



Doctoral Thesis

Imaging of cellular and extra-cellular stressed matter using synchrotron radiation based micro-computed tomography

Author(s):

Thurner, Philipp Johannes

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004782528> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 15535

Imaging of Cellular and Extra-Cellular Stressed Matter Using Synchrotron Radiation Based Micro-Computed Tomography

Dissertation for the degree of

DOCTOR OF THE NATURAL SCIENCES

of the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH, SWITZERLAND

Presented by

Philipp Thurner
Dipl.-Ing. Technische Universität Graz

Born April 5 1973
Citizen of Austria

Accepted on the recommendation of:

Prof. J. A. Hubbell, examiner

Prof. R. Müller, co-examiner

Dr. U. Sennhauser, co-examiner

PD Dr. B. Müller, co-examiner

2004

Abstract

Quantitative endpoints have become an important factor of success in biology and biomedical engineering. Classically such endpoints were investigated with 2D imaging tools. The 3D character of tissue lost in such investigations and the applied methods are invasive and destructive. Moreover, it is known that cells behave quite differently in 2D or 3D environments. Therefore true 3D imaging has gained in importance as a tool for both qualitative and quantitative assessment of biological structures. In this context X-ray tomography is a very promising tool. However, the contrast of soft tissue specimen is limited at spatial resolutions in the micrometer range. Therefore new 3D methods are needed for true geometrical visualization of soft tissue. Additionally, if we are interested to investigate the effect of mechanical forces and displacements, we will need a non-destructive 3D technique that can be used in a time-lapsed fashion. All of that is true for X-ray tomography. Nevertheless, if we want to further explore X-rays as source for advanced 3D imaging of both hard and soft materials, high brilliance is required. Thus, it is reasonable to assume that cell and cell culture imaging using synchrotron radiation can close the current gap for X-ray tomography as a hierarchical tool for both soft and hard tissue imaging.

One field of investigation where we would like to apply this approach is osteoporosis research. This disease is characterized by low bone mass, reduced bone stability and increase in fracture risk. Nowadays it becomes increasingly apparent that besides bone mineral density also microarchitecture and local tissue properties such as microcracks, cell density and cell distribution, and the quality of the organic matrix play an important role for bone stability. Nevertheless, features such as microcracks can currently only be investigated using 2D microscopy. Thus a 3D method for the assessment of bone microcracks and bone cells would be advantageous. Additionally, the recently developed technique of image guided failure assessment allows detailed investigation of the bone failure process in a time-lapsed fashion. For the assessment of microdamage, tube-based systems are of insufficient spatial resolution. Thus a device for image guided failure assessment for synchrotron light would provide the ability to uncover bone failure in greater detail. Therefore the overall goals of this thesis are first the development of a visualization and analysis scheme for cells in soft and hard tissues requiring new staining techniques; second; to visualize and also analyze microcracks directly in the 3D bone matrix; and third to develop a device for image guided failure assessment in a synchrotron environment.

For the development of a cell stain, a cell culture model system consisting of a polymer yarn seeded with cells was devised as described in Chapter 4. Stains with high absorption, are needed for cell culture visualization; the required minimum detectable concentrations in the *mmol* range were calculated. Staining techniques based on osmium tetroxide and a gold-labeled lectin in combination with a gold-

enhancement suspension were successfully developed. Retrieved visualizations from synchrotron radiation micro-computed tomography were found to be in good agreement with images from conventional techniques such as light and electron microscopy. If the stained sample resulted in low contrast in reconstructed images, spatial resolution was traded for better contrast. In the model system, both the geometry of the cell culture and the scaffold were segmented and quantified in 3D for the first time. The variation of the lectin-based staining protocol showed that the quantified parameters depend linearly on the exposure time to the gold-enhancement. Differential absorption contrast applied for such samples showed similar, but so far no additional information. The different morphology of cell cultures of human foreskin fibroblasts and mouse calvaria osteoblast-like cells on the model system scaffold were uncovered qualitatively and quantitatively in 3D for the first time introducing new metrics to demonstrate cell function. Cell clusters of human embryonic kidney cells were stained for DNA and RNA. In this way cell viability across the cluster was quantified and two different regions were uncovered. The application of the lectin-based staining technique on mouse bone resulted in stained cells mainly on the bone surface and in the remaining soft tissue around it.

In Chapter 5 microcrack imaging and analysis is discussed. The stain concentrations required for visualization of cells and microcracks in bone were calculated, however they systematically underestimated the truly needed concentrations. For microcracks in bone a stain based on lead- and uranyl-acetate could be used for the quantitative post-hoc analysis of microdamage in 3D. For detection of microcracks in specimen subjected to image guided failure assessment using synchrotron radiation no stain for microcracks was needed. The spatial resolution was sufficient for direct visualization of the cracks.

In Chapter 6 a new device for synchrotron-based image guided failure assessment is introduced. The device was validated using solid aluminum and trabecular bovine bone. Comparing the mechanical tests of aluminum to similar ones retrieved from a conventional mechanical testing device, the compliance of the new device was measured. After correction, the results from the new device and the conventional testing device were in good agreement. Retrieved 3D visualizations showed bone failure in great detail. Microcracks and microfractures were uncovered in 3D for the first time. A first algorithm for microcrack classification was developed and applied. The results suggest that the conventional classification of microcracks and microfractures from 2D sections is ambiguous. The comparison of failure of fatigued and non-fatigued trabecular bovine bone revealed that in the case of fatigued bone the volume-increase of microcracks and microfractures is greater than in the case of non-fatigued bone. Also the observed burst-like and band-like failure patterns for fatigued and non-fatigued bone, respectively, were different.

In conclusion the presented new developments add to existing X-ray tomography experiments making it now possible to perform both qualitative and quantitative analysis of soft and hard tissues in a static and time-lapsed fashion with micrometer spatial resolution.

Zusammenfassung

Quantitative Endpunkte sind heute ein wichtiger Faktor in der Biologie und in der Biomedizinaltechnik. Normalerweise werden solche Endpunkte mittels zweidimensionaler bildgebender Verfahren analysiert. Dabei geht nicht nur der dreidimensionale Charakter des Gewebes verloren, vielmehr sind diese Methoden invasiv und destruktiv. Außerdem ist bekannt, dass Zellen sich in einer 2D und 3D Umgebung unterschiedlich verhalten. Daher haben dreidimensionale Bildgebungsverfahren an Wichtigkeit gewonnen, zumal diese für qualitative sowie auch für quantitative Bildverarbeitung geeignet sind. Die Röntgentomographie ist in diesem Kontext eine viel versprechende Methode. Jedoch ist der Kontrast von Weichgewebe bei einer Ortsauflösung im Mikrometerbereich limitiert. Daher werden neue dreidimensionale bildgebende Verfahren benötigt. Wenn zusätzlich der Einfluss von mechanischen Kräften in solche Untersuchungen miteinbezogen werden soll, dann wird eine nicht destruktive bildgebende Methode benötigt, die auch zeitaufgelöst eingesetzt werden kann. Beides trifft für die Röntgentomographie zu. Für solche Untersuchungen an Strukturen im Mikrometerbereich ist eine hohe Brillanz der eingesetzten Röntgenstrahlung notwendig, die nur von Synchrotronstrahlungsquellen erreicht wird. Daher würde die Visualisierung von Zellkulturen mittels Synchrotronstrahlung die Lücke in der Röntgentomographie als hierarchisches Bildgebungsverfahren von Hart- und Weichgeweben schließen.

Ein Forschungsgebiet, in dem wir diesen Ansatz einbringen wollen, ist die Osteoporoseforschung. Osteoporose ist durch eine geringe Knochenmasse, eine reduzierte Knochenstabilität und einen Anstieg des Frakturrisikos gekennzeichnet. Heutzutage wird immer mehr klar, dass nicht nur die Knochenmineralisierung, sondern auch die Mikroarchitektur und die lokalen Gewebeeigenschaften wie Mikrorisse, Zelldichte und Verteilung sowie die Qualität der organischen Matrix für stabile Knochen verantwortlich sind. Mikrorisse können zur Zeit mit 2D Mikroskopie untersucht werden. Eine Methode für die dreidimensional Erfassung von Mikrorissen und Knochenzellen wäre daher von Vorteil. Überdies erlaubt die kürzlich entwickelte Methode des „Image Guided Failure Assessment“, die die Röntgentomographie mit mechanischer Prüfung verbindet, die zeitaufgelöste Untersuchung von Knochenversagen. Für die Erfassung von Mikroschaden sind Systeme, die auf Röntgenröhren aufbauen, begrenzt einsetzbar, da ihre Ortsauflösung ungenügend ist. Aus diesem Grund würde ein Gerät für „Image Guided Failure Assessment“, welches an einem Synchrotron einsetzbar ist, es erlauben, das Knochenversagen noch genauer im Detail zu analysieren. Somit könnten lokale Gewebsunterschiede wie Mikroschaden, Zelldichte und Verteilung in die Analyse des Versagens miteinbezogen werden.

Aus diesem Grund waren die Ziele der vorgestellten Arbeit: erstens Zellen in Hart- und Weichgewebe zu visualisieren und quantifizieren, was die Entwicklung von

Kontrastierungsverfahren voraussetzt, zweitens Mikrorisse im Knochen in 3D darzustellen und zu quantifizieren und drittens eine Vorrichtung für „Image Guided Failure Assessment“ Experimente an einer Synchrotronstrahlungsquelle zu entwickeln.

Für die Entwicklung eines Kontrastmittels für Zellen wurde, wie in Kapitel 4 beschrieben, ein Zellkultur-Modellsystem benutzt. Für die Visualisierung von Zellkulturen werden Kontrastmittel mit hoher Röntgenabsorption benötigt. Die notwendigen minimal detektierbaren Konzentrationen dieser Kontrastmittel, die im *mmol* Bereich liegen, wurden berechnet. Kontrastierungsmethoden basierend auf Osmiumtetroxid bzw. auf mit Gold markiertem Lektin in Kombination mit einer Goldverstärkungssuspension konnten erfolgreich adaptiert werden. 3D Bilder von der Röntgentomographie mit Synchrotronstrahlung wurden mit Bildern optischer und Elektronenmikroskopie validiert. Im Falle von niedrigem Kontrast kann die Ortsauflösung gegen Kontrast eingetauscht werden. Für das Modellsystem konnten sowohl die Geometrie des Zellträgers als auch die der Zellkultur zum ersten Mal in 3D segmentiert und quantifiziert werden. Die Variation des Lektin-basierten Kontrastierungsprotokolls zeigte, dass die quantifizierten Parameter linear von der Inkubationszeit der Goldverstärkungssuspension abhängen. Differentieller Absorptionskontrast ergibt bei den untersuchten Proben ähnliche, aber keine zusätzliche Information. Die verschiedenen Morphologien von Fibroblasten der menschlichen Vorhaut und Osteoblast-ähnlicher Zellen von der Calvaria der Maus im Modellsystem konnten zum ersten Mal in 3D qualitativ und quantitativ aufgezeigt werden. In Zellklustern von humanen embryonalen Nierenzellen konnten die DNA und RNA kontrastiert werden. Auf diese Weise konnte die Zellviabilität im Zellcluster quantifiziert werden, welcher sich in zwei Regionen aufteilt. Die Anwendung des Lektin-basierten Kontrastmittels im Mäuseknochen resultierte in kontrastierten Zellen, die sich hauptsächlich an der Knochenoberfläche und in Resten von Weichgewebe um den Knochen herum befanden.

Wie in Kapitel 5 dargestellt ist, sind neben den Zellen auch die Mikrorisse im Knochen ein wichtiger Parameter. Die minimal detektierbaren Konzentrationen von Kontrastmittel im Knochen wurden berechnet, jedoch unterschätzen die so erhaltenen Werte, die tatsächlich benötigten Konzentrationen. Für die post-hoc Analyse von Mikrorissen im Knochen kann ein Kontrastmittel basierend auf Blei- und Uranylacetat eingesetzt werden. In Proben die dem „Image Guided Failure Assessment“ mit Synchrotronstrahlung unterzogen werden wird für die Detektion von Mikrorissen kein Kontrastmittel benötigt. Die Ortsauflösung ist ausreichend um diese direkt darzustellen.

Für „Image Guided Failure Assessment“ Experimente wurde ein neues Gerät entwickelt, das in Kapitel 6 vorgestellt wird. Das Gerät wurde mittels solidem Aluminium und trabekulärem Rinderknochen validiert. Der Vergleich von mechanischen Tests von Aluminium mit ähnlichen Tests an einer Stationären Prüfmaschine erlaubte es, die Verformung des neuen Gerätes zu messen. Die Miteinbeziehung dieser Verformung in die Tests von Rinderknochen ergab im

Vergleich mit ähnlichen Tests an der stationären Prüfmaschine eine gute Übereinstimmung der Resultate. Die 3D Visualisierungen zeigten das Knochenversagen im Detail. Mikrorisse und Mikrofrakturen konnten zum ersten Mal in 3D dargestellt werden. Für Ihre Quantifizierung wurde ein erster Algorithmus entwickelt. Resultate legen den Schluss nahe, dass die konventionelle Klassifizierung von Mikrorissen und Mikrofrakturen anhand von 2D Bilddaten nicht eindeutig ist. Der Vergleich von Versagen von ermüdetem und nicht ermüdetem trabekulären Rinderknochen zeigte, dass im Falle von ermüdetem Knochen die Volumenzunahme von Mikrorissen und -Frakturen größer ist als bei nicht ermüdetem Knochen. Auch das Versagensverhalten charakterisiert durch ein Bruchband im Fall von nicht ermüdetem und durch explosionsartiges Versagen im Fall von ermüdetem Knochen war unterschiedlich.

Zusammenfassend verbessern die neuen Entwicklungen die Röntgentomographie zu einer Methode die es erlaubt Hart- und Weichgewebe in 3D statisch und zeitaufgelöst mit einer Ortsauflösung im Mikrometerbereich zu untersuchen.