

Methodik zur dreidimensionalen Darstellung  
und morphometrischen Analyse  
der terminalen Lufträume der Lunge in der  
Mikro-Computertomographie

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

vorgelegt von Alexander Möll  
aus Gießen

Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung Diagnostische Radiologie  
Leiter: Prof. Dr. W. S. Rau  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. S. Rau

Gutachter: Prof. Dr. G. Bachmann

Tag der Disputation: 4. August 2009

**W**enn uns die Struktur nichts über die Funktion sagt, bedeutet das, dass wir sie nicht richtig betrachtet haben.

*Albert Szent-Györgyi, Nobelpreisträger (1893-1986)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Lunge und Atmung .....	1
1.2 Aufbau und Bauprinzipien der Luftwege .....	2
1.3 Quantifizierung des Lungengewebes – Morphometrie.....	4
1.4 Morphometrie – Limitationen.....	5
1.5 Röntgenverfahren zur Abbildung der Lunge .....	7
1.6 Experimentelle Verfahren – Mikro-CT .....	8
1.7 Ziele der Arbeit.....	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
2.1 Organpräparate.....	11
2.2 Fixierung der Lungen.....	13
2.3 Härtung und Trocknung durch Sauerstoffinsufflation.....	15
2.4 Ermittlung von Lungenvolumina und -gewichten .....	16
2.5 Gewinnung der Lungenscheiben und Gewebezyylinder .....	16
2.6 Präparation der Gewebezyylinder.....	18
2.6.1 Osmiumtetroxid-Kontrastierung.....	18
2.6.2 Chemische Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung .....	19
2.7 Durchmesser- und Gewichtsbestimmungen an den Gewebeproben.....	22
2.8 Röntgen und Markieren der Gewebezyylinder .....	22
2.9 Mikro-Computertomographie (Mikro-CT).....	23
2.10 Gewinnung der histologischen Präparate.....	26
2.11 Schnittbeurteilung Histologie/Mikro-CT – Artefakte und Ausbeute .....	26

---

2.11.1	Histologie.....	26
2.11.2	Mikro-CT.....	28
2.12	Bildpaar-Erstellung (Histologie / Mikro-CT).....	28
2.13	Morphometrische Analysen.....	30
2.13.1	Semiautomatische morphometrische Analyse (Mikro-CT).....	30
2.13.2	Stereologiebasierte Morphometrie der histologischen Schnitte.....	33
2.13.3	Stereologiebasierte Morphometrie (Mikro-CT).....	36
2.14	Morphometrische Korrelationsuntersuchungen.....	37
2.15	Zwei- und dreidimensionale Bildverarbeitung (Mikro-CT).....	38
2.15.1	Zweidimensionale Bildverarbeitung.....	38
2.15.2	Dreidimensionale Bildverarbeitung.....	38
2.16	Anwendung der Methodik auf humanes Lungenmaterial.....	39
2.17	Statistische Auswertung.....	40
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Lungenvolumina und -gewichte.....	41
3.2	Durchmesser und Gewichte der Gewebeproben.....	44
3.3	Mikro-CT: Zweidimensionale Darstellung des Lungengewebes.....	46
3.3.1	Mikrotomogramme der Lungenzylinder.....	46
3.3.2	Zweidimensionale Rekonstruktion (MPR).....	48
3.4	Bildpaare (Histologie / Mikro-CT).....	49
3.5	Histologie und Mikro-CT: Ausbeute und Artefakte.....	53
3.6	Morphometrische Analysen.....	59
3.6.1	Semiautomatische morphometrische Analyse (Mikro-CT).....	59
3.6.2	Histomorphometrie.....	60
3.6.3	Stereologiebasierte Morphometrie in der Mikro-CT.....	61

---

3.7	Morphometrische Korrelationsprüfungen.....	64
3.7.1	Mikro-CT / Histologie im Vergleich auf Basis stereologisch erhobener Daten.....	64
3.7.2	Vergleich semiautomatisch und stereologisch erhobener Daten.....	66
3.8	Mikro-CT: Dreidimensionale Rekonstruktion der terminalen Lufträume.....	68
3.9	Darstellung humanen Lungengewebes mit der Mikro-CT .....	74
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
4.1	Material.....	77
4.2	Lungenfixierung.....	78
4.2.1	Verfahren.....	78
4.2.2	Volumina und Gewichte der Lungen – alveolärer Strukturerehalt .....	81
4.3	Präparation der Gewebeproben.....	82
4.3.1	Kontrastierung .....	82
4.3.2	Trocknung inklusive chemischer Entwässerung .....	85
4.3.3	Verhalten der Gewebezylinder im Präparationsverlauf.....	89
4.4	Mikro-Computertomographie .....	91
4.4.1	Systeme.....	91
4.4.2	Untersuchung der Lungenzylinder .....	92
4.5	Qualitative Schnittbeurteilungen – Bildpaarvergleich.....	93
4.6	Verluste – Artefakte (Mikro-CT / Histologie).....	94
4.6.1	Artefakte in der Mikro-CT .....	94
4.6.2	Artefakte in der Histologie .....	95
4.7	Morphometrische Analysen.....	97
4.7.1	Alveoläre Oberflächendichte.....	98
4.7.2	Mittlerer Alveolardurchmesser.....	99
4.7.3	Oberflächendichte und Alveolardurchmesser im Vergleich .....	99

---

4.8	Einflussfaktoren bei der mikrotomographischen Analyse.....	100
4.8.1	Segmentierung – Schwellenwertwahl und Partialvolumeneffekt .....	100
4.8.2	Auflösung .....	103
4.8.3	Untersucherabhängigkeit .....	104
4.9	Dreidimensionale Gewebedarstellung: Alternativen – Limitationen .....	105
4.10	Zwei- und dreidimensionale Nachverarbeitung.....	106
4.11	Ausblick.....	108
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>111</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>137</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>139</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Lunge und Atmung

Die Zelle höherer Wirbeltiere gewinnt ihre Energie durch den oxidativen Abbau der Nährstoffe. So ist sie auf eine ständige Sauerstoffzufuhr angewiesen. Ebenso wichtig ist der Abtransport der Stoffwechselendprodukte, zu denen in erster Linie Kohlendioxid gehört.

Der Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebung erfolgt durch die Lungen. Über sie wird sauerstoffreiche Luft aufgenommen und kohlendioxidreiche Luft wieder abgegeben.

Dieser für das Leben grundlegende Vorgang wird allgemein als *Atmung* bezeichnet.

Ein zentrales Prinzip der Atmung ist die Diffusion<sup>1</sup>, also ein passiver Austausch, für den keine Energie aus dem Zellstoffwechsel benötigt wird. Nachteilig ist, dass auf diese Weise nur kurze Strecken (kleiner als 1 mm) überwunden werden können. Müssen größere Distanzen überwunden werden, sind konvektive<sup>2</sup> Transportprozesse notwendig.

Zunächst werden innerhalb der Lunge die Gasmoleküle im Rahmen der Ventilation konvektiv durch die Atemwege zu den Lungenbläschen (Alveolen) transportiert. Hier findet der Gasaustausch in das Kapillarblut mittels Diffusion statt. Sauerstoff wird aus der Luft ins Blut aufgenommen, das im Gewebestoffwechsel angefallene Kohlendioxid wird abgegeben. Diese Prozesse werden zur äußeren Atmung zusammengefasst.

Der Atemgastransport des Blutes zu den Körperzellen erfolgt dann konvektiv über den Blutkreislauf. Der Gasaustausch zu den Gewebekapillaren durch die Zellmembran in die Zellen geschieht wieder passiv mittels Diffusion (= innere Atmung).

Die Kapazität des Gasaustausches in den Alveolen wird von drei Faktoren beeinflusst: (1) den Partialdruckdifferenzen der Gase zwischen Luft und Blut, (2) der Dicke der Diffusionsbarriere sowie (3) der Größe der Oberfläche, in der Luft und Blut im Austausch stehen (Duncker 1985).

---

<sup>1</sup> Diffusion: passiver Transportprozess, Konzentrationsgefälle als treibende Kraft;  
bei der Gasdiffusion die Partialdruckdifferenzen zwischen Alveolarluft und Kapillarblut

<sup>2</sup> Konvektion: Transport von Materie oder Energie durch Trägerstoffe

## 1.2 Aufbau und Bauprinzipien der Luftwege

Die hohe Effizienz der Lunge beim Gasaustausch erklärt sich durch ihren räumlichen Aufbau (Murray 1978).

Ein grundlegendes Problem des funktionellen Lungendesigns besteht darin, die große innere Oberfläche gleichmäßig mit Luft (und Blut) zu versorgen. Durch die Architektur des Bronchialbaums wird eine homogene Belüftung der terminalen Lufträume realisiert.

Der Bronchialbaum ist so angelegt, dass jede Alveolarwand so nah wie möglich an den Beginn der Luftwege (die Luftröhre) gebracht wird (Weibel 1997).

Dabei teilt sich der Bronchialbaum dichotom, aus jedem Ast gehen zwei kleinere Äste ab. Die beiden Tochteräste werden als Äste der nächsten Generation bezeichnet. In der menschlichen Lunge besteht der Bronchialbaum vom Hauptbronchus bis zu den Alveolen aus 23 Generationen (Weibel 1997). Funktionell wird er in einen proximalen luftleitenden Abschnitt, in dem die Luft nur transportiert wird, und in einen distalen respiratorischen Abschnitt, in dem der Gasaustausch stattfindet, unterteilt (Abb. 1).

Der Übergang vom luftleitenden zum respiratorischen Abschnitt wird anatomisch durch das Auftreten von Alveolen in der Bronchialwand definiert. Dieser Übergang findet im Bereich der 14ten bis 15ten Generation statt. Der letzte Bronchus des luftleitenden Abschnitts wird als Bronchiolus terminalis bezeichnet. Der Bronchus mit ersten Alveolen in der Wand wird als Bronchiolus respiratorius bezeichnet.

Der respiratorische Abschnitt des Bronchialbaumes setzt sich mit drei bis acht weiteren Aufzweigungen fort. Die aus einem Bronchiolus terminalis hervorgehenden Endaufzweigungen bilden einen Acinus pulmonalis. Der Acinus wird als funktionelle Einheit der Lunge definiert, in der alle Abschnitte am Gasaustausch teilnehmen (Raskin 1982; Haefeli-Bleuer und Weibel 1988; Weibel 1997).

Die Gesamtlänge des Bronchialbaums (gemessen als Distanz von der Aufzweigung der Hauptbronchien bis zur Alveolarwand) beträgt beim Menschen etwa 15 cm. Die Länge des luftleitenden Abschnitts beträgt etwa 14 cm, die des respiratorischen Abschnittes dagegen nur 0,9 cm. Die Querschnittsfläche des Bronchialbaums liegt zu Beginn in der Luftröhre bei  $2,54 \text{ cm}^2$  und steigt bis zum Ende des luftleitenden Abschnittes auf  $70 \text{ cm}^2$  an. Im respiratorischen Abschnitt nimmt die Querschnittsfläche des Bronchialbaums dann in wenigen Teilungsschritten exponentiell zu und endet in einer Alveolaroberfläche von etwa  $140 \text{ m}^2$  (Weibel 1997).

Die Geometrie des Bronchialbaums hat zur Folge, dass sich der Luftstrom auf dem Weg zu den Alveolen durch die Zunahme der Querschnittsfläche zunehmend verlangsamt. Dabei sind die Durchmesser so angelegt, dass der Strömungswiderstand für alle Regionen annähernd gleich ist (Duncker 1985). Im respiratorischen Abschnitt ist der Luftstrom dann so gering, dass der Gasaustausch durch Diffusion möglich wird (Sapoval et al. 2002).

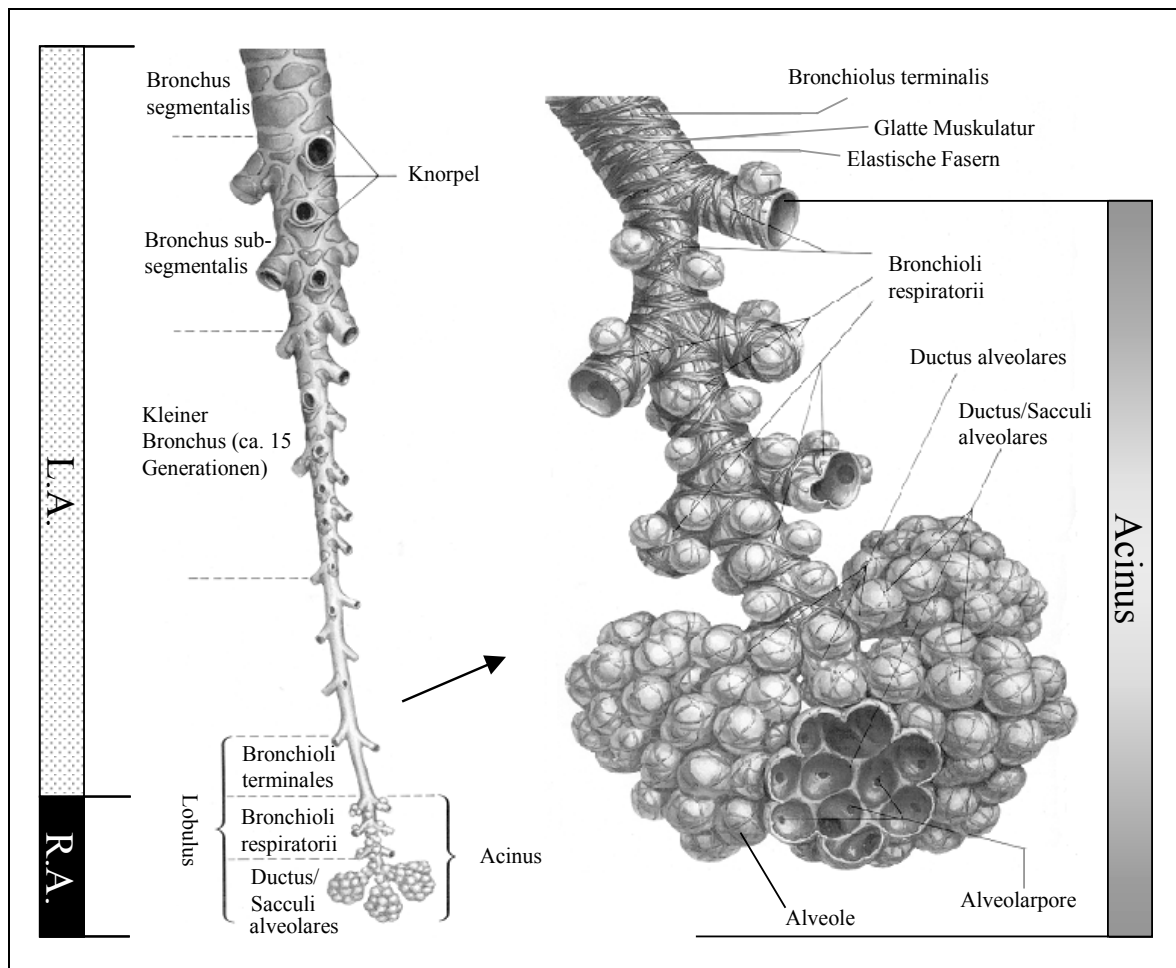


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Bronchus segmentalis mit seinen Aufzweigungen (modifiziert nach Netter 1980).

L.A. = Lufteleitender Abschnitt, R.A. = Respiratorischer Abschnitt (Gasaustausch).

Rechts: Ausschnittsvergrößerung zur detaillierten Wiedergabe der acinären Strukturen.

Der Ort des Gasaustausches selbst sind die 300 Millionen Alveolen. Ihre dünnen Wände, die Inter-alveolarepten, deren Dicke nur wenige Mikrometer beträgt, enthalten das große Kapillarnetz des Lungenkreislaufs, durch welches das Blut dem Gasaustausch zugeführt wird. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe finden über die alveolokapilläre Membran im Bruchteil einer Sekunde statt.

### 1.3 Quantifizierung des Lungengewebes – Morphometrie

Die übliche feingewebliche Betrachtung des Lungengewebes anhand histologischer Schnitte basiert auf einer Formbeschreibung, die sich auf Bildbefunde stützt. Dieser rein deskriptive – morphologische – Ansatz genügt nicht, wenn man strukturelle Eigenschaften des Organs mit physiologischen oder biochemischen Parametern in Bezug setzen will.

Dazu muss die Lungenstruktur vermessen werden. Geeignete geometrische Größen (wie etwa Volumen, Oberfläche oder Wanddicke), die Form und Gestalt beschreiben, müssen erfasst werden (Dunnill 1962).

Die Anwendung der *Morphometrie* (griechisch μορφή, morphe: „Gestalt“, „Form“ und μετρική, metron: „Metrik“, „Zählung“, „Messung“) zur Vermessung der Lunge und des Lungenparenchyms geht auf E. R. Weibel zurück (Weibel und Gomez 1962; Weibel 1963 a/b, 1979 a; Weibel und Cruz-Orive 1997).

Das Hauptinstrument zur Bestimmung morphometrischer Größen ist die *Stereologie* – eine mathematische Methodensammlung, die auf geometrischer und statistischer Grundlage basiert (Miles und Davy 1976). Sie ermöglicht Rückschlüsse auf die räumliche Struktur eines Organs anhand von Messungen an zweidimensionalen Gewebeschnitten.

Zum Einsatz kommen geometrische Testsysteme (Testgitter), die auf histologische Schnitte überlagert werden. Dabei werden Interaktionen zwischen Testgitter und Gewebe ausgezählt. Es steht eine mathematische Formelsammlung zur Verfügung, mit deren Hilfe man so genannte strukturelle *Basisgrößen* – wie (1) das *Volumen*, (2) die *Oberfläche*, (3) die *Länge* und (4) die *Anzahl* – bestimmen kann (Weibel 1979 a; Weibel und Cruz-Orive 1997).

Bezieht man diese Basisgrößen auf ein *Volumen*, erhält man so genannte *Dichten*. Das Bezugsvolumen kann das Organvolumen oder auch nur ein Teilvolumen des Organs sein.

Kennt man das Organvolumen und sind die Dichteergebnisse repräsentativ, kann man Aussagen über das Organ als Ganzes treffen.

Für den Gasaustausch besonders relevant ist die Alveolaroberfläche. Sie kann über die *Oberflächendichte* (also Oberfläche / Volumen; Einheit 1/mm) abgeschätzt werden. Hierzu wird ein Messgitter auf die histologischen Schnitte des Lungengewebes überlagert (Bolender et al. 1993; Weibel und Cruz-Orive 1997).

Laut einer fundamentalen stereologischen Gleichung – ursprünglich aufgestellt durch den russischen Mathematiker Saltykov (1945) – kann die Oberflächendichte (definiert als Oberfläche  $S$  / Messvolumen  $V$ ) durch die Gleichung

$$S/V = 2 \times (\text{Anzahl der Schnittpunkte mit dem Testgitter} / \text{Gesamtlänge der Testlinie})$$

ermittelt werden.

Mit Hilfe dieser Gleichung konnten Weibel und Gomez 1962 die Größe der Lungenoberfläche bestimmen.

Sie entspricht bei der humanen Lunge mit den oben angegebenen  $140 \text{ m}^2$  annähernd der Größe eines Tennisplatzes. Die ermittelte Gewebe-Barriere zwischen Luft und Blut ist mit  $0,6 \text{ }\mu\text{m}$  etwa 50 mal dünner als ein Bogen Luftpostpapier (Weibel 1983; Weibel 1984). Auch die zuvor beschriebenen Dimensionen des Bronchialbaums basieren auf stereologischen Vermessungen.

#### **1.4 Morphometrie – Limitationen**

Die Hauptschwierigkeit der Morphometrie beruht auf der Tatsache, dass die Messgrößen häufig sehr groß sind, die Messungen zur Abschätzung der Größe selbst jedoch an histologischen Schnitten im mikroskopischen Bereich durchgeführt werden (Gundersen und Østerby 1981).

Eine entscheidende Einschränkung aller stereologischen Techniken besteht darin, dass dreidimensionale Größen (wie Volumina) an zweidimensionalen Gewebeschnitten bestimmt werden (Weibel 1979 b). Die dritte Dimension wird also nur indirekt durch eine Extrapolation aus der zweiten Dimension erfasst. Dabei reflektieren die zweidimensionalen Schnittbilder oft nicht die wahre dreidimensionale Natur der pulmonalen Strukturen (Weibel und Cruz-Orive 1997).

Eine weitere Limitation ergibt sich durch die Gewebepräparation und die Herstellung der histologischen Schnittpräparate. So werden die Gewebeproben im Verlauf der histologischen Präparation mechanischen Prozessen ausgesetzt, zu denen neben der Probeneinbettung in Paraffin besonders das Zerschneiden und das Aufziehen der dünnen Schnitte auf Objektträger gehören.

Verglichen mit anderen Geweben ist die Lunge besonders anfällig für Artefakte der histologischen Präparation (Deverell et al. 1989). Das in der Lunge realisierte Bauprinzip, bei dem eine geringe Menge feinsten, elastischen Gewebes in einem großen Volumen

organisiert ist, gestaltet die Erhaltung der feingeweblichen Architektur außerordentlich schwierig (Stockinger und Hofer 1970; Rau et al. 1980; Satoh et al. 1997). Daher sind bei der histologischen Aufarbeitung des Lungengewebes artifizielle Gewebeveränderungen, die sich als Stauchungen, Dehnungen, Zerreißen und Brüche darstellen, nicht zu vermeiden.

Methodisch bedingt führt die Herstellung histologischer Schnitte immer zu einer Gewebedestruktion. Durch das Zerschneiden geht die ursprüngliche Beschaffenheit des Gewebes unwiederbringlich verloren. Es steht für weiterführende Untersuchungen (beispielsweise die Betrachtung seiner Architektur in unterschiedlichen Ebenen) nicht mehr zur Verfügung. Aufgrund der ständig wechselnden Schnittqualität sind kontinuierliche quantitative Messungen in einem Gewebevolumen kaum möglich. So kann nur eine Auswahl besonders gut erhaltener „idealer“ Schnitte in die Messungen einfließen. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Architektur von Geweben aus histologischen Serienschnitten ist zwar prinzipiell möglich, stellt jedoch ein zeitlich sehr aufwendiges Verfahren dar (Ware und Lo Presti 1975). Beim Lungenparenchym wird dieses Vorhaben aufgrund der Gewebefragilität und der resultierenden Unmöglichkeit einer gleichartigen histologischen Schnitterstellung bei geometrisch differierenden Schnittpräparaten besonders erschwert (Deverell et al. 1989; Kriete 1996).

Auch die Wahl des bildgebenden Verfahrens selbst beeinflusst das morphometrische Ergebnis. So fiel die Größe der Alveolaroberfläche, wie sie mit elektronenmikroskopischen Techniken ermittelt wurde, um 80 % höher aus als in vorangegangenen lichtmikroskopischen Arbeiten. Als Gründe wurden die Verbesserung des Auflösungsvermögens und die Verwendung dünnerer Gewebeschnitte aufgeführt (Gehr et al. 1978).

## 1.5 Röntgenverfahren zur Abbildung der Lunge

Als Wilhelm Conrad Röntgen vor mehr als 110 Jahren die Durchleuchtung der Hand seiner Frau Bertha gelang, wurde eine neue Ära in der medizinischen Diagnostik eingeläutet. Mit Hilfe der Röntgenstrahlen war es erstmals möglich, das Innere des Körpers unter Wahrung seiner Unversehrtheit darzustellen. Die Röntgenaufnahme ist dabei ein Summationsbild, auf dem dreidimensionale Strukturen unterschiedlicher Röntgendichte zweidimensional abgebildet werden.

Durch die Entwicklung der Röntgen-Computertomographie, die auf Hounsfield (1973) und Cormack (1963) zurückgeht, lassen sich später einzelne Scheiben des Körpers auf Querschnittsbildern überlagerungsfrei und anatomisch exakt darstellen. Anders als beim konventionellen Röntgen wird die Röntgenstrahlung nach Durchtritt des Patienten nicht mehr von einem Film registriert, sondern von einem Detektor gemessen. Dabei ist die Empfindlichkeit der verwendeten Detektoren höher als die Empfindlichkeit der Röntgenfilme. Die Querschnittsbilder werden aus einzelnen Volumenelementen (so genannte Voxel) zusammengesetzt. Für jedes Volumenelement wird bei der Messung die Röntgenabsorption bestimmt und in einen Grauwert umgewandelt. So gelingt es erstmals, innere Organe direkt abzubilden. Mit den computertomographisch erzeugten Datensätzen sind nun auch quantitative Messungen (Länge, Fläche und Volumen) sowie zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen durchführbar.

Die Steigerung der Auflösung im klinischen Anwendungsbereich gipfelt in der hochauflösenden Computertomographie der Lunge. Ihr Auflösungsbereich im Millimeterbereich setzt der Darstellung des Lungengewebes dennoch Grenzen. Die kleinste zu separierende Einheit ist der sekundäre Lobulus (Webb et al. 2001). Er stellt die kleinste pulmonale Einheit, die bindegewebig begrenzt ist, dar. Seine Größe liegt bei 1 bis 2,5 cm und er besteht aus 3 bis 20 Acini (Loeschcke 1921; Miller 1947). Die kleineren Strukturen wie Acini mit einem Durchmesser von 2 bis 8 mm (Raskin 1982; Sapoval et al. 2002) oder Alveolen mit einem Durchmesser von etwa 250  $\mu\text{m}$  (Gehr et al. 1978) liegen unterhalb der Auflösung und sind daher nicht darstellbar (Webb et al. 2001). Somit bleiben gerade die dem Gasaustausch dienenden Strukturen, welche einen entscheidenden Beitrag zum strukturell-funktionellen Verständnis der Lunge leisten, selbst der hochauflösenden Computertomographie verborgen.

## 1.6 Experimentelle Verfahren – Mikro-CT

Mit der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT,  $\mu$ -CT) steht eine relativ junge Technologie zur Verfügung, welche die Vorteile hochauflösender Mikroskopie und radiologischer Bildgebung vereint (Flannery et al. 1987; Ritman 2004).

Da sie auf Röntgenstrahlung basiert, bietet sie im Gegensatz zur Histologie die Möglichkeit, die innere Geometrie eines Objekts kontinuierlich und nichtdestruktiv darzustellen. Das Untersuchungsobjekt kann unter Wahrung seiner Intaktheit abgebildet und vermessen werden. Der bedeutendste Unterschied der Mikro-CT zu anderen radiologischen Verfahren liegt in der hohen Ortsauflösung im Bereich weniger Mikrometer, die prinzipiell eine der Lichtmikroskopie vergleichbare Abbildung der Mikrostrukturen ermöglicht (Rüegsegger et al. 1996; Engelke et al. 1999).

Die hohe Auflösung geht auf Kosten der Objektgröße, die im Zentimeterbereich liegt. Damit stellt die Mikro-CT ein Verfahren dar, das zur Exploration kleinerer Objekte eingesetzt wird.

Auf Grundlage der generierten kontinuierlichen Datensätze lassen sich detaillierte zwei- und auch dreidimensionale Untersuchungen durchführen (Müller et al. 1998; Karau et al. 2001; Duvall et al. 2004).

Wie die Ära der Radiologie, so beginnt auch die Mikro-Computertomographie mit der Untersuchung von Knochen (Feldkamp et al. 1989). Die besondere Eignung des Knochens für die Mikro-CT beruht zum einen auf der hohen Röntgendichte seiner mineralisierten Anteile. Durch dieses „natürliche“ Kontrastverhalten ist seine native Darstellung in der Mikro-CT möglich. Der zweite Vorteil des Knochens liegt darin, dass er als Hartgewebe strukturstabil ist und sein räumlicher Aufbau nach der Probenentnahme erhalten bleibt.

Eine erste dreidimensionale Abbildung der knöchernen Mikrostrukturen in der Mikro-CT mit einer Auflösung von 50  $\mu$ m gelingt Feldkamp et al. 1989. Rüegsegger et al. (1996) extrahieren später aus den mikrotomographischen Datensätzen von Knochenspongiosa Strukturindices. Bei diesen quantitativen Untersuchungen wird nun auch die dritte Dimension miteinbezogen. Vergleichsuntersuchungen ergeben, dass die erhobenen Knochenparameter aus konventioneller zweidimensionaler Histomorphometrie und dreidimensionaler Mikro-CT gut korrelieren (Müller et al. 1998).

So gilt die Mikrotomographie in der Osteologie als potenzielle Alternative zur Histomorphometrie. Mit ihr lässt sich das zur Stärke und Bruchfestigkeit des Knochens beitragende dreidimensionale Trabekelnetzwerk vollständiger und ohne aufwendige



Probenpräparation erfassen (Engelke et al. 1999). Delling et al. (1995) können zeigen, dass durch eine mikrotomographische, dreidimensionale Darstellung pathologisch veränderten Knochens das Ausmaß von Strukturveränderungen wesentlich deutlicher als im zweidimensionalen Schnittpräparat wird.

Später wurde die Anwendung der Mikro-CT auf Weichgewebe erweitert. Jorgensen et al. (1998) entdecken sie als geeignetes Werkzeug für das Studium der kleinsten Funktionseinheiten von Organen und führen Untersuchungen an isolierten fixierten Nieren und Herzen von Nagern durch. Das wachsende Interesse, auch Weichteile in der Mikro-CT zu untersuchen, zeigt sich am dreidimensionalen Studium der mikrovaskulären Strombahn von humanen und tierischen Organen (Garcia-Sanz et al. 1998; Lerman und Ritman 1999; Bentley et al. 2002 a/b).

Im Gegensatz zu Knochen besitzt das Lungengewebe einen nur geringen Röntgenkontrast. Daneben ist anders als bei der Spongiosa keine natürliche Stabilität vorhanden.

Die morphometrische Datenerfassung setzt so einen hohen präparatorischen Anspruch voraus, wenn das Lungengewebe in einem Zustand untersucht werden soll, der den physiologischen Bedingungen *in vivo* entspricht.

Die für die Atemmechanik notwendige Elastizität des Lungengewebes bewirkt, dass sich das Organ nach seiner Entnahme aus dem Thorax auf etwa ein Drittel der Größe *in situ* zusammenzieht. Die kollabierte Lunge gibt daher keine hinreichende Anschauung der natürlichen Größe und Form (Rauber/Kopsch 1987).

Für eine mikrotomographische Untersuchung der terminalen Lufträume bedeutet dies, dass ihre Architektur und räumliche Ausdehnung wiederhergestellt *und* erhalten werden müssen.

Bereits die Vielzahl der präparatorischen Schwierigkeiten mag ein Grund dafür sein, warum in der Literatur noch keine Arbeiten zur Darstellung und Analyse der Alveolarstrukturen in der Mikro-CT zu finden sind.

Dabei lässt die Mikro-CT gerade für die pulmonale Diagnostik auf der Ebene der terminalen Lufträume ein großes Potenzial erkennen. So ist für ein Verständnis der Lungenphysiologie die Kenntnis der nativen Konfiguration des Alveolargewebes essenziell (Hoppin und Hildebrandt 1977; Wilson und Bachofen 1982; Oldmixon et al. 1985).

Mit einer nichtdestruktiven Technik wie der Mikro-Computertomographie, die zudem verschiedene Möglichkeiten der Visualisierung und Quantifizierung bietet, ließe sich dieser Forderung näher kommen.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Es soll eine Präparationstechnik erarbeitet werden, die es erlaubt, die Mikrostrukturen humaner Lungen mit der Mikrocomputertomographie abzubilden.

Bei der Präparation müssen drei grundlegende Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Gewebeprobe müssen ausreichend stabil sein, damit keine räumlichen Veränderungen auftreten.
2. Die Alveolararchitektur und ihre Abmessungen sollen, verglichen mit dem ursprünglichen Zustand *in vivo*, so gut wie möglich erhalten bleiben.
3. Der Röntgenkontrast des Gewebes muss geeignet sein, um es radiologisch abbilden zu können.

Mit der Gewinnung zweidimensionaler mikrotomographischer Schnittbilder wird die dreidimensionale Darstellung der Alveolarstruktur angestrebt.

Die Nachverarbeitung der lückenlosen digitalen Datensätze soll die Segmentation der Bronchien und abhängiger Einheiten ermöglichen.

Ferner soll überprüft werden, ob es das neuartige Darstellungsverfahren ermöglicht, valide Vermessungen des Gewebes durchzuführen.

Dazu werden die mikrotomographischen Ergebnisse mit der etablierten Histomorphometrie verglichen. Der Goldstandard der histologischen Gewebevermessung dient als Referenz.

Da bei dem Vergleich zwei verschiedene Bildgebungen mit unterschiedlichen Messverfahren ausgewertet werden, wird in der Mikro-CT zusätzlich die stereologiebasierte Messung der Histologie durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Organpräparate

Die Untersuchungen werden an fünf Lungen von Schlachtschweinen aus dem Gießener Schlachthof durchgeführt. Die Schweine (Rasse: Masthybride) haben zum Schlachtzeitpunkt ein Lebendgewicht von etwa 120 kg und sind sechs Monate alt.

Die thorakalen Organe finden keine Verwendung bei der Fleischverarbeitung. Sie dürfen als so genannte Nebenprodukte des Schlachtbetriebs ausschließlich zu Tierfutter weiterverarbeitet werden. Die Schweine wurden zur Fleischverarbeitung geschlachtet. Kein Tier wurde extra für die Studie geschlachtet.

Die Zerlegung der Schweine beginnt mit einer medianen Sternotomie. Die Speiseröhre und das Mediastinum mit dem Herzen (das so genannte Geschlinge) werden im Verbund mit den Lungen stumpf herausgelöst.

Durch Inspektion und Palpation werden Lungen ausgesucht, die makroskopisch keine krankhaften Veränderungen oder Pleuraverletzungen aufweisen.

Es werden ausschließlich linke Lungen präpariert. Geeignete Organe werden kurz unter fließendem Wasser abgespült. Die Intaktheit der Lunge wird nach Intubation des Hauptbronchus mit einem herkömmlichen Magill-Endotrachealtubus (Innendurchmesser 5,0 mm; Fa. Mallinckrodt Medical, Hennef / Sieg) durch Beatmung mit einem Ambubeutel überprüft: Das Organ muss sich bei Luftinsufflation vollständig entfalten. Gewebeerletzungen zeigen sich nach Abklemmen des Tubus durch Luftverluste und Volumenabnahme der geblähten Lunge.

Die Lungen werden in den Fixationsraum im anatomischen Institut transportiert.

Dort wird die Lunge vorsichtig von den mediastinalen Organen (Herz, Gefäße und Ösophagus) abpräpariert. Die Lungengefäße werden hilusnah durchtrennt und der Hauptbronchus wird an der Carina abgesetzt (Abb. 2).

Durch exemplarische Ventilation nur eines Lungenlappens lässt sich der Effekt der Beatmung bei den nach ihrer Entnahme aus dem Thorax kollabierten Organen verdeutlichen (Abb. 3).

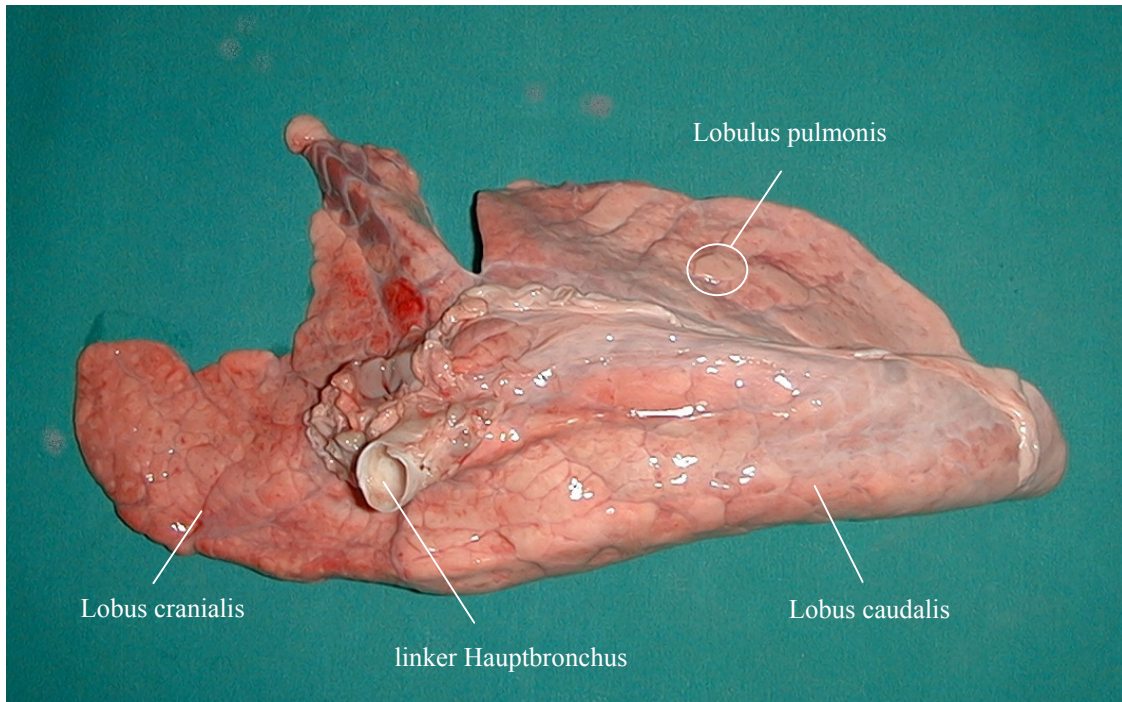


Abb. 2: Frisch isolierte linke Schweinelunge; Ansicht von mediastinal. Nach der Exstirpation kollabierte Lunge. Gut zu sehen sind die Interlobularsepten und die Lungenläppchen (Lobuli pulmonis).

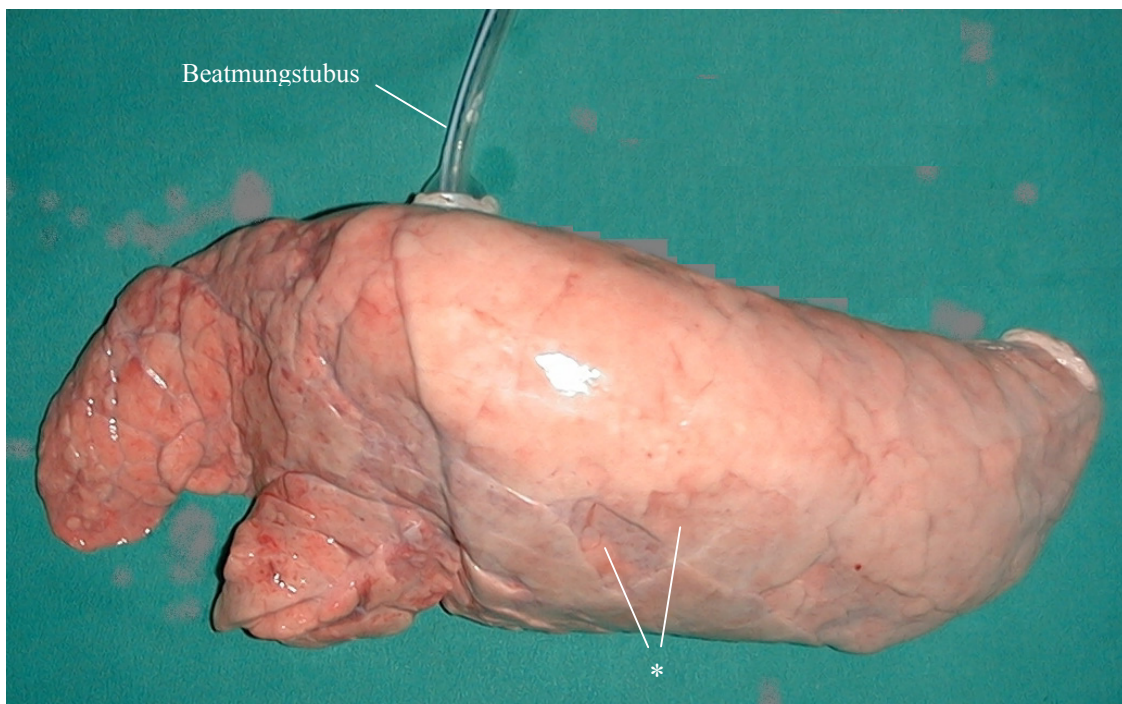


Abb. 3: Schweinelunge; Ansicht von costal. Um den Effekt der Beatmung zu verdeutlichen, wurde der Tubus so positioniert, dass nur der Unterlappen ventiliert wird. Die polygonalen Dystelektasen (\*) weisen auf die noch unvollständig entfalteten Lobuli hin.

## 2.2 Fixierung der Lungen

Die Fixation der Lungen in Inspirationsstellung erfolgt über die von Rau und Mittermayer (1980) entwickelte Formalindampfbeatmung.

Verwendet wird eine Apparatur, die aus einer Beatmungsmaschine und einer Fixationskammer besteht (Abb. 4).

Der Hauptbronchus der Lunge wird mit dem Ansatzstück der Beatmungsmaschine verbunden. Die Lunge wird dann in der Fixationskammer auf einer anatomisch geformten Auflagefläche so positioniert, dass sie auf ihrer mediastinalen Fläche zu liegen kommt. Dadurch können im Bronchialsystem enthaltene Spülflüssigkeit und Blut ablaufen. Nach dem Verschließen der Kammer wird der Fixationsprozess eingeleitet.

In einem geschlossenen Behälter wird Formalin (Formaldehyd 37 %, säurefrei; Firma Merck, Darmstadt) auf 50 °C erwärmt. Der entstehende Formalindampf wird durch eine Membranpumpe rhythmisch in die Lunge gepumpt. Zusätzlich gelangt Formalindampf über ein Schlauchsystem in die Fixationskammer. So wird die Fixation der Lunge über ihre pleurale Oberfläche von außen unterstützt. Um die Entstehung von Kondenswasser im Lungengewebe zu verhindern, ist die Temperatur des Formalindampfs in der Kammer höher als in der Lunge. Dieses wird durch eine zwischengeschaltete Heizung erreicht, welche die Temperatur des Formalindampfs in der Fixationskammer um weitere 5 °C auf 55 °C erhöht.

Nach alveolärer Rekrutierung mit einem Beatmungsspitzenwert (peak pressure) von 40 cm H<sub>2</sub>O über 40 Sekunden werden die Lungen in einem volumenkontrollierten, drucklimitierten Beatmungsmodus mit positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) beatmet. Der Beatmungszyklus beginnt mit einer Pumpentätigkeit von wenigen Sekunden, bei der ein konstantes Volumen des Luft-Formalindampfgemischs in das Rohrsystem eingebracht wird. Der Inspirationsphase folgt ein Pumpenstillstand, in der sich die Lunge durch ihre eigenen Rückstellkräfte retrahieren kann (der Expirationsphase entsprechend). Die Atemfrequenz liegt bei 12 / Minute, das Verhältnis von Inspirations- zu Expirationszeit (I:E-Ratio) beträgt 1:2.

Um die verschieden großen Lungen optimal zu entfalten, wird die Beatmung individuell angepasst. Dies geschieht durch die stufenlose Regulierung des Beatmungsdrucks mittels eines nachgeschalteten Ventils (Abb. 4). Bei vollständiger Öffnung des Ventils ist der Druck im Beatmungssystem niedriger als der pulmonale Widerstand – die Lunge entfaltet

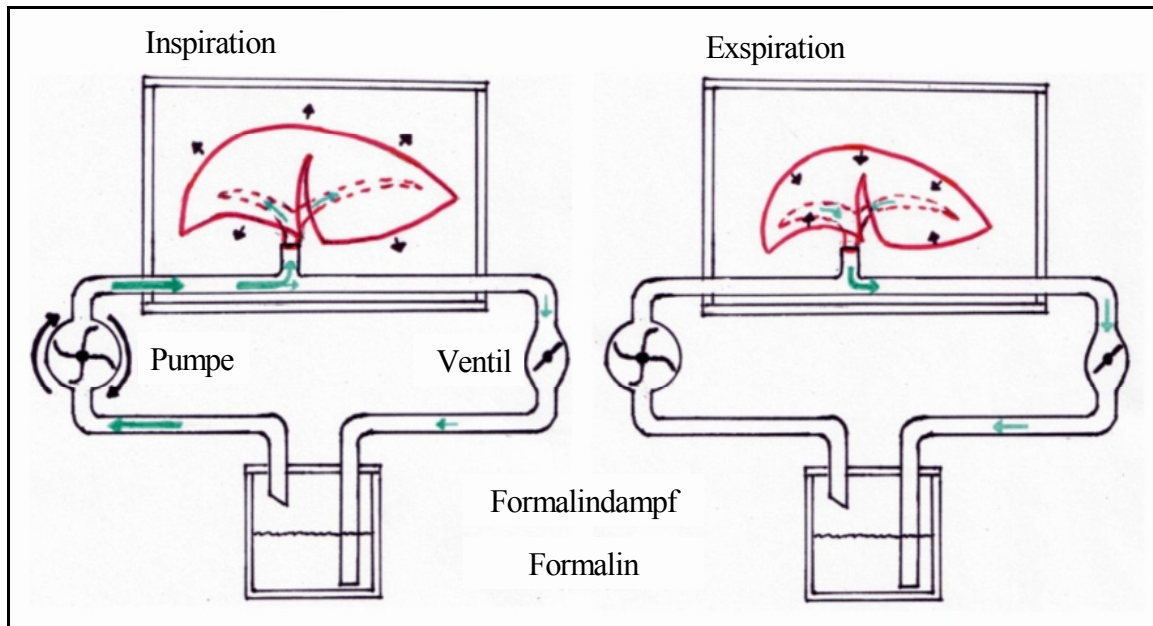


Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur zur Lungenfixierung durch Beatmung mit Formalindampf. Inspirations- und Expirationsstellung der Lunge resultieren aus der eingestellten Dauer der Pumpentätigkeit und der Regulierung des Widerstands durch das Ventil im abführenden Schenkel.

sich nicht. Je weiter das Ventil geschlossen wird, desto höher ist der Beatmungsdruck. Wird der pulmonale Widerstand überwunden, dehnt sich die Lunge aus. In der Expirationszeit kann die Lunge aufgrund des ventilbedingten Widerstands nicht vollständig kollabieren. Es besteht ein positiver endexpiratorischer Druck von 5 cm H<sub>2</sub>O. Unter optischer Kontrolle wird das zugeführte Volumen durch Erhöhung des nachgeschalteten Widerstands so lange erhöht, bis die Lunge vollständig entfaltet ist (Abb. 5). Der Beatmungsspitzenruck ist mit maximal 35 cm H<sub>2</sub>O limitiert.

Der Fixationsprozess dauert sechs Stunden und resultiert in einem in Inspirationsstellung fixierten, lufthaltigen Präparat.

Das Öffnen der Kammer nach Ende der Fixation ist aufgrund der bestehenden hohen Formaldehydkonzentration nur mit einer Gasmaske möglich.



Abb. 5: Fixationsmaschine, Ansicht von oben. Die Lunge ist am Hauptbronchus über ein Ansatzstück mit der Gaszuführung der Apparatur verbunden. Zum Zeitpunkt der Aufnahme befindet sich die Lunge in Inspirationsstellung. Die Pleura visceralis ist glatt-glänzend und ohne Fältelung.

### 2.3 Härtung und Trocknung durch Sauerstoffinsufflation

Die fixierte Lunge ist bei Entnahme aus der Fixationskammer feucht. Außerdem besteht eine geringe Retraktionstendenz.

Daher wird an die Fixierung mit Formalindampf eine Sauerstofftrocknung angeschlossen. Dazu wird ein Endotrachealtubus im Bronchusstumpf vernäht und geblockt. Die Lunge wird über einen Wandanschluss kontinuierlich mit Sauerstoff insuffliert. Der Fluss ist so eingestellt, dass die Lunge gerade voll entfaltet, also keine pleurale Fältelung mehr erkennbar ist. Das Präparat wird, um Deformierungen zu vermeiden, auf Zellstoff gebettet und zur gleichmäßigen Trocknung regelmäßig gewendet. Nach 72 Stunden kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr ist die Lunge ausgehärtet. Sie ist nun in Inspirationsstellung fixiert.

## 2.4 Ermittlung von Lungenvolumina und -gewichten

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Präparationstechnik werden Gewichts- und Volumenbestimmungen der Lunge durchgeführt.

Die isolierten Organe werden vor und nach ihrer Fixierung (inklusive O<sub>2</sub>-Trocknung) gewogen (Präzisionswaage L2200P, Fa. Sartorius, Göttingen).

Das Lungenvolumen wird durch Wasserverdrängung nach der Methode nach Scherle (1970) bestimmt. Die Lunge wird in ein vollständig mit Wasser gefülltes Becken getaucht und das überlaufende Wasser aufgefangen. Das Volumen des verdrängten Wassers entspricht dem Volumen der eingetauchten Lunge.

Die Lungenvolumina werden zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt: vor der Fixation im kollabierten (1) und im geblähten Zustand (2) sowie nach der Fixation (3). Vor allen Messungen wird ein Endotrachealtubus in den Bronchusstumpf eingeführt und abgeklemmt. So wird einer Komprimierung der Lunge durch den Druck des Wassers beim Messvorgang entgegengewirkt. Im Fall der zweiten Volumenbestimmung wird die Lunge vor dem Abklemmen des Tubus über einen Beatmungsbeutel in Inspirationsstellung gebracht.

Das Volumen der belüfteten Lunge vor der Fixation ist das Zielvolumen der fixierten Lunge und wird als Totalkapazität gewertet.

## 2.5 Gewinnung der Lungenscheiben und Gewebezylinder

Zur Überprüfung der regulären kompletten Belüftung werden die fixierten Lungen in mediolateraler Projektion bei 40 kV und 12 mAs geröntgt.

Danach werden die Lungen in Längsrichtung mit einer herkömmlichen Brotschneidemaschine in 10 mm dicke Scheiben geschnitten. Man erhält durchschnittlich neun Scheiben pro Lunge.

Für die Gewinnung der Proben wird von jeder Lunge die zweite Scheibe, gerechnet von der costalen Lungenfläche, ausgewählt. Mit einer scharfen Stanze werden aus dieser Lungenscheibe zwei Gewebezylinder entnommen. Die Probennahme erfolgt an festgelegten Positionen (Abb. 6). Es wird eine Probe aus dem Lobus caudalis und eine aus dem Lobus cranialis gewonnen. Gestanzt wird stets subpleural. Der Durchmesser der Gewebezylinder beträgt 8 mm, die Länge 10 mm. Insgesamt werden 10 Gewebezylinder (zwei Gewebezylinder pro Lunge bei insgesamt fünf untersuchten Lungen) gewonnen.



Um den Ort ihrer Entnahme zu dokumentieren, werden von jeder ausgewählten Scheibe vor und nach Probengewinnung mit einem Mammographiegerät (Mammomat, Fa. Siemens, Erlangen) Röntgenbilder in Weichteiltechnik angefertigt: Film-Fokus-Abstand 45 cm; Belichtungsdaten 30 kV, 80 mAs; Filmmaterial: hochauflösender folienloser Materialprüffilm (Cronex NDT 65, Fa. DuPont, Wilmington, USA).

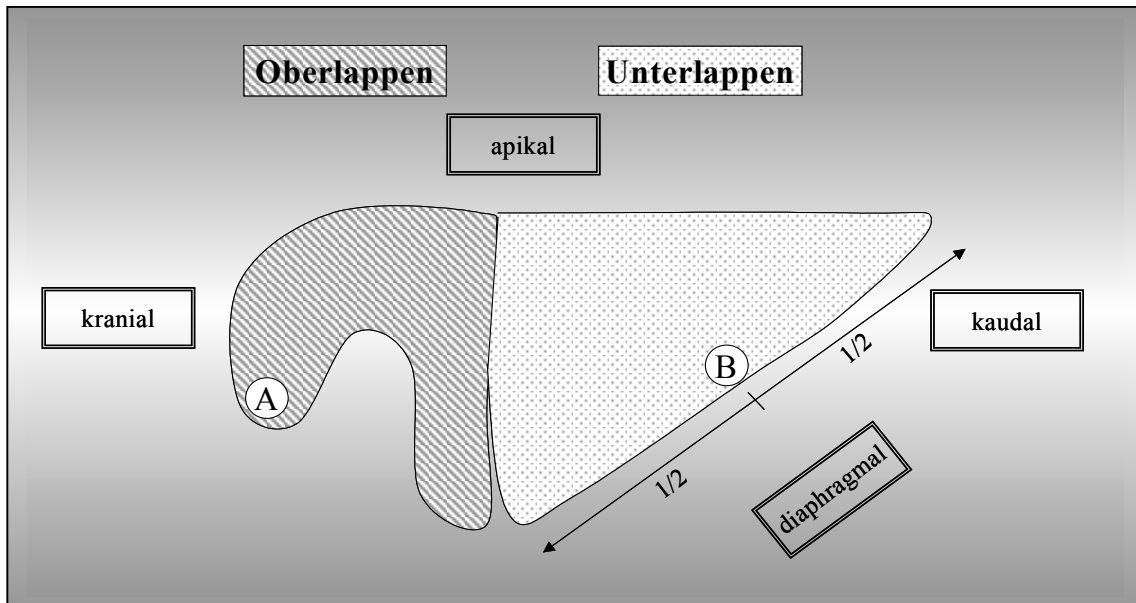


Abb. 6: Schweinelunge; Positionen der Gewebeatnahme: es wird jeweils subpleural gestanzt, ohne sich an anatomischen Strukturen zu orientieren (Vermeidung von Anisotropie).

## 2.6 Präparation der Gewebezylinder

### 2.6.1 Osmiumtetroxid-Kontrastierung

Für die mikrotomographischen Untersuchungen besitzen die dünnen Alveolarsepten einen zu niedrigen Röntgenkontrast. Daher muss in die Alveolarwände ein Element mit hoher Röntgendichte (also hoher Ordnungszahl) eingebracht werden, um den Gewebekontrast zu erhöhen.

Als Kontrastmittel wird Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) verwendet. Mit seiner Ordnungszahl von 76 besitzt es einen hohen Röntgenkontrast. Die Substanz bindet sich irreversibel an ungesättigte Fettsäuren der Zellmembran, indem es diese oxidiert. Dabei wird es zu schwarzem, metallischem Osmium reduziert (Adams 1960; Komorowska et al. 1982; Behrman 1983). Aus der Schwermetalleinlagerung resultiert die erwünschte Kontrastierung.

#### a) Osmieren:

Aufgrund der hohen Giftigkeit von Osmiumtetroxid wird unter dem Abzug gearbeitet. Jede Lungenstanze wird in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben. Mit einer Glaspipette werden 1,5 ml einer 1%-igen Osmiumtetroxid-Lösung (Osmiumtetroxid kristallin, Fa. Paesel-Lorei; Frankfurt/Main; gelöst in Reinstwasser) hinzugegeben. Anschließend lässt man die Proben über drei Stunden auf einem Probenrotator (Eigenbau G. Magdowski; Institut für Anatomie und Zellbiologie) langsam rotieren. In dieser Zeit verfärben sich die Gewebezylinder durch die Osmierung dunkelbraun bis schwarz.

#### b) Waschen:

Zur Entfernung ungebundenen Osmiumtetroxids aus den Proben werden sie mit Reinstwasser gewaschen. Dazu wird die Osmiumtetroxid-Lösung abgegossen und die Lungenstanzen kurz vorsichtig auf einem saugfähigen Tuch gerollt. So werden bereits größere Mengen überschüssigen Osmiums entfernt. Jede Stanze wird in ein Schraubdeckelgläschen gegeben und 7 ml Reinstwasser zugefügt. Dann rotieren die Proben 30 Minuten. Das Reinstwasser wird im Anschluss ausgetauscht und man lässt die Proben erneut rotieren. Diese Prozedur (Abgießen – erneutes Befüllen – Probenrotation) wird insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend sind die Proben in Reinstwasser im Kühlschrank bei 4 °C lagerungsfähig.

### 2.6.2 Chemische Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung

Um den Gewebekontrast zu optimieren, muss nun die Flüssigkeit vollständig aus dem Alveolarraum entfernt werden.

Zum Einsatz kommt die Kritisch-Punkt-Trocknung (Anderson 1951). Dieses in der Elektronenmikroskopie etablierte Verfahren ermöglicht eine gewebeschonende Trocknung der Lungenzylinder unter Erhalt der räumlichen Struktur.

Beim Übergang eines Stoffs von flüssig zu gasförmig unterhalb des so genannten kritischen Punkts muss eine Phasengrenze überschritten werden, die in teilweise hohen Oberflächenspannungen resultiert (z.B. beim Verdunsten des Wassers bei der einfachen Lufttrocknung). Diese Oberflächenspannungen können zu Strukturartefakten oder gar Strukturzerstörungen am Präparat führen. Oberhalb des kritischen Punkts existiert diese Phasengrenze nicht mehr. So ist ein *schlagartiger* Übergang von flüssig zu gasförmig möglich, ohne dass Oberflächenspannungen auftreten. Die Kritisch-Punkt-Trocknung hat zum Ziel, Temperatur und Druck so zu erhöhen, dass eine objektschonende Trocknung jenseits dieses Punkts möglich ist (Abb. 7).

Bei Wasser liegt der kritische Punkt mit einer Temperatur von 374 °C und einem Druck von 220 bar sehr hoch. Deshalb muss Wasser gegen ein Medium mit einem niedriger liegenden kritischen Punkt ausgetauscht werden: Bei dem standardmäßig verwendeten Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) liegt der kritische Punkt bei nur 31 °C und 73,8 bar und ist deshalb technisch leicht zu realisieren. Da sich das Wasser im Präparat mit flüssigem CO<sub>2</sub> nur schlecht mischt, wird es zunächst durch ein Zwischenmedium (2,2-Dimethoxypropan) substituiert.

#### a) chemische Entwässerung:

Als vorbereitender Schritt zur Kritisch-Punkt-Trocknung werden die osmierten Stanzylinder chemisch entwässert. Es wird angesäuertes 2,2-Dimethoxypropan (DMP) verwendet, das mit dem Objektwasser zu Aceton und Methanol reagiert.

#### *Herstellung:*

Zu 100 ml DMP (2,2-Dimethoxypropan, zur Synthese, Gehalt 97 %, Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) werden 4 Tropfen 37 %ige Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben.

Unter dem Abzug wird immer eine Lungenprobe aus dem mit Reinstwasser gefüllten Schraubdeckelgläschen entnommen. Die Probe wird kurz und vorsichtig auf saugfähigen Tüchern gerollt, um so bereits einen Teil des Wassers zu entfernen. Sie wird dann in ein frisches Schraubdeckelgläschen gegeben. In dieses pipettiert man 7 ml angesäuertes DMP. Danach rotieren die Lungenproben für 30 Minuten. Anschließend wird das DMP durch frisches ersetzt. Insgesamt wird das DMP viermal ausgetauscht und entsprechend viermal für 30 Minuten rotiert. Nach dem letzten Rotationsschritt wird das DMP noch einmal ausgetauscht.

*b) Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD= critical point drying)*

Die Trocknung selbst wird mit dem *Critical Point Dryer CPD 030* (Fa. BAL-TEC, Witten) durchgeführt. Es können immer nur vier Gewebeproben getrocknet werden. Limitierend ist die Größe der Druckkammer.

Zunächst muss das DMP gegen flüssiges CO<sub>2</sub> ausgetauscht werden. Dazu wird mit Waschvorgängen begonnen, bei denen das Medium DMP schrittweise durch das bei Raumtemperatur und einem Druck von 55 bar bereits flüssige Medium CO<sub>2</sub> ersetzt wird. Die Lungenzylinder werden in einen mit angesäuertem DMP angefüllten Probenhalter so eingefüllt, dass sie nicht mit Luft in Kontakt kommen. Dieser wird mit einem Deckel sicher verschlossen. Auch die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners wird mit angesäuertem DMP gefüllt. Der siebartige Probenhalter wird zügig in die Druckkammer eingesetzt und diese gut verschlossen. Nun wird die Kammer auf 10 °C abgekühlt.

Nach Einleiten des Kohlendioxids (Kohlendioxid, unter Druck verflüssigt; Fa. Messer-Griesheim, Kassel) werden alle Ventile geschlossen und es erfolgt eine Durchmischung durch einen eingeschalteten Magnetprüher für vier Minuten. Anschließend wird das Gasgemisch abgelassen und erneut CO<sub>2</sub> eingeleitet. Das Manöver (CO<sub>2</sub> einleiten, mischen, rühren, Gasgemisch ablassen, frisches CO<sub>2</sub> einleiten) wird zehnmal wiederholt. Die Proben befinden sich dann vollständig in flüssigem CO<sub>2</sub>. Daraufhin wird die Druckkammer ein letztes Mal mit CO<sub>2</sub> gefüllt, Kühlung und Prüher werden ausgeschaltet.

Mit dem Einschalten der Heizung des Kritisch-Punkt-Trockners beginnt die eigentliche Trocknung. Die benötigte Druckerhöhung resultiert allein aus der Temperaturerhöhung der Kammer. Der kritische Punkt für CO<sub>2</sub> ist bei 31 °C und 73,8 bar erreicht. Die Präparate werden durch den prompten Umschlag von flüssig zu gasförmig getrocknet. Um eine Temperaturreserve zu schaffen, wird die Kammer weiter auf 42 °C (resultierender Druck etwa 95 bar) erwärmt. Diese Temperaturreserve ist nötig, da es beim Ablassen des Gases

zu einer Abkühlung kommt. Hierbei können Feuchtigkeitseffekte auftreten, die das Trocknungsergebnis beeinträchtigen (Fromme und Pfautsch 1975; Bozzola und Russell 1991). Bei der konstanten Temperatur von 42 °C wird das Gas unter ständiger Kontrolle langsam abgelassen, bis Normaldruck erreicht ist. Dann können die Proben aus der Kammer entnommen werden. Sie sind nun vollständig getrocknet.

Die Aufbewahrung erfolgt in 2 ml-Eppendorfgefäßen bei Raumtemperatur.

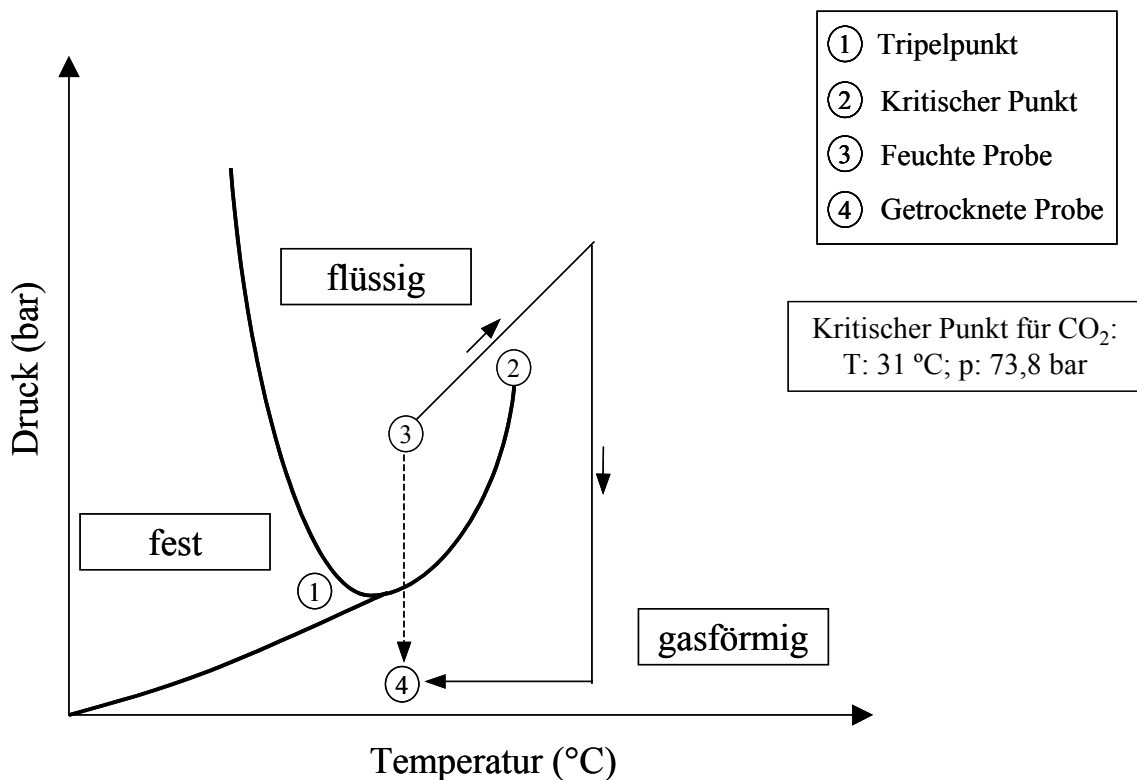


Abb. 7: Phasendiagramm: Verfahren der Kritisch-Punkt-Trocknung. Das Fehlen der Phasengrenze jenseits des kritischen Punkts ermöglicht eine strukturschonende Probentrocknung (—>), im Gegensatz zur Luft- oder Vakuumtrocknung, bei der diese überschritten werden muss (--->).

*Tripelpunkt = Vorliegen aller drei Aggregatzustände im Gleichgewicht*

## **2.7 Durchmesser- und Gewichtsbestimmungen an den Gewebeproben**

Zur Abschätzung der Probenschumpfung durch die Präparation wird der Probendurchmesser vor der Osmierung und nach der Kritisch-Punkt-Trocknung mittels Schieblehre vermessen.

Zusätzlich wird das Probengewicht ermittelt (Analysenwaage Mettler AM 100, Fa. Mettler, Gießen).

## **2.8 Röntgen und Markieren der Gewebezyylinder**

Die osmierten und getrockneten Gewebezyylinder werden in Weichteiltechnik (Gerät, Einstellungen, Filmmaterial vgl. Kap. 2.5) geröntgt. Dadurch ist eine Feinbeurteilung der Proben möglich. Das Ergebnis der Kontrastierung und Trocknung kann so überprüft werden.

Um bei der Vergleichsuntersuchung das Heraussuchen korrespondierender Schnittpaare (histologischer Schnitt / Mikrotomogramm) zu erleichtern, wird der Mantel der Probenzyylinder mit einer Kerbe versehen. Diese Kerbe dient der Orientierung und ermöglicht eine gleichartige Ausrichtung von Mikro-CT Bildern und histologischen Schnitten.

Da eine möglichst gleichartige Angulierung der Gewebeproben im Tomographen und bei der histologischen Schnittgewinnung erzielt werden soll, müssen sie möglichst idealen Zylindern entsprechen. Zu diesem Zweck werden ihre unregelmäßigen Grund- und Deckflächen mit einer Rasierklinge nivelliert.

## 2.9 Mikro-Computertomographie (Mikro-CT)

Ein Mikro-Computertomograph ist in seinem Aufbau grundsätzlich mit den klinischen Computertomographen vergleichbar. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass Proben mit einer Ortsauflösung von wenigen Mikrometern abgebildet werden können und man eine Detailerkennbarkeit im mikroskopischen Bereich erzielt. Die hohe Auflösung geht auf Kosten der Probengröße, welche im Zentimeter- bis Millimeterbereich liegt. Mit Hilfe der Mikro-CT können die Proben nichtdestruktiv untersucht werden: Die Probe bleibt in ihrer Gesamtheit intakt (Flannery et al. 1987; Rügsegger et al. 1996; Engelke et al. 1999).

Die wichtigsten Komponenten eines Mikrotomographen (Abb. 8) sind Strahlungsquelle (Mikrofokus), Probenmanipulator, hochauflösender Flächendetektor (CCD-Array) und die Rechereinheit zur Systemkontrolle und Datenverarbeitung. Im Gegensatz zur konventionellen Computertomographie rotiert im Mikrotomographen nur das Objekt. Strahlungsquelle und Detektor bleiben hingegen stationär. Das Untersuchungsobjekt muss daher rotationsstabil sein.

Beim Durchstrahlen des Objekts kommt es durch Wechselwirkungen (besonders durch den Photoeffekt) zu einer Abnahme der Photonenflussdichte, die mit dem Detektorsystem gemessen wird. Das Schwächungsausmaß steht im Verhältnis zur Art und räumlichen Verteilung des jeweiligen Gewebes. Die erhaltenen Daten eines Intensitätsprofils liefern letztlich ein digitales Transmissionsradiogramm des Objekts. Durch Rotieren der Probe in kleinen Winkelinkrementen werden Projektionsradiographien der gesamten Probe erzeugt. Die Anzahl der Radiographien ergibt sich aus der Größe der Rotationsschritte.

Alle zehn formalindampffixierten, kontrastierten und getrockneten Lungenproben werden mit dem institutseigenen, kommerziell erhältlichen Mikro-Computertomographen *Skyscan 1072* (*SkyScan-1072 High resolution desk-top micro-CT system*, Fa. Skyscan, Aartselaar, Belgien) untersucht. Eine Beschreibung des verwendeten Geräts findet sich bei Sasov und Van Dyck (1998).

Die Strahlungsquelle ist eine Wolfram-Mikrofokusröhre (80 kV type L6731-01, Fa. Hamamatsu, Toyooka-village, Japan), die bei Beschleunigungsspannungen von 20 bis 80 kV betrieben werden kann. Der Winkel des Strahlenbündels liegt bei 39°. Die erreichbare Fokusgröße beträgt 8 µm bei einer Leistung von 8 W.

Das verwendete System basiert auf einer Kegelstrahlgeometrie. Der Lungenzylinder wird während der Rotation in seiner Gesamtheit von der konusförmigen Röntgenstrahlung

durchdrungen, die nach entsprechender Schwächung auf den Flächendetektor trifft. Durch die Kegelstrahlgeometrie entscheidet die Position der Probe zwischen Strahlenquelle und Detektor über die resultierende Vergrößerung (und damit auch die Pixelgröße): Je größer der Abstand zum Detektor ist, desto stärker ist die Vergrößerung.

Als Röntgendetektor mit hoher räumlicher Auflösung dient eine Szintillatorschicht, die auf einem 2:1 verkleinernden Glasfasertaper abgeschieden wurde. Dieser liegt auf dem Kamerafenster einer gekühlten CCD-Kamera (charge-couple-device, 12 bit; 1024 x 1024 Pixel). Hier kommt es zu einer Umwandlung der Röntgenstrahlung in sichtbares Licht. Die Dichte jedes Voxels wird in einen Grauwert einer 16-bit-Skala umgewandelt.

Ein interner Dual Pentium III Computer mit unter Windows NT laufender Software dient der Anlagensteuerung und Datenerfassung.

Das System ermöglicht bei maximaler Vergrößerung eine Detailerkennbarkeit von 3  $\mu\text{m}$ , die räumliche Auflösung (angegeben als 10 %-Wert der Modulationsübertragungsfunktion-MTF) liegt bei 8  $\mu\text{m}$ . Die kleinste erreichbare Pixelgröße wird mit unter 2  $\mu\text{m}$  angegeben. Die Kegelstrahlgeometrie des Mikrotomographen limitiert die Probengröße. Der maximale Probendurchmesser liegt bei 20 mm.

Der zu untersuchende Gewebezylinder wird auf einen Probenhalter gebracht und dieser auf dem Drehteller des Scanners montiert. Über einen computergesteuerten Präzisionsprobenmanipulator wird die Gewebeprobe vertikal so positioniert, dass sie sich beim Scanvorgang vollständig im konusförmigen Röntgenstrahl befindet. Mit der variierbaren horizontalen Positionierung wird die Vergrößerung eingestellt (Abb. 8).

Zur Untersuchungsplanung wird von der Probe ein Übersichtsradiogramm (Scout View) erstellt. Die Untersuchung wird bei einer Röhrenspannung von 60 kV und einem Röhrenstrom von 100  $\mu\text{A}$  durchgeführt. Es werden keine Filter verwendet. Eingesetzt wird ein Modus zur Korrektur von Strahlenaufhärtingen („beam hardening correction“). Die Probe wird während des Scanvorgangs in 400 Rotationsschritten von je 0,45° um insgesamt 180° gedreht. Die Expositionsdauer pro Rotationsschritt beträgt 18 Sekunden. Die Messdauer für eine Probe – in der insgesamt 400 Projektionsradiographien erzeugt werden – liegt bei zwei Stunden.

Aus den 400 Projektionsradiographien pro Lungenzylinder werden durchschnittlich 900 kontinuierliche Schnittbilder in axialer Richtung berechnet.

Um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen, wird die höchstmögliche Matrix von 1024 x 1024 Bildpunkten (Pixeln) gewählt.



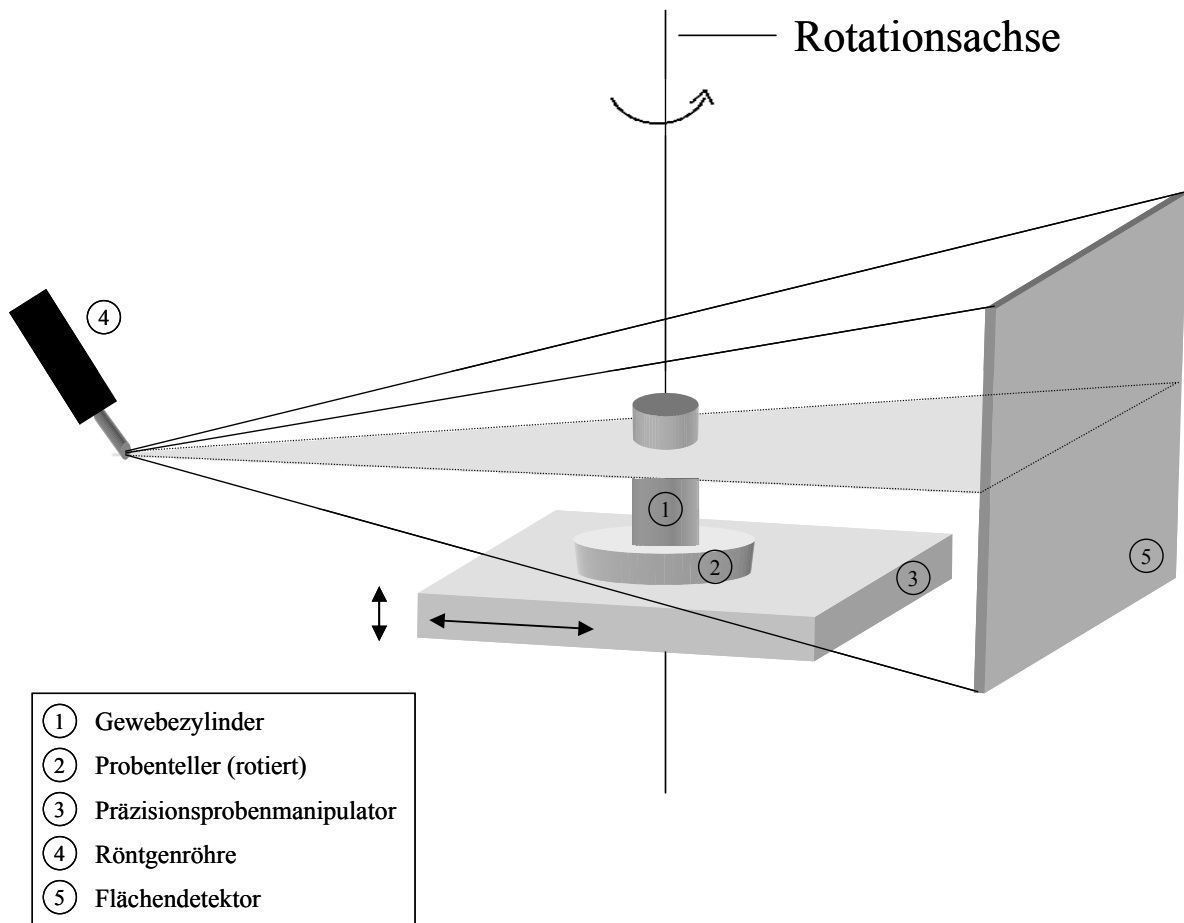


Abb. 8: *Prinzip des eingesetzten Mikro-Computertomographen mit Kegelstrahlgeometrie. Der konusförmige Röntgenstrahl durchdringt das gesamte Objekt und trifft auf den Flächendetektor.*

Die Projektionsaufnahmen können aufgrund der Kegelstrahlgeometrie des Systems auf der Basis eines modifizierten Feldkamp-Algorithmus (Feldkamp et al. 1984) rekonstruiert werden. Da der Probendurchmesser einheitlich bei 8 mm liegt, kann mit einer konstanten Vergrößerung von 27,5 gearbeitet werden. Es resultieren kubische – so genannte isotrope – Voxel (Volumenelemente) mit einer Seitenlänge von 9  $\mu\text{m}$ . Sie ermöglichen eine Ortsauflösung von 18  $\mu\text{m}$ . Die Würfelform der Voxel optimiert durch die damit verbundene Isotropie der Bilddatensätze die Rekonstruktionen.

Die Mikrotomogramme von jedem Lungenzylinder werden digital als Bitmap-Dateien auf CD gebrannt (Speicherbedarf 1 MB pro Datensatz).

## **2.10 Gewinnung der histologischen Präparate**

Zur Validierung des Verfahrens wird die Mikro-CT mit dem histologischen Goldstandard der Darstellung und Analyse des Lungengewebes verglichen.

Dazu werden alle 10 Proben im Anschluss an die mikrotomographische Darstellung zusätzlich histologisch weiterverarbeitet.

Die Gewebeproben werden in Paraffin eingebettet (Protokoll siehe Abb. 9). Durch die Einbettung bei Unterdruck wird eine homogene, blasenfreie Durchtränkung der lufthaltigen Proben erreicht. Aufgrund der bestehenden Osmiumkontrastierung ist für die Vergleichsuntersuchungen eine zusätzliche histologische Färbung nicht erforderlich.

Es werden Serienschnitte mit einer Dicke von 8  $\mu\text{m}$  angefertigt (vergleichbar der Schichtdicke von 9  $\mu\text{m}$  in der Mikro-CT). Alle 200  $\mu\text{m}$  werden im Präparat fünf aufeinanderfolgende Schnitte gewonnen. Je Probenzylinder resultieren etwa 130 sequenzielle Serienschnitte.

## **2.11 Schnittbeurteilung Histologie/Mikro-CT – Artefakte und Ausbeute**

### **2.11.1 Histologie**

Die histologischen Schnitte werden mit einem Standard-Binokular-Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss, Jena) bei Übersichtsvergrößerung und 100- bis 250-facher Vergrößerung auf ihre Intaktheit untersucht.

Als histologische Artefakte definiert werden mechanisch-destruktive Gewebeveränderungen wie Deformierungen, Risse, Brüche, Ablösungen, Falten, Stauchungen im Gewebe und Verunreinigungen sowie Luftblasen, die beim Eindecken der Präparate aufgetreten sind. Schnitte werden nur dann als artifiziell verändert bewertet, wenn Gewebeveränderungen bereits bei Übersichtsvergrößerung erkennbar sind.

In einem zweiten Ausleseverfahren werden aus der Gruppe intakter Schnitte jene ausgesucht, die über geeignete anatomische „Landmarken“ (wie Gefäße, Bronchialstrukturen, interlobuläre Septen) verfügen. Diese Schnitte dienen als Grundlage für die anschließenden Vergleiche mit Schichtbildern aus der Mikro-CT.

**Material: Gewebezylinder (fixiert, osmiert, KP-getrocknet); n=10****1. Einbetten:**

- ▶ 70 % Ethanol über Nacht bei + 4 °C
- ▶ Exsikkator für 10 Minuten
- ▶ im Automaten (TP 1020 Automatic Tissue Processor, Fa. Leica, Nussloch)  
*unter ständigem Unterdruck:*
  - 70 % Ethanol für 1,5 Stunden
  - 80 % Ethanol für 1,5 Stunden
  - 90 % Ethanol für 1,5 Stunden
  - 2 x 100 % Ethanol für 1,5 Stunden
  - 4 x Xylol für 1,5 Stunden
  - 2 x Paraplast (Fa. Sigma, Deisenhofen) für 2 Stunden
- ▶ Ausblocken in frischem Paraplast

**2. Schneiden:**

- ▶ am Mikrotom (Tetrander; Fa. Jung, Heidelberg)
- ▶ Anfertigung von histologischen Schnitten in Querrichtung:  
200 µm verwerfen, 5 Serienschnitte à 8 µm, 200 µm verwerfen, u.s.w.  
Endzahl der Serienschnitte pro Stanzzylinder: durchschnittlich 130
- ▶ Strecken der Schnitte im Wasserbad (40 °C)
- ▶ Schnitte auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger aufziehen  
und über Nacht bei +37 °C stehen lassen
- ▶ Entparaffinieren: 2 x 5 Minuten in Xylol
- ▶ Eindecken: Eindeckmittel Eukitt (Fa. Fluka, Buchs, CH; Vertreter in  
Deutschland: Sigma-Aldrich); Deckgläser (Fa. Menzel, Braunschweig)

Abb. 9: Histologiegewinnung: Einbettungs- und Schneideprotokoll.

Die Landmarken erleichtern das Anpassen der histologischen und korrespondierenden mikrotomographischen Schnitte.

Die ausgewählten histologischen Schnitte werden unter einem Photomikroskop (Axioplan 2; Fa. Zeiss, Jena) mit gekoppelter 3CCD-Kamera (DXC-3000P, Sony, Japan) bei 10-facher Vergrößerung digital fotografiert.

### **2.11.2 Mikro-CT**

Auch die Mikro-CT Bilder werden einer Schnittbewertung unterzogen.

Hierbei wird jedes der etwa 900 tomographischen Schnittbilder einer Gewebeprobe hinsichtlich seiner Abbildungsqualität überprüft.

Als Artefakte werden jene Veränderungen eingestuft, die den Bildeindruck negativ beeinflussen. Hier sind vor allem Strahlenaufhärtungen durch zu starken Gewebekontrast zu nennen.

## **2.12 Bildpaar-Erstellung (Histologie / Mikro-CT)**

Um die realitätsgetreue Abbildung der Feinstrukturen der Lunge in der Mikro-CT zu überprüfen, wird ein Bildvergleich mit korrespondierenden histologischen Schnitten durchgeführt.

Es müssen also vergleichbare Schnitte aus beiden Bildgebungsverfahren gefunden werden. Als Referenzbild dient der fotografierte histologische Schnitt. Das Auffinden des korrespondierenden Bilds aus dem mikrotomographischen Datensatz erfolgt mit Hilfe der Software *Analyze* (Version 4.0, Mayo Foundation, Rochester, Minnesota, USA). Dazu werden alle mikrotomographischen Einzelschnitte der Probe in einen Volumendatensatz überführt. Es ist nun ein kontinuierliches Durchblättern des Datensatzes möglich. Die gleichartige Ausrichtung der mikrotomographisch-histologischen Bilderpaare erfolgt über die eingeschnittene Kerbe (siehe Kap. 2.8) in der Probe.

Trotz größter Sorgfalt bei der Präparation stimmen die Schnittebenen beider Verfahren nicht komplett überein. Schon geringe Winkelabweichungen der histologischen Schnittebene bezogen auf das mikrotomographische Bild führen im Mikrometerbereich zu unterschiedlichen, nicht passenden Schnitten. Aus diesem Grund werden die mikrotomographischen Schnitte interaktiv vom Untersucher angepasst.

Leitstrukturen wie Gefäße, Bronchioli und Septen, die in beiden Verfahren vom Untersucher erkannt werden, dienen der ersten Annäherung. Danach werden im histologischen Schnitt drei möglichst kleine, voneinander distante, markante Strukturen ausgesucht. Nach ihnen wird oberhalb und unterhalb in der Nachbarschaft des mikrotomographischen Schnitts gefahndet. Sind die drei Punkte durch den Benutzer definiert (die Koordinaten der Punkte dem Programm übertragen), errechnet das Programm eine neue mikrotomographische Schnittebene.

Mithilfe dieses Verfahrens gelingt es, die mikrotomographische Schnittebene so zu angulieren, dass die Verkippung kompensiert wird. Der berechnete mikrotomographische Schnitt entspricht der histologischen Schnittebene (Abb. 10).

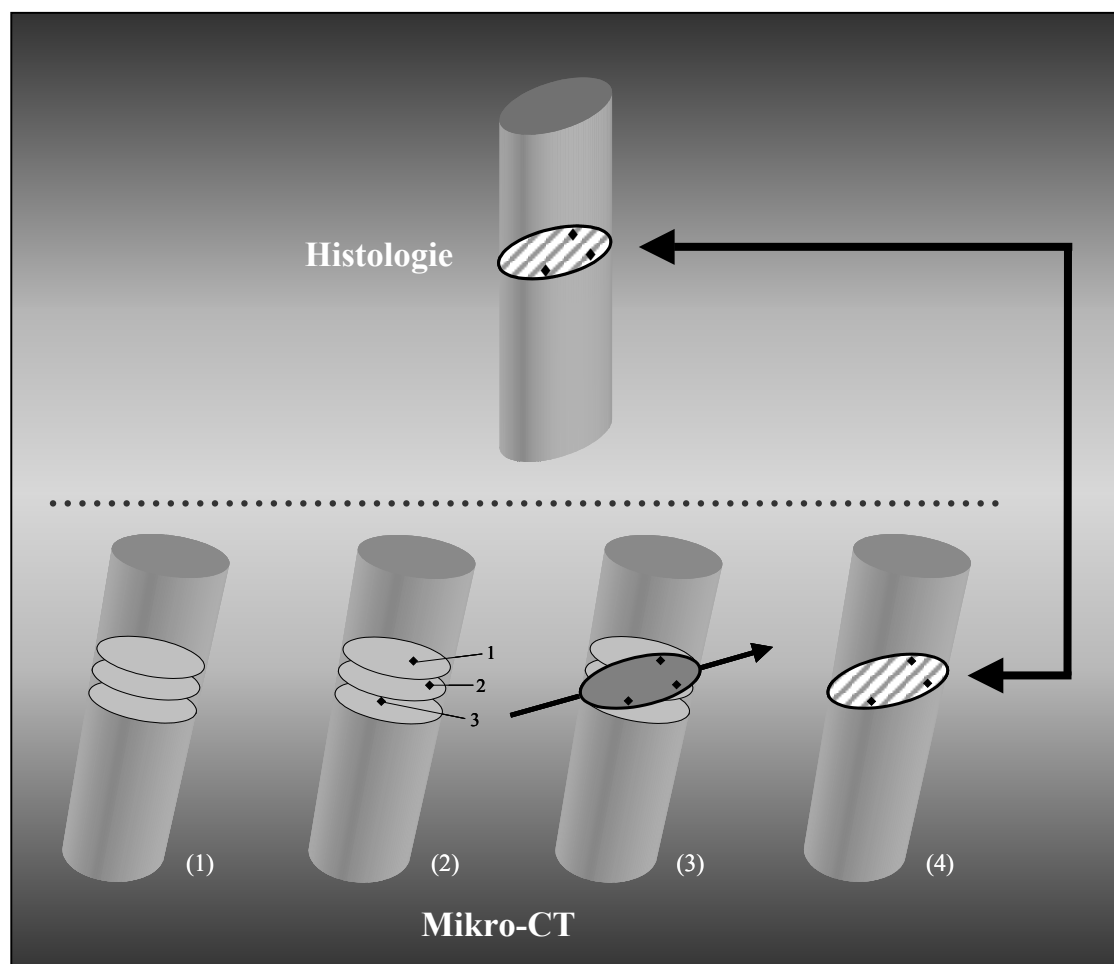


Abb. 10: *Interaktive Anpassung der Schnittebene auf der Grundlage eines kontinuierlichen mikrotomographischen Volumendatensatzes einer Lungenprobe (1): Markierung von drei kleinen, markanten Strukturen in unterschiedlichen Schnitten (2). Diese drei markierten Strukturen definieren dann die neue Schnittebene („Verkippung“), welche durch das Programm errechnet wird (3) und (4).*

## 2.13 Morphometrische Analysen

### 2.13.1 Semiautomatische morphometrische Analyse (Mikro-CT)

Für den Vergleich mit der Histologie wurden die morphometrischen Parameter *alveoläre Oberflächendichte* sowie *Alveolardurchmesser* ausgewählt.

Die morphometrische Analyse wird in einem kubischen Volumenelement (volume of interest – VOI, Messvolumen) durchgeführt, in dem vorwiegend Alveolen enthalten sind (Abb. 11). Das Volumenelement wird visuell so positioniert, dass es keine größeren Gefäße und Bronchien enthält. Die Seitenlänge des Würfels beträgt  $702\ \mu\text{m}$  bei einem Schichtstapel von 78 aufeinanderfolgenden Schnitten. Das resultierende Messvolumen beträgt  $0,346\ \text{mm}^3$ . In ihm sind 474 552 Voxel enthalten.

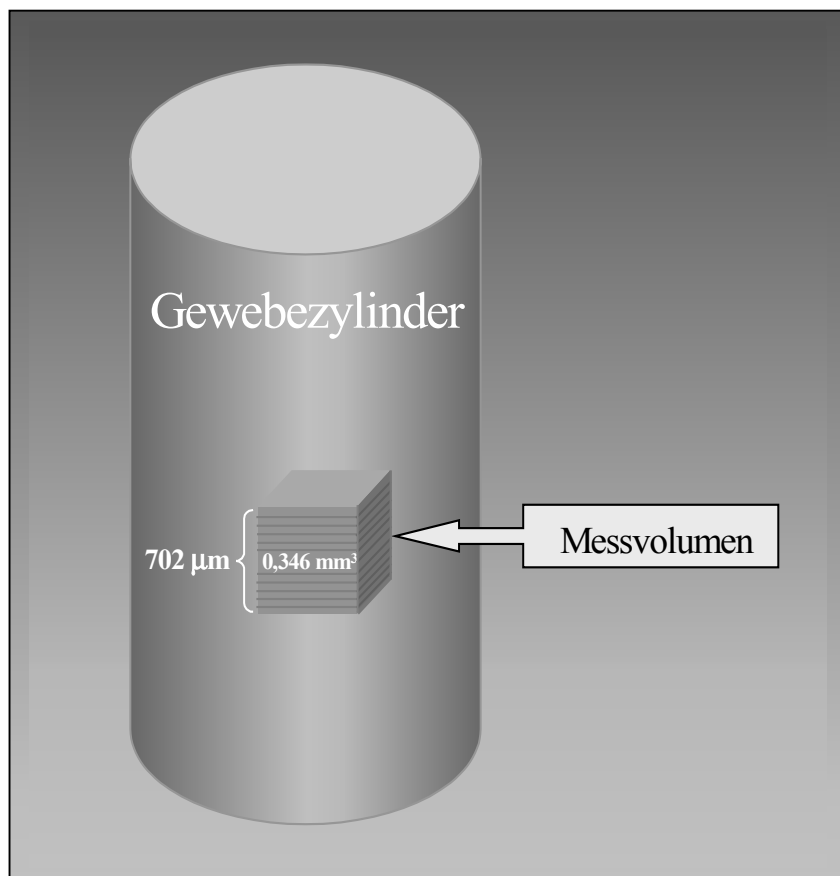


Abb. 11: *Semiautomatische Morphometrie des Alveolargewebes (Mikro-CT). Innerhalb des Lungenzylinders wird ein virtuelles Subvolumen vermessen. Dieses würfelförmige Messvolumen setzt sich aus 78 Schnitten (Seitenlänge  $702\ \mu\text{m}$ ; Dicke jeweils  $9\ \mu\text{m}$ ) zusammen. Es resultiert ein Volumenelement von  $0,346\ \text{mm}^3$ .*

Für die morphometrische Analyse müssen die Grauwerte der Bilder zunächst binarisiert, das heißt, die ursprünglichen Graustufenbilder in Schwarz-Weiß-Bilder überführt werden: Gewebe wird dann schwarz, die Lufträume werden weiß dargestellt (Abb. 12).

Das Programm zur Binarisierung arbeitet mit einem lokalen Segmentierungs-Algorithmus, der automatisch lokale Schwellenwerte ermittelt, um Gewebe von Nicht-Gewebe zu separieren. Grundlage ist ein standardisierter Kanten-Detektions-Algorithmus, der nach der Methode nach Canny arbeitet (Canny 1986). Zusätzlich wird im jeweiligen Messvolumen eine histogrammbasierte Vorsegmentierung durchgeführt.

Zur Ermittlung der Schwellenwerte werden die binarisierten mikrotomographischen Schnitte mit den histologischen Schnitten verglichen (Abb. 12).

Im Anschluss wird die morphometrische Analyse mit der Software *Analyze* (Version 4.0, Mayo Foundation, Rochester, Minnesota, USA) durchgeführt.

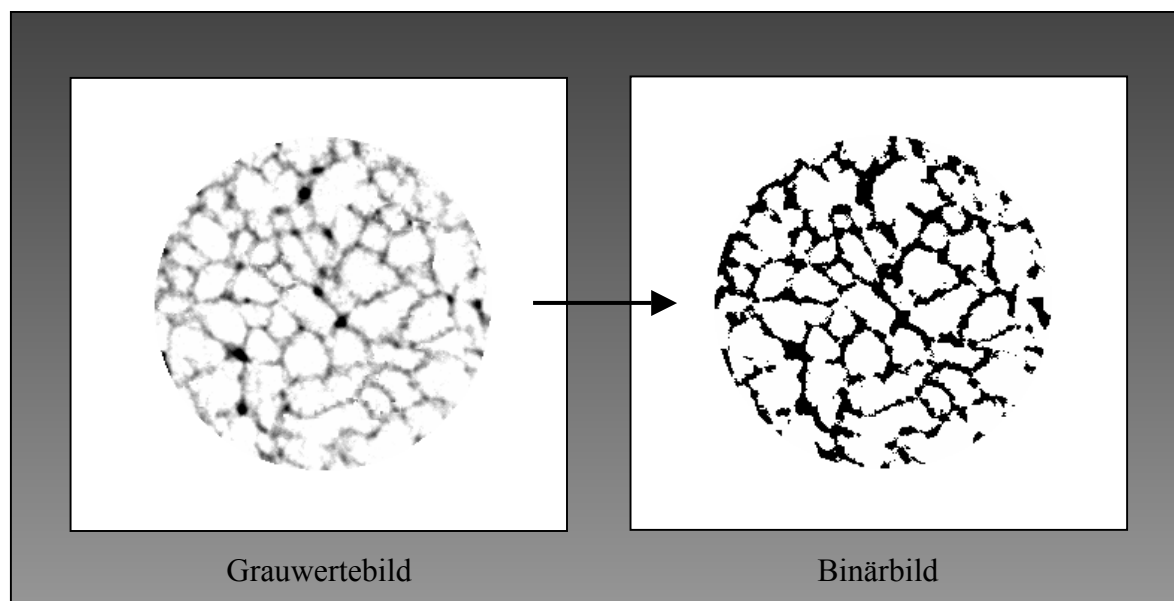


Abb. 12: Alveolargewebe (Mikro-CT). Zur Morphometrie müssen die mikrotomographischen Grauwertebilder (links) in Binärbilder (rechts) umgewandelt werden. Diese setzen sich nur noch aus schwarzen und weißen Pixeln zusammen.

Bei einem Teil der gewonnenen morphometrischen Daten handelt es sich um so genannte *Primärparameter*. Sie werden an den Binärbildern direkt (pixelbasiert) erhoben. *Sekundärparameter* sind demgegenüber indirekte Parameter, die von den Primärparametern abgeleitet (= berechnet) werden (Müller et al. 1998).

Das *Gewebevolumen* sowie die *Alveolaroberfläche* sind morphometrische Primärparameter. Nach der Schwellenwerteneinstellung werden diese Werte vom Programm direkt bestimmt.

Die *alveoläre Oberflächendichte* ist die Alveolaroberfläche bezogen auf das Messvolumen:

$$\text{alveoläre Oberflächendichte} = \frac{\text{Alveolaroberfläche}}{\text{Messvolumen}} = \frac{\text{Alveolaroberfläche}}{0,346 \text{ mm}^3} \quad (1)$$

Sie stellt einen sekundären morphometrischen Parameter dar.

Kennt man das Volumen einer Kugel und ihre Oberfläche, kann man den Durchmesser errechnen.

Der *Alveolardurchmesser* (Sekundärparameter) wird so nach der allgemeinen Formel berechnet:

$$\text{Alveolardurchmesser} = k \cdot \frac{\text{Volumen des Luftraums der Alveolen}^{2)}}{\text{Alveolaroberfläche}} \quad (2)$$

wobei: <sup>1)</sup>  $k = 6$

<sup>2)</sup> Volumen des Luftraums der Alveolen = Messvolumen – alveoläres Gewebevolumen

Das Volumen des Luftraums der Alveolen ist die Differenz des Messvolumens und des darin enthaltenen Gewebevolumens.

Zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors  $k$  siehe Anhang (Kap. 7; A1).



### 2.13.2 Stereologiebasierte Morphometrie der histologischen Schnitte

Die stereologiebasierte Morphometrie wird mit Testgittern durchgeführt, die den histologischen Schnitten überlagert werden. Letztlich dienen die Schnittpunkte des Gewebes mit dem Testgitter als Messgröße. Ist die Gitterlänge bekannt, kann man Größenangaben machen.

Die Histomorphometrie wird an einem computergestützten Bildanalyse-System durchgeführt. Das System besteht aus einem Lichtmikroskop (Axioplan; Fa. Carl Zeiss, Jena) in Verbindung mit einer 3CCD-Kamera (DXC-3000P, Sony, Japan) und einem IBAS 2 Bildprozessor (Fa. Kontron, Echingen).

Von jeder der zehn Lungenproben werden zehn gut erhaltene histologische Schnitte ausgesucht. Bei jedem der Schnitte werden mittels Lichtmikroskopie bei Übersichtsvergrößerung (20-fach) korrespondierende Regionen des Messvolumens der Mikro-CT eingestellt und markiert. Die Definition dieser ROI (regions of interest) folgt dabei den mikrotomographischen Analysen. Jede der markierten Regionen wird 80-fach vergrößert. Der resultierende Bildausschnitt wird über die Kamera in eine Computereinheit übertragen und die Bilddaten digitalisiert.

Folgende histomorphometrische Parameter werden dann analog der CT-basierten Morphometrie ermittelt:

1. *Alveoläre Oberflächendichte*
2. *Alveolardurchmesser*

#### 1. *Alveoläre Oberflächendichte*

Laut der fundamentalen stereologischen Gleichung von Saltykov (1945) kann die Oberflächendichte (definiert als Oberfläche / Messvolumen) durch die Gleichung

$$\text{Oberflächendichte} = 2 \frac{\text{Anzahl der Gitterschnittpunkte}}{\text{Gesamtlänge der Testlinien}} \quad (3)$$

bestimmt werden (Bolender et al. 1993; Saltykov 1946).

Als Testsystem wird ein wellenförmiges Messgitter nach Merz (1968) verwendet (Abb. 13). Die Seitenlänge des Messfelds entspricht mit 700 µm der Seitenlänge des Messvolumens der Mikro-CT.

Das Merzgitter besteht aus 10 Linien. Jede Linie ist aus 10 aneinandergereihten Halbkreisen zusammengesetzt.

Der Durchmesser eines Halbkreises beträgt  $70 \mu\text{m}$  ( $700 \mu\text{m} / 10$ ).

Der Umfang eines Halbkreises ( $1/2 \times (\pi \times d)$ ) beträgt  $1/2 \pi \times 70 \mu\text{m}$ .

Die Gesamtlänge ( $L_{\text{gesamt}}$ ) der Testlinie des Gitters berechnet sich zu

$$L_{\text{gesamt}} = 10_{\text{Linien}} \times 10_{\text{Halbkreise}} \times (1/2 \times 70 \times \pi \mu\text{m})_{\text{Halbkreis}} = 3500 \times \pi \mu\text{m} = 3,5 \times \pi \text{ mm} \quad (4)$$

Die *Oberflächendichte* kann mit der Formel

$$\text{Oberflächendichte} = 2 \frac{\text{Anzahl der Gitterschnittpunkte}}{3,5 \times \pi \text{ mm}} \quad (5)$$

abgeschätzt werden.

Die Anzahl der Gitterschnittpunkte wird in 20 Merzgittern pro Probe (2 Gitter pro Schnitt x 10 Schnitte) bestimmt.

## **2. Alveolardurchmesser**

Der Alveolardurchmesser wird nach der histomorphometrischen Methode der *Zweipunkt-Streckenmessung* bestimmt. Auch hierbei wird das Messgitter nach Merz verwendet, um Schnittpunkte für die Messung der Abstände der Alveolarwände zu bestimmen.

Die Auswahl der zu vermessenden Alveolen erfolgt nach einem für alle Messfelder standardisierten Protokoll:

Als Alveole wird eine geschlossene polygonale Struktur definiert, die frei von nach innen vorspringenden Septen ist. Vermessen wird die innerhalb des Messfelds (Merzgitter) liegende zentrale Alveole und spiralförmig von ihr ausgehend im Uhrzeigersinn die folgenden vier Alveolen. Die Messpunkte der Streckenmessung ergeben sich aus dem Schnittpunkt des Alveolarseptums mit dem Merzgitter einerseits und dem hiervon entferntesten Punkt der Alveolarwand andererseits (Abb. 13).

So wird mit vier weiteren Regionen in demselben histologischen Schnittpräparat verfahren (pro Schnitt resultieren 25 Einzelmessungen). Es werden insgesamt 5 Schnitte einer Probe

nach diesem Verfahren vermessen. Aus den insgesamt 125 Einzelmessungen wird der *mittlere Alveolardurchmesser* für jede Lungenprobe ermittelt.

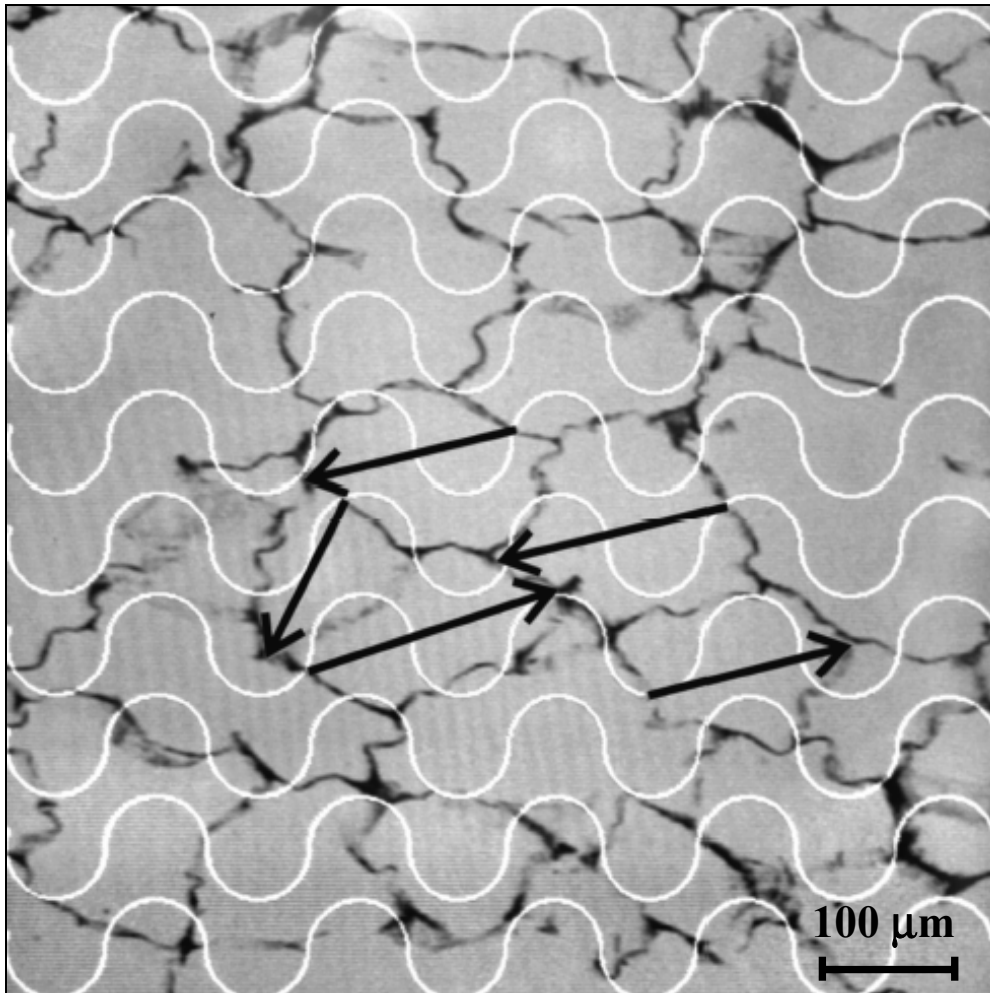


Abb. 13: *Histologischer Schnitt mit darüber projiziertem wellenförmigen Merzgitter; Seitenlänge 700 μm (Bildschirmaufnahme). Die Anzahl der alveolären Schnittpunkte mit dem Merzgitter dient zur Bestimmung der Oberflächendichte. Die Pfeile in der Bildmitte entsprechen den Messstrecken der Zweipunkt-Streckenmessung zur Bestimmung des Alveolardurchmessers: Nach Markierung der zwei definierten Messpunkte einer Alveole (Schnittpunkt der Alveolarwand mit dem Messgitter und davon ausgehend die längste Distanz) wird die Strecke gemessen.*

### **2.13.3 Stereologiebasierte Morphometrie (Mikro-CT)**

Es wird zusätzlich eine morphometrische Analyse der mikrotomographischen Schnittbilder unter Anwendung des histomorphometrischen Verfahrens durchgeführt.

Hierzu wird das Merz-Gitter auf die Mikro-CT Schnitte überlagert.

Auch hier werden die *alveoläre Oberflächendichte* und der *Alveolardurchmesser* ermittelt.

#### ***1. Alveoläre Oberflächendichte***

Die Oberflächendichte wird gemäß der Formel in Kapitel 2.13.2 berechnet.

Die Anzahl der Gitterschnittpunkte wird in 2 Messgittern pro Schnittbild bestimmt. Vermessen werden 10 Schnittbilder einer Gewebeprobe. Je Lungenprobe werden damit 20 Merzgitter ausgewertet.

#### ***2. Alveolardurchmesser***

Nach Projektion des Merzgitters auf die mikrotomographischen Schnittbilder wird der Alveolardurchmesser analog der Histomorphometrie bestimmt.

Es werden insgesamt 125 Einzelmessungen pro Gewebeprobe durchgeführt. Dabei wird dem Protokoll der Zweipunkt-Streckenmessung im histologischen Schnitt gefolgt (siehe Kap. 2.13.2).

## 2.14 Morphometrische Korrelationsuntersuchungen

Es werden zwei verschiedene Verfahren (Mikro-CT und Histologie) mit unterschiedlicher Gewebepreparation verglichen.

Zudem unterscheiden sich die Messmethoden (computergestützte Messmethode der Mikro-CT und stereologiebasierte Messung der histologischen Schnitte).

Da verschiedene Faktoren eingehen, genügt kein einfacher Vergleich der Histologie mit der Mikro-CT.

### **Unter diesem Aspekt werden folgende Korrelationsuntersuchungen durchgeführt:**

**1.**

Um den *Einfluss der Präparation* abzuschätzen, werden die *identisch stereologiebasiert* ermittelten Daten aus *mikrotomographischen* und *histologischen* Schnitte verglichen.

**2.**

Um den *Einfluss der Messmethode* abzuschätzen, werden die Daten aus *computergestützter Messung* und *stereologiebasierter Mikro-CT Messung* verglichen.

Diese morphometrischen Korrelationsprüfungen werden auf Basis der ermittelten Parameter *alveoläre Oberflächendichte* und *mittlerer Alveolardurchmesser* durchgeführt.

## 2.15 Zwei- und dreidimensionale Bildverarbeitung (Mikro-CT)

Die vom Mikrotomographen generierten Bilddatensätze können mit unterschiedlichen Bildverarbeitungstechniken nachverarbeitet und als zwei- oder dreidimensionale Rekonstruktionen dargestellt werden. Grundlage bilden die einzelnen Schichtaufnahmen. Zunächst werden zwei in der konventionellen Computertomographie übliche Rekonstruktionen durchgeführt: die *multiplanare Reformation (MPR)* und die *dreidimensionale Rekonstruktion in Volume-Rendering-Technik (VRT)*.

### 2.15.1 Zweidimensionale Bildverarbeitung

Bei der *multiplanaren Reformation* können aus einem kontinuierlichen Datensatz Schnitte nicht nur axial, sondern auch coronar und sagittal errechnet werden.

An jeder Lungenprobe wird eine zweidimensionale Reformation aus dem Primärdatensatz eines Lungenzylinders durchgeführt, bei der aus dem Datenvolumen nur die übereinanderliegenden Voxel einer erstellten Ebene in Längsrichtung des Zylinders dargestellt sind.

### 2.15.2 Dreidimensionale Bildverarbeitung

Zur dreidimensionalen Darstellung des Lungengewebes findet die *Volume-Rendering-Technik* Anwendung. Sie vereint Rechenprozesse der Oberflächen- und Volumendarstellung. Das zu rekonstruierende Objekt wird durch ein ihm zugeordnetes CT-Wertintervall und eine zugehörige Opazität (= Sichtbarkeit) definiert.

Die dreidimensionale Bildverarbeitung wird mit der Software *Analyze* (Version 4.0, Mayo Foundation, Rochester, Minnesota, USA) durchgeführt. Nach Überführen der zweidimensionalen Bitmap-Dateien (8 bit) in einen Volumendatensatz erfolgt eine Filterung und Segmentierung zur isolierten Darstellung des Lungengewebes unter Anwendung eines Schwellenwertverfahrens.

Die *dreidimensionale Struktur des luftleitenden Bronchialbaums* wurde mithilfe einer Saatkorntechnik rekonstruiert. Dieses Verfahren verknüpft Voxel vergleichbarer Dichte (Hounsfield-Einheiten) zu einem zusammenhängenden Volumenelement.

Die Segmentation wird mit der Software *Volume Tool* der *Advantage Workstation 4.1* (General Electric Medical Systems Europe, Buc, Frankreich) durchgeführt.

Der Startpunkt wird interaktiv vom Untersucher in einen Bronchiolus terminalis gesetzt. Die automatische Segmentation erfolgt unter visueller Kontrolle des wachsenden Bronchialbaums bis zu den Wänden der terminalen Alveolen. Dort wird die Segmentation gestoppt.

### **2.16 Anwendung der Methodik auf humanes Lungenmaterial**

Um zu überprüfen, ob die Präparation auf humane Lungen übertragen werden kann, wird eine linke Lunge aus dem Pathologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen exemplarisch präpariert.

Ihre Fixierung durch Formalindampfbeatmung folgt dem Protokoll für die Schweinelungen. Die anschließende Sauerstofftrocknung kann allerdings nur über 14 Stunden durchgeführt werden, da die Lunge bereits am nächsten Morgen an das Institut zurückgegeben werden muss.

Nach Scheibengewinnung werden aus vier subpleuralen Regionen Probenzylinder entnommen.

Diese werden exakt nach dem in der Arbeit vorgestellten Verfahren mit Osmium kontrastiert und der Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen.

Der Messvorgang im Mikrotomographen erfolgt analog zur Schweinelunge. Abweichend wird mit einer reduzierten Röhrenspannung von 40 kV gearbeitet.

### 2.17 Statistische Auswertung

Bei den ermittelten Ergebnissen finden die Parameter der deskriptiven Statistik, arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STD) Anwendung. Die erhaltenen Daten werden mittels Varianzanalyse geprüft.

Für den Vergleich der beiden Methoden Mikro-CT und Histologie hinsichtlich der morphometrischen Parameter wird eine bivariate Regressionsanalyse mit Bestimmung des Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Es kommen die gebräuchlichen Signifikanzniveaus (signifikant:  $p \leq 0,05$ ; hoch signifikant:  $p \leq 0,01$ ; höchst signifikant:  $p \leq 0,001$ ) zur Anwendung.

Zur Übereinstimmungsprüfung der mittels semiautomatischer Analyse (Mikro-CT) und stereologiebasiert gewonnenen Parameter *alveoläre Oberflächendichte* und *Alveolardurchmesser* in denselben Mikrotomogrammen findet der Mittelwert-Differenzen-Plot, die Analyse nach Bland-Altman (1986), Anwendung (siehe hierzu auch Kap. 7, Anhang A2). Dabei wird die Differenz der ermittelten morphometrischen Parameter aus semiautomatischer Analyse und Stereologie gegen deren Mittelwert aufgetragen. Der Übereinstimmungsgrad erklärt sich dann über den Mittelwert der Abweichung („bias“) und die Standardabweichung vom Mittelwert („precision“). Es wird ein Bereich festgelegt, in welchem sich mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit alle Abweichungswerte befinden (Abweichungsmittelwert  $\pm$  zweifache Standardabweichung).

Außerdem wird die Übereinstimmung der gewonnenen stereologiebasierten morphometrischen Daten aus Mikrotomogrammen und histologischen Schnitten geprüft.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Lungenvolumina und -gewichte

Beim Vergleich der Volumina der kollabierten und der belüfteten Lunge vor der Fixation lässt sich eine Verdoppelung des Volumens der Lunge nach vollständiger Belüftung feststellen.

Vergleicht man die Volumina der belüfteten Lunge vor und nach der Fixation, so findet sich kein signifikanter Unterschied. Durchschnittlich verringern sie sich um nur drei Prozent (Tabelle 1).

Im Gegensatz dazu verändert sich das Lungengewicht signifikant. Nach der Fixation entspricht es nur noch 30 % seines Ausgangsgewichts (Tabelle 1).

Tabelle 1: *Volumina und Gewichte der isolierten linken Lungen vor und nach der Fixation mit Formalindampf inklusive 72-stündiger Sauerstofftrocknung (MW= Mittelwert, STD= Standardabweichung)*

Lunge Nr.	vor Fixation			nach Fixation	
	Volumen kollabiert (ml)	Volumen gebläht (ml)	Gewicht (g)	Volumen (ml)	Gewicht (g)
1	1016	2478	400	2388	120
2	995	1850	344	1814	103
3	836	1650	325	1595	97
4	989	2247	367	2176	109
5	1002	2313	383	2261	117
MW	967,6 (*)	2107,6	363,8	2046,8	109,2 (*)
STD	66,4	308,1	26,8	295,7	8,5

(Anm.: Dunkelgrau hinterlegt sind die zum Nachweis des Volumenerhalts entscheidenden Werte.)



Abb. 14: *Formalinfixierte Lunge nach 72-stündiger Sauerstofftrocknung; Ansicht von costal. Die Lunge ist vollständig luftgefüllt und von solider Konsistenz. Eine Tendenz zur elastischen Retraktion ist in diesem Zustand nicht mehr zu beobachten. Das Organ wird in Längsrichtung in Scheiben geschnitten, aus denen dann die Gewebezylinder entnommen werden.*

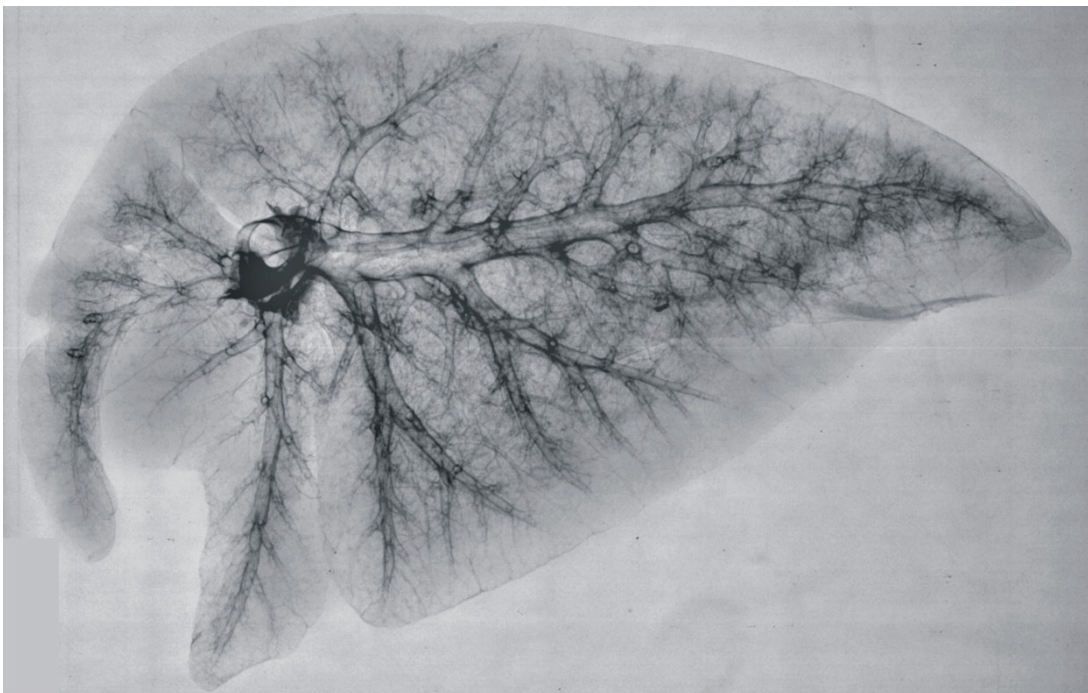


Abb. 15: *Die Röntgenaufnahme in mediolateraler Projektion (40 kV, 12 mAs) zeigt eine vollständige Entfaltung der Lunge. Die Aufteilung des Bronchialbaums ist bis nach subpleural erkennbar.*

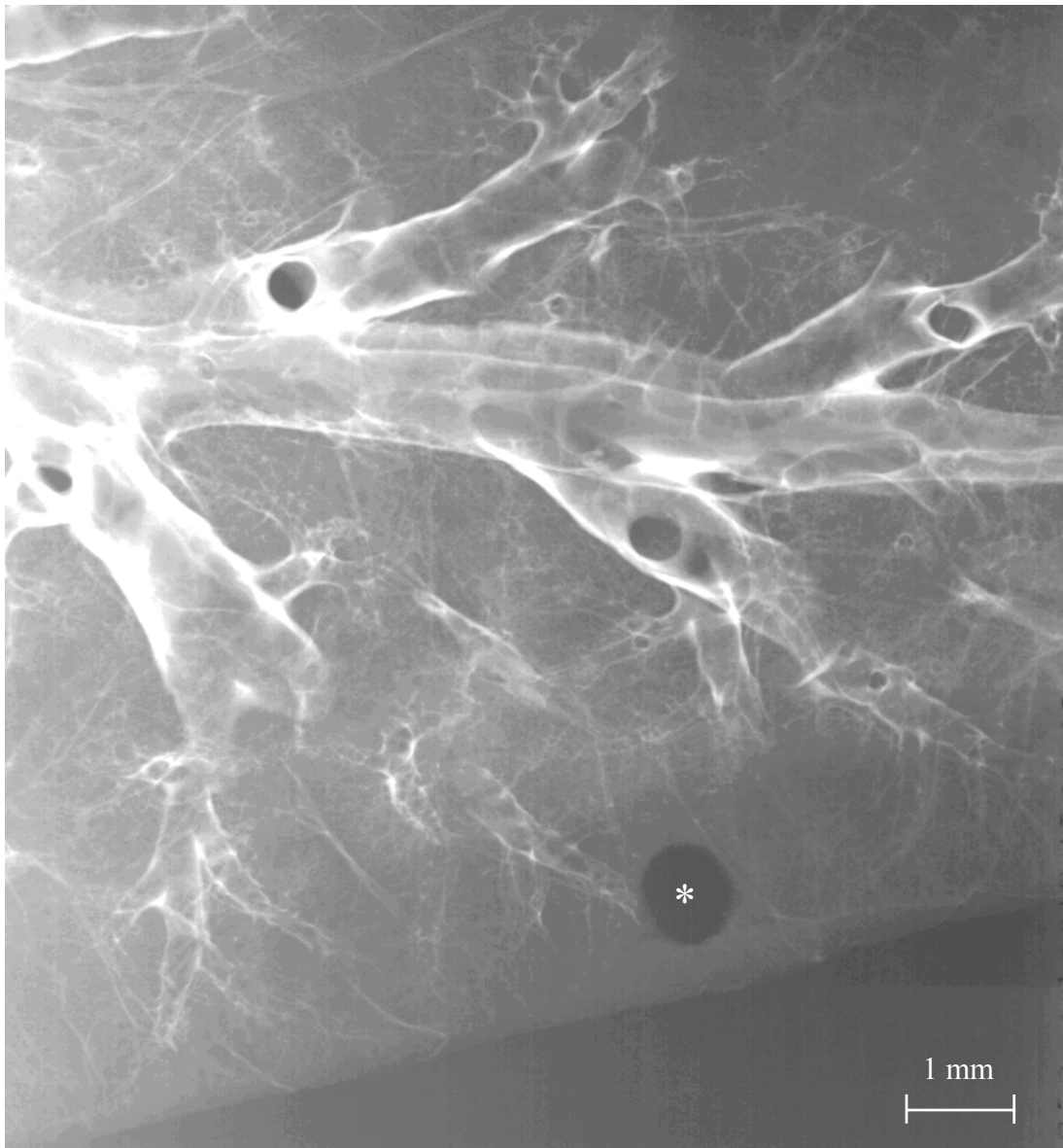


Abb. 16: Prüffilmradiographie einer Lungenscheibe; Bildausschnitt. Durch die Weichteiltechnik ist eine feinradiologische Beurteilung der sich verzweigenden Luftwege möglich. Es wurde ein Gewebezylinder entnommen (\*).

### 3.2 Durchmesser und Gewichte der Gewebeproben

Die Osmierung und Kritisch-Punkt-Trocknung führen zu einer Schrumpfung und zu einem Gewichtsverlust des formalinfixierten Lungengewebes.

Der mittlere Durchmesser der Gewebezylinder fällt von 8,17 mm vor der Präparation auf 7,32 mm nach der Präparation ab. Es ergibt sich eine signifikante Schrumpfung von durchschnittlich 10,4 %.

Auch das Gewicht der Proben reduziert sich signifikant um durchschnittlich 37,5 %.

Tabelle 2 gibt die ermittelten Werte für die zwei Gewebeproben aus jeder Lunge wieder.

Tabelle 2: *Durchmesser und Gewichte der Gewebezylinder vor der Kontrastierung mit Osmiumtetroxid und nach der Kritisch-Punkt-Trocknung (MW= Mittelwert, STD= Standardabweichung)*

Lunge	Probe Nr.	vor Osmieren und Trocknen		nach Osmieren und Trocknen	
		Durchmesser (mm)	Gewicht (g)	Durchmesser (mm)	Gewicht (g)
1	1	8,0	0,034	7,0	0,020
	2	8,2	0,036	7,3	0,022
2	3	8,3	0,037	7,7	0,023
	4	8,2	0,042	7,2	0,028
3	5	8,2	0,038	7,6	0,026
	6	8,2	0,030	7,3	0,018
4	7	8,1	0,034	7,1	0,020
	8	8,2	0,031	7,3	0,019
5	9	8,2	0,037	7,6	0,025
	10	8,1	0,038	7,1	0,023
MW		8,17	0,036	7,32 (*)	0,022 (*)
STD		0,08	0,003	0,23	0,003

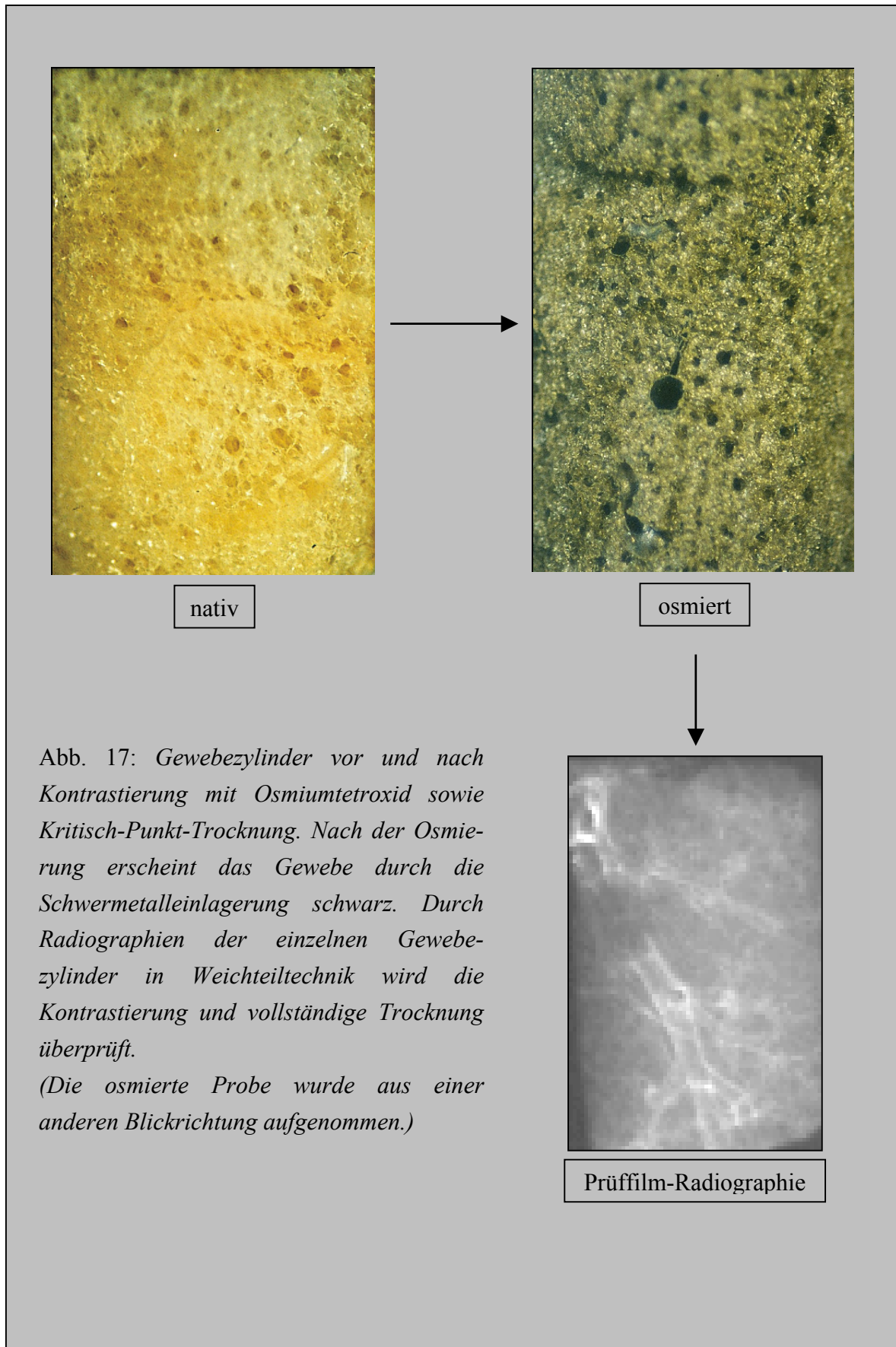


Abb. 17: Gewebezylinder vor und nach Kontrastierung mit Osmiumtetroxid sowie Kritisch-Punkt-Trocknung. Nach der Osmierung erscheint das Gewebe durch die Schwermetalleinlagerung schwarz. Durch Radiographien der einzelnen Gewebezylinder in Weichteiltechnik wird die Kontrastierung und vollständige Trocknung überprüft.

(Die osmierte Probe wurde aus einer anderen Blickrichtung aufgenommen.)

### 3.3 Mikro-CT: Zweidimensionale Darstellung des Lungengewebes

Durch die Osmierung und Trocknung des Lungengewebes wird der gewünschte hohe Röntgenkontrast erzielt. Dadurch ist eine realistische Darstellung der pulmonalen Mikrostrukturen bis zu den Alveolarwänden möglich. So lässt sich eine der Lichtmikroskopie vergleichbare Darstellung des Lungengewebes erreichen (Abb. 19).

Aus den kontinuierlichen Datensätzen der Mikro-CT lassen sich *zweidimensionale Rekonstruktionen* in beliebigen Ebenen durchführen (Abb. 20). Durch die Verwendung isometrischer (kubischer) Voxel tritt kein Verlust der Ortsauflösung auf.

#### 3.3.1 Mikrotomogramme der Lungenzylinder

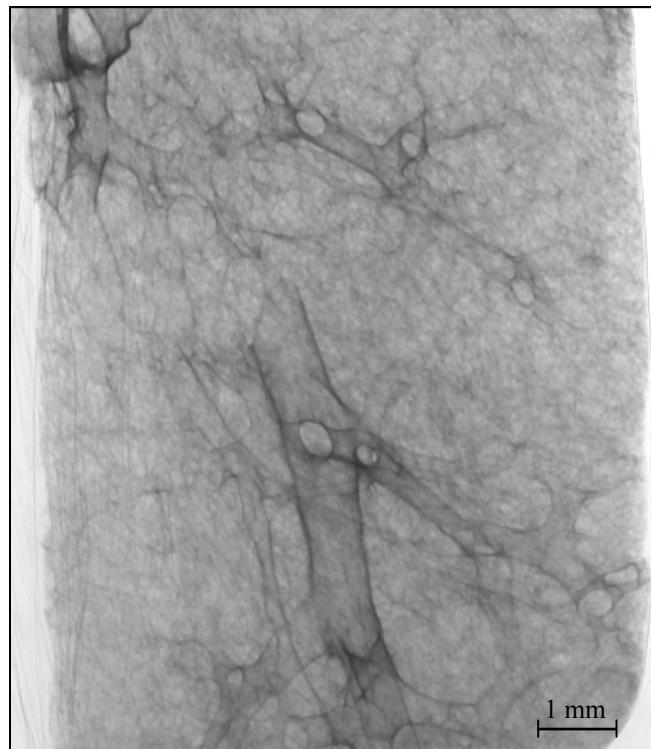


Abb. 18: Übersichtsradiogramm (Scout View) der Lungenprobe zur Planung der Mikro-CT-Untersuchung.

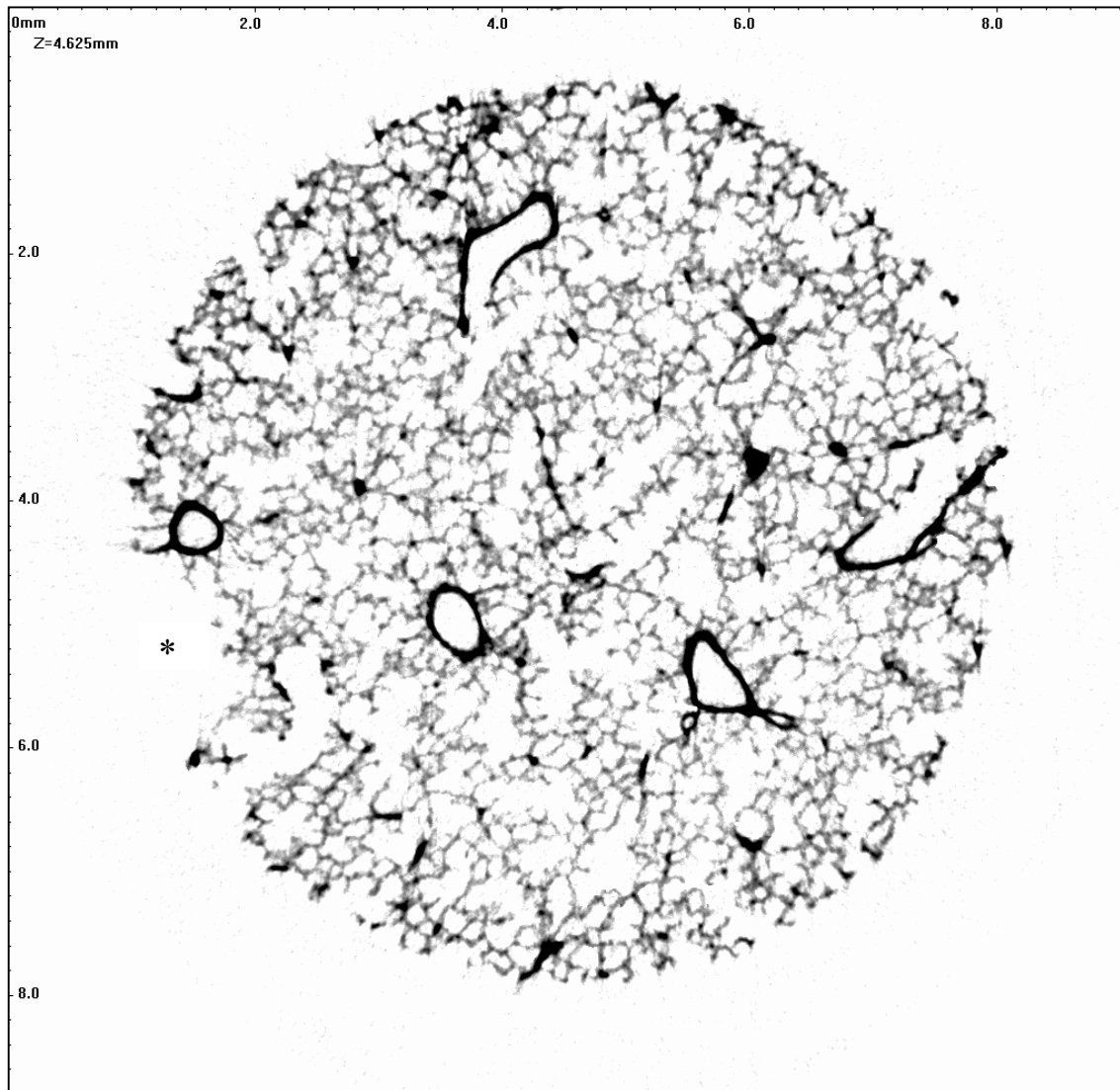


Abb. 19: *Transversales Mikrotomogramm eines Lungenzylinders (Voxelgröße 9  $\mu\text{m}$ , Ortsauflösung 18  $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 27,5, Matrix 1024 x 1024). Kontrastierung und Trocknung sind homogen erfolgt. Die terminalen Luftwege sind bis zu den einzelnen Alveolen darstellbar. Bei den dickwandigen Strukturen handelt es sich um Bronchioli und Gefäße. Kerbe links (\*) zur Schnittausrichtung für den Vergleich mit der Histologie.*

### 3.3.2 Zweidimensionale Rekonstruktion (MPR)

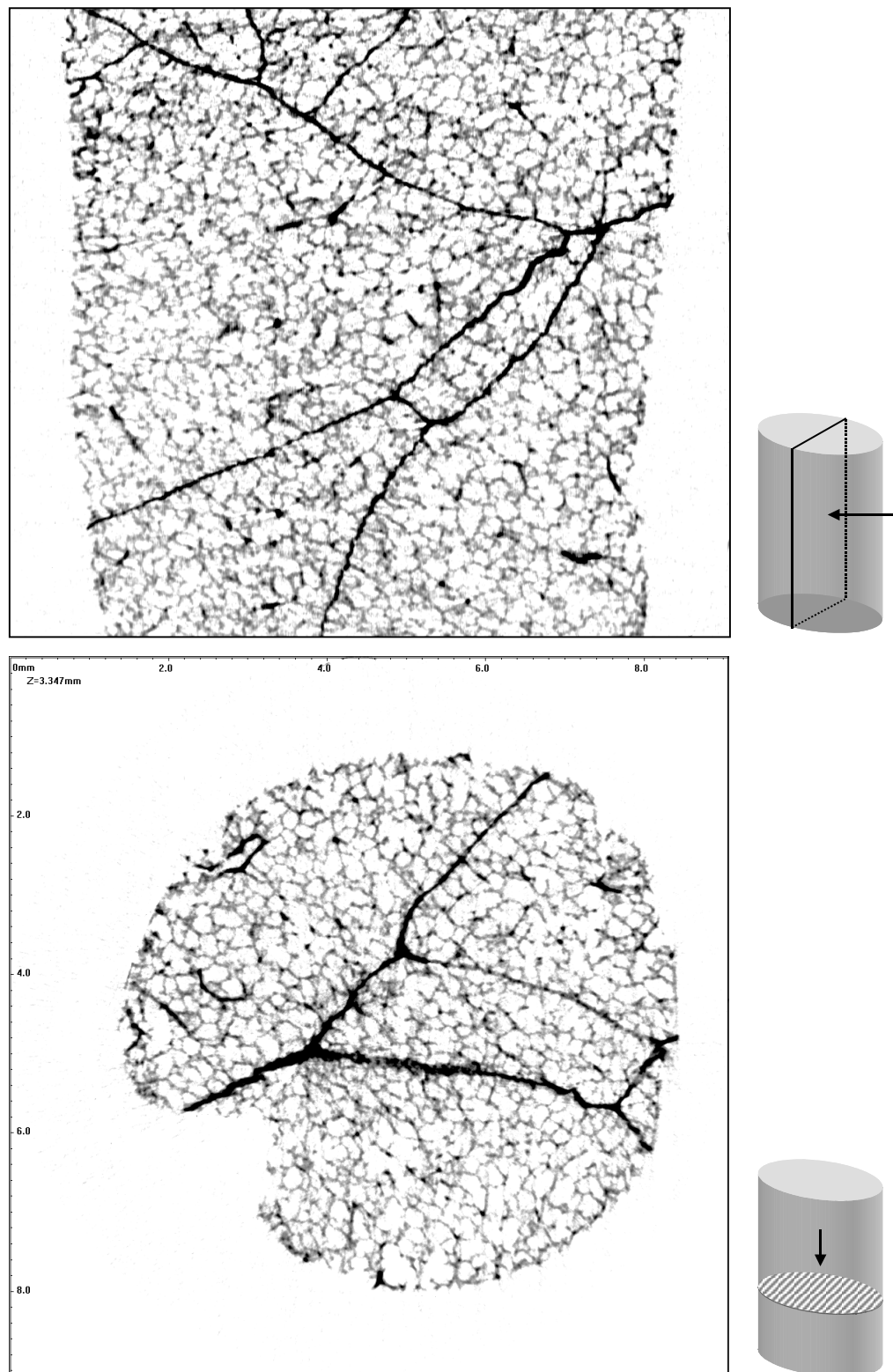


Abb. 20: *Sagittale multiplanare Reformation (oben). Der Vergleich mit einem Transversalschnitt (unten) zeigt die verlustfreie Darstellung in der Rekonstruktion.*



### 3.4 Bildpaare (Histologie / Mikro-CT)

Der Vergleich histologischer Schnitte mit korrespondierenden errechneten mikrotomographischen Schnitten (Abb. 22-24 und 28) lässt eine hohe Übereinstimmung erkennen.

Die Bildpaare dienen als visueller Beweis für die realitätsgetreue Wiedergabe des Lungengewebes in der Mikro-Computertomographie.

Eine exakte Übereinstimmung beider Verfahren ist präparationsbedingt und aufgrund der differierenden Schnittebenen im mikroskopischen Bereich nicht möglich. (Zur Notwendigkeit der Schnittebenenanpassung der errechneten Mikrotomogramme siehe Kap. 2.12 sowie Abb. 10.)

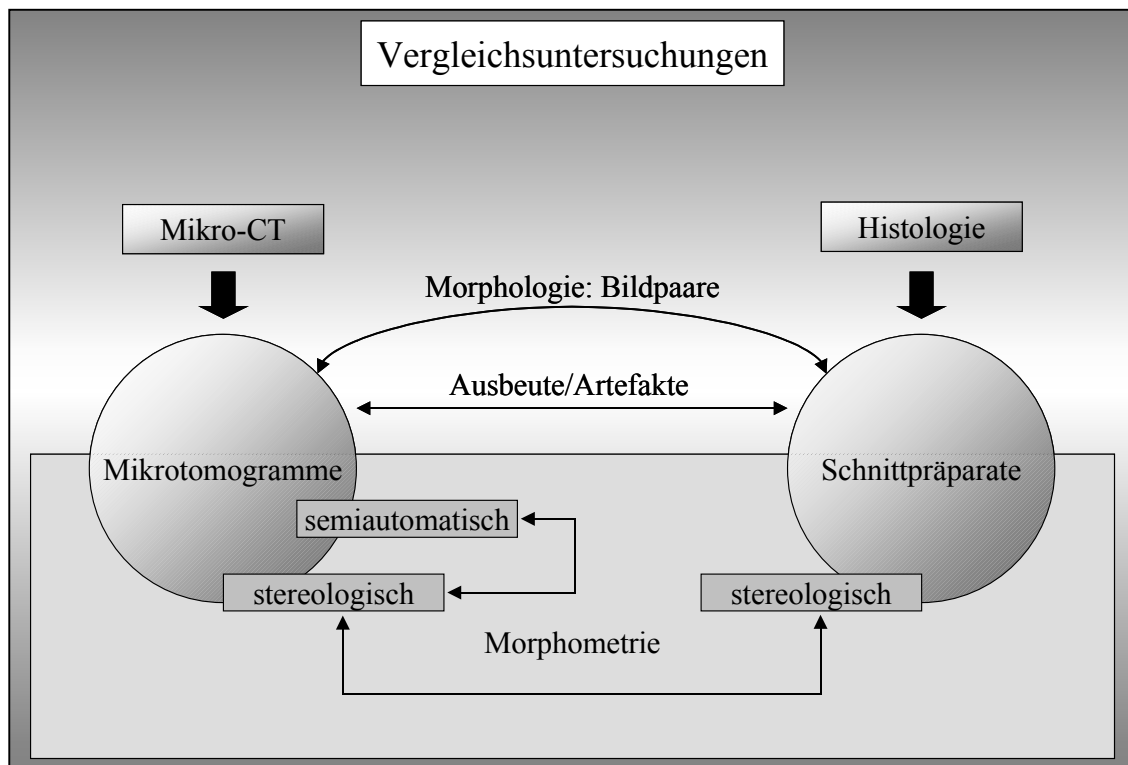


Abb. 21: Vergleichsuntersuchungen: Mikro-CT / Histologie

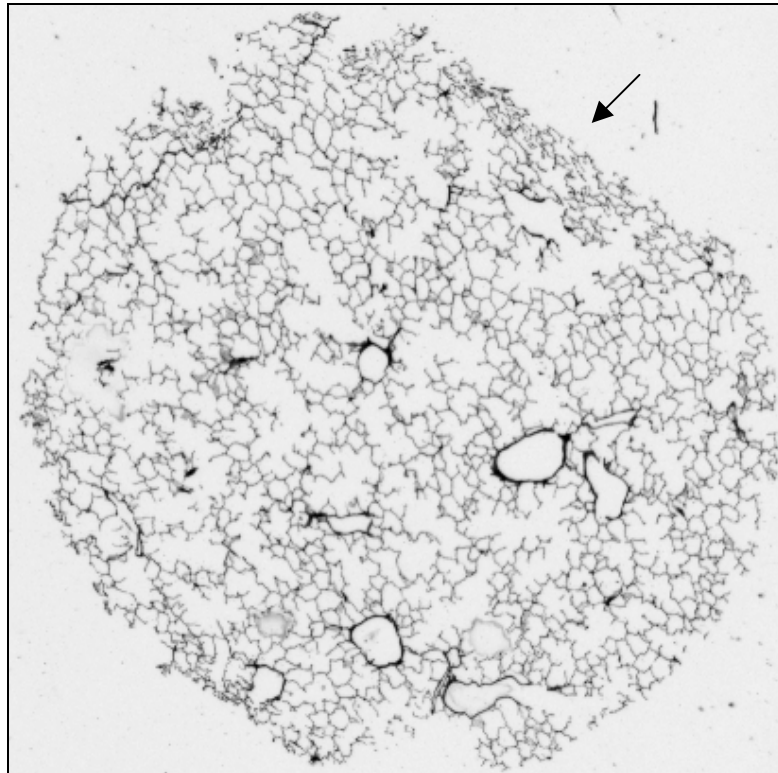
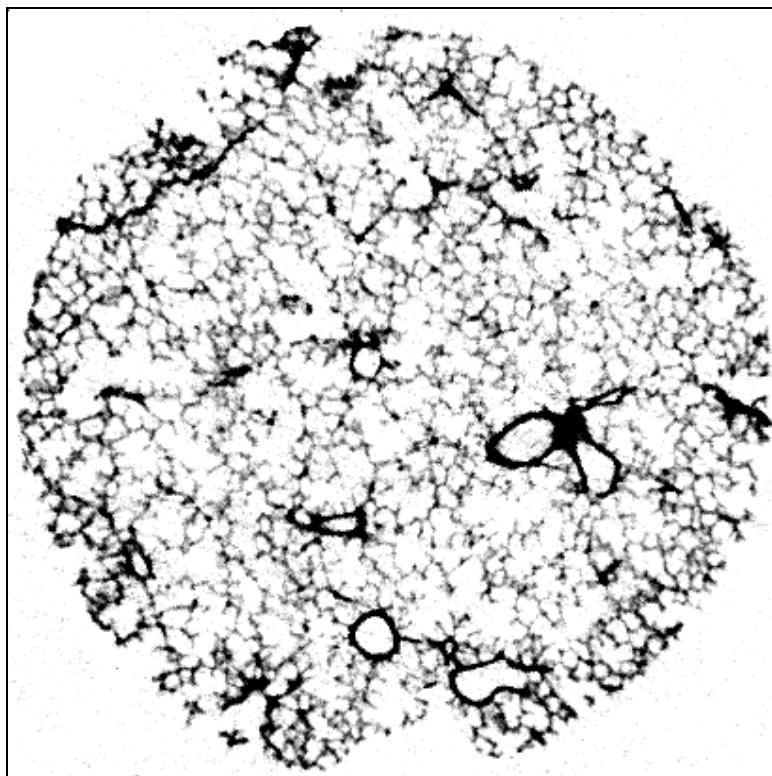
**Histologie****Mikro-CT**

Abb. 22 Bildpaar 1: Übereinstimmung größerer Landmarken (wie Gefäße, Bronchialstrukturen, Alveolargänge, Interlobularsepten) bis hin zur Konfiguration einzelner Alveolen. Zu beachten ist die Destruktion der Alveolararchitektur durch Stauchung im lichtmikroskopischen Schnitt (↙). Das Mikrotomogramm weist diese Beschädigung nicht auf.

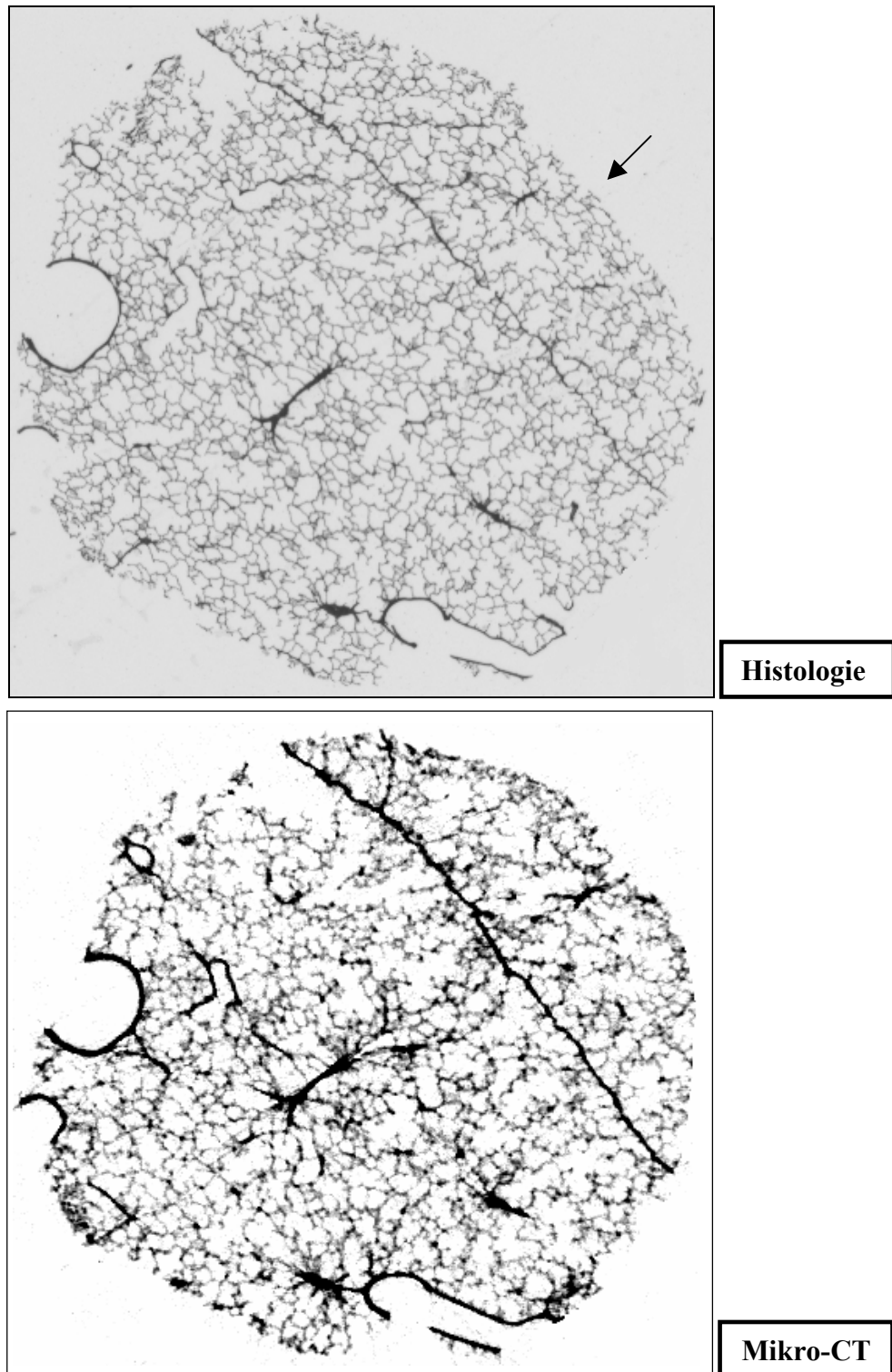


Abb. 23 Bildpaar 2: *Vergleich des Bildmaterials aus Histologie und Mikro-CT zur Darstellung der pulmonalen Mikrostrukturen. Erneut ist eine Gewebestauchung im histologischen Schnittpräparat (↙) zu erkennen.*

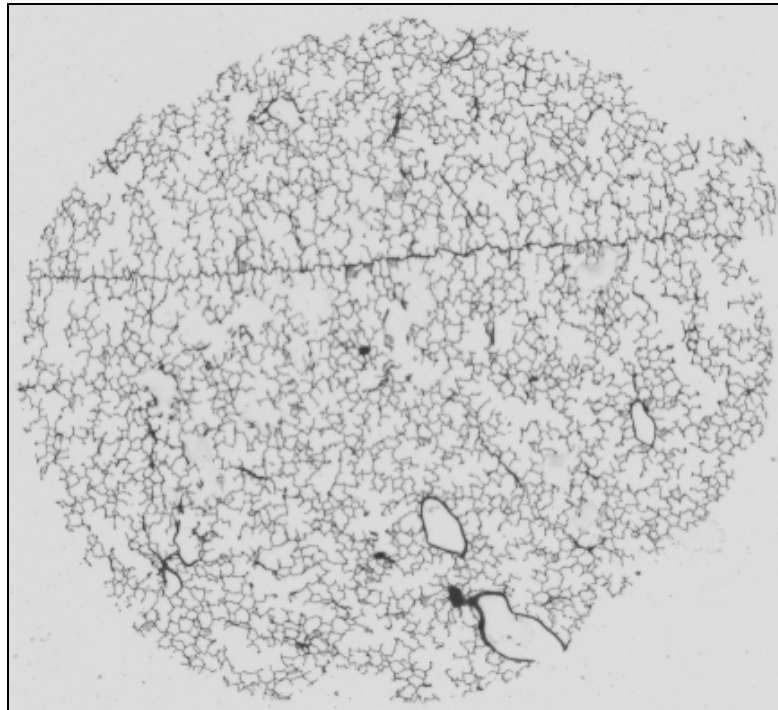
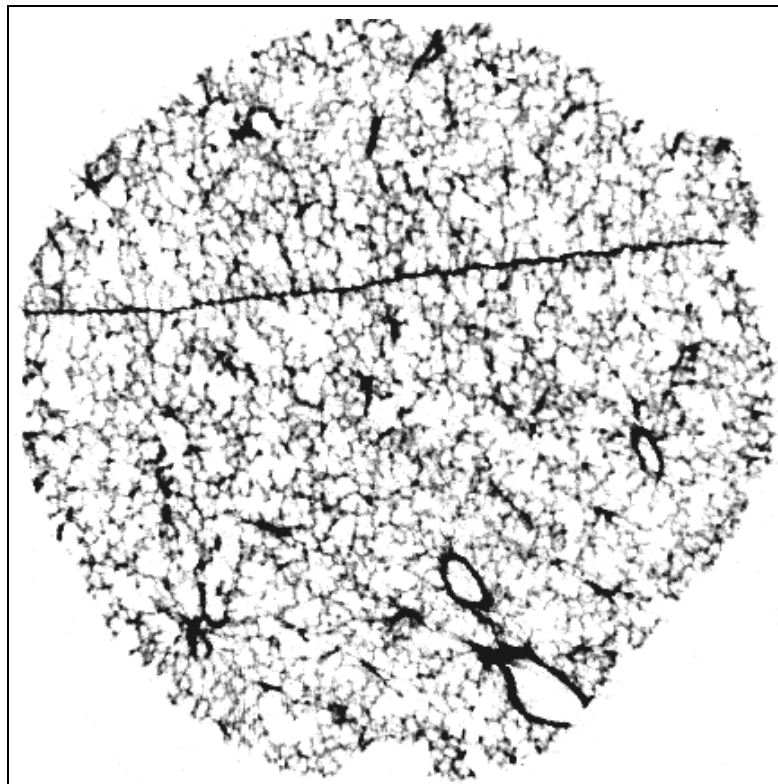
**Histologie****Mikro-CT**

Abb. 24 Bildpaar 3: Erfolgreiche Bildpaargewinnung auch bei geringerem Anteil an Leitstrukturen. Neben den gleichartig abgebildeten Gefäß- und Bronchialstrukturen und dem Interlobularseptum imponiert besonders die Übereinstimmung der Ductus und der Sacculi alveolares sowie einzelner Alveolen.

### 3.5 Histologie und Mikro-CT: Ausbeute und Artefakte

Der Großteil der histologischen Artefakte – Dehnungen, Stauchungen, Brüche, Ablösungen, Falten, Verunreinigungen – ist präparationsbedingt und führt zu einer Störung der Gewebearchitektur (Abb. 22, 23, 26, 27 und 28).

Dagegen treten aufgrund der nichtdestruktiven Abbildungstechnik bei der Mikro-Computertomographie keine Architekturstörungen des formalinfixierten Lungengewebes auf. Als methodisch bedingte Artefakte sind Aufhärtungen und Rauschen zu beobachten. Sie beeinträchtigen die Beurteilbarkeit des Gewebes durch Überlagerungen und Auslöschungen. Diese Artefakte sind vor allem in Bereichen größerer, dickwandiger Strukturen – also an Orten hoher Osmiumeinlagerung – zu beobachten (Abb. 29).

Die Anzahl der insgesamt gewonnenen histologischen beziehungsweise mikrotomographischen Schnitte (Schnittausbeute je Probe) sowie die Anzahl artifiziell veränderter Schnitte sind in Tabelle 3 dargestellt. Die deutlich geringere Gesamtschnittanzahl je Probe in der Histologie resultiert insbesondere aus der Gewinnung sequenzieller Serienschnitte, die Proben wurden nicht vollständig zu histologischen Präparaten verarbeitet.

Tabelle 3: *Vergleich von Mikro-Computertomographie und Histologie in Bezug auf Schnittausbeute und Artefakte*

Lunge	Probe Nr.	Mikro-CT		Histologie	
		Schnittanzahl (gesamt)	Schnittanzahl (Artefakte)	Schnittanzahl (gesamt)	Schnittanzahl (Artefakte)
1	1	901	8	135	79
	2	900	11	128	87
2	3	920	14	135	94
	4	901	16	117	66
3	5	920	10	135	72
	6	851	16	120	96
4	7	900	9	135	85
	8	901	12	126	102
5	9	901	74 <sup>1)</sup>	135	79
	10	901	15	125	98
insgesamt		8996	185	1291	858
in Prozent		100	2,1	100	66,5
STD		18,9	19,7	6,9	11,8

<sup>(1)</sup> größerer Anteil an Aufhärtungsartefakten durch hohen Makrostrukturanteil)

Es ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren in Bezug auf den Erhalt der Alveolararchitektur:

- In der Mikro-CT ist die Architektur in allen Schnitten erhalten. Bei 2,1 % der Schnitte treten Aufhärtungsartefakte auf.
- In der Histologie dagegen zeigt nur ein Drittel der Schnitte keine Störung der Alveolararchitektur.

Ein in beiden Abbildungsverfahren zur Darstellung kommendes Artefakt ist die mitunter zu beobachtende Schrumpfung von Gefäßwänden (Abb. 25). Es tritt ähnlich häufig wie die Aufhärtungsartefakte auf. Dieses Artefakt ist Folge der Fixierung (formalinbedingte Schrumpfung der Gefäßwände), existiert also bereits vor der Bildgebung. Eine Beeinflussung der benachbarten Alveolararchitektur lässt sich jedoch nicht feststellen.

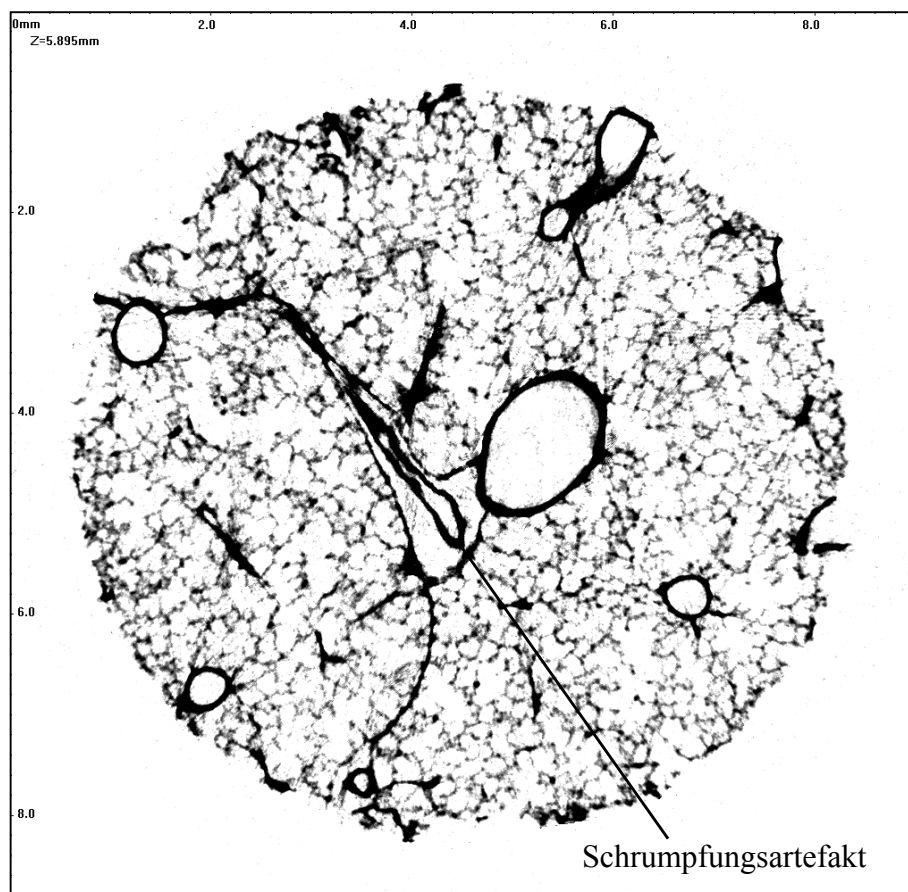


Abb. 25: Schrumpfungsartefakt, bedingt durch die Formalinfixation. Die tubuläre Struktur im Zentrum lässt sich durch ihren Lagebezug zum Interlobularseptum als Vene identifizieren. Die Vene ist kollabiert und vom angrenzenden Bindegewebe distanziert.

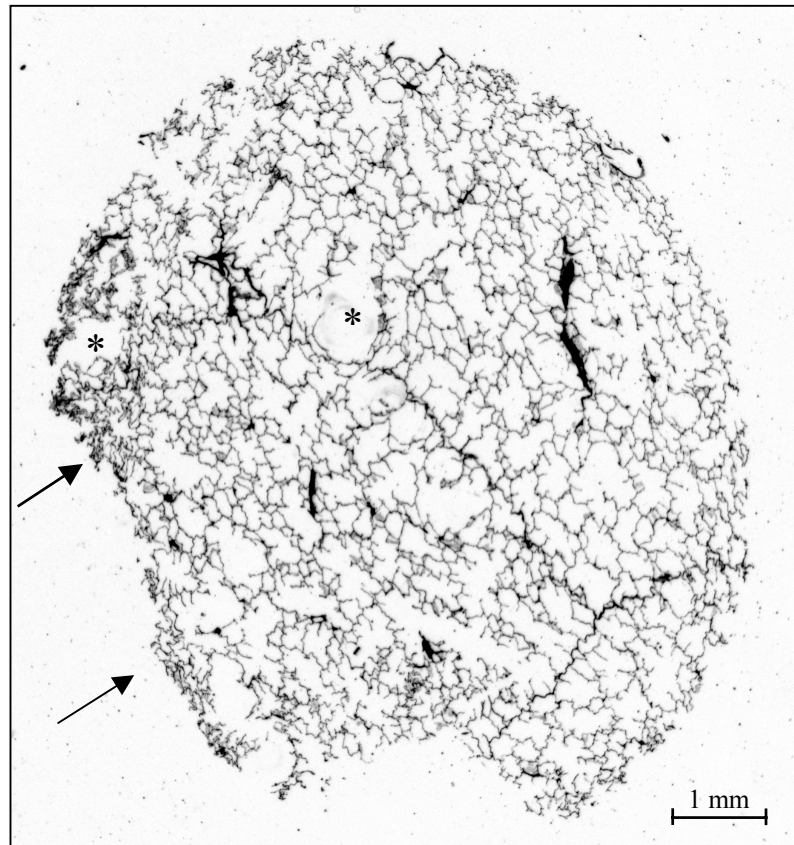


Abb. 26: *Histologische Artefakte. Der Lungenschnitt in Übersichtsvergrößerung zeigt typische Gewebeveränderungen der histologischen Präparation. Das Präparat ist entrundet (deformiert). Neben Gewebestauchungen (↗) erkennt man Überdehnungen und Zerreißen, die als Löcher im Alveolargewebe imponieren (\*).*

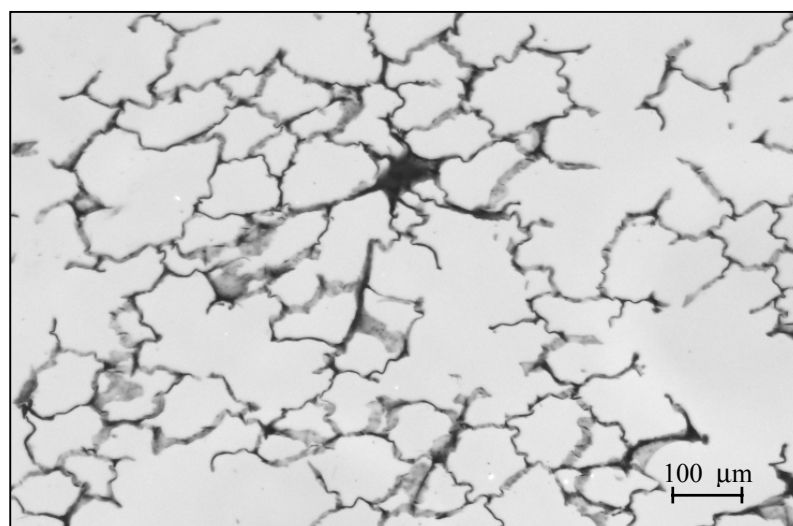


Abb. 27: *Histologische Artefakte bei stärkerer Vergrößerung. Stauchungsbedingter ziehharmonikaartiger Verlauf der Alveolarwände und septale Zerreißen.*

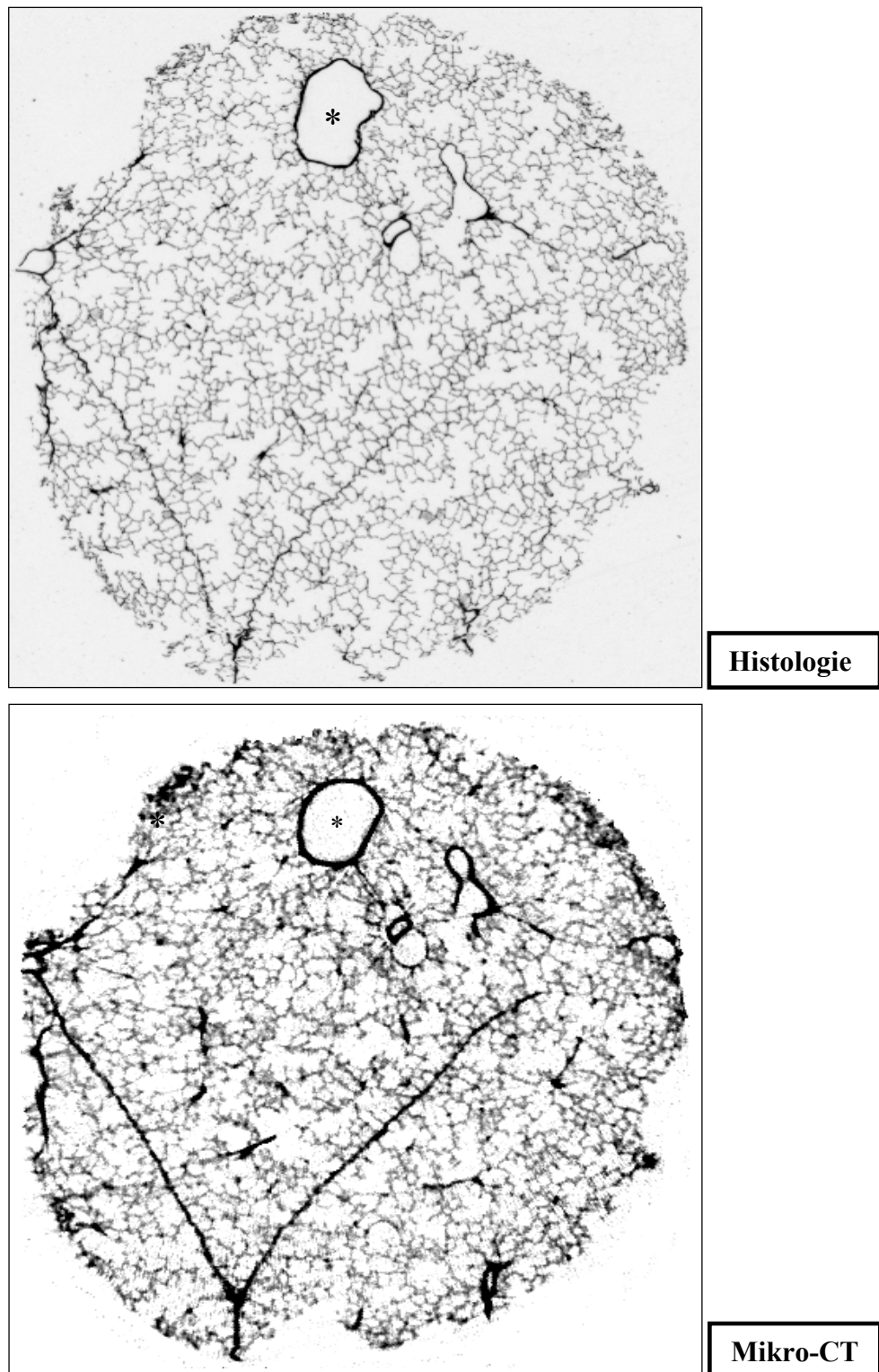


Abb. 28 Bildpaar 4: *Detektion histologischer Artefakte im Mikrotomogramm. Während die beiden Interlobularsepten im histologischen Schnitt gewellt aussehen, erscheinen sie im Mikrotomogramm linienartig gestreckt. Der stabilere Bronchiolus (\*) besitzt einen rundlich-ovalen Querschnitt. Im histologischen Schnitt ist er entrundet.*



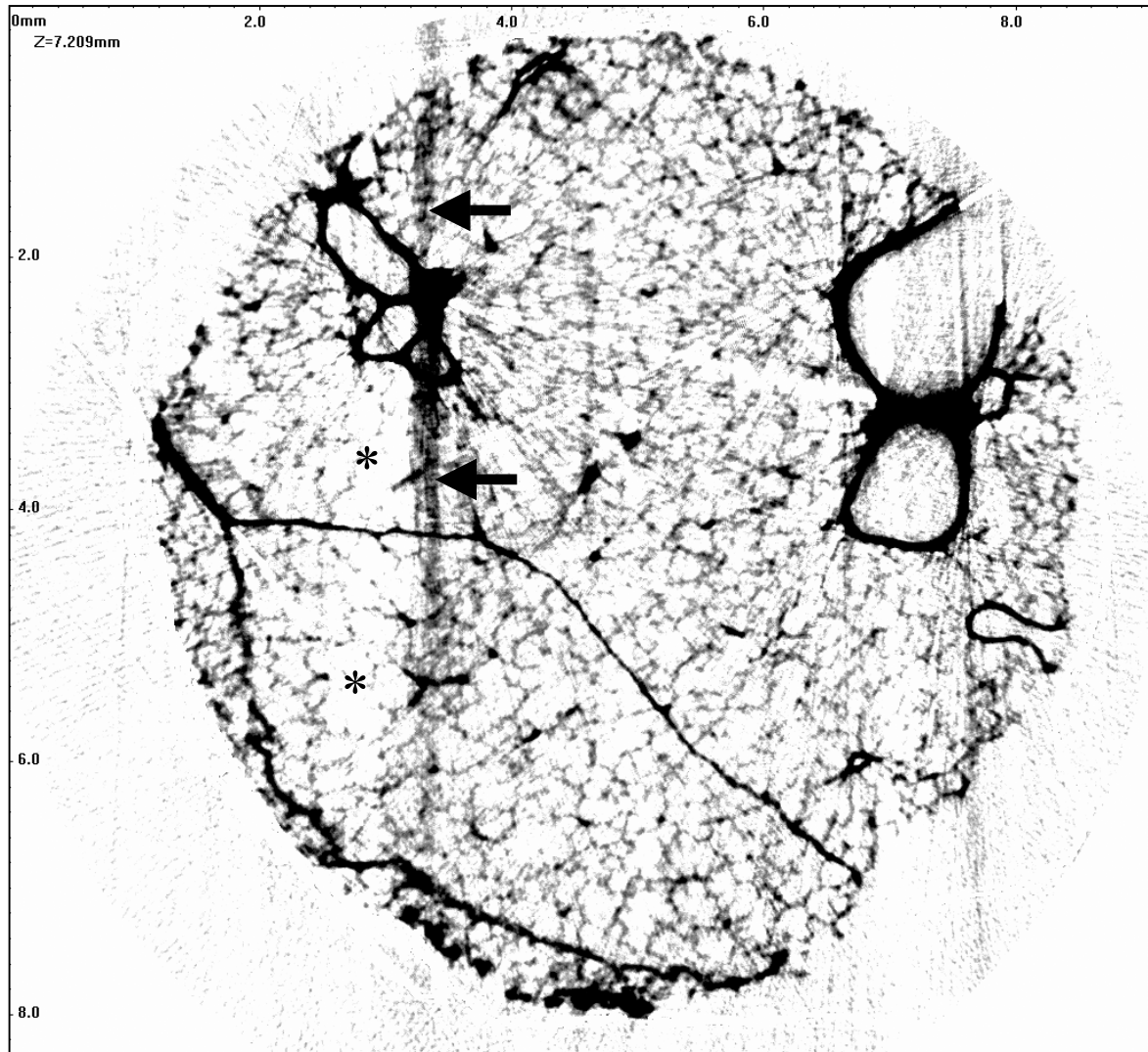


Abb. 29: Aufhärungsartefakte der Mikro-CT an Orten hoher Osmiumeinlagerung. Maskierungen (←) und Auslöschungen (\*) benachbarter Strukturen können auftreten.

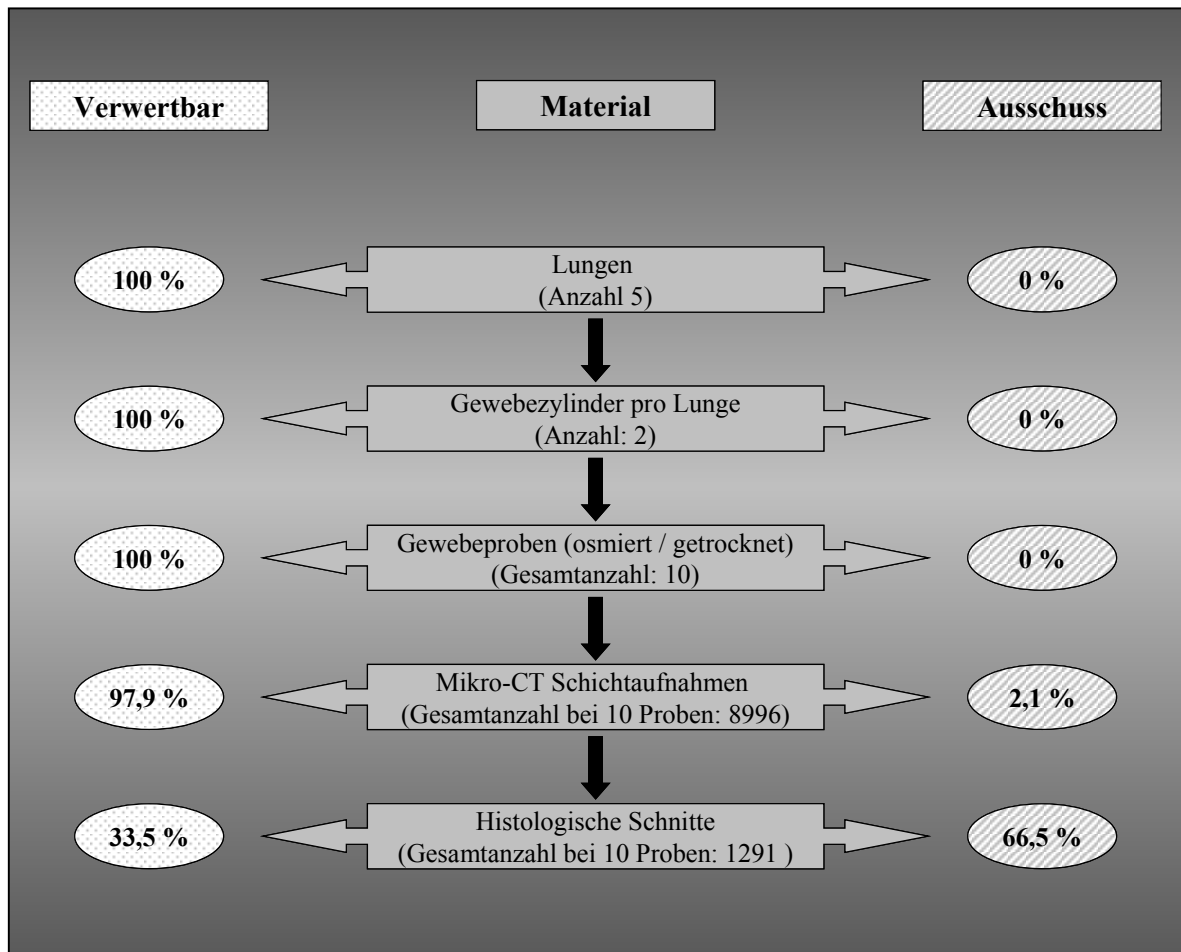


Abb. 30: Ausbeute und Verlust bei Material- und Bildgewinnung.

Zur Beurteilung der Effektivität und Reproduzierbarkeit der vorgestellten Methodik werden Ausbeute und Ausschuss beim Durchlauf der einzelnen Präparations- beziehungsweise Untersuchungsschritte gegenübergestellt (Abb. 30).

Bei der Fixierung des Probenmaterials sowie der Osmierung und Kritisch-Punkt-Trocknung treten keine Verluste auf.

Dem hohen Anteil verwertbarer Mikrotomogramme steht der relativ große Verlust histologischer Schnitte gegenüber.

Es treten bei 2,1 % der mikrotomographischen Schnitte Aufhärtungsartefakte auf.

Im Gegensatz dazu zeigen etwa zwei Drittel der histologischen Schnitte Störungen der Gewebearchitektur. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Tabelle 3).

### 3.6 Morphometrische Analysen

#### 3.6.1 Semiautomatische morphometrische Analyse (Mikro-CT)

Für die mikrotomographische Analyse wird ein würfelförmiges Volumen, bestehend aus 78 Schnitten (Seitenlänge 702  $\mu\text{m}$ , Messvolumen = 0,346  $\text{mm}^3$ ), ausgewählt.

Bei der Analyse müssen die originären Grauwertebilder in Binärbilder umgewandelt werden (Abb. 31).

- Das *Gewebevolumen* sowie die *Alveolaroberfläche* können direkt aus den Mikro-CT Schnitten bestimmt werden (*Primärparameter*).
- Das *Volumen des Luftraums* lässt sich aus der Differenz  
Messvolumen (0,346  $\text{mm}^3$ ) – Gewebevolumen  
berechnen.

Tabelle 4: *Morphometrische Parameter der semiautomatischen Mikro-CT-Analyse (dunkelgrau hinterlegt sind die morphometrischen Primärparameter)*

Lunge	Probe Nr.	Mikro-CT			
		Gewebe- volumen [V <sub>1</sub> ] (mm <sup>3</sup> )	Luftraum- volumen [V <sub>2</sub> ] (mm <sup>3</sup> )	Alveolar- oberfläche [A] (mm <sup>2</sup> )	V <sub>2</sub> / A (mm)
1	1	0,101	0,245	10,446	0,0235
	2	0,100	0,246	10,254	0,0240
2	3	0,117	0,229	10,426	0,0220
	4	0,114	0,232	10,686	0,0217
3	5	0,156	0,190	10,201	0,0186
	6	0,094	0,252	10,116	0,0249
4	7	0,053	0,293	11,217	0,0261
	8	0,110	0,236	10,713	0,0220
5	9	0,131	0,215	10,766	0,0200
	10	0,120	0,226	10,680	0,0212
MW		0,110	0,236	10,551	0,0224
STD		0,026	0,026	0,329	0,0023

Das *mittlere Gewebevolumen* beträgt  $0,110 \pm 0,026 \text{ mm}^3$ .

Das *mittlere Volumen des Luftraums* liegt bei  $0,236 \pm 0,026 \text{ mm}^3$ .

Dieses entspricht etwa 68 % des Messvolumens (0,346  $\text{mm}^3$ ).

Die *mittlere Alveolaroberfläche* liegt bei  $10,551 \pm 0,329 \text{ mm}^2$ .

Das Verhältnis V / A dient der Berechnung des *mittleren Alveolardurchmessers*.

***Alveoläre Oberflächendichte:***

Die alveoläre Oberflächendichte der semiautomatischen Mikro-CT-Messung entspricht dem Quotienten der Alveolaroberfläche durch das Messvolumen (Kap. 2.13.1; Formel 1):

$$\text{alveoläre Oberflächendichte} = \text{Alveolaroberfläche} / 0,346 \text{ mm}^3$$

Die *mittlere alveoläre Oberflächendichte* beträgt  $30,49 \pm 0,95$  /mm (Tabelle 5; 1. Spalte).

***Mittlerer Alveolardurchmesser:***

Der Quotient Volumen / Oberfläche wird verwandt, um den mittleren Alveolardurchmesser gemäß Formel 2 aus Kapitel 2.13.1 zu berechnen (siehe auch Kap. 7; Anhang A1):

$$\text{Alveolardurchmesser} = 6 \times \text{Volumen des Luftraums der Alveolen} / \text{Alveolaroberfläche}$$

Der *mittlere Alveolardurchmesser* errechnet sich zu  $134,4 \pm 13,6$   $\mu\text{m}$  (Tabelle 6; 1. Spalte).

**3.6.2 Histomorphometrie**

Nach Überlagerung des Merzgitters auf die histologischen Schnitte werden die alveoläre Oberflächendichte und der mittlere Alveolardurchmesser mit den stereologischen Verfahren ermittelt.

***Alveoläre Oberflächendichte:***

Die Oberflächendichte wird nach der Formel 5 (Kap. 2.13.2)

$$\text{Oberflächendichte} = 2 \times (\text{Anzahl der Gitterschnittpunkte} / 3,5 \times \pi \times \text{mm})$$

ermittelt.

Die *alveoläre Oberflächendichte* beträgt  $35,47 \pm 2,41$  /mm (Tabelle 5; 3. Spalte).

***Mittlerer Alveolardurchmesser:***

Der Alveolardurchmesser wird mittels Merzgitter durch die *Zweipunkt-Streckenmessung* bestimmt (Kap. 2.13.2).

Der *mittlere Alveolardurchmesser* beträgt  $135,7 \pm 14,5$   $\mu\text{m}$  (Tabelle 6; 3. Spalte).

### 3.6.3 Stereologiebasierte Morphometrie in der Mikro-CT

Wie in der Histologie werden, nach Überlagerung des Merzgitters auf die Mikro-CT Schnitte (Abb. 31), alveoläre Oberflächendichte und mittlerer Alveolardurchmesser unter Anwendung der gleichen stereologischen Verfahren ermittelt.

#### *Alveoläre Oberflächendichte:*

Die *Oberflächendichte* beträgt  $33,47 \pm 1,91$  / mm (Tabelle 5; 2. Spalte).

Tabelle 5: *Alveoläre Oberflächendichte: ermittelt semiautomatisch in der Mikro-CT und stereologiebasiert am mikrotomographischen sowie am histologischen Schnitt*

Lunge	Probe Nr.	Alveoläre Oberflächendichte (/ mm)		
		Mikro-CT (semiautom.)	Mikro-CT (Merzgitter)	Histologie (Merzgitter)
1	1	30,19	32,19	35,65
	2	29,64	29,83	30,20
2	3	30,13	32,74	34,56
	4	30,88	33,47	37,11
3	5	29,48	33,83	37,84
	6	29,24	31,83	35,29
4	7	32,42	35,29	35,65
	8	30,96	36,38	37,83
5	9	31,12	35,11	37,47
	10	30,87	34,01	33,10
MW		30,49	33,47	35,47
STD		0,95	1,91	2,41

Beim Vergleich der jeweiligen Mittelwerte ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden ( $p < 0,05$ ).

**Mittlerer Alveolardurchmesser:**

Der *mittlere Alveolardurchmesser* beträgt  $135,8 \pm 15 \mu\text{m}$  (Tabelle 6; 2. Spalte).

Tabelle 6: *Alveolardurchmesser: ermittelt semiautomatisch in der Mikro-CT und stereologiebasiert am mikrotomographischen sowie am histologischen Schnitt*

Lunge	Probe Nr.	Alveolardurchmesser ( $\mu\text{m}$ )		
		Mikro-CT (semiautom.)	Mikro-CT (Merzgitter)	Histologie (Merzgitter)
1	1	141	141	142
	2	144	152	150
2	3	132	132	133
	4	130	132	133
3	5	112	115	117
	6	149	151	152
4	7	157	161	159
	8	132	127	119
5	9	120	120	125
	10	127	127	127
MW		134,4	135,8	135,7
STD		13,6	15,0	14,5

Beim Vergleich der Mittelwerte ergibt sich im Gegensatz zur alveolären Oberflächendichte hinsichtlich des Parameters *Alveolardurchmesser* kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden.

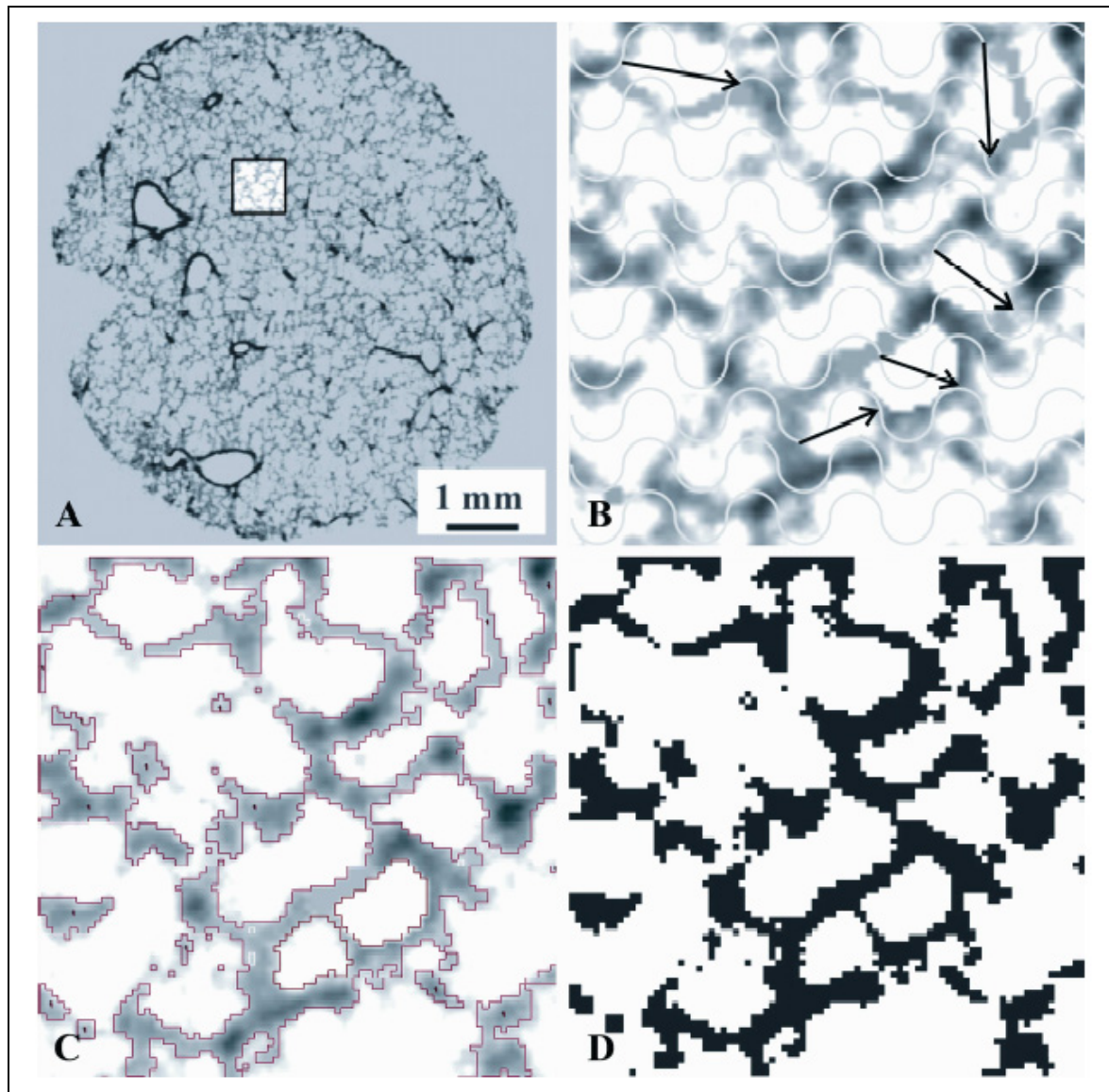


Abb. 31: Für die morphometrischen Analysen der Mikro-CT wird eine quadratische ROI mit einer Seitenlänge von  $702 \mu\text{m}$  definiert, die nur Alveolen beinhaltet (A). Grauwertebild der ROI mit dem darüber projizierten Merzgitter und den Pfeilen zur Bestimmung des Alveolardurchmessers (B). Die roten Linien (in C) markieren die Grenzlinie der schwellenwertbasierten Segmentierung von Gewebe und Luft. Resultierendes Binärbild (D). Beim Segmentierungsverfahren sind nicht alle Gewebestrukturen eingeschlossen.

### 3.7 Morphometrische Korrelationsprüfungen

#### 3.7.1 Mikro-CT / Histologie im Vergleich auf Basis stereologisch erhobener Daten

Zur Überprüfung des Einflusses der Präparation werden die stereologisch gewonnenen Parameter der histologischen und der mikrotomographischen Schnittbilder verglichen.

Hinsichtlich des Parameters *alveoläre Oberflächendichte* (Tabelle 5) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen histologischen und mikrotomographischen Schnittbildern ( $35,47 \pm 2,41$  / mm versus  $33,47 \pm 1,91$  / mm).

Die Regressionsanalyse (Abb. 32 A) zeigt eine Korrelation von  $r = 0,72$  ( $p = 0,018$ ).

Die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot (Abb. 32 B) beträgt  $2 \pm 1,6$  / mm.

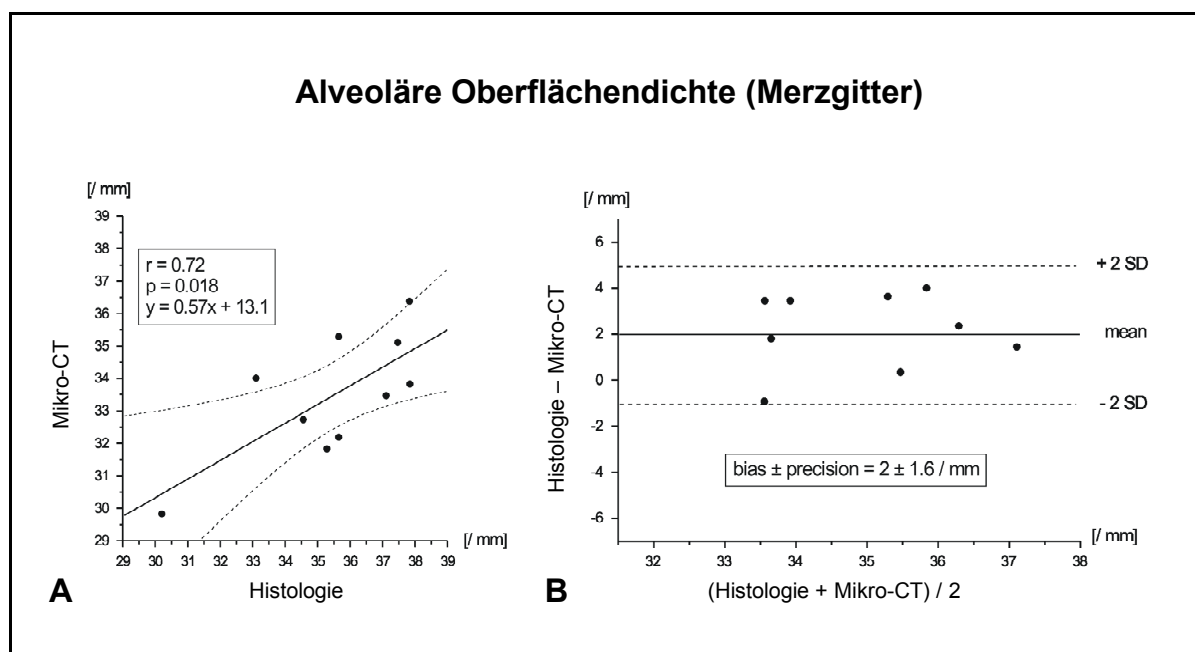


Abb. 32: Regressionsanalyse (A) und Bland-Altman-Plot (B) der alveolären Oberflächendichte. Vergleich der auf stereologischer Grundlage erhobenen Parameter aus histologischen und mikrotomographischen Schnitten.



Die am histologischen und mikrotomographischen Schnitt auf stereologischer Basis bestimmten *Alveolardurchmesser* ( $135,7 \pm 14,5 \mu\text{m}$  versus  $135,8 \pm 15,0 \mu\text{m}$ ; Tabelle 6) korrelieren signifikant.

Die Regressionsanalyse (Abb. 33 A) ergibt eine Korrelation von  $r = 0,97$  ( $p < 0,0001$ ).

Die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot (Abb. 33 B) beträgt  $-0,1 \pm 3,4 \mu\text{m}$ .

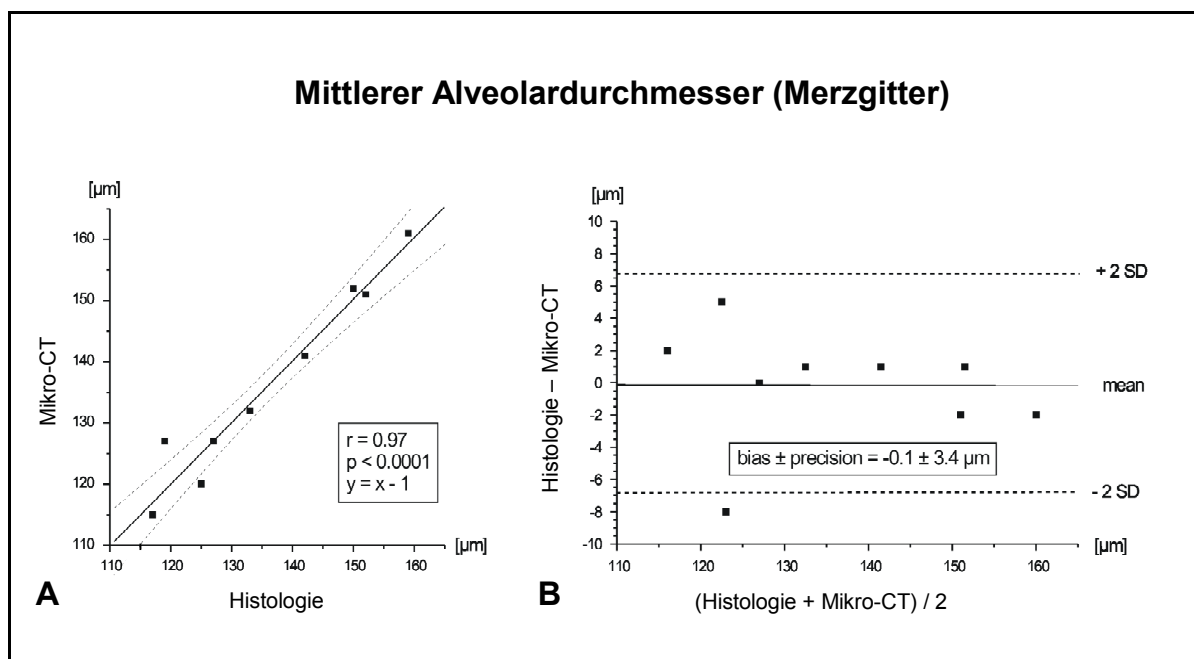


Abb. 33: Regressionsanalyse (A) und Bland-Altman-Plot (B) des mittleren Alveolardurchmessers. Vergleich der auf stereologischer Grundlage erhobenen Parameter aus histologischen und mikrotomographischen Schnitten.

### 3.7.2 Vergleich semiautomatisch und stereologisch erhobener Daten

Um die Genauigkeit der semiautomatischen Morphometrie der Mikro-CT zu überprüfen, werden die stereologiebasierten Daten der Mikro-CT Schnitte mit der computergestützten Mikro-CT Messung aus identischen Messfeldern der Mikrotomogramme verglichen.

Hinsichtlich des Parameters *alveoläre Oberflächendichte* (Tabelle 5) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Messmethoden ( $33,47 \pm 1,91 / \text{mm}$  versus  $30,49 \pm 0,95 / \text{mm}$ ).

Die Regressionsanalyse (Abb. 34 A) ergibt eine Korrelation von  $r = 0,70$  ( $p = 0,023$ ).

Die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot (Abb. 34 B) beträgt  $2,9 \pm 1,4 / \text{mm}$ .

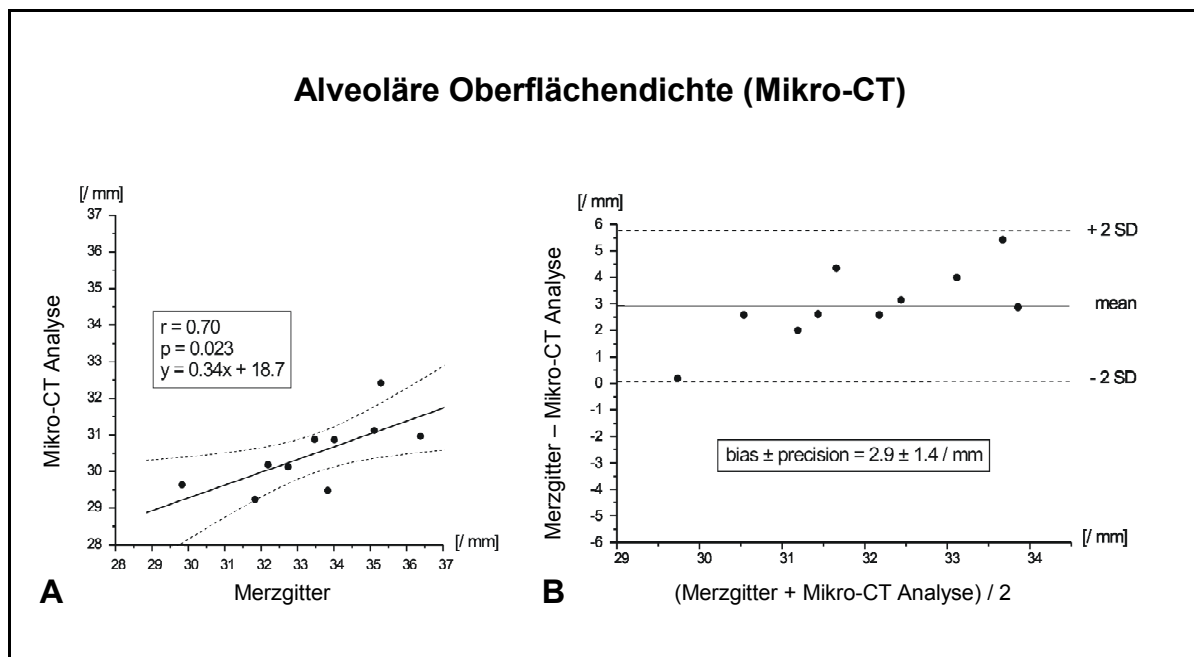


Abb. 34: Regressionsanalyse (A) und Bland-Altman-Plot (B) der alveolären Oberflächendichte. Vergleich der auf stereologischer Basis gewonnenen morphometrischen Daten mit jenen aus semiautomatischer Analyse jeweils innerhalb desselben tomographischen Schnittbilds.

Der errechnete *Alveolardurchmesser* ( $135,8 \pm 15,0 \mu\text{m}$  versus  $134,4 \pm 13,6 \mu\text{m}$ ; Tabelle 6) korreliert signifikant.

Die Regressionsanalyse (Abb. 35 A) ergibt eine Korrelation von  $r = 0,97$  ( $p < 0,0001$ ).

Die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot (Abb. 35 B) beträgt  $1,4 \pm 3,3 \mu\text{m}$ .

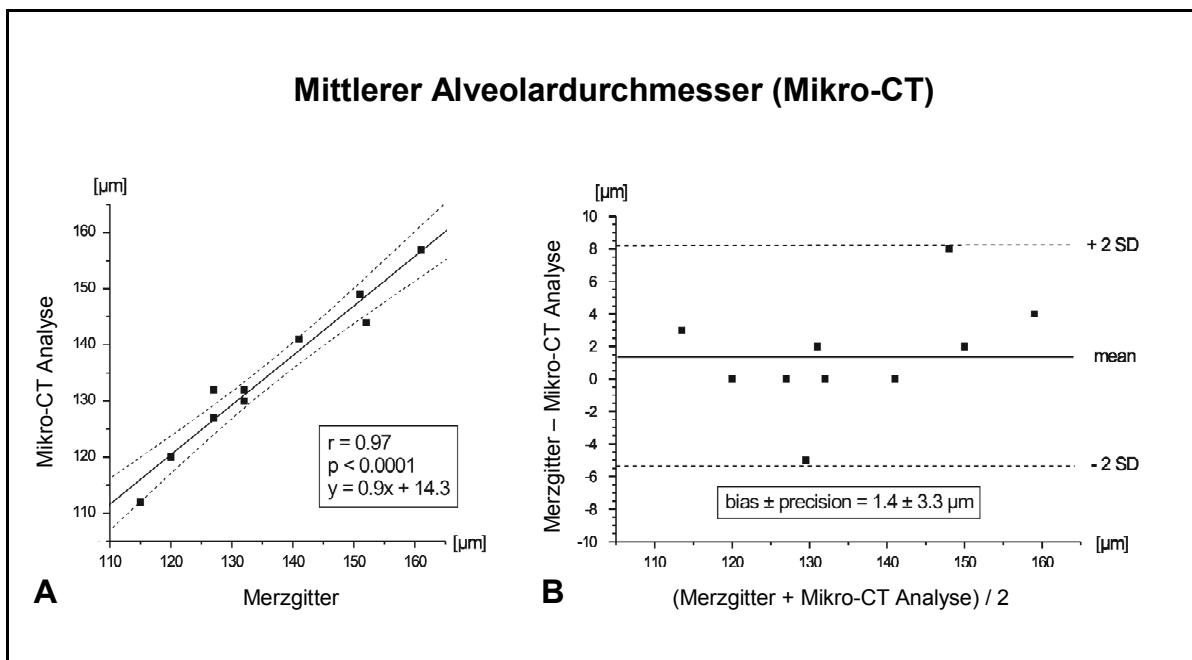


Abb. 35: Regressionsanalyse (A) und Bland-Altman-Plot (B) des mittleren Alveolardurchmessers. Vergleich der auf stereologischer Basis gewonnenen morphometrischen Daten mit jenen aus semiautomatischer Analyse jeweils innerhalb desselben tomographischen Schnittbilds.

### 3.8 Mikro-CT: Dreidimensionale Rekonstruktion der terminalen Lufträume

Der kontinuierliche Datensatz der Mikro-Computertomographie erlaubt eine dreidimensionale Rekonstruktion der Lungenprobe in verschiedenen Raumrichtungen (Abb. 36-39).

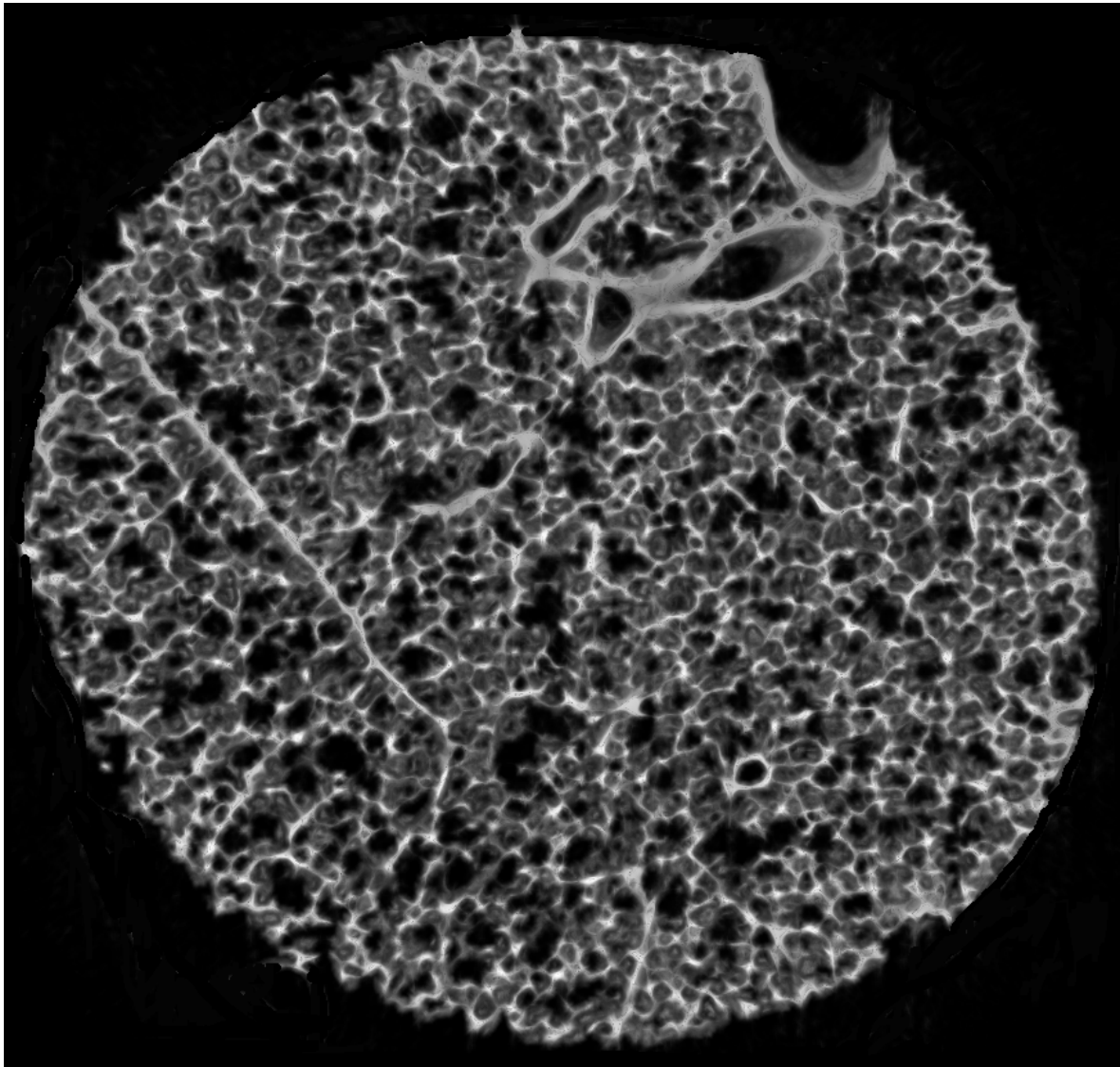


Abb. 36: Dreidimensionale Rekonstruktion der terminalen Lufträume mittels Volume-Rendering-Technik aus transversalen Mikrotomogrammen.

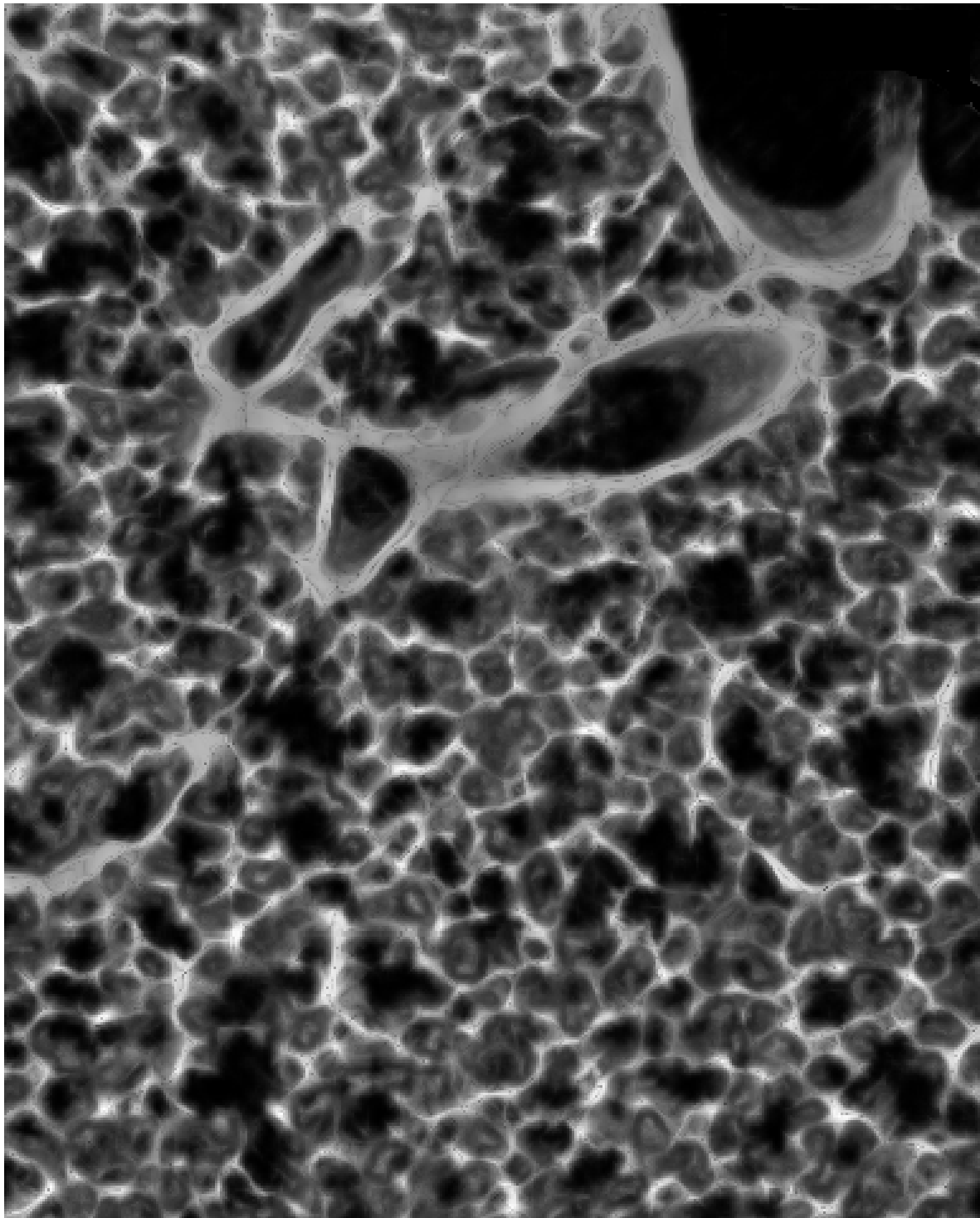
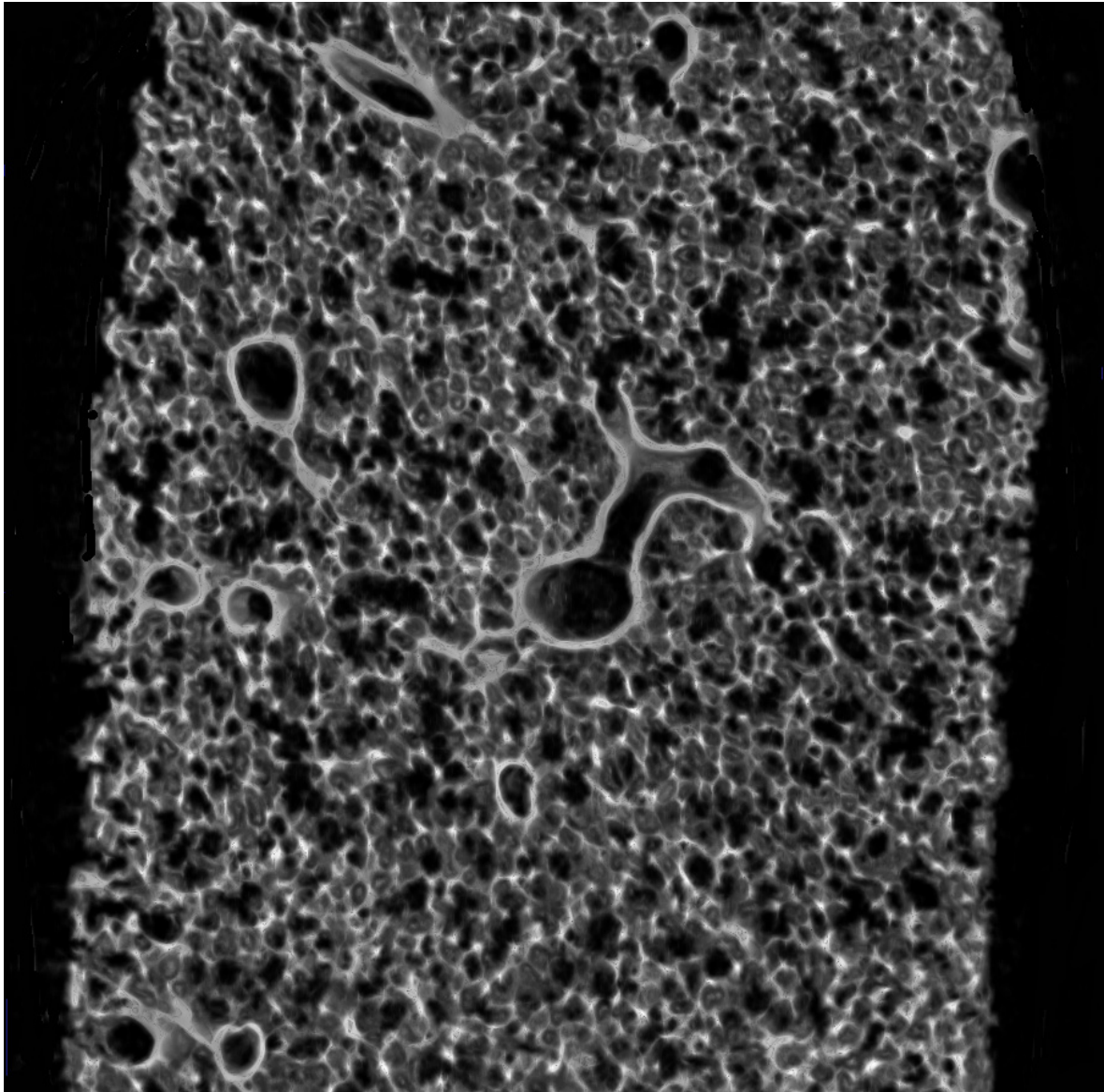


Abb. 37: *Dreidimensionale Rekonstruktion mittels Volume-Rendering-Technik; Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 36.*



*Abb. 38: Coronare dreidimensionale Rekonstruktion mittels Volume-Rendering-Technik. Aufgrund der isometrischen Voxel ist eine dreidimensionale Darstellung des Alveolargewebes in verschiedenen Ebenen ohne Verlust der Ortsauflösung möglich.*

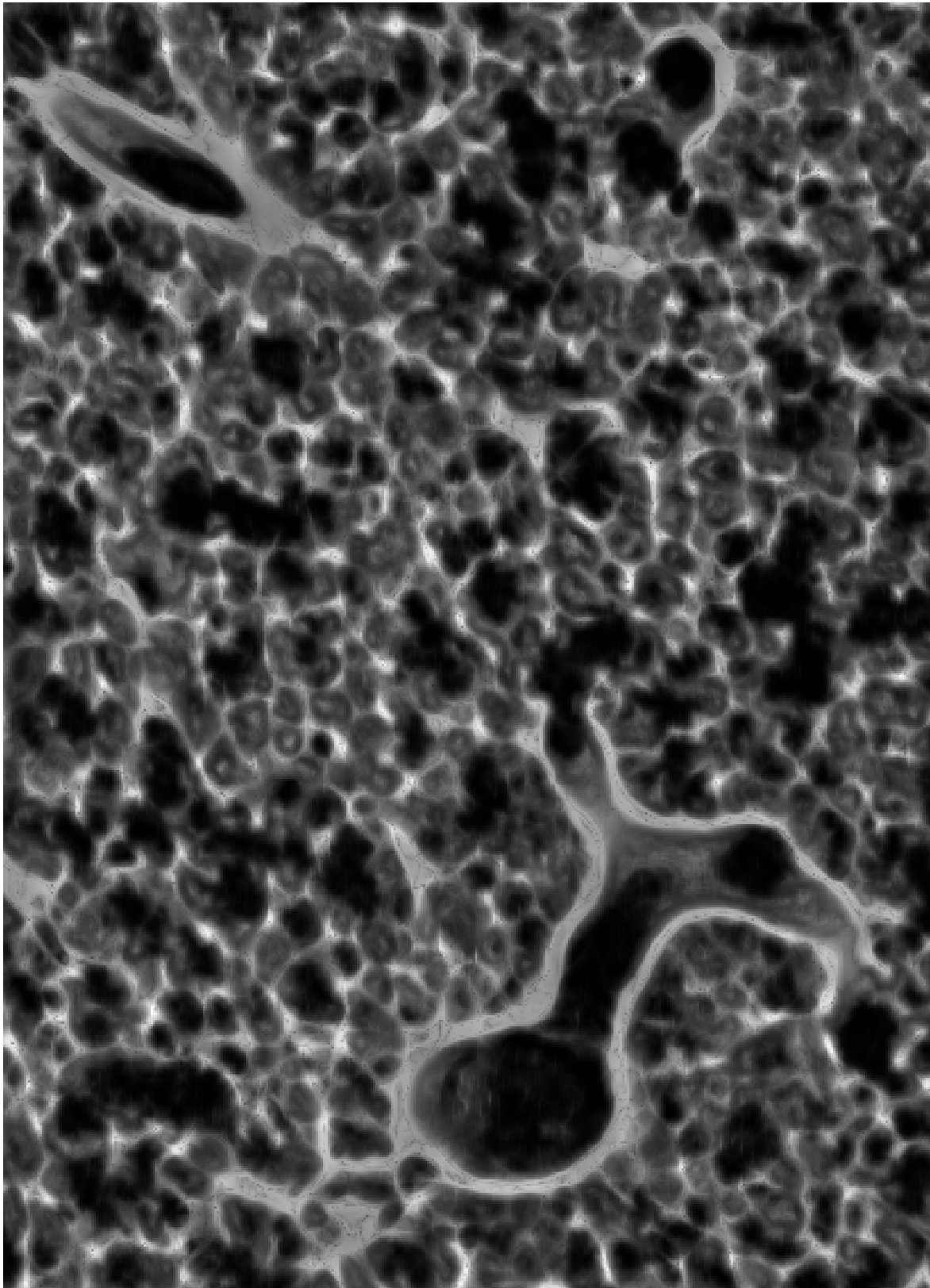


Abb. 39: Coronare dreidimensionale Rekonstruktion mittels Volume-Rendering-Technik. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 38.

Mittels der so genannten Saatkorntechnik können interaktiv Acini rekonstruiert werden. Dazu wurde zunächst ein peripherer luftleitender Atemweg markiert. Von dort wurden die Luftwege antegrad ausgefüllt. Anschließend wurde nach Festlegung des Startpunkts im Bereich eines Übergangs luftleitende zu acinären Atemwegen eine Einheit zusammenhängender Luftwege rekonstruiert (Abb. 40 und 41).

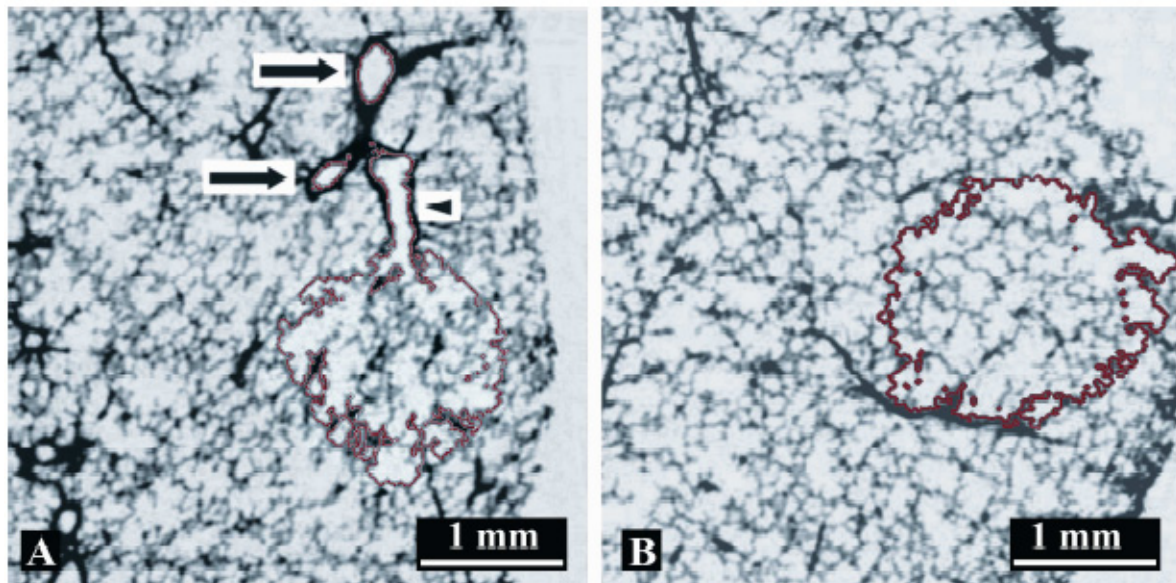


Abb. 40: *Dreidimensionale Rekonstruktion des pulmonalen Acinus. Die Grundlage der Segmentierung bilden coronare (A) und transversale (B) Schnittbilder. Im ersten Schritt wird der luftleitende periphere Bronchialbaum (⇒) segmentiert. Der zweite Segmentierungsschritt startet im Bereich des letzten Bronchiolus ohne Alveolen (◄). Die roten Linien stellen die Begrenzung des Acinus dar.*



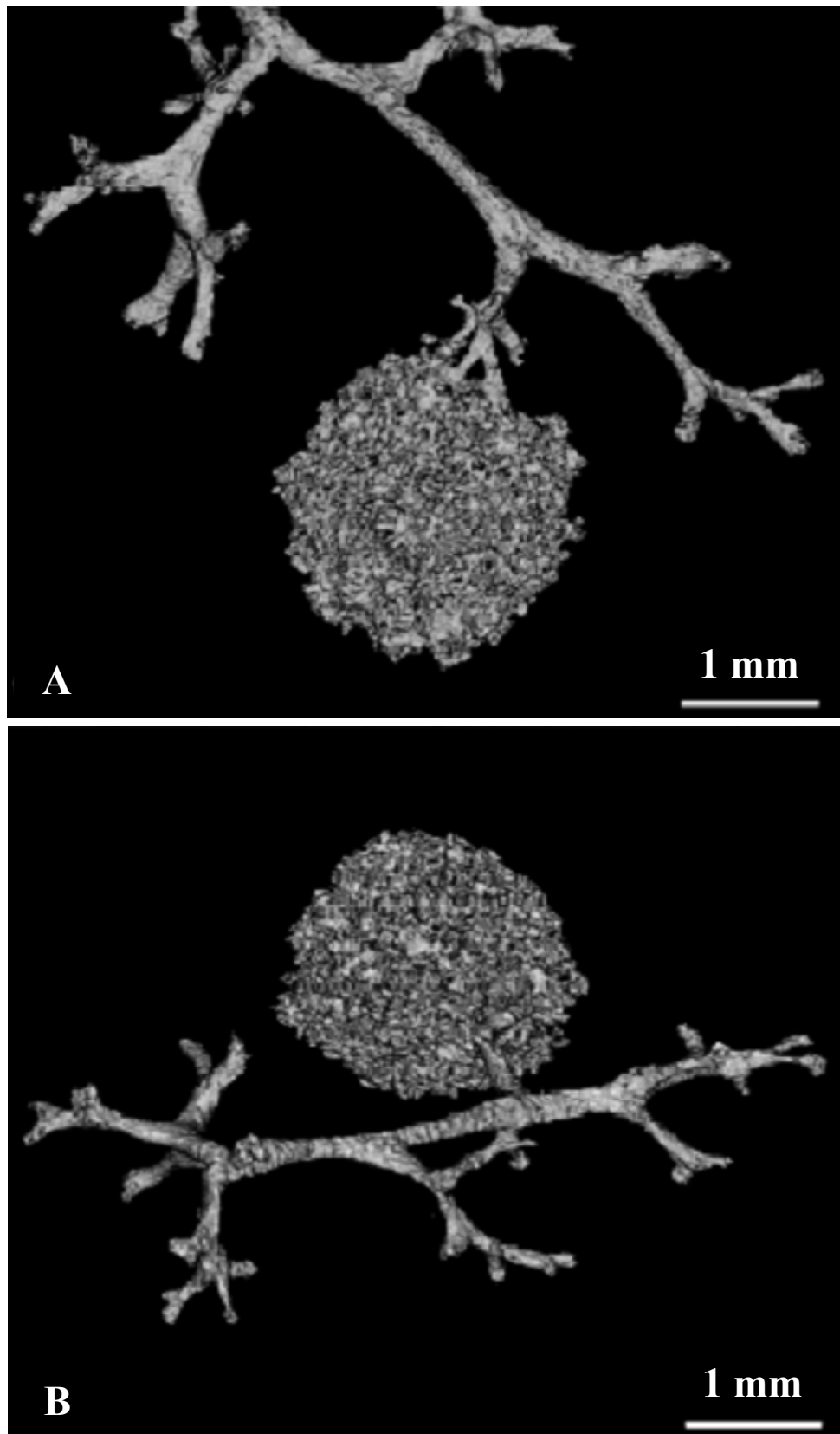


Abb. 41: Pulmonaler Acinus – dreidimensionale Rekonstruktion mittels Saatkorntechnik. Ansicht aus zwei senkrecht aufeinanderstehenden Richtungen (A und B).

### 3.9 Darstellung humanen Lungengewebes mit der Mikro-CT

Die an Schweinelungen entwickelte Methodik wird exemplarisch an einer humanen Lunge angewandt.

Bis auf die verkürzte Sauerstofftrocknung nach Fixation und die reduzierte Röhrenspannung bei der Messung im Mikrotomographen wird exakt dem vorgestellten Versuchsprotokoll gefolgt.

Es gelingt die Darstellung der terminalen Lufträume humaner Lungen in der Mikro-Computertomographie (Abb. 42).

Neben der zweidimensionalen Visualisierung werden dreidimensionale Rekonstruktionen der pulmonalen Mikrostrukturen mittels Volume-Rendering-Technik durchgeführt (Abb. 43 und 44).

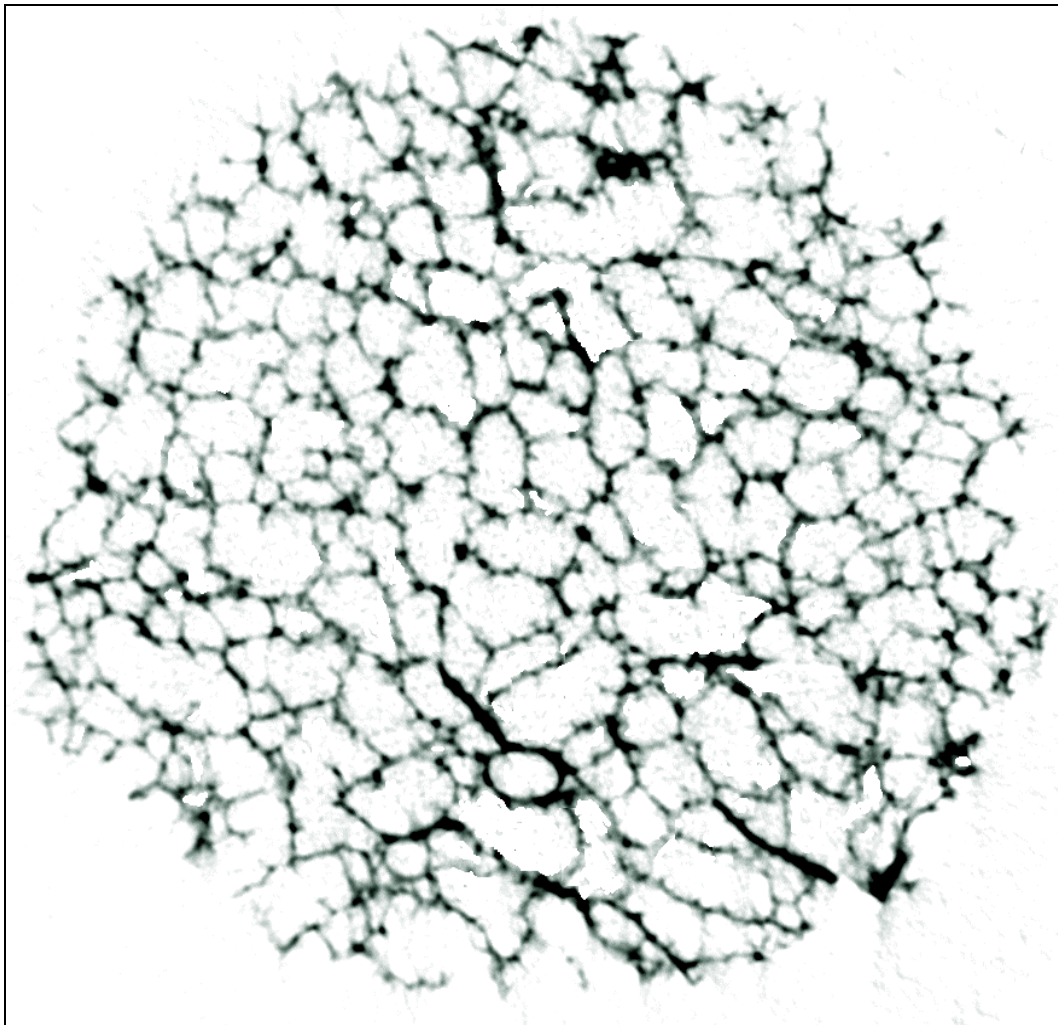


Abb. 42: *Humane Lunge: Zweidimensionale Darstellung des Alveolargewebes mittels Mikro-Computertomographie (Transversalschnitt).*

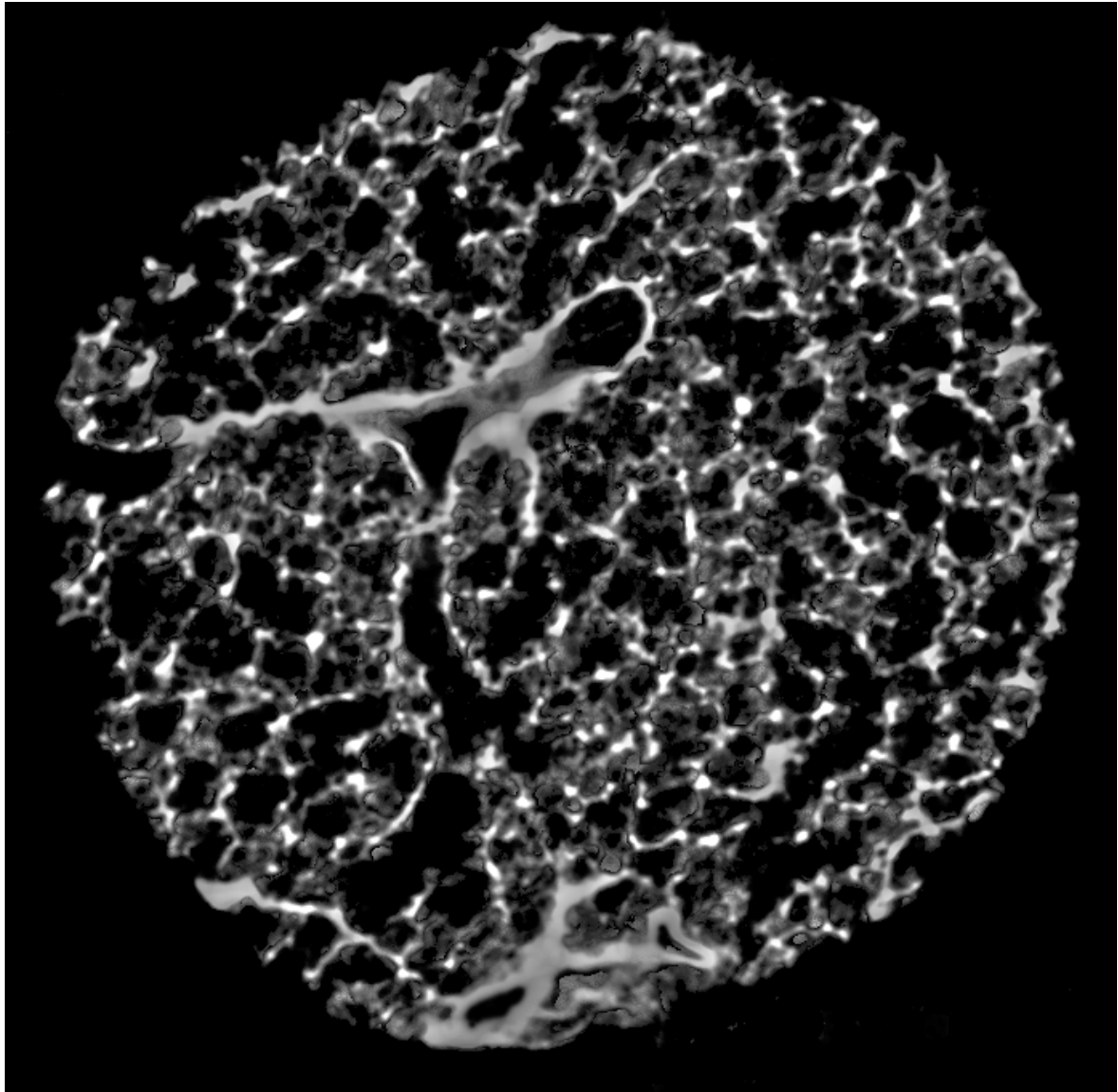


Abb. 43: *Humane Lunge: Dreidimensionale Darstellung der pulmonalen Mikrostrukturen unter Anwendung der Volume-Rendering-Technik; Transversalschnitt.*

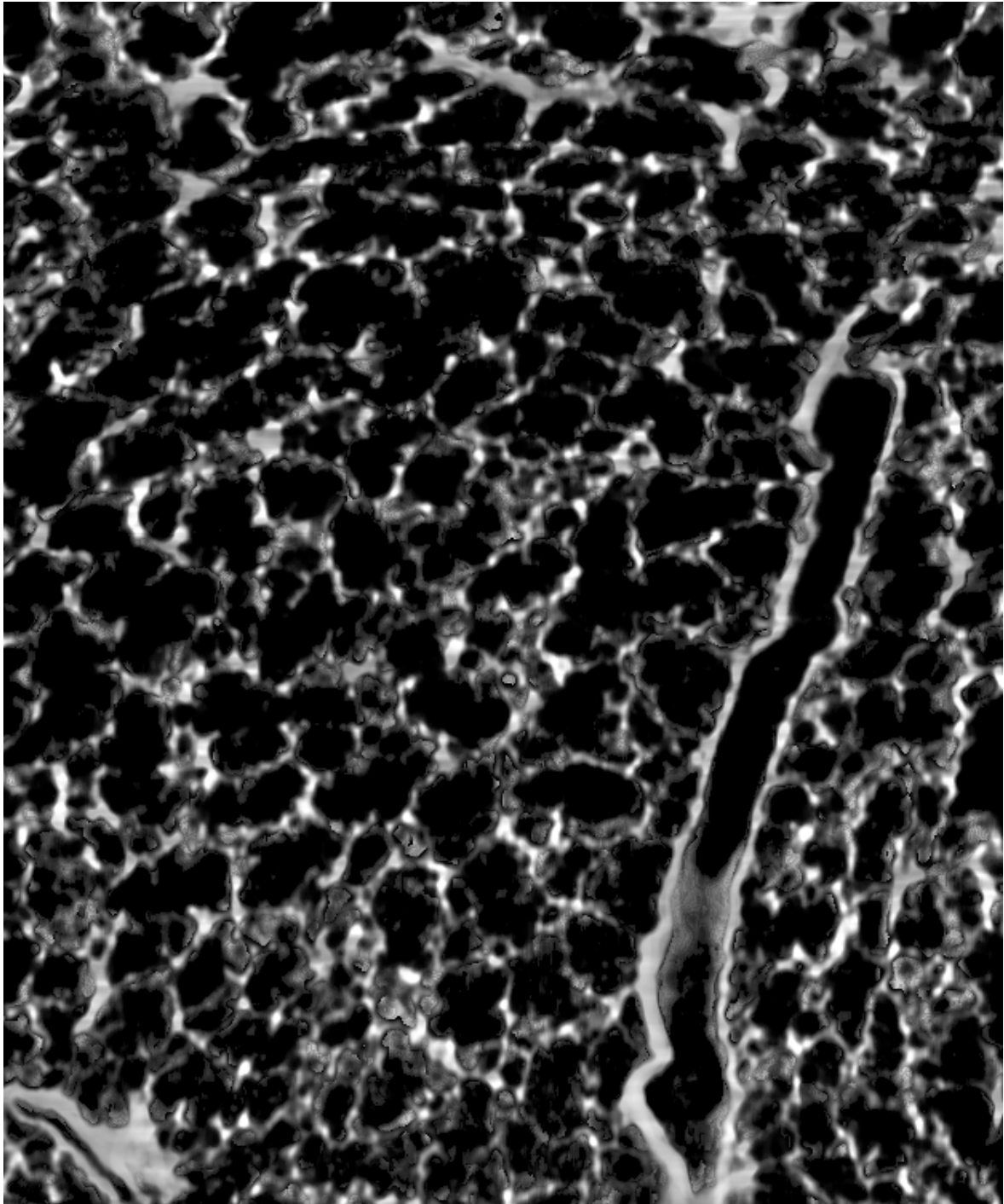


Abb. 44: *Humane Lunge: Coronare dreidimensionale Rekonstruktion mittels Volume-Rendering-Technik.*

## 4. Diskussion

### 4.1 Material

Die Präparationstechnik zur Darstellung der Alveolararchitektur mithilfe der Mikro-CT wurde an Schweinelungen entwickelt.

Schweine weisen eine dem Menschen vergleichbare Anatomie und Physiologie auf (Riquet et al. 2000). Von allen Versuchstieren sind ihre Lungen hinsichtlich Größe und anatomischer Struktur der humanen Lunge am ähnlichsten (Cooper et al. 1991). Dank der Fleischproduktion am ortsansässigen Schlachthof stehen sie an jedem Schlachttag frisch zur Verfügung.

Schweinelungen besitzen bei Geburt einen hohen Reifegrad. Die postnatale Alveolarisierung erfolgt schneller als beim Menschen (Berg 1990). Die Lungen sind bei den sechs Monate alten Tieren funktionell und morphologisch schon voll ausgereift (Kern et al. 1992).

Das interlobuläre Bindegewebe ist stärker ausgeprägt als das der menschlichen Lunge. Die Interlobularsepten und die Läppchenaufteilung (Lobuli; siehe Abb. 2) sind deutlicher zu erkennen (Berg 1990). Ein wesentlicher Unterschied der Schweinelunge ist der höhere Anteil an elastischen Fasern (Töndury und Picco 1952).

Im Unterlappen ist der anatomische Aufbau des Organs identisch mit dem der humanen Lunge: Die Pulmonalarterien begleiten die Bronchien im peribronchovaskulären Bindegewebskompartiment (so genannte bronchoarterielle Verzweigung). Die Lungenvenen verlaufen im interlobulären Bindegewebe an den Läppchen- und Lappengrenzen. Im Ober- und Mittellappen unterscheidet sich der Aufbau der Schweinelunge. Hier verlaufen die Lungenvenen nicht an den Läppchengrenzen, sondern gemeinsam mit den Pulmonalarterien entlang der Bronchien (bronchovaskuläre Aufzweigung – Töndury und Picco 1952).

Eine weitere Besonderheit betrifft den Bronchialbaum. Beim Schwein besitzt die rechte Lunge regelhaft einen Bronchus trachealis. Er geht direkt aus der Trachea ab und belüftet den rechten Oberlappen. Mittel- und Unterlappen der rechten Seite werden über den Hauptbronchus belüftet. Die linke Lunge wird – wie die humane Lunge – nur über einen Hauptbronchus belüftet (Waibl 1999).

Aufgrund dieser anatomischen Besonderheit kann nur die linke Schweinelunge vollständig mit der Fixationsmaschine mittels Formalindampfbeatmung fixiert werden. Bei der rechten Lunge würde bei Intubation des Hauptbronchus der vom Bronchus trachealis abhängige Oberlappen nicht fixiert.

## 4.2 Lungenfixierung

### 4.2.1 Verfahren

Die Erhaltung der räumlichen Struktur der Lunge stößt im Rahmen der Präparation auf eine Reihe von Schwierigkeiten.

Anders als die Spongiosa des Knochens, mit der die mikrotomographischen Untersuchungen eingeleitet wurden (Feldkamp et al. 1989), besitzt das Lungengewebe keine räumliche Stabilität. Schon die Entnahme aus dem Thorax führt unweigerlich zum Kollaps des Organs.

Die Bewahrung der Architektur des Alveolarraums erfordert deshalb eine aufwendige Lungenpräparation.

Die Gewebepreparation muss zunächst in der Lage sein, die räumliche Struktur der gesamten Lunge bis hin zur Alveolararchitektur im mikroskopischen Bereich zu fixieren. Bei der Präparation soll neben einer „chemischen Fixation“ (also der Konservierung der Zell- und Gewebekomponenten) auch eine „mechanische Fixation“ (i.e. der Erhalt der Luftraumarchitektur) der Lunge gewährleistet sein (Oldmixon et al. 1985).

Durch die angewandte Technik der volumenkontrollierten Beatmung mit Formalindampf lassen sich die Lungen in einem Zustand fixieren, der bezüglich Form, Größe und Gasgehalt den Verhältnissen *in vivo* nahe kommt (Rau 1980).

Es wurden verschiedene alternative Techniken der Lungenpräparation – mit dem Ziel, die räumliche Struktur zu erhalten – entwickelt (Oldmixon et al. 1985).

Bereits René Théophil Hyacinth Laennec (1826) kämpfte bei der Untersuchung des Lungenemphysems mit dem Problem des Erhalts der räumlichen Struktur des Organs. Schon er machte die Elastizität der Lunge für den Organkollaps verantwortlich. Er erkannte die Notwendigkeit, getrocknete und luftgefüllte Lungenpräparate herzustellen, um aussagekräftige morphologische Untersuchungen durchführen zu können. Seine Methode, Lungen über **Lufttrocknung** in ihrem möglichst ursprünglichen Zustand zu fixieren, wurde lange Zeit für postmortale Röntgenuntersuchungen der Lunge angewandt. Die

Lufttrocknung ist sehr zeitaufwendig. Das Gewebe wird im eigentlichen Sinne nicht fixiert und es treten Verdunstungsartefakte auf.

Heitzmann (1973) löste das Problem der fehlenden Gewebekonservierung durch eine der Lufttrocknung vorangehende **Flüssigfixierung**. Seine Technik ist trotz der relativ guten Röntgenaufnahmen aufgrund einer wochenlangen Präparationszeit und der schlechten Qualität der histologischen Schnitte unbefriedigend.

Satoh et al. (1994) gelang es, die Qualität des histologischen Materials zu verbessern, indem sie der Methode nach Heitzmann (1973) eine **Formalininstillation** voranstellten. Schwierigkeiten bereitete allerdings die vollständige Entfernung des Formalins. Neben der ursprünglichen Entfernung durch manuelle Kompression arbeiteten sie später mit Druckluft zur Entfernung des Fixans (Satoh et al. 1997).

Die **intravasale Formalininjektion** (Loeschcke 1924; Gil und Weibel 1972) und die bis heute zur histologischen Präparation übliche **intrabronchiale Formalininstillation** (Loeschcke 1924; Hartroft und Macklin 1943; Willet et al. 2001) sind in Bezug auf Lungenentfaltung und Erhalt des pulmonalen Gasgehalts als kritisch anzusehen. Diese Techniken sind für radiologische Untersuchungen ungeeignet, da die Fixierungsflüssigkeit den natürlichen Kontrast (Luft – Lungengewebe) aufhebt. Zudem wird bei der Instillation von Formalinlösung eine Schrumpfung der Alveolarsepten um die inkompressible Flüssigkeit beobachtet. Dieses hat eine Störung der geometrischen Größenverhältnisse des Lungenparenchyms zur Folge (Weibel und Vidone 1961).

Weibel und Vidone (1961) folgerten, dass eine ideale Fixierung mit dem Ziel, die Lungenarchitektur zu erhalten, die **intrabronchiale Insufflation von Formalindampf** sei. Eine Fixierung mit kaltem Formalindampf bei konstantem Druck wurde bereits von Blumenthal und Boren (1959) durchgeführt. Im Anschluss war eine weitere Lufttrocknung nötig. Das Verfahren blieb mit einer Dauer von 10-12 Tagen zeitaufwendig. Die histologischen Präparate waren von schlechter Qualität. So wurde ihre Methode von Weibel und Vidone (1961) modifiziert. Sie entfalteten die Lunge in einem Unterdruckbehälter. Während sich die Lunge durch den Unterdruck in der Kammer ausdehnte, wurde einmalig Formalindampf passiv angesaugt. Problematisch war der ungenügende Gasaustausch, der eine Nachfixierung erforderlich machte.

Der Forderung nach einer „natürlicheren“ Fixation (Weibel 1963 b) wurden Pratt und Klugh (1961) durch eine erste Simulation von Atemzügen mit Formalindampf erstmals gerecht. Durch eine Steigerung der Atemzüge wurde sie weiter verbessert (Wright et al.

1974). Die ebenfalls mit Wechseldruck arbeitende Apparatur von Mittermayer et al. (1978) ermöglichte zwar einen ausreichenden Gasgehalt der fixierten Lunge, jedoch kam es durch die Aufhängung der Lunge mit dem Hauptbronchus nach oben zu Flüssigkeitsansammlungen in den basalen Präparateanteilen und damit zur Vortäuschung eines intraalveolären Ödems.

Erst das von Rau und Mittermayer (1980) entwickelte System umgeht die Nachteile der aufgeführten Fixationsmethoden. Die Beatmung der Lunge mit Formalindampf erfolgt bei dieser modifizierten Apparatur eines Engström-Respirators volumenkontrolliert. Durch die Lagerung der isolierten Lungen mit dem Bronchus nach unten kann in der Lunge befindliche Flüssigkeit (Blut, Sekret, Spülflüssigkeit) ungehindert abfließen. Eine Zusatzheizung verhindert durch eine höhere Kammertemperatur die Kondensation von Formalindampf im Gewebe. Die Beatmung mit einem positiven endexpiratorischen Druck eröffnet minderbelüftete Regionen und wirkt einem Alveolenkollaps entgegen.

Am Ende der Formalindampf-Fixation sind die Schweinelungen vollständig entfaltet. Sie besitzen jedoch noch eine geringe Retraktionstendenz. Offensichtlich sind noch elastische Rückstellkräfte vorhanden, die dazu führen, dass die Lunge die Inspirationsstellung nicht vollständig beibehält.

Bei Fixationen humaner Lungen wird ein derartiges Verhalten nicht beschrieben (Rönn 1991; Stroh 1991, Watz et al. 2005). Auch die von uns präparierte humane Lunge war nach einer Fixationszeit von sechs Stunden vollständig steif.

Das unterschiedliche Verhalten der Schweinelunge dürfte auf dem höheren Anteil elastischer Fasern beruhen (Töndury und Picco 1952). Von den Strukturproteinen des Lungengewebes stellen Elastin und Kollagen die beiden Hauptkomponenten dar. Formalin fixiert nur das Kollagen, nicht aber das Elastin (Sobin et al. 1982). So erklärt sich die elastische Restretraktion der Lunge nach der Fixation.

Die an die Fixation angeschlossene 72-stündige Trocknung durch kontinuierliche Gasinsufflation führt zu einer Versteifung und Aufhebung der Schrumpfungstendenz.

Das Ergebnis ist ein in Inspirationsstellung fixiertes Präparat, das für die radiologischen und histologischen Untersuchungen weiterverarbeitet werden kann.



#### 4.2.2 Volumina und Gewichte der Lungen – alveolärer Strukturerehalt

Die Formalinfixation führt ohne Zweifel zu Veränderungen des Lungengewebes. Proteine – und hier vor allem das Kollagen – werden denaturiert, der Flüssigkeitsgehalt des Gewebes wird verändert. Zusätzlich wird der die Oberflächenspannung mindernde Surfactant-Film zerstört. Der Flüssigkeitsverlust im Parenchym zeigt sich in der Reduktion des Organgewichts um 70 %.

In der Literatur ist eine Lungenvolumenabnahme von bis zu 20 % bei der Formalinfixierung beschrieben (Lum und Mitzner 1985). Volumenunterschiede, die infolge der Präparation auftreten, müssen bei morphometrischen Analysen berücksichtigt werden (Xiao et al. 2003).

Im Rahmen einer Vergleichsstudie der Diffusionsfläche bei Säugetierlungen ermittelten Tenney und Remmers (1963) bei Schweinen eine Totalkapazität von 4,3 Litern.

Das mittlere Volumen der von uns verwendeten kleineren linken Lunge lag bei 2,1 Litern. Dabei war das Volumen der ausgedehnten Lunge vor der Präparation mit dem Volumen nach Abschluss der Präparation vergleichbar (Tabelle 1). Betrachtet man das Lungenvolumen, so dürften die „exogenen“ Einflüsse der chemischen Fixierung einerseits (Schrumpfungstendenz) und der „intrinsische“ Effekt des Lungengewebes (Retraktionstendenz) durch den erzeugten positiven Druck bei der Formalindampffixierung inklusive Gastrocknung weitestgehend kompensiert worden sein. Die Lungenentfaltung wird dabei mit einem physiologischen Medium (Gas) erreicht. Artefakte, die bei der üblichen Flüssigfixierung auftreten, werden vermieden.

Es stellt sich die Frage, ob der Volumenerhalt der Lunge während der Präparation mit dem Erhalt der Abmessungen des Alveolarraums gleichzusetzen ist.

Einige Autoren (Forrest 1970; Bachofen et al. 1987) gehen davon aus, dass die Zunahme des Lungenvolumens durch die Zunahme der Ausdehnung der Alveolen erreicht wird. In diesem Falle sind keine wesentlichen Änderungen des Lungenvolumens erlaubt.

Eine alternative Vorstellung ist die Volumenzunahme über die Rekrutierung nicht belüfteter Alveolen. In diesem Fall ist die Ausdehnung der einzelnen Alveolen über einen größeren Bereich des Lungenvolumens relativ konstant. Diese schon von Radford (1962) aufgestellte Hypothese einer Lungenvolumenzu- und -abnahme durch eine Rekrutierung und Derekrutierung von Alveolen wird durch mehrere Arbeiten gestützt: Carney et al. (1999) zeigen durch *in vivo*-Mikroskopie von Hundelungen unter mechanischer Beatmung, dass der Wechsel der Lunge vom kollabierten Zustand bis zu 80 % ihrer Totalkapazität mit

einer nur minimalen Zunahme des Alveolardurchmessers bei signifikanter Zunahme der Alveolenanzahl einhergeht. Die Untersuchungen wurden an subpleuralen Alveolen durchgeführt. Der Beschränkung dieser Studie auf lediglich periphere pulmonale Regionen begegnen Smaldone et al. (1983): Durch die Füllung exstirpierter Hundelungen mit monodispersen Aerosol und Bestimmung der Verteilung bei „Atemstopp“ lässt sich die Hypothese der Rekrutierung / Derekrutierung an der gesamten Lunge bestätigen.

Da das Lungenvolumen während der Präparation konstant bleibt, gehen wir davon aus, dass sich die Alveolarabmessungen nicht wesentlich verändert haben.

### 4.3 Präparation der Gewebeproben

#### 4.3.1 Kontrastierung

Das Haupthindernis der mikrotomographischen Bildgebung der Alveolararchitektur ist der unzureichende Röntgenkontrast des Lungengewebes.

Abbildung 45 zeigt beispielhaft das Mikrotomogramm einer Lungenprobe nach alleiniger Formalinfixierung. Größere Strukturen wie Bronchien und Gefäße sind erkennbar. Dagegen besitzen die dünnen Alveolarwände keinen ausreichenden Kontrast und sind nicht abgrenzbar. Um sie sichtbar zu machen, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

Eine Möglichkeit besteht in der **Verkleinerung der Proben** (Abb. 46). Dadurch lässt sich eine stärkere Vergrößerung mit verbesserter Auflösung erzielen. Eine verlässliche Gewebevermessung wie auch eine sinnvolle dreidimensionale Rekonstruktion setzt eine ausreichende Probengröße voraus. So liegt die Größe des pulmonalen Acinus bei einem Durchmesser von etwa 2 bis 8 mm (Raskin 1982; Sapoval et al. 2002). Dieses ist bei der Wahl der Probengröße zu berücksichtigen.

Die andere Möglichkeit besteht in der Anhebung des Röntgenkontrasts des Lungenparenchyms und insbesondere der Alveolarwände durch das Einbringen eines **Kontrastmittels**.

Erste Versuche wurden mit Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) als Kontrastmittel und anschließendem vorsichtigem Zentrifugieren zur Entfernung überschüssigen Silbernitrats aus den Lufträumen unternommen (Watz et al. 2005). Mit dieser Methode konnte allerdings keine homogene Kontrastierung des Lungengewebes erreicht werden. Die Zentrifugation führt zu einer Deformierung der Alveolarstruktur mit konsekutiver Beeinflussung morphometrischer Analysen.

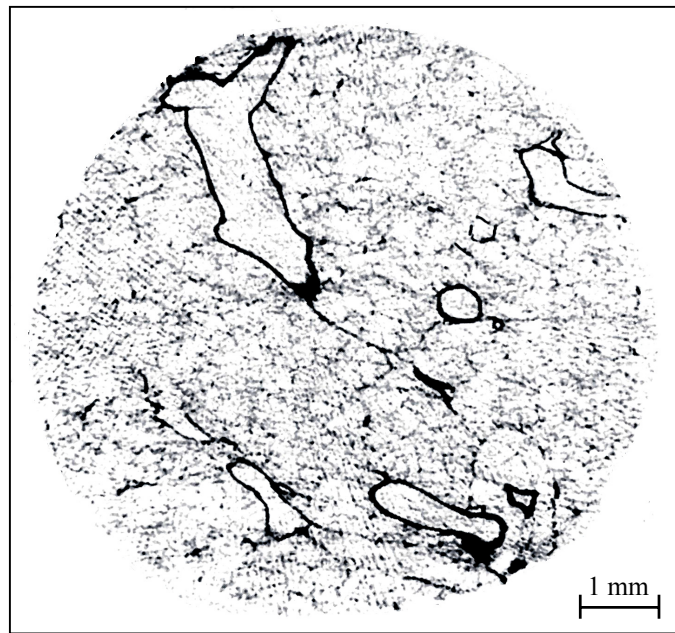


Abb. 45: Mikrotomogramm eines formalindampffixierten unkontrastierten Gewebezylinders. Erkennbar sind die Wände größerer Gefäße und Bronchialstrukturen. Die Alveolarwände sind nicht abgrenzbar. Der Versuch ihrer Visualisierung verstärkt lediglich das Rauschen.

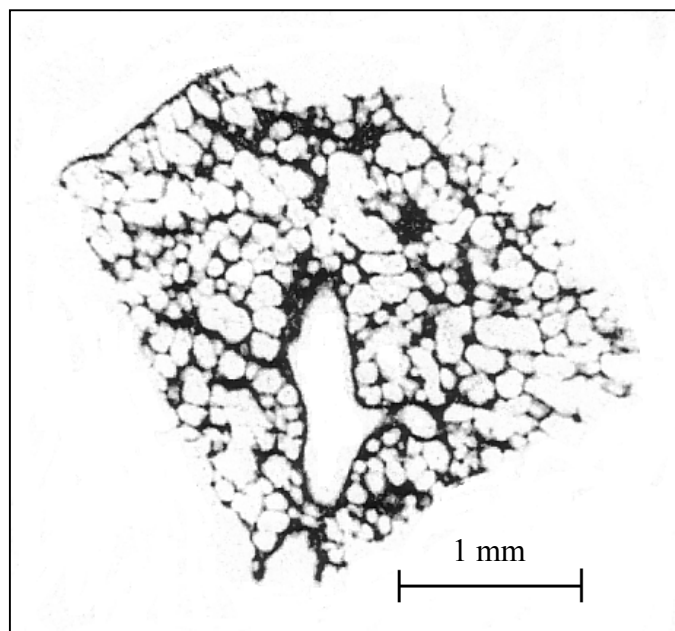


Abb. 46: Mikrotomographisches Schnittbild einer kleinen unkontrastierten Gewebeprobe. Die Probenverkleinerung ermöglicht eine stärkere Vergrößerung. So ist eine Darstellung der feinen Alveolarwände möglich.

Deshalb wurde Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) als Röntgenkontrastmittel ausgewählt. Die Substanz wird seit ihrer Einführung in den 50er Jahren in der Elektronenmikroskopie als Fixations- und Kontrastmittel eingesetzt (Palade 1952).

Mit seiner Ordnungszahl von 76 besitzt Osmiumtetroxid eine hohe Röntgendichte.

Ein besonderer Vorteil der Substanz ist, dass sie nicht nur den Röntgenkontrast anhebt, sondern auch fixierend wirkt (Bozzola und Russell 1991).

Osmiumtetroxid lagert sich als Schwermetall in Gewebe ein. Dabei reagiert es als starkes Oxidationsmittel mit verschiedenen Molekülgruppen. Besonders bedeutsam ist die Reaktion von Osmiumtetroxid an den Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren von Lipiden der Zellmembran (Adams 1960; Komorowska et al. 1982; Behrman 1983). An diesen Doppelbindungen kommt es zur Ausbildung von Mono- und Diestern der Osmiumsäure, die zu einer Vernetzung und Stabilisierung benachbarter Zellmembranbestandteile führt.

Die gute Strukturhaltung von Osmiumtetroxid wurde schon 1927 von Strangeways und Canti bei lichtmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen.

Die Verwendung von Osmiumtetroxid als 1%-ige wässrige Lösung wird als optimal angesehen (Plattner 1971; Schiechl 1974). Eine Erhöhung der Konzentration steigert weder die Fixations- noch die Penetrationsrate (Schiechl 1974). Auch die gewählte Fixierungsdauer von drei Stunden entspricht der in der Literatur empfohlenen. Nach Bahr (1955) ist die Osmiumaufnahme in die meisten Säugetiergewebe nach zwei bis vier Stunden abgeschlossen. Schiechl (1968) gibt eine Zeit von zwei Stunden an, nach der die für die Fixierung bedeutsamen chemischen Reaktionen abgelaufen sind. Nach dieser Zeit hat das Osmiumtetroxid mit seiner im Vergleich zu anderen Fixantien geringen Eindringungsgeschwindigkeit die Gewebeproben vollständig kontrastiert.

Die Osmierung wurde nach der Formalinfixierung durchgeführt. Es muss also sichergestellt sein, dass sich beide Verfahren nicht negativ beeinflussen.

Das Gegenteil ist der Fall. In der Elektronenmikroskopie wird die fixierende Wirkung des Osmiumtetroxids in der so genannten Mehrfachfixation genutzt. Nach einer Vorfixierung mit einem Aldehyd wird mit Osmiumtetroxid nachfixiert (Hayat 1981). Diese Technik wurde sowohl zur lichtmikroskopischen (Oldmixon et al. 1985) als auch zur elektronenmikroskopischen Untersuchung (Weiss und Burri 1996) pulmonaler Strukturen eingesetzt.

Der Vorteil dieser Doppelfixierung ist chemisch begründet und basiert auf den verschiedenen Angriffspunkten der Fixantien. Formaldehyd stabilisiert vor allem Gewebseiweiße, während  $\text{OsO}_4$  mit Lipiden reagiert (Plattner 1971). Aufgrund der schnelleren Penetrationsfähigkeit der Aldehyde wird primär eine Aldehydfixierung durchgeführt. In einem zweiten Schritt wird wie bei unserer Präparation  $\text{OsO}_4$  als so genanntes Sekundärfixans eingesetzt.

Darüber hinaus wirkt die Osmierung der Extraktion von Lipidkomponenten durch organische Lösungsmittel entgegen (Bell 1983; Bozzola und Russell 1991), die im weiteren Verlauf der Präparation (Entwässerung) verwendet werden. So konnte Boyde (1978) mithilfe rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen feststellen, dass osmierte Zellen bei Entwässerung und Trocknung weniger schrumpfen als nicht osmierte.

Nach der Färbung muss überschüssiges Osmiumtetroxid aus dem Alveolarraum entfernt werden. Dazu muss das Wasser den wabigen, septierten Alveolarraum durchdringen. Dieses wird mechanisch durch Rotation der Proben erreicht. Die räumliche Stabilität der fixierten Proben führt zu keiner Deformierung. Die osmotische Unempfindlichkeit des Gewebes nach der Osmierung (Wangensteen et al. 1981; Bozzola und Russell 1991) ermöglicht ein Waschen der Gewebeproben in Reinstwasser ohne Störung der Alveolararchitektur.

#### **4.3.2 Trocknung inklusive chemischer Entwässerung**

Der aufwendigste und kritischste Schritt der Probenpräparation ist die Entfernung der Flüssigkeit aus dem Alveolarraum.

Verbleibt Flüssigkeit im Luftraum der Alveolen, werden die Alveolarsepten maskiert (Abb. 47 a). Die Entfernung der Flüssigkeit führt zu einer deutlichen Verbesserung des Röntgenkontrasts des Lungengewebes (Abb. 47 b). Die Proben müssen daher vollständig getrocknet werden. Auch sind nur trockene Proben auf Dauer räumlich stabil und für die mikrotomographischen Untersuchungen geeignet. Werden feuchte Proben mit dem Mikrotomographen untersucht, ist aufgrund der thermischen Belastung durch Röntgenstrahlung eine unkontrollierte (Luft-)Trocknung und damit verbundene Gewebedeformierung während des Messvorgangs möglich.

Die Trocknung – beziehungsweise die Wahl des Trocknungsverfahrens – bestimmt ganz wesentlich den Erhalt der räumlichen Struktur. Dieses ist besonders bedeutsam bei fragilem, instabilem Gewebe. Gefordert wird also ein Verfahren, das einerseits die

Flüssigkeit vollständig aus dem Alveolarraum entfernt und andererseits die räumliche Struktur des Gewebes nicht verändert.

Das einfachste Trocknungsverfahren ist die **Lufttrocknung**. Der Vorgang dauert jedoch selbst bei kleinen Gewebeproben lange und führt zu keinem homogenen Ergebnis. Außerdem treten bei der Verdunstung von Flüssigkeiten Oberflächenspannungen auf, die regelhaft zu Strukturveränderungen und Gewebedeformierungen führen (Fromme und Pfautsch 1975). Ein Trocknen der Präparate aus wässrigem Milieu führt zu besonders großen strukturellen Alterationen, da die Oberflächenspannung von Wasser – verglichen mit anderen Flüssigkeiten – besonders hoch ist. Bei Lungengewebe ist die Lufttrocknung also nicht besonders geeignet.

Die **Vakuumtrocknung** ist eine Form der Lufttrocknung, bei der die Trocknungszeit physikalisch verkürzt wird. Hier macht man sich die Druckabhängigkeit des Siedepunkts von Wasser zunutze. Bei Unterdruck beginnt Wasser bei niedrigeren Temperaturen zu sieden und zu verdampfen. Die Trocknung wird so beschleunigt. Die prinzipiellen physikalischen Probleme der Lufttrocknung bleiben jedoch bestehen. Abbildung 46 a zeigt exemplarisch das Mikrotomogramm eines vakuumgetrockneten Lungenzylinders: Die Trocknung ist unvollständig. Es sind Gewebedeformierungen vor allem an der Probenoberfläche zu erkennen.

Eine weitere Variante der Lufttrocknung besteht in der Verwendung von **Flüssigkeiten mit niedriger Oberflächenspannung**. Dazu muss Wasser gegen geeignete Flüssigkeiten (wie Ethanol, Chloroform, Ethylether, Freon) ausgetauscht werden. Die anschließende Lufttrocknung bringt nach Klein und Stockem (1976) befriedigende Ergebnisse bezüglich des Strukturerhalts. Auch dieses Trocknungsverfahren ist jedoch als nicht optimal zu werten und gehört nicht zu den standardmäßig angewandten Trocknungsverfahren.

Eine Trocknung, bei der das Auftreten von Oberflächenspannungen weitgehend vermieden wird, ist die **Kritisch-Punkt-Trocknung**. Als technisch aufwendigeres Verfahren wurde sie bereits 1951 von Anderson entwickelt.

Das Verfahren hat sich als Standardtrocknung biologischer Proben in der Rasterelektronenmikroskopie (also einer Bildgebung zur räumlichen Oberflächendarstellung) etabliert (Boyde und Maconnachie 1983; Bozzola und Russell 1991).

Der Methode liegt das Prinzip einer Trocknung jenseits des kritischen Punkts zugrunde. Mit dem kritischen Punkt (definiert durch eine flüssigkeitsspezifische Temperatur und den dazugehörigen Druck) endet die Phasengrenze zwischen dem flüssigen und gasförmigen Aggregatzustand (siehe Abb. 7). Oberhalb des Punkts existiert die Phasengrenze nicht mehr: die Flüssigkeit wechselt dann schlagartig in den gasförmigen Zustand. Da im Gegensatz zu den herkömmlichen Trocknungsverfahren keine Oberflächenspannungen auftreten, ist eine besonders gewebeschonende Trocknung biologischer Proben unter Erhalt ihrer Gewebearchitektur (Gusnard und Kirschner 1977; Bozzola und Russell 1991) möglich (Abb. 47 b).

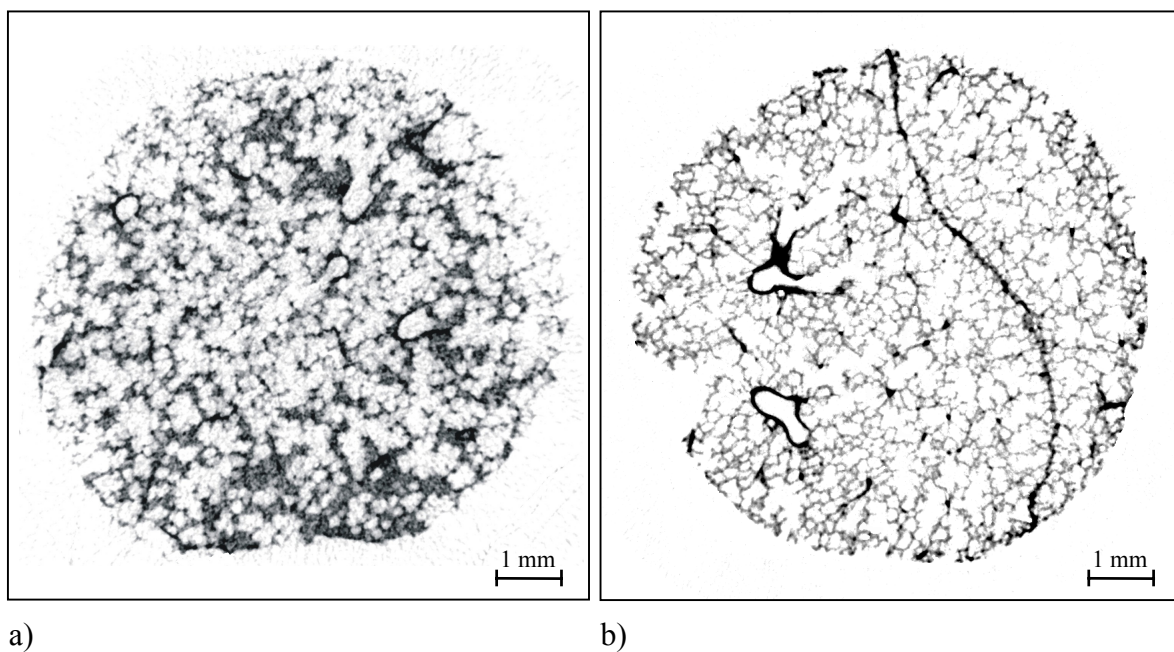


Abb. 47: *Auswirkung des Trocknungsverfahrens osmierter Proben. Nach der Vakuumtrocknung (a) wurde die Flüssigkeit nicht vollständig aus dem Luftraum entfernt. Es zeigen sich Gewebedeformierungen. Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung (b) ist das Objektwasser vollständig und strukturerhaltend entfernt. Die Detailerkennung ist deutlich verbessert.*

Aus physikalischen Gründen ist diese Trocknungsmethode zur Entfernung von Wasser nicht geeignet. Der kritische Punkt von Wasser liegt mit einer Temperatur von 374 °C und einem Druck von 220 bar sehr hoch. Unter diesen Bedingungen kommt es zwangsläufig zur Zerstörung jedes biologischen Gewebes (Fromme und Pfautsch 1975).

Daher ersetzte bereits Anderson (1951) das Gewebewasser durch flüssige Kohlensäure. Deren kritischer Punkt liegt mit 31 °C und 73,8 bar niedrig und ist biologisch verträglich sowie technisch einfacher zu realisieren.

Da sich das Gewebewasser im Präparat mit flüssiger Kohlensäure nur schlecht mischt, muss es zunächst durch ein anderes Medium substituiert werden.

Hierzu entwickelten Muller und Jacks eine chemische Entwässerung mit angesäuertem 2,2-Dimethoxypropan (= DMP; Muller und Jacks 1975; Conway und Kiernan 1999). Dieses reagiert mit dem Objektwasser. In einer endothermen Reaktion wird DMP zu Azeton und Methanol hydrolysiert. Dabei konnten Muller und Jacks (1975) den vollständigen Erhalt sogar subzellulärer Strukturen verschiedener tierischer Gewebe nach Entwässerung mit DMP demonstrieren. Maser und Trimble (1977) wandten dieses Entwässerungsverfahren erstmalig im Rahmen einer Kritisch-Punkt-Trocknung an. Günstig ist die Tatsache, dass DMP mit flüssigem CO<sub>2</sub> mischbar ist. So ist es als Zwischenmedium geeignet. Die in DMP befindlichen Gewebeproben können direkt der Kritisch-Punkt-Trocknung zugeführt werden. Dabei sollten sie nicht mehr mit Luft in Kontakt kommen, um ein Antrocknen der Objekte (welches bereits zu einer Veränderung des Gewebes führen kann) zu vermeiden. Im Kritisch-Punkt-Trockner selbst ist auf ein ausreichend langes Intervall zwischen den Austauschmanövern von DMP gegen flüssige Kohlensäure zu achten. Der Medien austausch in den Proben beruht auf Diffusion und nimmt gerade bei der Größe der Lungenzylinder einige Zeit in Anspruch.

Die Temperatur in der Druckkammer liegt beim Erwärmen höher, als es für das Erreichen des kritischen Punkts notwendig wäre (42 °C versus 31 °C). Diese Temperaturreserve wird benötigt, da es beim Druckablassen aus der Kammer zu einer Abkühlung kommt. Beim Unterschreiten des Kritischen Punkts kann es zu einer Kondensation des CO<sub>2</sub> mit Feuchtigkeitseffekten kommen (Fromme und Pfautsch 1975; Bozzola und Russell 1991). Auch besteht ein Risiko von Feuchtigkeitseffekten am Objekt durch eine zu schnelle Dekompression, die unbedingt zu vermeiden ist.

Die getrockneten Präparate sind stark hygroskopisch und müssen daher feuchtigkeitsgeschützt aufbewahrt werden.



### 4.3.3 Verhalten der Gewebezylinder im Präparationsverlauf

Die zur Kontrastierung, chemischen Entwässerung und Trocknung angewandten Methoden sind Standardtechniken der Elektronenmikroskopie. Dort müssen sie den hohen Anforderungen der Erhaltung von Gewebestrukturen bis in den subzellulären Bereich genügen. So finden sich in der Literatur Arbeiten, die sich immer wieder kritisch mit den Aspekten Strukturerhaltung, mögliche Artefakte und ihre Auswirkungen auf das Gewebe (inklusive quantitativer Angaben) auseinandersetzen. Für die mikrotomographischen Untersuchungen der Lunge existieren vergleichbar hohe Ansprüche an die Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials.

An dieser Stelle sei nochmals betont, dass jede Gewebepreparation zu Änderungen der Gewebestruktur führt. Bereits der präparatorische Charakter einer noch so gewebeschonenden Methodik steht der vollständigen Wiedergabe der intravitalen Bedingungen entgegen. *Keine* der bekannten Fixations- und Präparationstechniken ermöglicht ein perfektes Abbild der Pulmonalstrukturen in ihrem „wahren“ Zustand (Bachofen et al. 1982). Es bleibt bei der Erzeugung eines Äquivalenzbildes.

Die Kritisch-Punkt-Trocknung ist eine Prozedur, die unter standardisierten, reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt wird. Die Gewebestruktur und die morphologischen Details bleiben erhalten (Gusnard und Kirschner 1977). Allerdings treten auch bei diesem Trocknungsverfahren Objektschrumpfungen auf.

Für die Schrumpfung wurden anfangs die vorausgehende Fixierung (Ulmer und Honjo 1973) und die Entwässerung (Boyde 1972) verantwortlich gemacht. Erst spätere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei der Kritisch-Punkt-Trocknung selbst Gewebeschrumpfungen auftreten (Boyde et al. 1977; Boyde und Maconnachie 1981). Deren Ausmaß ist, wie nicht anders zu erwarten, gewebeabhängig. Bei Nervengewebe liegt die Schrumpfung bei 10-15 %, bei Embryonalgewebe kann sie bis zu 60 % betragen (Boyde und Maconnachie 1981). Literaturangaben zum Verhalten des Lungengewebes bei der Kritisch-Punkt-Trocknung oder der DMP-Entwässerung ließen sich nicht finden.

Für die morphometrische Analyse bedeutsam ist die Gewebeschrumpfung, die je nach verwendetem Entwässerungsmittel unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Boyde et al. 1977). Es gibt keine Möglichkeit, diese vollständig zu verhindern (Bell 1983). Bei der Untersuchung ganzer Zellen kann Boyde (1978) allerdings feststellen, dass eine vorangehende Osmierung den Grad der Schrumpfung bei Entwässerung und Trocknung reduziert.

In unserer eigenen Serie zeigte sich eine Schrumpfung der Gewebezylinder nach Durchlaufen der Präparation. Der Probendurchmesser hatte sich nach der Kritisch-Punkt-Trocknung durchschnittlich um 10,4 % reduziert (Tabelle 2). Da die Gewebeproben ihre zylindrische Form bewahren und auch im mikrostrukturellen Bereich keine Deformationen zu beobachten sind, gehen wir von einer gleichmäßigen Schrumpfung aus. Die anzunehmende Wahrung der Strukturverhältnisse ist für rein deskriptive Untersuchungen daher weniger bedeutend. Für die stereologischen Untersuchungen ist allerdings die Einführung eines Korrekturfaktors notwendig, der sich leicht bestimmen lässt. Er ergibt sich aus dem Verhältnis der mittleren Zylinderdurchmesser vor und nach der Präparation (Tabelle 2: 8,17 mm / 7,32 mm) und beträgt demnach 1,11.

Ebenfalls signifikant ist die Gewichtsveränderung der Gewebezylinder während der Präparation. Die aus den formalinfixierten Lungen entnommenen Gewebezylinder weisen noch eine geringe Restfeuchtigkeit auf. Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung ist das Gewebe vollständig trocken. Die Gewichtsreduktion um durchschnittlich 37,5 % (Tabelle 2) ist als Maß für den Flüssigkeitsverlust des Gewebes anzusehen.

## 4.4 Mikro-Computertomographie

### 4.4.1 Systeme

Die Mikro-Computertomographie ist ein relativ junges, rein experimentelles radiologisches Bildgebungsverfahren. Mit ihrer hohen Auflösung fungiert sie als Bindeglied zur Histologie. Seit der Entwicklung des ersten Mikrotomographen von Elliott und Dover 1982 sind bereits unterschiedliche Systeme entwickelt worden.

Der erste Mikrotomograph basiert auf den Prinzipien der konventionellen Computertomographie. Hinsichtlich seiner Komponenten ist er mit dem Urtyp des medizinischen Computertomographen von Godfrey Hounsfield (1973) vergleichbar. Er arbeitet mit einem 15 µm-Kollimator zur Begrenzung der emittierten Röntgenstrahlung auf einen feinen Strahl (= Nadelstrahlgeometrie). Dieser durchdringt das Objekt und trifft auf einen Szintillationszähler. Zur Erstellung eines zweidimensionalen Bildes wird die Probe gedreht („Rotation“) und im Strahl verschoben („Translation“). Daher werden die nach diesem Prinzip arbeitenden Mikrotomographen auch als Translations-Rotations-Scanner bezeichnet. Bereits bei den ersten Geräten konnte eine Auflösung von 12 µm erzielt werden. Allerdings ließen sich nur Objekte bis zu einer Größe von 1 mm untersuchen.

Eine Weiterentwicklung stellen die Systeme mit Fächerstrahlgeometrie dar (Seguin et al. 1985). Durch den Einsatz eines Schlitz-Kollimators wird fächerförmige Röntgenstrahlung erzeugt, die auf einen Zeilendetektor trifft. Mit den Mikrotomographen dieser Generation ist eine deutlich schnellere Datenerhebung möglich (Davis und Wong 1996).

Der von uns eingesetzte Mikrotomograph gehört der nächsten Gerätegeneration an. Diese basiert auf Kegelstrahlgeometrie. Der kegelförmige Röntgenstrahl durchdringt das Objekt und trifft nach seiner Schwächung auf einen Flächendetektor (Abb. 8). Die Probe rotiert in Winkelschritten. Nach jedem Winkelschritt wird eine zweidimensionale Projektion des gesamten Objekts in Form eines Schattenbildes erzeugt. Aufgrund der kegelförmigen Röntgenstrahlung und dem Flächendetektor ist es möglich, aus dem Satz erzeugter Röntgenaufnahmen ein dreidimensionales Bild der Probe zu rekonstruieren (Feldkamp et al. 1984). Die Datenakquisition ist bei Kegelstrahl-Systemen schneller als bei den vorangegangenen Geräten. Andererseits fallen große Datenmengen an. Der Rekonstruktionsalgorithmus der Kegelstrahlgeometrie ist komplexer als bei Fächerstrahlgeometrie (Davis und Wong 1996).

Mit Mikrotomographen lässt sich je nach Probengröße eine Auflösung von 5-50  $\mu\text{m}$  erzielen. Die maximale Auflösung medizinischer Computertomographen liegt bei etwa 250  $\mu\text{m}$  und einer Schichtdicke von etwa 0,5 mm. Die Lichtmikroskopie besitzt eine höhere Auflösung als diese radiologischen Verfahren. Ihre Auflösung liegt bei 0,5-5  $\mu\text{m}$  (Engelke und Kalender 1998; Engelke et al. 1999).

#### 4.4.2 Untersuchung der Lungenzylinder

Die Auflösung des mikrotomographischen Systems hängt von der Brennfleckabmessung und der Detektorauflösung ab (Paulus et al. 2000). In Abhängigkeit von der Positionierung der Probe zwischen Strahlenquelle und Detektor kann man eine (geometrische) Vergrößerung und eine höhere Auflösung erreichen. Vergrößerung und Probendurchmesser verhalten sich dabei umgekehrt proportional. Bei dem gewählten Durchmesser der Lungenproben von 8 mm ergibt sich eine Vergrößerung von 27,5. Die Voxelgröße beträgt 9  $\mu\text{m}$ , die Auflösung (entsprechend der doppelten Voxelgröße) liegt bei 18  $\mu\text{m}$ .

Zur bestmöglichen Darstellung des Lungengewebes wurden die Geräteeinstellungen wie folgt optimiert: Es wurde die maximale Bildmatrix (1024 x 1024 Pixel) benutzt. Zudem wurden so genannte isometrische Datensätze mit kubischen Voxeln gewonnen. So kommt es zu keiner Reduktion der Auflösung bei der Rekonstruktion in verschiedenen Ebenen. Die Wahl der kleinstmöglichen Rotationsschritte ( $0,45^\circ$ ) während des Scanvorgangs verbessert ebenfalls die Bildqualität. Aus diesem Optimierungsschritt ergeben sich allerdings auch Nachteile. So verlängert sich die Messzeit und erhöht sich die Datenmenge. Aufgrund der Kegelstrahlgeometrie des Systems lassen sich aus dem Rohdatensatz zweidimensionale Grauwertbilder mit einem modifizierten Feldkamp-Algorithmus berechnen (Feldkamp et al. 1984). Er stellt bei Geräten mit Kegelstrahlgeometrie das am häufigsten eingesetzte Rekonstruktionsverfahren dar (Johnson et al. 1998).

## 4.5 Qualitative Schnittbeurteilungen – Bildpaarvergleich

Bei der zweidimensionalen mikrotomographischen Untersuchung wird unter Verwendung der Voxelgröße von 9  $\mu\text{m}$  mit resultierender hoher Ortsauflösung (18  $\mu\text{m}$ ) eine der Lichtmikroskopie vergleichbare Darstellung des Alveolarraums ermöglicht.

Mit der Mikrotomographie gelingt die realitätsgetreue Abbildung von feinen Lungenstrukturen wie Interlobularsepten, Gefäßen und kleineren Luftwegen bis zu den einzelnen Alveolarwänden (Abb. 19, 20).

Verglichen mit den korrespondierenden histologischen Bildpaaren ergibt sich eine hohe Übereinstimmung (Abb. 22-24 und 28).

Eine absolute Deckungsgleichheit der Schnittbilder lässt sich jedoch nicht erreichen. Einerseits führen bereits geringe Winkelabweichungen der Schnittebenen beider Verfahren zu deutlichen Abweichungen der Bildelemente im Mikrometerbereich. Um dieses geometrische Problem zu minimieren, wurde die mikrotomographische Schnittebene dem jeweiligen histologischen Schnitt interaktiv angepasst (siehe Kap. 2.12; Abb. 10). Andererseits liegen zwischen mikrotomographischer und lichtmikroskopischer Abbildung zusätzliche Präparationsschritte. Zur Erzeugung histologischer Schnitte wurden die Proben nach der mikrotomographischen Untersuchung in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Jeder dieser zusätzlichen Präparationsschritte kann zu Gewebealterationen führen.

So sind in den Abbildungen 22 und 23 im histologischen Schnitt Entrundungen zu erkennen, die in den korrespondierenden mikrotomographischen Schnitten nicht nachweisbar sind. In den Abbildungen 24 und 28 verlaufen die Interlobularsepten in den histologischen Abbildungen wellig, in den korrespondierenden Mikrotomogrammen dagegen gestreckt. Dieser wellige Verlauf setzt sich bis zu den Alveolarsepten fort (Abb. 27). Ähnliche Veränderungen lassen sich auch bei größeren, stabileren Strukturen nachweisen. So wird die Deformierung der Bronchialstruktur im histologischen Schnittbild in 12-Uhr-Position (Abb. 28 oben) beim direkten Vergleich mit dem Mikrotomogramm (Abb. 28 unten) deutlich.

Es ist zu vermuten, dass es sich um Gewebedeformierungen handelt, die durch die histologische Präparation verursacht werden.

Der Vergleich mit der Histologie zeigt, dass die Mikro-CT die Gewebestruktur realitätsgetreu abbildet. Die Gewebeklassifikation, also die Differenzierung verschiedener Zelltypen, ist im Gegensatz zur Histologie nicht möglich.

## 4.6 Verluste – Artefakte (Mikro-CT / Histologie)

Eine wesentliche Eigenschaft radiologischer Verfahren ist ihre nichtdestruktive Bilddarstellung. So treten bei der mikrotomographischen Bildgebung keine strukturellen Gewebeveränderungen auf.

Die Mikro-CT stellt beim Erzeugen eines kontinuierlichen Datensatzes ein zeiteffizientes Verfahren dar. Die Datenakquisition für 900 kontinuierliche Schnittbilder eines Lungenzylinders beträgt etwa 2 Stunden. Der histologische Schneideprozess gestaltet sich demgegenüber bedeutend zeitaufwendiger (8 Stunden für 135 Schnitte je Probe). Wegen des Arbeitsaufwands wurden die histologischen Präparate nicht kontinuierlich aufgearbeitet, sondern sequenzielle Serienschritte gewonnen – mit konsekutiv geringerer Schnittausbeute.

Auch die Anzahl der mikrotomographisch erzeugten Bilder weicht vom theoretischen Wert von 1111 Schnitten pro Lungenzylinder (Probenhöhe 1 cm = 10.000 µm, Schichtdicke 9 µm) ab. Dies ist auf die Begradigung der Böden der Gewebezylinder (Kap. 2.8) und den daraus resultierenden Gewebeverlust zurückzuführen. Die Nivellierung war erforderlich, um die Probenzylinder auf dem Probenhalter platzieren und ausrichten zu können.

### 4.6.1 Artefakte in der Mikro-CT

Nur 2,1 % der mikrotomographischen Schnittbilder sind aufgrund von Strahlungsartefakten nicht beurteilbar – zumeist handelt es sich dabei um **Aufhärtungsartefakte** (Tabelle 3; Abb. 29).

Röntgenstrahlung setzt sich aus einem Spektrum hoher und niedriger Energien zusammen. Trifft die Röntgenstrahlung auf Regionen hoher Osmiumeinlagerung, werden die niederenergetischen Anteile der Strahlung absorbiert. Der Anteil höherer Energie nimmt relativ zu – die Strahlung wird aufgehärtet. Die Aufhärtung findet besonders in Bereichen dicker Bronchial- und Gefäßwände als Orte hoher Osmiumeinlagerung statt. Die Aufhärtungsartefakte führen zu einer Überlagerung des Parenchyms und stören die morphometrische Untersuchung.

Die Strahlenaufhärtung ist auch in der konventionellen Computertomographie in Regionen hoher Röntgendichte (etwa bei Metallimplantaten – Gelenkersatz oder Osteosynthesematerial) zu beobachten (Duerinckx und Macovski 1978). Hier existieren Korrekturalgorithmen, die auch in der Mikro-CT zur Anwendung kommen (De Paiva et al.

1998). Über die eingesetzte „beam hardening correction“ kann die Strahlenaufhärtung jedoch nur reduziert werden. Ihre komplette Eliminierung ist kaum möglich (Paulus et al. 2000).

Ein weiteres, rein geometrisches Artefakt der Computertomographie ist der **Partialvolumeneffekt**. Bei kleinen Strukturen muss bedacht werden, dass in jedem Volumenelement Partikel verschiedener Dichte enthalten sein können. Der CT-Wert entspricht aber der mittleren Dichte aller im Voxel befindlichen Partikel. Füllt eine Alveolarwand das Volumenelement nur partiell und nicht vollständig aus, beeinflusst sie die mittlere Dichte nur wenig und kann so dem Nachweis entgehen (siehe Abb. 47). Letztlich kann der Partialvolumeneffekt nur über eine Verringerung der Schichtdicke (genauer: der Voxelgröße) reduziert werden.

#### 4.6.2 Artefakte in der Histologie

Im Gegensatz zur Computertomographie werden histologische Schnitte durch ein destruktives Verfahren gewonnen, bei der die Gewebeintegrität unwiederbringlich verloren geht.

Etwa zwei Drittel aller histologischen Schnitte zeigen strukturelle Veränderungen, die zu einer Architekturveränderung des Gewebes führen (Tabelle 3). Sie resultieren aus den Artefakten durch die mechanischen Prozesse des Einbettens, Schneidens und Aufziehens (Fukaya und Martin 1969; Lum und Mitzner 1985). Aufgrund der Labilität der Lunge finden sie sich hier besonders ausgeprägt (Hartroft 1945).

Bei dem überproportional hohen Anteil struktureller Veränderungen ist zu berücksichtigen, dass unsere histologische Präparation von der Standardpräparation (Romeis 1989) abweicht.

Die Paraffineinbettung wurde für Lungengewebe optimiert: Bei der üblichen Paraffineinbettung unter Normaldruck wird das Lungengewebe nicht homogen vom Paraffin durchdrungen. Es verbleiben kleine Luftblasen im Alveolarraum, die eine Gewebeerreißung beim Schneiden verursachen. Durch die Einbettung im Unterdruck wird das Auftreten von Gaseinschlüssen im Lungengewebe reduziert.

Außerdem wurde die histologische Schnittdicke mit 8  $\mu\text{m}$  der Schichtdicke der Mikrotomogramme (9  $\mu\text{m}$ ) angepasst. Sie ist damit doppelt so dick wie die übliche Schnittdicke der Histologie, welche bei 4  $\mu\text{m}$  liegt.

Die histologischen Schnitte wurden auch nicht der üblicherweise eingesetzten Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen (Romeis 1989).

Die aus den durchgeführten Kontrastierungs- und Entwässerungsschritten resultierende Gewebehärtung wird als vorteilhaft für den Schneideprozess von Lungen gewertet (Oldmixon et al. 1985). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich ein verändertes Schneideverhalten im Vergleich zu den üblicherweise hergestellten Präparaten ergibt. Beispielsweise ist eine schnellere Messerabstumpfung durch die Metalleinlagerung in das Gewebe (Osmierung) möglich. Außerdem ist eine erhöhte Fragilität des gehärteten Pulmonalgewebes denkbar.

Die genannten Abweichungen zur histologischen Standardpräparation erklären zumindest zum Teil die hohe Zahl struktureller Gewebeveränderungen. Selbst bei großer Erfahrung in geübter Hand lassen sich strukturelle Störungen präparationsbedingt nicht vermeiden.

Die histologische Präparation erfolgte unter Anleitung einer erfahrenen MTA aus dem anatomischen Institut. Die kritischsten Arbeitsgänge für den Erhalt der Gewebestruktur (das Schneiden und Aufziehen der Präparate auf den Objektträger) wurden von der geübten MTA durchgeführt.



## 4.7 Morphometrische Analysen

Neben der reinen Abbildung des Lungengewebes muss die neue Bildgebung in der Lage sein, valide Messungen durchzuführen.

Die Gewinnung quantitativer Messdaten der terminalen Lufträume erfolgte bislang unter Nutzung stereologischer Verfahren an histologischen Schnittpräparaten. Sie stellen bis heute den Goldstandard bei der morphometrischen Analyse des Lungengewebes dar (Weibel 1989; Bolender et al. 1993; Weibel und Cruz-Orive 1997).

Grundlage einer entscheidenden methodischen Limitation der histologiebasierten Stereologie ist die Erhebung dreidimensionaler Daten durch Vermessungen zweidimensionaler Gewebeschnitte. Die dritte Dimension wird nur indirekt durch eine Extrapolation der gewonnenen Daten aus der zweidimensionalen Schnittebene erfasst (Weibel und Cruz-Orive 1997).

Die Gewebepräparation selbst – die Herstellung histologischer Schnitte – führt zu Veränderungen der Gewebearchitektur und somit zu Veränderungen der Messdaten.

Der kontinuierliche Datensatz der Mikro-CT erlaubt die dreidimensionale Erfassung des Gewebes. Dabei ist die Bildgebung nichtdestruktiv. Bei der Gewebepräparation ist kein mechanischer Schneideprozess erforderlich.

Beim Methodenvergleich Histologie – Mikrotomographie müssen also einerseits unterschiedliche Bilddarstellungen, verbunden mit unterschiedlichen Präparationen, berücksichtigt werden. Andererseits müssen unterschiedliche Messverfahren, nämlich die stereologische Messung an zweidimensionalen histologischen Schnitten und die computergestützte mikrotomographische Auswertung dreidimensionaler Gewebemodelle, verglichen werden.

Um den Einfluss der unterschiedlichen Gewebepräparationen abzuschätzen, wurde die klassische stereologiebasierte Messung sowohl in den histologischen als auch in den mikrotomographischen Schnitten durchgeführt. Es wurde also die gleiche etablierte Messmethode in beiden Bilddarstellungen angewandt.

Zur Überprüfung der Verlässlichkeit der neuen computergestützten Auswertung der Mikro-CT wurden die mikrotomographischen Datensätze zweimal vermessen: So wurde erst die semiautomatische computergestützte Analyse und anschließend die stereologische Messung durchgeführt (Abb. 21).

#### 4.7.1 Alveoläre Oberflächendichte

Die alveoläre Oberflächendichte stellt einen grundlegenden physiologischen Parameter der Lunge dar. Multipliziert man die alveoläre Oberflächendichte mit dem Lungenvolumen, kann man die Alveolaroberfläche abschätzen (Bolender et al. 1993; Weibel und Cruz-Orive 1997). Die Alveolaroberfläche stellt neben Kapillardichte und Membrandicke einen der von Weibel (1973) postulierten drei Parameter zur Bestimmung der *Sauerstoffdiffusionskapazität* auf morphologischer Grundlage dar.

In der semiautomatischen mikrotomographischen Analyse können Gewebeoberfläche und Gewebevolumen (der schwarzen Voxel) des binären Gewebemodells direkt bestimmt werden (primäre Parameter). Die alveoläre Oberflächendichte als sekundärer Parameter errechnet sich aus dem Quotienten Gewebeoberfläche / Messvolumen.

Stereologiebasiert wurde die Oberflächendichte am histologischen Schnitt beziehungsweise mikrotomographischen Schnittbild nach Überlagerung eines Testgitters (Bolender et al. 1993; Weibel und Cruz-Orive 1997) gemäß der Formel 3 (Kap. 2.13.2) nach Saltykov (1946) und Bolender et al. (1993) berechnet.

Die Werte für die stereologisch ermittelte Oberflächendichte sind in der Mikro-CT signifikant geringer als in der Histologie (33,47 /mm vs. 35,47 /mm). Dabei korrelieren beide Messungen gut (Tabelle 5; Abb. 32).

Die niedrigeren Werte in der Mikro-CT dürften sich in erster Linie durch die im Vergleich zur Histologie geringere Auflösung des mikrotomographischen Systems erklären.

Um die Verlässlichkeit der Mikro-CT Auswertung zu prüfen, wurden die stereologische Messung und die semiautomatische Analyse der Mikro-CT in denselben Schnitten angewendet und verglichen. Letztere lieferte bezüglich der Oberflächendichte vergleichbare Daten, die jedoch niedriger als die stereologischen Messungen der Mikro-CT liegen (30,49 / mm vs. 33,47 / mm; Tabelle 5; Abb. 34).

Die Werte der Mikro-CT sind also niedriger als die der Histologie. Offensichtlich geht Gewebeoberfläche verloren (oder die Alveolaroberfläche in der Histologie wurde falsch zu hoch bestimmt). Es müssen also Faktoren auftreten, welche die eingangs angesprochenen Vorteile der Mikro-CT aufwiegen.

Die Auflösung der Histologie wird in unseren mikrotomographischen Schnitten nicht erreicht. Obwohl die Grauwertebilder den histologischen Schnitten sehr ähnlich sind, gilt dies nicht für die errechneten Binärbilder. Die kleinste erreichbare Voxelgröße von 9  $\mu\text{m}$

reicht für die Erzeugung eines realistischen binären Gewebemodells nicht aus. So liegt die mittlere Dicke der Alveolarsepten mit etwa 5  $\mu\text{m}$  unterhalb der erreichten Auflösung.

#### **4.7.2 Mittlerer Alveolardurchmesser**

Die histomorphometrische Bestimmung des Alveolardurchmessers mit der Zweipunkt-Streckenmethode basiert auf klassischen morphometrischen Prinzipien (Dunnill 1962; Weibel und Gomez 1962; Weibel 1963 a/b; Weibel 1973; Weibel und Cruz-Orive 1997). Sie ist ein heute noch gebräuchliches Verfahren (Lum und Mitzner 1987; Willet et al. 2001).

Das verwendete „Interaktive Bildanalyse-System“ (IBAS) bei der Analyse der histologischen Schnitte wurde bereits zur Ableitung stereologischer Parameter von Alveolen am lichtmikroskopischen Schnittpräparat eingesetzt (Rigaut et al. 1983).

Der ermittelte mittlere Alveolardurchmesser (Tabelle 6) stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von Lum und Mitzner (1987) überein. Sie erhalten bei ihrer histomorphometrischen Untersuchung an durch bronchiale Formalininstillation entfalteten Schweinelungen einen Alveolardurchmesser von 133  $\mu\text{m}$ .

In der semiautomatischen mikrotomographischen Analyse wurde der Alveolardurchmesser aus volumen- und oberflächenbasierten Primärparametern sekundär kalkuliert. Auch dieses Messverfahren liefert gute Daten. Allerdings musste ein Proportionalitätsfaktor von 6 in die Formel (2) integriert werden (siehe Kap. 7; Anhang A1).

#### **4.7.3 Oberflächendichte und Alveolardurchmesser im Vergleich**

Im Methodenvergleich zeigte der Alveolardurchmesser eine bessere Korrelation als die Oberflächendichte (Kap. 3.7).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Alveolardurchmesser weniger stark von der Auflösung beeinflusst wird.

Bei der Berechnung des Alveolardurchmessers wird das Verhältnis aus Gewebevolumen und Gewebeoberfläche berücksichtigt. Bei der Binarisierung beeinflussen die Auflösung und die Wahl des Schwellenwerts sowohl das Ergebnis der Gewebeoberfläche als auch das des Gewebevolumens. Da beide gleichsinnig beeinflusst werden, wird dies durch den Quotienten Volumen / Oberfläche zum Teil ausgeglichen.

## 4.8 Einflussfaktoren bei der mikrotomographischen Analyse

### 4.8.1 Segmentierung – Schwellenwertwahl und Partialvolumeneffekt

Bei der Binärbilderzeugung stellen die *Segmentierung* und dabei besonders die Wahl des geeigneten *Schwellenwerts* (= Threshold) einen kritischen Schritt dar.

Auch auf dem mikrotomographisch am meisten erforschten osteologischen Sektor ist sie ein noch nicht vollständig gelöstes Problem (Rüegsegger et al. 1996; Ito et al. 1998; Hara et al. 2002).

Die Einstellung des optimalen Schwellenwerts erfolgt interaktiv durch den Untersucher. Dazu wurde das erzeugte Binärbild mit dem korrespondierenden histologischen Schnitt verglichen.

Nach Festlegung eines Schwellenwerts werden Voxel, deren mittlere Dichte oberhalb des Schwellenwerts liegt, schwarz dargestellt und solche, deren mittlere Dichte unter dem Schwellenwert liegt, weiß dargestellt. Der Anteil der schwarzen Voxel repräsentiert das Gewebe, der Anteil der weißen Voxel den Luftraum. Mit Hilfe dieses Schwellenwertverfahrens wird ein dreidimensionales Gewebemodell berechnet, welches dann automatisiert vermessen werden kann.

Die korrekte Binärbilderzeugung setzt voraus, dass eine sichere Diskriminierung zwischen Gewebe (zuvor graue Voxel) und Luft (weiße Voxel) gelungen ist. Innerhalb eines Voxels können jedoch Partikel verschiedener Dichte enthalten sein (also Luft *und* Alveolarwände). Der errechnete CT-Wert stellt immer einen Mittelwert der Dichten aller im Voxel befindlichen Anteile dar. Liegt der Mittelwert der Voxeldichte unterhalb des Schwellenwerts, so wird er mit Luft gleichgesetzt. Der Gewebeanteil des Voxels geht so über die Binarisierung verloren. Aus diesem *Partialvolumeneffekt* resultiert ein Strukturverlust. Der sichtbare Strukturanteil kommt in diesem Voxel nicht mehr zur Darstellung (Abb. 48).

Für die Binarisierung vorteilhaft ist der hohe Gewebe-Luft-Kontrast – er liegt ungefähr bei 10:1.

Die Binarisierung wurde mit einem im Analyseprogramm implementierten Segmentierungs-Algorithmus durchgeführt. Dieser beinhaltet ein kantenbasiertes Segmentierungsverfahren, das auf der Canny-Methode beruht (Canny 1986).

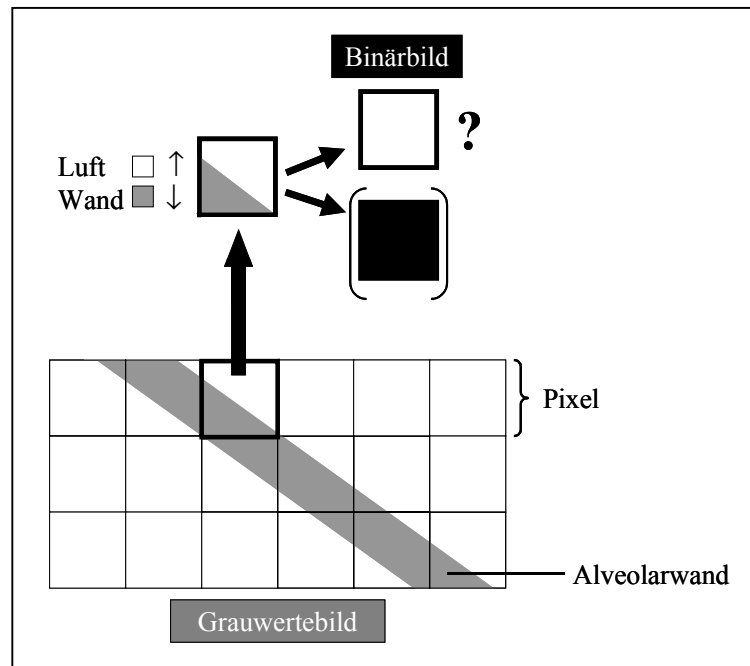


Abb. 48: *Partialvolumeneffekt. Exemplarische pixelbasierte Darstellung. Der Alveolarwandanteil ist im markierten Pixel geringer als der Luftanteil. Nach der Binärbilderzeugung wird der Pixel mit Luft gleichgesetzt. Der Gewebeanteil geht bei der Binarisierung verloren.*

Die Canny-Methode als robustes Verfahren zur Kantendetektion ist der in der digitalen Bildverarbeitung am häufigsten eingesetzte Algorithmus. Kanten stellen in Bildern die auffälligsten Merkmale dar. Sie entstehen an Objektgrenzen (hier: Alveolarwand und Luft) und entsprechen im digitalen Bild abrupten Änderungen der Grau- oder Farbwerte. Nach Überführung des originären Bilds in das Grauwertbild werden unter streng mathematischer Vorgehensweise nacheinander verschiedene Faltungsoperationen durchgeführt. Als ideales Ergebnis resultiert ein Bild aus Linien, die entlang der Kanten des Originals laufen.

Durch das automatische Ermitteln lokaler Schwellenwerte kann Gewebe optimal von Nichtgewebe getrennt werden. Dieses adaptive lokale Verfahren ist einem globalen Schwellenwertverfahren vorzuziehen (Kuhn et al. 1990 b). Bei der Wahl eines globalen Schwellenwerts kommt es letztlich zu einer Überrepräsentierung dickerer und einem Verlust dünnerer Strukturen. Feldkamp et al. (1989) und Kuhn et al. (1990 a) weisen in diesem Zusammenhang auf die Variation der Gewebegeometrie und -dichte sowie die Änderungen innerhalb der einzelnen Strukturkomponenten in einer Probe hin. Im

Gegensatz zur Anwendung einfacher Segmentierungsverfahren liefert die in diesem Programm realisierte Kombination genauere Ergebnisse bei der Binärbilderzeugung.

Alle Proben wurden so nach einem standardisierten Protokoll analysiert. Außer bei der Vorsegmentierung, für die in jedem Messvolumen eine histogrammbasierte Berechnung des Schwellenwerts durchgeführt wird, bleiben die Einstellungen zur morphometrischen Analyse der Gewebezyylinder unverändert.

Den Einfluss der Schwellenwertwahl auf die Morphologie des Alveolargewebes im erzeugten Binärbild zeigt Abbildung 49.

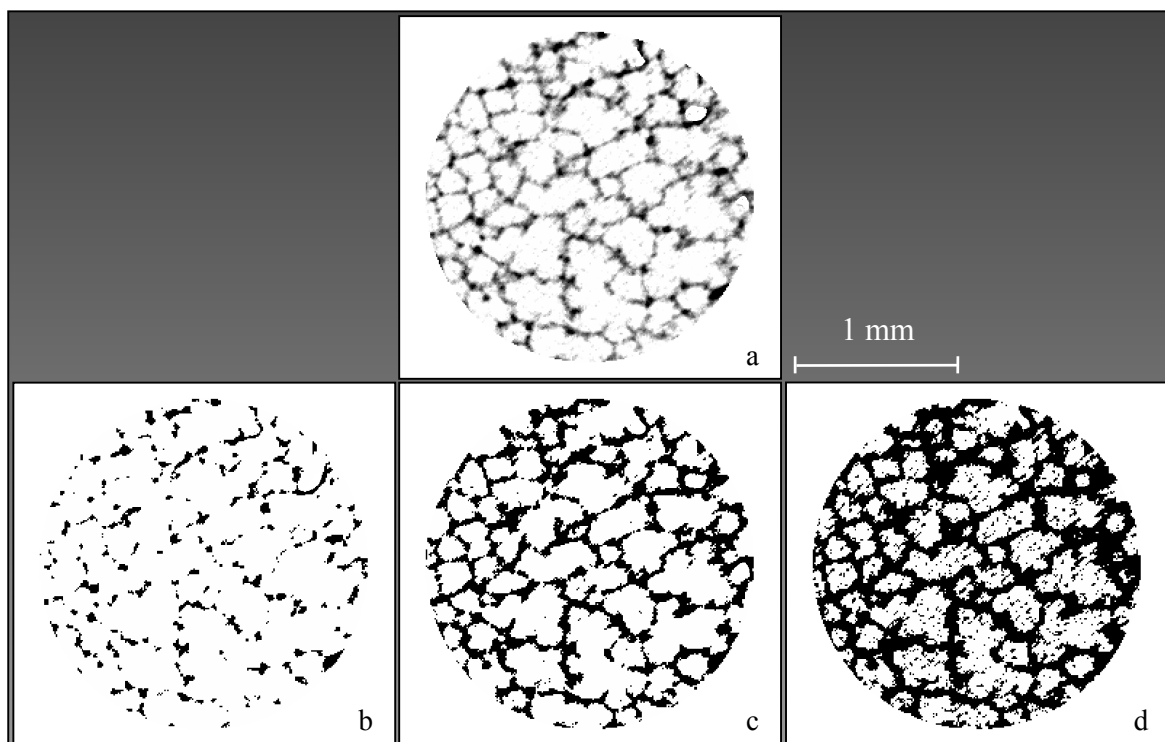


Abb. 49: Strukturdarstellung in Abhängigkeit des Schwellenwerts.

Originäres Grauwertbild (a); Binärbilder mit zu niedrigem (b), mit optimalem (c) und mit zu hohem (d) Schwellenwert.

Bei Wahl eines zu niedrigen Schwellenwerts werden zu wenige Pixel den Alveolarstrukturen zugeordnet. Die Septen sind artifiziell ausgedünnt oder kommen erst gar nicht zur Ansicht. Im errechneten Binärbild gehen Alveolarsepten verloren (Abb. 49b). Bei Erhöhung des Schwellenwerts nimmt der Strukturanteil immer mehr zu und erreicht einen Punkt, an dem das reale Objekt adäquat wiedergegeben wird (Abb. 49c). Wird der Schwellenwert weiter erhöht, resultiert eine Überrepräsentierung der Lungenstrukturen; die

Alveolarsepten sind verdickt. Außerdem kommt es zu einer Verstärkung des Bildrauschens (Abb. 49d).

#### 4.8.2 Auflösung

Die Auflösung nimmt einen großen Einfluss auf die Quantifizierung mikrostruktureller Daten.

Die starke Abhängigkeit quantitativer Daten von der Auflösungsfähigkeit des mikrotomographischen Systems wurde auf osteologischem Sektor bereits erforscht. Es überrascht dabei nicht, dass die Präzision gewonnener struktureller Daten mit der Wahl einer höheren Auflösung zunimmt (Müller et al. 1996; Ito et al. 1998; Müller et al. 1998).

Auch ist die einfachste Möglichkeit, den angesprochenen Partialvolumeneffekt zu verringern, die Verkleinerung der Voxelgröße – also die Steigerung der Auflösung.

Dies kann bei unserer Messanordnung, die mit maximal möglicher Geräteeinstellung durchgeführt wurde, nur durch eine Verkleinerung der Proben geschehen. Eine Größenreduktion der Probe ist aufgrund der unter Kap. 4.3.1 angeführten Gründe nicht sinnvoll.

Unter Berücksichtigung der geringen Alveolarseptendicke von etwa 5  $\mu\text{m}$  ist eine Voxelgröße unter 3  $\mu\text{m}$  zu postulieren, um eine präzise Quantifizierung der pulmonalen Feinstrukturen zu ermöglichen.

Der Forderung nach einer Optimierung der Auflösung des mikrotomographischen Systems ließe sich insbesondere durch die Wahl der geeigneten Strahlungsquelle näher kommen. Hier stellt insbesondere der Einsatz von *Synchrotronstrahlung* (= Kreisbeschleunigungsstrahlung) eine interessante Alternative dar (Bonse und Busch 1996; Peyrin et al. 2000; Wiedemann 2003).

Synchrotronstrahlung entsteht, wenn energiereiche schnelle Elektronen – welche sich annähernd mit Lichtgeschwindigkeit bewegen – in einem Magnetfeld abgelenkt werden. Der bei Systemen mit Synchrotronstrahlung herausgefilterte monochromatische Strahl weist im Vergleich zu konventionellen Röntgenröhren eine um Größenordnungen höhere Intensität auf. Dadurch kann eine besonders hohe Auflösung (unter 5  $\mu\text{m}$ ) erreicht werden. Neben ihrer hohen Strahlenintensität ist die nahezu parallele Strahlausbreitung der Synchrotronstrahlung vorteilhaft. Im Vergleich zum Mikro-CT ermöglicht sie eine deutlich bessere Rekonstruktionsqualität (Flannery et al. 1987; Bonse und Busch 1996).

Mit diesem Verfahren lässt sich die morphometrische Analyse verbessern (Tsuda et al. 2008).

Nachteilig sind die begrenzte Verfügbarkeit, die Ortsgebundenheit und der vergleichsweise hohe experimentelle Aufwand (Engelke et al. 1999).

### **4.8.3 Untersucherabhängigkeit**

Einige Schritte der Bild- und Datengenerierung (interaktive Bildnachverarbeitung, Schwellenwertfestlegung, morphometrischer Analyseprozess) bedurften einer aktiven Einbeziehung des Untersuchers.

So stellt die mikrotomographische Strukturanalyse kein vollständig automatisiertes Verfahren dar. Sie kann nur unter direkter Einbeziehung des Untersuchers (*semi*-automatisiert) angewendet werden. Der Untersucher selbst definiert den Ort der Vermessung im Gewebe. Das Programm ist nicht in der Lage, Alveolen von anderen Strukturen zu unterscheiden. Der Untersucher muss ein Messvolumen festlegen, das möglichst homogen Alveolen erfasst und störende Elemente wie Bronchien oder Gefäße ausschließt.

Grundsätzlich sollte die Einbindung des Untersuchers jedoch nur auf diese notwendigen Schritte begrenzt sein, gefährdet doch seine aktive Einbeziehung stets auch die Objektivität der Untersuchung.

Zukünftig wären im Analyseprogramm implementierte Algorithmen zur optimalen Strukturdiskriminierung und Schwellenwertfestlegung zu fordern, mit der sich die Untersucherabhängigkeit reduzieren oder gar gänzlich eliminieren ließe.



#### 4.9 Dreidimensionale Gewebedarstellung: Alternativen – Limitationen

Die kontinuierliche, lückenlose Einsicht der Mikro-CT bleibt der Lichtmikroskopie verborgen. Hier muss die dritte Dimension über zweidimensionale **histologische Serienschritte** rekonstruiert werden (Ware und LoPresti 1975; Weibel und Cruz-Orive 1997). Auch bei sorgfältigster Präparation passen zwei benachbarte Schnitte wegen der unvermeidlichen Gewebedeformation niemals exakt aufeinander (Whimster 1989; Kriete 1996).

Auch mit den Möglichkeiten der computergestützten 3D-Rekonstruktion lassen sich die Schwierigkeiten der histologischen Präparation nicht überwinden („das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile“). Sie setzt einen hohen präparatorischen Aufwand voraus und ist immer sehr zeitaufwendig. Zur dreidimensionalen Rekonstruktion eines halben Acinus aus histologischen Serienschritten benötigte Boyden drei Jahre (Boyden 1971).

Moderne mikroskopische Verfahren, wie die **Konfokale Laserscanning-Mikroskopie**, versuchen ebenfalls, das Gewebe nichtdestruktiv zu untersuchen. Dazu wird das mechanische Zerschneiden der Histologie durch ein „optisches Zerschneiden“ ersetzt (Paddock 1999; Taylor et al. 2002). Mit dem konfokalen Lasermikroskop ist die Fokussierung auf eine bestimmte Ebene des Präparats möglich. Die ober- und unterhalb der Fokusebene liegenden Informationen sind unscharf und tragen nicht zur Bilderstellung bei. Je nach Tiefeneinstellung der Focusebene lässt sich das Objekt in einen Stapel kontinuierlicher optischer, so genannter konfokaler Schnittebenen zerlegen. Diese können wie bei der Mikro-CT zu einem räumlichen Bild zusammengefügt werden. Limitierend ist die maximale Tiefe des Fokus; sie liegt unter 1 mm (Bentley et al. 2002 a). Daher können nur kleinere Probenvolumina (unter 1 mm<sup>3</sup>) kontinuierlich dargestellt werden (Jorgensen et al. 1998).

Eine weitere Technik zur Erzeugung dreidimensionaler Bilder ist die **Rasterelektronenmikroskopie** (Nagai und Thurlbeck 1991). Sie bedient sich eines feinen Elektronenstrahls, der das Objekt zeilenweise abtastet. Der nutzbare Vergrößerungsbereich ist groß (5- bis etwa 100.000-fache Vergrößerung). Die rasterelektronischen Bilder besitzen eine große Tiefenschärfe, so dass ein starker dreidimensionaler Eindruck der Objektstrukturen vermittelt wird. Allerdings lassen sich mit der Rasterelektronenmikroskopie nur Gewebeoberflächen darstellen. Das Innere des Objekts bleibt dieser Technik verborgen (Bentley et al. 2002 a).

#### 4.10 Zwei- und dreidimensionale Nachverarbeitung

Im Gegensatz zur Histologie ermöglicht die Mikro-CT erstmals eine rasche Einsicht in den räumlichen Gewebeaufbau. Die nichtdestruktive Gewinnung eines kontinuierlichen Datensatzes ermöglicht eine Darstellung des Gewebes und seines Aufbaus in verschiedenen Ebenen und Dimensionen.

Die Qualität der Nachverarbeitung wird ganz wesentlich von der Qualität des primär gewonnenen CT-Datensatzes beeinflusst. Entscheidend sind zunächst die Schichtdicke (also die Voxelgröße) und der Schichtabstand. Je dünner die Schichten, desto hochwertiger wird die Rekonstruktion. Die Schichten sollen dabei zumindest lückenlos oder besser überlappend rekonstruiert werden. Außerdem ist der Gewebekontrast von Bedeutung. Je höher der Kontrast, desto besser wird die Rekonstruktion (Drebín et al. 1988; Calhoun et al. 1999).

Zur zwei- beziehungsweise dreidimensionalen Abbildung der Gewebeprobe wurden Nachverarbeitungstechniken eingesetzt, die auch in der klinischen Computertomographie angewendet werden (Remy et al. 1998; Ravenel et al. 2001):

Als zweidimensionales Rekonstruktionsverfahren wurde die **multiplanare Reformation** gewählt. Hierbei können Schnittebenen in jeder beliebigen Raumrichtung durch das Untersuchungsvolumen gelegt werden. Üblicherweise werden aus dem Datenvolumen zunächst transversale Schnitte und anschließend sekundäre coronare und sagittale Schnitte berechnet (Abb. 20). Durch die Verwendung kubischer Volumenelemente ist die Auflösung in jeder Raumebene gleich. Anatomische Strukturen, die nicht in der ursprünglichen Schnittebene verlaufen, können mittels multiplanarer Reformation über die Berechnung gekrümmter Ebenen abgebildet werden. Die Darstellung des Gewebevolumentums in verschiedenen Raumebenen vermittelt einen dreidimensionalen Eindruck des Objekts.

Die Segmentation des Acinus erfolgte mit Hilfe der **Volume-Rendering-Technik** als echtes dreidimensionales Nachverarbeitungsverfahren (Abb. 40 und 41). Mit diesem Verfahren gelingt es, räumliche Einheiten aus einem Datenvolumen zu separieren. Routinemäßig wird diese Technik zur dreidimensionalen Darstellung von Skelettelementen oder von kontrastierten Gefäßen eingesetzt. Je höher der Dichteunterschied ist, desto einfacher gestaltet sich die räumliche Darstellung im Untersuchungsvolumen.

Bei der Volume-Rendering-Technik wird das zu rekonstruierende Objekt durch ein ihm zugeordnetes CT-Wertintervall und eine zugehörige Sichtbarkeit definiert. Letztlich muss

der Luftraum (niedrige Dichte) vom Gewebe (hohe Dichte) separiert werden. Dies geschieht erneut unter Anwendung eines Schwellenwertverfahrens.

Die Hauptlimitation dieses einfachen Segmentationsverfahrens liegt auch wieder im Partialvolumeneffekt. Die verschiedenen Dichteanteile innerhalb eines Voxels führen zu Störungen mit inkorrekt dargestellt gerade im Bereich der Grenzfläche Luft zum Gewebe. Zudem ist die Volume-Rendering-Technik anfällig für Strahlenartefakte, die zu Verfälschungen der Dichte führen.

Die Segmentation des Acinus selbst beginnt mit der Definition des Startpunktes. Dieser Startpunkt wird interaktiv vom Untersucher gesetzt. Hierzu wird im primären Volumendatensatz der Übergang eines Bronchiolus terminalis zu einem Bronchiolus respiratorius (dem Bronchus mit ersten Alveolen in der Bronchialwand) gesucht. Dieser Übergang ist sicher und eindeutig zu erkennen. In unseren Gewebeproben lässt sich ein markanter Unterschied der Wände der luftleitenden Atemwege zu den Wänden des respiratorischen Abschnitts erkennen (Abb. 40).

Beginnend im Bronchiolus terminalis wird unter Verwendung der so genannten Saatkorntechnik der weitere Bronchialbaum bis zu den Alveolarwänden rekonstruiert. Die Saatkorntechnik verknüpft Voxel vergleichbarer Dichte zu einem zusammenhängenden Volumenelement. Die Rekonstruktion muss an den zusammenhängenden Elementen hoher Dichte Halt machen. Dabei erfolgt die automatische Segmentation unter visueller Kontrolle des wachsenden Bronchialbaums bis zu den Wänden der terminalen Alveolen (Abb. 41).

Ein Nachteil der schwellenwertbasierten Nachverarbeitung liegt in der angesprochenen Untersucherabhängigkeit. Die segmentierten Strukturen können in Abhängigkeit von der Wahl des Schwellenwerts hinsichtlich ihrer Größe und Form variieren. Somit handelt es sich um ein semiautomatisiertes Verfahren. Die Technik basiert auf einem automatisierten Algorithmus, der unter aktiver Einbeziehung des Untersuchers angewandt wird. Zur Reduktion der Untersucherabhängigkeit wäre auch hier ein standardisiertes Nachverarbeitungsprotokoll wünschenswert.

### 4.11 Ausblick

Die morphometrische Untersuchung der Lunge ist aufwendig. Das methodische Hauptproblem der Morphometrie beruht auf der Tatsache, dass die Dimensionen der interessierenden Organstruktur häufig sehr groß sind – die Lungenoberfläche entspricht etwa der Größe eines Tennisplatzes – die Messungen aber an kleinen Proben im mikroskopischen Bereich erfolgen. Darüber hinaus interessieren räumliche – also dreidimensionale – Parameter, die bislang an zweidimensionalen histologischen Schnitten gemessen wurden. Die morphometrischen Daten konnten also nicht direkt ermittelt werden. Sie mussten aus Schnitten kleiner Proben abgeleitet werden, die nicht die dreidimensionale Gewebestruktur wiedergeben.

Als neues Verfahren vermag die Mikro-CT erstmals, Gewebe nichtdestruktiv mit hoher Auflösung als dreidimensionales Gewebevolumen abzubilden. Deshalb ist die Methode besonders für morphometrische Untersuchungen geeignet.

Die Vermessung ist nur sinnvoll, wenn es gelingt, die räumliche Struktur des Lungengewebes bis hin zur Bildgebung zu bewahren.

Unabhängig vom bildgebenden Verfahren ist zunächst eine Präparation erforderlich, mit der es gelingt, die ursprüngliche Gewebearchitektur der Lunge nach Explantation zu bewahren. Das kollabierte Organ muss zunächst in Inspiration fixiert werden. Hierzu besonders geeignet ist die Fixation durch Beatmung mit Formalindampf. Diese Technik arbeitet mit Bedingungen, die einer physiologischen Fixierung des Organs am nächsten kommen.

Mit unserer entwickelten Präparationstechnik gelingt es, Lungengewebe mikrotomographisch darzustellen. Dazu musste zunächst der niedrige native Röntgenkontrast mit einem röntgendichten Kontrastmittel angehoben werden. Auch bei der weiteren Gewebeaufarbeitung ist darauf zu achten, dass die räumliche Struktur des fragilen Lungengewebes bewahrt wird. Als geeignet hat sich die Kontrastierung mit Osmiumtetroxid, gefolgt von einer Kritisch-Punkt-Trocknung, erwiesen.

Da die Gewebeproben während der mikrotomographischen Untersuchung intakt bleiben, treten im Gegensatz zur Histologie keine Architekturstörungen auf.

Zusätzlich ist es mit dem digitalen Datensatz möglich, das Gewebe zu quantifizieren. Die mikrotomographische Auswertung ist schneller und standardisierter durchführbar als die klassische, auf histologischen Schnitten basierende stereologische Technik.

Verglichen mit der Histologie ist die Auflösung der Mikro-CT geringer. Sie hängt zum einen vom eingesetzten mikrotomographischen System ab. Zum anderen lässt sie sich durch die Wahl der Proben- und Voxelgröße beeinflussen: Je kleiner die Probengröße, desto kleiner ist die Voxelgröße und desto höher ist die Auflösung.

Auch wenn sich die korrespondierenden histologisch-mikrotomographischen Schnittpaare sehr ähnlich sind, wurde die Auflösung der Lichtmikroskopie nicht erreicht. Mit unserem System erzielten wir bei einem Probendurchmesser von 8 mm eine Voxelgröße von 9  $\mu\text{m}$ . Die Auflösung liegt demnach bei 18  $\mu\text{m}$ . Dies macht sich bei geringerer Vergrößerung (Vergleich der Schnittpaare) nicht bemerkbar. Erst bei stärkerer Vergrößerung im Rahmen der Binarisierung wird deutlich, dass die Segmentierung die Alveolarepten nicht realitätsgetreu abbildet. Durch die Verwendung neuer Scanner mit höherer Auflösung sollte sich diese Limitation der computergestützten Auswertung der Mikro-CT überwinden lassen.

Im Gegensatz zur Histologie ermöglichen die kontinuierlichen, nichtdestruktiv generierten Datensätze der Mikro-CT die Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder. Darüber hinaus können sekundäre Rekonstruktionen des terminalen Bronchialbaums und des pulmonalen Acinus durchgeführt werden.

Die Mikro-CT als neues experimentelles Werkzeug zur Untersuchung der pulmonalen Mikrostrukturen ist nicht nur für Radiologen von Interesse. Prospektiv könnte sie in Disziplinen zum Einsatz kommen, in denen bislang klassische mikroskopische Techniken eingesetzt wurden. So müsste man sich nicht (mehr) allein auf die Betrachtung von Oberflächen des Untersuchungsobjekts beschränken. Der kontinuierliche Datensatz der Mikro-CT kann beliebig oft nachbearbeitet werden. Anders als in der Histologie werden die Proben dabei nicht zerstört. Die Mikro-CT hat das Potenzial, die serielle Histologiegewinnung als Referenz und Standard in vielen *in vitro*-Studien zu ersetzen (Holdsworth und Thornton 2002).

Im tierexperimentellen Bereich richtet sich ein großes Augenmerk auf mikrotomographische *in vivo*-Studien an kleinen Labortieren (Kinney et al. 1995).

Eine *in vivo*-Untersuchung des Lungenparenchyms beim Menschen mit der Mikro-CT ist bereits wegen der langen Scandauer und der hohen Strahlendosis nicht möglich. Anders als bei Knochenstanzen gelingt es nicht, das Verfahren etwa auf Lungenbiopsien anzuwenden, die räumliche Struktur des Lungengewebes bleibt bei der Entnahme nicht gewahrt.

Die vorgestellte Präparationstechnik kann auch bei humanem Lungengewebe angewendet werden. Zudem ist die dreidimensionale Rekonstruktion eines pulmonalen Acinus gelungen. Als grundlegende funktionelle Einheit trägt er zum Verständnis des Organaufbaus bei und erlaubt wichtige Aussagen über pathologische Veränderungen bei pulmonalen Erkrankungen.

Zukünftig wäre daher insbesondere die morphometrische Untersuchung humanpathologischer pulmonaler Krankheitsentitäten wie Lungenemphysem, Lungenfibrose oder Pneumokoniosen mittels Mikro-CT von Bedeutung. Sie gehen in besonderem Maße mit einer Störung der alveolären Architektur einher, aus der sich die funktionellen Defizite mit der vorgestellten Methodik grundlegend ableiten lassen.

## 5. Zusammenfassung

Die vorgestellte Präparation ermöglicht eine nichtdestruktive, kontinuierliche zwei- und dreidimensionale Darstellung der terminalen Lufträume der Lunge mittels der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) sowie ihre morphometrische Analyse.

Fünf isolierte linke Schweinelungen werden durch Formalindampfbeatmung und anschließende Sauerstofftrocknung in Inspirationsstellung fixiert. Anschließend werden die Lungen in Scheiben geschnitten und subpleurale Gewebezyylinder (Durchmesser 8 mm, Höhe 10 mm) aus definierten Regionen entnommen. Die Gewebeproben werden einer Osmiumkontrastierung, chemischen Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen. Von jedem der Gewebezyylinder werden im Mikrotomographen unter Verwendung kubischer Voxel (Seitenlänge 9  $\mu\text{m}$ , Auflösung 18  $\mu\text{m}$ ) etwa 900 Querschnittsbilder des Lungengewebes erzeugt. Die gewonnenen isotropen Datensätze bilden die Grundlage für zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen des Lungenparenchyms.

Für den Methodenvergleich werden die Probenzyylinder im Anschluss an die mikrotomographische Untersuchung zusätzlich histologisch aufgearbeitet: Nach Paraffineinbettung unter Vakuum erfolgt die Anfertigung von 8  $\mu\text{m}$  dicken sequenziellen Serienschnitten.

Basierend auf etablierten stereologischen Techniken erfolgt die quantitative Untersuchung der terminalen Lufträume in mikrotomographischen und histologischen Schnittbildern. Zudem werden auf Basis mikrotomographischer Datensätze quantitative Strukturparameter mittels einer semiautomatischen Analysesoftware gewonnen. Die Übereinstimmung der eingesetzten Methoden wird mittels Regressions- und Bland-Altman-Analyse geprüft.

1. Mithilfe der Fixation durch Formalindampfbeatmung gelingt es, die Lunge in Inspiration zu entfalten und zu fixieren. Unter Anwendung etablierter elektronenmikroskopischer Präparationstechniken können luftgefüllte, homogen kontrastierte und getrocknete, stabile Gewebezyylinder gewonnen werden. Das Lungenvolumen bleibt im Präparationsverlauf erhalten. Im Rahmen der Kontrastierung, Entwässerung und Trocknung der Gewebezyylinder tritt eine lineare Schrumpfung von 10 % auf.

2. Die Implementierung eines gewebeschonenden Präparationsverfahrens, gefolgt von der nichtdestruktiven radiologischen Bildgebung, ermöglicht den Erhalt der Gewebearchitektur. In dieser Hinsicht besitzt die Mikro-CT Vorteile gegenüber der Histologie.
3. Die Mikro-CT ermöglicht eine Darstellung des Lungenparenchyms, die mit der Lichtmikroskopie vergleichbar ist. Mit einer Ortsauflösung von 18  $\mu\text{m}$  kann das Lungengewebe bis zu den einzelnen Alveolen abgebildet werden. Das gesamte Probenvolumen lässt sich kontinuierlich erfassen. Die hohe Übereinstimmung beim visuellen Vergleich von Mikrotomogrammen mit den korrespondierenden histologischen Schnitten zeigt, dass die pulmonalen Mikrostrukturen mit der Mikro-CT adäquat abgebildet werden können.
4. Basierend auf den isotropen Datensätzen (isovolumetrische Voxel von 9  $\mu\text{m}$  Kantenlänge) werden verlustfreie zwei- und direkte dreidimensionale Rekonstruktionen des Lungengewebes durchgeführt. Mit dem Datensatz der Mikro-CT gelingt die dreidimensionale Rekonstruktion eines pulmonalen Acinus.
5. Aufgrund des nichtdestruktiven Charakters der Mikro-CT bleiben Gewebezylinder und Lungengewebe bei der Bilderzeugung intakt. In der Mikro-CT treten bei nur 2,1 % der untersuchten 8996 Schnittbilder Artefakte (zumeist Aufhärungsartefakte) auf. Die mechanischen Bearbeitungsschritte der histologischen Präparation hingegen verursachen bei 66,5 % der insgesamt 1291 histologischen Schnittpräparate strukturelle Gewebealterationen.
6. Zur Abschätzung des Einflusses der unterschiedlichen Präparationen werden am mikrotomographischen und histologischen Schnitt auf **stereologischer Basis** die *alveoläre Oberflächendichte* ( $33,47 \pm 1,91 / \text{mm}$  bzw.  $35,47 \pm 2,41 / \text{mm}$ ) sowie der *Alveolardurchmesser* ( $135,8 \pm 15,0 \mu\text{m}$  bzw.  $135,7 \pm 14,5 \mu\text{m}$ ) ermittelt. Die erhobenen Werte für die *alveoläre Oberflächendichte* differieren signifikant zwischen mikrotomographischen und histologischen Schnittbildern mit konstant niedrigeren Werten in der Mikro-CT. Die Korrelation beträgt  $r = 0,72$  ( $p = 0,018$ ), die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot  $2 \pm 1,6 / \text{mm}$ . Die Werte für den *mittleren Alveolardurchmesser* differieren demgegenüber nicht signifikant. Die Regressionsanalyse ergibt eine gute



Korrelation ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,0001$ ), die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot beträgt  $-0,1 \pm 3,4 \mu\text{m}$ .

7. Über die **semiautomatische Analyse** können das *Gewebevolumen* ( $0,110 \pm 0,026 \text{ mm}^3$ ) und die *alveoläre Oberfläche* ( $10,551 \pm 0,329 \text{ mm}^2$ ) direkt bestimmt werden. Aus diesen beiden Parametern lassen sich das *Luftraumvolumen* ( $0,236 \pm 0,026 \text{ mm}^3$ ), die *alveoläre Oberflächendichte* ( $30,49 \pm 0,95 / \text{mm}$ ) und der *Alveolardurchmesser* ( $134,4 \pm 13,6 \mu\text{m}$ ) sekundär berechnen.

Zur Abschätzung der Genauigkeit der **semiautomatischen Analyse** werden diese Werte mit den **stereologiebasierten** Werten der mikrotomographischen Schnitte verglichen. Die stereologiebasiert und semiautomatisch ermittelten Werte für die *alveoläre Oberflächendichte* differieren signifikant innerhalb desselben Messvolumens mit konstant niedrigeren Werten in der semiautomatischen Analyse ( $33,47 \pm 1,91 / \text{mm}$  versus  $30,49 \pm 0,95 / \text{mm}$ ). Die Korrelation beträgt  $r = 0,70$  ( $p = 0,023$ ), die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot  $2,9 \pm 1,4 / \text{mm}$ . Demgegenüber differiert der *mittlere Alveolardurchmesser* nicht signifikant ( $135,8 \pm 15,0 \mu\text{m}$  versus  $134,4 \pm 13,6 \mu\text{m}$ ). Es ergibt sich eine gute Korrelation ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,0001$ ), die Übereinstimmung im Bland-Altman-Plot beträgt  $1,4 \pm 3,3 \mu\text{m}$ .

8. Die entscheidende Limitation der Mikro-CT liegt in der Auflösung. So erklärt sich über den Partialvolumeneffekt bei der Binärbilderzeugung durch die schwellenwertabhängige Segmentation ein Gewebeverlust. Dünne Alveolarsepten der ursprünglichen Grauwertebilder werden in den Binärbildern nicht oder nur unzureichend abgebildet.

9. Das an Schweinelungen entwickelte Präparationsverfahren konnte auf humane Lungen übertragen werden. Die Alveolararchitektur lässt sich beliebig zwei- und dreidimensional visualisieren. Auch hier besteht die Möglichkeit, aus dem kontinuierlichen Datensatz Acini zu segmentieren.

10. Ziel weiterer Arbeiten ist die Segmentierung, dreidimensionale Rekonstruktion und Quantifizierung des Acinus als funktionelle Einheit der Lunge. Hierfür ist die Verwendung von Systemen mit höherer Auflösung erforderlich. Postmortale Strukturanalysen pulmonaler Krankheitsentitäten wie des Lungenemphysems und der Lungenfibrose

könnten neue Erkenntnisse zu den strukturell-funktionellen Zusammenhängen der Lunge liefern. Die Präparationstechnik in Verbund mit der vorgestellten mikrotomographischen Bildgebung ist als Methodik geeignet, weitere Untersuchungen der Lungenstruktur und der Architektur des Alveolarraums voranzutreiben.

## Summary

**Purpose:** To develop a method to visualise lung architecture in two and three dimensions and to obtain morphometric data by using microfocal X-ray-computed tomography (micro-CT).

**Methods and Materials:** Five porcine lungs were inflated near total lung capacity and fixed by formaldehyde ventilation. Lungs were cut into slices and cylindrical tissue specimens (diameter 8 mm, height 10 mm) were taken from two subpleural locations. To enhance contrast for micro-CT scanning, specimens were stained with osmium tetroxide. To remove remaining dye inside the alveolar air space, the samples were dehydrated with 2,2-dimethoxypropane and then subjected to a critical point drying procedure.

From each sample 400 projection images (1024 x 1024 pixel) were obtained using a micro-CT scanner (Skyscan-1072). From these continuous isotropic data sets 900 micro-CT scans (isometric, cubic voxels: 9  $\mu\text{m}$  on a side) were acquired and three-dimensional images were reconstructed with a resolution of 18  $\mu\text{m}$ . Post-processing of the continuous data sets leads to the segmentation of bronchial trees and the pulmonary acinus.

For histologic comparison, tissue samples were embedded in paraffin and sequential serial sectioned (slice thickness 8  $\mu\text{m}$ ).

Based on established stereological techniques, alveolar surface density and mean alveolar diameter were assessed in micro-CT scans and corresponding histological sections. Furthermore, morphometric parameters were obtained by using a semi-automated micro-CT analysis. Agreement of methods was assessed by regression and Bland-Altman analysis.

**Results:** The fixation process resulted in stable air-filled lungs with inflated alveoli. Lung volumes were comparable before and after fixation ( $2.1 \pm 0.3$  l vs.  $2.0 \pm 0.3$  l). Further preparation of the tissue specimens (osmium tetroxide staining, dehydration and critical point drying) resulted in linear shrinkage of 10 %.

The resolution of the micro-CT system of 18  $\mu\text{m}$  permitted the visualisation of lung parenchyma down to the alveolar walls. The entire sample volume can be examined continuously. Histological slices and corresponding micro-CT scans showed excellent

matching of pulmonary structures. Based on the continuous isotropic data set of micro-CT scanning, imaging of two- and three-dimensional structures without loss in resolution is possible. We succeeded in reconstructing the pulmonary acinus.

The nondestructive nature of micro-CT results in much less artefacts in comparison to the mechanical destructive histological method (2.1 % vs. 66.5 % of structural artefacts).

To evaluate the influence of the different preparation techniques, alveolar surface density and alveolar diameter were assessed by stereology-based morphometry in micro-CT scans and corresponding histologic sections.

The alveolar surface density differed significantly between methods, with consistently lower values in micro-CT analysis ( $33.47 \pm 1.91 / \text{mm}$  vs.  $35.47 \pm 2.41 / \text{mm}$ ). Regression analysis showed a correlation of  $r = 0.72$  ( $p = 0.018$ ). Agreement in the Bland-Altman plot was  $2 \pm 1.6 / \text{mm}$ . In contrast, the mean alveolar diameter did not differ significantly ( $135.8 \pm 15.0 \mu\text{m}$  vs.  $135.7 \pm 14.5 \mu\text{m}$ ). Regression analysis showed a good correlation ( $r = 0.97$ ;  $p < 0.0001$ ). Agreement in the Bland-Altman plot was  $-0.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ .

By semiautomated micro-CT analysis tissue volume ( $0.110 \pm 0.026 \text{ mm}^3$ ) and alveolar surface ( $10.551 \pm 0.329 \text{ mm}^2$ ) could be directly assessed. Airspace volume ( $0.236 \pm 0.026 \text{ mm}^3$ ), alveolar surface density ( $30.49 \pm 0.95 / \text{mm}$ ) and mean alveolar diameter ( $134.4 \pm 13.6 \mu\text{m}$ ) were calculated from these parameters.

To evaluate the accuracy of semiautomated analysis, morphometric data of semiautomated micro-CT analysis were compared with stereological based measurements in the same micro-CT scans.

Alveolar surface density differed significantly with constantly lower values in the semiautomatic analysis ( $33.47 \pm 1.91 / \text{mm}$  vs.  $30.49 \pm 0.95 / \text{mm}$ ). Correlation was  $r = 0.70$  ( $p = 0.023$ ). Agreement in the Bland – Altman plot was  $2.9 \pm 1.4 / \text{mm}$ . In contrast, mean alveolar diameter did not differ significantly ( $135.8 \pm 15.0 \mu\text{m}$  vs.  $134.4 \pm 13.6 \mu\text{m}$ ). Regression analysis showed a good correlation ( $r = 0.97$ ;  $p < 0.0001$ ). Agreement in the Bland-Altman plot was  $1.4 \pm 3.3 \mu\text{m}$ .

**Conclusion:** The evolved method is feasible to visualise the microstructures of pulmonary tissue two- and three-dimensionally and to obtain morphometric data using micro-CT. In contrast to histology, micro-CT offers the opportunity to investigate tissue nondestructively and to obtain continuous data sets. The main limitation of micro-CT

analysis is determined by the insufficient resolution. For precise tissue quantification micro-CT systems with higher resolution are required.

It was also demonstrated, that the preparation technique can be applied in human lungs. Further studies may focus on the examination of the human pulmonary acinus and postmortal morphometric investigations of human pulmonary pathologies like lung emphysema and fibrosis.

The preparation technique in combination with microtomographic imaging may lead to new findings referring to structural-functional relationships of lung pathologies.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams CWM:

Osmium tetroxide and the Marchi method: reactions with polar and non-polar lipids, protein and polysaccharide.  
J Histochem Cytochem 1960; 8: 262-267

Anderson TF:

Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope.  
Trans NY Acad Sci 1951; 13: 130-133

Bachofen H; Ammann A; Wangenstein D; Weibel ER:

Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis: credits and limitations.  
J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol 1982; 53: 528-533

Bachofen H; Schürch S; Urbinelli M; Weibel ER:

Relations among alveolar surface tension, surface area, volume, and recoil pressure.  
J Appl Physiol 1987; 62: 1878-1887

Bahr GF:

Continued studies about the fixation with osmium tetroxide. Electron stains IV.  
Exptl Cell Res 1955; 9: 277-285

Behrman EJ:

The chemistry of osmium tetroxide fixation. In: The science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis. Revel JP, Barnard T, Haggis GH, Bhatt SA (Hrsg.); Scanning Electron Microscopy, Inc.; AMF O'Hare, Chicago, IL; 1983: 1-5

Bell PB Jr:

The preparation of whole cells for electron microscopy. In: The science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis. Revel JP, Barnard T, Haggis GH, Bhatt SA (Hrsg.); Scanning Electron Microscopy, Inc.; AMF O'Hare, Chicago, IL; 1983: 45-59

Bentley MD; Ortiz MC; Ritman EL; Romero JC:

The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002 a; 282: R 1267- R 1279

Bentley MD; Rodriguez-Porcel M; Lerman A; Sarafov MH; Romero JC; Pelaez LI; Grande JP; Ritman EL; Lerman LO:

Enhanced renal cortical vascularization in experimental hypercholesterolemia.  
Kidney Int 2002 b; 61: 1056-63

Berg R:

Lehrbuch der Veterinär-Anatomie; begründet von Koch T  
Band II: Eingeweidelehre (Splanchnologie); 4. Auflage;  
Gustav Fischer Verlag, Jena; 1990

Bland JM; Altman DG:

Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical  
measurement.  
The Lancet 1986; 1: 307-310

Blumenthal BJ; Boren HG:

Lung structure in three dimensions after inflation and fume fixation.  
Amer Rev Tuberc 1959; 79: 764-772

Bolender R.; Hyde DM; Dehoff RT:

Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue,  
cell and molecular biology.  
Am J Physiol 1993; 265: L521-L548

Bonse U; Busch F:

X-ray computed microtomography ( $\mu$ CT) using synchrotron radiation (SR).  
Prog Biophys Molec Biol 1996; 65: 133-169

Boyde A:

Biological specimen preparation for the scanning electron microscope –  
an overview.  
Scanning Electron Microscop 1972; 2: 257-264

Boyde A:

Pros and cons of critical point drying and freeze drying for SEM (Tutorial).  
Scanning Electron Microsc 1978; 2: 303-314

Boyde A; Bailey E; Jones SJ; Tamarin A:

Dimensional changes during specimen preparation for scanning electron  
microscopy.  
Scanning Electron Microsc 1977; 1: 507-518

Boyde A; Maconnachie E:

Morphological correlations with dimensional change during SEM specimen  
preparation.  
Scanning Electron Microsc 1981; 4: 27-34

Boyde A; Maconnachie E:

Not quite critical point drying. In: The science of biological specimen preparation  
for microscopy and microanalysis. Revel JP, Barnard T, Haggis GH,  
Bhatt SA (Hrsg.); Scanning Electron Microscopy, Inc.;  
AMF O'Hare, Chicago, IL; 1983: 71-75

Boyden EA:

The structure of the pulmonary acinus in a child of six years and eight months.  
Am J Anat 1971; 132: 275-230

Bozzola JJ; Russell LD:

Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists.  
Jones and Bartlett Publishers, Boston; 1991

Calhoun PS; Kuszyk BS; Heath DG; Carley JC; Fishman EK:

Three-dimensional volume rendering of spiral CT data: theory and method.  
Radiographics 1999; 19: 745-764

Canny JF:

A computational approach to edge detection.  
IEEE Trans Pattern Analysis And Machine Intelligence 1986; 8: 679-698

Carney DE; Bredenberg CE; Schiller HJ; Picone AL; McCann UG II; Gatto LA;  
Bailey G;Fillinger M; Nieman GF:

The mechanism of lung volume change during mechanical ventilation.  
Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1697-1702

Conway K; Kiernan JA:

Chemical dehydration of specimens with 2,2-dimethoxypropane (DMP) for  
paraffin processing of animal tissues: practical and economic advantages over  
dehydration in ethanol.  
Biotech Histochem 1999; 74: 20-26

Cooper DKC; Ye Y; Rolf LL Jr; Zuhdi N:

The pig as potential organ donor for man.  
In: Cooper DKC; Kemp E; Reemtsma K; White DJG: Xenotransplantation. The  
transplantation of organs and tissues between species.  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York; 1991: 481-500

Cormack AM:

Representation of a function by its line integrals, with some radiological  
applications.  
J Appl Phys 1963; 34: 2722-2727

Davis GR; Wong FS:

X-ray microtomography of bones and teeth.  
Physiol Meas 1996; 17: 121-146

De Paiva RF; Lynch J; Rosenberg E; Bisiaux M:

A beam hardening correction for X-ray microtomography.  
NDT&E Int 1998; 31: 17-22



- Delling G; Hahn M; Bonse U; Busch F; Günnewig O; Beckmann F; Uebbing H; Graeff W:  
Neue Möglichkeiten der Strukturanalyse von Knochenbiopsien bei Anwendung der  
Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT).  
Pathologe 1995; 16: 342-347
- Deverell MH; Bailey N; Whimster WF:  
Tissue distortion in three-dimensional reconstruction of wax or plastic embedded  
microscopic structures.  
Pathol Res Pract 1989; 185: 598-601
- Drebin RA; Carpenter L; Hanrahan P:  
Volume rendering.  
Comput Graph 1988; 22: 65-74
- Duerinckx AJ; Macovski A:  
Polychromatic streak artifacts in computed tomography images.  
J Comput Assist Tomogr 1978; 2: 481-487
- Duncker HR:  
Der Atemapparat (Apparatus respiratorius).  
In: Benninghoff- Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen;  
2. Band: Kreislauf und Eingeweide; Fleischhauer K (Hrsg.); Kapitel 3: 307-388;  
13./14. Auflage; Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore; 1985
- Dunnill MS:  
Quantitative methods in the study of pulmonary pathology.  
Thorax 1962; 17: 320-328
- Duvall CL; Taylor WR; Weiss D; Guldberg RE:  
Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development  
after ischemic injury.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H 302-310
- Elliott JC; Dover SD:  
X-ray microtomography.  
J Microsc 1982; 126: 211-213
- Engelke K; Kalender WA:  
Beyond bone densitometry: assessment of bone architecture by x-ray computed  
tomography at various levels of resolution.  
In: Gennant HK; Guglielmi G Jergas (Hrsg.): Bone densitometry and osteoporosis.  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York; 1998: 417-447
- Engelke K; Karolczak M; Lutz A; Seibert U; Schaller S; Kalender W:  
Mikro-CT. Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur.  
Radiologe; 1999: 39: 203-212

- Feldkamp LA; Davis LC; Kress JW:  
Practical cone-beam algorithm.  
J Opt Soc Am 1984; 1: 612-619
- Feldkamp LA; Goldstein SA; Parfitt AM; Jesion G; Kleerekoper M:  
The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by  
computed tomography.  
J Bone Miner Res 1989; 4: 3-11
- Flannery BP; Deckman WG; Roberge WG; D'Amico KL:  
Three dimensional x-ray microtomography.  
Science 1987; 273: 1439-1444
- Forrest JB:  
The effect of changes in lung volume on the size and shape of alveoli.  
J Physiol London 1970; 210: 533-547
- Fromme HG; Pfautsch M:  
Die Trocknung wasserhaltiger Objekte mit der Kritischen-Punkt-Methode.  
In: Schimmel G, Vogell W (Hrsg.): Methodensammlung der Elektronenmikrosko-  
pie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; Stuttgart;  
Loseblatt-Ausgabe; 7. Lieferung; 1975
- Fukaya H; Martin LJ:  
Lung tissue shrinkage for histologic preparations.  
Am Rev Respir Dis 1969; 99: 946-948
- Garcia-Sanz A; Rodriguez-Barbero A; Bentley MD; Ritman EL; Romero JC:  
Three dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats.  
Hypertension 1998; 31: 440-444
- Gehr P; Bachofen M; Weibel ER:  
The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion  
capacity.  
Resp Physiol 1978; 32: 121-140
- Gil J; Weibel ER:  
Morphological study of pressure-volume hysteresis in rat lungs fixed by vascular  
perfusion.  
Respir Physiol 1972; 15: 190-213
- Gundersen HJG; Østerby R:  
Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology:  
Or "Do more less well!"  
J Microsc 1981; 121: 65-73

- Gusnard D; Kirschner RH:  
Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying.  
J Microsc 1977; 110: 51-57
- Haefeli-Bleuer B; Weibel ER:  
Morphometry of the human pulmonary acinus.  
Anat Rec 1988; 220: 401-414
- Hara T; Tanck E; Homminga J; Huiskes R:  
The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties.  
Bone 2002; 31: 107-109
- Hartroft WS:  
The microscopic diagnosis of pulmonary emphysema.  
Am J Path 1945; 21: 889- 903
- Hartroft WS; Macklin CC:  
Intrabronchial fixation of the human lung for purposes of alveolar measurement using 25 microsections made therefrom.  
Trans Roy Soc Canada (Biol) 1943; 37: 75
- Hayat MA:  
Fixation for electron microscopy.  
Academic Press; New York; 1981
- Heitzmann ER:  
The lung. Radiologic-pathologic correlations.  
Mosby, Saint Louis; 1973
- Holdsworth DW; Thornton MM:  
Micro-CT in small animal and specimen imaging.  
Trends Biotechnol 2002; 20: S 34-39
- Hoppin FG Jr; Hildebrandt J:  
Mechanical properties of the lung.  
In: Bioengineering Aspects of the Lung; J.B. West (Hrsg.);  
New York: Dekker, 1977; vol. 3: 83-162 (Lung Biol Health Dis Ser)
- Hounsfield GN:  
Computerized transverse axial scanning (tomography): part I. Description of system.  
Br J Radiol 1973; 46: 1016-1022
- Ito M; Nakamura T; Matsumoto T; Tsurusaki K; Hayashi K:  
Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture.  
Bone 1998; 23: 163-169

- Johnson RH; Hu H; Haworth ST; Cho PS; Dawson CA; Linehan JH:  
Feldkamp and circle-and-line cone-beam reconstruction for 3D micro-CT of  
vascular networks.  
Phys Med Biol 1998; 43: 929-940
- Jorgensen SM; Demirkaya O; Ritman EL:  
Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs  
with x-ray micro-CT.  
Am J Physiol 1998; 275 (Heart Circ Physiol 44): H 1103-1114
- Karau KL; Johnson RH; Molthen RC; Dhyani AH; Haworth ST; Hanger CC; Roering DL;  
Dawson CA:  
Microfocal X-ray CT imaging and pulmonary arterial distensibility in excised rat  
lungs.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281: H 1447-1457
- Kern JA; Tribble GC; Flanagan TL; Chan BBK; Scott WW; Cassada DC; Kron IL:  
Growth potential of porcine reduced-size mature pulmonary lobar transplants.  
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104: 1329-1332
- Kinney JH; Lane NE; Haupt DL:  
In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone.  
J Bone Miner Res 1995; 10: 264-270
- Klein HP; Stockem W:  
Präparation biologischer Objekte für das Raster-Elektronenmikroskop.  
Microsc Acta 1976; 78: 388-406
- Kriete A:  
Scientific image computing in lung research: from form to function.  
Habilitationsschrift, Gießen; 1996
- Komorowska M; Koter M; Bartosz G; Glomulkiewicz J:  
The effects of glutaraldehyde and osmium tetroxide on the erythrocyte membrane.  
Biochim Biophys Acta 1982; 686: 94-98
- Kuhn JL; Goldstein SA; Feldkamp LA; Goulet RW; Jasion G:  
Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone  
structure.  
J Orthop Res 1990 a; 8: 833-842
- Kuhn JL; Goulet RW; Pappas M; Goldstein SA:  
Morphometric and anisotropic symmetries of the canine distal femur.  
J Orthop Res 1990 b; 8: 776-780
- Laennec RTH:  
Traité de l'auscultation médiate et des maladies des poumons et du cœur.  
Tome premier, p. 292  
Paris: Chaudé; 1826

Lerman A; Ritman EL:

Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT.

Herz 1999; 24: 531-533

Loeschcke H:

Die Morphologie des normalen und emphysematösen Acinus der Lunge.

Beitr. path. Anat. allg. Path. 1921; 68: 213-223

Loeschcke H:

Methoden zur morphologischen Untersuchung der Lunge.

In: Abderhalden E.; Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Abt. VIII; Methoden der experimentellen morphologischen Forschung.

Teil 1; 1924: 575-598

Lum H; Mitzner W:

Effects of 10 % formalin fixation on fixed lung volume and lung tissue shrinkage.

A comparison of eleven laboratory species.

Am Rev Respir Dis 1985; 132: 1078-1083

Lum H; Mitzner W:

A species comparison of alveolar size and surface forces.

J Appl Physiol 1987; 62: 1865-1871

Maser MD; Trimble JJ 3<sup>rd</sup>:

Rapid chemical dehydration of biologic samples for scanning electron microscopy using 2,2- dimethoxypropane.

J Histochem Cytochem 1977; 25: 247-251

Merz WA:

Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe.

Mikroskopie 1968; 22: 132-142

Miles RE; Davy PJ:

Precise and general conditions for the validity of a comprehensive set of stereologic fundamental formulae.

J Microsc 1976; 107: 211-226

Miller WS:

The lung. 2<sup>nd</sup> edition.

Springfield; Thomas 1947

Mittermayer C; Wybitul K; Rau WS; Ostendorf P; Riede UN:

Standardized fixation of human lung for radiology and morphometry; description of a "two-chamber"-System with formaldehyde vapor inflation.

Path Res Pract 1978; 162: 115-130

- Muller L; Jacks T:  
Rapid chemical dehydration of samples for electron microscopic examinations.  
J Histochem Cytochem 1975; 23: 107-110
- Müller R; Koller B; Hildebrand T; Laib A; Gionollini S; Rügsegger P:  
Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional  $\mu$ -tomography.  
Technol Health Care 1996; 4: 113-119
- Müller R; Van Campenhout H; Van Damme B; Van Perre G; Dequeker J; Hildebrand T; Rügsegger P:  
Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative study structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.  
Bone 1998; 23: 59-66
- Murray JF:  
Die normale Lunge: Grundlage für Diagnose und Therapie von Lungenkrankheiten.  
1. dt. Aufl.; Schattauer, Stuttgart New York; 1978
- Nagai A; Thurlbeck WM:  
Scanning electron microscopic observations of emphysema in humans.  
A descriptive study.  
Am Rev Respir Dis 1991; 144: 901-908
- Netter FH:  
The CIBA Collection of Medical Illustration Vol 7.  
Respiratory System second edition 1980.
- Oldmixon EH; Suzuki S; Butler JP; Hoppin FG Jr:  
Perfusion dehydration fixes elastin and preserves lung air-space dimensions.  
J Appl Physiol 1985; 58: 105-113
- Paddock SW:  
Confocal laser scanning microscopy.  
Biotechniques 1999; 27: 992-1004
- Palade GE:  
A study of fixation for electron microscopy.  
J Exp Med 1952; 95: 285-297
- Paulus MJ; Gleason SS; Kennel SJ; Hunsicker PR; Johnson DK:  
High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research.  
Neoplasia 2000; 2: 62-70

- Peyrin F; Salome M; Nuzzo S; Cloetens P; Laval-Jeantet AM; Baruchel J:  
Perspectives in three-dimensional analysis of bone samples using synchrotron radiation microtomography.  
Cell Mol Biol 2000; 46: 1089-1102
- Plattner H:  
Die chemische Fixierung biologischer Objekte für die Elektronenmikroskopie.  
In: Schimmel G, Vogell W (Hrsg.): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart;  
Loseblatt-Ausgabe; 3. Lieferung; 1971
- Pratt PC; Klugh GA:  
A technique for the study of ventilatory capacity, compliance and residual volume of excised lungs and for fixation, drying and serial sectioning in the inflated state.  
Am Rev Resp Dis 1961; 83: 690-696
- Radford EP:  
Influence on physicochemical properties of the pulmonary surface on stability of alveolar air spaces and on static hysteresis of lungs.  
Proc Int Congress Physiol Sci 22<sup>nd</sup> Leiden 1962; 1: 275-280
- Raskin SP:  
The pulmonary acinus.  
Radiology 1982; 144: 31-34
- Rau WS:  
Röntgenuntersuchung der normalen und pathologischen Feinstruktur exstirpierter Lungen.  
Habilitationsschrift, Freiburg; 1980
- Rau WS; Hauenstein K; Mittermayer C; Volk P:  
A simple and rapid method for postmortem radiographic investigation of lung fine structure.  
Path Res Pract 1980; 170: 426-432
- Rau WS; Mittermayer C:  
Die röntgenologische Feinstruktur der Lunge.  
I. Volumenkontrollierte Fixierung isolierter Lungen mit Formalindampf.  
Fortschr Röntgenstr 1980; 133: 233-239
- Rauber A; Kopsch F:  
Anatomie des Menschen- Lehrbuch und Atlas. Band II- Innere Organe; Kapitel 3: Atmungssystem; Leonhardt H (Hrsg.);  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York; 1987: 127-191
- Ravenel JG; McAdams HP; Remy-Jardin M; Remy J:  
Multidimensional imaging of the thorax: practical applications.  
J Thorac Imaging 2001;16 (4): 269-81

- Remy J; Remy-Jardin M; Artaud D; Fribourg M:  
Multiplanar and three-dimensional reconstruction techniques in CT: impact on chest diseases.  
Eur Radiol 1998; 8 (3): 335-51
- Rigaut JP; Berggren P; Robertson B:  
Automated techniques for the study of lung alveolar stereological parameters with the IBAS image analyser on optical microscopy sections.  
J Microsc 1983; 130: 53-61
- Riquet M; Souilamas R; Hubsch JP; Brière J; Colomer S; Hidden G:  
Lymphatic drainage of heart and lungs comparison between pig and man.  
Surg Radiol Anat 2000; 22: 47-50
- Ritman EL:  
Micro-computed tomography – current status and developments.  
Annu Rev Biomed Eng 2004; 6: 185-208
- Romeis B:  
Mikroskopische Technik.  
17. Auflage; Neubearbeitet und herausgegeben von Böck P, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore; 1989
- Rönn M v:  
Morphometrie peripherer Lungenangiographien und radiologisch-histologische Korrelation formalindampffixierter menschlicher Lungen.  
Inauguraldissertation, JLU Gießen; 1991
- Rossi M; Casali F; Romani D; Carabini ML:  
3D micro-CT analysis of cancellous bone architecture.  
Proc. SPIE, Developments in X-Ray Tomography III, Bonse U (Hrsg.);  
2002; 4503: 349-358
- Rüegsegger P; Koller B; Müller R:  
A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture.  
Calcif Tissue Int 1996; 58: 24-29
- Saltykov SA:  
Stereometric metallography.  
1st edition. (in Russian). State Publishing House of Metals Sciences, Moscow 1945
- Saltykov SA:  
The method of intersections in metallography.  
Zavodskaja laboratorija 1946; 12: 816-825
- Sapoval B; Filoche M; Weibel ER:  
Smaller is better – but not too small: A physical scale for the mammalian pulmonary acinus.  
Proc Natl Acad Sci 2002 August 6; 99: 10411-10416.



- Sasov A; Van Dyck D :  
Desktop X-ray microscopy and microtomography.  
J Microsc 1998; 191:151-158
- Satoh K; Kobayashi T; Ohkawa M; Tanabe M:  
Preparation of human whole lungs inflated and fixed for radiologic-pathologic correlation.  
Acad Radiol 1997; 4: 374-379
- Satoh K; Sato A; Nagahara Y; Kawase Y; Kobayashi T; Kojima K; Tanabe M:  
Improved method of preparation of inflated-fixed lung for radiologic-pathologic correlation.  
J Thorac Imaging 1994; 9: 112-115
- Scherle W:  
A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology.  
Mikroskopie 1970; 26: 57-60
- Schiechl H:  
Einige chemische Aspekte der Osmiumtetroxid-Fixierung.  
Z Naturforschg 1968; 23: 989-992
- Schiechl H:  
Einige theoretische Aspekte der Osmiumtetroxid-Fixierung.  
Mikroskopie 1974; 30: 38-45
- Seguin FH; Burstein P; Bjorkholm PJ; Homburger F; Adams RA:  
X-ray computed-tomography with 50  $\mu\text{m}$  resolution.  
Appl Opt 1985; 24: 4117-4123
- Smaldone GC; Mitzner W; Itoh H:  
Role of alveolar recruitment in lung inflation: influence on pressure-volume hysteresis.  
J Appl Physiol 1983; 55: 1321-1332
- Sobin SS; Fung YC; Tremer HM:  
The effect of incomplete fixation of elastin on the appearance of pulmonary alveoli.  
J Biomech Eng 1982; 104: 68-71
- Stockinger L; Hofer H:  
Preparation and fixation dependence of alveolar structures.  
Anat Anz 1970; 127: 200-209
- Strangeways TSP; Canti RG:  
The living cell in vitro as shown by dark-ground illumination and the changes induced in such cells by fixing reagents.  
Quart J Micr Sci 1927; 71: 1-14

- Stroh H:  
Röntgenologische Morphometrie der Lungenalveolen.  
Inauguraldissertation, JLU Gießen; 1991
- Taylor MD; Roberts JR; Hubbs AF; Reasor MJ; Antonini JM:  
Quantitative image analysis of drug-induced lung fibrosis using laser scanning  
confocal microscopy.  
Toxicol Sci 2002; 67: 295-302
- Tenney SM; Remmers JE:  
Comparative quantitative morphology of the mammalian lung: Diffusing area.  
Nature 1963; 197: 54-56
- Töndury G; Picco G:  
Zur Anatomie der Schweinelunge.  
Acta anat 1952; 16: 436
- Tsuda A; Filipovic N; Haberthür D; Dickie R; Matsui Y; Stampanoni M; Schittny JC:  
Finite element 3D reconstruction of the pulmonary acinus imaged by synchrotron  
X-ray tomography.  
J Appl Physiol 2008; 105: 964-976
- Ulmer KM; Honjo S:  
Quantitative evaluation of fixation and dehydration methods for scanning electron  
microscopic preparation of soft sea water organisms.  
Proc 6<sup>th</sup> Ann SEM Symposium ; Johari O (Hrsg.); IITRI, Chicago; 1973: 365- 373
- Waibl H:  
Atmungsapparat. In: Nickel R; Schummer A; Seiferle E: Lehrbuch der Anatomie  
der Haustiere; Bd. II-Eingeweide;  
8. Auflage; Parey, Berlin; 1999: 223-307
- Wangensteen D; Bachofen H; Weibel ER:  
Effects of glutaraldehyde or osmium tetroxide fixation on the osmotic properties of  
lung cells.  
J Microsc 1981; 124: 189-196
- Ware RW; LoPresti V:  
Three dimensional reconstruction from serial sections.  
Int Rev Cytol 1975; 40: 325-440
- Watz H; Breithecker A; Rau WS; Kriete A:  
Micro-CT of the human lung: imaging of alveoli and virtual endoscopy of an  
alveolar duct in a normal lung and in a lung with centrilobular emphysema – initial  
observations.  
Radiology 2005; 236: 1053-1058

- Webb WR; Müller NL; Naidich ND:  
High-resolution CT of the lung; third edition.  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001
- Weibel ER:  
Morphometry of the human lung.  
Springer Verlag und Academic Press; Heidelberg New York; 1963 a
- Weibel ER:  
Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs.  
Lab Invest 1963 b; 12: 131-155
- Weibel ER:  
A simplified morphometric method for estimating diffusing capacity in normal and emphysematous human lungs.  
Am Rev Resp Dis 1973; 107: 579-588
- Weibel ER:  
Stereological methods, vol 1: Practical methods for biological morphometry.  
New York; Academic; 1979 a
- Weibel ER:  
Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades  
Bull Europ Physiopath Resp 1979 b; 15: 999-1013
- Weibel ER:  
How does lung structure affect gas exchange ?  
Chest 1983; 83: 657-665
- Weibel ER:  
The pathway for oxygen.  
Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1984: 425 p.
- Weibel ER:  
Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods.  
J Microsc 1989; 155: 393-403
- Weibel ER:  
Design of Airways and Blood Vessels considered as Branching Trees.  
In: The Lung: Scientific Foundations eds. Crystal RG, West JB, Weibel ER and Barnes PJ  
Lippincott-Raven Philadelphia Vol one 1997; pp. 1061- 1071.
- Weibel ER; Cruz-Orive LM:  
Morphometric methods.  
In: The lung: scientific foundations; second edition; Crystal RG et al. (Hrsg.);  
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 1997; Kapitel 22: 333-343

- Weibel ER; Gomez DM:  
Architecture of the human lung.  
Science 1962; 137: 577-585
- Weibel ER; Vidone RA:  
Fixation of the lung by formalin steam in a controlled state of air inflation.  
Am Rev Respir Dis 1961; 84: 856-861
- Weiss MJ; Burri PH:  
Formation of interalveolar pores in the rat lung.  
Anat Rec 1996; 244: 481-489
- Whimster WF:  
Problems of the third dimension.  
Path Res Pract 1989; 185: 594-597
- Wiedemann H:  
Synchrotron Radiation.  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York; 2003
- Willet KE; Jobe AH; Ikegami M; Kovar J; Sly PD:  
Lung morphometry after repetitive antenatal glucocorticoid treatment in preterm sheep.  
Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1437-1443
- Wilson TA; Bachofen H:  
A model for mechanical structure of the alveolar duct.  
J Appl Physiol 1982; 52: 1064-1070
- Wright BM; Slavin G; Kreel L; Callan K; Sandin B:  
Postmortem inflation and fixation of human lungs. A technique for pathological and radiological correlations.  
Thorax 1974; 29: 189-194
- Xiao Y; Carbayo JJP; Weibel ER; Hsia CCW:  
Variation of lung volume after fixation when measured by immersion or Cavalieri method.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: L242-L245

## 7. Anhang

### A1: Zur Bestimmung des Alveolardurchmessers

Unter der Annahme, dass Alveolen ideale Kugeln darstellen, lässt sich der Durchmesser ( $d$ ) einer einzelnen Alveole berechnen. Bekannt sein müssen das Luftraumvolumen und die Oberfläche der Alveole sowie ein Proportionalitätsfaktor.

$$V_{\text{Kugel}} = (\pi \times d^3) / 6 \quad (1)$$

$$A_{\text{Kugel}} = \pi \times d^2 \quad (2)$$

Der Durchmesser ( $d$ ) kann wie folgt berechnet werden:

$$d = k \times (V / A) \quad (3)$$

$$k = (d \times A_{\text{Kugel}}) / V_{\text{Kugel}} \quad (4)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 1 und 2 in Gleichung 4 erhält man

$$k = 6 \times [(d \times \pi \times d^2) / (\pi \times d^3)] \quad (5)$$

In diesem Fall erhält man für den Proportionalitätsfaktor  $k$  den Wert 6.

Unter der Annahme, dass die Alveolen innerhalb des Messvolumens eine Gruppe von Kugeln unterschiedlicher Größe darstellen, stellt sich die Sachlage komplexer dar.

Der Proportionalitätsfaktor  $k$  hängt nicht nur von der Verteilung der Kugeln, sondern auch von der Variation der einzelnen Durchmesser ab.

### 1. FALL: HOMOGENE VERTEILUNG DER KUGELN

#### Beispiel A: Verschiedene Durchmesser

Im Falle fünf kleiner Kugeln ( $d_{\text{kl}} = 1 \text{ mm}$ ) und fünf großer Kugeln ( $d_{\text{gr}} = 2 \text{ mm}$ ) lässt sich der mittlere Durchmesser ( $d_{\text{m}} = 1,5 \text{ mm}$ ) gemäß Gleichung 3 berechnen.

Das Luftraumvolumen ( $V$ ) stellt die Summe des Volumens der fünf kleinen Kugeln [ $V_{\text{kl}} = 5 \times (\pi \times d_{\text{kl}}^3) / 6$ ] und des Volumens der fünf großen Kugeln [ $V_{\text{gr}} = 5 \times (\pi \times d_{\text{gr}}^3) / 6$ ] dar:

$$V = 5 \times (\pi \times d_{\text{kl}}^3) / 6 + 5 \times (\pi \times d_{\text{gr}}^3) / 6 \quad (6)$$

$$V = 5/6 \times \pi \times (d_{\text{kl}}^3 + d_{\text{gr}}^3) \quad (7)$$

Die Oberfläche (A) stellt die Summe der Oberfläche der fünf kleinen Kugeln

( $A_{kl} = 5 \times \pi \times d_{kl}^2$ ) und der Oberfläche der fünf großen Kugeln ( $A_{gr} = 5 \times \pi \times d_{gr}^2$ ) dar:

$$A = 5 \times \pi \times d_{kl}^2 + 5 \times \pi \times d_{gr}^2 \quad (8)$$

$$A = 5 \times \pi \times (d_{kl}^2 + d_{gr}^2) \quad (9)$$

Setzt man die Gleichungen 7 und 9 in Gleichung 3 ein, erhält man:

$$d_m = k \times [(d_{kl}^3 + d_{gr}^3) / (d_{kl}^2 + d_{gr}^2)] / 6$$

$$1,5 = k \times [(d_{kl}^3 + d_{gr}^3) / (d_{kl}^2 + d_{gr}^2)] / 6$$

$$1,5 = k \times [(1+8) / (1+4)] / 6 \quad (10)$$

$$1,5 = k \times 9 / 30$$

$$k = 5$$

In diesem Fall beträgt der Proportionalitätsfaktor  $k = 5$ .

#### Beispiel B: Ähnliche Durchmesser

Bei fünf kleinen Kugeln ( $d_{kl} = 1$  mm) und fünf großen Kugeln ( $d_{gr} = 1,1$  mm) lässt sich der mittlere Durchmesser ( $d_m = 1,05$  mm) nach Gleichung 3 berechnen.

Setzt man die Gleichungen 7 und 9 in die Gleichung 3 ein, erhält man:

$$d_m = k \times [(V_{kl} + V_{gr}) / (A_{kl} + A_{gr})]$$

$$1,05 = k \times [(d_{kl}^3 + d_{gr}^3) / (d_{kl}^2 + d_{gr}^2)] / 6$$

$$1,05 = k \times [(1 + 1,331) / (1 + 1,21)] / 6 \quad (11)$$

$$1,05 = k \times (2,331 / 2,21) / 6$$

$$k = 5,97$$

In diesem Fall beträgt der Proportionalitätsfaktor  $k = 5,97$ .

## **2. FALL: HETEROGENE VERTEILUNG DER KUGELN**

#### Beispiel C: Verschiedene Durchmesser

Im Falle einer kleinen Kugel ( $d_{kl} = 1$  mm) und neun großer Kugeln ( $d_{gr} = 2$  mm) lässt sich der mittlere Durchmesser ( $d_m = 1,9$  mm) nach Gleichung 3 berechnen.

Analog zu Gleichung 6 beträgt die Summe der Volumina:

$$V = 1 \times (\pi \times d_{kl}^3) / 6 + 9 \times (\pi \times d_{gr}^3) / 6 \quad (12)$$

Analog zu Gleichung 8 beträgt die Summe der Oberflächen:

$$A = 1 \times (\pi \times d_{kl}^2) + 9 \times (\pi \times d_{gr}^2) \quad (13)$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 12 und 13 in Gleichung 3 erhält man:

$$d_m = k \times [(V_{kl} + V_{gr}) / (A_{kl} + A_{gr})]$$

$$1,9 = k \times [(d_{kl}^3 + 9 \times d_{gr}^3) / (d_{kl}^2 + 9 \times d_{gr}^2)] / 6$$

$$1,9 = k \times [(1 + 9 \times 8) / (1 + 9 \times 4)] / 6 \quad (14)$$

$$1,9 = k \times (73 / 37) / 6$$

$$k = 5,78$$

Der Proportionalitätsfaktor beträgt dann  $k = 5,78$ .

Wenn die Durchmesser nur gering differieren (zum Beispiel weniger als 10 %), liegt der Wert für den Proportionalitätsfaktor  $k$  bei ungefähr 6 – unabhängig von der Verteilung der Kugeln.

## **A2: Statistik – Analyse nach Bland-Altman**

Die durchgeführten Korrelationsuntersuchungen auf Basis der akquirierten Daten dienen einerseits der Überprüfung der Genauigkeit der Mikromotographie sowie andererseits der Validität ermittelter Daten in der semiautomatischen morphometrischen Analyse.

Hierbei wird neben der Regressionsanalyse ein Mittelwert-Differenzen-Plot, die Analyse nach Bland-Altman (1986), durchgeführt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für den Vergleich zweier Methoden bei unbekanntem wahren Messwert. Der Grundgedanke ist, dass der Mittelwert der Messwerte der zu vergleichenden Methoden als die beste Annäherung an den wahren Messwert gilt. Bland und Altman (1986) weisen auf die nur beschränkte Aussagekraft des Korrelationskoeffizienten hin, wenn es darum geht, die Validität eines Messverfahrens im Verhältnis zu einem anderen zu prüfen, da dieser lediglich das Maß der Gleichläufigkeit (Linearität) zweier unterschiedlich erhobener Parameter ausdrückt. Der Forderung nach einem Verfahren, das nicht die Linearität, sondern besonders die Übereinstimmung der ermittelten Werte überprüft, wird die deskriptive Bland-Altman-Analyse gerecht.





## 8. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. S. Rau für die Überlassung des interessanten Themas sowie die wertvollen Anregungen und weiterführenden Kritiken. Sie haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Einen großen Dank möchte ich Herrn Dr. H. D. Litzlbauer für seine gute Betreuung aussprechen. Auch während der bei einer derartigen Grundlagenarbeit nicht zu vermeidenden Rückschläge stand er mir jederzeit mit konstruktiven Ratschlägen und einer stetigen Diskussionsbereitschaft zur Seite.

Ein außerordentlicher Reiz der Arbeit lag in ihrem interdisziplinären Charakter. In diesem Rahmen möchte mich bei den Mitarbeitern des Zentrums für Radiologie (Leiter: Prof. Dr. W. S. Rau), des Instituts für Pathologie (Leiter: Prof. Dr. A. Schulz) und des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, besonders auch seinem Leiter Prof. Dr. W. Kummer, für die wertvollen Beiträge danken. Folgende Personen möchte ich dabei besonders hervorheben:

Aus dem Zentrum für Radiologie bedanke ich mich bei Frau Gunhild Martels für das Scannen der Proben im Mikrotomographen und bei Frau Dr. Susanne Greschus für die Unterweisung in die bildverarbeitenden Schritte.

Herrn Gerd Magdowski aus der Abteilung Elektronenmikroskopie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie danke ich für das Einarbeiten in die elektronenmikroskopischen Techniken.

Für ihre wertvollen Beiträge zur Histologiegewinnung danke ich Herrn Dr. F. E. Franke (Institut für Pathologie) und Frau Tamara Papadakis (Institut für Anatomie und Zellbiologie).

Herrn PD Dr. T. Dreyer (Institut für Pathologie) danke ich für das Bereitstellen des Bildanalyseystems für die histomorphometrischen Analysen und seine diesbezüglichen Beratungen.

Meinen größten Dank möchte ich meinen Eltern für ihre in jeder Hinsicht einmalige Unterstützung aussprechen. Ohne ihren Rückhalt wären Studium und Promotion in dieser Form nicht möglich gewesen.



**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.