

**Evaluation eines Computerprogramms zur Bestimmung unterschiedlicher  
Lungenparameter anhand von Volumen- Computer- Tomographischen  
Datensätzen aus in vivo- Mausuntersuchungen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von Melanie Dietz

aus Essen

Gießen, 2013

Aus dem Institut für Neuroradiologie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Leitung: Prof. Dr. Elke R. Gizewski

Gutachter: Prof. Dr. E. R. Gizewski

Gutachter: PD Dr. S. Herold

Tag der Disputation: 05.05.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Die Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie (flat- panel Volumen- Computer- Tomography, fpVCT)	- 1 -
1.2 Lungensegmentierung	- 2 -
1.3 Lungenvolumetrie	- 4 -
1.4 Hounsfield- Einheit- Maxima und -Histogramme	- 4 -
1.5 Lungendensitometrie	- 4 -
1.6 Wirkung und humanmedizinische Bedeutung des Methacholins	- 5 -
1.7 Zielsetzung der Arbeit	- 6 -
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>- 7 -</b>
2.1 Versuchstiere und ihre Verwendung in der Lungenuntersuchung	- 7 -
2.2 Technische Grundlagen der Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie (fpVCT), Akquirieren der radiologischen Daten	- 10 -
2.3 Bildrekonstruktion	- 11 -
2.4 Verarbeitung der Bilder	- 11 -
2.5 Erstellen von Dateien zur automatischen Bestimmung der Lungenparameter 	- 12 -
2.6 Erstellung und Verwendung des Computerprogramms: Volumetrie, Hounsfield- Einheit- Maxima- Bestimmung und Densitometrie	- 15 -
2.6.1 Lungenvolumetrie	- 20 -
2.6.2 Hounsfield- Einheit- Maxima- Berechnung	- 21 -
2.6.3 Lungendensitometrie	- 23 -
2.7 Statistische Auswertung	- 24 -
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>- 25 -</b>
3.1 Überblick	- 25 -
3.2 Darstellung der experimentellen Messergebnisse	- 25 -
3.2.1 Absolute Lungenvolumina	- 25 -
3.2.2 Relative Lungenvolumina	- 26 -

3.2.3 Absolute Hounsfield- Einheit- Maxima.....	- 27 -
3.2.4 Relative Hounsfield- Einheit- Maxima.....	- 29 -
3.2.5 Absolute Lungendichten .....	- 30 -
3.2.6 Relative Lungendichten .....	- 31 -
3.3 Ergebnisse der statistischen Analyse .....	- 32 -
3.3.1 B6 .....	- 33 -
3.3.2 B6 M .....	- 34 -
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>- 36 -</b>
4.1 Einleitung .....	- 36 -
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	- 36 -
4.2.1 Programmevaluation.....	- 37 -
4.2.2 Abhängigkeit von der Zeit .....	- 37 -
4.2.3 Absolute Lungenvolumina .....	- 39 -
4.2.4 Relative Lungenvolumina.....	- 39 -
4.2.5 Absolute HE- Maxima .....	- 40 -
4.2.6 Relative HE- Maxima .....	- 40 -
4.2.7 Absolute Lungendichten .....	- 40 -
4.2.8 Relative Lungendichten .....	- 41 -
4.3 Fehlerdiskussion .....	- 41 -
4.3.1 Ermitteln des Tracheapunkts .....	- 41 -
4.3.2 Messgenauigkeit.....	- 42 -
4.3.3 Versuchsprotokoll .....	- 44 -
4.3.4 Pharmakodynamik und -Kinetik des Methacholins .....	- 44 -
4.4 Ausblick .....	- 45 -
4.4.1 Weiterentwicklung des Computerprogramms.....	- 46 -
4.4.2 Messgenauigkeit und Gütekriterien.....	- 46 -
4.4.3 Versuchsprotokoll .....	- 47 -
4.4.4 Versuchsaufbau .....	- 47 -
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>6. Abstract.....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>- 53 -</b>

<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>- 56 -</b>
<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>11. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>- 65 -</b>

## 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist methodischer Art und bezweckt die Evaluation eines Computerprogramms, mithilfe dessen eine halbautomatische Analyse von radiologischen Bilddatensätzen erfolgte. Dabei handelt es sich um eine in vivo-Bildgebung von murinen Lungen, welche anhand einer Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie, teils unter dem Einfluss von Methacholin, durchgeführt wurde. Auf diese Weise können die innerhalb dieser Lungenuntersuchung gewonnenen Lungenbilddaten quantitativ, volumetrisch und densitometrisch charakterisiert werden. Die Notwendigkeit, ein Computerprogramm zu erstellen, hat sich im Rahmen einer Studie aus einem Kooperationsprojekt zwischen dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus- Liebig- Universität Gießen, Deutschland, Leitung Herr Prof. Dr. Kummer, und der Abteilung für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, Deutschland, Leitung Frau Prof. Dr. Gizewski, ergeben. Im Rahmen ihrer lungenphysiologischen Forschungsthemen nutzten Herr Prof. Dr. Kummer und seine Mitarbeiter in Mausmodellen die Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie- Methode, welche in der Abteilung für Neuroradiologie bereitgestellt wurde. Das Computerprogramm wurde ebenfalls in der Abteilung für Neuroradiologie erstellt und angewandt.

Im Folgenden werden die Bereiche *Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie, Lungensegmentierung, Lungenvolumetrie, Hounsfield Einheit (HE)- Maxima und Histogramme, Lungendensitometrie* sowie einige *Eigenschaften der Substanz Methacholin* und schließlich die *Zielsetzung dieser Arbeit* thematisiert.

### **1.1 Die Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie (flat-panel Volumen- Computer- Tomography, fpVCT)**

Durch die Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie (Englisch: flat- panel Volumen- CT, kurz „fpVCT“) wurde Bildmaterial gewonnen, welches in dieser Arbeit analysiert wurde.

Die fpVCT (Gupta et al. 2011) ist eine Methode zur nichtinvasiven, dreidimensionalen Bildgebung von Kleintieren. In der Literatur werden als weitere Methoden die

Mehrschicht- Computer- Tomographie (im Englischen: „multi- slice Computed Tomography“, kurz „MSCT“, Liu et al. 2012) und die Mikro- Computer- Tomographie ( $\mu$ CT) beschrieben (Pandit et al. 2013). Die fpVCT stellt den ersten Tomographen dar, welcher einen Flachdetektor zur Strahlendetektion (Schulte- Geers 2011) nutzen kann. Die Methodologie erlaubt eine schnelle Datenakquisition mit hoher Bildqualität (Kiessling et al. 2005). Mit dieser Technologie wird eine sehr schonende und schnelle in vivo- Bildgebung ermöglicht (Obert et al. 2005; Savai et al. 2005). Die fpVCT ist der MSCT überlegen (Greschus et al. 2007), denn sie verfügt über eine 15- fach höhere räumliche Auflösung, so dass auch die adulte Maus mit ihrem geringen Körpervolumen untersucht werden kann (Obert et al. 2005). Die hohe Bildqualität bei Thoraxuntersuchungen (Greschus et al. 2005) ermöglichte eine Verlaufsbeobachtung lungentransplanterter Ratten (Greschus et al. 2009; Hirschburger et al. 2009). Kiessling und Mitarbeiter (Kiessling et al. 2005) stellten anhand der fpVCT die Tumorangiotenese im Mausmodell dar. Sie zeigten, dass die fpVCT ein enormes Potential durch ihre extrem hohe Auflösung im Vergleich zur klinischen 1,5 Tesla- MRT hat. Die  $\mu$ CT kann auch kleinere Gefäßdurchmesser visualisieren, eignet sich aber aufgrund der langen Untersuchungszeiten und der hohen Strahlendosis nicht für wiederholte Messungen in vivo, so dass die fpVCT durch kurze Akquisitionszeiten die Vorteile von klinischer CT und der  $\mu$ CT verbindet (Kiessling et al. 2005). Zudem bieten die akquirierten fpVCT- Bilder die Möglichkeit einer besseren anatomischen Orientierung durch Erfassen des ganzen (Maus)Körpers und durch manuelles Variieren des Abbildungsfensters, so dass Weichteile oder Skelett und Gefäße selektiv visualisiert werden können (Kiessling et al. 2005). Die hochauflösende fpVCT schließt somit eine Lücke zwischen den beiden Technologien MSCT und  $\mu$ CT (Obert et al. 2005).

## **1.2 Lungensegmentierung**

Dieser Abschnitt thematisiert die Arbeitsprozesse der CT- basierten Lungensegmentierung.

Der erste Schritt bei der Lungenanalyse in CT- Bildern ist die Identifikation der Lunge durch Segmentierung, welche manuell, computerassistent oder vollautomatisiert durchgeführt werden kann (Ukil & Reinhardt 2005). Die Lungensegmentierung im Rahmen der CT- Diagnostik ist seit Längerem ein gängiges Verfahren der Aufbereitung

der CT- Rohdatensätze zur Identifikation der Lungengrenzen innerhalb der Bilder. Sie basiert i.d.R. auf Schwellenwertbildung: Datenpunkte mit Grauwerten, d.h. Hounsfield-Dichtewerten bzw. Hounsfield- Einheiten (HE) werden bis zu einem bestimmten Schwellenwert,  $HE_{\text{Schwelle}}$ , dargestellt. Datenpunkte überschwelliger HE werden hingegen eliminiert. So lässt sich beispielsweise das Lungenparenchym mit seinen weit negativen Hounsfield- Werten ( $HE < 0$ ) separat darstellen, während das umliegende Weichteil- und Knochengewebe mit wesentlich höheren Hounsfield- Werten ( $HE > 0$ ) nicht mehr zur Darstellung kommt, was z.B. Goris und Mitarbeiter beschreiben (Goris et al. 2006). Dies bedeutet, dass Gewebe wie Herz oder Knochen, welches irrelevant für die Determinierung von durchschnittlichen Lungenwerten und für die Erstellung 3D- Volumen- Karten der Lunge ist, entfernt wird (Jobse et al. 2009). Guerrero und Mitarbeiter verwendeten im Segmentierungsalgorithmus einen Trennwert von -900 HE zum Abgrenzen des Lungenparenchyms in fpVCT- Bildern, so dass die Lunge segmentiert und das Lungenvolumen bestimmt werden konnte (Guerrero et al. 2006). Ukil und Mitarbeiter (Ukil & Reinhardt 2005) erarbeiteten in diesem Kontext ein Schema, um die aufgrund der unregelmäßigen Indentationen u.a. von Lungengefäßen (Hu et al. 2001) schwerer darzustellende, mediastinalseitige Lungenkontur bei der Segmentierung zu glätten.

Eine Segmentierungsvorschrift ist der Literatur zu entnehmen (Armato & Sensakovic 2004): Armato und Sensakovic haben die automatische Lungensegmentierung erfolgreich zur Detektion von pulmonalen Noduli und computerassistierter Messung von Mesotheliomen verwendet. Chaturvedi und Lee führten eine Segmentierung und Skelettierung der Atemwege von kleinen Labortieren in CT- Bildern anhand von entsprechenden Algorithmen in der *Interaktiven Daten- Programmiersprache* (Im Englischen: „Interactive Data Language“, abgekürzt „IDL“) durch (Chaturvedi & Lee 2005). Auf diesem Wege konnten sie das weit verzweigte Netzwerk der intrathorakalen Atemwege darstellen. Auch in dieser Arbeit wurde eine Lungensegmentierung, hauptsächlich basierend auf Schwellenwertbildung, mit einem IDL- Programms durchgeführt.



### **1.3 Lungenvolumetrie**

In dieser Arbeit wurde eine Lungenvolumetrie anhand von fpVCT- Bildern durchgeführt.

Die quantitative Analyse der intrathorakalen Atemwege ist entscheidend bei der objektiven Beurteilung von Struktur und Funktion des Bronchialbaums (Chaturvedi & Lee 2005). Diese Beurteilung ist u.a. im Rahmen von Prävention, Diagnose und Therapie pulmonaler Erkrankungen von Bedeutung. Physiologische Messungen und Untersuchungen, welche die Mitarbeit des Patienten erfordern, beispielsweise die humandiagnostisch relevante Körper- Plethysmographie, sind von großer humanmedizinisch- klinischer Bedeutung, da auf diese Weise die Lungenfunktion inkl. Lungenvolumen ermittelt werden kann. Letzteres lässt sich radiologisch im Rahmen der fpVCT- Lungenvolumetrie ermitteln.

### **1.4 Hounsfield- Einheit- Maxima und -Histogramme**

Im Rahmen von CT- basierten Untersuchungen lassen sich die Hounsfield- Einheiten, welche zu nach unterschiedlichen Kriterien selektierten (3D-) Bilddatenpunkten gehören, graphisch als Histogramm darstellen. Durch diese Form des Diagramms werden die Häufigkeitsverteilungen der betrachteten Hounsfield- Einheiten deutlich. Erstmals angewendet wurde diese Darstellungsweise von Müller und Mitarbeitern (Müller et al. 1988). In der hier vorliegenden Arbeit sind dabei die Histogramme von segmentierten Mäuslungen relevant.

### **1.5 Lungendensitometrie**

Der folgende Abschnitt beleuchtet die Hintergründe der CT- gestützten Dichtemessung u.a. anhand eines Beispiels aus der Lungenemphysemforschung.

Das Lungengewebe weist in unterschiedlich belüftetem Zustand eine unterschiedliche Dichte, somit eine unterschiedliche Masse an Gewebe pro Volumeneinheit auf. Vergleichbar ist dies aufgrund der wabigen Konsistenz des Lungengewebes mit einem Schwamm im komprimierten und im expandierten Zustand. Letzterer weist eine geringere Dichte auf und verhält sich analog zu Lungengewebe im emphysematösen,

d.h. überblähten Zustand. Lungenemphyseme stellen eine häufige Affektion der Lunge im Rahmen unterschiedlicher, vor allem internistischer Krankheitsbilder dar und werden am sichersten radiologisch mittels hochauflösender CT diagnostiziert (Herold et al. 2009). Die Präzisierung der CT- Diagnostik z.B. anhand von Lungendensitometrie ist somit von humanmedizinischer Relevanz. Müller und Mitarbeiter führten CT- basierte Untersuchungen an Lungenresektaten durch, um Emphysemareale anhand ihrer radiologischen Dichte zu determinieren (Müller et al. 1988). Es wurde dafür ein CT- Programm namens „Density Mask“ (auf Deutsch „Dichtemaske“) verwendet, welches 3D- Bilddatenpunkte mit HE unterhalb eines bestimmten Schwellenwerts markierte. So ließen sich Areale unnormal niedriger Strahlenabsorption, Arealen mit unnormal niedrigen HE entsprechend, abgrenzen und die Ausbreitung eines Emphysems ermitteln (Müller et al. 1988).

In dieser Lungenuntersuchung wurden Daten erhoben, anhand derer sich die radiologische Lungendichte analog zur o.g. Definition berechnen ließ: die Lungendichte entspricht dem Quotienten aus *Hounsfield- Masse* pro Lungen- Volumeneinheit. Als *Hounsfield- Masse* gilt die Summe aller HE der segmentierten Lunge auf Voxel Ebene.

## **1.6 Wirkung und humanmedizinische Bedeutung des Methacholins**

Das in dieser Lungenuntersuchung verwendete Methacholin (M) ist ein Azetylcholinderivat und hat mittels Parasympathikomimese Einfluss auf die Lunge, u.a. in Form einer Bronchokonstriktion (Schwabe & Paffrath 2001). Diese Methacholinwirkung ist aus der Pulmonologie und Allergologie bekannt und kann dort beispielsweise im Rahmen eines Methacholin- Provokationstests zur Diagnose eines hyperreagiblen Bronchialsystems genutzt werden (Muñoz- López 2013). Nach der Inhalation von Methacholin kommt es zu einer Erhöhung des Atemwegswiderstands und somit zugleich zu einer Abnahme des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde. Im positiven Falle eines hyperreagiblen Bronchialsystems nimmt dieses Volumen um  $\geq 20\%$  ab, während sich der Atemwegswiderstand sogar verdoppelt (Herold et al. 2009). Die hier geschilderte Eigenschaft des Methacholins wird in dieser Arbeit zur Provokation des Bronchialsystems bei einem auf Methacholin reagierenden Mausstamm genutzt und experimentell angewendet.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde das für diese Studie entwickelte Computerprogramm zur Bestimmung von Lungenparametern in fpVCT- Datensätzen evaluiert. Es wurden das *Lungenvolumen*, die radiologische *Lungendichte* und entsprechende *HE-Histogramme* von in vivo untersuchten Mäusen eines Wildtypstamms ermittelt. Eine Versuchsgruppe wurde dem Einfluss von steigenden Methacholindosen in einer Zeitreihenuntersuchung ausgesetzt. Eine andere Mausgruppe wurde als Kontrollgruppe zu Vergleichszwecken im gleichen Zeitablauf radiologisch untersucht. Da das verwendete fpVCT als ein Prototyp in der CT- Technologie eine schnelle und schonende, hochauflösende in vivo- Gewebedarstellung ermöglicht (Hirschburger et al. 2009), sollte es sich zu quantitativen Auswertungen in Lungenstudien eignen, was in dieser Arbeit erprobt wurde. Das dafür benötigte Programm wurde in der Programmiersprache IDL von Herrn Dr. Obert aus der o.g. Abteilung Neuroradiologie des Universitätsklinikums Gießen erstellt. IDL stellt eine geeignete Programmiersprache zur Analyse und Visualisierung von wissenschaftlichem 2D- und 3D- Bildmaterial dar (Tang 2009).

Während Chaturvedi und Lee sich lediglich auf den Bronchialbaum von Labortieren in CT- Bildern und Armato und Sensakovic sich ausschließlich auf die Detektion von Lungenherden bezogen (siehe 1.2), wurde in dieser Arbeit ein Computerprogramm verwendet, mit welchem das Volumen der kompletten Lunge, d.h. sowohl des Lungenparenchyms, als auch des Bronchialbaums ab Larynxhöhe, von Mäusen in VCT- Bildern berechnet wurde. Der Trennwert betrug dabei -270 HE im Gegensatz zu dem von Guerrero et al. verwendeten Trennwert (siehe 1.2). Eine mediastinalseitige Glättung der Lungenkontur war dabei im Gegensatz zu der Arbeit von Hu et al. nicht erforderlich (siehe 1.2). Das dieser Arbeit zugrunde liegende Verfahren kombiniert demnach Aspekte unterschiedlicher, vorheriger Arbeiten.

Ziel dieser Arbeit war somit die Erprobung und Überprüfung des angewandten, neuen ILD- basierten Programms zur Ermittlung der unterschiedlichen Lungenparameter anhand von fpVCT- Datensätzen im Mausmodell.

## **2. Material und Methoden**

Im Folgenden werden die verwendeten Versuchstiere sowie das Akquirieren und rechnergestützte Auswerten der radiologischen Datensätze erläutert.

### **2.1 Versuchstiere und ihre Verwendung in der Lungenuntersuchung**

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Versuchstiere beschrieben und ihre Behandlung innerhalb der Lungenuntersuchung aufgrund des gegebenen Versuchsprotokolls dargestellt.

Die Tierexperimente wurden allein von Frau Dr. Krasteva- Christ und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des o.g. Instituts für Anatomie und Zellbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kummer durchgeführt. Alle in diesem Abschnitt gemachten Angaben beruhen auf ihren freundlicherweise zur Verfügung gestellten Angaben. Das Versuchsvorhaben wurde nach § 8 Abs.2 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Gießen, Deutschland Dezernat V 54 – Veterinärwesen genehmigt.

Bei den verwendeten Versuchstieren des Wildtypstamms C57Bl6/Jnc (kurz „Black6“ bzw. „B6“) handelte es sich um erwachsene (14 Wochen alte) Hausmäuse männlichen Geschlechts der Art *Mus musculus domesticus* aus dem örtlichen Tierzuchtstandort (Justus- Liebig- Universität Gießen, Deutschland), unter Standardbedingungen gehalten, mit einem Gewicht von 20 g bis 27 g.

Die Narkose wurde durch eine zwei- bis dreisekündige Isofluraninhalation eingeleitet, welche eine schmerzfreie intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Narkosemischung ermöglichte. Bei dieser handelte es sich um 100 µl einer Mischung aus Xylazin (20 mg/ ml, Rompun®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), Ketamin (100 mg/ ml, Ketamin Inresa®, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) und Azepromazine (3 mg/ ml, Vetracil®, Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) aufgelöst in einer 0,9 %igen NaCl- Lösung. Das hier beschriebene Vorgehen wird als geeignetstes Anästhesieschema bei i.p. Injektionen beschrieben (Arras et al. 2001). Die Narkose wurde anschließend mit 50 µl der halbierten Ketamindosis aufrechterhalten.

Für das Experiment wurde die jeweils narkotisierte Maus auf der Probenhalterung der fpVCT mit dem Kopf in Richtung Bohrloch gelagert, d.h. mit ihrer Longitudinalachse parallel zur z- Achse des Tomographen. Durch eine Verweilkanüle konnten auch während des Experiments Pharmaka verabreicht werden, so dass an jeder Maus nach dem aufgestellten Versuchsprotokoll (**Tabelle 1**) Maßnahmen durchgeführt werden konnten. Die Positionierung der Mäuse auf der Halterung sowie die Verabreichung der Medikation wurden in allen Experimenten identisch durchgeführt. Es wurde jede Maus 13- mal radiologisch untersucht, wobei jede Untersuchung etwa 500 bis 800 fpVCT- Schnittbilder erbrachte. Es wurden nur die für die Lungenuntersuchung relevanten Körperabschnitte untersucht: von dem kaudalen Anteil des Kopfes bis hin zum Epigastrium.

Zwischen den Untersuchungen wurde im Abstand von 10 min eine Medikation à 100 µl verabreicht, wobei zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe mit jeweils drei Tieren pro Gruppe unterschieden wurde. Den Mäusen der Versuchsgruppe B6 M wurde Methacholin in aufsteigender Dosis  $m$  [µg/kg KG] in 100 µl 0,9 % iger NaCl- Lösung appliziert (siehe **Tabelle 1**).  $m$  lässt sich als applizierte absolute Methacholindosis  $m_{abs}$  oder als applizierte kumulative Dosis  $m_{kum}$  darstellen. Den Mäusen der Kontrollgruppe B6 wurde hingegen 100 µl einer 0,9 % igen NaCl- Lösung (Puffer) verabreicht. Nach Beendigung der Untersuchungen wurden die Mäuse durch Inhalation einer Überdosis an Sevofluran (Sevorane®, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Deutschland) getötet.

Zeit [min]		Maßnahme				
	Ge- mittelt	Radio- logische Unter- suchung (N°)	Medi- kation (N°)	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe B6 M	
				B6	Absolute, applizierte Methacholin- dosis  $m_{abs}$ [µg/kg KG]	Kumulative, applizierte Methacholin- dosis  $m_{kum}$ [µg/kg KG]
				NaCl 0,9 %		
0	0	1	1	100 µl	5	5
2	4	2				
6		3				
10			2	100 µl	5	10
12	14	4				
16		5				
20			3	100 µl	15	25
22	24	6				
26		7				
30			4	100 µl	25	50
32	34	8				
36		9				
40			5	100 µl	50	100
42	44	10				
46		11				
50			6	100 µl	150	250
52	54	12				
56		13				

**Tabelle 1. Versuchsprotokoll mit Zeitangaben zur radiologischen Untersuchung und zur Puffer- bzw. Methacholinapplikation.**

Mit Ausnahme der ersten Messung wurden alle Untersuchungen 2 und 6 min nach jeder Medikation durchgeführt. Bei den Auswertungen der quantitativen Lungenparameter werden Ergebnisse, die auf eine Medikation folgen, jeweils gemittelt. Das eingesetzte Versuchsprotokoll war für alle Mäuse identisch.

## **2.2 Technische Grundlagen der Flachdetektor- Volumen- Computer- Tomographie (fpVCT), Akquirieren der radiologischen Daten**

Folgend werden die technischen Begebenheiten des verwendeten Tomographen beschrieben.

Das Bildmaterial dieser Arbeit wurde in einer Kooperation zwischen der anatomischen Arbeitsgruppe, geleitet von Herrn Prof. Dr. Kummer, und der o.g. Abteilung für Neuroradiologie akquiriert. Zu der Zeit, in welcher die Experimente durchgeführt wurden, hatte Herr Prof. Dr. Traupe die Direktion, zur Zeit der durchgeführten Datenanalyse oblag Frau Prof. Dr. Gizewski die Leitung der Abteilung für Neuroradiologie.

Zur Bilddatenakquirierung wurde ein eXplore Locus Ultra- Computer Tomographiesystem (eLU), GE Healthcare, London, Ontario, Kanada verwendet, welches genau in der Literatur beschrieben wird (Obert et al. 2010; Schulte-Geers et al. 2011). Abbildungen des Systems sind ebenfalls in diesen Publikationen zu finden. Die hohe Auflösung und damit die Besonderheit dieses Systems basiert auf einem Flachdetektor. Dieser besteht u.a. aus einer amorphen, photosensitiven Silizium- Matrix, auf der in einem Sublimationsverfahren Caesium- Jodid- Nadeln aufgebracht wurden. Dieser Detektor wird zur Strahlendetektion benutzt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden mit der Einstellung von 140 kVp und 10 mA und einer Bestrahlungszeit der Lunge von 8 s durchgeführt. Die Gantry des eLUs führte in dieser Zeit eine Rotation durch und erfasste dabei 1000 Einzelprojektionsbilder. 1000 Zeilen und 360 Reihen wurden von der Detektormatrix, die  $1024 \times 1024$  Pixelelemente besitzt, bei dem hier angewendeten Protokoll ausgelesen. Dies erlaubte eine Bilddarstellung von  $15,1 \times 15,1 \text{ cm}^2$  in xy- und von 5,4 cm in z- Richtung (d.h. in Richtung der Längsachse des Untersuchungstisches des fpVCTs). Der Datentransfer von der Gantry zum Bildrekonstruktions- Cluster betrug etwa 2 min pro Datensatz.

## 2.3 Bildrekonstruktion

Die eLU- Rohdaten wurden mit einem für Kegelstrahl gefilterten Rückprojektionsalgorithmus in eine  $512 \times 512 \times n$  Voxelmatrix rekonstruiert. Hierbei ist  $n$  die Anzahl der Bilder in z- Richtung. Die Voxelmatrix besteht aus kubusförmigen Volumeneinheiten, d.h. dreidimensionalen Datenpunkten, die als Voxel bezeichnet werden. Sie weisen im Falle dieser Arbeit eine isotrope Voxelgröße von  $(0,05 \text{ mm})^3$  auf. Die Zahl  $n$  ist identisch mit der Bildanzahl eines 3D- Datensets einer Mausuntersuchung (siehe Kapitel 2.5). Die Rekonstruktionszeit betrug annähernd 8 min pro Untersuchung. Der Rekonstruktionsprozess konnte zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt nach Beendigung der Datenakquirierung initiiert werden. Die rekonstruierten Bilder wurden zu einer Advantage Windows Workstation (AW, siehe Kapitel 2.4), transferiert, an welcher eine visuelle Inspektion der Bilder durchgeführt werden konnte. Des Weiteren wurden die Daten zu einem Windows Vista ©- gestützten PC (siehe Kapitel 2.4) transferiert, welcher zur numerischen Lungenuntersuchung genutzt wurde.

## 2.4 Verarbeitung der Bilder

Der Abschnitt 2.4 thematisiert die Arbeitsabläufe der Abspeicherung, Archivierung und Exportierung der digitalen fpVCT- Bilder zum Ermöglichen ihrer Auswertung.

Nach Versuchsdurchführung und nach Rekonstruktion der Roh- Bilddaten befanden sich insgesamt 53.741 fpVCT- Bilder aus insgesamt 78 Untersuchungen auf dem LINUX- Rechner- Cluster des eLUs. Zur Durchführung der Lungenanalyse mussten die Bilddaten für jeden Untersuchungszeitpunkt einer Maus separat auf eine USB- Festplatte manuell exportiert und anschließend auf die o.g. Windows Vista ©- Bildverarbeitungs- Workstation (mit einem 3 GHz Intel ® Core™ 2 Duo CPU und 6 GB- RAM) kopiert werden. Auf diesem PC wurde die Berechnung der Lungenparameter mit dem von Herrn Dr. Obert in der IDL- Programmiersprache, Herstellerfirma ITT Visual Information Systems, Inc., USA, erstellten Programm durchgeführt. Dieses Computerprogramm wird im Folgenden kurz als „(IDL- )Programm“ bezeichnet. Neben dem genannten Datenexport wurden die Bilddaten ebenfalls für jeden Untersuchungszeitpunkt separat vom eLU- Bildrekonstruktions- Cluster auf die o.g. Advantage Windows Workstation (AW), Version 4.1, GE- Healthcare, BUC, Frankreich, als DICOM- Bilder exportiert. Danach wurden die DICOM- Bilddaten auf der AW



archiviert. Mit dem Programm „Volume Viewer“ können zur visuellen Begutachtung Schnittbilder in beliebiger Schnittebene dargestellt werden.

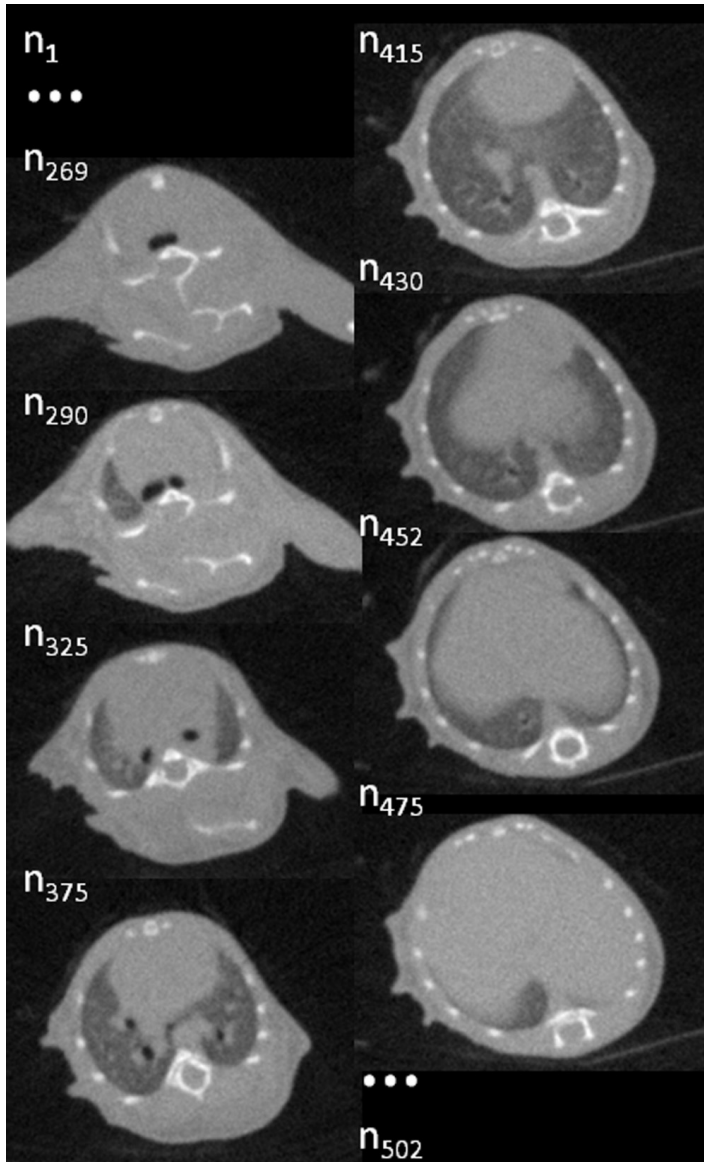
## 2.5 Erstellen von Dateien zur automatischen Bestimmung der Lungenparameter

Es folgt die Beschreibung der manuellen Erstellung derjenigen Dateien, welche der Arbeit mit dem Programm zugrunde liegen, sowie der Rolle der Lokalisation von Luftröhrenaufgabelung (Bifurcatio tracheae) und Lungenwinkel (Recessus pulmonales) in diesem Kontext.

Zur Analyse der Bilder wird mittels des beschriebenen, Windows Vista®-basierten PCs das IDL- Programm verwendet. Um Diesem die Bilddateien korrekt zuzuführen, müssen aus den während der Versuchsdurchführung manuell angefertigten Protokollen (festgehalten im fpVCT- Logbuch) und aus Daten, die das fpVCT- Datenbanksystem während der radiologischen Untersuchung eigenständig vergibt, Dateien erstellt werden. Die dafür benötigten Daten werden zunächst für alle Messungen einer Maus in Microsoft Excel® tabuliert und beinhalten die Daten Messnummer, Versuchsdatum, Datensatzname, Serien- und Rekonstruktions- Identifikations- Nummer. Zur weiteren Verwendung der Tabelle wird schließlich aus dieser eine Text- Datei abgeleitet. Dafür werden die entsprechenden Zeilen dieser Excel®- Tabelle kopiert, in eine neue Tabelle eingefügt und als Text- Datei auf dem Windows Vista®-basierten PC gespeichert. Die Zusammenführung dieser Daten ermöglicht eine korrekte Zuordnung der Bilddaten zu den entsprechenden Mausuntersuchungen. Dies wird für alle Datensätze der Lungenuntersuchung durchgeführt.

Da die Bildnummer  $n$  in Bezug zur Longitudinalachse der Maus steht und die Untersuchungsrichtung konstant gehalten wird, zeigt  $n$  die Position des jeweiligen Schnittbilds in Bezug zur Körperachse der Maus an. Dabei weisen kraniale Bilder kleinere Bildnummern als kaudale Bilder auf. Die nummerierten Schnittbilder werden im o.g. Programm „Volume Viewer“ im manuellen Durchgang von kranial nach kaudal einzeln visuell nach unterschiedlichen Parametern und möglichen Auffälligkeiten überprüft (siehe **Abb. 1**). Entscheidend dabei ist das Ermitteln der  $n$ - Werte der Höhe der Bifurcatio tracheae,  $n_{bt}$ , und der Höhe der Recessus pulmonales,  $n_{rp}$ , neben dem

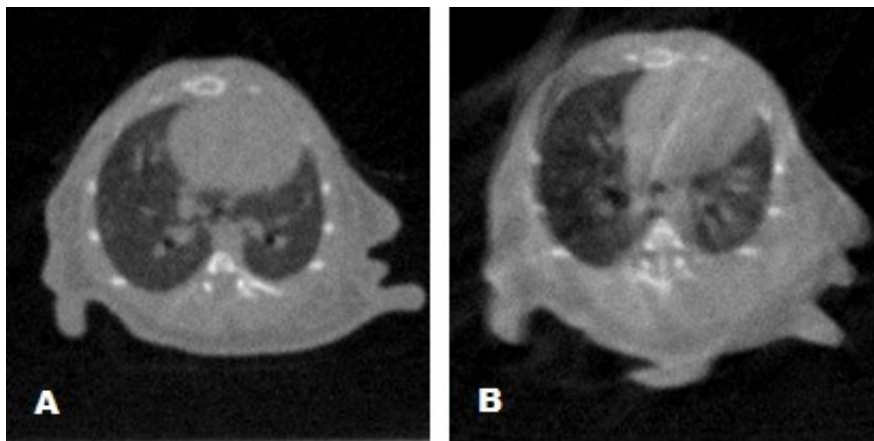
möglichen Vorhandensein von Bewegungsartefakten, Artefakten der Infusionsnadel oder einer sichtbaren Magenblase. Bei dieser visuellen Vorkontrolle der Bilder werden die Bildnummer  $n_{bt}$  und  $n_{rp}$  sowie das eventuelle Vorhandensein der jeweiligen Auffälligkeit notiert.



**Abb. 1. Illustration eines 3D- Bildstapels einer Mausuntersuchung.**

Die Ziffern im Index von  $n$  geben die Bildnummer innerhalb des Bildstapels an. Die Bilder im Intervall  $[269; 475]$ , welches dem Intervall  $[n_{bt}, n_{rp}]$  entspricht, beinhalten Abschnitte der Atemwege oder des Lungengewebes, welche durch das Programm analysiert werden.

Es wurde zwischen unvermeidbar geringen und starken Bewegungsartefakten unterschieden (siehe **Abb. 2**), wobei Letztere protokolliert werden. Von den insgesamt 110 Datensätzen von B6 (M)- Mäusen wurden 32 Datensätze komplett aus der Auswertung ausgeschlossen. Ausschlusskriterien waren o.g. starke Bewegungsartefakte oder technische Probleme mit Ausfall des Tomographen während einer Untersuchung, die dazu führten, dass nicht alle 13 Untersuchungen einer Mauszeitreihe komplett erfasst werden konnten. Auftreten eines starken Bewegungsartefaktes in einem einzigen Datensatz konnte auf diese Weise zum Ausschluss von allen 13 Datensätzen einer Maus führen. Tomographenfehler erklären, dass nicht immer die notwendigen 13 Untersuchungen einer Mauszeitreihe erhalten werden konnten. Dies erklärt, dass die 32 ausgeschlossenen Datensätze nicht ohne Rest durch 13 teilbar sind. Folglich wurden nur 6 komplette Zeitreihendatensätze mit jeweils 13 artefaktfreien Untersuchungen verwendet, was der o.g. Anzahl von 78 Untersuchungen entspricht.



**Abb. 2. Bildqualität anhand eines Untersuchungsbeispiels im kaudalen Thoraxbereich bei zwei unterschiedlichen Mäusen im Vergleich.**

**2A** Schnittbild mit normal hoher Qualität bei unvermeidlich kleinen Bewegungsartefakten. **2B** Schnittbild mit stark ausgeprägten Bewegungsartefakten, die zum Ausschluss der Bilder aus der Auswertung dieser Studie führten.

Die Schichtdicke eines Bildes umfasst 0,05 mm, entsprechend der Kantenlänge eines Voxels. Die Länge der Lunge in z- Richtung kann somit durch Multiplikation der Schichtdicke mit der Anzahl der Bilder zwischen  $n_{bt}$  und  $n_{rp}$  berechnet werden: Lungenlänge [mm] = 0,05 mm · ( $n_{rp} - n_{bt}$ ).

Die Daten  $n_{bt}$  und  $n_{rp}$  werden ferner für die Arbeit mit dem Programm (genauere Deskription siehe Kapitel 2.6) benötigt und werden in einer separaten Datei festgehalten.

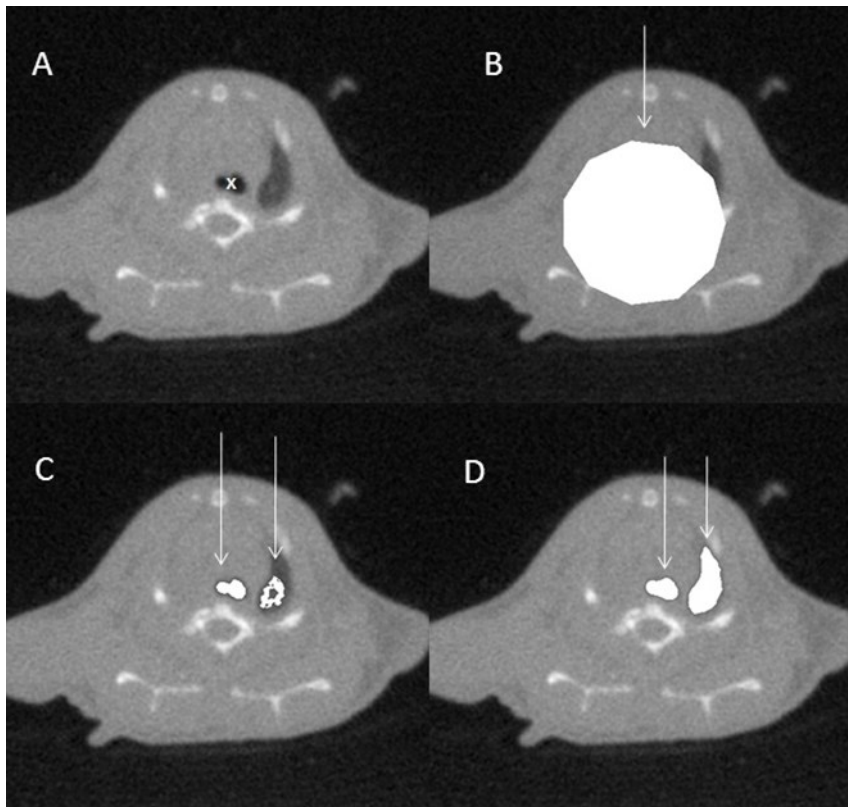
## **2.6 Erstellung und Verwendung des Computerprogramms: Volumetrie, Hounsfield- Einheit- Maxima- Bestimmung und Densitometrie**

Dieses Teilkapitel beinhaltet die genaue Deskription des verwendeten Computerprogramms zur Erhebung der Lungenparameter Volumen, HE- Maximum und Dichte.

Das für die Analysen dieser Lungenuntersuchungen erstellte Programm besteht aus zwei Unterprogrammen: dem Programm 1 (Vorprogramm) und Programm 2 (Hauptprogramm). Programm 1 hat die Aufgabe, die xy- Koordinaten eines Punktes in der Umgebung der Trachea im Bild  $n_{bt}$  (siehe **Abb. 3A**), d.h. im Bereich der Bifurcatio tracheae zu ermitteln. Die Verwendung dieses als Tracheapunkt bezeichneten Punktes wird im Folgenden erklärt. Um diesen festzustellen, zeigt Programm 1 konsekutiv die  $n_{bt}$ - Bilder aller Mausuntersuchungen einer Zeitreihe an, wodurch der Programmanwender per Klick mit der linken Computermastaste die Lage dieses Punktes bestimmen kann. Das Programm 1 zeigt daraufhin die gewählten xy- Koordinaten auf dem Bildschirm an und fügt die Werte einer Datei hinzu.

Programm 2 dient als eigentliches Haupt- bzw. Segmentierungsprogramm, indem es einen Schwellenwert mit einem Saatkorn- Algorithmus und den geometrischen Eigenschaften des fpVCT- Bildes kombiniert. Saatkorn- Algorithmen werden auch als Saatkorn- Algorithmen oder Saatkorn- Methode (im Englischen: „seed- growth algorithm“) bezeichnet, entstammen dem Bereich der Bildanalyse (siehe IDL- Benutzer- Handbuch, IDL 2012) und werden u.a. durch Gonzalez und Woods im Rahmen der digitalen Bildverarbeitung erläutert (Gonzalez & Woods 1993). Programm 2 wird gestartet und liest zunächst diejenigen Daten ein, die mit Programm 1 bestimmt wurden. Ferner liest es die Bilddaten im Bereich von der Bifurcatio tracheae bis zu den Recessus pulmonales, d.h. im Intervall von  $n_{bt}$  bis  $n_{rp}$ , jeweils schnittbildweise ein und führt dann die einzelnen Segmentationsschritte konsequent für alle Bilder dieses Intervalls durch. Da die Schnittbilder jeweils aus einer

einzelnen Schicht aus Voxeln bestehen, stellt dieser Vorgang eine mehrfach- 2D- anstelle einer eigentlichen 3D- Bildanalyse dar. Zunächst wird im Bild  $n_{bt}$  (siehe **Abb. 3A**) ein Messkreis (im axialen Schnittbild erscheinende, polygonale Fläche, siehe **Abb. 3B**), mit einem Radius von 3,5 mm bzw. 70 Voxeln um den o.g. Tracheapunkt, der daher als Kreismittelpunkt dient, gezogen. Dabei wird der Radius so gewählt, dass der Kreis zwingend innerhalb des Mausekörpers verbleibt. Es wird innerhalb dieses Messkreises die Position aller Voxel bestimmt, die unterhalb eines zuvor festgelegten Schwellenwertes für Lungengewebe,  $HE_{Lungenschwelle}$ , liegen. Der Hintergrund dessen ist, dass sich das lufthaltige Lungengewebe in der fpVCT durch negative HE abbildet. Reine Luft entspricht -1000 HE, Wasser entspricht 0 HE; während Knochen weit im positiven Bereich liegt. Die Lunge als Mischung aus Gewebe und Luft liegt somit zwischen -1000 HE und 0 HE und weist zunehmend negative Werte auf, je lufthaltiger ihr Zustand ist. Diese hypodensen Areale eines jeden Bildes lassen sich segmentieren, indem man diejenigen Voxel auswählt, deren HE unterhalb des gewählten Schwellenwertes liegen. In dieser Arbeit entspricht  $HE_{Lungenschwelle}$  einem Wert von -270 HE, unterhalb dessen die Voxel der Lunge erwartet werden.



**Abb. 3. Darstellung unterschiedlicher Berechnungsschritte des Programms 2 (Segmentierungsprogramms).**

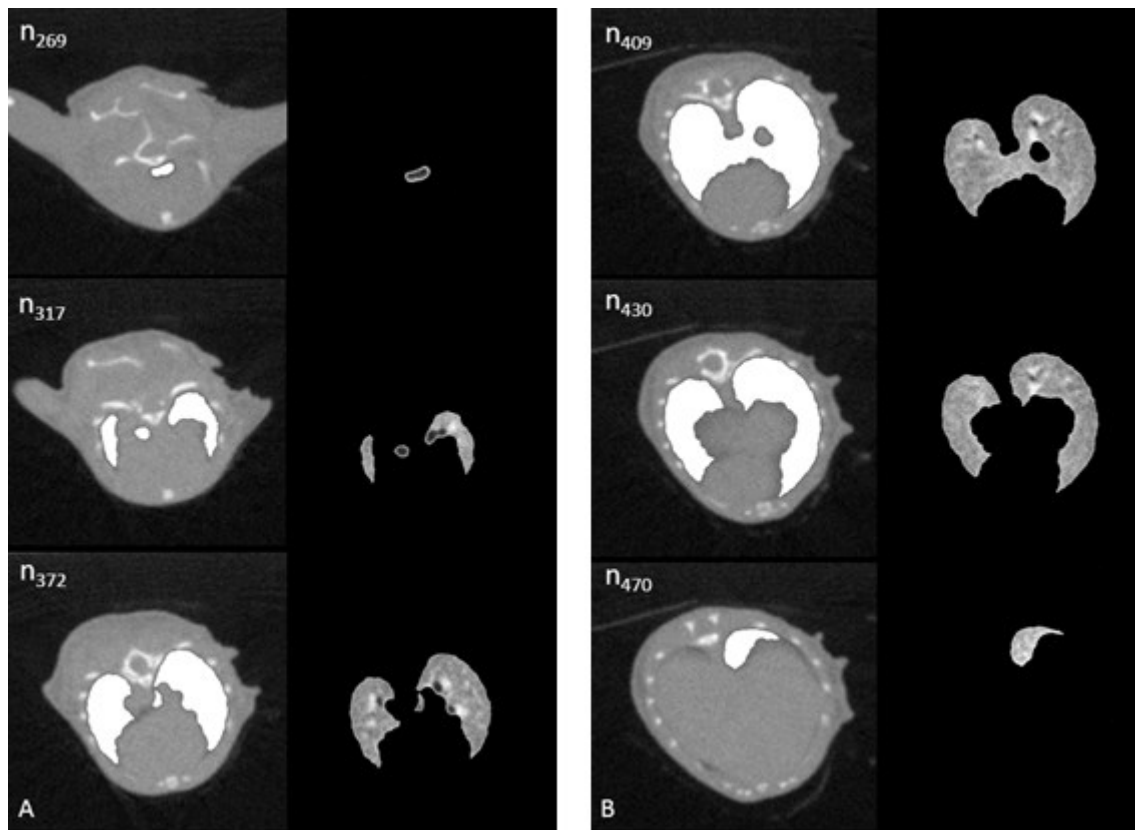
**3A** Nativbild. Das weiß eingezeichnete x weist ungefähr auf die Position des Tracheapunktes hin, welcher manuell gewählt wird. Die zugehörigen xy- Koordinaten werden während des Ablaufs von Programm 1 durch Positionieren des Mauszeigers und Klick auf die linke Maustaste bestimmt. **3B** Visualisierung des 11- eckigen Polygons, welches im Folgenden als Messkreis bezeichnet wird. Dieser wird um den o.g. Tracheapunkt geschlagen, dargestellt in Weiß (siehe Pfeil). Die Voxel innerhalb des Messkreises, die einen Hounsfield- Wert kleiner als  $HE_{\text{Lungenschwelle}}$  haben, werden selektiert. **3C** Ausgewählte Voxel, dargestellt in Weiß (siehe Pfeile). 5 % der Koordinatenwerte dieser selektierten Voxel werden im weiteren Segmentierungsprozess als Saatkörner in einem Saatkorn- Algorithmus verwendet. **3D** Segmentierungsergebnis der gesamten Lungenabschnitte dieses Schnittbildes, dargestellt in Weiß (siehe Pfeile).

Im nächsten Rechenschritt wird mithilfe eines Saatkorn- Algorithmus und einer IDL- Funktion, welche geometrische Bildeigenschaften berücksichtigen kann, die Position aller Voxel des Schnittbildes bestimmt, die zum Lungengewebe gehören. Das sind einerseits diejenigen Voxel, die innerhalb des Messkreises mit entsprechend niedrigen HE selektiert werden. Andererseits sind es auch diejenigen Voxel, die sich - v.a. bei

Schnittbildern mit größeren Arealen von Lungengewebe - außerhalb des Messkreises befinden und mithilfe des Saatkorn- Algorithmus selektiert werden. Für diesen Algorithmus werden 5 % der innerhalb des Messkreises selektierten Voxel als zufällig ausgewählte Saatkörner genutzt<sup>1</sup>. Würde demgegenüber eine schwellenwertbasierte Analyse des gesamten Schnittbildes  $n_{bt}$  erfolgen, würden auch dunklere Areale außerhalb der Maus, somit die Areale der Umgebungsluft, mitbestimmt, was zu einer inkorrekten Lungensegmentierung führen würde. Alle genannten Arbeitsschritte unterliegen einer permanenten visuellen Kontrolle durch den Benutzer, was ihre visuelle Darstellung auf dem Rechnermonitor ermöglicht. Das resultierende Segmentierungsergebnis des HE Schwellenwert- Algorithmus ist in **Abb. 3C** dargestellt (weiß dargestellte Voxel, siehe Pfeile). Das Segmentationsresultat der IDL- Funktion, welche die geometrischen, morphologischen Bildeigenschaften anhand der Saatkorn-Rechenvorschrift evaluieren kann, ist in **Abb. 3D** dargestellt (weiß dargestellte Voxel, siehe Pfeile). Ist die Position aller Voxel, die zum Lungenbereich gehören, eines Schnittbildes  $n$  bestimmt, werden alle diese gezählt, als  $V_n$  bezeichnet und durch Programm 2 in einer Datei abgespeichert. **Abb. 4** zeigt das Ergebnis einer Lungensegmentation für verschiedene Schnittbilder. Ebenso wird der zu jedem selektierten Voxel gehörende Hounsfield- Wert gespeichert. Diese Prozedur wird für alle Schnittbilder  $n$  im Bereich von  $n_{bt}$  bis  $n_{rp}$  durchgeführt, d.h. für alle Bilder, die zum Bildstapel der Lunge in z- Richtung gehören. Nach der Berechnung des letzten Schnittbildes,  $n_{rp}$ , wird die Summe aller Voxel bestimmt, die zum Lungengewebe gehören, d.h. die Summe aller  $V_n$  im Bereich von  $n_{bt}$  bis  $n_{rp}$ .

---

<sup>1</sup>Die Anzahl von 5 % ergab sich aus Voruntersuchungen innerhalb der Programmentwicklung. Dabei stellte sich heraus, dass 5 % der Voxelmenge des selektierten Messkreises ausreichen, um eine komplette Lungensegmentation zu ermöglichen.



**Abb. 4. Lungensegmentation.**

Exemplarisch ausgewählte Bilder zwischen  $n_{bt}$  und  $n_{rp}$  aus dem Arbeitsprozess von Programm 2. Von kranial nach kaudal werden in jedem ausgewählten Schnittbild die selektierten Voxel  $V_n$  weiß markiert (jeweils linke Bildspalte) und gesondert dargestellt (jeweils rechte Bildspalte). **4A** kranialere Anteile der Bildselektion. **4B** kaudalere Anteile der Bildselektion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mithilfe der durch Programm 1 entstandenen Datei eine automatische Lungensegmentierung pro Messzeitpunkt in aufsteigender Bildreihenfolge abläuft. Die innerhalb und aufgrund des Saatkorn- Algorithmus auch außerhalb des Messkreises ermittelten Voxel werden dabei visuell dargestellt (siehe **Abb. 4**), addiert und schließlich in die Einheit  $[mm^3]$  (genauere Beschreibung siehe Kapitel **2.6.1**) umgerechnet. Im Anschluss wird ein dazugehöriges Histogramm des Lungenbereichs erstellt (genauere Beschreibung siehe Kapitel **2.6.2**) und die Lungendichte berechnet (genauere Beschreibung siehe Kapitel **2.6.3**). Sobald die Berechnungen zu einem Messzeitpunkt der Untersuchungszeitserie einer Maus abgeschlossen sind, wird die nächste Untersuchung automatisch gestartet – bis die Bearbeitung aller Bilddatensätze einer Untersuchungszeitreihe abgeschlossen ist. Am



Ende eines solchen, vollständigen Durchgangs sind alle Lungenparameter der ausgewählten Maus für jeden Messzeitpunkt berechnet, ausgegeben und gespeichert.

### 2.6.1 Lungenvolumetrie

Da die Größe der Voxel aus der Rekonstruktion der Bilddaten mittels eLU bekannt ist (siehe Kapitel 2.3), kann das Lungenvolumen bestimmt werden: Der Volumeninhalt eines Voxels von  $(0,05 \text{ mm})^3$  multipliziert mit den selektierten Voxeln  $V_n$  ergibt das Lungenvolumen  $Vol_n$  [ $\text{mm}^3$ ] in einem Schnittbild  $n$ . Wird folglich das Voxelvolumen mit der Summe aller  $V_n$  multipliziert, ergibt sich daraus das gesuchte absolute Volumen  $Vol$  der gesamten Lunge. Die Zugehörigkeit eines gemessenen Datensatzes zur Messreihe wird wie folgt ausgedrückt:  $Vol(t, m_{\text{kum}})$  [ $\text{mm}^3$ ], wobei  $t$  die Abhängigkeit von dem Messzeitpunkt  $t$  [min] und  $m_{\text{kum}}$  die Abhängigkeit von der kumulativen Methacholindosis  $m_{\text{kum}}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ] ausdrückt. Die Messwerte  $Vol(t, m_{\text{kum}})$  entsprechen somit den Absolutwerten  $Vol_{\text{abs}}(t, m_{\text{kum}})$ :

$$Vol_{\text{abs}}(t, m_{\text{kum}}) = Vol(t, m_{\text{kum}}) \quad (\text{Formel 1})$$

Der Index *abs* bedeutet, dass es sich bei dem jeweiligen Werten um einen absoluten Messwert handelt, im Gegensatz zum Index *rel* (s.u.), der auf einen relativen, normierten Wert hinweist.

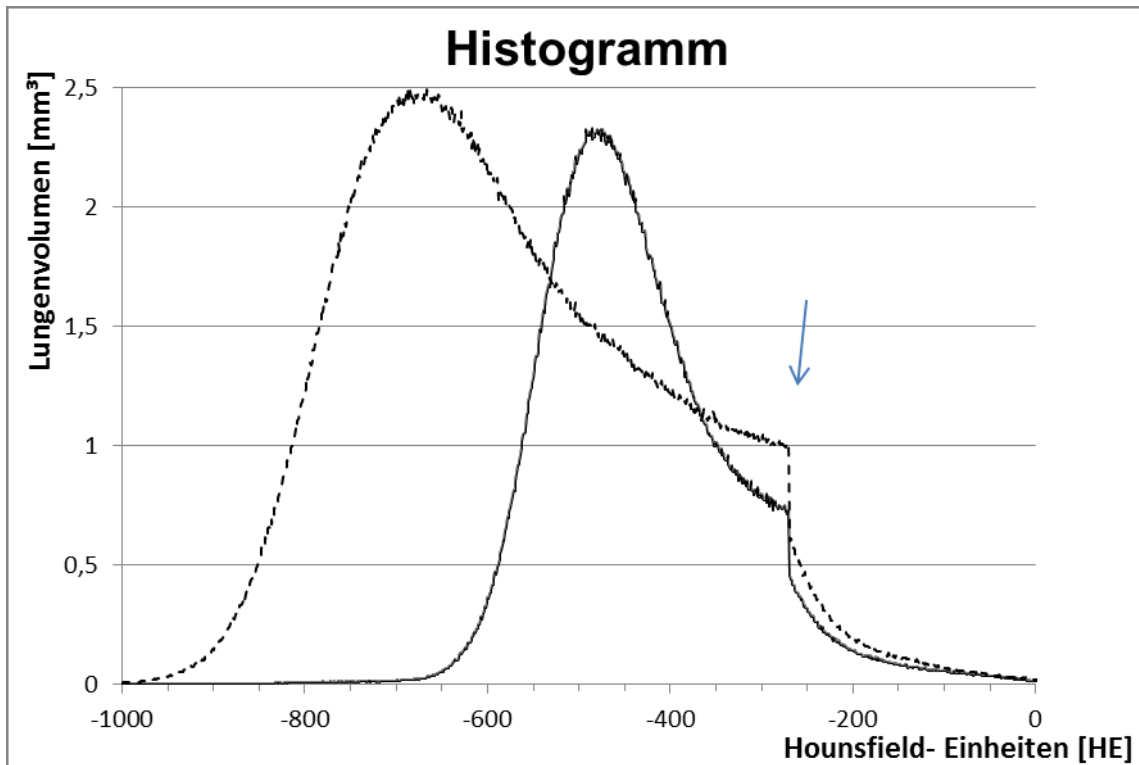
Die relativen Lungenvolumenwerte  $Vol_{\text{rel}}(t, m_{\text{kum}})$  lassen sich aus den absoluten Messwerten  $Vol_{\text{abs}}$  durch **Formel 2** berechnen. Der zu einem Messzeitpunkt  $t$  bestimmte absolute Wert  $Vol_{\text{abs}}(t, m_{\text{kum}})$  wird durch den Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ min}$ ,  $Vol_{\text{abs}}(t = 0, m_{\text{kum}})$ , geteilt:

$$Vol_{\text{rel}}(t, m_{\text{kum}}) = \frac{Vol_{\text{abs}}(t, m_{\text{kum}})}{Vol_{\text{abs}}(t=0, m_{\text{kum}})} \quad (\text{Formel 2})$$

Durch diese Berechnung werden somit die absoluten Messwerte zum Zeitpunkt  $t$  auf den Anfangsmesswert zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ min}$  normiert. Die auf diese Weise ermittelten absoluten und relativen Volumenwerte werden in Excel® tabuliert und pro Versuchstier (d.h. alle Untersuchungen eines Tieres beinhaltend), in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  graphisch dargestellt (siehe Kapitel 3.2).

### 2.6.2 Hounsfield- Einheit- Maxima- Berechnung

Die HE eines jeden selektierten Lungenvoxels sind bei der Segmentierung eines Datensatzes zu jedem Messzeitpunkt bekannt. Daraus wird die Summe aller Voxel berechnet, welche die gleiche HE aufweisen. Sortiert man die HE der Größe nach, so kann man die erhaltenen Daten in einem Histogramm auftragen. Dabei kann wahlweise die Anzahl der Voxel als Funktion von HE,  $Voxelanzahl(HE)$ , aufgetragen werden, oder es kann die Voxelanzahl jeweils mit der Voxelgröße multipliziert werden, so dass dann das Volumen als Funktion von HE im Histogramm angegeben werden kann. Letztere Darstellungsweise ist in **Abb. 5** als Beispiel gezeigt. Durch diese Graphik wird deutlich, dass das mittels Programm 2 errechnete, absolute Lungenvolumen mit dem Integral der Volumenkurve übereinstimmt, welche annäherungsweise einer Gauß- Kurve entspricht. Der maximale HE- Wert der Funktion von Volumen gegen HE wird als das Hounsfield- Einheit- Maximum (HE- Maximum) bezeichnet. Dieses wird aus der graphischen Auftragung abgelesen und entspricht dabei nicht notwendig der mittleren Lungendichte. Dieser Vorgang wird für alle erhaltenen Lungendatensätze der Studie durchgeführt.



**Abb. 5. Auftragung zweier Beispiel- Histogramme.**

Das Lungenvolumen  $Vol [mm^3]$  ist hierbei aufgetragen als eine Funktion der Hounsfield-Einheiten [HE]. Die durchgezogene Linie mit einem Maximum bei -490 HE entspricht einer Maus, welche zum Zeitpunkt  $t = 0$  min untersucht wurde und somit nicht mit Methacholin behandelt wurde. Die gestrichelte Linie mit einem Maximum bei -700 HE korrespondiert mit einer Maus, welche mit Methacholin behandelt wurde. Es wird deutlich, dass die Methacholinbehandlung zu einer Linksverschiebung des HE- Maximums hin zu radiologisch weniger dichtem, d.h. lufthaltigerem Gewebe führt. Der Pfeil zeigt auf einen scharfen Trennwert bei HE -270. Dieser Trennwert entsteht durch den Schwellenwert  $HE_{Lungenschwelle}$  im Segmentierungsprogramm (Programm 2, siehe Kapitel 2.6), welche besagt, Voxel mit HE unter -270 zu segmentieren.

Die so ermittelten HE- Maxima  $H(t, m_{kum})$  entsprechen den absoluten Werten  $H_{abs}(t, m_{kum})$ ; es gilt daher:

$$H_{abs}(t, m_{kum}) = H(t, m_{kum}) \quad (\text{Formel 3})$$

Um die Größe der Werte in Bezug zum Ausgangswert  $H_{abs}(t = 0, m_{kum})$  darzustellen, eignet sich folgende Formel:

$$H_{rel}(t, m_{kum}) = \frac{H_{abs}(t, m_{kum})}{H_{abs}(t=0, m_{kum})} \quad (\text{Formel 4})$$

Die auf diese Weise bestimmten absoluten und relativen HE- Maxima  $H_{abs}(t, m_{kum})$  und  $H_{rel}(t, m_{kum})$  werden in Excel® tabuliert und in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  graphisch dargestellt (siehe Katiptel 3.2).

### 2.6.3 Lungendensitometrie

Die absolute Dichte  $D(t, m_{kum})$  der segmentierten Lunge zu einem Zeitpunkt  $t$  wird definiert als der Quotient aus der HE- Masse  $Mas(t)$ , d.h. der Summe aller HE der selektierten Lunge, und dem Volumen  $Vol_{abs}(t)$ :

$$D(t, m_{kum}) = \frac{Mas(t, m_{kum})}{Vol(t, m_{kum})} \quad (\text{Formel 5})$$

Die absoluten Werte  $D_{abs}(t, m_{kum})$  entsprechen den erhobenen Messwerten  $D(t, m_{kum})$ , dargestellt in **Formel 6**. Aus diesen lassen sich wiederum die relativen Lungendichtewerte  $D_{rel}(t, m_{kum})$  durch **Formel 7** berechnen:

$$D_{abs}(t, m_{kum}) = D(t, m_{kum}) \quad (\text{Formel 6})$$

$$D_{rel}(t, m_{kum}) = \frac{D_{abs}(t, m_{kum})}{D_{abs}(t=0, m_{kum})} \quad (\text{Formel 7})$$

Es wird der Quotient aus dem absoluten Wert  $D_{abs}(t, m_{kum})$  zum Messzeitpunkt  $t$  und dem Ausgangswert  $D_{abs}(t=0, m_{kum})$  berechnet. Man erhält dadurch die relative Lungendichte  $D_{rel}(t, m_{kum})$ , normiert auf den Messzeitpunkt  $t = 0$  min.

Die auf diese Weise ermittelten absoluten und relativen Dichtewerte  $D_{abs}(t, m_{kum})$  und  $D_{rel}(t, m_{kum})$  werden in Excel® tabuliert und in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] graphisch dargestellt (siehe Kapitel 3.2).

## 2.7 Statistische Auswertung

Im Folgenden wird die statistische Herangehensweise an die erhobenen Daten beschrieben. Da es sich bei dieser Arbeit um eine methodische Programmevaluation handelt, konnte der Stichprobenumfang gering gewählt werden. Daher wird hier die statistische Auswertung der Werte nur der Vollständigkeit halber dargestellt und soll als Beispiel für die statistischen Rechenwege einer Folgestudie mit adäquat großem Stichprobenumfang, durch welchen auch quantitative Aussagen ermöglicht werden, dienen.

Die ermittelten Lungenparameter wurden unter Anwendung des Programmpakets IBM® SPSS® Statistics 19.0.0 unterschiedlichen deskriptiven, statistischen Tests zur Varianzenanalyse unterzogen. Statistische Hintergründe und Zusammenhänge sind der Fachliteratur zu entnehmen. Genannt seien Winer et al. 1991; Zwillinger & Kokoska 2000; Casella & Berger 2001; Weiß 2008 und Statsoft 2013.

Pro Lungenparameter wurden die Werte aller Mäuse in jeweils eine Gruppe zusammengefasst, die zu demselben Messzeitpunkt (bzgl. B6) bzw. mit derselben Methacholindosis (bzgl. B6 M) ermittelt wurden. Die Mittelwerte dieser Gruppen wurden zunächst auf signifikante Unterschiede mit einer einfaktoriellen Varianzenanalyse (im Englischen: „analysis of variance oneway“, kurz „ANOVA 1“) ausgewertet. Es schloss sich der Levene- Test (Janssen & Laatz 2007; Rudolf & Kuhlisch 2008) an, welcher genutzt wurde um die Homogenität der Varianzen zu testen. Testergebnisse deuteten auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  mit p-Werten  $> 0,05$  eine Homogenität ( $H_0$ - Hypothese über Homogenität der Varianzen angenommen); mit p- Werten  $\leq 0,05$  eine *In*homogenität ( $H_0$ - Hypothese über Homogenität der Varianzen verworfen) der Varianzen an. Als Nächstes folgte ein detaillierter Post- Hoc- Test zur Untersuchung, ob sich die Mittelwerte im Teilgruppenvergleich signifikant unterscheiden. Bei den ausgewählten Post- Hoc- Tests handelte es sich um Scheffé (Janssen & Laatz 2007) und Tamhane  $T_2$  (Janssen & Laatz 2007). Der Scheffé- Post- Hoc- Test wurde angewandt, wenn eine Varianz*gleichheit*; der Tamhane-  $T_2$ - Post- Hoc- Test, wenn eine Varianzen*ungleichheit* aufgrund des Levene- Testergebnisses angenommen wurde.

### 3. Ergebnisse

Zunächst folgt ein Überblick über die Darstellung der Ergebnisse; danach die ausführliche Ergebnisdarstellung.

#### 3.1 Überblick

Es folgt die Ergebnisdarstellung der Versuchsgruppen B6 und B6 M im Vergleich anhand der errechneten Mittelwerte (einschließlich der Standardabweichung) in sechs Abschnitten: 1. absolute Volumina, 2. relative Volumina, 3. absolute HE- Maxima, 4. relative HE- Maxima, 5. absolute Dichten und 6. relative Dichten.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse folgen als separater Abschnitt nach der Darstellung der experimentellen Messergebnisse, da sich so die einzelnen Werte übersichtlicher und zusammenfassender darstellen lassen.

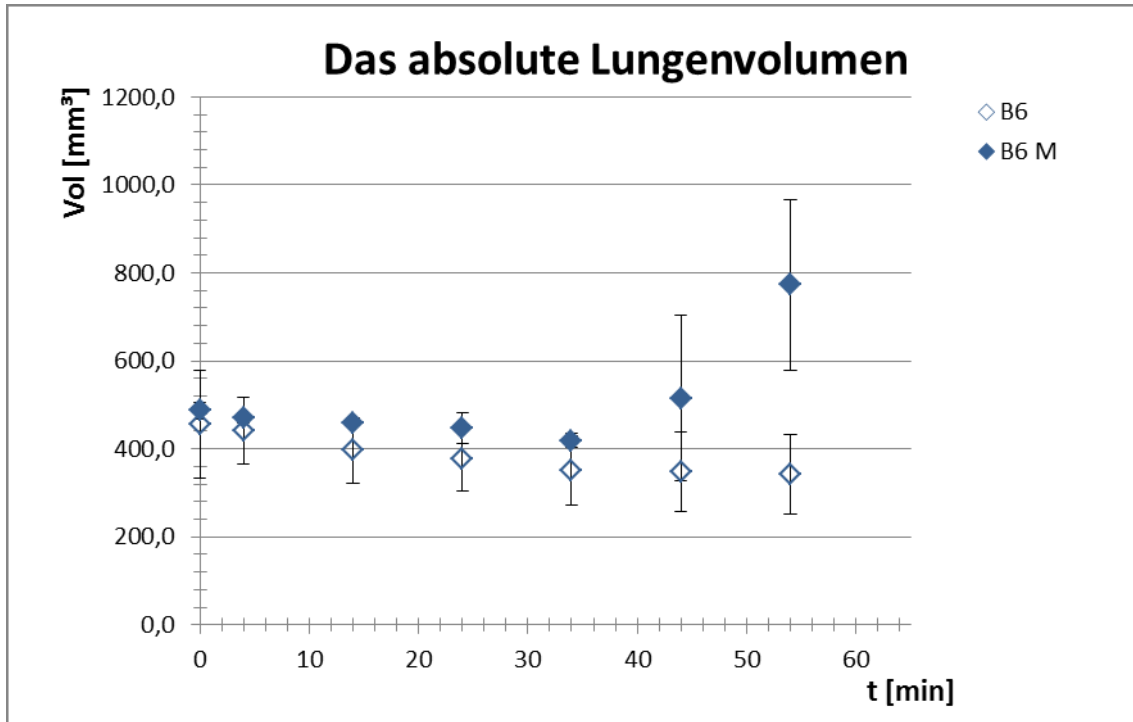
#### 3.2 Darstellung der experimentellen Messergebnisse

##### 3.2.1 Absolute Lungenvolumina

Die absoluten Volumina  $Vol_{abs}(t, m_{kum})$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{kum}$  [ $\mu$ g/ kg KG] zeigen je nach Versuchsgruppe einen unterschiedlichen Verlauf, dargestellt in **Abb. 6**. Während die Werte der B6- Mäuse eine abnehmende Tendenz des Lungenvolumens aufweisen, zeigen die Werte der B6 M- Gruppe nach einem annäherungsweise plateauförmigen Verlauf eine starke Zunahme in den letzten Messungen. Daraus folgt eine divergierende Lage der maximalen Volumina der beiden Gruppen: Das Maximum der Gruppe B6 wird direkt zu Beginn der Messungen mit dem Wert  $Vol_{abs}(t = 0, m = 0)$  von  $456,3 \text{ mm}^3$  erreicht (Standardabweichung  $122,1 \text{ mm}^3$ , entspricht der maximalen Standardabweichung der Gruppe B6). Die B6 M- Tiere erreichen ihr Maximum am Ende der Messungen:  $Vol_{abs}(t = 54, m = 250)$  von  $773,5 \text{ mm}^3$  (Standardabweichung  $193,6 \text{ mm}^3$ , entspricht der maximalen Standardabweichung dieser Gruppe). Das Minimum der Gruppe B6 wird am Ende der Messungen ermittelt ( $Vol_{abs}(t = 54, m = 0)$  von  $342,6 \text{ mm}^3$ ), während das Minimum der Gruppe B6 M zum Zeitpunkt  $t = 34 \text{ min}$  erreicht wird ( $Vol_{abs}(t = 34, m = 50)$  von  $419,2 \text{ mm}^3$ ).

So lässt sich sagen, dass die Volumina der B6- Gruppe im Bereich zwischen

342,6 mm<sup>3</sup> und 456,3 mm<sup>3</sup> (bei einer Standardabweichung zwischen 72,8 und 122,1 mm<sup>3</sup>) liegen, während die Werte der B6 M- Gruppe zwischen 419,2 mm<sup>3</sup> und 773,5 mm<sup>3</sup> (bei einer Standardabweichung zwischen 4,1 und 193,6 mm<sup>3</sup>) liegen.



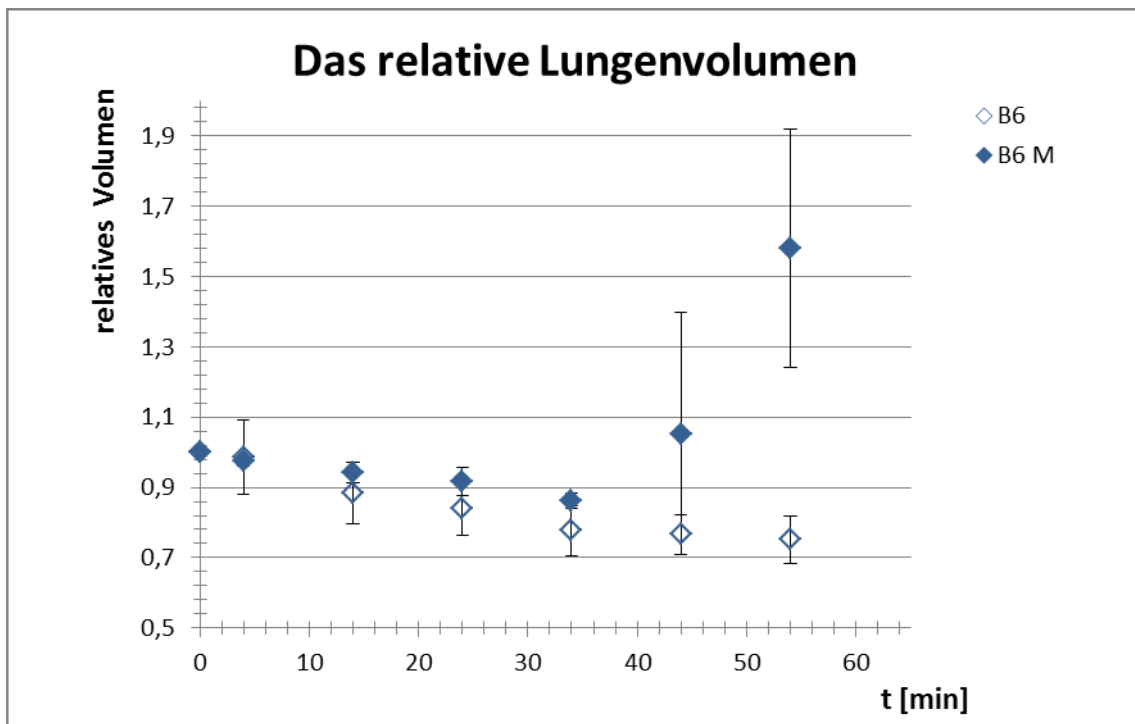
**Abb. 6. Darstellung des absoluten Lungenvolumens als Funktion der Zeit.**

Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.2.2 Relative Lungenvolumina

Die relativen Volumina  $Vol_{rel}(t, m_{kum})$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{kum}$  [ $\mu$ g/ kg KG] weisen einen Verlauf auf, bei welchem das Maximum der B6- Gruppe direkt zu Beginn der Messreihe mit dem Wert  $Vol_{rel}(t = 0, m = 0)$  von 1 ermittelt wird (siehe **Abb. 7**). Das Maximum der B6 M- Gruppe wird am Ende der Messreihe mit dem Wert  $Vol_{rel}(t = 54, m = 250)$  von 1,58 und der größten Standardabweichung dieser Gruppe mit einem Wert von 0,34 bestimmt. Der geringste Volumenwert unter den B6- Tieren ist bei  $t = 54$  min zu finden:

$\text{Vol}_{\text{rel}} (t = 54, m = 0)$  von 0,75. Das geringste Volumen innerhalb der B6 M- Gruppe lautet  $\text{Vol}_{\text{rel}} (t = 34, m = 50) = 0,86$ . Die relativen Messwerte liegen somit bzgl. der Gruppe B6 im Bereich 0,75 bis 1 (bei einer Standardabweichung bis zu 0,11), während diejenigen der Gruppe B6 M zwischen 0,86 und 1,58 (bei einer Standardabweichung bis zu 0,34) aufzufinden sind.



**Abb. 7. Darstellung des relativen Lungenvolumens als Funktion der Zeit.**

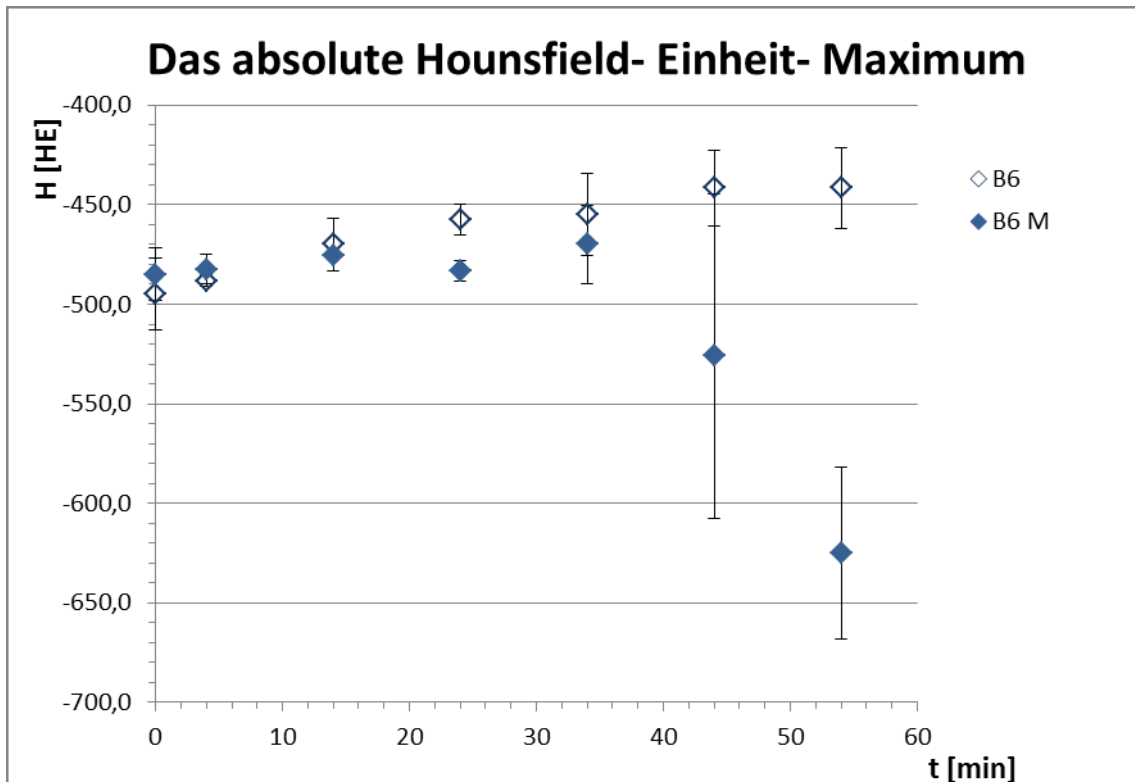
Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.2.3 Absolute Hounsfield- Einheit- Maxima

Die absoluten HE- Maxima  $H_{\text{abs}} (t, m_{\text{kum}})$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{\text{kum}}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ] sind bezogen auf das Lungengewebe ausnahmslos negative Werte, dargestellt in **Abb. 8**. Bezogen auf die Gruppe B6 liegen sie zwischen den Werten -495 HE und -442 HE (bei einer Standardabweichung von 3 HE bis 21 HE), während die Werte der Gruppe B6 M zwischen -625 HE und -470 HE



(bei einer Standardabweichung von 1 HE bis 82 HE) liegen. In Abhängigkeit von der Zeit nehmen die HE- Maxima der B6- Mäuse leicht zu, während die HE- Maxima der B6 M- Mäuse nach einer annäherungsweise plateauförmigen Phase in den letzten Messungen stark abnehmen. Daher wird der geringste Wert unter den HE- Maxima der B6- Mäuse am Anfang der Messreihe erreicht ( $H_{\text{abs}}(t = 0, m = 0)$  von -495 HE), wohingegen die B6 M- Gruppe den geringsten Wert zum letzten Zeitpunkt der Messreihe ( $H_{\text{abs}}(t = 54, m = 250)$  von -625 HE) aufweist. Ebenso werden die größten Werte der B6- Gruppe am Ende der Untersuchungsreihe erreicht; dabei entspricht  $H_{\text{abs}}(t = 44, m = 0)$  dem Wert  $H_{\text{abs}}(t = 54, m = 0)$  von -442 HE. Der größte Wert innerhalb der B6 M- Gruppe beträgt  $H_{\text{abs}}(t = 34, m = 50)$  von -470 HE.

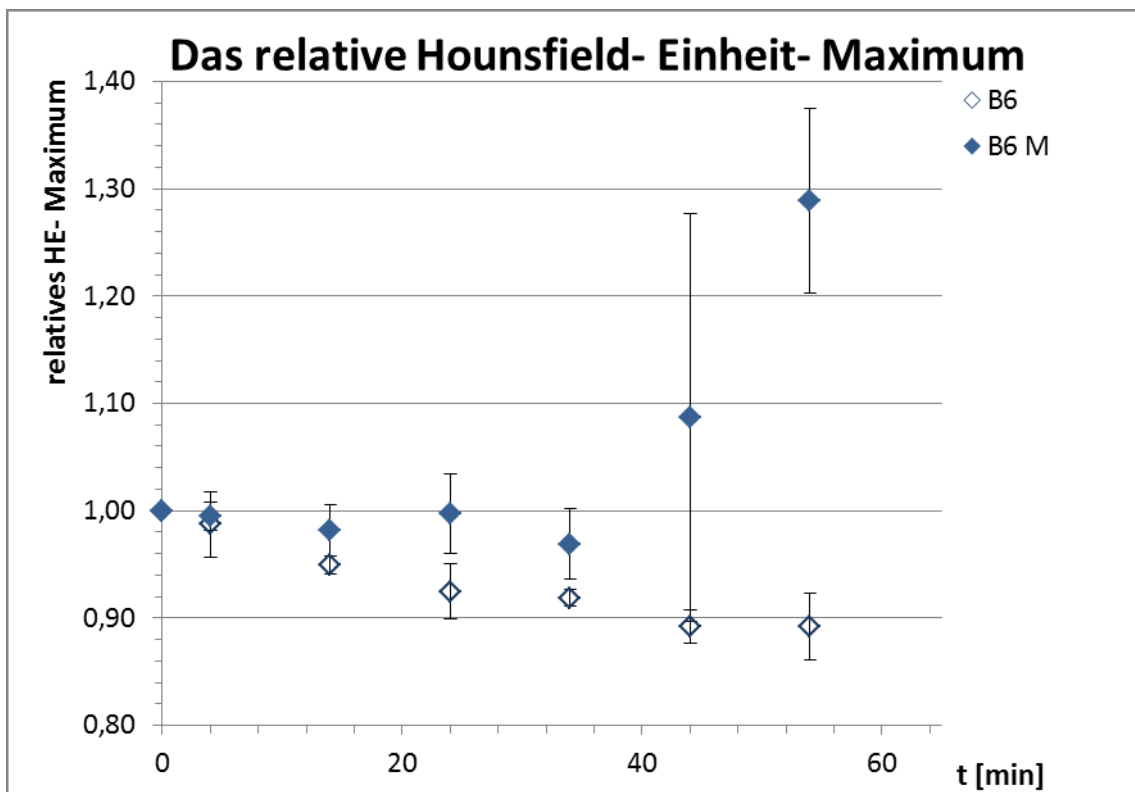


**Abb. 8. Darstellung des absoluten HU- Maximums als Funktion der Zeit.**

Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.2.4 Relative Hounsfield- Einheit- Maxima

Die relativen Werte der HE- Maxima  $H_{\text{rel}}(t, m_{\text{kum}})$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{\text{kum}}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ] sind dargestellt in **Abb. 9**. Sie liegen bzgl. der B6- Mäuse im Bereich 0,89 bis 1 (bei Standardabweichungen bis 0,03); bezogen auf die B6 M- Mäuse zwischen 0,97 und 1,29 (bei Standardabweichungen bis 0,19). Die Werte der B6- Mäuse nehmen im zeitlichen Verlauf leicht ab, so dass ihr größter Wert ( $H_{\text{rel}}(t = 0, m = 0)$  von 1) am Anfang der Messzeitreihe liegt, während diejenigen der B6 M- Mäuse in den letzteren Messungen stark zunehmen, ihr größter Wert ( $H_{\text{rel}}(t = 54, m = 250)$  von 1,29) somit am Ende der Messreihe liegt. Der niedrigste Wert der B6- Gruppe wird zum Zeitpunkt  $t = 54$  min mit dem Wert  $H_{\text{rel}}(t = 54, m = 0)$  von 0,89 erreicht. Derjenige der B6 M- Gruppe hingegen liegt bei  $H_{\text{rel}}(t = 34, m = 50)$  von 0,97.

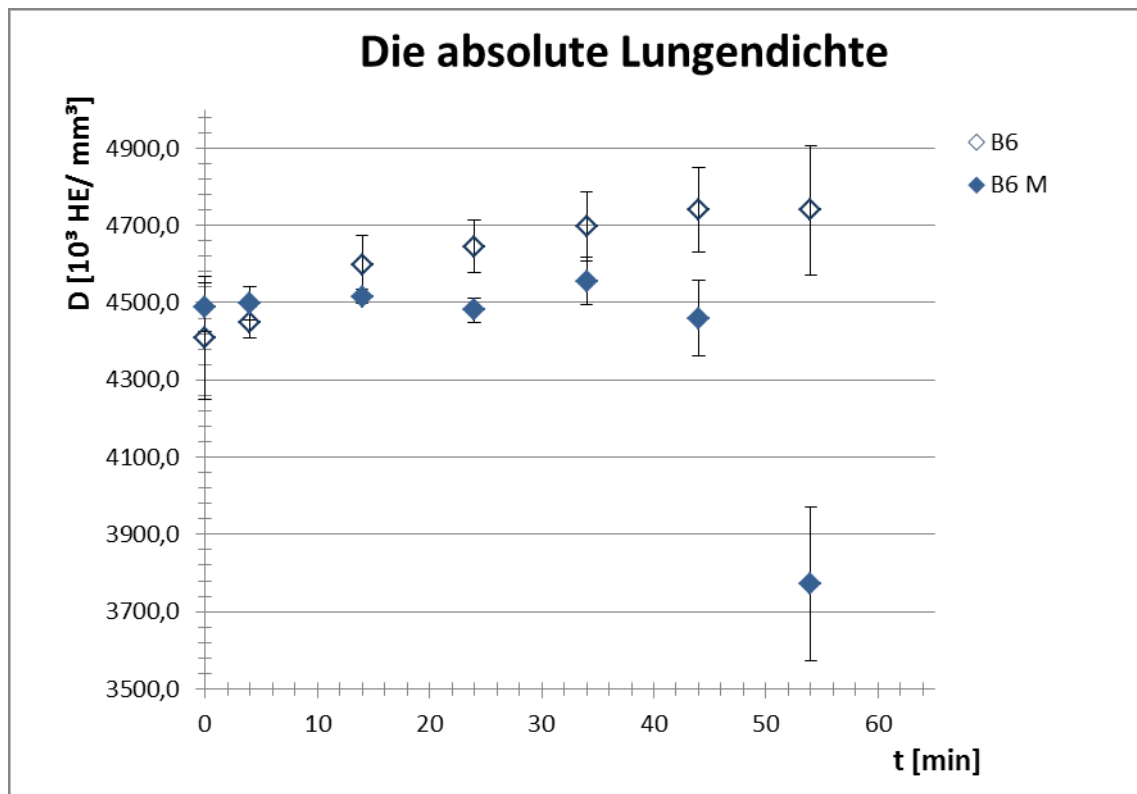


**Abb. 9. Darstellung des relativen HU- Maximums als Funktion der Zeit.**

Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.2.5 Absolute Lungendichten

Die absoluten Dichtewerte  $D_{abs}(t, m_{kum})$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{kum}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ] sind in **Abb. 10** dargestellt. Die Werte der Gruppe B6 liegen im Bereich von  $4408$  bis  $4739 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$  (bei einer Standardabweichung zwischen  $40$  und  $168 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$ ). Diejenigen der Gruppe B6 M liegen zwischen  $3772$  und  $4556 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$  (bei einer Standardabweichung im Bereich von  $18$  bis  $199 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$ ). Das Maximum der B6- Gruppe lautet  $D_{abs}(t = 44, m = 0)$  mit einem Wert von  $4739 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$ , während das Maximum innerhalb der B6 M- Gruppe  $D_{abs}(t = 34, m = 50)$  mit einem Wert von  $4556 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$  lautet. Das Minimum hingegen liegt am Anfang (bzgl. B6) bzw. am Ende (bzgl. B6 M) der Messreihe. Die beiden Werte lauten im Einzelnen  $D_{abs}(t = 0, m = 0)$  mit einem Wert von  $4408 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$  und  $D_{abs}(t = 54, m = 250)$  mit einem Wert von  $3772 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$  (Standardabweichung  $199 \times 10^3 \text{HE}/\text{mm}^3$ , entspricht der maximalen Standardabweichung dieser Versuchsgruppe).

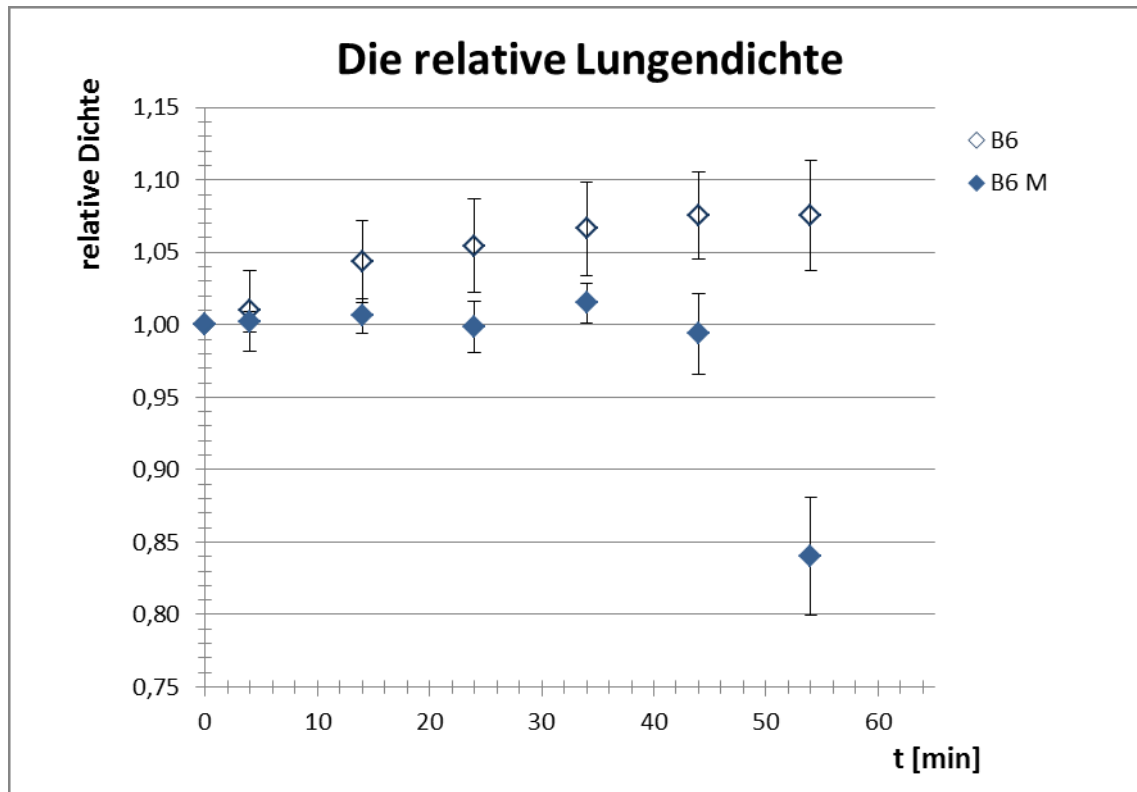


**Abb. 10. Darstellung der absoluten Lungendichte als Funktion der Zeit.**

Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.2.6 Relative Lungendichten

Die relative Dichte  $D_{\text{rel}}(t, m_{\text{kum}})$  beider Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] und der applizierten Methacholindosis  $m_{\text{kum}}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ] ist in **Abb. 11** dargestellt. Die Minimum liegt bei  $t = 0$  min bzgl. B6 ( $D_{\text{rel}}(t = 0, m = 0)$  mit einem Wert von 1) bzw.  $t = 54$  min bzgl. B6 M ( $D_{\text{rel}}(t = 54, m = 250)$  mit einem Wert von 0,84). Die Maxima beider Gruppen liegen in der zweiten Hälfte der Messreihe. Bezogen auf die B6-Gruppe lautet das Maximum  $D_{\text{rel}}(t = 44, m = 0)$  entsprechend  $D_{\text{rel}}(t = 54, m = 0)$  mit einem Wert von 1,08. Bezogen auf die B6 M- Gruppe liegt das Maximum bei  $D_{\text{rel}}(t = 34, m = 50)$  von 1,02. Daraus folgt, dass die relativen Dichtewerte der B6-Mäuse insgesamt im Bereich zwischen 1 und 1,08 und Diejenigen der B6 M- Mäuse im Bereich von 0,84 bis 1,02 liegen.



**Abb. 11. Darstellung der relativen Lungendichte als Funktion der Zeit.**

Gefüllte blaue Rauten weisen auf die mit Methacholin behandelten Mäuse (B6 M) hin, offene, unausgefüllte Rauten auf die Methacholin unbehandelten Mäuse (Kontrollmäuse B6). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Messzeitpunkt. Die Mittelung beruht auf einer Anzahl von jeweils drei Versuchstieren.

### 3.3 Ergebnisse der statistischen Analyse

Da die im anschließenden Abschnitt dargestellte statistische Betrachtung der Ergebnisse - wie in Kapitel 2.7 erläutert - hauptsächlich als Rechenbeispiel dient, werden die Parameter Volumen, HE- Maximum und Dichte pro Versuchsgruppe zusammenfassend betrachtet. **Tabelle 2** zeigt die Levene- und Post- Hoc- Testergebnisse der erfassten Lungenparameter ausgewertet nach der Zeitabhängigkeit. **Tabelle 3** zeigt die Levene- und Post- Hoc- Testergebnisse der erfassten Lungenparameter ausgewertet nach der Abhängigkeit der applizierten Methacholindosis.

### 3.3.1 B6

Die Varianzanalyse der Versuchsgruppe B6 liefert als Funktion der Zeit die in **Tabelle 2** aufgeführten Ergebnisse. Die Betrachtung des absoluten Volumens ergibt zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitpunkt. Beim relativen Volumen findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen erstem und letztem Zeitpunkt. Beim absoluten HE- Maximum findet sich ein signifikanter Unterschied zu den letzten zwei Untersuchungszeitpunkten. Beim relativen HE- Maximum finden sich sogar Unterschiede zwischen dem ersten und den letzten vier Zeitpunkten. Bei den absoluten oder relativen Dichten hingegen werden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zum ersten Untersuchungszeitpunkt hin gefunden.

Zusammenfassend für die Varianzanalyse der Versuchsgruppe B6 lässt sich sagen, dass nur sieben von insgesamt 36 mittels Post- Hoc- Test erhobenen p- Werten kleiner gleich 0,05 sind (siehe **Tabelle 2**) und ausschließlich im Rahmen des Scheffé- Tests erhobenen wurden. Diese treten v.a. in den Vergleichen der Gruppe  $t = 0$  min mit einer Gruppe zu einem fortgeschrittenen Untersuchungszeitpunkt von  $t = 44$  min oder  $t = 54$  min auf. Die meisten Ergebnisse im Teilgruppenvergleich sind folglich p- Werte  $> 0,05$ , so dass bei der Mehrheit der Werte kein signifikanter Unterschied gefunden wird.

Lungenparameter / p- Werte	Volumen Vol		HE- Maximum H		Dichte D	
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
<b>Levene-Test- p- Wert</b>	0,888	0,224	0,225	0,074	<b>0.01</b>	0.214
<b>Scheffé- oder Tamhane- <math>T_2</math>- Post Hoc- Test zwischen folgenden Gruppen:</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>S</b>
t = 0 min/ t = 4 min	1	1	0,999	0,996	1	1
t = 0 min/ t = 14 min	0,993	0,706	0,706	0,248	0.978	0.761
t = 0 min/ t = 24 min	0,97	0,368	0,278	<b>0,029</b>	0.911	0.543
t = 0 min/ t = 34 min	0,894	0,093	0,218	<b>0,017</b>	0.773	0.327
t = 0 min/ t = 44 min	0,884	0,07	<b>0,05</b>	<b>0,001</b>	0.646	0.2
t = 0 min/ t = 54 min	0,856	<b>0,049</b>	<b>0,05</b>	<b>0,001</b>	0.776	0.201

**Tabelle 2. P- Wert- Ergebnisse des Levene- und des jeweiligen Post Hoc- Tests von Versuchsgruppe B6 - ausgewertet als Zeitfunktion.**

Berechnet wurden jeweils die unterschiedlichen Lungenparameter absolutes (abs.) und relatives (rel.) Volumen, absolutes und relatives HE- Maximum, absolute und relative Dichte, untersucht an Methacholin unbehandelten Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten t [min]. Bei Levene- Test- p- Werten größer als 0,05 wurde ein Scheffé- Post- Hoc- Test (durch ein „S“ angegeben) gerechnet. Bei Levene- Test- p- Werten kleiner gleich 0,05 wurde ein Tamhane-  $T_2$ - Post- Hoc- Test (durch ein „T“ gekennzeichnet) gerechnet. Die Post- Hoc- Testergebnisse werden jeweils für den Vergleich der Werte zum Zeitpunkt t = 0 min mit den Werten der anderen Untersuchungszeitpunkte aufgeführt. Sämtliche Ergebnisse kleiner gleich 0,05 sind fett geschrieben, Post- Hoc- Testergebnisse kleiner gleich 0,05 sind zudem grau unterlegt.

### 3.3.2 B6 M

Die Varianzenanalyse der Versuchsgruppe B6 M als Funktion der Methacholindosis liefert die in **Tabelle 3** dargestellten Ergebnisse. Die Betrachtung des absoluten und relativen Volumens ergibt bei keinem Wert von  $m_{\text{kum}}$  Unterschiede verglichen mit dem Methacholin unbehandelten Zustand ( $m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ ). Dies trifft auch für die absoluten und relativen HE- Maxima und die absolute Dichte zu. Bei der relativen Dichte findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen Anfangs- und Maximaldosis, d.h. zwischen erster und letzter Messung. Bis auf einen einzigen p- Wert sind alle

Ergebnisse daher größer als 0,05, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianzen der Teilgruppen ermittelt werden können.

Lungenparameter / p- Werte	Volumen Vol		HE- Maximum H		Dichte D	
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
<b>Levene- Test- p- Wert</b>	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0.006</b>	0.067
<b>Scheffé- oder Tamhane- <math>T_2</math>- Post Hoc- Test zwischen folgenden Gruppen:</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>S</b>
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 5 \mu\text{g/ kg KG}$	1	0,696	1	1	1	1
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 10 \mu\text{g/ kg KG}$	0,910	0,784	1	1	1	1
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 25 \mu\text{g/ kg KG}$	0,985	0,784	1	1	1	1
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 50 \mu\text{g/ kg KG}$	0,173	0,178	1	0,997	0.998	0.991
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 100 \mu\text{g/ kg KG}$	1	1	1	1	1	1
$m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG} -$ $m_{\text{kum}} = 250 \mu\text{g/ kg KG}$	0,936	0,884	0,382	0,45	0.311	<b>&lt; 0.001</b>

**Tabelle 3. P- Wert- Ergebnisse des Levene- und des jeweiligen Post Hoc- Tests von Versuchsgruppe B6 M - ausgewertet als Methacholin-Dosisfunktion.**

Analyse der unterschiedlichen Lungenparameter anhand unterschiedlicher statistischer Tests (identisch zu den in **Tabelle 2** dargestellten Berechnungen) in Abhängigkeit von der verabreichten kumulativen Methacholindosis  $m_{\text{kum}}$  [ $\mu\text{g/ kg KG}$ ] von 5, 10, 25, 50, 100 und 250  $\mu\text{g/ kg KG}$ . Die Post- Hoc- Testergebnisse werden jeweils für den Vergleich der Werte bei kumulativer, applizierter Methacholindosis  $m_{\text{kum}} = 0 \mu\text{g/ kg KG}$  mit den anderen applizierten Methacholindosen aufgeführt. Sämtliche Ergebnisse kleiner gleich 0,05 sind fett geschrieben, Post- Hoc- Testergebnisse kleiner gleich 0,05 sind zudem grau unterlegt.



## **4. Diskussion**

Nach einer Einleitung folgen die Ergebnis- und die Fehlerdiskussion sowie ein Ausblick auf zukünftige Folgestudien, welche sich aus dieser Arbeit ergeben.

### **4.1 Einleitung**

Die Untersuchung der fpVCT- Maus- Lungendaten wurde mit dem Ziel durchgeführt, ein neu entwickeltes Programm in seiner Funktion der Bestimmung von Volumen, HE-Maximum und Dichte für Folgestudien zu überprüfen. Die Robustheit des Programms sollte einerseits an relevanten, experimentell gewonnenen Beispieldatensätzen evaluiert werden, andererseits sollte auch untersucht werden, inwiefern jeweils die absoluten und relativen Lungenparameter Vol, H und D dazu geeignet sind, tierexperimentelle Unterschiede in Lungenstudien zu detektieren. Zugrunde lagen 78 Datensätze, bestehend aus Bildmaterial der fpVCT. Nach der Segmentierung der murinen Lunge in den fpVCT- Bildern konnte die Berechnung des Lungenvolumens durch die Multiplikation der segmentierten Voxelanzahl mit der Voxelgröße erfolgen. Zudem wurden automatisch Histogramme erstellt, in denen das Lungenvolumen gegen die HE dargestellt wurde, so dass H abgelesen werden konnte. D konnte durch die Division der summierten HE der segmentierten Lunge durch das Volumen bestimmt werden. Die o.g. Datenerhebung wurde mit der Erwartung durchgeführt, dass sich die Lungenwerte der Kontrollmäuse in Abhängigkeit von der Zeit nicht ändern, im Gegensatz zu den mit dem lungenwirksamen Methacholin behandelten Mäusen. Entsprechend wurde das Versuchsprotokoll geplant und aufgestellt.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Es folgt die Diskussion der Programmevaluation, der generellen Abhängigkeit der erhobenen Lungenparameter von der Untersuchungszeit sowie separat jedes einzelnen Lungenparameters.

#### 4.2.1 Programmevaluation

Anhand der Lungenuntersuchung konnte die Programmevaluation als Ziel dieser Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden, da das Programm zuverlässig funktioniert hat. So konnte die Analyse der sechs Untersuchungsserien in Bezug auf alle erfassten Lungenparameter einwandfrei durchgeführt, d.h. die Lunge aller Versuchstiere segmentiert und ausgewertet werden. Bisher ist ein Programm, welche die Parameter Volumen, HE- Maximum und Dichte bestimmt, nicht kommerziell erhältlich.

Ein genereller Vorteil des Computerprogramms ist die studienorientierte Datensatzauswertung, durch welche komplette Untersuchungsserien innerhalb eines Programmablaufes analysiert werden können. Generell sind in der Radiologie nur andere Ansätze der Bildanalyse bekannt, welche patientenorientiert im Sinne einer klinikalltagsgerechten, individuellen Auswertung vorgehen. Dabei werden jeweils Einzeluntersuchungen ausgewertet, jedoch keine Untersuchungsserien.

#### 4.2.2 Abhängigkeit von der Zeit

Anhand der erhobenen Daten konnte die ursprüngliche Hypothese, dass das Lungenvolumen unabhängig von der Zeit ist, widerlegt werden. Denn die Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigen, dass sich die Werte der Lungenparameter im zeitlichen Verlauf stetig messbar ändern (siehe **Abb. 6** bis **11**). Dieser unerwartete Befund erschwert die ursprünglich geplante Auswertung der Ergebnisse, welche anhand des Versuchsprotokolls (**Tab. 1**) ermittelt wurden, bei dessen Erstellung nicht von einer zeitlichen Abhängigkeit der Parameter ausgegangen wurde. Bei der Ursprünglich geplanten Auswertung des Versuchsprotokolls war der Vergleich der Gruppen B6 versus B6 M als Funktion der Methacholindosis mit einer statistischen ANOVA 1 angedacht. Dies wird in **Abb. 6** bis **11** bereits durch die jeweils gemeinsame Auftragung der Gruppen B6 und B6 M verdeutlicht, welche den Betrachter durch die Auftragsart zum visuellen Vergleich zwingen. Das Auffinden eines zusätzlichen Untersuchungsparameters – nämlich der Untersuchungszeit – hätte statistisch eine ANOVA 2- Analyse erfordert. Bei dem relativ geringen Stichprobenumfang von drei Mäusen je Gruppe und einem derartig komplex verwobenen Zusammenhang der Untersuchungsparameter erschien es als zu wagemutig, eine Experimentauswertung in dieser Richtung anzudenken. Deshalb wurde die B6- Gruppe als Zeitfunktion und die B6 M- Gruppe als Methacholindosisfunktion, jeweils nur eigenständig als ANOVA 1

ausgewertet. Dies ist für diese Arbeit, welche nur das erstellte Computerprogramm evaluieren soll, völlig hinreichend.

Der Befund der Zeitabhängigkeit der verschiedenen evaluierten Lungenparameter lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass vermutlich doch lungenbeeinflussende Faktoren auf die Kontrollmäuse einwirkten; sie erhielten jedoch lediglich die i.p. applizierten Anästhetika und den Puffer NaCl (siehe Kapitel **2.1**). Diese Anästhetika bzw. die Narkosetiefe könnten einen Einfluss auf das vegetative Nervensystem und somit auf die Lunge haben. Die verwendeten Wirkstoffe könnten dabei als Einzelsubstanz oder in der hier angewandten Kombination diesen „Anästhesieeffekt“ in Bezug auf die Lunge aufweisen. Ketamin verfügt über eine relaxierende Wirkung auf die bronchiale Muskulatur und kann daher notfalltherapeutisch bei Asthmatikern verwendet werden (Karow & Lang- Roth 2012). In der verwendeten Kombination Xylazin/ Ketamin werden sympathikolytische Wirkungen des Xylazins (Vetpharm 2013) durch sympathomimetische Wirkungen des Ketamins in unterschiedlichem Ausmaß antagonisiert.

Ein weiterer Einfluss auf das Lungenvolumen bzw. das vegetative Nervensystem ist durch eine Auskühlung der jeweiligen Maus während der Generalanästhesie (Taylor 2007) denkbar. Die Hypothermieanfälligkeit liegt im Verhältnis der relativ großen Körperoberfläche zur Körpermasse der Maus (Taylor 2007) begründet, kombiniert mit einer durch die Narkose gehemmten Thermoregulation (Insler & Sessler 2006). Dadurch verläuft die Entwicklung einer Hypothermie schnell (Taylor 2007, Regensburg 2011), welche wiederum das vegetative Nervensystem beeinträchtigt (Kushikata et al. 2005). Simons Untersuchungen (Simon 1969) zeigen, dass sich unter spinaler Hypothermie der Sympathikotonus ändern kann, es bei funktionierender Kreislaufregulation aber nur zu gering ausgeprägten Veränderungen im Gesamtkreislauf kommt. Hierunter würden auch Veränderungen des Lungenvolumens fallen, so dass es fraglich ist, ob Hypothermie bei Nagern einen (bemerkbaren) Einfluss auf das Lungenvolumen haben könnte.

Bis zum Vorliegen neuer Daten aus Vergleichsstudien (siehe Kapitel **4.4**) lässt sich somit diese zentrale Beobachtung eines abnehmenden Lungenvolumens (bei gleichzeitig zunehmender Lungendichte) daher nur mit einem in Anführungsstrichen gesetzten „Anästhesieeffekt“ in Verbindung bringen.

### 4.2.3 Absolute Lungenvolumina

Die in **Abb. 6** graphisch dargestellte, vergleichsweise große und homogene Standardabweichung verdeutlicht, wie sehr die absoluten Werte variieren. Diese individuell ausgeprägte Streuung ist so groß, dass jeglicher Effekt beeinflussender Substanzen durch sie verschleiert werden und auch eine geringere Signifikanz der Unterschiede im Gruppenvergleich verursachen kann. Aus **Tabelle 2** und **3** wird ersichtlich, dass kein signifikanter Unterschied ermittelt werden kann. Daher ist die Normierung der absoluten Werte bedeutsam, was sich jedoch nicht als trivial herausstellt. Zum Eichen der Parameter könnte sich hypothetisch die Relation zum Körpergewicht der Maus eignen. Der Korrelationsgrad zwischen Lungengröße und Körpergewicht scheint allerdings unsicher, was in den Bereich der intraspezifischen Allometrie<sup>2</sup> fällt. Das bedeutet im Falle der Lungenuntersuchung, dass große Mäuse nicht einfache Vergrößerungen kleinerer Mäuse sind, sondern unterschiedliche Proportionen aufweisen und sich daher ihre Lungengröße oder ihr Lungenvolumen nicht linear zum Körpergewicht verhalten muss. Aufgrund der oftmals fehlenden oder unvollständigen, allometrischen Daten (Lindstedt & Schaeffer 2002) wären in diesem konkreten Fall weitere und aufwändige Studien zur Untersuchung der Relation zwischen den Lungenparametern und des Körpergewichts erforderlich. Daher ist in dieser Arbeit die Normierung der absoluten Werte auf den jeweiligen, individuellen Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t = 0$  min sinnvoll.

### 4.2.4 Relative Lungenvolumina

Verglichen mit den absoluten Werten führen die relativen Volumenwerte in den statistischen Teilgruppenvergleichen vorwiegend zu geringeren p- Werten. Im letzten Teilgruppenvergleich in Abhängigkeit von der Zeit liegt der p- Wert sogar unterhalb des Signifikanzniveaus, d.h. es wurde ein signifikanter Unterschied detektiert (siehe **Tabelle 2**). Dadurch wird deutlich, dass die Normierung der Lungenvolumina sinnvoll ist.

---

<sup>2</sup>(von griechisch ἄλλος (allos) = andere/r/s und μέτρο (metro) = Maß); beschreibt die disproportionalen Unterschiede u.a. von anatomischen Eigenschaften, welche unterschiedlichen „Prinzipien des Designs“ unterliegen (Lindstedt & Schaeffer 2002). Dabei handelt es sich selten um lineare Extrapolationen z.B. des Körpergewichts (Stahl 1967; Lindstedt & Schaeffer 2002; Fritz 2007).

#### 4.2.5 Absolute HE- Maxima

Die absoluten HE- Maxima haben im Gegensatz zum absoluten Volumen eine allgemeinere Aussagekraft, da sie nicht von der Größe einer Maus bzw. vom absoluten Volumen abhängen. Der Grund dafür ist, dass das absolute Lungenvolumen (entsprechend der y- Achse in **Abb. 5**) bei der Bestimmung des HE- Maximums anhand der Histogramme (siehe **Abb. 5**) keine Bedeutung hat. Sie führen in den beiden letzten Teilgruppenvergleichen in Abhängigkeit von der Zeit zu signifikanten Unterschieden (siehe **Tabelle 2**), und eignen sich somit mehr als die beiden zuvor genannten Parameter zur Detektion von signifikanten Unterschieden.

#### 4.2.6 Relative HE- Maxima

Die Normierung der HE- Maxima auf den jeweiligen Ausgangswert ist nicht ergänzend zur besseren Vergleichbarkeit durchgeführt worden, denn die p- Werte dieses Parameters sind bei den statistischen Teilgruppenvergleichen in Abhängigkeit von der Zeit niedriger als diejenigen der absoluten Werte. Dies deutet auf individuelle Merkmalsausprägungen der Mäuse hin. Signifikante Unterschiede zwischen den Teilgruppen in Abhängigkeit von der Zeit werden im Gegensatz zu den anderen Parametern schon zu früheren Messzeitpunkten (d.h. in den letzten vier Teilgruppenvergleichen, siehe **Tabelle 2**) ermittelt. Somit stellen die relativen HE- Maxima aufgrund der höchsten Unterscheidbarkeit den Effektivsten der Lungenparameter in der Zeitserie dar.

#### 4.2.7 Absolute Lungendichten

Die absolute Dichte hat im Gegensatz zum absoluten Volumen eine allgemeinere Aussagekraft, da sie als Quotient von HE- Masse und Volumen bereits eine Normierung auf das interindividuell variierende Volumen aufweist. Dennoch führt sie im statistischen Teilgruppenvergleich weder in Abhängigkeit von der Zeit, noch von der kumulativen Methacholindosis zu signifikanten Unterschieden. Dadurch erscheint zusätzlich eine Normierung auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt  $t = 0$  min sinnvoll.

#### **4.2.8 Relative Lungendichten**

Im statistischen Teilgruppenvergleich der Zeitserie führen die relativen Dichtewerte zu geringeren p- Werten als die absoluten Dichtewerte d.h. sie sind abhängig von individuellen Merkmalsausprägungen der Mäuse, was eine Normierung auf den Ausgangswert erforderlich macht. Eventuell prägt der tatsächliche gesundheitliche Zustand der jeweiligen Maus die Lungendichte. Möglicherweise könnten restriktive Lungenerkrankungen wie eine Fibrosierung, d.h. eine Bindegewebsvermehrung in der Lunge (Moore & Hogaboam 2008), die Dichte der murinen Lunge erhöhen.

Zudem detektieren die relativen Werte in der Methacholindosis- Serie als einziger Parameter einen signifikanten Unterschied und weisen somit die höchste Unterscheidbarkeit auf. Daher stellt die relative Dichte - als Normierung der absoluten Dichte auf den jeweiligen Ausgangswert - den Effektivsten der Lungenparameter in Abhängigkeit von der Methacholindosis dar.

### **4.3 Fehlerdiskussion**

Im Folgenden werden einzelne mögliche Fehlerquellen bezogen auf das Computerprogramm und seinen Ansatz bei der Volumetrie sowie bezogen auf das Messprotokoll diskutiert.

#### **4.3.1 Ermitteln des Tracheapunkts**

Bei der Nutzung von Programm 1 ist auf die korrekte Positionierung des Messkreises zu achten, so dass dieser komplett innerhalb des Mauskörpers liegt und eine einwandfreie Segmentierung ermöglicht wird. Der Kreismittelpunkt muss dabei nicht zwangsläufig im anatomischen Zentrum der Trachea liegen und kann flexibel gewählt werden, da mehrere Koordinaten des Kreismittelpunktes die o.g. korrekte Lage des Messkreises ermöglichen. Schließlich ist der Messkreis um ein Vielfaches größer als die Trachea, so dass ihr gesamter Querschnitt in den Messkreis sicher eingeschlossen ist. Durch die anschließende, visuelle Kontrolle und die Möglichkeit, manuelle Korrekturen des gewählten Punktes durchführen zu können, werden dem Programm 2 ausschließlich Daten zugeführt, die eine exakte Lungensegmentation ermöglichen.

In Vorversuchen der Programmentwicklung wurden gering variierende Messkreispositionen am gleichen Datensatz getestet, welche jeweils zu gleichen Lungenvolumina führten. Sehr große Variationen der Messkreisposition, die dazu führen, dass der Luftraum außerhalb der Maus fälschlicherweise als Lunge segmentiert wird, führen hingegen zu unsinnig großen Volumina, die ein murines Lungenvolumen um ein Vielfaches übersteigen - und hierdurch auch trivial erkannt werden können.

#### 4.3.2 Messgenauigkeit

In dieser Arbeit wird die Genauigkeit der Volumetrie durch Bewegungsartefakte (im Englischen „motion artifacts“). beeinflusst, welche im Allgemeinen durch mangelnde absolute Bewegungslosigkeit des Versuchstiers während der radiologischen in vivo-Untersuchung entstehen. Die kaum vermeidbaren kardialen und respiratorischen Bewegungsartefakte werden in der Literatur im Rahmen unterschiedlicher Methoden der Bildgebung erwähnt (Presson et al. 2011; Fuerst et al. 2012; Schöndube et al. 2013). Die frei atmende Maus verursacht radiologische Artefakte durch Atemexkursionen (Presson et al. 2011) mit einer Frequenz von ca. 70 bis 220 min<sup>-1</sup> (Green 1981; Harkness & Wagner 1989). Das bedeutet, dass ca. 10 bis 30 Atemzüge während einer fpVCT- basierten Untersuchung von 8 s Dauer auftreten. Diese Atemexkursionen innerhalb der physiologischen Atemschleife führen zu einer artifiziellen Verschwommenheit der Bilder, welche in unserem Experimentaufbau unvermeidlich ist (siehe **Abb.2**). Um diese Artefakte zu minimieren, könnten die Nager intubiert und an einen Luftdruckregulator angeschlossen werden, welcher während der Messdauer für einen konstanten Druck sorgen würde (Guerrero et al. 2006). Die Beatmung würde demnach kurzzeitig sistiert (Wearn et al. 1934, zitiert nach Presson et al. 2011), so dass die auf diese Weise durchgeführte Messung äquivalent zu einer Messung bei gehaltenem Atem wäre (Guerrero et al. 2006). Solche Messmethoden, bei denen die regulären Atemexkursionen verhindert werden, weisen jedoch immer noch Bewegungsartefakte durch den murinen Herzschlag (Presson et al. 2011) mit einer Frequenz von ca. 400 bis 700 min<sup>-1</sup> (Green 1981; Harkness & Wagner 1989) auf. Der Vorteil der zugrunde liegenden Lungenuntersuchung ist, dass man durch die enorm hohe Atemfrequenz der Maus in Zusammenhang mit der 8- sekündigen Untersuchungsdauer von einer radiologischen Mittelung der Atemexkursionen und somit der Bewegungsartefakte sprechen kann. In der zugrunde liegenden Arbeit wird daher zwischen diesen unvermeidbaren kleinen

(siehe **Abb. 2A**) und starken (siehe **Abb. 2B**) Bewegungsartefakten unterschieden, wobei Letztere bei der visuellen Vorkontrolle zum Ausschluss aus der gesamten Auswertung führten (siehe Kapitel **2.5**).

Die Messgenauigkeit des Programms wurde insgesamt nur implizit ermittelt. Bei einer großen Streuung der Messwerte wären die in Kapitel **3** beschriebenen Verläufe der Werte, bei denen auch Unterschiede zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messpunkten ermittelt wurden, nicht gefunden worden. Um einen prozentualen Messfehler zu ermitteln, hätten u.a. Phantomstudien (Weber 2005) durchgeführt werden können. Für diese Arbeit wurde allerdings direkt das komplexere Mausmodell gewählt. Einerseits sind damit zwar ein experimenteller Eingriff in den tierischen Organismus und somit teils nicht reproduzierbare Ergebnisse verbunden, aber andererseits erscheint es realitätsnaher und wesentlich praxisrelevanter, als jegliche Phantomstudie, welche mittels fpVCT durchgeführt werden könnte.

Theoretisch ließe sich ein Vergleich zwischen der IDL- gestützten Datenanalyse und einer manuellen Volumetrie an der AW durchführen. Die manuelle Methode würde jedoch aufgrund eines hohen Arbeitsaufwands kaum praktikabel sein. Manuelle Voruntersuchungen an der AW zeigten, dass man zur sorgfältigen Segmentierung einer Mauslunge zu einem einzigen Messzeitpunkt schon bis zu 4h benötigt (Obert 2013). Zudem beinhalten die erhaltenen Volumina eine große Variabilität, welche zu kaum brauchbaren Ergebnissen führt. So berichtet Obert, dass bei manueller Volumetrie des murinen Femurs 20%ige Messfehler auftraten, ohne dass sich visuell ein wirklicher Unterschied zwischen verschiedenen segmentierten Femurknochen wahrnehmen ließ. Die beiden Parameter HE- Maximum und Dichte hätten zudem nicht manuell bestimmt werden können, da die AW über keine Programmooptionen verfügt, welche diese Parameter angibt. Auch Ukil und Mitarbeiter stellen dar, dass die manuelle Lungensegmentierung zeitintensiv und gegenüber Interobserver- Variationen anfällig ist, während die automatisierte Segmentierung zu reproduzierbaren Ergebnissen führt und zeitsparend ist (Ukil & Reinhardt 2005). In dieser Arbeit wurden nur ca. 30 min für die Auswertung von 13 Datensätzen einer jeden Mausserie benötigt. Das ergibt drei Stunden Rechenzeit zur Auswertung aller 78 Datensätze. Dies steht ca. 312 Stunden einer manuellen Auswertung gegenüber, die nur einen personenabhängigen, manuellen versus automatischen Lungenvolumetrie-Vergleich ermöglicht hätte. Deshalb wurde in dieser Arbeit von manuellen Vergleichen abgesehen.



### 4.3.3 Versuchsprotokoll

Wie in **Tab. 1** dargestellt, wurden von den aufeinanderfolgenden Werten, zwischen denen keine Methacholingabe erfolgte, der arithmetische Mittelwert berechnet und für die weitere Auswertung der Studienergebnisse verwendet. Dieses Vorgehen basierte auf der nun falsifizierten Annahme, dass das Lungenvolumen nicht von der Zeit abhängt. Zwischen den gemittelten Messpunkten wurde zwar kein Methacholin appliziert, aber zwischen ihnen lag jeweils ein Zeitraum von 4 min, innerhalb dessen Veränderungen des Lungenvolumens stattfinden konnten. Somit ist diese Art der Mittelung vor dem Hintergrund des „Anästhesieeffekts“ methodisch gesehen als fraglich zu beurteilen.

### 4.3.4 Pharmakodynamik und -Kinetik des Methacholins

Methacholin wirkt als Azetylcholinderivat am Erfolgsorgan Lunge an muskarinischen Rezeptoren, welche sich auf den glatten Muskelzellen der Atemwege, den submukösen Drüsen und Blutgefäßen befinden (Coulson & Fryer 2003, Gosens et al. 2006). Die Funktion des cholinergen Systems bezieht sich daher u.a. auf die Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur und Förderung der Mukussekretion (Coulson & Fryer 2003). Somit wird deutlich, dass Methacholin auf den *Bronchialbaum* wirkt. In dieser Arbeit wurden jedoch nicht die Atemwege separat, sondern nur als Teil der *gesamten* Lungenquerschnittsfläche innerhalb der Schnittbilder betrachtet. Somit ist das verwendete Programm nicht befähigt, die Methacholin-induzierten Veränderungen am Bronchialsystem isoliert darzustellen, was die Validität dieses Messverfahrens mindert. Das erklärt vermutlich, weshalb bei geringer  $m_{\text{kum}}$  keine wesentlichen Veränderungen an der Lunge ermittelt werden konnten. Möglicherweise sind diese Veränderungen getrennt betrachtet sehr deutlich, aber in Relation zur gesamten Lungenquerschnittsfläche so gering, dass sie bei dieser Art der Bildanalyse erst bei höherer  $m_{\text{kum}}$  erfasst werden.

Eine mögliche Ursache für den Lungenvolumenzuwachs der Gruppe B6 M (siehe Kapitel 3.2) zu fortgeschrittenem Messzeitpunkt kann das verabreichte Methacholin sein, welches die Mäuse durch seine bronchospastische Wirkung in einen asthmatischen Zustand versetzen konnte. Dieser ist von einem hohen Atemwegswiderstand gekennzeichnet, der eine Luftfalle begünstigt: Die inspirierte Luft kann nur erschwert ausgeatmet werden. Der in der Folge erhöhte Luftanteil der Lunge

zeichnet sich dadurch ab, dass mit höherer  $m_{\text{kum}}$  zunehmend negativere HE in den Voxeln der Lunge dominieren – die Lunge wird hypodenser (siehe Kapitel 2.6). Dies bedeutet, dass sich das HE- Maximum in den Histogrammen im Laufe der Zeit zu negativeren Werten verschiebt, was einer Linksverschiebung entspricht. Ein graphisches Beispiel liefert **Abb. 5**. Auch der zeitliche Verlauf der absoluten und relativen Dichtewerte demonstriert eine Dichteabnahme, was auf eine Überblähung der Lunge im Zuge des Bronchspasmus hinweisen kann.

Aus engmaschigen Messprotokollen von Methacholin- Provokationstests (American Thoracic Society 1999) lässt sich ein früher Wirkeintritt des Methacholins ableiten. Es liegen pharmakologische Daten vor, dass die Wirkung von Methacholin schnell einsetzt, nach ca. 1 bis 4 min ihr Maximum erreicht und bis zu ca. 15 bis 75 min anhalten kann (Drug Area 2013). Juniper und Mitarbeiter (Juniper et al. 1978) beschreiben einen geringen, dennoch signifikanten, kumulativen Dosis-effekt von inhalativ verabreichtem Methacholin. Der Abbau von Methacholin im Organismus erfolgt durch unspezifische Cholinesterasen, wobei die Abbaugeschwindigkeit verglichen mit Azetylcholin verlangsamt ist (Schwabe & Paffrath 2001, Frey & Löscher 2009). Der enzymatische Abbau von Azetylcholin hingegen erfolgt so schnell, dass sich diese Substanz nicht als Arzneimittel eignet (Frey & Löscher 2009), woraus folgt, dass die Halbwertszeit von Methacholin vermutlich relativ gering ist. Anhand dieser pharmakologischen Daten lässt sich bezogen auf die vorliegende Arbeit vermuten, dass der Effekt des applizierten Methacholins auf die murine Lunge unmittelbar nach der jeweiligen Verabreichung eintrat und es bei 10- minütigen Intervallen zwischen den Medikationen zu einer kumulativen Wirksteigerung kommen konnte. Dies würde sich in einem übermäßig stark zunehmenden Bronchospasmus äußern, welcher die o.g. Überblähung der Lunge mit zunehmendem Volumen begünstigen würde.

#### 4.4 Ausblick

Aus dieser Arbeit gehen folglich neue Fragestellungen und Erkenntnisse hervor, welche sich auf den Entwurf zukünftiger Studien auswirken. Dies wird im Folgenden dargestellt.

#### **4.4.1 Weiterentwicklung des Computerprogramms**

Der erfolgreiche Einsatz der o.g. Computerprogramme konnte in dieser Arbeit verifiziert werden. Zukünftige Programmversionen könnten durch eine kürzere Rechenzeit und einen höheren Automatisierungsgrad jedoch noch benutzerfreundlicher gestaltet werden. Bewegungsartefakte und der Tracheapunkt könnten automatisch durch das Programm selbst erkannt werden, wodurch nur noch ein Hauptprogramm erforderlich wäre. Um die o.g. Wirkung des Methacholins auf die Lunge zu untersuchen, wäre zudem die Entwicklung eines Computerprogramms sinnvoll, welches den Durchmesser bzw. das Volumen der Atemwege bestimmt.

#### **4.4.2 Messgenauigkeit und Gütekriterien**

Für Folgestudien ließe sich ein spezieller Versuchsaufbau zur Ermittlung der Messgenauigkeit aufstellen, beispielsweise anhand von Lungenphantomen. Weber verwendete in seiner Arbeit genormte Kunststoffkugeln mit einem vom Hersteller angegebenen Durchmesser, mithilfe dessen das Volumen berechnet und mit den Ergebnissen aus einer automatisierten Bildanalyse verglichen werden konnte (Weber 2005). Dies wäre bezogen auf diese Arbeit eine denkbare Lösung, wenn die genormten Phantome eine lungengewebsähnliche (radiologische) Dichte aufweisen. Kommerziell erhältlich sind gewebeäquivalente Materialien, u.a. lungengewebsäquivalente Produkte (Gammex 2013). Es ließen sich zudem dieselben Mäuse mehrfach untersuchen, d.h. die gleichen Experimente unter identischen Bedingungen an z.B. unterschiedlichen Tagen komplett wiederholen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse - als ein Gütekriterium des angewandten Messverfahrens - zu überprüfen. Die wenigen erforderlichen, manuellen Abmessungen ließen sich zur Überprüfung der Objektivität von unterschiedlichen Untersuchern durchführen.

#### **4.4.3 Versuchsprotokoll**

In einem neuen Studienprotokoll sollte die gefundene Abhängigkeit der Parameter von der Zeit Berücksichtigung finden, um die Ergebnisse aussagekräftiger werden zu lassen. Bei erneuten Untersuchungen ist daher darauf zu achten, dass das Protokoll vereinfachter gestaltet wird, beispielsweise durch vereinheitlichte Stufengröße der Dosiserhöhung, um die Ergebnisauswertung zu erleichtern.

#### **4.4.4 Versuchsaufbau**

Im Versuchsaufbau zukünftiger Studien könnten andere Anästhetika Verwendung finden. Ein Gegenversuch z.B. mit der ebenfalls veterinärmedizinisch bekannten Kombination Xylazin- Zoletil® (Vetpharm 2013) könnte durchgeführt werden, um den möglichen „Anästhesieeffekt“ bzw. den Einfluss der gewählten Anästhetika auf das murine Lungenvolumen zu ergründen. Es ließe sich auch eine Untersuchung mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (z.B. Forene®, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG (Arzneimittel- Datenbank 2013)) als Gegenprobe durchführen. Dabei ist zu beachten, dass Isofluran über respiratorische Nebenwirkungen wie Atemdepression und vermehrter Schleimsekretion verfügt (Karow & Lang- Roth 2012). Bei Verwendung des neueren und nebenwirkungsärmeren Sevoflurans (Sevorane®, siehe Kapitel 2.1) wäre dies nicht der Fall (Pharmazie 2013, Karow & Lang- Roth 2012).

Dabei wäre es zusätzlich aufschlussreich, die Tiefe der Generalanästhesie zu untersuchen, um einen möglichen Zusammenhang zum Lungenvolumen aufzudecken. Die Narkosetiefe kann bei Mäusen durch Tests untersucht werden, welche u.a. auf einem Setzen von Schmerzreizen beruhen, z.B. durch Überprüfen des Zwischenzehenreflexes (Arras et al. 2001, GV-SOLAS TVT 2010) oder Beobachten von Barthaarbewegungen (Erhardt et al. 2011). Bei der humanmedizinischen Narkoseüberwachung werden u.a. vegetative Symptome (z.B. Tachykardie, Blutdruckanstieg) und motorische Entäußerungen bei einer zu geringen Narkosetiefe beobachtet (Lehmann et al. 2001) oder EMG- basierte Methoden angewandt (Mourisse et al. 2003; Schroth 2005). Zur Beurteilung der Narkosetiefe der jeweiligen Maus ließen sich in Folgeprojekten teils intensivmedizinisch bekannte, vegetative Messgrößen (Puls, Blutdruck, Atemfrequenz, Körpertemperatur etc.) und der Schutzreflexstatus während der Untersuchungen protokollieren.

Die Erhebung und Verlaufskontrolle dieses Mausstatus könnte einen tieferen Einblick

in den Zustand der Maus während der Untersuchungen und in der Folge eine bessere Deutung der Ergebnisschwankungen ermöglichen. Guerrero und Mitarbeiter (Guerrero et al. 2006) untersuchten Lungen von Mäusen unter unterschiedlichen Luftdruckbedingungen und stellten dar, dass mit zunehmendem endotrachealem Druck Lunge und Atemwege expandieren und das Zwerchfell nach kaudal verlagert wird. Interessant wäre daher bezogen auf diese Arbeit die Fragestellung, ob der äußere Luftdruck einen Einfluss auf das murine Lungenvolumen ausübt. Aus der Lungenphysiologie ist die Ruhedehnungskurve bekannt (Huppelsberg & Walter 2003, Klinka et al. 2005, Behrends et al. 2010), welche der graphischen Darstellung der Dehnbarkeit des Atemapparats dient. Anhand ihrer lässt sich vermuten, dass das Lungenvolumen mit zunehmendem (Beatmungs)Druck zunehmen würde. Zur Untersuchung dieser Hypothese ließe sich der äußere Luftdruck als ein weiteres Merkmal des Mausstatus erfassen.

Zusätzlich könnte man der Hypothermie als mögliche, lungenbeeinflussende Variable durch ein Warmhalten der Nager entgegenwirken. Unterschiedliche Methoden werden in der Literatur beschrieben (Taylor 2007).

In zukünftigen Untersuchungen ließe sich ein Lungenfunktionstest für Mäuse entwickeln und anwenden, um pulmonale Vorerkrankungen der jeweiligen Maus zu eruieren und auszuschließen. In der Studie von Deuse (Deuse 2004) wurden beispielsweise arterielle Blutgasanalysen durchgeführt, welche zur laborchemischen Lungenfunktionsanalyse beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, ein Computerprogramm zur Volumetrie, HE- Maximum- Bestimmung und Densitometrie zu evaluieren, welches explizit für diese Lungenuntersuchung entwickelt wurde. Dabei wurden 78 fpVCT- Bilddatensätze von Mauslungen analysiert. Das Programm führt eine Schwellenwert- basierte Lungensegmentierung durch, wodurch die Anzahl der zur Lunge gehörenden Voxel und in der Folge das Lungenvolumen bestimmt werden kann. Das HE- Maximum wird in einem Histogramm abgelesen, während die Dichte als Quotient aus HE und Volumen errechnet wird.

Die Versuchstiere der Experimentgruppe erhielten während der radiologischen Messung Methacholin in aufsteigenden Dosen; die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine NaCl- Pufferlösung.

Die Evaluation hat ergeben, dass das entwickelte Programm die verwendeten Datensätze studienorientiert zuverlässig auswertet und alle erfassten Lungenparameter einwandfrei analysiert. Ein Programm dieser Art ist derzeit noch nicht kommerziell erhältlich und lässt sich im Sinne einer weiteren Automatisierung einzelner Rechenschritte zur weiteren Steigerung der Benutzerfreundlichkeit weiterentwickeln.

Gefunden wurde in dieser Arbeit der überraschende Effekt, dass sich das Lungenvolumen auch bei den Kontrollmäusen in Abhängigkeit von der Zeit ändert. Bei der Lungenvolumetrie ist dieser unerwartete Befund in Zukunft zu berücksichtigen. Zudem erschwert er die Auswertung der Ergebnisse, die anhand des zugrunde liegenden Versuchsprotokolls ermittelt wurden, was Einfluss auf Planungen und Auswertungen für zukünftige Studien haben kann. Eventuell wird die Volumenabnahme durch ein zugeführtes Anästhetikum, durch eine möglicherweise abnehmende Narkosetiefe oder anderen Wirkungen auf das vegetative Nervensystem verursacht. In Folgeprojekten ließe sich überlegen, wie man diesen Effekt genauer untersuchen kann (z.B. durch kontinuierliche Isofluranzuführung) und sich die Narkosetiefe definieren und messen lassen könnte.

Die Lungenparameter in ihrer absoluten und relativen Ausführung weisen vor dem Hintergrund des gering gewählten Stichprobenumfangs eine unterschiedliche Effektivität auf. Das absolute Volumen unterliegt einer starken individuellen Streuung, so dass eine Normierung auf den Ausgangswert erfolgte. Anhand der relativen Volumina kann ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt

werden. Die absoluten HE- Maxima werden unabhängig vom absoluten Volumen bestimmt, haben daher eine allgemeinere Aussagekraft und weisen eine größere Unterscheidbarkeit auf. Der effektivste Parameter in der Zeitserie ist das relative HE-Maximum, welches die größte Unterscheidbarkeit aufweist. Die absolute Dichte detektiert keine signifikanten Unterschiede, im Gegensatz zur relativen Dichte. Diese ist der effektivste Parameter in der Methacholindosisserie, da sie als einzige einen signifikanten Unterschied detektiert.

Viele neu entstandene Fragestellungen bleiben offen: Zukünftig können die Volumetrie der Atemwege als Wirkort des Methacholins, die Messgenauigkeit der Volumetrie, sowie der Einfluss von Anästhetika, Narkosetiefe und Hypothermie untersucht werden. Für weitere Studien würde sich das Computerprogramm erneut eignen, da seine studienorientierte Datensatzauswertung erfolgreich verlief. Die o.g. Feststellungen zeigen zudem, dass das Programm in der Lage ist, neue Befunde im Bereich der Mauslunge zu Tage zu bringen.

## 6. Abstract

The aim of this study was the evaluation of a computer programme which has explicitly been developed for this lung examination and which determines lung volume, HU-peak and lung density. Seventy- eight fpVCT- data sets of murine lungs have been analysed. The software uses a threshold- and seed- growth- based lung- segmentation method, which can determine the voxels belonging to the lung, indicating the lung volume, can be determined. HU- peak values can be identified in histogram- functions of voxel amount as the graph of HU. Lung density is computed as the fraction of HU-mass and volume.

The animals of the experimental group were administered with methacholine in increasing dosages during a series of radiological investigations; the animals of the control group received NaCl- buffer solution.

In this study, a surprising effect has been revealed: the lung volume of the untreated mice changes depending on time. This unexpected observation has to be kept in mind in future lung- volumetric studies. Furthermore it hinders the analysis of the results detected by the underlying study protocol. Against this backdrop, the study design should be optimised for future studies to enable a serious analysis of results. It seems to be possible that the reduction of the lung volume is either caused by the administered anaesthesia, by an eventually decreasing depth of anaesthesia, or by other effects on the autonomic nervous system. In follow- up projects, the examination of this effect should be addressed more precisely (e.g. by continuous application of isoflurane). Additionally, it seems advisable to measure the depth of anaesthesia.

The absolute and relative lung parameters evaluated in this study indicate different explanatory powers that have to be carefully considered in the context of a small sample size. The absolute volume shows an enormous individual variation emphasizing that normalisation to an initial value of a time series was performed. According to the relative lung volumes a significant difference depending on time could be identified in a time- series analysis in untreated mice. The absolute HU- peak is independent of the absolute volume of an individual mouse, hence it has a more general informative value and enables better differentiations between different experimental groups. The most effective parameter in the time- series analysis represents the relative HU- peak parameter, which enables the most significant differentiation. The absolute density is not able to detect any significant difference in contrast to the relative density. Thus, this parameter is the most effective one in series



analysis of methacholine- dose rates because it is the only parameter which reveals a significant difference between different experimental groups at all.

Many new open- end questions emerge: In the future volumetric studies of the airways of the murine lung, the effect of methacholine, the accuracy of measurements, the influence of anaesthesia and of its depth, as well as effects of hypothermia should be investigated. For subsequent studies, once again, the software is suitable because its study- orientated data analysis has succeeded. In addition, the above- listed explanations show that the software is capable of revealing new findings in the field of the murine lung.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

abs	-	absolut
AW	-	Advantage Windows Workstation
bt	-	Bifurcatio tracheae
D	-	Lungendichte
D <sub>abs</sub>	-	absolute Lungendichte
D <sub>rel</sub>	-	relative Lungendichte
eLU	-	eXplore Locus Ultra, genauere Gerätebezeichnung der
fpvCT	-	flat- panel Volumen- Computer- Tomographie
H	-	Hounsfield- Einheit- Maximum
h	-	Stunde
H <sub>abs</sub>	-	absolutes Hounsfield- Einheit- Maximum
HE	-	Hounsfield- Einheit(en)
H <sub>rel</sub>	-	relatives Hounsfield- Einheit- Maximum
Hz	-	Herz
KG	-	Körpergewicht
m	-	applizierte Methacholindosis
M	-	Methacholin
m <sub>abs</sub>	-	absolute applizierte Methacholindosis
Mas	-	(Hounsfield- Einheit-) Masse
min	-	Minuten
m <sub>kum</sub>	-	kumulative applizierte Methacholindosis
n	-	Bildnummer
NaCl	-	Natriumchlorid

p- Wert	-	Signifikanzwert der Statistik
rel	-	relativ
rp	-	Recessus pulmonales
s	-	Sekunde
t	-	Zeitpunkt in [min]
Vol	-	Lungenvolumen
Vol <sub>abs</sub>	-	absolutes Lungenvolumen
Vol <sub>rel</sub>	-	relatives Lungenvolumen

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Illustration eines 3D- Bildstapels einer Mausuntersuchung.....	- 13 -
Abb. 2. Bildqualität anhand eines Untersuchungsbeispiels im kaudalen Thoraxbereich bei zwei unterschiedlichen Mäusen im Vergleich.....	- 14 -
Abb. 3. Darstellung unterschiedlicher Berechnungsschritte des Programms 2 (Segmetierungsprogramms).....	- 17 -
Abb. 4. Lungensegmentation.....	- 19 -
Abb. 5. Auftragung zweier Beispiel- Histogramme.....	- 22 -
Abb. 6. Darstellung des absoluten Lungenvolumens als Funktion der Zeit. ....	- 26 -
Abb. 7. Darstellung des relativen Lungenvolumens als Funktion der Zeit. ....	- 27 -
Abb. 8. Darstellung des absoluten HU- Maximums als Funktion der Zeit.....	- 28 -
Abb. 9. Darstellung des relativen HU- Maximums als Funktion der Zeit.....	- 29 -
Abb. 10. Darstellung der absoluten Lungendichte als Funktion der Zeit. ....	- 31 -
Abb. 11. Darstellung der relativen Lungendichte als Funktion der Zeit. ....	- 32 -

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Versuchsprotokoll mit Zeitangaben zur radiologischen Untersuchung und zur Puffer- bzw. Methacholinapplikation. .... - 9 -

Tabelle 2. P- Wert- Ergebnisse des Levene- und des jeweiligen Post Hoc- Tests von Versuchsgruppe B6 - ausgewertet als Zeitfunktion. .... - 34 -

Tabelle 3. P- Wert- Ergebnisse des Levene- und des jeweiligen Post Hoc- Tests von Versuchsgruppe B6 M - ausgewertet als Methacholin-Dosisfunktion..... - 35 -

## 10. Literaturverzeichnis

American Thoracic Society 1999; Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testeing- 1999. Official statement of the American Thoracic Society (1999).

Armato & Sensakovic 2004; Armato SG, Sensakovic WF. Automated Lung Segmentation for Thoracic CT: Impact on Computer-Aided Diagnosis. Acad Radiol, 11:1011- 21 (2004).

Arras et al. 2001; Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. Comp Med, 51:443- 456 (2001).

Arzneimittel- Datenbank 2013; Präparat Forene ®, [http://www.arzneimittel-datenbank.de/produkt/forene\\_250\\_ml-04831850.htm](http://www.arzneimittel-datenbank.de/produkt/forene_250_ml-04831850.htm), zitiert am 2.2.13, 18:58.

Behrends et al. 2009; Behrends J, Bischofsberger J, Deutzmann R, Kurtz A, Wagner C, Hoth M, Rettig J. Duale Reihe Physiologie. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland (2009), S. 236f.

Casella & Berger 2001; Casella G, Berger RL, Statistical inference, in: Duxbury Advanced Series, 2<sup>nd</sup> edition, Pacific Grove, CA (2001).

Chaturvedi & Lee 2005; Chaturvedi A, Lee Z. Three-dimensional segmentation and skeletonization to build an airway tree data structure for small animals. Phys Med Biol, 50: 1405- 1419 (2005).

Coulson & Fryer 2003; Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. Pharmacol Ther. 98: 59- 69 (2003).

Deuse 2004; Deuse u. Vergleich zweier Beatmungsgeräte für Mäuse, vorwiegend unter dem Aspekt der klinischen Tauglichkeit. Inaugural- Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität München, Deutschland (2004).

Drug Area 2013; Pharmacodynamics/ Kinetics Methacholine, <http://drugsarea.com/Dets-Drugs/Print/Methacholinepd.html>, zitiert am 31.3.13, 23:59.

Erhardt et al. 2011; Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. 2. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart, Deutschland (2011), S. 719.

- Frey & Löscher 2009; Frey HH, Löscher W. Lehrbuch für Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3. Auflage, Enke Verlag Stuttgart, Deutschland (2009), S. 52f.
- Fritz 2007; Fritz J. Allometrie der Kotpartikelgröße von pflanzenfressenden Säugern, Reptilien und Vögeln. Inaugural- Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München, Deutschland (2007).
- Fuerst et al. 2012; Fuerst B, Mansi T, Zhang J, Khurd P, Declerck J, Boettger T, Navab N, Bayouth J, Comaniciu D, Kamen A. A personalized biomechanical model for respiratory motion prediction. Med Image Comput Comput Assist Interv. 15(Pt 3):566- 73 (2012).
- Gammex 2012; Tissue equivalent materials, [www.gammex.com/nportfolio/productpage.asp?id=289&category=Radiation+Oncology&name=Tissue+Equivalent+Materials+](http://www.gammex.com/nportfolio/productpage.asp?id=289&category=Radiation+Oncology&name=Tissue+Equivalent+Materials+), zitiert am 14.1.2013, 21:21.
- Gonzalez & Woods 1993; Gonzalez RC, Woods RE. Digital image processing. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, MA, USA (1993).
- Goris et al. 2006; Goris ML, Zhu HJ, Blankenberg F, Chan F, Robinson TE. An automated approach to quantitative air trapping measurements in mild cystic fibrosis. Chest, 123:1655-63 (2003).
- Gosens et al. 2006; Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. Respir Res, 7: 73 (2006).
- Green 1981; Green EL, Biology of the Laboratory Mouse, 2nd edition. Dover publications: New York, USA 1981.
- Greschus et al. 2005; Greschus S, Kiessling F, Lichy MP, Moll J, Mueller M, Savai R, Rose F, Ruppert C, Guenther A, Lücke M, Fusenig NE, Semmler W, Traupe H. Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging. Neoplasia, 7:730- 740 (2005).
- Greschus et al. 2007; Greschus S, Savai R, Wolf JC, Rose F, Seeger W, Fitzgerald P, Traupe H. Non-invasive screening of lung nodules in mice comparing a novel volumetric computed tomography with a clinical multislice CT. Oncology Reports, 17:707- 712 (2006).

- Greschus et al. 2009; Greschus S, Kuchenbuch T, Plötz C, Obert M, Traupe H, Padberg W, Grau V, Hirschburger M. Monitoring of Experimental Rat Lung Transplants by High-Resolution Flat-Panel Volumetric Computer Tomography (fpVCT). *Journal Investigative Surgery*, 22: 69- 75 (2009).
- Guerrero et al. 2006; Guerrero T, Castillo R, Sanders K, Price R, Komaki R, Cody D. Novel method to calculate pulmonary compliance images in rodents from computed tomography acquired at constant pressures. *Phys Med Biol*, 51:1101-12 (2006).
- Gupta et al. 2004; Gupta R, Bartling SH, Basu SK, et al. Experimental flat-panel highspatial- resolution volume CT of the temporal bone. *Am J Neuroradiol*, 25:1417– 1424 (2004).
- Gupta et al. 2011, Gupta R, Mehndiratta A, Mitha AP, Grasruck M, Leidecker C, Ogilvy C, Brady TJ. Temporal resolution of dynamic angiography using flat panel volume CT: in vivo evaluation of time-dependent vascular pathologies. *Am J Neuroradiol*. 32:1688- 96. (2011).
- GV-SOLAS TVT 2010; Ausschuss für Anästhesie, Analgesie und Schmerzprophylaxe der Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society of Laboratory Animals (GV-SOLAS) und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT). Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren (Stand 2010).
- Harkness & Wagner 1989; Harkness JE, Wagner JE. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodent*, 3rd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 1989.
- Herold et al. 2009; Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin 2010*. Auflage 2010, Gerd Herold Verlag Köln, Deutschland (2009), S. 339 ff.
- Hirschburger et al. 2009; Hirschburger M, Obert M, Traupe H, Kuchenbuch T, Padberg W, Fehrenbach H, Grau V. Treatment with keratinocyte growth factor does not improve lung allograft survival in the rat. *Langenbecks Archive Surgery*, 394: 133- 141 (2009).
- Hu et al. 2001; Hu S, Hoffman EA, Reinhardt JM. Automatic lung segmentation for accurate quantitation of volumetric X-ray CT images. *IEEE Trans Med Imaging*, 20:490- 8 (2001).
- Huppelsberg & Walter 2003; Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland (2003), S. 105f.



- IDL 2012; IDL- Benutzer- Handbuch, IDL®, Version 8.1.0, Execlis Visual Information Solutions, Boulder, Colorado, USA (2012).
- Insler & Sessler 2006; Insler SR, Sessler DI. Perioperative thermoregulation and temperature monitoring. *Anesthesiol Clin.* 24(4):823- 37 (2006).
- Janssen & Laatz 2007; Janssen J, Laatz W. Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows: Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests. 6. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, Deutschland (2007), S. 245ff.
- Jobse et al. 2009; Jobse BN, Johnson JR, Farncombe TH, Labiris R, Walker TD, Goncharova S, Jordana M. Evaluation of allergic lung inflammation by computed tomography in a rat model in vivo. *Eur Respir J*, 33: 1437- 47 (2009).
- Karow & Lang-Roth 2012; Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 20. Auflage, Dr. med. Thomas Karow Verlag, Deutschland (2012), S.501ff.
- Kiessling et al. 2005; Kiessling F, Greschus S, Lichy MP, Bock M, Fink C, Vosseler S, Moll J, Mueller MM, Fusenig NE, Traupe H, Semmler W. Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high resolution monitoring of tumor angiogenesis. *Nature Medicine*, 10:1133- 1138 (2004).
- Klinke et al. 2005; Klinke R, Pape HC, Silbernagl S. Physiologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland (2005), S. 264ff.
- Kushikata et al. 2005; Kushikata T, Hirota K, Kotani N, Yoshida H, Kudo M, Matsuki A. Isoflurane increases norepinephrine release in the rat preoptic area and the posterior hypothalamus in vivo and in vitro: Relevance to thermoregulation during anesthesia. *Neuroscience*.131(1):79- 86 (2005).
- Lehmann et al. 2001; Lehmann A, Thaler E, Boldt J. Ist es sinnvoll, die Narkosetiefe zu messen? Ein Versuch der Marktübersicht über die kommerziell erhältlichen Geräte zur Messung der Narkosetiefe. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 36: 683- 92 (2001).
- Lindstedt & Schaeffer 202; Lindstedt SL, Schaeffer PJ. Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals. *Lab Anim*, 36:1- 19 (2002).

- Liu et al. 2012; Liu QY, Zhang WD, Lai DM, Ou-Yang Y, Gao M, Lin XF. Hepatic focal nodular hyperplasia in children: imaging features on multi-slice computed tomography. *World J Gastroenterol*.18:7048- 55 (2012).
- Moore & Hogaboam 2008; Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 294(2):L152- 60 (2008).
- Mourisse et al. 2003; Mourisse J, Gerrits W, Lerou J, van Egmond J, Zwarts MJ, Booij L. Electromyographic assessment of the blink and corneal reflex during Midazolam administration: useful methods for assessing depth of anesthesia? *Acta Anaesthesiol Scand*. 47: 593- 600 (2003).
- Müller et al. 1988; Müller NL, Staples CA, Miller RR et al. "Density mask"- an objective method to quantitate emphysema using computed tomography. *Chest* 94;782- 787 (1988).
- Muñoz- López 2013; Muñoz- López F. Bronchial hyperresponsiveness and asthma in the paediatric population. *Allergol Immunopathol (Madr)*, S0301- 0546(13) 00042- 6. (2013).
- Obert et al. 2005; Obert M, Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E, Traupe H. Flat-Panel Volumetric Computed Tomography - A New Method for Visualizing Fine Bone Detail in Living Mice. *J Comput Assist Tomogr*, 29:560- 565 (2005).
- Obert et al. 2010; Obert M, Schulte-Geers C, Schilling RL, Harth S, Klaever M, Traupe H, Ramsthaler F, Verhoff MA. High-resolution flat-panel volumetric CT images show no correlation between human age and sagittal suture obliteration - Independent of sex. *Forensic Sci Int*. 200(1- 3):180.e1-12 (2010).
- Obert 2013; Obert M. Persönliche Mitteilung (2013).
- Pandit et al. 2013; Pandit P, Johnston SM, Qi Y, Story J, Nelson R, Johnson GA. The Utility of Micro-CT and MRI in the Assessment of Longitudinal Growth of Liver Metastases in a Preclinical Model of Colon Carcinoma. *Acad Radiol*. 20:430- 9 (2013).
- Pharmazie 2013; Sevorane- Inhalationsnarkotikum: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/65/1-21565.pdf>, zitiert am 2.2.13, 22:10.
- Presson et al. 2011; Presson RG Jr, Brown MB, Fisher AJ, Sandoval RM, Dunn KW, Lorenz KS, Delp EJ, Salama P, Molitoris BA, Petrache I. Two-photon imaging

- within the murine thorax without respiratory and cardiac motion artifact. *Am J Pathol.* 179(1):75- 82 (2011).
- Regensburg 2011; Anästhesie- Empfehlungen (Ketamin/ Xylazin: Maus und Ratte. [http://www.uni-regensburg.de/forschung/zentrale-tierlaboratorien/medien/informationen/narkose\\_v2.pdf](http://www.uni-regensburg.de/forschung/zentrale-tierlaboratorien/medien/informationen/narkose_v2.pdf), zitiert am 1.2.2013, 20:45.
- Rudolf & Kuhlisch 2008; Biostatistik – Grundlagen und Einführung in Statistikprogramme: Eine Einführung für Biowissenschaftler 1. Auflage, Verlag Pearson Studium München, Deutschland (2008). S. 150- 154.
- Savai et al. 2005; Savai R, Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hänze J, Voswinckel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, Seeger W, Rose F. Analysis of Tumor Vessel Supply in Lewis Lung Carcinoma in Mice by Fluorescent Microsphere Distribution and Imaging with Micro- and Flat- Panel Computed Tomography. *American Journal of Pathology*, 167:937- 946 (2005).
- Schöndube et al. 2013; Schöndube H, Allmendinger T, Stierstorfer K, Bruder H, Flohr T. Temporal resolution and motion artifacts in single-source and dual-source cardiac CT. *Med Phys.* 40(3):031112 (2013).
- Schroth 2005; Schroth MJ. Überwachung der Narkosetiefe mit dem computergestützten EEG- Monitor Narcotrend®. Inaugural- Dissertation zu Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians- Universität Würzburg, Deutschland (2005).
- Schulte-Geers et al. 2011; Schulte-Geers C, Obert M, Schilling RL, Harth S, Traupe H, Gizewski ER, Verhoff MA. Age and Gender Dependent Bone Density Changes of the Human Skull Disclosed by High-Resolution Flat-Panel Computed Tomography. *Int J Legal Med*, 125:417- 425 (2011).
- Schwabe & Paffrath 2001, Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungsreport 2001. Springer Verlag Heidelberg, Deutschland (2001), S.46.
- Simon 1969; Simon E. Changes in the activity of the cervical sympatheticus during spinal cord hypothermia. *J Neurovisc Relat*, 31:260- 74 (1969).
- Stahl 1967; Stahl WR; Scaling of respiratory variables in mammals. *J Appl Physiol*, 22:453- 60 (1967).

- Statsoft 2013; Electronic Statistics Textbook (Electronic Version):  
<http://www.statsoft.com/textbook/>, Tulsa, OK, StatSoft, Inc. (2013).
- Tang 2009; Tang M. A novel image processing and analysis system for medical images based on IDL language. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 26:725- 30 (2009).
- Taylor 2007; Taylor DK. Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia. J Am Assoc Lab Anim Sci. 46(5):37- 41 (2007).
- Ukil & Reinhardt 2005; Ukil S, Reinhardt JM. Smoothing lung segmentation surfaces in three-dimensional X-ray CT images using anatomic guidance. Acad Radiol, 12:1502- 11 (2005).
- Vetpharm 2013; Xylazin: [http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00000736/1617\\_\\_F.htm](http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00000736/1617__F.htm),  
zitiert am 28.1.2013, 14:40.
- Wearn et al. 1934; Wearn JT, Ernstene AC, Bromer AW, Barr JS, German WJ, Zschesche LJ. The normal behavior of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in the arterioles and capillaries. Am J Physiol. 109:236- 256 (1934).
- Weiß 2008; Weiß C, Basiswissen Medizinische Statistik, 4. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, Deutschland (2008).
- Winer et al. 1991; Winer BJ, Brown DR, und Michels KM, Statistical Principles in Experimental Design, 3<sup>rd</sup> edition, McGraw- Hill Series in Psychology, New York, USA (1991).
- Zwillinger & Kokoska 2000; Zwillinger D, Kokoska S. CRC Standard Probability and Statistics Tables and Formulae, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL, USA (2000).

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

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 Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

Aufrichtig danke ich Frau Univ.- Prof. Dr. med. Elke R. Gizewski für die Überlassung des Themas meiner vorliegenden Arbeit.

Ebenso herzlich danke ich Herrn Univ.- Prof. Dr. Wolfgang Kummer und seiner Mitarbeiterin Frau Dr. Gabriele Krasteva- Christ dafür, dass ich ihre zugrundeliegenden Daten im Rahmen meiner Promotion auswerten durfte.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Martin Obert für seine unendlich hilfreiche und persönliche Betreuung und Beratung danken. Durch sein unermüdliches Interesse an meiner Arbeit konnte ich auch unter widrigen Lebensbedingungen meine eigene Motivation gut aufrechterhalten, bis ich wieder Land in Sicht sah - was sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Dieses unvergleichbare Engagement weiß ich sehr zu schätzen.

Dem Statistiker Andreas Hermann der Arbeitsgruppe medizinische Statistik, Justus-Liebig- Universität Gießen, Deutschland, danke ich für die Hilfe anhand seiner ausführlichen, statistischen Beratung.

Ein Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Benjamin Dassinger, Physiker der o.g. Abteilung Neuroradiologie, für die hilfreichen Diskussionen, in denen er mich an seinen wissenschaftlichen Erfahrungen teilhaben ließ.

Vielen Dank an die sekundäre Engländerin Frau Christine Müller mit ihren beeindruckenden Sprachkenntnissen, die sie in den hilfreichen Korrekturen der englischsprachigen Textabschnitte meiner Dissertation zum Glänzen bringen konnte.

Hiermit möchte ich von Herzen all den Menschen danken, die mich auf meinem Weg liebevoll begleiten. Ein ganz besonderes Wort des Dankes gilt meinem Verlobten Tobias, durch welchen ich Martin Obert und dieses Promotionsthema einst kennenlernte. In diesem Zusammenhang Danke für unsere gute Teamarbeit und für seinen immerwährenden Glauben an mich und meine Fähigkeiten. Ich danke meiner Familie und von ganzen Herzen meinen Eltern Barbara und Norbert für Ihre bedingungslose Wegbegleitung in den etlichen gemeinsam gemeisterten Lebenslagen. Auch möchte ich meiner Freundin Anja Katharina für unsere unzähligen Gespräche danken, in denen ich die Begeisterung für meine unterschiedlichsten Projekte mit ihr teilen kann. Zuletzt möchte ich meiner treuen Gefährtin Luna für ihre unaufhaltbaren Aufmunterungen, sowie meiner Freundin Ouvidos für die erholsamen Oasen im Alltag danken.