

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 Material

Für die vorliegende Studie wurden elf menschliche Embryonen und Feten unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht. Die Embryonen und Feten stammen zum einen aus der Sammlung Prof. Dr. R. J. Radlanski, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Abteilung für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und zum anderen aus der University of Turku, dental school, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Kristina Heikinheimo¹⁷. Die Präparate waren äußerlich unversehrt und zeigten keinerlei Anzeichen von Missbildungen. Sie stammen von legalen oder spontanen Schwangerschaftsabbrüchen.

Die Scheitel-Steiß-Länge (SSL)¹⁸ der Embryonen und Feten lag bei 19 bis 150 mm, was einem Alter von 7 bis 18 Wochen entspricht.

Tabelle 4 gibt eine Aufstellung aller bearbeiteten Embryonen und Feten mit Angaben zum jeweiligen Stand der Entwicklung, geordnet nach mm Scheitel-Steiß-Länge (SSL).

Katalognummer	Sammlung	SSL (mm)	Schnittrichtung	Alter (Wochen)	3D
CHR 220687	Radlanski	19	SAG	7	x
EMM 150787	Radlanski	22	SAG	7	x
JOS 080289	Radlanski	25	HOR	8	x
T61	Heikinheimo	30	HOR	8	x
KUR 030389	Radlanski	41	HOR	9	
HAN 040389	Radlanski	53	SAG	9	x
THE 230494	Radlanski	54	HOR	9	x
ART 270694	Radlanski	68	HOR	10	
DES 200597	Radlanski	87	HOR	12	x
HUL 110589	Radlanski	117	FRO	14	
T26	Heikinheimo	150	SAG	18	x

Tab. 4 Untersuchte Präparate der verschiedenen Entwicklungsstadien, in mm SSL, mit Benennung der Schnittrichtung parallel zur Frontal-, Sagittal- oder Horizontalebene und mit Angabe der 3D-Rekonstruktion

¹⁷ Gefördert durch COST action B23.

¹⁸ Die SSL wird vom Scheitel bis zum Mittelpunkt zwischen beiden Gesäßerhebungen gemessen (LANGMANN 1989). Für die Embryonalperiode wurde die SSL-abhängige Altersbestimmung nach HINRICHSSEN (1990) verwendet, für die Fetalperiode die nach MOORE (1985).

Die Embryonen und Feten liegen als histologische Schnittserien vor, sowohl in frontaler, sagittaler als auch horizontaler Schnittrichtung.

Die Grenze zwischen Embryo und Fetus wurde nach SPERBER 1976, MOORE 1985 und LANGMANN 1989 zwischen der 8. und 9. Woche gezogen.

Für die Anfertigung der histologischen Schnittserien wurden die Embryonen und Feten zunächst in Bouin'scher Lösung (71% gesättigte Pikrinsäure, 24% Formalin 37%ig, 5% Eisessig) fixiert und durch Alkohol mit steigender Konzentration bis zu 100% dehydriert (ROMEIS 1989). Je nach Volumen der Objekte erfolgte die Entkalkung mit RDO-Schnellentkalker (Eurobio S.A., Paris; France, Vertrieb: Pharmacia Labor & Medizin, Ratingen) und EDTA für zwei bis dreißig Tage. Anschließend wurden die Präparate nach Standardverfahren in Paraffin eingebettet und in horizontale, frontale oder sagittale Serien von 10 µm Dicke mittels Mikrotom geschnitten (Leica, Reichert-Jung RM 2065).

Die Standardfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin (H. E.). Einige ausgesuchte Schnitte wurden zusätzlich mit der Trichrom, Elastica-Trichrom (modifizierten Masson-Goldner Färbung mit Anilinblau), Trap, Azan, Domagk (Modifikation nach van Giesson) und Feulgen versehen.

3.2 Rekonstruktionstechnik

Die zu rekonstruierenden anatomischen Strukturen der Schnittserien wurden mit dem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) differenziert und mit 2,5- bis 4-facher Vergrößerung dargestellt. Bei vier Serien wurden die verschiedenen Gewebkonturen der einzelnen Schnitte mittels eines integrierten Zeichenspiegels auf Transparentpapier übertragen und anschließend auf einem Lichtkasten anhand charakteristischer anatomischer Merkmale aligniert¹⁹ (GAUNT und GAUNT 1978, RADLANSKI und JÄGER 1992).

Die Farbwahl für die verschiedenen anatomischen Strukturen, die auch für die grafische 3D-Rekonstruktion übernommen wurde, richtete sich nach den Vorschlägen von BLECHSCHMIDT (1963).

¹⁹ Alignieren ist die relative Ausrichtung der Bildebenen zueinander (SOFT IMAGING SYSTEM GmbH [SIS], 2000).

Anatomische Struktur	Farbe	Anatomische Struktur	Farbe
Arterien	Red	Meckel'scher Knorpel	Light Blue
Ligament	Light Blue	Membrana tympani	Grey
Bulbus	Light Blue	Mesenchym	Purple
Drüsen	Dark Green	Muskeln allgemein ²⁰	Orange
Haut	Light Brown	Nerven allgemein	Yellow
Incus	Light Blue	Os hyoideum	Blue
Knochen	Light Brown	Processus styloideus	Light Blue
Larynx	Blue	Schädelbasis	Light Blue
Lingua	Red	Stapes	Dark Blue
Lens	Black	Tuba auditiva	Grey

Tab. 5 Farbmodell für die 3D-Darstellung der Embryonen und Feten

Danach wurden die auf Transparentpapier übertragenen histologischen Schnitte eingescannt und unter Verwendung der Software AnalySIS[®] (SOFT IMAGING SYSTEM GmbH [SIS], Münster, Deutschland) ins Dreidimensionale projiziert.

AnalySIS[®] basiert auf einem Triangulationsverfahren zur Oberflächenrekonstruktion, wodurch das Anfertigen manueller anatomischer Zeichnungen nicht mehr nötig ist.

Weitere vier Serien wurden direkt mit einer Digitalkamera fotografiert und die Gewebkonturen der digitalisierten mikroskopischen Bilder am Computer nachgezeichnet, auch das Alignieren fand hier direkt manuell am Computer statt.

Durch die mikroskopische Aufnahme mehrerer Bilder bei hoher Vergrößerung ist es nun möglich auch größere Feten darzustellen, mit Hilfe des Multiple Image Alignment (MIA) werden die Bilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Auch diese vier Schnittserien wurden mit Hilfe der Software AnalySIS[®] in 3D rekonstruiert.

Somit können nun durch die dreidimensionale Darstellung morphologisch bedeutsame Wachstumsvorgänge und der Verlauf einzelner anatomischer Strukturen unabhängig von der Schnittrichtung aus jeder Perspektive betrachtet und untersucht werden.

²⁰ Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich in den folgenden Abbildungen Modifikationen innerhalb des Farbtone für die einzelnen unterschiedlichen Muskeln und Nerven wie auch schon bei den Knorpeln dargestellt.