

CT, μ -CT und μ -Tomographie (Synchrotron) der in vitro Kalzifizierung

M. Krings¹, A. Mahnken², C. Schroer³, J. Patommel⁴, W. Kalender⁵
und B. Glasmacher¹

¹Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, RWTH Aachen (HIA) und IZKF
"BIOMAT.", Universitätsklinikum Aachen. ²Klinik für Radiologische Diagnostik,
Universitätsklinikum Aachen. ³Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY),
Hamburg. ⁴II. Physikalisches Institut B, RWTH Aachen. ⁵Institut für medizinische
Physik (IMP), Universität Erlangen-Nürnberg
Email: krings@hia.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Kalzifizierung stellt immer noch eine der Hauptursachen des Versagens biologischer Herzklappenprothesen dar. Mittels eines „Fatigue Accelerated Calcification Testers“ (FACT) können Bioprothesen in einem in vitro Verfahren beschleunigt kalzifiziert werden. Zur zerstörungsfreien Analyse des Kalzifikationsgrades und -ortes wurden erstmals in vitro kalzifizierte Herzklappenbioprothesen dreidimensional mit den hochauflösenden radiologischen Methoden μ -CT und μ -Tomographie (Synchrotron) analysiert. Die Auswertung der diversen Datensätze erfolgte nach Möglichkeit mit denselben Routinen. Besonders die Verteilung der Kalzifizierung in Segel und Aortenwand, das Kalzifizierungsmuster der gesamten Klappe und der Beginn der Kalzifizierung (Detektion kleinster Ablagerungsplaques) waren bei der Analyse von hohem Interesse. Abhängig von der radiologischen Untersuchungsmethode und der Kalzifizierungsmethode konnten für die einzelnen Bioprothesen volumetrische Gesamtkalzifikationsgrade zwischen zwei und 35 Prozent gefunden werden. Durch 2D- und 3D-Rekonstruktionen konnten ortsspezifisch Regionen unterschiedlichen Kalzifikationsgehaltes detektiert werden. Nach Auswertung bisher gewonnener Synchrotrondaten lässt sich für die Segelkalzifizierung als primären Kalzifikationsort die Spongiosa (Tunica media) bestimmen.

1 Problemstellung

Beim Ersatz einer defekten Herzklappe kommen Herzklappenbioprothesen zunehmend häufiger zum Einsatz und dies trotz ihres entscheidenden Nachteils der im Vergleich zu mechanischen Prothesen geringeren nicht prognostizierbaren Dauerfunktionstüchtigkeit. Die Hauptursache für die individuell eingeschränkte Haltbarkeit dieses Klappentyps liegt größtenteils am noch ungeklärten Phänomen der Bio-prothesenkalzifizierung. Hierbei handelt es sich um ein multifaktorielles Problem, da sowohl patientenspezifische als auch prothesenspezifische Faktoren eine Rolle spielen.

Mittels eines Testgeräts, dem „Fatigue Accelerated Calcification Tester“ können Bioprothesen in einem in vitro Verfahren beschleunigt kalzifiziert werden [1]. Diese kalzifizierten Bioprothesen dienen als Grundlage zur Erforschung der prothesenspezifischen Kalzifizierung. Zur zerstörungsfreien Analyse des Kalzifikationsgrades und -ortes werden radiologische, computertomographische (CT) und μ -computertomographische (μ -CT) Methoden sowie die μ -Tomographie mittels Synchrotronstrahlung eingesetzt.

Die Verfügbarkeit radiologischer Untersuchungsgeräte nimmt mit zunehmender Auflösung ab. So ist heutzutage das CT-Gerät mit einer Auflösung im mm-Bereich in beinahe jedem deutschen Krankenhaus anzutreffen. μ -CT-Geräte besitzen eine Auflösung von unter $100\mu\text{m}$ und sind in nur wenigen Forschungsstätten vorhanden. Tomographie mit Synchrotronstrahlung erreicht Auflösungen im μm -Bereich und kann zum Beispiel am DESY in Hamburg und beim ESRF in Grenoble durchgeführt werden. In vitro kalzifizierte Herzklappenbioprothesen wurden im Rahmen dieser Studie erstmals dreidimensional mittels der hochauflösenden radiologischen Methoden μ -CT und μ -Tomographie (Synchrotron) analysiert und rekonstruiert. Die Ergebnisse der einzelnen Analysemethoden sollen miteinander verglichen werden.

2 Material und Methode

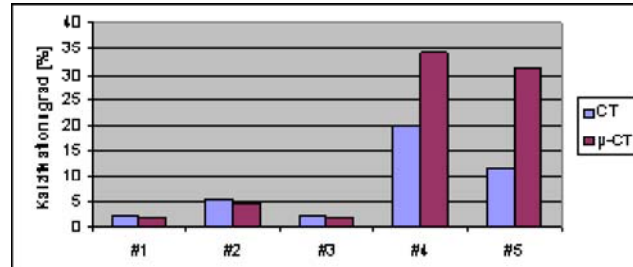
Herzklappenprothesen. Fünf Glutaraldehyd-fixierte aortale Bioprothesen porcinen Ursprungs wurden über vier Wochen mit zwei unterschiedlichen dynamischen beschleunigten in vitro Kalzifizierungsmethoden untersucht. Dabei handelt es sich um sogenannte gerüstringfreie Prothesen [2].

Kalzifizierungsmethoden. Die Untersuchungstemperatur im Testgerät betrug für alle Klappen ($37_{\pm 0.8}$) °C, die beim Klappenschluss herrschende Druckdifferenz $90^{+20/-0}$ mmHg bei einer Testfrequenz von 300/min. Das Testfluid wurde wöchentlich - nach ca. 3 Millionen Zyklen - gewechselt, um so den Verbrauch an Kalzifizierungsionen (Calcium- und Phosphat -ionen) zu kompensieren. Dieser diskontinuierliche Ersatz erfolgte bei drei Klappen (#1, #2 #3) [3]. Bei den übrigen Klappen (#4 und #5) wurden die durch die Präzipitation verbrauchten Ionen kontinuierlich über eine pH-abhängige Regelstrecke nachtitriert, so dass man von einer quasi „constant composition“ des Testfluids sprechen kann [4]. Der in vitro Kalzifizierungsversuch wurde nach 4 Wochen, respektive 12 Millionen Zyklen, planmäßig beendet.

Analysemethoden. Die Klappen sollten zerstörungsfrei und hoch orts aufgelöst auf Kalzifizierungsablagerungen untersucht werden. Dazu wurden drei Methoden eingesetzt:

Computertomographie. Die Klappen wurden zunächst vor Testbeginn und dann nach dem Kalzifizierungsprozess am 16-Schicht CT-Scanner (SOMATOM Sensation 16, Siemens, Forchheim, Germany) der Klinik für Radiologische Diagnostik des Universitätsklinikums Aachen mit folgenden Einstellun-

Abb. 1. Vergleich der volumetrischen Gesamtkalzifizierungsgrade die durch CT- und μ -CT-Analyse ermittelt wurden.



gen untersucht: 16 x 0.75 mm Collimation, 3.4 mm Tischvorschub pro Rotation, Röhrenspannung 120 kV, effektives Röhrenstromprodukt 100 mAs_{eff} und Röhrenrotationszeit 0.5s. Zur Bildrekonstruktion wurden eine effektive Schichtdicke von 1.0 mm und ein Rekonstruktionsinkrement von 0.3 mm gewählt. Die Datenrekonstruktion erfolgte mit einem Gesichtsfeld von 80 x 80 mm², einer 512x512 Rekonstruktionsmatrix und einem mittleren, zur Kalzifikationsbewertung optimierten glättenden Faltungskerns (B35f).

Microcomputertomographie. Die Bioprothesen wurden ebenfalls vor und nach dem Kalzifikationsprozess in Erlangen am IMP mit einem μ -CT-Scanner (Tomoscope 30s) analysiert. Dabei betrug der Messfelddurchmesser 40mm, die Röhrenspannung 80kV und die Pixelmatrix des Detektors 1024x1024. Hiermit ergibt sich eine räumliche Auflösung von < 100 μ m.

Synchrotron (μ -Tomographie). In der Reihe der radiologischen Untersuchungsmethoden steht die Analyse mittels Synchrotronstrahlung bezüglich der räumlichen Auflösung an oberster Stelle. Ein kleiner, ca. 2x1mm² kalzifizierter Segelabschnitt wurde am ESRF in Grenoble μ -tomographisch analysiert. Dabei wurden in der Projektionstomographie (Parallelprojektion) bei kalzifizierten Segelstückchen Auflösungen von etwa 1 μ m erreicht. Durch die Methode der vergrößerten Röntgenabsorptionstomographie [5] kann die räumliche Auflösung in Zukunft weit unter ein 1 μ m gedrückt werden. Die Brillanz (Anzahl emittierter Photonen pro Quellfläche, pro Zeiteinheit und pro Raumwinkel innerhalb einer relativen Energiebandbreite von 1/1000) einer modernen Synchrotronstrahlungsquelle ist um 12 Größenordnungen höher als die der besten Röntgenröhren. Eine Röntgenaufnahme, die an einem Synchrotron 1ms dauert, würde an einer Röntgenröhre 32 Jahre dauern. Größere Proben werden leider erst im Februar 2006 am DESY in Hamburg analysiert werden können.

Auswertemethoden. Die Auswertung der diversen Datensätze erfolgte nach Möglichkeit mit denselben Routinen. Dabei kamen eigene (DISOS®) (entwickelt am HIA, Abt. Chirurgische Therapietechnik) und kommerzielle Programme (z.B. T3D®) zur Anwendung. Klappenspezifisch wurden bei der CT- und μ -CT-Auswertung vor der Kalzifizierung Absorptionsschwellen bestimmt, ab deren Überschreitung von einer Kalzifizierung ausgegangen wird. Dabei wurde der

Abb. 2. Klappe #3: 3D Darstellung kalzifizierter Areale in Klappe #3: Rekonstruktion der CT- (links) und μ -CT- (rechts) Daten.



Gesamtkalzifikationsgrad als das Verhältnis der Voxelsumme der kalzifizierten Areale zur Gesamtvoxelsumme bestimmt. So konnten klappenspezifische volumetrische Kalzifikationsgrade ermittelt werden. Besonders die Verteilung der Kalzifizierung im Segelgewebe als auch im aortalen Wandgewebe (das Kalzifizierungsmuster der gesamten Klappe) und der räumliche Beginn der Kalzifizierung (kleinste kalkartige Plaques) waren bei der Analyse von hohem Interesse.

3 Ergebnisse

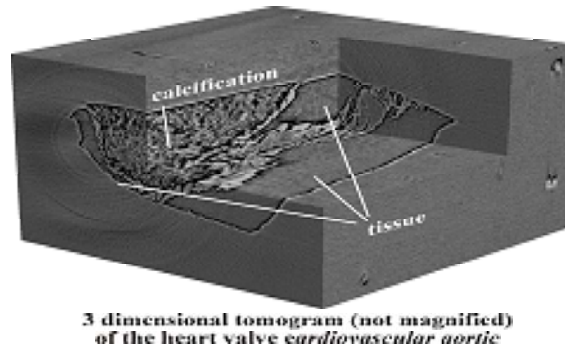
Abhängig von der radiologischen Untersuchungsmethode und der Kalzifizierungsmethode konnten für die untersuchten Bioprothesen individuelle volumetrische Gesamtkalzifikationsgrade zwischen zwei und 35 Prozent gefunden werden (siehe Abbildung 1). Hierbei konnte eine stärkere Verkalkung bei den Klappen #4 und #5, die nach der „constant composition“ Methode kalzifiziert wurden, beobachtet werden.

Im Vergleich konnten durch 2D- und 3D-Rekonstruktionen ortsspezifisch Regionen unterschiedlichen Kalzifikationsgehaltes detektiert werden. Ein Beispiel der 3D-Rekonstruktion ist in Abbildung 2 für die Klappe #3 abgebildet. Hierbei wurde mittels DISOS® die Klappengesamtkalzifizierung nach CT (links) und μ -CT-Analyse (rechts) dargestellt. Die feinkörnige Verteilung der Kalzifizierung über die gesamte Klappe lässt sich hierbei nur im rechten Bild (nach μ -CT-Analyse) darstellen obwohl wie in Abbildung 1 dargestellt die Gesamtkalzifizierungsgrade mit ca. 2% gleich hoch waren.

Nach Auswertung bisher gewonnener Synchrotrondaten (siehe Abb. 3) lässt sich für die Segelkalzifizierung als primären Kalzifikationsort die Spongiosa (Tunica media) bestimmen.

4 Diskussion

Radiologische Methoden eignen sich sehr gut zur zerstörungsfreien Darstellung der Kalzifizierung im kollagenreichen Herzklappenbioprothesengewebe. Die ge-

Abb. 3. 3D-Darstellung eines Segelanschnitts (μ -tomographisch)

wonnenen μ -Daten zeigen, wie fein strukturiert und somit für die konventionelle CT nicht erfassbar die Kalzifizierung von Bioprothesen sein kann. Durch die radiologische μ -Analyse kalzifizierter Bioprothesen können möglicherweise Rückschlüsse auf den ursprünglichen Kalzifikationsstartpunkt gezogen werden. Für den Patienten bedeutet der Nachweis kleinster detektierbarer Herzklappenkalkplaques im konventionellen CT, dass nach diesen Daten die Abklärung einer beginnenden Herzklappenkalzifizierung stattfinden sollte.

Danksagung. Diese Studie wurde mit Mitteln des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung „BIOMAT.“ in der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen (TV B108) sowie durch Mittel des „IKYDA 2003 bilateral cooperation program DAAD (DE) - IKY (GR)“ (D/03/40393)“ gefördert. Für die Hilfe beim Programm DISOS® danke ich Herrn Dipl.-Ing. Ting Wu.

Literaturverzeichnis

1. Pettenazzo E, Deiwick M, Glasmacher B, et al. Dynamic in vitro calcification of bi-oprothetic porcine valves: Evidence of Apatite. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(3):500–509.
2. Glasmacher B, Krings M, Kesper H, Schroer C. Calcification of stentless bioprotheses: 3D-localisation with computer tomography and high resolution micro tomography. *Int J Artif Organs* 2001;24(8):548.
3. Glasmacher B, et al. In vitro Kalzifizierung biologischer Herzklappenprothesen. Computer-gestützte Bestimmung des Kalzifizierungsgrads aus Mikroradiographie. In: *Procs BVM*; 1998.
4. Mavrilas D, Kapolos J, Koutsoukos PG, Dougenis D. Screening biomaterials with a new in vitro method for potential calcification: Porcine aortic valves and bovine pericardium. *Journal of materials science: materials in medicine* 2004;15:1–6.
5. Schroer C, Meyer J, Kuhlmann M, et al. Nanotomography based on hard x-ray microscopy with refractive lenses. *Appl Phys Lett* 2002;81(8):1527–1529.