

Kontrastverstärkung zur Quantifizierung des fetoplazentaren Gefäßbaumes
in der 3D Mikro-Computertomographie: Barium versus Blei

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julia Seidenstücker

aus Hannover

Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie

Abteilung Diagnostische Radiologie

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. W.S. Rau

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

Gutachter: PD Dr. med. S. Grüßner

Tag der Disputation: 18.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entwicklung der Plazenta	1
1.1.1	Differenzierung der Zotten	3
1.1.2	Fetoplazentare Durchblutung	5
1.2	Bildgebende Verfahren zur Gefäßdarstellung	5
1.3	Die Mikro-Computertomographie	6
1.4	Kontrastmittel	7
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Untersuchungsmaterial und Kontrastmittel	10
2.2	Grundlagen des Computertomographen	12
2.3	Grundlagen der Mikro-Computertomographie	14
2.3.1	Bildakquisition	17
2.3.2	Bildberechnung	18
2.4	Bildanalyse	19
2.5	Statistik	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Plazenta- und Geburtsgewicht	21
3.2	Mikro-CT	21
3.2.1	Statistische Analyse der mikro-CT-Daten	26
3.3	Histologische Untersuchungen	28
3.3.1	Statistische Analyse der Histologie	32
4	Diskussion	34
4.1	Mikro-CT	35
4.2	Histologie	37
4.3	Kontrastmittel	37
5	Zusammenfassung	40

6	Summary	41
7	Literaturverzeichnis	44
8	Danksagung	52
9	Lebenslauf	53
10	Publikationen	55

1 Einleitung

1.1 Entwicklung der Plazenta

Die Entwicklung und Differenzierung der Plazenta ist ein komplexer Vorgang, der sich bis zum Ende der Schwangerschaft parallel zu den steigenden Versorgungsansprüchen des wachsenden Feten vollzieht. Die plazentäre Gefäßentwicklung und uterine Gefäßanpassung während dieser Zeit gewähren eine adäquate Nahrungs- und Substratversorgung des Feten. Störungen in der Differenzierung des Zottenbaumes werden mit anormaler intrauteriner Entwicklung, höherer Morbidität und Mortalität assoziiert (1).

Nach der Befruchtung entsteht 60 – 72 Stunden später die Morula, bestehend aus 32 Zellen. Am vierten Tag post conceptionem entwickelt sich die Blastozyste, ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, in dem sich die Zellen in zwei Schichten anordnen. Aus der äußeren entwickelt sich der Trophoblast, der später zur Plazenta wird, die innere Zellschicht – der Embryoblast – bildet die Ausgangszellen zur Entwicklung und Differenzierung des Embryos. Danach folgen Nidation und Implantation. Hier kommt es zunächst zur breitflächigen Verklebung der Blastozyste mit dem Endometrium. Nach Auflösung der Hüllschichten können die nun freien Trophoblastzellen zwischen den Endometriumzellen einwachsen und bis zu den Gefäßen der Tunica propria vordringen. Die äußeren, dem mütterlichen Gewebe unmittelbar anliegenden Trophoblastzellen verschmelzen dabei unter Auflösung der trennenden Zellgrenzen miteinander synzytial. Es entsteht der primäre Synzytiotrophoblast. Der Implantationsvorgang wird etwa am 12. Tag mit dem vollständigen Eindringen der Blastozyste in das endometriale Stroma und dem Schluss des Endometriums über dem Implantationsort abgeschlossen (2). Durch das weitere Vordringen des Synzytiotrophoblasten kommt es zur Eröffnung maternaler Gefäße im Endometrium, die ihr Blut in das synzytiale Lakunensystem abgeben. In diesem verbleiben Trabekel, die sich zwischen Chorion- und Basalplatte ausspannen. Von der Chorionplatte aus sprießt nun Synzytiotrophoblast in die Trabekel ein und bildet so die Primärzotten. Ab dem 15. Tag dringt extraembryonales Mesoderm in die Zotten ein, dadurch entstehen die Sekundärzotten. Am Ende der dritten Gestationswoche sprießen über den Haftstiel Gefäße in die Sekundärzotten ein. Gleichzeitig beginnen sich in der Peripherie der Zotten die ersten Kapillaren zu differenzieren (autochthone Kapillarisation). Damit sind die Tertiärzotten etabliert. Das

Zottenkapillarsystem gewinnt bald Anschluss an die im extraembryonalen Mesoderm und im Haftstiel enthaltenen Kapillaren. Im Verlauf treten diese Gefäße in Verbindung mit dem intraembryonalen Gefäßsystem und stellen damit die existentielle Verbindung zwischen Plazenta und Embryo her (Abbildung 1).

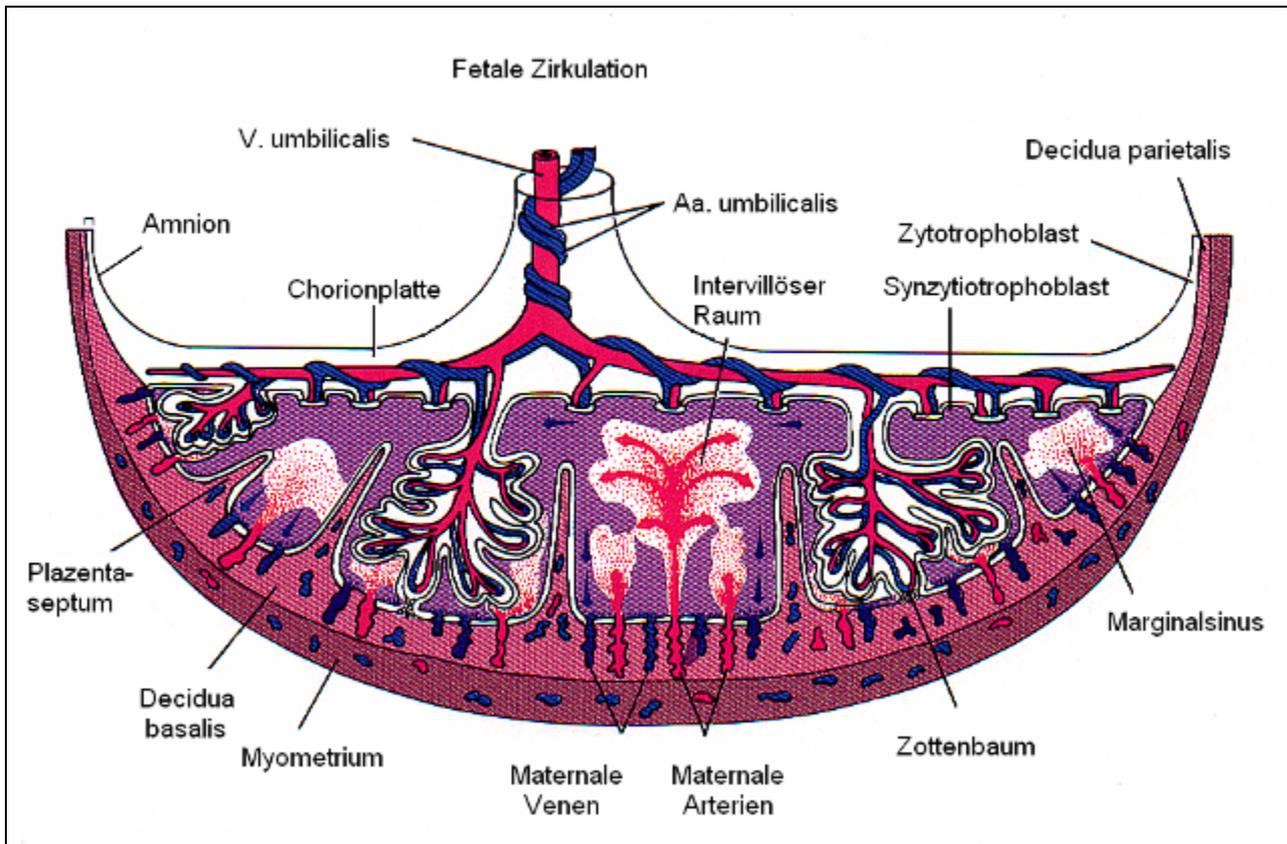


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Gefäßarchitektur einer Plazenta (modifiziert nach Keith L. Moore. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Schattauer. 1990).

Im Rahmen der nun einsetzenden Reifung der Tertiär- zur Funktionszotte (3) und einer daraus resultierenden größeren Kontaktfläche zwischen mütterlicher und fetaler Strombahn kommt es zur weiteren Differenzierung der Zotten. Im Vordergrund dieser Entwicklung steht eine Ausdehnung der Zottenbäume durch dichotome Verzweigungen und Zottenproliferationen, eine Verdünnung des Synzytiums und zentrifugale Verlagerung der Zottenkapillaren (4). Die Anzahl der Zotten nimmt kontinuierlich zu, wobei die Größe der Zotten mit weiterer Entwicklung abnimmt. Das Zottenstroma wird dabei zusehends verdrängt. Die innere Oberflächenvergrößerung der Zotten erfolgt durch Erweiterung der Kapillaren und ihre Umbildung zu sogenannten Sinusoiden (5).

Die Gefäße werden mehr und mehr wandständig und liegen bald unter der Austauschmembran. Hierdurch wird die fetomaternale Austauschfläche vergrößert und die Diffusionsstrecke verkürzt. Die Trennschicht der reifen Resorptionszotte wird gebildet aus der sogenannten synzytiokapillären Membran (Stoffwechsellmembran). Diese besteht aus einem feinen Zytoplasmasaum des Trophoblastepithels, seiner Basalmembran, einem schmalen Mesenchymstreifen und der fetalen Kapillarwand mit Basalmembran (3). Die Distanz zwischen mütterlichem und kindlichem Blut beträgt anfangs ca. 25 μm , am Ende der Schwangerschaft nur noch ca. 4 μm . Am Ende des vierten Schwangerschaftsmonats hat die Plazenta ihre endgültige Ausgestaltung erreicht. Die Zahl der Terminalzotten wächst jedoch mit Fortdauer der Schwangerschaft, wodurch die Gesamtzottenoberfläche ständig zunimmt, die synzytiale Gesamtoberfläche beträgt am Termin ca. 12 m^2 (6).

1.1.1 Differenzierung der Zotten

Abhängig von der Lage der Zotten innerhalb des Zottenbaumes, der Art der fetalen Gefäße und der Struktur des Bindegewebes innerhalb der Zotten können diese in verschiedene Typen unterteilt werden (7), schematisch dargestellt in Abbildung 2.

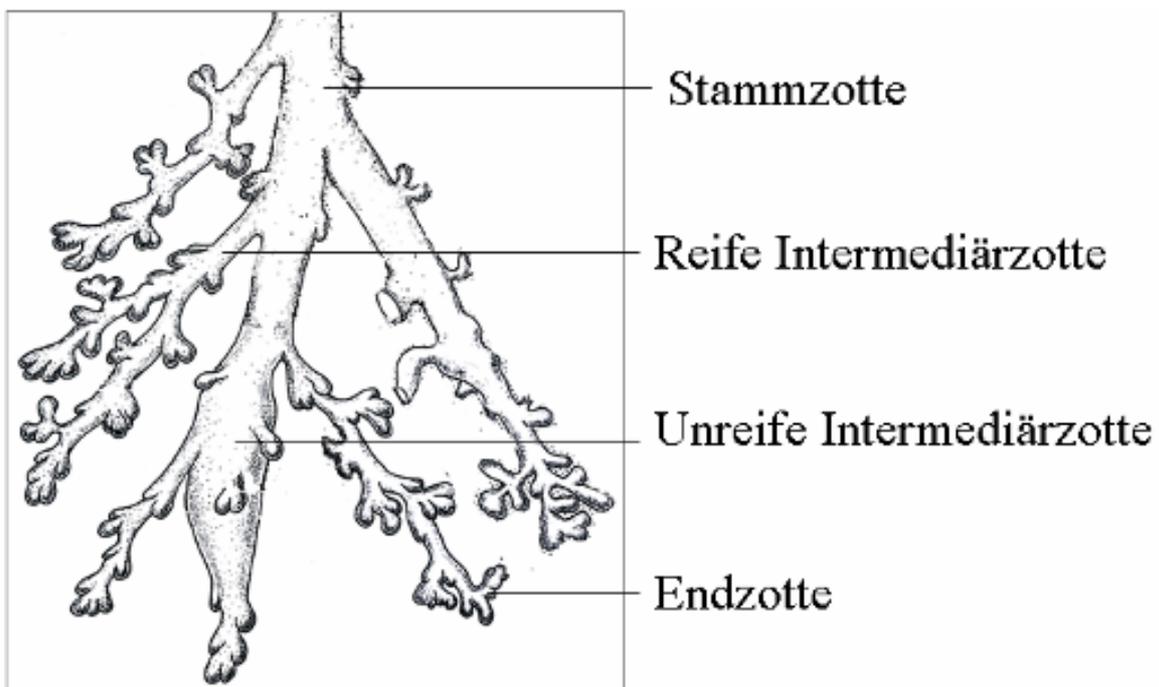


Abbildung 2: Differenzierung der verschiedenen Zottenarten (25).

Abbildung 3 zeigt dazu im Detail den peripheren Teil des fetoplazentaren Gefäßbaumes mit Aufzweigung einer Stammzotte über Intermediärzotte bis zur Endzotte.

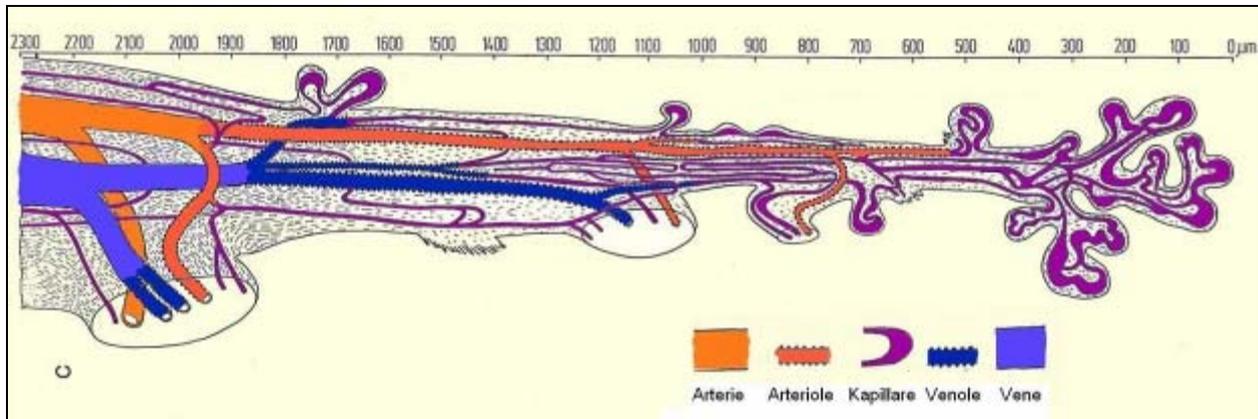


Abbildung 3: Peripherer Teil des fetoplazentaren Gefäßbaumes (25).

Die zentral lokalisierten Stammzotten sind gekennzeichnet durch mittig angeordnete Arterien und Venen, ein kaum entwickeltes fetales Kapillarsystem und ein bindegewebiges Stroma. Sie machen ungefähr ein Drittel des gesamten Zottenvolumens aus. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der mechanischen Unterstützung. Diese Stammzotten verzweigen sich entweder in schlanke, leicht kurvige oder in dickere Zotten. Beide Arten verbinden nahezu alle peripher gelegenen Endzotten mit den Stammzotten und werden daher Intermediärzotten genannt. Diese Zotten sind charakterisiert durch das Auftreten von Arteriolen und Venolen und das Fehlen von Arterien und Venen. Sie lassen sich in zwei verschiedene Arten unterteilen: die unreifen Intermediärzotten und die reifen Intermediärzotten. Erstere sind wesentlich dicker und kräftiger, ihre Oberfläche besitzt kaum Endzotten. In reifen Plazenten kommen sie nur zu einem geringen Prozentsatz im Zentrum des Zottenbaumes vor. In der Histologie erkennt man ein reiches Stroma sowie eine unterentwickelte fetale Vaskularisierung. Sie sind daher weniger für den fetomaternalen Austausch als für das Wachstum der Zotten zuständig. Die reifen Zotten sind dagegen schlanker und tragen ca. 95% aller Endzotten. Ihr Gefäßsystem besteht fast ausschließlich aus Kapillaren, es existieren nur wenige Arteriolen und Venolen. Das locker angeordnete Bindegewebe ist arm an Fasern und Zellen. Durch die verkürzte Diffusionsstrecke und die gesteigerte fetale Vaskularisierung haben diese reifen Zotten einen großen Anteil am fetomaternalen Austausch. Außerdem nehmen sie am metabolischen und endokrinen

Stoffwechsel der Plazenta teil. Die finalen Verzweigungen des Zottenbaumes bilden die Endzotten, welche hauptsächlich mit den reifen Intermediärzotten verbunden sind. Nur 5% der Endzotten gehen von unreifen Zotten und Stammzotten ab. Im peripheren Teil bilden die fetalen Kapillaren die sogenannten Sinusoide, manche mit einem Durchmesser von bis zu 40 µm. Die Volumenfraktion macht bis zu 34% aus, die Oberflächenfraktion sogar bis zu 47% (7). Die extreme fetale Durchblutung, die minimale maternofetale Diffusionsstrecke von ca. 4 µm und das hohe Vorkommen von Epithelplatten demonstrieren deutlich, dass hier der optimale Ort für den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind vorliegt.

1.1.2 Fetoplazentare Durchblutung

Die fetoplazentare Durchblutung gliedert sich entsprechend den morphologischen Strukturen. Die Nabelschnurarterien anastomosieren nach Erreichen der Plazenta und teilen sich dann in mehrere Segmentarterien. Diese ziehen geschlängelt auf der fetalen Plazentafläche unter dem Amnionüberzug entlang und verzweigen sich in Sekundär- und Tertiärarterien, die in den Stammzotten verlaufen und als Stammzottengefäße erster Ordnung bezeichnet werden. Am Hilus eines Plazentaläppchens teilen sie sich in die Stammzottengefäße zweiter Ordnung (Ramusgefäße). Diese verzweigen sich weiter in Stammzottengefäße dritter Ordnung, die in die Zottenkapillaren übergehen. Arterielle und venöse Schenkel der Zottengefäße sind durch ein paravaskuläres, dichtes Kapillarnetz und durch die sinusoidalen Kapillaren der Zottenperipherie verbunden. Die uteroplazentare Durchblutung erfolgt über Aa. uterinae und die vom Synzytiotrophoblasten arrodieren Spiralarterien. Die Spiralarterien, die aus den so genannten Arkadengefäßen entspringen, münden basal in das zottenarme Zentrum des Plazentons. Das arterielle Blut verteilt sich von hier strahlenförmig und strömt im Bereich der Peripherie des Plazentons nach basal, wo es über ebenfalls eröffnete Venen in der Dezidua wieder abfließt.

1.2 Bildgebende Verfahren zur Gefäßdarstellung

In den letzten Jahren sind neue, zum Teil konkurrierende Methoden auf dem Gebiet der vaskulären Bildgebung implementiert worden. Zwischen der mikroskopischen Histomorphologie auf der einen und der klinischen Angiographie auf der anderen Seite

stehen sowohl dem Kliniker als auch dem Grundlagenforscher weitere Verfahren, wie z.B. die Magnetresonanztomographie (MRT) (8, 9), der intravaskuläre Ultraschall (10, 11, 12) oder die Mehrzeilen-CT (13, 14) zur Analyse von Gefäßen zur Verfügung. Auf dem Gebiet der ex-vivo Diagnostik und der präklinischen Forschung ist die Histologie von Gefrier- und Paraffinschnitten der Gold-Standard zur quantitativen Bestimmung von Gefäßmorphologie und -morphometrie. Dazu werden histologische Schnitte mit verschiedenen Färbemethoden untersucht. Diese Untersuchungen haben allerdings verschiedene Nachteile: Die Probenpräparation ist zeit- und personalintensiv und, nachdem die histologischen Schnitte einmal angefertigt wurden, sind weitere Untersuchungen mit anderen Methoden nur schwer realisierbar oder gar unmöglich geworden. Des Weiteren liefert die Histologie nur eine zweidimensionale Gefäßdarstellung und erlaubt, da die Quantifizierung der Gefäßparameter (Gefäßwanddicke, Plaquegröße, Verkalkungen, Stenosegrad) nur an wenigen Serienschnitten erfolgt, keine kontinuierliche longitudinale Darstellung der Gefäßarchitektur (15).

Mit der Angiographie (Luminographie) können nur bedingt Aussagen zur Gefäßmorphologie getroffen und lediglich makromorphologische Veränderungen erfasst werden. Neue ergänzende radiologische Methoden, wie die Angio-MRT (16) und Mehrzeilen-CT-Technologie (17), befinden sich bereits im klinischen Einsatz. Doch auch diese Methoden lassen bei Ortsauflösungen im Millimeterbereich keine befriedigende Beurteilung der prä- und postkapillären Gefäße zu.

Das derzeitige Verständnis der mikrovaskulären Gefäßarchitektur und Morphometrie der Plazenta wurde durch verschiedene zeitintensive morphometrische Analysen gewonnen. Dazu zählen die konventionelle Histologie, die Elektronenmikroskopie von Ausgusspräparaten (corrosion casts) sowie dreidimensionale Rekonstruktionen von Gewebeschnitten (18-27). 2004 wurde erstmals zu den bisher etablierten Methoden die Mikro-Computertomographie (mikro-CT) zur qualitativen und quantitativen Evaluation des fetoplazentaren Gefäßbaumes genutzt.

1.3 Die Mikro-Computertomographie

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Technologie der mikro-CT als neue Methode und potentielle Alternative zur Histologie in der ex-vivo Forschung etabliert. Durch

technischen Fortschritt sind mikro-CT-Systeme in der Lage, hoch auflösende Bilder von kleinen Proben zu generieren. Die ersten Studien mit der mikro-CT beinhalteten Untersuchungen zur Knochenarchitektur und Knochendichte bei Osteoporose und Arthritis bei Tieren (28-31). Andere Arbeitsgruppen nutzten die mikro-CT-Technologie zur Evaluation der trabekulären Knochenstruktur (32, 33) sowie zur Untersuchung von osteolytischen Tumoren und deren Wirkung auf die trabekuläre dreidimensionale Knochenstruktur (34). Weiterhin wurden Untersuchungen an Mäusen vorgenommen, um u.a. Skelett- und Gewebestrukturen darzustellen (35-38). In den letzten Jahren hat sich die mikro-CT außerdem vermehrt in der vaskulären Grundlagenforschung durchgesetzt (39-41), und es haben sich beeindruckende Ergebnisse in der Darstellung und Quantifizierung pathologischer Gefäßalterationen gezeigt.

Joergensen und Mitarbeiter begannen, mit Hilfe der mikro-CT dreidimensionale Bilder der Gefäß- und Parenchymarchitektur zu quantifizieren (39). Sie zeigten durch intravasale Kontrastmittel-Injektion die Möglichkeit der Gefäßdarstellung in isolierten Organen. Zum ersten Mal konnte in dieser methodischen Arbeit bei einer Voxelgröße von 5-25 µm eine dreidimensionale Darstellung der Vasa vasorum von Koronargefäßen erarbeitet werden. Spätere Studien von Wan und Mitarbeitern (42) an Rattenkoronarien zeigten erstmals eine lückenlose Analyse und Quantifizierung der Parameter Gefäßvolumen, -dichte und -verzweigung. Die mikro-CT wurde weiterhin erfolgreich genutzt, um die dreidimensionale Gefäßstruktur des Myokards, der Niere, der Leber und der Lunge darzustellen (43-50). 2004 wurde die mikro-CT erstmals zur dreidimensionalen Evaluation der fetoplazentaren Gefäßarchitektur genutzt (51). Die Ergebnisse diverser Studien zeigen die hohe Korrelation zwischen den dreidimensionalen mikrocomputertomographischen stereologischen und den standardisierten zweidimensionalen histologischen Parametern (52). Die mikro-CT ist dadurch mittlerweile zu einem ergänzenden Verfahren zur konventionellen Histologie herangewachsen.

1.4 Kontrastmittel

Blutgefäße bewirken einen nur sehr geringen Kontrast in der CT-Darstellung, so dass hier eine Verstärkung mit Hilfe röntgenpositiver oder -negativer Kontrastmittel erfolgen muss. Bis Mitte der 80er Jahre war Bariumsulfat (BaSO_4), ein Kontrastmittel, welches normalerweise für klinische Routineuntersuchungen des Gastrointestinaltraktes

eingesetzt wird, das meist genutzte Medium in der ex-vivo Gefäßdarstellung (53). Diverse Studien zeigen, dass durch Applikation von Bariumsulfat eine Darstellung der Gefäße an isolierten Organen möglich ist. Mit Hilfe der mikro-CT konnte so die Mikroarchitektur des Lungenparenchyms erfasst (15, 54), der fetoplazentare Gefäßbaum dargestellt (51) sowie in weiteren Studien die Vaskularisierung von Tumoren gezeigt werden (55). Untersuchungen belegen, dass neuere Kontrastmittel im Vergleich zu Bariumsulfat eine bessere Gefäßfüllung ermöglichen (56). Die Implementierung dieser neuen vaskulären Kontrastmittel hat zu neuen methodischen Ansätzen der mikro-CT zur Evaluierung der Gefäßarchitektur geführt (43). Zur Darstellung und Quantifizierung der Vasa vasorum von Koronargefäßen (43, 57-59), der Nierenarterien (45, 60), der Leberarterien (47), der Pulmonalarterien (49) sowie der Corpora cavernosa des Kaninchens (61) wurde ein Zwei-Komponentensystem bestehend auf einer Silikon-Blei-Basis (Microfil[®] MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) verwendet. Erste Untersuchungen mit Mikrofil wurden bereits in den 60er Jahren durchgeführt. Es konnten so erfolgreich die Mikrozirkulationen der Lunge, des Gastrointestinaltraktes und der Niere dargestellt werden (62).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die quantitative und qualitative Analyse des fetoplazentaren Gefäßbaumes ist von außerordentlicher Bedeutung für das Verständnis pathophysiologischer Veränderungen intrauterinen Wachstums. Je genauer dabei die Darstellung der Mikroarchitektur der Gefäße erfolgt, desto vielfältiger und detaillierter sind die Aussagen, die über physiologische und pathologische Veränderungen getroffen werden können. Mit dieser Studie sollte daher ermittelt werden, ob die Evaluation des fetoplazentaren Gefäßbaumes mit der mikro-CT nach Perfusion mit Mikrofil ebenso möglich ist wie nach Applikation einer bariumsulfathaltigen Kontrastmittelsuspension.

Es ergaben sich daraus für uns folgende Fragestellungen:

- 1.) Ermöglicht die Perfusion mit Mikrofil die Evaluation des fetoplazentaren Gefäßbaumes in der mikro-CT?
- 2.) Sind nach Perfusion mit Mikrofil und anschließender Untersuchung im mikro-CT weitere histologische Untersuchungen der Proben möglich?

-
- 3.) Ergeben sich Unterschiede in der quantitativen Analytik des fetoplazentaren Gefäßbaumes zwischen Mikrofil und Bariumsulfat in der mikro-CT?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial und Kontrastmittel

In der Studie wurden termingerechte Plazenten (n=10) von unkomplizierten Schwangerschaften untersucht. Diese wurden am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität Gießen jeweils nach primären Sectiones gewonnen. Die Auswahl der Plazenten richtete sich nach bestimmten Ein- und Ausschlusskriterien. Das Geburtsgewicht der neugeborenen Kinder sollte zwischen der 10. und 90. Perzentile, möglichst im Bereich der 50. Perzentile liegen. Dies wurde bei Voruntersuchungen mittels Ultraschall festgestellt und verifizierte sich nach der Geburt durch Wiegen des Kindes. Die Plazenten sollten weiterhin von unkomplizierten termingerechten Schwangerschaften stammen. Außerdem kamen nur Plazenten von Müttern mit gesunden Kindern für die Studie in Betracht. Chromosomenanomalien oder Behinderungen der Kinder galten als Ausschlusskriterium. Ebenso wurden Plazenten von Mehrlingsgraviditäten und Hepatitis- bzw. HIV-infizierten Müttern nicht zugelassen. Weitere Ausschlusskriterien waren makroskopisch nicht intakte Plazenten, welche bei der Sectio zerstört wurden und daher nicht mehr perfundiert werden konnten. Des Weiteren konnten die Plazenten nur nach Einwilligung der Mutter für die Studie verwendet werden.

Nach Erhalt der intakten Plazenta wurde diese makroskopisch begutachtet, gewogen und das Volumen bestimmt. Über eine große Chorionplattenarterie wurde die komplette Plazenta per Kanüle unter behutsamem Druck gespült, bis auch der venöse Schenkel blutleer war. Die Plazenten wurden zunächst mit gepufferter Kochsalzlösung, Heparin und Xylonest gespült, um Gefäßthrombosierungen zu vermeiden (500 ml 0,9% NaCl + 25.000 I.E. Heparin + 20 ml Xylonest). Sofort im Anschluss wurde Kontrastmittel in die Gefäße injiziert, bis die Plazenta vollständig gefüllt war. Für die ersten fünf Plazenten wurde hierzu ein Gemisch aus 500 ml Bariumsulfat (Micropaque, Guerbet, Sulzbach, Germany), 42g Gelatine (Merck, Darmstadt, Germany) und 15g Thymol (Merck, Darmstadt, Germany) (BSGT) verwendet. Bariumsulfat ist das Barium-Salz der Schwefelsäure und besitzt eine hohe Elektronendichte. In der klinischen Routinediagnostik wird es als positives Röntgenkontrastmittel verwendet und den Patienten in Form einer Suspension zum Trinken gegeben, um den Gastrointestinaltrakt bei einer CT- oder Röntgenuntersuchung zu kontrastieren. Unser Gemisch aus

Bariumsulfat, Gelatine und Thymol wurde zunächst erhitzt und dann unter konstantem Druck (100 mm Wassersäule) in die fetoplazentaren Gefäße injiziert, bis es im venösen Schenkel erschien. Nachdem die perfundierte Plazenta bis auf 4°C abgekühlt war, wurden acht 1cm³ große Blöcke aus verschiedenen Regionen der Plazenta entnommen. Vier aus einem äußeren, vier aus einem inneren Quadranten. Die acht Blöcke wurden daraufhin in gepufferter 3,7%-haltiger Formalinlösung fixiert und im Anschluss im mikro-CT gescannt.

Die Plazenten 6 – 10 wurden ebenfalls mit 500 ml 0,9% NaCl + 25.000 I.E. Heparin + 20 ml Xylonest zur Vasodilatation gespült. Im Anschluss wurden diese mit Mikrofil (Microfil® MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) perfundiert. Mikrofil besteht aus einem Zwei-Komponentensystem (Silikon und Blei), das zur Gefäßperfusion in einem Gemisch vorliegen muss. Dazu wurden die Komponenten (MV Diluent, MV Compound, MV Curing Agent) im Verhältnis von 5 ml MV Diluent, 4 ml MV Compound und 5% MV Curing Agent vermischt. Mikrofil besitzt hydrophobe Eigenschaften sowie eine deutlich geringere Viskosität als Bariumsulfat.

Nachdem auch die Gefäße dieser Plazenten perfundiert und auf ca. 4°C abgekühlt waren, wurden mittels eines Stanzzylinders 8 ca. 20 x 2 x 2 mm große Proben entnommen, wieder jeweils 4 aus einem inneren und einem äußeren Quadranten der Plazenta. Die Fixation der Proben erfolgte bis zum Scan im mikro-CT ebenfalls in gepufferter 3,7%-haltiger Formalinlösung.

Im Anschluss an die Untersuchung im mikro-CT wurden die mit Bariumsulfat und Mikrofil perfundierten Plazentaprobe in Paraffin eingebettet, randomisiert jeweils 30 histologische Schnitte angefertigt und diese nach Haematoxylin-Eosin gefärbt. Mittels Mikroskop und integrierter Kamera (Axioskop, Zeiss; Kamera: JVC, KY-F75U) wurden Bilder der histologischen Schnitte digitalisiert und mit Hilfe eines Auswerteprogramms (Diskus 4.50 Firewire, Karl Hilgers Technisches Büro, Königswinter) die mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße ausgezählt und der prozentuale Anteil der gefüllten Gefäße am Gesamtgefäßanteil berechnet. Abbildung 4 veranschaulicht die Plazentaperfusion sowohl mit Bariumsulfat als auch mit Mikrofil sowie die Entnahme der Proben mittels Stanzzylinder.

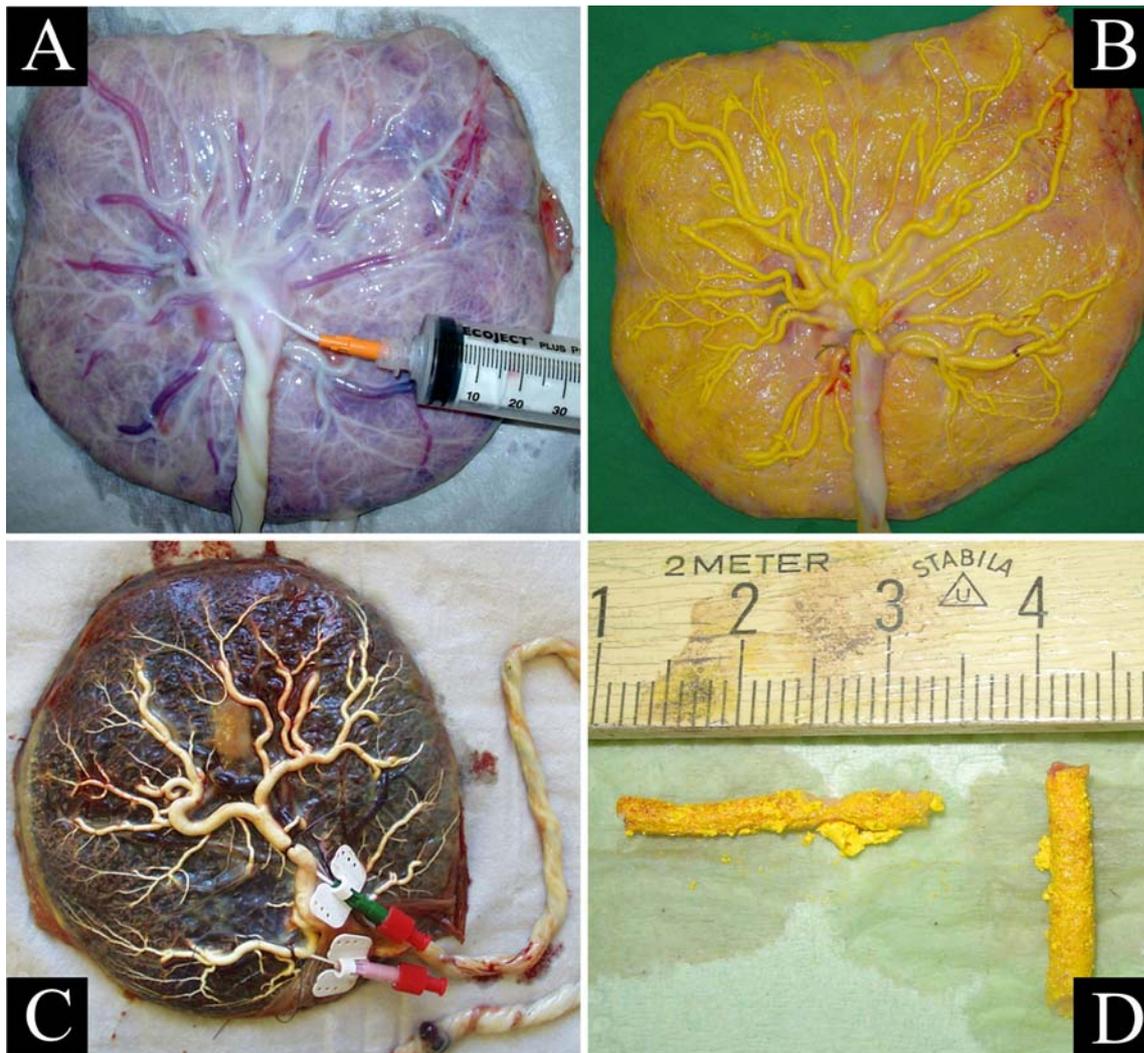


Abbildung 4: Spülung der Plazenta mit heparinierter Kochsalzlösung (A), Plazenta nach Perfusion mit Mikrofil (B) oder bariumsulfathaltiger Suspension (C). Anschließend Entnahme von 8 definierten Stanzzyylinder/Plazenta (D).

2.2 Grundlagen des Computertomographen

Im Gegensatz zur konventionellen Projektionsradiographie, bei der ein dreidimensionaler Körper auf einer Fläche abgebildet wird, ermöglicht die Computertomographie (CT) die Erzeugung von Schnittbildern (so genannte Tomogramme). Die CT ist die Weiterentwicklung des klassischen Tomographieprinzips und stellt die Schwächungswerte der durchstrahlten Schichten ortsfest und überlagerungsfrei dar.

Die Methodik der CT (und damit auch der mikro-CT) beruht auf folgenden Komponenten:

- Akquisition (Messung)

- Rekonstruktion
- Visualisierung und Quantifizierung

Zur Erzeugung von überlagerungsfreien Bildern werden Projektionsbilder aus verschiedenen Winkeln betrachtet, d.h. es wird eine bestimmte Anzahl von Körperschichten von einem Röntgenstrahler und dem gegenüberliegenden Detektorsystem abgetastet. Hierbei durchdringt ein eng eingeblendeter Röntgenstrahl die zuvor definierte Körperschicht. Im Rahmen der bekannten Wechselwirkungsprozesse (z.B. Photoeffekt, Compton-Streuung) der Röntgenstrahlung mit den verschiedenen Gewebearten im Körper resultiert eine unterschiedliche Schwächung, wodurch die hinter dem Patienten austretende und im Detektor gemessene Strahlung die räumliche Verteilung und Dichte des durchstrahlten Gewebes repräsentiert.

Die im Detektorsystem gemessene Schwächung der Röntgenstrahlung wird anschließend mittels hochleistungsfähiger Rechner über digitale Prozessierungen und komplizierte mathematische Verfahren in ein analoges Graustufenbild umgewandelt. Unter der Bildrekonstruktion verstehen wir also die Umformungen der Schwächungswerte in ein digitales Signal. Im mikro-CT werden beispielsweise 8 Bit-Bilder erzeugt (Format = bmp), so dass 2^8 (256) Graustufen von weiß (CT# = 256) bis schwarz (CT# = 1) entstehen.

Zur Darstellung der in CT-Bildern auftretenden digitalen Werte wird zumeist eine Bildauflösung von 512×512 (1024×1024) Bildpunkten verwendet. Hierbei korrespondiert jeder Bildpunkt des CT-Bildes mit einem Volumenelement (=Voxel) der zu untersuchenden Körperschicht. Das heißt, ein Voxel ist definiert als Pixel x Schichtdicke (d). Für die Bildberechnung wird also unsere Objektscheibe in eine Matrix von Bildpunkten mit der Tiefe d zerlegt, wobei die projektionsspezifische Gesamtschwächung des Röntgenstrahls die Summe aus den einzelnen Voxelabsorptionen darstellt. Der Rechner ordnet nun in einer zweidimensionalen Verteilung jedem ortsständigen Voxel seinen individuellen Schwächungswert zu. Die gefilterten und rückprojizierten Schwächungswerte werden nun in eine Relativskala (Graustufenskala) übertragen und dargestellt.

2.3 Grundlagen der Mikro-Computertomographie

Der bedeutendste Unterschied zwischen einem ex-vivo mikro-CT-Scanner und einem klinischen Computertomographen liegt in der resultierenden Ortsauflösung der Bilddaten. Während mit einem medizinischen Gerät der neuesten Generation (dual-source 64-Zeilen-CT, Siemens, Deutschland) eine isotrope Ortsauflösung von bis zu 0,6 mm erzielt werden kann, liegt dieser Wert beim mikro-CT je nach Objektgröße zwischen 5 und 50 μm . Diese Erhöhung der Ortsauflösung impliziert jedoch ein Design, das sich wesentlich von dem klinischer CT-Scanner unterscheidet (Tabelle 1). Beispielsweise können konventionelle Röntgenröhren für mikro-CT-Systeme aufgrund ihrer zu hohen Fokusgröße nicht benutzt werden. Stattdessen werden entweder Synchrotronstrahlungsquellen oder optimierte Fein- und Mikrofokusröntgenröhren mit Transmissions- oder Reflektionsanoden eingesetzt, wodurch kleinere Fokusgrößen erreicht werden können. Die Wahl der Röntgenquelle legt dann die Geometrie des mikro-CT-Scanners fest: Parallelstrahlgeometrie für Synchrotronstrahlung oder Fächer- bzw. Kegelstrahlgeometrie für Fein- und Mikrofokusröntgenröhren. Im Falle der Parallelstrahlgeometrie hängt die maximal erreichbare Auflösung im Wesentlichen von dem verwendeten Detektor ab, wohingegen in der Fächer- und Kegelstrahlgeometrie die Fokusgröße der Röntgenröhre den ausschlaggebenden Parameter darstellt. Neben der Detektorauflösung bzw. der Quellgröße (Fokus) ist auch die zur Verfügung stehende Anzahl der Röntgenquanten von großer Bedeutung. Dies lässt sich vereinfacht am Beispiel monochromatischer Strahlung erklären: Soll die Auflösung bei konstantem Probendurchmesser und bei gleichem Bildkontrast und Bildrauschen isotrop um den Faktor 10 erhöht werden, wird eine um den Faktor 10000 höhere Quantenzahl benötigt (63). Da eine Verringerung der Fokusgröße, welche zum Erzielen einer höheren Auflösung erstrebenswert scheint, jedoch mit einer Verringerung der Quantenzahl einhergeht, kommt der Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Röntgenquanten eine besondere Bedeutung zu. Dies hat in der Praxis zu einem Wechsel von Fächerstrahl- zu Kegelstrahlgeometrie geführt. Letztere ist allerdings technisch aufwendiger, da anstatt eines Zeilen- ein Flächendetektor benötigt wird und sich zusätzlich der Rekonstruktionsalgorithmus als wesentlich komplizierter gestaltet. Neben der besseren Nutzung der Röntgenquanten reduziert die Kegelstrahlgeometrie aber auch durch die gleichzeitige Erfassung aller Schichten eines zu rekonstruierenden Volumens die Messzeit gegenüber der Fächerstrahlgeometrie.

Tabelle 1: Charakteristika von mikro-CT-Scannern im Vergleich mit klinischen Spiral-CT-Scannern (modifiziert nach Engelke et al. Der Radiologe. 1999).

	Ganzkörper-Spiral-CT	mikro-CT
Geometrie	Fächerstrahl Detektor und Röhre rotieren	Parallelstrahl oder Fächer- bzw. Kegelstrahl Objekt rotiert
Maximale Ortsauflösung		
In der Schicht	0,6 – 1,0 mm	1 – 50 µm
Schichtdicke	0,1 – 2,0 mm	1 – 50 µm (Synchrotronstrahlung bis 1µm)
Röhre	Hochleistungs-CT-Röhre	Synchrotronstrahlungsquelle Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	10 – 500 mA	40 – 100 µA
Spannung	80 – 140 kV	10 – 150 kV
Fokusgröße	0,6 – 1,5 mm	5 – 30 µm
Detektor	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
Objektdurchmesser	5 – 50 cm	< 5 cm (Spezialgeräte bis 8 cm)
Matrixgröße	512	512 – 1024
Volumenscanzeit	10 – 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Die Synchrotronstrahlung bietet im Röntgenbereich ein kontinuierliches Spektrum, aus dem bei mikrocomputertomographischen Untersuchungen ein monochromatischer Strahl herausgefiltert wird. Die Intensität (Anzahl der zur Verfügung stehenden Röntgenquanten) dieses monochromatischen Strahles ist um den Faktor 10^6 höher als diejenige konventioneller Röntgenröhren (64). Daher ist die Synchrotronstrahlung die Quelle der Wahl, wenn entweder extrem hohe Auflösungswerte ($< 5 \mu\text{m}$) angestrebt werden oder die Untersuchungszeit begrenzt werden soll. Die Nachteile sind hierbei allerdings die Ortsgebundenheit, die begrenzte Verfügbarkeit der Elektronenspeicherringe, mit denen die Synchrotronstrahlung erzeugt wird, und der vergleichsweise relativ hohe experimentelle und finanzielle Aufwand.

Der uns zur Verfügung stehende mikro-CT-Scanner der Firma Skyscan („SkyScan-1072 High-resolution desk-top mikro-CT system“, Aartselaar, Belgien) setzt sich zusammen aus dem Scanner mit einem umgebenden röntgendichten Gehäuse sowie zwei PC-Einheiten zur Gerätesteuerung und Bildrekonstruktion. In Abbildung 6 ist der Aufbau eines mikro-CT schematisch dargestellt.

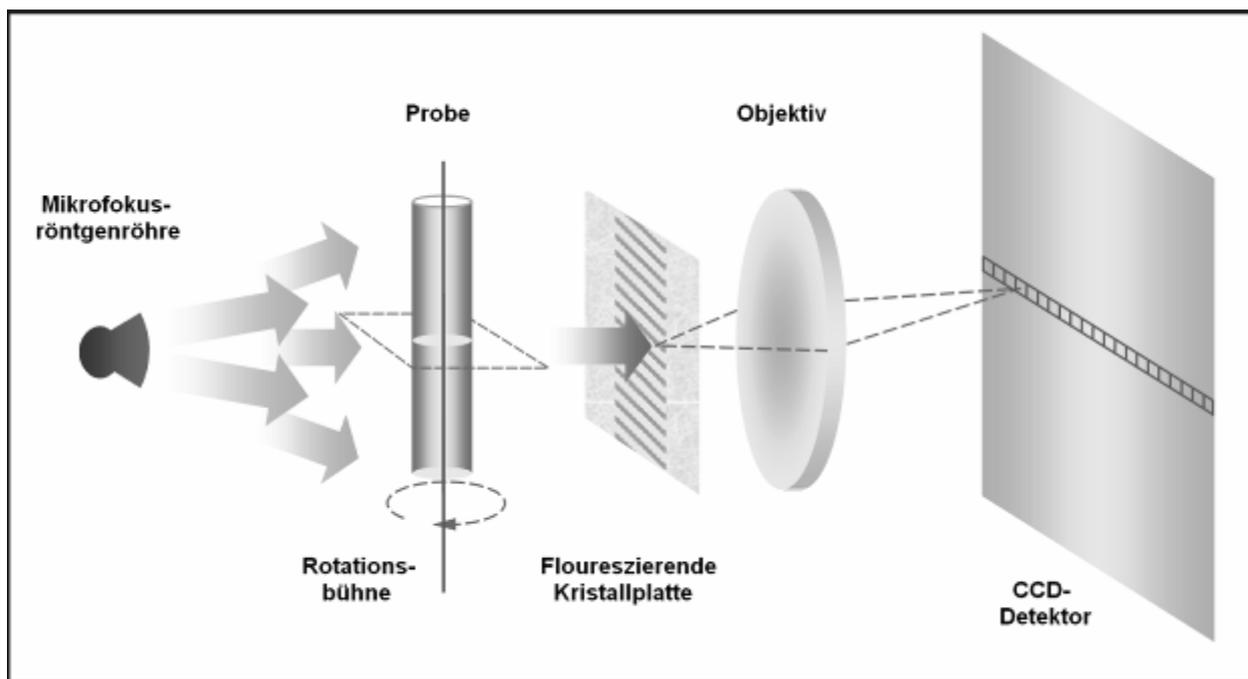


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines mikro-CT mit Kegelstrahlgeometrie.

Im Scanner ist ein Probenschlitten zwischen einer Mikrofokusröntgenröhre und einem CCD (Charge-Coupled-Device)-Detektor auf einer drehbaren Achse befestigt. Dieser führt Rotationsbewegungen in frei definierten Winkelschritten durch und kann entlang der Längsachse zwischen Röntgenröhre und CCD-Detektor bewegt werden. Dadurch kann der Fokus-Objektstand je nach gewünschter Vergrößerung verschoben werden, so dass Proben bis zu einem maximalen Durchmesser von ca. 1,5 cm gescannt werden können. Der Scanner arbeitet mit Kegelstrahlgeometrie, wobei eine Mikrofokusröntgenröhre als Strahlenquelle dient (Fokusgröße 8 μm). Diese kann bei einer Beschleunigungsspannung von 20 – 80 kV bei einer Leistung von 8 W betrieben werden. Als Detektor dient eine ca. 25 μm dicke Szintillatorschicht, die auf dem Kamerafenster einer gekühlten CCD-Kamera mit 1024 \times 1024 Pixeln aufliegt und einen maximalen Bildausschnitt (field of view, FOV) von 25 mm zulässt. Die kontinuierliche

Überwachung der Probe wird von einer optischen Kamera übernommen. Spannungsquelle und Steuerelektronik befinden sich im Scanner. Für die Bilderzeugung durch die Mikrofokusröntgenröhre werden Röntgenquanten erzeugt, die in unserem Fall kegelförmig fokussiert und beim Durchtritt durch das Objekt abgeschwächt werden. Der CCD-Detektor misst die ankommende Röntgenstrahlung, die in ein digitales Signal umgewandelt wird. Hierdurch entstehen in $0,45^\circ$ und $0,90^\circ$ Winkelschritten Absorptionsbilder des zu untersuchenden Objektes bei einer Aquisitionsmatrix von 1024×1024 Pixeln, welche dann mit Hilfe einer Rückprojektionstechnik, dem Feldkamp-Algorithmus, in isotrope axiale Schnittbilder umgewandelt werden.

Die Auflösung im mikro-CT hängt von mehreren Faktoren ab. Dabei bestimmt die Fokusgröße der Röntgenröhre die maximal erreichbare Auflösung. Sie sollte daher so klein wie möglich gewählt werden. Das Problem liegt dann jedoch darin, dass die Leistung der Röhre umso geringer wird, je kleiner die Fokusgröße ist. Dadurch entstehen wesentlich längere Messzeiten als bei den klinisch eingesetzten Computertomographen, welche sich im Sekundenbereich befinden. Durch die Verschieblichkeit des Probenschlittens zwischen Strahlenquelle und CCD-Detektor lässt sich der Vergrößerungsfaktor in einem weiteren Bereich anpassen. Nachteile ergeben sich jedoch auch hier durch die Fokusgröße von $8 \mu\text{m}$. Die theoretische Möglichkeit, ein sehr kleines Objekt nah an die Strahlenquelle heranzuführen, um so einen möglichst großen Vergrößerungsfaktor zu erzielen, ist technisch durch die Unschärfe des Projektionsbildes auf dem CCD-Detektor limitiert. Eine weitere Einschränkung ist durch die maximale Probengröße gegeben. Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Detektor darf nicht breiter sein als der Detektor selbst, da es sonst zu Artefakten bei der Bildberechnung kommen kann. Die maximale geometrische Auflösung des Projektionsbildes und der daraus errechneten Querschnittsbilder beträgt somit $1/1000$ des Objektdurchmessers. Die tatsächliche Auflösung nimmt jedoch aufgrund der Fokusgröße von $8 \mu\text{m}$ in dem Maße ab, in dem der Vergrößerungsfaktor durch Annäherung der Probe an die Röntgenröhre gesteigert wird.

2.3.1 Bildakquisition

Nach Entnahme der Proben aus der Eppendorfküvette, in der sie in gepufferter 3,7%-haltigem Formalin lagerten, wurden sie in Cellufanfolie eingehüllt und auf der

Probenhalterung mit Hilfe von Formmasse zentriert fixiert. Die Cellufanfolie verhinderte das Austrocknen der Probe. Dabei stellte sich die Formmasse als unkomplizierteste und variabelste Fixationsmöglichkeit heraus. Der Probenhalter wurde anschließend in den Scanner eingebracht und seine optimale Positionierung durch Anfertigung eines Übersichtsbildes (Scout view) überprüft. Zeigte sich hierbei eine falsche oder suboptimale Einstellung, d.h. war die Probe evtl. dezentriert, zu hoch oder zu niedrig abgebildet, konnte dies durch Manipulation der Probe und Ansteuerung der Halterung positiv korrigiert werden. Kontrollieren ließ sich dies durch mehrere in 20°-Schritten angefertigte Topogramme. Alle Proben wurden mit den gleichen Parametern gescannt. Die Röhrenspannung betrug 80 kV, der Röhrenstrom 100 μ A, die Vergrößerung war mit dem Faktor 61 immer konstant. Eine Matrix von 1024×1024 Pixeln bei einem Rotationswinkelschritt von 0,45° und einer Drehung von 180° diente der Bildaquisition. Die Expositionszeit wurde nach der Auswertung einer Absorptionskurve im Topogramm ermittelt, wodurch Über- und Unterbelichtungen vermieden werden.

Bei einer durchschnittlichen Expositionszeit von ca. 2,4 – 2,6 s und ca. 412 Einzelbildern ergab sich eine reine Gesamtexpositionszeit von ca. 17 Minuten. Die Gesamtscanzzeit war jedoch ca. dreimal länger, da zwischen jedem Einzelbild eine Abspeicherung der aufgenommenen Rohdaten in sogenannte TIF-Dateien erfolgen musste. Vor dem Entfernen der Probe aus dem Gerät ließ sich die ausreichende Bildqualität mit der Anfertigung eines einzelnen Rekonstruktionsbildes überprüfen.

2.3.2 Bildberechnung

Durch den primären Scanvorgang existierten zunächst nur Rohdaten, die im TIF-Format mit einer Größe von 2049 kB (Matrix 1024) vorlagen. Aus diesen Daten wurden im Anschluss axiale Schnittbilder rekonstruiert. Nach der Anfertigung einer einzelnen Rekonstruktion und der Optimierung der Grauwertdarstellung, d.h. der Festlegung des minimalen und maximalen Grauwertes, erfolgte die serielle Rekonstruktion der axialen Schnittbilder der gesamten Probe. Hierfür war nur eine Rotation der Probe um 180° notwendig. Weitere Rotationen von 180° und 360° hätten nur eine zusätzliche spiegelbildliche Information erbracht und das endgültige Schnittbildergebnis nicht beeinflusst. Außerdem hätte sich dadurch die erforderliche Bildaquisitionszeit (Scanzeit) verdoppelt.

Die Darstellung erfolgte in positivem Kontrast, die Strukturen hoher Dichte sind dadurch schwarz abgebildet. Die erzeugten axialen Schnittbilder im Bitmap-Format besitzen eine Größe von ca. 1026 kB und sind damit einer schnellen Darstellung und morphometrischen Auswertung zugänglich. Erzeugt wurden ca. 960 Schnittbilder pro Probe bei einer Pixelgröße von 4 µm.

2.4 Bildanalyse

Die Auswertung der im mikro-CT gescannten Plazentaprobe erfolgte mit dem Programm ANALYZE[®] 7.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). Dieses Programm ermöglicht es, dreidimensionale Volumenbilder zu errechnen, darzustellen und zu verarbeiten. Zunächst mussten die axialen Bitmap-Datensätze in Volumendatensätze umgewandelt werden, um die Darstellung dreidimensionaler Bilder zu ermöglichen. Zu Beginn der Auswertung erfolgte die Grauwertfestlegung zur Definition des Gewebes und der Gefäße in der Plazenta. Hierzu wurde als erstes eine quantitative Analyse aller vorkommenden Grauwerte durchgeführt und in einem Histogramm graphisch dargestellt. Dem angefertigten Histogramm konnten die Häufigkeitsgipfel für das Plazentagewebe und die mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße entnommen werden. Hierbei ergab sich ein Grenzwert (Threshold) von 60 für Gewebe und von 150 für die Gefäße. Mit der Funktion „Volume Render“ wurden daraufhin von allen Proben folgende Strukturparameter erfasst:

- 1.) Gesamtvolumen des Gewebes innerhalb der Probe: Total Tissue Volume (TTV, in mm³):
- 2.) Gesamtvolumen der Gefäße innerhalb der Probe: Total Vascular Volume (TVV, in mm³).
- 3.) Relativer Anteil der Gefäße am Gesamtvolumen der Probe: Vascular Volume Fraction (VVF, in %), berechnet nach der Formel: $VVF = TVV/TTV \times 100$.

Bei den mit Bariumsulfat perfundierten Proben wurde das Gesamtvolumen des Gewebes innerhalb einer Plazentaprobe genau definiert. Dazu erfolgte die Festlegung einer rechteckigen „region of interest“ innerhalb der Plazentaprobe mit einer Seitenlänge von 5×5 mm (125 mm³). Danach wurden äquivalent zu den Mikrofilproben die gleichen Strukturparameter (TTV, TVV) durch das Analyzeprogramm ermittelt und daraus die VVF berechnet.

2.5 Statistik

Statistische Hypothesen dienen der Überprüfung wissenschaftlicher Vermutungen. Zu Anfang werden die Null- und die Alternativhypothese festgelegt. Bei der Durchführung eines Gruppenvergleichs wird die Ablehnung dieser Hypothesen durch den Anwender überprüft. Will man eine Hypothese mit einem geringen Fehler ablehnen, so sollte die Wahrscheinlichkeit, mit der man die Hypothese fälschlicherweise ablehnt, niedrig sein. Dazu wird eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau α) bestimmt, die den Fehler, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist, begrenzt. Häufig gewählte Signifikanzniveaus sind $\alpha = 1\%$ ($p = 0,01$) und $\alpha = 5\%$ ($p = 0,05$). Ist p kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau, so liegt statistische Signifikanz vor und die Nullhypothese kann verworfen werden. Die hier aufgeführte statistische Ausarbeitung erfolgte mit dem JMP-Statistikprogramm (JMP, A Business, Unit of SAS; SAS Campus Drive, Cary, NC 27513; Version JMP Release 6). Mittelwerte und Standardabweichung wurden für jeden Parameter in jeder Gruppe berechnet. Die Daten wurden mit dem t-Test und der einfachen Varianzanalyse für unabhängige Stichproben ausgewertet und bei einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die mikrocomputertomographischen Untersuchungen des fetoplazentaren Gefäßbaumes nach Bariumsulfat- und Mikrofilperfusion. Basierend auf der Hypothese, dass mit Mikrofil eine qualitativ und quantitativ bessere Analyse vor allem kapillärer Strukturen gelingt, wurden die unterschiedlich perfundierten Plazenten hinsichtlich ihres relativen Gefäßanteiles am Gesamtvolumen verglichen. Nach der Analyse im mikro-CT erfolgte die Quantifizierung des Gefäßanteiles mittels etablierter histologischer Methoden.

3.1 Plazenta- und Geburtsgewicht

In Tabelle 2 und 3 sind die Daten der untersuchten normalen termingerechten Plazenten aufgeführt. Die Plazenten variierten in ihrem Gewicht von 460 bis 670 g und in ihrem Gestationsalter von Schwangerschaftswoche 36+6 bis 39+3. Alle neugeborenen Kinder waren altersentsprechend entwickelt und gesund. Das Neugeborenenengewicht lag zwischen 2800 und 3900 g und befand sich damit jeweils zwischen der 10. und 90. Perzentile.

3.2 Mikro-CT

Zur Quantifizierung des fetoplazentaren Gefäßbaumes wurden die Parameter Gesamtvolumen Gewebe (Total Tissue Volume: TTV) und Gesamtvolumen Gefäße (Total Vascular Volume: TVV) in den beiden Plazentagruppen mittels zweier Verfahren erfasst und im Anschluss der relative Anteil der Gefäße am Gesamtvolumen der Probe (Vascular Volume Fraction: VVF) berechnet. Dargestellt sind in Tabelle 2 die Daten der mit Bariumsulfat gefüllten Plazenten. Die Werte für den relativen Gefäßanteil zeigen nur geringe Schwankungen und reichen von 15,54 % bis 16,38 % mit einem Mittelwert von $15,94 \pm 0,39$ %. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse für den relativen Gefäßanteil der mit Mikrofil perfundierten Plazenten aufgeführt. Es ergeben sich deutlich höhere Werte als bei den mit Bariumsulfat perfundierten Plazenten. Sie liegen zwischen 21,54 und 40,95 % mit einem Mittelwert von $30,35 \pm 8,48$ %.

Tabelle 2: Quantifizierung der Parameter TTV, TVV und VVF nach Perfusion mit bariumsulfathaltiger Kontrastmittelsuspension.

Anzahl der Proben	Plazenta 1 (n=8)	Plazenta 2 (n=8)	Plazenta 3 (n=8)	Plazenta 4 (n=8)	Plazenta 5 (n=8)	Mittelwert
TTV (mm ³)	125	125	125	125	125	125
TVV (mm ³)	20,47±1	19,42±2	19,98±0,5	20,29±1,4	19,6±1,5	20±0,5
VVF (%)	16,4±0,8	15,5±1,6	16±0,4	16,3±1,1	15,6±1,1	15,9±0,4
Plazentagewicht (g)	460	560	650	500	540	542±72
Geburtsgewicht (g)	3090	2800	3300	3180	3530	3180±269

Dargestellt sind die Gefäßparameter ± Standardabweichung 5 verschiedener Plazenten, aus denen jeweils n = 8 Proben analysiert wurden.

TTV (Total Tissue Volume): Gesamtvolumen Gewebe in mm³

TVV (Total Vascular Volume): Gesamtvolumen Gefäße in mm³

VVF (Vascular Volume Fraction): Relativer Gefäßanteil am Gesamtvolumen in %

Tabelle 3: Quantifizierung der Parameter TTV, TVV und VVF nach Perfusion mit Mikrofil-Kontrastmittel.

Anzahl der Proben	Plazenta 1 (n=8)	Plazenta 2 (n=8)	Plazenta 3 (n=8)	Plazenta 4 (n=8)	Plazenta 5 (n=8)	Mittelwert
TTV (mm ³)	44,8±12,2	27,6±10,5	23,5±8,3	42,4±8,9	37±7,1	35,1±9,2
TVV (mm ³)	14,6±4,5	6,3±3,4	5,2±2,2	17,1±4,7	13,3±6,1	11,3±5,3
VVF (%)	32,8±5,5	21,8±7,4	21,5±4,4	41±10	34,6±10,5	30,4±8,5
Plazentagewicht (g)	660	670	660	510	550	610±74,50
Geburtsgewicht (g)	3900	2940	3080	3100	2840	3172±420,6

Dargestellt sind die Gefäßparameter ± Standardabweichung 5 verschiedener Plazenten, aus denen jeweils n = 8 Proben analysiert wurden.

TTV (Total Tissue Volume): Gesamtvolumen Gewebe in mm³

TVV (Total Vascular Volume): Gesamtvolumen Gefäße in mm³

VVF (Vascular Volume Fraction): Relativer Gefäßanteil am Gesamtvolumen in %.

Die Abbildungen 7-9 zeigen dreidimensionale Bilder des fetoplazentaren Gefäßbaumes, die mit dem Bildbearbeitungsprogramm ANALYZE[®] erstellt wurden, um die Mikroarchitektur und Gefäßdichte der Plazenta darzustellen. Abbildung 8 und 9 zeigen in maximaler Intensitätsprojektion Schnitte einer mit Bariumsulfat und einer mit Mikrofil perfundierten Plazenta. Es wurden jeweils Bilder in transversaler, sagittaler und koronarer Ebene angefertigt, um einen Vergleich der beiden unterschiedlich perfundierten Plazenten zu erhalten. Hierbei zeigt sich, dass sowohl mit Bariumsulfat als auch mit Mikrofil eine weitgehend homogene Füllung des fetoplazentaren Gefäßbaumes möglich ist. Gleichzeitig werden aber auch die qualitativen und quantitativen Unterschiede der zwei verschiedenen Kontrastmittel sichtbar. Die Abbildungen verdeutlichen, dass mit Mikrofil eine wesentlich höhere Anzahl an kontrastgefüllten Gefäßen erreicht wird als mit Bariumsulfat. Vor allem die Kontrastierung kleinerer, terminaler Gefäße ist mit Mikrofil deutlich höher. Abbildung 7 hebt noch einmal im transversalen Schnitt die Unterschiede der beiden verschiedenen Füllungen hervor. Bild B demonstriert nach Mikrofilperfusion deutlich mehr gefüllte Gefäße als Bild A nach Bariumsulfatinjektion. Die weißen Pfeile zeigen die Intermediärzotten in beiden Abbildungen.

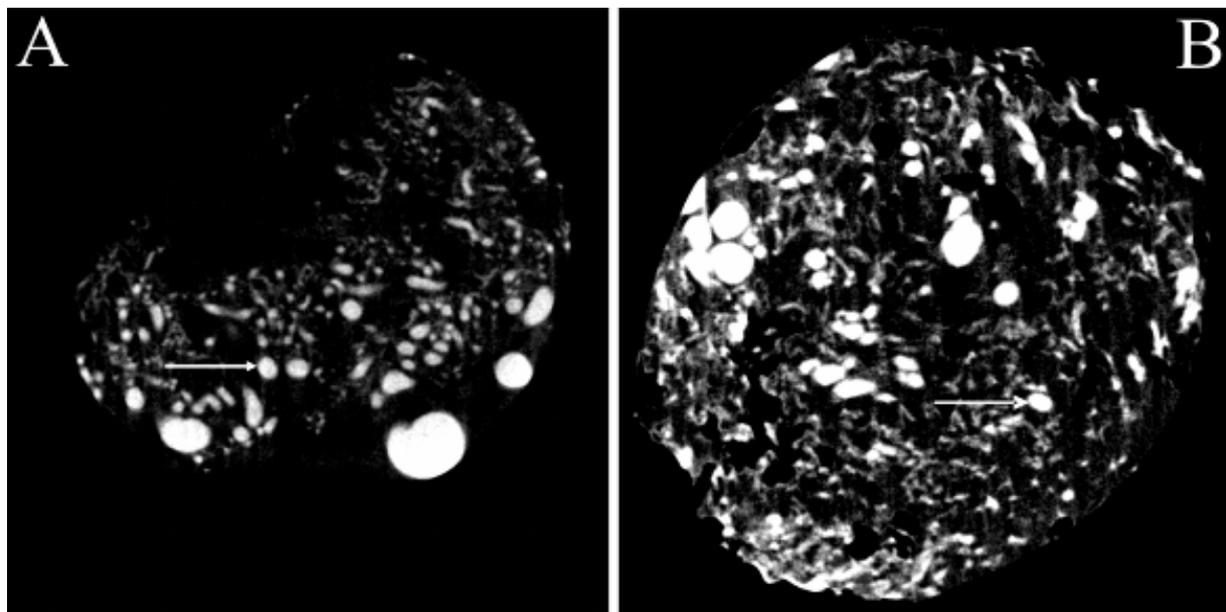


Abbildung 7. A, B: Transversaler Schnitt einer normalen mit Bariumsulfat (A) und Mikrofil (B) perfundierten Plazenta; weiße Pfeile demonstrieren die Intermediärzotten.

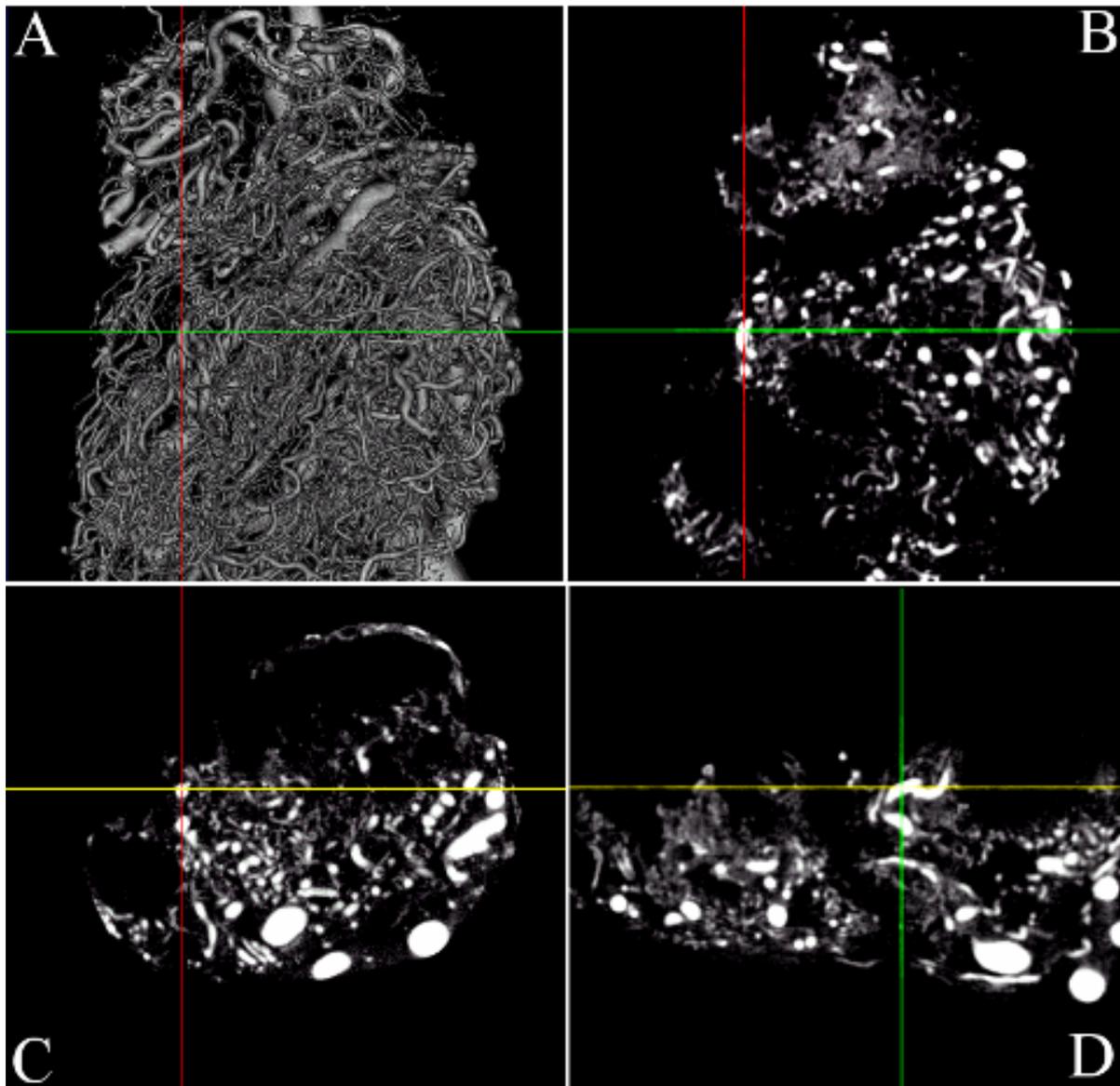


Abbildung 8: Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion einer Plazentaprobe nach Perfusion mit bariumsulfathaltiger Suspension (A). Koronare (B), transversale (C) sowie sagittale (D) Einzelschichtbilder mit Darstellung der 3D-Raumachsen zur definierten Lokalisation von Strukturen innerhalb des 3D-Datensatzes.

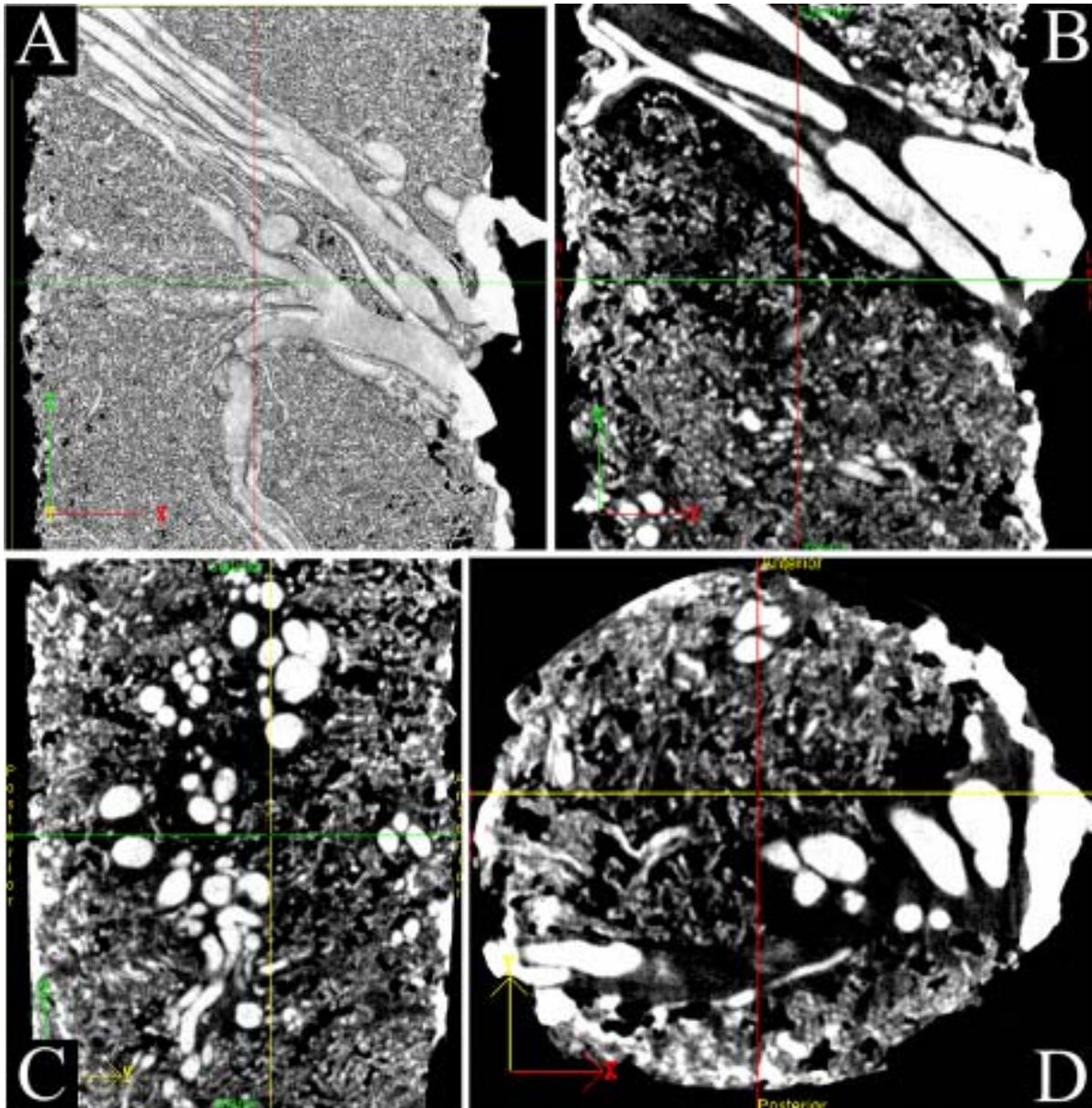


Abbildung 9: Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion einer Plazentaprobe nach Perfusion mit Mikrofil (A). Koronare (B), sagittale (C) sowie transversale (D) Einzelschichtbilder mit Darstellung der 3D-Raumachsen zur definierten Lokalisation von Strukturen innerhalb des 3D-Datensatzes.

In Abbildung 10 sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Mikrofil- und Bariumsulfatplazenten hinsichtlich ihres relativen Gefäßanteils am Gesamtvolumen in Form eines Säulendiagrammes dargestellt. Es zeigt sich noch einmal im Vergleich,

dass alle mit Mikrofil bearbeiteten Plazenten in der mikrocomputertomographischen Analyse jeweils einen höheren relativen Gefäßvolumenanteil (VVF) aufweisen.

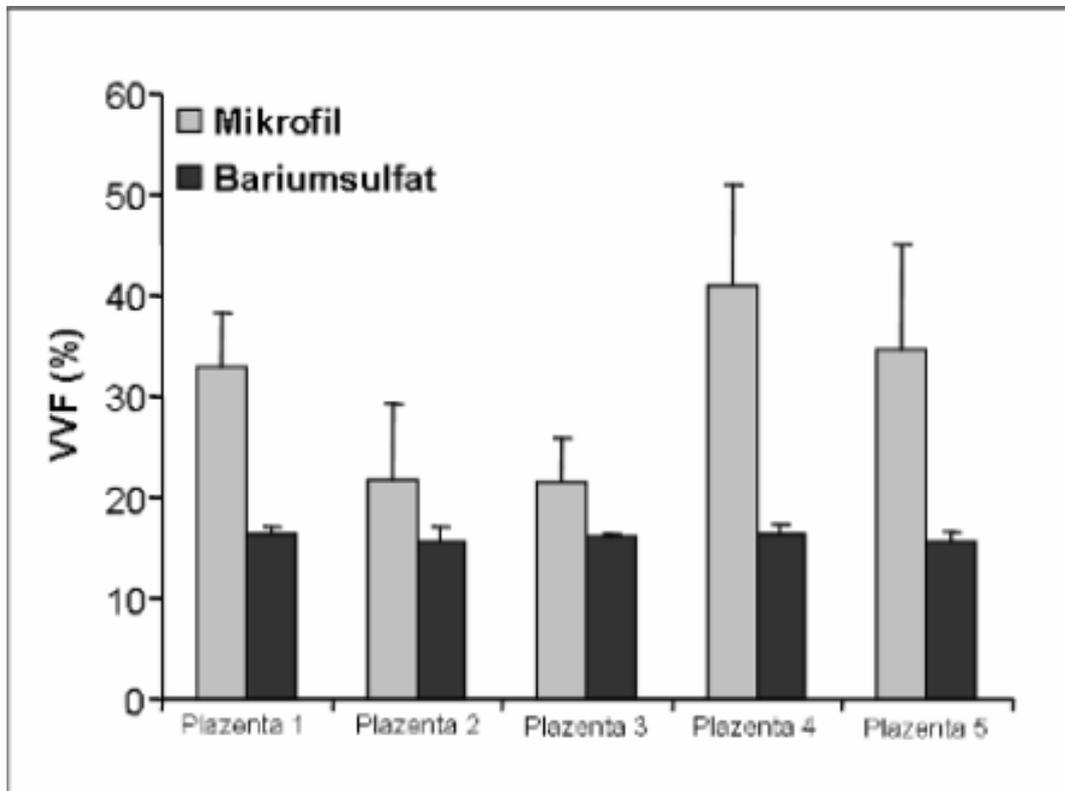


Abbildung 10: Vergleich der VVF der mit Bariumsulfat und Mikrofil perfundierten Plazenten in der mikro-CT. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 5$ Plazenten. VVF (Vascular Volume Fraction): Relativer Gefäßanteil am Gesamtvolumen in %.

3.2.1 Statistische Analyse der mikro-CT-Daten

Unter der Annahme, dass die Perfusion mit den zwei verschiedenen Kontrastmitteln keine Unterschiede zeigt, erfolgte die Überprüfung dieser Hypothese mit Hilfe des t-Tests. Die Ergebnisse des statistischen Testes sind in den Abbildungen 11 und 12 zusammengefasst. Bei einem festgelegten Signifikanzniveau α von 0,05 ergab sich bei der Analyse der mikro-CT-Ergebnisse ein p-Wert $< 0,01$. Damit konnte bei dem Test mit einem $p < \alpha$ von einem signifikanten Ergebnis ausgegangen und die Nullhypothese verworfen werden. Es wird die Alternativhypothese angenommen, die besagt, dass die zwei Kontrastmittel Unterschiede in der Perfusion des fetoplazentaren Gefäßbaumes zeigen.

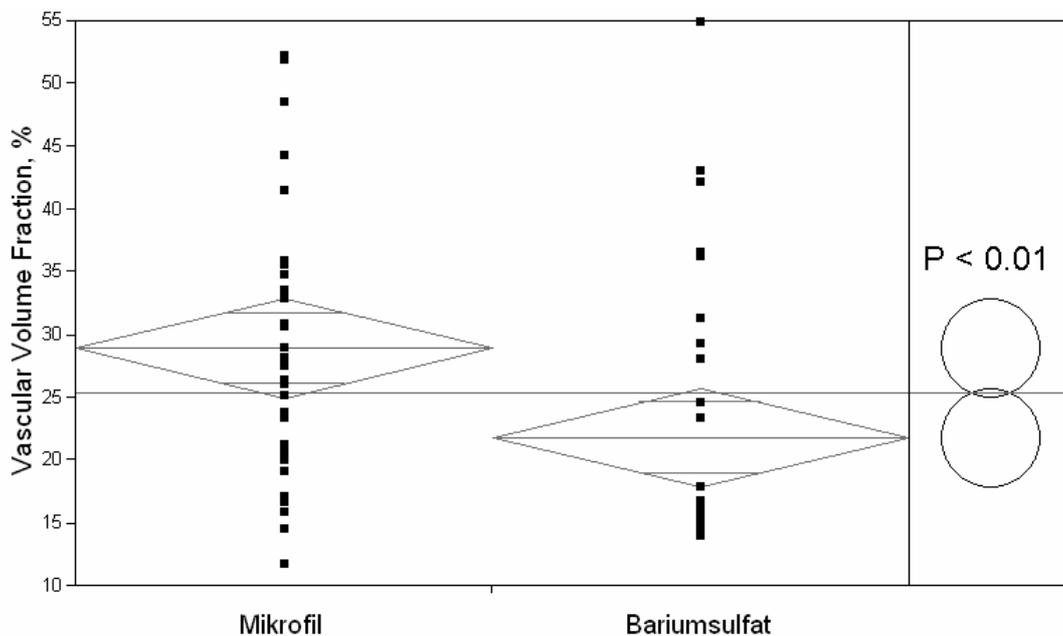


Abbildung 11: Dargestellt sind die Gesamtwerte für den relativen Gefäßanteil am Gesamtvolumen (Vascular Volume Fraction, VVF, in %) für Mikrofil und Bariumsulfat bei n = 5 Plazenten. Die statistische Signifikanz (p) ist kleiner 0,01.

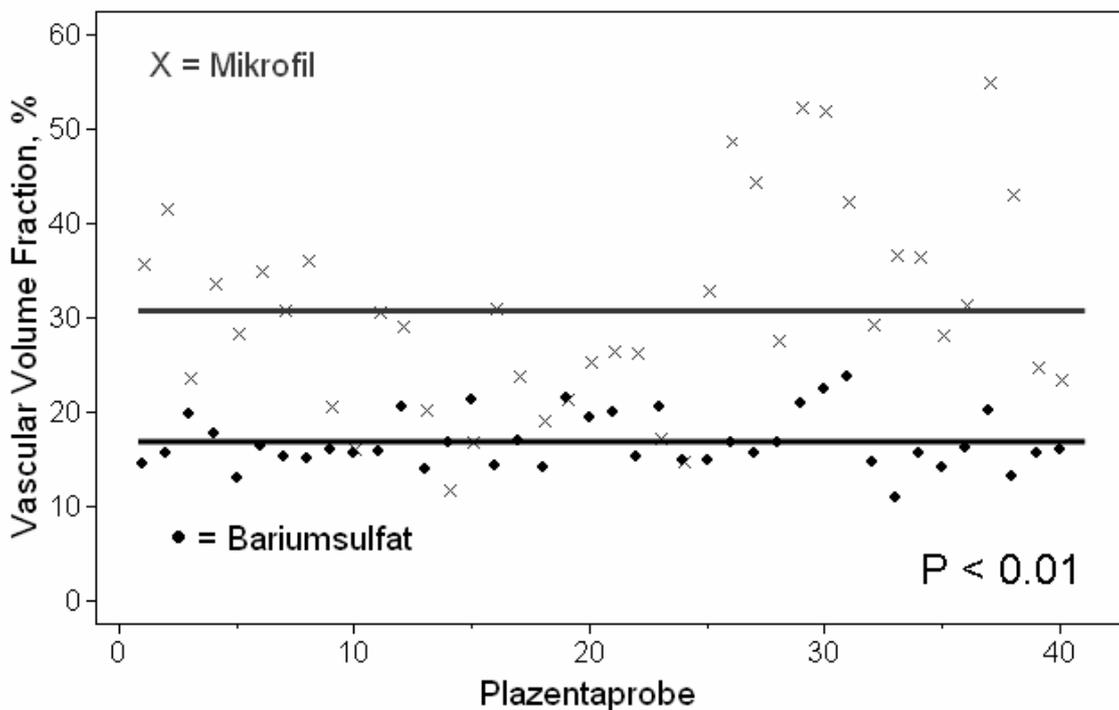


Abbildung 12: Dargestellt sind die Einzelwerte für den relativen Gefäßanteil am Gesamtvolumen (Vascular Volume Fraction, VVF, in %) für Mikrofil und Bariumsulfat bei n = 5 Plazenten mit jeweils 8 Proben. Die statistische Signifikanz (p) ist kleiner 0,01.

3.3 Histologische Untersuchungen

Im Anschluss an die Untersuchungen im mikro-CT wurden von den Mikrofil- und Bariumsulfatproben jeweils 30 histologische Schnitte pro Plazenta angefertigt und nach Haematoxylin-Eosin gefärbt, um mikroskopisch den Anteil der perfundierten Gefäße am Gesamtgefäßanteil auszuwerten. Abbildung 13 und 14 zeigen die histologischen Querschnitte der Bariumsulfat- und Mikrofilproben. Man erkennt die quer angeschnittenen Zotten mit Blutgefäßen, die mit Kontrastmittel und zum Teil auch noch mit Blut gefüllt sind. In den Abbildungen 13A und 14A sieht man die Querschnitte vor Auszählung der mit Kontrastmittel perfundierten Gefäße. Die Abbildungen 13B und 14B demonstrieren die histologischen Querschnitte nach mikroskopischer Auszählung. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die mit Kontrastmittel perfundierten Gefäße, die roten Pfeile die zum Teil noch mit Blut gefüllten Gefäße, in die kein Kontrastmittel vorgedrungen ist. Der hohe Anteil von schwarzen gegenüber roten Pfeilen in Abbildung 14B veranschaulicht, dass nach Perfusion mit Mikrofil deutlich mehr Gefäße mit Kontrastmittel gefüllt sind als nach Perfusion mit Bariumsulfat (Abbildung 13B).

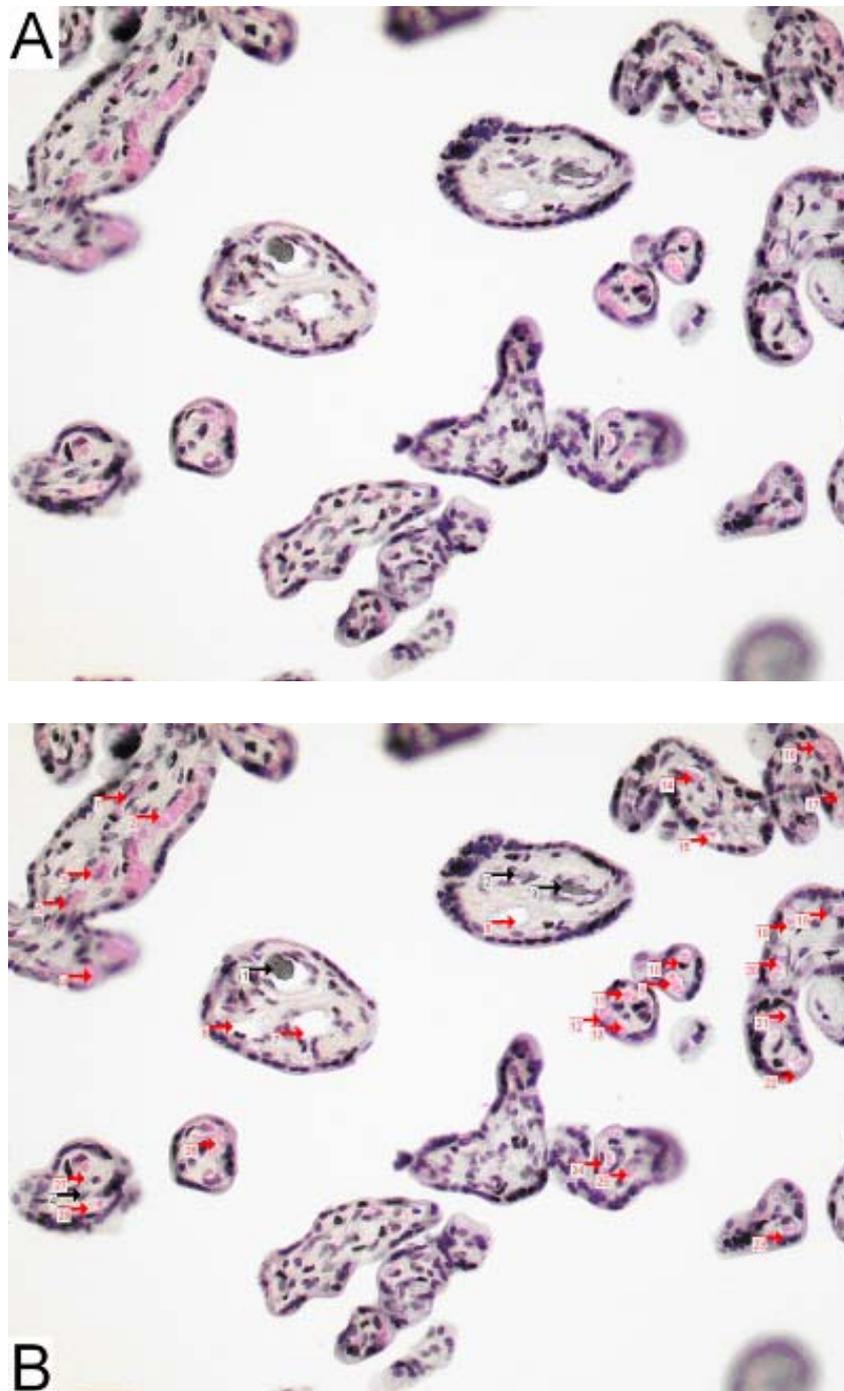


Abbildung 13. A, B: Histologischer Querschnitt einer normalen mit Bariumsulfat perfundierten Plazenta nach HE-Färbung und Untersuchung im mikro-CT (A, B); schwarze und rote Pfeile demonstrieren die Gefäße mit (schwarz) und ohne (rot) Kontrastmittel (B).

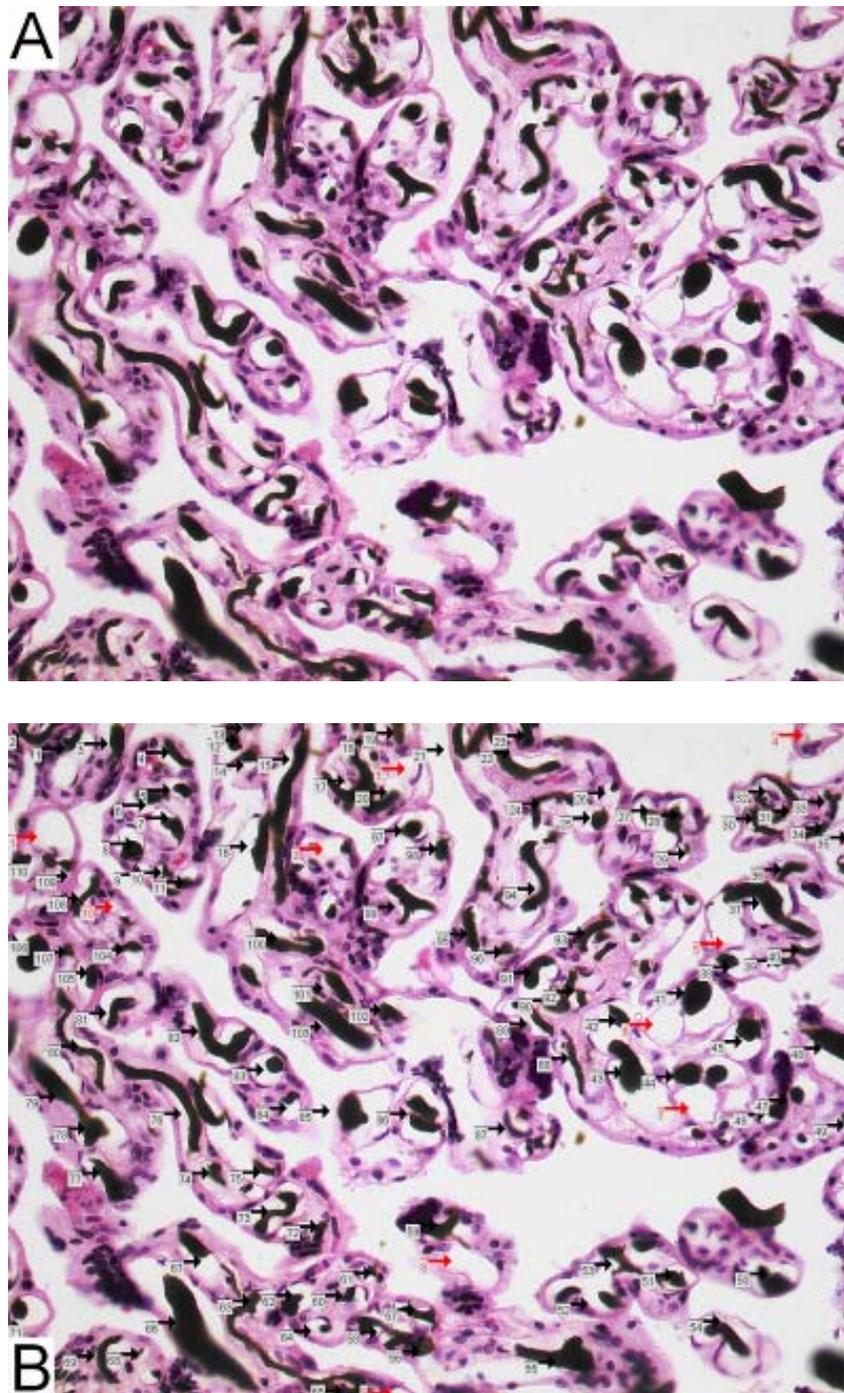


Abbildung 14.A, B: Histologischer Querschnitt einer normalen mit Mikrofil perfundierten Plazenta nach HE-Färbung und Untersuchung im mikro-CT (A, B); schwarze und rote Pfeile demonstrieren die Gefäße mit (schwarz) und ohne (rot) Kontrastmittel (B).

Tabelle 4 zeigt die Quantifizierung der histologischen Auszählung. Mit Mikrofil werden durchgehend mehr Gefäße perfundiert als mit Bariumsulfat. Der Anteil der perfundierten Gefäße am Gesamtgefäßanteil liegt bei Mikrofil mit $90,5 \pm 3,37$ % deutlich über den nach Bariumsulfatperfusion erhaltenen $26,8 \pm 9,7$ %.

Tabelle 4: Quantifizierung der kontrastmittelgefüllten Gefäße in der Histologie für n = 30 Schnitte

Schnitt	Anteil der mit Bariumsulfat gefüllten Gefäße in %	Anteil der mit Mikrofil gefüllten Gefäße in %	Schnitt	Anteil der mit Bariumsulfat gefüllten Gefäße in %	Anteil der mit Mikrofil gefüllten Gefäße in %
1	30,19	85,29	16	37,56	91,30
2	22,22	88,42	17	53,97	92,63
3	23,08	92,31	18	25,00	93,67
4	21,88	90,91	19	37,78	95,56
5	39,02	91,58	20	25,00	91,21
6	13,11	91,59	21	16,67	88,24
7	18,18	91,00	22	20,59	93,75
8	18,18	91,67	23	34,48	92,73
9	24,00	88,64	24	20,00	86,00
10	18,18	83,05	25	24,39	94,44
11	24,68	84,72	26	28,89	91,18
12	43,90	88,57	27	23,08	84,38
13	30,43	90,00	28	21,21	92,16
14	36,79	94,12	29	21,05	89,47
15	40,45	96,88	30	12,50	91,94

Dargestellt sind die mit Mikrofil und Bariumsulfat perfundierten Gefäße am Gesamtgefäßanteil in %
Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) für Bariumsulfat: $26,8 \pm 9,7$ %
Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) für Mikrofil: $90,5 \pm 3,37$ %

3.3.1 Statistische Analyse der Histologie

Für die statistische Analyse der Histologie wurde analog zur Testung der mikro-CT-Ergebnisse vorgegangen. Zur Überprüfung der Nullhypothese wurde daher erneut der t-Test durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ergab sich ein p-Wert < 0,0001. Damit ergibt sich wieder ein $p < \alpha$, so dass auch hier die Nullhypothese verworfen und von einem Unterschied in der Perfusion der beiden Kontrastmittel ausgegangen werden kann. Die Abbildungen 15 und 16 liefern die dazugehörigen Ergebnisse.

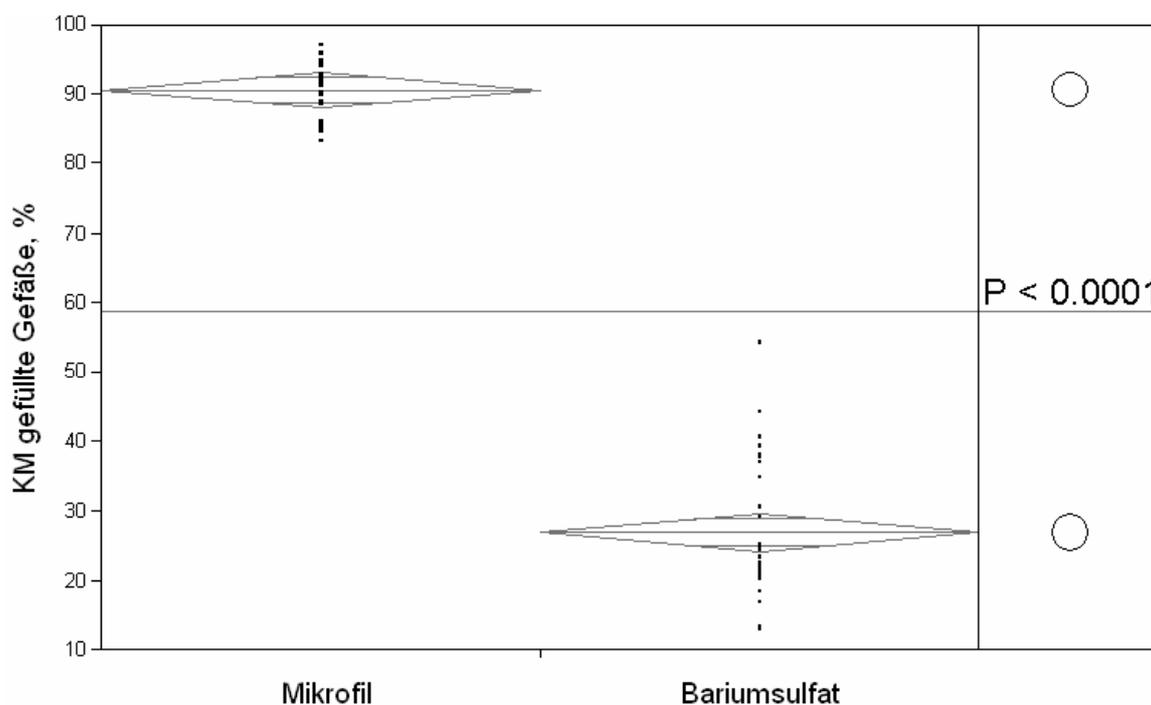


Abbildung 15: Dargestellt sind die Gesamtwerte für die mit Mikrofil und Bariumsulfat perfundierten Gefäße in der Histologie bei $n = 30$ Schnitte. Die statistische Signifikanz (p) ist kleiner 0,0001. KM: Kontrastmittel.

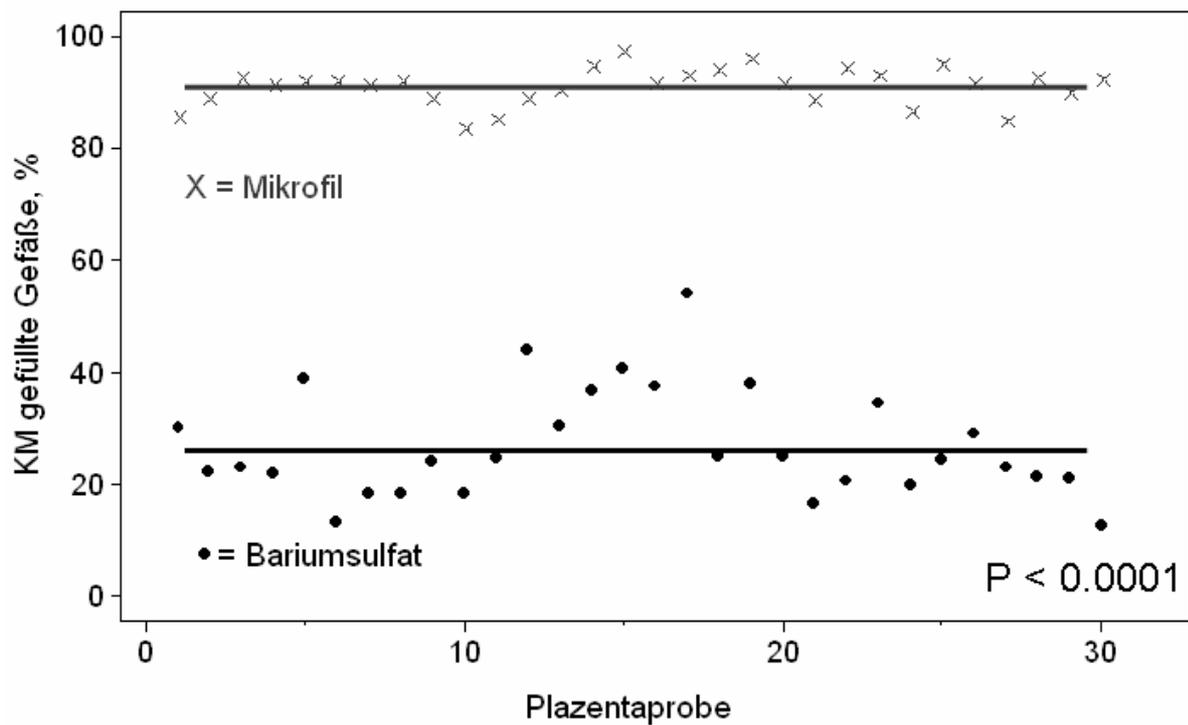


Abbildung 16: Dargestellt sind die einzelnen Werte für die mit Mikrofil und Bariumsulfat perfundierten Gefäße in der Histologie bei n = 30 Schnitte. Die statistische Signifikanz (p) ist kleiner 0,0001. KM: Kontrastmittel.

4 Diskussion

Das Potenzial der mikro-CT-Technologie hat sich erst durch die Anwendung verschiedener Kontrastierungs- und Perfusionstechniken entwickelt, eben auch solche Gewebe zu visualisieren und zu differenzieren, deren Feinstruktur erst nach Kontrastverstärkung hervortritt. Für ex-vivo Darstellungen wurde bis Mitte der 80er Jahre als Kontrastmittel am häufigsten Bariumsulfat eingesetzt. Durch Beimischung von Gelatine wird erreicht, dass die bei 50 bis 60°C flüssige Suspension bei Zimmertemperatur erstarrt. In der mikro-CT lässt sich das nach Applikation intravasal verbleibende bariumsulfathaltige Kontrastmittel darstellen und quantitativ erfassen. Neue vaskuläre Kontrastmittel und neue Perfusionstechniken konnten zu weiterführenden methodischen Ansätzen der mikro-CT zur Evaluierung der Gefäßarchitektur beitragen. Bereits in den 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Mikrofil-Kontrastmittel (Microfil® MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) eine lückenlose und homogene Perfusion des arteriellen Gefäßsystems in verschiedenen Organen möglich ist. Mikrofil besteht aus zwei Komponenten (Blei und Silikon), die in wässriger Lösung vorliegen. Nach Vermischung der Komponenten härtet dieses Kontrastmittel nach 20 Minuten vollständig aus. Ein wesentlicher Vorteil von Mikrofil gegenüber bariumsulfathaltigem Kontrastmittel besteht in der geringeren Viskosität und somit in der besseren kapillären Penetration. Des Weiteren hat Mikrofil polymere Eigenschaften, die eine Penetration in den extravaskulären Raum verhindern.

Die quantitative und qualitative Analyse des fetoplazentaren Gefäßbaumes hat sowohl eine außerordentliche Bedeutung für das Verständnis der Pathophysiologie intrauterinen Wachstums und kindlicher Entwicklung als auch für die klinischen Behandlungsmöglichkeiten. Schon geringe Veränderungen in der Zottendifferenzierung und damit der fetoplazentaren Durchblutung können zu Entwicklungsstörungen des Feten führen. Je genauer daher die Darstellung der Mikroarchitektur der Gefäße erfolgt, desto vielfältiger und präziser sind dementsprechend auch die Aussagen, die über physiologische und pathologische Veränderungen gewonnen werden können. Im weiteren Verlauf können so mögliche Ursachen aufgedeckt und weiterführende klinische Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden. Thema dieser Studie bildete daher die qualitative und quantitative Untersuchung der fetoplazentaren Vaskularisierung in der mikro-CT nach Perfusion mit Bariumsulfat oder Mikrofil.

4.1 Mikro-CT

Seit der Einführung der mikro-CT zur Darstellung der Gefäßarchitektur verschiedener Organe (39-47) steht außer der konventionellen Histologie ein weiteres Verfahren zur Verfügung, das die Analytik von Gefäßstrukturen und -volumen auf zwei- und dreidimensionaler Ebene erlaubt. Die mikro-CT erlaubt eine lückenlose, dreidimensionale Darstellung der Gefäßarchitektur. Ein weiterer Vorteil der mikro-CT ist die zerstörungsfreie Darstellung der Probe und somit eine uneingeschränkte weitere Nutzbarkeit der Proben für anschließende histologische Studien. Durch die Akquisition eines lückenlosen, dreidimensionalen Datensatzes ermöglicht die mikro-CT neben der Gewebedifferenzierung eine Quantifizierung des Kontrastmittelperfusates, d.h. es können Aussagen zur Gefäßdichte, zur Gefäßoberfläche und zum Gefäßvolumen getroffen werden.

Je nach Fragestellung der zu untersuchenden Gewebe existieren derzeit verschiedene Perfusionsformen von Kontrastmittel, um die Feinstruktur von Weichteilgewebe zu analysieren. Die intraarterielle ex-vivo Applikation von Kontrastmittel ist in der mikro-CT der „Gold-Standard“ zur Gefäßdarstellung. Karau und Mitarbeiter (49) konnten nach dieser Perfusionstechnik eine vollständige und lückenlose Darstellung des pulmonalarteriellen Gefäßbaumes erarbeiten. In dieser Arbeit wurde erstmals eine Methode zur dreidimensionalen Analytik des pulmonalarteriellen Gefäßbaums der Lunge gezeigt. Dazu wurden Rekonstruktionsalgorithmen und spezielle 3D-Bildbearbeitungsprogramme (ANALYZE[®] 7.0, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) entwickelt, um Gefäßaufzweigungen („branching“) zu analysieren.

In unserer Studie zeigen wir, dass nach Injektion von Mikrofil die Evaluation des fetoplazentaren Gefäßbaumes mit der mikro-CT möglich ist. Nach Perfusion mit Mikrofil erhalten wir einen Gefäßvolumenanteil von 30 % am Gesamtvolumen der Probe. Im Gegensatz dazu zeigten sich signifikante Unterschiede in der quantitativen Auswertung der mit Bariumsulfat perfundierten Plazenten. Hier werden durchschnittlich nur 16 % Gefäßvolumenanteil erreicht.

Vorangegangene Studien zur quantitativen Analytik des fetoplazentaren Gefäßbaumes mittels Histomorphometrie zeigen unterschiedliche Gefäßvolumina. Kaufmann und Mitarbeiter (5) demonstrieren einen Gefäßanteil von 28,4 % bezogen auf die terminalen Zotten normaler termingerechter Plazenten. Mayhew et al. (27) sprechen von einer

Kapillardichte von 23,8 % in peripheren Zotten, Burton et al. (23) von 20,6 % bezogen auf die Intermediärzotten und terminalen Zotten.

Die nach Mikrofilperfusion erhaltenen 30% Gefäßanteil unterscheiden sich zum einen stark von den nach Injektion von Bariumsulfat erhaltenen 16%, zum anderen liegen sie über den durch histomorphometrische Studien gewonnenen Daten. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Techniken zur Erfassung der Gefäßvolumina ergeben sich einige Erklärungsmöglichkeiten. In unserer Studie haben wir zum einen durch die Methodik der Probenentnahme die komplette Plazenta mit allen Gefäßstrukturen untersucht, so dass sich die Volumenberechnungen nicht nur auf die terminalen und die Intermediärzotten wie in den oben angeführten Studien beziehen. Dies zeigt sich an den gemessenen Durchmesser der Gefäße, die von 2 mm (Chorionplattenarterien) bis zu 14 μ m (terminale Zotten) reichen. Damit ist zu erklären, dass unsere 30% Gefäßanteil zum Teil über den histomorphometrisch gewonnenen Werten liegen. Wie oben bereits erwähnt, unterscheiden sich auch die Werte der von uns untersuchten zwei Gruppen signifikant voneinander. Nach Perfusion mit Mikrofil zeigen die Ergebnisse einen fast doppelt so hohen Gefäßvolumenanteil wie nach Perfusion mit Bariumsulfat bei Kriteriengleichheit der Plazenten. Dies bestätigt die Annahme, dass durch die Präparation mit Mikrofil wesentlich mehr Gefäße perfundiert werden und dadurch eine vollständigere Füllung des Gefäßbaumes gelingt.

Obwohl die mikro-CT bei unseren Analysen keine nachweisbaren Artefakte erkennen lässt oder zu Beeinträchtigungen mit quantitativen Bildanalysen führt, sind davon trotzdem mehrere, wie z.B. Schatten-, Ring- oder Aufhärungsartefakte, bekannt. Weitere Limitationen unserer Methodik können sich bei der Probenpräparation ergeben. Durch die Injektion des Kontrastmittels unter Druck und gleichzeitiger Verletzbarkeit der Gefäße kann es zum Austreten von Kontrastmittel in umliegendes Gewebe kommen. Bei der automatisierten Auswertung würden diese Bereiche dann fälschlicherweise als perfundierte Gefäße angesehen, und der prozentuale Gefäßanteil könnte sich dementsprechend als zu hoch errechnen. Des Weiteren könnte eine inhomogene Gefäßfüllung durch Vermischen von Kontrastmittel und Restblut zu einer ungleichen Aushärtung des Kontrastmittels führen, was sich ebenfalls negativ auf die Quantifizierung des Gefäßvolumens auswirken würde. Weiterhin kann es, bedingt durch eine reaktive Gefäßkonstriktion nach Kontrastmittelinjektion, zu einer verminderten Volumenberechnung kommen. Durch Phasen der Ischämie kann die Ultrastruktur der

Zotten verändert und Ödembildung hervorgerufen werden. Mit der von uns angewandten Methodik zur Plazentapräparation können wir eine kurze ischämische Periode nicht komplett ausschließen. Diese Limitationen können allesamt zu Ungenauigkeiten in der quantitativen Analyse der Daten führen (65).

4.2 Histologie

Die deutlich bessere Perfusion mit Mikrofil gegenüber Bariumsulfat lässt sich auch in der Histologie bestätigen. Durch die Auszählungen der kontrastverstärkten Gefäße in der Histologie zeigen wir, dass mit Mikrofil im Durchschnitt mehr als dreimal so viele Gefäße gefüllt werden wie nach Injektion von Bariumsulfat. Den Vorteil der stärkeren Kontrastierung zum umliegenden Gewebe nach Nutzung von Mikrofil sowie dessen polymeren Eigenschaften, die schon von Cortell 1969 beschrieben wurden (62), demonstrieren auch wir anhand der angefertigten histologischen Bilder.

Obwohl die quantitative Histomorphometrie oder stereologische Verfahren nach wie vor in der quantitativen Analytik von vaskulären Parametern eingesetzt werden, haben sie gewisse Nachteile. Nur wenige Mikrometer eines Gefäßes werden in diesen Verfahren zur Quantifizierung der Gefäßvolumina herangezogen. Die Selektion des zu untersuchenden Segmentes ist mehr oder weniger zufällig, so dass Heterogenitäten innerhalb der Probe kaum zuverlässig erfasst werden können. Durch Interpolation wird auf die Dimension des gesamten Gefäßes oder eines bestimmten Gefäßsegmentes rückgeschlossen. Neben der zeit- und personalintensiven Probenaufbereitung bestehen die Nachteile einer zweidimensionalen Gefäßdarstellung.

4.3 Kontrastmittel

Lange Zeit war Bariumsulfat die am häufigsten eingesetzte Kontrastverstärkung zur ex-vivo Darstellung von Gefäßen. Es konnte hiermit die Gefäßarchitektur verschiedenster Organe in der mikro-CT evaluiert werden (44, 57-59). Erst die Implementierung neuer Kontrastmittel hat die Limitationen von bariumsulfathaltigem Kontrastmittel deutlich gemacht. Aufgrund der zähen Fließeigenschaften und der schnellen Aushärtung ist die Perfusion kleinster Gefäße (vor allem in voluminösen Organen) mit Bariumsulfat nicht gewährleistet. Mikrofil dagegen ist ein Kontrastmittel mit niedriger Viskosität und zudem unabhängig von der Umgebungstemperatur der perfundierten Gefäßprovinzen. Schon

in den 60er Jahren wurden die Vorteile von Mikrofil in Studien beschrieben. Cortell und Mitarbeiter (62) zeigten, dass mit Mikrofil ein fester und stabiler Ausguss von Gefäßen erreicht wird und der hydrophobe Charakter dieses Kontrastmittels die weitgehend homogene Füllung des Gefäßbaumes erlaubt. Auch Marxen und Thornton (56) haben mit verschiedenen Kontrastmitteln Untersuchungen im mikro-CT durchgeführt und die Vorzüge des Mikrofil dargestellt. Diese liegen in der einfachen Handhabung und vor allem in der langsameren Aushärtung dieses Kontrastmittels. Zudem können nachweislich Gefäße mit einem Durchmesser kleiner als 20 µm nach Mikrofilperfusion evaluiert werden.

Unsere Ergebnisse lassen sich in die bereits existierende Literatur eingliedern. Wir haben durch die quantitative Analytik in der mikro-CT und Histologie gezeigt, dass mit Mikrofil eine homogenere Perfusion der Gefäße gelingt als mit Bariumsulfat. Dies liegt vor allem an der unterschiedlichen Konsistenz der Kontrastmittel. Während Bariumsulfat sehr viskös ist, zeichnet sich Mikrofil durch seinen hydrophoben Charakter und seine geringe Viskosität aus. Bei der Gefäßpräparation mit Bariumsulfat wird durch die höhere Viskosität dieses Kontrastmittels ein großer Kraftaufwand benötigt, wodurch es leicht zu Gefäßrupturen mit nachfolgendem Austritt von Kontrastmittel in umliegendes Gewebe kommen kann. Dies kann im weiteren Verlauf der Messungen zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Ein weiterer Nachteil bei der Nutzung von Bariumsulfat liegt in der schnelleren Aushärtung dieses Kontrastmittels. Bei Abkühlung der Suspension verliert Bariumsulfat sehr schnell seine durch Erhitzen hergestellte Fließeigenschaft, und die Perfusion der Gefäße stagniert. Die Verarbeitungszeit liegt bei zehn bis maximal 15 Minuten. Diese schnelle Aushärtung führt zu erheblichen Limitationen in der Perfusion größerer Organe und ihrer vor allem kapillären Strukturen, so dass Bariumsulfat hierfür nicht mehr oder nur noch selten eingesetzt wird.

Bariumsulfathaltiges Kontrastmittel wird als Suspension in der klinischen Routinediagnostik zur Kontrastverstärkung des Intestinaltraktes eingesetzt. Die Kosten der Kontrastmittelsuspension liegen hier bei ca. 0,0053 €/ml. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz von Mikrofil auf die ex-vivo Applikation beschränkt. Die Kosten für Mikrofil liegen hier bei ca. 0,5 €/ml. Somit ist der Einsatz von Mikrofil auf den Einsatz kleiner Gefäßvolumina beschränkt. Die Kosten pro Plazentaperfusion betragen für bariumsulfathaltiges Kontrastmittel ca. 2 Euro, für Mikrofil ca. 150 Euro. Insofern

ergeben sich in der Perfusion von großen Gefäßvolumina (wie z.B. der Plazenta) beträchtliche Unterschiede in der Finanzierung.

Ein zusätzlicher Vorteil von Mikrofil besteht in den Variationsmöglichkeiten durch fünf verschiedene Viskositätsstufen. Diese Stufen ermöglichen eine individuell auf die jeweilige Gewebeart abgestimmte Einsatzmöglichkeit und verbessern dadurch die Penetration kleinster Kapillaren. Dadurch lassen sich z.B. auch geringe vaskuläre Strukturveränderungen, wie sie u.a. bei Wachstumsretardierung und Diabetes mellitus auftreten können, quantitativ erfassen. Durch die oben angeführten Vorteile des Mikrofil wird deshalb seit einigen Jahren bevorzugt dieses Kontrastmittel zur Darstellung vaskulärer Strukturen verwendet (15, 54, 55).

5 Zusammenfassung

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Technologie der Mikro-Computertomographie als neue Methode und potentielle Alternative zur Histologie in der ex-vivo Forschung etabliert. Durch technischen Fortschritt sind mikro-CT-Systeme in der Lage, hoch auflösende dreidimensionale Bilder von kleinen Proben zu generieren. Vor allem seit der Implementierung neuerer Kontrastmittel hat sich die mikro-CT zu einer wertvollen und kosteneffektiven Bereicherung in der Gefäßdarstellung entwickelt. Wir demonstrieren in unserer Studie am Beispiel des fetoplazentaren Gefäßbaumes, dass sich nach Perfusion mit Mikrofil die Gefäßarchitektur sowohl in der mikro-CT als auch in der Histologie wesentlich genauer darstellen lässt als nach Injektion von Bariumsulfat.

Zehn normale termingerechte durch Sectiones gewonnene Plazenten wurden mit Kontrastmittel perfundiert. Fünf wurden nach Erhalt mit Mikrofil, einem Silikon und Blei enthaltenen Kontrastmittel, perfundiert, die anderen fünf mit einem Gemisch aus Bariumsulfat, Thymol und Gelatine. Proben aus acht unterschiedlichen Regionen jeder Plazenta wurden im Anschluss im mikro-CT gescannt und mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen zu dreidimensionalen Bildern verarbeitet, die eine stereoskopische Visualisierung und kontinuierliche quantitative Analyse der Gefäßstrukturen ermöglichen. Die Proben der zwei unterschiedlichen Kontrastmittelgruppen wurden hinsichtlich ihres relativen Gefäßanteiles am Gesamtvolumen (VVF in %) verglichen. Quantitative Berechnungen ergaben einen durchschnittlichen Gefäßanteil von $15,94 \pm 0,39$ % für die Bariumsulfatproben und von $30,35 \pm 8,48$ % für die mit Mikrofil perfundierten Plazentaprobe. Im Anschluss an die Auswertungen im mikro-CT wurden von den unterschiedlich perfundierten Plazentaprobe randomisiert jeweils 30 histologische Schnitte angefertigt, um mikroskopisch den Füllungsgrad der Gefäße zu beurteilen. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine signifikant stärkere Gefäßperfusion für Mikrofil ($90,5 \pm 3,37$ %) als für Bariumsulfat ($26,8 \pm 9,7$ %).

Für das Verständnis der Mikroarchitektur des Gefäßbaumes ist es von entscheidender Bedeutung, eine möglichst genaue Darstellung kleinster Strukturen zu erlangen, um auch pathologische Veränderungen, wie sie z.B. bei Diabetes mellitus und Wachstumsretardierungen auftreten können, zu erkennen. Wie wir in unserer Studie demonstrieren konnten, ergibt die Gefäßperfusion mit Mikrofil eine homogene und

lückenlose Füllung der Gefäße, so dass Gefäßkontinuität und Gefäßstruktur mikrocomputertomographisch dargestellt werden können. Die Vorteile gegenüber anderen herkömmlichen Kontrastmitteln wie dem Bariumsulfat liegen in der genaueren Untersuchung der Mikrozirkulation und dem dadurch vereinfachten Vergleich zwischen normalen und pathologischen Strukturen. So können zu den schon existierenden Ergebnissen vaskulärer Parameter weitere diagnostisch wertvolle Informationen über Physiologie und Pathophysiologie selbst kleinster vaskulärer Veränderungen geliefert werden.

6 Summary

In the past decade, micro-CT has become a new method and potential alternative to histological investigations in ex-vivo analysis. Due to technical advances in computer speed and memory, micro-CT systems are enabled to generate high-resolution three-dimensional images of small specimen. Especially since the implementation of new contrast agents, micro-CT has developed into a precious and cost-effective adjunct for vascular imaging. In the present study we demonstrate a much better imaging of the fetoplacental villous tree in micro-CT and conventional histology after infusion of Microfil than after perfusion of barium-sulfate.

Term placentae (n=10) were perfused with contrast-agent shortly after Caesarean-section-delivery. Five were filled with Microfil, a silicone and lead chromate containing contrast agent, the other five with a contrast agent consisting of barium-sulfate, gelatine and thymol. Samples of eight different regions of each placenta were subsequently scanned in the micro-CT. Using tomographic reconstruction algorithms, three-dimensional images were obtained by micro-CT allowing total stereoscopic visualization and continuous quantitative analysis of the vascular structure of the investigated samples. The samples of the two different contrast agent groups were compared regarding their vascular volume fraction (VVF, %). Quantitative assessment showed an average vascular volume fraction of $15,94 \pm 0,39$ % for the barium-sulfate samples and of $30,35 \pm 8,48$ % for the samples perfused with Microfil. After micro-CT analysing, 30 histological sections of the two different perfused placentae groups were made to consider microscopically the filling degree of the vasculature. A significant higher perfusion for Microfil ($90,5 \pm 3,35\%$) than for barium-sulfate ($26,8 \pm 9,7$ %) was shown as well.

For the understanding of the microvasculature of the fetoplacental villous tree it is of high importance to achieve a very detailed imaging of the fine-structure to assess pathological changes as they are seen for example in diabetes mellitus or intrauterine growth restriction (IUGR) pregnancies. As shown in our study, the perfusion with Microfil dye results in a quantitative and qualitative better filling of the vessels with only minimal shrinkage, so that continuity and structure of the vessels could be precisely demonstrated by micro-CT. The advantages compared to other accepted contrast agents like barium-sulfate result in the more exacting analysis of the microvasculature und the easier comparison of physiological and pathological structures. Thereby, in

addition to the existing results of vasculature parameter, more detailed information about the physiology and pathophysiology of even finest vasculature changes can be gained.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Kingdom,J., Huppertz,B., Seaward,G. and Kaufmann,P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth, *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol*, 92: 35-43, 2000.
- 2 Boyd,J.D. and Hamilton,W.J. *The Human Placenta*, Cambridge, 1970.
- 3 Stegner,H.-E. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Stuttgart: Enke, 1996.
- 4 Künzel,W., Stoz,F. und Schuhmann,R. *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe*, Band 4, München, Jena. Urban und Fischer. 2000.
- 5 Becker,V., Schiebler,T and Kubli,F (Hrsg.) *Die Plazenta des Menschen*, Thieme: Stuttgart - New York. 1981.
- 6 Donath,E.M., Schuhmann,R.A. and Stoz,F. [Functional morphometry of the villous surface of the mature human placenta], *Z.Geburtshilfe Perinatol.*, 188: 213-217, 1984.
- 7 Kaufmann,P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta, *Contrib.Gynecol.Obstet.*, 13: 5-17, 1985.
- 8 Wehrli,F.W., Hwang,S.N. and Song,H.K. New architectural parameters derived from micro-MRI for the prediction of trabecular bone strength, *Technol Health Care*, 6: 307-320, 1998.
- 9 Benveniste,H. and Blackband,S. MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research, *Prog Neurobiol*, 67: 393-420, 2002.
- 10 Nadkarni,S.K., Austin,H., Mills,G., Boughner,D. and Fenster,A. A pulsating coronary vessel phantom for two- and three-dimensional intravascular ultrasound studies, *Ultrasound Med Biol*, 29: 621-628, 2003.

- 11 Lupotti,F.A., Mastik,F., Carlier,S.G., de Korte,C.L., van der Giessen,W.J., Serruys,P.W. and van der Steen,A.F. Quantitative IVUS blood flow: validation in vitro, in animals and in patients, *Ultrasound Med Biol*, 29: 507-515, 2003.
- 12 von,Birgelen C. Quantitative assessment of mild-to-moderate coronary atherosclerosis by computerized border detection in 3D IVUS, *Int.J.Cardiovasc.Imaging*, 19: 105-106, 2003.
- 13 Achenbach,S., Giesler,T., Ropers,D., Ulzheimer,S., Anders,K., Wenkel,E., Pohle,K., Kachelriess,M., Derlien,H., Kalender,W.A., Daniel,W.G., Bautz,W. and Baum,U. Comparison of image quality in contrast-enhanced coronary-artery visualization by electron beam tomography and retrospectively electrocardiogram-gated multislice spiral computed tomography, *Invest Radiol.*, 38: 119-128, 2003.
- 14 Giesler,T., Baum,U., Ropers,D., Ulzheimer,S., Wenkel,E., Mennicke,M., Bautz,W., Kalender,W.A., Daniel,W.G. and Achenbach,S. Noninvasive visualization of coronary arteries using contrast-enhanced multidetector CT: influence of heart rate on image quality and stenosis detection, *AJR Am.J.Roentgenol.*, 179: 911-916, 2002.
- 15 Langheinrich,A.C., Leithauser,B., Greschus,S., Von,G.S., Breithecker,A., Matthias,F.R., Rau,W.S. and Bohle,R.M. Acute rat lung injury: feasibility of assessment with Mikro-CT, *Radiology*, 233: 165-171, 2004.
- 16 Goyen,M., Herborn,C.U., Kroger,K., Lauenstein,T.C., Debatin,J.F. and Ruehm,S.G. Detection of atherosclerosis: systemic imaging for systemic disease with whole-body three-dimensional MR angiography--initial experience, *Radiology*, 227: 277-282, 2003.
- 17 Achenbach,S. [Clinical Use of Multi-Slice CT Coronary Angiography], *Herz*, 28: 119-125, 2003.
- 18 Baur,R. Morphometry of the placental exchange area, *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol*, 53: 3-65, 1977.

- 19 Sala,M.A., Matheus,M. and Valeri,V. Estimation of the average diameter of human placental villi by a stereologic method, *Microsc.Acta*, 82: 339-342, 1980.
- 20 Kaufmann,P., Bruns,U., Leiser,R., Luckhardt,M. and Winterhager,E. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi, *Anat.Embryol.(Berl)*, 173: 203-214, 1985.
- 21 Leiser,R., Luckhardt,M., Kaufmann,P., Winterhager,E. and Bruns,U. The fetal vascularisation of term human placental villi. I. Peripheral stem villi, *Anat.Embryol.(Berl)*, 173: 71-80, 1985.
- 22 Jackson,M.R., Walsh,A.J., Morrow,R.J., Mullen,J.B., Lye,S.J. and Ritchie,J.W. Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms, *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 172: 518-525, 1995.
- 23 Burton,G.J., Reshetnikova,O.S., Milovanov,A.P. and Teleshova,O.V. Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress, *Placenta*, 17: 49-55, 1996.
- 24 Krebs,C., Macara,L.M., Leiser,R., Bowman,A.W., Greer,I.A. and Kingdom,J.C. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree, *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 175: 1534-1542, 1996.
- 25 Benirschke,K and Kaufmann,P. Pathology of the human placenta. 4th edition, New York: Springer-Verlag, 2000.
- 26 Mayhew,T.M. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells, *Placenta*, 23: 742-750, 2002.
- 27 Mayhew,T.M., Ohadike,C., Baker,P.N., Crocker,I.P., Mitchell,C. and Ong,S.S. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by

- pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction, *Placenta*, 24: 219-226, 2003.
- 28 Badger,A.M., Blake,S., Kapadia,R., Sarkar,S., Levin,J., Swift,B.A., Hoffman,S.J., Stroup,G.B., Miller,W.H., Gowen,M. and Lark,M.W. Disease-modifying activity of SB 273005, an orally active, nonpeptide alphavbeta3 (vitronectin receptor) antagonist, in rat adjuvant-induced arthritis, *Arthritis Rheum.*, 44: 128-137, 2001.
- 29 Dedrick,D.K., Goldstein,S.A., Brandt,K.D., O'Connor,B.L., Goulet,R.W. and Albrecht,M. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months, *Arthritis Rheum.*, 36: 1460-1467, 1993.
- 30 Kapadia,R.D., Stroup,G.B., Badger,A.M., Koller,B., Levin,J.M., Coatney,R.W., Dodds,R.A., Liang,X., Lark,M.W. and Gowen,M. Applications of Mikro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis, *Technol Health Care*, 6: 361-372, 1998.
- 31 Genant,H.K., Gordon,C., Jiang,Y., Lang,T.F., Link,T.M. and Majumdar,S. Advanced imaging of bone macro and micro structure, *Bone*, 25: 149-152, 1999.
- 32 Borah,B., Gross,G.J., Dufresne,T.E., Smith,T.S., Cockman,M.D., Chmielewski,P.A., Lundy,M.W., Hartke,J.R. and Sod,E.W. Three-dimensional microimaging (MRmicrol and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis, *Anat.Rec.*, 265: 101-110, 2001.
- 33 Gross,G.J., Dufresne,T.E., Smith,T., Cockman,M.D., Chmielewski,P.A., Combs,K.S. and Borah,B. Bone architecture and image synthesis, *Morphologie.*, 83: 21-24, 1999.
- 34 Kurth,A.A. and Muller,R. The effect of an osteolytic tumor on the three-dimensional trabecular bone morphology in an animal model, *Skeletal Radiol.*, 30: 94-98, 2001.

- 35 Graichen,H., Lochmuller,E.M., Wolf,E., Langkabel,B., Stammberger,T., Haubner,M., Renner-Muller,I., Englmeier,K.H. and Eckstein,F. A non-destructive technique for 3-D microstructural phenotypic characterisation of bones in genetically altered mice: preliminary data in growth hormone transgenic animals and normal controls, *Anat.Embryol.(Berl)*, 199: 239-248, 1999.
- 36 Montero,A., Okada,Y., Tomita,M., Ito,M., Tsurukami,H., Nakamura,T., Doetschman,T., Coffin,J.D. and Hurley,M.M. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation, *J.Clin.Invest*, 105: 1085-1093, 2000.
- 37 Cindik,E.D., Maurer,M., Hannan,M.K., Muller,R., Hayes,W.C., Hovy,L. and Kurth,A.A. Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing, *Technol Health Care*, 8: 267-275, 2000.
- 38 Easterly,M.E., Foltz,C.J. and Paulus,M.J. Body condition scoring: comparing newly trained scorers and micro-computed tomography imaging, *Lab Anim (NY)*, 30: 46-49, 2001.
- 39 Jorgensen,S.M., Demirkaya,O. and Ritman,E.L. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray Mikro-CT, *Am.J.Physiol*, 275: H1103-H1114, 1998.
- 40 Bentley,M.D., Ortiz,M.C., Ritman,E.L. and Romero,J.C. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents, *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 282: R1267-R1279, 2002.
- 41 Johnson,R.H., Hu,H., Haworth,S.T., Cho,P.S., Dawson,C.A. and Linehan,J.H. Feldkamp and circle-and-line cone-beam reconstruction for 3D Mikro-CT of vascular networks, *Phys.Med Biol*, 43: 929-940, 1998.

- 42 Wan,S.Y., Ritman,E.L. and Higgins,W.E. Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D Mikro-CT images, *Comput.Biol Med*, 32: 55-71, 2002.
- 43 Lerman,A. and Ritman,E.L. Evaluation of microvascular anatomy by Mikro-CT, *Herz*, 24: 531-533, 1999.
- 44 Garcia-Sanz,A., Rodriguez-Barbero,A., Bentley,M.D., Ritman,E.L. and Romero,J.C. Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats, *Hypertension*, 31: 440-444, 1998.
- 45 Ortiz,M.C., Garcia-Sanz,A., Bentley,M.D., Fortepiani,L.A., Garcia-Estan,J., Ritman,E.L., Romero,J.C. and Juncos,L.A. Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation, *Kidney Int.*, 58: 1632-1640, 2000.
- 46 Kwon,H.M., Sangiorgi,G., Ritman,E.L., McKenna,C., Holmes,D.R., Jr., Schwartz,R.S. and Lerman,A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia, *J.Clin.Invest*, 101: 1551-1556, 1998.
- 47 Wan,S.Y., Kiraly,A.P., Ritman,E.L. and Higgins,W.E. Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D Mikro-CT images, *IEEE Trans.Med Imaging*, 19: 964-971, 2000.
- 48 Rodriguez-Porcel,M., Lerman,A., Ritman,E.L., Wilson,S.H., Best,P.J. and Lerman,L.O. Altered myocardial microvascular 3D architecture in experimental hypercholesterolemia, *Circulation*, 102: 2028-2030, 2000.
- 49 Karau,K.L., Molthen,R.C., Dhyani,A., Haworth,S.T., Hanger,C.C., Roerig,D.L., Johnson,R.H. and Dawson,C.A. Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography, *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 281: H2747-H2756, 2001.

- 50 Ritman,E.L. Micro-computed tomography of the lungs and pulmonary-vascular system, *Proc.Am.Thorac.Soc.*, 2: 477-80, 501, 2005.
- 51 Langheinrich,A.C., Wienhard,J., Vormann,S., Hau,B., Bohle,R.M. and Zygmunt,M. Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography, *Placenta*, 25: 95-100, 2004.
- 52 Muller,R., Van,C.H., Van,D.B., Van Der,P.G., Dequeker,J., Hildebrand,T. and Ruegsegger,P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography, *Bone*, 23: 59-66, 1998.
- 53 Quinodoz,P., Quinodoz,M., Nussbaum,J.L., Montandon,D. and Pittet,B. Barium sulphate and soft-tissue radiology: allying the old and the new for the investigation of animal cutaneous microcirculation, *Br.J.Plast.Surg.*, 55: 664-667, 2002.
- 54 Langheinrich,A.C., Bohle,R.M., Breithecker,A., Lommel,D. and Rau,W.S. [Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli], *Rofo*, 176: 1219-1225, 2004.
- 55 Maehara,N. Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangioarchitecture of tumors, *Eur.Radiol.*, 13: 1559-1565, 2003.
- 56 Marxen,M., Thornton,M.M., Chiarot,C.B., Klement,G., Koprivnikar,J., Sled,J.G. and Henkelman,R.M. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging, *Med Phys.*, 31: 305-313, 2004.
- 57 Kantor,B., Kwon,H.M., Ritman,E.L., Holmes,D.R. and Schwartz,R.S. Images in Cardiology Imaging the coronary microcirculation: 3D Mikro-CT of coronary vasa vasorum, *Int.J.Cardiovasc.Intervent.*, 2: 79, 1999.
- 58 Wilson,S.H., Herrmann,J., Lerman,L.O., Holmes,D.R., Jr., Napoli,C., Ritman,E.L. and Lerman,A. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa

- vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering, *Circulation*, 105: 415-418, 2002.
- 59 Beighley,P.E., Thomas,P.J., Jorgensen,S.M. and Ritman,E.L. 3D architecture of myocardial microcirculation in intact rat heart: a study with Mikro-CT, *Adv.Exp.Med Biol*, 430: 165-175, 1997.
- 60 Garcia-Sanz,A., Rodriguez-Barbero,A., Bentley,M.D., Ritman,E.L. and Romero,J.C. Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats, *Hypertension*, 31: 440-444, 1998.
- 61 Simopoulos,D.N., Gibbons,S.J., Malysz,J., Szurszewski,J.H., Farrugia,G., Ritman,E.L., Moreland,R.B. and Nehra,A. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation, *J.Urol.*, 165: 1776-1782, 2001.
- 62 Cortell,S. Silicone rubber for renal tubular injection, *J.Appl.Physiol*, 26: 158-159, 1969.
- 63 Engelke,K., Karolczak,M., Lutz,A., Seibert,U., Schaller,S. and Kalender,W. [Mikro-CT. Technology and application for assessing bone structure], *Radiologe*, 39: 203-212, 1999.
- 64 Bonse,U. and Busch,F. X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). *Prog Biophys Mol Biol* 65, 133-169, 1996.
- 65 Kaufmann,P. Influence of ischemia and artificial perfusion on placental ultrastructure and morphometry. In: Schneider H, Dancis J, editors. *Contr Gynec Obstet*. Basel: Karger; p. 18-26, 1985.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. A. C. Langheinrich für die intensive Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für seine wertvollen Anregungen und Diskussionsbeiträge.

Herrn Prof. Dr. M. Zygmunt danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die fachkundige Betreuung.

Bei Frau Dr. J. Wienhard möchte ich mich für Ihre Einarbeitung und intensive Betreuung während der gesamten Zeit der Probensammlung und Datenerhebung bedanken.

Frau G. Martels aus dem Zentrum für Diagnostische Radiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für die zuverlässige und schnelle Bearbeitung der Proben am Mikro-Computertomographen sowie für ihre hilfreichen Ideen bei der Auswertung.

Den Mitarbeitern der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe und des Zentrums für Diagnostische Radiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für Ihre freundliche und hilfsbereite Unterstützung während der Probengewinnung und -bearbeitung.

Meinen Freunden und besonders meinem Bruder danke ich für ihre Motivation, konstruktive Kritik und Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein unendlicher Dank gilt meinen Eltern für Ihre großartige Unterstützung während der gesamten Studienzeit sowie bei der Erstellung dieser Arbeit. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 01.11.1977

Geburtsort: Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Weiterbildung

02/2007 - 09/2008 Assistenzärztin am Laborzentrum Bremen, Prof. Dr. M. Klouche, Prof. Dr. G. Rothe
Ausbildung zur Fachärztin für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Seit Oktober 2008 Assistenzärztin am Diako Ev. Diakonie-Krankenhaus GmbH, Prof. Dr. M. Katschinski, Prof. Dr. Pflüger
Ausbildung zur Fachärztin für Innere Medizin

Universitäre Ausbildung

10/1999 - 05/2006 Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen

05/2006 3. Staatsexamen, Note: 1,0

03/2005 2. Staatsexamen, Note: 1,66

10/2003 - 04/2004 Erasmus-Semester in Paris, Université Pierre et Marie Curie; Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière

08/2002 1. Staatsexamen, Note: 3,0

09/2001 Physikum, Note: 2,66

Schule und sonstige Ausbildung

02-09/1999 8-monatige MTA-Ausbildung am Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Hamburg

1998-1999 Freiwilliges Soziales Jahr bei der Arbeiter-Wohlfahrt in Lüneburg

1997-1998 Sprach- und Arbeitsaufenthalt in Brisbane, Australien

1990-1997 Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule in Lüneburg; Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Praktisches Jahr

02-03/2006 Zentrum für **Kinderheilkunde**, Prof. Dr. med. J. Kreuder
Universitätsklinikum Gießen

12/2005-01/2006 **Pädiatrie**, Wexford General Hospital, Dr. Sheehan
University of Dublin, Irland

08-11/2005 **Chirurgie**, St. George's General Hospital, Dr. Yearwood
St. George's School of Medicine, Grenada, West Indies

04-08/2005 Zentrum für **Innere Medizin**, Abt. f. Kardiologie/Angiologie
Prof. Dr. H. Tillmanns und Med. Klinik und Poliklinik, Prof. Dr.
R. G. Bretzel, Universitätsklinikum Gießen

Sonstige Tätigkeiten

05/2002-02/2005 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** im **Schlaflabor** des
Universitätsklinikums Gießen

10/2001-09/2004 **Tutorin** am **biochemischen Institut** der Justus-Liebig-
Universität Gießen

10 Publikationen

1. Originalarbeiten

1. Langheinrich AC, Vorman S, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M. Quantitative 3D Mikro-CT Imaging of the Human Feto-placental Vasculature in Intrauterine Growth Restriction. *Placenta*. 2008;29(11):937-41.

2. Abstracts

1. Langheinrich AC, Vorman S, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M. Quantitative 3D Mikro-CT Imaging of the Human Feto-placental Vasculature in Intrauterine Growth Restriction and Diabetes Mellitus. *Fortschr Röntgenstr* 2008; 180. DOI: 10.1055/s-2008-1073936

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Julia Seidenstücker