

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Radke



---

## **Charakterisierung des Zustandes von pathologischem Lebergewebe durch Ultraschallgewebeparameter / Ultraschallspektroskopie**

### **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lars Köthe,  
geb. am 15.12.1974 in Merseburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Joachim Radke
2. Prof. Dr. med. Hans Heynemann
3. Prof. Dr. med. Peter Pohl (Linz)

Halle (Saale), den 27.10.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000012660**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012660>]

Ziel dieser Arbeit war es, Informationen über die Nutzbarkeit von Ultraschallgewebeparametern zur qualitativen und quantitativen Gewebedifferenzierung zu erhalten. Dazu wurden 35 durch Tetrachlorkohlenstoff toxisch geschädigte und 16 gesunde Rattenlebern histologisch, ultraschallspektroskopisch und deren Blut laborchemisch untersucht.

Beispielhaft für die akustischen Gewebeparameter erfolgte die Bestimmung der frequenzabhängigen Dämpfung durch die Schmalband- und eine modifizierte Spektrum-Differenz-Methode bei jeweils unterschiedlichem Wandler-Phantom-Abstand, des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten und des relativen Rückstreuungskoeffizienten.

Die gewonnenen Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungsmethoden und ihre Möglichkeiten einer qualitativen und quantitativen Beurteilung von Gewebeveränderungen werden diskutiert.

Köthe, Lars:  
Charakterisierung des Zustandes von pathologischem Lebergewebe durch Ultraschallgewebeparameter / Ultraschallspektroskopie  
Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2006

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung .....	1
1.1. Gewebedifferenzierung mittels Ultraschallverfahren in der medizinischen Diagnostik.....	1
1.1.1. A- und B-Bildverfahren .....	1
1.1.2. Ultraschall (US) -Gewebecharakterisierung / Ultraschall- spektroskopie .....	3
1.2. Die Leber als Versuchsobjekt .....	6
1.2.1. Funktion, Morphologie, ausgesuchte allgemeinpathologische Aspekte.....	6
1.2.2. Unterschiede zwischen der menschlichen und der Rattenleber .....	9
1.3. Tetrachlorkohlenstoff.....	9
1.3.1. Biochemischer Überblick .....	9
1.3.2. Histologische Veränderungen.....	12
1.3.3. Laborchemische Veränderungen.....	14
1.4. Problemstellung .....	14
2. Material und Methoden .....	16
2.1. Untersuchungsmaterial und dessen Aufarbeitung .....	16
2.2. Messverfahren .....	17
2.2.1. Ausbreitung von Ultraschall in biologischem Gewebe / Fre- quenzabhängige Gewebeparameter.....	17
2.2.2. Bestimmung der Ultraschall-Dämpfung .....	21
2.2.3. Bestimmung des relativen Rückstreukoeffizienten .....	26
2.2.4. Aufbau des Messplatzes.....	28
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Ergebnisse der histologischen Veränderungen.....	31
3.2. Ergebnisse der laborchemischen Veränderungen .....	34
3.3. Ultraschallmessergebnisse .....	41

4. Diskussion .....	48
4.1. Diskussion der histologischen Veränderungen .....	48
4.2. Diskussion der laborchemischen Ergebnisse.....	49
4.3. Diskussion der Ultraschallmessergebnisse.....	52
4.3.1. Die Ultraschalldämpfung.....	53
4.3.2. Der relative Rückstreukoeffizient .....	55
4.4. Schlussfolgerungen zur Effektivität der jeweiligen Bestimmungs- methoden bei der Gewebedifferenzierung .....	56
5. Zusammenfassung .....	58
Literaturverzeichnis .....	61
Thesen der Dissertation .....	78

## Verzeichnis häufig verwendeter Formelzeichen und Abkürzungen

### Abkürzungen

A.	Arteria
ALAT	Alaninaminotransferase
ASAT	Aspartataminotransferase
AT III	Antithrombin III
CAB	Chromotrop Anilinblau
DSO	Digital-Speicher-Oszilloskop
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Hochfrequenz
HIFU	High Intensity Focused Ultrasound
GPIB	General Purpose Interface Bus
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
ROI	region of interest
SGOT	Serumglutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serumglutamat-Pyruvat-Transaminase
US	Ultraschall
V.	Vena
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
Vv.	Venae

### Chemische Formelzeichen

$\text{Ca}^{2+}$	Kalziumionen
$\text{CCl}_3\cdot$	Trichlormethylradikal
$\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$	Trichlormethylperoxidradikal
$\text{CCl}_4$	Tetrachlorkohlenstoff (Tetrachlormethan)
$\text{CHCl}_3$	Chloroform
$\text{C}\cdot\text{OCl}$	Chlorocarbonylradikal

## Lateinische Formelzeichen

$a_s$	Anstieg des Dämpfungskoeffizienten
$f$	Frequenz
$f_C$	Mittenfrequenz des Schallwandlers
$I$	Ultraschallintensität
$I_0$	in das Medium einfallende Ultraschallintensität
$I_{BS}$	rückgestreute Ultraschallintensität
$I_{BS \text{ Gewebe}}$	aus dem Gewebe rückgestreute Ultraschallintensität
$I_{BS \text{ ref}}$	aus dem Referenzobjekt rückgestreute Ultraschallintensität
$\log A^2$	Abnahme der Signalamplitude
$\log A^2_{\text{Gew}}$	Abnahme der aus dem Gewebe rückgestreuten Signalamplitude
$\log A^2_{\text{Diff}}$	Differenz der Abnahme der Signalamplitude
$\log A^2_{\text{Ph0}}$	Abnahme der vom Phantom rückgestreuten Signalamplitude
$\log A^2_{\text{PhGew}}$	Abnahme der in Summe vom Phantom und Gewebe rückgestreuten Signalamplitude
$R$	Radius der streuenden Struktur
$t$	Zeit
$z$	Wandlerabstand

## Griechische Formelzeichen

$\alpha$	Dämpfungskoeffizient
$\alpha_0$	Dämpfungskoeffizient bei der Frequenz Null
$\alpha_A$	Absorptionsanteil des Dämpfungskoeffizienten
$\alpha_C$	Dämpfungskoeffizient bei der Mittenfrequenz des Schallwandlers
$\alpha_S$	Streuungsanteil des Dämpfungskoeffizienten
$\lambda$	Wellenlänge
$\sigma_{BS}$	Rückstreukoeffizient
$\sigma_{BS \text{ Gewebe}}$	Rückstreukoeffizient im Gewebe
$\sigma_{BS \text{ ref}}$	Rückstreukoeffizient im Referenzobjekt
$\sigma_{\text{rel BS}}$	Relativer Rückstreukoeffizient

## **1. Einleitung und Problemstellung**

### **1.1. Gewebedifferenzierung mittels Ultraschallverfahren in der medizinischen Diagnostik**

#### **1.1.1. A- und B-Bildverfahren**

Die Ultraschalldiagnostik mit ihren kaum vorhandenen Nebenwirkungen (Dewhurst, 1971; Watts et al., 1972) hat sich im Laufe ihrer Entwicklung als unentbehrliches Hilfsmittel bei der nichtinvasiven Untersuchung des menschlichen Körpers erwiesen und ist heute nicht mehr aus den klinischen Alltag wegzudenken.

Seit der Entwicklung der A- und B-Bild-Techniken in den 50er Jahren war und ist der Fortschritt in der Ultraschalldiagnostik unaufhaltbar: die Bildauflösung verbesserte sich, digitale Bildverarbeitungsverfahren wurden entwickelt, die Schallwandler wurden kleiner und leichter handhabbar.

Mit dem A-Mode-Verfahren ist es möglich, die Echosignale entlang einer akustischen Achse als Amplituden auf einen Oszillographen intensitäts- und laufzeitproportional wiederzugeben. Damit ist das A-Bild eine eindimensionale Darstellung. Im Gegensatz dazu stellt das B-Bild-Verfahren, bei dem die akustische Achse schrittweise verschoben oder geschwenkt wird, eine zweidimensionale Bilderzeugung dar. Beim B-Bild-Verfahren ist die Bildhelligkeit proportional zur jeweiligen Echoamplitude.

Gerade das B-Bild-Verfahren hat sich in den letzten zwanzig Jahren als nichtinvasive, leicht applizierbare, risikoarme, beliebig oft wiederholbare und vor allem effektive Methode in der medizinischen Diagnostik zur Erkennung pathologischer Organveränderungen durchgesetzt (Ehler et al., 1979). Eine genaue Gewebebeurteilung ist dabei jedoch nur in Grenzen möglich und in hohem Maße von der Güte des Diagnosegerätes und der Erfahrung des Untersuchers abhängig (Lutz et al., 1979). So ist es z. B. bei der Leber möglich, diffuse Parenchymabnormalitäten mit einer Treffsicherheit von 77 bis 98% zu erkennen (Joseph et al., 1991; Sandford et al., 1985). Man kann diese Strukturabnormalitäten aber nicht genau klassifizieren (40 % der fokalen Leberläsionen bleiben bei dem nativen B-Bild-Verfahren unklar [Strobel et al., 2003]), so dass die konventionellen B-Bild-Verfahren als weniger nützlich zum Erkrankungsscreening aber sehr gut zum Auffinden unspezifischer Gewebeabnormalitäten geeignet sind (Joseph et al., 1979; Sandford et al., 1985).

Wesentlich für die klinische Diagnostik sind jedoch die sichere Beurteilung der feingeweblichen Veränderungen, objektivierbare Verlaufskontrollen und die Erfassung

der Dynamik morphologischer pathologischer Befunde. Die Kombination mehrerer verschiedener Abbildungscharakteristika (Gosink et al., 1979) und die Einbeziehung klinischer Parameter in die Diagnosefindung lässt eine weitere, wenn auch nur geringe Eingrenzung des sonografischen Befundes zu. Mit verschiedenen elektronischen und computergestützten Auswertverfahren lässt sich die B-Bild-Information umfassender und auch objektiver nutzen. Hierzu gehörten und gehören:

- die als Pre- und Postprocessing bezeichneten signal-, empfangs- und verarbeitungsmodulierenden Eingriffe
- die Leuchtdichtemessungen von Rettenmaier (1977),
- die Videodensitometrie (Raab et al., 1982), ein statistisches Bildpunktauswertverfahren, auf dem Wege einer Helligkeits- und Punktdichtemessung ähnlich der Leuchtdichtemessung,
- die computerisierte B-Bild-Texturanalyse, bei der durch Aufarbeitung der Grauwerte in Bezug auf Verteilung, Dichte, Varianz und Schiefheit durch computergesteuerte Berechnungen eine höhere Trefferwahrscheinlichkeit bei der Entdeckung von Leber- (Raeth et al., 1985), aber auch bei Prostata- und Schilddrüsenerkrankungen (Mailloux et al., 1983) erzielt werden konnte,
- der Aufbau dreidimensionaler Schnittbilder (Landes et al., 2006 a & b; Meyberg-Solomayer et al., 2004),
- die intravasale Ultraschalldiagnostik (Shimada et al., 2006; Jang et al., 2002)
- die Kontrastmittelsonographie, mit der eine Sensitivität von mehr als 95 % bei der Erkennung fokaler Leberläsionen bzw. eine Spezifität von 89 bis 97 % hinsichtlich der Diagnose maligner Leberläsionen erzielt werden konnte (von Herbay et al., 2004; Hohmann et al., 2003; Strobel et al., 2003),
- die Grauwertstatistik 1. und 2. Ordnung mit (Li et al., 2005) und ohne Kontrastmittel (Nielsen et al., 2000),
- die so genannte Hochfrequenz-Sonografie, bei der Frequenzen von 20 bis über 50 MHz genutzt werden und die damit nur zur Darstellung peripherer Gewebe wie der Haut (Raju & Srinivasan, 2001), der vorderen (Coleman et al., 1998) und hinteren (Coleman et al., 2004) Segmente des Auges geeignet ist, erreicht ein axiales und laterales Auflösungsvermögen von bis zu 50 µm, bei einer maximalen Eindringtiefe von 5 bis 15 mm (Roters, 2001).
- das Tissue Harmonic Imaging und Contrast Harmonic Imaging (Choudhry et al., 1999; Becker et al., 2000), u. a. m.



Mit all diesen Methoden wird die Informationsausbeute und die daraus resultierende Diagnosegenauigkeit aus den Ultraschall-A- bzw. B-Bild erhöht. Eine quantitative Beschreibung bzw. Einschätzung der Pathologie des betreffenden Gewebes ist aber damit nicht möglich.

### **1.1.2. Ultraschall (US)-Gewebecharakterisierung / Ultraschallspektroskopie**

Der durch den Schallwandler ausgesendete US-Impuls erzeugt eine kleine Serie fokussierter Kompressionen und Dekompressionen des fortleitenden Mediums. Somit ist der US-Impuls dafür verantwortlich, dass innerhalb des Mediums im Raum vor dem Wandler Regionen entstehen, die mehr oder weniger komprimiert sind als die umgebenden Gebiete. Die dadurch entstehenden akustischen Reflexionen werden mit Hilfe des Schallwandlers sowohl in positive als auch in negative Spannungen umgewandelt. In konventionellen US-Bild-Systemen besteht der erste Schritt der Echobearbeitung in der Berechnung der Einhüllenden des hochfrequenten Echosignals. Die sich daraus ergebenden Daten können dann relativ einfach als Amplituden im A-Bild oder als Grauwertpunkte im B-Bild dargestellt werden. Damit erlaubt das konventionelle A- bzw. B-Bild nur eine qualitative, stark vom verwendeten System und vom Untersucher abhängige Beurteilung der Eigenschaften des Gewebes, beschränkt auf die Mittelfrequenz des Wandlers. Unser Verständnis über die Art und Weise, mit der der US mit dem biologischen Gewebe interagiert, deutet aber darauf hin, dass die unkorrigierten hochfrequenten Echosignale Daten und damit Informationen über die physikalischen Charakteristika des betreffenden Gewebes enthalten, die bei der oben erwähnten Korrektur verloren gehen. Die Tatsache, dass das US-Echo mehr Informationen als die herkömmlich genutzten enthält, veranlasste viele Wissenschaftler dazu, das Gebiet, welches als US-Gewebecharakterisierung bekannt wurde, zu erforschen.

Ein Weg zu dieser US-Gewebecharakterisierung nutzt die Analyse der hochfrequenten US-Daten in Form des so genannten normalisierten Powerspektrums (Lizzi et al., 1983; Feleppa et al., 1986). Warum aber sollte das normalisierte Gewebe-Powerspektrum von Interesse sein? Die Antwort liegt in unserem Verständnis für die Streuphänomene. Das am besten deutlich machende, uns tagtäglich begleitende Beispiel für die Streuung ist das Himmelblau. Der Himmel ist im Tagesverlauf deshalb nicht schwarz, weil kleinste Partikel der Atmosphäre das Sonnenlicht abfangen und in eine neue Richtung streuen. Rayleigh (1871) zeigte, dass die Farbe des gestreuten Lichtes von den Eigenschaften der Lichtquelle, in unseren Fall der Sonne,

und von der Größe der streuenden Partikel abhängig ist. Wenn diese Partikel relativ klein sind zur Wellenlänge des Lichtes, dann werden die höchsten Frequenzanteile des Lichtquellenspektrums am effektivsten gestreut. In unserem Beispiel ist das der blaue Anteil des Sonnenlichtes, wohingegen der niedrige Frequenzanteil weiter in gerader Linie zur Erde gelangt. Analog zum eben beschriebenen Beispiel interagiert die akustische Welle des US mit den Gewebekomponenten.

Es ist möglich, durch die Spektralanalyse der Echosignale und nach entsprechender Korrektur der Systemeigenschaften (Gärtner et al., 1996) verschiedene Gewebeparameter zu berechnen. Die Korrektur erfolgt dabei auf der Basis von Schallfeldmessungen oder Messungen an Referenzobjekten mit bekannten, gewebeähnlichen akustischen Eigenschaften (Chen & Zagzebski, 2004; Browne et al., 2003; Wu et al., 1992). Bei den am meisten gebrauchten Parametern handelt es sich um:

- die Dämpfung, in Versuchen
  - am Herzen zur Ischämieerkennung (Mimbs et al., 1979; O`Donnell et al., 1979),
  - an Nieren (Worthington & Sherar, 2001), Sehnen und Hoden (Goss et al., 1979),
  - an humanem Muskel- (Ophir et al., 1982), Knochen- (Wear et al., 2000) und Prostatagewebe (Worthington et al., 2002),
  - zur Erkennung von Lebererkrankungen (Gaitini et al., 2004; Kuc, 1980),
  - während der Schwangerschaft und an der Lunge (Ophir et al., 1984),
  - zur besseren Interpretation von Hochfrequenzultraschallbildern (Maruvada et al., 2000)
  - zur Klärung des Einflusses von Glykogen-, Phosphat- (Parker et al., 1987), Kollagen- (Nguyen et al., 2001), Protein- (Goss & Dunn, 1980), Fett- (Mörlein et al., 2005; Taylor et al., 1986; Suzuki et al., 1992) und Wassergehalt (Tuthill et al., 1989) auf die Dämpfung,
  
- die Streuung, in Versuchen
  - am Herzen zur Ischämieerkennung (Lin et al., 2000; Wu et al., 2000),
  - zur Erfassung der Abhängigkeit des Streukoeffizienten vom Fett- (Mörlein et al., 2005) und Kollagengehalt (Nguyen et al., 2001),
  - an humanen Milz- (Sommer et al., 1982), Brust- (Anderson et al., 2001), Knochen- (Wear et al., 2000) und Prostatagewebe (Worthington et al., 2002),
  - an fetalen Lungen- und Lebergewebe (Ossant et al., 2001)
  - zur Erkennung von Leber- (Gaitini et al., 2004; Gara et al., 1987; Lu et al., 1999) und Nierenerkrankungen (Worthington & Sherar, 2001; Gara et al., 1994),

- zur besseren Interpretation von Hochfrequenzultraschallbildern (Maruvada et al., 2000)
- die Schallgeschwindigkeit, in Versuchen
- an fetalen Hirngewebe des Menschen (Wladimiroff et al., 1975),
  - an humanen Leber- (Bamber et al., 1981b; Lin et al., 1987), Knochen- (Wear et al., 2000) und Milzgewebe (Chen et al., 1987),
  - zur Klärung des Einflusses von Kollagen-, Fett- und Wassergehalt (Lin et al., 1987; Matsushashi et al., 1996) auf die Schallgeschwindigkeit, u. a. m.

Mit Hilfe dieser Gewebeparameter ist eine relativ genaue und auch frühzeitige Gewebedifferenzierung zwischen normalem und pathologisch verändertem Gewebe erreichbar (Allison et al., 1994). Vor allem die Kombination dieser Parameter ermöglicht Erkenntnisse über kleinste Strukturen von normalen und pathologischen Geweben (Insana et al., 1989) und damit eine bessere Differenzierbarkeit von Gewebeveränderungen (Hartmann et al., 1993). Insbesondere in Bezug auf die Tumorfriherkennung und die Tumordifferenzierung in der Gastroenterologie (Bamber & Hill, 1981a; Jenderka et al., 1991; Dong et al., 1994) und der Ophthalmologie (Coleman et al., 1985; 1990) erreichte man damit erste viel versprechende Ergebnisse. Ein Vergleich zwischen einer konventionellen B-Bildauswertung durch einen Arzt und ausgewerteter Gewebeparameter der US-Gewebecharakterisierung bei verschiedenen Lebererkrankungen zeigte die sehr viel höhere Treffsicherheit in der Auffindung und Differenzierbarkeit der pathologischen Leberveränderungen durch die US-Gewebecharakterisierung (Garra et al., 1989). In anderen Versuchen wurde außerdem deutlich, dass eine pathologische Veränderung mit Hilfe der Beurteilung von US-Gewebeparametern zu einem früheren Zeitpunkt zu erkennen war, als mit der subjektiven B-Bild-Auswertung (O'Brien et al., 1996; Lu et al., 1997).

Nachdem die ersten speziell auf die Gewebecharakterisierung abgestimmten US-Arbeitsstationen entwickelt wurden (Krasner et al., 1994), erfolgten die ersten, größeren, klinischen Anwendungen.

Die Gewebebecharakterisierung mit Hilfe der Spektralanalyse der Echosignale, bei der man auch von der US-Spektroskopie spricht, befindet sich zurzeit noch in der Phase der klinischen Erprobung. Aber durch die im Vorfeld gemachten Erfahrungen kann man auf eine Erfolg versprechende Anwendung in der medizinischen Diagnostik hoffen.

## **1.2. Die Leber als Versuchsobjekt**

### **1.2.1. Funktion, Morphologie, ausgesuchte allgemeinpathologische Aspekte**

Die Leber stellt das zentrale Stoffwechselorgan und die größte Drüse des menschlichen und tierischen Körpers dar. Aufgrund ihrer Einschaltung zwischen Pfortader (V. porta) und unterer Hohlvene (V. cava inferior) ist die Leber für viele im Darm resorbierte Stoffe eine wichtige Zwischenstation auf dem Wege in den Organismus. Alle Stoffe, die mit der Nahrung aufgenommen, im Darm aufgeschlossen, resorbiert und an die Pfortader weitergegeben werden, gelangen zunächst in die Leber. Hier finden wichtige Syntheseschritte statt. So wird ein großer Teil der Blut- und Gerinnungsproteine und des Cholesterinbedarfs in der Leber gebildet und in das Blut abgegeben. Für Glukose dient die Leber als zentrales Speicherorgan nach dessen Umbau zu Glykogen. Die Leber ist jedoch nicht nur als zentrales Synthese- und Speicherorgan lebenswichtig, sondern sie nimmt auch eine Monopolstellung bei Abbau und Entgiftung körpereigener und körperfremder Verbindungen ein. Diese können verstoffwechselt bzw. über die Niere (u. a. Harnstoff) oder über die Galle (u. a. Blutfarbstoffe, Gallensäuren, Arzneimittel) ausgeschieden werden. Weiterhin produziert die Leber als exokrine Drüse Galle, die in den Darm abgegeben wird. Die Galle enthält hauptsächlich Gallensäuren, Gallenfarbstoffe, Cholesterin, Phospholipide, Immunglobuline und Albumin. Sie dient der Ausscheidung von Fremdstoffen und nicht mehr benötigten Stoffwechselprodukten und erfüllt gleichzeitig eine wichtige Funktion bei der Verdauung in Form der Emulgierung von Fetten.

Zur optimalen Erfüllung aller dieser Funktionen ist eine enge räumliche und funktionelle Beziehung zwischen den Zellen der Leber und dem Blut Voraussetzung. Sie wird durch die spezielle Architektur der Leber gewährleistet. Jede Beeinträchtigung dieser einzelnen Komponenten und deren Interaktion im Rahmen krankhafter Prozesse führt zu einer Funktionsstörung der Leber.

Die Leber besteht aus einer riesigen Anzahl einander ähnelnder, etwa 1-2 mm großer Baueinheiten, den Leberläppchen. Im Leberläppchen sind die Leberzellen und die Endstrecken der Blutgefäße, die Lebersinus, in ganz bestimmter Weise angeordnet. Die Gestalt des einzelnen Leberläppchens kann mit der einer Bienenwabe verglichen werden. Die Höhe beträgt etwa 2 mm, der Durchmesser 1,0-1,3 mm. In der Längsachse des im Querschnitt polygonalen Gebildes verläuft die Zentralvene, die den Anfangsteil des abführenden Systems der Vv. hepaticae bildet. Durch die polygonale Gestalt der Leberläppchen entsteht im Winkel zwischen mehreren solcher

Läppchen ein großer dreieckiger Bindegewebsspalt, der als periportales Feld bezeichnet wird. In diesem Dreieck liegen als Glissonsche Trias jeweils ein Ast der A. hepatica propria in Form der A. interlobulares, der V. porta in Form der V. interlobulares und ein ableitender Gallengang in Form des Ductus interlobulares.

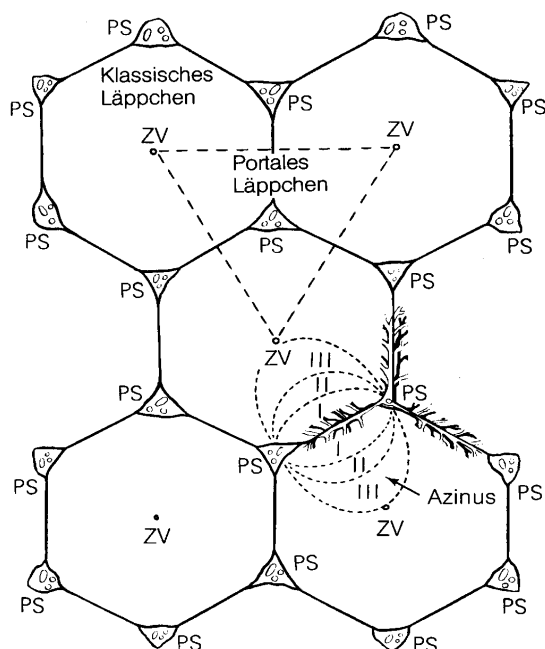


Abb. 1.1. Schema zur Lebergliederung in klassisches Läppchen, Periportalläppchen und Leberazini

PS Periportalfeld  
 ZV Zentralvene  
 I erste metabolische Zone  
 II zweite metabolische Zone  
 III dritte metabolische Zone

(nach Junqueira, 2000)

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten der Lebergliederung (siehe Abb. 1.1):

- das klassische Leberläppchen - mit der Zentralvene im Mittelpunkt, auf die radiär gestellte Leberzellplatten und Sinusoide zugehen, und den Periportalfeldern als periphere Ecken,
- das Periportalläppchen - mit diesen im Mittelpunkt und den Zentralvenen als Eckpunkte, wodurch die Funktion der Leber als Drüse mit den Gallengängen als Zentrum betont wird, und
- die Leberazini - in der die Gefäßversorgung im Mittelpunkt steht und damit die Stoffwechselprozesse am deutlichsten beschreibt. Der rhombenartige Leberazinus besteht aus je einem Teilbezirk von zwei Leberläppchen, wobei die Ecken jeweils von zwei gegenüberliegenden Zentralvenen sowie zwei Periportalfeldern gebildet werden. Das Blut fließt von der Peripherie durch drei metabolische Zonen zur Zentralvene, wobei das Blut durch zahlreiche Stoffwechselprozesse verändert wird. Die aeroben Stoffwechselprozesse laufen in der Peripherie, die anaeroben in der Innenzone ab. Diese Einteilung bildet für das Verständnis pathologischer Befunde große Vorteile (Arias et al., 1988; Rappaport, 1980; Rappaport et al., 1954).

Die Leberläppchen bestehen aus radiär zur Zentralvene ausgerichteten Leberzellplatten oder -balken, die zusammen ein dreidimensionales Netz bilden (siehe Abb. 1.2.). Diese Platten und Balken bestehen wiederum aus einschichtig angeordneten Leberzellen, den Hepatozyten. Das den Leberzellen zugeführte nährstoffreiche Blut gelangt von der Pfortader über kleinere Venen zu den Lebersinusoiden, die zwischen den aus Leberzellen aufgebauten Zellsträngen liegen und in Funktion weiträumiger Kapillaren das Blut von der Läppchenperipherie zur Zentralvene weiterleiten. Die sehr dünne Wand der Lebersinusoiden besteht aus drei Zelltypen (Fahimi, 1969):

- Endothelzellen,
- Kupfer-Zellen, die zum Monozyten-Makrophagen-System gehören (Widmann et al., 1972) und
- Fettspeicherzellen, die Lipide und Vitamin A enthalten (Tanuma et al., 1982).

Zwischen der aus Endothelzellen aufgebauten Wand der Sinusoide und den Leberzellen liegt der perisinusoideale Raum, der auch als Disse'sche Raum bezeichnet

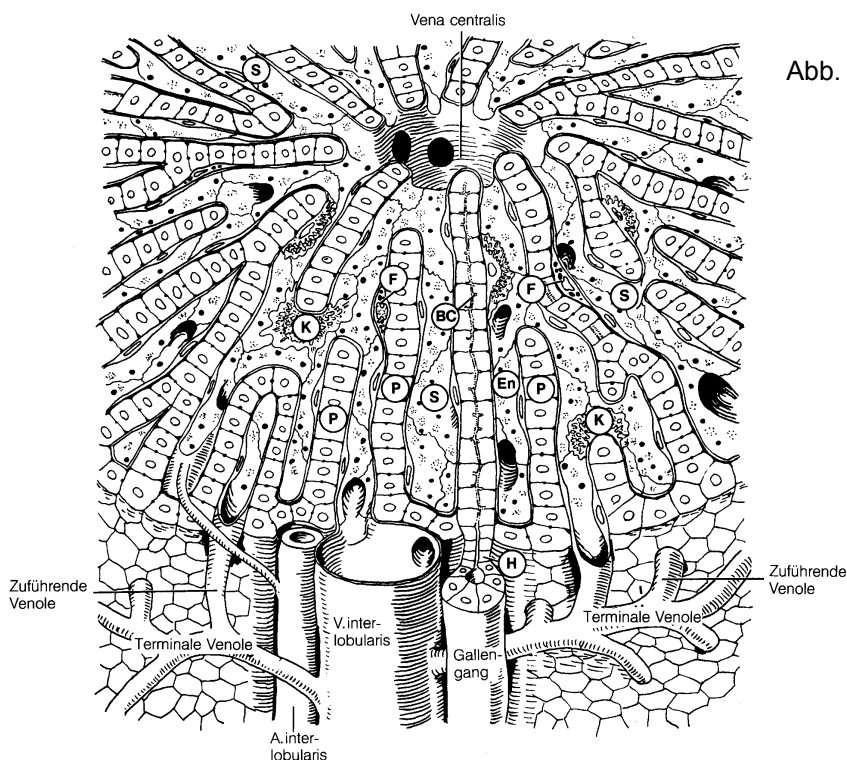


Abb. 1.2. Dreidimensionale Darstellung der Leber

- S Sinusoide
- En Endothelzellen
- K Kupfer-Zellen
- F fettspeichernde Zellen
- P Leberzellplatten
- BC interzelluläre Gallenkanälchen

(nach Junqueira, 2000)

wird. Die Gallenkapillaren liegen als rinnenartige Vertiefungen zwischen den einander zugekehrten Leberzellen. Sie besitzen keine eigene Gefäßwand. Ihre Wand wird vom Plasmalemm der Leberzellen gebildet.

Kommt es zu einer Störung des Fettsäure- und Triglyceridstoffwechsels und damit zu einer vermehrten Anhäufung von Triglyceriden in den Leberzellen, spricht man von

einer Fettleber. Viele chronische Lebererkrankungen verursachen eine Bindegewebsvermehrung im Leberparenchym. Bleibt dabei die normale Läppchenarchitektur erhalten, spricht man von einer Leberfibrose. Die Leberzirrhose ist ein Endstadium diverser schwerer entzündlicher und nekrotisierender Leberschädigungen, wobei es unter Ausbildung von Bindegewebssepten und Parenchymregeneratknoten zu einer Zerstörung der lobulären und vaskulären Leberarchitektur gekommen ist.

### **1.2.2. Unterschiede zwischen der menschlichen und der Rattenleber**

Die vierlappige Leber ist im Verhältnis zu den anderen inneren Organen der Ratte relativ groß, wobei der linke Hauptlappen der größte ist. Eine Gallenblase ist nicht vorhanden, so dass die sezernierte Galle ohne Speichermöglichkeit direkt in den Dünndarm geleitet wird (Hagemann und Schmidt, 1960).

Der Bindegewebsanteil der Rattenleber ist um einiges höher, als der der Menschenleber. Dadurch ist die Läppchengliederung sehr ausgeprägt und lässt sich schon makroskopisch deutlich erkennen (Giersberg und Rietschel, 1986).

Im mikroskopischen Aufbau, in der Physiologie und Pathologie gibt es aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen der menschlichen und der Ratteleber.

## **1.3. Tetrachlorkohlenstoff**

### **1.3.1. Biochemischer Überblick**

Tetrachlorkohlenstoff (Tetrachlormethan,  $\text{CCl}_4$ ) fand früher als Fleckentferner in der chemischen Reinigung und im Haushalt weit reichende Verwendung. Außerdem wurde es als Allgemeinanästhetikum, als Wurmmittel und als Haarwaschmittel benutzt und war damit häufige Ursache von Vergiftungen. Dabei sind vor allem Niere (Schädigung der proximalen Tubuli) und Leber, aber auch das Herz (Sensibilisierung des Myokards für Katecholamine mit daraus folgenden Herzrhythmusstörungen) organotoxisch betroffen. Heute wird Tetrachlorkohlenstoff nur noch als gewerbliches Lösungsmittel bei der Maschinenreinigung und zu experimentellen Versuchen in wissenschaftlichen Laboratorien verwendet (Kahl, 1997).

Tetrachlorkohlenstoff gehört zu den Lebergiften, die erst nach metabolischer Aktivierung biologisch wirksam werden. Diese metabolische Aktivierung findet hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum, aber zu einem geringen Teil auch in den Mitochondrien (Brattin et al., 1984; Tomasi et al., 1987) statt. Dabei wird das  $\text{CCl}_4$  mit

Hilfe des Cytochrom P-450 zum primären toxischen Metabolit Trichlormethylradikal  $\text{CCl}_3\cdot$  reduziert (Albano et al., 1982; Davies & Slater, 1986; Connor et al., 1986). Das Cytochrom P-450 wird bei dieser Reduktion inaktiviert, wahrscheinlich auf Grund der Zerstörung der Häm-Gruppe durch das  $\text{CCl}_3\cdot$  (Fernandez et al., 1982; Manno et al., 1989). Das Cytochrom P-450 ist also gleichzeitig Katalysator und Ziel der reduktiven Aktivierung des  $\text{CCl}_4$  (Manno et al., 1992), weshalb man auch von einer Suizidreaktion des Enzyms spricht (Manno et al., 1988).

In Gegenwart von Sauerstoff bildet sich aus  $\text{CCl}_3\cdot$  das sehr viel reaktivere Trichlormethylperoxyradikal  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$  (Forni et al., 1983) (siehe Abb.1.3.). Connor et al. (1986) berichteten des Weiteren von einem dritten freien Radikal als Derivat des

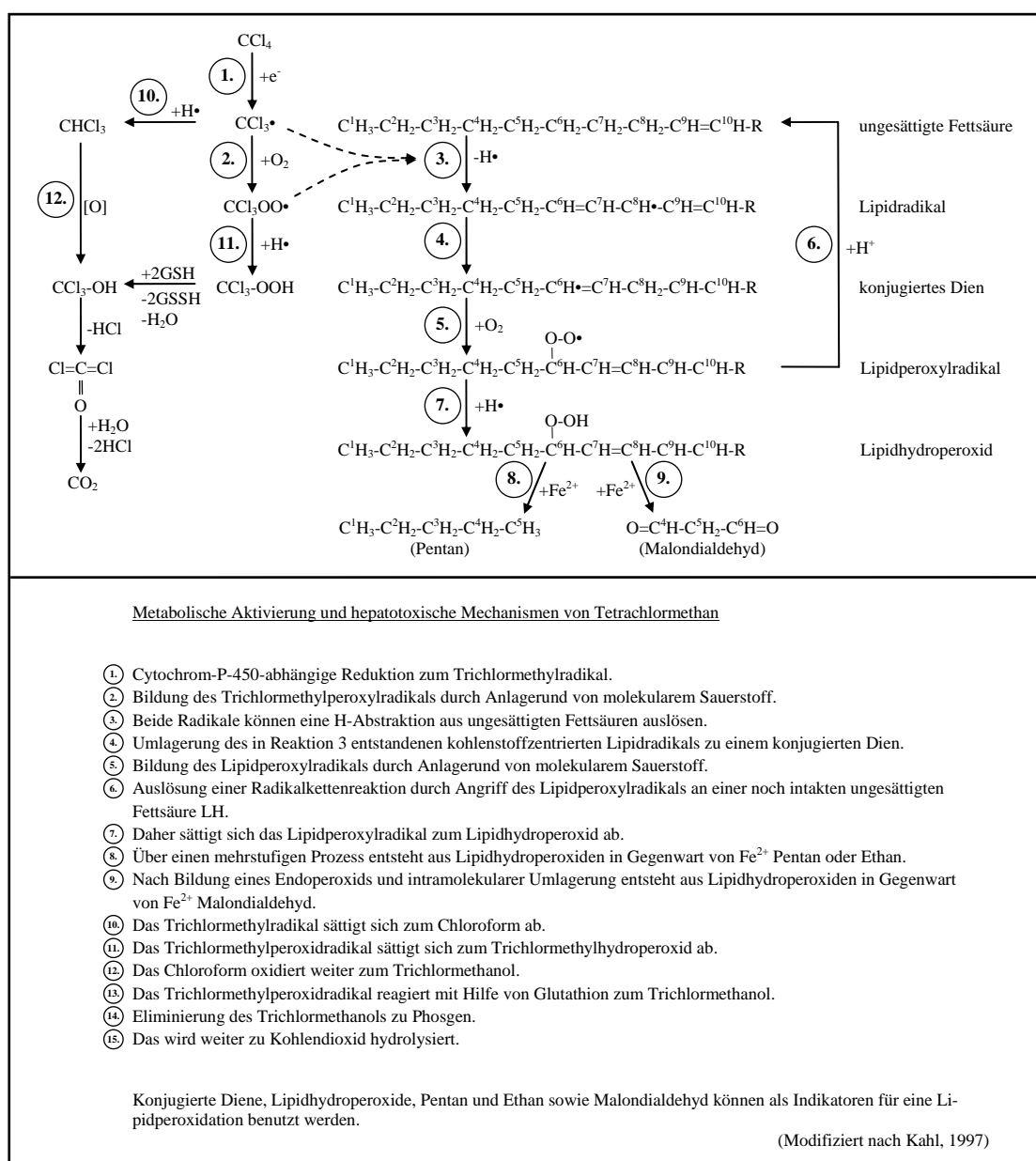


Abb. 1.3. Metabolische Aktivierung und hepatotoxische Mechanismen von Tetrachlormethan



$\text{CCl}_4\cdot$  aus dem  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$  bildet sich das Chlorocarbonylradikal  $\text{C}\cdot\text{OCl}$ , welches sich schnell zu Kohlensäure umwandelt.

$\text{CCl}_3\cdot$  und  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ , die zwei wichtigsten Radikale der  $\text{CCl}_4$ -Metabolisierung, lösen im endoplasmatischen Retikulum durch Wasserstoffabstraktion aus ungesättigten Fettsäuren eine Lipidperoxidation aus. Dabei entstehen Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) und kohlenstoffzentrierte Fettsäureradikale. Chloroform wird oxidativ zu Phosgen, einem ebenfalls reaktionsfähigen und sehr toxischen Molekül, metabolisiert (Dianzani and Poli, 1985). Quantitativ ist dieser Weg für die  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung von untergeordneter Bedeutung, wahrscheinlich dadurch, dass beim  $\text{CCl}_4$ -Metabolismus gleichzeitig Cytochrom P-450 durch  $\text{CCl}_3\cdot$  zerstört wird und daraufhin der  $\text{CHCl}_3$ -Metabolismus zu Phosgen vermindert wird (Kappus, 1996). Aus den entstandenen kohlenstoffzentrierten Fettsäureradikalen entstehen durch Sauerstoffaufnahme Lipidperoxyradikale, die eine Radikalkettenreaktion auslösen, indem sie neue, noch intakte Fettsäureketten angreifen und sich selbst zu Hydroperoxid absättigen (Kappus, 1985 & 1987; Sevanian & Hochstein, 1985). Die instabilen Hydroperoxide reagieren in Gegenwart von Eisenionen weiter zu Ethan, Pentan und Malondialdehyd (Kahl, 1997).

$\text{CCl}_3\cdot$  und  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$  führen aber nicht nur zur Wasserstoffabstraktion, sondern binden sich auch irreversibel an Lipide und Proteine. Dadurch kommt es:

- zu einen Aktivitätsverlust des Cytochrom P-450
- zu einen Aktivitätsverlust der Glukose-6-phosphatase, einen Markerenzym des endoplasmatischen Retikulums
- zur Hemmung der Proteinsynthese (Smuckler et al., 1962), die sich elektronenmikroskopisch durch eine Verringerung des Ribosomenbesatzes im rauen endoplasmatischen Retikulum manifestiert
- zu einer Abnahme der Lipoproteinsekretion und
- zu einer Schädigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen.

Aus dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien als Orte der toxischen Primärläsion der  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung breitet sich die Schädigung auch auf die anderen Leberzellkompartimente aus. Dafür ist wahrscheinlich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilungsstörung verantwortlich (Recknagel, 1983). Durch den  $\text{CCl}_4$ -Metabolismus im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien, der wie schon erwähnt mit einer Schädigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen (Lowrey et al., 1981; Tomasi et al., 1987) einhergeht, kommt es zu einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol (Dolak et al., 1988). Das wiederum löst die Aktivierung zahlreicher kataboler Enzyme aus. So führt

die Aktivierung von "latentem" Membran-Phospholipasen durch eine hohe cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Glende & Pushpendran, 1986; Ungemach, 1985) zu einer Degeneration der Plasmamembranen und damit zum Zelltod (Recknagel & Glende, 1989; Recknagel et al., 1989).

In der Literatur gibt es bis heute noch immer keine einheitliche Meinung, welche der oben beschriebenen biochemischen Veränderungen Konsequenzen der Lipidperoxidation oder der Halalkylierung sind.

### 1.3.2. Histologische Veränderungen

Die Tetrachlorkohlenstoffintoxikation führt zu verschiedenen morphologischen Veränderungen in der Rattenleber, die von der Fettleber über die Leberfibrose bis letztendlich zur Leberzirrhose reichen können. Schon kurze Zeit nach der  $CCl_4$ -Metabolisierung kommt es im Zentrum der Leberläppchen zu einer hydropischen Schwellung mit Vergrößerung der Kerne der Hepatozyten und einer Einengung vieler Sinusoide (Sandritter & Beneke, 1974). Ursache ist wahrscheinlich die oben schon erwähnte Zerstörung des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien mit dem damit verbundenen Wassereinstrom in diese Zellkompartimente (siehe auch Abb. 1.4.). Im weiteren Verlauf entwickelt sich gleichzeitig mit einem makroskopisch sichtbaren, stärker hervortretenden Läppchenaufbau eine zentrolobuläre Nekrose, die mit einer hydropischen Schwellung der Zellen am Rand der Nekrose und mit schweren, großtropfigen Fettablagerungen in der Intermediärzone vergesellschaftet ist, die bis fast an die portalen Felder reichen (Popper & Schaffner, 1961).

Die Fettablagerung in das Zytoplasma der Leberzellen, als pathomorphologisches

Korrelat der Fettleber, stellt eine Triglyceridakkumulation dar und entsteht durch eine Sekretionsstörung für die fetttransportierenden Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) (Recknagel et al., 1960).

Diese beruht auf einer

Synthesestörung des Apolipoproteins der VLDL und wahrscheinlich auch durch eine

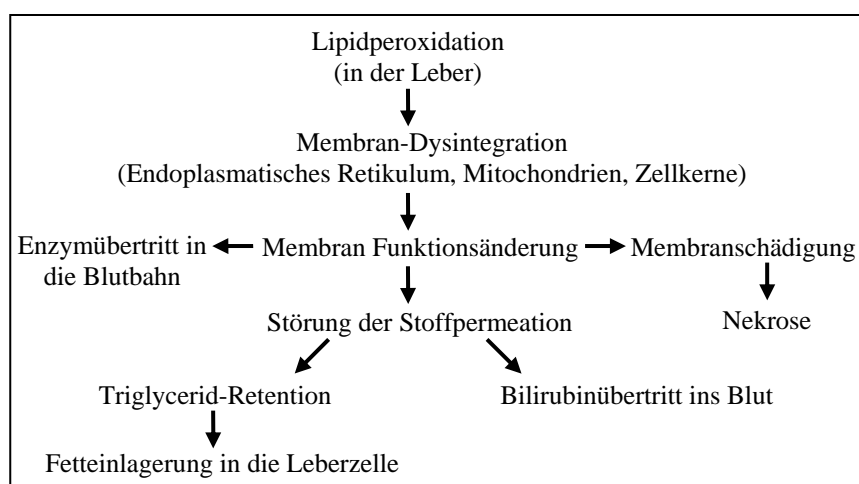


Abb. 1.4. Auswirkungen der Lipidperoxidation

gestörte Kopplung zwischen der Fett- und Eiweißkomponente (Poli et al., 1985 & 1987). Die Fettvakuolen sind dabei von Membranen des endoplasmatischen Retikulums umgeben (Denk et al., 2004). Neben den Fettvakuolen sind noch Lipofuszinpigmente als Produkt der Lipidperoxidation und Zerroidpigmente als typisches "Zerfallspigment" von oxidierten Lipiden auffällig (Bornhöft, 1997).

Obwohl es in der Literatur auch gegenteilige Beschreibungen gibt (Szende et al., 1988), gilt die zentrolobuläre Lokalisation der Nekrose für die CCl<sub>4</sub>-Vergiftung als charakteristisch. Die Ursache dafür ist die Konkurrenz von CCl<sub>4</sub> und Sauerstoff um das verfügbare Cytochrom P-450 (de Groot und Noll, 1986). Deutlich wird diese Konkurrenz dadurch, dass der Metabolismus und damit auch die Toxizität des CCl<sub>4</sub> in vitro bei niedrigen Sauerstoffpartialdruck am größten ist. Da in der zentrolobulären Region der Sauerstoffpartialdruck am geringsten und die Konzentration des Cytochrom P-450 am größten ist (Kahl, 1994; Kappus, 1996), manifestiert sich hier die CCl<sub>4</sub>-Schädigung als erstes und am deutlichsten.

Im weiteren Verlauf kommt es infolge der durch den eintretenden Abbau der Parenchymnekrose entstehenden Gewebeinstabilität (Ashburn et al., 1947) zu einem Gewebekollaps. Dieser zeigt sich durch dicht zusammengerückte Blutgefäße (Kämpfe, 1978) und verstreut liegende Hepatozyten mit zelligen Infiltrationen, die auf abgelaufene Zellnekrosen hinweisen. Nach dem Gewebekollaps erfolgt eine frühzeitig einsetzende, von der Peripherie des Läppchens ausgehende Regeneration (Popper & Schaffner, 1961), die durch das vermehrte Auftreten mehrkerniger Hepatozyten, einer einsetzenden Ductulusproliferation, eine Zunahme der Kernpolyploidie und der Bindegewebsvermehrung als Zeichen der Leberfibrose gekennzeichnet ist. Auf Grund der Zerstörung des Azinus durch Faserbildung verlieren die resultierenden Hepatozytenplatten ihre für eine normale Funktion essentielle Ausrichtung auf die mikrozirkulatorische Struktur der Leber (Fleig, 2003). Das Ergebnis ist die Ausbildung von Pseudolobuli.

Durch das wiederholte Auftreten von neuen Schädigungsschüben zeigen sich im histologischen Bild zeitlich parallel Parenchymläsionen und Septenbildung mit frischen degenerativen Veränderungen und Rundzellinfiltrationen im Bereich der Septen. Dabei führt die erneute Schädigung zur Septenverbreiterung sowie zur fortschreitenden Unterteilung des Leberparenchyms in immer neue Pseudolobuli. Im Gegensatz zur Fibrose sind die Bindegewebsstrukturen bei der somit entstandenen Zirrhose untereinander verbunden.

Im Endstadium ist das Lebergewebe relativ gleichmäßig durch schmale, zellarme Bindegewebssepten pseudolobulär kompartimentiert, d.h., das Lebergewebe ist in

Pseudolobuli umgebaut. In deren Zentrum finden sich immer öfter Portalstrukturen. Dieser Umbau erfasst relativ gleichartig das gesamte Organ (Ungar, 1951), wobei sich jedoch zwischen einzelnen und komplexen Azini Differenzen zeigen, besonders im Hinblick auf die toxische Schädigung. Das könnte nach Rappaport (1960) auf unterschiedliche Durchblutungsverhältnisse zurückgeführt werden. Außerdem ist zu beachten, dass dispositionelle und genetische Faktoren der einzelnen Individuen bezüglich der Reaktion auf toxische Substanzen zu unterschiedlichen Ausprägungsgraden bei gleichartiger Intoxikation führen können (Ungar, 1951).

### **1.3.3. Laborchemische Veränderungen**

Laborchemische Veränderungen manifestieren sich in einer obligaten, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägten Transaminasenerhöhung als Zeichen einer hepatozellulären Schädigung, wobei vor allem die massiv erhöhte Alaninaminotransferaseaktivität charakteristisch für die Tetrachlorkohlenstoffintoxikation ist (Schmidt & Schmidt, 1979). Als Ausdruck einer eingeschränkten hepatischen Syntheseleistung kommt es zu einem raschen Abfall der Prothrombinzeit nach Quick (Suchman & Griner, 1986) sowie der Plasmakonzentrationen von Fibrinogen (Wagner & Dati, 2000a), Antithrombin (Mammen, 1995) und anderen Gerinnungsfaktoren (Mammen, 1992). Der Serumalbuminspiegel sinkt auf Grund der langen Halbwertszeit erst nach ein paar Wochen (Whicher & Spence, 1987). Die Hyperbilirubinämie als Zeichen einer gestörten Ausscheidungsfunktion zeichnet sich durch einen hohen Anteil an konjugiertem Bilirubin aus (Häussinger, 2003).

### **1.4. Problemstellung**

Durch die verschiedenen morphologischen Veränderungen, die sich im Verlauf einer Tetrachlorkohlenstoffintoxikation ergeben, ist zu vermuten, dass sich auch die akustischen Eigenschaften des geschädigten Lebergewebes verändern.

Die schallphysikalischen Eigenschaften des Lebergewebes werden durch Strukturelemente und die stoffliche Zusammensetzung bestimmt. Dabei dürften der Wasser-, Fett-, Eiweiß- und Kollagengehalt vor allem die Schallabsorption beeinflussen, während die Strukturinhomogenitäten und deren räumliche Verteilung für die Schallreflexion und die Schallstreuung von Bedeutung sind (Carstensen, 1979; Sommer et al., 1982). Beim Übergang von der gesunden, weitestgehend homogenen Leber über die Leberverfettung mit immer größer werdenden Fetttröpfchen zur kollabierten Le-

berzellnekrose mit der anschließenden Fibrosierung und Zirrhoseausbildung kommt es zu Veränderungen, sowohl in der stofflichen Zusammensetzung als auch in der Gewebestruktur, allein schon durch die sich ändernde Zellzahl und Zellgröße.

Bisher ist in der Literatur nur eine Verlaufsbeschreibung der Änderung des Absorptions-, Dämpfungs- und Rückstreuungskoeffizienten nach einer akuten Tetrachlorkohlenstoffintoxikation bekannt (Parker & Tuthill, 1986). Des Weiteren existieren noch Arbeiten über die Eignung der Schallschwächung zur Gewebecharakterisierung (Drescher et al., 1990) und zur Ermittlung der Schallgeschwindigkeit in der Fettleber (Matsuhashi et al., 1996), die mit Hilfe tetrachlorkohlenstoffgeschädigter Ratten durchgeführt wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Veränderung der Gewebeparameter im Verlauf einer chronischen Tetrachlorkohlenstoffintoxikation zu gewinnen und damit beizutragen, die Fähigkeiten der quantitativen US-Gewebecharakterisierung zur Erkennung und zur Verlaufsbeobachtung von Lebererkrankungen zu beweisen und damit ihre mögliche Einführung in die Klinik zu unterstützen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Untersuchungsmaterial und dessen Aufarbeitung**

Um die Messverfahren und die bestimmten Parametersätze hinsichtlich ihrer diagnostischen Wertigkeit zu klassifizieren, ist die Schaffung eines weitestgehend definierten Gewebemodells von großer Bedeutung. Dieses Gewebemodell sollte den Vergleich der Parameter für normales und definiert verändertes Gewebe sowie deren Gewebehistologie ermöglichen. Dazu bieten tierexperimentielle Untersuchungen eine gute Basis. Sie haben außerdem den Vorteil, die Messdaten unter in-vivo-ähnlichen Bedingungen zu erheben.

Für grundlegende Versuche der Schall-Gewebe-Wechselwirkung sind vor allem Gewebe mit einer homogenen, regulären Struktur, an denen pathologische Veränderungen induziert werden können, geeignet. In verschiedenen Arbeiten (Drescher et al., 1990; Matsushashi et al., 1996; Parker & Tuthill, 1985; Tuthill et al., 1989; Jenderka et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die Rattenleber prinzipiell als Modellorgan Verwendung finden kann und zur Bestimmung akustischer Parameter geeignet ist.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden nach Erteilung der Genehmigung zum Tierversuchvorhaben durch die Tierschutzkommission insgesamt 52 männliche Wistar-Unilever-Ratten der Harlan Winkelmann GmbH für den Versuch ausgewählt. Das zugrunde gelegte Körpergewicht von ca. 200 g garantierte eine methodisch notwendige hinreichende Lebergröße und schloss alimentäre Schäden weitestgehend aus.

Die Tiere wurden in artgerechten Käfigen in 4-er bzw. 5-er Gruppen bei einer konstanten Raumtemperatur von 21 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % und unter einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus untergebracht. Dabei hatten sie freien Zugang zu Wasser und standardisiertem "Haltungsfutter-Ratten/Mäuse" der Altromin GmbH.

Die Versuchstiere wurden in vier Kontrollgruppen mit jeweils vier Ratten und sieben Versuchsgruppen mit jeweils fünf Ratten eingeteilt. Die Versuchsgruppen erhielten mit dem Ziel der Entwicklung einer Leberfibrose bzw. -zirrhose in Anlehnung an McLean (1969) und Szende et al. (1988) zweimal wöchentlich je 0,2 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg Körpergewicht in Olivenöl auf 0,5 ml gelöst über eine Magensonde geschlundelt. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten analog dazu 0,5 ml reines Olivenöl via Magensonde geschlundelt. Nach fünf Wochen Behandlungsdauer wurde wöchentlich eine Versuchsgruppe untersucht, während die verbliebenen Versuchsgruppen weiter mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden. Von den Kontrollgruppen

wurden zwei nach der fünften und jeweils eine nach der achten und nach der zwölften Behandlungswoche untersucht.

Zum Gewinn der zu untersuchenden Leber wurde die jeweilige Ratte mit 50 mg Pentobarbital/kg Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Dabei verstarb ein Tier einer Versuchsgruppe. Es wurde nicht in die weiteren Untersuchungen aufgenommen. Die mit dem Abbau des Pentobarbitals im Zusammenhang stehenden Vorgänge im Leberparenchym sind schallphysikalisch von untergeordneter Bedeutung. Nach erfolgter Narkose wurde dem jeweiligen Tier die Peritonealhöhle eröffnet und die Aorta freipräpariert. Diese wurde mit Hilfe eines speziell für den Versuch entwickelten Punktionsverfahrens kanüliert. Durch diese Aortenpunktion wurde dem Tier weitestgehend das gesamte Blut mit handelsüblichen Blutmonovetten entnommen, so dass das Tier dabei verstarb und die zu untersuchende Leber annähernd blutleer war. Im Anschluss wurde die Leber herauspräpariert und in einen mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gefüllten Messbecher in die Ultraschallversuchsapparatur integriert. Das mit den Blutmonovetten gewonnene Blut wurde anschließend analysiert. Dabei wurde die Thromboplastinzeit durch photometrische Bestimmung des Extinktionskoeffizienten mit Hilfe des Behring-Coagulation-Systems der Dade Behring Marburg GmbH ermittelt. Das Blutbild wurde durch den Gebrauch des Hämatologischen Analyseautomaten K 1000 der Sysmex GmbH nach dem Impedanzprinzip bestimmt. Das Vitros-Chemistry-System von Johnson+Johnson ermittelte mit Hilfe der Reflexspektrophotometrie den Albumin-, den Alaninaminotransferase-, den Aspartataminotransferasegehalt bzw. den Bilirubingehalt mit der Endpointcolormetrie. Nach der Schalluntersuchung wurden vom rechten Oberlappen der jeweiligen Leber nach 10 %-iger Formalinfixation histologische Schnitte für die feingewebige Differenzierung angefertigt. Anschließend erfolgte die Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin. Nach der Betrachtung der Präparate wurden einige ausgesuchte Leberproben zusätzlich noch mit Chromotrop Anilinblau und nach van Gieson zur Bindegewebsdarstellung gefärbt.

## **2.2. Messverfahren**

### **2.2.1. Ausbreitung von Ultraschall in biologischem Gewebe / Frequenzabhängige Gewebeparameter**

Die aus biologischem Gewebe zurückgestreuten Ultraschallsignale werden maßgeblich durch die Struktur und Zusammensetzung des Gewebes und der damit verbun-

denen lokalen Variation von Dichte und Kompressibilität beeinflusst. Von Bedeutung ist dabei die Größenordnung der Strukturen in Relation zur Wellenlänge der Ultraschallpulse. Makroskopische Strukturgrenzen bewirken kohärente Reflexionen (so genannte Spiegelechos), die den Gesetzen der geometrischen Optik folgen.

Strukturen in der Größenordnung der Wellenlänge (bei einer Frequenzen von 7,5 MHz entspricht das in Wasser rund 0,2 mm) oder darunter bewirken eine Streuung der Ultraschallpulse, die durch ihre charakteristische Frequenzabhängigkeit gekennzeichnet sind und neben der Absorption zur Schwächung der Ultraschallwellen während der Ausbreitung im Gewebe beitragen.

Diese gestreuten Ultraschallsignale beinhalten Informationen über die Struktur des Gewebes. Somit führen pathologische Veränderungen im Gewebeaufbau auch zu Änderungen des Streuverhaltens.

In konventionellen Ultraschall-Schnittbildern (B-Mode) können diese spezifischen Änderungen der rückgestreuten Echosignale nur unvollständig wiedergegeben und erkannt werden. Die Ursache hierfür ist, dass nur die Amplituden der Ultraschallechos für die Kontrastierung der B-Bilder herangezogen werden und Änderungen in der spektralen Zusammensetzung unberücksichtigt bleiben.

Die von der Ultraschallfrequenz abhängenden Wechselwirkungen zwischen Schallwelle und Gewebe während der Ausbreitung können grundsätzlich durch zwei gewebetypische Parameter beschrieben werden: die frequenzabhängige Dämpfung und die Streuung (insbesondere die Rückstreuung). Diese Parameter sind vom lokalen Gewebezustand bzw. Gewebetyp und damit vom Ort abhängig. Bei eindimensionaler Betrachtung ergibt sich damit neben der Frequenzabhängigkeit eine Abhängigkeit vom Wandlerabstand  $z$ .

#### *a.) Ultraschalldämpfung*

Für die Intensität  $I(z,f)$  einer Ultraschallwelle der Frequenz  $f$  nach Durchlaufen der Strecke  $z$  in einem Medium mit der Dämpfung  $\alpha$  gilt damit allgemein:

$$I(z, f) = I_0(f) e^{-\alpha(z,f)} \quad (1)$$

$I_0(f)$  ist die in das Medium eingebrachte Ultraschallintensität bei der Frequenz  $f$ . Für die Intensität  $I$  ergibt sich der charakteristische exponentielle Abfall mit Zunahme des Dämpfungskoeffizienten  $\alpha$ . Die von der Frequenz abhängige lokale Dämpfung  $\alpha(f)$



einer Ultraschallwelle während der Ausbreitung im Gewebe setzt sich aus Beiträgen von Streuung  $\alpha_S(f)$  und Absorption  $\alpha_A(f)$  zusammen:

$$\alpha(f) = \alpha_S(f) + \alpha_A(f) \quad (2)$$

Die für die Absorption verantwortlichen Relaxations-Prozesse sind noch nicht vollständig aufgeklärt und somit schwierig zu modellieren. Aber die Streueffekte können unter Annahme bestimmter Randbedingungen modellhaft dargestellt werden, so dass sich im Labor anhand der spektralen Amplituden der gestreuten Ultraschallsignale Rückschlüsse auf die mittlere Streuergröße und Verteilung ziehen lassen (Oelze & O'Brien, 2002; Insana & Hall, 1990).

Die Beschreibung und Modellierung der Dämpfung in biologischem Gewebe beruht daher weitgehend auf Messungen und daraus abgeleiteten Parameter-Modellen zur Beschreibung der Frequenzabhängigkeit. Für einen weiten Frequenzbereich, insbesondere im Bereich diagnostisch eingesetzter Frequenzen von 1 bis 15 MHz, kann eine Potenzfunktion zur Beschreibung der Frequenzabhängigkeit herangezogen werden:

$$\alpha(f) = a f^\beta, \quad \beta = 1,0 \dots 1,5, \quad a = \text{konst.} \quad (3)$$

Im eingeschränkten Frequenzbereich der effektiven Bandbreite eines Diagnostiksystems kann allgemein von einer linearen Frequenzabhängigkeit ausgegangen werden:

$$\alpha(f) = a_S f + \alpha_0 \quad \text{oder} \quad \alpha(f) = a_S (f - f_C) + \alpha_C \quad (4)$$

Hier lassen sich  $a_S$  als Anstieg des Dämpfungskoeffizienten,  $\alpha_0$  als angenommener Dämpfungskoeffizient bei der Frequenz Null und  $\alpha_C$  als der absolute Dämpfungskoeffizient bei der Mittenfrequenz des Schallwandlers  $f_C$  als charakteristische Größen ableiten. Der Anstieg  $a_S$  und eine der beiden Konstanten  $\alpha_0$  oder  $\alpha_C$  sind zur Beschreibung der Dämpfungseigenschaften ausreichend. Aus praktischen Gründen ist neben dem Anstieg  $a_S$ , der angibt um wie viel dB sich der Dämpfungskoeffizient über eine Strecke von 1 cm ändert, wenn sich die Frequenz um 1 MHz erhöht, die Konstante  $\alpha_C$  vorzuziehen, die angibt, um wie viel dB der Ultraschallimpuls auf einer Gewebestrecke von 1 cm bei der Mittenfrequenz  $f_C$  gedämpft wird. Bei den Messungen

kam ein Ultraschallwandler mit einer Mittenfrequenz von 9 MHz zum Einsatz (siehe Kap. 2.2.4.).

### *b.) Ultraschallstreuung*

Gewebestrukturen, die in ihren akustischen Eigenschaften (Dichte, Kompressibilität) vom umgebenden Medium abweichen und deren Abmessungen kleiner oder gleich der Ultraschallwellenlänge sind, führen zu Änderungen von Ausbreitungsrichtung, Amplitude, Phase und Schallgeschwindigkeit der Welle. Dieser Vorgang, bei dem keine Umwandlung der mechanischen Energie in Wärme stattfindet, wird als Streuung bezeichnet. Die Intensität der Streuwellen in Abhängigkeit von der Richtung (Raumwinkel) hängt neben den akustischen Eigenschaften der Streuer auch von deren Größe, Form und Verteilung ab. Infolge der Streuung an einer Vielzahl von Gewebeinhomogenitäten tritt eine Schwächung der sich ausbreitenden Ultraschallwelle auf. Der um 180° abgelenkte Streuanteil, der sich zurück in Richtung des Sendewandlers ausbreitet, wird als Rückstreuecho bezeichnet.

Der mittlere Streufaktor (auch als Streukoeffizient bezeichnet), also das Verhältnis zwischen gestreuter und einfallender Schallintensität, nimmt gegenüber der Wellenlänge kleiner Einzelstreuer mit dem Volumen des Partikelchens ab. Bei sehr kleinen Partikelchen erfolgt jedoch bevorzugt eine Rückstreuung. Dies führt dazu, dass bei den auf dem Echolotprinzip basierenden bildgebenden Verfahren der Ultraschall-diagnostik kleinste Rückstreuechos empfindlich erfasst werden können. Der Bildkontrast von Ultraschall-Schnittbildern spiegelt hauptsächlich das Streuverhalten des Gewebes wider.

Die Streuintensität ist für streuende Strukturen in der Größenordnung der Wellenlänge ( $R \approx \lambda$ ) proportional zu  $f^2$  (stochastische Streuung) und für  $R < \lambda$  proportional zu  $f^4$  (Rayleigh-Streuung) mit  $R$  als lineare Ausdehnung der Inhomogenitäten. Die  $f^4$ -Abhängigkeit ist z. B. für das Streuverhalten des Blutes experimentell gut nachgewiesen worden (Cobet et al., 1995).

Für die bei eindimensionaler Betrachtung aus einer Tiefe  $z$  rückgestreute Intensität einer Ultraschallwelle gilt allgemein

$$I_{BS}(z, f) = I_0(z, f) \sigma_{BS}(z, f) \quad (5)$$

mit der am Ort  $z$  einfallenden Intensität  $I_0$ , der rückgestreuten Intensität  $I_{BS}$  und dem Rückstreukoeffizienten  $\sigma_{BS}$ .  $I_0(z, f)$  ist nur unter Laborbedingungen mit Hilfe eines geeigneten, kalibrierten Hydrophons im Freifeld messbar. Die tatsächlichen Verhältnisse im Gewebe können für unterschiedliche Gewebetiefen nur unter Berücksichtigung

der frequenzabhängigen Dämpfung vorgelagerter Gewebeschichten abgeschätzt werden.

Diese Einschränkungen können durch Einführung des relativen Rückstreukoeffizienten  $\sigma_{rel\ BS}$  umgangen werden.

Mit

$$\sigma_{BS\ Gewebe}(z, f) = \frac{I_{BS\ Gewebe}(z, f)}{I_0(z, f)} \quad (6)$$

für das Gewebe und

$$\sigma_{BS\ ref}(z, f) = \frac{I_{BS\ ref}(z, f)}{I_0(z, f)} \quad (7)$$

für ein Referenzmaterial (z. B. ein gewebeähnliches Phantom) folgt

$$\sigma_{rel\ BS}(z, f) = \frac{\sigma_{BS\ Gewebe}(z, f)}{\sigma_{BS\ ref}(z, f)} = \frac{I_{BS\ Gewebe}(z, f)}{I_{BS\ ref}(z, f)}. \quad (8)$$

Der relative Rückstreukoeffizient bezieht sich damit auf ein streuendes Referenzmedium (gewebeähnliches Phantom, Stahlreflektor oder andere Streukörper mit bekannten akustischen Parametern). Er gibt die relative Änderung des Rückstreuverhaltens gegenüber der Referenz in Abhängigkeit von der Frequenz an und ist unabhängig von der nur aufwendig zu bestimmenden einfallenden Intensität  $I_0$ .

### 2.2.2. Bestimmung der Ultraschall-Dämpfung

Messtechnisch bieten sich verschiedene Zugangsmöglichkeiten zur experimentellen Bestimmung der frequenzabhängigen Ultraschalldämpfung an. Transmissionsmessungen sind mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführbar. Allerdings sind sie auf die Erfassung der bulk-Parameter (mittlerer Wert über das durchschallte Volumen des gesamten zu schallenden Objektes) beschränkt und ausschließlich für in vitro-Untersuchungen einsetzbar. Ausgewertet wird die spektrale Differenz des von einem Hydrophon aufgezeichneten, breitbandigen Ultraschallimpulses nach Durchlaufen einer Wasserstrecke mit und ohne Gewebeprobe (Madsen et al., 1978 & 1982; Gärtner, 2001).

Die orts aufgelöste, lokale Bestimmung der Dämpfungsparameter erfolgt mit dem Impuls-Echo-Verfahren, welches auch eine in-vivo-Applikation und den Vergleich mit konventionellen Ultraschall-Schnittbildern gestattet.

Durch Analyse der digital aufgezeichneten hochfrequenten Echosignale im Frequenzbereich werden die Dämpfungsparameter des interessierenden Gewebebereiches extrahiert. Dazu finden zwei unterschiedliche Techniken Anwendung, die prinzipiell zum gleichen Ergebnis führen.

Die Breitband- oder Spektrum-Differenz-Methode wertet die Differenz der Frequenzspektren aus unterschiedlichen Gewebetiefen aus (siehe Abb. 2.1.). Unter Maßgabe homogener Gewebeigenschaften und homogenen Schallfeldeigenschaften ent-

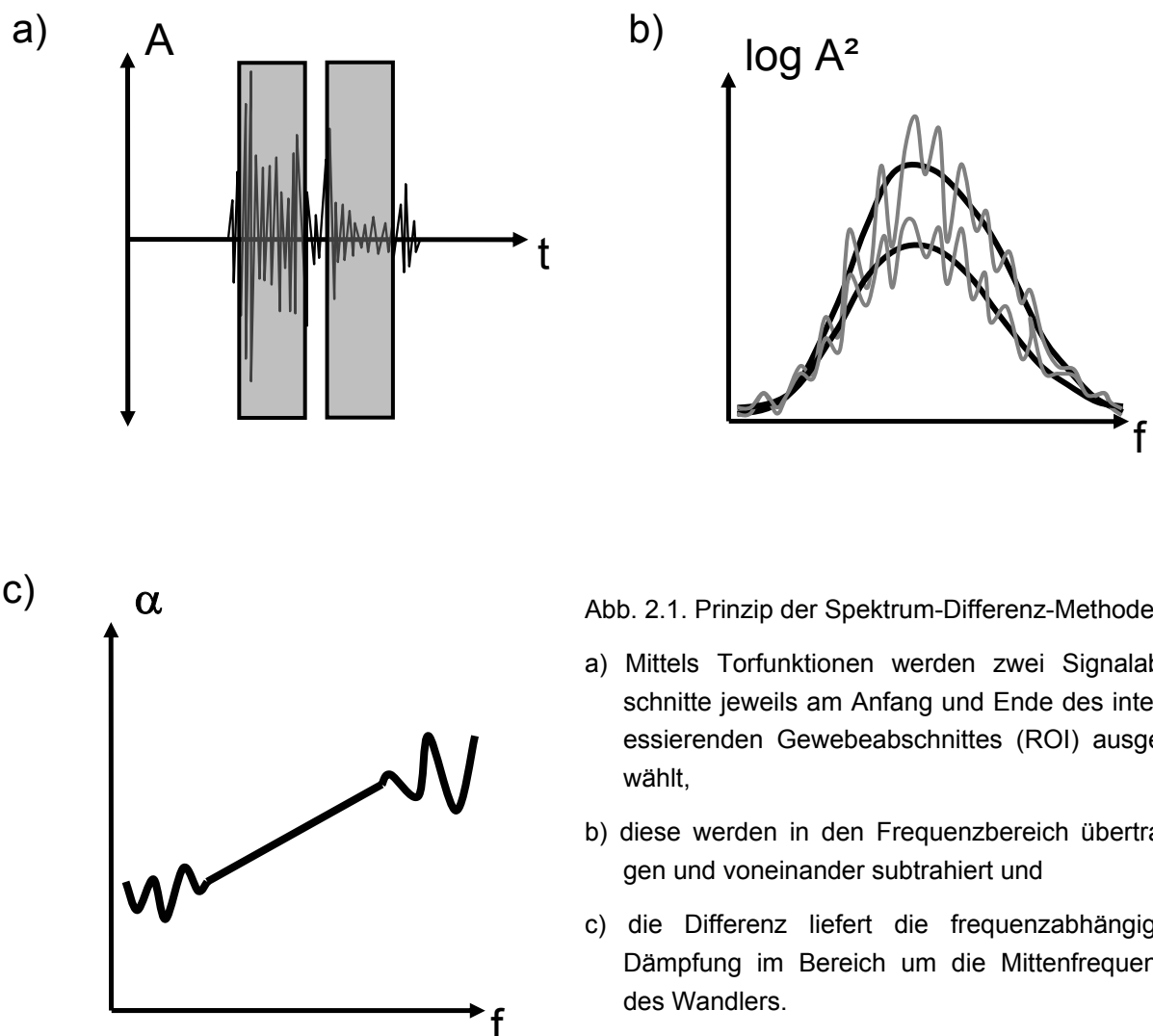


Abb. 2.1. Prinzip der Spektrum-Differenz-Methode:

- a) Mittels Torfunktionen werden zwei Signalabschnitte jeweils am Anfang und Ende des interessierenden Gewebeabschnittes (ROI) ausgewählt,
- b) diese werden in den Frequenzbereich übertragen und voneinander subtrahiert und
- c) die Differenz liefert die frequenzabhängige Dämpfung im Bereich um die Mittenfrequenz des Wandlers.

spricht diese Differenz dem Doppelten der frequenzabhängigen Dämpfung des dazwischen liegenden Gewebeabschnittes (Lizzi et al., 1983; Kuc, 1984).

Die Schmalband-Methode hingegen wertet für einzelne Frequenzkomponenten die Abnahme der Signal-Intensität über die Eindringtiefe aus (siehe Abb. 2.2.). In log-

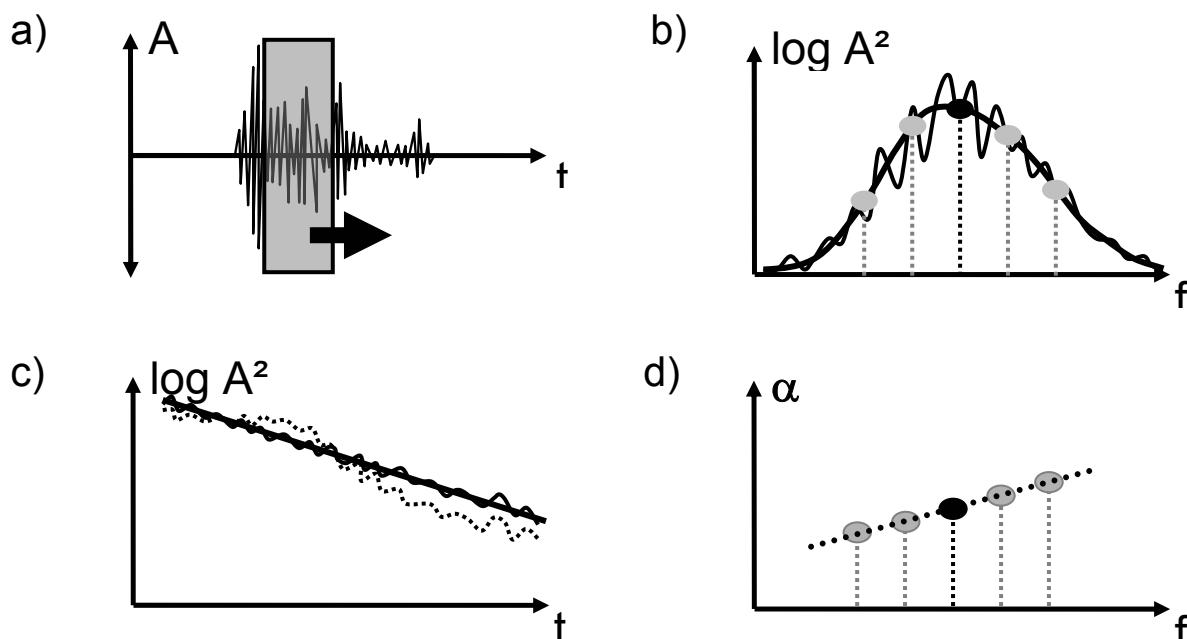


Abb. 2.2. Prinzip der Schmalband-Methode (Multi-Narrow-Band-Verfahren):

- Eine Torfunktion wird schrittweise vom Anfang bis zum Ende des interessierenden Gewebeabschnittes (ROI) bewegt und
- für jede Position dabei das Spektrum berechnet.
- Die Abnahme der logarithmierten Amplituden-Quadrate mit der Laufzeit wird um die Einflüsse des Schallfeldes korrigiert.
- Nach linearer Regression für ausgewählte Frequenzen innerhalb der Bandbreite des Wandlers wird der Anstieg als Maß für die Dämpfung berechnet und in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt.

arithmischer Darstellung ist der negative Anstieg der Geraden ein Maß für die Dämpfung bei der betrachteten Frequenz. Die Werte für verschiedene Frequenzen liefern folglich die Frequenzabhängigkeit der gesuchten Dämpfungsparameter (Cloostermans and Thijssen, 1983).

Die lokalen Rückstreukspektren werden für beide Techniken durch Multiplikation der Echosignale mit einer Torfunktion und anschließender Fourier-Transformation gewonnen. Diese Spektren sind typischer Weise durch eine Reihe von Minima und Maxima gekennzeichnet, die durch die Überlagerung der Vielzahl minimal zeitversetzter Einzelechos der Gewebestruktur hervorgerufen werden (Höhne & Kälber, 1988).

Vor der Spektralanalyse ist somit eine Glättung der Spektren zwingend erforderlich. Dies kann durch Mittelwertbildung der Spektren paralleler, aber nicht oder nur schwach kreuzkorrelierter Scan-Linien erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der cepstralen Glättung der Spektren (Jenderka, 1989; Gärtner, 2001).

In dieser Arbeit kamen die Schmalband-Methode und eine Modifikation der Spektrum-Differenz-Methode mit Komponenten des Transmissionsverfahrens zur Anwendung.

Die Schmalband-Methode bietet den Vorteil einer direkten Beurteilbarkeit der Zuverlässigkeit der Dämpfungsschätzung über die Linearität (linear in dB) der Intensitätsabnahme. Lokale Inhomogenitäten (z. B. Gefäße) können so erkannt und ausgeglichen werden. Gleichzeitig stellen die erhaltenen Parameter einen Zwischenschritt bei der Berechnung des relativen Rückstreukoeffizienten dar, wodurch eine einfache Weiterführung der Berechnungen möglich ist.

Die modifizierte Spektrum-Differenz-Methode ist weniger empfindlich gegenüber Störungen durch lokale Inhomogenitäten im Gewebe und lässt zuverlässigere Werte erwarten.

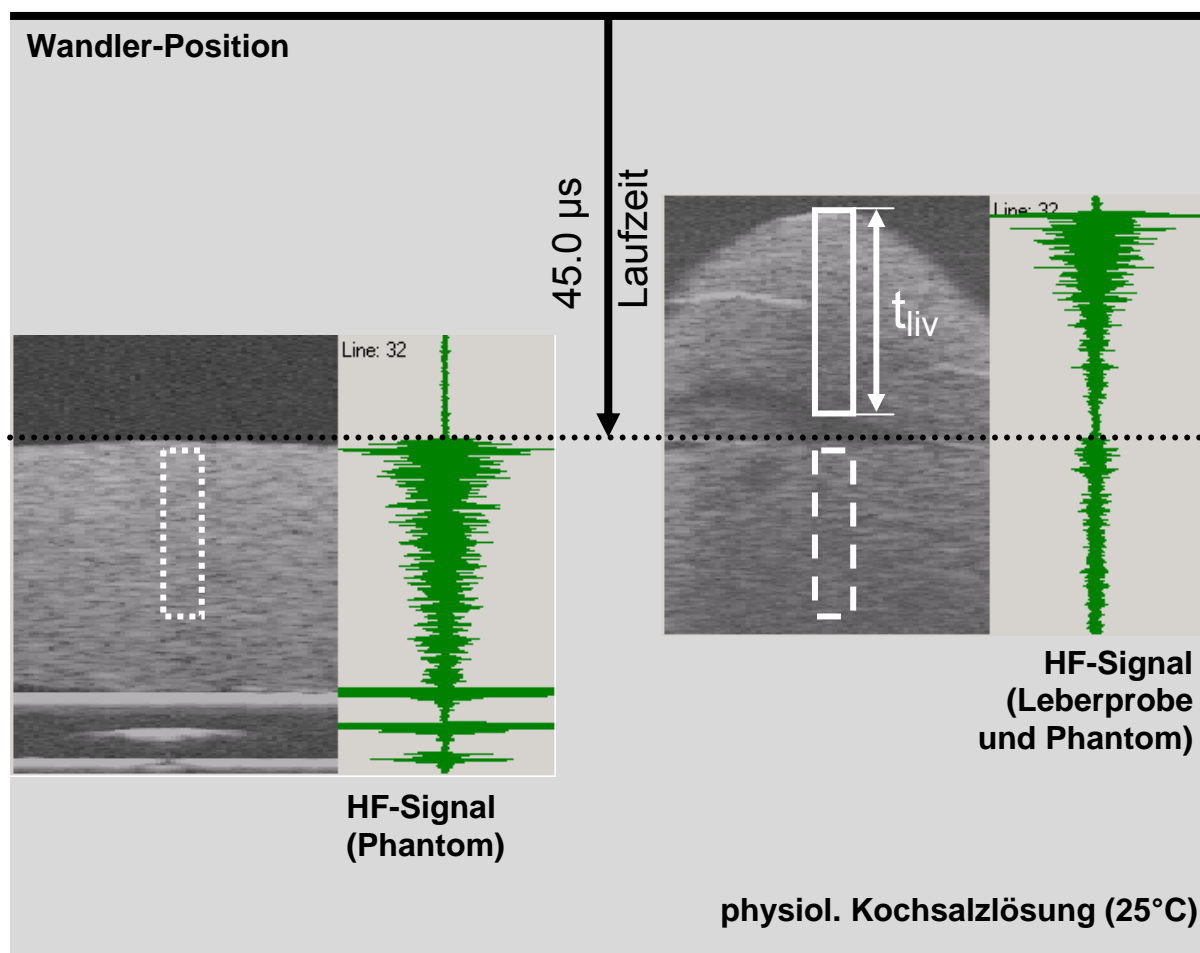


Abb. 2.3. Anordnung der Gewebeprobe und Auswahl der ROI für die Bestimmung der Ultraschalldämpfung

Im Experiment wurden die kompletten Sets der hochfrequenten Rückstreuerechos des Phantommaterials und der darüber liegenden Gewebeprobe bzw. Flüssigkeitsstrecke aufgezeichnet (siehe Abb. 2.3.). Die Signalaufnahme erfolgte für zwei unterschiedli-

che Wandler-Phantom-Abstände: 45  $\mu\text{s}$  und 65  $\mu\text{s}$  Laufzeit, respektive 34 mm und 48 mm Abstand.

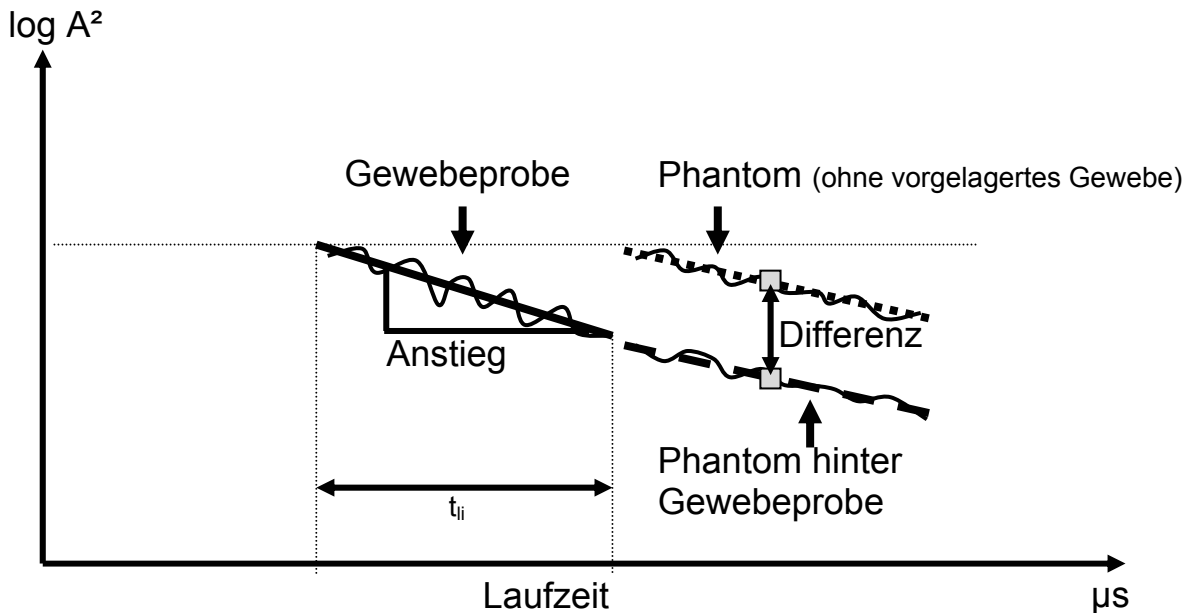


Abb. 2.4. Prinzipieller Verlauf der Signalamplituden für die Messanordnung nach Abb. 2.3.

Für die Abnahme der Signalintensität ( $\log A^2$ ) mit der Laufzeit (Tiefe) ergibt sich damit der in Abb. 2.4. dargestellte prinzipielle Verlauf: Die Echointensität im jeweils schallkopfnahem Bereich des Phantoms bzw. der Gewebeprobe sind annähernd gleich und unterscheiden sich nur durch die geringfügige Dämpfung in der Kochsalzlösung (ca. 0,18 dB/cm bei 9 MHz [Duck, 1990]).

Aus der Abnahme der Intensität der aus dem Gewebe rückgestreuten Echos mit der Tiefe ( $\Delta \log A^2_{\text{Gew}}$ ) kann entsprechend der Schmalband-Methode die frequenzabhängige Dämpfung bestimmt werden.

$$\alpha(f_i) = 10 \frac{\Delta \log A^2_{\text{Gew}}(f_i)}{100 \Delta t c} \quad (9)$$

Die Rückstreusignale aus dem Phantom bieten hier noch eine zusätzliche Möglichkeit zur Bestimmung der Ultraschalldämpfung in der Gewebeprobe. Nach Modifizierung des Verfahrens zur Bestimmung der Ultraschalldämpfung in Transmission kann aus dem Abstand der parallel verlaufenden, für das Phantom charakteristischen Schwächungskurven bei der jeweiligen Frequenz

$$\log A^2_{\text{Diff}}(f_i) = \log A^2_{\text{Ph0}}(t, f_i) - \log A^2_{\text{PhGew}}(t, f_i) \quad (10)$$

und der Dicke der darüber liegenden Gewebeschicht die Gewebedämpfung berechnet werden:

$$\alpha(f_i) = 10 \frac{\log A_{Diff}^2(f_i)}{100 t_{Gew} c} \quad (11)$$

Die Dicke der Probe wird im B-Bild gemessen (siehe Abb. 2.3.). Der Unterschied zur klassischen Transmissionsmessung besteht darin, dass die Gewebeprobe von dem Ultraschallimpuls zweimal durchlaufen wird. Das Phantom übernimmt hier die Funktion eines Referenz-Streubjektes. Grundsätzlich könnte auch ein ebener Stahlreflektor für diesen Zweck eingesetzt werden - allerdings stünde dann kein geeignetes Referenzsignal für die Bestimmung des relativen Rückstreukoeffizienten zur Verfügung.

### 2.2.3. Bestimmung des relativen Rückstreukoeffizienten

Als Referenz für die Bestimmung des relativen Rückstreukoeffizienten dienen die

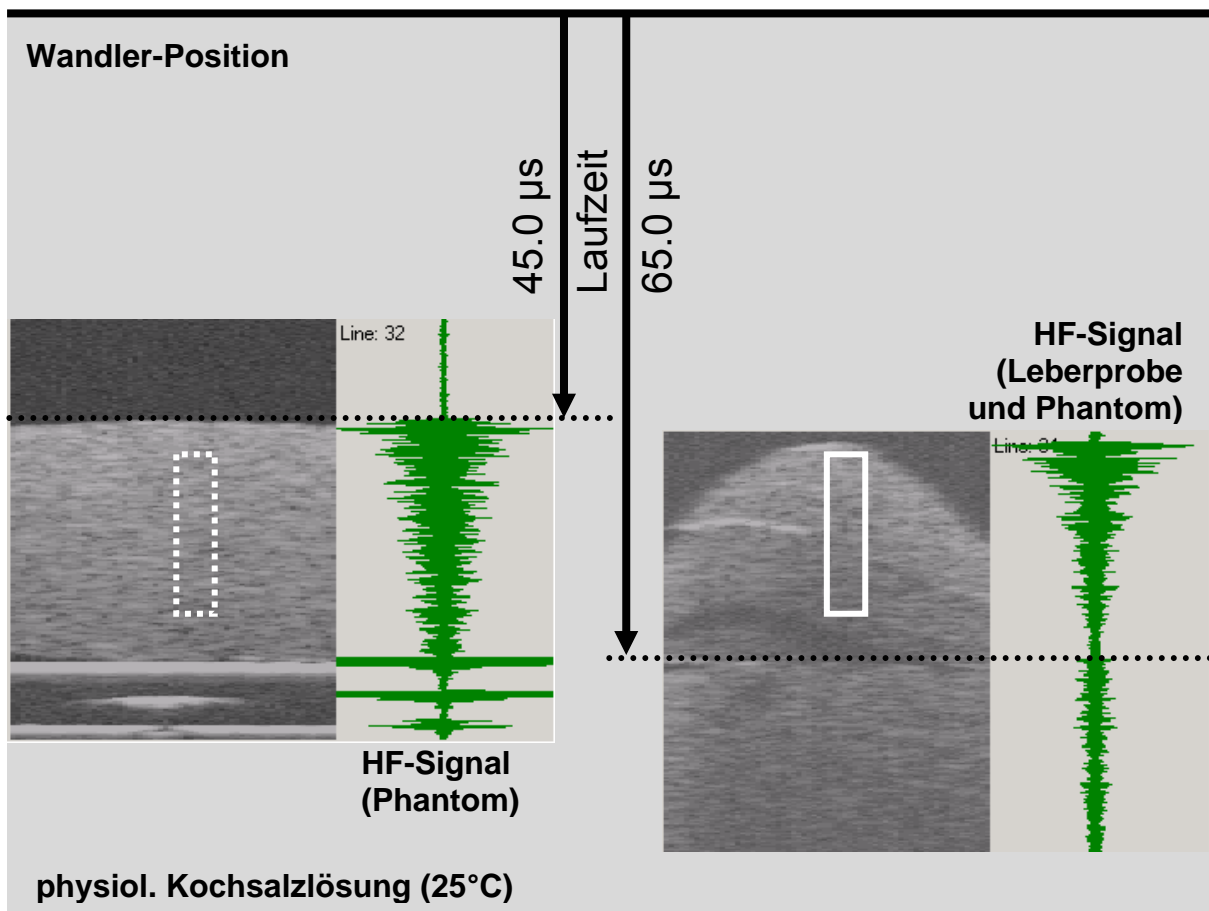


Abb. 2.5. Anordnung der Gewebeprobe und Auswahl der ROI für die Bestimmung des relativen Rückstreukoeffizienten



aufgezeichneten Echosignale am Phantom ohne vorgelagertes Gewebe. Diese bei kurzem Wandler-Phantom-Abstand (Laufzeit von 45  $\mu\text{s}$ ) gemessenen Rückstreuungssignale wurden zu den aus dem Lebergewebe rückgestreuten Echos bei langem Wandler-Phantom-Abstand (Laufzeit von 65  $\mu\text{s}$ ) in Relation gesetzt. Damit wurde gewährleistet, dass die untersuchten Regionen im Gewebe und Phantom den gleichen Abstand zum Wandler haben und somit vergleichbare Druckverhältnisse im Schallfeld herrschten.

Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe der zuvor ermittelten Werte für die frequenzabhängige Dämpfung die Signalverluste über die Tiefe ausgeglichen und die Rückstreuamplituden für Referenz und Probe jeweils auf gleiches Niveau gebracht (siehe Abb. 2.6.).

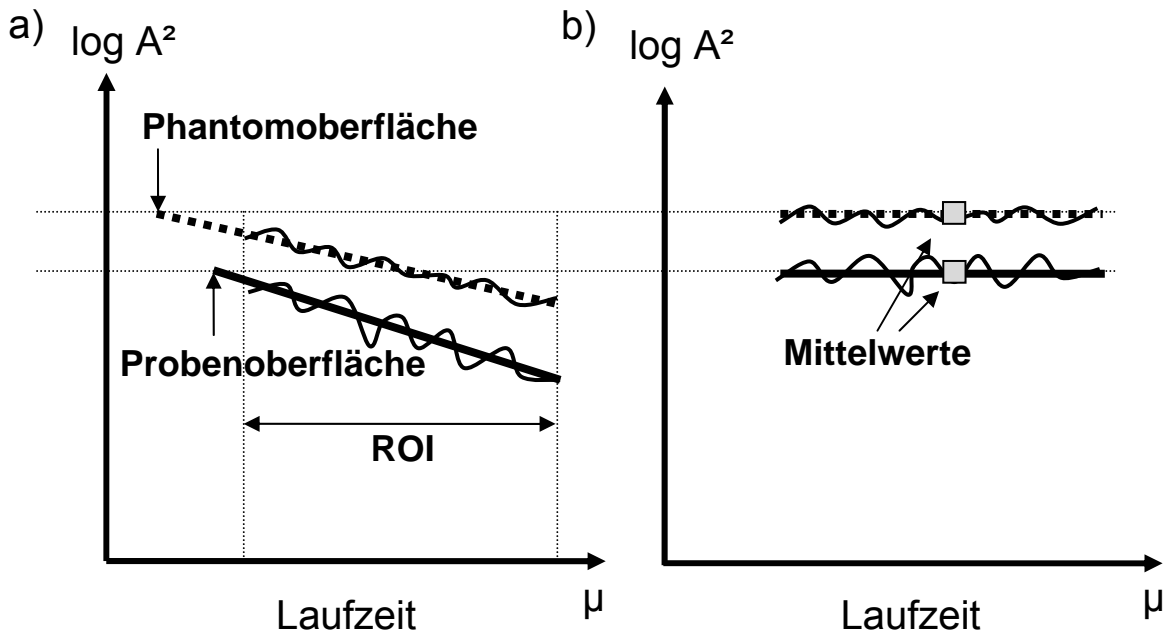


Abb. 2.6. Prinzipieller Verlauf der Signalamplituden für die Messanordnung nach Abb. 2.5.  
a) vor und b) nach Korrektur der Dämpfung

Nach Korrektur der Dämpfungsverluste im vorgelagerten Medium und Mittelwertbildung (jeweils für die Referenz- und Gewebemessung) erfolgte die Berechnung des mittleren, frequenzabhängigen relativen Rückstreckoeffizienten (siehe Gleichung 8) nach

$$\sigma_{relBS}(f_i) = 10 \left( \log \bar{A}_{c\_Gew}^2(f_i) - \log \bar{A}_{c\_pha}^2(f_i) \right) \quad (12)$$

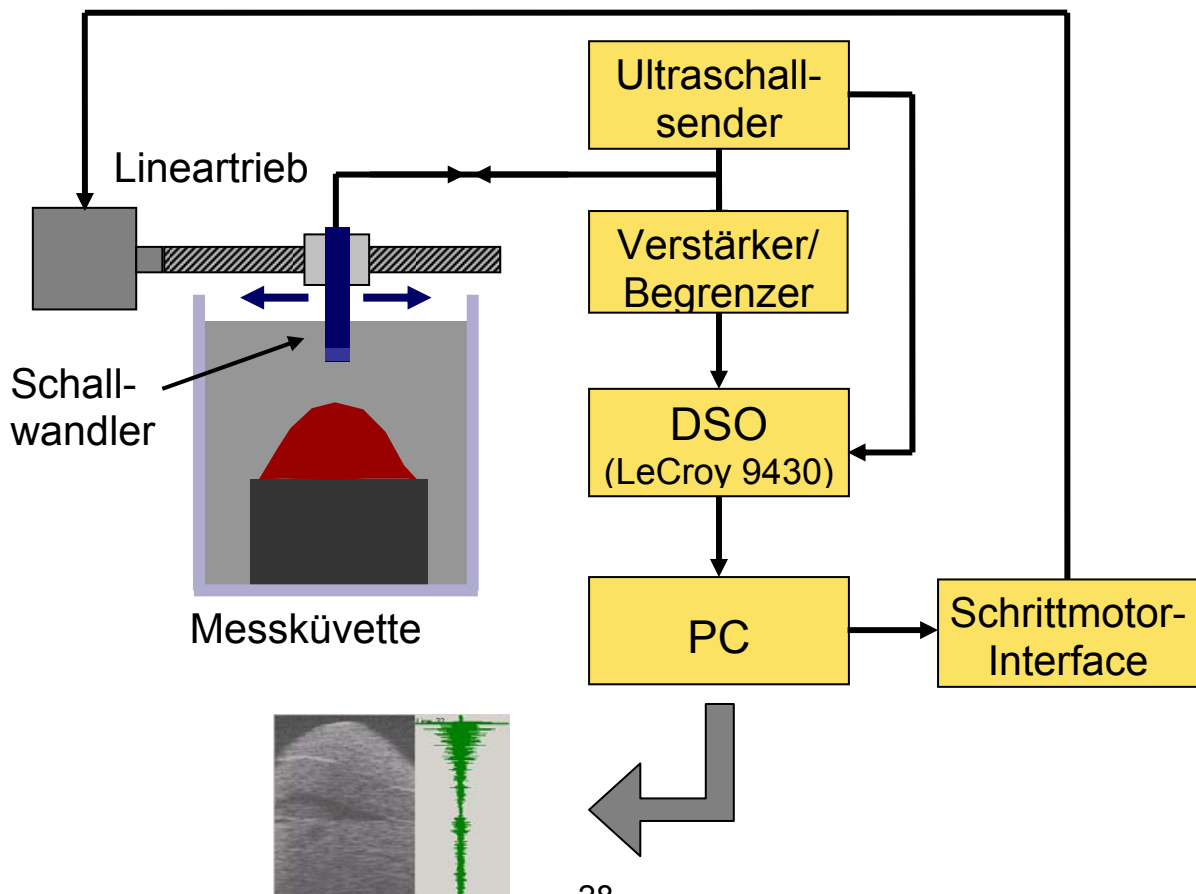
Der relative Rückstreckoeffizient  $\sigma_{relBS}(f)$  gibt den Unterschied der Rückstreuintensität der Gewebeprobe in Bezug auf das gewebeähnliche Phantom in Abhängigkeit

von der Frequenz in dB an. Negative dB-Werte bedeuten dabei eine schwächere Rückstreuung.

#### 2.2.4. Aufbau des Messplatzes

Das Messsystem zur Aufnahme der hochfrequenten Ultraschallechosignale setzte sich aus folgenden Gerätekomponten zusammen (siehe Abb. 2.7. und 2.8.):

- Ultraschallsender (Pulser) mit Einzelelement-Schallwandler (Eigenbau vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- Schrittmotor-Interface (Eigenbau vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- HF-Verstärker mit Begrenzer (Eigenbau vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- Digital-Speicher-Oszilloskop (LeCroy 9430)
- PC mit GPIB-Karte (NI-PCIIa)
- Messküvette mit montierten Lineartrieb und Wandlerhalterung (Eigenbau vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)



Der Ultraschallsender erzeugt kurze Spannungsspitzen zur Anregung des breitbandigen Einzelelementwandler mit einer Pulsfolgenfrequenz von 1 kHz. Diese Taktfre-

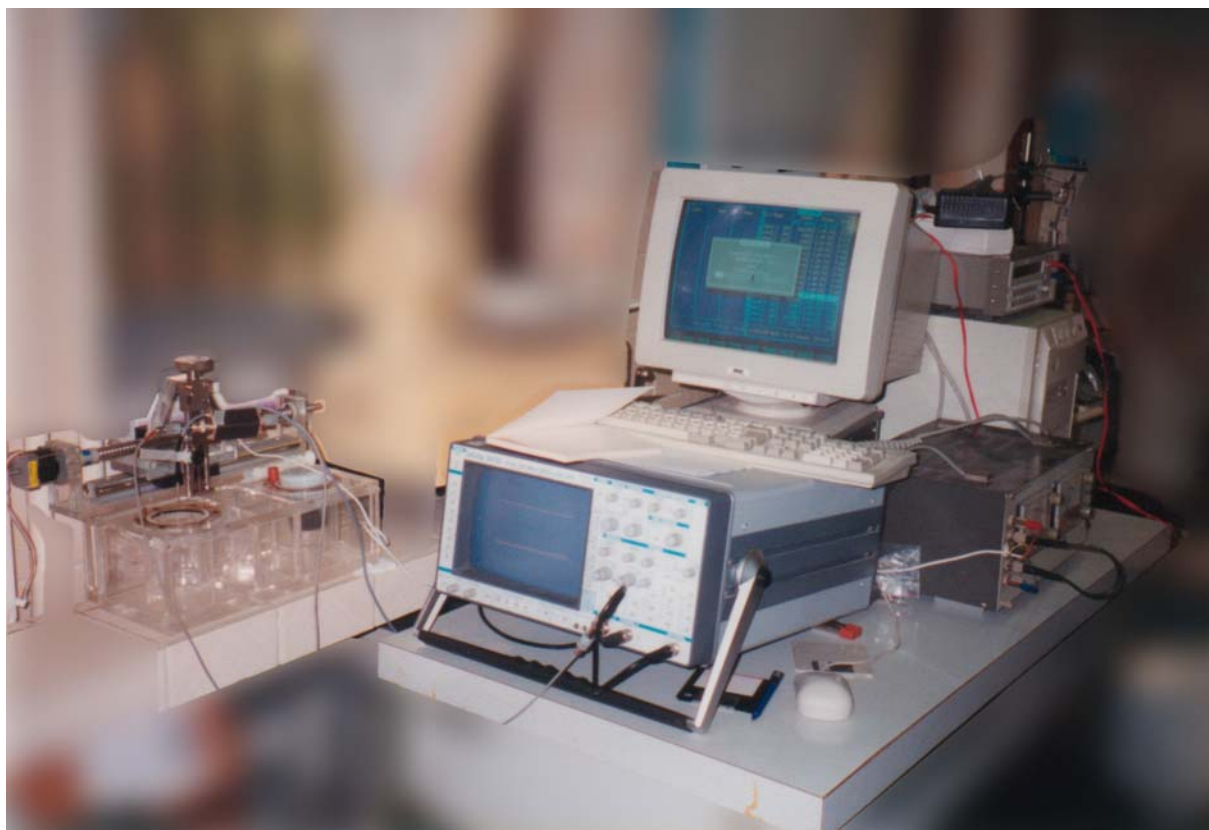


Abb. 2.8. Experimenteller Versuchsaufbau

quenz dient weiterhin auch zur Triggerung des Digital-Speicher-Oszilloskopes (DSO).

Nach Anregung durch den Pulser gibt der Schallwandler mit einer Mittenfrequenz von 9 MHz Ultraschallimpulse in die Messküvette ab, die sich entsprechend durch das Koppelmedium (physiologische Kochsalzlösung), die Gewebeprobe und das Phantommaterial ausbreiten und von dort rückgestreut werden.

In den Pausen zwischen den Sendeimpulsen werden die am Schallwandler eintreffenden Streuechos wieder in eine adäquate Wechselspannung umgewandelt, die zur Anpassung an die Eingangsempfindlichkeit des DSO am nachfolgenden Verstärker rauscharm um 15 dB verstärkt wird. Der Eingang des Verstärkers ist durch antiparallel geschaltete Dioden vor den Spannungsspitzen des Sendepulses geschützt.

Im DSO erfolgt die Digitalisierung der Echofolgen mit einer Abtastfrequenz von 100 MHz und einer Amplitudenauflösung von 10 bit. Nach der Sicherung der Echosignaldaten wird über die Schrittmotorsteuerung und den Lineartrieb die nächste Messposition angefahren. Ein kompletter Scan setzt sich aus 64 Einzelmessungen mit einem lateralen Abstand von 0,5 mm zusammen.

Nach Abschluss der Messung stehen die gespeicherten Daten für die off-line-Signalanalyse und Parameterbestimmung zur Verfügung. Aus den Echodaten im PC wird ein Schnittbild generiert, in dem einzelne Scanlinien dargestellt werden können. Damit sind eine Kontrolle der aufgezeichneten Daten, Abstandsmessungen und die Auswahl der interessierenden Regionen (ROI) für die Parameteranalyse möglich.

Die Software zur Steuerung der Messung und Aufzeichnung der Ultraschallechos wurde in Borland Pascal (Version 7.0, Borland Software Corporation, USA) und die Software zur Parameteranalyse in Borland Delphi (Version 6, Borland Software Corporation, USA) erstellt.

Die Aufbereitung, Analyse und graphische Darstellung aller Messdaten erfolgte mit Origin (Version 6.1, ADDITIVE Soft- und Hardware für Technik und Wissenschaft GmbH, Deutschland). Dabei erfolgte die Bestimmung der Mittelwerte, Mediane und der Standardabweichungen für alle Versuchs- und Vergleichstiergruppen. Um ein objektives Maß zur Signifikanz der bestehenden Differenzen zwischen den Versuchs- und Vergleichstiergruppen der 5., 8. und 11. Versuchswoche zu erhalten, wurde der t-Test für paarige Stichproben nach Student verwendet. Dabei wurde der p-Wert als nominelles Signifikanzniveau verwendet, wobei ein  $p < 0,05$  (d. h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$ ) als statistisch signifikant bezeichnet wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der Histologischen Veränderungen

Bei der Betrachtung der histologischen Präparate zur feingewebigen Differenzierung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Vergleichs- und Versuchstieren.

Bei den Vergleichstieren ergaben sich im Laufe der elf Behandlungswochen keine Veränderungen in der mikroskopischen Leberstruktur. Exemplarisch ist jeweils in Abbildung 3.1. das Präparat eines Vergleichstieres der fünften Behandlungswoche und in Abbildung 3.2. das Präparat der elften Behandlungswoche in 10- und 20-facher Vergrößerung dargestellt. Beide Abbildungen zeigen gesunde, morphologisch unauffällige Leberschnitte. Es ergaben sich somit während der gesamten Behandlungszeit bei den Vergleichstieren keine Strukturveränderungen der Leber.

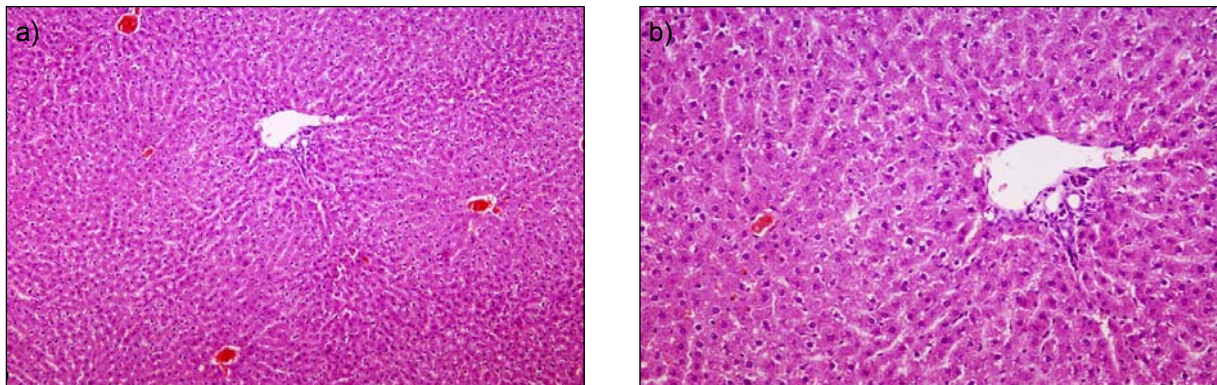


Abb. 3.1. Vergleichstier Behandlungswoche 5, HE-Färbung, Vergrößerung a) 10-fach und b) 20-fach

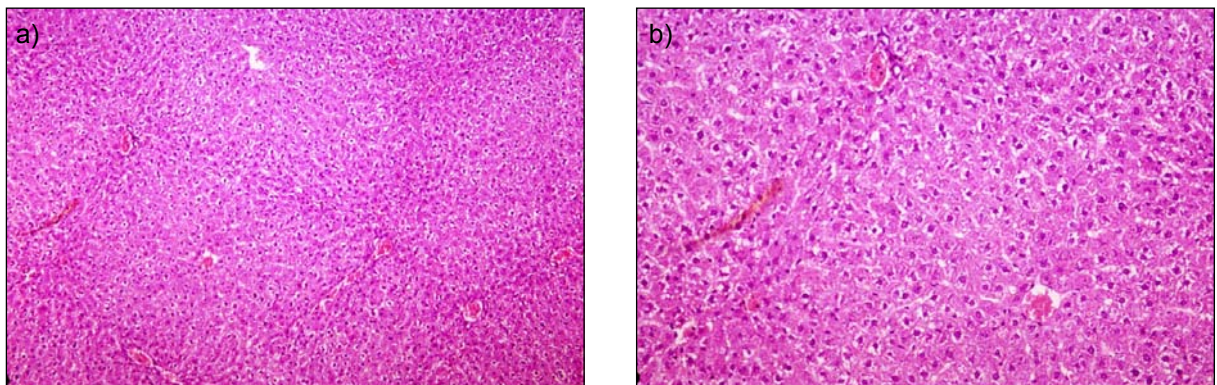


Abb. 3.2. Vergleichstier Behandlungswoche 11, HE-Färbung, Vergrößerung a) 10-fach und b) 20-fach

Die mikroskopischen Präparate der einzelnen Versuchstiergruppen unterschieden sich anders als die der Vergleichstiergruppen auch untereinander deutlich. Auffällig waren die unterschiedlich schweren Parenchymschädigungen zu gleichen Zeitpunkten bzw. gleiche morphologische Bilder in verschiedenen Zeitabständen nach der ersten CCl<sub>4</sub>-Insufflation. In den Abbildungen 3.3. bis 3.5., in denen jeweils Leber-



schnitte in 5- und 10-facher Vergrößerung von Versuchstieren der fünften, neunten und elften Behandlungswoche dargestellt sind, kann man das sehr gut erkennen. Exemplarisch für die Versuchstiergruppe der fünften Behandlungswoche zeigt die Abbildung 3.3. einen Leberschnitt mit einer typisch läppchenperipher lokalisierten mikrovesikulären Verfettung der Hepatozyten. Außerdem sind neben den Fettvakuolen noch Schrumpfnekrosen mit hyalinen Einschlusskörperchen und Lipofuszinpigmente zu erkennen. Die Portalfelder sind unauffällig.

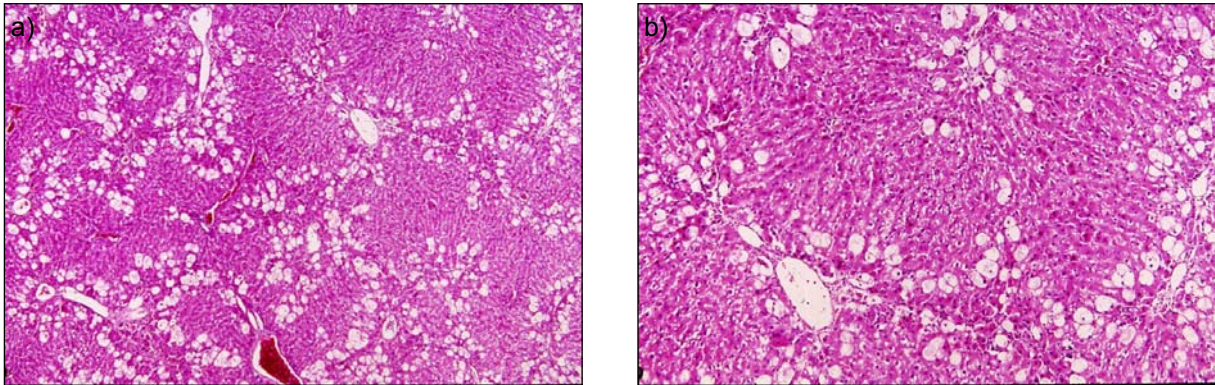


Abb. 3.3. Versuchstier Behandlungswoche 5, HE-Färbung, Vergrößerung a) 5-fach und b) 10-fach

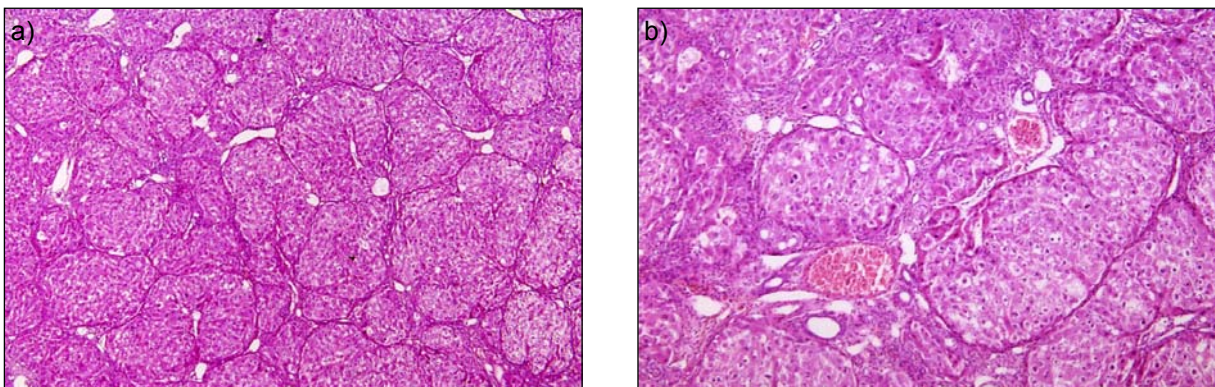


Abb. 3.4. Versuchstier Behandlungswoche 9, HE-Färbung, Vergrößerung a) 5-fach und b) 10-fach

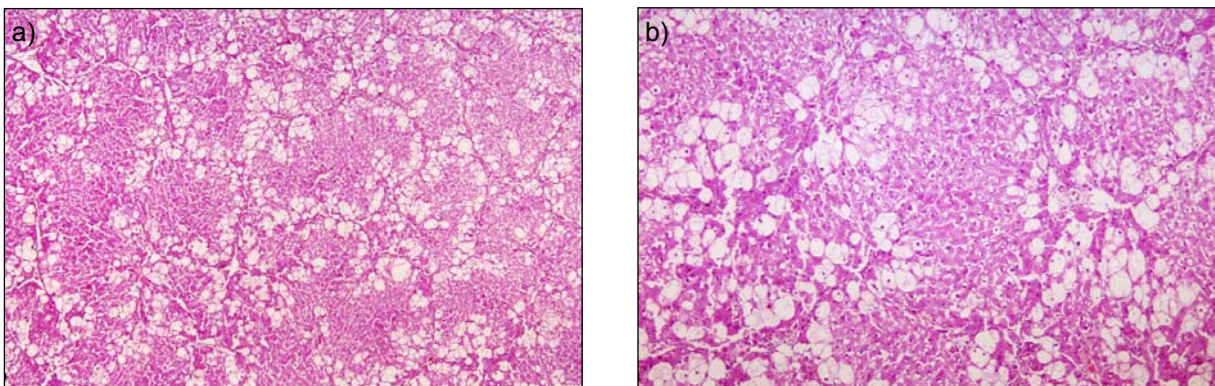


Abb. 3.5. Versuchstier Behandlungswoche 11, HE-Färbung, Vergrößerung a) 5-fach und b) 10-fach

Die Abbildung 3.4. zeigt den Leberschnitt eines Versuchstieres der neunten Behandlungswoche. Dabei ist ein umfangreicher Umbau der ursprünglichen Leberstruktur



mit starker Fibrosierung, Verfettung und enormer Septenzergliederung zu sehen. Es kommt zur Ausbildung einer deutlichen Pseudolobulistruktur. Zentralvenen sind kaum noch zu erkennen. Außerdem fallen die nicht mehr im Verband angeordneten, scheinbar zufällig verteilten Hepatozyten mit Infiltraten und die immer häufiger auftretenden Mitosen auf.

Eine völlig aufgehobene Lebertextur mit Läppchenumkehr, das heißt die Ausrichtung der Leberläppchen um das Portalfeld und nicht wie ursprünglich um die Zentralvene, kennzeichnen den Leberschnitt des Versuchstieres aus der elften Behandlungswoche in der Abbildung 3.5. Es zeigt sich eine deutlichen Septenverbreiterung sowie eine fortschreitende Unterteilung des Leberparenchyms in immer neue Pseudolobuli. Reichlich Mitosen und vereinzelte Duktulusproliferationen als Zeichen regenerativer Prozesse sind auch zu erkennen.

Zur besseren Darstellung der Bindegewebsanteile wurden einige Leberpräparate zusätzlich zur HE-Färbung noch mit Chromotrop Anilinblau (CAB) gefärbt. In den Abbildungen 3.6. bis 3.8. sind Leberschnitte von Versuchstieren der sechsten, neunten und elften Behandlungswoche in dieser CAB-Färbung in jeweils 10-facher Vergrößerung exemplarisch dargestellt. Dabei ist noch einmal sehr deutlich der Verlauf der Leberstrukturveränderung von der Leberverfettung (Abb. 3.6.), über die zunehmende Fibrosierung (Abb. 3.7.), bis hin zum völlig zirrhotischen Umbau mit Läppchenumkehr (Abb. 3.8.) zu erkennen.

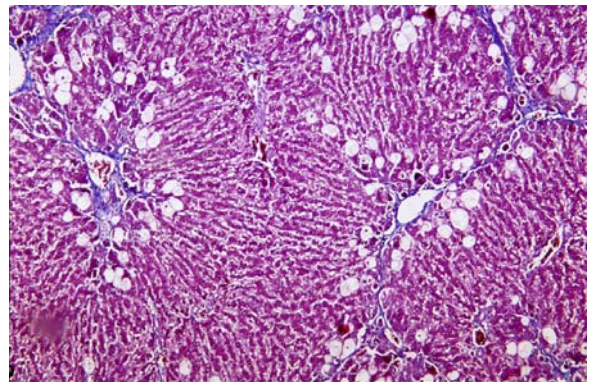


Abb. 3.6. Versuchstier Behandlungswoche 6, CAB-Färbung, Vergrößerung 10-fach

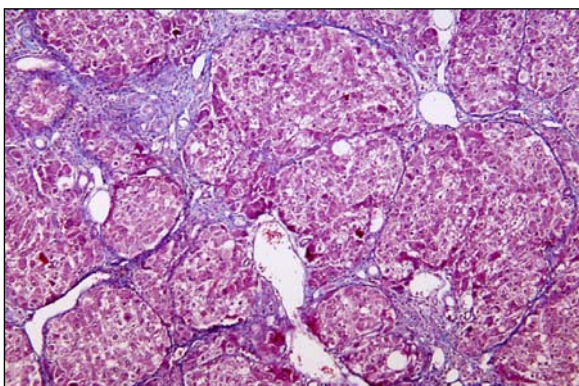


Abb. 3.7. Versuchstier Behandlungswoche 9, CAB-Färbung, Vergrößerung 10-fach

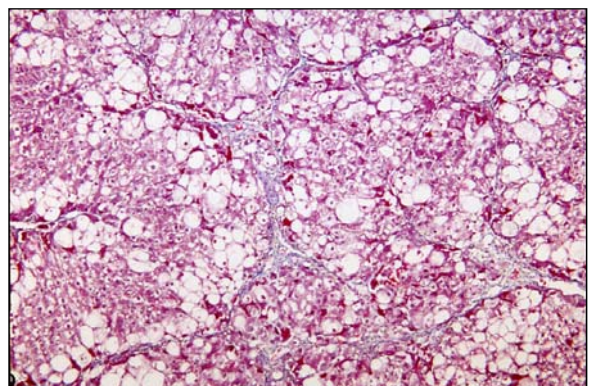


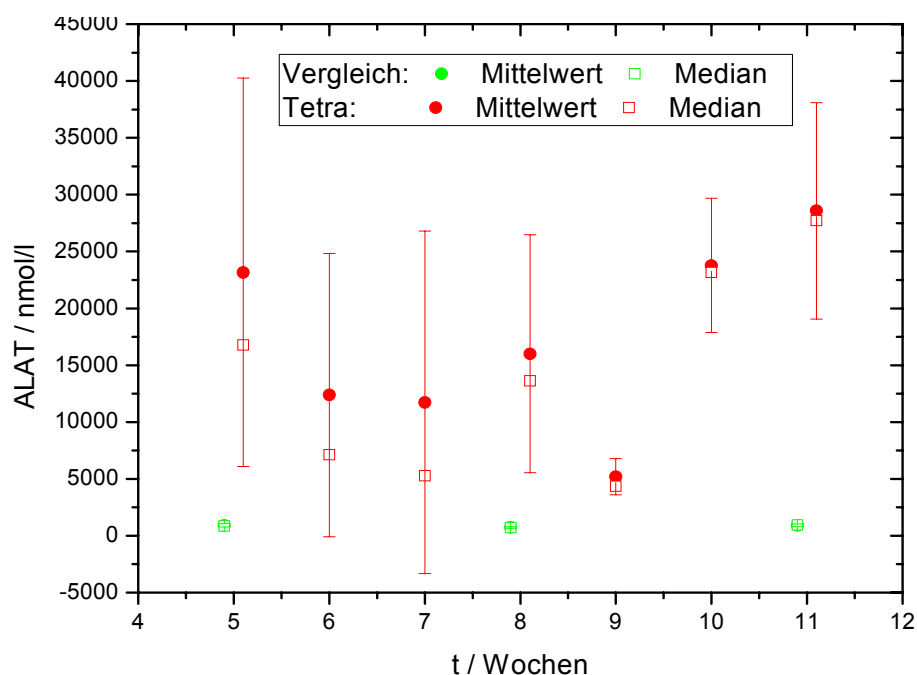
Abb. 3.8. Versuchstier Behandlungswoche 11, CAB-Färbung, Vergrößerung 10-fach

### 3.2. Ergebnisse der laborchemischen Veränderungen

Die Bestimmung des Blutbildes ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchs- und den Vergleichstieren. Mit zunehmender Dauer der Tetrachlorkohlenstoffexposition zeigten sich auch zwischen den Versuchstieren untereinander keine nennenswerten Unterschiede bei der Blutbildanalyse.

Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich aber bei der Bestimmung der Leberfunktionswerte:

1. Wie in der Grafik 3.1. graphisch und in der Tabelle 3.1. numerisch deutlich zu erkennen ist, sind die Ergebnisse für die Alaninaminotransferase (ALAT) der Versuchstiere höher als die der Vergleichstiere. Dabei sind die Ergebnisse in den vergleichbaren Gruppen der 5. ( $p < 0,01$ ), 8. ( $p < 0,05$ ) und 11. Woche ( $p < 0,001$ ) statistisch signifikant voneinander abzugrenzen. Die Werte der Versuchstiere haben im Gegensatz zu denen der Vergleichstiere eine viel größere Schwankungsbreite



Grafik 3.1. ALAT vs. Behandlungszeit

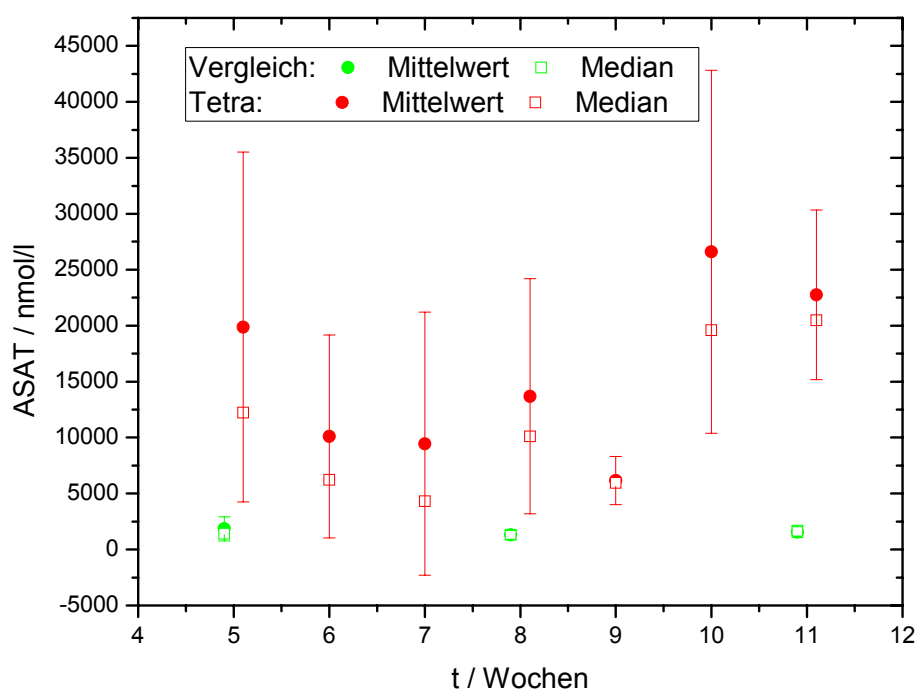
Tabelle 3.1. Mittelwert, Median und Standardabweichung der ALAT in nmol/l

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere		916,5	876,0	139,98
	8	738,2	712,5	70,55
	11	923,7	939,0	120,95
Versuchstiere	5	23176,0	16781,0	17073,06
	6	12380,2	7143,0	12457,87
	7	11732,4	5291,0	15065,80
	8	16011,6	13626,0	10467,95
	9	5186,0	4349,0	1591,68
	10	23780,2	23150,0	5912,53
	11	28580,4	27725,0	9518,79



(zwischen 24,9 % in der 10. und 128,4 % in der 7. Behandlungswoche bei den Versuchstieren bzw. zwischen 9,6 % in der 8. und 15,3 % in der 5. Behandlungswoche bei den Vergleichstieren) und sind bis zum 30-fachen größer. Auffällig bei den Versuchstiergruppen ist der relativ geringe Mittelwert in der neunten Behandlungswoche. Mit Ausnahme der 9. Behandlungswoche ist nach einem akuten ALAT-Anstieg mit anschließenden Abfall eine kontinuierliche Zunahme der ALAT-Konzentration von ungefähr 6000 nmol/l/Woche ab der siebenten Behandlungswoche in der Versuchstiergruppe festzustellen, während die der Vergleichstiere annähernd konstant bleibt.

2. Auch die Ergebnisse der Aspartataminotransferase (ASAT) sind bei den Versuchstieren im Vergleich zu denen der Vergleichstiere deutlich höher (Tabelle 3.2.), wobei sich nur die Ergebnisse der 5. ( $p < 0,05$ ) und 11. Woche ( $p < 0,001$ ) statistisch signifikant voneinander unterscheiden, während in der 8. Woche ( $p > 0,05$ )



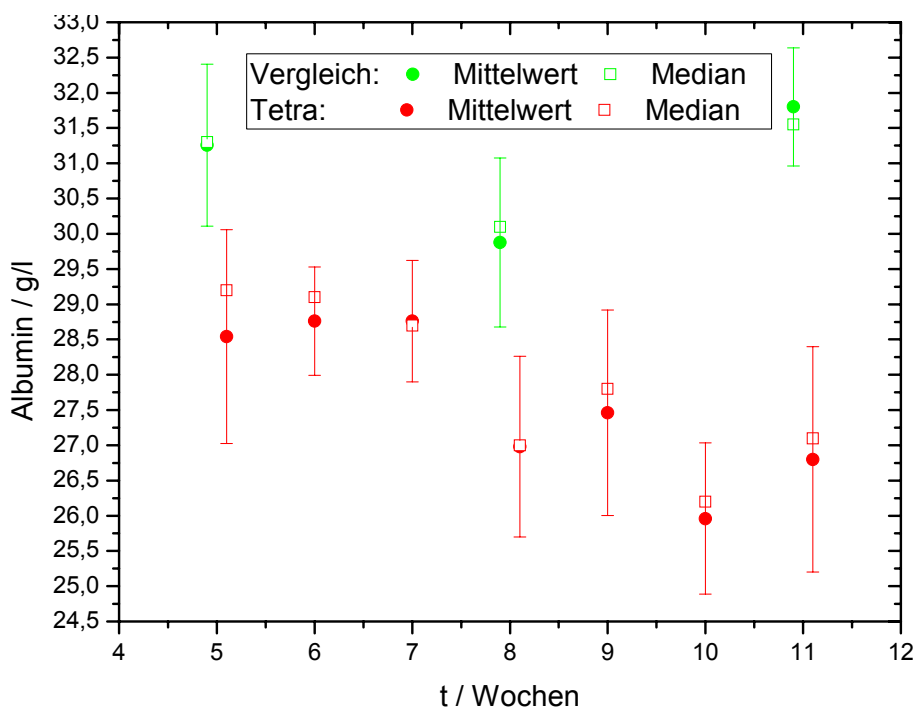
Grafik 3.2. ASAT vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.2. Mittelwert, Median und Standardabweichung der ASAT in nmol/l

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	1851,4	1394,0	1076,18
	8	1311,0	1302,5	399,35
	11	1562,5	1678,5	487,00
Versuchstiere	5	19878,2	12232,0	15627,09
	6	10103,0	6222,0	9078,04
	7	9451,2	4324,0	11748,93
	8	13689,0	10098,0	10504,17
	9	6170,8	5944,0	2153,76
	10	26606,2	19587,0	16217,18
	11	22746,8	20484,0	7592,08

keine signifikanten Unterschiede zu erkennen sind. Auch bei der ASAT sind die Mittelwerte der Versuchstiergruppen viel größer (bis zum 15-fachen) als die der Vergleichstiere. Während die Schwankungsbreite bei den Vergleichstieren nur zwischen 30,5 % (8. Behandlungswoche) und 58,1 % (5. Behandlungswoche) liegt, ist sie bei den Versuchstieren mit Werten zwischen 33,4 % (11. Behandlungswoche) und 124,3 % (7. Behandlungswoche) deutlich breiter. Bei der Betrachtung der Grafik 3.2. ist ein ähnliches Verteilungsmuster, einschließlich des relativ geringen Mittelwertes für die Versuchstiergruppe der neunten Behandlungswoche, wie bei der ALAT in der Grafik 3.1., zu erkennen. Auch der mit Ausnahme der neunten Behandlungswoche kontinuierliche Anstieg der ASAT-Konzentration von ungefähr 4900 nmol/l/Woche nach dem Abfall des initialen ASAT-peaks zu Behandlungsbeginn ist ähnlich dem Verlauf der ALAT-Konzentration.

3. In der Grafik 3.3. und in der Tabelle 3.3. ist die Entwicklung des Albumins im Ver-



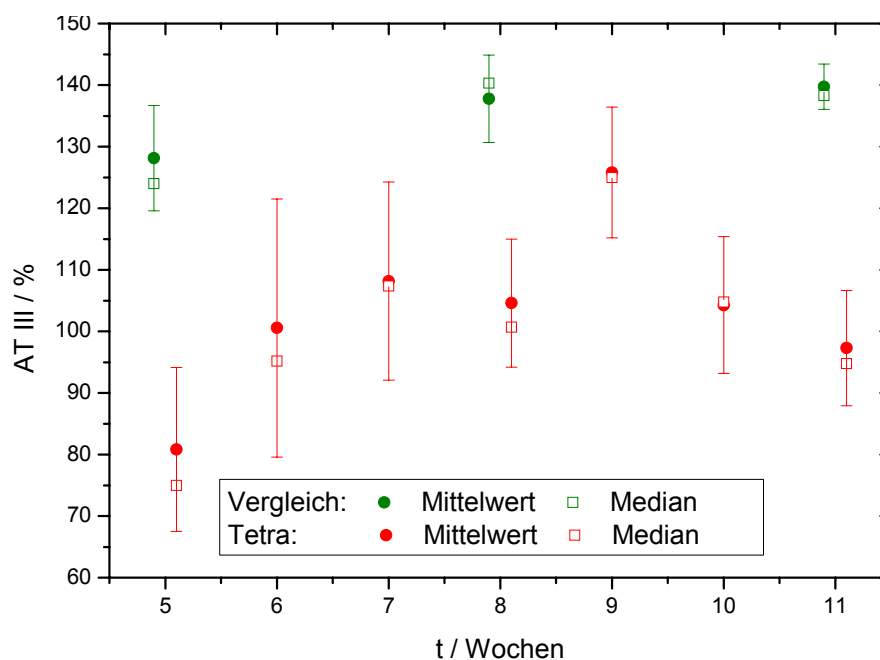
Grafik 3.3. Albumin vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.3. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Albumins in g/l

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	31,26	31,30	1,1502
	8	29,88	30,10	1,1983
	11	31,80	31,55	0,8367
Versuchstiere	5	28,54	29,20	1,5176
	6	28,76	29,10	0,7701
	7	28,76	28,70	0,8620
	8	26,98	27,00	1,2834
	9	27,46	27,80	1,4588
	10	25,96	26,20	1,0738
	11	26,80	27,10	1,6000

lauf der Behandlungszeit dargestellt. Beim Vergleich der Mittelwerte ist ein deutlicher, in den vergleichbaren Gruppen der 5. ( $p < 0,01$ ), 8. ( $p < 0,05$ ) und 11. Woche ( $p < 0,001$ ) signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichs- und Versuchstiergruppen zu erkennen, der mit zunehmender Behandlungsdauer immer größer wird. So sind die Albuminkonzentrationen der Versuchstiere der 5. Behandlungswoche um etwa 8,7 % kleiner als die der Vergleichstiere, während die Konzentrationen der Versuchstiere der 11. Behandlungswoche schon um etwa 15,7 % kleiner sind, als die der entsprechenden Vergleichstiergruppe. Die Einzelergebnisse sowohl der Versuchstier- als auch der Vergleichstiergruppen weisen dabei eine annähernd gleiche Schwankungsbreite auf.

4. Die Bestimmung der Antithrombin-III-Konzentrationen (siehe Grafik 3.4. und Tabelle 3.4.) ergab einen deutlichen, in den vergleichbaren Gruppen der 5. ( $p < 0,00005$ ), 8. ( $p < 0,001$ ) und 11. Woche ( $p < 0,0001$ ) signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichs- und den Versuchstieren. So sind die Antithrombin-III-Konzentrationen



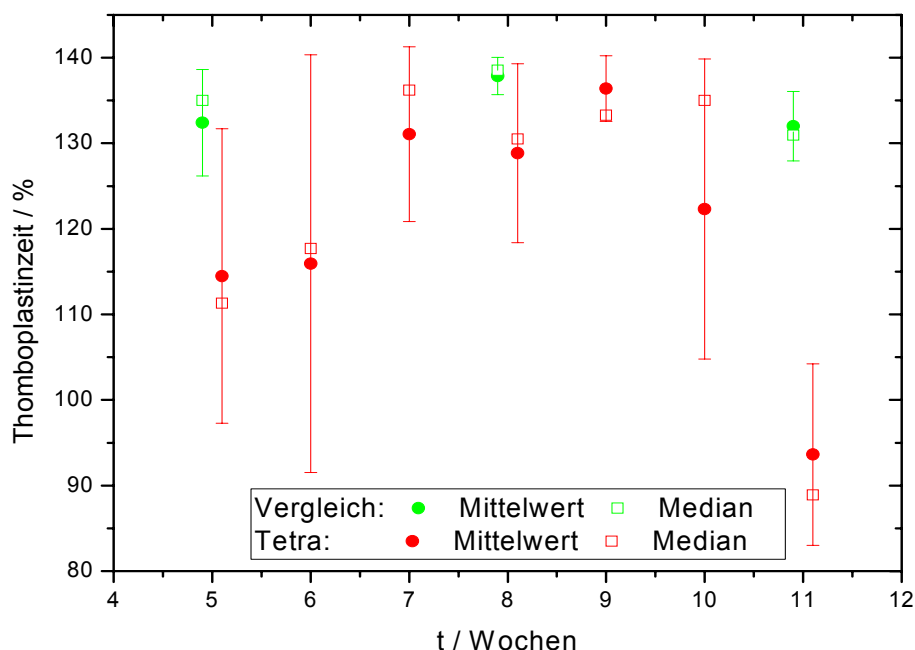
Grafik 3.4. Antithrombin III vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.4. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Antithrombin III in %

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	128,13	124,00	8,5352
	8	137,78	140,30	7,0906
	11	139,75	138,30	3,6828
Versuchstiere	5	80,84	74,95	13,3226
	6	100,55	95,20	20,9631
	7	108,16	107,35	16,1120
	8	104,60	100,65	10,3810
	9	125,82	124,95	10,6159
	10	104,26	104,75	11,1159
	11	97,28	94,75	9,3291

der Versuchstiere zwischen ungefähr 10,4 % (9. Behandlungswoche) und 36,9 % (5. Behandlungswoche) kleiner als die der Vergleichstiere. Weiterhin fallen die großen Standardabweichungen der Versuchstiergruppen (von minimal 8,4 % in der 9. bis maximal 20,8 % in der 6. Behandlungswoche) gegenüber denen der Vergleichstiergruppen (von minimal 2,6 % in der 11. bis maximal 6,7 % in der 5. Behandlungswoche) auf. Während bei den Vergleichstieren über den gesamten Untersuchungszeitraum eine tendenzielle Konzentrationszunahme des Antithrombin III von ca. 2,6 %/Woche zu erkennen ist, ist das bei den Versuchstieren nur bis zur 9. Behandlungswoche (Anstieg von etwa 11,2 %/Woche) der Fall. In den folgenden Behandlungswochen kommt es dort zu einer Konzentrationsabnahme von ca. 15,5 %/Woche.

5. Wie in Grafik 3.5. und Tabelle 3.5. ersichtlich, erbrachte die Bestimmung der Thromboplastinzeit nur für die Versuchstiergruppen der fünften, sechsten und elften Behandlungswoche deutlich niedrigere Werte im Vergleich zu denen der Ver-



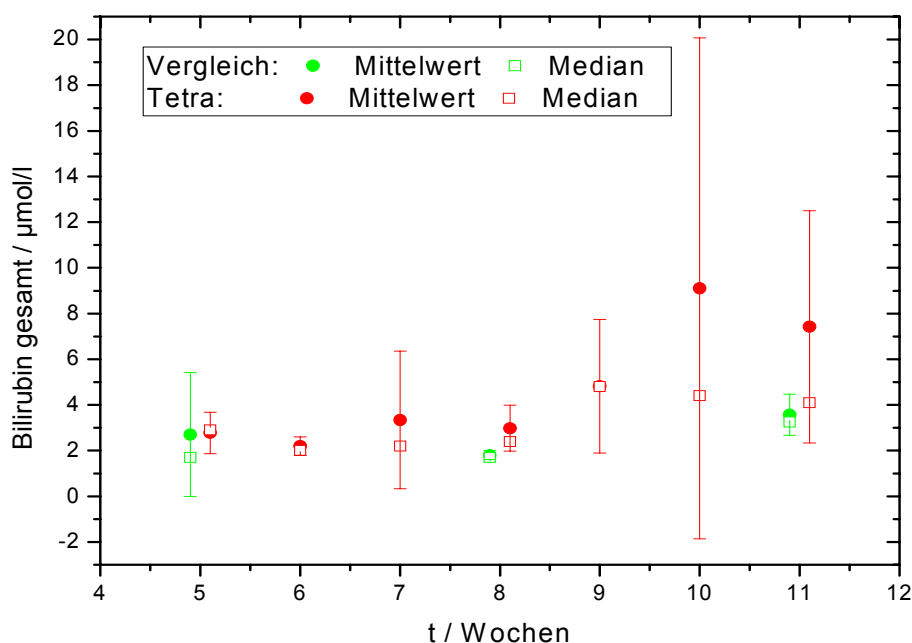
Grafik 3.5. Thromboplastinzeit vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.5. Mittelwert, Median und Standardabweichung der Thromboplastinzeit in %

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	132,41	135,00	6,2092
	8	137,88	138,55	2,1762
	11	132,00	130,95	4,0500
Versuchstiere	5	114,48	111,30	17,2095
	6	115,93	117,70	24,3980
	7	131,08	136,20	10,2121
	8	128,84	130,50	10,4467
	9	136,40	133,30	3,8393
	10	122,32	135,00	17,5285
	11	93,62	88,90	10,6098

gleichstiergruppen. Sie liegen zwischen 13,4 % (6. Behandlungswoche) und 30,1 % (11. Behandlungswoche) der Vergleichstiere. Die Mittelwerte für die Versuchstiergruppen der siebten bis zehnten Behandlungswochen sind nur unwesentlich kleiner als die der Vergleichstiergruppen, die sich untereinander nur gering voneinander unterscheiden. Signifikante Unterschiede ergeben sich nur beim Vergleich der Tiergruppen der 5. ( $p < 0,05$ ) und 11. Behandlungswoche ( $p < 0,0005$ ), während sich die der 8. Woche ( $p > 0,05$ ) nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch bei der Thromboplastinzeit ist die Standardabweichung in den Versuchstiergruppen deutlich größer als die der Vergleichstiergruppen. So liegt die Schwankungsbreite bei den Vergleichstieren nur zwischen 1,6 % (8. Behandlungswoche) und 4,7 % (5. Behandlungswoche), während sie sich bei den Versuchstieren zwischen 2,8 % (9. Behandlungswoche) und 21,0 % (6. Behandlungswoche) bewegt.

6. Bei der Bestimmung des Gesamtbilirubins ergaben sich nur geringe, nicht signifikante ( $p_{5./8./11. Wo} > 0,05$ ) Unterschiede zwischen Versuchs- und Vergleichstieren, wie



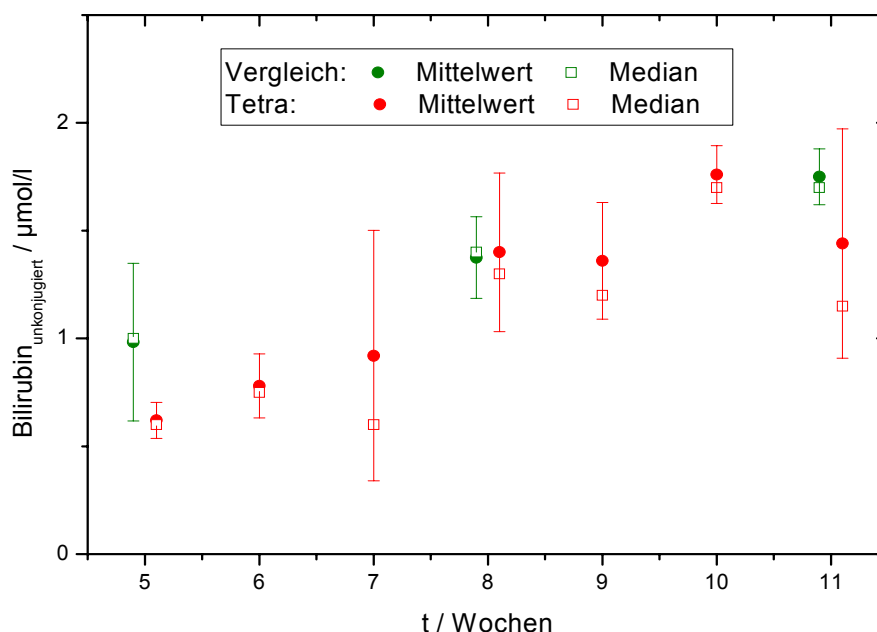
Grafik 3.6. Gesamtbilirubin vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.6. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Gesamtbilirubins in µmol/l

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	2,70	1,70	2,7105
	8	1,80	1,70	0,2000
	11	3,58	3,25	0,8995
Versuchstiere	5	2,78	2,90	0,9094
	6	2,20	2,00	0,4062
	7	3,34	2,20	3,0121
	8	2,98	2,40	1,0010
	9	4,82	4,80	2,9286
	10	9,10	4,40	10,9672
	11	7,42	4,10	5,0786

man in der Tabelle 3.6. und der Grafik 3.6. erkennen kann. Die Standardabweichungen der Versuchstiergruppen der siebten, neunten, zehnten und elften bzw. die der Vergleichstiergruppe der fünften Behandlungswoche waren im Vergleich zu denen der anderen Gruppen relativ groß. Tendenziell kam es zu einem Anstieg der Billirubinkonzentration von ungefähr 0,5  $\mu\text{mol/l/Woche}$  im Behandlungsverlauf bei den Versuchstieren, während die der Vergleichstiere annähernd konstant blieb.

7. Auch die Bestimmung des unkonjugierten Bilirubins zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p_{5./8./11. \text{Wo}} > 0,05$ ) zwischen Vergleichs- und Versuchstieren (Grafik 3.7. und Tabelle 3.7.). Auffällig ist die im Gegensatz zum Gesamtbilirubin in beiden Tierreihen zunehmende Konzentration, wobei die der Versuchstiere mit ungefähr 0,23  $\mu\text{mol/l/Woche}$  stärker ist als die der Vergleichstiere mit 0,13  $\mu\text{mol/l/Woche}$ . Die Absolutwerte in beiden Tierreihen sind dabei aber, wie schon erwähnt, annähernd gleich. Größere Unterschiede bei den Schwankungsbreiten zwischen den Vergleichs- und Versuchstiergruppen stellen sich nicht dar.



Grafik 3.7. Unkonjugiertes Bilirubin vs. Behandlungszeit

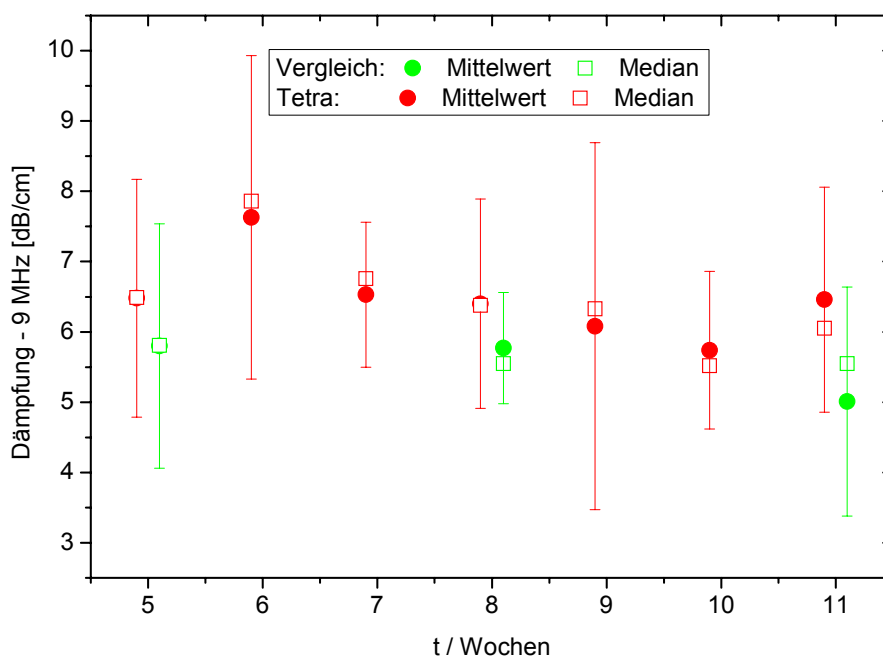
Tabelle 3.7. Mittelwert, Median und Standardabweichung des unkonjugierten Bilirubins in  $\mu\text{mol/l}$

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	0,98	1,00	0,3656
	8	1,38	1,40	0,1893
	11	1,75	1,70	0,1291
Versuchstiere	5	0,62	0,60	0,0837
	6	0,78	0,75	0,1483
	7	0,92	0,60	0,5805
	8	1,40	1,30	0,3674
	9	1,36	1,20	0,2702
	10	1,76	1,70	0,1342
	11	1,44	1,15	0,5320

### 3.3. Ultraschallmessergebnisse

Im Folgenden werden die Messergebnisse des Dämpfungskoeffizienten für die Mittelfrequenz von 9 MHz des in diesem Versuch verwendeten Wandlers vorgestellt:

Die Grafiken 3.8. und 3.9. mit den dazugehörigen Tabellen 3.8. und 3.9. stellen die Ergebnisse der Bestimmungen des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz nach der Schmalband-Methode dar. Dabei zeigen sich bei den Ergebnissen für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm), die in der Grafik 3.8. bzw. in der Tabelle 3.8. vorgestellt werden, nur geringe nicht signifikante Unterschiede ( $p_{5./8./11.Wo} > 0,05$ ) zwischen Vergleichs- und Versuchstieren. In beiden Untersuchungsgruppen fällt eine große Schwankungsbreite der Dämpfungswerte auf. Außerdem ist bei den Versuchstieren ab der 6. Behandlungswoche eine abfallende Tendenz des Dämpfungskoeffizienten im Verlauf der Behandlungszeit erkennbar.

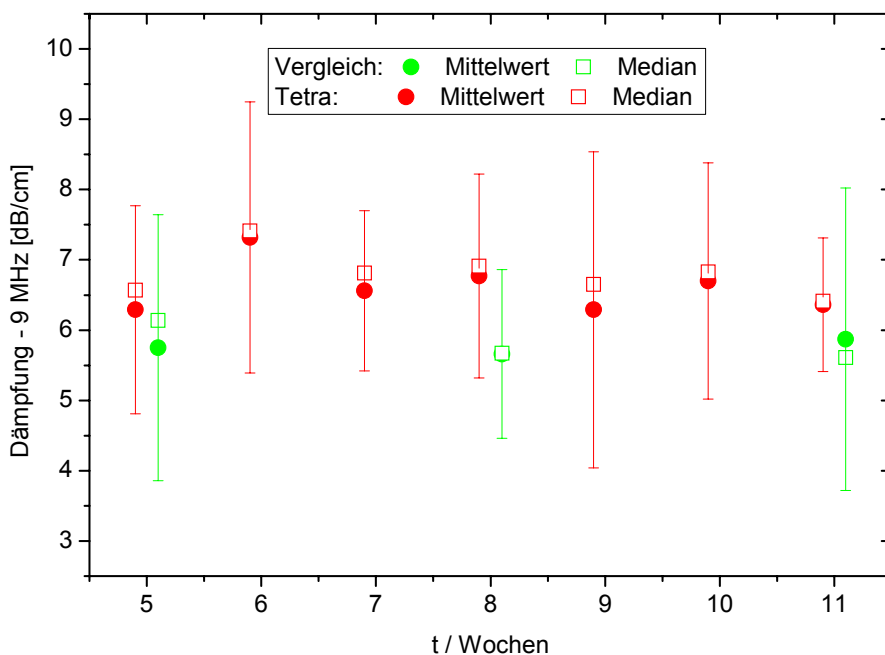


Grafik 3.8. Dämpfungskoeffizient bei 9 MHz für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm) der Schmalband-Methode vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.8. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm) der Schmalband-Methode

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	5,80	5,81	1,74
	8	5,77	5,55	0,79
	11	5,01	5,55	1,63
Versuchstiere	5	6,48	6,49	1,69
	6	7,63	7,86	2,30
	7	6,53	6,76	1,03
	8	6,40	6,38	1,49
	9	6,08	6,33	2,61
	10	5,74	5,52	1,12
	11	6,46	6,05	1,60

Die Messwerte des langen Wandler-Phantom-Abstandes (65  $\mu$ s; 48 mm), die in der Grafik 3.9. bzw. Tabelle 3.9. dargestellt sind, ergeben ähnliche Ergebnisse wie die des kurzen Wandler-Phantom-Abstandes. Auch hier sind keine großen Unterschiede zwischen den Vergleichs- und den Versuchstieren zu erkennen (fehlende Signifikanz der vergleichbaren Behandlungsgruppen:  $p_{5./8./11. W_0} > 0,05$ ). Und auch hier fallen die in beiden Gruppen vorhandenen großen Standardabweichungen und die ab der 6. Behandlungswoche tendenziell kleiner werdenden Dämpfungskoeffizienten bei den Versuchstieren auf.



Grafik 3.9. Dämpfungskoeffizient bei 9 MHz für den langen Wandler-Phantom-Abstand (65  $\mu$ s; 48 mm) der Schmalband-Methode vs. Behandlungszeit

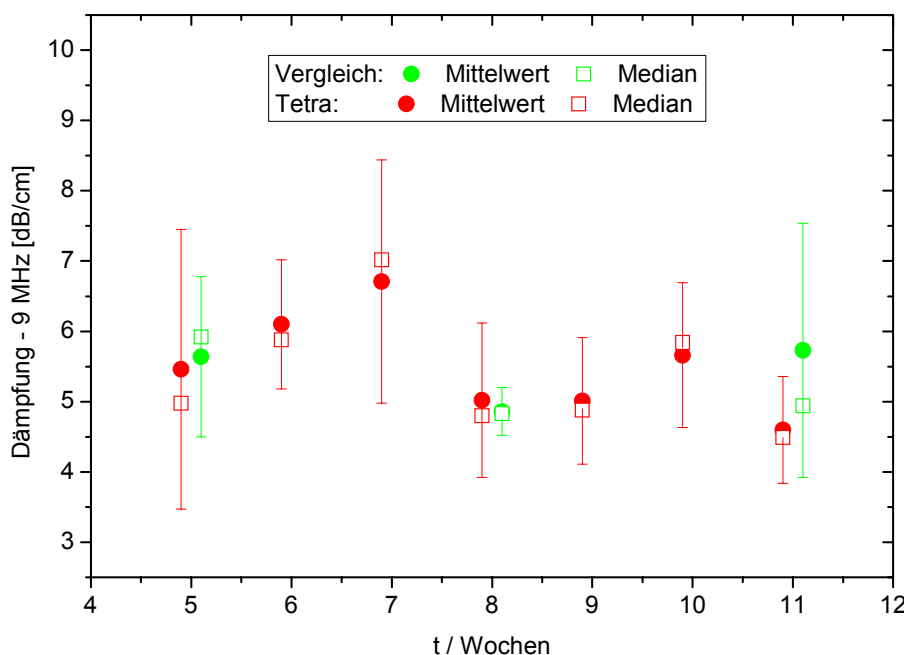
Tabelle 3.9. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz für den langen Wandler-Phantom-Abstand (65  $\mu$ s; 48 mm) der Schmalband-Methode

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	5,75	6,14	1,89
	8	5,66	5,67	1,20
	11	5,87	5,61	2,15
Versuchstiere	5	6,29	6,57	1,48
	6	7,32	7,41	1,93
	7	6,56	6,81	1,14
	8	6,77	6,91	1,45
	9	6,29	6,65	2,25
	10	6,70	6,83	1,68
	11	6,36	6,41	0,95

Die Ergebnisse der Bestimmung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz nach der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm) sind in der Grafik 3.10. bzw. in der Tabelle 3.10. dargestellt. Hier sind kaum Unterschiede zwischen den Vergleichs- und den Versuchstieren festzustellen



(fehlende Signifikanz der vergleichbaren Behandlungswochen:  $p_{5./8./11. W_0} > 0,05$ ). Sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen befinden sich in beiden Gruppen in ähnlichen Größenordnungen. Eine Tendenz über den gesamten Verlauf der Behandlungszeit lässt sich nicht erkennen.



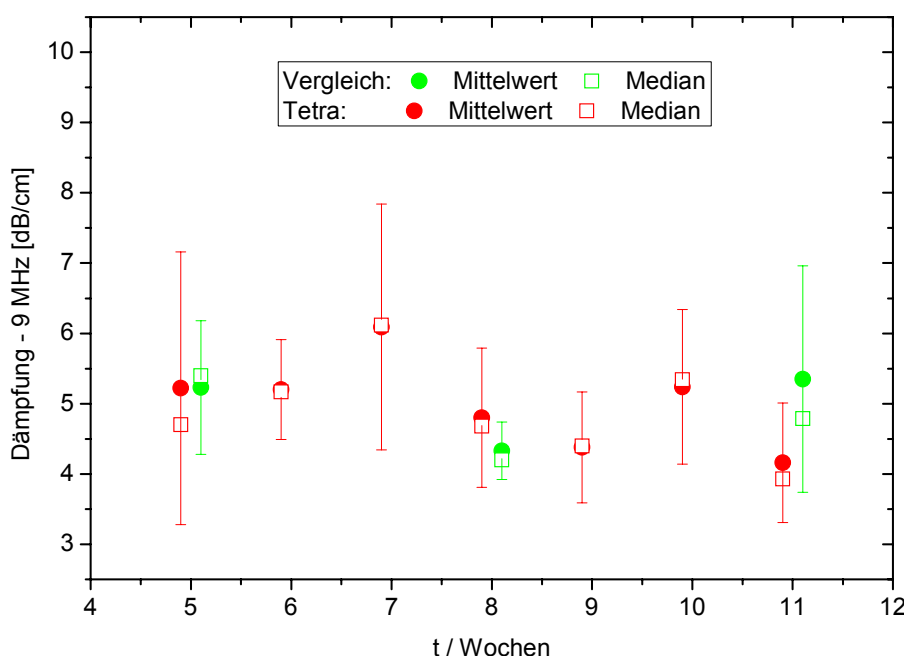
Grafik 3.10. Dämpfungskoeffizient bei 9 MHz für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm) der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.10. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (45  $\mu$ s; 34 mm) der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	5,64	5,92	1,14
	8	4,86	4,83	0,34
	11	5,73	4,94	1,81
Versuchstiere	5	5,46	4,98	1,99
	6	6,10	5,88	0,92
	7	6,71	7,02	1,73
	8	5,02	4,80	1,10
	9	5,01	4,88	0,90
	10	5,66	5,84	1,03
	11	4,60	4,49	0,76

Die Grafik 3.11. bzw. die Tabelle 3.11. zeigen die Ergebnisse der Berechnung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz nach der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode für den langen Wandler-Phantom-Abstand (65  $\mu$ s; 48 mm). Auch hier befinden sich sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen in beiden Gruppen in ähnlichen Größenordnungen, ein statistisch signifikanter Unterschied ist nicht festzustellen ( $p_{5./8./11. W_0} > 0,05$ ). Auch hier ist keine Tendenz über den gesamten Behandlungszeitraum zu erkennen.

Auffällig ist der Vergleich der Standardabweichungen der Schmalbandmethode mit den jeweilig dazu passenden der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode: Die Schwankungsbreiten der Messwerte der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode sind sowohl bei langem als auch bei kurzen Wandler-Phantom-Abstand jeweils bei den Vergleichs- als auch bei den Versuchstieren kleiner als die der Schmalbandmethode. So schwanken die Messwerte beim kurzen Wandler-Phantom-Abstand bei den Vergleichstieren in der Schmalbandmethode zwischen 13,7 % (8. Behandlungswoche) und 32,5 % (5. Behandlungswoche) bzw. in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode zwischen 7,0 % (8. Behandlungswoche) und 31,6 % (11. Behandlungswoche) und bei den Versuchstieren in der Schmalbandmethode zwischen 15,8 % (7. Behandlungswoche) und 42,9 % (9. Behandlungswoche) bzw. in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode zwischen 15,1 % (6. Behandlungswoche)



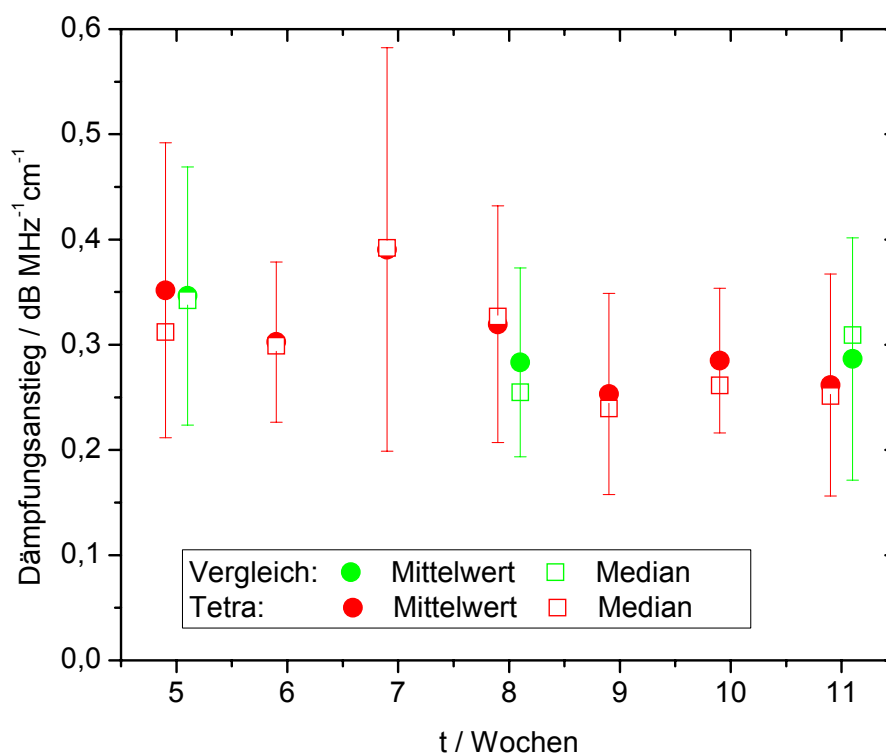
Grafik 3.11. Dämpfungskoeffizient bei 9 MHz für den langen Wandler-Phantom-Abstand (65  $\mu$ s; 48 mm) der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.11. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz für den kurzen Wandler-Phantom-Abstand (65  $\mu$ s; 48 mm) der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	5,23	5,40	0,95
	8	4,33	4,20	0,41
	11	5,35	4,79	1,61
Versuchstiere	5	5,22	4,70	1,94
	6	5,20	5,17	0,71
	7	6,09	6,12	1,75
	8	4,80	4,68	0,99
	9	4,38	4,40	0,79
	10	5,24	5,34	1,10
	11	4,16	3,93	0,85

und 36,4 % (5. Behandlungswoche). Ähnliches zeigt sich beim langen Wandler-Phantom-Abstand: Hier schwanken die Messwerte bei den Vergleichstieren in der Schmalbandmethode zwischen 21,2 % (8. Behandlungswoche) und 36,6 % (11. Behandlungswoche) bzw. in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode zwischen 9,5 % (8. Behandlungswoche) und 30,1 % (11. Behandlungswoche) und bei den Versuchstieren in der Schmalbandmethode zwischen 14,9 % (11. Behandlungswoche) und 35,8 % (9. Behandlungswoche) bzw. in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode zwischen 13,6 % (6. Behandlungswoche) und 37,2 % (5. Behandlungswoche).

Auch die Betrachtung des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten in der Schmalband-Methode, der in der Grafik 3.12. bzw. in der Tabelle 3.12. dargestellt ist,



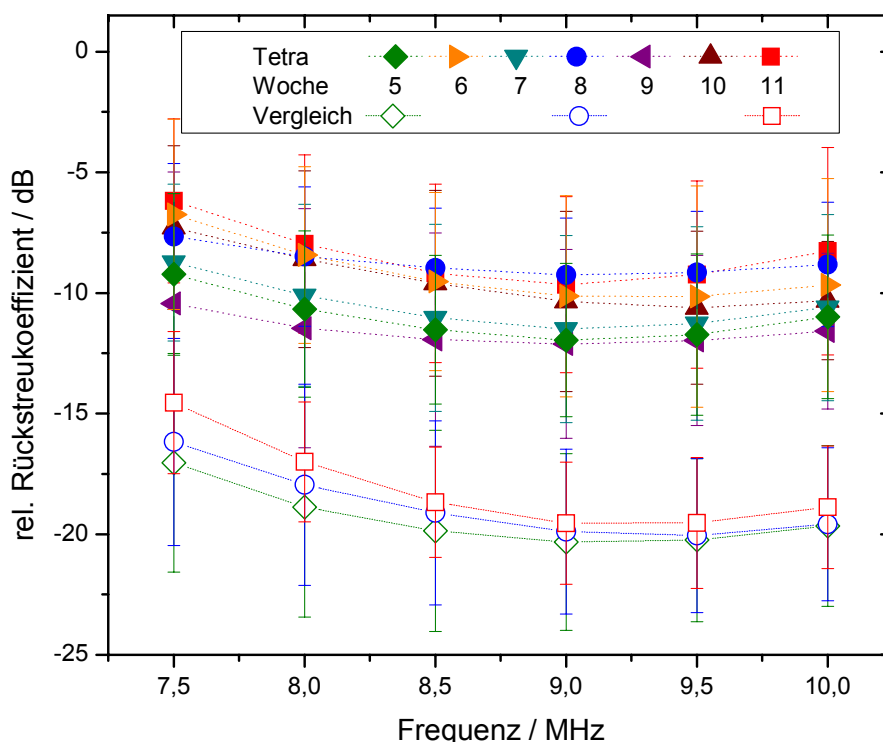
Grafik 3.12. Frequenzanstieg des Dämpfungskoeffizienten bei 9 MHz vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.12. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten bei 9MHz

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	0.346	0.342	0.122
	8	0.283	0.255	0.090
	11	0.286	0.309	0.115
Versuchstiere	5	0.352	0.312	0.140
	6	0.302	0.299	0.076
	7	0.390	0.392	0.192
	8	0.319	0.327	0.112
	9	0.253	0.239	0.096
	10	0.285	0.261	0.069
	11	0.262	0.251	0.105

zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen Vergleichs- und Versuchstieren (fehlende Signifikanz der vergleichbaren Behandlungswochen:  $p_{5./8./11.Wo} > 0,05$ ). Sowohl die Standardabweichungen als auch die Mittelwerte bewegen sich in ähnlichen Größenordnungen. In beiden Gruppen ist eine fallende Tendenz in den Absolutwerten des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten über den gesamten Behandlungszeitraum zu erkennen.

Bei der Betrachtung der Grafik 3.13., bei der die relative Rückstreuung für die verschiedenen Behandlungszeiten der Versuchs- und der Vergleichstiere in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt ist, fällt der mit steigender Frequenz zunehmende, aber vor allem bei den Frequenzen von 9, 9,5 und 10 Megahertz deutliche Unterschied zwischen den Versuchs- und den Vergleichstiergruppen auf.

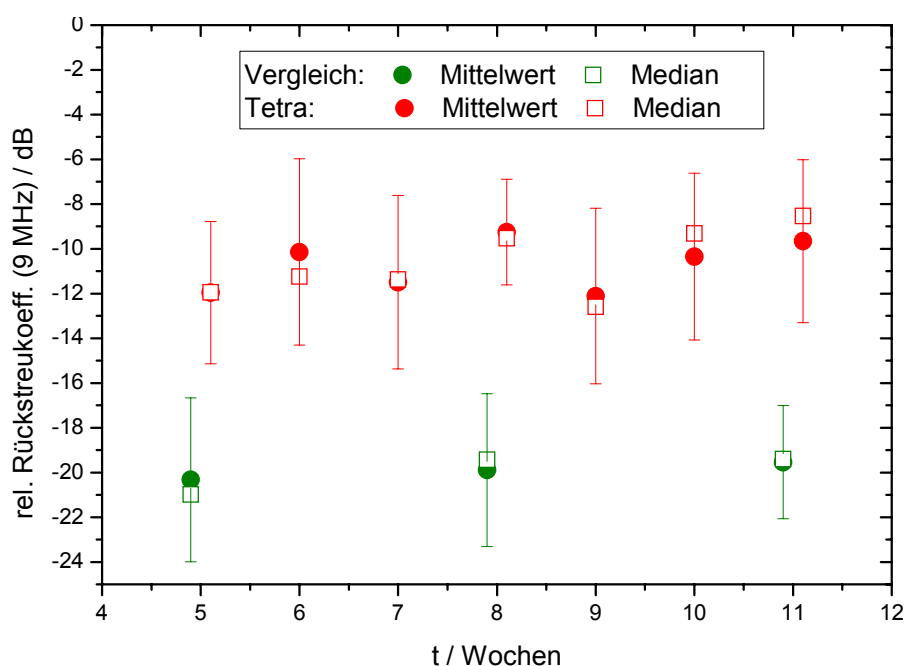


Grafik 3.13. Relativer Rückstreuungskoeffizient der jeweiligen Behandlungszeiten vs. Frequenz

In der Grafik 3.14. mit der dazugehörigen Tabelle 3.14. werden die Ergebnisse des Relativen Rückstreuungskoeffizienten der Grafik 3.13. exemplarisch für die Mittelfrequenz von 9 Megahertz des in diesen Versuch benutzten Wandlers in Abhängigkeit zur Behandlungszeit dargestellt. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Relativen Rückstreuungskoeffizienten der vergleichbaren Behandlungswochen der Vergleichs- und Versuchstieren ( $p_{5. Wo} < 0,00001$ ;  $p_{8. Wo} < 0,000005$ ;  $p_{11. Wo} < 0,00005$ ). So ist der Relative Rückstreuungskoeffizient bei den Versuchstieren zwischen minimal 50 %

(11. Behandlungswoche) und maximal 215 % (8. Behandlungswoche) größer als bei den Vergleichstieren.

Der Relative Rückstreukoeffizient der Vergleichstiere bleibt im Rahmen der Messungsgenauigkeiten über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant. Anders bei den Versuchstieren: Hier lässt sich eine ansteigende Tendenz des Relativen Rückstreukoeffizienten mit einem Anstieg von etwa 0,27 Dezibel pro Woche erkennen. Bei der Betrachtung der Standardabweichungen der Versuchs- und Vergleichstiere lassen sich keine Unterschiede feststellen.



Grafik 3.14. Relativer Rückstreukoeffizient bei 9 MHz vs. Behandlungszeit

Tabelle 3.14. Mittelwert, Median und Standardabweichung des Relativen Rückstreukoeffizienten bei 9 MHz

	Woche	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Vergleichstiere	5	-20,33	-20,56	3,66
	8	-19,90	-19,34	3,42
	11	-19,54	-18,72	2,53
Versuchstiere	5	-11,96	-12,71	3,18
	6	-10,14	-11,53	4,17
	7	-11,50	-11,37	3,88
	8	-9,26	-9,76	2,35
	9	-12,11	-13,23	3,92
	10	-10,35	-9,39	3,73
	11	-9,66	-8,57	3,64

## **4. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der histologischen Veränderungen**

Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) führt zu einer toxischen Schädigung des Leberparenchyms, die bei chronischer Exposition von der Fettleber über die Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose reichen kann.

Die Betrachtung der histologischen Bilder bestätigte das eindrucksvoll: Schon nach fünf Wochen Behandlungsdauer zeigten sich deutliche Veränderungen in der Leberparenchymstruktur der Versuchstiere, wohingegen die der Vergleichstiere während des gesamten Versuchzeitraumes völlig unauffällig blieben. Wie schon durch Popper und Schaffner (1961) bzw. Sandritter und Beneke (1974) beschrieben, zeigten sich auch in den Präparaten unseres Versuches reichlich Nekrosen mit hydropisch geschwollenen Zellen am Rand der Nekrose, die mikrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten, die auf einer Synthesestörung des Apolipoproteins (Poli et al., 1985) und der damit verbundenen Sekretionsstörung der fetttransportierenden Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) (Recknagel et al., 1960) beruht, und die Lipofuszinpigmente als Produkt der Lipidperoxidation (siehe Seite 12, Abbildung 1.4.). Elektronenmikroskopisch zeigte sich nach Dawborn et al. (1961) eine deutliche Schwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums als Orte der toxischen Primärläsion (Brattin et al., 1984; Tomasi et al., 1987). Die Portalfelder blieben unauffällig. Zusammenfassend zeigte sich in der Auswertung der mikroskopischen Präparate der ersten Behandlungswochen das Bild einer massiven Leberverfettung.

Mit zunehmender Dauer der CCl<sub>4</sub>-Exposition setzte sich der Umbau des Leberparenchyms weiter fort: Es zeigte sich eine immer stärker werdende Verfettung, eine weiter fortschreitende Fibrosierung und Septenzergliederung sowie kaum noch zu erkennende Zentralvenen. Die verstreut liegenden Hepatozyten mit zelligen Infiltrationen wiesen auf abgelaufene Zellnekrosen hin (Kämpfe, 1978). Ergebnis der zunehmenden Faserbildung und der damit verbundenen Aufhebung der funktionellen Feinstruktur des Leberparenchyms war die Ausbildung von Pseudolobuli. Die durch Popper und Schaffner (1961) beschriebene von der Peripherie der Leberläppchen ausgehende Geweberegeneration der entstandenen Leberfibrose wurde durch die quantitativ immer häufiger auftretenden Mitosen bestätigt.

Die mikroskopischen Präparate der Versuchstiere der letzten Behandlungswochen zeigten eine völlig aufgehobene Leberfeinstruktur. Infolge der fortlaufenden Schädigung kam es durch die anhaltende Fibrosierung zur Septenverbreiterung sowie zur

fortschreitenden Unterteilung des Leberparenchyms in immer neue Pseudolobuli, wobei praktisch alle Leberläppchen erfasst wurden. Es kam zur Ausbildung einer Zirrhose. Die dabei immer wieder reichlich auftretenden Mitosen und Ductulusproliferationen zeugten von der anhaltenden Regenerationsbereitschaft der geschädigten Leber (Popper & Schaffner, 1961; Hübner, 1974).

Die in den einzelnen Versuchstiergruppen festgestellten unterschiedlichen Ausprägungsgrade bei gleichartiger Intoxikation waren nach Ungar (1951) auf dispositionelle und genetische Faktoren zurückzuführen. Dabei sind z.B. die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Leberläppchen, unterschiedliche Giftexposition der verschiedenen Leberteile bzw. Leberlappen oder die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Tiere (konstitutionelle Faktoren) zu erwähnen.

Die in der klinischen Routine als Goldstandard geltende histologische Untersuchung von Gewebeproben ermöglicht eine sehr gute Einschätzung über die Art und den Grad einer Gewebeschädigung. Dabei sind die Genauigkeit und die mögliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in relativ hohem Maße von der Erfahrung des Untersuchenden abhängig und können durch zusätzliche Informationen über den klinischen Verlauf oder mögliche Schädigungsursachen weiter gesteigert werden.

Eine noch präzisere, eventuell sogar quantitative Einschätzung des Schädigungsgrades aus der histologischen Begutachtung ließe sich durch verschiedene, technisch bzw. zeitlich aufwendige Verfahren erreichen. Hier sind beispielhaft die EDV-gestützte Auszählung der Fettzellen oder die quantitative Beurteilung des Absolutfett- (Suzuki et al., 1992) oder des Kollagengehaltes durch chemische Methoden zu nennen.

#### **4.2. Diskussion der laborchemischen Ergebnisse**

Die Schweregrade akuter und chronischer Lebererkrankungen sowie leberspezifische StoffwechsellLeistungen lassen sich relativ sicher anhand der Veränderungen verschiedener laborchemischer Parameter einschätzen. Dazu gehören die Aspartat- und die Alaninaminotransferase, deren Funktionen bei Zellschädigung und Störungen der Membranfunktion eingeschränkt sind und die auf Grund ihrer relativ kurzen Halbwertszeit sehr gut für die Verlaufsbeurteilung einer hepatozellulären Schädigung geeignet sind (Thomas, 2000a). Eine Störung der Syntheseleistung der Leber lässt sich gut durch die Bestimmung der Plasmaproteine, z.B. Albumin, oder der Gerinnungsfaktoren, z.B. durch die Prothrombinzeit nach Quick oder des Antithrombin

III darstellen, während Störungen des Konjugations- und Exkretionsvermögens der Leber mit Hilfe des Bilirubins abgeschätzt werden können.

Die Aspartataminotransferase (ASAT; früher Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase [SGOT]) ist ein Enzym, was der Übertragung der Aminogruppen vom Aspartat auf die Gammaketogruppen vom Ketoglutarat dient und die Bildung von Oxalacetat und L-Glutamat katalysiert. Es kommt hauptsächlich in der Leber aber auch in Herz- und Skelettmuskel, Niere und Gehirn vor. Infolge der chronischen Leberschädigung durch die kontinuierliche Gabe von  $\text{CCl}_4$  kam es bei den Versuchstieren zu einer über den gesamten Behandlungszeitraum deutlich ansteigenden ASAT, deren Konzentration dabei bis zum 15-fachen der Vergleichstiere betrug. Dabei zeigte sich eine erhebliche Schwankungsbreite der ASAT-Konzentrationen zwischen den einzelnen Versuchstieren, wohingegen die der Vergleichstiere über den gesamten Beobachtungszeitraum deutlich kleiner waren. Signifikante Unterschiede waren aber nur in der 5. und 11. Behandlungswoche festzustellen.

Ähnliches zeigte sich bei der Bestimmung der Alaninaminotransferase (ALAT; früher Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase [SGPT]), die als Enzym die Umwandlung von Glutamat und Pyruvat zu L-Alanin und Alphaketoglutarat katalysiert und leberspezifisch ist: Auch die ALAT-Konzentrationen der Versuchstiere waren deutlich größer als die der Vergleichstiere und nahmen im Behandlungsverlauf stetig zu. Auch hier waren die Schwankungsbreiten bei den Versuchstieren deutlich größer als bei den Vergleichstieren. Ein signifikanter Unterschied konnte in allen vergleichbaren Behandlungswochen festgestellt werden.

Sowohl die ALAT als auch die ASAT zeigten dabei einen zu Behandlungsbeginn initialen Konzentrationspeak gefolgt von einem Abfall, der dann in eine kontinuierliche Konzentrationszunahme überging. Möglicherweise handelt es sich dabei um den Übergang vom Ende der akuten Leberschädigung mit anschließender kurzer Stabilisierungsphase zur chronischen Leberschädigung. Der parallel verlaufende Anstieg der ASAT und ALAT, wie er auch in diesen Versuch beobachtet werden konnte, gilt hierbei als sicherer Beweis einer hepatozellulären Nekrose (Thomas, 2000a).

Albumin als wichtigstes Transportprotein von Mensch und Ratte wird im rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) der Hepatozyten gebildet. Durch die Schädigung des RER als einem der Orte der toxischen Primärläsion der  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation (siehe 1.3.1) kam es zu einer deutlichen Abnahme der Albuminkonzentration bei den Versuchstieren im Verlauf des Behandlungszeitraumes, während die der Vergleichstiere annähernd konstant blieb. Die Unterschiede zwischen Versuchs- und



Vergleichstieren der vergleichbaren Behandlungswochen waren dabei statistisch signifikant.

Leberfunktionsstörungen führen in Abhängigkeit vom Schweregrad zu komplexen Gerinnungsstörungen (Mammen, 1992). Dabei gelten die Prothrombinzeit und die Antithrombinkonzentration als zwei der empfindlichsten Messgrößen zur Verlaufskontrolle eines Leberleidens (Wagner & Dati, 2000b).

Das Antithrombin als wichtigster physiologischer Inhibitor der Serin-Proteasen, zu deren Vertretern das Thrombin, der Faktor Xa und der Faktor IXa gehören, war in Folge der chronischen Tetrachlorkohlenstoffintoxikation und der damit verbundenen gestörten hepatozellulären Proteinsynthese bei den Versuchstieren deutlich niedriger als bei den Vergleichstieren. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in allen vergleichbaren Behandlungswochen festgestellt werden.

Die Prothrombinzeit (syn. Thromboplastinzeit) ist ein Parameter zum Nachweis von Störungen im exogenen System der Blutgerinnung. Sie wird im Wesentlichen durch die Funktion und Konzentration der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X, deren wichtigster Bildungsort die Leber ist, beeinflusst (Jelkmann, 2005). Wenn auch nicht so deutlich wie bei der ASAT-, ALAT-, Albumin- und Antithrombinkonzentrationen, so zeigte sich auch bei der Auswertung der Prothrombinzeit nach Quick die induzierte Leberfunktionsstörung für den Großteil der Versuchstiere im Gegensatz zu der intakten Leberfunktion der Vergleichstiere: Die Mittelwerte der Prothrombinzeiten der CCl<sub>4</sub>-geschädigten Tiere waren mit Ausnahme der 9. Behandlungswoche niedriger und zeigten eine größere Schwankungsbreite. Signifikante Unterschiede waren aber nur in der 5. und 11. Behandlungswoche festzustellen.

Das Bilirubin als Hämoglobinabbauprodukt wird nach Glukuronierung und Sulfatierung im Hepatozyten mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden (Vaupel, 2005). Durch die CCl<sub>4</sub>-Schädigung der Hepatozyten sollte diese Funktion der Leber eingeschränkt sein (Sherlock, 1989). Anders als erwartet, ergaben sich aber im Vergleich der Versuchs- mit den Vergleichstieren keine deutlichen Unterschiede. Tendenziell zeigte sich eine Zunahme der Gesamtbilirubinkonzentration der Versuchstiere über den Behandlungszeitraum, wobei sich die von Häussinger (1998) beschriebene Zunahme des konjugierten Anteils am Gesamtbilirubin gerade zum Ende des Beobachtungszeitraumes immer deutlicher abzeichnete. Ursache der in dem Versuch nur unzureichend ersichtlichen eingeschränkten Leberfunktion könnte unter anderen ein zu geringer Schädigungseinfluss des CCl<sub>4</sub> auf das Konjugations- und Exkretionsvermögen der Rattenleber sein.

Anhand der sich im Behandlungsverlauf deutlich veränderten Prothrombinzeit, ASAT-, ALAT-, Antithrombin- und Albuminkonzentrationen der Versuchstiere wird die erwartete Leberschädigung infolge der chronischen CCl<sub>4</sub>-Exposition auch laborchemisch bestätigt. Die dabei aufgetretenen großen Schwankungsbreiten zwischen den einzelnen Tieren sind wie oben schon erwähnt sehr wahrscheinlich auf dispositionelle und genetische Faktoren zurückzuführen. Aber auch intraindividuelle Variationen, wie sie von Costongs et al. (1985) eindrucksvoll beschrieben wurden, könnten dafür eine nicht zu unterschätzende Ursache sein.

Quantitative Rückschlüsse über den Schweregrad der Leberschädigung lassen sich allerdings an Hand der in diesen Versuch bestimmten laborchemischen Parameter nicht ziehen. Zu groß waren die Schwankungsbreiten in den einzelnen Versuchstiergruppen. Zu klein waren teilweise die Unterschiede zwischen Versuchs- und Vergleichstieren. So gut die einzelnen Parameter zur Unterscheidung zwischen gesunder und pathologisch veränderter Leber auch sind (Schmidt & Schmidt, 1979), so unzureichend ist doch ihre Aussagekraft zur quantitativen Einschätzung dieser pathologischen Veränderungen.

Abhängig von der klinischen Erfahrung des Untersuchenden lassen sich aus der Summe der Aussagen der einzelnen laborchemischen Parameter zwar Rückschlüsse auf den Grad und die Art der Leberschädigung ziehen. Aber selbst die Hinzuziehung weiterer, sehr spezifischer, in diesen Versuch nicht bestimmter Parameter, wie z. B. der Gamma-Glutamyl-Transferase (v Herbay & Strohmeyer, 1994; Schmidt & Schmidt, 1984) oder der Glutamat-Dehydrogenase (Thomas, 2000b), bringt keine objektiveren, sicher reproduzierbaren quantitativen Ergebnisse über den Schweregrad der Leberschädigung.

### **4.3. Diskussion der Ultraschallmessergebnisse**

Viele, im Ultraschall-B-Bild-Verfahren nicht genutzte Informationen des zurückgestreuten Ultraschallsignals könnten zu einer besseren Differenzierung zwischen gesunden und pathologisch veränderten Geweben beitragen. Die beim Vergleich von gesunden und pathologisch veränderten Gewebe unterschiedliche Struktur und Zusammensetzung und die damit verbundenen lokalen Variationen von Dichte und Kompressibilität führen zu einer Änderung des Streuverhaltens des Ultraschallpulses. Die frequenzabhängige Dämpfung und der relative Rückstreuoeffizient beschreiben dabei sehr gut die Wechselwirkungen zwischen sich ausbreitender Schall-

welle und Gewebe und können somit zur besseren Gewebedifferenzierung beitragen (Allison et al., 1994; Insana et al., 1989; Hartmann et al., 1993).

#### **4.3.1. Die Ultraschalldämpfung**

Die frequenzabhängige Dämpfung wurde in diesem Versuch durch zwei unterschiedliche Methoden bestimmt: 1.) die Schmalbandmethode und 2.) die modifizierte Spektrum-Differenz-Methode (siehe 2.2.2.). Dabei wurden jeweils Messungen mit einem kurzen (45  $\mu$ s; 34 mm) und einen langen (65  $\mu$ s; 48 mm) Wandler-Phantom-Abstand durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten in der Schmalband-Methode.

Prinzipiell konnten bei beiden Messmethoden der Dämpfungsbestimmung keine großen Unterschiede zwischen kurzem und langem Wandler-Phantom-Abstand festgestellt werden. Der Einfluss des Schallfeldes in dem im Versuch gewählten Messbereich ist also zu vernachlässigen. Der unterschiedliche Wandler-Phantom-Abstand spielte bei beiden Methoden keine messbare Rolle.

Sowohl die Dämpfungsbestimmung in der Schmalband- als auch die in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den durch CCl<sub>4</sub> geschädigten und den Vergleichstieren. Die Dämpfungswerte beider Messmethoden stimmen im Rahmen der Messunsicherheiten annähernd überein. Allerdings scheint die modifizierte Spektrum-Differenz-Methode weniger anfällig zu sein als die Schmalbandmethode: Die deutlich geringeren Schwankungen zwischen den einzelnen Dämpfungswerten in den jeweiligen Tiergruppen sowohl der Versuchs- als auch der Vergleichstiere und den damit verbundenen kleineren Standardabweichungen sprechen für eine höhere Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse nach der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode, was infolge des störungsanfälligeren Messprinzips zu erwarten war.

Anders als in anderen, schon früher durchgeführten, ähnlichen Versuchen (Lu et al., 1997; O'Brien et al., 1996; Tuthill et al., 1989; Parker et al., 1988) bei denen eine Dämpfungszunahme beobachtet wurde, zeigte sich in diesen Versuch für die modifizierte Spektrum-Differenz-Methode keinerlei erkennbare Tendenz bzw. in der Schmalbandmethode ein tendenzieller Abfall der Dämpfung über den gesamten Behandlungszeitraum bei den Versuchstieren. Betrachtet man aber die histologischen Veränderungen genauer und differenzierter, so ergeben sich doch, zumindest für den in diesen Versuch festgestellten Dämpfungsverlauf der Schmalbandmethode, einige

plausible Erklärungen, während sich der ungerichtete Verlauf der Dämpfung in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode damit allerdings nicht begründen lässt:

Die infolge der chronischen CCl<sub>4</sub>-Exposition fortschreitende Leberschädigung beginnt in den ersten Behandlungswochen mit einer zunehmenden hydropischen Schwellung und mikrovesikulären Verfettung der Hepatozyten. Wie in anderen Studien übereinstimmend beschrieben, kommt es infolge der zunehmenden hepatozellulären Wassereinlagerung zu einem Abfall der Dämpfung (Tuthill et al., 1989; Bamber et al., 1981b;), wie es auch in der Schmalbandmethode dieses Versuches festgestellt werden konnte. Anders sieht es bei der Betrachtung des Dämpfungsverhalten des Lebergewebes mit zunehmenden Fettgehalt aus: Während Parker und Tuthill (1986), Taylor et al. (1986), Tervola et al. (1985) und Bamber et al. (1981b) einen Dämpfungsanstieg mit zunehmender hepatozellulärer Verfettung beobachteten, stellten Johnston et al. (1979) bzw. Dunn et al. (1969) dabei einen Dämpfungsabfall, ähnlich dem in der Schmalbandmethode dieses Versuches ermittelten, fest.

Nicht zu erklären ist der anhaltende Dämpfungsabfall in der Schmalbandmethode zum Ende des Versuches. Die histologische Aufarbeitung der Leberpräparate der Versuchstiergruppen zeigte eine zunehmende Fibrosierung der Leberfeinstruktur bis hin zur sich letztendlich ausgebildeten Leberzirrhose (siehe 4.1.). Der dabei deutlich angestiegene Kollagengehalt (siehe Seite 33, Abbildungen 3.6.-3.8.) ließ eigentlich einen Dämpfungsanstieg erwarten, wie es in den Versuchen von Goss und Dunn (1980), Goss et al. (1980), Kuc (1980) sowie Johnston et al. (1979) festgestellt wurde. Nur Bamber et al. (1981 b) und Taylor et al. (1986) konnten keine signifikante Korrelation zwischen Kollagengehalt und Dämpfung erkennen. Ein Dämpfungsabfall, wie in der Schmalbandmethode dieses Versuches festgestellt, ist in der Literatur nicht beschrieben.

Auf Grund der in 4.1. beschriebenen deutlich erkennbaren Veränderungen der Leberfeinstruktur infolge der chronischen CCl<sub>4</sub>-Intoxikation waren auch bei der Bestimmung des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten, der angibt, um wie viel dB sich der Dämpfungskoeffizient über eine Strecke von 1 cm ändert, wenn sich die Frequenz um 1 MHz erhöht, Unterschiede zwischen den Versuchs- und Vergleichstieren zu erwarten. Aber sowohl die Mittelwerte als auch die breite Streuung der Messergebnisse in den jeweiligen Behandlungszeiträumen waren in beiden Gruppen annähernd gleich.

Wie schon bei Meziri et al. (2005), Drescher et al. (1990), Lin et al. (1988), Gara et al. (1987) und Taylor et al. (1986) stellte sich auch in diesem Versuch eine unzureichende Nutzbarkeit der Ultraschalldämpfung und des Anstieges des Dämpfungs-

koeffizienten zur feingeweblichen Differenzierung einer Leberzellschädigung heraus: Das durch die chronische CCl<sub>4</sub>-Intoxikation pathologisch veränderte Lebergewebe der Versuchstiere lässt sich mit Hilfe der Ultraschalldämpfung zwar in gewissen Grenzen vom histologisch unauffälligen Lebergewebe der Vergleichstiere unterscheiden, signifikante Unterschiede sind aber infolge der großen Streuung der Einzelmesswerte nicht zu erkennen. Des Weiteren konnte die, auf Grund der in der Vergangenheit schon mehrfach publizierten Messergebnisse zu erwartende, Dämpfungszunahme nicht beobachtet werden.

Dafür könnten mehrere verschiedene Ursachen verantwortlich sein, von denen hier einige genannt werden sollen: So beschrieb z.B. Robinson (1985) die ansteigende Komplexität und Variabilität des morphologischen Erscheinungsbildes infolge zunehmender pathologischer Gewebeveränderungen. Passend dazu definierten Sommer et al. (1984) in ihren Messungen an humanen Lebergewebe die Dämpfung als intraindividuelles Charakteristikum. Auch die von Frizzel et al. (1979) beobachteten Folgen einer nur minimal, vom Untersucher nicht registrierten veränderten Leberpräparation mit den daraus resultierenden Gaseinschlüssen, wie auch von Bamber und Nassiri (1985) beschrieben, könnten zu einer Erhöhung der Variabilität der Dämpfungsergebnisse beigetragen haben.

#### **4.3.2. Der relative Rückstreukoeffizient**

Neben der frequenzabhängigen Dämpfung wurde in diesen Versuch der relative Rückstreukoeffizient als gewebespezifischer US-Parameter bestimmt. Anders als bei den Dämpfungsergebnissen konnte bei der Betrachtung der Messergebnisse des relativen Rückstreukoeffizienten ein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichs- und den Versuchstieren der vergleichbaren Behandlungswochen festgestellt werden. Die relativen Rückstreukoeffizienten der Vergleichstiere bei der Mittelfrequenz von 9 MHz des in diesen Versuch genutzten Wandlers waren dabei um etwa 100 % kleiner als die der Versuchstiere. Erkennbar wurde dabei auch die Frequenzabhängigkeit des relativen Rückstreukoeffizienten: Mit zunehmender Wandlerfrequenz wurde der Unterschied des relativen Rückstreukoeffizienten zwischen Vergleichs- und Versuchstieren deutlicher.

Bei der differenzierteren Betrachtung der einzelnen Versuchstiergruppen konnte ähnlich wie bei Parker und Tuthill (1986) oder bei O'Brien et al. (1996) bzw. Lu et al. (1997), die die Leberschädigung nach einmaliger CCl<sub>4</sub>- bzw. chronischer Prednisoloneintoxikation untersuchten, ein tendenzieller Anstieg des relativen Rückstreukoeffizi-

enten registriert werden. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich mehrere Ursachen: Der wichtigste Aspekt in der ersten Versuchshälfte scheint hierbei die mit der CCl<sub>4</sub>-Intoxikation einhergehende Progression der Größe, Anzahl und räumlichen Verteilung der hydropisch geschwollenen Hepatozyten und der Fettvakuolen zu sein. Grundlagenversuche an so genannten Graphit-in-Gel-Phantomen bestätigen dies (Wu et al., 1992). Wie Freese und Lyons (1977), Bamber et al. (1981 b) und Layer et al. (1990) übereinstimmend feststellten, trägt aber auch die zunehmende Absolutkonzentration des Fettes zu einem Anstieg des relativen Rückstreukoeffizienten bei. Anders als in der ersten wird der Anstieg des relativen Rückstreukoeffizienten in der zweiten Versuchshälfte wahrscheinlich vor allem durch den zunehmenden Kollagengehalt infolge des pseudolobulär-fibrotischen bzw. im weiteren Verlauf zirrhotischen Leberumbaus bestimmt. Diese These wird durch ähnliche Messergebnisse von Waag et al. (1982) bzw. O'Donnell et al. (1981) gestützt.

Ähnlich wie die Dämpfungsergebnisse erbrachten auch die Versuchsergebnisse des relativen Rückstreukoeffizienten keine ausreichende Nutzbarkeit zur feingeweblichen Differenzierung einer Leberschädigung. Zwar war in diesen Versuch eine signifikante Unterscheidung zwischen erkranktem und gesundem Lebergewebe möglich, wie aber schon bei Meziri et al. (2005) und Lu et al. (1997 & 1999) kann eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Versuchstiere zu den jeweiligen histopathologischen Erkrankungsstadien anhand des relativen Rückstreukoeffizienten nur unzureichend erzielt werden. Wahrscheinlich ist die von Robinson (1985) beschriebene ansteigende Komplexität und Variabilität des morphologischen Erscheinungsbildes infolge zunehmender pathologischer Gewebeveränderungen zu groß für eine sichere klinische Nutzbarkeit des intraindividuellen Charakteristikums Relativer Rückstreukoeffizient (Sommer et al., 1984) als isolierten Parameter zur feingeweblichen Gewebedifferenzierung .

#### **4.4. Schlussfolgerungen zur Effektivität der jeweiligen Bestimmungsmethoden bei der Gewebedifferenzierung**

Zur Einschätzung der Nutzbarkeit der US-Gewebecharakterisierung zur Differenzierung von pathologisch verändertem Gewebe wurden in diesen Versuch exemplarisch die frequenzabhängige Dämpfung, der Frequenzanstieg des Dämpfungskoeffizienten und der relative Rückstreukoeffizient bestimmt. Zur besseren Beurteilung der Wertigkeit dieser Messgrößen erfolgten zusätzlich die histologische Aufarbeitung und die Bestimmung verschiedener laborchemischer Parameter. Dabei musste bei der ge-

naueren Betrachtung festgestellt werden, dass keine der eben genannten Verfahren eine genaue Quantifizierung einer Gewebeschädigung ermöglichte.

Jeder der in diesen Versuch bestimmten Parameter ermöglichte in gewissen Grenzen eine Unterscheidung zwischen gesunden und pathologisch veränderten Lebergewebe. Aber weder die in der klinischen Routine als Goldstandard geltende histologische Untersuchung von Gewebeproben noch die Bestimmung verschiedener Leberspezifischer Laborparameter, wie die Aspartat- und die Alaninaminotransferase, die Albuminkonzentration, die Prothrombinzeit nach Quick, die Antithrombin-III- bzw. die Bilirubinkonzentration oder die Analyse der US-Echosignale mit der Auswertung der frequenzabhängigen Dämpfung, des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten und des relativen Rückstreukoeffizienten waren für eine eindeutige, reproduzierbare Gewebedifferenzierung geeignet.

Zwar ließ sich in diesen Versuch feststellen, dass mit dem relativen Rückstreukoeffizienten ein akustischer Parameter zur Verfügung steht, mit dem einzelne Gewebeveränderungen erfassbar sind. Wie aber durch die tägliche klinische Routine immer wieder bestätigt, ist der Vergleich komplexer morphologisch-funktioneller und individuell variabler Gewebeveränderungen mit nur einem Parameter oder nur einer Untersuchungstechnik äußerst problematisch. Eine integrative Betrachtung und Analyse der im US-Signal enthaltenen Informationen, kombiniert mit der Auswertung der klinischen, histologischen und laborchemischen Veränderungen erscheint dabei eher Erfolg versprechend.

Weiterführende Versuche mit der Erhebung großer Mengen Messwerte verschiedener akustischer Gewebeparameter, wie Dämpfung, Frequenzanstieg des Dämpfungskoeffizienten, Streuung, Absorption, Schallgeschwindigkeit oder die Echotexturanalyse und deren komplexe Betrachtung unter möglichst gleichen Bedingungen könnten die diagnostische Wertigkeit der US-Gewebecharakterisierung verbessern. Außerdem könnten die so gewonnenen Ergebnisse dazu beitragen, das Problem der Vergleichbarkeit der akustischen Gewebeparameter mit histologischen oder auch klinischen Diagnosen zu lösen. Denn bis heute lassen sich sowohl mit den histologischen als auch mit den klinischen Diagnosen mit ihrer zum Teil erheblichen morphologischen Variabilität nur unzureichende Rückschlüsse auf die die akustischen Gewebeparameter beeinflussenden akustischen Gewebeeigenschaften ziehen. Es wäre daher notwendig, solche Gewebeparameter zu finden, die die akustischen Eigenschaften des Gewebes entscheidend bestimmen und diese dann in Beziehung zu den gewonnenen Messdaten zu setzen, um daraus bioakustische Differenzierungskriterien pathologischer Gewebeveränderungen ableiten zu können.

## **5. Zusammenfassung**

Die Ultraschalldiagnostik mit ihren kaum vorhandenen Nebenwirkungen hat sich insbesondere durch die Entwicklung hochauflösender Abbildungsverfahren in vielen Bereichen der Medizin als unentbehrliches Hilfsmittel bei der nichtinvasiven Untersuchung des menschlichen Körpers etabliert und ist heute nicht mehr aus dem klinischen Alltag wegzudenken. Trotz der ständig fortschreitenden Entwicklung neuer Technologien, verbesserter Wandlerysteme und erhöhter Datenverarbeitungskapazitäten ist die Aussagefähigkeit über diffuse Gewebeveränderungen bis heute noch nicht über eine qualitative hinausgegangen. Eine quantitative, sicher reproduzierbare Beurteilung von pathologisch verändertem Gewebe ermöglichen diese Technologien noch nicht. Deshalb wird in der Ultraschalldiagnostik nach weiteren Verfahren, die zur Gewebecharakterisierung genutzt werden können, gesucht.

Viel versprechende Ergebnisse lieferte dabei in den letzten Jahren die so genannte US-Gewebecharakterisierung, die auch als US-Spektroskopie bezeichnet wird. Hierbei werden die nach dem Durchlaufen des zu untersuchenden Gewebes gewonnenen hochfrequenten Ultraschallsignale, die über einen hohen spezifischen Informationsgehalt verfügen, genutzt. Diese im konventionellen B-Bildverfahren nur unzureichend aufgearbeiteten gewebespezifischen Informationen erlauben die Berechnung verschiedener akustischer Gewebeparameter, wie z. B. der frequenzabhängigen Dämpfung, des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten, des relativen Rückstreuungskoeffizienten und anderer.

Ziel dieser Arbeit war es, Informationen über die Nutzbarkeit der eben genannten akustischen Gewebeparameter zur qualitativen und quantitativen Gewebedifferenzierung zu erhalten. Dafür wurden die pathologisch veränderten Lebern von 35 durch tägliche Tetrachlorkohlenstoffapplikation behandelten bzw. die gesunden Lebern von 16 unbehandelten Wistar-Unilever-Ratten untersucht. Dabei diente die Leber als zentrales Stoffwechselorgan und größte Drüse des tierischen Körpers mit ihrer homogenen, regulären Gewebestruktur, an der pathologische Veränderungen induziert werden können, als ideales Versuchsobjekt.

Zur Erzeugung verschiedener morphologischer Lebergewebeveränderungen und damit auch verschiedener akustischer Gewebeeigenschaften wurde die in vielen vorausgegangenen Arbeiten histologisch und biochemisch ausführlichst untersuchte chronische CCl<sub>4</sub>-Intoxikation genutzt. Somit konnten neben der normalen Leber auch pathologische Leberveränderungen von der Fettleber über die Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose untersucht werden. Dabei erfolgte neben der histologischen Ge-



webeauswertung auch die Bestimmung der frequenzabhängigen Dämpfung, des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten und des relativen Rückstreuoeffizienten als akustische Gewebeparameter und der leberspezifischen Laborparameter Aspartat- und Alaninaminotransferase, Prothrombinzeit nach Quick, Antithrombin-III-, Albumin- und Bilirubinkonzentration.

Bei der Auswertung der histologischen Präparate bestätigte sich eindrucksvoll die schon in anderen Arbeiten beschriebene toxische Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffes auf das Leberparenchym: Während des Untersuchungszeitraumes konnten von der Fettleber über die Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose mit ihren jeweiligen strukturellen Besonderheiten alle Schädigungsstadien der chronischen  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation beobachtet werden. Eine Unterscheidung zwischen normalem und pathologisch verändertem Lebergewebe war problemlos möglich. Allerdings ist eine präzise, jederzeit reproduzierbare quantitative Einschätzung der Gewebeschädigung in hohem Maß von der Erfahrung des Untersuchenden abhängig. Nur durch die Untersuchungserweiterung mit Hilfe technisch und/oder zeitlich aufwendiger Methoden oder der Hinzuziehung verschiedener klinischer oder laborchemischer Parameter könnte dieses Ziel näherungsweise erreicht werden.

Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse der laborchemischen Untersuchungsparameter: Mit Ausnahme der Bilirubinkonzentration konnte mit allen in diesem Versuch bestimmten leberspezifischen Laborparametern eine Differenzierung zwischen normalen und pathologisch veränderten Lebergewebe erzielt werden. Aber auch hier war die Aussagekraft zur quantitativen Einschätzung dieser pathologischen Veränderungen nur unzureichend, ließe sich aber bei der komplexen Betrachtung aller Laborparameter und der Integration klinischer und histologischer Erkenntnisse deutlich erweitern.

Bei der Auswertung der Messergebnisse der frequenzabhängigen Dämpfung und des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten konnten verschiedene Erkenntnisse gewonnen werden: Zum einen wurde klar, dass in beiden der in diesen Versuch gebrauchten Bestimmungsmethoden zur Dämpfungsbestimmung, nämlich der Schmalband- und der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode, der Einfluss des Schallfeldes in dem im Versuch gewählten Messbereich von 45 bis 65  $\mu\text{s}$  bzw. 34 bis 48 mm zu vernachlässigen ist und damit ein unterschiedlicher Wandler-Phantom-Abstand keine messbare Rolle spielt. Des Weiteren musste festgestellt werden, dass sich in diesem Versuch, anders als in ähnlichen in der Literatur beschriebenen Versuchen, keine signifikante Unterscheidung zwischen gesundem und pathologisch verändertem Lebergewebe mittels des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizien-

ten oder der frequenzabhängigen Dämpfung erzielen ließ, weder mit der Schmalband- noch mit der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode. Außerdem bestätigte sich die auf Grund des störungsanfälligeren Messprinzips erwartete bessere Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode.

Als ein zur Unterscheidung von normalem und pathologischem Lebergewebe besser geeigneter akustischer Gewebeparameter stellte sich der relative Rückstreuoeffizient dar: Mit ihm war eine signifikante Differenzierung zwischen toxisch geschädigtem und gesundem Lebergewebe problemlos möglich. Deutlich wurde dabei auch die Frequenzabhängigkeit des relativen Rückstreuoeffizienten, die sich durch eine stetige Vergrößerung des Unterschiedes des relativen Rückstreuoeffizienten zwischen Vergleichs- und Versuchstieren bei zunehmender Wandlerfrequenz zeigte. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieses Versuches, dass auch mit Hilfe des relativen Rückstreuoeffizienten eine sicher reproduzierbare quantitative Charakterisierung der jeweiligen Erkrankungsstadien nur unzureichend möglich ist. Auch hier könnte eine integrative Betrachtung des relativen Rückstreuoeffizienten mit klinischen und histologischen Parametern zu einer präziseren Gewebedifferenzierung beitragen.

Der Grund für den mit zunehmender Leberschädigung einhergehenden Anstieg des relativen Rückstreuoeffizienten konnte nicht eindeutig erklärt werden und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Diese könnten auch dazu beitragen, bioakustische Differenzierungskriterien für pathologische Gewebeveränderungen zu definieren und somit das Problem der Vergleichbarkeit der akustischen Gewebeparameter mit histologischen und klinischen Diagnosen zu lösen, um damit die diagnostische Wertigkeit der US-Gewebecharakterisierung entscheidend zu erhöhen.

## Literaturverzeichnis

1. **Albano** E, Lott KAK, Slater TF, Stier A, Symons MCR, Tomasi A: Spin-trapping studies on the free radical products formed by metabolic activation of carbon tetrachloride in rat liver microsomal fractions, isolated hepatocytes and in vivo in the rat. *Biochem J* 204 (1982) 593-603
2. **Allison** JW, Barr LL, Massoth RJ, Berg GP, Krasner BH, Gara BS: Understanding the process of quantitative ultrasonic tissue characterization. *Radiographics* 14 (1994) 1099-1108
3. **Anderson** ME, Soo MSC, Trahey GE: In vivo breast tissue backscatter measurements with 7,5- and 10-MHz transducers. *Ultrasound Med Biol* 27 (2001) 75-81
4. **Arias** IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA: *The Liver. Biology and Pathobiology*. 2nd Edition. Raven Press, New York 1988
5. **Ashburn** LL, Endicott KM, Daft FS, Lillie RD: The monoportal distribution of the trabecula in the distary cirrhosis and in carbon tetrachloride of rats and guinea-pige. *Amer J Pathol* 23 (1947) 159-165
6. **Bamber** JC and Hill CR: Acoustic properties of normal and cancerous human liver - I Dependence on pathological condition. *Ultrasound Med Biol* 7 (1981a) 121-133
7. **Bamber** JC, Hill CR, King JA: Acoustic properties of normal and cancerous human liver - II Dependence on tissue structure. *Ultrasound Med Biol* 7 (1981b) 135-144
8. **Bamber** JC and Nassiri DK: Effect of gaseous inclusions on the frequency dependence of ultrasonic attenuation in liver. *Ultrasound Med Biol* 11 (1985) 293-298
9. **Becker** D, Strobel D, Hahn EG: Tissue Harmonic Imaging und Contrast Harmonic Imaging. *Internist* 41 (2000) 17-23
10. **Bornhöft** G: *Pathologie Kompakt*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, usw. (1997) 188-202

11. **Brattin** WJ, Pencil SD, Waller RL, Glende EA, Recknagel RO: Assessment of the role of calcium ion in halocarbon hepatotoxicity. *Environm Health Perspectives* 57 (1984) 321-323
12. **Browne** JE, Ramnarine KV, Watson AJ, Hoskins PR: Assessment of the acoustic properties of common tissue-mimicking test phantoms. *Ultrasound Med Biol* 29 (2003) 1053-1060
13. **Carstensen** EL: Absorption of sound in tissues. In: Linzer M (Ed.): Reprinted from *Ultrasonic Ultrasonic Tissue Characterization II*. NBS Special Publikation 525. U.S. Government Printing Office, Washington DC (1979)
14. **Chen** CF, Robinson DE, Wilson LS, Griffiths KA, Manoharan A, Doust BD: Clinical sound speed measurements in liver and spleen in vivo. *Ultrason Imaging* 9 (1987) 221-235
15. **Chen** Q and Zagzebski JA: Simulation study of effects of speed of sound and attenuation on ultrasound lateral resolution. *Ultrasound Med Biol* 30 (2004) 1297-1306
16. **Choudhry** S, Gorman B, Charboneau JW, Tradup DJ, Beck RJ, Kofler JM: Comparison of harmonic imaging and conventional ultrasound imaging in hepatocellular carcinoma. *Radiology* 209 (1999) 223-231
17. **Cloostermans** MJ and Thijssen JM: A beam corrected estimation of the frequency dependent attenuation of biological tissues from backscattered ultrasound. *Ultrasonic Imaging* 5 (1983) 136-147
18. **Cobet** U, Pfundner P, Walke M, Schultz M, Schrodter L: Determination of cell interaction forces in suspensions with ultrasonic scattering. *Ultrasonics Symposium 1995, Proceedings* 2 (1995) 1231-1234
19. **Coleman** DJ, Lizzi FL, Rondeau MJ, Silverman RH, Helson L, Torpey JH: A model for acoustic characterization of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 (1985) 545-550
20. **Coleman** DJ, Rondeau MJ, Silverman RH, Lizzi FL, McLean IW, Jakobiec FA: Correlations of acoustic tissue typing of malignant melanoma and histopathologic features as a predictor of death. *Am J Ophthalmol* 110 (1990) 380-388

21. **Coleman** DJ, Daly SW, Atencio A, Lloyd HO, Silverman RH: Ultrasonic evaluation of the vitreous and retina. *Semin Ophthalmol* 13 (1998) 210-218
22. **Coleman** DJ, Silverman RH, Chabi A, Rondeau MJ, Shung KK, Cannata J, Lincoff H: High-resolution ultrasonic imaging of the posterior segment. *Ophthalmology* 111 (2004) 1344-1351
23. **Connor** HD, Thurman RG, Galizi MD, Mason RP: The formation of a novel free radical metabolite from CCl<sub>4</sub> in the perfused rat liver and in vivo. *J Biol Chem* 261 (1986) 4542-4548
24. **Costongs** GMPJ, Jason PCW, Bas BM, Hermans J, van Wersch JWJ, Brombacher PJ: Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of clinical chemical laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 23 (1985) 7-16
25. **Davies** MJ and Slater TF: Electron spin resonance spin trapping studies on the photolytic generation of halocarbon radicals. *Chem Biol Interac* 58 (1986) 137-147
26. **Dawborn** IK, Ralston M, Weiden S: Acute carbon tetrachloride poisoning. *Brit Med J* 2 (1961) 493-494
27. **de Groot** H and Noll T: The crucial role of low steady state oxygen partial pressures in haloalkane free-radical mediated lipid peroxidation: possible implications in haloalkane liver injury. *Biochem Pharmacol* 35 (1986) 15-19
28. **Denk** H, Dienes HP, Trauner M: Leber und intrahepatische Gallenwege. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): *Pathologie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (2004) 755-798
29. **Dewhurst** CJ: The safety of ultrasound. *Proc R Soc Med* 64 (1971) 996-997
30. **Dianzani** MU and Poli G: Lipid peroxidation and haloalkylation in CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF (Hrsg): *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press Oxford (1985) 149-158
31. **Dolak** JA, Waller RL, Glende EA, Recknagel RO: Liver cell calcium homeostasis in carbon tetrachloride liver cell injury: new data with Fura2. *J Biochem Toxicol* 3 (1988) 329-342

32. **Dong** BW, Wang M, Xie K, Chen MH: In vivo measurements of frequency-dependent attenuation in tumors of the liver. *J Clin Ultrasound* 22 (1994) 167-174
33. **Drescher** T, Letterer H, Richter KP: Zur Gewebecharakterisierung der Leber mittels Ultraschallschwächung im Tierexperiment. *Ultraschall in Med* 11 (1990) 104-108
34. **Duck** FA: *Physical Properties of Tissue*. London: Academic Press Limited (1990)
35. **Dunn** F, Edmonds PD, Fry WJ: Absorption and dispersion of ultrasound in biological media. In: Schwan HP (Ed.): *Biological Engineering*. McGraw-Hill, New York (1969) ch. 3
36. **Ehler** R, Lutz H, Reichel L, Heyder N: Diagnostic value of sonography (B-scan) in the upper abdominal region. *Fortschr Med* 38 (1979) 1656-1662
37. **Fahimi** HD: Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat-storing cells: Structure and function. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (Hrsg): *The Liver. Biology and Pathobiology*. 1st Edition. Raven Press, New York (1982)
38. **Feleppa** EJ, Lizzi FL, Coleman DJ, Yaremko MM: Diagnostic spectrum analysis in ophthalmology: a physical perspective. *Ultrasound Med Biol* 12 (1986) 623-631
39. **Fernandez** G, Villaruel MC, De Toranzo EGD, Castro JA: Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products. *Res Commun Chem Pathol Pharm* 35 (1982) 283-290
40. **Fleig** WE: Reaktionsformen und Symptome der Leber. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg): *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (2003) 1259-1272
41. **Forni** LG, Packer JE, Slater TF, Wilson RL: Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study. *Chem Biol Interac* 45 (1983) 171-177

42. **French** LA, Wild JJ, Neal B: Detection of cerebral tumors by ultrasonic pulses: pilot studies on postmortem material. *Cancer* 3 (1950) 705-708
43. **Freese** M and Lyons EA: Ultrasonic backscatter from human liver tissue: Its dependence on frequency and protein/lipid composition. *J Clin Ultrasound* 5 (1977) 307-312
44. **Frizzel** LA, Carstensen EL, Davis JD: Ultrasonic absorption in liver tissue. *J Acoust Soc Am* 65 (1979) 1309-1312
45. **Gaitini** D, Baruch Y, Ghersin E, Veitsman E, Kerner H, Shalem B, Yaniv G, Sarfaty C, Azhari H: Feasibility study of ultrasonic fatty liver biopsy: Texture vs. attenuation and backscatter. *Ultrasound Med Biol* 30 (2004) 1321-1327
46. **Garra** BS, Insana MF, Shawker TH, Russell MA: Quantitative estimation of liver attenuation and echogenicity: normal state versus diffuse liver disease. *Radiology* 162 (1987) 61-67
47. **Garra** BS, Insana MF, Shawker TH, Wagner RF, Bradford M, Russell MA: Quantitative ultrasonic detection and classification of diffuse liver disease. Comparison with human observer performance. *Invest Radiol* 24 (1989) 196-203
48. **Garra** BS, Insana MF, Sesterhenn IA, Hall TJ, Wagner RF, Rotellar C, Winchester J, Zeman RK: Quantitative ultrasonic detection of parenchymal structural change in diffuse renal disease. *Invest Radiol* 29 (1994) 134-140
49. **Gärtner** T: Ultraschallspektroskopie mit fokussierenden Systemen zur quantitativen Bestimmung von akustischen Parametern. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
50. **Gärtner** T, Jenderka KV, Heynemann H, Cobet U: A Soundfield Correction Method by Means of Reference Phantoms in the Investigations of Acoustical Attenuation and Backscattering of Human Tissue. In: *Conference Proceedings 1996 IEEE Engineering in Med and Biol 18th Annual Intern. Conference.* (1996)
51. **Giersberg** H und Rietschel P: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere, Band II. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1986) 78-79

52. **Glende** EA and Pushpendran CK: Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 35 (1986) 3301-3307
53. **Gosink** BB, Lemon SK, Scheible W, Leopold GR: Accuracy of ultrasonography in diagnosis of hepatocellular disease. *AJR Am J Roentgenol* 133 (1979) 19-23
54. **Goss** SA, Frizzel LA, Dunn F: Ultrasonic absorption and attenuation in mammalian tissues. *Ultrasound Med Biol* 5 (1979) 181-186
55. **Goss** SA, Johnston RL, Frizzel LA, Dunn F: Dependence of ultrasonic properties of biological tissue on constituent proteins. *J Acoust Soc Amer* 67 (1980) 1041-1044
56. **Goss** SA and Dunn F: Ultrasonic propagation properties of collagen. *Phys Med Biol* 25 (1980) 827-837
57. **Hagemann** E und Schmidt G: Ratte und Maus - Versuchstiere in der Forschung. Walter de Gruyter & Co, Berlin (1960) 93-94
58. **Hartman** PC, Oosterveld BJ, Thijssen JM, Rosenbusch GJ, van Den BJ: Detection and differentiation of diffuse liver disease by quantitative echography. A retrospective assessment. *Invest Radiol* 28 (1993) 1-6
59. **Häussinger** D: Akutes Leberversagen. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg): *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (2003) 1293-1295
60. **Höhne** SO und Kälber, S: Untersuchungen von Abstandsparametern im Ultraschallrückstreuverfahren. Diplomarbeit, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1988)
61. **Hohmann** J, Skrok J, Puls R, Albrecht T: Characterization of focal liver lesions with contrast-enhanced low MI real time ultrasound and Sono Vue. *Rofo* 175 (2003) 835-843
62. **Hübner** K: Die formale Pathogenese als Einteilungsprinzip der Leberzirrhose. *Therapiewoche* 24 (1974) 3846-3859
63. **Insana** MF, Garra BS, Rosenthal SJ, Hall TJ: Quantitative ultrasonography. *Med Prog Technol* 15 (1989) 141-153



64. **Insana** MF and Hall TJ: Characterizing the microstructure of random media using ultrasound. *Phys Med Biol* 35 (1990) 1373-1386
65. **Jang** IK, Bouma BE, Kang DH, Park SJ, Park SW, Seung KB, Choi KB, Shishkov M, Schlendorf K, Pomerantsev E: Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography comparison with intravascular ultrasound. *J Am College Cardiology* 39 (2002) 604-609
66. **Jelkmann** W: Blut. In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2005) 510-537
67. **Jenderka** KV: Die Bestimmung akustischer Parameter aus rückgestreuten Ultraschallsignalen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1989)
68. **Jenderka** KV, Taute BM, Richter KP, Millner R: Ultraschall-Rückstreuung zur Charakterisierung von humanen Lebergewebe. In: Walser K (Hrsg.): *Ultraschalldiagnostik '90*. Springer, Berlin, Heidelberg (1991) 86-89
69. **Jenderka** KV, Gärtner T, Steinke T, Knaut M, Cobet U: Estimation of ischemic tolerance time of rat liver by ultrasonic spectroscopy investigations. *Proc. of the 1996 IEEE Ultrasonic Symposium*, vol. 2 of 2 (1997) 1599-1602
70. **Johnston** RL, Goss SA, Maynard V, Brady JK, Frizzel LA, O'Brien WD, Dunn F: Elements of tissue characterization, Part I. In: Linzer M (Ed.): *Ultrasonic Tissue Characterization II*. NBS Special Publication 525. U.S. Government Printing Office, Washington DC (1979) 19-27
71. **Joseph** AE, Dewbury KC, McGuire PG: Ultrasound in the detection of chronic liver disease (the "bright liver"). *Br J Radiol* 52 (1979) 184-188
72. **Joseph** AE, Saverymuttu SH, al Sam S, Cook MG, Maxwell JD: Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol* 43 (1991) 26-31
73. **Junqueira** LC, Schiebler TH, Schneider F: *Histologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (2000) 278-284
74. **Kahl** R: Leber. In: Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg): *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1997) 178-197

75. **Kämpfe** D: Histologische Untersuchungen zum pseudolobulären Leberumbau am Beispiel der chronischen Leberschädigung der Ratte durch Tetrachlorkohlenstoff. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1979)
76. **Kappus** H: Lipid peroxidation mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: Sies H (Hrsg): Oxidative Stress. Academic Press, New York (1985) 273-310
77. **Kappus** H: A survey of chemicals inducing lipid peroxidation. Chem Phys Lipids 45 (1987) 105-115
78. **Kappus** H: Reaktive Metaboliten und kovalente Bindung. In: Greim H, Deml E (Hrsg): Toxikologie: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1996) 87-105
79. **Krasner** BH, Garra BS, Mun SK: US tissue characterization workstation: applications and design. Radiographics 14 (1994) 1415-1422
80. **Kuc** R: Clinical application of ultrasound attenuation coefficient estimation technique for liver pathology characterization. IEEE Trans Biomed Eng 27 (1980) 312-319
81. **Kuc** R: Estimating acoustic attenuation from reflected ultrasound signals: Comparison of spectral-shift and spectral-difference approaches. IEEE Trans on Signal Processing 32 (1984) 1-6
82. **Landes** CA, Goral WA, Mack MG, Sader R: 3-D-sonography for diagnosis of osteoarthritis and disk degeneration of the temporomandibular joint, compared with MRI. Ultrasound Med Biol 32 (2006a) 627-632
83. **Landes** CA, Goral WA, Sader R, Mack MG: 3-D-sonography for diagnosis of disk dislocation of the temporomandibular joint, compared with MRI. Ultrasound Med Biol 32 (2006a) 633-639
84. **Layer** G, Zuna I, Lorenz A: Computerized ultrasound B-scan texture analysis of experimental fatty liver disease: Influence of total lipid content and fat deposit distribution. Ultrason Imaging 12 (1990) 171-188

85. **Li J**, Dong B, Yu X, Wang X, Li C: Grey-scale contrast enhancement in rabbit liver with Sono Vue™ at different doses. *Ultrasound Med Biol* 31 (2005) 185-190
86. **Lin LC**, Yen RF, Hwang JJ, Chiang FT, Tseng CD, Huang PJ: Ultrasonic tissue characterization evaluates myocardial viability and ischemia in patients with coronary artery disease. *Ultrasound Med Biol* 26 (2000) 759-769
87. **Lin T**, Ophir J, Potter G: Correlations of sound speed with tissue constituents in normal and diffuse liver disease. *Ultrason Imaging* 9 (1987) 29-40
88. **Lin T**, Ophir J, Potter G: Correlations of ultrasonic attenuation with pathologic fat and fibrosis in liver disease. *Ultrasound Med Biol* 14 (1988) 729-734
89. **Lizzi FL**, Greenebaum M, Feleppa EJ, Elbaum M, Coleman DJ: Theoretical framework for spectrum analysis in ultrasonic tissue characterization. *J Acoust Soc Am* 73 (1983) 1366-1373
90. **Lowrey K**, Glende EA, Recknagel RO: Destruction of microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride or bromotrichloromethane. *Biochem Pharmacol* 30 (1981) 135-140
91. **Lu ZF**, Zagzebski JA, O'Brien RT, Steinberg H: Ultrasound attenuation and backscatter in the liver during prednisone administration. *Ultrasound Med Biol* 23 (1997) 1-8
92. **Lu ZF**, Zagzebski JA, Lee FT: Ultrasound backscatter and attenuation in human liver with diffuse disease. *Ultrasound Med Biol* 25 (1999) 1047-1054
93. **Lutz HL**, Reichel L, Mayer P: Stellenwert der Ultraschalldiagnostik bei Lebererkrankungen. *Kinderarzt* 7 (1979) 533-541
94. **Madsen EL**, Zagzebski JA, Banjavic RA, Jutila RE: Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. *Medical Physics* (1978) 391-394
95. **Madsen EL**, Zagzebski JA, Frank G: Oil-in-gelantine dispersions for use as ultrasonically tissue-mimicking materials. *Ultrasound Med Biol* 3 (1982) 277-287
96. **Mailloux GE**, Bertrand M, Stampfler R, Ethier S: Texture analysis of ultrasound B-mode images by segmentation. *Ultrason Imaging* 6 (1984) 262-277

97. **Mammen** EF: Coagulation abnormalities in liver disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 6 (1992) 1247-1257
98. **Mammen** EF: Clinical relevance of antithrombin deficiencies. *Sem Hematol* 32 (1995) 2-6
99. **Manno** M, de Matteis F, King LJ: The mechanism of the suicidal, reductive inactivation of microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 37 (1988) 1981-1990
100. **Manno** M, King LJ, de Matteis F: The degradation of haem by carbon tetrachloride: metabolic activation requires a free axial coordination site on the haem iron and electron donation. *Xenobiotica* 19 (1989) 1023-1035
101. **Manno** M, Ferrara R, Cazzaro S, Rigotti P, Ancona E: Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane in vitro. *Pharmacology & Toxicologie* 70 (1992) 13-18
102. **Maruvada** S, Shung KK, Wang SH: High-frequency backscatter and attenuation measurements of selected bovine tissue between 10 and 30 MHz. *Ultrasound Med Biol* 26 (2000) 1043-1049
103. **Matsushashi** T, Yamada N, Shinzawa H, Takahashi T: An evaluation of hepatic ultrasound speed in injury models in rats. *J Ultrasound Med* 15 (1996) 563-570
104. **McLean** EK: An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Path* 50 (1969) 502-511
105. **Meyberg-Solomayer** GC, Kraemer B, Bergmann A, Kraemer E, Krainick U, Wallwiener D, Solomayer EF: Does 3-D-sonography bring any advantage to noninvasive breast diagnostics? *Ultrasound Med Biol* 30 (2004) 583-589
106. **Meziri** M, Pereira WCA, Abdelwahab A, Degott C, Laugier P: In vitro chronic hepatic disease characterization with a multiparametric ultrasonic approach. *Ultrasonics* 43 (2005) 305-313
107. **Mimbs** JW, O'Donnel M, Miller JG, Sobel BE: Changes in ultrasonic attenuation indicative of early myocardial ischemic injury. *Am J Physiol* 236 (1979) 340-344

108. **Mörlein** D, Rosner F, Brand S, Jenderka KV, Wicke M: Non-destructive estimation of the intramuscular fat content of the longissimus muscle of pigs by means of spectral analysis of ultrasound echo signals. *Meat Science* 69 (2005) 187-199
109. **Nguyen** CT, Hall CS, Scott MJ, Zhu Q, Marsh J, Wickline SA: Age-related alterations of cardiac tissue microstructure and material properties in Fischer 344 rats. *Ultrasound Med Biol* 27 (2001) 611-619
110. **Nielsen** PK, Jensen BR, Darvann T, Jorgensen K, Bakke M: Quantitative ultrasound image analysis of the supraspinatus muscle. *Clin Biomechanics* 15 (2000) 13-16
111. **O'Brien** RT, Zagzebski JA, Lu ZF, Steinberg H: Measurement of acoustic backscatter and attenuation in the liver of dogs with experimentally induced steroid hepatopathy. *Am J Vet Res* 57 (1996) 1690-1694
112. **O'Donnell** M, Mimbs JW, Miller JG: The relationship between collagen and ultrasonic attenuation in myocardial tissue. *J Acoust Soc Am* 65 (1979) 512-517
113. **Oelze** ML and O'Brien WD Jr.: Method of improved scatterer size estimation and application to parametric imaging using ultrasound. *J Acoust Soc Amer* 112 (2002) 3053-3063
114. **Ophir** J, Maklad NF, Bigelow RH: Ultrasonic attenuation measurements of in vivo human muscle: *Ultrason Imaging* 4 (1982) 290-295
115. **Ophir** J, Shawker TH, Maklad NF, Miller JG, Flax SW, Narayana PA, Jones JP: Attenuation estimation in reflection: progress and prospects: *Ultrason Imaging* 6 (1984) 349-395
116. **Ossant** F, Lebertre M, Pourcelot L, Patat F: Ultrasonic characterization of maturation of fetal lung microstructure: an animal study. *Ultrasound Med Biol* 27 (2001) 157-169
117. **Parker** KJ and Tuthill TA: Carbon tetrachloride induced changes in ultrasonic properties of liver. *IEEE Trans Biomed Eng BME-33*, No. 4 (1986) 453-460
118. **Parker** KJ, Tuthill TA, Baggs RB: The role of glycogen and phosphate in ultrasonic attenuation of liver. *J Acoust Soc Am* 83 (1988) 374-378

119. **Poli G**, Albano E, Biasi F, Cecchini G, Carini R, Bellomo G, Dianzani MU: Lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or iron and hepatocyte death: protective effect of vitamin E. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF (Hrsg): Free Radicals in Liver Injury. IRL Press, Oxford (1985) 207-215
120. **Poli G**, Albano E, Dianzani MU: The role of lipid peroxidation in liver damage. Chem Phys Lipids 45 (1987) 117-142
121. **Popper H** und Schaffner F: Die Leber. Struktur und Funktion. Thieme, Stuttgart (1961) 451-459
122. **Raab K**, Schilling H, Wermke M, Wünsche A: Videodensitometrie des Ultraschallsonogramms zur Gewebedifferenzierung der Leber. Radiol Diagn 23 (1982) 127-134
123. **Raeth U**, Schlaps D, Limberg B, Zuna I, Lorenz A, van Kaick G, Lorenz WJ, Kommerell B: Diagnostic Accuracy of Computerized B-Scan Texture Analysis and Conventional Ultrasonography in Diffuse Parenchymal and Malignant Liver Disease. J Clin Ultrasound 13 (1985) 87-99
124. **Raju BI** and Srinivasan MA: High-frequency ultrasonic attenuation and backscatter coefficients of in vivo normal human dermis and subcutaneous fat. Ultrasound Med Biol 27 (2001) 1543-1556
125. **Rappaport AM**, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Anat Rec 119 (1954) 11-33
126. **Rappaport AM**: Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur. Klin Wschr 38 (1960) 561-577
127. **Rappaport AM**: Hepatic blood flow: Morphologic aspects and physiologic regulation. Internat Rev Physiol 21 (1980) 1-63
128. **Rayleigh JWS**: On the light from the sky: Ist polarization and colour appendix. Philosophical Magazine 41 (1871) 77, 274
129. **Recknagel RO**, Lombardi B, Schotz MC: A new insight into pathogenesis of carbon tetrachloride fat infiltration. Proc Soc Exp Biol Med 104 (1960) 608-610

130. **Recknagel** RO: Minireview: a new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci* 33 (1983) 401-408
131. **Recknagel** RO and Glende EA: The carbon tetrachloride hepatotoxicity model: Free radicals and calcium homeostasis. In: Miguel T, Quintanilha T, Weber H (Hrsg): *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, vol III. CRC Press, Boca Raton (1989) 3-16
132. **Recknagel** RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL: Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43 (1989) 139-154
133. **Rettenmaier** G: *Quantitative Auswertung bei diffusen Leberkrankheiten*. Thieme Copythek Nr. ISBN 3 13550801 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1977)
134. **Robinson** DE: Tissue Characterisation. *Proceed. WFUMB Melbourne* (1985) 36-39
135. **Roters** S: *Ultraschallbiomikroskopie in der augenheilkundlichen Diagnostik*. *Deutsches Ärzteblatt* 38 (2001) 2443-2447
136. **Sandritter** W und Beneke G: *Allgemeine Pathologie*. Schattauer, Stuttgart (1974)
137. **Sandford** NL, Walsh P, Matis C, Baddeley H, Powell LW: Is ultrasonography useful in the assessment of diffuse parenchymal liver disease? *Gastroenterology* 89 (1985) 186-191
138. **Schmidt** E und Schmidt FW: Modell Lebererkrankungen. In: Lang H, Rick W, Büttner H (Hrsg): *Validität klinisch-chemischer Befunde*. Springer, Heidelberg (1979) 92
139. **Schmidt** E und Schmidt FW: Diagnostik des Ikterus. *Dtsch Med Wschr* 109 (1984) 139-146
140. **Sevanian** A and Hochstein P: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 5 (1985) 365-390
141. **Sherlock** S: *Diseases of the liver and biliary system*. 8th ed. Oxford: Blackwell Scientific (1989)

142. **Shimada** Y, Courtney BK, Nakamura M, Hongo Y, Sonoda S, Hassan AHM, Yock PG, Honda Y, Fitzgerald PJ: Intravascular ultrasonic analysis of atherosclerotic vessel remodeling and plaque distribution of stenotic left anterior descending coronary arterial bifurcation lesions upstream and downstream of the side branch. *Am J Cardiology* 98 (2006) 193-196
143. **Smuckler** EA, Iseri OA, Benditt EP: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. *J Exp Med* 116 (1962) 55-71
144. **Sommer** FG, Joynt LF, Hayes DL, Macovski A: Stochastic frequency-domain tissue characterization: application to human spleens "in vivo". *Ultrasonics* 20 (1982) 82-86
145. **Sommer** FG, Gregory PB, Fellingham LL, Stern RA, Nassi M, Weissberg J, Solomon H: Measurement of attenuation and scatterer spacing in human liver tissue. *J Ultrasound Med* 3 (1984) 557-561
146. **Strobel** D, Raeker S, Martus P, Hahn EG, Becker D: Phase inversion harmonic imaging versus contrast-enhanced power Doppler sonography for the characterization of focal liver lesions. *Int J Colorectal Dis* 18 (2003) 63-72
147. **Suchman** AL and Griner PL: Diagnostic uses of activated partial thromboplastin time and prothrombin time. *Ann Intern Med* 104 (1986) 810-816
148. **Suzuki** K, Hayashi N, Sasaki Y, Kono M; Kasahara A, Fusamoto H, Imai Y, Kamada T: Dependence of ultrasonic attenuation of liver on pathologic fat and fibrosis: examination with experimental fatty liver and liver fibrosis models. *Ultrasound Med Biol* 18 (1992) 657-666
149. **Szende** B, Lapis K, Timar J, Schaff Z, Simon K, Jeney A, Divald A, Paku S, Timar F: Glycosaminoglycan containing fat-storing cells in hepatic fibrogenesis. *Acta-Morphol-Hung* 36 (1988) 241-251
150. **Tanuma** YT, Ito T, Shibasaki S: Further electronmicroscope studies on the human hepatic sinusoidal wall with special reference to the fat-storing cell. *Arch Histol Jap* 45 (1982) 263-274



151. **Taylor** KJ, Riely CA, Hammers L, Flax S, Weltin G, Garcia-Tsao G, Conn HO, Kuc R, Barwick KW: Quantitative US attenuation in normal liver and in patients with diffuse liver disease: importance of fat. *Radiology* 160 (1986) 65-71
152. **Tervola** KMU, Gummer MA, Erdmann JW, O'Brien WD: Ultrasonic attenuation and velocity properties in rat liver as a function of fat concentration. *J Acoust Soc Am* 77 (1985) 307-313
153. **Thomas** L: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST). In: Thomas L (Hrsg.): Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main (2000a) 56-67
154. **Thomas** L: Glutamat-Dehydrogenase (GLDH). In: Thomas L (Hrsg.): Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main (2000b) 89-91
155. **Tomasi** A, Albano E, Banni S, Botti B, Corongin F, Dessi MA, Iannone A, Vanini V, Dianzani MU: Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria: study of the mechanism of action. *Biochem J* 246 (1987) 313-317
156. **Tuthill** TA, Baggs RB, Parker KJ: Liver glycogen and water storage: Effect on ultrasound attenuation. *Ultrasound Med Biol* 15 (1989) 621-627
157. **Ungar** H: Transformation of the hepatic vasculature of rats following protracted experimental poisoning with carbon tetrachloride. Its possible relation to the formation of urate calculi in the urinary tract. *Amer J Pathol* 27 (1951) 871-879
158. **Ungemach** FR: Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A<sub>2</sub>. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF (Hrsg): Free Radicals in Liver Injury. IRL Press, Oxford (1985) 127-134
159. **Vaupel** P: Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg.): Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2005) 838-887
160. **von Herbay** A und Strohmeyer G: Die erhöhte  $\gamma$ -GT ( $\gamma$ -Glutamyltransferase). *Dtsch Med Wschr* 119 (1994) 1041-1044

161. **von Herbay** A, Vogt C, Willers R, Haussinger D: Realtime imaging with the sonographic contrast agent Sono Vue: differentiation between benign and malignant hepatic lesions. *J Ultrasound Med* 23 (2004) 1557-1568
162. **Waag** RC, Lee PPK, Persson HW, Schenk EA, Gramiak R: Frequency dependent angle scattering of ultrasound by liver. *J Acoust Soc Amer* 72 (1982) 343-352
163. **Wagner** C und Dati F: Fibrinogen. In: Thomas L (Hrsg.): Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main (2000a) 624-626
164. **Wagner** C und Dati F: Thromboplastinzeit. In: Thomas L (Hrsg.): Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main (2000b) 613-616
165. **Watts** PL, Hall AJ, Fleming JEE: Ultrasound and chromosome damage. *Br J Radiol* 45 (1972) 335-339
166. **Wear** KA, Stuber AP, Reynolds JC: Relationships of ultrasonic backscatter with ultrasonic attenuation, sound speed and bone mineral density in human calcaneus. *Ultrasound Med Biol* 26 (2000) 1311-1316
167. **Whicher** J and Spence C: When is serum albumin worth measuring? *Ann Clin Biochem* 24 (1987) 572-580
168. **Widmann** JJ, Cotran RS, Fahimi HD: Mononuclear phagocytes and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoides by endogenous peroxidase activity. *J Cell Biol* 52 (1972) 159-170
169. **Wladimiroff** JW, Craft IL, Talbert DG: In vitro measurements of sound velocity in human fetal brain tissue. *Ultrasound Med Biol* 1 (1975) 377-382
170. **Worthington** AE and Sherar MD: Changes in ultrasound properties of porcine kidney tissue during heating. *Ultrasound Med Biol* 27 (2001) 673-682
171. **Worthington** AE, Trachtenberg J, Sherar MD: Ultrasound properties of human prostate tissue during heating. *Ultrasound Med Biol* 28 (2002) 1311-1318
172. **Wu** CC, Liu YB, Lin LC, Ho YL, Liao CS, Lee YT: Ultrasonic tissue characterization with integrated backscatter during inotropic stimulation. *Ultrasound Med Biol* 26 (2000) 1413-1420

173. **Wu** EX, Goodsitt MM, Madsen EL: Microscopic mechanism of attenuation of compressional ultrasonic waves in tissue-mimicking phantom materials. *Ultrasound Imaging* 14 (1992) 121-133

## **Thesen der Dissertation**

1. Die Aussagefähigkeit moderner, in der Medizin genutzter Ultraschallabbildungsverfahren über diffuse Gewebeveränderungen ist bis heute noch nicht über eine qualitative hinausgegangen. Eine quantitative, sicher reproduzierbare Beurteilung von pathologisch verändertem Gewebe ermöglichen diese Technologien noch nicht.
2. Die in den letzten Jahrzehnten zunehmend untersuchte Ultraschallgewebecharakterisierung, die auch als Ultraschallspektroskopie bezeichnet wird, nutzt den im konventionellen B-Bild-Verfahren nur unzureichend aufgearbeiteten hohen gewebespezifischen Informationsgehalt zur Berechnung verschiedener akustischer Gewebeparameter, wie z. B. der frequenzabhängigen Dämpfung, des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten, des relativen Rückstreukoeffizienten und anderer.
3. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzbarkeit dieser akustischen Gewebeparameter zur qualitativen und quantitativen Gewebedifferenzierung der Lebern 35 durch chronische Tetrachlorkohlenstoffapplikation erkrankter und 16 gesunder Ratten untersucht. Außerdem erfolgte die Bestimmung verschiedener laborchemischer, leberspezifischer Laborparameter und die histopathologische Aufarbeitung der Lebern.
4. Die chronische Tetrachlorkohlenstoffintoxikation führte zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen des Leberparenchyms. Während des elfwöchigen Untersuchungszeitraumes konnten von der Fettleber über die Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose alle bekannten Schädigungsstadien der chronischen Tetrachlorkohlenstoffintoxikation beobachtet werden.
5. Eine Unterscheidung zwischen normalem und pathologisch verändertem Lebergewebe ist durch die histopathologische Aufarbeitung problemlos möglich. Allerdings ist eine präzise, jederzeit reproduzierbare quantitative Einschätzung der Gewebeschädigung im hohen Maße von der Erfahrung des Untersuchenden abhängig und nur durch die Untersuchungserweiterung mit Hilfe technisch und/oder zeitlich aufwendiger Methoden bzw. der Hinzuziehung verschiedener klinischer oder laborchemischer Parameter annähernd erreichbar.

6. Mit Hilfe der leberspezifischen Laborparameter Aspartat- und Alaninaminotransferase, Prothrombinzeit nach Quick, Antithrombin-III, Albumin und Bilirubin ist eine Differenzierung zwischen normalem und pathologisch verändertem Lebergewebe möglich. Aber auch hier ist die quantitative Einschätzung dieser pathologischen Veränderungen nur unzureichend, ließe sich aber bei der komplexen Betrachtung aller Laborparameter und der Integration klinischer und histologischer Erkenntnisse deutlich erweitern.
7. Bei der Bestimmung der frequenzabhängigen Dämpfung spielt ein unterschiedlicher Wandler-Phantom-Abstand sowohl in der Schmalband- als auch in der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode keine messbare Rolle. Dabei ist die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse der modifizierten Spektrum-Differenz-Methode auf Grund des störunanfälligeren Messprinzips besser als die der Schmalbandmethode.
8. Eine signifikante Unterscheidung zwischen gesundem und pathologisch verändertem Lebergewebe ist mit Hilfe des Frequenzanstieges des Dämpfungskoeffizienten oder der frequenzabhängigen Dämpfung nicht möglich.
9. Mit Hilfe des frequenzabhängigen relativen Rückstreukoeffizienten ist eine signifikante Differenzierung zwischen toxisch geschädigtem und gesundem Lebergewebe möglich. Die sicher reproduzierbare, quantitative Charakterisierung verschiedener Parenchymveränderungen ist dabei aber nur unzureichend.
10. Umfangreiche Nachfolgeversuche könnten dazu beitragen, bioakustische Differenzierungskriterien für pathologische Gewebeveränderungen zu definieren und somit das Problem der Vergleichbarkeit der akustischen Gewebeparameter mit histologischen und klinischen Diagnosen zu lösen, um damit die diagnostische Wertigkeit der Ultraschall-Gewebecharakterisierung entscheidend zu erhöhen.

## **Angaben zur Person**

Name: Lars Köthe  
Geburtsdatum: 15.12.1974  
Geburtsort: Merseburg  
Familienstand: verheiratet

## **Schulbildung**

1981-1985: Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Merseburg  
1985-1990: Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Bad Lauchstädt  
1990-1991: Spezialklassen der TH "Carl Schorlemmer" Leuna-Merseburg  
1991-1993: Domgymnasium in Merseburg

## **Wehrdienst**

1993-1994: Grundwehrdienst bei der Bundeswehr

## **Studium**

1995-2002: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Arzt im Praktikum**

2003-2005: Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Assistenzarzt**

seit 2005: Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Bad Lauchstädt, den 27. Oktober 2006

## **Eidesstattliche Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die hier vorliegende Dissertation selbst verfasst und nur die von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen benutzt zu haben.

Lars Köthe

## Publikation von Ergebnissen dieser Dissertation

**Köthe** L, Wolff I, Schneider I, Pankow D, Jenderka KV: In vitro ultrasound attenuation and relative backscatter in the rat liver during carbon tetrachloride administration. In: Conference Proceedings 2002 IEEE Ultrasonics Symposium (2002) 1290-1293

Jenderka KV and **Köthe** L: Ultrasound attenuation and relative backscatter estimations in the rat liver during carbon tetrachloride administration. Ultrasound Med Biol 29 (2003) 97-98



## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation der erste Versuch zur Erlangung des Grades Dr. med. ist.

Lars Köthe

## Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Radke für die prompte und unkomplizierte Übernahme und Weiterbetreuung dieser Arbeit nach dem unerwarteten Tod von Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Cobet, der mir dieses Thema überließ.

Hervorzuheben ist die langjährige, enge und freundschaftliche Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. K.-V. Jenderka, dessen beständige, vielseitige und fördernde Unterstützung ganz wesentlich zum Gesamtergebnis dieser Arbeit beigetragen haben. Hierfür möchte ich mich noch einmal ganz herzlich bedanken.

Das erfolgreiche Gelingen eines solch umfangreichen Projektes ist ganz entscheidend von der praktischen Hilfe und umfangreichen Beratung vieler Kollegen der dieses Thema streifenden Fachbereiche abhängig. Für ihre großzügige und verständnisvolle Unterstützung bin ich dabei vor allem Herrn Prof. Dr. med. habil. H.-J. Holzhausen, Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. D. Pankow, Frau Dr. med. I. Schneider, Frau Dr. rer. nat. I. Wolff und Frau H. Grygier zu großem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Dr. sc. hum. O. Kuss für die ausführliche statistische Beratung.

Für das Korrekturlesen des Manuskriptes bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. T. Clausen und Herrn Dr. med. D. Henze.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Frau und meinem Bruder, die mir jederzeit aufmunternd und hilfreich zur Seite standen und ohne deren ständige Unterstützung die erfolgreiche Umsetzung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre.