och inga reflektioner/bilder från djupare liggande strukturer. I en vätska finns normalt inte så många

gränssytor, det gör att nästan inget av ljudvågorna reflekteras och vätska blir därför nästan helt svart på ultraljudsbilden.

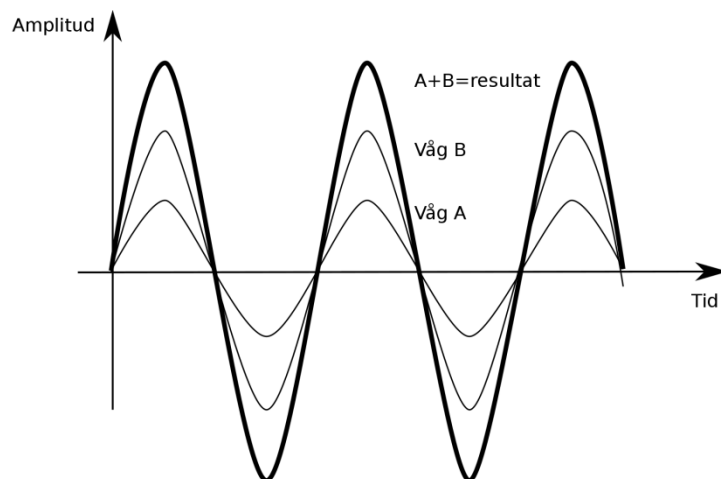
Ultraljudsbildens upplösning, d.v.s. hur små objekt som kan identifieras beror på våglängden, som i sin tur beror på frekvens och ljudets hastighet i vävnaden enligt formeln $\text{våglängd} = \text{ljudhastighet} / \text{frekvens}$ (Tole, 2005). Axial upplösning är $0,5 \times \text{SPL}$, där $\text{SPL} = \text{spatial pulslängd} = \text{våglängd} \times \text{vågcykler per puls}$. I diagnostiskt ultraljud används frekvenser mellan 2-15 MHz vilket ger våglängder på 0,5-1 mm. Högre frekvenser tillåter alltså detektion av mindre objekt. Men ultraljudsvågor med högre frekvens kommer också att dämpas mer i vävnaden och därmed inte nå lika djupt.

Ultraljudstekniken har använts mycket länge och anses i princip ofarlig. Ultraljud kan tas med ut i fält och undersökningen kan ske på osederad häst men är alltså inte en så bra metod för att utesluta fissurer i ben.

Olinjärt ultraljud

Olinjärt ultraljud innefattar en rad olika metoder som på något vis tar hänsyn till ljudvågornas olinjära egenskaper.

I ett linjärt system är det man får ut proportionellt mot det man stoppar in, $y=kx$ är ett exempel på en linjär ekvation. Linjära system uppfyller superpositionsprincipen, d.v.s. lösningen till summan av två system är lika med summan av lösningarna till de två systemen: om $F(x)=A$ och $F(y)=B$ så är $F(x+y)=A+B$. Om ultraljudsvågor hade haft strikt linjära egenskaper skulle alltså två vågor som träffar på varandra slås ihop till en våg som var lika med summan av de två ursprungsvågorna (Figur 8).



Figur 8. Superpositionsprincipen för vågor i ett linjärt system.

Det mesta i världen är dock olinjärt och olinjära system uppfyller inte superpositionsprincipen (Björnö, 2010). Eftersom olinjära system har svårare lösningar som innefattar flera ekvationer av högre grad approximeras de ofta med ett linjärt system. Allt snabbare och kraftfullare datorer har nu öppnat upp för att utforska olika olinjära fenomen, t.ex. de hos ultraljudsvågor. När ultraljudsvågor interagerar med varandra, t.ex. i organisk vävnad sker helt andra saker än i Figur 8, detta används i olinjära ultraljudsmetoder.

Mycket forskning har gjorts på olinjära effekter som uppkommer mellan ultraljudsvågor och mikrosprickor i fasta material (Broda *et al.*, 2014). Det har visats att sprickor ger ett mycket starkare olinjärt respons än linjärt, alltså skulle olinjära ultraljudsmetoder vara känsligare för att detektera sprickor än traditionellt diagnostiskt ultraljud som huvudsakligen håller sig i det linjära beräkningsområdet.

Tekniken har idag kommit så långt att den används kommersiellt för att detektera materialdefekter, bland annat av företaget Acoustic Agree AB i Ronneby, Sverige. Kanske skulle den även kunna användas inom veterinärmedicinen för att tidigt diagnostisera fissurer/frakturer *in vivo*, i fält och utan att utsätta patienten för någon form av strålning. Det skulle i så fall kunna vara ett mycket värdefullt komplement till dagens bilddiagnostiska tekniker för att utesluta fissur/fraktur vid ett akut trauma eller som screeningmetod för att förebygga stressfrakturer.

Diagnostiskt ultraljud vs olinjärt ultraljud

Skillnaden mellan ”vanligt” diagnostiskt ultraljud och olinjärt ultraljud ligger i vilka parametrar som studeras då ljudvågorna färdats i materialet som ska undersökas. I diagnostiskt ultraljud används t.ex. de linjära parametrarna tid och reflektion: Hur lång tid tar det innan ultraljudspulsen kommer tillbaka till proben och hur mycket har reflekterats.

I olinjära ultraljudsmetoder utnyttjas att ultraljudsvågor ändrar form då de propagerar genom ett olinjärt material (Björnö, 2010). Man undersöker hur vågornas frekvenser och amplitud påverkas av materialet (Haller, 2007). Det ”olinjära” i ”olinjärt ultraljud” kommer dels från olinjäriteter i materialet som undersöks och dels från att vågorna beskrivs med olinjära ekvationer.

Även i vanligt diagnostiskt ultraljud uppstår olinjära fenomen (Duck, 2002). Vid beräkningarna som använts för att skapa bilderna har man länge ignorerat detta och approximerat med linjära vågekvationer. I början av 80-talet började dock forskare presentera konsekvenser av olinjära vågeffekter i medicinskt ultraljud. Detta ledde bl.a. till att ”Harmonic imaging” använts sedan 90-talet för att förbättra bildkvaliteten vid diagnostiskt ultraljud (Tranquart, F. 1999). Denna metod tar hänsyn till vissa av de olinjära effekterna.

För att försöka ge en förståelse för de olinjära fenomenen ges här först en fysikalisk bakgrund om vågor i allmänhet, om olinjäritet hos material och om vad som sker med en ultraljudsvåg när den propagerar genom vävnad.

Fysikalisk bakgrund

Vågor

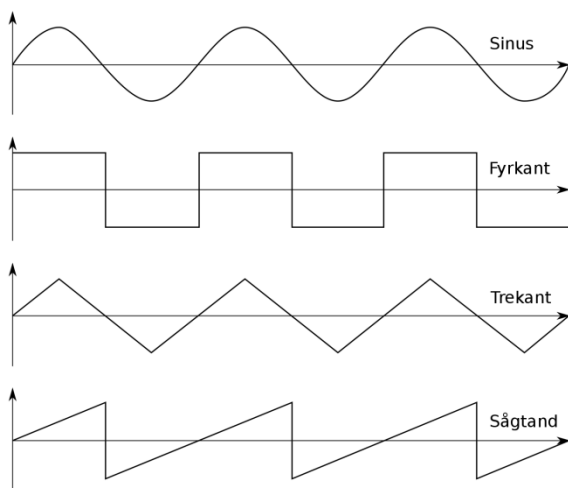
I fysiken är en våg en störning som breder ut sig i ett medium utan att det sker någon permanent masstransport, endast energi förflyttas (Chaudhuri, 2010). En våg kan beskrivas av parametrar som t.ex. våglängd, amplitud och frekvens.

Våglängd är avståndet mellan två punkter på vågen som har samma störning och är på väg åt samma håll, t.ex. mellan två toppar.

Amplitud är ett mått på en oscillerande vågs största avvikelse från baslinjen, och används för att beskriva ljudstyrka/intensitet. Amplituden hos en ultraljudsvåg som propagerar genom vävnad kommer att dämpas genom absorption och genom spridning av vågen i andra riktningar än den ursprungliga. Det sker även dämpning vid gränssytor mellan olika material/vävnader (genom att en del av vågen reflekteras). Amplituddämpningen anges i decibel, dB. Ofta anges dB enhetslöst men ska egentligen uttryckas relativt ett referenstryck. dB är ingen absolut enhet utan har olika referenstryck i olika medium (Leighton, 2007).

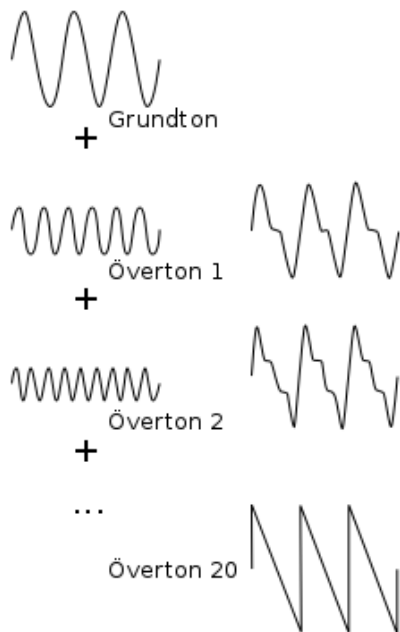
Frekvens är antalet repeterande cykler som vågen gör på en sekund. Frekvensen bestäms av hur snabbt källan till störningen oscillerar. Ju högre frekvens desto mer av energin absorberas i vävnaden. Ultraljud är ljudvågor med frekvens över 20 kHz, vilket är ohörbart för det mänskliga örat (Nyland & Matoon, 1995).

Vågor kan ha olika form varav den enklaste är en sinusvåg då denna består av en enda frekvens (Truax, 1999). Exempel på andra vågformer är fyrkantsvåg, sågtandsvåg och triangelvåg (Figur 9).

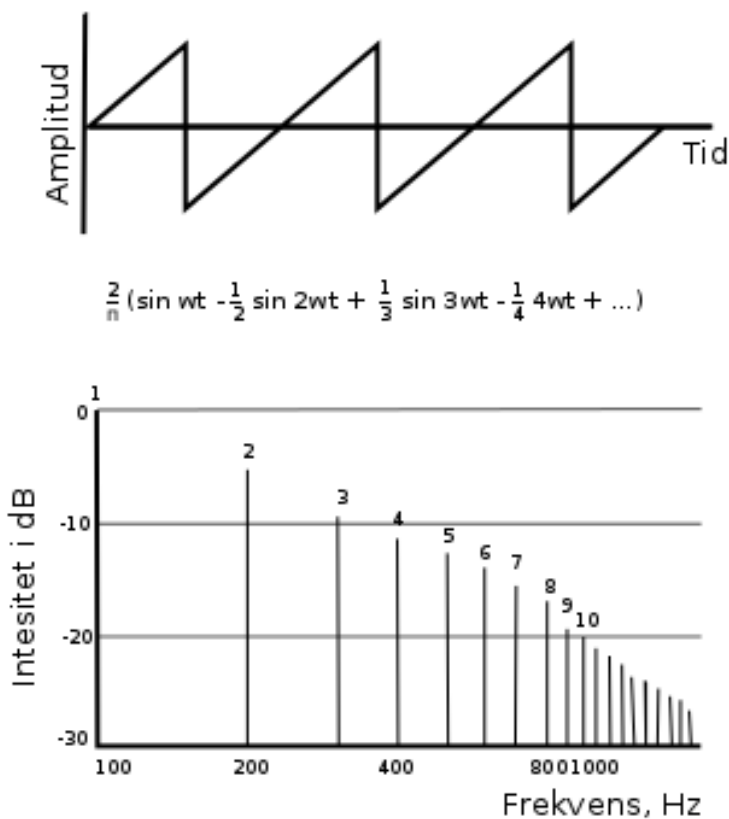


Figur 9. Olika vågformer.

Sinusvågor med olika frekvenser bygger enligt superpositionsprincipen tillsammans upp andra vågformer (Truax, 1999) (Figur 10). Med matematiska beräkningar kan man genom Fourieranalys dela upp alla periodiska vågformer i sina komponenter av sinusvågor med olika frekvenser (Figur 11).



Figur 10. Flera sinusvågor som läggs ihop skapar vågor som i formen blir mer och mer som en "sågtandsvåg" (Truax, 1999)



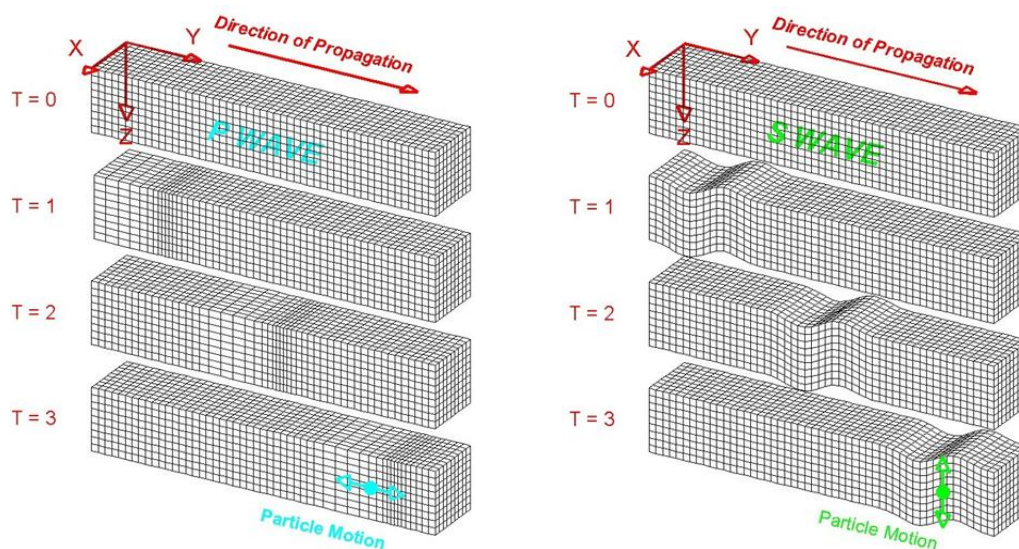
Figur 11. En sågtandsvåg, dess beskrivning som en Fourierserie, samt ett spektrum med de ingående sinusvågornas olika frekvenser.

Ljudvågor

Ljudvågor är mekaniska vågor, d.v.s. de behöver ett medium annat än luft att fortplanta sig i. Störningen är en tryckförändring i mediet. Vanligast i diagnostiskt ultraljud är longitudinella vågor som propagerar genom att trycka ihop mediet de färdas i, de kallas även tryckvågor

eller P-vågor (Leighton, 2007). Partiklarna i en P-våg oscillerar parallellt med vågens rörelseriktning (Figur 12). S-vågor, skjuv-vågor, är en sorts elastisk våg där partiklarna istället rör sig vinkelrätt mot vågens rörelseriktning, antingen upp-ned eller från sida till sida.

Mjukvävnad kan endast leda vidare P-vågor medan ben även kan leda S-vågor (Tole, 2005). Det finns även andra typer av vågor, t.ex. Rayleigh-vågor och Lamb-vågor som båda studerats i samband med olinjärt ultraljud och detektion av materialdefekter (Broda *et al.*, 2014). En vågform kan konverteras till en annan, t.ex. vid gränssytor mellan olika material (Leighton, 2007). De olika vågtyperna har olika egenskaper vad gäller t.ex. hastighet, dämpning och spridning då de propagerar genom ett material.



Figur 12. Partiklarnas rörelse i P-vågor och S-vågor. I en P-våg (till vänster) kommer materialet växelvis att tryckas ihop (mörkare delar, ansamling av partiklar) och töjas (ljusare delar, glesare mellan partiklarna). I S-vågen (till höger) rör sig partiklarna vinkelrätt mot vågens rörelseriktning. (Lawrence Braille, 2000).

Olinjäritet i material

Ett olinjärt material är ett där sambandet töjning-spänning inte är linjärt, dvs. det kan inte beskrivas grafiskt med en rät linje (Nationalencyklopedin).

Många material har en inneboende olinjäritet p.g.a. sin mikrostruktur, t.ex. sten och organisk vävnad, dessa material kan kallas för "Nonlinear Mesoscopic¹ Elastic materials", NME (Guyer *et al.*, 1999). NME skiljer sig från material som t.ex. aluminium eller vatten som besitter en atomisk elasticitet². De senare ger normalt ingen olinjär respons hos ultraljudsvågorna. Guyer visade dock att atomiskt elastiska material med defekter, som t.ex. sprickor, beter sig som NME vad gäller olinjär respons. Han såg också att defekter hos NME gav ett större bidrag till olinjäriteten än materialstrukturen i sig.

Björnö (2010) beskriver två olika experimentella metoder att ta fram ett materials olinjäritetsparameter, B/A. Denna parameter har tagits fram för en del biologiska material,

¹ Mesoskopisk är ett storleksmått mellan mikroskopisk och makroskopisk.

² Hur mycket materialet kan tänjas beror till största delen på kemiska bindningar på atomnivå (Roylance, 2000)

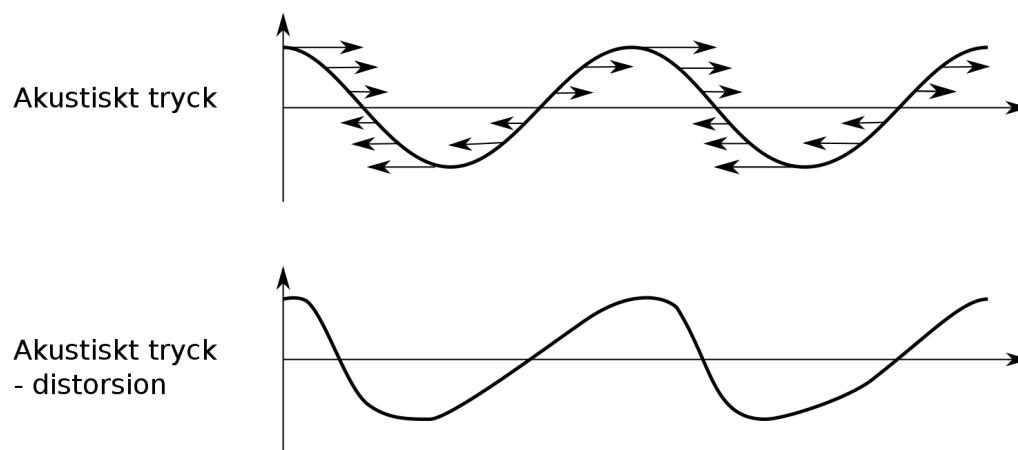
dock ej för ben. Parametern kan användas för att delvis förutspå ultraljudets olinjära beteende i ett material.

Ultraljudsvågor i vävnad

Den mekaniska energin i svängningen hos kristallen fortplantas som en vågform genom vävnaden då partiklar i vävnaden också börjar oscillera. Det är energin och vågformen som propagerar genom vävnaden, ingen nettoförflyttning av partiklar sker, dessa vibrerar endast fram och tillbaka.

Som beskrevs under rubriken ”Diagnostiskt ultraljud” kommer en del av vågen att reflekteras och en del att spridas. Dessutom kommer ljudvågsintensiteten (indirekt amplituden, se ovan) kontinuerligt att dämpas då en del av energin absorberas av vävnaden som värme. Detta är anledningen till att höga ljudintensiteter ger upphov till en temperaturökning i vävnaden, vilket diskuteras som en potentiell risk i samband med fosterdiagnostik (Miller et al., 2012).

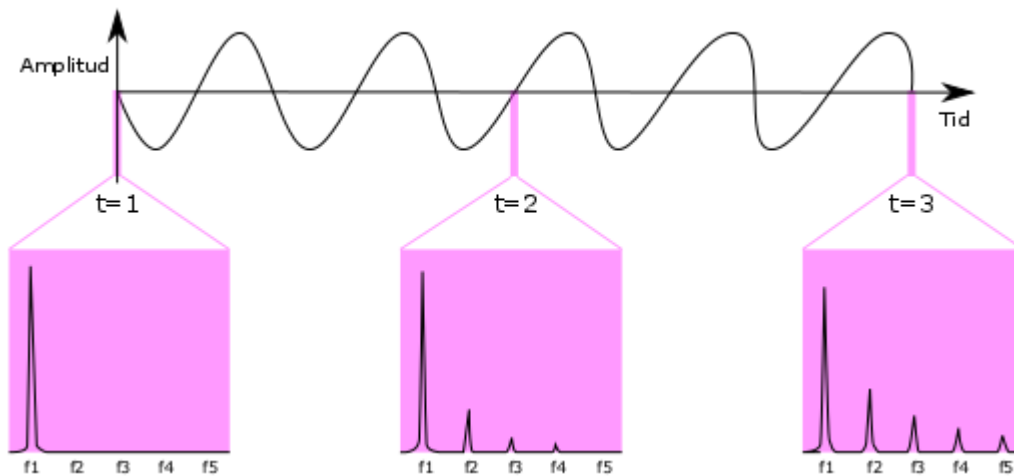
I ett olinjärt material, som organisk vävnad, kommer ljudvågen inte bara att dämpas, reflekteras och spridas utan även distorderas, ändra form (Björnö, 2010). Vågen startar som en sinusvåg men blir på sin väg genom vävnaden mer och mer lik en sågtandsformad våg. Distortion sker p.g.a. att partikelhastigheten i vågen inte är konstant. I delar av vågen med högre tryck, topparna, kommer partikelhastigheten att vara högre vilket innebär att den delen av vågen kommer att röra sig fortare. Resultatet blir att vågtopparna kommer ifatt dalarna och vågformen i denna del blir mer och mer lodrät (Figur 13). Det kan visas matematiskt att den lokala partikelhastigheten i vågen beror på dels ljudets hastighet genom materialet och dels på materialets olinjäritetsparameter B/A .



Figur 13. Pilarna i den övre vågen visar storleken på trycket i vågens olika delar. Ju högre tryck desto högre partikelhastighet, detta leder till distorsion av vågformen vilket ses i den nedre bilden.

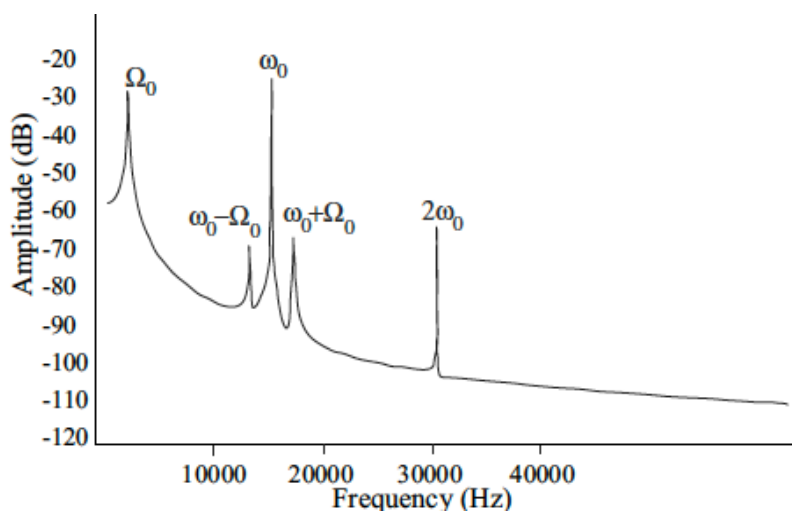
När ljudvågen distorderas (under interaktionen med vävnaden) ändras frekvensspektrat för vågen (Jhang, 2009) (Figur 14), detta kan visas med Fourieranalys som beskrevs tidigare. Dessa nya frekvenser är heltalsmultipler av ursprungsfrekvensen och kallas för övertoner (eng. harmonics) (Ziegler & O'Brien, 2002). I den matematiska beskrivningen av en våg är dessa övertoner olinjära komponenter av vågekvationen, därav uttrycket ”olinjärt ultraljud” för metoder som använder sig av dessa. För matematisk bakgrund till övertoner och

härledningar av olinjära vågekvationer hänvisas till t.ex. Duck (2002), Haller (2007) eller Leighton (2007).



Figur 14. Den övre bilden visar en sinusvåg som distorderas mer och mer ju längre vågen propagerar genom vävnad=åt höger på x-axeln. De nedre bilderna visar frekvensspektrat för den övre vågen i tre olika tidpunkter: $t=1$, $t=2$ och $t=3$. Varje frekvenstopp i de nedre bilderna representerar en sinusvåg av en viss frekvens som är övertoner (f_2 - f_5) till ursprungsfrekvensen f_1 . Ju mer distorderad vågen blir desto fler övertoner ses i frekvensspektrat.

När ljudvågor med olika frekvens, f_1 och f_2 , propagerar i ett olinjärt material så kommer dessa att interagera med varandra i områden med sprickor. De kommer inte att följa superpositionsprincipen, istället bildar de ytterligare nya frekvenser ($f_{ny}=f_1\pm f_2$) som kallas sidband (Figur 15) (Jhang, 2009).



Figur 15. Frekvensspektrum efter olinjär propagering av två ursprungsfrekvenser $\omega_0=15000$ Hz och $\Omega_0=20000$ Hz. Sidbanden $\omega_0-\Omega_0$ samt $\omega_0+\Omega_0$ bildas p.g.a. materialdefekter. Det har även bildats en överton, $2\omega_0$. (Haller, 2007).

Oförstörande provning med olinjärt ultraljud

Oförstörande provning innebär att ett objekts tillstånd undersöks utan att det skadas. Exempel på oförstörande provningsmetoder är t.ex. röntgen och ultraljud. Oförstörande materialprovning är ett mycket viktigt område inom såväl medicin som många andra branscher. En sökning i databasen Web of Science på orden "nondestructive testing" ger över 20000 träffar. Som exempel kan nämnas flygplansvingar och kärnkraftsverk där materialens tillstånd är mycket viktigt för säkerheten och det ej är aktuellt att använda en förstörande provningsmetod (Jhang, 2009).

Ultraljud är en kraftfull metod för att utvärdera ackumulerande skada i ett material i och med att vågornas propagerande är direkt relaterat till egenskaper hos materialet. Den traditionella ultraljudstekniken är känslig för stora defekter och öppna sprickor, där det finns ett hinder (luft) för vågornas propagering. Det är dock önskvärt att upptäcka även små skador på ett tidigt stadium i materials åldrande. Något som kan åstadkommas med hjälp av ultraljudets olinjära komponenter då dessa ger utslag på även mycket små defekter (Jhang, 2009).

Forskningen om olinjärt ultraljud för oförstörande provning har lett till utvecklandet av flera olika metoder och man har avhandlat såväl utmattningsskador som andra skademekanismer hos ett stort antal material, t.ex. olika metaller, betong och plaster (Jhang, 2009).

De senaste åren har ett fåtal försök även gjorts att använda olinjära akustiska fenomen för att hitta mikrofrakturer i ben som ett led i forskningen om osteoporos (Hauptert *et al.*, 2014, Muller *et al.*, 2005 och 2008. Renaud *et al.*, 2008). Inget av dessa försök studerade ben från häst. De hade inte heller med mjukdelar i sina experiment vilket gör det svårt att utvärdera metodernas potential *in vivo*.

Higher Harmonics

Metoden Higher Harmonics utnyttjar att amplituden hos övertonerna som bildas beror på materialets olinjära elasticitet. Ju mer skada desto högre blir amplituden hos övertonerna. En annan effekt som genererar övertoner är när ultraljudsvågor kommer till operfekta gränssytor (eng. "Contact Acoustic Nonlinearity") t.ex. en stängd spricka (Jhang, 2009).

Renaud *et al.* (2008) undersökte olinjäritet i spongiöst ben med Higher Harmonics. De använde 24 mm tjocka preparat av humant hälben där kortikalt ben samt märm tagits bort. Författarna drar slutsatsen att den tredje övertonen som bildas skulle kunna användas för att utvärdera mikroskador i spongiöst ben. De säger även att försöksupställningen dock inte lämpar sig för försök *in vivo* p.g.a. att mjukdelar och kortikalt ben orsakar så mycket dämpning (10-15 dB) att amplituder upp mot 1 MPa skulle krävas. I kombination med en lång³ (tiondels millisekund) ultraljudspuls på 400 kHz skulle detta kunna orsaka biologiska termoeffekter.

3 I diagnostiskt ultraljud är pulserna betydligt kortare, μ -sekundlånga.

Nonlinear Elastic Wave Modulation Spectroscopy (NEWS)

NEWS är en grupp metoder som bygger på de effekter som uppkommer då vågor med olika frekvens interagerar med varandra. Denna innefattar bl.a. Nonlinear Resonant Ultrasound (NRUS), Nonlinear Wave Modulation Spectroscopy (NWMS) samt Nonlinear Acoustic Wave modulation (NAW)

I NRUS studeras hur resonansfrekvensen⁴ hos ett material påverkas då materialet exciteras av ultraljudsvågor med ökande amplitud (Jhang, 2009). I ett oskadat material ökar resonansfrekvensens amplitud medan olinjäriteter i materialet leder till att både amplitud och frekvens ändras.

Muller *et al.* (2005) undersökte utmattning och uppkomst av mikrofrakturer i små preparat av bovint kortikalt ben med NRUS. De utsatte preparaten för belastning i flera steg (tills de gick sönder), däremellan undersöktes preparaten med NRUS. Resultatet var en ökande olinjär respons efter varje belastningscykel benen utsattes för. De drog slutsatsen att detta berodde på att preparaten blev mer och mer skadade för varje belastningssteg. Muller och hennes kollegor (2008) fortsatte försöken med NRUS på humant kortikalt ben och kunde då hitta en olinjär parameter som ökade med antalet belastningscykler.

Hauptert *et al.* (2014) gjorde liknande försök med NRUS och humant kortikalt ben som utsattes för belastningsutmattning i flera steg. De fann att mikrofrakturerna blev fler men inte längre med ökande utmattning samt att den olinjära responsen ökade med ökande antal mikrofrakturer i preparaten.

I NWMS mäts hur amplituden hos en högfrekvent ultraljudsvåg moduleras av en lågfrekvent vibration av materialet (Jhang 2009). En mycket förenklad förklaring är att om det finns sprickor i materialet kommer dessa att öppnas och stängas p.g.a. den lågfrekventa vibrationen. När sprickorna är öppna kommer den högfrekventa vågen att dämpas medan den kan passera oförändrad när sprickorna är stängda. Amplitudmoduleringen genererar sidband som indikerar att det finns materialdefekter.

Renaud *et al.* (2008) använde även denna metod för att undersöka olinjäriteter i preparat av humant hälben. I motsats till deras försök med Higher Harmonics krävdes inte alls lika höga energier och de konkluderar att metoden har potential för *in vivo* applikationer.

NAW är en metod som utvecklats av Acoustic Agree AB. Metoden utnyttjar i likhet med NWMS att sidband uppkommer då vågor med olika frekvens interagerar i ett olinjärt material (Haller, K. Acoustic Agree AB, pers. medd. 140619). Antingen så sänds två olika frekvenser in i materialet eller så används materialets resonansfrekvens som en andra frekvens. Egenskaper hos sidbanden används för att beräkna ett skadevärde för det undersökta objektet. Algoritmerna för att beräkna detta skadevärde är utvecklade av Acoustic Agree AB. Vid såväl mätningen som beräkningen finns en mycket stor parameterrymd (Haller, K. Acoustic Agree AB, pers. medd. 141010). Det är inte ovanligt att antalet parametrar överstiger 10000. Vid beräkningarna av ett skadevärde finns varken

⁴ Egenfrekvens. Den frekvens som får materialet att oscillera med högst amplitud.

möjlighet eller behov att använda alla dessa parametrar. Istället bör metoden kalibreras för att vara känslig för just den skada som man är intresserad av. Detta görs genom att pröva vilka av ett antal parametrar som ger bäst resultat för kända defekter. Man kan t.ex. titta på olika delar av frekvensspektrat och analysera olika frekvenstoppar.

MATERIAL OCH METODER

Försöksupplägg

1. Kotben inkl. mjukdelar undersöks med datortomografi för att få en bild av benens initiala utseende före traumatisering.
2. Försök 1: Val av frekvenser samt undersökning med olinjärt ultraljud av kotbenen inklusive mjukdelar med två olika mätmetoder, dubbelfrekvensmetoden och singelfrekvensmetoden.
3. Utvärdering av de två mätmetoderna.
4. Traumatisering av kotbenen med syfte att orsaka sprickor.
5. Datortomografi för att konfirmera och kvantifiera traumatiseringen.
6. Försök 2: Undersökning med olinjärt ultraljud av kotbenen inklusive mjukdelar vid två separata tillfällen med mätutrustningen bortkopplad mellan mättillfälle ett och två. Metoden som användes bestämdes av resultaten i punkt 3.
7. Avlägsnande av mjukdelar.
8. Försök 3: Undersökning med olinjärt ultraljud av de traumatiserade kotbenen exkl. mjukdelar. (Samma metod som i försök 2.)

Kotben från häst

Åtta kotben, inklusive mjukdelar, från två olika hästar användes. Kotbenen, inklusive omkringliggande mjukdelar, togs loss från hästen med skalpell och kniv ca två timmar efter avlivning. Benen bedömdes okulärt med avseende på skador i hud, senor/senskida samt brosk (Tabell 1) och placerades sedan direkt i en frys (-20°C). Hästarna hade använts vid en terminal övningsoperation för veterinärstudenter vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala. På grund av detta fanns det varierande snitt och suturer (Prolene, storlek 2) i mjukdelarna. Det uppstod även broskskador vid losstagandet av benen. Den första DT-undersökningen gjordes på frysta ben och benen förvarades sedan i frys tills de transporterades till Ronneby och tinades under ett dygn i kylskåp och ca tre timmar i rumstemperatur inför försök 1. Därefter frystes benen igen tills det var dags för punkt 4-8. Detta skedde under totalt fem sammanhängande timmar på tinade ben. Alla ultraljudsförsök utfördes med benen i en tunn plastpåse av hygienskäl.

Traumatisering av ben

För att orsaka sprickor i benen användes kniv och hammare. Benet sattes fast på högkant, i ett skruvstöd, knivens egg lades mot dorsala delen av sagittalfåran i den proximala ledytan, alternativt mellan kondylerna i den distala ledytan. 6-8 milda hammarslag applicerades mot knivbladets baksida i höjd med eggens kontakt med benet (Figur 16). Traumatiseringen avslutades då en tydlig spricka uppkommit, antingen visuellt eller att det kändes i kniven att den gick in djupare i benet. Fyra av benen fick sprickor proximalt, dorsalt (H1HF, H1VB, H2HF, H2HB) och resterande fyra fick sprickor distalt, dorsalt (H1VF, H1HB, H2VF, H2VB). Vilket ben som traumatiserades proximalt respektive distalt valdes ut slumpvis.

Tabell 1. Skador i mjukdelar och brosk. SDFT=Superficial Digital Flexor Tendon, DDFT=Deep Digital Flexor Tendon

	Hud	Senor, senskidor	Brosk	
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
H1VF	Tvärgående snitt kaudalt, suturerat med 4 korsstygn	Tvärsnitt genom ca 80 % av SDFT tjocklek		3 skalpellsnitt proximalt, 1-2 cm.
H1HF				3 skalpellsnitt proximalt, över halva ledytan
H1VB				3 skalpellsnitt proximalt, ca 2-4 mm.
H1HB				3 skalpellsnitt distalt, ca 2-4 mm.
H2VF	Längsgående snitt lateralt, hela benets längd. Suturerat med 7 korsstygn		Proximalt, ca 3 mm i diam.	2 skalpellsnitt distalt, ca 3 mm.
H2HF	Längsgående snitt. Suturerat 4 korsstygn	Längsgående snitt genom kotsenskida		2 skalpellsnitt proximalt, ca 2 mm.
H2VB		Tvärgående snitt genom ca 30 % av DDFT.	Proximalt, ca 5 mm i diam.	Skalpellsnitt proximalt och distalt, ca 3 mm.
H2HB	Snett snitt längs hela benet, suturerat 10 enkla isolerade.			Skav av skalpell distalt, ca 3 mm i diam.



Figur 16. Benet hålls fast i ett skruvstäd och sprickor orsakas genom att slå på en kniv som hålls mot benets proximala eller distala del.

Datortomografi

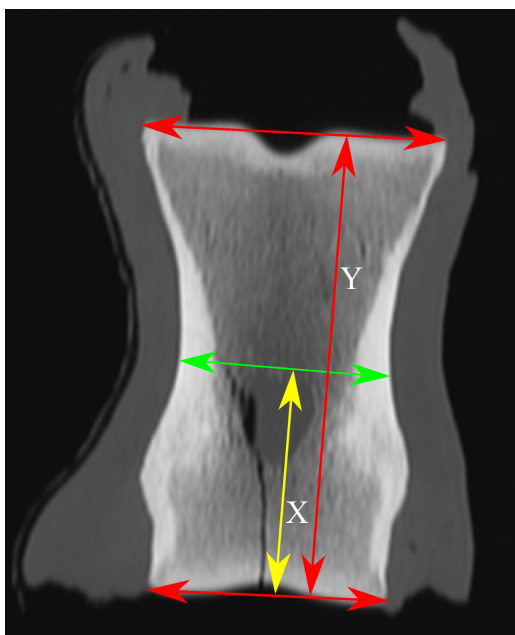
För att utvärdera benens utseende före traumatiseringen undersöktes de i fryst tillstånd med DT på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala (Siemens medical System, Erlangen, Germany. 120 kV, 35 mA, snitt 0,6 mm, increment 0,7 mm). DT-bilderna av kotbenen bedömdes med avseende på sprickor i kortikalt och spongiöst ben (ja=+/nej=-), cysta (ja=+/nej=-), benpålagringar (homogena/heterogena) samt subkondral skleros i proximala samt distala delen av benet. Benpålagringar och skleros graderades från 1-3 (finns ej=-, lindrig=1, måttlig=2, grav=3). Skleros bedömdes i ett uppskattat mittplan i sagittal- och dorsalsnitten. Inställningar vid bildtolkningen var WL=500 och WW=3500. Initialt gjordes oberoende bedömningar av DT-bilderna av veterinärstudent Katarina Sandelin och veterinärradiolog Charles Ley. Därefter gjordes en konsensus bedömning (Tabell 2). Övriga fynd från DT-undersökningen var att H1VB hade luft mellan kortikalt och spongiöst ben samt att H2HF hade en metall/kontrast-densitet i området runt kotsenskidan.

Tabell 2. Bedömning av benen utifrån DT-bilder. -=finns ej, 1=lindrig, 2=måttlig.

	Sprickor		Cysta	Benpålagring		Subkondral skleros	
	kortikal t ben	spongiöst ben		Homo-gen	Hetero-gen	Prox.	Dist.
H1VF	-	-	-	1	2	1	-
H1HF	-	-	-	1	2	1	-
H1VB	-	-	-	1	-	1	-
H1HB	-	-	-	1	-	1	-
H2VF	-	-	-	1	2	-	-
H2HF	-	-	-	1	2	-	-
H2VB	-	-	-	1	-	-	-
H2HB	-	-	-	1	-	-	-

Efter traumatisering undersöktes benen, i tinat skick, med DT på Evidensia Dju sjukhuset Malmö (Philips Brilliance, 120 kV, 30 mA, snitt 1,4 mm, increment 0,7 mm) för att kontrollera att minst en större spricka uppkommit. Sprickans samt benets längd mättes enligt Figur 17, detta gav sprickans längd som procent av benets längd. Sprickornas bredd mättes

vid deras utgångspunkt proximalt alternativt distalt. Bedömningen är sammanställd i Tabell 3.



Figur 17 Sprickornas och benets längd mättes i ett uppskattat sagittalplan i datortomografibildens dorsalsnitt. X =sprickans längd, Y =benets längd. De horisontella pilarna är stödlinjer som är vinkelräta mot X respektive Y .

Tabell 3. Data för tillfogat trauma redovisat som längd och bredd i mm. Skadan är bedömd som en fissur om frakturlinjen inte kan följas hela vägen, annars som fraktur

	Sprickan utgår från	Sprickans längd (mm)	Kotbenets längd (mm)	Sprickans längd (% av kotbens längd)	Sprickans bredd (mm)	Fissur/ fraktur	Grenad/ enkel
H1VF	dist.	47	89	53	0,7	fissur	E
H1HF	prox.	49	88	56	0,6	fissur	E
H1VB	prox.	50	86	58	0,9	fraktur	G*
H1HB	dist.	45	86	52	0,5	fissur	E
H2VF	dist.	62	102	61	0,5	fissur	E
H2HF	prox.	40	101	40	0,6	fissur	E
H2VB	dist.	58	96	60	0,5	fissur	E
H2HB	prox.	20	96	22	0,5	fissur	E

dist=distala ledytan, prox=proximala ledytan, E=enkel, G=grenad.

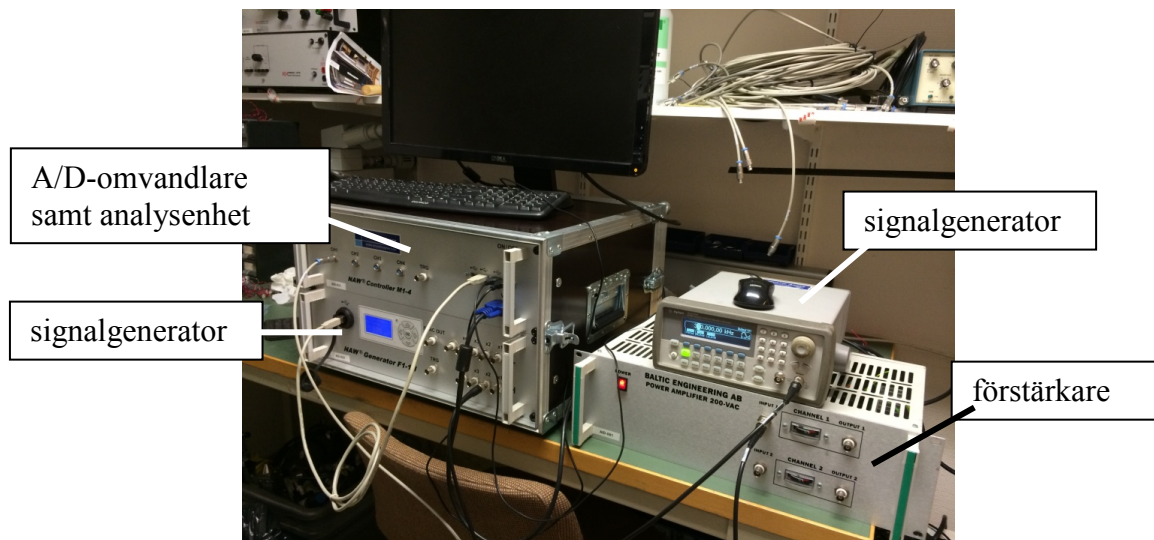
*litet subkondraltfragment.

Olinjärt ultraljud - "Nonlinear Acoustic Wavemodulation, NAW"

Ultraljudsförsöken utfördes hos Acoustic Agree AB i Ronneby med deras egenutvecklade utrustning. Apparaturen består av två generatorer för ultraljudsvågor, en sändare per

generator, en mottagare (tar emot signaler från båda sändarna) samt en analysenhet (Figur 18). Liksom i vanligt diagnostiskt ultraljud alstras störningen av en piezoelektrisk kristall (PZT) men istället för pulser så skickas ljudvågor kontinuerligt in i materialet.

Frekvenser mellan 20-300 kHz används vilket gör att vågorna kan fylla upp hela materialet utan att reflekteras i gränssytor som i diagnostiskt ultraljud (Haller, K. Acoustic Agree AB, pers. medd. 141112). En separat mottagar-PZT aktiveras av vågorna som passerar ut ur materialet. Mottagaren kopplas till en Analog/Digital-omvandlare vilken visar frekvenser och amplituder på de modifierade vågorna som passerat materialet.

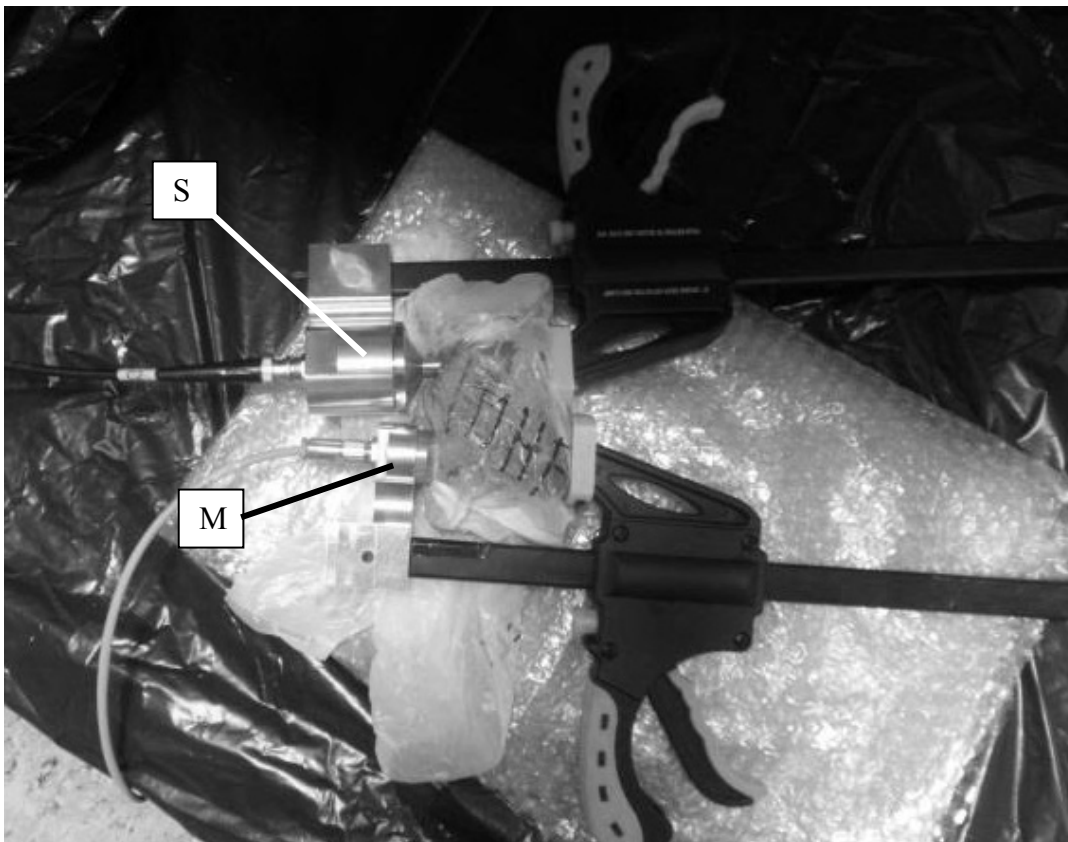
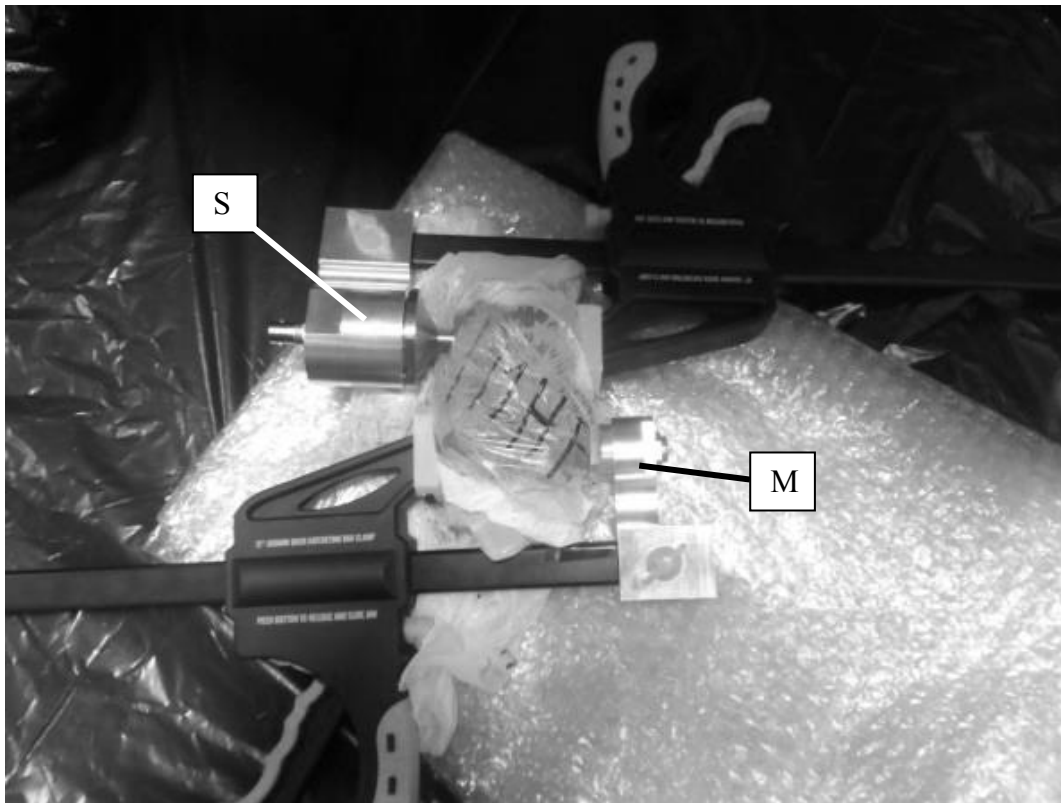


Figur 18. Utrustning hos Acoustic Agree. Två generatorer, en förstärkare, en analysenhet, en A/D-omvandlare och en skärm.

Försök ett

För att bestämma vilka frekvenser som skulle användas vid själva undersökningen gjordes ett frekvensresponsvep över fyra av benen (H1HF, H2HF, H1VB, H2HB). Sändare och mottagare placerades först på motsatta sidor av benet och sedan på samma sida (Figur 19 a och b) Ljudvågor med frekvenser mellan 20-300 kHz genererades och sändes in i benen kontinuerligt under 120 sekunder. Detta gjordes vid amplituder som gavs av fem olika voltstyrkor över sändarkristallen: 6, 12, 18, 24 samt 26V. Målet var att hitta frekvenser som går genom benen med tydlig signal hos mottagarsensorn och därmed höga toppar i frekvensspektrat. Förhoppningen var att alla benen skulle ha några gemensamma tydliga frekvenstoppar.

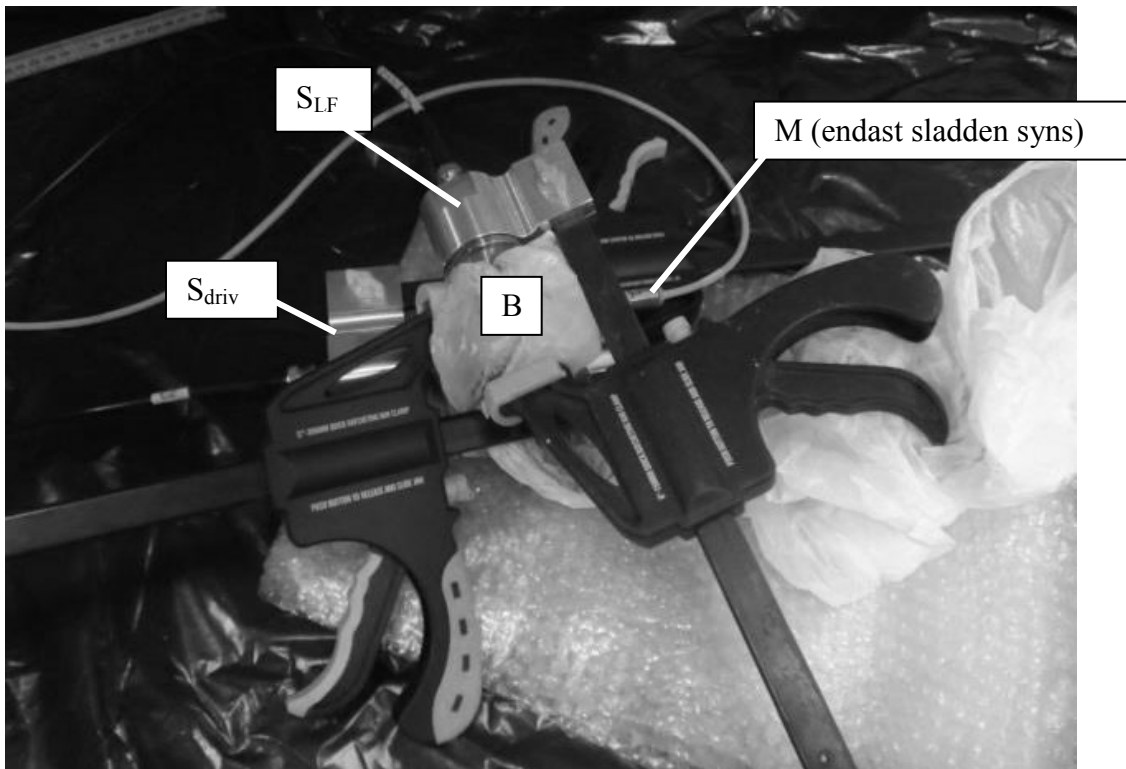
Fyra frekvenser gav toppar för alla fyra benen (40, 52, 64, 83 kHz), oavsett placering av sändare och mottagare. De tre högsta av dessa valdes ut som drivfrekvenser till försöken. Amplituden vid 24V gav minst brus i signalen vid frekvenssvepen och valdes därför till försöken. Den lägsta gemensamma frekvenstoppen användes som riktvärde för att välja frekvenser till en lågfrekvent signal på 35-45 kHz.



Figur 19 a (övre bild) och b (nedre bild). Sändare (S) och mottagare(M) placerades på motstående respektive samma sida av benen vid de första frekvensresponsundersökningarna.

För varje drivfrekvens gjordes två mätvarianter. I den första mätmetoden, ”dubbelfrekvens”, genererades en lågfrekvent signal av en separat generator. Denna sändes samtidigt som var och en av drivfrekvenserna för att få eventuella sprickor att vibrera. I den andra mätmetoden, ”singelfrekvens”, användes ingen yttre lågfrekvent signal. Här utnyttjas istället att energin från drivfrekvenserna sätter benet i svängning i sin egen resonansfrekvens. Mätningen tog 23 sekunder för vardera drivfrekvens i båda metoderna.

Benen placerades stående på högkant på ett bord, med distala delen nedåt. Sändare för drivfrekvens (S_{driv}) respektive lågfrekvens (S_{LF}), samt mottagare (M) fästes vid benet utanpå plastpåsen med hjälp av tvingar (Figur 20). S_{driv} placerades mest distalt på benets medial- eller lateralsida (gick ej att avgöra med säkerhet vad som var vad). S_{LF} placerades proximalt, palmart/plantart. Mottagaren placerades proximalt på motsatt sida om S_{driv} . I singelfrekvensmetoden användes endast S_{driv} och M, men S_{LF} satt kvar på benet under mätningen för att inte rubba uppställningen. Alla sensorer placerades så att varken de eller respektive tving hade direkt kontakt med varandra för att undvika att ljudvågorna skulle gå genom utrustningen istället för genom preparatet.



Figur 20. Försöksuppställning: Två sändare (S) och en mottagare (M) fästes till benet (B) med hjälp av tvingar.

Försök två och tre

Försök två med olinjärt ultraljud, efter traumatisering, utfördes enligt singelfrekvensmetoden ovan då dubbelfrekvensmetoden inte gav några utvärderbara resultat. S_{driv} och M placerades på samma sätt som tidigare. Sändaren för den lågfrekventa signalen användes ej. För att undersöka repeterbarheten undersöktes varje ben (med mjukdelar, efter traumatisering) vid två olika tillfällen (med 12 veckors mellanrum), däremellan var mätutrustningen bortkopplad och benen förvarades i frys.

För ett av benen mättes temperaturen i mjukdelarna före, under och efter ultraljudsundersökningen med en temperaturlogger (National Instruments: NI USB-TC01. Probe: typ J). Proben placerades i kotsensskidan, så nära S_{driv} som möjligt. Temperaturmätningen avslutades då temperaturen stabiliserats och inte stigit på två minuter.

Därefter togs mjukdelarna bort med hjälp av skalpell och de ”nakna” benen undersöktes med singelfrekvensmetoden (försök 3).

Egenskaper hos sidbanden som genererades vid mätningarna användes för att beräkna ett skadevärde för varje ben före och efter tillfogande av spricka/sprickor. Algoritmerna för att beräkna detta skadevärde är utvecklade av Acoustic Agree AB och utfördes av dem.

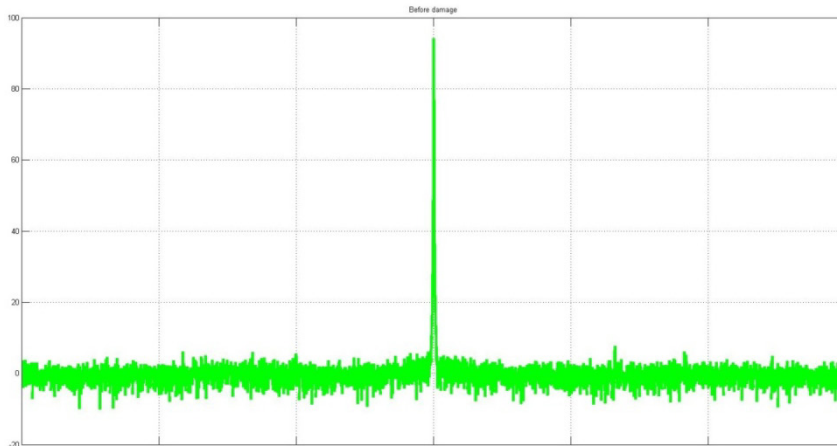
RESULTAT

Dubbelfrekvensmetoden gav inga resultat och användes därför inte vidare i försöken. Den första singelfrekvensmätningen på ben med mjukdelar efter traumatisering gav inga resultat p.g.a. ett tekniskt fel på utrustningen som gjorde att resultaten ej sparades i datorn. I den andra singelfrekvensmätningen på ben med mjukdelar efter traumatisering gav drivfrekvensen 83 kHz bäst signal med avseende på förhållandet mellan brus och toppar. Värden från mätningar med denna frekvens användes därför i beräkningarna.

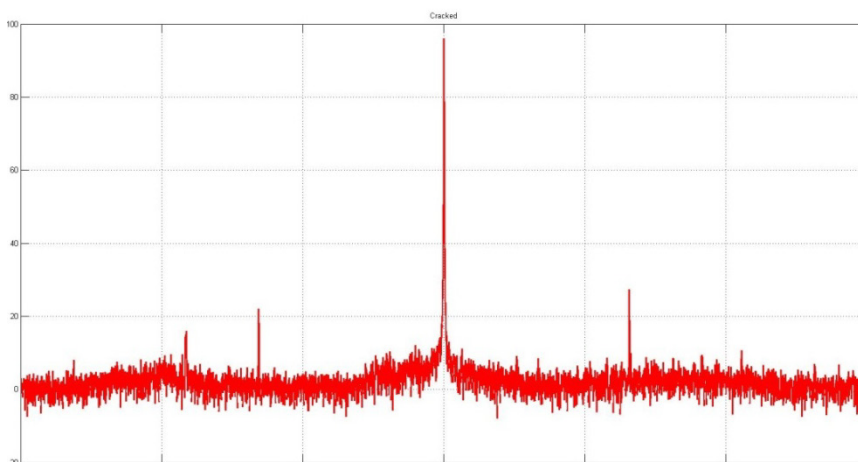
Skadevärden

I figur 21- 23 visas utsignalen från A/D-omvandlaren för H2HF i de tre olika mätningarna med singelfrekvens, 83 kHz: med mjukdelar före trauma (försök 1), med mjukdelar efter trauma (försök 2) samt utan mjukdelar efter trauma (försök 3). Den höga toppen i mitten är det ingående ultraljudets frekvens på 83 kHz, övriga toppar är sidband som uppkommit då vågorna stött på olinjäriteter, t.ex. sprickor. I figur 24 har spektrum från vardera mätning lagts ovanpå varandra för att tydliggöra skillnader och likheter. Figurerna visar endast en del av spektrat, x-axeln fortsätter i båda riktningarna.

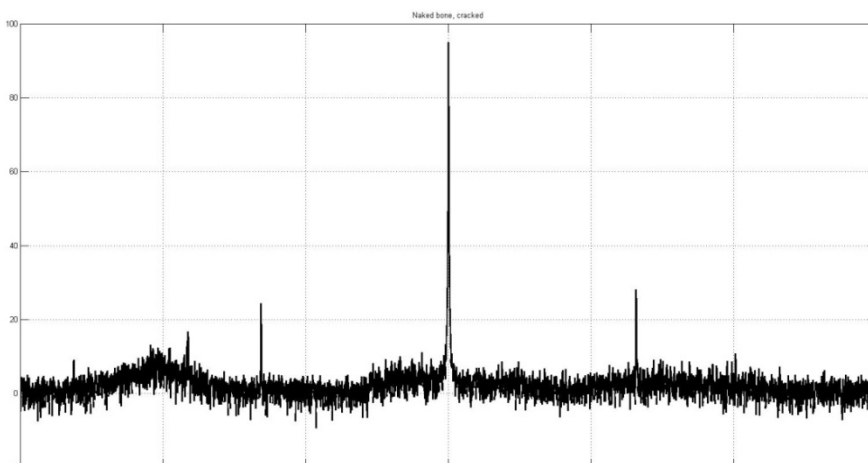
Vissa av sidbanden valdes ut av Acoustic Agree AB för att räkna fram ett skadevärde för respektive mätning. Urvalsmetoden liksom algoritmerna tillhör företaget och kan ej redovisas här. Två olika beräkningssätt, a och b, har använts för att få fram skadevärden för varje ben från de olika mätningarna. Beräkningssätten skiljer sig åt i vilka delar av spektrat som analyseras samt vilka algoritmer som används. I beräkningssätt b har värdena dessutom normaliserats så att alla ben har värdet 100 från start, d.v.s. i mätningen med mjukdelar före traumatisering. Skadevärden för alla ben och alla mätningar visas i Tabell 4.



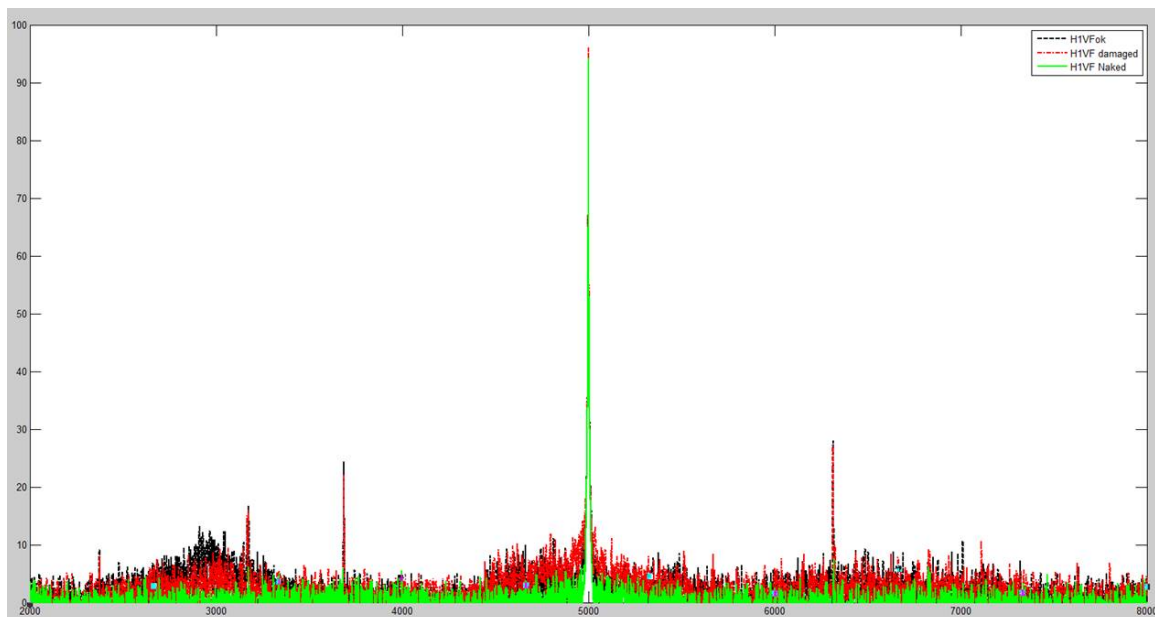
Figur 21. *Frekvensspektrum H2HF med mjukdelar före trauma (försök 1). Decibel på y-axeln, frekvens på x-axeln.*



Figur 22. *Frekvensspektrum H2HF med mjukdelar efter trauma (försök 2). Decibel på y-axeln, frekvens på x-axeln.*



Figur 23 *Frekvensspektrum för H2HF utan mjukdelar efter trauma (försök 3). Decibel på y-axeln, frekvens på x-axeln.*



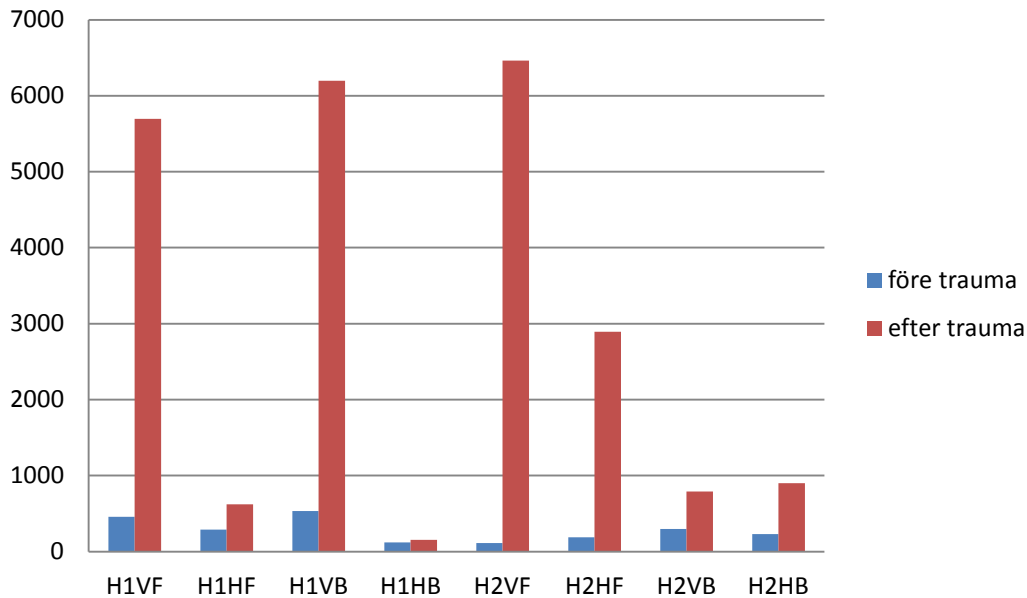
Figur 24. Frekvensspektra för de tre olika mätningarna på H2HF lagda ovanpå varandra. Decibel på y-axeln, frekvens på x-axeln. Grön=ursprungsläge, röd=med spricka och mjukdelar, svart=med spricka utan mjukdelar. Den högsta toppen är det ingående ultraljudet på 83 kHz, övriga toppar är sidband. (Spektrat är inlagt i ett beräkningsprogram, därav står det 5000 under mittentoppen som egentligen är på 83 kHz)

Tabell 4. Skadevärden med beräkningsparameter *a* och *b*. I beräkningssätt *b* har värdena normaliserats så att alla ben har värdet 100 initialt

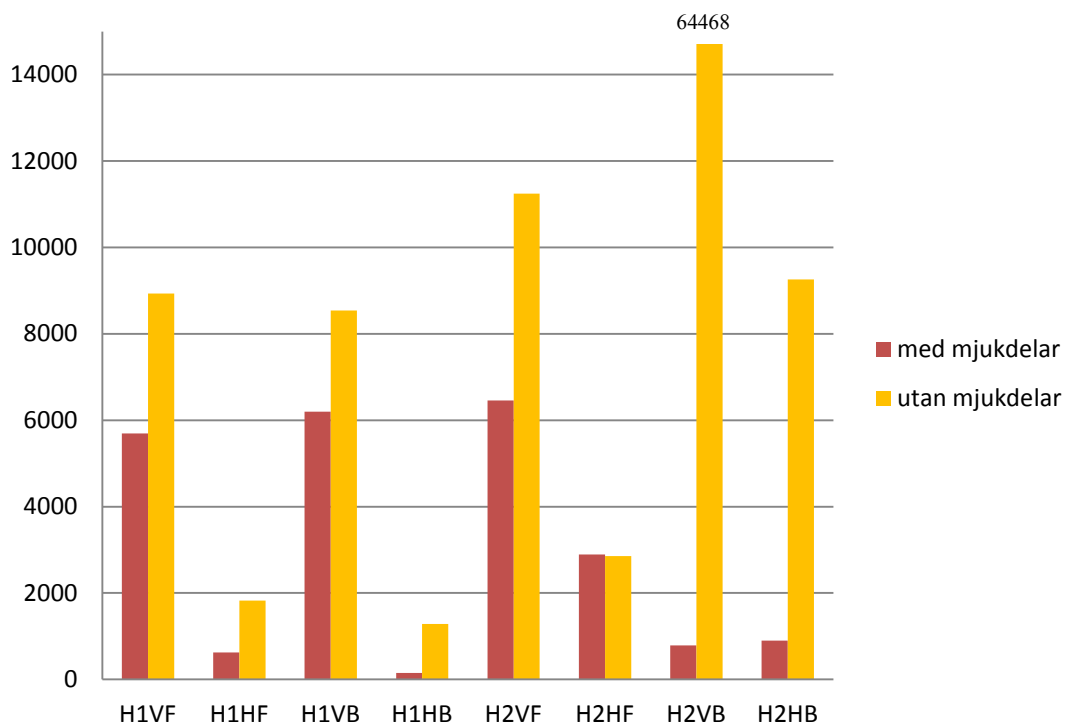
Ben och beräkningsparameter		Med mjukdelar, oskadat	Med mjukdelar, med spricka.	Utan mjukdelar, med spricka
H1VF	a	459	5696	8932
	b	100	1318	2352
H1HF	a	290	624	1825
	b	100	211	1311
H1VB	a	536	6196	8544
	b	100	1248	2800
H1HB	a	123	153	1287
	b	100	100	1061
H2VF	a	111	6461	11249
	b	100	533	673
H2HF	a	187	2893	2856
	b	100	1122	1150
H2VB	a	300	789	64468
	b	100	132	6318
H2HB	a	231	901	9260
	b	100	100	267

Med beräkningsparameter *a* ligger skadevärdet för ben med mjukdelar mellan 111 och 536 före traumatisering. Efter traumatisering är skadevärdet betydligt högre för alla ben utom

H1HB (Figur 25). Mätningen på ben utan mjukdelar, med spricka, ger avsevärt högre skadevärde än med mjukdelar, med spricka, för alla ben utom H2HF (Figur 26). Medelvärden, min- och maxvärden samt standardavvikelse för skadevärden med beräkningsparameter a kan ses i Tabell 5. Det är stor spridning på värdena men trenden är tydlig att NAW ger högre utslag då benet har en spricka.



Figur 25. Skadevärden med beräkningsmetod a för ben med mjukdelar före och efter trauma.



Figur 26. Skadevärden med beräkningsmetod a för ben med spricka, med respektive utan mjukdelar. H2VB utan mjukdelar har värdet 64468, stapeln är kapad.

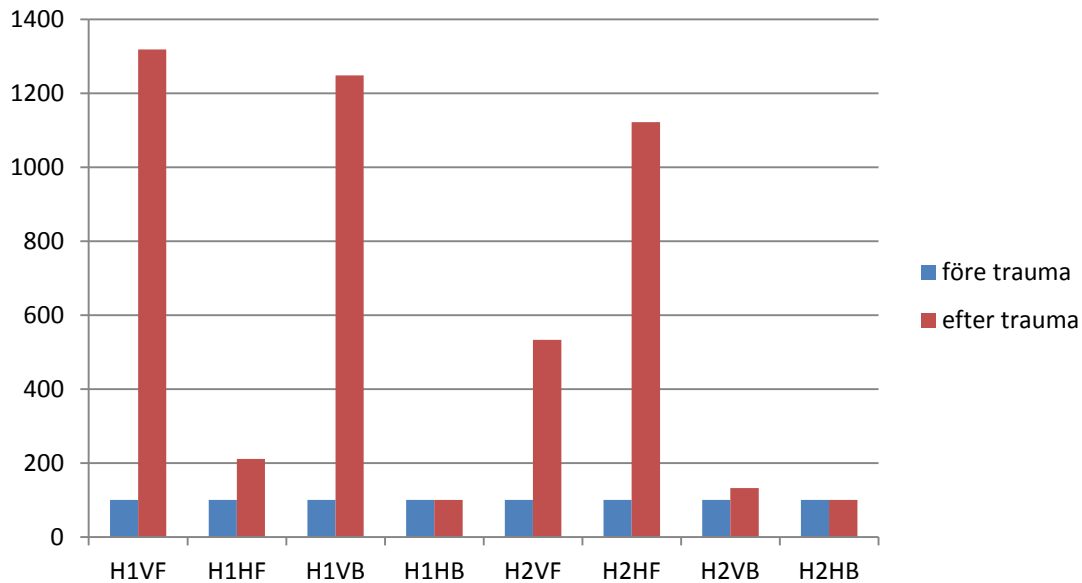
Tabell 5. Skadevärden med beräkningsparameter a: minvärde (min), maxvärde (max), medelvärde (medel) och standardavvikelse (std)

	Min	Max	Medel	Std
Med mjukdelar, oskadat	111	536	280	152
Med mjukdelar, med spricka.	152	6461	2964	2739
Utan mjukdelar, med spricka	1286	64468	13552	20925

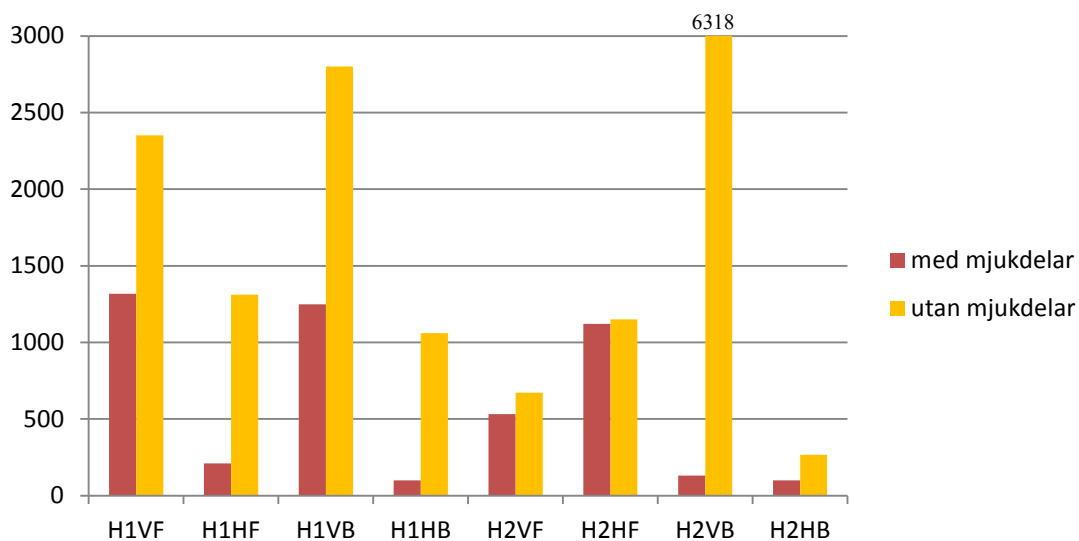
Med beräkningsparameter b har alla värden normaliserats så att ben med mjukdelar före traumatisering har skadevärde 100 som utgångsvärde. Ben med spricka och mjukdelar har högre skadevärde för alla ben utom två som fortfarande har värdet 100 (H1HB samt H2HB) (Figur 27). För ett av benen är skillnaden mycket liten före och efter spricka (H2VB). I Figur 28 ses skadevärden med beräkningsparameter b för ben med spricka med respektive utan mjukdelar. Medelvärden, min- och maxvärden samt standardavvikelse för skadevärden med beräkningsparameter b kan ses i Tabell 6.

Tabell 6. Skadevärden med beräkningsparameter b: minvärde (min), maxvärde (max), medelvärde (medel) och standardavvikelse (std)

	Min	Max	Medel	Std
Med mjukdelar, med spricka.	100	1318	596	510
Utan mjukdelar, med spricka	267	6318	1992	1811



Figur 27. Skadevärden med beräkningsmetod b för ben med mjukdelar före och efter trauma. Värdena är normaliserade så att alla ben har värdet 100 före trauma.



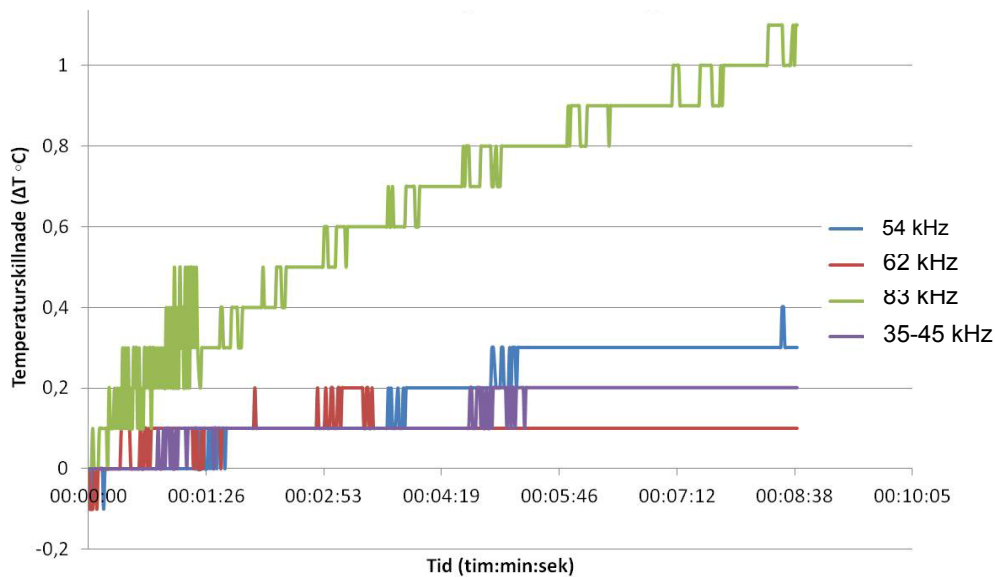
Figur 28. Skadevärden med beräkningsmetod b för ben med spricka, med respektive utan mjukdelar. H2VB utan mjukdelar har värdet 6318, stapeln är kapad

Det går inte att se några samband mellan storleken på skadevärdet och sprickans längd eller bredd.

Temperaturmätning

I ett av benen (med mjukdelar, före trauma) mättes temperaturen under mätningarna med singelfrekvensmetoden. Temperaturen steg från 18 till 19,1 grader C i mjukvävnaden under en ultraljudsundersökning (Figur 27). Stigningen fortsatte i åtta minuter då den högsta

frekvensen (83 kHz) användes (ultraljudet var igång 23 sekunder per frekvens). De lägre frekvenserna gav en temperaturökning på 0,1-0,3 grader C.



Figur 29. Temperaturutvecklingen under ultraljudsundersökning vid olika frekvenser. HF=högfrekvent signal. LF=lågfrekvent signal (som användes vid dubbelfrekvensmetoden). Temperaturmätningen avslutades då temperaturen stabiliserats, diagrammet är kapat där plattan börjar.

DISKUSSION

Detta var en explorativ studie för att undersöka om olinjärt ultraljud skulle kunna ha en framtid som diagnostiskt hjälpmedel inom veterinärmedicinen. I studien valdes att undersöka kotben från häst för att det skulle vara lätt att transportera materialet till försöksutrustningen samt för att det finns möjlighet att undersöka dessa med DT vilket behövdes som referens. Det finns även en potential för metoden att göra nytta i diagnostik av fissurer/frakturer hos just häst vid tillfällena då annan bilddiagnostik inte är ett alternativ.

I tidigare forskning på olinjära ultraljudsmetoder har man endast gjort mätningar på små preparat av rent skelettben utan några mjukdelar. Utifrån dessa försök är det svårt att dra slutsatser om hur metoderna skulle fungera *in vivo*, då större delar måste undersökas och det finns mjukdelar att ta hänsyn till. Benen som använts har dessutom varit av humant eller bovint ursprung vilket skiljer sig i sin mikrostruktur från ekvint ben. Såvitt författaren känner till har inga försök hittills gjorts med ekvint ben inklusive mjukdelar i syfte att utvärdera om olinjärt ultraljud skulle kunna användas *in vivo* för att detektera sprickor i hästskelett.

Datortomografi

Med upplösningen som användes vid datortomografiundersökningarna på UDS bör man kunna se sprickor av storleken 0,1 mm. Vi såg inga sprickor hos något ben vid den första undersökningen. Inga ben hade heller cystor. Alla ben hade milda homogena benpålagringar och häst 1 hade mild subkondral skleros proximalt på alla ben. H2HF hade diffusa

ansamlingar av något med metall-/kontrastdensitet i området för kotsenskidan. Detta kan ha varit rester av jord som gnuggats in i fabricerade sår under övningsoperationen som hästen användes i före denna studie. Det verkar dock inte ha påverkat NAW-värdet då H2HF hade ett av de lägsta skadevärdena från start (med beräkningssätt a).

DT efter traumatisering gjordes på tinade ben som sen frystes innan nästa ultraljudsundersökning. Troligen har sprickorna blivit större mellan DT och ultraljudsundersökning p.g.a. vatten i sprickorna som utvidgats vid frysning. Eftersom studien i detta skede handlar om att se om metoden detekterar sprickor överhuvudtaget på ett relevant sätt och inte på hur små sprickor den hittar så bedöms det inte viktigt om sprickorna ändrats. Huvudsaken är att det fanns minst en spricka mer än i utgångsläget, oavsett storlek. Av samma anledning accepterades en sämre upplösning på DT-undersökningen av benen efter traumatisering jämfört med DT-undersökningen av benens utgångsläge. Det var viktigare att kunna göra en noggrann bedömning av benens tillstånd från start då vi förutspådde att eventuella skador då skulle vara i en betydligt mindre storleksklass. Vi har ej undersökt om sprickorna innehöll luft vilket skulle kunna påverka skadevärdet. I framtida studier bör undersökas om detta är en parameter som måste kontrolleras eftersom luft ej är förväntat i fissurer *in vivo*.

Detektion av sprickor

Med beräkningssätt a identifierade⁵ NAW sprickorna i alla ben. För H1HB var skillnaden i skadevärde relativt liten, endast 24 % ökning. Övriga bens skadevärde ökade mellan 115-572 %. Studien ger inte tillräckligt stort underlag för att göra några relevanta statistiska beräkningar men i figur 25-28 syns en tydlig trend att skadevärdet blir högre efter traumatisering.

Det är svårt att dra några slutsatser om skadevärdets storlek utifrån materialet i denna studie. Andelen defekt ben uppskattades genom att mäta sprickans utbredning i benet relativt benets längd. H2VF var defekt till 61 % och hade visserligen högst skadevärde (beräkningsparameter a) med mjukdelar efter traumatisering (6461), men H2VB var defekt till 60 % och hade bland de tre lägsta skadevärdena (789). H1VB fick en grenad spricka och skadevärdet är näst högst (6196), men det hade också den bredaste sprickan (0,9 mm) samt en luftspalt mellan kortikalt och spongiöst ben som kan ha bidragit till det höga värdet. Inte heller om man jämför benens skadevärden efter att mjukdelarna tagits bort går det att se något mönster relativt storlek på sprickorna.

Med beräkningsparameter b normaliseras skadevärdena så att alla ben har 100 som ursprungsläge. 100 har valts för att NAW alltid ger ett visst utslag och värdet bör därför inte sättas till 0 som kanske känns som det logiska för ett startvärde (Haller, K. Acoustic Agree AB, pers. medd. 141207). Med denna metod identifierade NAW sprickorna i 6/8 ben med mjukdelar. För ett av dessa ben (H2VB) var skillnaden i skadevärde mycket liten före och efter trauma. Att använda normaliserade värden kan vara ett relevant sätt att räkna då man undersöker mer homogena objekt och vet att utgångsläget är felfritt. Det är dock känt att strukturen hos ben varierar mycket både mellan och inom individer. Detta kan också ses i att

⁵ Skadevärdet för benet var högre efter traumatisering än före.

spridningen i ingångsskadevärde med beräkningsparameter a är stor, 111-536. När man undersöker en viss individ första gången vid ett misstänkt trauma kommer man inte att ha normalvärdet för just denna individ. Möjligen kan denna metod användas när man undersökt ett stort antal ben före och efter spricka och därmed kunnat kalibrera metoden mer. Kanske skulle denna metod också fungera om man ville följa en hästs benkvalitet (med avseende på mikrosprickor och stressfrakturer). I denna studie har vi inte kunnat undersöka om NAW hittar mikrosprickor men detta är troligt om man tittar på andra studier med olinjärt ultraljud (Broda et al., 2014. Hauptert et al., 2014. Muller et al., 2008).

Vid frakturläkning bildas först primärt ben, med kollagenfibrerna i oordning. Detta borde kunna ge utslag med NAW då det troligen innebär en högre grad av inneboende olinjäritet än det ordnade sekundära benet med sin osteonstruktur. Dock borde en öppen spricka ge ännu högre utslag. En intressant studie skulle vara att följa hästar med frakturer och göra upprepade mätningar med regelbundna mellanrum.

Mjukdelarnas påverkan på resultatet

För alla ben utom ett är skadevärdet (beräkningssätt a) utan mjukdelar betydligt större än med mjukdelar. För H2HF är de i princip lika stora (2893 med, 2856 utan). Genom att mäta direkt på benen utan annan vävnad fås en större utväxling på skadevärdet. Detta beror på att vågamplituden i benet, skelettdelen, blir avsevärt högre än när annan vävnad kan dämpa vågens amplitud. Det var också svårt att få sensorerna att sitta ordentligt på benen med mjukdelar, de gled iväg så att de mest hade mjukdelar mellan sig. Huruvida sensorernas placering bidrog till den stora spridningen i skadevärde för ben med mjukdelar bör undersökas vidare.

Det går inte att se att mjukdelarnas tillstånd skulle påverka benens skadevärde utifrån denna studies material. H1VB hade inga suturerade snitt eller uppenbara skador på sensor men ändå högst skadevärde i första mätningen. Lägst skadevärde hade H2VF som hade ett långsgående snitt längs hela benet som var suturerat med 7 korsstygn.

En fortsatt studie skulle kunna utvärdera skadevärdet i endast mjukdelar före och efter kirurgisk behandling (skalpellsnitt och sutur) respektive ”skada i fält” (krossår, skrubbsår och dyl.). Även broskskadors påverkan på skadevärdet bör studeras.

Metod

Sensorerna placerades så lika som möjligt på alla ben. Planen var från början att göra flera mätningar på varje ben med sensorerna placerade på olika platser. Det visade sig vara mycket svårt att fästa sensorerna så att de ej skulle ha direktkontakt med varandra. Det gick i princip bara på ett sätt. Under frekvensresponssvepet i början av studien användes endast två sensorer, då kunde de placeras på samma respektive motstående sida av benet och detta gav samma resultat. Enligt tidigare undersökningar på andra material spelar det inte någon roll var man placerar sensorerna (Haller, K. Acoustic Agree AB. Pers. medd. 2014-08-19). Detta stöds också av den underliggande teorin att ljudvågorna fyller upp hela materialet istället för att reflekteras.

Sensorernas utformning i denna studie lämpar sig inte för användning *in vivo*. För distala ben kan man tänka sig sensorer i form och storlek som en enkrona invävda i ett band som kan spännas runt hästens ben. Liknande sensorer finns utvecklade men har då fästs till objektet med lim (Haller, K. Acoustic Agree AB. Pers. medd. 2014-08-19). Detta skulle troligen ge jämnare resultat då de skulle vara lättare att applicera på samma sätt varje gång. Ingen kraft lades ned på att kontrollera omgivningsparametrar som temperatur eller luftfuktighet då syftet endast var att undersöka om metoden kunde detektera en spricka eller inte. Om man skulle vilja undersöka metodens sensitivitet för mikrofrakturer skulle mer kontrollerade försök behövas. Man kunde t.ex. göra belastningsförsök med upprepade ultraljudsmätningar efter hand. Det skulle även kräva känsligare metoder att validera mikrosprickorna.

Beräkningarna utfördes helt och hållet av Acoustic Agree AB utan någon insyn av författaren. Det är svårt att analysera resultaten utan full vetskap om hur de uppkommit. Med ett större materialunderlag och med blindade försök hade studiens tillförlitlighet ökat.

Material

Endast åtta ben undersöktes i denna studie. Detta p.g.a. tidsbrist, då företaget som tillhandahöll utrustning och utförde beräkningarna hade många andra uppdrag under perioden. Det hade varit önskvärt att se resultat från flera mätningar på varje ben för att se om värdena är reproducerbara. Ett större underlag med fler ben hade också gett mer information om normalvariationen hos oskadade ben hos hästar av olika kön och ålder.

Vi valde att undersöka just kotben dels av praktiska skäl då dess storlek gör dem lätta att transportera och hantera. Men också eftersom kotbenens proximala del är en vanlig lokalisering för fissurer/frakturer hos häst. Positivt var att fissurerna som uppkom efter traumatisering av benen var realistiska (Ley, C. UDS. pers. medd. 141124).

I framtida studier bör även andra ben undersökas samt större delar av hästen. T.ex. från hov till karpus så att fler ben och leder ingår i materialet. Detta för att studera hur mycket ultraljudet sprider sig och hur man ska göra för att kunna lokalisera en fissur/fraktur till ett visst ben. I dagsläget antar vi att ultraljudet fyller upp hela det undersökta preparatet, kanske går det även ut i bordet som preparaten stod på under undersökningen. Detta måste undersökas. Det finns metoder för att lokalisera en defekt som kanske skulle kunna anpassas till häst (Haller, 2007). Ett annat alternativ är att försöka begränsa ultraljudets spridning så att man vet att man bara undersöker ett visst område (Haller, K. Acoustic Agree AB, pers. medd. 140819).

Säkerhet

Temperaturmätningen som gjordes under en av mätningarna visar att temperaturen steg drygt en grad i vävnaden då den högsta frekvensen användes. Denna frekvens var också den som gav bäst resultat vad gäller sprickdetektion och alltså den vi skulle vilja gå vidare med. Enligt American Institute of Ultrasound in Medicine, AIUM, (2009) har det ej observerats signifikanta, negativa biologiska effekter i vävnad vid en temperaturhöjning på max 2 grader under upp till 50 timmar. För en temperaturhöjning på 4 grader är gränsen 16 minuter. Temperaturhöjningen under våra försök kan således ses som försumbar. Dock bör fler försök

göras under mer kontrollerade former där vävnaden har kroppstemperatur från början. Det skulle också vara intressant att sätta temperaturproben i själva skelettbenet då ben absorberar mer värme än mjukdelar (AIUM, 2009).

KONKLUSION

NAW kan detektera sprickor i kotben från häst. Mjukdelarna dämpar signalerna och det blir därför lägre skadevärde när mjukdelarna finns kvar jämfört med när de är borttagna. I denna studie kan vi inte dra några slutsatser om hur snitt, suturer eller andra skador i mjukdelarna påverkar skadevärdet. Metoden kan troligen kalibreras att ge högre skadevärde för sprickor genom att välja ut ”rätt” område av frekvensspektrat.

Mer studier är nödvändiga för att säkerställa vad som mäts och vad som ger utslag hos NAW. Utrustningen måste bli mindre för att kunna användas i fält, den måste också anpassas till hästens anatomi. Med detta uppfyllt skulle NAW kunna vara ett värdefullt komplement till dagens bilddiagnostiska metoder för att diagnostisera fissurer/frakturer hos häst.

REFERENSER

- American Institute of Ultrasound in Medicine, (2009). Statement on Heat. Tillgänglig: <http://www.aium.org/officialStatements/17>.
- Barnes, J. Ed. (1992). Characteristics and control of Contrast in CT. *RadioGraphics*. Vol. 12 (4), ss 825-837.
- Björnö, L. (2010). Introduction to Nonlinear Acoustics. *Physics Procedia* Vol. 3, ss. 5–16.
- Brnjac-Kraljevic, J. (2009). Physical Bases of Medical Ultrasound. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. Vol. 3 (2), ss. 1-9.
- Broda, D., Staszewski, W.J., Martovicz, A., Uhl, T., Silberschmidt, V.V. (2014). Modelling of Nonlinear Crack-Wave interactions for Damage Detection based on Ultrasound - a Review.
- Burr, D.B., Martin, R.B., Schaffler M.B. & Radin E.L. (1985). Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *Journal of Biomechanics*. Vol. 18 (3), ss. 189-200.
- Chaudhuri, R.N. (2010). *Waves and Oscillations*. Daryaganj: New Age International. Tillgänglig: E-brary. [2014-11-21]
- Donahue, S.W. & Galley, S.A. (2006). Microdamage in bone: Implications for Fracture, Repair, Remodeling, and Adaptation. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. Vol 34 (3), ss. 215-271.
- Duck, F.A. (2002). Nonlinear acoustics in diagnostic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 28 (1), ss. 1-18.
- Dykgraaf, S., Firth, E.F., Rogers C.W., Kawcak, C.E. (2007). Effects of exercise on chondrocyte viability and subchondral bone sclerosis in the distal third metacarpal and metatarsal bones of young horses. *The Veterinary Journal* . Vol. 178 ss. 53–61.
- Dyson, S.J., Pilsworth, R.C., Twardock, A.R. & Martinelli, M.J. (2003). *Equine scintigraphy*. Ashford, UK: Equine Veterinary Journal Ltd.

- Guyer, R.A., Johnson, P.A. (1999). *Nonlinear Mesoscopic Elasticity: Evidence for a New Class of Materials*. Physics Today. Vol. 52, ss. 30-36.
- Haller, K., (2007). *Nonlinear acoustics applied to nondestructive testing*. Lic. Blekinge Tekniska Högskola. Karlskrona: Printfabriken.
- Haupt S., Guérard, S., Peyrin, F., Mitton, D. & Laugier, P. (2014). Non Destructive Characterization of Cortical Bone Micro Damage by Nonlinear Resonant Ultrasound Spectroscopy. *PLoS ONE*. Vol 9 (1): e83599. doi:10.1371/journal.pone.0083599
- Jhang, K-Y., (2009). Nonlinear Ultrasonic Techniques for Nondestructive Assessment of Micro Damage in Material: A Review. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*. Vol. 10 (1), ss. 123-135.
- Junqueira, L.C. & José, C. (2003). *Basic Histology Text and Atlas*. 10. ed. USA: McGraw-Hill Companies
- Leighton, T.G. (2007). What is ultrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Vol. 93 (1-3), ss. 3–83.
- Kimpe, T. & Tuytschaever, T. (2007). Increasing the Number of Gray Shades in Medical Display Systems - How Much is Enough? *Journal of Digital Imaging*. Vol. 20(4), ss. 422-432.
- Miller, D., Smith, N., Bailey, M., Czarnota, G., Hynynen, K., Makin, I & American Institute of Ultrasound in Medicine Bioeffects Committee. (2012). Overview of Therapeutic Ultrasound Applications and Safety Considerations. *Journal of Ultrasound in Medicine*. Vol. 31 (4), ss. 623-634.
- Mobile Animal CT. *Mobile Animal CT Services*. <http://animalctscan.com/services.html> [141207]
- Muller, M., Sutin, A., Guyer, R., Talmant, M., Laugier, P. & Johnson, P.A., (2005). Nonlinear resonant ultrasound spectroscopy (NRUS) applied to damage assessment in bone. *Journal of Acoustical Society of America*. Vol. 188 (6), ss. 3946-3952.
- Muller, M., Mitton, D., Talmant, M., Johnson, P. & Laugier, P. (2008). Nonlinear ultrasound can detect accumulated damage in human bone. *Journal of Biomechanics*. Vol. 41 (5), ss. 1062-1068.
- Murray, R.C. (2011). *Equine MRI*. West Sussex, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Nationalencyklopedin, olinjärt material. Tillgänglig:
<http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/olinjärt-material>. [2014-11-23]
- Nelson, T.R., Fowlkes, B., Abramowicz, J.S. & Church, C.C. (2009). Ultrasound Biosafety Considerations for the Practicing Sonographer and Sonologist. *Journal of Ultrasound in Medicine*. Vol. 28 (2), ss. 139-150.
- Nyland, T.G. & Mattoon, J.S. (1995), *Veterinary diagnostic ultrasound*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Orsini, J.A. & Divers, T.J. (2014). *Equine Emergencies Treatment and Procedures*. 4. ed. St Louis: Elsevier.
- Renaud, G., Callé, S., remenieras, J-P. & Defontaine, M. (2008). Non-linear acoustic measurements to assess crack density in trabecular bone. *International Journal of Non-Linear Mechanics*. Vol. 47 (3) ss. 194-200.s
- Ross, M.W., Dyson, S.J., (2011). *Lameness in the Horse*. 2.ed. Missouri: Elsevier Saunders.

- Roylance, D., (2000). *Atomistic Basis of Elasticity*. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology. Tillgänglig: <http://www.slideshare.net/dellelce/117812422-atomisticbasisofelasticity> [2014-11-23]
- Schwarz, T. & Saunders, J., (ed.) (2011). *Veterinary Computed Tomography*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Sjaastad, Ö.V. ,Hove K. & Sand O. (2003). *Physiology of Domestic Animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Taylor, D., Hazenberg J.G. & Lee, C. (2007). *Living with cracks: Damage and repair in human bone*. *Nature Materials*. Vol. 6 (4), ss. 263-268
- Thrall, D.E., (2013). *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. 6. ed. Missouri: Elsevier Saunders.
- Tole, M.M. (2005). *Basic Physics of Ultrasonographic Imaging*. Malta: World Health Organisation. Tillgänglig: http://www.isradiology.org/isr/books_basic.php [2014-11-23]
- Tranquart, F., Grenier, N., Erder, V. & Pourcelot, L. (1999). Clinical Use of Ultrasound Tissue Harmonic Imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology*. Vol. 25 (6), ss. 889 – 894.
- Truax, B. (ed.) (1999). *Handbook for Acoustic Ecology*. 2. ed. Cambridge Street Publishing. Tillgänglig: <http://www.sfu.ca/sonic-studio/handbook/index.html> [2014-11-20]
- Zacharias, K., Balabanidou, E., Hatzokos, I., Rekanos, I.T. & Trochidis, A. (2009). Microdamage evaluation in human trabecular bone based on nonlinear ultrasound vibro-modulation (NVUM). *Journal of Biomechanics*. Vol 42 (5) ss. 581-586.
- Zedda, M., Lepore, G., Manca, P., Chisu, V. & Farina, V. (2008). Comparative Bone Histology of Adult Horses (*Equus caballus*) and Cows (*Bos Taurus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*. Vol 37 (6), ss. 442-445.
- Ziegler, L., O'Brien, R.T. (2002). Harmonic ultraslud: a review. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. Vol. 43 (6) ss. 501-509.