

Quantifizierung des dreidimensionalen glomerulären
Kapillarsystems von Schweinen mittels der
Mikro – und Nano – Computertomographie

Emmanuel René Karl Schneck

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2013

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

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Quantifizierung des dreidimensionalen glomerulären
Kapillarsystems von Schweinen
mittels der Mikro – und Nano – Computertomographie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Emmanuel René Karl Schneck

geboren in Siegen

Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen
Klinik für diagnostische Radiologie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. med. C. Heiß

Tag der Disputation: 1. November 2013

Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	ANATOMIE UND HISTOLOGIE DER NIERE	1
1.1.1	MAKROSKOPISCHE ANATOMIE DER NIERE	1
1.1.2	ANATOMIE DER RENALEN BLUTVERSORGUNG	2
1.1.3	AUFBAU DES GLOMERULUMS	3
1.1.4	DIE PORCINE NIERE IM VERGLEICH ZUR HUMANEN NIERE	6
1.2	GRUNDLAGEN DER MIKRO- UND NANO – CT – TECHNOLOGIE	7
1.2.1	GRUNDLAGEN DER MIKRO – CT – TECHNOLOGIE	7
1.2.2	GRUNDLAGEN DER NANO – CT – TECHNOLOGIE	10
1.2.3	KONTRASTMITTEL IN DER COMPUTERTOMOGRAPHIE	11
1.2.4	DIE ANWENDUNG DER MIKRO- UND NANO – COMPUTERTOMOGRAPHIE IN DER RENALEN BILDGEBUNG	12
1.3	FRAGESTELLUNG	15
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1	STUDIENDESIGN	16
2.2	STUDIENKOLLEKTIVE	16
2.3	PRÄPARATION UND PERFUSION DES RENALEN GEFÄßBAUMS	18
2.3.1	NIERENPRÄPARATION DER STUDIENPOPULATION 1	18
2.3.2	NIERENPRÄPARATION DER STUDIENPOPULATION 2	18
2.4	BILDGEBUNG	19
2.4.1	DIE MIKRO – CT – UNTERSUCHUNG	19
2.4.2	DIE NANO – CT – UNTERSUCHUNG	20
2.4.3	DIE QUANTITATIVE ANALYSE DER PROBEN	21
2.4.3.1	Die Messung der Anzahl der Gesamtglomeruli pro Gesamtfläche	22
2.4.3.2	Die Planimetrie des Glomerulums	22
2.4.3.3	Die Volumetrie des Glomerulums	23
2.4.3.4	Die Bestimmung des glomerulären Gesamt/Gefäßfraktions – Volumen und Flächenquotienten	23
2.5	HISTOLOGISCHE AUFBEREITUNG	24
2.5.1	FIXIERUNG DES HISTOLOGISCHEN PRÄPARATES	24
2.5.2	ZUSCHNEIDEN DES HISTOLOGISCHEN PRÄPARATES	24
2.5.3	FÄRBEN DES PRÄPARATES	25

2.6	DER VERGLEICH VON HISTOLOGIE UND MIKRO- UND NANO – CT	26
2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	ERGEBNISSE DES STUDIENKOLLEKTIVS 1	28
3.1.1	DIE VISUALISIERUNG INTRARENALER GEFÄßE	28
3.1.2	DIE ANZAHL DER GLOMERULI PRO FLÄCHE	30
3.1.3	DIE ERGEBNISSE DER GLOMERULÄREN PLANIMETRIE	30
3.1.4	DIE ERGEBNISSE DER GLOMERULÄREN VOLUMETRIE	32
3.1.5	DIE GLOMERULÄRE GEFÄßFRAKTION IM VERGLEICH ZUR VASKULÄREN GEFÄßFRAKTION	33
3.2	ERGEBNISSE DES STUDIENKOLLEKTIVS 2	34
3.2.1	DIE ANZAHL DER GLOMERULI PRO FLÄCHE	34
3.2.2	DIE ERGEBNISSE DER GLOMERULÄREN PLANIMETRIE	34
3.2.3	DIE GLOMERULÄRE GEFÄßFLÄCHE IN KORRELATION ZUR GLOMERULÄREN GESAMTFLÄCHE	36
4	DISKUSSION	38
4.1	DIE QUANTIFIZIERUNG DER RENALEN GEFÄßSTROMBAHN MITTELS DER MIKRO- UND NANO – COMPUTERTOMOGRAPHIE	38
4.2	DIE BILDGEBUNG DES RENALEN GEFÄßSTROMGEBIETS	40
4.3	LIMITATIONEN	47
5	AUSBLICK	48
6	ZUSAMMENFASSUNG	50
7	SUMMARY	51
8	LITERATURVERZEICHNIS	52
9	ANHANG	57
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	57
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
9.3	TABELLENVERZEICHNIS	60
9.4	MATERIALVERZEICHNIS	61
9.4.1	MATERIAL	61
9.4.2	FÄRBEMETHODEN	62

9.4.2.1	Haematoxylin-Eosin Färbung	62
9.4.2.2	Elastika-HE-Färbung nach Weigert	63
9.4.2.3	Trichrome Färbung nach Goldner-Masson	64
9.5	LEBENS LAUF	66
9.6	DANKSAGUNG	68
10	PUBLIKATIONEN	69

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Histologie der Niere

1.1.1 Makroskopische Anatomie der Niere

Die Nieren sind paarige, bohnenförmige Organe des Retroperitoneums. Sie sind 120 – 200 g schwer und messen im Längsdurchmesser 10 – 12 cm, in der Breite 5 – 6 cm und in der Dicke 4 cm. Die rechte Niere ist in der Regel etwas kleiner als die Linke und wird durch die Leber circa 2 cm nach kaudal verdrängt. Die Nieren werden in einen oberen und unteren Pol, den konvexen lateralen Rand und den medial liegenden Nierenhilus eingeteilt. Letzterer formt den Nierensinus, welcher den Ein- bzw. Austrittspunkt der Nierengefäße und des Ureters darstellt. Begrenzt werden die Nieren durch die Capsula fibrosa, eine kräftige Bindegewebskapsel. Um diese befindet sich ein Fettkörper, der von einem renalen Faszien­sack ummantelt wird.

Makroskopisch kann die Niere im Längsschnitt in 2 Zonen eingeteilt werden: Zentral befindet sich die Medulla renalis (Nierenmark), welche in eine helle Innen- und eine rötliche Außenzone unterteilt wird, peripher wird die Medulla renalis von dem bräunlichen Kortex renalis (Nierenrinde) ummantelt. Dieser teilt sich in einen subkapsulären Teil und in die Columnae renales (Bertini – Säulen) auf. Die subkapsulären Anteile der Nierenrinde liegen den Markpyramiden auf und werden von Markstrahlen durchsetzt, die als Längsstreifen erkennbar sind und den proximalen Anteilen der Nephrone entsprechen. Die Columnae renales befinden sich zwischen den Markpyramiden, erstrecken sich bis zum Nierenhilum und werden von den Arteriae (Aa.) und Venae (Vv.) interlobares durchzogen. Insgesamt beinhaltet das Nierenmark ca. 12 – 18 Markpyramiden. Auf Grund ihrer hilusgerichteten Anordnung grenzen ihre Basen an den Nierenkortex und ihre Spitzen an den Nierensinus. In ihnen sind ebenfalls Längsstreifen zu erkennen, welche nun den distalen Anteilen des tubulären Systems entsprechen. Sie münden in den Nierenpapillen, welche anschließend zum Nierenbecken konfluieren und im Ureter enden. Die Einheit einer Markpyramide und ihr zugehöriger Kortexanteil entsprechen einem Lobus renalis¹.

1.1.2 Anatomie der renalen Blutversorgung

Die Entgiftung des Körpers von harnpflichtigen Substanzen, die Regulation des metabolischen Systems und exkretorische Funktionen sind physiologische Hauptaufgaben der Niere. Dies erfordert einen komplexen Aufbau der renalen Blutgefäße und eine enge Verknüpfung zwischen dem vaskulären und tubulären System der Niere.

Die Nieren werden entsprechend der jeweiligen Seite durch die Arteria renalis dextra und sinistra mit Blut versorgt. Nachdem sich die Nierenarterien in zwei Hilusgefäße (Ramus principalis anterior und posterior) aufspalten, entspringen aus dem vorderen Hilusgefäß vier und aus dem Hinteren eine Segmentarterie. Diese münden in die Aa. interlobares, welche in den Bertini – Säulen zwischen den Markpyramiden in Richtung Nierenrinde verlaufen. An der Rinden – Mark – Grenze gehen die Aa. interlobares in die Aa. arcuatae über, die sich anschließend den Markpyramidenbasen anlegen. Die Aa. Arcuatae spalten sich radiär in die Aa. interlobulares auf, die in den afferenten Arteriolen der Glomeruli enden. In den Glomeruli formen sich die Kapillargefäße zu einem Gefäßknäuel und bilden zusammen mit der glomerulären Basalmembran die Blut – Harn – Schranke und somit den Ort der Harnfiltration. Das filtrierte Blut fließt anschließend in die efferenten Arteriolen der Nephrone. Sowohl die afferenten als auch die efferenten Arteriolen spielen durch die Interaktion von Vasokonstriktion und -dilatation eine entscheidende Rolle in der Autoregulation der glomerulären Durchblutung. Über den weiteren Verlauf der Gefäße entscheidet die Lage des Glomerulums. Die efferenten Arteriolen der subkapsulär gelegenen Glomeruli treten in das venöse Gefäßsystem über, während die Gefäße der marknahen Glomeruli die Vasa recta bilden und im Nierenmark ein zweites Kapillarnetz versorgen. Die arteriellen Vasa recta legen sich den Tubuli an, versorgen das Mark mit Blut und gehen anschließend weiter distal in die venösen Abschnitte der Vasa recta über (Abbildung 1.1). Diese enge anatomische Beziehung der arteriellen und venösen Vasa recta zu den Tubuli ist die Basis für das Gegenstromprinzip, welches die tubuläre Harnkonzentration und Rückresorption ermöglicht. Der Abfluss aus dem Mark in das venöse System der Niere erfolgt analog zu den arteriellen Gefäßen und mündet in die Vv. renales dextra und sinistra

2.

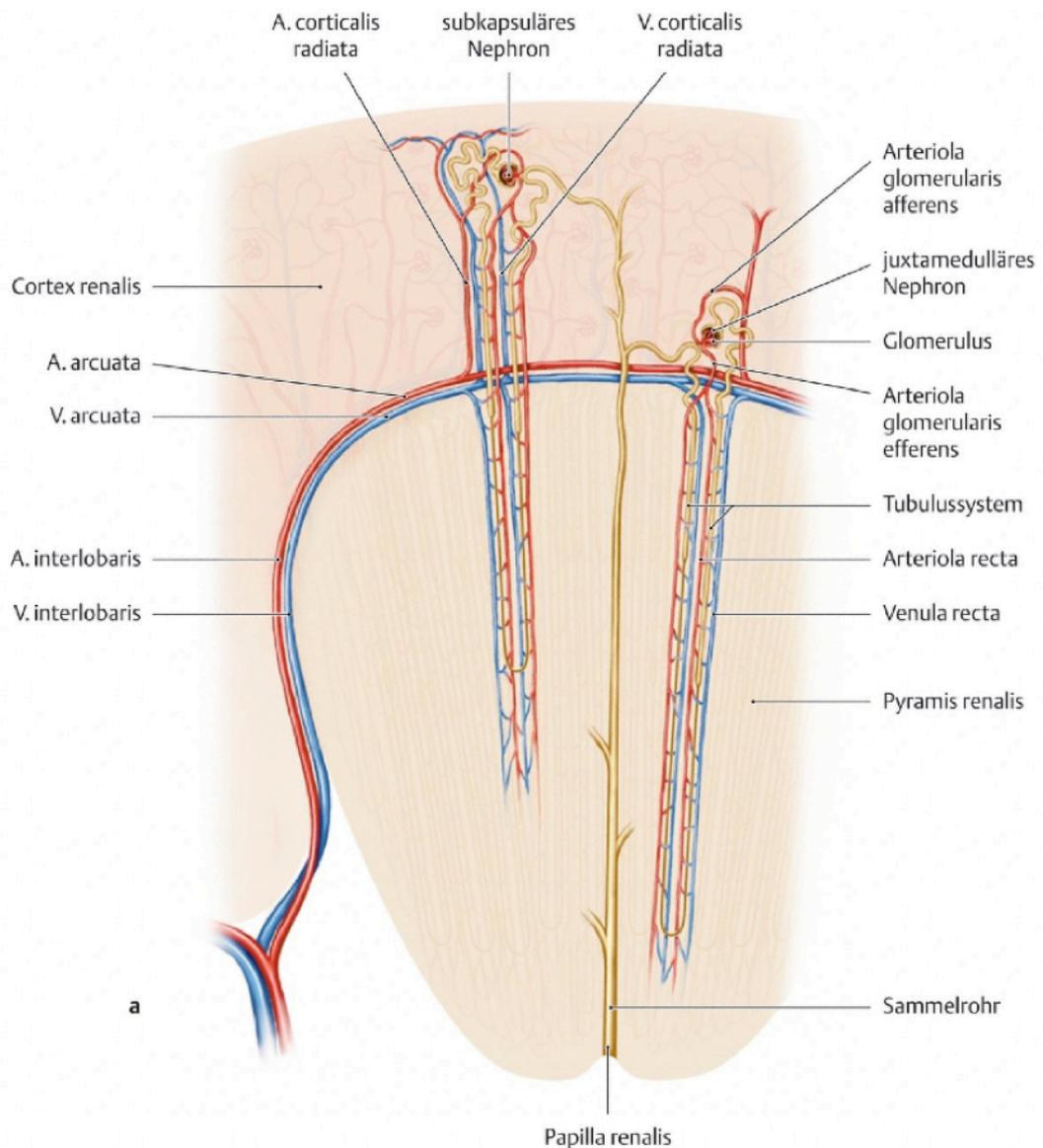


Abb. 1.1 Zeichnung der Endstrombahn renaler Gefäße. Die Gefäße unten links im Bild entsprechen der Arteria und Vena segmentaris. Die Arteria corticalis radiata entspricht der Arteria interlobularis. Entnommen aus Schünke et al., Prometheus Lernatlas der Anatomie, 2006²

1.1.3 Aufbau des Glomerulums

Das Nephron ist die funktionelle Einheit der Niere und besteht aus einem Glomerulum und dem zugehörigen tubulären System. Das Glomerulum ist die Schnittstelle zwischen dem Gefäß- und Harnsystem und ist aus diesem Grund stark vaskularisiert. Wie aus Abb. 1.2 zu entnehmen ist, kann das Glomerulum in zwei Pole unterschieden werden, die durch die Blut – Harn – Schranke voneinander

getrennt werden. Der Gefäßpol, bestehend aus dem zuführenden Vas afferens, einem Gefäßknäuel und dem abführenden Vas efferens, stülpt sich in die Bowman'sche Kapsel, deren Inneres den Harnpol bildet³.

Der glomeruläre Kapselapparat besteht aus einem viszeralen und einem parietalen Blatt. Das viszerale Blatt grenzt an die Kapillaren und ist Bestandteil der Blut – Harn – Schranke. Es schlägt an der Grenze des Gefäßknäuels um und geht anschließend in das parietale Blatt über. Dieses umschließt das Glomerulum von außen und entspricht dann der Bowman'schen Kapsel. Das viszerale Blatt formt sich aus den Primär- und Sekundärfortsätzen der Podozyten, welche die Kapillaren umstülpen. Die Sekundärfortsätze legen sich der 250 bis 350 nm dicken Basalmembran an. Die Lücken zwischen den Podozytenfortsätzen werden durch sehr dünne Schlitzmembranen mit einer Länge von 300 bis 500 nm und einer Breite von 35 bis 40 nm überbrückt⁴. Gegenüber den Podozytenfortsätzen grenzt die Basalmembran an das diskontinuierliche Endothel der Kapillaren (Porengröße 70 – 90 nm). Somit besteht die Blut – Harn – Schranke aus dem Endothel, der gemeinsamen Basalmembran und den Schlitzmembranen der Podozytenfortsätze. Die glomeruläre Ultrafiltration ist ein blutdruckabhängiger passiver Prozess und wird maßgeblich durch die Permeabilität der Blut – Harn – Schranke bestimmt. Die Permeabilität ist definiert durch die Größe der Poren in den Schlitzmembranen, der Lücken im diskontinuierlichen Endothel und der elektrischen Ladung der Basalmembran. So können nur Moleküle, die kleiner als 70 kDa sind, die Blut-Harn-Schranke passieren³. Sowohl die Basalmembran, als auch die Podozyten beinhalten einen hohen Anteil an einer stark negativ geladenen Glykokalyx, die ein Übertreten von Anionen und Proteinen erschwert. Plasmaproteine, wie z.B. das Albumin weisen auf Grund ihrer Aminosäurenanteile eine negative Ladung auf und stoßen sich daher von der Blut-Harn-Schranke ab^{3,4}.

Nach der Filtration gelangt der Primärharn in den proximalen Tubulus. In den weiteren Abschnitten des tubulären Systems werden die verschiedenen Bestandteile des Filtrats zurück in die Vasa recta resorbiert und Metabolite in den Urin sezerniert. Hierbei definieren die spezifischen Funktionen der verschiedenen Tubulusabschnitte deren Morphologie. Zu unterscheiden ist vom Glomerulum ausgehend der proximale Tubulus, die Henle'sche Schleife, der distale Tubulus sowie das Sammelrohr. Ein

Sammelrohr bildet das Endstück mehrerer Tubuli und endet mit anderen Sammelrohren in den Markkelchen.

Zwischen den Kapillaren des Glomerulums finden sich mesangiale Zellen. Sie dienen der Ernährung des Glomerulums, phagozytieren Zellreste und produzieren die mesangiale Matrix, welche den Raum zwischen den Kapillarschlingen füllt. Nicht zu verwechseln sind sie mit dem extraglomerulären Mesangium, das den Raum zwischen der sog. Macula densa und den endothelialen Polkissenzellen füllt. Die Macula densa entspricht einem chemosensitiven Feld, das den hohen Epithelzellen des distalen Tubulus aufliegt. Polkissenzellen sind epitheloide Myozyten, die das Vas afferens ummanteln und Renin produzieren. Zusammen bilden sie den juxtaglomerulären Apparat, welcher der Kommunikation zwischen dem vaskulären und tubulären System dient und ein wichtiges Stellglied im Renin – Angiotensin – Aldosteron – System darstellt^{3,4}.

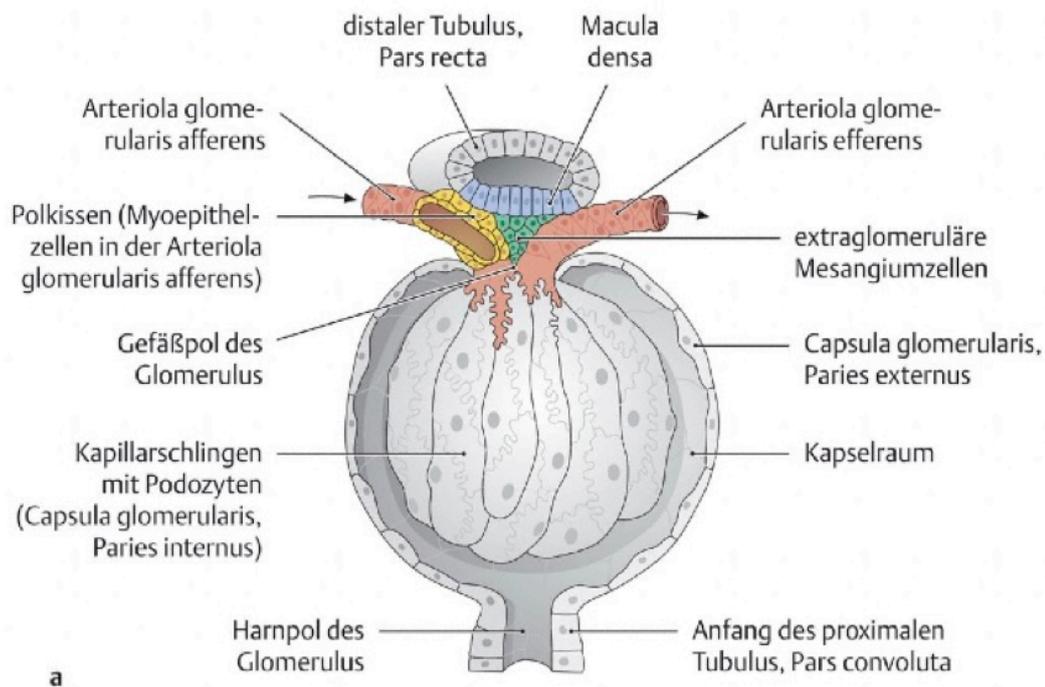


Abb. 1.2 Übersichtsskizze eines Glomerulums; Die im Text beschriebenen Vasa afferentes und efferentes werden mit Arteriola glomerularis afferens und efferens benannt. Entnommen aus Prometheus Lernatlas der Anatomie, 2006²

1.1.4 Die porcine Niere im Vergleich zur humanen Niere

Schweinenieren dienen in den unterschiedlichen medizinischen Disziplinen als Studienobjekte, da sie humanen Nieren im makro- und mikroskopischen Aufbau sehr ähnlich sind. Schweine besitzen wie Menschen zwei paarig angeordnete bohnenförmige Nieren. In der makroskopischen Betrachtung lassen sich entsprechend zur humanen Anatomie Kortex und Medulla renalis definieren sowie 8 – 12 Markpyramiden mit den entsprechenden Papillen- und Kelchsystemen. Die embryologische Verschmelzung der 6 – 8 Kortexplappen führt zu einer glatten Oberfläche, während in der Medulla die Markpyramiden und Kelche nicht assimilieren. Daher werden sowohl humane als auch porcine Nieren als glatt und mehrwarzig definiert ⁵. Auch das vaskuläre System der Niere zeigt im Aufbau große Ähnlichkeit zwischen Menschen und Schweinen. Im Gegensatz zu den meisten Säugetieren verlaufen hier die renalen Blutgefäße aus verschiedenen Segmentarterien stammend transversal vom dem Hilus ausgehend in die Peripherie anstatt longitudinal durch das Organ ⁶. Der histologische Aufbau der Nephrone ist ebenfalls gut vergleichbar. Sowohl die porcine Mikrogefäßarchitektur als auch die glomeruläre Histologie von Schweinenieren weisen gegenüber dem Menschen den gleichen Grundaufbau auf ⁷. Porcine Glomeruli verfügen mit einem mittleren Durchmesser von ca. 160 µm und einer mittleren Anzahl von ca. 1.200.000 Glomeruli pro Niere über sehr ähnliche Dimensionen wie beim Menschen, wobei eine hohe Variabilität dieser Parametern zwischen den unterschiedlichen ethnischen Gruppen zu beachten ist ⁸. Es ist außerdem eine starke Analogie zwischen der porcinen und humanen renalen Funktion beschrieben. So sind maximale Harnkonzentration und maximale Blut-/Harn – Quotienten von verschiedenen Parametern, wie z.B. den Elektrolyten vergleichbar ⁷. Suarez et al. zeigen außerdem, dass diese Zusammenhänge nicht nur zwischen normalen Schlachthauschweinen und dem Menschen zu finden sind, sondern auch zwischen Minipigs und dem Menschen ⁹.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass Schweinenieren sich für den Vergleich zur humanen Morphologie eignen und sich daher als Alternative in der biomedizinischen Forschung der menschlichen Nieren anbieten. Wie alle neuen morphologischen Untersuchungsverfahren korrelieren auch die Mikro- und Nano – CT ihre Ergebnisse mit dem Goldstandard der Histologie. Während für beide Spezies

ausgiebige histologische Untersuchungen vorhanden sind, ist eine Analyse von porcinen Nieren mittels der Mikro- oder Nano – CT – Technologie bisher noch nicht beschrieben.

1.2 Grundlagen der Mikro- und Nano – CT – Technologie

1.2.1 Grundlagen der Mikro – CT – Technologie

Die Mikro – CT (μ CT) ist ein bildgebendes Verfahren zur dreidimensionalen Darstellung und Quantifizierung von Geweben im μm – Bereich. Mit ihr ist eine vollständige dreidimensionale Rekonstruktion von Geweben in hochauflösenden Bildern möglich. Es werden heutzutage Ortsauflösungen von 5 – 10 μm isotroper Voxelgröße erreicht ¹⁰. Diese Eigenschaften bieten neuartige Perspektiven in der Analytik von Geweben. Insbesondere die lückenlose dreidimensionale Betrachtung und die Quantifizierung einer Probe in ihrer Vollständigkeit ergänzen die Histologie.

Die Computertomographie ist ein röntgenbasiertes Schnittbildverfahren, welches durch orts- und zeitfeste Überlagerung von Schnittbildern Bilddaten akquiriert und anschließend aus den verschiedenen Schwächungswerten der durchstrahlten Gewebe mittels einer speziellen Computersoftware Bilder rekonstruiert. Diese Rekonstruktionen werden visualisiert, analysiert und anschließend quantifiziert. Im prinzipiellen Aufbau der Mikro – CT – Geräte sind folgende Bestandteile zu unterscheiden: Eine Mikrofokusröntgenröhre dient als Strahlungsquelle und emittiert die Strahlen in Richtung des Untersuchungsobjektes, welches im Strahlengang auf einem beweglichen Probenschlitten rotiert. Die Röntgenstrahlen werden anschließend von einem Charged – Coupled – Detektor (CCD – Kamera) aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches an den Computer zur Rekonstruktion weitergeleitet wird (Abb. 1.3).

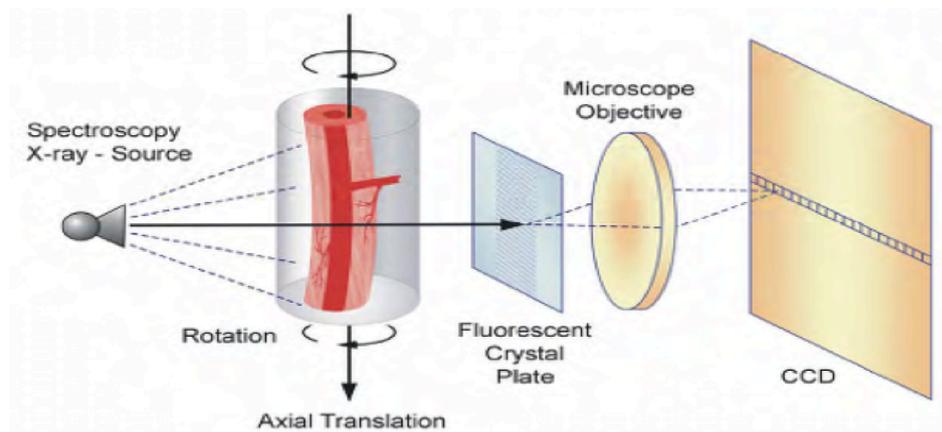


Abb. 1.3 Schemazeichnung der Funktionsweise einer μ CT mit Kegelstrahlgeometrie (mit freundlicher Genehmigung von Eric L. Ritman, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA).

Die hohe Ortsauflösung von μ CT – Scannern im Gegensatz zu konventionellen CT – Geräten bedingt einige Unterschiede in ihren Konstruktionen und in den technischen Details (Tab. 1.1). So können zur Bildakquisition in μ CT – Untersuchungen keine konventionellen Röntgenröhren verwendet werden, da diese keine zufriedenstellende Ortsauflösung und Bildqualität im Mikrometerbereich erreichen. Um diese zu ermöglichen, werden optimierte Fein- und Mikrofokusröhren verwendet. Diese werden mit Transmissions- oder Reflektionsanoden kombiniert und ermöglichen daher eine weit geringere Fokusgröße ($5 - 30 \mu\text{m}$) als konventionelle Röntgenröhren. Die unterschiedlichen Strahlungsquellen erfordern eine spezifische Geometrie des Scanners, der die emittierte Strahlung auffängt. Feinfokusröhren werden daher mit einem Fächerstrahldetektor betrieben, während Mikrofokusröhren mit einem Kegelstrahldetektor kombiniert werden. Zwischen dem Strahlenermitter und dem Strahldetektor befindet sich ein Probenschlitten, der zum einen in der horizontalen Ebene verschiebbar ist und zum anderen das Untersuchungsobjekt in der vertikalen Achse gradgenau drehen kann. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu einem konventionellen CT der Strahlengang und nicht das Objekt fixiert ist. In der μ CT dreht sich das Studienobjekt gradgenau im Strahlengang während in einem herkömmlichen CT die Gantry um das Studienobjekt rotiert. Die Bewegung des Probenschlittens in der Längsachse auf die Röntgenröhre zu oder weg führt zu einer Vergrößerung bzw. Verkleinerung des Bildes. Analog zur Optik ist allerdings der Vergrößerungsfaktor maßgeblich von der optimalen Einstellung der Fokusgröße und Strahlungsintensität abhängig. Um eine optimale Bildauflösung zu erreichen, wird

eine minimale Fokusgröße angestrebt, die allerdings eine hohe Strahlungsintensität benötigt. Diese physikalische Bedingung verursacht ein technisches Dilemma, da eine geringe Fokusgröße mit einer reduzierten Röhrenleistung einhergeht und somit auch eine verringerte Strahlungsintensität bewirkt. Die Lösung dieses Problems findet sich in längeren Scanzeiten mit schwächerer Strahlung^{10,11}. Ein weiteres Problem der Bildvergrößerung stellen die Detektorkameras dar. Die CCD – Kamera registriert die Strahlung und leitet die Absorptionsbilder an den Computer weiter. Ist ein Projektionsbild größer als die Kamera oder ist die Strahlungsquelle zu nah am Brennpunkt und daher das Projektionsbild zu groß, kann die Kamera das Bild nicht mehr exakt erfassen und führt in der späteren Bildberechnung zu Artefakten. Im letzten Schritt der Bildakquisition treffen die Strahlen auf eine 25 µm starke Szintillatorschicht. Diese besteht aus Caesiumiodid und Thallium und wandelt die elektromagnetische Strahlung in Lichtsignale um, welche durch eine gekühlte 12 – bit – CCD – Kamera (max. Matrixgröße 1024 x 1024 Pixel) aufgenommen und in Bildinformationen an einen Rechner weitergeleitet werden. Dieser kann dann mit Hilfe des Feldkamp – Algorithmus, einer Rückprojektionstechnik aus den Detektorbildern, axiale Tomogramme erstellen^{12,13}. Nach Einstellung und Optimierung der Grauwerte in den Tomogrammen kann eine serielle Darstellung des untersuchten Objektes erfolgen, welche anschließend der dreidimensionalen Rekonstruktion als Grundlage dient. Die weitere Bearbeitung und Auswertung erfolgt durch eine spezielle Bildanalyse – Software.

	Ganzkörper – Spiral – CT	Mikro – CT
Geometrie	Fächerstrahl Detektor und Röhre rotieren	Fächer- oder Kegelstrahl Objekt rotiert
Maximale Ortsauflösung in der Schicht	0,25 - 1,00 mm	5 - 50 μ m
Schichtdicke	0,50 - 2,00 mm	5 - 50 μ m
Röhre	Hochleistungs – CT – Röhre	Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	10 - 500 mA	40 - 100 μ A
Spannung	80 - 140 kV	10 - 150 kV
Fokusgröße	0,7 - 1,5 mm	5 - 30 μ m
Detektor	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
Objektdurchmesser	5 - 50 cm	< 5 cm
Matrixgröße	512 ²	512 ³ - 1024 ³
Speicherbedarf	0,5 MB/Bild (16bit) 160 MB/Datensatz	1,5-2,1 MB/Schicht (16 - bit) 270-2150 MB/Datensatz
Volumenscanzeit	20 - 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Tab. 1.1 Charakteristika von Mikro – CT – Scannern im Vergleich mit klinischen Spiral- CT – Scannern (modifiziert nach Engelke et al. Der Radiologe. 1999)¹⁰

1.2.2 Grundlagen der Nano – CT – Technologie

Die Nano – CT (NCT) ist eine neuartige Technologie, die 2005 durch die Firma Skyscan® eingeführt wurde. Der herausragende Unterschied zu der μ CT ist das hohe Ortsauflösungsvermögen von bis zu 500 nm, das eine detailreiche Darstellung von Strukturen bis zu 200 nm ermöglicht¹⁴. Ähnliche Ortsauflösungen können sonst nur mittels der aufwendigen und kostenintensiven Synchrotron – μ CT erreicht werden. Daher bietet die NCT eine neue Methode in der dreidimensionalen Darstellung und Quantifikation im Submikrometerbereich. Gegenüber der Histologie weist sie dieselben Vorteile auf wie die μ CT, d.h. die zerstörungsfreie kontinuierliche dreidimensionale Darstellung und zuverlässige Quantifikation des Untersuchungsobjektes.

Die NCT entspricht in ihrem Grundaufbau von Strahlenemitter, drehbaren Probenschlitten, Strahlendetektor und Computersystem dem der μ CT. Die hohe Ortsauflösung wird durch mehrere hintereinander geschaltete elektromagnetische Blenden und Linsen erreicht, die eine Fokussierung des Elektronenstrahls bis in den Submikrometerbereich ermöglichen. Die dazu nötige Röhrenspannung liegt bei den verschiedenen NCT – Geräten zwischen 20 und 80 kV. Eine zusätzliche Konzentration der Strahlung wird erreicht, indem sie direkt nach ihrer Emission aus der Mikrofokusröhre durch eine mit Wolfram beschichtete Berylliumglasplatte, dem sog. Target geleitet wird. Die Röntgenstrahlen werden von der Wolframschicht (5 μ m Dicke) abgelenkt und treffen auf das sich rotierende Untersuchungsobjekt. Durch diesen speziellen technischen Aufbau kann der Röntgenstrahl eine Fokusgröße von < 500 nm erreichen und ist somit gegenüber in der μ CT mit einer Fokusgröße von 5 – 30 μ m überlegen. Der weitere Ablauf der Bildakquisition entspricht dem der μ CT, d. h. die Strahlung wird von einer 12 – bit wassergekühlten CCD – Kamera (1024 x 1024 Pixel) erfasst und in optische Signale umgewandelt. Die weitere Verarbeitung und anschließende Quantifizierung der Bilddaten findet mittels einer speziellen Software statt ¹⁵.

1.2.3 Kontrastmittel in der Computertomographie

Kontrastmittel werden sowohl in der computertomographischen als auch in der sonographischen und magnetresonanztomographischen Bildgebung genutzt. Sie dienen der besseren Differenzierung von Gewebsanteilen und ermöglichen Aussagen über die Integrität, Vitalität und Funktion eines Organs. Die Computertomographie unterliegt dabei im höchsten Maße dem Nutzen der Kontrastmittelperfusion, da ihr wie jedem röntgenstrahlenbasierenden Verfahren die Darstellung unterschiedlicher Gewebedichten zu Grunde liegt. Kontrastmittel verursachen röntgenologische Dichteunterschiede, welche anschließend im Bild wahrnehmbar sind. So ist eine Differenzierung von benachbarten Weichteilgeweben, die ähnliche Röntgendichten und somit eine geringe Kontrastierung aufweisen mit einer nativen Röntgenaufnahme nicht möglich und ist erst nach einer Kontrastmittelperfusion erfolgreich.

In der renalen Bildgebung werden die Sonographie, die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Computertomographie mit Kontrastmittel kombiniert und somit eine dreidimensionale Darstellung der renalen Gefäß- und Organstruktur bis zu einer Ortsauflösung von unter einem Millimeter erreicht ¹⁶. Die μ CT und NCT nutzen Kontrastmittel ebenfalls, um das renale Gefäßsystem dreidimensional darzustellen und somit eine quantitative Analytik im Mikro- und Submikrometerbereich zu erreichen.

In der klinischen Routine werden neben wasserlöslichen jodhaltigen Kontrastmitteln häufig wasserunlösliche bariumsulfathaltige Kontrastmittel verwendet. In der biomedizinischen Ex – vivo – Darstellung von Gefäßen werden neben den bariumsulfathaltigen Kontrastmitteln auch Silikon und Chromat enthaltende Kontrastmittellösungen (z.B. Microfil[®], Flowtech Inc., Claver, Ma, USA) benutzt. Letztere weisen gegenüber den bariumhaltigen Kontrastmitteln einige Vorteile auf: Sie sind weniger viskös und lassen sich daher leichter und mit weniger Perfusionsdruck in die Nierenarterien applizieren. Dies reduziert die Gefahr der Gefäßverletzungen und ermöglicht eine vollständigere und gleichmäßigere Verteilung im Gefäßbaum. So können mit Microfil[®] Kapillaren bis zu einem Durchmesser von 20 μ m perfundieren werden ¹⁷. Ein weiterer Vorteil ist der hydrophobe Charakter von Microfil[®], da er einer Diffusion in das umliegende Gewebe entgegenwirkt. Da bariumsulfathaltige Kontrastmittel eine höhere Viskosität besitzen und deutlich schneller im Gefäßsystem aushärten, eignen sie sich für die Visualisierung und Quantifizierung kapillärer Strukturen in der Mikro- oder Nano – CT weniger als Microfil[®].

1.2.4 Die Anwendung der Mikro- und Nano – Computertomographie in der renalen Bildgebung

Die Mikro- und Nano – CT haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten als Ergänzung zur Histologie in der ex – vivo – Forschung etabliert. Besonders in der kardiovaskulären Forschung haben sie Einzug erhalten, da sie die Quantifizierung der Gefäßarchitektur in ihrer vollen Kontinuität bis in die kleinsten Gefäßanteile ermöglichen ^{11,18,19}. Die Entwicklung der μ CT hat in der medizinischen Forschung

mit der Strukturanalyse osteoporotischer Knochen begonnen, da diese von Natur aus einen hohen Kontrast zwischen Knochenbälkchen und den zwischen ihnen befindlichen Markanteilen aufweisen und somit keiner Kontrastmittel bedurften^{10,20}. Durch die Weiterentwicklung der μ CT – Geräte und mit der Verwendung von Kontrastmitteln wurden die Möglichkeiten zur dreidimensionalen Visualisierung und Quantifizierung optimiert und die Einsatzbereiche der μ CT erweitert. Dieser Fortschritt wurde v.a. zur Darstellung parenchymatöser Organe und ihrer Gefäßarchitektur genutzt. Jorgensen et al. quantifizierten 1998 erstmals die koronararteriellen Vasa vasorum von Ratten mittels der μ CT und präsentierten so die Möglichkeit einer kontinuierlichen dreidimensionalen Gefäßdarstellung bis zu einer isotropen Voxelgröße von 5 – 25 μm ²¹. Dies gelang durch die Perfusion der Koronararterien mit einem Kontrastmittel. Basierend auf dieser Arbeit wurden zunehmend auch andere parenchymatöse Organe und ihr Gefäßsystem mittels der μ CT quantifiziert. Dabei dienten v.a. Mäuse und Ratten als Tiermodelle^{11,18,19}. So wurden im Rahmen dieser Entwicklung auch murine Nieren in der μ CT untersucht. Glomeruläre und peritubuläre Gefäße von Mäusen wurden erstmals vollständig von Garcia et al. dreidimensional dargestellt und quantifiziert²². Allerdings gelang nicht die Visualisierung des gesamten Nephrons. Die fehlende Quantifizierung der tubulären Anteile eines Nephrons konnten später mittels einer modifizierten Fixierung der Nierenproben durch Bentley et al. präsentiert werden²³. Nachdem die Methodik zur Quantifizierung von gesunden Mäuse- und Rattennieren in reliabler und guter Qualität etabliert wurde, verlagerte sich das Interesse auf die Analyse renaler Pathologien mittels der μ CT. So zeigten Langheinrich et al., dass das vaskuläre Volumen von Mäuseglomeruli infolge einer systemischen Artherosklerose abnimmt und mit glomerulären Schäden assoziiert ist. Als Tiermodell wurde eine apoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout Maus verwendet, die ein etabliertes Tiermodell zur Imitierung humaner Artherosklerose darstellt²⁴.

Die NCT ist wie die μ CT mit Hilfe von Kontrastmittel zur Quantifizierung des vaskulären Anteils von Organen geeignet und erreicht Ortsauflösungen bis zu 200 nm^{15,25}. Dies war bisher nur der sehr aufwendigen und teuren Synchrotronstrahlen – Technik vorbehalten. Die hohe Ortsauflösung und die dreidimensionale Bildgebung erlauben volumetrische Messungen im kapillären Bereich. Dies ist für die Niere besonders interessant, da verschiedene systemische Erkrankungen zu kapillären

Schäden an den Glomeruli führen und somit mittels der NCT neue Aspekte in der pathomorphologischen Analyse eingebracht werden können. So konnten beispielsweise Langheinrich et al. bereits mittels der Nano – CT Zeichen der Glomerulopathie an murinen Nieren demonstrieren^{24,25}. Daher ist davon auszugehen, dass die NCT auch in der renalen Gefäßdarstellung der porcinen Niere die Histologie mit ihren kontinuierlichen dreidimensionalen Bildern und detaillierten Quantifizierungsmöglichkeiten im Submikrometerbereich ergänzen kann.

1.3 Fragestellung

Die Nierenfunktion basiert auf dem komplexen Aufbau des renalen Gefäßbaums. Das anatomische Wissen über glomeruläre Strukturen entstand insbesondere durch die mikroskopische Betrachtung und histologische Analyse^{26–28}. Die Histologie ist allerdings nur ein zweidimensionales Verfahren und erfasst das Studienobjekt nicht in seiner vollen Heterogenität, da hierfür eine vollständige dreidimensionale Erfassung notwendig ist. Um die renale Gefäßarchitektur in seiner vollen Kontinuität und Komplexität darzustellen und zu quantifizieren sind verschiedene Methoden, wie z.B. die Elektronenmikroskopie, stereologische Verfahren, Konfokalmikroskopie und Computer – gestützte Rekonstruktionsprogramme erprobt worden^{29–33}. Die Ergebnisse dieser Methoden sind bisher v.a. in der Quantifizierung kapillärer Gefäße nicht zufriedenstellend. Vor dem Hintergrund erfolgreicher Gefäßdarstellungen in der Mikro- und Nano – CT bietet sich diese als Alternative an. Daher ist die kontinuierliche und dreidimensionale Bildgebung sowie die Quantifizierung verschiedener renaler Strukturen des Schweines, insbesondere des Glomerulums mittels Mikro- und Nano – CT Ziel der vorliegenden Dissertation.

Speziell sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist eine lückenlose dreidimensionale Darstellung renaler Strukturen von Schweinen in der Mikro- und Nano – CT möglich? Folgende Strukturen sind dabei von Interesse:
 - a. das Glomerulum
 - b. das Kapillarnetz des Glomerulums
2. Gibt es signifikante Unterschiede in der Quantifizierung von glomerulären und vaskulären Parametern in der μ CT im Vergleich zur NCT und der Histomorphometrie?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Dissertation ist eine multizentrische Studie des radiologischen und pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen und der Mayo Klinik, Rochester, USA (Leitung Lilach O. Lerman, M.D.; Ph.D., Department of Nephrology and Hypertension). Das Studiendesign sieht zur Bearbeitung der Fragestellungen zwei Studienkollektive vor (s.2.2). Die Nieren ($n = 17$) werden mit einem Kontrastmittel perfundiert und fixiert. Nach dem Zuschneiden sollen die Präparate jeweils in der μ CT und NCT gescannt und anschließend mittels der Histomorphometrie quantitativ untersucht werden. Die Analyse der CT – Bilder findet im radiologischen Labor des Universitätsklinikums Gießen statt und umfasst die Beurteilung der Bildqualität in Bezug auf die Kontrastmittelperfusion und Darstellbarkeit des renalen Gefäßbaums sowie die Quantifizierung der glomerulären und vaskulären Strukturen. Die Histomorphometrie ist der Goldstandard zur Darstellung und Quantifizierung von Geweben im Mikrometerbereich und dient aus diesem Grunde als Referenzmethode für die Messdaten der Mikro- und Nano – CT. Die Präparation und Analyse der histologischen Schnitte erfolgt im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen. Die Techniken zu diesen Untersuchungen sind sowohl im Mikro- und Nano – CT – Labor der Radiologie als auch im histologischen Labor der Pathologie etabliert.

2.2 Studienkollektive

Insgesamt werden für die Studie 17 Nieren von 12 Schweinen untersucht. Die Gruppe der Schlachthauschweine ($n = 5$) ist als Studienkollektiv 1 definiert, während die der Minipigs ($n = 7$) als Studienkollektiv 2 definiert ist..

Die Tiere des ersten Studienkollektivs stammen aus dem täglichen Betrieb eines lokalen Schlachthauses, während die Nierenproben des zweiten Studienkollektivs Präparate des wissenschaftlichen Labors der radiologischen Abteilung der Mayo Klinik sind. Diese werden im Rahmen einer Studie zur Untersuchung von

Nierenarterienstenosen an adulten Minipigs gewonnen. Die Kollektive dieser Studie bestehen aus gesunden Referenztieren und sog. 2 – Kidney – 1 – Clip – Tieren (2K1C). Letztere weisen eine artifizielle Verengung einer Nierenarterie auf, um eine renale Hypertonie zu verursachen. Daher stehen die Nieren der hypertensiven Tiere im Zentrum der Untersuchung, weshalb die gesunden Nieren der Referenztiere für die hiesige Studie genutzt werden können. Die Gesundheit der Tiere im Studienkollektiv 1 ist durch die veterinärmedizinische Begutachtung im Schlachthausbetrieb garantiert, während die Schweine aus Gruppe 2 regelmäßig im Rahmen der Nierenarterienstenosen – Studie an der Mayo Klinik, Rochester, untersucht werden.

Das Studienkollektiv 1 besteht aus 10 Nieren von 5 Schlachthauschweinen. Pro Niere werden jeweils 10 Stenzen entnommen, d.h. es ergibt sich eine Gesamtanzahl von 100 Proben. Die Analyse und Quantifizierung der Proben findet mittels der Histologie, der Mikro- und Nano – CT statt.

Das Studienkollektiv 2 setzt sich aus 7 Nieren von 7 domestizierten Minipigs zusammen. Aus diesen Proben wurden ebenfalls jeweils 10 Stenzen entnommen, was zu einer Gesamtanzahl von 70 Proben führt. Diese wurden mit der NCT und der Histologie analysiert und quantifiziert.

Die Grundcharakteristika beider Studienkollektive sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Parameter	Studienkollektiv 1	Studienkollektiv 2
Stichprobenumfang (N)	5 Schweine, 10 Nieren	7 Schweine, 7 Nieren
Gewicht	120 kg	45 – 55 kg
Alter	6 Monate	25 Wochen
Spezies	Schlachthauschweine	Minipigs
Geschlecht	gemischt	weiblich

Tab. 2.1 Darstellung der Grundcharakteristika der beiden Studienkollektive

2.3 Präparation und Perfusion des renalen Gefäßbaums

2.3.1 Nierenpräparation der Studienpopulation 1

Die Nieren werden aus der täglichen Schlachtung eines lokalen Schlachthauses gewonnen. Um eine Thrombosierung des Blutes im renalen Gefäßbaum zu verhindern, werden die Nieren unmittelbar nach der Schlachtung mit einer Kochsalzlösung gespült. Hierzu kanüliert man die Nierenarterie und spült sie so lange mit einer 0,9 %igen gepufferten Kochsalzlösung bis die Nierenvenen blutleer erscheinen und die Kochsalzspülung widerstandslos möglich ist. Im Anschluss werden die Nieren so lange mit einem bariumsulfathaltigen Kontrastmittel perfundiert, bis es die Nierenvenen vollständig füllt. Zur Vorbereitung dieses Kontrastmittels müssen 500 ml Bariumsulfat (Micropaque®, Guerbet, Sulzbach, Deutschland), 42 g Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 15 g Thymol (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter Erwärmung vermischt und in fünf 100 ml Perfusorspritzen aufgezogen werden. Nach der Kontrastmittelapplikation werden die großen Nierengefäße mit Ligaturen verschlossen und auf Eis gelagert. Im radiologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen findet die Entnahme von zehn 1 cm³ Stanzen aus der Nierenrinde für die μ CT – Untersuchung statt. Für die NCT – Scans müssen aus diesen Stanzen 10 mm hohe, und 2-3 mm breite und lange Streifen geschnitten werden.

2.3.2 Nierenpräparation der Studienpopulation 2

Die Nieren werden im Rahmen einer Studie der Mayo Kliniken in Rochester, MN, USA zur Untersuchung von Nierenarterienstenosen an Minipigs gewonnen. Diese Studie definiert zwei Studienkollektive: eine Studienpopulation mit normotensiven und eine mit hypertensiven Schweinen. Die hypertensiven Schweine entwickeln nach einer Clipimplantation an einer der zwei Nierenarterien eine renovaskuläre Hypertonie. Im Rahmen dieser Studie werden nach der Schlachtung die Nieren der normotensiven Schweine mit Microfil® Kontrastmittel (Microfil® MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) perfundiert. Hierzu verläuft die Kontrastmittelapplikation analog zu der Nierenperfusion der Studienpopulation 1. Sobald der venöse Schenkel makroskopisch blutleer erscheint, wird die kanülierte

und gespülte Nierenarterie mit Hilfe einer Perfusorspritze unter einem Stempeldruck von ca. 100 mmHg mit der gelben Microfil® – Lösung perfundiert. Ist das Kontrastmittel in den oberflächlichen Gefäßen sichtbar und tritt es aus den Nierenvenen blasenfrei aus, werden die großen Nierengefäße mit einer Ligatur verschlossen. Nach 20 minütiger Aushärtungszeit können anschließend analog zur Studienpopulation 1 Stenzen aus der Nierenrinde gefertigt werden.

2.4 Bildgebung

2.4.1 Die Mikro – CT – Untersuchung

Die mit Kontrastmittel perfundierten und anschließend fixierten Proben werden mit dem Mikro – Computertomographen (Mikro-CT_1072) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) in der Abteilung für Radiologie am Universitätsklinikum in Gießen, Deutschland gescannt.

Die Proben sind auf dem sich in der vertikalen Achse drehenden Schlitten fixiert. Im ersten Schritt wird eine Übersichtsaufnahme der Probe gefertigt um einen Eindruck über die Gesamtperfusion und Qualität der Probe zu gewinnen. Dann werden die in Parafilm®-Folie verpackten Präparate in Winkelschritten von 0,45° um insgesamt 180° bei einer Röhrenspannung von 60 kV, einem Strom von 80 µA und einer Vorfilterung mittels einer 3 mm starken Aluminiumplatte gescannt. Die geringe Röhrenspannung führt zu der langen Belichtungszeit von 2,4 s pro Winkelschritt. Die Röntgenstrahlung wird von einer gekühlten (-40 °C) 12 – bit – CCD – Kamera (1024 – 1024 Pixel) detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Anschließend können die Akquisitionsbilder mit Hilfe der Rückprojektionstechnik nach Feldkamp^{12,13} in isotrope axiale Tomogramme umgewandelt werden. Die Rekonstruktion der Datensätze resultiert in dreidimensionalen Bildern mit einer isotropen Voxelgröße von 14 µm und 8 bit Grauwertstufen. Die Rekonstruktion dauert hierbei bei Verwendung eines dualen Intel® Xeon™ Prozessors (2 x 1800 MHz, 1024 MB RAM) ca. 6 Stunden. Die technischen Details der µCT 1072 der Firma Skyscan werden in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.4.2 Die Nano – CT – Untersuchung

Die Nierenproben werden im radiologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen mittels einer NCT vom Typ 2011 der Firma Skyscan aus Belgien untersucht.

Die grundlegende Technik ist in Kapitel 1.2.2 dargestellt. Die NCT 2011 der Firma Skyscan nutzt als Strahlenemitter eine vakuumevakuierte Mikrofokusröhre, die mittels einer LaB_6 – Kathode einen Elektronenstrahl freisetzt. Dieser wird durch zwei elektromagnetische Linsen gebündelt und auf die Anode fokussiert. Die gebündelten Strahlen treffen anschließend auf das Target, welches aus einer wolframbeschichteten Berylliumglasplatte besteht. Das Target bricht den Elektronenstrahl und sorgt so für die Entstehung von Röntgenstrahlen mit einer Fokusgröße unter 400 nm. Der weitere Strahlengang der Röntgenteilchen ist in einer Fächergeometrie formiert und trifft auf die sich in der vertikalen Achse um 180° drehende Probe. Dabei wird eine Röhrenspannung von 40 kV angelegt und in Winkelschritten von $0,5^\circ$ mit je 2,4 s Belichtungszeit gescannt. Die Röntgenstrahlen treffen hinter dem Untersuchungsobjekt auf den Detektor, der aus einer Szintillatorschicht, einem Bildverstärker und einer hochauflösenden digitalen 12 – bit – CCD – Kamera (1280 x 1024 Pixel) besteht. Analog zur Mikro-CT-Untersuchung werden die Messungen mit dem modifizierten Feldkamp-Algorithmus dreidimensional rekonstruiert und Volumendatensätze mit einer 8-bit Grauwertverteilung und einer isotropen Voxelgröße von $1,2 \mu\text{m}$ bzw. 390 nm Kantenlänge generiert. Zusammenfassende Details werden in der Tabelle 3.2 aufgeführt.

Parameter	Skyscan Mikro-CT 1072	Skyscan Nano-CT 2011
Geometrie	Fächer- oder Kegelstrahl Objekt rotiert	Fächerstrahlgeometrie Objekt rotiert
Maximale Ortsauflösung		
in der Schicht	5 μm	150 – 200 nm
Schichtdicke	5 μm	< 400 nm
Röhre	Mikrofokusröhre	Mikrofokusröhre
Spannung	20-150 kV	20 – 80 kV
Fokusgröße	5-30 μm	<400 nm
Detektor	Flächendetektor	Flächendetektor
Objektdurchmesser	< 5 cm	0,2 bis 1 mm
Kamera	12-bit-CCD-Kamera 1024 x 1024 Pixel gekühlt auf -40 °C	12-bit-CCD-Kamera 1280 x 1024 Pixel gekühlt auf -40 °C
Volumenscanzeit	Minuten bis Stunden	ca. 15 – 90 Minuten (1280 x 1280 x 900 Pixel)
Bildrekonstruktion		
Grauwerte	8 bit	8 bit
Isotrope Voxelgröße	14 μm	1,2 μm

Tab. 3.2 Übersichtstabelle zu den technischen Eigenschaften der μCT 1072 und NCT 2011 der Firma Skyscan^{10,34}

2.4.3 Die quantitative Analyse der Proben

Die aus der Mikro- und Nano – CT gewonnenen Daten der Nierenproben beider Studienpopulationen werden mit der ANALYZE[®] 9.0 Software der Mayo Clinic, Rochester, MN, USA analysiert. Die histologische Analyse findet mit dem Programm Diskus (Diskus 4.50.1003, C. H. Hilgers, Königswinter, Deutschland) statt. Dabei werden folgende Parameter gemessen:

1. Anzahl der Glomeruli/Fläche (n/mm^2)
2. Durchmesser der Glomeruli (mm)
3. Fläche der Glomeruli (mm^2)
4. Volumen der Glomeruli (mm^3)
5. Kapillarovolumen (mm^3)

Auf Grund der zweidimensionalen Projektion in der Histologie können mit ihr keine volumetrischen Messungen vorgenommen werden. Nach einer orientierenden Einschätzung der Qualität und Größe der gemessenen Probe wird jeder 20. Schnitt einer CT – Schnittbildserie quantifiziert. Zur Analyse der histologischen Proben wurden je Niere sechs Präparate aus dem Kortex gewonnen. Als Referenzebene für eine einheitliche Messung der glomerulären Parameter dient der Hilus, also die Ebene, in der die Vasa afferentes und efferentes ein- bzw. austreten. Gefäßanteile werden nur berücksichtigt, wenn sie innerhalb der Bowman´sche Kapsel liegen.

2.4.3.1 Die Messung der Anzahl der Gesamtglomeruli pro Gesamtfläche

Zur Ermittlung der Gesamtanzahl der Glomeruli in der Mikro- und Nano – CT werden zehn Schnitte gewählt, anschließend die Gesamtfläche in mm^2 bestimmt und dann die Anzahl der erkennbaren Glomeruli gezählt (Studienpopulation 1: $n = 200$, Studienpopulation 2: $n = 100$). Analog zur CT - Untersuchung werden je Niere sechs histologische Schnittbilder unter dem Mikroskop vermessen und ausgezählt (Studienpopulation 1: $n = 200$, Studienpopulation 2: $n = 480$). Alle Messungen enden mit der Bestimmung des relativen Quotienten der glomerulären Dichte (n/mm^2). Hierzu wird die Anzahl der Glomeruli durch die ausgemessene Fläche dividiert.

2.4.3.2 Die Planimetrie des Glomerulums

Die Planimetrie des Glomerulums erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wird die Referenzebene identifiziert anschließend der Diameter des Glomerulums bestimmt und als letztes die glomeruläre Fläche quantifiziert. Zur Bestimmung des Diameters in der Mikro- und Nano – CT wird die Schnittebene des Hilus gewählt und anschließend die äußeren sichtbaren Teile des Glomerulums mit einer Geraden verbunden. In der histologischen Messung ist die Bowman´sche Kapsel mit eingeschlossen. Der glomeruläre Diameter wird aus dem arithmetischen Mittelwert des Längs- und Querdurchmessers bestimmt. Die Planimetrie entspricht in ihrem Ablauf dem der Diametrie. Nachdem in den CT – Bildern die Hilusebene identifiziert ist, kann mit dem Cursor die Fläche eines Glomerulums umfahren und somit

planimetriert werden. Die histologischen Schnittbilder werden hierzu analog mit der Computersoftware vermessen. Es sollen 200 Glomeruli in der Studienpopulation 1 und 35 Glomeruli im Studienkollektiv 2 mittels der Mikro- und Nano – CT vermessen werden, während 480 Proben in den Studienpopulationen 1 und 2 histologisch quantifiziert werden.

2.4.3.3 Die Volumetrie des Glomerulums

Die volumetrische Vermessung eines Glomerulums gelingt in der computertomographischen Analyse durch Summierung der planimetrischen Messwerte eines Glomerulums in allen Schnittebenen, in denen es zu identifizieren ist. Das Analyseprogramm kann dann unter Berücksichtigung der Schichtdicken (μ CT: 14 μ m; NCT: Studienpopulation1: 450 nm, Studienpopulation 2: 750 nm) das Volumen errechnen. Insgesamt sollen für die Studienpopulation 1 7 und für das Studienkollektiv 2 35 Glomeruli vermessen werden. Die Volumetrie ist in der mikroskopischen Analyse nicht möglich.

2.4.3.4 Die Bestimmung des glomerulären Gesamt/Gefäßfraktions – Volumen und Flächenquotienten

Die Volumetrie des glomerulären Volumens wird im vorherigen Kapitel beschrieben. Das Vermessen der Gefäßfraktion verläuft nach der gleicher Methodik wie der Volumetrie des Glomerulums. Das Volumen der Gefäßfraktion wird mittels Planimetrie der Gefäßanteile in allen Schnittbildern und anschließender Summierung durch das Analyseprogramm bestimmt. Anschließend kann das glomeruläre Volumen durch das Volumen der Gefäßfraktion dividiert werden. In der Studienpopulation 2 wird zusätzlich ein Quotient aus der glomerulären und kapillaren Fläche auf Höhe des Hilus miteinander korreliert. Je Studienpopulation werden 100 Glomeruli vermessen.

2.5 Histologische Aufbereitung

Die histologische Analyse findet nach den computertomographischen Untersuchungen statt. Weisen die dort gewonnen Messdaten und Bilder eine zufriedenstellende Qualität auf, werden die Präparate zur histologischen Aufarbeitung in das pathologische Institut des Universitätsklinikums Gießen transportiert. Zur mikroskopischen Untersuchung wird ein Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop 50, Zeiss, Deutschland) verwendet. Die Aufnahme und Digitalisierung der mikroskopischen Bilder gelingt mit einer JVC Digital Kamera (KY – F75U). Zur Vermessung der Bilder wird das Computerprogramm Diskus® (Diskus 4.50.1003, C. H. Hilgers, Königswinter, Deutschland) verwendet.

2.5.1 Fixierung des histologischen Präparates

Die gescannten Proben werden nach der Überprüfung der Qualität der CT – Bilder in Paraffinwachs eingebettet. Dieser stabilisiert das empfindliche Gewebe und beugt einer Zerstörung der feinen Gewebsarchitektur vor, die durch eine Quetschung beim Zuschneiden droht. Die Paraffineinbettung und das darauf folgende Zuschneiden der Präparate finden in mehreren Schritten statt. Als erstes werden die 1 cm³ großen Präparate in kleine mit 4,5%igen Formalin gefüllten Einbettkassetten gelegt. In der darauffolgenden Nacht wird im zweiten Schritt mittels einer maschinellen aufsteigenden Alkoholreihe das Präparat entwässert. Danach kann die entwässerte Probe in Xylol fixiert und anschließend in erhitztes flüssiges Paraffin gebettet werden. Zur Aushärtung der Paraffinpräparate lässt man sie anschließend auf Raumtemperatur abkühlen. Im letzten Schritt werden die histologischen Schnittpräparate mit Hilfe eines Mikrotoms gefertigt.

2.5.2 Zuschneiden des histologischen Präparates

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfordert sehr dünn geschnittene Schnittpräparate, welche nur mit Hilfe eines Mikrotoms gefertigt werden können. Im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen wird ein kreuzrollengeführtes Schlittenmikrotom der Firma Microm International GmbH,

Walldorf, Deutschland verwendet. Damit werden 6 µm dünne Schnittpräparate aus dem fixierten Nierengewebe gewonnen und anschließend zur Glättung in ein warmes Wasserbad (37 °C) gelegt. Um eine bessere Haftung der Schnittpräparate auf dem Objektträger zu bewirken, lässt man sie im Anschluss über Nacht in einem Wärmeschrank inkubieren (37 °C). Am nächsten Morgen werden die Schnitte für 10 Minuten zur Entfettung in Xylol gebettet und für zwei Minuten in absteigender Alkoholreihe gewässert. Nun können sie gefärbt und luftdicht mit einem Glasplättchen abgedeckt werden.

2.5.3 Färben des Präparates

Die Färbung histologischer Präparate dient der besseren Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Anteilen des Gewebes. Es werden für die vorliegende Studie drei Färbungen verwendet:

1. Haematoxylin – Eosin – Färbung (HE)
2. Elastika – Haematoxylin – Eosin – Färbung nach Weigert (ELA)
3. Goldner – Masson´sche trichrome Färbung (GO)

Die detaillierten Arbeitsschritte zu diesen Färbungen sind im Anhang erklärt. Es sollen pro Niere zwei Präparate je Färbung erstellt werden, also insgesamt 6 histologische Objektträger pro Niere.

Die HE – Färbung ist eine gebräuchliche Übersichtsfärbung und stellt die entscheidenden Gewebsstrukturen dar. Zellkerne sind blau bis violett und das Cytoplasma rot gefärbt. Sie eignet sich besonders zum schnellen Identifizieren und Zählen der Glomeruli. Die Elastika – Färbung nach Weigert wird zur Darstellung der elastischen Fasern verwendet, die in hohem Maße in Gefäßwänden vorkommen. So gelingt die exakte Differenzierung zwischen dem Glomerulum und dem Beginn eines Vas afferens oder efferens zufriedenstellend. Im histologischen Präparat stellen sich die elastischen Fasern dunkelviolet bis schwarz dar, während kollagene Fasern rosa und glatte Muskelzellen rot erscheinen. In der trichromen Färbung nach Goldner und Masson wird die Elastika – Färbung als Grundlage verwendet und im Regelfall mit drei oder mehr verschiedenen dispersen Farbstoffen kombiniert. In der vorliegenden Studie sind es die Farbstoffe Ponceau – Säurefuchsin, Orange G und Lichtgrün. Die

Goldner – Masson – Färbung hebt ebenfalls besonders die kollagenen Strukturen hervor und hilft genau wie die Elastikafärbung bei der detaillierten Differenzierung der Strukturen in einem Glomerulum. Dabei erscheinen die Zellkerne braunschwarz, das Cytoplasma rot, glatte Muskelzellen blassrot und das kollagene Bindegewebe grün. Da die Proben erst nach dem Scannen in die Histologie gebracht werden, sind sie mit Kontrastmittel gefüllt. Dies führt zu Verdrängung der Erythrozyten, erschwert aber nicht die Identifizierung des Gefäßlumens, da das Kontrastmittel leicht als dunkelgraue bis schwarze Masse in den Gefäßen zu erkennen ist.

2.6 Der Vergleich von Histologie und Mikro- und Nano – CT

Das sog. Matching einer Probe entspricht der Korrelation eines Bildobjektes in einem histologischen Bild zu dem entsprechenden Objekt im digitalisierten CT – Schnittbild. Es dient zur Kontrolle der Vergleichbarkeit von Messdaten, die mit unterschiedlichen Methoden generiert wurden.

Das Matching beginnt mit der Suche nach markanten Leitstrukturen sowohl in dem histologischen Präparat als auch in der Schnittbildserie. Dies können auffällige Gefäße, wie z. B. die Arteria arcuata oder gruppierte Glomeruli sein. In Bezug zu diesen Leitstrukturen ist es anschließend möglich ein Glomerulum in beiden Medien sicher zu identifizieren. Im Anschluss wird mittels Feinjustierung ein möglichst identischer Schnitt durch das Glomerulum gesucht, in dem man den glomerulären Sinus als Referenzebene definiert. Dies ist nur annäherungsweise möglich, da sich die Schnittdicken in den verschiedenen Methoden unterscheiden (Histologie 6 μm , μCT : 14 μm , NCT 750 nm bzw. 450 nm). Nach Sicherung der Daten im JPEG-Format können die gewonnen Schnittbilder in Microsoft Powerpoint® übereinander gelegt und somit „gematcht“ werden.

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten werden mittels Microsoft Excel 2007[®] in Tabellen archiviert und anschließend mit Hilfe des Computerprogramms JMP[®] 6.0 (SAS, CA, USA) statistisch analysiert.

Zur statistische Analyse von Unterschieden zwischen den Studienpopulationen wird der einfaktorielle Varianzanalysetest (One-way ANOVA) verwendet, während Unterschiede zwischen mehreren unterschiedlichen Parametern mittels Tuckey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur analysiert werden. Der unpaare Students T-Test wird zur Errechnung des Signifikanzniveaus zwischen den verschiedenen Studienpopulationen verwendet. Dabei wird eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant gewertet. Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Studienkollektivs 1

In Tabelle 3.1 werden die Ergebnisse der statistischen Analyse zusammengefasst.

3.1.1 Die Visualisierung intrarenaler Gefäße

Abb. 3.1 zeigt exemplarisch die dreidimensionale Rekonstruktion des vollständigen intrarenalen Gefäßbaums mittels der μ CT. Erkennbar ist nicht nur die lückenlose Visualisierung der Gefäße, sondern auch die des Glomerulums, welches einem Nachweis der Kontrastmittelperfusion bis in die glomerulären Kapillaren entspricht.

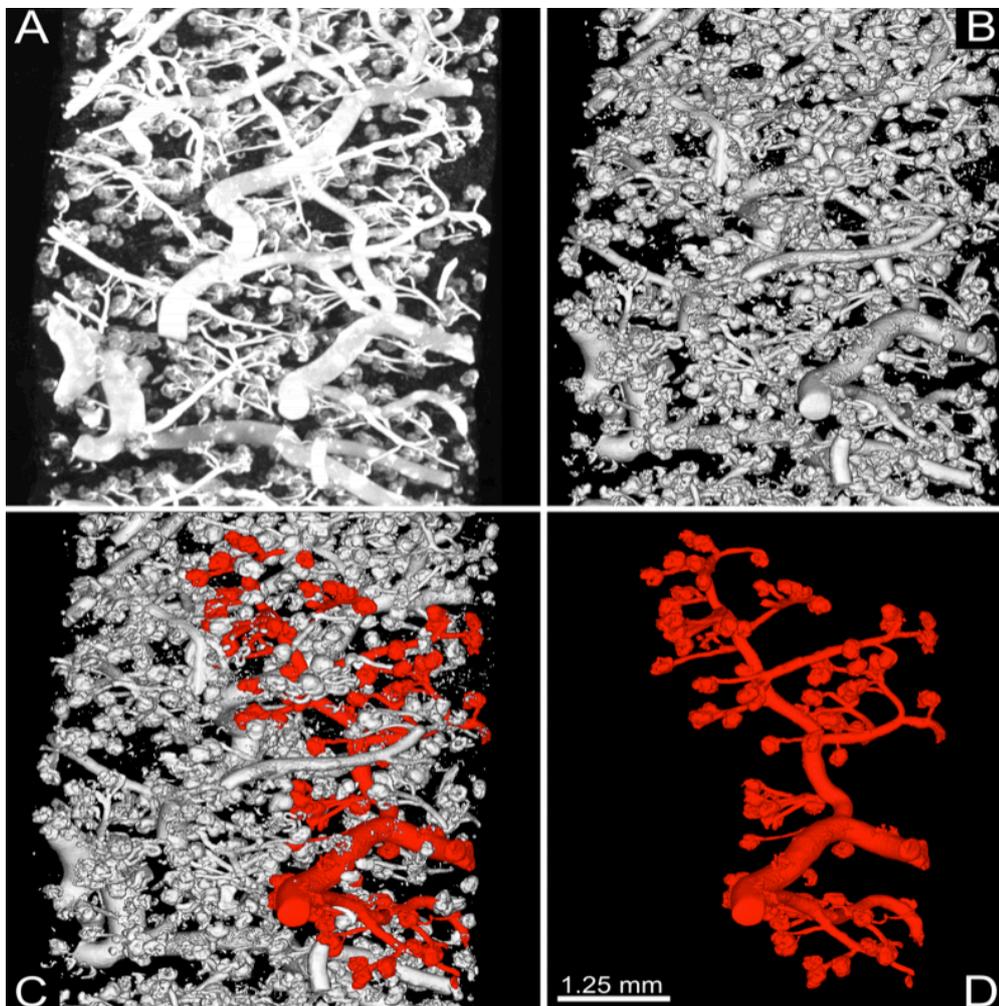


Abb. 3.1 Exemplarische 3D – Mikro – CT Abbildung (SkyScan 1072) einer Nierenprobe nach bariumsulfathaltiger Kontrastmittelapplikation (A, MIP; B-D, Oberflächenrekonstruktion). Das vaskuläre Stromgebiet einschließlich der Glomeruli lässt sich in seiner Konnektivität vollständig erfassen.

Diese Kontinuität kann auch in der NCT bei einer isotropen Voxelgröße von 450 nm über die Vasa afferentes bis in die glomerulären Kapillaren erzielt werden (exemplarische Darstellung in Abb. 3.2 A, B). Es zeigen sich bei beiden computertomographischen Methoden keine radiographischen Artefakte. In der histologischen Untersuchung kann eine Kontrastmittelperfusion sowohl in den intrakortikalen Gefäßen als auch in den intraglomerulären Kapillaren demonstriert werden (Abb. 3.2 D).

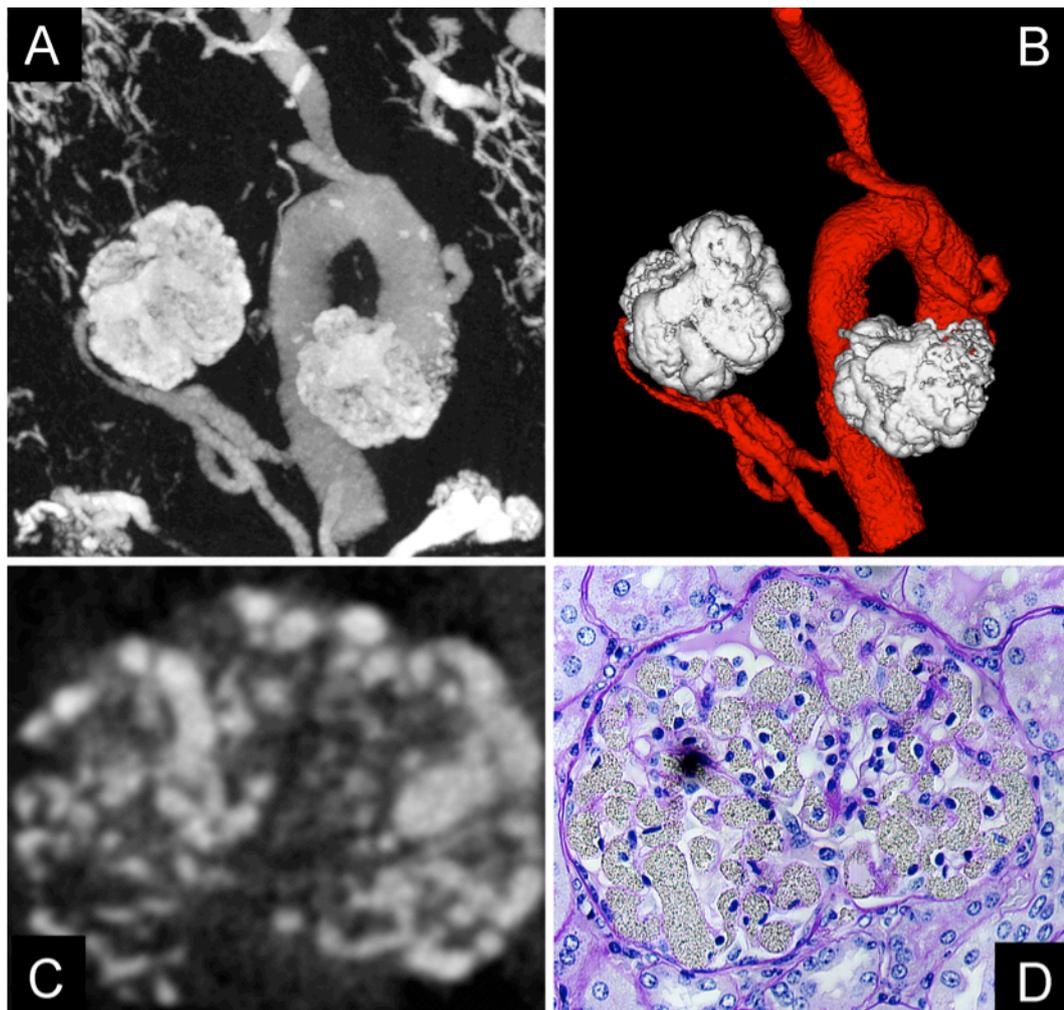


Abb. 3.2 Exemplarische 3D – Nano – CT Abbildung (SkyScan 2011) einer Nierenprobe nach bariumsulfathaltiger Kontrastmittelapplikation (A, MIP; B, Oberflächenrekonstruktion, C, Einzelschicht) bei einer isotropen Voxelgröße von 450 nm. Die Vasa afferentes einschließlich der glomerulären Kapillaren können quantitativ erfasst werden. C, Einzelschicht durch das kontrastverstärkte Glomerulum und die korrelierende Histologie (HE Färbung, Vergrößerung x 20) zeigen das Gefäßkonvolut innerhalb des Glomerulum.

3.1.2 Die Anzahl der Glomeruli pro Fläche

Die Gesamtanzahl der Glomeruli pro Fläche (n/mm^2) ist in der Histologie signifikant höher als in der Mikro- und Nano – CT ($1,649 \pm 0,331$ (HM) vs. $0,666 \pm 0,206$ (μ CT) vs. $1,043 \pm 0,758$ (NCT), $p < 0,0001$).

3.1.3 Die Ergebnisse der glomerulären Planimetrie

Der glomeruläre Durchmesser (mm) weist signifikant höhere Messwerte in der μ CT im Vergleich zur NCT und Histomorphometrie (HM) auf ($0,269 \pm 0,037$ (μ CT) vs. $0,252 \pm 0,028$ (NCT), $p < 0,0002$, Abb. 3.3). Außerdem finden sich im Vergleich der Mikro- und Nano – CT mit der HM jeweils hochsignifikante Unterschiede mit Werten von $0,269 \pm 0,037$ (μ CT) vs. $0,231 \pm 0,03$ (HM) und $0,252 \pm 0,028$ (NCT) vs. $0,231 \pm 0,03$ (HM), $p < 0,0001$. Abb. 3.3 demonstriert die Abnahme des glomerulären Durchmessers von der μ CT zur NCT von 6,3 %, NCT zur Histologie von 8,3 % und der μ CT zur Histologie von 14,1 %.

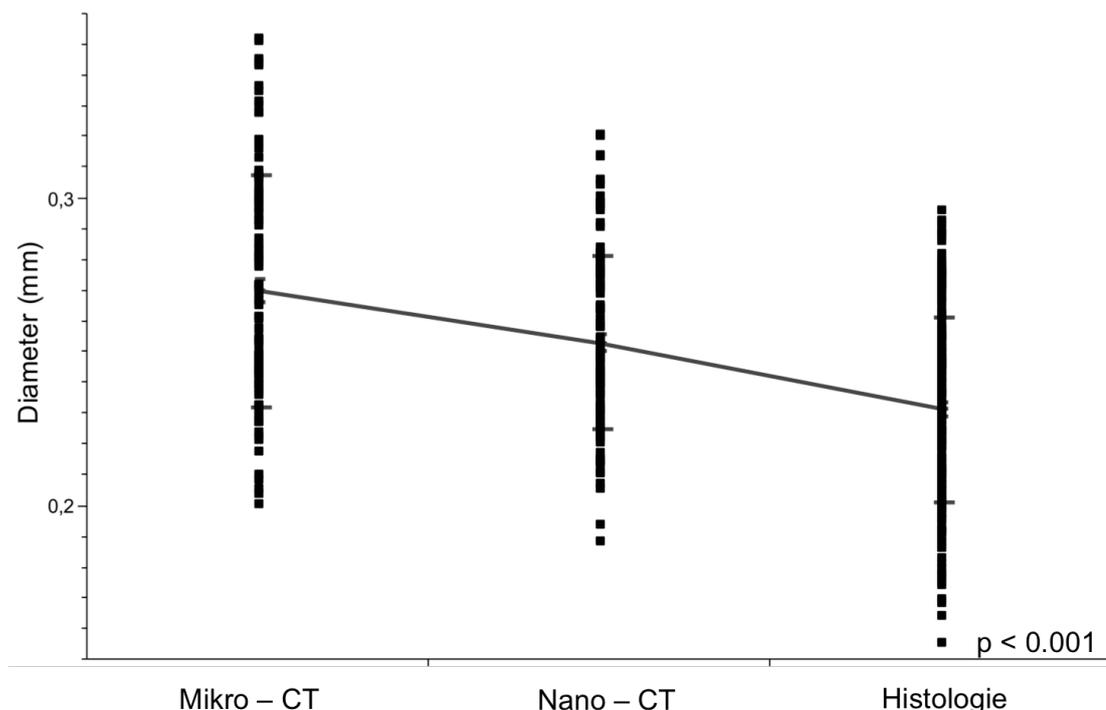


Abb. 3.3 Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Diametermessungen in der μ CT, NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs I

In der Bestimmung der glomerulären Fläche (mm^2) stellen sich analog zur Messung des glomerulären Diameters signifikant höhere Messwerte in der μCT im Vergleich zur NCT und der Histomorphometrie dar ($0,047 \pm 0,01$ (μCT) vs. $0,041 \pm 0,01$ (NCT) vs. $0,033 \pm 0,01$ (HM), alle $p < 0,0001$), Abb. 3.4). Es lässt sich somit eine Abnahme der Messungen beginnend von der μCT zur NCT von 12,8 %, der NCT zur Histologie von 19,5 % und der μCT zur Histologie von 29,8 % nachweisen.

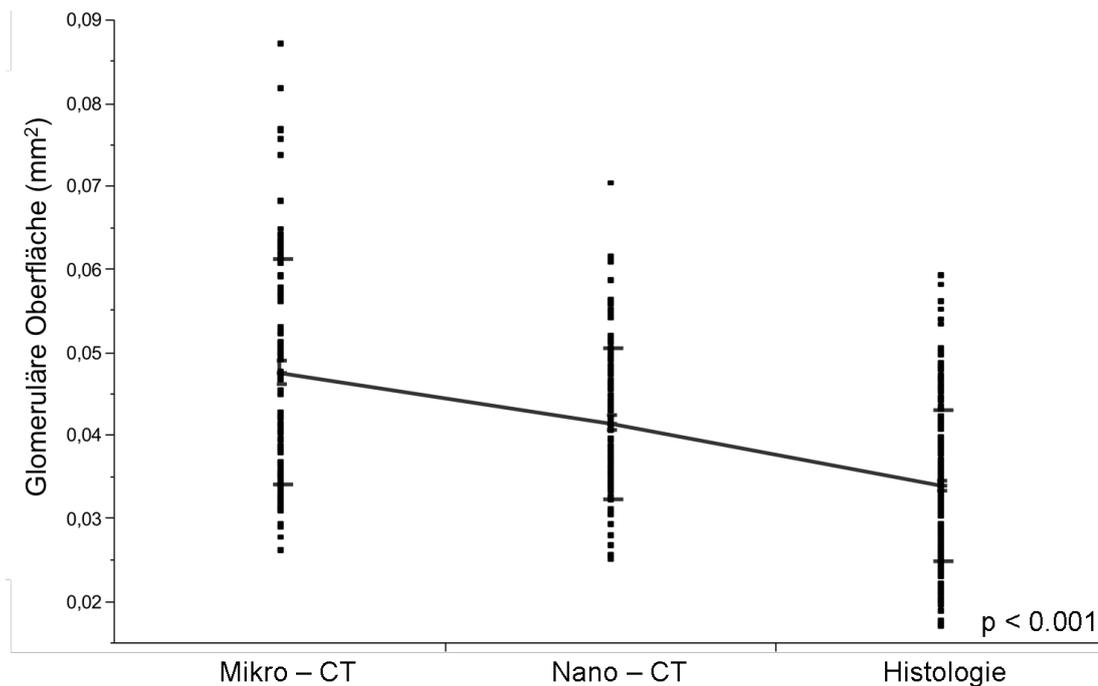


Abb. 3.4 Darstellung der Ergebnisse der glomerulären Oberflächenmessungen in der μCT , NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 1 in einem Boxplotdiagramm.

3.1.4 Die Ergebnisse der glomerulären Volumetrie

Die erhobenen Messwerte des glomerulären Volumens (mm^3) ist in der μCT signifikant höher als in der NCT ($0,0067 \pm 0,0025$ (μCT) vs. $0,0057 \pm 0,0017$ (NCT), $p = 0,03$, Abb. 3.5). Ein Vergleich zu der Histomorphometrie ist nicht möglich, da mittels dieser Methode keine Volumetrie möglich ist. Die volumetrische Messung ist analog zu der Messung des glomerulären Durchmessers und der Fläche in der μCT um 14,9 % höher als in der NCT.

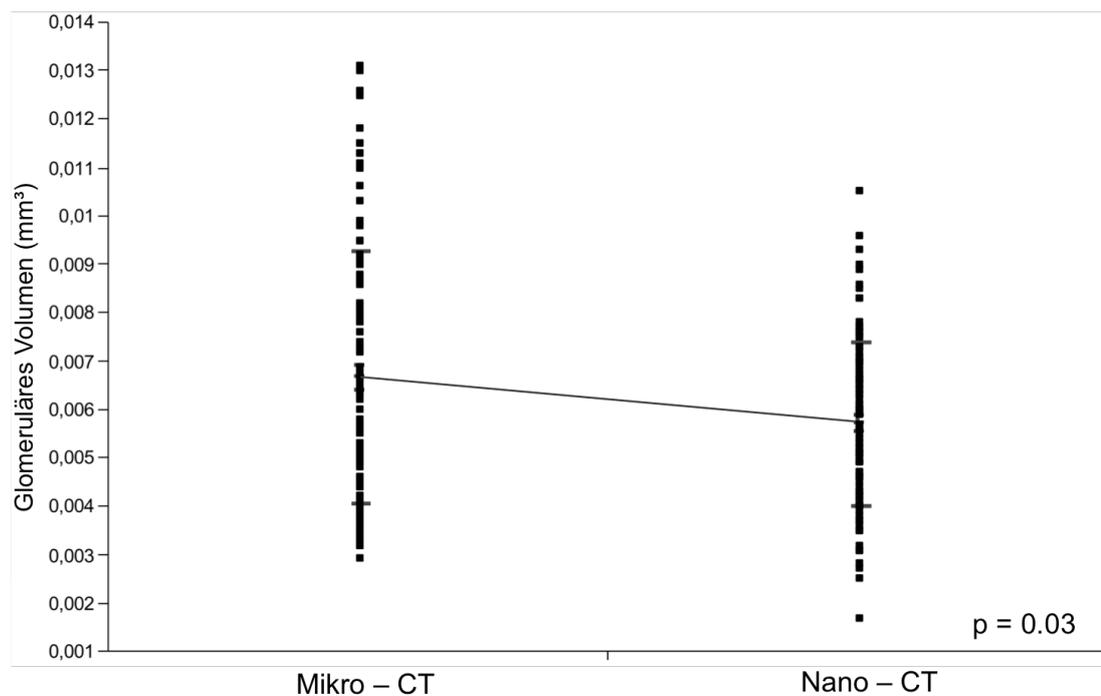


Abb. 3.5 Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Volumetrie der Glomeruli in der Mikro- und Nano-CT des Studienkollektivs I

3.1.5 Die glomeruläre Gefäßfraktion im Vergleich zur vaskulären Gefäßfraktion

Die quantitative Analytik des vaskulären Gefäßvolumens (mm^3) korreliert signifikant mit dem glomerulären Gesamtvolumen (mm^3) ($y = 0,0007 + 2,8837x$, $r^2 = 0,97$, $p < 0,0001$, Abb. 3.6). Es zeigt sich somit ein Zusammenhang zwischen der Größe eines Glomerulums und seines vaskulären Anteils. Analog zu den Ergebnissen der glomerulären Gefäßvolumina (Kapitel 4.2.4) ist eine Volumetrie in der HM nicht möglich.

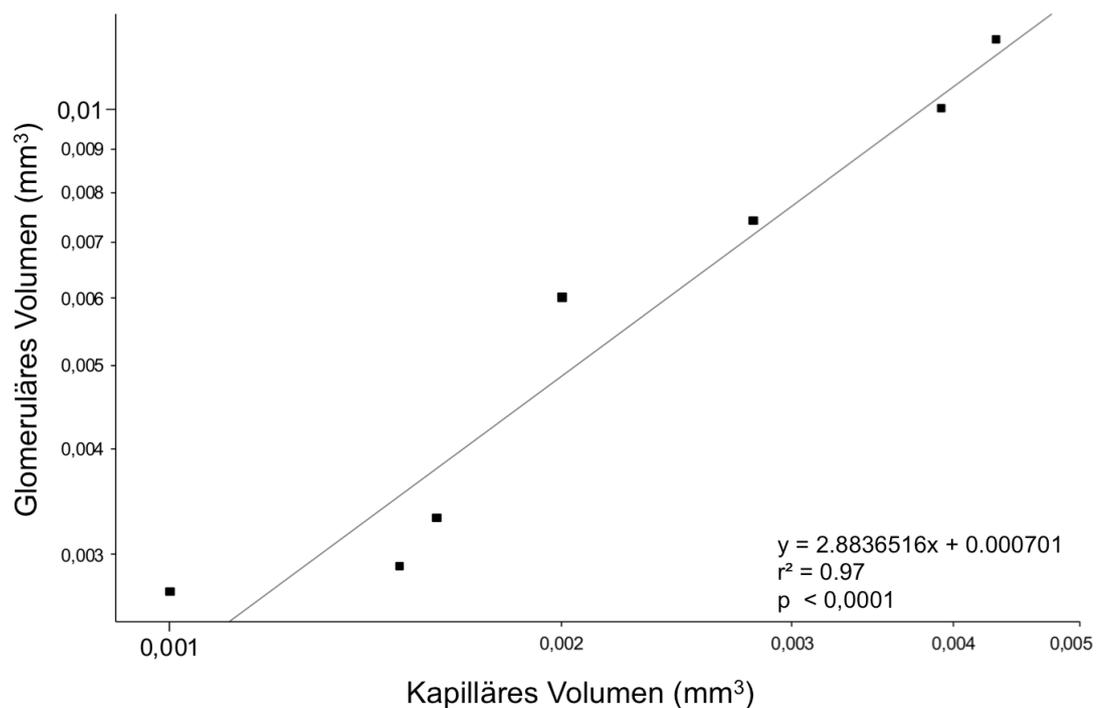


Abb. 3.6 Darstellung der Korrelation zwischen der vaskulären Gefäßfraktion und dem glomerulären Gesamtvolumen in der NCT in einer bivariaten Varianzanalyse (Studienkollektiv 1)

3.2 Ergebnisse des Studienkollektivs 2

3.2.1 Die Anzahl der Glomeruli pro Fläche

Es zeigt sich in den Ergebnissen der Auszählung der gesamtglomerulären Anzahl pro Fläche (n/mm^2) kein signifikanter Unterschied zwischen der NCT und der Histologie ($3,275 \pm 1,855$ (NCT) vs. $3,221 \pm 0,833$ (HM), n.s.).

3.2.2 Die Ergebnisse der glomerulären Planimetrie

Die histologische Bestimmung des glomerulären Durchmessers (mm) ist signifikant kleiner als in der nanocomputertomographischen Messung ($0,139 \pm 0,019$ (NCT) vs. $0,12 \pm 0,02$ (HM), $p < 0,001$, Abb. 3.7). Dies entspricht einer Verringerung von 13,7 %.

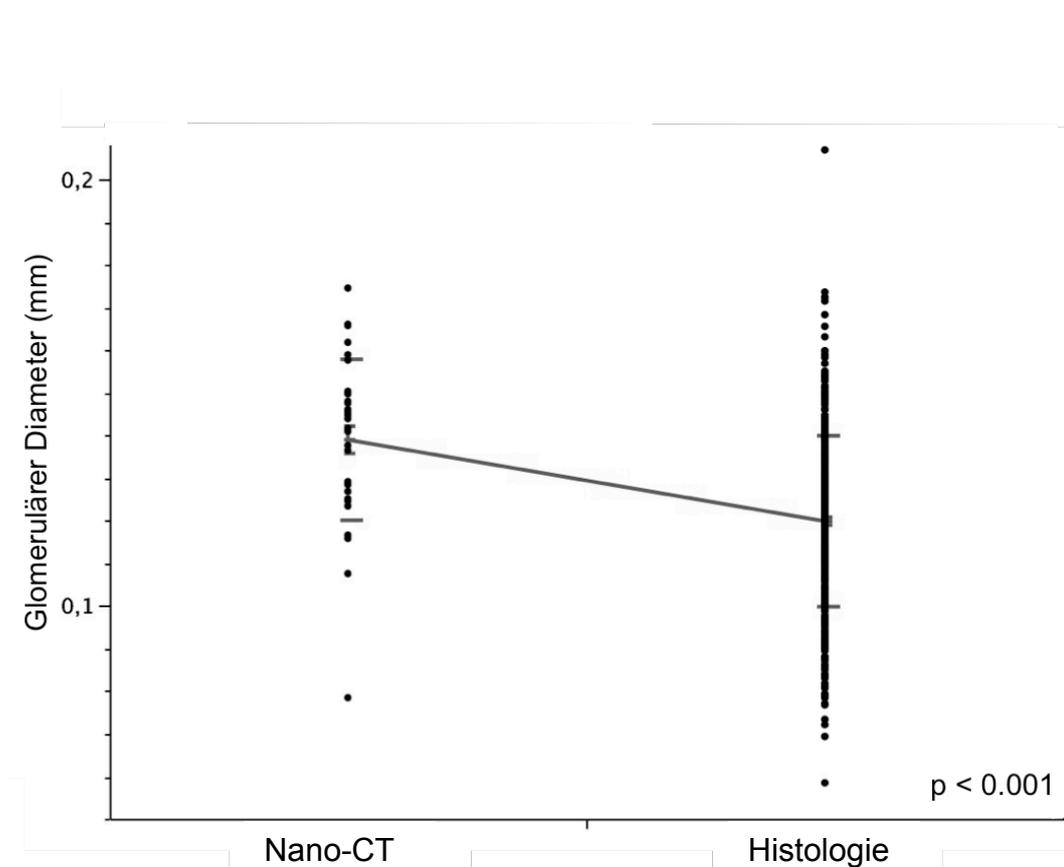


Abb. 3.7 Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Diametermessungen in der NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 2

Die Bestimmung der glomerulären Fläche (mm^2) zeigt eine signifikante Verringerung der Messwerte in der histomorphometrischen Untersuchung im Vergleich zur NCT – Analyse ($0,016 \pm 0,004$ (NCT) vs. $0,011 \pm 0,003$ (HM), $p < 0,001$, Abb. 3.8). Dies entspricht einem Unterschied von 31,3 % zwischen beiden Methoden.

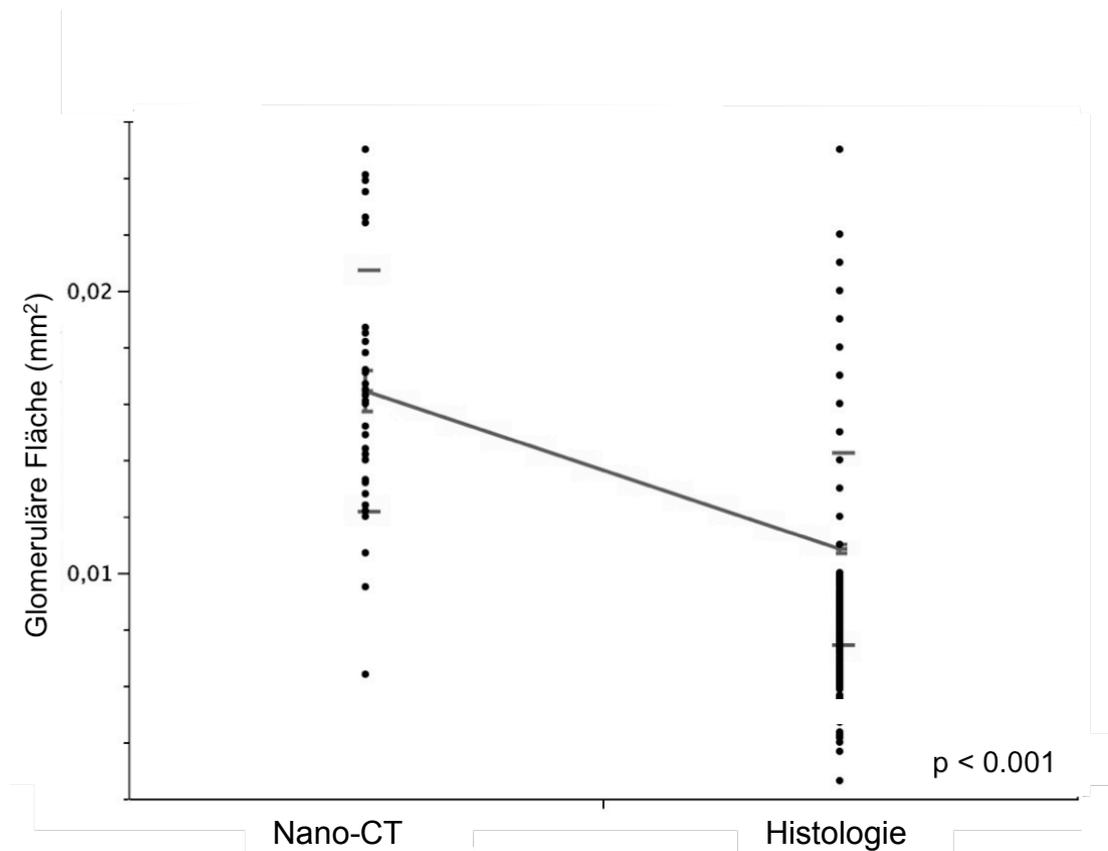


Abb. 3.8 Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Oberflächenmessungen in der NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 2

3.2.3 Die glomeruläre Gefäßfläche in Korrelation zur glomerulären Gesamtfläche

Im Studienkollektiv 2 kann eine signifikante Korrelation zwischen der glomerulären Gesamtfläche (mm^2) und ihrem vaskulären Anteil dargestellt werden. Somit steigt und sinkt die vaskuläre Gefäßfläche korrelierend zu der glomerulären Gesamtfläche ($0,0089251 + 1,0118729x$, $r^2 = 0,19$, $p < 0,0001$, Abb. 3.9).

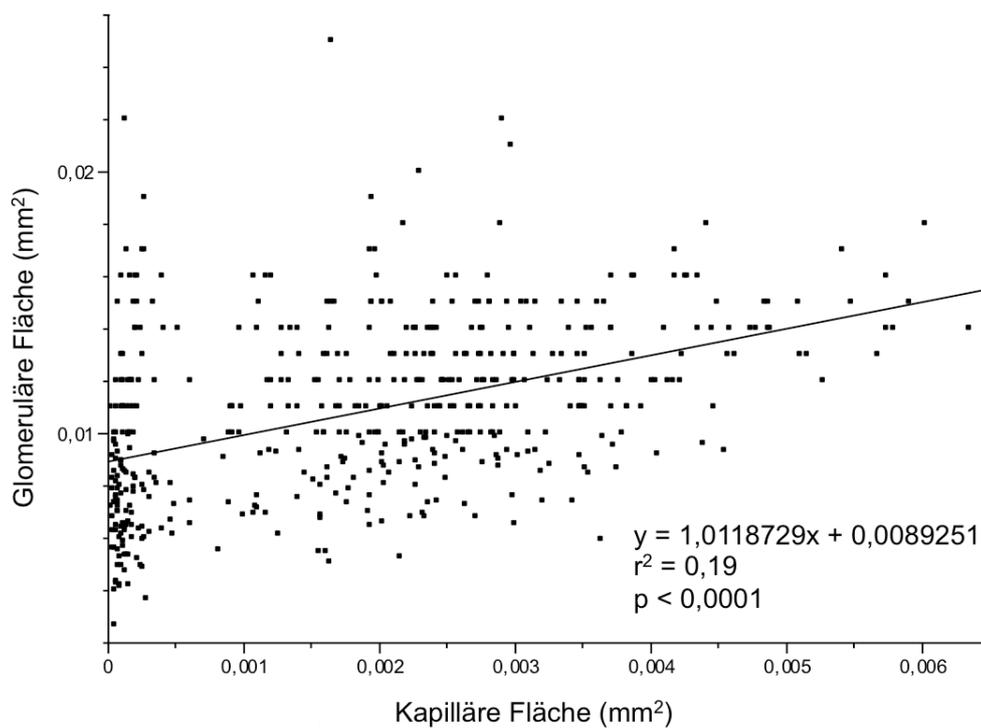


Abb. 3.9 Darstellung der Korrelation zwischen der vaskulären Gefäßfraktion und der glomerulären Gesamtfläche in einer bivariaten Varianzanalyse des Studienkollektivs 2

	Mikro-CT		Nano-CT		Histologie	
	SK 1	SK 2	SK 1	SK 2	SK 1	SK 2
Anzahl der Glomeruli/ Fläche (n/mm²)						
Mittelwert	0,666*	-	1,043*	3,275 ⁺	1,649*	3,221 ⁺
Standardabweichung	0,206	-	0,758	1,855	0,331	0,833
glomerulärer Durchmesser (mm)						
Mittelwert	0,269 [∇]	-	0,252*	0,139*	0,231*	0,12*
Standardabweichung	0,037	-	0,028	0,019	0,03	0,02
glomeruläre Fläche (mm²)						
Mittelwert	0,047*	-	0,041*	0,016*	0,033*	0,011*
Standardabweichung	0,01	-	0,01	0,004	0,01	0,003
glomeruläres Volumen (mm³)						
Mittelwert	0,0067 [°]	-	0,0057 [°]	0,00053	-	-
Standardabweichung	0,0025	-	0,0017	0,0003	-	-

Tab. 3.2 Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Glomeruli/Fläche (n/mm²), dem Glomerulardiameter (mm), der Glomerulumfläche (mm²) und des Glomerulumvolumens (mm³). Zeichenerklärung: SK1 = Studienkollektiv 1, SK2 = Studienkollektiv 2, * = $p < 0,001$, + = nicht signifikant, [∇] = $p = 0,0002$, [°] = 0,03

4 Diskussion

Die Morphologie ist ein essentieller Bestandteil aller biologischen Forschungen, da auf ihrer Basis Anomalien erkannt und Krankheiten charakterisiert werden können. In den letzten Jahrhunderten haben sich die morphometrischen Methoden einer kontinuierlichen Weiterentwicklung unterzogen. Sie begann mit der makroskopischen Analyse der Organe in Leichnamen und fand ihre Fortsetzung in der mikroskopischen Betrachtung der Zellen bis hin zur Darstellung von Zellorganellen mittels der Elektronenmikroskopie seit den 1950er Jahren. In diese Entwicklung integriert sich die hochauflösende Mikro- und Nano – CT – Technologie. Insbesondere in der kardiovaskulären Forschung findet sie Verwendung und zeigt sehr gute Ergebnisse^{18,35,36}. Daher ist anzunehmen, dass die kontinuierliche dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung der renalen Mikromorphologie mittels der Mikro- und Nano – CT nicht nur für die Erforschung von Nierenerkrankungen, sondern auch für das Verständnis von Systemerkrankungen, wie z. B. der arteriellen Hypertonie oder Artherosklerose hilfreich sein könnte.

4.1 Die Quantifizierung der renalen Gefäßstrombahn mittels der Mikro- und Nano – Computertomographie

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob und in wie weit die dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung renaler Strukturen, insbesondere der Glomeruli und seiner Kapillaren, von Schweinen in der Mikro- und Nano – CT gelingt.

Zuerst muss festgestellt werden, dass eine lückenlose dreidimensionale Visualisierung der renalen Gefäßstrombahn sowohl in der Mikro- als auch in der Nano – CT erreicht werden kann (Abb. 3.1, Abb. 3.2). Die Bildgebung schließt von der A. interlobularis bis zu den Vasa efferentes alle Abschnitte ohne Unterbrechungen ein. Mit der segmentierten Darstellung einzelner Gefäßverläufe lässt sich dies gut demonstrieren (Abb. 3.1 D). In der NCT können Proben bis zu

einer Voxelgröße von 450 nm aufgelöst werden und somit das Kapillarnetz eines Glomerulums von dem Mesangium getrennt werden. Dies ermöglicht die Berechnung des Verhältnisses zwischen dem glomerulären Gesamtvolumen und seinem Kapillaranteil. Um eine Vergleichbarkeit der Mikro- und Nano – CT – Bilder zur Histologie herzustellen, werden die computertomographischen Schnittbilder mit den histologischen Proben verglichen (Abb. 3.2 C, D). Zusammenfassend lässt sich dementsprechend die Fragestellung 1 zur Qualität der dreidimensionalen Visualisierung positiv beantworten.

Fragestellung 2 beschäftigt sich mit der computertomographischen Quantifizierung der glomerulären Parameter im Vergleich zur Histomorphometrie. Die Anzahl der Glomeruli pro Fläche zu bestimmen ist in der Übersichtsprojektion leicht und zuverlässig erreichbar. Die Quantifizierung der individuellen glomerulären Parameter gelingt in der vorliegenden Studie in einer reliablen und reproduzierbaren Weise. Allerdings muss angemerkt werden, dass es signifikante Unterschiede in den Messwerten zwischen den drei Methoden gibt, die in allen Untersuchungen den gleichen Trend aufweisen. In der Histologie sind die gemessenen Werte signifikant geringer als in der Mikro- und Nano – CT und diejenigen der NCT signifikant geringer als die der μ CT. Diese Messauffälligkeiten sind bereits in anderen Studien beschrieben, sollten aber dennoch diskutiert werden. So beobachten Langheinrich et al. in der Quantifizierung von humanen Koronargefäßen dasselbe Phänomen, d.h. die Messwerte der ermittelten Gefäßwandperimeter und der intraluminalen Flächen sind analog zu der jetzigen Studie in der Histologie signifikant geringer als in der μ CT¹⁸. Dies wird durch die starke Beanspruchung der Proben erklärt, die bei der Fixation des Gewebes entsteht. Der Fixationsprozess enthält zu einem Dehydrierungsschritte, was zu einem Schrumpfen der Zellen führt, zum anderen wird das Gewebe während des Zuschneidens mechanisch gequetscht. Die CT-Analysen verlangen dagegen keine aufwendigen Präparationen. Daher resümieren Langheinrich et al., dass die Messungen in der μ CT der Realität näher sind. Dieser Aspekt lässt sich in der vorliegenden Studie für die signifikant niedrigeren Messungen in der Histologie übernehmen und erweitern. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren ebenso eine Größenkorrelation zwischen der Mikro und Nano – CT, wobei die höheren Messdaten durch die μ CT ermittelt werden. Eine Erklärung dieser Beobachtung bietet der Partialvolumeneffekt. Er tritt auf, wenn die Schichtdicken des

Computertomographen die Größe des anvisierten Objekts übertreffen. In diesem Fall wird die Gesamtdichte des Objekts in der Schnittebene gemittelt um den Dichtewert zu errechnen, was häufig zu Abweichungen vom realen Dichtewert führt. Dieser Effekt tritt vor allem bei älteren Generationen von Computertomographen auf, da diese auf Grund der technischen Unreife noch Schichtdicken im Millimeterbereich generieren^{37,38}. Da der Partialvolumeneffekt durch die minimalen Schichtdicken in der NCT sehr reduziert wird, ist davon auszugehen, dass die mittels der NCT gemessenen Werte am präzisesten und reliabelsten sind.

Die Anzahl der Glomeruli pro Fläche zeigt in der Studienpopulation 1 einen signifikanten Unterschied zwischen den Methoden, während in der Studienpopulation 2 kein Unterschied zu erfassen ist. Dieses widersprüchliche Ergebnis ist mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu erklären. Zu erwarten wäre das Ergebnis der Studienpopulation 2 in beiden Studienkollektiven, da die Auszählung sowohl in der Histologie, als auch in den Computertomographen in einer Übersichtsprojektion durchgeführt wurde und somit auflösungs- und probenunabhängig ist. Dieser unerwarteten Beobachtung sollte im Laufe weiterer Studien nachgegangen werden, um die Zuverlässigkeit der Mikro- und Nano – CT zu bestätigen.

Weiterhin ist festzustellen, dass die glomerulären Gesamtflächen und –volumina signifikant mit dem jeweiligen kapillären Anteil in der nanocomputertomographischen Analyse korrelieren. Diese Beobachtung könnte von Nutzen für die Beurteilung von renalen Pathologien sein, da viele Glomerulopathien mit einer Gefäßrarefizierung einhergehen. Außerdem ist auch die Glomerulosklerose durch eine Kapillarrarefizierung gekennzeichnet und unter anderem Folge einer systemischen Hypertension^{39,40}. Die NCT eignet sich somit zur Identifizierung von krankhaften Glomeruli.

4.2 Die Bildgebung des renalen Gefäßstromgebiets

Die Untersuchung des renalen Gefäßstromgebiets ist ein wichtiger Aspekt der klinischen Diagnostik von Nieren- und Systemerkrankungen wie z.B. der arteriellen Hypertension. Hierfür stehen dem Kliniker verschiedene invasive und noninvasive

Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Die (Farbduplex-)Sonographie, die CT- und MR – Angiographie sind etablierte Methoden der renalen Gefäßdarstellung, die Kontrastmittel gestützt im klinischen Alltag genutzt werden ⁴¹⁻⁴⁴. Außerdem wird zur invasiven Diagnostik der Nierenarterien die digitale Subtraktionsangiographie angewendet ⁴⁵. Kontrastmittel werden zur renalen Gefäßdarstellung regelmäßig verwendet und unterstützen die differenzierte Quantifizierung des vaskulären Systems. Dabei führt die stetige Weiterentwicklung in der Anwendung von Kontrastmittel in computer- und magnetresonanztomographischen Verfahren zu einer Erweiterung ihres Einsatzbereichs. Mit ihnen ist nicht nur die alleinige Darstellung der renalen Morphologie und Struktur möglich, sondern auch die Evaluierung der renalen Perfusion und Vitalität. Mittels dynamischer Aufnahmen von Kontrastmittelperfusions- und –filtrationsverhalten können der renale Blutfluss, die glomeruläre Filtration und Perfusionsunterschiede zwischen Kortex und Medulla renalis analysiert werden. Die Quantifikation der glomerulären Filtrationsrate als aussagekräftiger Marker der renalen Funktion mittels CT oder MRT ist nach wie vor in der Entwicklung ^{46,47}. Trotz der enormen technischen Entwicklung der letzten Jahrzehnte ist die klinische Bildgebung auf eine Ortsauflösung bis zu ca. 500 µm begrenzt. Dies ist für häufige klinische Fragestellungen, wie z.B. die Evaluierung einer Nierenarterienstenose ausreichend, allerdings erlaubt sie keine Aussage zu kapillären Veränderungen der Niere. Prä- und postkapilläre Schäden an den Glomeruli sind häufige Folge systemischer Erkrankungen, wie z.B. der arteriellen Hypertension und dem Diabetes mellitus und verursachen ihrerseits wiederum eine Aggravation dieser Erkrankungen. Daher ist die exakte Darstellung und Quantifizierung dieses Abschnittes des renalen Gefäßbaums Bestandteil der aktuellen radiologischen Forschung.

Die dreidimensionale Visualisierung und Quantifizierung mikroskopischer Strukturen ist Ziel verschiedener Untersuchungsmethoden. Vor allem die Feinstruktur der Niere, insbesondere des Glomerulums und seines Kapillarnetzes wird in diesem Zusammenhang analysiert. Hierzu werden verschiedene Methoden, wie z.B. die Elektronen- und Konfokalmikroskopie sowie stereologische Verfahren verwendet. Die Histologie stellt hierbei mit einer Ortsauflösung bis zu 200 µm das etablierteste Verfahren dar und ist daher der Goldstandard zur Beurteilung mikroskopischer Strukturen der Niere. Sie dient allen neuen Techniken zur

Visualisierung und Quantifizierung von Gewebsstrukturen im Mikrometerbereich als Referenz. Allerdings zeigen neue Verfahren auch Nachteile der Histomorphologie und -metrie auf: Die Histologie ist ein zweidimensionales Verfahren, das keine vollständige Betrachtung des Studienobjektes zulässt, da nur Schnittbilder einer Gesamtprobe untersucht werden können. Die Betrachtung unter dem Mikroskop erfordert eine irreversible Probenbearbeitung, welche verschiedene Schritte der Präparation, Färbung und des Zuschneidens beinhaltet, welche zu Fixationsartefakten führen können (Kapitel 4.1.1). Da eine exakte Selektion der Schnittebenen nicht möglich ist, ist die Erfassung der Heterogenität eines Organs limitiert. Strukturen werden nur zufällig getroffen, was dazu führt, dass Strukturveränderungen, die zwischen zwei Schnitten liegen, nicht erfasst werden. Aufwendige Serienschnitte können zwar den Verlauf von Organstrukturen verfolgbar machen, garantieren aber keine lückenlose Betrachtung, da der Probenumfang in seiner Größe stark begrenzt ist und nur wenige Mikrometer am Stück analysiert werden können. Eine vollständige Visualisierung ist aber besonders bei der Evaluierung von vaskulären Strukturen von Bedeutung, da sich pathologische Veränderungen, wie z.B. die Plaquebildung oft im Milli- bis Mikrometerbereich befinden und somit von der Mikroskopie oft gar nicht oder nur teilweise erfasst werden⁴⁸.

Seit Beginn der 90er Jahren stehen stereologische Verfahren zur Evaluierung der renalen Gefäßanatomie zur Verfügung. Sie sind ebenso wie die Histologie durch eine destruktive und irreversible Probenaufbereitung gekennzeichnet, können aber im Unterschied zur Histologie aus den zweidimensionalen Aufnahmen mittels spezieller mathematischer Algorithmen dreidimensionale Bilder rekonstruieren. Mit Hilfe der Stereologie können der renale Gefäßbaum und glomeruläre Strukturen unterschiedlicher Tierarten zuverlässig untersucht werden. Es ist möglich die Anzahl der Glomeruli im Kortex zu zählen sowie den Diameter, die Fläche, das glomeruläre und kapilläre Volumen individueller Glomeruli zu quantifizieren^{32,49,50}. Außerdem sind auch pathologische Prozesse nachweisbar, wie z.B. die glomeruläre Hypertrophie an Ratten, die eine fokale segmentale Glomerulosklerose aufweisen⁵¹. Trotz allem weist auch diese Methode Nachteile auf, die durch Nyengaard zusammenfassend festgestellt werden⁴⁹: Ebenso wie die Histologie ist die Stereologie ein Schnittbildverfahren, das keine lückenlose Visualisierung und Quantifizierung zulässt. Auf Grund der zufälligen Selektion der Schnittebenen

werden ebenso wie in der histologischen Analyse Heterogenitäten innerhalb einer Probe nicht reliabel erfasst. Die Bestimmung von Grenzflächen innerhalb eines Glomerulums bereitet stereologischen Verfahren Schwierigkeiten. So lassen sich beispielsweise Glomeruli stereologisch sehr gut von den umliegenden Tubuli abgrenzen, während sich mensangiale Zellen wiederum nur schwer von den intraglomerulären Kapillaren differenzieren lassen^{32,49,50}. Schließlich ist noch zu erwähnen, dass die Analyse der hochkomplizierten mathematischen Algorithmen nur Experten vorbehalten ist, was stereologische Verfahren sehr kosten- und personalintensiv werden lässt.

Ein weiteres Verfahren zur Visualisierung und Quantifikation von Strukturen im Submikrometerbereich stellt die Scanning Elektronenmikroskopie (SEM) dar. Diese Methode ist mit Hilfe spezieller Asservierungsmethoden in der Lage artefaktfreie dreidimensionale Bilder von Feinstrukturen zu erstellen. Allerdings ist auf Grund des hohen technischen Aufwands der Probenaufbereitung und der Elektronenmikroskopie an sich der Material- und Kostenaufwand sehr hoch. Die Probenaufbereitung ist ebenso wie die histologischen und stereologischen Verfahren destruktiv und irreversibel, so dass sie keine weitere Analyse mit anderen Untersuchungsmethoden erlaubt. Yu et al. nutzt die Scanning Elektronenmikroskopie (SEM), um das Glomerulum darzustellen³³. Die Visualisierung feiner Strukturen, wie z. B. der Basalmembran gelingt in sehr guter Qualität³⁰. Yu et al. entwickelte für diese Methode eine in – vivo Kryoasservierung, die eine weitgehend artefaktfreie Probenkonservierung ermöglicht und dadurch dem lebenden Zustand nahezu entspricht³³. Die Darstellung und Quantifizierung der Kapillaren in der Elektronenmikroskopie konzentriert sich auf kapillare Teilabschnitte des Glomerulums und nicht auf den gesamten kortikalen Gefäßabschnitt³⁰. Eine Quantifizierung des gesamten glomerulären Kapillarbettes und der kortikalen Gefäße ist mit dieser Methode nicht beschrieben.

Neben der Elektronenmikroskopie und stereologischen Verfahren steht mit der Konfokalmikroskopie eine weitere Methode zur dreidimensionalen Visualisierung und Quantifizierung von mikroskopischen Untersuchungsobjekten zur Verfügung^{29,52}. Konfokalmikroskope sind Laserrastermikroskope deren Konfokalität aus den zwei Strahlengängen des Beleuchtungs- und Beobachtungslicht herrührt, indem sie

den gleichen Fokus aufweisen und somit zueinander konfokal sind. Das Licht fällt hierbei durch nur mikrometergroße sog. Pinholes, die speziellen sehr kleinen Lochblenden entsprechen. Sie verhindern, dass Licht, dessen Spektrum außerhalb der Schärfenebene liegt, nicht in den Detektor fällt, was zu einer deutlichen Verringerung der Schärfentiefe und somit zu einer höheren Auflösung führt. Die Punktmessungen eines Präparates finden in allen drei Ebenen statt und können anschließend mittels computergestützter Algorithmen zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden. Die dreidimensionale Darstellung der renalen Gefäßstrombahn ist nur zum Teil möglich, da die Differenzierung zwischen Kapillaren und Mesangium nicht exakt gelingt. So kann zwar der gesamte glomeruläre Kapillarbaum dreidimensional dargestellt werden, die Differenzierung von einzelnen Kapillaren ist allerdings nicht möglich (siehe Abb. 4.1) ^{29,52}. Demensprechend ist auch nur eine Quantifizierung der gesamtglomerulären Anteile realisierbar und führt somit zu einer ungenauen Volumetrie der Gefäßanteile. An Hand eines von Kaczmarek et al. entwickelten Algorithmus kann der Kapillardurchmesser und die Kapillarlänge quantifiziert werden. Die Methode ist für den Bereich der mikroskopischen dreidimensionalen Darstellung eine zeitintensive Methode, da sie für die Visualisierung eines Glomerulums ca. 10 Stunden benötigt ^{29,52}.

Sowohl die licht-, als auch die elektronenmikroskopischen Verfahren profitieren von der Weiterentwicklung in dem Bereich der komplexen computergestützten Rekonstruktionssysteme. Diese ermöglichen eine automatische Berechnung des dreidimensionalen Volumens aus der Summe umgrenzter zweidimensionaler Flächen einer Schnittbildserie. Der Computer errechnet zunächst ein dreidimensionales Bild und kann anschließend mit Hilfe spezieller Algorithmen glomeruläre Parameter quantifizieren ^{31,53}. Limitiert wird die Genauigkeit der Messungen unter anderem durch die Schnittdicke des Mikrotoms und das exakte Erkennen der glomerulären Begrenzungen durch die Software.

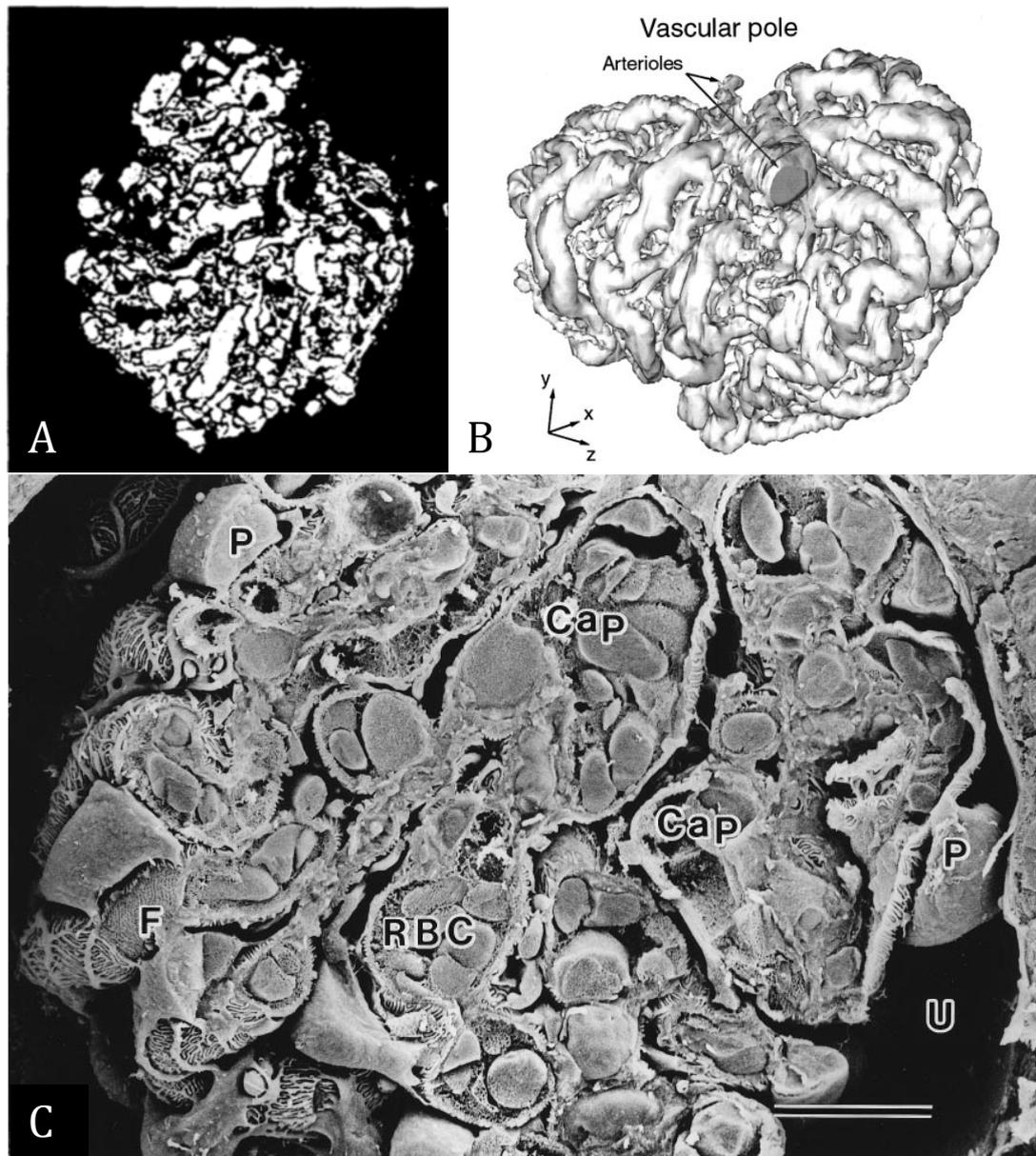


Abb 4.1 exemplarische Darstellung verschiedener Methoden zur Visualisierung von Glomeruli.
A Konfokalmikroskopisches Bild eines Kapillarnetzes eines mit Acriflavin gefärbten Rattenglomerulums²⁹;
B dreidimensionales Oberflächenmodell eines glomerulären Kapillarnetzes (Ratte) in der lichtmikroskopischen Rekonstruktion mittels eines computergestützten Verfahren⁵³;
C dreidimensionale Darstellung eines Schnittes durch ein kryoasserviertes Mäuseglomerulum, das mit Hilfe eines Scanning Elektronenmikroskop visualisiert wurde (P = Podozyten, F = Podozytenfortsätze, RBC = Erythrozyten, Cap = Kapillaren, U = Harnpol, Markierung = 1,0 μm)³³

Die Mikro- und Nano – CT stellen eine Alternative in der dreidimensionalen Visualisierung und Quantifizierung mikroskopischer Strukturen der Niere dar. Die μCT hat sich bereits im Bereich der vaskulären ex – vivo – Forschung etabliert^{11,18,21,54}, während die NCT auf Grund ihrer erst kurzen Anwendung in diesem Bereich noch nicht vollständig etabliert ist, aber sehr gute Ergebnisse im Submikrometerbereich zeigt²⁴. Mit der Möglichkeit zur Rekonstruktion der

Bilddatensätze zu dreidimensionalen Bildern können sie die bisherigen zweidimensionalen Verfahren ergänzen. Auf Grund der lückenlosen dreidimensionalen Visualisierung mittels der Mikro- und Nano – CT kann die Integrität eines Studienobjektes vollständig erfasst werden. Dies stellt insbesondere in der Vaskularforschung einen großen Vorteil dar, da erstmals die gesamte Gefäßarchitektur von Organen dreidimensional visualisiert und volumetrisch quantifiziert werden können. Somit können auch Heterogenitäten innerhalb eines Gefäßverlaufs zuverlässig vollständig erfasst und separat dargestellt und analysiert werden. Dabei erreichen die computertomographischen Verfahren Ortsauflösungen bis zu 5 – 10 µm in der µCT und bis zu 150 nm in der NCT^{10,55}. Die NCT eignet sich daher besonders für die Analyse von kapillären Strukturen. Die Differenzierung eines Gefäßverlaufs von dem umliegenden Parenchym ist auf Grund der Kontrastmittelperfusion deutlich leichter als mit Hilfe der Stereologie und Konfokalmikroskopie. Die hochauflösende Bildqualität der Elektronenmikroskopie erreichen die computertomographischen Methoden nicht, sie sind allerdings auch wesentlich weniger kosten,- material- und zeitintensiv. Weiterhin handelt es sich bei den computertomographischen Verfahren um nondestruktive Methoden, d.h. die gescannten Proben können für weitere Untersuchungen, wie z.B. histologische Analysen oder Immunfluoreszenzmessungen weiterverwendet werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber allen anderen genannten Verfahren.

In der vorliegenden Studie gelingt an Hand von Schweinenieren die dreidimensionale Bildgebung und exakte Quantifizierung von intrakortikalen Gefäßen, Glomeruli und intraglomerulären Kapillaren. Dies bildet die Grundlage für zukünftige Untersuchungen renaler Pathologien mittels computertomographischer Verfahren und ermöglicht neue potentielle Erkenntnisgewinne in der renalen Morphologie in Ergänzung zu dem Goldstandard der histologischen Analyse.

4.3 Limitationen

Die vorliegende Studie zeigt nicht nur die Möglichkeiten der Mikro- und Nano – CT sondern auch einige Nachteile. Die μ CT – Messungen weisen signifikant höhere Ergebnisse als die NCT – Analysen auf. Diese Beobachtung wird durch den Partialvolumeneffekt erklärt und deutet auf die Problematik der Artefaktbildung von computertomographischen Verfahren hin. Diese können verschiedene Ursachen haben, wie z.B. Schatten-, Ring- oder Aufhärtungseffekte und können die Aussagekraft der Computertomographie limitieren. In der hier vorliegenden Studie sind außer dem Partialvolumeneffekt keine weiteren Artefakte aufgetreten. Ein weiterer Nachteil stellt die starke Beschränkung der Probengröße auf wenige cm^3 bzw. mm^3 dar, die für eine Untersuchung in der Mikro- und Nano – CT je nach angestrebter Vergrößerung und Ortsauflösung notwendig sind. Größere Proben würden das Messfeld der CT – Geräte überschreiten und wiederum zu Artefakten und Fehlmessungen führen. Daher ist die Mikro – und Nano – CT bisher nur auf die ex – vivo – Forschung beschränkt gewesen, wobei sich aktuell in – vivo – Scanner in der Etablierung befinden mit denen Lebenduntersuchungen von Kleintieren, wie z.B. von Ratten und Mäusen möglich sind ^{56,57}. Mit der Notwendigkeit der Kontrastmittelperfusion wird allerdings auch bei Scannern der neueren Generationen ein Nachteil gegenüber anderen Methoden bestehen. Ohne Kontrastierung des Gewebes ist eine exakte Strukturdifferenzierung und Rekonstruktion der Gefäßarchitektur nicht möglich. Die Kontrastmittelperfusion stellt eine potentielle Fehlerquelle dar, da ein zu starker Perfusionsdruck Kapillaren platzen lässt, während ein zu schwacher Perfusionsdruck nicht alle Gefäßabschnitte ausfüllt. Sowohl ein Austreten des Kontrastmittels in den Extravasalraum als auch ein nicht oder nur partiell ausgefüllter Gefäßabschnitt führen zu Fehlmessungen und sind auf Grund der Aushärtung des Kontrastmittels nicht mehr korrigierbar. In der in – vivo – Diagnostik führen Kontrastmittelapplikationen bei kleinen Tieren zu erheblichen Volumenbelastungen des Herz – Kreislauf – Systems ^{56,57}.

Die Differenz in den Ergebnissen der Auszählung der Glomeruli ist mit der vorliegenden Studie nicht erklärbar und sollte im Rahmen weiterer Studien an Schweinen noch einmal überprüft werden.

5 Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt, dass mittels der Mikro- und Nano – CT die renale Gefäßstrombahn von Schweinen bis in die Kapillaren der Glomeruli suffizient dreidimensional dargestellt und quantifiziert werden kann. Somit reiht sie sich in die Forschungen zur mikro- und nanocomputertomographischen vaskulären Bildgebung ein. Es können bereits verschiedene Organe, wie z. B. das Gefäßsystem der Plazenten und der Lunge, aber auch Aorten und Koronarien visualisiert und quantifiziert werden ^{11,15,19,35,54}. Im nächsten Schritt nach der Bildgebung einer gesunden Morphologie steht die Untersuchung der pathologischen Morphologie an der gleichen Spezies im Vordergrund. Die vorliegende Studie kann somit die Grundlage für die Visualisierung und Quantifizierung renaler Krankheiten an Schweinen mittels der Mikro- und Nano – CT bilden. Das Studienkollektiv 2 der vorliegenden Dissertation stammt aus der Referenzgruppe einer anderen Studie, welche ein gutes Beispiel für die Weiterentwicklung der mikrocomputertomographischen Forschung an porcinen Nieren darstellt. Diese Studie befasst sich mit der Analytik und Quantifizierung von morphologischen Veränderungen der porcinen Niere mittels der Mikro- und Nano – CT. Da die Niere ein wichtiges Stellglied in dem blutdruckregulierenden System darstellt, sind weitere Studien im Zusammenhang zur renalen Hypertension sowie die Auswirkungen einer systemischen Hypertension auf die Niere denkbar. Insbesondere die Nano – CT verspricht neue Erkenntnisse, da es nur wenige begrenzte Methoden gibt um glomeruläre und kapilläre Veränderungen im Submikrometerbereich darstellen und quantifizieren zu können, wie sie z. B. oft auf dem Boden einer arteriellen Hypertension entstehen. Die erfolgreiche dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung porciner Nieren eröffnet auf Grund ihrer hohen Ähnlichkeit zu humanen Nieren auch für die Erforschung menschlicher Nierenpathologien neue Möglichkeiten. So könnten solche an porcinen Tiermodellen imitiert und anschließend mittels der Mikro- und Nano – CT dreidimensional und kontinuierlich visualisiert und quantifiziert werden um Rückschlüsse auf den Menschen zu ziehen. Ebenso ist eine mikro- und nano – computertomographische Analytik von humanen Nieren z.B. aus pathologischen Sektionen ebenfalls als zukünftige Studie denkbar.

Einen weiteren Schwerpunkt in der biomedizinischen Forschung mittels Mikro- und Nano – CT – Scannern werden in – vivo – Geräte darstellen, da sie lebende Organsysteme in ihrer Vollständigkeit dreidimensional erfassen und exakt quantifizieren können. Außerdem stellen sie potentielle Möglichkeiten zur Funktionsdiagnostik dar. So sind beispielsweise in der renalen Bildgebung die Untersuchung der Filtrationsfunktion oder die Erprobung eines Verfahrens zur Messung der glomerulären Filtrationsrate denkbar. Allerdings sind solche Untersuchungen auf Grund ihrer Größe nicht für Schweine geeignet, sondern auf Kleintiere beschränkt.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die vorliegende Arbeit präsentiert die dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung des renalen Gefäßsystems von Schlachthauschweinen und domestizierten Minipigs mittels der Mikro- und Nano – CT.

Material und Methoden: Um den renalen porcinen Gefäßbaum dreidimensional darzustellen und zu quantifizieren, werden zwei Studienkollektive aus fünf Schlachthauschweinen (Studienpopulation: 1, Alter: 6 Monate; Gewicht: 120 kg) und sieben domestizierten Minipigs (Studienpopulation: 2, Alter: 25 Wochen, Gewicht: 45 – 55 kg) gebildet. Die Nieren werden entweder mit einer Mischung aus BaSO₄ und Gelatine (SP 1) oder mit Microfil[®] (SP 2) perfundiert. Anschließend werden aus den Nieren Stanzen gewonnen, diese fixiert und mittels der Mikro- und Nano – CT gescannt. Mit der Mikro – CT und Nano – CT werden der glomeruläre Durchmesser (mm), Fläche (mm²), Volumen (mm³) und die Gesamtanzahl der Glomeruli pro Fläche (n/mm²) bestimmt. Mit der Nano – CT wird zusätzlich zu den genannten Parametern das intraglomeruläre Kapillarovolumen (mm³) quantifiziert. Die gewonnenen Daten werden mit der Histologie verglichen.

Ergebnisse: In der Analyse der Daten des Studienkollektivs 1 stellt sich eine signifikante Zunahme der Messwerte ausgehend von der histomorphometrischen Untersuchung über die NCT zu der μ CT – Untersuchung ($0,231 \pm 0,03$ mm, $0,033 \pm 0,01$ mm²; $0,252 \pm 0,028$ mm, $0,041 \pm 0,01$ mm², $0,0057 \pm 0,0025$ mm³; $0,269 \pm 0,037$ mm, $0,047 \pm 0,01$ mm², $0,0067 \pm 0,0025$ mm³, $p < 0,001$). Die quantitative Analyse des glomerulären und kapillären Volumens (SK 1) und Fläche (SK 2) zeigt eine signifikante Korrelation der Parameter zueinander ($r^2 = 0,97$, $r^2 = 0,19$). Die Nano – CT – Untersuchungen der Studien-population 2 ergeben ebenfalls signifikant höhere Resultate als deren histologischen Korrelate ($0,139 \pm 0,019$ mm, $0,016 \pm 0,004$ mm², $0,12 \pm 0,02$ mm, $0,011 \pm 0,003$ mm², $p < 0,001$).

Schlussfolgerung Die Ergebnisse weisen auf einen potentiellen Nutzen der 3D – Visualisierung und Quantifikation mittels der Mikro- und Nano - CT zur Evaluierung glomerulärer und vaskulärer Anteile der Niere und könnten somit für die Erforschung renaler und hypertensiver Erkrankungen von Nutzen sein.

7 Summary

Background: This study is designed to evaluate the feasibility for analysis of the kidney glomeruli capillary unit in adult and domestic pigs using micro- and nano – CT imaging.

Methods: Kidneys were harvested from five healthy hybrid pigs (study population 1, 6 months of age; weight 120 kg) at a local slaughterhouse and seven kidneys from healthy domestic minipigs (study population 2, 25 weeks of age, weight 45 – 55 kg). They were infused either with a mixture of BaSO₄ and gelatine (SP 1) or Microfil® (SP 2). Kidney samples were punched out, harvested and scanned with micro – CT and nano – CT. Diameter (mm) and cross-sectional area (mm²) of glomeruli were measured using micro – CT, nano – CT and histology. The capillary vessel volume (mm³) within single glomeruli was quantitated using nano – CT. Results were complemented by colocalized histology.

Results: Within the study population 1 glomeruli diameter, cross-sectional area and glomerular volume increased significantly as measured by histology, nano – CT and micro – CT (0.231 ± 0.03 mm, 0.033 ± 0.01 mm²; 0.252 ± 0.028 mm, 0.041 ± 0.01 mm², 0.0057 ± 0.0025 mm³; 0.269 ± 0.037 mm, 0.047 ± 0.01mm², 0.0067 ± 0.0025 mm³, p < 0.001; respectively). Quantitative nano – CT analysis demonstrated a strong linear relationship of the volume of glomeruli and the capillary volume (r² = 0.97). In study population 2 the analysis shows comparable results relating to study population1. Nano – CT measurements demonstrate significant higher values as in histological analysis (0.139 ± 0.019 mm, 0.016 ± 0.004 mm², 0.12 ± 0.02 mm, 0.011 ± 0.003 mm², p < 0.001). The capillary surface area relates strongly to the glomerular surface area (r² = 0.19).

Conclusion: These results demonstrate potential use of quantitative 3D micro- and nano – CT imaging to obtain information about glomeruli dimensions' and vascularisation, which could be useful in animal models of kidney alterations.

8 Literaturverzeichnis

1. Schiebler TH; Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, Makroskopische Und Mikroskopische Anatomie. Auflage: 9; 598-609, *Springer* (2004)
2. Schünke M, Schumacher S; Prometheus - Lernatlas der Anatomie; Auflage 1; 228 -229, *Thieme* (2005)
3. Welsch U; Sobotta - Lehrbuch Histologie; Auflage 2; 451-463, *Urban und Fischer* (2005)
4. Kühnel W; Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11. Auflage; 352-374, *Thieme* (2002)
5. Nickel R, Schummer A, Seiferle E; Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band II. 9. Auflage; 308-332, *Parey* (2004)
6. Swindle M, Smith A; Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. Suppl.* **25**; 1-10 (1998)
7. Nielsen T, Maaske C; Some comparative aspects of porcine renal function. *Swine Biomed. Res.* **12**; 529 - 36 (1969)
8. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF; Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Cur. opin. nephrol. hyperten.* **1**; 7-15 (2011)
9. Suarez C, Guerrero AA, Musil G; Renal function and nephron structure in the miniature pig. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 995-1007 (1968)
10. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W; Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe.* **39**, 203-212 (1999)
11. Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS; Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli. *Rofo.* **176**, 1219-25 (2004)
12. Johnson RH, Hu H, Harworth ST, Cho PS, Dawson CA, Linehan JA; Feldkamp and circle and line cone beam reconstruction for 3D micro-CT of vascular networks. *Phys. Med. Biol.* **43**, 929-940 (1998)

13. 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.* **4**, 3-11 (1989)
14. Cnudde, V. Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Van Hoorebeke L, Jacobs P. Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. *Appl Geochem.* **21**, 826-832 (2006)
15. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Diercke S, Gerietts T; In vitro evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D micro- and nanocomputed tomography. *Neuroradiology.* **52**, 815-821 (2010)
16. Huber J, Hallscheidt P, Wagener N, Pahernik S, Haferkamp A, Hohenfellner M; Tumours of the Kidney: CT vs. MRI. Nearly equal alternatives with minor differences. *Urologe.* **49**, 345-50 (2010)
17. Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, Klement G, Koprivnikar J, Henkelman RM; MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med Phys.* **31**, 305-313 (2004)
18. Langheinrich A, Bohle RM, Greschus S, Hackstein N, Walker G, Hölschermann H; Atherosclerotic Lesions at Micro CT: Feasibility for Analysis of Coronary Artery Wall in Autopsy Specimens. *Radiology.* **231**, 675-681 (2004)
19. Langheinrich AC, Wienhard J, Vormann S, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M. Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography. *Placenta.* **25**, 95-100 (2004).
20. Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW, Albrecht M; A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum.* **36**, 1460-1467 (1993)
21. 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.* **275**, 1103-14 (1998)
22. Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley MD, Ritman EL, Romero JC; Three-Dimensional Microcomputed Tomography of Renal Vasculature in Rats. *Hypertension.* **31**, 440-444 (1998)

23. Bentley MD, Jorgensen SM, Lerman LO, Ritman EL, Romero JC; Visualization of three-dimensional nephron structure with microcomputed tomography. *Anatomical record*. **290**, 277-83 (2007)
24. Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierckes C, Stieger P, Weidner W; Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice. *BMC Nephrol*. **11**, 18 (2010)
25. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Gerietts T; Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. *BMC Neurol*. **10**, 36 (2010)
26. Rinehart JF, Farquhar MG, Jung HC, Abul-Haj S; the normal Glomerulus and its basic reactions in Disease. *Am J Pathol*. **29**, 21-31 (1952)
27. Pease DC, Baker RF; Electron microscopy of the kidney. *Am J Anat*. **87**, 349-89 (1950)
28. Yamada E; The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J BioPhys Biochem Cytol*. **1**, 551-66 (1955)
29. Kaczmarek E; Visualisation and modelling of renal capillaries from confocal images. *Med Biol Eng Comput*. **37**, 273-277 (1999)
30. Lea, PJ, Silverman M, Hegele R, Hollenberg MJ; Tridimensional ultrastructure of glomerular capillary endothelium revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Microvasc Res*. **38**, 296-308 (1989)
31. Shimizu H, Shinohara N, Yokoyama T; Topological analysis of the three-dimensional structure of the human renal glomerulus using a computer-aided reconstruction system. *Microvasc Res*. **36**, 130-139 (1988)
32. Bertram JF; Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol*. **161**, 111-72 (1995)
33. Yu Y, Leng CG, Terada N, Ohno S. Scanning electron microscopic study of the renal glomerulus by an in vivo cryotechnique combined with freeze-substitution. *J Anat*. **192**, 595-603 (1998)
34. SkyScan2011 - X-Ray Nanoatomograph. Benutzerhandbuch. (2011)
35. Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Ritman EL; Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque

- progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**, 347-352 (2006)
36. 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.* **282**, 1267-79 (2002)
 37. Hoetjes NJ, van Felden FH, Hoekstra OS, Hoekstra CJ, Krak NC, Boellaard R; Partial volume correction strategies for quantitative FDG PET in oncology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **37**, 1679-87 (2010)
 38. Roussel OG, Ma Y, Evans AC; Correction for Partial Volume Effects in PET: Principle and Validation. *In Vivo.* **39**, 904 - 11 (1998)
 39. Marcussen N. Atubular glomeruli in renal artery stenosis. *Lab Invest.* **65**, 558-565 (1991)
 40. Shanley PF; The pathology of chronic renal ischemia. *Semin Nephrol.* **16**, 21-32 (1996)
 41. Siracusano S, Bertolotto M, Cicilato S, Valentino M, Liguori G, Visalli F; The current role of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) imaging in the evaluation of renal pathology. *World J Urology.* **29**, 633-8 (2011)
 42. Zeller T, Bonvini RF, Sixt S. Color-coded duplex ultrasound for diagnosis of renal artery stenosis and as follow-up examination after revascularization. *Cath Cardiovasc Interventions.* **71**, 995-9 (2008)
 43. Hazirolan T, Öz M, Türkbey B, Karaosmanoglu AD, Ogus BS, Canyigit M; CT angiography of the renal arteries and veins: normal anatomy and variants. *Diagn Intervent Radiology.* **17**, 67-73 (2011)
 44. Attenberger UI, Morelli JN, Schoenberg SO, Michaely HJ; Assessment of the kidneys: magnetic resonance angiography, perfusion and diffusion. *J Cardiovasc Magn Resonance.* **13**, 70 (2011)
 45. Kock MC, Adriaensen ME, Pattynama PM, van Sambeek MR, van Urk H, Hunik MG; DSA versus multi-detector row CT angiography in peripheral arterial disease: randomized controlled trial. *Radiology.* **237**, 727-737 (2005)
 46. Bokcheva L, Rusinek H, Zhang J; Assessment of Renal Function with Dynamic Contrast Enhanced MR Imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* **16**, 1-26 (2009)

47. Grenier N, Quaia E, Prasad PV, Juillard L. Radiology imaging of renal structure and function by computed tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasound. *Sem Nucl Medicine*. **41**, 45-60 (2011)
48. Kampschulte M, Brinkmann A, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Langheinrich; Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice. *Atherosclerosis*. **212**, 444-450 (2010)
49. Nyengaard JR; Stereologic methods and their application in kidney research. *J A Soc Nephrology*. **10**, 1100-23 (1999)
50. Cahill M, Kett M, Mccausland JE, Bertram JF; Glomerular stereology: Why, what and how to measure glomerular structure. *Nephrology*. **2**, 305-313 (1996)
51. Cahill MM, Ryan GB, Bertram JF; Biphasic glomerular hypertrophy in rats administered puromycin aminonucleoside. *Kidney int*. **50**, 768-75 (1996)
52. Kaczmarek E, Becker RL; Three-dimensional modeling of renal glomerular capillary networks. *Anal Quant Cytol Histol*. **19**, 93-101 (1997)
53. Antiga L, Ene-Iordache B, Remuzzi G, Remuzzi A; Automatic generation of glomerular capillary topological organization. *Microvasc Res*. **62**, 346-354 (2001)
54. Lerman A, Ritman EL. Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz*. **24**, 531-3 (1999)
55. Wagner R, van Loo D, Hossler F, Czymbek K, Pauwels E, van Hoorebeke L; High-Resolution Imaging of Kidney Vascular Corrosion Casts with Nano-CT. *Microsc Microanal*. **17**, 215-219 (2011)
56. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann M; Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*. **50**, 2-13 (2010)
57. Bag S, Schambach SJ, Boll H, Schilling L, Groden C, Brockmann MA; Current concepts for experimental micro-CT in small animals. *Rofa*. **182**, 390-403 (2010)

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ELA	Elastika-Haematoxylin-Eosin
HE	Haematoxylin-Eosin
HM	Histomorphometrie
GO	Goldner-Färbung
μCT	Mikro-Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NCT	Nano-Computertomographie
n.s.	nicht signifikant
SEM	Scanning Elektronenmikroskopie
SEW	Standardabweichung
Sog.	Sogenannte
Tab.	Tabelle
Vv.	Venae
2K1C	2-Kidney-1-Clip

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Zeichnung der Endstrombahn renaler Gefäße	3
Abb. 1.2	Übersichtsskizze eines Glomerulums	5
Abb. 1.3	Schemazeichnung der Funktionsweise einer Mikro – CT mit Kegelstrahlgeometrie	8
Abb. 3.1	Exemplarische 3D – Mikro – CT – Abbildung (SkyScan 1072) einer Nierenprobe nach bariumsulfathaltiger Kontrastmittelapplikation	28
Abb. 3.2	Exemplarische 3D – Nano – CT – Abbildung (SkyScan 2011) einer Nierenprobe nach bariumsulfathaltiger Kontrastmittelapplikation	29
Abb. 3.3	Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Diametermessungen in der μ CT, NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 1	30
Abb. 3.4	Darstellung der Ergebnisse der Oberflächenmessungen in der μ CT, NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 1 in einem Boxplotdiagramm	31
Abb. 3.5	Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Volumetrie der Glomeruli in der μ CT und NCT des Studienkollektivs 1	32
Abb. 3.6	Darstellung der Korrelation zwischen der vaskulären Gefäßfraktion und dem glomerulären Gesamtvolumen in der NCT in einer bivariaten Varianzanalyse (Studienkollektiv 1)	33

Abb. 3.7	Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Diametermessungen in der μ CT, NCT und Histomorphometrie des Studienkollektivs 2	34
Abb. 3.8	Boxplotdiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der Oberflächenmessungen in der NCT und der Histomorphometrie des Studienkollektivs 2	35
Abb. 3.9	Darstellung der Korrelation zwischen der vaskulären Gefäßfraktion und dem glomerulären Gesamtfläche in einer bivariaten Varianzanalyse des Studienkollektivs 2	36
Abb. 4.1	exemplarische Darstellung verschiedener Methoden zur Visualisierung von Glomeruli	45

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Charakteristika von Mikro – CT – Scannern im Vergleich mit klinischen Spiral – CT – Scannern	10
Tab. 2.1	Darstellung der Grundcharakteristika der beiden Studienkollektive	17
Tab. 3.1	Übersichtstabelle zu den technischen Eigenschaften der μ CT 1072 und NCT 2011 der Firma Skyscan	21
Tab. 3.2	Ergebnisse der statistischen Analyse	37
Tab. 8.1	Liste der verwendeten Materialien	61

9.4 Materialverzeichnis

9.4.1 Material

Material	Typ
Automatische Alkoholreihe	Sakura Tissue-Tek VIP, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Bildanalyseprogramm	Analyze [®] 9.0, Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
Eisen-(3)-Chlorid-Lösung	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Färbeautomat (HE)	Typ COT 20, Firma Medite, Burgdorf Deutschland
Gelantine	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Firma Chroma, Köngen, Deutschland
Hämatoxylin	Firma Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Kontrastmittel	Studienpopulation 1: Bariumsulfat Studienpopulation 2: Microfil [®] MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA
Lichtgrün SF	Firma Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Magnetrührer	Typ MR3002, Firma Heidolph, Schwabach, Deutschland
Microfil [®] MV-122	Firma Flowtech Inc., Claver, Ma, USA
Micropaque [®]	Guerbet, Sulzbach, Deutschland
Mikro-CT	SkyScan_1072 X-Ray Microscope - Microtomograph, Aartselaar, Belgien

Mikroskop	Axioskop 50 Zeiss, Deutschland JVC Digital Camera KY-F75U,
Mikrotom	Typ Microm HM 400, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Nano-CT	SkyScan_2011 X-Ray Nanotomograph, Aartselaar, Belgien
Orange G	Firma Chroma, Köngen, Deutschland
Parafilm	Firma Pechiney Plastic Bagaging, Chicago, IL, USA
Pertex-Einschlussmedium	Firma Medite, Burgdorf Deutschland
Phosphorwolframsäure	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau de Xylidine	Firma Chroma, Köngen, Deutschland
Resorcin-Fuchsin	Firma Chroma, Köngen, Deutschland
Säurefuchsin	Firma Fluka, Firma der Sigma-Aldrich-Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Thymol	Firma Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 8.1 Liste der verwendeten Materialien

9.4.2 Färbemethoden

9.4.2.1 Haematoxylin-Eosin Färbung

Diese Färbung erfolgt mittels dem Färbeautomaten COT 20 der Firma Medite (Burgdorf, Deutschland).

Folgende Schritte sind zum Ansatz der Färbelösungen notwendig:

1. Herstellung der 2%igen Eosingebrauchslösung
 - a. Das Ansetzen erfolgt in einem 2,0 l-Messzylinder.
 - b. In 1 l 96%igen Alkohol werden 12,5 g Eosin (gelblich) mittels einem Magnetrührer über Nacht eingemischt.

- c. Nach Verschließen des Zylinders mit Parafilm ist die Eosinstammlösung fertig.
 - d. Die Eosinstammlösung wird mit 70%igen Alkohol zu gleichen Teilen abgemessen und mit 8 Tropfen Eisessig je 200 ml Ansatz bestückt.
 - e. Als Resultat erhält man dann die Eosin-Gebrauchslösung
2. HE-Färbung eines Präparates
- a. Die in Paraffin getrockneten Schnitte 10 Minuten in Xylol-Lösung entparaffinieren.
 - b. Entwässerung und Spülen des Präparates mittels der automatischen Alkoholreihe (100% - 96% - 70% - Aqua destilare)
 - c. Dann das Präparat 5 min mit Hämalaun färben und mit Leitungswasser bläuen.
 - d. Weiteres Färben mittels 3 minütigen Einwirken von 2%iger Eosinlösung und Spülen mit Leitungswasser
 - e. Fixieren mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol
 - f. Eindecken des Präparates in Pertex®-Einschlussmedium

9.4.2.2 Elastika-HE-Färbung nach Weigert

- 1. Herstellen der 0,5%igen HCL-Lösung
 - a. 980 ml 70%igen Alkohol mit 20 ml 25%iger Salzsäure mischen.
- 2. ELA-Färbung der Präparate
 - a. Die in Paraffin getrockneten Schnitte 10 Minuten in Xylol-Lösung entparaffinieren.
 - b. Entwässerung und Spülen des Präparates mittels der automatischen Alkoholreihe (100% - 96% - 70% - Aqua destilare)
 - c. Resorcin-Fuchsin 30 min lang im Inkubationsschrank bei 45 °C auf das Präparat einwirken lassen
 - d. Dann die Lösung mit 0,5%igen HCL-Alkohol differenzieren.
 - e. Nun mit erst mit 70%igen Alkohol und dann mit Leitungswasser spülen.
 - f. Mikroskopische Kontrolle des Färbezustandes der elastischen Fasern.
 - g. Ab diesen Zeitpunkt weiteres Vorgehen wie bei HE-Färbung mit Einsatz des Färbeautomaten

9.4.2.3 Trichrome Färbung nach Goldner-Masson

1. Ansetzen der Ponceau de Xylidine-Lösung
 - a. 900 ml destilliertes Wasser werden mit 0,6 g der Ponceau de Xylidine – Lösung, 0,3 g Säurefuchsin und 1,8 ml 100 %iger Essigsäure vermischt
2. Ansetzen der Orange G-Lösung
 - a. 500 ml destilliertes Wasser werden mit 20 g Phosphorwolframsäure und 10 g Orange G vermischt.
3. Ansetzen der Lichtgrün-Lösung
 - a. 500 ml destilliertes Wasser werden mit 1 g Lichtgrün SF und 1 ml 100 %iger Essigsäure vermischt.
4. Ansetzen der Weigert´s Hämatoxylin-Lösung
 - a. Lösung A: Vermischung von 100 ml 100 %iger Stammlösung von Hämatoxylin mit 900 ml 96 %igen Ethanol
 - b. Lösung B: 950 ml destilliertes Wasser und 40 ml 29 %iger Eisen-(3)-chlorid Lösung und 10 ml 25 %iger Salzsäure vermischen.
 - c. Diese zwei Lösungen zu jeweils gleichen Teilen miteinander vermischen. Dann innerhalb von 2 Tagen aufbrauchen.
5. Durchführung der Goldner-Masson´schen Färbung
 - a. Die in Parafin getrockneten Schnitte 10 Minuten in Xylol-Lösung entparaffinieren.
 - b. Entwässerung und Spülen des Präparates mittels der automatischen Alkoholreihe (100% - 96% - 70% - Aqua destilare)
 - c. Einlegen der Präparate in Weigert´s Hämatoxylin über Nacht.
 - d. Nach 10 minütigen Spülen mit warmen Leitungswasser lässt man das Ponceau de Xylidine 5 min lang einwirken.
 - e. Danach 2 bis 3 mal mit 1 %iger Essigsäure spülen.
 - f. Präparate für 15 Sekunden in Orange G tauchen und 2 bis 3 mal mit 1 %iger Essigsäure spülen.
 - g. Präparate für 5 Minuten in Lichtgrün-Lösung legen und anschließend 2 bis 3 mal mit 1 %iger Essigsäure spülen.

- h. Fixieren mittels aufsteigender Alkoholreihe ab 96 %igen Alkohol und Xylol
- i. Eindecken des Präparates in Pertex®-Einschlussmedium

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

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

9.6 Danksagung

Die Liste derjenigen Menschen, denen ich im Verlauf meines Studiums und meiner Promotion zu Dank verpflichtet bin, ist lang geworden. Ich hoffe, dass ich trotzdem allen gerecht werde.

- Zu Beginn gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Langheinrich für die Überlassung dieses Themas. Die Betreuung war und ist sowohl fachlich, als auch menschlich exzellent! Danke!
- Außerdem möchte ich mich bei Anne Brinkmann für die viele, viele Hilfe bedanken!
- Ohne die Aufbereitung und das Scannen der Proben wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich bei Frau G. Martels für die sehr gute Arbeit bedanken!
- Ebenso viel Dank gilt es an das pathologische Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen insbesondere an Frau Dr. med. S. von Gerlach und Frau G. Jurat für die Bearbeitung der histologischen Proben zu richten.
- Danken muss ich ebenso Frau B. Parviz für die große Gelassenheit und Hilfe!

Trotz der erstklassigen Betreuung hat kein Studium und keine Promotion Erfolg ohne die Unterstützung von Familie und Freunden. Daher möchte ich mich bedanken

- Bei meinen Eltern dafür, dass sie mir alles ermöglicht haben!
- Bei Franzi dafür, dass Du seit nun mehr neun Jahren an meiner Seite stehst!
- Bei meinen Schwestern Emilie und Anne-Sophie für die Unterstützung!
- Bei Familie Hecker und Angeheirateten für die immer richtigen Tipps und Tricks zur Promotion!
- Bei Heidrun und Erich Krumm für jahrelange Hilfe!

10 Publikationen

02.06.2011 Quantifizierung des Glomerulären Kapillaren Gefäß-
systems in Schweinen mittels 3D Mikro- und Nano-CT“
Deutscher Röntgenkongress Hamburg 2011. (Posterpreis
summa cum laude).



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6087-9



9 783835 196087 9