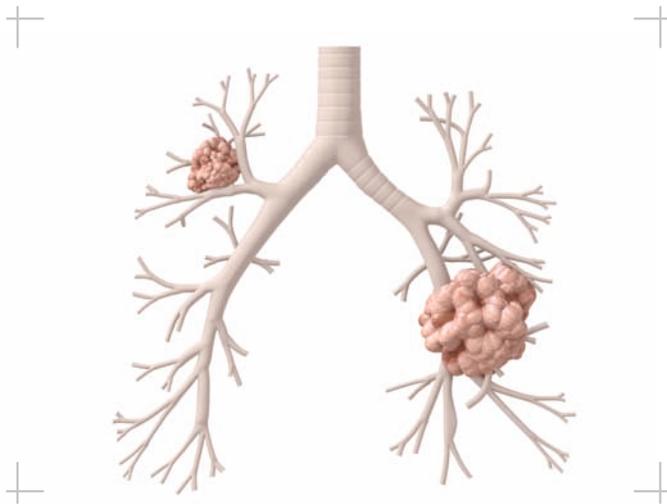


Morphometrische Analyse des Azinus der humanen Lunge mittels synchrotron-basierter Mikro-Computertomographie

Kathrin Julia Ebner, geb. Korbel



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Morphometrische Analyse des Azinus der
humanen Lunge mittels synchrotron-basierter
Mikro-Computertomographie**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Kathrin Julia Ebner, geb. Korbel
aus
Schwalmstadt

Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
Abteilung Diagnostische Radiologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter:
Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich
und
Prof. Dr. med. A. Günther

Tag der Disputation:
11.12. 2014

Gewidmet meinem lieben Opa

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1. EINLEITUNG	1
1.1 ANATOMIE DER ATEMWEGE.....	2
1.2 MORPHOMETRIE.....	4
1.2.1 Morphometrie des Bronchialbaumes	6
1.2.2 Morphometrie – Limitationen	7
1.3 BILDGEBUNG.....	8
1.3.1 Grundlagen der Mikro- Computertomographie.....	10
1.3.2 Grundlagen des Synchrotrons	11
1.3.3 Anwendung der Mikro- Computertomographie.....	12
1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 HERKUNFT DER HUMANEN LUNGE	17
2.2 PRÄPARATION DER HUMANEN LUNGE UND HERSTELLUNG DER GEWEBEPROBEN	17
2.2.1 Entfaltung und Fixation der Lunge mit Formalindampf	17
2.2.2 Ausstanzen der Gewebezylinder unter CT- Kontrolle.....	19
2.2.3 Kontrastierung der Proben mit Osmiumtetroxid	21
2.2.4 Trocknung der Gewebezylinder	21
2.3 BILDGEBUNG – SYNCHROTRON- BASIERTE MIKRO- COMPUTERTOMOGRAPHIE	23
2.4 QUANTITATIVE ANALYSE DER INTRAAZINÄREN ATEMWEGE.....	23
2.4.1 Binarisierung der Grauwerte	23
2.4.2 Segmentierung der Azini.....	24
2.4.3 Analyse der binarisierten Datensätze	25

Inhaltsverzeichnis	II
2.5 HISTOLOGISCHE VERGLEICHSUNTERSUCHUNGEN	25
2.6 STATISTISCHE ANALYSEN	26
3. ERGEBNISSE.....	27
3.1 DARSTELLUNG DER MIKROARCHITEKTUR DER HUMANEN LUNGE MIT DER SYNCHROTRON-BASIERTEN MIKRO-CT TECHNIK	27
3.2 ERGEBNIS DER HISTOLOGISCHEN VERGLEICHSUNTERSUCHUNG	28
3.3 NACHBEARBEITUNG DER VOLUMENDATENSÄTZE	28
3.3.1 Binarisierung der Volumendatensätze	28
3.3.2 Segmentation der Azini.....	29
3.3.3 Erstellen der Mittelachse.....	31
3.4 ERGEBNISSE DER MORPHOMETRISCHEN ANALYSE	32
3.4.1 Volumen, Oberfläche und Anzahl der Generationen	32
3.4.2 Anzahl der Tochteräste pro Segment (Generation) und Abhängigkeit von der Segmentlänge und dem Volumen der Azini	33
3.4.3 Longitudinale Länge der Luftwege innerhalb des Azinus	35
3.4.4 Segmentlänge und Verzweigungswinkel.....	36
3.4.5 Innerer und äußerer Durchmesser	37
4. DISKUSSION.....	40
4.1 ERGEBNISSE DER MORPHOMETRISCHEN ANALYSE	41
4.1.1 Volumen und Oberfläche	41
4.1.2 Anzahl der Generationen	41
4.1.3 Geometrie.....	41
4.1.4 Longitudinale Länge intraazinärer Atemwege	42
4.1.5 Innerer und äußerer Durchmesser	42
4.2 VERGLEICH VON HISTOMORPHOMETRIE UND MIKRO- CT- TECHNIK	43
4.2.1 Histomorphometrie	43
4.2.2 Mikrocomputertomographie	43
4.2.2.1 Synchrotronstrahlenquellen	44

Inhaltsverzeichnis	III
4.3 VERGLEICH DER PRÄPARATIONSMETHODEN	45
4.4 NACHBEARBEITUNG DER DATENSÄTZE	45
4.5 LIMITATIONEN	46
5.ZUSAMMENFASSUNG	48
5.1 Deutsch	48
5.2 Englisch.....	49
6.ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	50
7.LITERATURVERZEICHNIS	51
8.PUBLIKATIONEN	58
9.ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	59
10.DANKSAGUNG	60
11.LEBENS LAUF	61

1 Einleitung

Die Aufgabe der Lungen besteht in der Atmung, also dem Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut. Der Transport von Sauerstoff aus der Umgebungsluft in das Blut beinhaltet die Ventilation durch die Atemwege und die Diffusion durch die Gewebebarriere aus Alveolaroberfläche und Gefäßwand.¹

Der Prozess des Gasaustausches muss sehr effizient sein. Das durch die Lungen fließende Blut nimmt den gesamten vom Körper benötigten Sauerstoff aus der Atemluft auf und gibt gleichzeitig das vom Körper produzierte Kohlendioxid an die in der Lunge enthaltene Luft ab; dies geschieht, vor allem bei körperlicher Anstrengung, im Bruchteil einer Sekunde. Ein derart komplexer Vorgang erfordert eine besondere Lungenarchitektur.²

Das Design der Atemwege und Blutgefäße der Lunge ist speziell ausgerichtet auf die Effizienz des Gasaustausches, im Hinblick auf die Sicherstellung der Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff.^{3,4}

Für einen optimalen Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid müssen Blut und Luft in einen sehr engen Kontakt über eine möglichst große Fläche gebracht werden.¹ Die humane Lunge eines Erwachsenen ermöglicht einen Luft-Blut-Kontakt über eine innere Lungenoberfläche in der Größenordnung eines Tennisplatzes und erschafft eine Diffusionsbarriere, die 50 mal dünner ist als ein Blatt Luftpostbriefpapier.²

Kleine Variationen in der Geometrie der Lungenstruktur induzieren große Veränderungen in der Physiologie der Atmung.⁵ Während die Partialdruckdifferenzen zwischen Alveolarluft und Kapillarblut, die die treibende Kraft der Diffusion darstellen, von einer adäquaten Ventilation und Perfusion der gasaustauschenden Einheiten abhängen, wird die Diffusionskapazität bestimmt von der Dicke und Fläche der Diffusionsmembran.^{3,6}

Eine Oberfläche von bis zu 140 m² befindet sich gefaltet in den Pleurahöhlen, welche ungefähr ein Volumen von 4 Litern besitzen. Diese Tatsache legt nahe, dass die Strukturen des Lungenparenchyms sehr klein und überaus komplex gestaltet sein müssen.⁷ Es entsteht eine komplizierte morphologische Struktur.⁸ Detaillierte morphometrische Daten der Lungenarchitektur, insbesondere der intraaziniären Atemwege, sind schwer zu ermitteln.

Die Kenntnis der Morphologie des humanen Azinus, als grundlegende funktionelle Einheit, ist Grundlage für das Verständnis der physiologischen Vorgänge des Gasaustausches und der Pathophysiologie von Erkrankungen des Respirationstraktes.

Der Einsatz von Mikro- Computertomographen (μ CT) eröffnet auf diesem Gebiet neue Möglichkeiten der detaillierten Darstellung von Mikrostrukturen und deren quantitativen Analyse.

1.1 Anatomie der Atemwege

Die Lunge ist ein parenchymatöses Organ, das aus einem einzigen Lungendivertikel des embryonalen Pharynx (Vorderdarm) entsteht. Durch mehrere dichotome Teilungen entwickeln sich daraus die unzähligen Verzweigungen des Bronchialbaumes.⁹

Die enge Assoziation der Blutgefäße und der Atemwege ist ein Ergebnis der Lungenentwicklung. Die sich teilende Lungenknospe wächst lateral in das Mesenchymbett ein. Der Teilungsprozess der Lungenanlage geschieht in Interaktion mit dem darunter liegenden Mesenchym. Von Anfang an enthält das umgebende Mesenchym ein lockeres Gefäßnetzwerk, welches die knospenden Luftwege umgibt und der Kontur der sich verzweigenden Atemwege folgt.¹⁰

Der Respirationstrakt besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Bereichen: den konduktiven Bronchien und den intraaziniären Luftwegen. Die konduktiven Bronchien haben die Aufgabe, die Atemluft in das Lungenparenchym zu leiten.⁷ Innerhalb der Azini findet der Gasaustausch statt. Die am Gasaustausch teilnehmenden Lungenabschnitte machen 90% des Lungenvolumens aus, die restlichen 10% entfallen auf Bronchien und Blutgefäße der konduktiven Zone.¹¹

Die humane Lunge besteht aus ungefähr 30.000 Azini.¹⁰ Loeschke definierte den Bronchiolus terminalis als „Stamm“ des Azinus.¹² Die Azini beinhalten somit alle Alveolen tragenden Anteile der Atemwege. Die ersten Alveolen sieht man in der Wand der ersten Generation der Bronchioli respiratorii.^{13,14} Im Verlauf der Bronchioli respiratorii nimmt die Anzahl der Alveolen zu. Die Ducti alveolares sind vollständig von Alveolen umgeben.¹⁵

Annähernd 10.000 Alveolen sind zu einer gasaustauschenden Einheit, dem Azinus, zusammengefasst.¹⁰

Die große Oberfläche der Lunge eines Erwachsenen wird gebildet von den ungefähr 300 Millionen Alveolen.² Es entsteht eine Oberfläche von bis zu 140 m².

Eines der grundlegenden Probleme der funktionellen Architektur der Lunge besteht darin, die mehreren Millionen am Gasaustausch teilnehmenden Strukturen gleichmäßig zu belüften und zu durchbluten. Die Lösung dieses Problems liegt in der Konstruktion eines Bronchialbaumes, welcher einen einzigen Stamm, die Trachea besitzt und um dessen Endäste die gasaustauschenden Abschnitte der Lunge so angeordnet sind,

dass jede Alveole so nah wie möglich an der Trachea liegt. Die Lungengefäße folgen den Verzweigungen des Bronchialbaumes dicht anliegend.¹⁰

Beginnend mit der Trachea teilen sich die Atemwege über mehrere Generationen zunächst in Bronchien und Bronchiolen, welche schließlich in die intraazinären Luftwege übergehen. Auch in den Azini findet eine weitere Aufzweigung in Bronchioli respiratorii und Ducti alveolares statt. Der Bronchialbaum endet mit den Sacculi alveolares¹⁰ (siehe Abbildung 1).

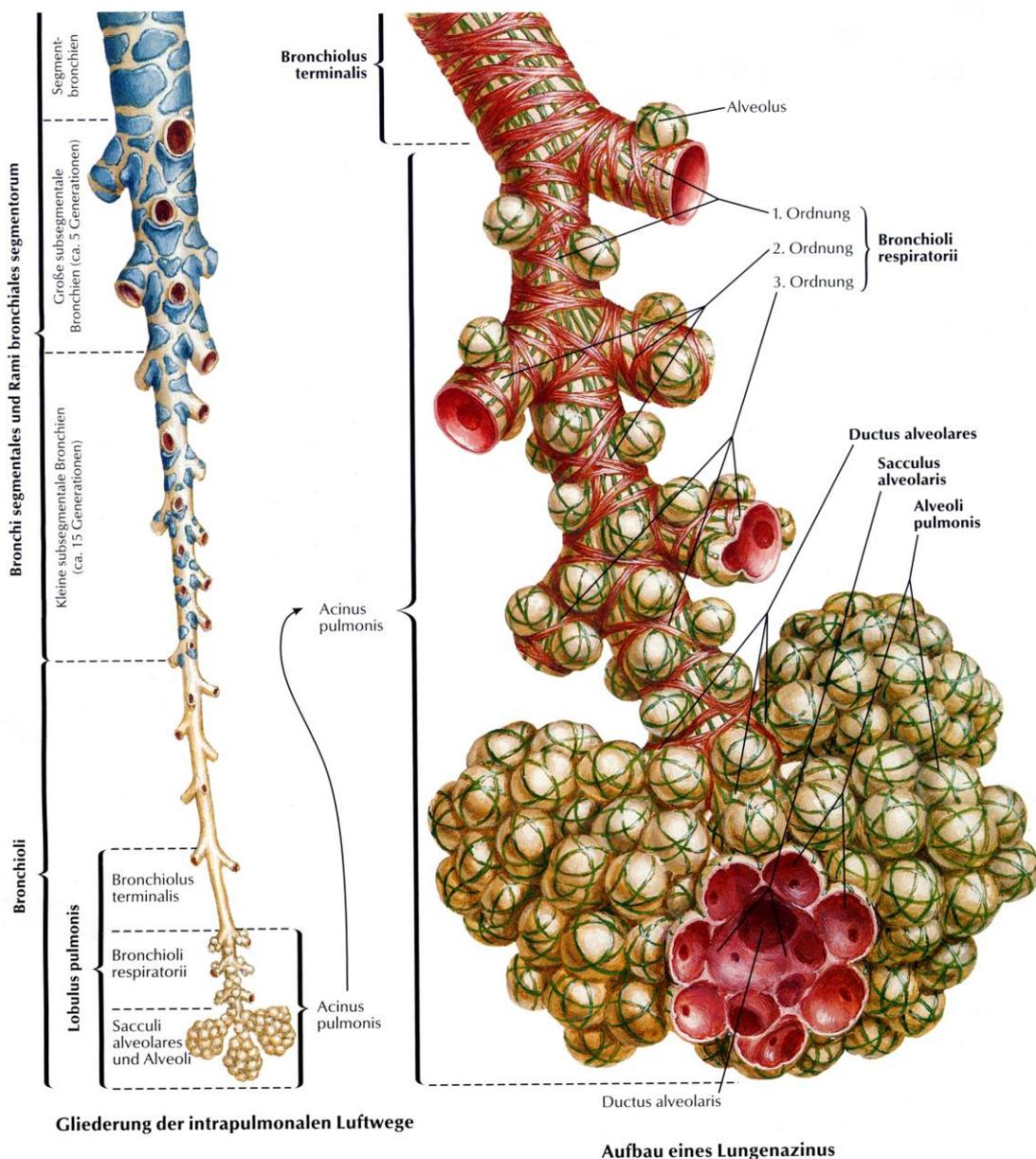


Abb. 1: Intrapulmonale Luftwege: Schema. Aus Netter FH, Atlas der Anatomie des Menschen.⁷⁴

Die Teilung der Atemwege folgt einer irregulären Dichotomie, d.h. jeder Ast verzweigt sich in zwei Tochteräste, wobei deren Durchmesser und/ oder deren Länge nicht identisch sind. Allerdings ist der Durchmesser der Tochteräste immer kleiner als der des Elternastes.¹⁰ Demzufolge wird der Durchmesser der einzelnen Luftwege im Verlauf stetig kleiner; gleiches gilt für die Länge der Segmente.¹⁰ Die totale Atemwegsquerschnittsfläche wächst allerdings exponentiell mit der Anzahl der Generationen.¹

Der Azinus der humanen Lunge, als funktionelle Einheit des Gasaustausches, hat eine komplizierte morphologische Struktur. Die Anordnung der Alveoli im dreidimensionalen Raum lässt eine Alveolarmembran mit einer einzigartigen, sehr unregelmäßigen Oberfläche entstehen.⁸

Die Atemwege innerhalb des Azinus haben nicht die „rohrartige“ Gestalt der konduktiven Bronchien. Ihre Wand wird gebildet von den zahlreichen ringförmigen Alveolareingänge.⁷

Alveolarsepten haben nur eine Dicke von 5-8 μm und sind auf jeder Seite von einer Alveolaroberfläche begrenzt. Jedes Alveolarseptum enthält ein dichtes Kapillarnetzwerk.²

1.2 Morphometrie

Die Morphologie ist eine rein deskriptive Methode, die auf der Darstellung der Strukturen mittels Bildern beruht. Die alleinige Strukturdarstellung reicht allerdings nicht aus, wenn anatomische Gegebenheiten mit physiologischen und biochemischen Daten in Bezug gesetzt werden sollen. Hierfür ist es notwendig quantitative Informationen der Strukturen zu erlangen, wie z.B. Anzahl, Länge, Oberfläche und Volumen der Gewebeanteile. Von Interesse ist, bezogen auf die Lungenphysiologie, hier unter anderem die gesamte Alveolaroberfläche und die Dicke der Alveolarsepten.¹⁶ Diese Daten können mittels morphometrischer Methoden erhoben werden.

Traditionell werden Ausgussmodelle der konduktiven und intraazinären Atemwege angefertigt.^{13,17,18}

Eine flüssige Abformmasse wird über die Trachea infundiert, anschließend ausgehärtet und das umgebende Gewebe entfernt. Es werden unterschiedliche Materialien zum Ausgießen benutzt, zum Beispiel Wachs, Metall, Silikon oder Kunstharz.¹⁹ Durch Mikrodisektion werden die Azini vom restlichen Modell separiert. Die Dimensionen der azinären Strukturen werden unter Mikroskopen vermessen.^{13,20} Die

Präparationsmethode ist sehr komplex und resultiert oftmals in einer inkompletten Füllung, besonders der peripheren Atemwege.

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung morphometrischer Daten des Azinus ist die heute standardisierte Histomorphometrie,²¹⁻²³ die immer noch als Goldstandard zur Untersuchung kleiner Strukturen in einer Größenordnung $<200\ \mu\text{m}$ anzusehen ist. Das zu untersuchende Gewebe wird mit standardisierten Methoden aufgearbeitet, angefärbt und quantifiziert.

Die Stereologie stellt ein wichtiges Instrument dar, um Rückschlüsse von den Messungen am zweidimensionalen histologischen Schnitt auf die dreidimensionale Struktur des Organs zu ziehen. Die Theorien der Stereologie beruhen auf mathematischen Grundlagen (Integralgeometrie, Stochastische Geometrie).¹⁶

Eine grundlegende Theorie stellte der Geologe Delesse 1842 auf. Er sagte, dass der Flächenanteil einer Komponente in einem Schnitt durch eine Gewebeprobe gleich dem Volumenanteil der Komponente in der Probe ist.²⁴

Die Stereologie ist also ein Hilfsmittel, über das man anhand von einfachen Messungen an zweidimensionalen Schnitten Rückschlüsse auf dreidimensionale geometrische Verhältnisse ziehen kann.²⁵

Aus repräsentativen Gewebeproben werden dünne histologische Schnitte angefertigt. Unter dem Mikroskop werden diese Schnitte mit geometrischen Testgittern überlagert. Die Testgitter können aus Punkten, Linien, Flächen oder Volumina bestehen. Jedes dieser Testgitter gibt Auskunft über verschiedene Aspekte der Geometrie des Gewebes. Registriert und ausgezählt werden die Interaktionen zwischen den eingesetzten Testgittern und der Gewebeprobe. Diese können beispielsweise sein, die Anzahl der Punkte eines Testgitters, die innerhalb der zu erfassenden Gewebestruktur liegen, oder die Anzahl der Überschneidungen zwischen den Linien des Messinstrumentes und den Umrissen des Objektes.²⁵

Anhand dieser Auszählung und einer großen mathematischen Formelsammlung können die strukturellen Basisgrößen (Volumen, Oberfläche, Länge, Anzahl) bestimmt werden.

Anschließend werden die Basisgrößen auf ein Volumen bezogen. Dieses Volumen kann entweder das gesamte Organvolumen sein oder ein entsprechendes Teilvolumen des Organs. Man erhält durch die Division mit einem Volumen sogenannte Dichten.^{16,25}

Die systematische und detaillierte morphometrische Untersuchung der Struktur humaner Lungen geht zurück auf Ewald R. Weibel und Domingo M. Gomez. Die Zusammenarbeit dieser beiden Forscher, Weibel als Anatom und Gomez als

Mathematiker und Biophysiker, hatte das Ziel, die Architektur der Lungenstruktur und die Physiologie der Lunge in einen quantitativen Zusammenhang zu bringen.

Die umfassende Studie erbrachte neue Methoden der quantitativen Beschreibung komplexer Organstrukturen. Weibel entwickelte neue Gewebepreparationstechniken und Methoden der Zufallsstichprobenerhebung, Gomez trug zur Weiterentwicklung mathematischer Formeln bei und entwickelte neue Zähltechniken für die Gewinnung der geometrischen Daten. Das Ergebnis der Untersuchungen ist eine detaillierte quantitative Beschreibung der Lungenarchitektur.²⁴

1.2.1 Morphometrie des Bronchialbaumes

Der Bronchialbaum der humanen Lunge teilt sich im Durchschnitt über 23 Generationen. Die Generationen 0-14 sind konduktive Atemwege. Die Azini beginnen durchschnittlich mit der 15. Generation, in der erste Alveolen auftreten. Nach ungefähr drei weiteren Generationen ist die Wand der Atemwege vollständig mit Alveolen besetzt, d.h. die Ducti alveolares beginnen.²⁶

Haefeli-Bleuer und Weibel bestimmten ein mittleres Azinusvolumen von 187 mm^3 , wobei das Volumen der einzelnen Azini von 50 mm^3 bis 450 mm^3 variierte.¹³ Hansen und Ampaya ermittelten mit $182,8 \text{ mm}^3$ einen ähnlichen Wert.²¹ Wohingegen Pump und Boyden, anhand von Ausgussmodellen der Azini, ein wesentlich geringeres Volumen von $1,33 \text{ mm}^3$ bis $30,9 \text{ mm}^3$ und $15,6 \text{ mm}^3$ maßen.^{18,27}

Haefeli-Bleuer und Weibel fanden irreguläre dichotome Verzweigungen der intraazinären Atemwege über durchschnittlich 9 Generationen, Sacculi alveolares traten in den Generationen 6 bis 12 auf.¹³ Schreider und Raabe bestimmten durchschnittlich 8 intraazinäre Verzweigungen, meist irregulär dichotom, allerdings mit einzelnen trichotomen und polytomen Verzweigungen.²⁸ Parker et al beschrieben 9 bis 10 Generationen in den Azini, Pump ermittelte 5 bis 6 Generationen mit einzelnen Sacculi respiratorii bis in Generation 9.^{23,27}

Die mittlere Segmentlänge und der innere Durchmesser werden mit zunehmender Verzweigung geringer.^{11,27,28} Weibel und Gomez maßen einen Durchmesser von $500 \mu\text{m}$ in den Bronchioli respiratorii und einen Durchmesser von 400 bis $450 \mu\text{m}$ in den Ducti und Sacculi alveolares.¹¹

Der innere Durchmesser (Durchmesser des Ganges ohne angrenzende Alveolen) verringert sich in der Studie von Haefeli-Bleuer und Weibel von Generation 1 zu Generation 10 von $500 \mu\text{m}$ auf $270 \mu\text{m}$. Für alle Sacculi alveolares beträgt der innere Durchmesser $250 \mu\text{m}$.¹³ Den äußeren Durchmesser (Durchmesser des Ganges einschließlich umgebender Alveolen) bestimmten sie mit $700 \mu\text{m}$. Dieser Wert bleibt für

alle intraazinären Atemwege konstant und zeigt damit die Größenzunahme der Alveolen Richtung Peripherie.¹³

Schreider und Raabe maßen eine durchschnittliche Länge der Bronchioli terminalis von 819 μm und eine durchschnittliche Länge der Sacculi alveolares von 300 μm .²⁸

Die mittlere Länge der intraazinären Atemwege, gemessen entlang der Bronchioli terminales bis zum Ende der Sacculi alveolares, beträgt laut Haefeli-Bleuer und Weibel durchschnittlich 8,8 mm.¹³

Hansen und Ampaya bestimmten eine Länge von 6-7 mm.²¹

Die irreguläre Teilung, d.h. die unterschiedlichen Dimensionen der Tochteräste bezüglich der Länge und des Durchmessers, hat auch Einfluss auf den Verzweigungswinkel. Der Tochterast mit dem kleineren Durchmesser weicht in einem größeren Winkel von der Verlaufsrichtung des Elternastes ab, als der Tochterast mit dem größeren Durchmesser. Dieser ändert nur minimal die Verlaufsrichtung des Elternastes. Phalen et al untersuchten eine große Anzahl von Verzweigungen. Sie zeigten, dass der Verzweigungswinkel des Astes mit dem geringeren Durchmesser 30°- 65° beträgt, während der dickere der beiden Äste einen um 20° kleineren Verzweigungswinkel aufweist.²⁰

Die Irregularität entsteht primär durch die unterschiedliche Länge der Tochteräste und sekundär durch die Variation im Durchmesser.^{20,24}

Weibel und Gomez bestimmten eine Alveolaroberfläche, in Abhängigkeit von der Größe der Lunge, von 40-80 m^2 .¹¹ Dieser Wert wurde 1962 mit Lichtmikroskopen bestimmt. Später, unter Verwendung von Elektronenmikroskopen, wurde die Alveolaroberfläche mit durchschnittlich 143 m^2 wesentlich höher geschätzt.²⁹

Alveolen haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 250 μm .²⁸

1.2.2 Morphometrie – Limitationen

Obwohl mit den Methoden der Histomorphometrie eine hohe räumliche Auflösung und ein hoher Bildkontrast erreicht werden, bestehen wesentliche Limitationen.

Die quantitativen Daten der komplizierten dreidimensionalen pulmonalen Strukturen müssen durch Berechnungen an zweidimensionalen histologischen Serienschnitten erfasst werden und stellen damit lediglich Rückschlüsse dar.^{16,30} Die zweidimensionalen Schnittbilder können nicht die wahre Natur der dreidimensionalen Objekte reflektieren, sie stehen nur in einem lockeren Zusammenhang.³¹

Ein weiteres Problem der Histomorphometrie besteht darin, dass die zu untersuchenden Organstrukturen oftmals sehr groß sind (z.B. die innere Oberfläche der Lunge), die Messungen allerdings mit einem Licht- oder Elektronenmikroskop

durchgeführt werden. Somit werden nur kleine Ausschnitte des gesamten Organs untersucht.¹⁶

Die Histomorphometrie ist stets gewebedestruktiv. Eine dreidimensionale Analyse der Strukturen ist nicht möglich. Auch der Schneideprozess an sich führt zu Artefakten des sehr instabilen Alveolargewebes.³⁰

1.3 Bildgebung

In der klinischen Routinediagnostik von Lungenerkrankungen stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung. Hierzu gehören Röntgenaufnahmen des Thorax in zwei Ebenen, die Mehrzeilen Computertomographie (CT), die hochauflösende Computertomographie (HRCT), die Magnetresonanztomographie (MRT), der perkutane Ultraschall, die Lungenzintigraphie und die Angiographie.

Die Computertomographie wurde in den 70er Jahren von Godfrey N. Hounsfield entwickelt und revolutionierte die Medizintechnik und ihre klinischen Einsatzmöglichkeiten.

Mit Einführung der Einzelschicht-Spiral-CTs Anfang der 90er Jahre konnten zum ersten Mal echte Volumendatensätze aufgenommen werden, ohne die Gefahr der Miss- oder Doppelregistrierung anatomischer Details. In den folgenden Jahren gab es eine rasante Weiterentwicklung der Computertomographen von Mehrschicht-Spiral-CTs (anfangs 2- Schicht- CTs bis heute 64- Schicht- CTs) bis hin zu den neusten Dual-Source- CTs, die mit zwei senkrecht zueinander stehenden Röhren und Detektoren arbeiten.³²⁻³⁴

Trotz der erheblichen Weiterentwicklung dieser Verfahren, mit Steigerung der räumlichen und zeitlichen Auflösung durch die Mehrschichtaufnahmen und die verkürzte Rotationszeit, lässt sich mit klinisch einsetzbaren Geräten kaum eine räumliche Auflösung von <500µm erreichen. Weichteildetails wie z. B. Alveolarwände lassen sich nicht darstellen.³⁵

Die bei bestimmten klinischen Fragestellungen eingesetzte HRCT-Technik (Hochauflösende CT, High Resolution CT) kann trotz Erhöhung der Ortsauflösung keine Bronchiolen innerhalb der Lungenläppchen abbilden. Die Lungenläppchen sind unvollständig bindegewebig begrenzte Einheiten, bestehend aus mehreren Azini. Ihr Durchmesser beträgt 10 bis 25 mm.^{9,36}

Die quantitative Histomorphometrie ist weiterhin der Goldstandard zur Visualisierung und quantitativen Auswertung von Strukturen, die kleiner als 200 µm sind.³⁵

In den letzten Jahren hat sich die Technologie der Mikro-Computertomographie (μ CT) in der Ex-vivo-Forschung etabliert. Die μ CT stellt eine neue Methode und potentielle Alternative zur Histomorphometrie dar.³⁷⁻³⁹

Im Vergleich mit histomorphometrischen Verfahren ermöglicht die μ CT eine vollständige und lückenlose Quantifizierung von Gewebeparametern, wodurch in der Grundlagenforschung neue Perspektiven und Möglichkeiten entstehen.³⁵

Die Fortschritte in der Computertechnik, in Bezug auf die Rechengeschwindigkeit und die Speicherkapazität, machen es möglich mit μ CT-Systemen dreidimensionale Darstellungen von kleinen Proben mit einer hohen räumlichen Auflösung zu generieren.⁴⁰ Somit kann das benötigte räumliche Auflösungsvermögen zur Darstellung und Quantifizierung von Mikrostrukturen, wie z. B. den Alveoli, erreicht werden.⁴¹

Die ersten μ CT Scanner wurden in den frühen 80er Jahren entwickelt.⁴²⁻⁴⁴ Sie emittierten Röntgenstrahlung aus modifizierten Mikrofokusröntgenröhren.

Feldkamp et al. gelang es 1989 ein μ CT- System zur Abbildung dreidimensionaler Objekte mit einer Ortsauflösung von 50 μ m isotroper Voxel zu entwickeln. Die Methode kombiniert hochauflösende dreidimensionale Computertomographie mit Rekonstruktionsalgorithmen.⁴⁵ Die Arbeitsgruppe zeigte die Möglichkeit der direkten Erfassung der dreidimensionalen Knochenstruktur ex-vivo.⁴⁶

Die Einführung der Synchrotronstrahlenquellen in einer Reihe von Ländern führte zur Nutzung dieser hochenergetischen Strahlung in der Computertomographie mit Auflösungen im Mikrometerbereich.⁴⁷ Während 1947 erstmals an einem Teilchenbeschleuniger Synchrotronstrahlung beobachtet und als Störfaktor angesehen wurde, erkannte man kurze Zeit später die großen Vorteile dieser Strahlung. 1970 wurde die erste Synchrotronstrahlenquelle gebaut, heute nutzt man die 3. Generation der Synchrotronstrahlenquellen.⁴⁸

Mikro- CT Scanner, die Synchrotronstrahlung als Strahlenquelle nutzen, wurden von Flannery und Mitarbeitern beschrieben. Diese Scanner erreichen eine räumliche Auflösung von 10 μ m Voxelgröße.⁴⁹

Inzwischen gibt es auch In-vivo- μ CT-Scanner, die in Studien zu Untersuchungen an kleinen Labortieren eingesetzt werden.⁵⁰

Eine sehr gute Korrelation zwischen den Methoden der konventionellen Histomorphometrie und morphometrischen Analysen an dreidimensionalen μ CT Datensätzen konnte gezeigt werden.^{51,52}

Ein Nachteil der μ CT besteht bisher allerdings in der Begrenzung des Messfeldes auf sehr kleine Volumina.³⁵

1.3.1 Grundlagen der Mikro-Computertomographie

Alle μ CT- Scanner folgen grundlegend dem gleichen Aufbau. Sie bestehen aus einer Strahlenquelle, einem Probenschlitten und einer CCD-Detektorkamera (Charged-Coupled-Device) und sind an mehrere Computerarbeitsplätze angeschlossen.⁴⁷

Der Probenschlitten befindet sich zwischen der Strahlenquelle und der CCD-Detektorkamera auf einer drehbaren Achse. Im Gegensatz zu Computertomographen im klinischen Gebrauch, dreht sich bei μ CT Scannern der Probenschlitten in einem feststehenden Strahlengang in frei definierbaren Winkelschritten und erzeugt so auf der Filmschicht der CCD-Kamera Durchlichtschattenbilder. Zusätzlich kann das Objekt auf dem Probenschlitten entlang der Längsachse zwischen Strahlenquelle und Detektor bewegt werden. Dadurch lässt sich der Vergrößerungsmaßstab, je nach Position der Probe, zwischen 1:1 und 20:1 variieren. Ein Erreichen höherer geometrischer Vergrößerungen, durch weiteres Heranführen der Probe an die Strahlenquelle, ist allerdings aufgrund der minimalen Fokusgröße von 8 μ m nicht möglich. Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Bildschirm wird bei zunehmender Annäherung des Objektes an die Strahlenquelle unscharf. Ist das Projektionsbild größer als der Detektor selbst entstehen Artefakte in der Bildbrechung.³⁵

μ CT Scanner erreichen eine isotrope Ortsauflösung zwischen 5 und 50 μ m. Dies bedeutet eine Erhöhung der Ortsauflösung um ein bis zwei Größenordnungen im Vergleich zu modernen CT-Scannern (isotrope Ortsauflösung von 1-0,5 mm).

Um diese hohe Ortsauflösung zu erzielen, muss unter anderem die Fokusgröße herabgesetzt werden. Hierzu werden optimierte Fein- oder Mikrofokusröntgenröhren mit Transmissions- oder Reflektionsanoden oder Synchrotronstrahlenquellen verwendet.

Die eingesetzte Strahlenquelle bestimmt die Geometrie des μ CT-Scanners. Beim Einsatz von Röntgenröhren entsteht eine Fächer- bzw. Kegelstrahlgeometrie, bei Synchrotron basierten μ CT- Scannern ist das Objekt Parallelstrahlung ausgesetzt.

Die maximal erreichbare Auflösung ist bei der Fächer- oder Kegelstrahlgeometrie von der Fokusgröße der Röntgenröhre begrenzt. Bei der Parallelstrahlgeometrie ist der entscheidende Parameter die Auflösung des Detektors.⁵³

Neben einer kleinen Fokusgröße wird zur Verbesserung der Auflösung eine Erhöhung der Strahlungsintensität benötigt. Die Intensität der Strahlung, also die in einem Zeitintervall zur Verfügung stehende Quantenanzahl, ist abhängig von der Röhrenleistung. Eine kleinere Fokusgröße führt allerdings zu einer Einschränkung der Röhrenleistung, womit die benötigte Strahlungsintensität wiederum nicht erreicht

werden kann. Die Lösung dieses Problems beinhaltet die ausschließliche Verwendung kleinerer Probendurchmesser und die Inkaufnahme wesentlich längerer Scanzeiten, welche abhängig von der Auflösung im Bereich von Minuten bis Stunden liegen. Die Probengröße und die Auflösung sind über den Faktor 1000 miteinander verbunden. Soll eine Auflösung von 10 μm erreicht werden, darf die Probe nicht größer als 1 cm sein. Ein weiteres Problem bezüglich des Probendurchmessers besteht in der Speicherung und Visualisierung solch großer Datenvolumina.⁵³

Der Bilddetektor besteht aus folgenden Komponenten: einer hochauflösenden, 25 μm dicken Szintillatorschicht, die auf einem faseroptischen Sensor aufliegt und einer elektronisch gekühlten 12-bit CCD-Kamera. Die Szintillatorschicht, bestehend aus Caesiumiodid und Thallium, wandelt die transmittierende Strahlung in ein Lichtsignal um, welches an die CCD-Kamera übertragen wird. Zur Visualisierung des Bildes werden zusätzlich Computersysteme benötigt, die über einen digitalen Frame-Gabber mit der Kamera verbunden sind. Der Frame-Gabber muss die analogen Lichtsignale, die bei der Durchstrahlung des rotierenden Objektes vom Detektorsystem aufgezeichnet werden, in digitale Lichtsignale umwandeln, damit diese an die angeschlossenen PC-Systeme übermittelt werden können. Der Feldkamp-Algorithmus ermöglicht mit der Rückprojektionstechnik eine Umwandlung der Absorptionsbilder in axiale Schnittbilder.⁴⁵

Die axialen Schnittbilder haben eine Größe von ca. 1 MB und bestehen aus isotropen Voxeln. Mit Hilfe der Computertechnik ist es möglich, nach Optimierung der Grauwertverteilung des minimalen und maximalen Grauwertes, aus diesen zweidimensionalen Projektionen die gesamte dreidimensionale Probe zu rekonstruieren. Eine Visualisierung und Auswertung der Probe mit einer genauen Quantifizierung und Qualifizierung aller Parameter geschieht mit einem Bildanalyseprogramm, z.B. Analyze 7.0.

1.3.2 Grundlagen des Synchrotrons

Zur Erzeugung von Synchrotronstrahlung werden geladene Teilchen (Elektronen oder Positronen) in Speicherringen mit nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt. Dieser Vorgang geschieht an Teilchenbeschleunigern. Die Teilchen besitzen eine Energie von mehreren Gigaelektronenvolt (GeV). Mit Hilfe von Magnetfeldern werden die Elektronen oder Positronen in eine Kreisbahn gezwungen. Durch die entstehende starke Radialbeschleunigung wird die sogenannte Synchrotronstrahlung tangential zur Bewegungsrichtung der geladenen Teilchen frei. Das elektromagnetische Spektrum

der Synchrotronstrahlung erstreckt sich vom infraroten Spektralbereich bis hin zur harten Röntgenstrahlung.⁵⁴

Aus dem kontinuierlichen Energiespektrum der Synchrotronstrahlung im Röntgenbereich wird bei μ CT-Untersuchungen ein monochromatischer Strahl herausgefiltert. Dieser monochromatische Strahl erreicht eine Intensität, die um Größenordnungen höher ist, als die Intensität der konventionellen Röntgenröhren.⁵³

Durch die Entwicklung der hochauflösenden Synchrotronstrahlung konnte das Auflösungsvermögen auf Werte unter einen Mikrometer gesenkt werden.⁵⁴ Die Scanzeiten sind wesentlich kürzer als beim Einsatz von konventionellen Strahlenquellen.

Ein großer Nachteil ergibt sich allerdings durch die Ortsgebundenheit an Laboratorien mit Teilchenbeschleunigern.⁵³

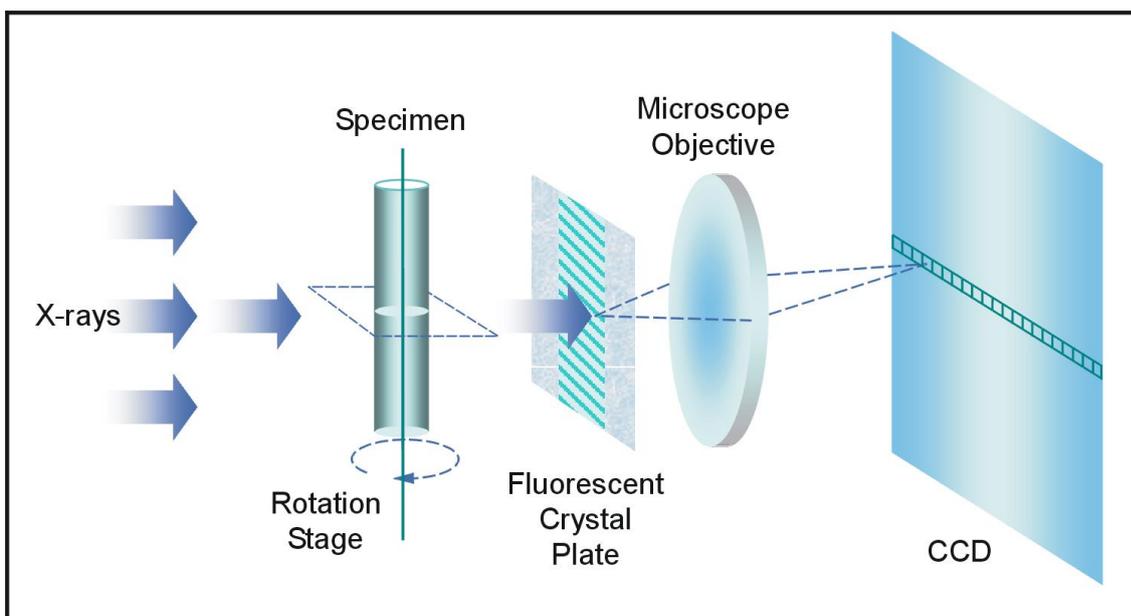


Abb. 2: Parallelstrahlgeometrie für Synchrotronstrahlenquellen.

1.3.3 Anwendung der Mikro- Computertomographie

Die μ CT- Technik findet zunächst im Bereich der dreidimensionalen Darstellung der Knochenstruktur Anwendung.⁵⁵ Den ersten Versuch der Quantifizierung der Knochenarchitektur führten Feldkamp und Mitarbeiter 1989 durch.⁴⁶ Besonders im Bereich der Osteoporoseforschung wird die μ CT- Technik zu morphometrischen Untersuchungen des spongiösen Knochens eingesetzt.^{53,56} Knochengewebe ist in zweierlei Hinsicht zur Untersuchung mit dem μ CT geeignet: Zum einen hat der

mineralisierte Knochen eine hohe Röntgendichte und zum anderen bleibt der räumliche Aufbau nach Probenentnahme stabil. Bereits mit den ersten Geräten konnten qualitativ hochwertige dreidimensionale Bilder erstellt werden.⁵⁷

Seit einigen Jahren wird die Technologie der μ CT auch im Bereich der vaskulären Grundlagenforschung eingesetzt. Durch intravasal appliziertes Kontrastmittel kann die Gefäßarchitektur dargestellt und quantifiziert werden.³⁵ Jorgensen et al untersuchten isolierte, fixierte und intakte Organe von Nagetieren, z. B. das Herz und die Nieren. Es gelang ihnen, die Gefäßarchitektur, einschließlich der Vasa vasorum der Koronargefäße, darzustellen.³⁷ Mittels Segmentation und Extraktionsalgorithmen konnten Wan et al 2002, anhand dreidimensionaler Darstellungen der Gefäßarchitektur von Koronarien der Ratte, eine quantitative Analyse der Strukturen durchführen. Sie untersuchten Volumen, Dichte und Gefäßverzweigungen.⁵⁸ In einer Studie von Karau et al aus 2001 wurde erstmals eine Methode zur Analyse der dreidimensionalen Struktur des Gefäßbaumes der Lunge beschrieben. Mit Hilfe von speziell entwickelten 3D-Bildbearbeitungsprogrammen analysierten sie die Architektur der Gefäßverzweigungen anhand ihrer vollständigen Darstellung des pulmonalarteriellen Gefäßbaumes.⁵⁹

Op Den Buijs und Mitarbeiter beschrieben 2006 anhand eines kompletten Datensatzes des Portalvenenbaumes der Ratte die Morphologie und Geometrie der Gefäßaufzweigungen.⁶⁰

Die intravasale Kontrastmittelapplikation ist eine gute Methode zur 3D Gefäßdarstellung parenchymatöser Organe, die ihre Form nach Entnahme aus dem Körper nicht verändern.³⁵

Vergleichsweise schwierig ist die 3D Darstellung des Lungengewebes in der μ CT. Die Retraktionskräfte der Lunge und die dünnen Alveolarsepten machen es schwierig, die räumliche Konfiguration der Lunge nach Entnahme wieder herzustellen und zu erhalten.⁶¹⁻⁶³ Desweiteren bieten die dünnen Alveolarsepten keinen ausreichenden Röntgenkontrast.^{30,64}

Langheinrich et al entwickelten 2004 eine neue Perfusionstechnik, bei der ein Kontrastmittel- Gelatine- Gemisch in die Vena jugularis interna von narkotisierten Tieren appliziert wird. Dieses Verfahren führt zur Stabilisierung des Lungengerüsts, die Lungen sind frei entfaltet. Möglich ist zum ersten Mal die gleichzeitige quantitative volumetrische Analyse der intrapulmonalen Gefäße und des Lungengerüsts.⁴⁰

Weitere Versuche der Darstellung von Lungenparenchym im μ CT unternahm Watz und Mitarbeiter 2005. Sie untersuchten Proben einer gesunden und einer emphysematös veränderten formalindampffixierten humanen Lunge. Zur

Kontrastverstärkung setzten sie Silbernitrat ein. Darstellen konnten sie Alveoli bei einer isotropen Voxelgröße von 14 μm .⁶⁴

Litzlbauer und Mitarbeiter präsentieren eine Präparationsmethode, die das Lungengewebe von Schweinelungen mittels Formalindampf in Inspirationsstellung fixiert und mit Osmiumtetroxid eine Kontrastverstärkung der Alveolarwände hervorruft. Dieses Präparationsverfahren ermöglicht eine Darstellung der terminalen Luftwege in der μCT . Die Möglichkeit der Anwendung dieses Verfahrens auf humane Lungen wird gezeigt. Eine lückenlose und direkte 3D Rekonstruktion des Azinus, sowohl der Schweine- als auch der humanen Lunge, ist möglich. Limitierend bezüglich der morphometrischen Analyse der Azinusstrukturen erweist sich allerdings die Ortsauflösung. Während die Grauwertbilder der μCT , verglichen mit korrespondierenden histologischen Schnitten, eine hohe Übereinstimmung zeigen, ist dies für die errechneten Binärbilder nicht der Fall. Da die Alveolarwände nur eine Dicke von 5-10 μm haben und damit ungefähr in der Größenordnung eines Voxels (9 μm) liegen, gehen während der Binärbilderzeugung dünne Alveolarsepten entweder ganz verloren oder werden nur unzureichend abgebildet.³⁰

Zur adäquaten Darstellung dieser Strukturen ist eine Voxelgröße von ungefähr 5 μm nötig.⁴¹

Durch Verringerung der Voxelgröße unter Verwendung hochenergetischer Synchrotronstrahlung ergeben sich neue Möglichkeiten der morphometrischen Analyse der feinen Lungenstrukturen.

Aufgrund der sehr hohen Intensität der Strahlung lässt sich ein Verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis der Bilder erreichen, während sich die Datenaquisitionszeit im Vergleich mit Standard μCT s verringert. Dies ist vor allem notwendig, wenn die räumliche Auflösung erhöht werden soll. Reduziert man die Voxelgröße um den Faktor zwei, erhöht sich die erforderliche Dosis und Scanzeit um den Faktor 16. Synchrotronbasierte μCT -Scanner erstellen 3D Bilder im Mikrometer und Submikrometerbereich mit verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis und akzeptablen Probenscanzeiten unter einer Stunde.⁴⁸

Verdeutlichen lässt sich dies anhand der Abbildungen 3a und 3b. Beide Abbildungen zeigen denselben Bronchiolus terminalis. Abbildung 3a ist eine μCT - Aufnahme mit einem Standard μCT mit einer Auflösung von 6 μm isotroper Voxelgröße, Abbildung 3b ist aufgenommen in einem μCT mit Synchrotronstrahlenquelle mit einer isotropen Voxelgröße von 3,9 μm . Deutlich zu erkennen ist das Verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis der Aufnahme unter Verwendung der Synchrotronstrahlenquelle.

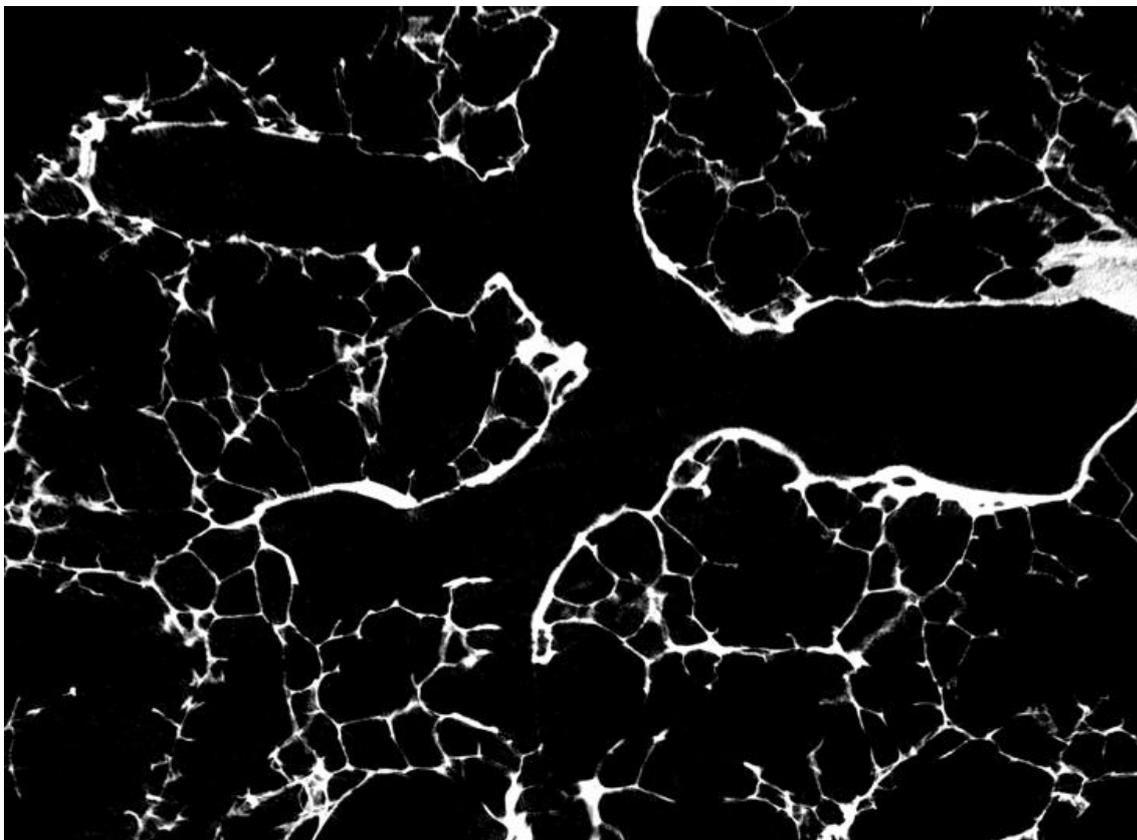
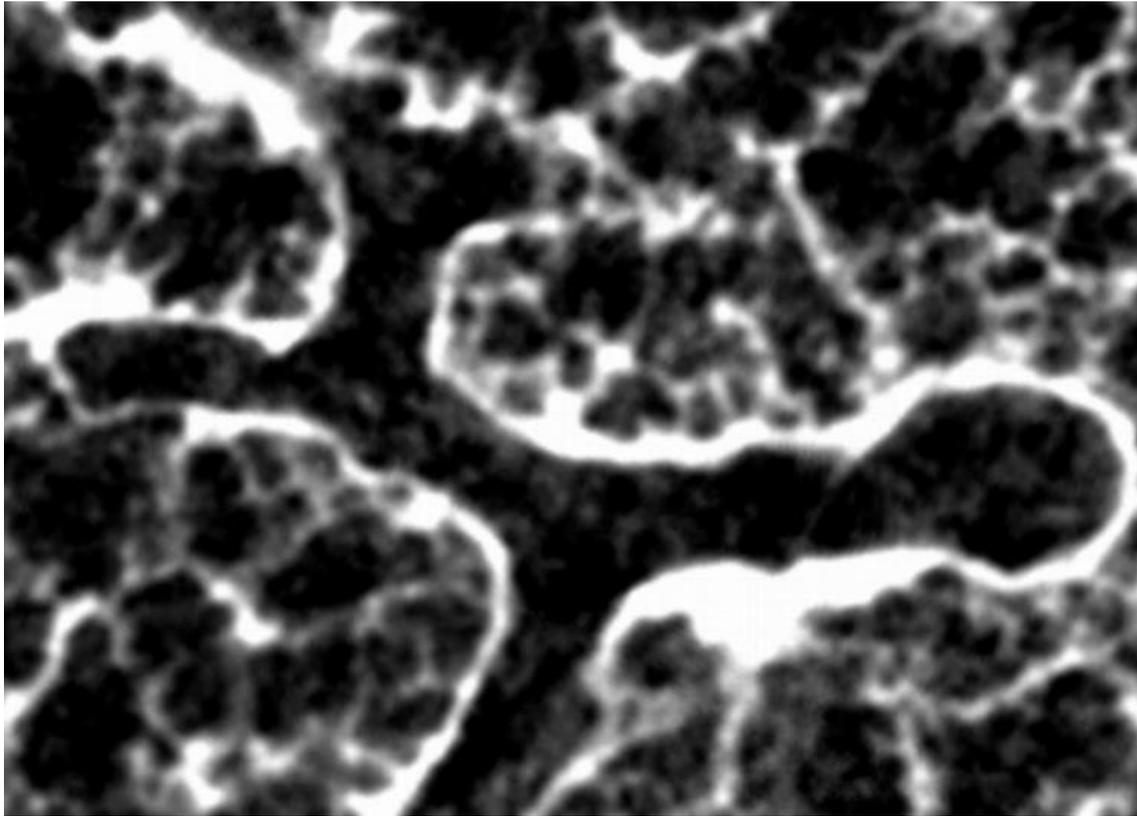


Abb. 3: Beispiel eines sich verzweigenden Bronchiolus terminalis im sagittalen Schnitt. Die obere Abbildung ist eine μ CT- Aufnahme mit einer Auflösung von 6 μ m Voxelgröße (Abb. 3a).

Die untere Abbildung zeigt denselben Bronchiolus terminalis in einer Synchrotron- basierten μ CT- Aufnahme bei einer Voxelgröße von $3,9 \mu\text{m}$ Voxelgröße (Abb. 3b). Deutlich sichtbar ist das verbesserte Signal- Rausch- Verhältnis unter Verwendung der Synchrotronstrahlenquelle.

Tsuda und Mitarbeiter zeigen das Potential der Synchrotron- basierten μ CT- Technik zur Darstellung des Azinus. Proben von Rattenlungen werden mit hoher Auflösung abgebildet und anschließend segmentiert.⁷

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung eines vollständigen dreidimensionalen Datensatzes des Azinus der humanen Lunge in der hochauflösenden Synchrotron- basierten μ CT. Anhand dieser Datensätze erfolgen die Segmentation, die dreidimensionale Rekonstruktion und die anschließende morphometrische Analyse der Struktur des humanen Azinus.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der humanen Lunge

Wir führen unsere Untersuchungen an einer explantierten humanen Lunge durch. Die Lunge wird im Rahmen einer Sektion zur Klärung der Todesursache des Patienten für diagnostische Zwecke entnommen. Die Sektion wird am Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg-Saar (Leitung Prof. Dr. med. R. Bohle) durchgeführt. Der Patient verstarb an einem Myokardinfarkt im Alter von 40 Jahren. Er war Nichtraucher und litt unter keinen pulmonalen Vorerkrankungen.

Die Lunge zeigt makroskopisch sowohl Bereiche mit einem kardial bedingten Lungenödem, als auch Anteile normalen Lungengewebes.

Für unsere Untersuchungen bekommen wir den rechten Lungeflügel zur Verfügung gestellt. Die Leiter der Institute für Radiologie und Pathologie haben unsere Studie bewilligt.

2.2 Präparation der humanen Lunge und Herstellung der Gewebeproben

Die dreidimensionale Darstellung und quantitative Analyse des Lungengewebes ist nur sinnvoll, wenn es gelingt, die räumliche Struktur der Lunge bis zur Bildgebung zu erhalten. Die kleinen Luftwege und Alveolen müssen entfaltet und in diesem Zustand fixiert werden. Weiterhin muss die Strahlenabsorption der anatomisch sehr dünnen Alveolarwände erhöht werden.

Um die humane Lunge in Inspirationsstellung zu fixieren, setzen wir die von Rau und Mittermayer 1980 entwickelte Methode der Formalindampfbeatmung ein und führen anschließend eine Kontrastierung der Lungenproben mit Osmiumtetroxid durch, gefolgt von einer Kritisch-Punkt-Trocknung. Diese von Litzlbauer und Mitarbeitern entwickelte Präparationstechnik zur Darstellung von Lungengewebe einer Schweinelunge in der Mikro-CT erwies sich als optimal.

Die verwendeten Methoden sind in der Literatur bereits detailliert beschrieben.^{30,61,65}

2.2.1 Entfaltung und Fixation der Lunge mit Formalindampf

Die verwendete Apparatur besteht grundlegend aus folgenden Komponenten: einem modifizierten Beatmungsgerät vom Typ Engström, einer geschlossenen Fixationskammer, in welcher der Fixationsprozess der Lunge stattfindet und einem geschlossenen Behälter gefüllt mit Formalin (siehe Abbildung 4).

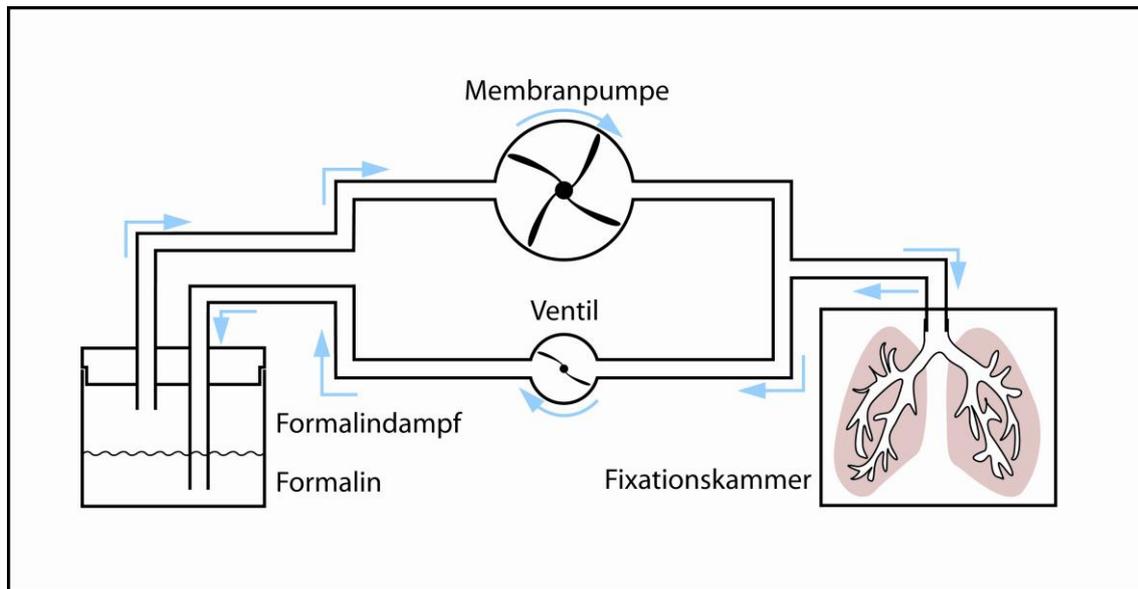


Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur zur Lungenfixierung durch Beatmung mit Formalindampf.

Die humane Lunge wird über die angeschnittene Trachea mit dem Ansatzstück des Beatmungsgerätes verbunden und anschließend auf einer anatomisch geformten Unterlage in der Fixationskammer platziert. Die Fixationskammer wird geschlossen. Das Beatmungsgerät ist über sein Schlauchsystem mit dem geschlossenen und mit Formalin gefüllten Behälter verbunden (Formaldehyd 37%, säurefrei, der Firma Merck aus Darmstadt). Zur Produktion des benötigten Formalindampfes wird die Formalinflüssigkeit auf 50°C erhitzt. Der entweichende Dampf wird über eine im Schlauchsystem zwischengeschaltete Membranpumpe in die Lunge eingebracht.

Der aus dem erhitzten Formalinbehälter entweichende Dampf wird über das Schlauchsystem zur Fixationskammer geleitet und fixiert die Lunge durch Beatmung von innen und durch Einleiten des Dampfes in die Fixationskammer auch von außen.

Um die Lunge zusätzlich zu der Fixation über den Bronchialbaum auch von der Lungenoberfläche aus zu fixieren, wird zusätzlich Formalindampf in die Fixationskammer geleitet. Der Dampf in der Fixationskammer wird durch eine Heizung auf 55°C erhitzt und ist damit 5°C höher als der intrapulmonale Formalindampf. Dies verhindert die Bildung von Kondenswasser im Gewebe.

Die Lunge wird zunächst über 40 Sekunden mit einem Beatmungsspitzenruck von 40 cmH₂O ventiliert um die kollabierten Luftwege und Alveolen zu entfalten. Nach dieser initialen Beatmung wird die Ventilation volumenkontrolliert, drucklimitiert und mit einem

positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5 cmH₂O fortgeführt. Der Beatmungsspitzenruck wird auf 35 cmH₂O limitiert. Die Atemfrequenz beträgt 12/min. Das Verhältnis von Inspiration und Expiration (I:E-Ratio) ist 1:2. In der Inspirationsphase wird mittels der Pumpe aktiv Formalindampf in die Lunge gepresst, während in der Expirationsphase rein passiv der Dampf über die Rückstellkräfte der Lunge entweicht. Dieser Beatmungsmodus wird über sechs Stunden beibehalten, da so lange der Fixationsprozess dauert. Vor Entnahme der Lunge muss eine Gasmasken aufgesetzt werden, da die Formaldehydkonzentration sehr hoch ist.

Die Trocknungsphase der Lunge beträgt 72 Stunden. Während dieser Zeit wird die Lunge auf Zellstoff gelagert um Deformationen durch den Auflagedruck zu vermeiden. In regelmäßigen Abständen muss das Präparat gewendet werden. Um eine intrapulmonale Trocknung und vollständige Aushärtung zu erreichen, wird in das Lungenpräparat Sauerstoff geleitet. Hierzu wird der Trachealstumpf mit einem gewöhnlichen Endotrachealtubus „intubiert“. Der Tubus wird geblockt, mit einer Naht fixiert und über einen Schlauch an einen Sauerstoffwandanschluss angeschlossen. Der Gasfluss wird gerade so hoch gewählt, dass die Pleura visceralis glatt und ohne Falten erscheint.

Das Ergebnis ist ein in Inspirationsstellung fixiertes, luftgefülltes Lungepräparat mit entfalteten Alveolen.

2.2.2 Ausstanzen der Gewebezylinder unter CT Kontrolle

Nach der nun vollendeten Fixation und Trocknung wird der komplette rechte Lungenflügel in einem 64-Zeilen Computertomographen (Definition, Siemens, Erlangen) gescannt. Für die weitere Präparation werden Lungenbereiche ausgewählt, die kein sichtbares Ödem auf den CT-Bildern enthalten. Die Abbildung 5 zeigt das Computertomogramm des rechten Lungenflügels.

Mit einer gewöhnlichen Brotschneidemaschine wird der Lungenflügel in Längsrichtung in 10 mm dicke parallele Scheiben geschnitten. Anschließend werden 22 zylindrische Gewebeproben mit einer scharfen mechanischen Gewebestanze ausgestanzt. Die Proben haben einen Durchmesser von 8 mm und eine Höhe von 10 mm. Die Entnahme der Proben beschränkt sich auf die subpleuralen Bereiche. 12 der Gewebeproben sind sicher in Bereichen entnommen, die auf der CT Darstellung nicht ödematös erscheinen.

Zusätzlich wird eine histologische Untersuchung der Proben durchgeführt, die bestätigt, dass die entnommenen Proben ausschließlich aus gesundem Lungengewebe bestehen.

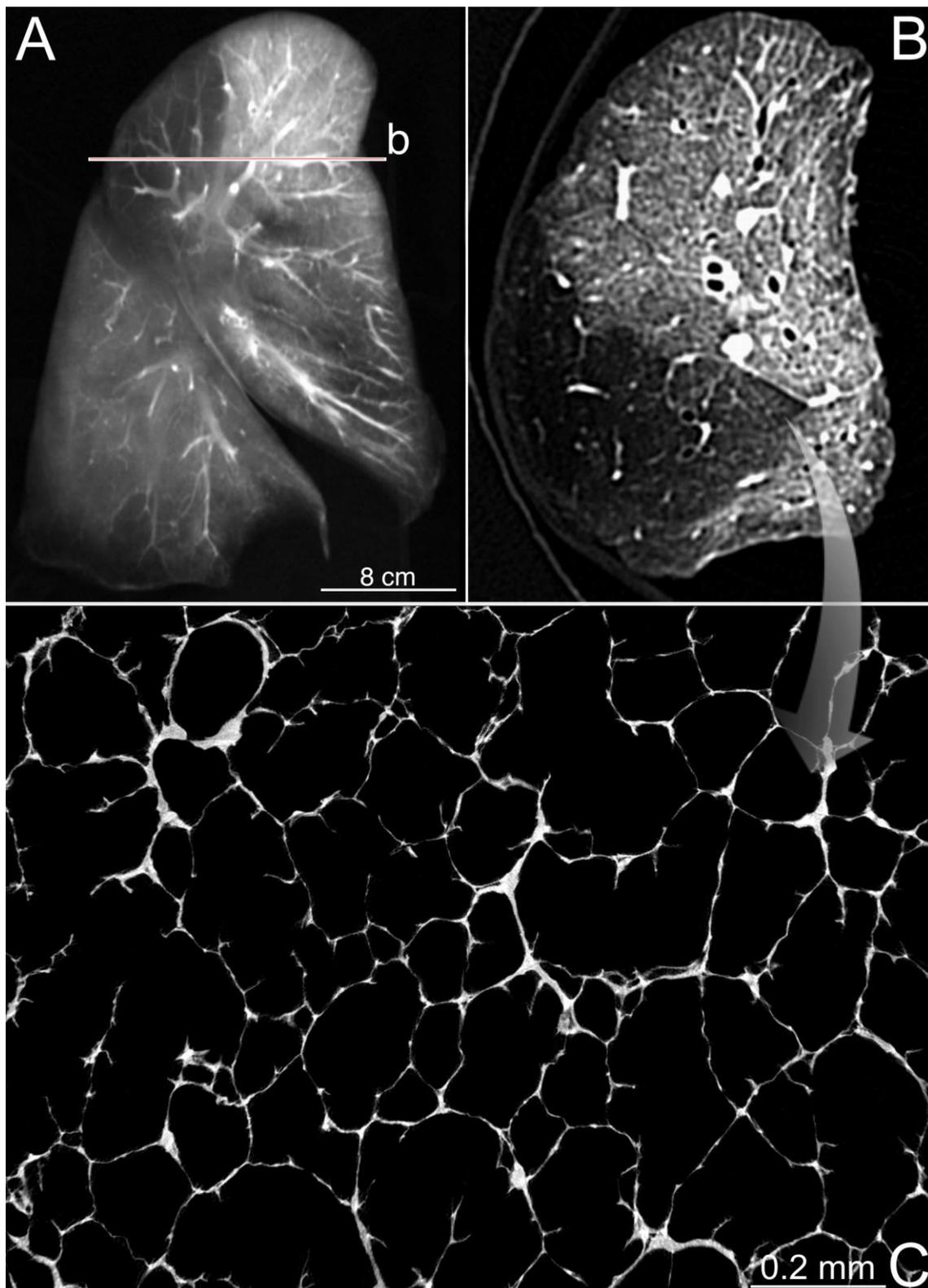


Abb. 5: Rechter Lungenflügel. Die Abbildung 5 A zeigt den vollständigen Lungenflügel gescannt in einem 64- Zeilen Computertomographen und einen transversalen Schnitt durch den rechten Lungenflügel (Abbildung 5 B). Es werden Lungenbereiche ohne pathologische Auffälligkeiten ausgewählt. Abbildung 5 C ist eine Synchrotron- basierte μ CT- Aufnahme des Lungengewebes bei einer Voxelgröße von $3,9 \mu\text{m}^3$.

2.2.3 Kontrastierung der Proben mit Osmiumtetroxid

Ziel der Kontrastierung mit Osmiumtetroxid (OsO_4) ist es den Röntgenkontrast der dünnen Alveolarwände zu erhöhen und damit mittels der μCT darstellbar zu machen.

Das als Kontrastmittel eingesetzte Osmiumtetroxid ist zur Kontrastverstärkung geeignet, da es eine hohe Ordnungszahl von 76 besitzt und damit eine hohe Röntgendichte aufweist. Das Osmiumtetroxid reagiert mit den ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen und lagert sich dort als Schwermetall ein. In der zugrunde liegenden chemischen Reaktion oxidiert das Osmiumtetroxid die ungesättigten Fettsäuren und wird dabei selbst zu schwarzem metallischem Osmium reduziert.^{66,67}

1.Arbeitsschritt: Das Osmieren

Verwendete Arbeitsgeräte: 2 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf Hamburg), Glaspipette, 1%-ige Osmiumtetroxid-Lösung (Osmiumtetroxid kristallin, Fa. Paesel-Lorei, Frankfurt am Main, gelöst in Reinstwasser), Probenrotator (Eigenbau G. Magdowski, Institut für Anatomie und Zellbiologie).

Vorgehensweise: In das Reaktionsgefäß wird je ein Gewebezylinder gegeben und 1,5 ml der Osmiumtetroxidlösung pipettiert. Das Reaktionsgefäß wird anschließend drei Stunden lang auf dem Probenrotator langsam rotiert.

Gearbeitet wird aufgrund der giftigen Dämpfe des Osmiumtetroxids unter einem Abzug.

2.Arbeitsschritt: Das Waschen

Verwendete Arbeitgeräte: Reinstwasser, saugfähiges Papier, Schraubdeckelgläser, Probenrotator

Vorgehensweise: Die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß wird abgegossen und die Proben werden vorsichtig mit saugfähigem Papier abgetupft. Anschließend wird je ein Gewebezylinder in ein Schraubglas getan und 7 ml Reinstwasser hinzu pipettiert. Das Schraubglas wird verschlossen auf dem Probenrotator platziert und 30 Minuten langsam rotiert. Diese Waschung wird dreimal wiederholt, um das nicht gebundene Osmiumtetroxid vollständig zu entfernen.

2.2.4 Trocknung der Gewebezylinder

Bevor die Gewebeproben im μCT gescannt werden können, muss das Wasser vollständig aus dem Lumen der Azini eliminiert werden. Eine einfache Lufttrocknung ist allerdings nicht möglich, da das Verdunsten des Wassers große Gewebeschäden zur Folge hätte. Man wendet zur Gewebeschonung das Verfahren der Kritisch-Punkt-Trocknung an.⁷⁵

Mit diesem Verfahren ist es möglich, die zum Gewebeschaden führenden hohen Oberflächenspannungen beim Übertritt von der flüssigen zur gasförmigen Phase zu vermeiden.

Die Proben werden oberhalb des kritischen Punktes getrocknet. Der kritische Punkt von Wasser liegt allerdings bei 374°C und 72 bar, was technisch schwer zu realisieren ist. Eingesetzt wird daher Kohlendioxid (CO₂) mit einem kritischen Punkt von 31°C und 72 bar. Vor der Trocknung wird eine chemische Entwässerung mit angesäuertem 2,2-Dimethoxypropan (DMP) durchgeführt.

1. Arbeitsschritt: Herstellen des angesäuerten DMP

Verwendete Chemikalien: 2,2-Dimethoxypropan (Gehalt 97%, Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn), 37%ige Salzsäure (Fa. Merck Darmstadt)

Herstellung: 100 ml des DMP werden mit 4 Tropfen der 37%igen Salzsäure gemischt.

2. Arbeitsschritt: chemische Entwässerung

Unter einem Abzug werden die Gewebezylinder aus den Schraubgläsern entnommen, vorsichtig mit saugfähigem Papier abgetupft und in ein neues Schraubglas getan. Mit einer Pipette werden 7 ml des angesäuerten DMP dazu pipettiert. Anschließend werden die Proben für 30 min mit dem Probenrotator rotiert. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt und anschließend das DMP noch einmal ausgetauscht. Das angesäuerte DMP reagiert mit dem Wasser im Gewebe zu Aceton und Methanol.

3. Arbeitsschritt: Kritisch-Punkt-Trocknung

In mehreren Waschvorgängen wird das angesäuerte DMP durch flüssiges CO₂ ersetzt.

Verwendet wird das Gerät Critical Point Dryer CPD 030 (Fa. BAL-TEC, Witten).

Die Probenhalter und die Druckkammer des Kritisch- Punkt- Trockners werden mit angesäuertem DMP gefüllt. Jeweils ein Gewebezylinder wird in einen Probenhalter gegeben und mit einem Deckel verschlossen. Die Druckkammer wird auf 10° C abgekühlt. Nun wird 10mal flüssiges CO₂ in die Druckkammer des Gerätes eingeleitet, mit einem Magnetrührer für vier Minuten mit dem angesäuerten DMP vermischt und anschließend wieder abgelassen. Die Proben befinden sich dann vollständig in dem flüssigen CO₂.

Der kritische Punkt von CO₂ liegt bei 31° C und 73,8 bar. Mit dem Einschalten der Heizung beginnt der Trocknungsvorgang durch plötzlichen Umschlag von der flüssigen zur gasförmigen Phase. Um eine Temperaturreserve zu schaffen wird die Kammer auf

42° C erwärmt. Es entsteht ein Druck von 95 bar. Nach Abschluss des Trocknungsvorganges wird das Gas abgelassen bis Normaldruck herrscht. Die getrockneten Proben können bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

2.3 Bildgebung – Synchrotron- basierte Mikro- Computertomographie

Die Synchrotron- basierten Mikro-CT Aufnahmen werden mit dem Mikro- CT Scanner an der X2B-beam-line der National Synchrotron Light Source (NSLS), Brookhaven, Long Island, USA angefertigt.⁶⁸

Jeweils einer der 12 osmierten und getrockneten Gewebezyylinder wird auf dem drehbaren Probenschlitten zwischen der Strahlenquelle und dem CCD-Detektor befestigt.

Die Proben rotieren während des Scannvorganges um 360° um ihre zentrale Achse. Aus den definierten Winkelschritten von 0,25° resultieren am Ende 1440 Einzelprojektionen.

Alle Proben werden unter identischen Bedingungen mit 16 keV Photonen- Energie und einer Bandbreite von 50 eV gescannt. Die dreidimensionalen Aufnahmen bestehen aus annähernd 3000 zweidimensionalen Schichten mit einer 2000 × 2000 planer Datenmatrix. Das resultierende isotrope Auflösungsvermögen beträgt 3,9 µm Voxelgröße. Die Projektionen werden nach der Datenerfassung zu Schnittbildern mit einer 16-bit Grauwertverteilung rekonstruiert.

2.4 Quantitative Analyse der intraazinären Atemwege

Zunächst werden die Grauwerte der 16-Bit-Volumendatensatz binarisiert, d. h. in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt. Anhand dieser binarisierten Daten erfolgt die quantitative Untersuchung der Azini.

Timothy L. Kline aus der Abteilung für Biophysik und Physiologie der Mayo Clinic (Laborleitung Prof. Dr. E.L. Ritman) entwickelte für uns einen Algorhythmus, welcher die zuvor vom Untersucher identifizierten intakten Azini zu einem zusammenhängenden Volumenelement verknüpft, die inneren Atemwege nach außen hin verschließt und eine Mittelachse innerhalb der Atemwege errechnet.

2.4.1 Binarisierung der Grauwerte

Zur Umwandlung der Graustufen der Mikro-CT Bilder in Schwarz-Weiß-Bilder muss ein Grenzwert (Threshold) festgelegt werden, der präzise Gewebe von Luft trennt. Diesen Grenzwert haben wir mit Hilfe des Frequenzhistogramms der Graustufenskala festgelegt. Das Frequenzhistogramm ist bimodal, mit einem Peak bei Werten oberhalb

von Null für Luft und einem Peak für Gewebe mit über 8000 Grauskalen Einheiten. Als Threshold wurde der niedrigste Wert zwischen diesen beiden Peaks gewählt.

Die Graustufen unterhalb des festgelegten Threshold bekommen den Wert 0 zugeordnet und die Graustufen oberhalb des Grenzwertes den Wert 1. Somit erscheint das Gewebe der Lunge im binarisierten Datensatz weiß und die lufthaltigen Alveolarräume schwarz.

Die Wahl des korrekten Schwellenwertes bei der Binärbilderzeugung stellt einen kritischen Schritt dar, da dieser Wert Gewebe von nicht Gewebe trennt und somit die Dicke der Alveolarwände beeinflusst.

Da innerhalb eines Voxels Partikel verschiedener Dichte vorkommen können (Gewebe und Luft) und daraus ein Mittelwert aller im Voxel befindlichen Dichten gebildet wird, kann es aufgrund des Partialvolumeneffektes entweder zu einem Strukturverlust kommen, der dazu führt, dass die Alveolarwände zu dünn abgebildet werden, oder dazu, dass lufthaltiger Raum dem Alveolargewebe zugerechnet wird und die Alveolarwände dementsprechend zu dick erscheinen. Ist innerhalb eines Voxels beispielsweise der Luftanteil höher als der Gewebeanteil wird dem Voxel bei der Binarisierung der Wert 1 zugeordnet, also mit Luft gleichgesetzt. Der Gewebeanteil geht verloren, in der Alveolarwand entsteht ein Loch.

Die entstandenen Löcher in den Alveolarwänden werden mit einzelnen binarisierten Voxeln geschlossen, indem diese der Gewebeoberfläche zugefügt werden. Eine nachfolgende Abtragung versetzt die Oberfläche der Alveolarwände wieder in ihre originale Lokalisation.

2.4.2 Segmentation der Azini

Zunächst werden die durch das Ausstanzen der Gewebezyylinder nach außen geöffneten Atemwege verschlossen. Hierzu wird ein Algorithmus angewendet, der die binarisierten Datensätze „einwickelt“ und somit zum äußeren Raum abgrenzt. Dieser Schritt ermöglicht eine Analyse des Inneren der Atemwege.

Die dreidimensionale Struktur der Azini wird mit Hilfe des entwickelten Algorithmus rekonstruiert. Bei diesem Verfahren werden Voxel gleicher Dichte zu einem zusammenhängenden Volumenelement verknüpft. Der Untersucher identifiziert in potentiell intakten Azini den Bronchiolus terminalis und definiert diesen als Startpunkt. Distal der terminalen Bronchiole werden alle Voxel denen der Wert 0 im Binärbild zugeordnet wurde verbunden und anschließend aus dem Volumendatensatz segmentiert.

Es konnten innerhalb der 22 gescannten und binarisierten Proben von 50 vorhandenen Azini nur 8 intakte Azini identifiziert und segmentiert werden.

Ein weiterer Schritt beinhaltet das bestimmen der Mittelachse der Atemwege mit dem Centerline-Extraktionsalgorithmus.⁶⁹ Die errechnete Mittelachse erlaubt die Vermessung des Azinus in Form einer sich hierarchisch verzweigenden Struktur, in der einzelne Segmente abgegrenzt werden können. Die Morphometrie wird anhand der bestimmten Mittelachse untersucht.

2.4.3 Analyse der binarisierten Datensätze

Die morphometrische Untersuchung der Lungengewebsproben wird an den binarisierten 16-bit Volumendatensätzen durchgeführt.

Der Verzweigungswinkel, die longitudinale Länge und die Anzahl der Segmente jeder Generation der untersuchten 8 Azini werden anhand der zuvor ermittelten Mittelachse bestimmt. Hierzu wird das Software Programm ANALYZE (ANALYZE 9.0, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA) verwendet. Ebenso werden die Volumina, Oberflächen, Längen und Durchmesser der einzelnen Segmente mithilfe von ANALYZE 9.0 vermessen.

2.5 Histologische Vergleichsuntersuchungen

Nachdem alle Gewebeproben radiographisch untersucht worden sind, werden histologische Vergleichsuntersuchungen vorgenommen.

Die Aufbereitung der Proben für die histologische Untersuchung findet am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Homburg/Saar statt.

Um sehr dünne und gleichmäßige Schnitte anfertigen zu können, muss das Gewebe eine einheitliche Konsistenz und Stabilität aufweisen und wird zunächst in Paraffinwachs eingebettet. Das erhitzte, flüssige Paraffinwachs wird nach Abkühlung auf Raumtemperatur wieder fest und das in Paraffin fixierte Gewebe kann nach kurzer Aushärtungszeit weiter verarbeitet werden.

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms werden aus den Paraffinblöcken 6 µm dicke histologische Schnitte angefertigt. Der paraffinfixierte Schnitt wird in einem Wasserbad gestreckt, geglättet und auf einen Objektträger aufgezo-gen. Eine anschließende Inkubation in einem Wärmeschrank verbessert die Haftung der Schnitte auf dem Objektträger. Nach Entfettung der Schnitte in Xylol und Wässerung in absteigender Alkoholreihe, wird das Lungengewebe gefärbt.

Als histologische Färbung wird die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) eingesetzt. Die HE Färbung stellt eine gebräuchliche Routinefärbung dar.

Im Anschluss an den Färbeporgang wird das Gewebe auf den Objektträgern luftdicht eingedeckt und verschlossen.

Die Auswertung und Digitalisierung der histologischen Präparate erfolgt unter Lichtmikroskopen mit angeschlossener JVC Digital Camera.

2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Berechnungen werden mit dem Analyseprogramm JMP 6.0 (SAS, North Carolina, USA) durchgeführt. Alle statistischen Angaben stellen Mittelwertvergleiche \pm Standardabweichung dar. Zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen den Messungen an den Segmenten der 8 untersuchten Azini dient der einfaktorielle Varianzanalysetest (One-way ANOVA) und der Tukey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur für mehrere Vergleiche.

Die statistische Wahrscheinlichkeit wird mit einem Wert von $p < 0,05$ in allen Berechnungen als signifikant angenommen.

Zur Darstellung der statistischen Daten werden Boxplot-Diagramme gewählt. Diese stellen anschaulich den Median, die Streuung, begrenzt durch die 25. bzw. 75. Perzentile und die Maximal- und Minimalwerte dar.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Mikroarchitektur der humanen Lunge mit der Synchrotron-basierten μ CT-Technik

Mit dem Einsatz der Mikrocomputertomographie lässt sich Gewebe nichtdestruktiv mit hoher Auflösung dreidimensional darstellen. Unter Verwendung einer Synchrotronstrahlenquelle erreichen wir eine Auflösung von $3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße. Die hochenergetische Synchrotronstrahlung ermöglicht durch ihre sehr hohe Intensität ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis und ist dadurch geeignet die Mikroarchitektur des Azinus abzubilden (siehe Abbildung 6).

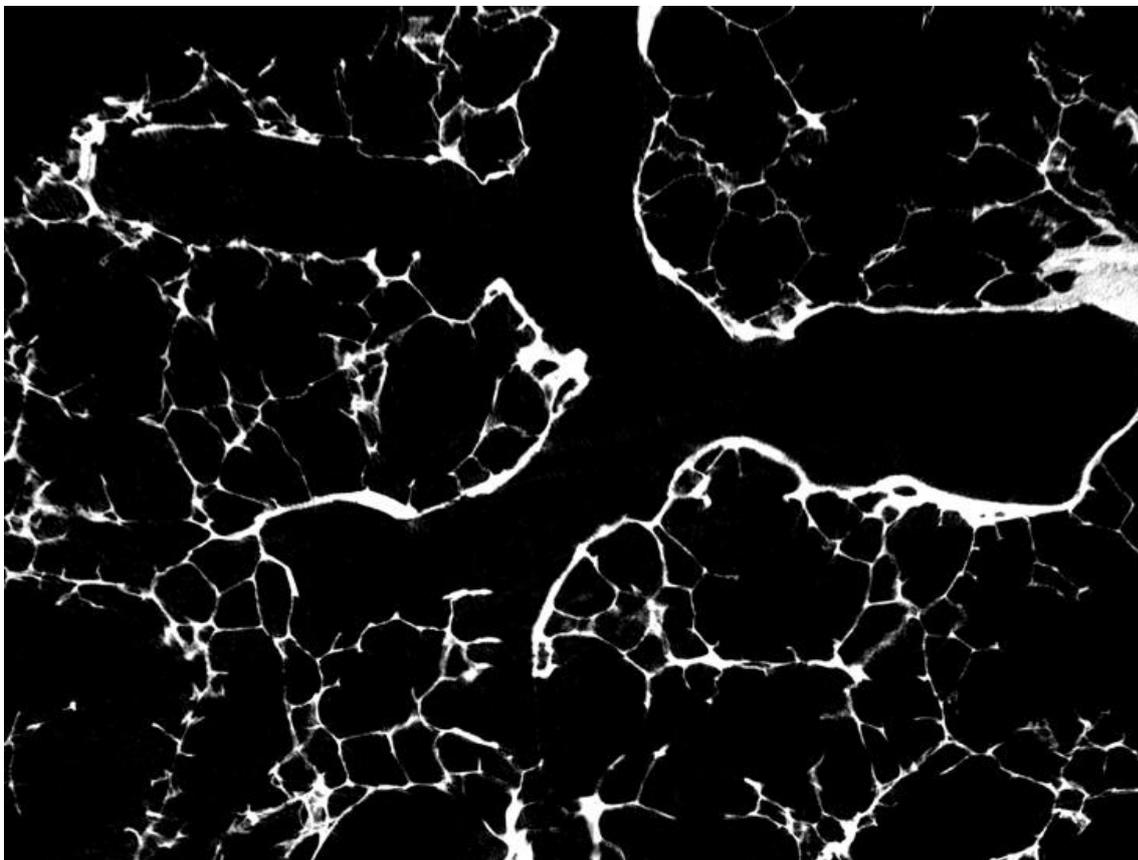


Abb. 6: Synchrotron- basierte μ CT- Aufnahme eines sich verzweigenden Bronchiolus terminalis im axialen Schnitt. Die monochromatische Synchrotronstrahlung führt zu einem exzellentem Signal- Rausch- Verhältnis.

Die Synchrotron- basierten Mikro-CT Aufnahmen werden mit dem Mikro- CT Scanner an der X2B-beam-line der National Synchrotron Light Source (NSLS) der nationalen Brookhaven Laboratorien angefertigt. ⁶⁸

Alle 12 Gewebezylinder werden unter identischen Bedingungen gescannt und wir erhalten 12 Volumendatensätze.

3.2 Ergebnis der histologischen Vergleichsuntersuchung

Der Vergleich der radiographisch erstellten Datensätze des Lungengewebes mit den digitalisierten histologischen Präparaten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung.

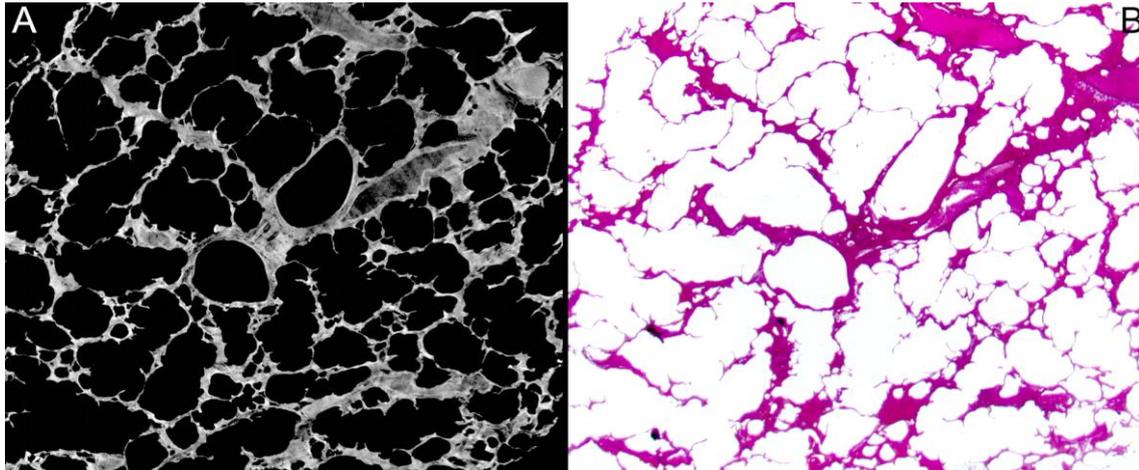


Abb. 7: Gegenüberstellung einer Synchrotron- basierten μ CT- Aufnahme ($3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße) und einer mikrophotographischen Aufnahme des mit Hämatoxylin- Eosin gefärbten Lungengewebes (Abb. 7 B).

3.3 Nachbearbeitung der Volumendatensätze

3.3.1 Binarisierung der Volumendatensätze

Die computertomographisch erstellten Volumendatensätze der 12 Lungengewebeproben werden zur Segmentation der Azini binarisiert.

Abbildung 8 stellt eine Synchrotron- basierte μ CT- Aufnahme (Abbildung 8 A) und den zugehörigen binarisierten Datensatz (Abbildung 8 B) gegenüber. Der rote Stern markiert den sich verzweigenden konduktiven Bronchus.

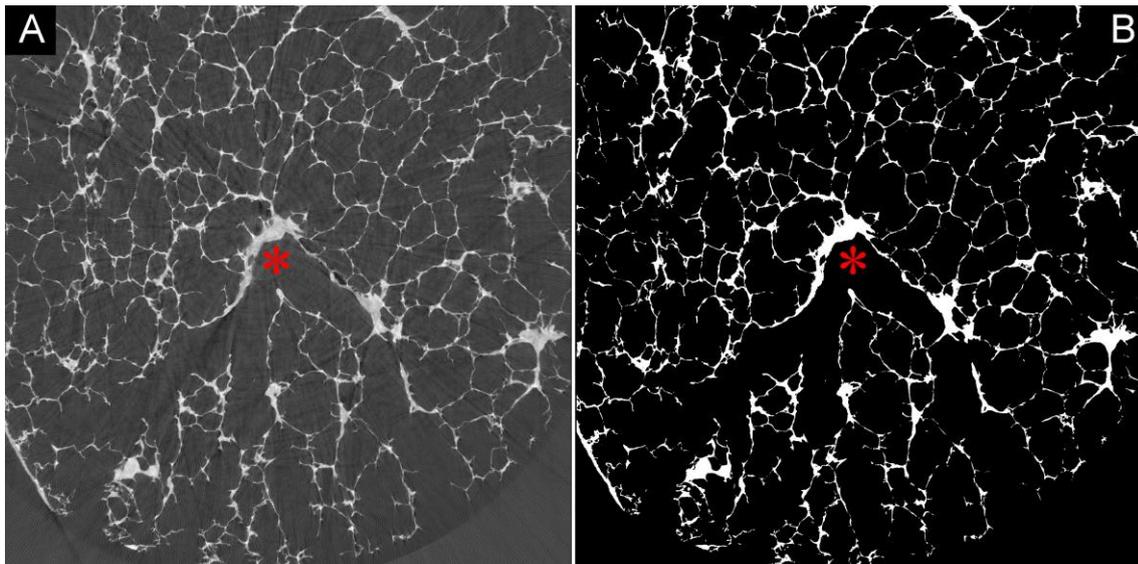


Abb.8: Der rote Stern markiert einen sich verzweigenden konduktiven Bronchus. Abbildung 8 A ist eine Synchrotron- basierte μ CT- Aufnahme vor der Binarisierung der Volumendatensätze. Die verschiedenen Dichten des Gewebes sind in Graustufen abgebildet. Gegenübergestellt sieht man den binarisierten Datensatz. Das Gewebe erscheint weiß, die lufthaltigen Alveolarräume schwarz (Abb. 8 B).

3.3.2 Segmentation der Azini

Die Segmentation der Azini wird anhand der binarisierten Volumendatensätze durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt die einzelnen Schritte der Segmentation. Mittels des roten Sterns ist jeweils der Bronchus terminalis markiert. Zu sehen ist in Abbildung 9 A ein computertomographischer axialer Schnitt durch einen Bronchus terminalis mit einer Voxelgröße von $3,9 \mu\text{m}^3$. Nach dem Verbinden der Strukturen des Azinus entsteht ein zusammenhängendes Volumenelement (Abb. 9 B). Hierbei werden Voxel gleicher Dichte miteinander verbunden. Anschließend können die Azini aus dem Volumendatensatz segmentiert werden. Abbildung 9 C zeigt exemplarisch einen segmentierten Azinus.

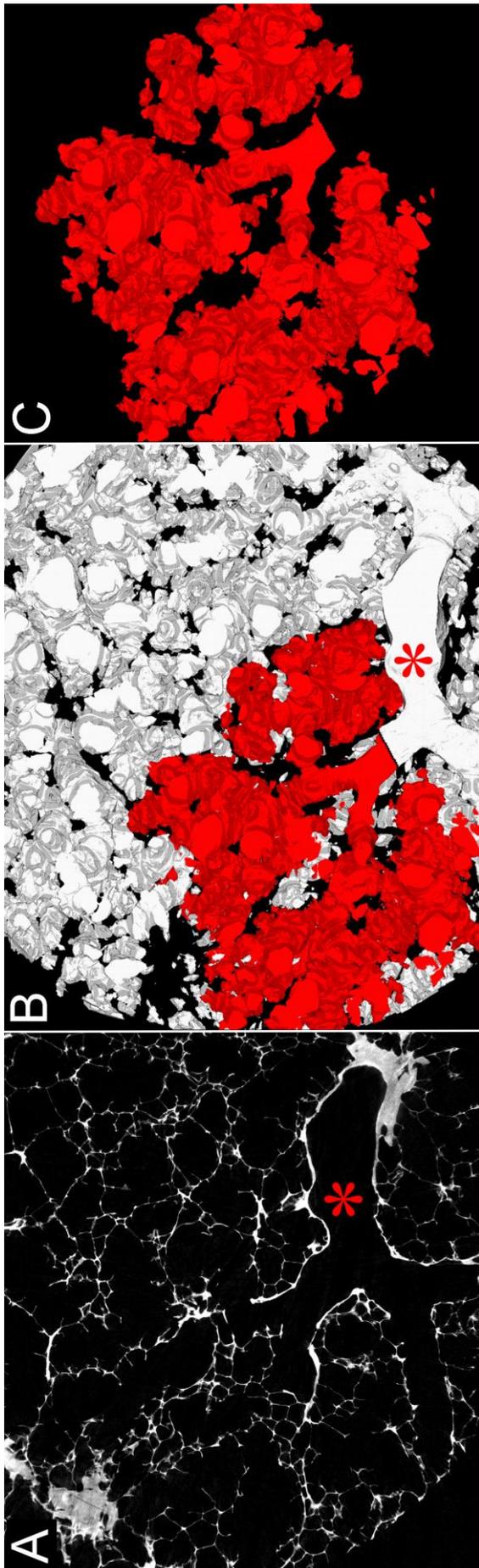


Abb. 9: Segmentation eines Azinus aus dem binarisierten Volumendatensatz. Abbildung 9 A zeigt eine Synchrotron- basierte μ CT-Aufnahme ($3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße) eines sich verzweigenden Bronchiolus terminalis (roter Stern) im axialen Schnitt. Nach dem Verbinden der Voxel gleicher Dichte zu einem zusammenhängenden Volumenelement (siehe Abbildung 9 B) wird der Azinus aus dem Volumendatensatz segmentiert (Abbildung 9 C).

3.3.3 Erstellen der Mittelachse

Mit dem für uns entwickelten Centerline- Extraktionsalgorithmus wird eine Mittelachse aller Atemwege innerhalb der segmentierten Azini gebildet (siehe Abb.10, schematische Darstellung des Azinus mit Mittelachse). Die so errechnete Mittelachse erlaubt die Vermessung des Azinus in Form einer sich hierarchisch verzweigenden Struktur, in der einzelne Segmente abgegrenzt werden können. Die morphometrischen Daten werden anhand der bestimmten Mittelachse berechnet.

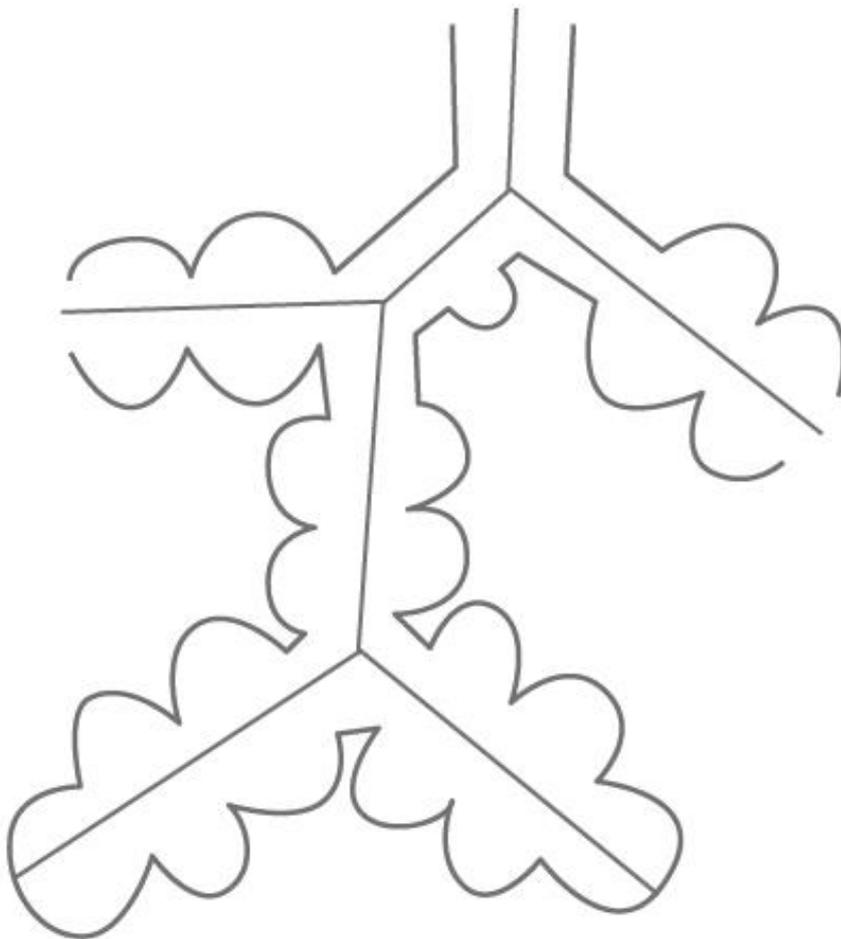


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Azinus mit Mittelachse. Mit dem entwickelten Centerline- Extraktionsalgorithmus wird eine Mittelachse durch die intraazinären Atemwege gelegt.

Auf Abbildung 11 ist ein segmentierter Azinus mit der zugehörigen Mittelachse dargestellt.

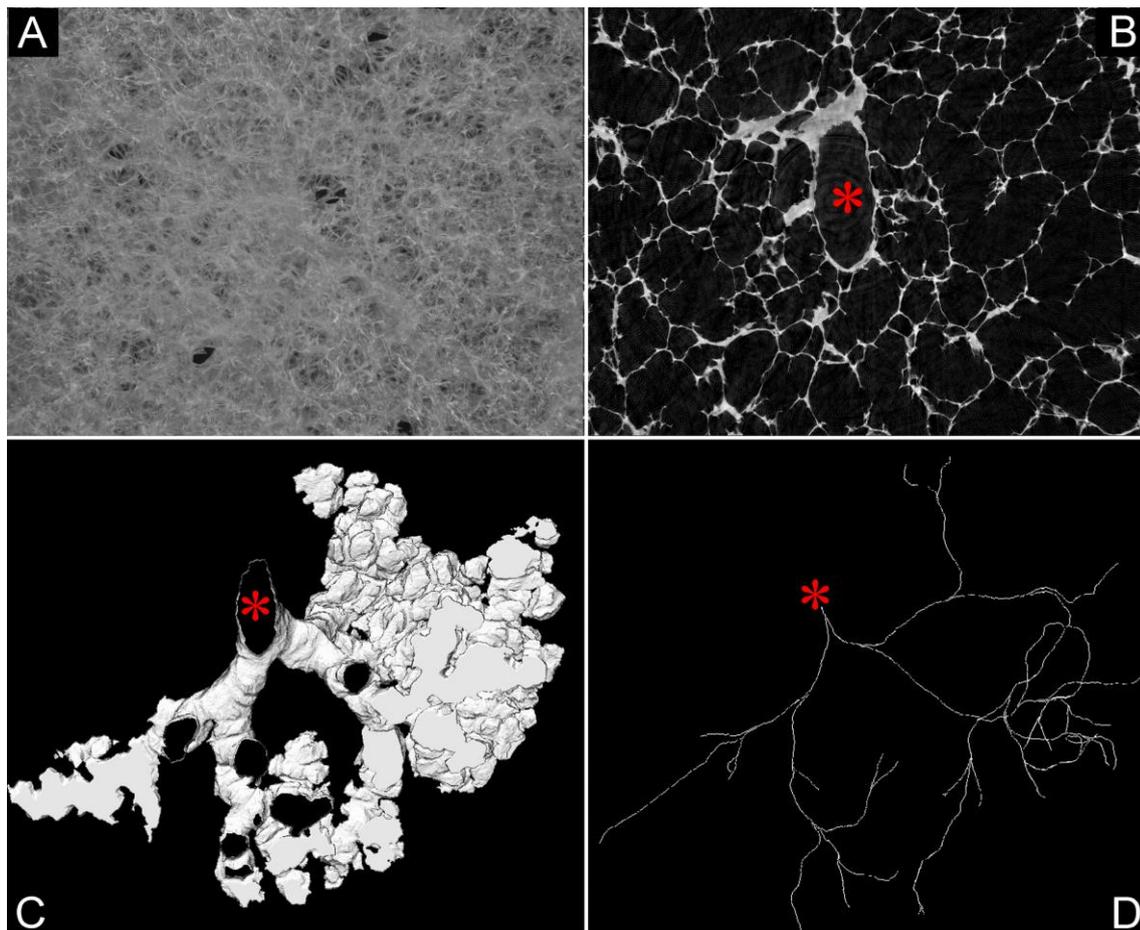


Abb. 11: Segmentation eines Azinus. Die Abbildung 11 A zeigt das mit Formalin fixierte Lungengewebe. Der rote Stern (Abb. 11 B, Synchrotron- basierte μ CT- Aufnahme, transversaler Schnitt eines Bronchus respiratorius) wird interaktiv vom Untersucher als Startpunkt gesetzt, von welchem ausgehend Voxel gleicher Dichte miteinander verknüpft werden. Auf Abbildung 11 C ist der segmentierte Azinus zu sehen. Mit dem entwickelten Centerline-Extraktionsalgorithmus wird die Mittelachse der Atemwege errechnet (Abb. 11 D).

3.4 Ergebnisse der morphometrischen Analyse

3.4.1 Volumen, Oberfläche und Anzahl der Generationen

Die morphometrische Analyse wird mit dem Softwareprogramm ANALYZE 9.0 durchgeführt. Es werden 8 Azini vermessen, da nur diese als vollständig erfasste Azini identifiziert werden konnten.

Hierbei wird das mittlere Azinusvolumen mit einem Wert von $131,3 \pm 29,2 \text{ mm}^3$ bestimmt. Die Volumina der einzelnen Azini schwanken innerhalb eines Bereichs von $92,5 \text{ mm}^3$ bis $171,3 \text{ mm}^3$.

Bei der Berechnung der mittleren Oberfläche der Azini ergibt sich eine Oberflächengröße von $112 \pm 26 \text{ cm}^2$.

Durchschnittlich weisen die untersuchten Azini 43 ± 10 Segmente (Generationen) auf.

3.4.2 Anzahl der Tochteräste pro Segment (Generation) und Abhängigkeit von der Segmentlänge und dem Volumen der Azini

Die Anzahl der Tochteräste, in Abhängigkeit von der Generation des intraazinären Bronchialbaumes, weist signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten 8 Azini auf (siehe Abbildung 12). So werden beispielsweise Azini gefunden, die in der 6. Generation 29 Tochteräste besitzen, wohingegen andere Azini in dieser Generation nur 6 Tochteräste aufweisen.

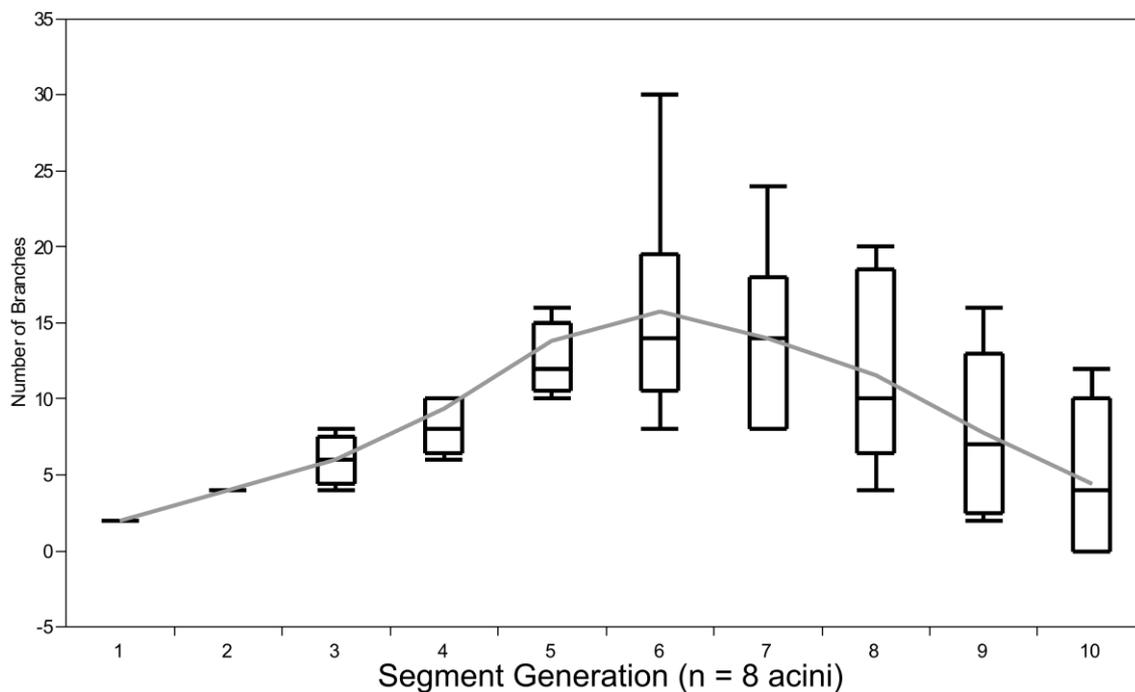


Abb. 12: Boxplot- Diagramm der Anzahl der Verzweigungen (y- Achse) in Relation zu der Generation (x- Achse). Die Anzahl der Verzweigungen steigt an bis zur sechsten Generation und fällt dann kontinuierlich wieder ab bis zur zehnten Generation.

Allerdings ist zu erkennen, dass die Anzahl der Tochteräste bis zu Generation 6 stetig ansteigt und anschließend bis zu Generation 10 wieder abfällt.

Die Länge der einzelnen Segmente ist sehr unterschiedlich. Wie auf Abbildung 13 erkennbar, zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der Segmentlänge und der Generation ($P < 0,3$) innerhalb der Azini.

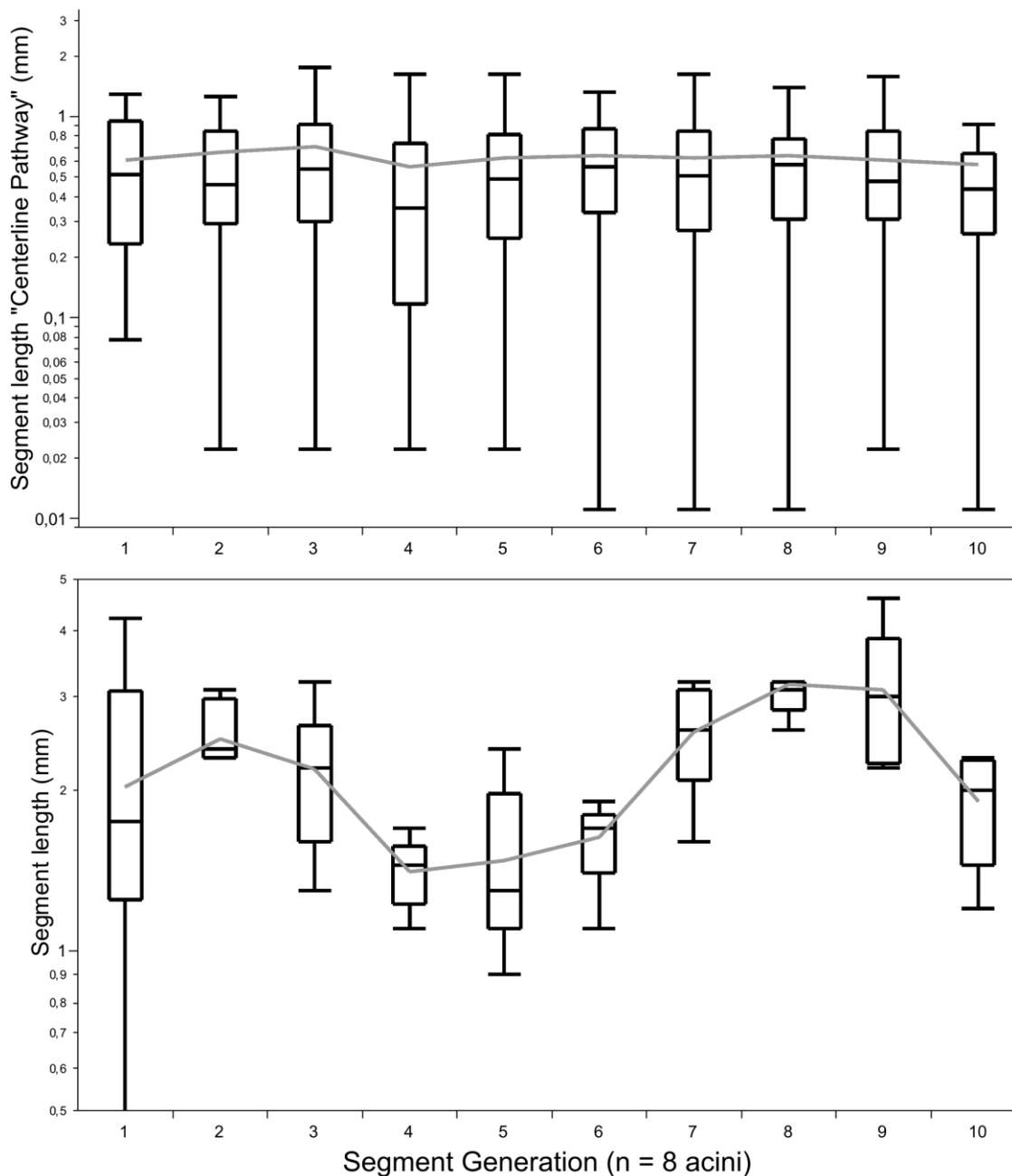


Abb. 13: Boxplot- Diagramm der Segmentlängen (y- Achse) in Relation zu der Generation (x- Achse). Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Länge der Segmente und der Generation innerhalb des Azinus ($P < 0,3$).

Allerdings zeigt sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Tochteräste und dem Volumen der Azini (Abbildung 14). Je höher die Anzahl der Tochteräste pro Azinus, desto größer ist das Volumen des jeweiligen Azinus ($r^2 = 0,96$).

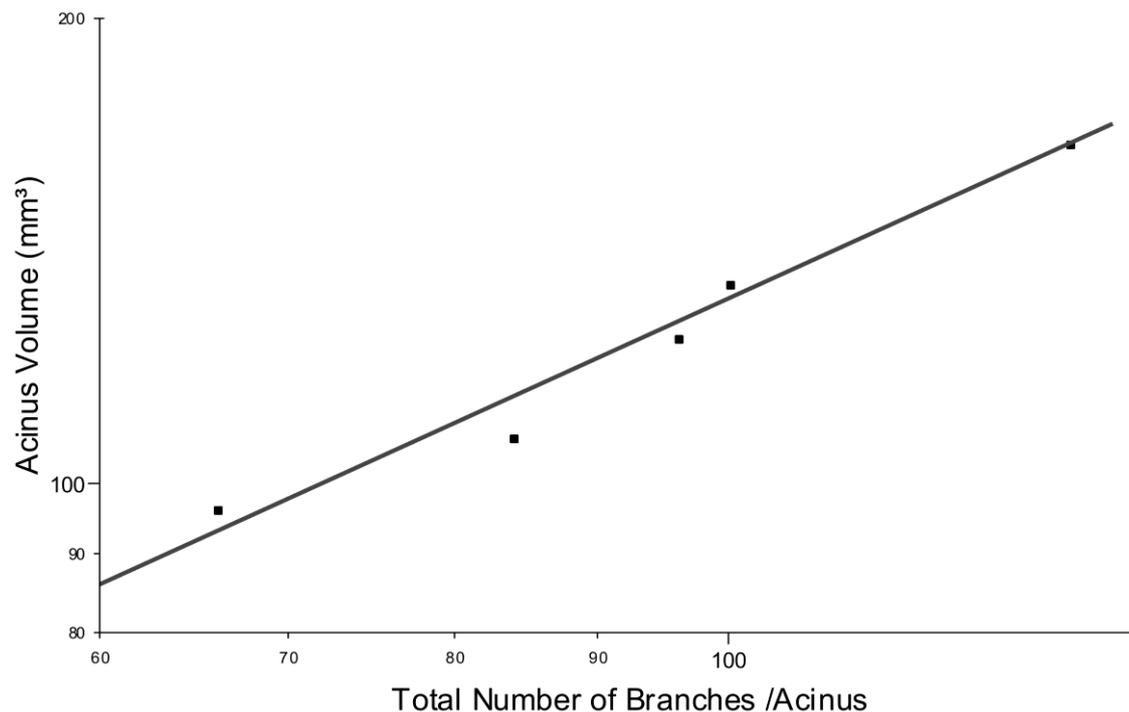


Abb. 14: Darstellung der gesamten Anzahl der Verzweigungen innerhalb der Azini (x- Achse) in Relation zu dem Volumen der Azini (y- Achse). ($r^2 = 0,96$)

3.4.3 Longitudinale Länge der Luftwege innerhalb des Azinus

Die longitudinale Länge der intraazinären Atemwege ist die Distanz, gemessen vom Beginn der ersten Alveole im Bronchiolus respiratorius bis zum Ende der Sacculi alveolares, einschließlich der letzten Alveole (siehe Schemazeichnung Abb. 15).

Gemessen wird die longitudinale Länge entlang der errechneten Mittellinie innerhalb des sich verzweigenden Bronchialbaumes. Es werden anschließend die Längen der einzelnen Segmente, die über die Mittellinie verbunden sind, summiert.

Wir messen eine mittlere longitudinale Länge der einzelnen Segmente von $0,638 \pm 0,55$ mm, wobei die ermittelten Längen von $0,02 - 3,75$ mm reichen. Die Summe der mittleren longitudinalen Längen der Segmente, als komplette Atemwegslänge im Azinus, beträgt $7,45 \pm 0,63$ mm.

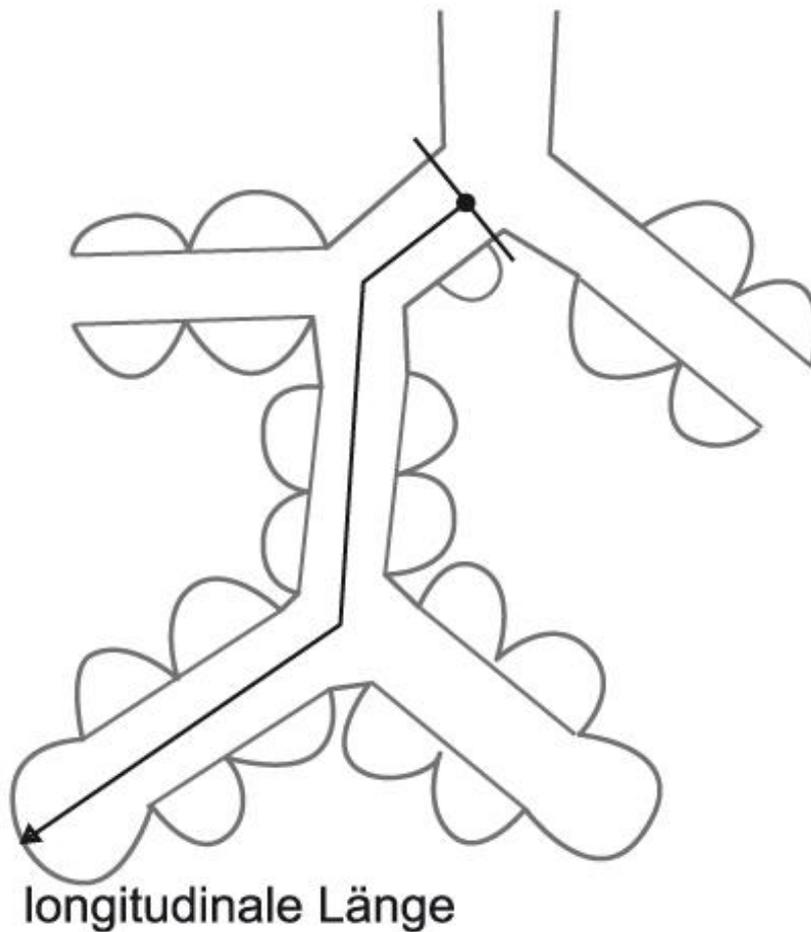


Abb. 15: Schemazeichnung eines Azinus. Die longitudinale Länge ist die Distanz, gemessen von der ersten Alveole im Bronchiolus respiratorius bis zur letzten Alveole im Sacculus.

3.4.4 Segmentlänge und Verzweigungswinkel

Die Längen der Segmente in Abhängigkeit von der Generation sind in Abbildung 13 dargestellt. Es wird eine Länge von 0,52 bis 0,93 mm gemessen. Diese zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Segmenten ($P < 0,2$).

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Segmenten lassen sich bei den Verzweigungswinkeln der Tochteräste feststellen ($P < 0,3$). Diese werden mit 113° bis 134° bestimmt (siehe Tabelle 1).

Generation	Length (mm)	Surface (mm ²)	Angle	Mean Number of Branches
1 (Bronchus terminalis)	0.93 ± 0.43	0.53 ± 0.3	113.1 ± 37.5	-
2	0.61 ± 0.41	0,4 ± 0.19	125.2 ± 42.9	2
3	0.66 ± 0.61	0,39 ± 0.18	126.4 ± 24.5	4
4	0.71 ± 0.49	0,28 ± 0.16	128.1 ± 31.8	6
5	0.55 ± 0.58	0,23 ± 0,18	125.7 ± 32.1	9.3
6	0.62 ± 0.51	0,22 ± 0,17	124.6 ± 25.5	13.7
7	0.64 ± 0.47	0.2 ± 0.15	129.4 ± 30.4	15.7
8	0.52 ± 0.51	0,19 ± 0.1	127.5 ± 29.3	14
9	0.64 ± 0.47	0.2 ± 0.12	129.8 ± 26.3	11.5
10	0.61 ± 0.45	0.18 ± 0.11	125.5 ± 29.4	7.7
11	0.58 ± 0.49	0.15 ± 0.11	134.2 ± 19.3	4.5

Tabelle 1: Dimensionen der acht segmentierten Azini angegeben als Mittelwerte und Standardabweichung.

3.4.5 Innerer und äußerer Durchmesser

Der innere Durchmesser der azinären Atemwege verkleinert sich von $0,66 \pm 0,04$ mm auf $0,34 \pm 0,06$ mm ($P < 0,001$) und bleibt ab der siebten Generation konstant ($P < 0,5$). Zu erkennen ist eine kontinuierliche Abnahme des inneren Durchmessers mit zunehmender Generation (Abbildung 17).

Der äußere Durchmesser, einschließlich des Durchmessers der außen aufsitzenden Alveolen, beträgt im Mittel $0,75$ mm ($0,67 - 0,79$ mm). Dieser steht, im Gegensatz zum inneren Durchmesser, in keinem Zusammenhang mit der Generation (Abbildung 17).

Eine schematische Darstellung des Azinus (Abb. 16) soll die Bedeutung von innerem und äußerem Durchmesser erläutern.

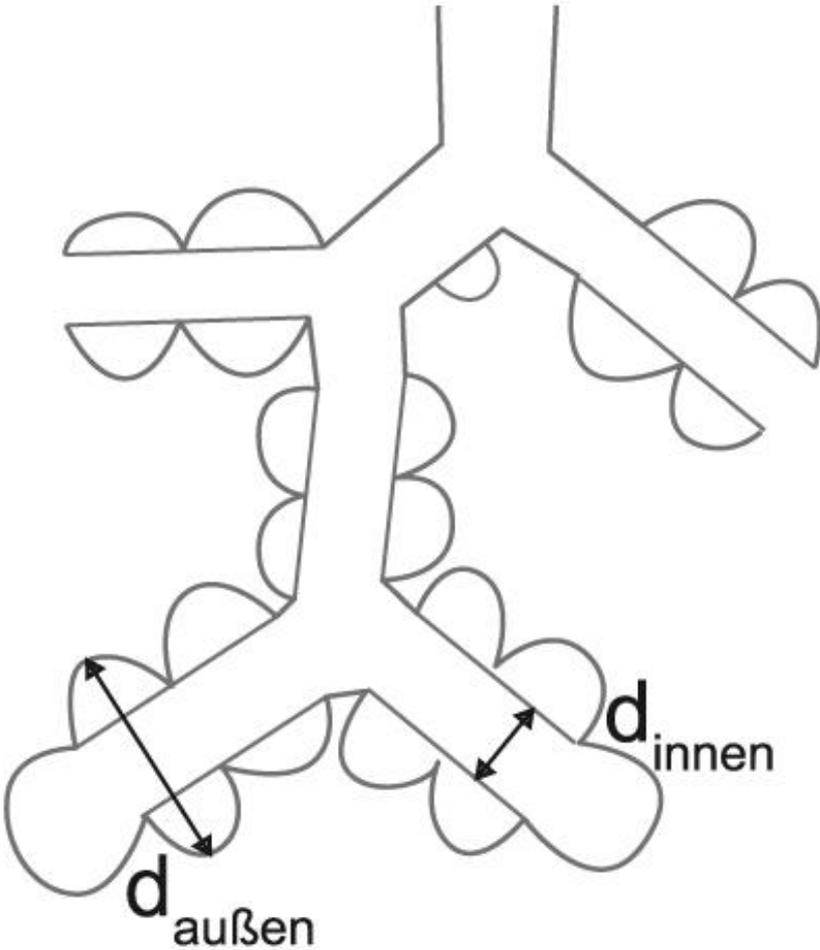


Abb. 16: Schematische Darstellung eines Azinus. Der innere Durchmesser bezieht sich nur auf den Atemwegsgang, während der äußere Durchmesser auch die außen aufsitzenden Alveolen misst.

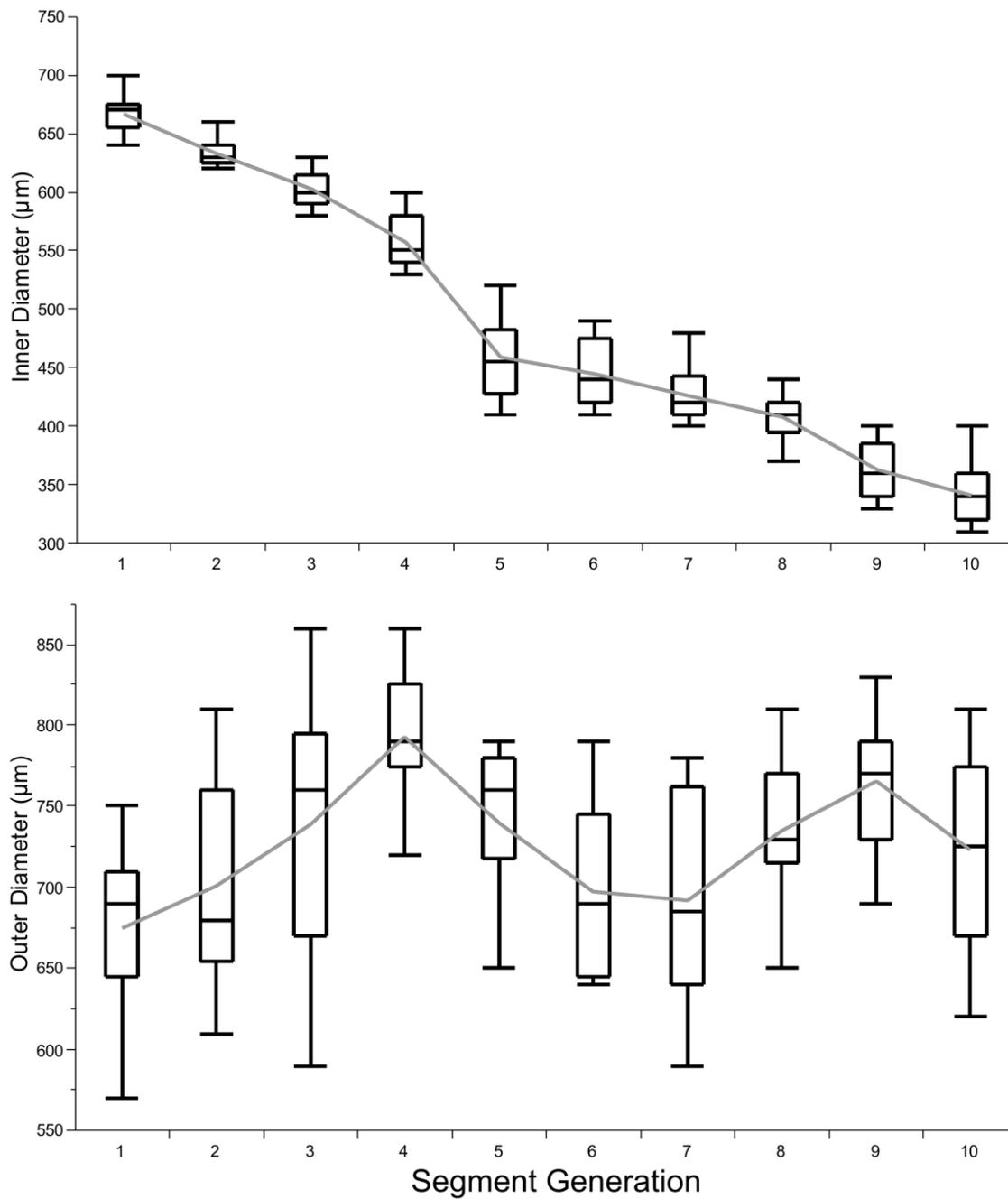


Abb. 17: Boxplot- Diagramm der Relation zwischen innerem und äußerem Durchmesser (y-Achse) und der Generation (x- Achse). Während der innere Durchmesser mit zunehmender Generation kontinuierlich abnimmt, steht der äußere Durchmesser in keinen Zusammenhang mit der Generation.

4 Diskussion

Die quantitative, radiologische Analytik des Azinus, als kleinste funktionelle Einheit der Lunge, ist aufgrund der komplizierten Mikroarchitektur und der geringen Dicke der Alveolarwände von wenigen Mikrometern durch dreidimensionale bildgebende Verfahren nicht möglich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung eines lückenlosen dreidimensionalen Datensatzes des Azinus der humanen Lunge, einschließlich der morphometrischen Quantifizierung der segmentierten Azini. Wir erreichen mit dem Einsatz hochenergetischer Synchrotronstrahlung eine Auflösung von $3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße. Diese Auflösung erweist sich als geeignet, die dünnen Alveolarwände ausreichend abzubilden.

Goldstandard zur quantitativen Erfassung kleiner räumlicher Strukturen ist bisher die Histomorphometrie, welche jedoch zahlreiche Nachteile und Limitationen aufweist.²¹⁻²³ Die von uns angewendete Methode erweist sich gerade im Hinblick auf die vollständige dreidimensionale und nicht destruiende Darstellung als vorteilhaft und stellt ein schnelleres und standardisierteres Verfahren dar.⁴⁶

Das große Potential in der Verwendung von Synchrotronstrahlenquellen zur Darstellung von Lungengewebe wurde auch in vergangenen Arbeiten schon gezeigt.

Tsuda et al und Schittny et al nutzten die Synchrotron-basierte μCT -Technik, um Azini von Rattenlungen abzubilden und um die Alveolarsepten zu quantifizieren.^{7, 70}

Parameswaran et al setzten die μCT - Technik zur Visualisierung und Quantifizierung von Umbauvorgängen im Rahmen des Lungenemphysems in Mäuselungen ein.⁷¹

Litzlbauer et al zeigten in ihrer Studie an Schweinelungen und anschließend an einer humanen Lunge die Darstellbarkeit des Gewebes mittels μCT -Technik. Limitierend bezüglich einer korrekten morphometrischen Analyse war allerdings die Auflösung von $9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße.³⁰

Watz et al benutzten in ihrer Studie humane Lungen. Eine der Lungen besaß keine pathologischen Auffälligkeiten, die andere war durch ein zentrilobuläres Emphysem verändert. Die terminalen Lufträume wurden mittels der μCT -Technik bei einer Auflösung von $14 \mu\text{m}^3$ dreidimensional rekonstruiert. Morphometrische Analysen wurden keine durchgeführt.⁶⁴

4.1 Ergebnisse der morphometrischen Analyse

4.1.1 Volumen und Oberfläche

Wir bestimmten ein mittleres Azinusvolumen von $131,3 \text{ mm}^3 \pm 29,2 \text{ mm}^3$. Haefeli-Bleuer und Weibel berechneten, anhand ihrer Ausgussmodelle aus Silikon, ein Volumen von 187 mm^3 .¹³ Hansen und Ampaya, die Serienschnitte rekonstruierten, fanden ein sehr ähnliches Volumen von $182,8 \text{ mm}^3$.²¹

Die von Pump und Boyden veröffentlichten Volumina sind wesentlich geringer. Diese bestimmten Volumina von Azini humaner Lungen von $1,33$ bis $30,9 \text{ mm}^3$, bzw. von $15,6 \text{ mm}^3$.^{18, 27} Allerdings ist sehr zweifelhaft, ob die untersuchten Ausgussmodelle die kleinen intraazinären Atemwege überhaupt komplett ausfüllten.

Die Oberfläche der Azini lag in unserer Arbeit durchschnittlich bei $112 \pm 26 \text{ cm}^2$. Dieses Ergebnis ist verglichen mit dem Ergebnis histomorphometrischer Untersuchungen, die eine Oberfläche von $69 \pm 23 \text{ cm}^2$ hervorbrachten, höher.

4.1.2 Anzahl der Generationen

Die Atemwege innerhalb der Azini verzweigen sich im Durchschnitt über 11 Generationen.

Bezüglich der Anzahl der Generationen unterscheiden sich die veröffentlichten Ergebnisse nicht signifikant.

Haefeli-Bleuer und Weibel beschrieben im Durchschnitt eine Verzweigung über neun Generationen; die Azini endeten zwischen der sechsten und zwölften Generation.¹³ In der Studie von Schreider und Raabe endeten die Azini im Durchschnitt in der achten Generation.²⁸ Hansen und Ampaya lokalisierten das Ende der Azini zwischen der siebten und elften Generation, mit einem Maximum in Generation neun²¹, wohingegen Pump nur wenige Azini fand, die sich bis zur neunten Generation erstreckten, und das Ende des Azinus im Durchschnitt in Generation fünf bis sechs beschrieb.²⁷ Wie schon erwähnt ist dieses Ergebnis sehr wahrscheinlich auf die inkomplette Füllung mit Ausgussmasse zurückzuführen.

4.1.3 Geometrie

Die Atemwege verzweigen sich irregulär dichotom. Dies bedeutet, dass aus jedem Elternast zwei Tochteräste hervorgehen, die sich allerdings in ihrer Geometrie unterscheiden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem zahlreicher anderer Autoren überein.^{13,21}

Zu der irregulären Dichotomie trägt auch ein unterschiedlicher Verzweigungswinkel der „Tochteräste“ bei. Phalen et al fanden heraus, dass sich der Winkel, mit dem der „Tochterast“ vom „Mutterast“ abzweigt, proportional zum Durchmesser des „Tochterastes“ verzweigt. Dies führt dazu, dass ein sehr kleiner „Tochterast“ annähernd rechtwinklig verläuft, während der Ast mit dem größeren Durchmesser nur leicht die Richtung des „Mutterastes“ ändert.²⁰

Innerhalb der acht in unserer Studie vermessenen Azini fanden wir Verzweigungswinkel von 113° - 134° . Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Segmenten.

4.1.4 Longitudinale Länge intraazinärer Atemwege

Eine Möglichkeit der Charakterisierung der Dimension und Variation intraazinärer Atemwege ist die Bestimmung der longitudinalen Länge der Atemwege innerhalb des Azinus.⁷² Gemessen und summiert werden die einzelnen Segmentlängen, beginnend mit dem ersten Bronchus respiratorius und endend im Sacculus alveolares.

Die mittlere longitudinale Länge der Atemwege wurde von uns mit $7,45 \pm 0,63$ mm gemessen. Die einzelnen Segmentlängen betragen im Mittel $0,638 \pm 0,55$ mm.

Haefeli- Bleuer und Weibel maßen Längen zwischen 5 und 13,5 mm, mit einem Mittelwert von $8,25 \pm 1,4$ mm und erbrachten damit sehr ähnliche Ergebnisse wie wir. Auch die Länge der einzelnen Segmente kommt mit 0,73 mm unserem Ergebnis sehr nah.

4.1.5 Innerer und äußerer Durchmesser

Der äußere Durchmesser misst den Durchmesser des Ganges einschließlich der aufsitzenden Alveolen, der innere Durchmesser beinhaltet die Alveolen nicht, sondern nur den Gang (siehe Abbildung 16).

Mit zunehmender Anzahl der Generation verringert sich der innere Durchmesser. Während er im Bereich der ersten respiratorischen Bronchiole $500 \mu\text{m}$ beträgt, wird von Haefeli- Bleuer und Weibel am Ende des Azinus nur noch ein Durchmesser von $300 \mu\text{m}$ gemessen. Der äußere Durchmesser beträgt $700 \mu\text{m}$ und verändert sich mit zunehmender Generation nicht.¹³ In unserer Arbeit beträgt der innere Durchmesser in der ersten Generation $665 \pm 18 \mu\text{m}$ und fällt auf $343 \pm 26 \mu\text{m}$ in der 10. Generation ab. Der äußere Durchmesser variiert zwischen $650 \mu\text{m}$ und $800 \mu\text{m}$.

Der im Verlauf kleiner werdende innere Durchmesser wurde auch schon von Weibel, Pump, Hansen und Ampaya und Schreider und Raabe beschrieben.^{21,24,27,28}

4.2 Vergleich von Histomorphometrie und μ CT-Technik

4.2.1 Histomorphometrie

In der Vergangenheit wurden die anatomischen Strukturen der Lunge histomorphometrisch erfasst. Weibel und zahlreiche andere Autoren quantifizierten die Mikroarchitektur des humanen Azinus anhand von mikroskopisch untersuchten Serienschnitten, hergestellt aus Gewebeproben.^{4,6,24} Die Histomorphometrie galt lange Zeit als Goldstandard zur Erfassung von Strukturen mit einer Größe $< 200 \mu\text{m}$. Obwohl eine hohe räumliche Auflösung und ein hoher Bildkontrast erreicht werden, ergeben sich unter Verwendung dieser Methode eine Reihe von Nachteilen und Limitationen.

Grundlage der mikroskopischen Untersuchung sind zweidimensionale Schnitte eines Gewebes, dessen Struktur allerdings ursprünglich dreidimensionaler Art ist. Ein auf zwei Dimensionen begrenzter Schnitt kann jedoch die komplizierte dreidimensionale Architektur komplexer Organe nicht abbilden. Letztendlich bleibt somit eine dreidimensionale Struktur auf zwei Dimensionen reduziert, die fehlende dritte Dimension muss nach Zerstörung der Integrität rekonstruiert werden.¹⁶ Problematisch hierbei ist unter anderem, dass trotz guter Präparationstechniken, zwei nebeneinander liegende Schnitte nicht ohne Gewebeverlust wieder zusammengefügt werden können.³⁰ Alle gängigen Präparationstechniken führen zu Gewebedeformitäten.

Darüber hinaus sind kontinuierliche quantitative Messungen, wie z.B. die kontinuierliche Messung der longitudinalen Länge der intraazinären Atemwege, nicht durchführbar.

Hinzu kommt, dass einmal zerschnittenes Gewebe in seiner Kontinuität zerstört ist und somit für weitere Untersuchungen mittels anderer Methoden nicht mehr zur Verfügung steht bzw. die Untersuchung erschwert ist.

Die Anfertigung der zahlreichen sehr dünnen Serienschnitte ist ein aufwendiger Prozess, der sehr viel Zeit und Personal in Anspruch nimmt. Zudem ist das Präparationsverfahren teuer.

Ein weiterer Nachteil der Histomorphometrie ergibt sich aus der Tatsache, dass jeweils nur wenige Mikrometer der Lunge quantifiziert werden können. Ausgehend von diesen kleinen Proben müssen Rückschlüsse auf ein gesamtes Organ gezogen werden.¹⁶

4.2.2 Mikrocomputertomographie

Die Mikrocomputertomographie wurde in den vergangenen Jahren immer häufiger zur quantitativen Analytik von Gewebeproben und kleinen Labortieren eingesetzt.^{35,37,50,58,60}

Der Einsatz von μ CT-Scannern in der Grundlagenforschung war zunächst auf Knochengewebe beschränkt.^{53,56} Dieses bietet einen ausreichenden Röntgenkontrast und die nötige Gewebestabilität nach Probengewinnung. Lungengewebe weist diese Eigenschaften von Natur aus nicht auf. Litzlbauer und Mitarbeiter zeigten in ihrer Arbeit an Schweinelungen, dass die Formalindampfbeatmung der Lungen und die anschließende Kontrasterhöhung des Lungengewebes mittels Osmiumtetroxid eine geeignete Methode ist, um auch Lungengewebe in der μ CT darzustellen. Auch eine humane Lunge wurde nach Anwendung dieser Präparationstechnik erfolgreich gescannt.³⁰

Die μ CT ermöglicht es, einen kompletten dreidimensionalen Datensatz zu erzeugen.³⁵ Somit wird eine dreidimensionale Gewebestruktur auch in allen drei Ebenen abgebildet. Die zweidimensionalen Schnittbilder werden ohne einen Gewebeverlust dreidimensional rekonstruiert.

Durch die Möglichkeit der dreidimensionalen Bildgebung, können nun auch kontinuierliche Messungen in allen 3 Raumebenen durchgeführt werden. Das Volumen, die Oberfläche und die Längen werden über die gesamte Länge der gescannten Probe berechnet.

Im Gegensatz zur destruktiven Methode der Histomorphometrie ist die μ CT ein nicht destruktives Verfahren. Die einmal gewonnenen Daten können beliebig oft nachbearbeitet und unterschiedlichen morphometrischen Analysen zugeführt werden.

4.2.2.1 Synchrotronstrahlenquellen

Durch die Entwicklung der hochauflösenden Synchrotronstrahlung konnte das Auflösungsvermögen von μ CT-Systemen auf Werte unter einen Mikrometer gesenkt werden.⁵⁴ Die Scanzeiten sind wesentlich kürzer als beim Einsatz von konventionellen Strahlenquellen.

Litzlbauer und Mitarbeiter scanneten die Proben der Schweinelungen und der humanen Lunge in einem μ CT-Scanner mit einer Auflösung von $9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße. Da die Alveolarsepten allerdings nur eine Dicke von 5-10 μm besitzen ist für die detaillierte Darstellung und Analyse eine höhere Auflösung nötig.³⁰

Durch den Einsatz hochenergetischer Synchrotronstrahlung ergeben sich neue Möglichkeiten der morphometrischen Analyse der feinen Lungenstrukturen. In unserer Arbeit wurde eine Auflösung von $3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße erreicht. Die Strukturen des Azinus werden damit abbildbar.

Aufgrund der sehr hohen Intensität der Strahlung lässt sich ein verbessertes Signal-Rausch- Verhältnis der Bilder erreichen, während sich die Datenaquisitionszeit im Vergleich mit Standard μ CT- Scannern verringert.⁴⁸

Ein großer Nachteil ergibt sich allerdings durch die Ortsgebundenheit an Laboratorien mit Teilchenbeschleunigern.⁵³ Es entstehen hohe Kosten und Transportzeiten.

4.3 Vergleich der Präparationsmethoden

Die Untersuchung der Architektur des Bronchialbaumes wurde traditionell anhand von Ausgussmodellen durchgeführt. Diese wurden z.B. aus Silikon angefertigt und anschließend unter Licht- oder Elektronenmikroskopen vergrößert und mittels stereologischer Methoden quantitativ erfasst.^{13,17,18} Diese Präparationsmethode ist sehr komplex und resultiert oftmals in einer inkompletten Füllung der Atemwege. Besonders die distal liegenden Azini, mit ihrer komplizierten Mikroarchitektur, sind kaum ohne Artefakte ausfüllbar. Daraus resultieren zwangsweise zu geringe Messwerte, unter anderem für Volumen und Oberfläche.

Ein weiteres Problem stellt die Trennung von konduktiven und respiratorischen Alveolen dar. Hierzu muss die erste Alveole korrekt aufgesucht werden, um den Azinus zu separieren. Wird der erste Bronchus respiratorius falsch bestimmt, sind auch die anschließend erhobenen Daten nicht korrekt.

Während die μ CT im Bereich der Strukturanalyse von Knochengewebe bereits breiten Einsatz findet, ist die Darstellung des Lungengewebes mit präparatorischen Schwierigkeiten verbunden. Lungengewebe besitzt keinen ausreichenden Röntgenkontrast und keine ausreichende Gewebestabilität. Um die alveolären Strukturen zu erhalten und die Lunge in Inspirationsstellung zu fixieren, haben wir die von Lizlbauer et al 2006 an Schweinelungen eingesetzte Methode der Formalindampfbeatmung verwendet.³⁰ Eine Veränderung des Gewebes lässt sich auch bei dieser Präparationsmethode nicht ausschließen. Es kommt zu einer Denaturation der Proteine, wie Kollagen und Elastin, außerdem zur Dehydratation des Gewebes. Dies führt unweigerlich zur Gewebeschrumpfung. Das Lungengewebe verliert an Elastizität. Es ist ein Volumenverlust von durchschnittlich 20 % nach Formalindampfbeatmung im Vergleich mit dem ursprünglichen Lungenvolumen beschrieben.⁷³

4.4 Nachbearbeitung der Datensätze

Die Volumendatensätze der gescannten Lungenproben werden zur morphometrischen Strukturanalyse nachbearbeitet. Zunächst werden die Datensätze binarisiert. Hierzu

wird ein Grenzwert festgelegt, der die Luft von dem Gewebe trennt. Die Wahl eines angemessenen Grenzwertes (Threshold) stellt einen kritischen Schritt im Rahmen der Binärbilderzeugung dar. Der Grenzwert wird nicht durch ein automatisiertes Verfahren eingestellt, sondern aktiv vom Untersucher gewählt. Wählt der Untersucher den Grenzwert zu hoch, erscheinen die Alveolarwände dicker als sie es in der Realität sind, wird er zu niedrig eingestellt, entstehen „Löcher“ innerhalb der nur wenige Mikrometer dicken Alveolarwände. Hieraus ergibt sich eine erhebliche Untersucherabhängigkeit.

Ausgehend von den binarisierten Datensätzen wird die Segmentierung der Azini vorgenommen. Der Untersucher muss auch hier aktiv einen Startpunkt festlegen, von dem ausgehend Voxel gleicher Dichte miteinander verknüpft werden. Mit Hilfe der Saatkorntechnik entsteht so ein zusammenhängendes Volumenelement. Der Übergang von einem Bronchus terminalis zu einem Bronchus respiratorius ist eindeutig zu identifizieren, so dass bei diesem Schritt, im Gegensatz zu der häufig fehlerbehafteten Dissektion der Azini anhand der Ausgussmodelle, keine Fehler entstehen sollten.

Ein relativ zeitaufwändiger Schritt besteht anschließend in dem Heraussuchen der vollständigen Azini. Der Untersucher verfolgt visuell alle segmentierten Azini bis zu den Sacculi alveolares. Nur die kompletten Azini können der quantitativen Analyse zugeführt werden.

4.5 Limitationen

Durch den Einsatz von μ CT-Scannern mit Synchrotronstrahlenquelle ergeben sich in der Grundlagenforschung neue Möglichkeiten. Selbst von Geweben, die außerhalb des Körpers keine ausreichende eigene Stabilität besitzen, gelingt es nach entsprechender Präparation, vollständige Volumendatensätze zu generieren. Verschiedene morphometrische Untersuchungen werden nach Segmentierung einzelner Strukturen aus dem Volumendatensatz möglich.

Zunächst bleibt der Einsatz der μ CT-Scanner allerdings auf die ex-vivo Forschung begrenzt.

Lungengewebsproben sind bislang ausschließlich postmortal zu untersuchen. Eine am Lebenden entnommene Lungenbiopsie besitzt weder ausreichende Gewebestabilität der dünnen Alveolarwände noch ausreichenden Röntgenkontrast. Einsetzbar ist das Verfahren am stabileren Knochengewebe, was in der Osteoporoseforschung auch vielfach genutzt wird.^{53,56}

Weiterhin limitierend bezüglich einer in-vivo Forschung ist die Begrenzung des Messfeldes auf kleine Volumina von wenigen cm^3 .³⁵ Die Vergrößerung der Probe ist

nur auf Kosten der Auflösung durchführbar. Lediglich kleinere Labortiere werden bislang im μ CT untersucht.⁵⁰ Das Scannen einer gesamten menschlichen Lunge ist mit der von uns erzielten hohen Auflösung von $3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße nicht möglich.

Die Nutzung von Synchrotronstrahlung ist bislang teuer und aufwendig, was unter anderem an der Ortsgebundenheit liegt.⁵³ Die Proben müssen zu Orten mit Teilchenbeschleunigern transportiert werden und die zugeteilten Scanzeiten sind begrenzt.

Ein spezielles Problem unserer Arbeit lag darin, dass während der Formalindampfbeatmung der Lunge der obere Lungenlappen nicht entfaltet wurde. Dies zeigte sich an dem im 64-Zeilen Computertomographen berechneten Gesamtvolumen der Lunge von 1155 ml, was verglichen mit dem totalen in-vivo Lungenvolumen wesentlich geringer ausfiel. Damit war unsere Probenentnahme ausschließlich auf den unteren Lungenlappen begrenzt.

Das Problem der Gewebeschrumpfung im Rahmen unserer Präparationstechnik wurde bereits erläutert und von anderen Autoren eingehend beschrieben.³⁰

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein vollständiger dreidimensionaler Datensatz des Azinus der humanen Lunge mittels der Synchrotron-basierten Mikro-CT-Technik erstellt und anschließend eine quantitative Untersuchung der Strukturen des Azinus durchgeführt.

Eine humane Lunge wurde durch die Beatmung mit Formalindampf in Inspirationsstellung fixiert und in einem 64-Zeilen Computertomographen gescannt. Die anschließend ausgestanzten Proben (N = 12, Durchmesser = 8 mm, Höhe = 10 mm) wurden mit Osmiumtetroxid kontrastverstärkt und mit einer Auflösung von $3,9 \mu\text{m}^3$ Voxelgröße in einem Mikro-CT mit Synchrotronstrahlenquelle gescannt. Mit einem automatisierten „Tree-Analysis“ Softwareprogramm konnten 8 Azini aus dem Volumendatensatz segmentiert werden. Die Morphometrischen Daten wurden mit dem Softwareprogramm ANALYZE 9.0 erhoben.

Die Atemwege innerhalb der Azini verzweigten sich über 11 Generationen. Das mittlere Azinusvolumen wurde mit $131,3 \pm 29,2 \text{ mm}^3$ berechnet und die mittlere Oberfläche des Azinus betrug $1012 \pm 26 \text{ cm}^2$. Der Innere Durchmesser verringerte sich ausgehend von dem Bronchiolus terminalis von $0,66 \pm 0,04 \text{ mm}$ auf $0,34 \pm 0,06 \text{ mm}$ ($P < 0,001$) und blieb nach der siebten Generation konstant ($P < 0,5$). Die Länge der einzelnen Generationen variierte zwischen 0,52 und 0,93 mm und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der zweiten und elften Generation. Der Verzweigungswinkel der „Tochteräste“ schwankte zwischen 113° und 134° ohne signifikante Unterschiede zwischen den Generationen ($P < 0,3$).

Die in vorangegangenen Arbeiten gezeigten Ergebnisse bezüglich der Morphometrie des humanen Azinus basieren auf den Methoden der Histomorphometrie. Diese arbeitet gewebedestruktiv und stellt lediglich Rückschlüsse von zweidimensionalen Serienschnitten auf dreidimensionale Strukturen her.

Unsere Arbeit zeigt die Möglichkeit der quantitativen Erfassung der Strukturen des Azinus anhand eines vollständigen Volumendatensatzes unter Verwendung der Synchrotron- basierten Mikro-CT- Technik.

5.2 English

Structural data about the human lung fin structure are mainly based on stereological methods applied to serial sections. As these methods utilize 2D images, which are often not contiguous, they suffer from inaccuracies which are overcome by analysis of 3D micro-CT images of the never-sectioned specimen.

The purpose of our study was to generate a complete data set of the intact three-dimensional architecture of the human acinus using high resolution synchrotron-based micro-CT (synMCT).

A human lung was inflation-fixed by formaldehyde ventilation and then scanned in a 64-slice CT over its apex to base extent. Lung samples (8-mm diameter, 10 mm height, N = 12) were punched out, stained with osmium tetroxide, and scanned using synMCT at $(4 \mu\text{m})^3$ voxel size. The lung functional unit (acinus, N = 8) was segmented from the 3D tomographic image using an automated tree-analysis software program. Morphometric data of the lung were analyzed by ANOVA. Intra-acinar airways branching occurred over 11 generations. The mean acinar volume was $131,3 \pm 29,2 \text{ mm}^3$ (range 92,5- 171,3 mm^3) and the mean acinar surface was calculated with $1012 \pm 26 \text{ cm}^2$. The airway internal diameter (starting from the bronchiolus terminalis) decreases distally from $0,66 \pm 0,04 \text{ mm}$ to $0,34 \pm 0,06 \text{ mm}$ ($P < 0,001$) and remains constant after the seventh generation ($P < 0,5$). The length of each generation ranges between 0,52 and 0,93 mm and did not show significant differences between the second and eleventh generation. The branching angle between daughter branches varies between 113-degree and 134-degree without significant differences between the generations ($P < 0,3$).

This study demonstrates the feasibility of quantitating the 3D structure of the human acinus at the spatial resolution readily achievable using synMCT.

6 Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro- Computertomographie
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
CCD	Charged- Couple- Device
Cm	Zentimeter
CmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DMP	Dimethoxypropan
eV	Elektronen- Volt
GeV	Giga- Elektronenvolt
HE	Haematoxylin- Eosin Färbung
HRCT	High Resolution Computertomographie
keV	Kilo- Elektronen- Volt
m ²	Quadratmeter
MB	Megabyte
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanz- Tomographie
PEEP	positive end expiratory pressure
SD	Standard deviation
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

1. Sapoval B, Filoche M, Weibel ER. Smaller is better- but not too small: A physical scale for the design of the mammalian pulmonary acinus. PNAS 2002; 99: 10411-10416
2. Weibel ER. 1997a. Design and morphometry of the pulmonary gas exchanger. In: Crystall RG, West RB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. The lung: scientific foundations. Philadelphia: Lippincott- Raven. pp. 1147-1157
3. Weibel ER. How does lung structure affect gas exchange? Chest 1983; 83: 657-665
4. Weibel ER. Is the lung built reasonably? Am Rev Respir Dis 1983; 128: 752-760
5. Mauroy B, Filoche M, Weibel ER, Sapoval B. An optimal bronchial tree may be dangerous. Nature 2004; 427: 633-636
6. Weibel ER. How much lung is good enough? Eur J Respir Dis Suppl 1986; 146: 37-45
7. Tsuda A, Filipovic N, Haberthur D, Dickie R, Matsui Y, Stampanoni M, Schittny JC. Finite element 3D reconstruction of the pulmonary acinus imaged by synchrotron X-ray tomography. J Appl Physiol 2008; 105: 964-976
8. Felici M, Filoche M, Sapoval B. Diffusional screening in the human pulmonary acinus. J Appl Physiol 2003; 94: 2010- 2016
9. Raskin SP. The pulmonary acinus: historical notes. Radiology 1982; 144: 31-34
10. Weibel ER. 1997b. Design of airways and blood vessels considered as branching trees. In: Crystall RG, West RB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. The lung: scientific foundations. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 1061-1071
11. Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the Human Lung 1962; Science 137: 577-585

12. Loeschke H. Die Morphologie des normalen und emphysematösen Acinus der Lunge. Beitr Path Anatom 1921; 68: 213-223
13. Haefeli-Bleuer B, Weibel ER. Morphometry of the human pulmonary acinus. Anat Rec 1988; 220: 401-414
14. Rodriguez M, Bur S, Favre A, Weibel ER. Pulmonary acinus: geometry and morphometry of the peripheral airway system in rat and rabbit. Am J Anat 1978; 180: 143-155.
15. Horsfield K, Cumming G. Morphology of the bronchial tree in man. J Appl Physiol 1968; 24: 373-383
16. Weibel ER, Cruz-Orive LM. 1997c. Morphometric methods. In: Crystall RG, West RB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. The lung: scientific foundations. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 333-343
17. Phalen RF, Oldham MJ, Beaucage CB, Crocker TT, Mortensen JD. Postnatal enlargement of human tracheobronchial airways and implications for particle deposition. Anat Rec 1985; 212: 368-380
18. Boyden EA. The structure of the pulmonary acinus in a child of six years and eight months. Am J Anat 1971; 132: 275-300
19. Phalen RF, Oldham MJ. Airway Structures. Tracheobronchial Airway Structure as Revealed by Casting Techniques. Am Rev Respir Dis 1983; 128: S1-S4
20. Phalen RF, Yeh HC, Schum GM, Raabe OG. Application of an idealized model to morphometry of the mammalian tracheobronchial tree. Anat Rec 1978; 190: 167-176
21. Hansen JE, Ampaya EP. Human air space shapes, sizes, areas, and volumes. J Appl Physiol 1975; 38: 990-995
22. Hansen JE, Ampaya EP, Bryant GH, Navin JJ. Branching pattern of airways and air spaces of a single human terminal bronchiole. J Appl Physiol 1975; 38: 983-989
23. Parker H, Horsfield K, Cumming G. Morphology of distal airways in the human lung. J Appl Physiol 1971; 31: 386-391

24. Weibel ER. Morphometry of the human lung. Springer-Verlag und Academic Press; Heidelberg New York 1963
25. Bolender RP, Hyde DM, Dehoff RT. Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell and molecular biology. *Am J Physiol* 1993; 265: L521-L548
26. Weibel ER. What makes a good lung? The morphometric basis of lung function. *SWISS MED WKLY* 2009; 139 (27-28): 375-386
27. Pump KK. Morphology of the Acinus of the Human Lung. *Dis. Chest* 1969; 56: 126-134
28. Schreider JP, Raabe OG. Structure of the human respiratory acinus. *Am J Anat* 1981; 162: 221-232
29. Weibel ER. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1979; 15: 999-013
30. Litzlbauer HD, Neuhaeuser C, Moell A, Greschus S, Breithecker A, Franke FE, Kummer W, Rau WS. Three-dimensional imaging and morphometric analysis of alveolar tissue from microfocal X-ray-computed tomography. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L535-L545
31. Gundersen HJG, Østerby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: Or "Do more less well !". *J Microsc* 1981; 121: 65-73
32. Flohr T, Ohnesorge B, Schaller S. Heutiger Stand und zukünftige Entwicklungen in der Mehrschichtcomputertomographie. *Radiologe* 2004; 44: 113-120
33. Hu H, He HD, Foley WD, Fox SH. Four multidetector-row helical CT: image quality and volume coverage speed. *Radiology* 2000; 215(1): 55-62
34. Rist C; Johnson TR, Becker A, Leber AW, Huber A, Busch S, Becker CR, Reiser MF, Nikolaou K. Dual-source Computertomographie des Herzens. Bildqualität und Funktionsanalyse bei verbesserter zeitlicher Auflösung. *Radiologe* 2007; 47: 287-294

35. Langheinrich AC, Bohle R M, Breithecker A, Lommel D, Rau WS. Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli. *RoFo* 2004; 176(9): 1219-1225
36. Murata K, Itoh H, Todo G, Kanaoka M, Noma S, Itoh T, Furuta M, Asamoto H, Torizuka K. Centrilobular lesions of the lung: Demonstration by high-resolution CT and pathologic correlation. *Radiology* 1986; 161(3): 641-645
37. Jorgensen SM, Demithaya O, Ritman EL. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol* 1988; 275 (Heart Circ Physiol 44): H1103-H1114
38. Wan SY, Kiraly AP, Ritman EL, Higgins WE. Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro- CT images. *IEEE Trans Med Imaging* 2000; 19(9): 964-971
39. Wang G. X-ray micro- CT with a displaced detector array. *Med Phys* 2002; 29(7): 1634-1636
40. Langheinrich AC, Leithäuser B, Greschus S, von Gerlach S, Breithecker A, Matthias FR, Rau WS, Bohle RM. Acute rat lung injury: Feasibility of assessment with micro-CT. *Radiology* 2004; 233: 165-171
41. Ritman EL. Micro- computed tomography of the lungs and pulmonary- vascular system. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 477-480
42. Sato T, Ikeda O, Yamakoshi Y, Tsubouchi M. X-ray tomography for microstructural objects. *Applied Optics* 1981; 20: 3880-3
43. Elliott JC, Dover SD. X-ray microtomography. *J Microsc* 1982; 126(2): 211-213
44. Burstein P, Bjorkholm PJ, Chase RC, Seguin, FH. The largest and the smallest X-ray computed tomography systems. *Nucl Instrum Methods Phys Res* 1984; 221: 207-212
45. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1984; 1: 612-619

46. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 3-11
47. Ritman EL. Micro-Computed Tomography- Current Status And Developments. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 185-208
48. Peyrin F. Investigation of bone with synchrotron radiation imaging: from micro to nano. *Osteoporos Int* 2009; 20: 1057-1063
49. Flannery BP, Deckman HW, Roberge WG, D'Amico KL. Three- dimensional X-ray microtomography. *Science* 1987; 273: 1439-44
50. Paulus MJ, Gleason SS, Easterly ME, Foltz CJ. A review of high- resolution X-ray computed tomography and other imaging modalities for small animal research. *Lab Anim (NY)* 2001; 30(3): 36-45
51. Müller R, van Campenhout H, van Damme B, van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23(1): 59-66
52. Jheon S, Youn HS, Kim HT, Choi GH, Kim JK. High-resolution X-ray refraction imaging of rat lung and histological correlations. *Microsc Res Tech* 69(8), 656-9 (2006).
53. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Der Radiologe* 1999; 39(3): 203-212
54. Bonse U, Busch F. X-ray computed microtomography (μ CT) using synchrotron radiation (SR). *Prog Biophys Molec Biol* 1996; 65: 133-169
55. Rügsegger P, Koller B, Müller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 24-29
56. Delling G, Hahn M, Bonse U, Busch F, Günnewig O, Beckmann F, Uebbing H, Graeff W. Neue Möglichkeiten der Strukturanalyse von Knochenbiopsien bei

- Anwendung der Mikrocomputertomographie (μ CT). *Pathologe* 1995; 16: 342-347
57. Shibata T, Nagano T. Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus 1996; *Nat Med* 2(8): 933-935
 58. Wan SY, Ritman EL, Higgins WE. Multi- generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. *Comput Biol Med* 2002; 32 (2): 55-71
 59. Karau KL, Johnson RH, Molthen RC, Dhyani AH, Haworth ST, Hanger CC, Roerig DL, Dawson CA. Microfocal X-ray CT imaging and pulmonary arterial distensibility in excised rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3): H 1447-H1457
 60. Op Den Buijs J, Bajzer Z, Ritman EL. Branching morphology of the rat hepatic portal vein tree: A micro- CT study. *Ann Biomed Eng* 2006; 34(9): 1420-1428
 61. Rau WS, Hauenstein K, Mittermayer C, Volk P. A simple and rapid method for postmortem radiographic investigation of lung fine structure. *Path Res Pract* 1980; 170: 426-432
 62. Satoh K, Kobayaski T, Ohkawa M, Tanabe M. Preparation of human whole lungs inflated and fixed for radiologic- pathologic correlation. *Acad Radiol* 1997; 4: 374-379
 63. Weibel ER, Vidone RA. Fixation of the lung by formalin steam in a controlled state of air inflation. *Am Rev Respir Dis* 1961; 84: 856-861
 64. Watz H, Breithecker A, Rau WS, Kriete A. Micro-CT of the human lung: Imaging of alveoli and virtual endoscopy of an alveolar duct in a normal lung and in a lung with centrilobular emphysema - initial observations. *Radiology* 2005; 236: 1053-1058
 65. Rau WS, Mittermayer C. Volume controlled fixation of the lung by formalin vapor. *RoFo* 1980; 133(3): 233-239
 66. Adams CWM. Osmium tetroxide and the Marchi method: reactions with polar and non-polar lipids, protein and polysaccharide. *The journal of histochemistry*

- and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 1960; 8: 262-267
67. Komorowska M, Koter M, Bartosz G, Glomulkiewicz J. The effects of glutaraldehyde and osmium tetroxide on the erythrocyte membrane. A spin label study. *Biochim Biophys Acta* 1982; 686(1): 94-98
 68. Ritman EL, Jorgensen SM, Beighley PE, Thomas PJ, Dunsmuir JH, Romero JC, Turner RT, Bolander ME. Synchrotron-based micro-CT of in situ biological basic functional units and their integration. *Proc. SPIE* 3149 (1997).
 69. Kline TL, Ritman EL. Paths of least flow-resistance: characterization for the optimization of synthetic tissue scaffold design. *Proc ISBI* 606-609 (2009).
 70. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L246-L254
 71. Parameswaran H, Bartolak- Suki E, Hamakawa H, Majumdar A, Allen PG, Suki B. Three dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. *J Appl Physiol* 2009; 107: 583-592
 72. Paiva M, Engel LA. Model analysis of gas distribution within human lung acinus. *J Appl Physiol* 1984; 56: 418-425
 73. Lum H, Mitzner W. Effects of 10% formalin fixation on fixed lung volume and lung tissue shrinkage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 1078-1083
 74. Netter FH. 2003. Intrapulmonale Luftwege: Schema. In: *Atlas der Anatomie des Menschen*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. Tafel 200
 75. Anderson TF. Techniques for the preservation of three- dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans NY Acad Sci* 1951; 13: 130-133

8 Publikationen

Horst Detlef Litzlbauer, Kathrin Korbel, Timothy L. Kline, Steven M. Jorgensen, Diane R. Eaker, Rainer M. Bohle, Erik L. Ritman, Alexander C. Langheinrich. Synchrotron-Based Micro-CT Imaging of the Human Lung Acinus, *The Anatomical Record* 2010; 293:1607-1614.

9 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiaterkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alexander C. Langheinrich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Unterstützung bei den experimentellen und wissenschaftlichen Verfahren und für die großzügigen Hilfestellungen zur Erstellung dieser Arbeit in der Abteilung für diagnostische Radiologie am Universitätsklinikum Gießen.

Herrn Dr. med. Detlef Litzlbauer für die vielfältige Unterstützung.

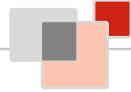
Herrn Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle für die tatkräftige Hilfe bei dem histologischen Teil der Arbeit am Universitätsklinikum Homburg an der Saar.

Frau Gudrun Mertels aus der Abteilung für Diagnostische Radiologie für die zuverlässige Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben in der Mikro-Computertomographie-Abteilung.

Und nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund danken, für den unermüdlichen Beistand während des gesamten Studiums und der Promotion.

11 Lebenslauf

Wurde herausgenommen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6270-5



9 783835 196270 5

