

Diplomarbeit

**Etablierung einer Gewebebank mit stereologisch
präparierten Spenderlungen**

eingereicht von

Jakob Antonius Legat

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Elvira Stacher-Priehse
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Philipp Stiegler

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 17.11.2016

Jakob Antonius Legat eh.

Danksagungen

Meine Danksagung gilt Frau Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Elvira Stacher-Priehse, welche mich den ganzen Prozess der Diplomarbeit über immer hilfsbereit, tatkräftig und komplikationslos unterstützt hat.

Auch danke ich Herrn Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Philipp Stiegler und dem gesamten Team der Klinischen Abteilung für Transplantationschirurgie der Medizinischen Universität Graz für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Entnahme der Spenderlungen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Schwiegereltern, meiner Frau und meinem Kind, welche im Studium und in allen anderen Dingen immer hinter mir stehen und mich bestmöglich unterstützen.

Zusammenfassung

Hintergrund: Biopsien spielen im heutigen klinischen Alltag eine große diagnostische Rolle bei vielen verschiedenen Organen. Sie repräsentieren jedoch nur einen kleinen Ausschnitt der untersuchten Zielstruktur. Wie geht man jedoch vor, wenn man ein Organ als Ganzes beurteilen möchte? Wie gibt man jedem Teil des Organes die gleiche Chance, dass eine Probe entnommen wird? Wie kann man quantitative Informationen von 3-dimensionalen Strukturen aus 2-dimensionalen Messungen unter dem Mikroskop gewinnen? Die Stereologie, eine auf stochastischer Geometrie basierende mathematische Methode, kann all die oben stehenden Fragen lösen.

Ziel: Ziel dieser Diplomarbeit ist es die Etablierung der Gewebebank mit stereologisch präparierten Spenderlungen auf dem Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz zu beschreiben. Es werden dazu die mathematischen Grundlagen und theoretischen Arbeitsschritte der Stereologie anhand der Lunge erklärt, um die praktische Umsetzung dieser Methode für eine eigens etablierte Gewebebank nachvollzogen werden. Zudem wird das Transplantationswesen in Österreich erläutert, da die Lungen von Organspenderinnen und Organspendern entnommen worden sind.

Methoden: 10 Spenderlungen, welche bei Eurotransplant nicht alloziert werden konnten, wurden durch die Methode der Stereologie präpariert. Diese Gewebeproben werden asserviert und sollen für zukünftige komparative morphologische Studien als Kontrollgewebe „Lungengesunder“ dienen.

Schlussfolgerung: Stereologie als Methode gibt die Möglichkeit, ein Organ als Ganzes ohne Bias zu erfassen und zu beurteilen. Die stereologisch präparierten Spenderlungen in der neu etablierten Gewebebank sollen in Zukunft als „gesunde und normale“ Kontrollgruppe dienen. In weiteren Forschungsprojekten sollen pathologisch veränderte Lungen durch die gleichen stereologischen Methoden wie die „gesunden“ Spenderlungen präpariert und mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Man hofft auf diese Weise neue Erkenntnisse in Bezug auf Pathomechanismen verschiedenster Lungenerkrankungen zu gewinnen und eventuell in Zukunft bessere Therapieansätze anbieten zu können.

Abstract

Background: Biopsies have a very important diagnostic role in the clinical daily routine. However they usually represent just a small part of the structure of interest. But what if we wish to assess a whole organ? How is it feasible to give every part of the organ the exactly same chance to be sampled? How can quantitative information of 3-dimensional structures be gained of 2-dimensional measurements under the microscope? Stereology, a mathematical method based on stochastic geometry can solve all these questions.

Aim: The aim of this thesis is the description of the establishing of a tissue bank with stereologically sampled lungs derived from organ donors at the Institute of Pathology at the Medical University of Graz. First, the mathematical basics and the theory behind stereology are described on the basis of the lung. Thus the practical implementation of the method in the tissue bank can be traced. In addition, the legal situation concerning organ transplantation in Austria is explained as the lungs were been taken from donors.

Methods: Donor lungs, which could not be allocated by Eurotransplant, were prepared by the method of Stereology. The tissue collected is meant to be used as “healthy” control pulmonary tissue for planned comparative morphological studies.

Discussion: Stereology allows the assessment of a whole organ without bias. The stereologically sampled donor lungs will serve as a “healthy and normal” control group in the future. In further research projects, pathologically altered lungs will be prepared by the same stereological methods as the "healthy" donor lungs and compared with the control group. New insights regarding pathomechanisms of various lung diseases are expected to be gained; in addition, this may potentially lead to the development of new therapeutic options.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis.....	x
1 Einleitung	11
1.1 Das Ziel dieser Diplomarbeit.....	11
1.2 Stereologie	13
1.2.1 Übersicht der Arbeitsschritte der Stereologie.....	13
1.2.2 Fixation und Präparation der Lunge	15
1.2.2.1 Fixation der Lunge	15
1.2.2.2 Präparation der Lunge	16
1.2.3 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge	16
1.2.3.1 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Archimedes-Prinzip	16
1.2.3.2 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Cavalieri-Prinzip....	19
1.2.3.3 Unterschied Archimedes-Prinzip / SURS	25
1.2.4 Zuschneiden der Lungen zur Morphometrie	25
1.2.4.1 SURS (Systematic uniform random sampling).....	26
1.2.4.2 StURS (Stratified uniform random sampling)	26
1.2.4.3 IUR (Isotropic uniform random) sampling	27
1.2.5 Morphometrie der Lunge.....	29
1.2.5.1 Point counting	29
1.3 Organtransplantationswesen in Österreich	33
1.3.1 Ethik und Moral.....	33
1.3.2 Rechtliche Rahmenbedingungen der Organspende.....	33
1.3.3 Organspendekriterien.....	33
1.3.3.1 Hirntod und Hirntoddiagnostik	34
1.3.3.1.1 Voraussetzungen	35
1.3.3.1.2 1. Klinisch-Neurologische Untersuchung.....	37
1.3.3.1.3 Ergänzende Untersuchung	37
1.3.3.1.4 2. Klinisch-Neurologische Untersuchung.....	39
1.3.3.1.5 Feststellung des irreversiblen Hirntods.....	39

1.3.3.2	Widerspruchslösung.....	39
1.3.3.3	Medizinische (Kontra-)Indikationen.....	40
1.3.4	Transplantationswesen in Österreich.....	40
1.3.5	Eurotransplant.....	41
2	Material und Methoden.....	43
2.1	Spenderkriterien.....	43
2.2	Entnahme und Transport der Lungen.....	43
2.3	Fixation der Atemwege, Präparation der Lunge und Fixation der Lungenflügel.....	46
2.3.1	Fixation der Atemwege.....	46
2.3.2	Präparation der Lunge.....	46
2.3.3	Fixation der Lungenflügel.....	46
2.4	Cavalieri-Methode zur Messung des Gesamtvolumens der Lungenflügel.....	47
2.5	SURS zur Probeentnahme.....	48
3	Ergebnisse.....	53
4	Diskussion.....	54
4.1	Zweck der Gewebebank.....	54
4.2	Erforschung von humanem Gewebe.....	54
4.3	Ziel der Forschung.....	55
4.4	Methodenauswahl bei der Präparation der Spenderlungen.....	57
4.4.1	Fixation des Lungenflügels.....	57
4.4.2	Berechnung des Gesamtvolumens der Lungenflügel.....	57
4.4.3	Zuschneiden der Lungenflügel zur Morphometrie.....	57
4.4.4	Morphometrie der Gewebeproben.....	58
4.5	Conclusion.....	58
5	Literaturverzeichnis.....	60

Glossar und Abkürzungen

AJP	American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology
AJRCMB	American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology
CT	Computertomographie
EEG	Elektroenzephalographie
EM	Elektronenmikroskop
ET	Eurotransplant
FOV	Field of view
GCS	Glasgow Coma Score
HTD	Hirntoddiagnostik
HTX	Herztransplantation
IUR sampling	Isotropic uniform random sampling
LM	Lichtmikroskop
LTX	Lebertransplantation
LuTX	Lungentransplantation
NTX	Nierentransplantation
OTPG	Organtransplantationsgesetz
PTX	Pancreastransplantation
StURS	Stratified uniform random sampling
SURS	Systematic uniform random sampling

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Arbeitsschritte der Stereologie	14
Abbildung 2: Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Archimedes-Prinzip.....	18
Abbildung 3: Zuschneiden der Lunge nach dem SURS.....	20
Abbildung 4: Zählprinzip zum Berechnen des Gesamtvolumens eines Objektes.....	22
Abbildung 5: Berechnen des Lungenvolumens nach dem Cavalieri-Prinzip.....	24
Abbildung 6: StURS (Stratified uniform random sampling)	27
Abbildung 7: IUR (Isotropic uniform random sampling) mit der „orientator“-Methode ..	28
Abbildung 8: „Point-counting“-Methode	31
Abbildung 9: Hirntoddiagnostik-Protokoll.....	36
Abbildung 10: Eurotransplantraum	42
Abbildung 11: Transport der explantierten Lungen	45
Abbildung 12: Lungenflügelschnittoberfläche zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge	48
Abbildung 13: Unterteilung der Lungenflügelschnitte zur Probeentnahme.....	49
Abbildung 14: Entnommenen Gewebeblöcke nach dem SURS	51
Abbildung 15: Übersicht der Arbeitsschritte bei der Probenentnahme.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen Fixationsmethoden mit Vor- und Nachteilen der Morphometrie von Gewebsstrukturen.....	15
Tabelle 2: Die häufigsten morphologischen Methoden in der Stereologie	29
Tabelle 3:Übersicht der verschiedenen Level bei Punktzählung zur Bestimmung von Volumendichten und absoluten Volumina in der Lunge durch Stereologie	30
Tabelle 4: Möglichkeiten der „Ergänzenden Untersuchung“ und dem Ergebnis bei vorherrschendem Hirntod.....	38
Tabelle 5: Beobachtungszeitraum bei primär supratentoriellen Läsionen wenn eine „Ergänzende Untersuchung“ nicht möglich ist.	38
Tabelle 6: Unterteilung Österreichs in Regionen mit den zugehörigen Transplantationszentren und den durchgeführten Organtransplantationen im Jahre 2015 .	40
Tabelle 7: Aktuelle prozentuelle Verteilung der durch Morphometrie untersuchten unterschiedlichen Spezies.....	55
Tabelle 8: Prozentuelle Verteilung der aktuellen biomedizinischen Forschungsthemen in Bezug auf die Morphometrie der Lunge.....	56
Tabelle 9: Prozentuelle Verteilung der morphometrisch untersuchten Lungenkompartimente.....	58

1 Einleitung

1.1 Das Ziel dieser Diplomarbeit

Man liest es heutzutage mit einer Selbstverständlichkeit in fast jedem umfangreichen Physiologiebuch: Die Lunge des Menschen enthält durchschnittlich 300 Millionen Lungenbläschen [16]. Dass es erst 2004 möglich war, die Anzahl der Lungenbläschen zu errechnen/schätzen, ist wahrscheinlich wenigen bekannt [17].

Wenn man sich Gedanken darüber macht, wie man die Anzahl der Lungenbläschen im menschlichen Körper durch Mikroskopieren zu schätzen/zählen versucht, stößt man gleich auf mehrere Schwierigkeiten.

Wie entnimmt man die Proben, sodass sie für das ganze Organ repräsentativ sind? Wie kann man eine dreidimensionale biologische Struktur wie eine Alveole zählen, wenn man sie zweidimensional unter dem Mikroskop betrachtet? Wie sind Proben zu entnehmen, sodass Rückschlüsse auf das Organ als Ganzes zulässig sind? Und wie können absolute Werte errechnet werden [3]?

Matthias Ochs und sein Team haben 2004 diese Schwierigkeiten durch die Methode der Stereologie gemeistert und in ihrem Paper „The number of alveoli in the human lung“ unter anderem die Anzahl der Alveolen geschätzt. Dabei benutzten sie je einen Lungenflügel von insgesamt sechs Organspenderinnen und Organspendern. [17]

Die Methode der Stereologie ist aber nicht erst seit etwas mehr als einer Dekade bekannt. Ihre Anfänge in der biologischen Forschung reichen bis in die Mitte des 20ten Jahrhunderts zurück, Ewald R. Weibel hat diese Methode explizit für die Lunge modifiziert [19,20].

Das Wort Stereologie kommt aus dem Griechischen mit „stereo“ und „logos“ und bedeutet grob übersetzt die „Wissenschaft von Feststoffen“ [1]. Sie ist eine auf stochastischer Geometrie basierende mathematische Methode [6,7].

Die „Stärken“ dieser Methode sind einerseits, dass durch systematische Randomisierung im Zielobjekt jedem Gewebe die gleiche Chance gegeben wird, dass eine Gewebeprobe entnommen wird. Man kann dies durchaus mit Meinungsumfragen vergleichen, deren Ziel es ist, die Bevölkerung möglichst gut in ihrer Heterogenität zu repräsentieren. [11].

Andererseits kann man quantitative Informationen von 3-dimensionalen Strukturen aus 2-dimensionalen Messungen gewinnen. [1]

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Etablierung einer kleinen Gewebebank mit stereologisch untersuchten Lungen von Organspenderinnen und Organspendern auf dem Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz zu beschreiben. Dieses Gewebe soll als Kontrollgewebe Lungengesunder dienen.

Die folgenden Kapitel beschreiben die mathematischen Grundlagen und die praktische Umsetzung der Stereologie anhand der Lunge, um die Arbeitsschritte der Etablierung der Gewebebank zu verstehen. Am Ende werden noch die aktuellen Forschungsgebiete in der Lungen-Stereologie beschrieben. Da die Lungen für die Gewebebank von Organspenderinnen und Organspendern entnommen worden sind, widmet sich zudem ein Kapitel dem Transplantationswesen in Österreich. Es wird explizit darauf hingewiesen, dass die für die Gewebebank wissenschaftlich benutzten Lungen **nicht** transplantabel waren und somit kein Schaden oder Nachteil für Patientinnen und Patienten auf der Warteliste entstanden ist!

1.2 Stereologie

1.2.1 Übersicht der Arbeitsschritte der Stereologie

Um fehlerfreie Ergebnisse in der Stereologie zu erhalten, gibt es klare Vorgehensweisen bzw. Algorithmen, die strikt einzuhalten sind. Es wird ein kurzer Überblick über den Verlauf der Arbeitsschritte gegeben, welche in den folgenden Kapiteln detailliert erläutert werden.

Der **erste** Arbeitsschritt der Stereologie ist die Fixation und Präparation des Organs [3]. Bei der Lunge ist die Fixation entweder über die Atemwege oder vaskulär möglich [11]. Die Präparation beinhaltet das Entfernen allen Gewebes, welches nicht zur Lunge gehört [3].

Im **zweiten** Arbeitsschritt wird das totale Volumen der Lunge berechnet [3]. Dazu stehen unter anderem das Archimedes-Prinzip oder das Cavalieri-Prinzip zur Verfügung. [18]

Der **dritte** Arbeitsschritt in der Stereologie ist die Probeentnahme [3]. Hier zeigt Stereologie seine Stärke, indem es jedem Gewebe im Organ dieselbe Chance gibt, als Gewebeprobe entnommen zu werden [3]. Hierbei stehen verschiedene Entnahmetechniken zur Verfügung, die später detaillierter erläutert werden (z.B. SURS, StURS, Isotropic uniform random (IUR) sampling) [11].

Der **vierte** und letzte Arbeitsschritt ist die Morphometrie des Lungengewebes. [11] Morphometrie ist definiert als Messung der Form eines Objektes. Dazu gehören die Messung von Zahlen, Volumen, Länge, Krümmung, Winkel sowie Messung von Form-Verhältnissen [2]. Hier ist die Methode der Wahl abhängig vom Zielobjekt bzw. der Zielgröße welche man ermitteln will [11]. Es stehen unter anderem lichtmikroskopische bzw. elektronenmikroskopische Verfahren zur Verfügung [11]. Dabei werden verschiedene Zählmethoden verwendet (u.a. „Point counting“, „Intersection counting“, „Physical disector“) [11]. Die Ergebnisse der Gewebeproben werden dann genommen und auf das Gesamtvolumen der Lunge (welches man in Arbeitsschritt 2 errechnet hat) hochgerechnet [3].

Um die Arbeitsschritte im Groben nachzuvollziehen zu können, wird kurz die Vorgehensweise erläutert, um das totale Volumen des Lungenparenchyms in Bezug auf die gesamte Lunge zu berechnen: Man präpariert und fixiert die Lunge. Danach berechnet man das Gesamtvolumen der Lunge. Als nächsten Arbeitsschritt entnimmt man systematisch

Gewebeproben. Anschließend betrachtet man die die entnommenen Proben unter dem Mikroskop. Man ermittelt durch Punktzählung welchen Prozentsatz das Lungenparenchym in Bezug auf das Referenzgewebe (also die Lunge) einnimmt.

Am Ende rechnet man den ermittelten Prozentsatz des Lungenparenchyms auf das Gesamtvolumen der Lunge hoch, wodurch man absolute Werte erhält.

Bei der Interpretation des Endergebnisses ist es wichtig, nicht das Lungenparenchym pro Einheit Lungengewebe anzugeben, sondern das Lungenparenchym auf das gesamte Volumen der Lunge hochrechnen [18]. Diese Interpretationsweise hat sich in der Stereologie durchgesetzt. Man interpretiert das Zielobjekt/die Zielgröße in Bezug auf das gesamte Volumen der Referenzstruktur [18]. Dies hat den Grund, dass ansonsten die Gefahr besteht, das Endergebnis falsch zu interpretieren[4,11,18].

In Abbildung 1 sind alle Arbeitsschritte der Stereologie noch einmal übersichtlich dargestellt.

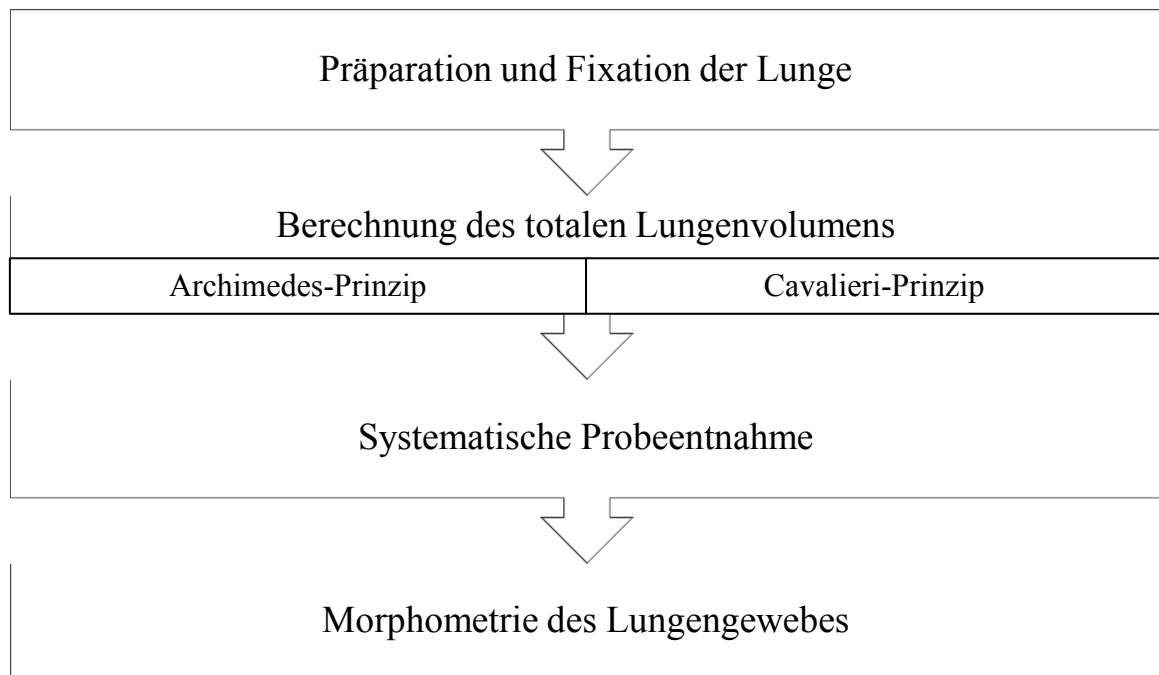


Abbildung 1: Übersicht der Arbeitsschritte der Stereologie

Modifiziert nach Quellen: [3,18]

1.2.2 Fixation und Präparation der Lunge

1.2.2.1 Fixation der Lunge

Der erste Arbeitsschritt der Stereologie ist die Fixation der Lunge [3,11]. Hierbei muss man einerseits entscheiden, über welchen Weg man die Lunge fixiert.

Es stehen 2 Möglichkeiten zur Verfügung:

- a) Fixation über die Atemwege (Instillationsfixation)
- b) Fixation durch vaskuläre Perfusion (Perfusionsfixation)

[11]

Andererseits gibt es mehrere Fixativ-Lösungen, welche zur Auswahl stehen (z.B. Formaldehyd, Glutaraldehyde, Paraformaldehyd; dies kann mit Osmium tetroxide, Uryanyl acetate, Ethanol/Aceton versetzt werden) [11].

Jede Fixationsmethode hat Vor- und Nachteile (siehe Tabelle 1)[11]. Allgemein gesagt hängt die Fixationsmethode davon ab, welches Zielobjekt bzw. welche Zielgrößen man im Gewebe analysieren und deshalb erhalten will [11].

GOAL To preserve:	Airway Instillation		Vascular Perfusion	Rapid Freezing
	2.5% GA buffered ⇒ OsO ₄ , UrAc	Formaldehyde, Paraformaldehyde	GA → OsO ₄ → UrAc → Alcohol dehydration	Freeze substitution
Lung volume	++	—	+++	—
Internal architecture	++	—	+++	—
Parenchyma	++	—	+++	—
Airways and vessels	++	—	+++	—
Tissue fine structure	+++	+	++	—
Capillary blood	+++	+	—	—
Cell structure	+++	—	++	—
Surface lining and edema	—	—	+++	+
Cells: molecular identity	—	+	—	+
LM	+	+	+	+
TEM	+	—	+	—
SEM	+	—	+	—
LSM	—	+	—	+

+++ excellent, ++ good, + acceptable, — inadequate.

Definition of abbreviations: GA = glutaraldehyde; LM = light microscopy; LSM = laser scanning confocal microscopy; OsO₄ = osmium tetroxide; SEM = scanning electron microscopy; TEM = transmission electron microscopy; UrAc = Uryanyl acetate.

Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen Fixationsmethoden mit Vor- und Nachteilen der Morphometrie von Gewebsstrukturen.

Quelle: [11]

1.2.2.2 Präparation der Lunge

Im nächsten Arbeitsschritt wird die Lunge präpariert. Dabei wird alles Gewebe entfernt, welches nicht zur Lunge gehört (z.B. Trachea und Gefäße). So vermeidet man Messfehler bei der Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge. [3]

1.2.3 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge

Zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge werden zwei Methoden vorgestellt:

1.) das **Archimedes-Prinzip**

2.) das **Cavalieri-Prinzip**

[3,11]

1.2.3.1 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Archimedes-Prinzip

Mathematische Grundlagen

Der mathematische Hintergrund dieser Messmethode basiert auf den wissenschaftlichen Erkenntnissen von Archimedes von Syrakus (gestorben 212 vor Christus). Er war einer der einflussreichsten griechischen Mathematiker der klassischen Antike. [5]

Er fand heraus, dass die Auftriebskraft (F) die auf einen Körper wirkt welche in eine Flüssigkeit eingetaucht wird, gleich dem Gewicht der Flüssigkeit (W) ist, welche durch den Körper verschoben wird. [3]

$$F=W \quad [3]$$

Diese Tatsache macht man sich zu Nutze, um das Gesamtvolumen der Lunge zu berechnen: Man nimmt dazu einen Behälter mit einer Flüssigkeit, welche ein spezifisches Gewicht von (nahezu) 1 hat (z.B. pures Wasser). Man stellt diesen Behälter gefüllt mit der

Flüssigkeit auf eine Waage und nullt diese. Danach taucht man die Lunge in den Behälter mit der Flüssigkeit und notiert die Gewichtszunahme (W) gemessen durch die Waage.

Die Gewichtszunahme (W) in Gramm entspricht dann dem Volumen des Objektes (in diesem Fall die Lunge) in Milliliter. [3]

$$V \approx W \quad [3]$$

Da die Lunge die Tendenz hat, nach oben an die Wasseroberfläche aufzutauchen, benutzt man eine Konstruktion, welche die Lunge unter Wasser hält (in Abbildung 2 als „Lungentaucher“ bezeichnet). Um Messfehler zu vermeiden taucht man den „Lungentaucher“ vor dem Nullen der Waage in die Flüssigkeit und markiert die Stelle, wo der Lungentaucher in die Flüssigkeit eindringt. So kann man während des Experimentes nach Eintauchen der Lunge den Lungentaucher wieder exakt auf die gleiche Eintauchtiefe einstellen. So entstehen keine Messfehler durch das Volumen des Lungentauchers. [3]

Die Durchführung der Messmethode nach dem Archimedes-Prinzip zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge wird in Abbildung 2 noch einmal veranschaulicht.

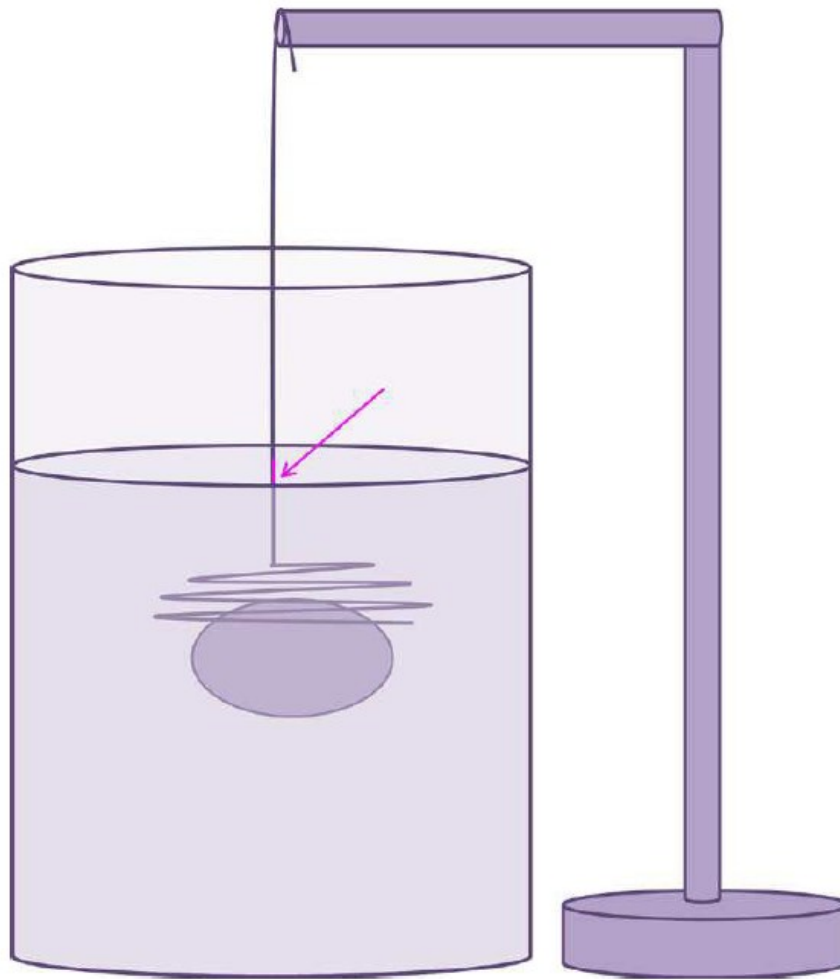


Abbildung 2: Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Archimedes-Prinzip.

Ein Behälter, welcher mit einer hellvioletten Flüssigkeit gefüllt ist, ist dargestellt. Das Volumen der ovalen dunkelvioletten Struktur im Bild, welche sich in der hellvioletten Flüssigkeit befindet soll gemessen werden. Diese tendiert an die Flüssigkeitsoberfläche aufzusteigen. Der dunkelviolette Standfuß mit einem Draht und einem aufgewickelten Ende fungieren als „Lungentaucher“. Dieser soll die dunkelviolette ovale Struktur unter Wasser halten. Die rosa Stelle, welche mit einem rosa Pfeil markiert ist, zeigt die Eintauchtiefe des Lungentauchers beim Nullen der Waage. Eine Waage ist in diesem Bild nicht dargestellt. Sie ist normalerweise unter dem Behälter mit der Flüssigkeit aufgestellt und wird vor Eintauchen der zu messenden Struktur genullt. Nach dem Eintauchen der ovalen dunkelvioletten Struktur wird der Lungentaucher exakt wieder auf die vorher markierte Eintauchtiefe wie beim Nullen der Waage eingestellt. Dadurch werden Messfehler durch Volumenzu- bzw. abnahme des Lungentauchers vermieden. Quelle: [3]

1.2.3.2 Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge durch das Cavalieri-Prinzip

Eine andere Methode das Gesamtvolumen der Lunge zu berechnen ist das Cavalieri-Prinzip. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Lungengewebe in der gleichen Art und Weise geschnitten wird, wie es später zur Probeentnahme (siehe Kapitel 1.2.4) notwendig ist [11]. Diese Art und Weise, die Lunge zu schneiden (und später die Gewebeproben zu entnehmen) nennt man SURS, was die Abkürzung für „Systematic uniform random sampling“ ist [3]. Die Lunge wird bei dieser Methode mit Transversalschnitten nach folgendem Schema mit einem scharfen Messer geschnitten:

Der erste Schnitt wird mit einer randomisierten Schnittbreite von minimal 0 bis maximal T geschnitten. Der Rest des Lungengewebes wird danach mit einer festgelegten Schnittbreite T (z.B. 2 cm) geschnitten. [3,11]

Nun ist es von höchster Wichtigkeit alle Teile der Lunge zu beschriften und mit **derselben Schnittfläche** nach oben (z.B. apikale Schnittfläche) auf einem Tisch anzuordnen. Die Schnittbreite T und das Auflegen der gewählten Schnittoberfläche nach oben sind im ganzen Prozess des Experimentes beizubehalten. Um das Lungengewebe präziser schneiden zu können ist es möglich, die Lunge zuerst in Agar einzubetten. [3]

Abbildung 3 veranschaulicht das Zuschneiden der Lunge nach dem SURS.

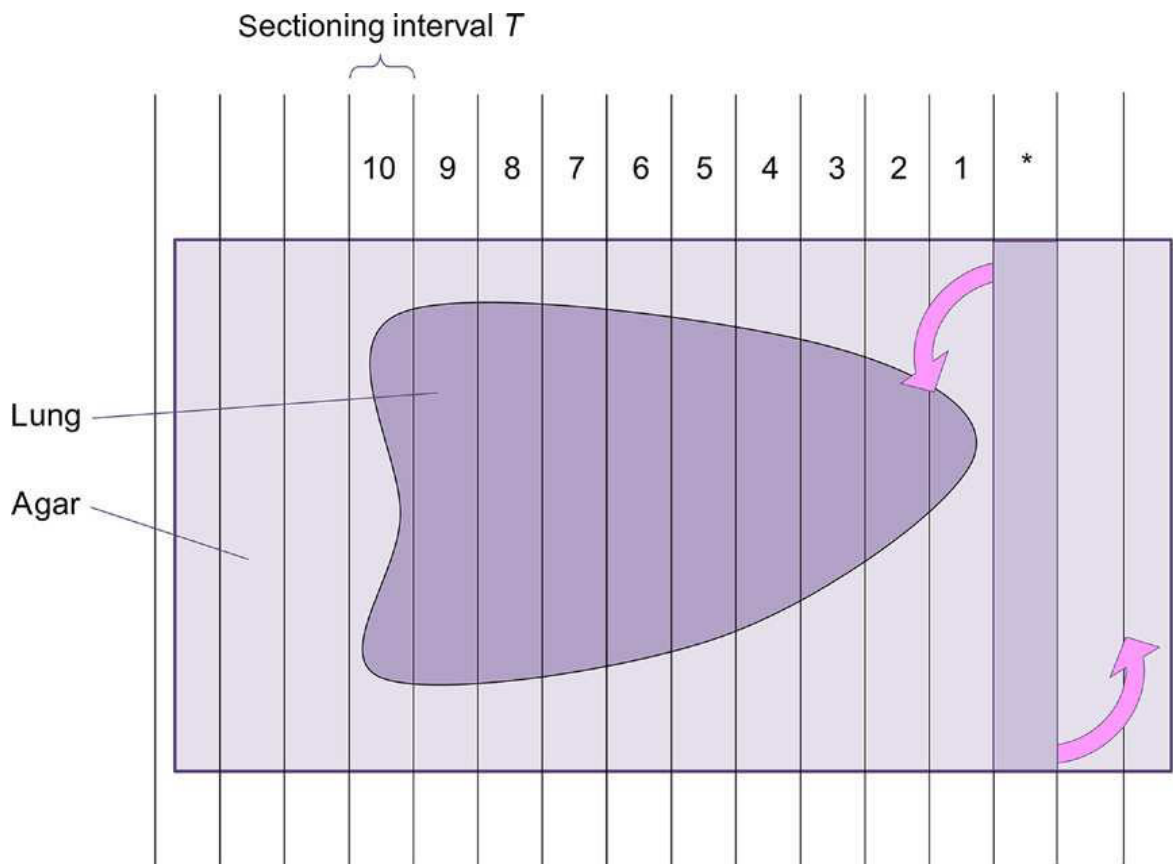


Abbildung 3: Zuschneiden der Lunge nach dem SURS

Es wird ein Lungenflügel dargestellt, welcher in Agar eingebettet ist. Die Basis des Lungenflügels zeigt nach links, der Apex nach rechts. Oben sind die Schnitte von 1 bis 10 nummeriert. Ist der Lungenflügel in Agar eingebettet, so enthält der „allererste“ Schnitt (in dieser Abbildung mit „*“ gekennzeichnet) kein Gewebe. Der Lungenflügelschnitt mit der Nummer 1 ist randomisiert mit einer Breite von 0 cm bis T cm. Die Schnitte 2 bis 10 sind mit einer konstanten Breite T geschnitten. Die rosa Pfeile symbolisieren, dass jeder Lungenflügelschnitt mit der gleichen Schnittfläche nach oben (z.B. apikal) auf einem Tisch angeordnet werden soll. Quelle: [3]

Es folgt die Berechnung des Lungenvolumens mit dem Cavalieri-Prinzip:

Die Formel um das Lungenvolumen zu berechnen lautet:

$$V = T \cdot \Sigma A \quad [3]$$

V=Totales Volumen des Organs

T=Schnittbreite der Lungenflügelschnitte

A=obere Schnittoberfläche von jedem einzelnen Lungenflügelschnitt

Da man T durch die Schnittbreite selbst vorgibt, ist der einzig fehlende Parameter um das totale Volumen des Lungenflügels zu schätzen die obere Schnittoberfläche (A) von jedem einzelnen Lungenflügelschnitt.

Um die Schnittoberfläche (A) zu schätzen, geht man zum nächsten Schritt über:

Man nimmt jeden einzelnen Lungenflügelschnitt und legt auf die obere Schnittoberfläche (z.B. wie oben gewählt apikal) eine durchsichtige Folie mit einem Gitternetz mit einer bekannten Größe der Quadrate. Es ist wieder einmal wichtig immer das gleiche Gitternetz mit der gleichen Größe der Quadrate für das restliche Experiment zu benutzen. [3]

Jetzt muss exakt ein Punkt in jedem Quadrat des Gitternetzes definiert werden, welcher ein Zählereignis darstellt [3]. Man nimmt dazu zum Beispiel die untere linke Ecke des Quadrates (siehe Abbildung 4). Trifft das Zielgewebe auf diesen Punkt (P), wird es als Zählereignis gewertet. [3]

Die „area per point“ (a(p)) ist die Innenfläche des Quadrates (z.B. bei einer Kantenlänge des Quadrates von 1cm \rightarrow 1cm x 1cm=1cm²).

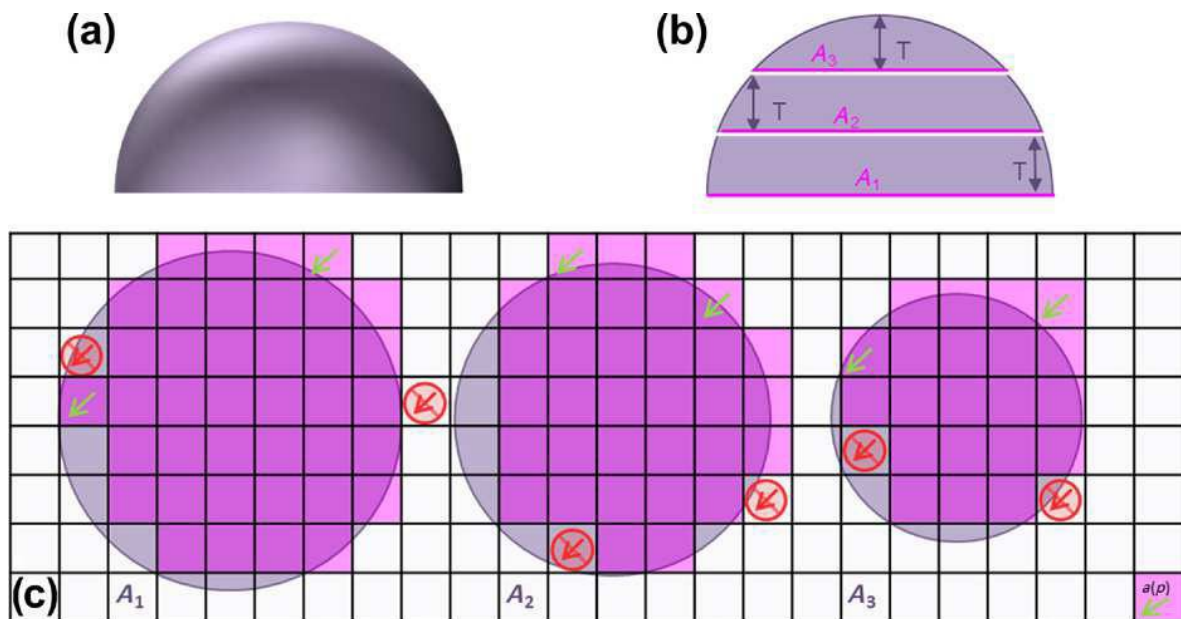


Abbildung 4: Zählprinzip zum Berechnen des Gesamtvolumens eines Objektes

Die Halbkugel in a) wird in b) durch zwei Transversalschnitte mit einer konstanten Schnittbreite T in drei Teile unterteilt. Dadurch entstehen 3 Schnittflächen welche in b) rosa dargestellt sind. Sie werden als A₁, A₂ und A₃ bezeichnet. In c) werden die in b) rosa markierten Schnittflächen A₁, A₂ und A₃ grülich nebeneinander dargestellt. Nun wird randomisiert ein Gitternetz mit gleichgroßen Quadraten auf die Schnittflächen der Halbkugel gelegt. Es wird ein Zählereignis festgelegt: Wenn die Zielstruktur (in diesem Fall die Schnittoberfläche der Halbkugel) den linken unteren Rand eines Quadrates trifft, wird es als Zählereignis gewertet. In c) ist das Quadrat ganz unten rechts mit dem grünen Pfeil in Richtung der unteren linken Ecke als Zählereignis beispielhaft dargestellt. Alle Quadrate welche in c) als Zählereignis gelten, sind violett gefärbt. Die grünen Pfeile in den violetten Quadraten verdeutlichen noch einmal ein Zählereignis. Die Felder mit den roten durchgestrichenen Pfeilen in einem Kreis verdeutlicht, was kein Zählereignis ist. Quelle [3]

Nachdem die Zählereignisse aller Lungenflügelschnittoberflächen vorliegen, kann das gesamte Lungenvolumen nach folgender Formel berechnet werden:

$$V_{\text{lung}} = a(p) \cdot T \cdot \Sigma P \quad [3]$$

V_{lung} = Totales Volumen des Organs

$a(p)$ = die „area per point“ auf dem Gitternetz

T = Schnittbreite der Lungenflügelschnitte

P = Anzahl der Zählereignisse, wenn das Zielgewebe die definierte Ecke des Quadrates trifft

Um sich die Berechnung des totalen Lungenvolumens besser vorstellen zu können, wird beispielhaft die Berechnung eines Lungenflügelvolumens nach dem Cavalieri-Prinzip beschrieben:

Man nimmt einen Lungenflügel. Dieser wird nun mit Transversalschnitten nach dem SURS geschnitten, d.h. der erste Schnitt ist randomisiert zwischen 0cm und T, die anderen Lungenschnitte werden in diesem Beispiel mit T=2cm geschnitten. Danach legt man die Lungenflügelschnitte mit der gleichen Schnittoberfläche nach oben auf einen Tisch und gibt ein Gitternetz mit gleich großen Quadraten darauf (siehe Abbildung 5). Die Kantenlänge der Quadrate beträgt in diesem Beispiel 1,5cm. Daraus folgt:

$a(p)=1,5\text{cm} \times 1,5\text{cm} = 2,25 \text{ mm}^2$. Nun wird ein Zählereignis (P) festgelegt: Trifft die linke untere Ecke eines Quadrates die Lungenflügelschnittoberfläche, so gilt es als Zählereignis (siehe Abbildung 5). Die Anzahl der Zählereignisse ist beispielsweise $P = 173$. Das totale Volumen des Lungenflügels in diesem Beispiel beträgt dann:

$$V_{\text{lung}} = a(p) \cdot T \cdot \Sigma P$$

$$V_{\text{lung}} = 2,25 \text{ cm}^2 \times 2\text{cm} \times 173 = 778,5\text{cm}^3.$$

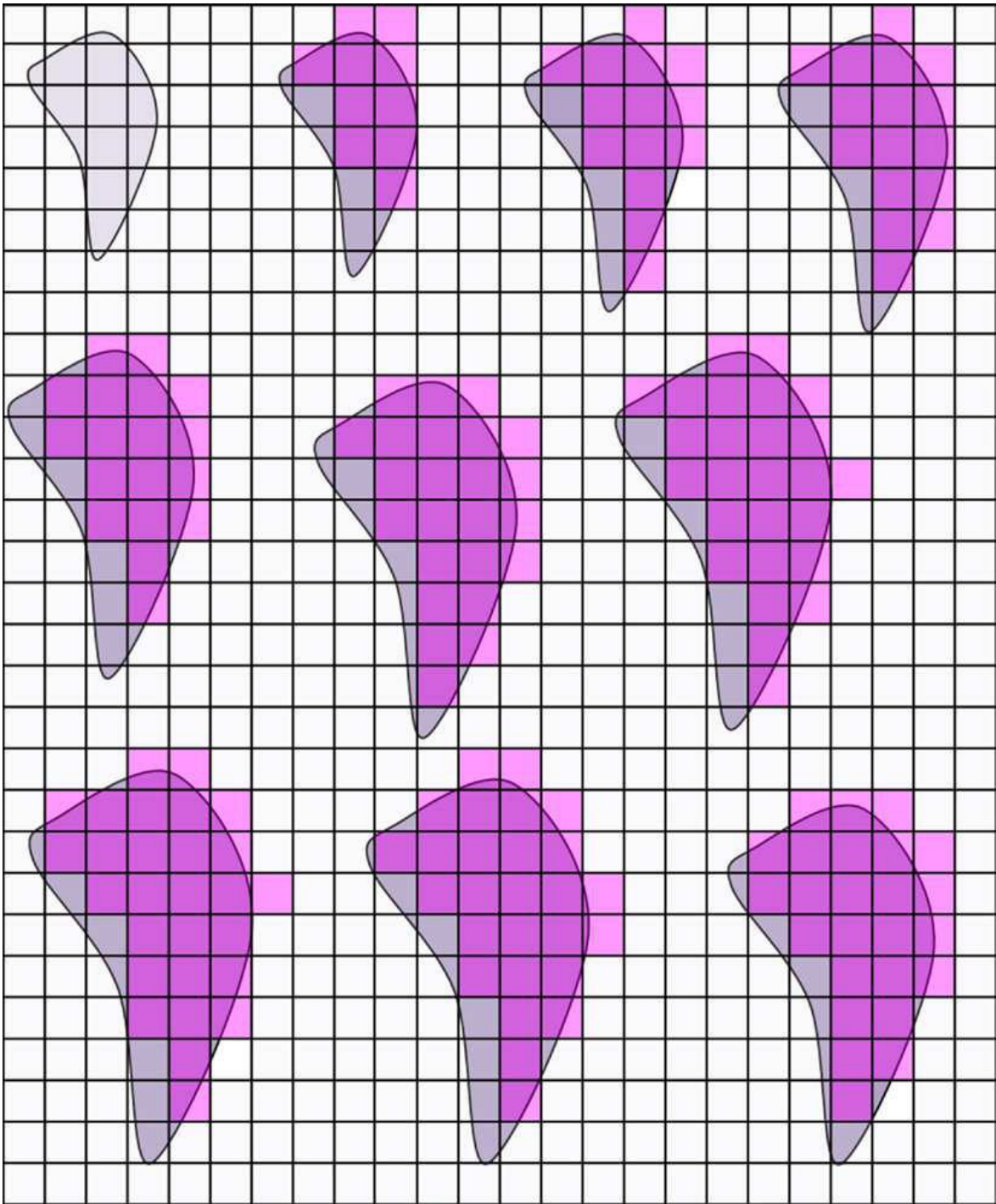


Abbildung 5: Berechnen des Lungenvolumens nach dem Cavalieri-Prinzip

Es wird beispielhaft das Berechnen des Lungenvolumens nach dem Cavalieri-Prinzip gezeigt. Es werden 10 Lungenflügelschnitte dargestellt. Die Schnittoberflächen der Lungenflügelschnitte sind grau dargestellt. Es wurde randomisiert ein Gitternetz mit gleich großen Quadraten auf die Lungenflügelschnittoberflächen gelegt. Die violett eingefärbten Quadrate stellen ein Zählereignis dar. Als Zählereignis gilt, wenn die linke untere Ecke eines Quadrates die Lungenflügelschnittoberfläche berührt. In dieser Abbildung sind alle Lungenschnitte mit der apikalen Schnittfläche nach oben gedreht. Beim obersten linken Lungenflügelschnitt handelt es sich um den apikalsten Teil der Lunge, der logischerweise oben keine Schnittoberfläche besitzt. Deshalb wird er beim Cavalieri-Prinzip nicht mitgezählt. Quelle [3]

1.2.3.3 Unterschied Archimedes-Prinzip / SURS

Vergleicht man das Archimedes-Prinzip mit dem Cavalieri-Prinzip, so stellt man fest, dass die Messergebnisse beim Archimedes-Prinzip um ca. 10-15% größer ausfallen als beim Cavalieri-Prinzip [10]. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass die elastischen Fasern durch das Aldehydfixativ nicht komplett fixiert werden [8,9]. Die erhaltenen elastischen Fasern und das eingeflößte Fixativ, welches im inneren der Lunge einen hydrostatischen Druck erzeugt, verursachen gemeinsam diese Vergrößerung des Lungenvolumens [10]. So ist das Cavalieri-Prinzip besser geeignet, als das Archimedes-Prinzip zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge [11].

Außerdem hat das Cavalieri-Prinzip in der Praxis auch folgende Pluspunkte gegenüber dem Archimedes-Prinzip:

- Die Morphometrie der Gewebeproben verwendet wie beim Cavalieri-Prinzip auch eine Punkt-/Ereigniszählung

- das Gewebe entspricht bei dieser Methode am ehesten dem Zustand der „relaxierten“ Lunge, wie bei der späteren Analyse der Gewebeproben

- da die Lungen zur stereologischen Analyse nach dem SURS geschnitten werden müssen, ist der zusätzliche Arbeitsaufwand gering (nur das Zählen der Zählereignisse im Gitternetz, wenn das Zielgewebe die definierte Ecke des Quadrates trifft)

[11]

1.2.4 Zuschneiden der Lungen zur Morphometrie

Nun gilt es sich zu entscheiden wie viele Gewebeproben man insgesamt aus der ganzen Lunge gewinnen will. Es wird empfohlen, auf insgesamt ca. 100-200 Zählereignisse zu kommen [3,11]. Entscheidend ist immer, dass jedem Gewebe die gleiche Chance gegeben wird, eine Gewebeprobe zu entnehmen. [3]

Es werden nun einige Möglichkeiten geschildert Gewebeproben zur Morphometrie zu entnehmen. Die Wahl der Methode hängt wieder von der Zielgröße/Zielstruktur ab welche man später erforschen will. [11]

1.2.4.1 SURS (Systematic uniform random sampling)

Wie oben beschrieben wird ein Lungenflügel horizontal geschnitten. Der erste Schnitt ist dabei randomisiert zwischen 0cm und T. Die darauffolgenden Lungenflügelschnitte sind mit einer konstanten Schnittbreite T zu schneiden. Die Lungenflügelschnitte werden alle mit der gleichen Seite nach oben (z.B. apikal) auf einen Tisch gelegt und beschriftet. Es wird ein Gitterraster mit gleich großen Quadraten auf die Lungenflügelschnittoberflächen gelegt. Es werden alle Quadrate gezählt, in welchen sich Gewebe befindet. Nun wird je nach Gewebeprobenzahl jedes x-te Quadrat als Gewebeprobe entnommen. [3,11]

Hat man z.B. 173 Quadrate mit Gewebe gezählt und will 100 Gewebeproben entnehmen, so zählt man $173/100=1,73$. Jedes 2-te Gewebequadrat wird also entnommen.

Um jedem Gewebe die gleiche Chance zu geben, nimmt man eine Münze, um zu entscheiden, bei welchem Gewebeblock man anfängt:

-Bei **Kopf** wird der erste Gewebeblock mit einer **geraden Zahl** genommen (Gewebeblock „2“ wird zuerst genommen)

-Bei **Zahl** wird der erste Gewebeblock mit einer **ungeraden Zahl** genommen (Lungenabschnitt „1“ wird zuerst genommen)

[3]

Man kommt auf $(173/2=86,5)$ 86 Proben. Die restlichen 14 Gewebeproben werden aus den restlichen Gewebeblocken randomisiert entnommen. Die Gewebeblocke die nicht unter die Gewebeproben gefallen sind, werden wieder in das Fixativ gelegt. [3,11]

1.2.4.2 StURS (Stratified uniform random sampling)

Beim StURS wird die Lunge in verschiedene Abschnitte unterteilt (z.B. in die einzelnen Lungenlappen). Jeder Abschnitt wird danach einzeln nach dem Cavalieri-Prinzip geschnitten und die Proben nach dem SURS (siehe Kapitel 1.2.4.1) entnommen. Abbildung 6 verdeutlicht das StURS. Diese Methode findet insbesondere dann Anwendung, wenn Heterogenität der zu analysierenden Struktur vermutet wird, bei großen Lungen, oder wo nur ein Teilabschnitt der Lunge zur Verfügung steht (z.B. nach Tumorlappenresektion). [11]

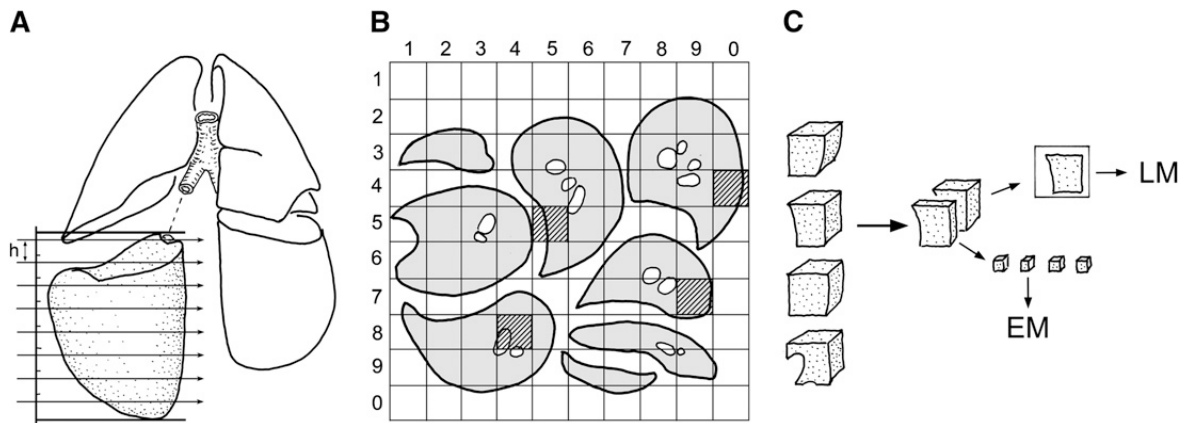


Abbildung 6: StURS (Stratified uniform random sampling)

Es wird eine Hundelunge in 4 Abschnitte unterteilt (rechter und linker Lungenflügel, oberer und unterer Lungenlappen). In a) wird der rechte untere Lungenlappen nach dem Cavalieri-Prinzip geschnitten (siehe Kapitel 1.2.3.2). In b) sind die Lungenlappenschnitte systematisch auf ein 10x10 Gitterraster mit gleich großen Quadraten gelegt. Es werden randomisiert 4 Gewebsblöcke gewählt. In c) werden die Gewebsblöcke geschnitten und eingebettet, je nach Experiment wahlweise/randomisiert analysiert durch das Lichtmikroskop (LM) oder Elektronenmikroskop (EM). Quelle [11]

1.2.4.3 IUR (Isotropic uniform random) sampling

Das IUR (Isotropic uniform random) sampling wird vor allem dazu angewandt, um Parameter nicht-isotroper Strukturen, wie zum Beispiel Gefäße oder Atemwege zu bestimmen. Dabei wird anfangs der zu analysierende Lungenflügel/-abschnitt nach dem Cavalieri-Prinzip (siehe Kapitel 1.2.3.2).geschnitten und die Probeentnahme wie beim SURS durchgeführt. Jeder zu analysierende Gewebsblock wird mit der apikalen Seite nach oben auf ein Bild mit einem gleichwinkligen Kreis gestellt. Es wird nun randomisiert eine Gradzahl gewählt und der Gewebsblock zur Tischachse in dieser Gradzahl geschnitten. Danach wird der Gewebsblock mit der Schnittfläche nach unten wieder auf den gleichwinkligen Kreis gelegt. Es wird wieder randomisiert eine Gradzahl gewählt und der Gewebsblock zur Tischachse in dieser Gradzahl geschnitten. Nun wird ein Parallelschnitt zur letzten Schnittfläche gemacht und dieser dann zum analysieren in das jeweilige Fixativum eingebettet. [11,14]

Man nennt diese zufälligen Orientierungen „orientator“[12] oder „disector“[13].

Abbildung 7 veranschaulicht das Isotropic uniform random sampling.

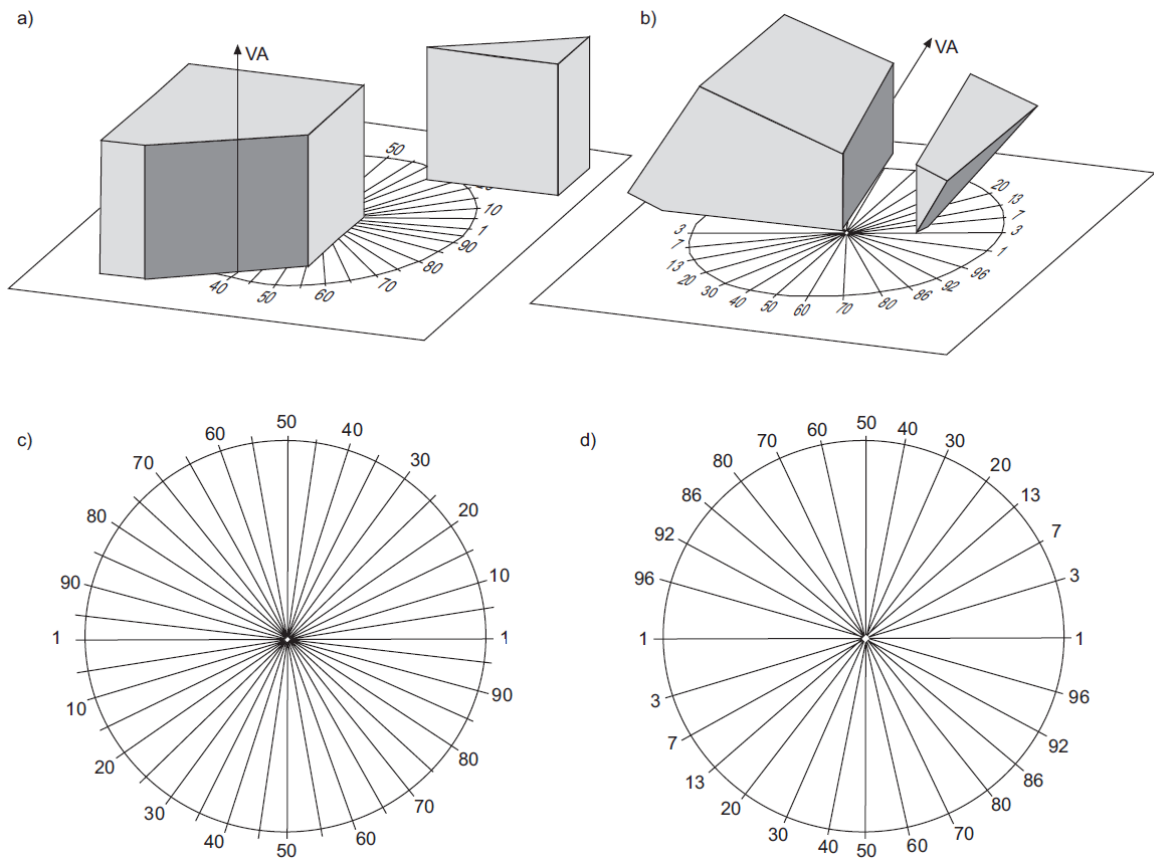


Abbildung 7: IUR (Isotropic uniform random sampling) mit der „orientator“-Methode

Zuerst wird in a) der grau dargestellte Gewebeblock mit der apikalen Seite nach oben auf den gleichwinkligen Kreis c) gestellt. Ein Rand zeigt parallel zur 1-1 Richtung. Es wird randomisiert eine Gradzahl zwischen 0 und 99,9 gewählt. Der Gewebeblock wird aufrecht zur Tischachse in dieser Gradzahl geschnitten. In a) betrug der Schnittwinkel 15. Danach wird die entstandene Schnittfläche auf d) gelegt. Wieder ist der Rand parallel zur 1-1 Richtung. Wie in b) dargestellt, wird ein zweiter Schnitt nach einer randomisierten Gradzahl gemacht. In b) ist der Schnittwinkel 60. Es wird nun ein Parallelschnitt zur dunkelgrauen Fläche (=letzter Schnitttrand) vom Gewebeblock in b) gemacht und dieser dann zum analysieren in ein Fixativum eingebettet.

Quelle [14]

1.2.5 Morphometrie der Lunge

Wie schon oben beschrieben, ist Morphometrie definiert als Messung der Form eines Objektes. Dazu gehören die Messung von Zahlen, Volumen, Länge, Krümmung, Winkel sowie Messung von Form-Verhältnissen [2].

Nach der Schätzung des totalen Lungenvolumens, dem Zuschneiden der Lungenflügel und Entnahme der Gewebeproben hängt die weitere Vorgehensweise von dem zu analysierenden Zielobjekt bzw. der Zielgröße ab [11].

Hierbei gibt es verschiedene Zählmethoden in der Stereologie. In Tabelle 2 sind die häufigsten Zählmethoden aufgelistet.

Methode	Schätzung von
Point counting	Volumendichte / absolutes Volumen
Intersection counting	Oberflächen
Physical disector	Anzahl von Objekten
MLI/MCL	Charakterisierung des gesamten azinären Luftraumkomplexes

Tabelle 2: Die häufigsten morphologischen Methoden in der Stereologie

Quelle [3,11,15]

Im Weiteren wird das „Point counting“ genauer erklärt, um das Prinzip der Zählmethoden näher zu bringen.

1.2.5.1 Point counting

Will man die Volumendichte oder das absolute Volumen von Lungenstrukturen analysieren, ist „Point counting“ die Methode der Wahl. [3,11]

Dabei unterscheidet man verschiedene „Level“, welche Struktur man betrachtet. Je höher das Level desto kleiner die Strukturen die man analysiert [11] (siehe Tabelle 3).

Level	Vergrößerung	Ziel
I	Makroskopisch	Schätzung des totalen Lungenvolumens durch SURS
II	Low-Power LM (1-250x)	Schätzung des Parenchymanteils der Lunge
III	High-Power LM (400-600x)	Schätzung des Volumenanteils interalveolärer Septen im Parenchym
IV	EM (1000-5000x)	Schätzung der Volumenzusammensetzung der Septen durch Endothel, Epithel, usw. in Bezug zu allen Punkten die das Septum treffen. Ziel ist es die jeweilige Volumendichte aller Strukturen herauszufinden (Anteil des Endothelvolumens, Epithelvolumens, usw.)(1000-5000x Vergrößerung)
	EM (10000-20000x)	Schätzung der Volumenzusammensetzung von Lamellarkörpern [Ib] in Typ II Epithelzellen

Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Level bei Punktzählung zur Bestimmung von Volumendichten und absoluten Volumina in der Lunge durch Stereologie

Quelle [11]

Vorgehensweise:

Im ersten Schritt des Point counting hat man zum Ziel, den prozentuellen Anteil einer Zielstruktur bezogen auf die Referenzstruktur herauszufinden (z.B. der prozentuelle Anteil des Parenchymvolumens der Lunge zum totalen Lungenvolumen). [3]

Im zweiten Schritt nimmt man diesen prozentuellen Anteil und multipliziert ihn mit dem Gesamtvolumen der Referenzstruktur. (z.B. der prozentuelle Mittelwert aller Anteil des Parenchymvolumens aller Gewebeproben wird multipliziert mit dem totalen Lungenvolumen). [3]

In der Praxis geht man folgendermaßen vor:

Nach Schneiden der Lungenflügel nach dem Cavalieri-Prinzip in Lungenflügelschnitte und der Entnahme der Gewebeproben je nach der Methode der Wahl nimmt man ein FOV im Mikroskop. Darauf legt man ein Punktenetz mit einem definierten Abstand der Punkte. [3]

Nun werden zwei Zielereignisse definiert:

P_{struct} : Zielstruktur (z.B. Lungenparenchym)

P_{ref} : Alle Punkte welche die Referenzstruktur treffen (z.B. Lunge)

[3]

Jedes Mal, wenn ein Punkt im Punktenetz P_{struct} oder P_{ref} im FOV trifft wird dieser Punkt gezählt. Natürlich wird auch jeder P_{struct} als P_{ref} mitgezählt [3]. Somit kann man im FOV

prozentuell das Volumen der Zielstruktur in Beziehung zur Referenzstruktur messen (z.B. prozentueller Anteil des Parenchymvolumens der Lunge zum totalen Lungenvolumen):

$$V_V(\text{struct/ref}) = \frac{\Sigma P_{\text{struct}}}{\Sigma P_{\text{ref}}} \quad [3]$$

$V_V(\text{struct/ref})$ = Prozentuelle Schätzung der Zielstruktur in Beziehung zur Referenzstruktur

P_{struct} : Zielstruktur (z.B. Lungenparenchym)

P_{ref} : Alle Punkte welche die Referenzstruktur betreffen (z.B. Lunge)

Abbildung 8 veranschaulicht die „Point counting“-Methode.

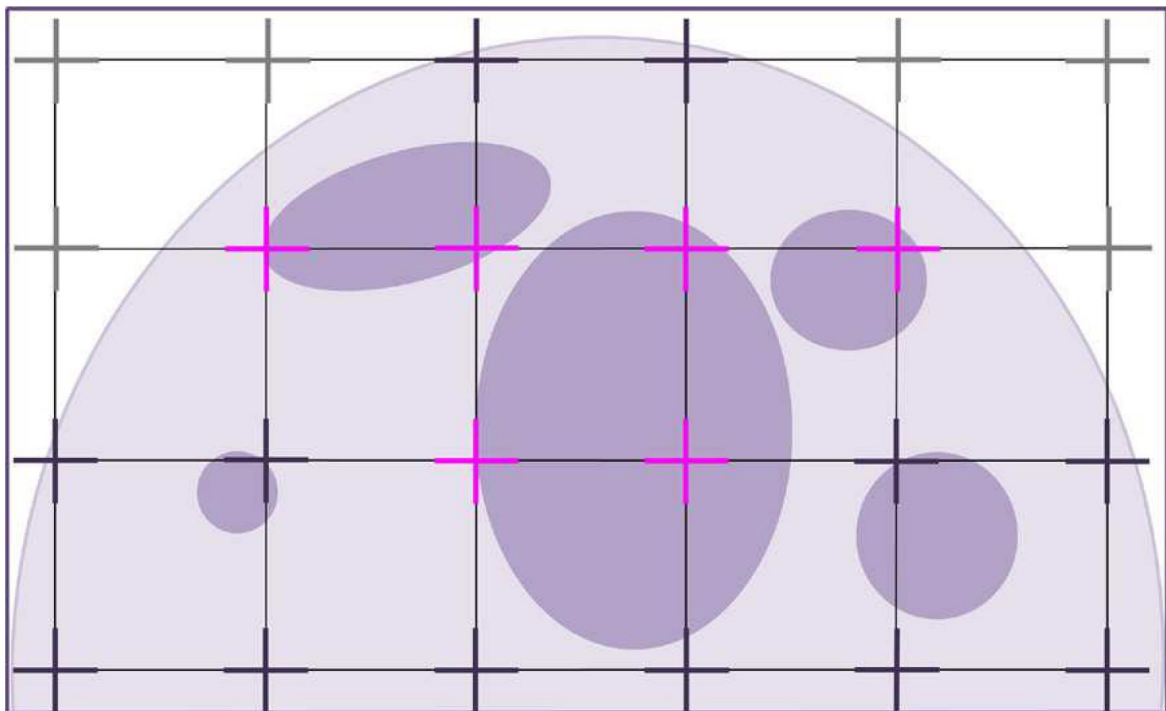


Abbildung 8: „Point-counting“-Methode

Es wird der Anteil der dunkelgrauen Struktur geschätzt, welche sich in der hellgrauen Struktur befindet. Dazu wird randomisiert ein Punktgitter mit einem konstanten Abstand der Punkte auf die Referenzstruktur gelegt. 6 Punkte treffen die dunkelgraue Struktur (Zielstruktur), gekennzeichnet mit lilafarbenen Punkten. Insgesamt zählt man 18 Punkte, welche die hellgraue Struktur (Referenzstruktur) treffen (man zählt auch die Punkte mit, welche die Zielstruktur treffen), gekennzeichnet mit einem Schwarzen Punkt. Punkte die nicht die Referenzstruktur treffen, sind mit einem grauen Punkt gekennzeichnet. Der prozentuellen Anteil der Zielstruktur in Bezug zur Referenzstruktur beträgt in dieser Abbildung: $6/18 \approx 33\%$, Quelle: [3]

Am Ende wird wie schon oben beschrieben der prozentuelle Anteil der Zielstruktur mit dem totalen Volumen der Referenzstruktur multipliziert:

$$V_{\text{struct, ref}} = V_v(\text{struct/ref}) \cdot V_{\text{ref}} \quad [3]$$

$V_{\text{struct, ref}}$ = Das Volumen der Zielstruktur innerhalb der Referenzstruktur

$V_v(\text{struct/ref})$ = Prozentuelle Schätzung der Zielstruktur in Beziehung zur Referenzstruktur

V_{ref} = totales Volumen der Referenzstruktur

Die praktische Umsetzung der Stereologie erfolgt in Kapitel 2. Dort wird die Etablierung der Gewebebank mit stereologisch präparierten Spenderlungen auf dem Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz beschrieben.

1.3 Organtransplantationswesen in Österreich

Da die Lungen für die Gewebebank von Organspenderinnen oder Organspendern entnommen worden sind, sollen die folgenden Kapitel einen Einblick in das Organtransplantationsgesetz in Österreich, in die Spenderinnen- und Spenderkriterien und die Organisation des Transplantationswesens in Österreich geben.

1.3.1 Ethik und Moral

Ein respektvoller Dank gilt an dieser Stelle allen Organspenderinnen und Organspendern, welche im hier und jetzt Menschenleben retten und durch ihre Spende an die Forschung die Lebenszeit/-qualität vieler Menschen in Zukunft verlängern/verbessern wird.

1.3.2 Rechtliche Rahmenbedingungen der Organspende

Am 7. Juli 2010 gab die Europäische Union Richtlinien über „Qualitäts- und Sicherheitsstandards für zur Transplantation bestimmte menschliche Organe“ heraus [21]. Diese Richtlinien wurden am 14. Dezember 2012 im Organtransplantationsgesetz (OTPG) in Österreich umgesetzt [22]. [23]

1.3.3 Organspendekriterien

Insgesamt müssen 3 Kriterien für eine Organspende erfüllt sein. Diese werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert:

1. Der eingetretene Tod („Hirntod“) wurde eindeutig festgestellt.
2. Es liegt kein Widerspruch gegen die Organspende vor (Widerspruchslösung) [22].
3. Es gibt keine medizinischen Kontraindikationen gegen eine Organspende.

1.3.3.1 Hirntod und Hirntoddiagnostik

Laut § 5. (2) OTPG darf eine Organspende „(...) erst durchgeführt werden, wenn eine/ein zur selbständigen Berufsausübung berechnigte/berechnigter Ärztin/Arzt den eingetretenen Tod festgestellt hat.“ [22]

Im Falle einer Organspenderin oder eines Organspenders wird der „Hirntod“ festgestellt. Dieser „(...) ist definiert als Zustand der irreversibel erloschenen Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstammes. Entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft ist der Hirntod identisch mit dem Individualtod eines Menschen.“ [20]

Um den Hirntod einer Patientin oder eines Patienten festzustellen, wird eine „Hirntoddiagnostik“ durchgeführt. In Österreich wird diese entsprechend dem Beschluss des Obersten Sanitätsrates vom 16. November 2013 herausgegebene „Empfehlungen zur Durchführung der Hirntoddiagnostik bei einer geplanten Organentnahme“ realisiert. [20].

Im Folgenden wird der Ablauf der Hirntoddiagnostik (HTD) kurz erläutert [20].

Die HTD wird in folgender Reihenfolge durchgeführt (Details siehe unten):

- a) Alle Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um mit der HTD zu beginnen
- b) 1. Klinische Neurologische Untersuchung
- c) Ergänzende Untersuchung
- d) 2. Klinische Neurologische Untersuchung

1.3.3.1.1 Voraussetzungen

Die erste Voraussetzung zur Durchführung einer HTD ist, dass es sich um eine **akute Hirnschädigung** handelt, welche entweder

- **primär** (d.h. das Gehirn direkt betreffend) oder
- **sekundär** („das Gehirn mittelbar über den Stoffwechsel...“ betreffend, z.B. Herzkreislaufstillstand) ist. [26]

Um mit der HTD anfangen zu können müssen als zweite Voraussetzung alle Dinge ausgeschlossen werden, welche den Hirntod „vortäuschen“ können. Hierzu zählen:

- Intoxikation
- Relaxation
- Hypothermie < 34 °C
- hypovolämischer Schock
- Hypokaliämie (< 2,5 mmol K⁺)
- metabolisches bzw. endokrines Koma
- Sedativa/Opiate über dem Cut-Off-Wert

Sind Benzodiazepine hoch dosiert, ist eine Antagonisierung mit 2mg Flumazenil i.v. möglich. Danach kann die HTD ohne Spiegelbestimmung durchgeführt werden. Bei Barbituraten, welche hoch dosiert sind, ist ein Abwarten notwendig, bis die Spiegel im Blut unter einen definierten Cut-Off-Wert fallen.

Alle hier beschriebenen Voraussetzungen sind im HTD-Protokoll unter „Voraussetzungen“ zu finden (siehe Abbildung 9).

**PROTOKOLL ZUR DOKUMENTATION DES IRREVERSIBLEN FUNKTIONSAUSFALLS DES GEHIRNS
(HIRNTODDIAGNOSTIK) (Version vom 16. November 2013)**

Patientendaten (Etikette)

Name:
 Vorname:
 Geburtsdatum:
 Station:

VORAUSSETZUNGEN	
Diagnose:	
Zeitpunkt des Unfalls/Krankheitsbeginns:	
Hirnschädigung:	Primär supratentoriell <input type="checkbox"/> Primär infratentoriell <input type="checkbox"/> Sekundär <input type="checkbox"/>
Bildgebung (CT oder MR): mit der Diagnose vereinbar <input type="checkbox"/>	Primär ausgeschlossen sind: Intoxikation <input type="checkbox"/> Relaxation <input type="checkbox"/> Hypothermie < 34 °C <input type="checkbox"/> hypovolämischer Schock <input type="checkbox"/> Hypokaliämie (< 2,5 mmol K+) <input type="checkbox"/> Metabolisches bzw. endokrines Koma <input type="checkbox"/>
Behandlung mit Sedativa/Opiaten beendet (Datum/Uhrzeit):	
Mehr als 2 Bolusgaben oder kontinuierliche Dauermedikation mit Benzodiazepinen <input type="checkbox"/> und/oder Barbituraten <input type="checkbox"/>	
Bei Benzodiazepinen: Wurden diese antagonisiert? Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Medikament: Dosis:	
Bei Barbituraten: Spiegel unter Cut-Off-Wert: Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>	
Datum/Uhrzeit: Name/Unterschrift:	

KLINISCH-NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG	1. Untersuchung Datum/Uhrzeit	2. Untersuchung Datum/Uhrzeit
Koma (Glasgow Coma Score 3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Keine Pupillenreaktion auf Lichtreiz bei mittel- bis maximalweiten Pupillen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlaffe Tetraplegie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des okulozephalen/vestibulookulären Reflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des Ziliospinalreflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des Masseterreflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des Kornealreflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des Pharyngealreflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fehlen des Hustenreflexes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kein Grimassieren auf Druckprovokation u. Ä.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atropintest (2 mg i. v.) positiv (im Sinne Hirntodsyndrom) <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> nein		
Datum/Uhrzeit: Name/Unterschrift:	Name	Name
Apnoetest erfüllt bei art. PaCO ₂ mm Hg: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> nein		
Datum/Uhrzeit: Name/Unterschrift:	Unterschrift	Unterschrift

ERGÄNZENDE UNTERSUCHUNGEN: EEG-Untersuchung		
Beginn Datum: Uhrzeit:	Ende Datum: Uhrzeit:	EEG-BEFUND: Beim Patienten kommt in der EEG-Ableitung während der angeführten Zeit bei einer Verstärkung von 2 µV/mm, Zeitkonstante 0,3, Frequenzbeschränkung 70 Hz, ein kontinuierliches (lediglich identifizierte Artefakte enthaltendes) Null-Linien-EEG zur Darstellung. <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein Name/Unterschrift:
Nachweis des Zirkulationsstillstandes mittels TCD/FDS		CTA
Erste Untersuchung Datum: Uhrzeit:	Zweite Untersuchung Datum: Uhrzeit:	Datum: Uhrzeit:
Zerebraler Zirkulationsstillstand festgestellt: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein		Name/Unterschrift:

Aufgrund der erhobenen Befunde wird der Hirntod festgestellt.

.....
 Datum/Uhrzeit Name (Blockschrift)/Unterschrift

Abbildung 9: Hirntoddiagnostik-Protokoll

Das Protokoll ist in mehrere Abschnitte unterteilt. Oben werden die Patientinnen- oder **Patientendaten** erfasst. Es folgen weiter die **Voraussetzungen**, welche für eine HTD erfüllt sein müssen. Es folgt das Protokoll für die **beiden Klinisch-Neurologischen Untersuchungen**. Unten ist (mindestens) eine **Ergänzende Untersuchung** einzutragen. Am Ende muss **ganz unten mit Datum und Uhrzeit eine Unterschrift** getätigt werden, dass der **irreversible Hirntod** festgestellt worden ist. Quelle: [20]

1.3.3.1.2 1. Klinisch-Neurologische Untersuchung

Nachdem alle Voraussetzungen zur HTD erfüllt worden sind, wird die 1. Klinisch-Neurologische Untersuchung durchgeführt. Hierbei wird der Glasgow Coma Score überprüft, welcher bei Vorhandensein des Hirntodes „3“ sein muss (=kein Öffnen der Augen, keine vorhandene verbale Reaktion, keine vorhandene Reaktion auf Schmerzreiz) [30].

Durch die fehlende Funktion des Gehirns bei Hirntod dürfen zudem keine Hirnnervenreflexe mehr vorhanden sein. Weiters muss eine schlaffe Tetraplegie vorliegen. Atropin verursacht normalerweise bei Applikation einen Anstieg der Herzfrequenz. Bei Hirntod ist diese Reaktion des Herzens nicht mehr vorhanden. Durch Gabe von 2mg Atropin i.v. wird im „Atropintest“ untersucht, ob es zu einem relevanten (>15%-igen) Herzfrequenzanstieg in den folgenden 3 Minuten kommt. Durch das Fehlen eines Herzfrequenzanstiegs wird angezeigt, dass das Herz nicht mehr innerviert ist [29].

Der letzte Test in der Klinisch-Neurologischen Untersuchung ist der „Apnoe-Test“, welcher nur einmal während der HTD durchgeführt werden muss. Er stellt durch das kurze Diskonnektieren des Beatmungsgerätes fest, ob die Patientin oder der Patient bei einem Anstieg des paCO_2 eine Spontanatmung aufweist. Ein Fehlen derselben bedeutet einen Ausfall des Atemzentrums im Gehirn.

Alle notwendigen Untersuchungen befinden sich auf dem HTD-Protokoll im Feld „Klinisch-Neurologische Untersuchung“ (siehe Abbildung 9).

1.3.3.1.3 Ergänzende Untersuchung

Als nächstes wird eine „Ergänzende Untersuchung“ durchgeführt. Alle Möglichkeiten einer „Ergänzenden Untersuchung“ werden in Tabelle 4 zusammengefasst.

Untersuchung	Ergebnis, um den Hirntod festzustellen
EEG (30 Minuten, Verstärkung:2 µV/mm)	isoelektrisches EEG, Null-Linien-EEG
Transkranielle Dopplersonographie (TCD)	zerebraler Kreislaufstillstand
farbcodierte Duplex-Sonographie (FDS)	zerebraler Kreislaufstillstand
Computertomographie-Angiographie (CTA)	zerebraler Kreislaufstillstand

Tabelle 4: Möglichkeiten der „Ergänzenden Untersuchung“ und dem Ergebnis bei vorherrschendem Hirntod

Quelle: [20]

Ist eine „Ergänzende Untersuchung“ der Patientin oder des Patienten auf Grund ihres oder seines Zustandes nicht möglich, hat man (nur) bei primär supratentoriellen Läsionen folgende Möglichkeit: Zwischen der ersten und zweiten Klinisch-Neurologischen Untersuchung wird ein definierter Beobachtungszeitraum gelassen (siehe Tabelle 5). Ergibt die zweite Klinisch-Neurologische Untersuchung nach dem Einhalten des definierten Beobachtungszeitraumes in allen Punkten wiederum das Vorliegen eines Hirntodes, so ist seine Feststellung auch ohne „Ergänzende Untersuchung“ zulässig. [20]

Alter	Beobachtungszeitraum
Erwachsene und Kinder über 2 Jahre	12 Stunden
Kleinkinder (2 Monate- 2 Jahre)	24 Stunden
Säuglinge (7.Lebenstag - 2 Monate)	72 Stunden

Tabelle 5: Beobachtungszeitraum bei primär supratentoriellen Läsionen wenn eine „Ergänzende Untersuchung“ nicht möglich ist.

Quelle: [20]

Im Klinikalltag hat sich das EEG als „Ergänzende Untersuchung“ durchgesetzt, da es:

- nicht invasiv ist
- direkt am Patientinnen- oder Patienten-Bett durchgeführt werden kann
- es die beste Wiedergabe der kortikalen Aktivität besitzt

Dokumentiert wird die „Ergänzende Untersuchung“ einerseits über den Fachbefund selbst, andererseits wird er im unteren Teil des HTD-Protokolls eingetragen (siehe Abbildung 9).

1.3.3.1.4 2. Klinisch-Neurologische Untersuchung

Im Anschluss an die „Ergänzende Untersuchung“ folgt die 2. Klinisch-Neurologische Untersuchung, welche wie die erste durchgeführt wird (siehe Kapitel 1.3.2.1.2 und Abbildung 9) [20].

1.3.3.1.5 Feststellung des irreversiblen Hirntods

Zusammengefasst wird der **irreversible Hirntod** bei einer Patientin oder bei einem Patienten diagnostiziert, wenn:

- alle **Voraussetzungen** wie im HTD-Protokoll erfüllt sind
 - alle Punkte der beiden Klinisch-Neurologischen Untersuchungen zutreffen**
 - die „**Ergänzende Untersuchung**“ den Hirntod feststellt
- [20]

1.3.3.2 Widerspruchslösung

In Österreich herrscht bezüglich der Organspende die **Widerspruchslösung**, welche durch das OTPG reglementiert wird [22].

Eine Multiorganentnahme bei Hirntoten darf demnach nur durchgeführt werden, wenn laut § 5. (1) OTPG:

- keine „(...)Erklärung vorliegt, mit der die/der Verstorbene oder, vor deren/dessen Tod, ihr/sein gesetzlicher Vertreter eine Organspende ausdrücklich abgelehnt hat“ [22]
- die Patientin oder der Patient nicht im Widerspruchsregister der Gesundheit Österreich GmbH eingetragen ist [22]

1.3.3.3 Medizinische (Kontra-)Indikationen

Verständlicherweise müssen auch medizinische Kriterien erfüllt sein, um eine Organspende durchzuführen. Hierbei sind folgende Punkte zu erfüllen, um eine Patientin oder einen Patienten überhaupt als „potenzielle“ Organspenderin oder als „potentiellen“ Organspender in Betracht zu ziehen (unabhängig davon, ob die Organe später alloziert werden können, oder nicht):

- Hirntod
- 0 – 90 Jahre
- kein metastasierendes Malignom
- keine massive Sepsis / septischer Schock

[24]

1.3.4 Transplantationswesen in Österreich

Um einen hohen Qualitätsstandard im Transplantationswesen zu gewährleisten, ist Österreich in 4 Regionen unterteilt. Jeder Region ist ein Transplantationszentrum zugeteilt. In jedem dieser Transplantationszentren werden unterschiedliche Arten von Organtransplantationen durchgeführt (siehe Tabelle 6) [23].

Region	Bundesland	TX-Zentrum	HTX	LuTX	PTX	LTX	NTX
Nord	Oberösterreich	Linz					X
Süd	Kärnten und Steiermark	Graz	X		X	X	X
West	Tirol, Vorarlberg und Salzburg	Innsbruck	X	X	X	X	X
Ost	Wien, Burgenland und Niederösterreich	Wien	X	X	X	X	X

Tabelle 6: Unterteilung Österreichs in Regionen mit den zugehörigen Transplantationszentren und den durchgeführten Organtransplantationen im Jahre 2015

Wenn eine Organtransplantation im jeweiligen Transplantationszentrum durchgeführt/angeboten wird, ist dieses mit einem „X“ markiert. (HTX = Herztransplantation, LuTX = Lungentransplantation, PTX = Pankreastransplantation, LTX = Lebertransplantation, NTX = Nierentransplantation), Quelle: [23]

Außerdem ist jeder dieser Regionen eine Transplantationsreferentin oder ein Transplantationsreferent zugeteilt (außer in Region Ost zwei), welche oder welcher u.a. eng mit den spenderbetreuenden Intensivstationen/Transplantationszentren zusammen arbeitet und Öffentlichkeitsarbeit leistet [23].

Im Jahre 2015 konnten so in Österreich 195 Organentnahmen bei Spenderinnen oder Spendern realisiert werden, was einem Durchschnittswert von 22,7 Spenderinnen oder Spendern pro Million Einwohnerinnen und Einwohner entspricht. Österreich liegt damit weltweit im Spitzenfeld der Organspende [23].

Dem gegenüber warteten im Jahre 2015 829 Patientinnen und Patienten auf ein oder mehrere geeignete Spenderinnen- oder Spenderorgane in Österreich [23].

1.3.5 Eurotransplant

Eurotransplant (ET) ist eine Organisation mit Sitz in Leiden, Niederlande.

Der Eurotransplantraum umfasst ca. 135 Millionen Menschen in 8 Ländern (Belgien, Deutschland, Ungarn, Luxemburg, Kroatien, Niederlande, Österreich, Slowenien) (siehe Abbildung 10). Eurotransplant hat die Aufgabe, Spenderinnen- oder Spenderorgane nach ethischen und medizinischen Kriterien zu verteilen. [27]

Bei der Allokation der Spenderinnen- oder Spenderorgane spielen im Allgemeinen 4 Prinzipien eine Rolle:

- das Outcome nach der Transplantation
- die Dringlichkeit der Transplantation
- die Wartezeit der Patientin oder des Patienten auf der Warteliste
- die Wahrung des Gleichgewichts in der nationalen Austauschbilanz

[27]

Durch die zentrale Führung einerseits der Wartelisten und andererseits der Organspenderinnen- und Organspendermeldungen und dem immens großen Einzugsgebiet des Eurotransplantraumes ergibt sich der Vorteil, dass man für beinahe jedes Spenderinnen- oder Spenderorgan die passende Empfängerin oder den passenden Empfänger findet [27].

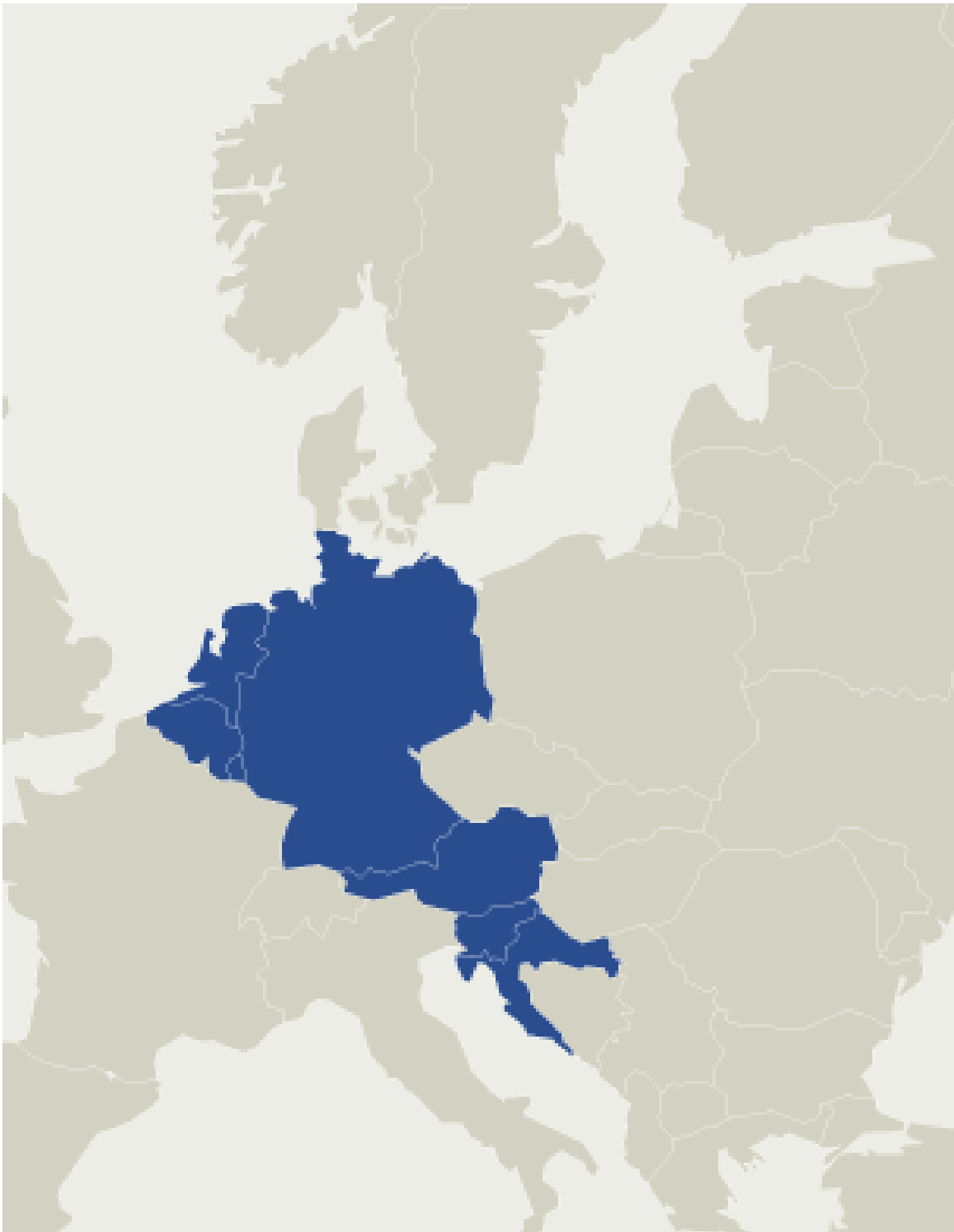


Abbildung 10: Eurotransplantraum

Der Eurotransplantraum umfasst ca. 135 Millionen Menschen in 8 Ländern (Belgien, Deutschland, Ungarn, Luxemburg, Kroatien, Niederlande, Österreich, Slowenien), Quelle: eurotransplant.org

2 Material und Methoden

2.1 Spenderkriterien

Für die Etablierung der Kontrollgewebebank Lungengesunder wurden die Lungen (beide Lungenflügel) von vier Organspenderinnen und sechs Organspendern entnommen. Dafür lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vor (Votum Nr. EK 26-296 ex 13/14). Die klinischen und persönlichen Daten der Organspenderinnen und Organspender wurden anonymisiert und liegen in chiffrierter Form den Koordinatorinnen und Koordinatoren des Departments für Transplantchirurgie (Chirurgische Universitätsklinik) der Medizinischen Universität vor.

Für die Entnahme der Spenderlungen mussten diese beiden Voraussetzungen erfüllt sein:

Einerseits musste beim Organspender der Hirntod festgestellt sein. Die Hirntoddiagnostik wurde entsprechend dem Beschluss des Obersten Sanitätsrates vom 16. November 2013 durchgeführt („Empfehlungen zur Durchführung der Hirntoddiagnostik bei einer geplanten Organentnahme“) [20].

Andererseits durften die Lungen der Organspenderinnen und Organspender **nicht** transplantabel sein, was im Rahmen der Organentnahme entsprechend dokumentiert wurde. An dieser Stelle wird ausdrücklich versichert, dass den Patientinnen und Patienten auf der Warteliste in keinsten Art und Weise ein Schaden oder ein Nachteil durch diese Studie entstanden ist.

2.2 Entnahme und Transport der Lungen

Die Lungenflügel wurden nach der Entnahme ohne jegliche Flüssigkeitszugabe in einen durchsichtigen sterilen Leber-Organbeutelverpackt und mit den beiliegenden Ligaturen luftdicht verschlossen. Danach wurden die Lungenflügel in eine Styroporbox gegeben, welche normalerweise für den Transport von Organen für die Transplantation verwendet werden. Die Styroporbox wurde voll mit Eis gefüllt und verschlossen, sodass eine

Temperatur von ca. 4 Grad Celsius vorherrschte. Es wurde darauf geachtet, dass das Organ erst in die Styroporbox gelegt und danach erst mit crushed ice gefüllt wurde. Diese Reihenfolge wird auch beim Einpacken von Organen für die Organtransplantation gehandhabt. Würde man erst das crushed ice in die Styroporbox geben und danach das Organ im Organbeutel direkt auf das crushed ice legen, wäre das Risiko gegeben, dass durch die Schwerkraft das Organ auf das crushed ice gedrückt wird und so Schäden durch das Anfrieren des Organes entstehen könnten.

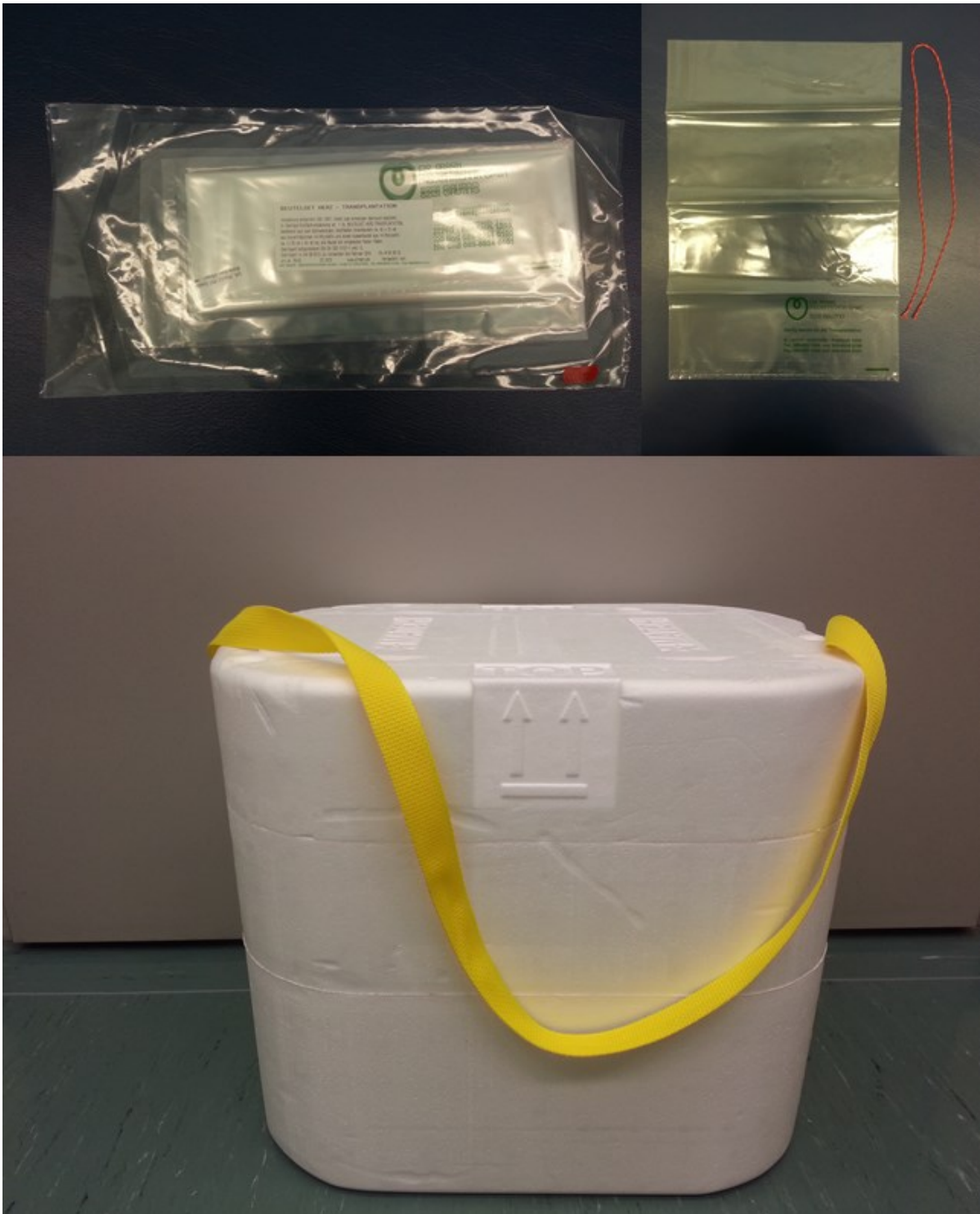


Abbildung 11: Transport der explantierten Lungen

Es werden oben links eine Packung mit 3 steril verpackten Organbeuteln incl. Ligaturen zum Verschließen abgebildet. Oben rechts ist ein steriler Organbeutel incl. Ligaturen zu sehen. Das Bild in der Mitte unten zeigt eine Organbox, welche für den Transport von explantierten Nieren verwendet wird. Quelle: privat

2.3 Fixation der Atemwege, Präparation der Lunge und Fixation der Lungenflügel

2.3.1 Fixation der Atemwege

Nach dem Auspacken der Lunge werden die beiden Lungenflügel getrennt, sofern dies nicht schon bei der Entnahme geschehen ist. Beide Lungenflügel werden separat fixiert. Es folgt die Fixation der Lungenflügel durch die Atemwege (Instillationsfixation). Ein Endotrachealtubus wird in den Hauptbronchus eingeführt und sein Cuff geblockt. Der Tubus wird an einen Kanister angehängt, der mit Fixationslösung (in diesem Falle eine 2,5%ige Glutaraldehydlösung) gefüllt ist. Diese wird mit einem Druck von 25cm Wassersäule passiv instilliert. Die Füllmenge variiert verständlicherweise durch die variable Größe des Lungenflügels. Nach Füllen des Lungenflügels wird der Atemweg maximal proximal zum Gewebe durch eine Klemme verschlossen. Der Cuff wird wieder entblockt und der Endotrachealtubus aus dem Atemweg entfernt. Der zweite Lungenflügel wird auf dieselbe Art und Weise fixiert. Der Lungenflügel gelangt in ein Gefäß, das ebenfalls mit einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung gefüllt ist.

2.3.2 Präparation der Lunge

Nach Fixation der Lungenflügel, wird alles Gewebe welches nicht zur Lunge gehört (z.B. Gefäße oder Atemwege distal der angebrachten Klemme) entfernt.

2.3.3 Fixation der Lungenflügel

Nach Fixation der Lungenflügel durch die Atemwege und der Entfernung allen nicht zur Lunge gehörenden Gewebes werden die Lungenflügel nun als Ganzes in einem Glasbehälter fixiert.

Bei einem Lungenflügel wurde nun nach der Cavalieri-Methode das Gesamtvolumen berechnet und danach die Probeentnahme durchgeführt. Der andere Lungenflügel bleibt im Fixativ.

2.4 Cavalieri-Methode zur Messung des Gesamtvolumens der Lungenflügel

Die Lungen werden aus den Glasbehältern mit dem Fixativ herausgenommen und in einem Behälter mit Leitungswasser eingetaucht um vom Fixativ befreit zu werden. Nun wird eine haushaltsübliche Brotschneidemaschine verwendet, bei der eine Schnittbreite von 0cm bis 2cm möglich ist. Der Lungenflügel wird nun in der Transversalebene geschnitten. Es wird von cranial (bzw.apikal) nach caudal geschnitten. Dabei ist die erste Schnittbreite randomisiert zwischen 0cm und 2cm. Die darauffolgenden Schnitte werden von dieser Schnittebene beginnend in einer konstanten Breite von 2cm geschnitten. Jeder Schnitt des Lungenflügels wird nun mit der apikalen Seite nach oben auf einen Tisch gelegt. Nun wird eine durchsichtige Folie mit einem Punktgitter mit definiertem Abstand der Punkte (in unserem Fall 2cm) zur Hand genommen. Zusätzlich ist jeder zweite Punkt auf dem Punktgitter eingekreist.

Es wird nun auf jede apikale Lungenflügelschnittfläche die Folie mit dem Punktgitter randomisiert aufgelegt. Ein Lineal und eine klare Beschriftung zur Identität des Lungenflügelschnittes werden danebengelegt. Nun wird mit einem digitalen Fotoapparat (Panasonic DMC-LX7) ein Foto auf grünem Hintergrund gemacht, um das Lungengewebe klar abzugrenzen (siehe Abbildung 12). Um immer die die gleiche Perspektive der Lungenflügelschnitte zu gewährleisten, wurde der Fotoapparat an einem Stativ befestigt.

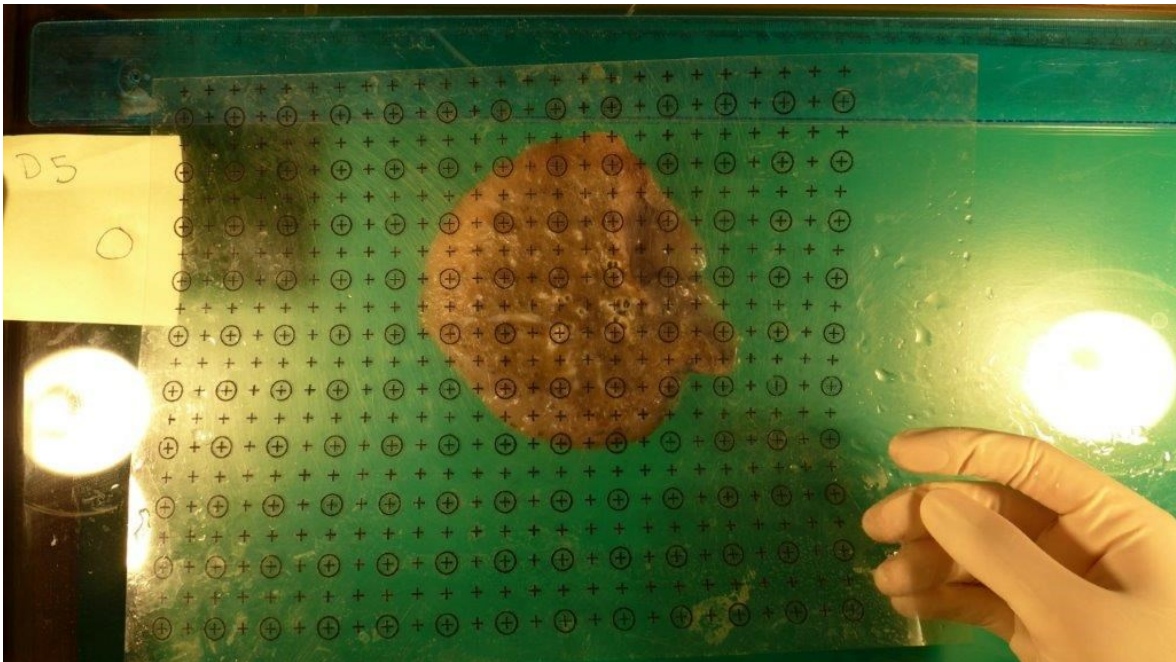


Abbildung 12: Lungenflügelschnittoberfläche zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge

Es wird eine Lungenflügelschnittoberfläche gezeigt, wie sie zur Berechnung des Gesamtvolumens der Lunge fotografiert wurde. Der Lungenflügelschnitt zeigt mit der apikalen Schnittfläche nach oben. Der Hintergrund ist grün, um das Lungengewebe besser abgrenzen zu können. Eine Folie mit einem Punktgitter wurde randomisiert auf den Lungenflügelschnitt gelegt. Ein Lineal (im oberen Bereich des Bildes) dient zur Größenorientierung.

Der Zettel oben links im Bild dient zur Identifikation des fotografierten Lungenflügelschnittes. Die Hand im Bild hebt nicht die Folie mit dem Punktgitter, sondern dient allein dazu die Folie so zu halten, dass durch die Lampen rechts und links im Bild keine Reflexionen im Punktgitter auftreten. Somit ist die Lungenflügelschnittoberfläche klar erkennbar unter der Folie. Quelle: privat

2.5 SURS zur Probeentnahme

Nachdem die Lungenflügelschnitte mit dem Punktgitter fotografiert worden sind, folgt die Probeentnahme nach dem SURS. Dazu geht man wie folgt vor:

Im **ersten** Arbeitsschritt unterteilt man die Lungenflügelschnitte in drei ungefähr gleich große Gruppen. Sie werden in „Oben“, „Mitte“ und „Unten“ benannt. Abbildung 13 verdeutlicht die Aufteilung der Lungenflügelschnitte.

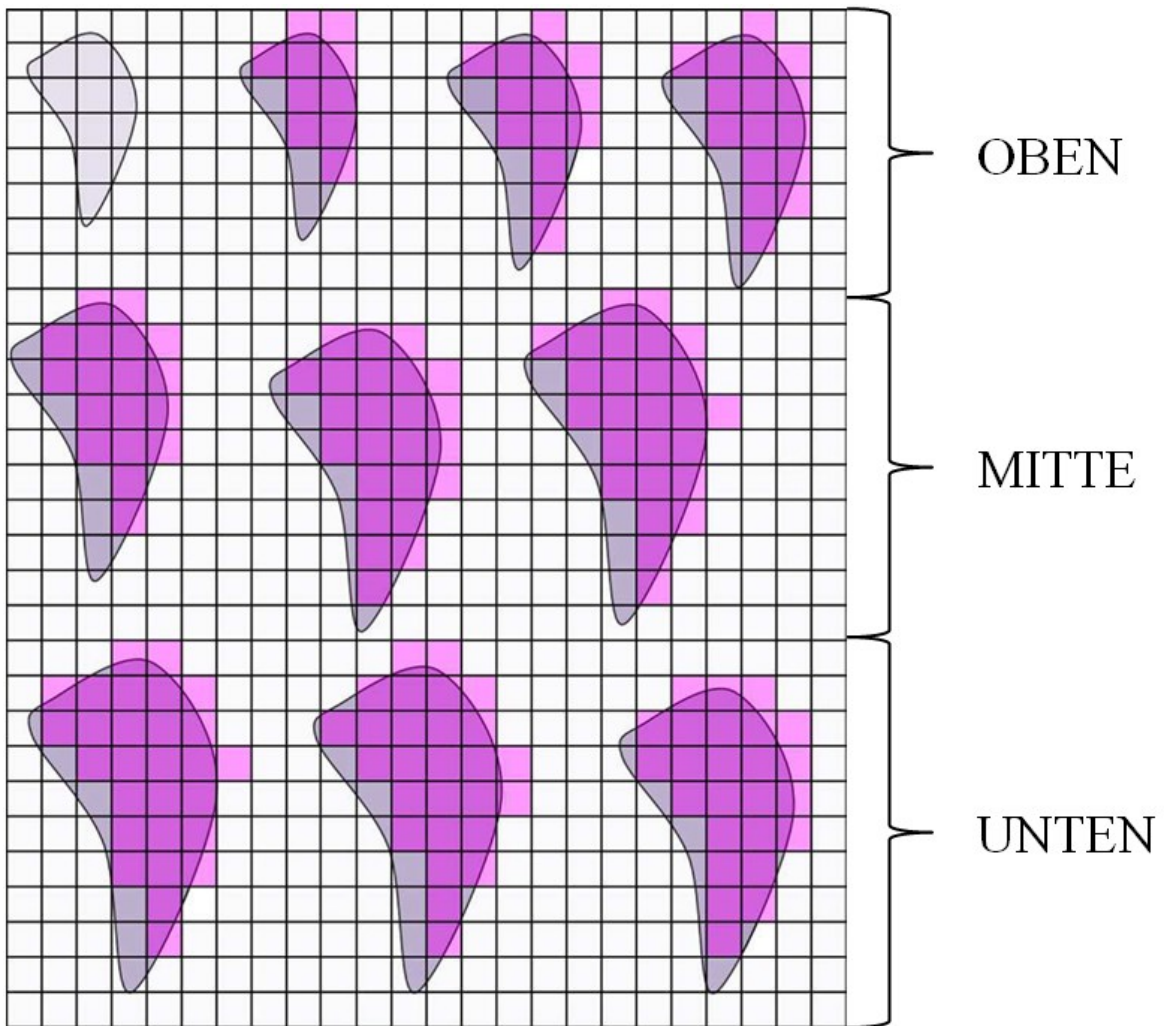


Abbildung 13: Unterteilung der Lungenflügelschnitte zur Probeentnahme

Es werden 10 Lungenflügelschnitte dargestellt. Die Schnittoberfläche der Lungenflügelschnitte ist grau gefärbt. Es wurde randomisiert ein Gitternetz mit gleich großen Quadraten auf die Lungenflügelschnittflächen gelegt. Die violett eingefärbten Quadrate, stellen ein Zählereignis dar. Als Zählereignis gilt, wenn die linke untere Ecke eines Quadrates die Lungenflügelschnittfläche berührt. In dieser Abbildung sind alle Lungenschnitte mit der apikalen Schnittfläche nach oben gedreht. Beim obersten linken Lungenflügelschnitt handelt es sich um den apikalsten Teil der Lunge, der logischerweise oben keine Schnittfläche hat.

Die Lungenflügel werden in drei ungefähr gleichgroße Gruppen unterteilt: „Oben“, „Mitte“ und „Unten“, modifiziert nach Quelle [3]

Es werden nun aus jeder der 3 Gruppen je 10 Proben entnommen. Dies ergibt insgesamt pro Lungenflügel 30 Probeentnahmen. Die Probeentnahme erfolgt nach dem SURS.

Dazu nimmt man im **zweiten** Arbeitsschritt alle Lungenflügelschnitte einer Gruppe („Oben“, „Mitte“ oder „Unten“) und legt diese nebeneinander auf einen Tisch.

Im **dritten** Arbeitsschritt wird bestimmt an welchem Ort die Proben entnommen werden. Dazu werden alle Lungenflügelschnittoberflächen einer Gruppe in gleich große Würfel unterteilt: Man nimmt eine durchsichtige Folie mit einem Gitternetz mit gleich großen Quadraten und legt diese auf die Lungenflügelschnittoberflächen (siehe Abbildung 13). Nun wird die Anzahl der Quadrate, welche eine Lungenflügelschnittoberfläche treffen gezählt und durch 10 (=die gewünschte Anzahl an Proben) dividiert. Dadurch weiß man, dass man jedes x-te Quadrat als Probe entnimmt. Mit einem Würfel wird randomisiert, bei welchem Quadrat man anfängt die Proben zu entnehmen (Möglichkeiten: 1 Probe – x-te Probe)

Beispiel: Man zählt 35 Quadrate, welche die Lungenflügelschnittoberfläche der „Oberen“ Gruppe treffen. $35/10= 3,5$. Man entnimmt also jedes vierte Quadrat mit einem scharfen Messer. Bei welchem Quadrat man mit der Probeentnahme beginnt (erstes, zweites, drittes oder viertes Quadrat), wird randomisiert mit einem Würfel.

Man kommt also auf 8 Gewebeproben ($35/4= 8$). Die zwei restlichen Proben werden randomisiert entnommen. Vor der Entnahme markiert man auf der apikalen Seite die obere rechte Ecke des zu entnehmenden Lungengewebes mit einer Stecknadel, um die Orientierung beizubehalten (siehe Abbildung 14).

Im **vierten** Arbeitsschritt wird jedem der 10 Proben ein ca. 1,0x1,0x0,3cm Gewebeblock entnommen und in eine beschriftete Kapsel gegeben (siehe Abbildung 14). Diese werden danach in einem Behälter mit dem Fixativ fixiert.

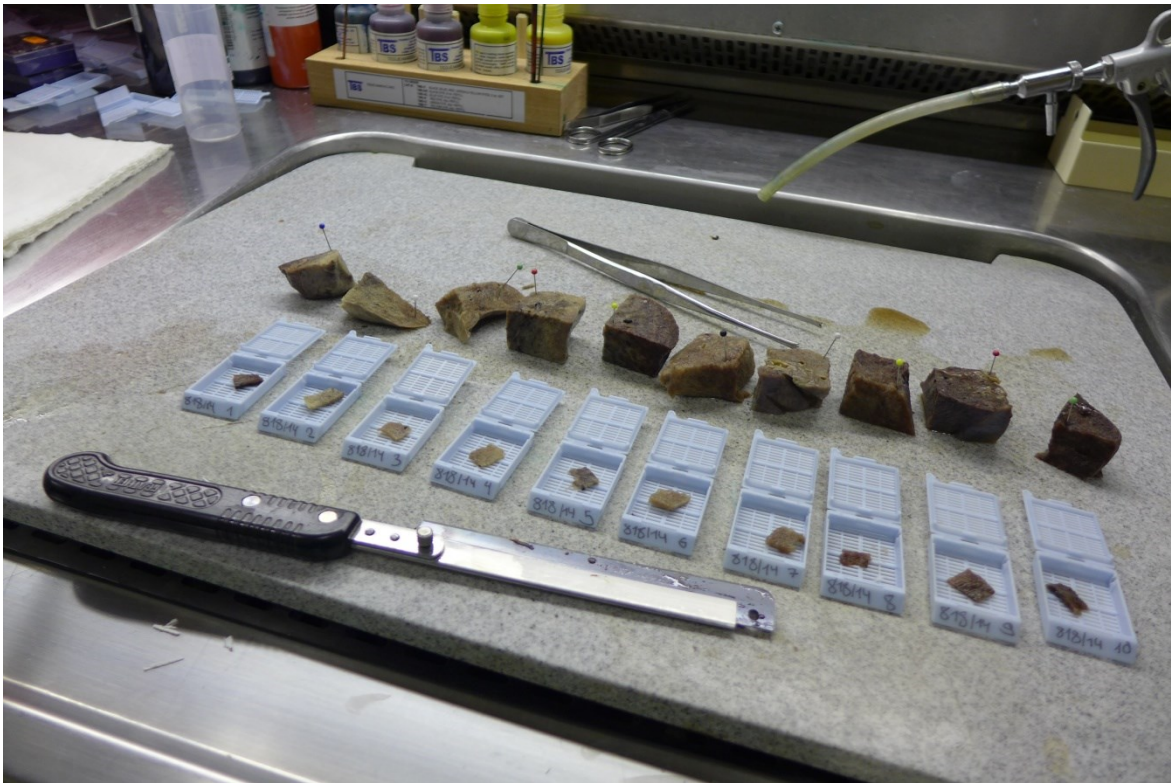


Abbildung 14: Entnommenen Gewebeblöcke nach dem SURS

Es wird unten ein Messer mit auswechselbaren Klingen gezeigt, mit welcher die Proben entnommen wurden. Oben sind 10 Gewebeblöcke zu sehen, welche mit einer Stecknadel auf der rechten oberen apikalen Ecke markiert sind (die unterschiedlichen Farben der Stecknadelköpfe haben keine Bedeutung). Unter den Gewebsblöcken befinden sich 10 ca. 1,0x1,0x0,3cm große Gewebestücke in hellblauen Kapseln eingelegt. Diese wurden den Gewebsblöcken entnommen.
Quelle: privat

Im **fünften** Arbeitsschritt wird nun jeder zweite Gewebeblock ausgewählt. Ob man beim ersten oder zweiten Gewebeblock anfängt zu zählen wird mit einer Münze entschieden (Kopf=erster, dritter, fünfter... Gewebeblock wird genommen, Zahl=zweiter, vierter, sechster... Gewebeblock wird genommen). Es werden also insgesamt 5 Gewebeblöcke randomisiert entnommen. Die restlichen 5 Gewebeblöcke werden im Fixativ belassen.

Im **sechsten** Arbeitsschritt werden die 5 Gewebeblöcke mit der **IUR (Isotropic uniform random) sampling-Methode** desorientiert. In Kapitel 1.2.4.3 wird zusammen mit Abbildung 7 das IUR (Isotropic uniform random) sampling beschrieben.

Nun werden die Arbeitsschritte 2-7 mit den restlichen Gruppen („Oben“, „Mitte“, „Unten“) wiederholt. Abbildung 15 stellt alle Arbeitsschritte der Probeentnahme noch einmal Schritt für Schritt dar.

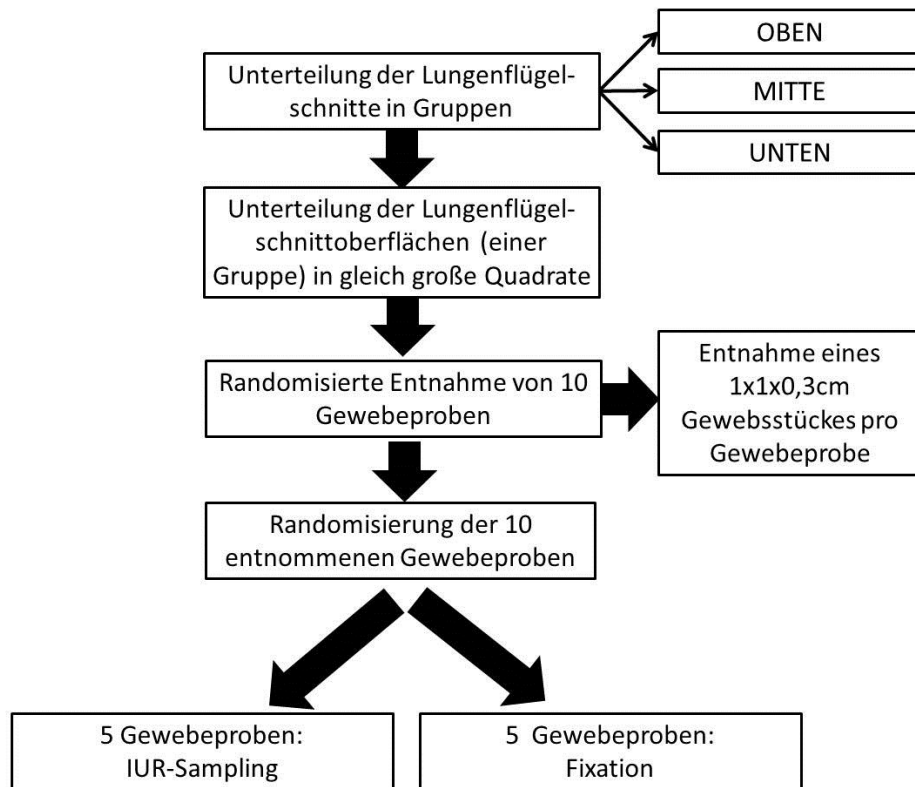


Abbildung 15: Übersicht der Arbeitsschritte bei der Probenentnahme

3 Ergebnisse

Es konnte erfolgreich eine kleine Gewebekbank von Lungengesunden etabliert werden. Im Gegensatz zu morphologisch unauffälligen Lungenproben (etwa im Rahmen einer Lobektomie entnommen), die im Archiv der Biobank der Medizinischen Universität Graz vorliegen, wurde das Gewebe der Organspenderinnen und Organspender nach den stringenten Vorgaben des SURS gesampelt. Dieses wertvolle Gewebe kann für zukünftige vergleichende morphologische Studien als Kontrollgewebe verwendet werden. Konkret sind an der Medizinischen Universität Graz Studien im Prozess der Durchführung, die sich vor allem auf die quantitative Morphologie der Lungengefäße bei verschiedenen Formen des Lungenhochdrucks fokussieren. Damit wurde die einzigartige Basis geschaffen, das Lungengefäßsystem erstmals quantitativ erfassen zu können, auch im Kontext von Alter und Geschlecht.

4 Diskussion

4.1 Zweck der Gewebebank

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es die Etablierung der Gewebebank mit stereologisch präparierten Lungen auf dem Institut für Pathologie am LKH Graz zu beschreiben. Am Ende soll die Gewebebank dazu dienen, auf Daten von stereologisch präparierten „gesunden und normalen“ Lungen zugreifen zu können.

Parallel zu den stereologisch präparierten „gesunden und normalen“ Lungen werden pathologisch veränderte Lungenflügel untersucht. Hierbei wurde der bei der Lungentransplantation kranke explantierte Lungenflügel (nach Informed consent des Empfängers) verwendet. Diese pathologisch veränderten Lungenflügel werden nach denselben stereologischen Methoden präpariert wie die „gesunden“ Lungen.

Am Ende will man die pathophysiologischen Veränderungen der erkrankten Lungenflügel mit dem „gesunden“ Gewebe der Spenderlungen vergleichen. So hofft man neue Erkenntnisse in Bezug auf den Pathomechanismus von Erkrankungen der Lunge zu gewinnen. In weiterer Folge will man das neu gewonnene Wissen nutzen, um bessere Therapiemöglichkeiten für den Patienten zu entwickeln.

4.2 Erforschung von humanem Gewebe

Insgesamt wurden bis dato 10 Lungen von Organspenderinnen und Organspendern in die Gewebebank aufgenommen und präpariert. 6 Organspender waren männlich, 4 weiblich. In der Stereologie ist es immer noch (u.a. aus ethischen Gründen) eine Seltenheit menschliche Lungen zu verwenden. Tierversuche nehmen immer noch den größten Teil der Forschungsobjekte ein (siehe Tabelle 7) [15].

Species investigated by morphometry

Species	AJP	AJRCMB	Sum	Relative Fraction, %
Mouse	26	43	69	57.5
Rat	13	10	23	19.2
Guinea pig	1	2	3	2.5
Hound	1	0	1	0.8
Sheep	2	0	2	1.7
Human or nonhuman primate	5	6	11	9.2
Horse	2	0	2	1.7
Other	8	1	9	7.5

AJP, American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology; AJRCMB, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.

Tabelle 7: Aktuelle prozentuelle Verteilung der durch Morphometrie untersuchten unterschiedlichen Spezies

Review von zwei Journals (AJP und AJRCMB), welche den höchsten Impact Faktor der letzten Jahre in ihrem Fachgebiet hatten (basic lung research journals). Es wurde über die letzten 2 Jahre der Gebrauch von stereologischen/morphometrischen Methoden (in Bezug auf die Lunge) untersucht. Diese Tabelle zeigt die prozentuelle Verteilung, welche Spezies morphometrisch untersucht worden sind. Quelle: [15]

4.3 Ziel der Forschung

Es ist primär geplant, den Fokus der Forschung auf die pathologischen Veränderungen des Lungengefäßsystems zu richten und u. a. Veränderungen bei pulmonalem Hypertonus näher zu erforschen. Die Gewebebank mit den Spenderlungen wurde wie oben beschrieben als „gesunde“ Vergleichsgruppe zu Forschungsprojekten etabliert, welche pathologisch veränderte Lungen erforschen sollen.

Dementsprechend hat man die Präparation und Morphometrie der Spenderlungen (wie weiter unten beschrieben) an den Fokus der zukünftigen Forschungsziele angepasst. In einfachen Worten wurden die „gesunden“ Spenderlungen auf die gleiche Art und Weise stereologisch bearbeitet wie die pathologisch veränderten Lungen. Das Augenmerk war darauf gerichtet, dass das Lungengefäßsystem gut beurteilbar ist. Deshalb werden im nächsten Kapitel Schritt für Schritt die Gedanken hinter der Auswahl der Präparationsmethode und Morphometrie der Spenderlungen beschrieben.

In der derzeit aktuellen stereologischen/morphometrischen Lungen-Forschung nimmt die Untersuchung des „normalen“ Lungengewebes/-entwicklung, wie man es an der oben beschriebenen Gewebebank gemacht hat, ungefähr ein Zehntel des Forschungsfeldes ein. Im restlichen Teil der stereologischen/morphometrischen Lungen-Forschung widmet man sich (neben einigen wenigen Ausnahmen) ungefähr gleich verteilt folgenden pathologischen Veränderungen der Lunge: pathologische Entwicklung der Lunge, bronchopulmonale Dysplasien, Verletzungen, Entzündungen, pulmonaler Hypertonus, COPD, Emphyseme. (siehe Tabelle 8) [15].

Biomedical topics addressed by morphometry

Subject	AJP	AJRCMB	Sum	Relative Fraction, %
Normal lung development	8	4	12	12.1
Pathological development, bronchopulmonary dysplasia	9	11	20	20.2
Injury, inflammation	5	10	15	15.2
Pulmonary hypertension	9	6	15	15.2
COPD, emphysema	4	14	18	18.2
Asthma, airway hyperreactivity	3	6	9	9.1
Compensatory lung growth, postpneumonectomy	0	1	1	1.0
Method development	1	2	3	3.0
Other	4	2	6	6.1

COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

Tabelle 8: Prozentuelle Verteilung der aktuellen biomedizinischen Forschungsthemen in Bezug auf die Morphometrie der Lunge

Review von zwei Journals (AJP und AJRCMB), welche den höchsten Impact Faktor der letzten Jahre in ihrem Fachgebiet hatten (basic lung research journals). Es wurde über die letzten 2 Jahre der Gebrauch von stereologischen/morphometrischen Methoden (in Bezug auf die Lunge) untersucht. Diese Tabelle zeigt die prozentuelle Verteilung der aktuellen biomedizinischen Forschungsthemen in Bezug auf die Morphometrie der Lunge. Quelle: [15]

4.4 Methodenauswahl bei der Präparation der Spenderlungen

4.4.1 Fixation des Lungenflügels

Die Lunge wurde nach der Explantation in beide Lungenflügel getrennt. Es folgte die Fixation der Lungenflügel über die Atemwege. Diese Fixationsmethode mit einer Glutaraldehydlösung als Fixativum hat den Vorteil, dass sämtliche Strukturen besonders gut erhalten werden können.

4.4.2 Berechnung des Gesamtvolumens der Lungenflügel

Zur Berechnung des Gesamtvolumens des Lungenflügels wurde das Cavalieri-Prinzip gewählt. Wie in Kapitel 1.2.3.3 beschrieben, hat diese Methode mehrere Vorteile gegenüber dem Archimedes-Prinzip [11].

4.4.3 Zuschneiden der Lungenflügel zur Morphometrie

Um jedem Gewebe die gleiche Chance zu geben, analysiert zu werden wurde das SURS zur Probeentnahme angewandt. So können Messergebnisse ohne Bias erzielt werden [3].

Nach der Probeentnahme wurde das IUR-Sampling verwendet. Diese Methode eignet sich (wie in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben) sehr gut um Oberflächen oder Längen von Gefäßen oder der Atemwege zu bestimmen [11]. So können später wie geplant pathologische Veränderungen des Lungengefäßsystems und Erkrankungen wie der pulmonale Hypertonus mit den „gesunden“ Spenderlungen verglichen werden.

Schaut man sich die Lungenkompartimente an, welche derzeit am häufigsten morphometrisch erforscht werden, so stellt man fest, dass in über der Hälfte der Fälle Alveolen als Zielstruktur untersucht worden sind. Als nächsthäufigere Struktur wird das vaskuläre System der Lungen, dicht gefolgt von den Atemwegen erforscht (Tabelle 9) [15].

Lung compartments addressed by morphometry

Lung Compartment	AJP	AJRCMB	Sum	Relative Fraction, %
Airways	9	11	20	16.3
Vasculature	17	11	28	22.8
Alveoli	27	41	68	55.3
Other	5	2	7	5.7

Tabelle 9: Prozentuelle Verteilung der morphometrisch untersuchten Lungenkompartimente

Review von zwei Journals (AJP und AJRCMB), welche den höchsten Impact Faktor der letzten Jahre in ihrem Fachgebiet hatten (basic lung research journals). Es wurde über die letzten 2 Jahre der Gebrauch von stereologischen/morphometrischen Methoden (in Bezug auf die Lunge) untersucht. Diese Tabelle zeigt die prozentuelle Verteilung, welche Lungenkompartimente morphometrisch untersucht worden sind. Quelle: [15]

4.4.4 Morphometrie der Gewebeproben

Nach dem Zuschneiden der Gewebeproben folgte die Einbettung zur Morphometrie. Hierbei hat man 10 Proben in Paraffin und 5 Proben in Glycolmethylacrylat eingebettet.

Die Einbettung in Glycolmethylacrylat ringt den Vorteil, dass das Gewebe im Gegensatz zu Paraffin nicht schrumpft, allerdings sind hier eventuell nötige immunhistochemische Untersuchungen nicht möglich. .

Von den Gewebelöcken werden Schnitte mit einer Dicke von 3µm angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Diese Schnitte werden mit einer speziellen Software (Visiopharm, Arhus, Denmark) ausgewertet.

4.5 Conclusion

Stereologie als Methode gibt die Möglichkeit ein Organ als Ganzes ohne Bias zu beurteilen [3]. Die stereologisch präparierten Spenderlungen in der neu etablierten Gewebebank sollen in Zukunft als „gesunde und normale“ Kontrollgruppe dienen. In weiteren Forschungsprojekten sollen pathologisch veränderte Lungen durch die gleichen stereologischen Methoden wie die „gesunden“ Spenderlungen präpariert und mit der Kontrollgruppe verglichen werden. Man hofft auf diese Weise neue Erkenntnisse in Bezug

auf Pathomechanismen der Lunge zu gewinnen, um dem Patienten in Zukunft bessere Therapiemöglichkeiten zu bieten.

5 Literaturverzeichnis

1. Baddeley A. International Society for Stereology. Available at: <http://stereologysociety.org/about.html>. Accessed 15.09.2016, 2016.
2. MBF Bioscience. Glossary terms. Available at: <http://www.stereology.info/glossary-terms/>. Accessed 15.09.2016, 2016.
- 3 Jan Philipp Schneider, Matthias Ochs. Stereology of the Lung. In: Michael Conn P., editor. Laboratory Methods in Cell Biology Imaging Volume 113 New York: Academic Press; 2013. p. 257-293.
4. Braendgaard H, Gundersen HJ. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods* 1986 Oct;18(1-2):39-78.
5. Wikipedia contributors. Archimedes. Available at: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Archimedes&oldid=747478431>. Accessed 15.09.2016, 2016.
6. Baddeley A, Vedel Jensen EB, editor. Stereology for Statisticians. Boca Raton: Chapman and Hall; 2005.
7. Miles RE, Davy PJ. Precise and general conditions for the validity of a comprehensive set of stereological fundamental formulae. *J Microsc* 1976(107):211-226.
8. Oldmixon EH, Suzuki S, Butler JP, Hoppin FG, Jr. Perfusion dehydration fixes elastin and preserves lung air-space dimensions. *J Appl Physiol* (1985) 1985 Jan;58(1):105-113.
9. Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D, Weibel ER. Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis: credits and limitations. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1982 Aug;53(2):528-533.
10. Yan X, Polo Carbayo JJ, Weibel ER, Hsia CC. Variation of lung volume after fixation when measured by immersion or Cavalieri method. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 Jan;284(1):L242-5.
11. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Feb 15;181(4):394-418.
12. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 1990 Sep;159(Pt 3):301-317.

13. Nyengaard JR, Gundersen HJG. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J Microsc* 1992(165):427-431.
14. Nyengaard JR, Gundersen HJG. Sampling for stereology in lungs. *European Respiratory Review* 2007;15(101):107-114.
15. Muhlfeld C, Hegermann J, Wrede C, Ochs M. A review of recent developments and applications of morphometry/stereology in lung research. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015 Sep 15;309(6):L526-36.
16. Ehmke H. Atmung. In: Beherends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. editor. *Duale Reihe: Physiologie*. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 224-265.
17. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Jan 1;169(1):120-124.
18. Ochs M, Muhlfeld C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013 Jul 1;305(1):L15-22.
19. Wikipedia contributors. Stereology. 2016; Available at: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Stereology&oldid=746126070>. Accessed 26.09.2016, 2016.
20. Empfehlungen zur Durchführung der Hirntoddiagnostik bei einer geplanten Organentnahme Entsprechend dem Beschluss des Obersten Sanitätsrates vom 16. November 2013. 2013; Available at: http://www.goeg.at/cxdata/media/download/empfehlungen_hirntoddiagnostik_organentnahme_inkl_protokoll.pdf. Accessed 12.10.2016, 2016.
21. DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. RICHTLINIE 2010/45/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 7. Juli 2010 über Qualitäts- und Sicherheitsstandards für zur Transplantation bestimmte menschliche Organe. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX:32010L0053>. Accessed 13.11.2016, 2016.
22. Bundesgesetz über die Transplantation von menschlichen Organen (Organtransplantationsgesetz – OTPG). Available at: <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20008119>. Accessed 13.11.2016, 2016.
23. Gesundheit Österreich GmbH Wien. ÖBIG-Transplant (2016): Transplant-Jahresbericht 2015. 2015 Mai 2016.

24. Zink M. Vortrag: Organspende und Transplantation, Im Rahmen des Kommunikationsseminares: „Organspende - Das Gespräch mit den Angehörigen“, Bad St. Leonard. 2016.
25. Eurotransplant Foundation. Eurotransplant Manual Chapter 9: The Donor Version 4.6, 15.09.2016, 2016
26. Deutsches Ärzteblatt. Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nr. 1 TPG für die Regeln zur Feststellung des Todes nach § 3 Abs. 1 S. 1 Nr. 2 TPG und die Verfahrensregeln zur Feststellung des endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms nach § 3 Abs. 2 Nr. 2 TPG, 2015 30. März 2015. Available at: DOI: 10.3238/arztebl.2015.rl_hirnfunktionsausfall_01. Accessed 14.11.2016, 2016.
27. Eurotransplant International Foundation. Über Eurotransplant. Available at: http://eurotransplant.org/cms/index.php?page=pat_austria. Accessed 14.11.2016, 2016.
28. Transplantationskoordination LKH Graz. Vortrag: TX-Koordination Region Süd, Im Rahmen des Kommunikationsseminares: „Organspende - Das Gespräch mit den Angehörigen“, Bad St. Leonard. 2014.
29. Thiel H, Roewer N. Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
30. Wikipedia. Glasgow Coma Scale. 2016; Available at: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Glasgow_Coma_Scale&oldid=159408935. Accessed 14.11.2016, 2016.