

Aus dem Institut für Tieranatomie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

Arbeit angefertigt unter Leitung von PD Dr. Sven Reese

Computergestützte 3D-Visualisierung histologischer
Schnittbildserien am Beispiel des bovinen
Mesonephros

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrich Wolfram Mühlbauer
aus
Simmern

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Reese

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinen Eltern

Dietlinde und Herbert Mühlbauer

und meiner Frau Catharina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Dreidimensionale Rekonstruktion aus zweidimensionalen Schnittbildern	3
2.1.1	Geschichte der dreidimensionalen Rekonstruktion	3
2.1.2	Funktionsprinzip der computergestützten Rekonstruktion anatomischer Bilddaten	5
2.1.3	Der Prozess der Visualisierung	6
2.1.3.1	Gewinnung der Ausgangsdaten	6
2.1.3.2	Registrierung und Alignment	6
2.1.3.3	Segmentierung (Labelling)	8
2.1.3.4	Mapping und Rendering	10
2.1.3.5	Cuberille-Modell und Marching-Cubes-Algorithmus	12
2.1.4	Arbeit mit optischen Schnitten	13
2.1.5	Arbeit mit physikalischen Schnitten	14
2.1.6	Verwendung histologischer Schnittbildserien	15
2.1.6.1	Darstellung tubulärer Strukturen	16
2.1.6.2	Marker-basierte Vorgehensweisen	17
2.1.7	Die Software-Anwendung „Amira“	19
2.1.7.1	Grundgedanke	19
2.1.7.2	Programmbasis	19
2.1.7.3	Benutzeroberfläche, Bedienung, Funktionen	20
2.1.7.4	Anwendungsbeispiele	22
2.1.8	Anwendungen der Rekonstruktion in der Veterinär- und Humanmedizin	23
2.1.8.1	Anwendungen in Anatomie und Embryologie	27
2.2	Mesonephros	28
2.2.1	Einführung	28
2.2.2	Entwicklung und Struktur der Urniere	29
2.2.2.1	Entwicklung und Struktur der Urniere des Wiederkäuers im Besonderen	32
2.2.2.2	Verschmelzung einzelner Urnierenkörperchen	34

2.2.2.3	Gefäßversorgung der Urniere	34
2.2.3	Funktion als harnproduzierendes Organ	35
2.2.4	Einfluss auf die Gonadenbildung	37
2.2.5	Weitere Funktionen des Mesonephros	38
2.2.6	Degeneration	39
2.2.7	Die Urniere des Menschen	40
2.2.8	Die Urniere bei Vögeln und Reptilien	41
2.2.9	Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse zur Struktur von Glomerula, Wolffschem Gang und Tubulussystem	42
2.2.9.1	Gestalt und Anordnung der Glomerula	42
2.2.9.2	Verlauf des Ductus mesonephricus	42
2.2.9.3	Entwicklung und Gestalt der Nephrone	43
3	Material und Methoden.....	50
3.1	Genutzte Rechensysteme.....	50
3.1.1	Arbeit auf dem Fakultätsrechner	50
3.1.2	Arbeit mit der Remote Visualisierung.....	51
3.1.2.1	Remote-Visualisierung und das gvs1-System	51
3.2	Digitalisierung der Bilddaten	54
3.3	Wandlung der Bilddaten.....	54
3.4	Eingrenzung der interessierenden Region (ROI)	55
3.5	Ausrichtung der zweidimensionalen Schnittbilder	56
3.6	Segmentierung der Urniere und deren Strukturen	58
3.7	Rendering und weitere Darstellung der gewonnenen Rekonstruktionen..	61
3.7.1	Berechnung einer Isosurface	61
3.7.2	Oberflächenberechnung und Visualisierung	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Methodische Ergebnisse.....	63
4.1.1	Ergebnisse der Digitalisierung der Bilddaten	63
4.1.2	Ergebnisse des Alignments	63
4.1.3	Ergebnisse und Qualität des Segmentierungsprozesses.....	64
4.1.4	Das dreidimensionale Modell.....	65
4.2	Morphologische Ergebnisse.....	68
4.2.1	Das Organ als Ganzes.....	68

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Gestalt und Verlauf des Ductus mesonephricus	69
4.2.3	Gestalt der Nephrene.....	71
5	Diskussion.....	76
5.1	Computergestützte Visualisierung der histologischen Schnittbildserie.....	76
5.2	Die Urniere und ihre Strukturen	79
6	Schlussfolgerung.....	82
7	Zusammenfassung.....	83
8	Summary.....	85
9	Abbildungsverzeichnis.....	86
10	Literaturverzeichnis	88

Abkürzungen und Glossar

Algorithmus	endliche Folge von Handlungsanweisungen, die nacheinander ausgeführt zur Lösung eines Problems durch Berechnung führen
C++	höhere Programmiersprache, Erweiterung von C
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> ; konfokale Lasermikroskopie
CPU	<i>Central Processing Unit</i> ; Hauptprozessor eines Rechners
DLL	<i>dynamic link library</i> ; Programmcodes, die von mehr als einer Anwendung verwendet werden, werden nur einmal in den Hauptspeicher geladen, um Speicherbedarf zu reduzieren
Drag and drop	Bedienung grafischer Rechneroberflächen mittels „Ziehen und Fallenlassen“
Finite Elemente	Aufteilung eines zu lösenden Problems z.B. im Ingenieurwesen in endliche Teilgebiete, die bearbeitet werden können und wieder zusammengesetzt eine Lösung der Gesamtfragestellung zulassen
GB	Gigabyte; Maßeinheit für eine Datenmenge entsprechend 10^9 Byte
GVS	<i>grid visualisation server</i>
IP-Adresse	Adresse, die einem teilnehmenden Gerät in einem Netzwerk zugewiesen wird, das auf dem Internetprotokoll basiert
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i> ; unterschiedlich komprimiertes Bildformat
Linux	modular aufgebautes Betriebssystem, das zum großen Teil frei verfügbar ist und von Benutzern weiterentwickelt werden kann
Linux-Cluster	Gruppe vernetzter Rechner, die von außen als ein Rechner angesehen werden können mit dem Ziel der Erhöhung der Rechenkapazität
MB	Megabyte; Maßeinheit für eine Datenmenge entsprechend 10^6 Byte
OpenGL	Sammlung von plattform- und programmiersprachen-unabhängigen Programmierbefehlen zur Erstellung von 2D- sowie 3D-Grafiken
Open Source	Initiative zur Förderung freier Software, deren Quelltext offen liegt und die beliebig kopiert, genutzt und verbreitet werden kann
Opteron	Markenname von AMD-Prozessoren
Quad-core	Prozessor mit vier Prozessorkernen
RAM	<i>Random-Access Memory</i> , Arbeitsspeicher in Computern
Rendern	Erzeugung einer Grafik aus Ausgangsdaten

Abkürzungen und Glossar

RGB	Nachbildung des Farbraumes durch additive Mischung der drei Grundfarben Rot, Grün und Blau
Screenshot	Kopie der aktuellen Bildschirmoberfläche
Tcl	<i>Tool command language</i> ; Open-Source-Programmiersprache
TIF/TIFF	Dateiformat zur Speicherung von Bilddaten
Threshold	Schwellenwert
Unix	Mehrbenutzer-Betriebssystem, das Anfang der 1970er Jahre entwickelt wurde
VNC	<i>Virtual Network Computing</i> ; Software, die Tastatur- und Mausbefehle eines lokalen Rechners an einen Server überträgt und im Gegenzug Bildschirminhalte zurückübermittelt

1 Einleitung

Anatomische Studien rückten zum ersten Mal mit Leonardo da Vinci und Andreas Vesalius¹ im 15. bzw. 16. Jahrhundert in das öffentliche Interesse. Freilich auch, weil es damals höchst kontrovers diskutiert wurde, ob es überhaupt erlaubt sein dürfte, einen menschlichen Leichnam zu sezieren. Auch wenn sich die technischen Möglichkeiten zur Bildgewinnung und –aufbereitung seither stetig weiterentwickelt haben, so sind die visuellen Ergebnisse doch in den allermeisten Fällen auf zwei Dimensionen beschränkt und jegliche räumliche Anordnung bleibt der Vorstellungskraft des Betrachters überlassen. Der Informationsgehalt ist hierdurch erheblich reduziert und nach Bearbeitung der anatomischen Präparate deren räumliche Beziehung meist unwiederbringlich zerstört.

An moderne Methoden in Forschung und Lehre wird jedoch der Anspruch gestellt, dass sie interaktive und multimediale Wege zum besseren Verständnis von Zusammenhängen und Vermitteln von Lerninhalten schaffen. Studierenden wird über den Umgang mit Präparaten und haptischer Manipulation an diesen ein tieferer Zugang gewährt. Besonders im Fall von anatomischen Strukturen ergibt sich jedoch das Problem, dass diese meist aufwendig hergestellt werden müssen und zu kostenintensiv sind, um sie in großer Zahl zur Verfügung zu stellen und gar durch Zerschneiden oder Zerlegen zerstören zu lassen. Überdies ist die Nutzung solcher Lernmöglichkeiten örtlich fast immer an ein Institut gebunden und nicht flexibel etwa von zu Hause aus zugänglich.

Insbesondere embryologische Fragestellungen verlangen neben den drei Raumachsen noch eine zeitliche Darstellung der Entwicklung. Aus genannten Gründen gibt es seit einigen Jahren Bemühungen, anatomische, embryologische sowie histologische Inhalte den vorhandenen technischen Möglichkeiten an den Instituten und den Anforderungen von Wissenschaftlern und Studierenden entsprechend aufzubereiten. Leichter ist diese Zielsetzung bei bildgebenden Verfahren wie CT und MRT zu erreichen, die meist bereits schon mit leistungsfähigen Computersystemen ausgestattet sind und aufgrund ihrer Technik gut nutzbare Ausgangsdaten liefern. Mikroskopische Untersuchungsmethoden, die für viele Fragestellungen und Gewebearten unumgänglich sind, stellen den Unter-

¹ *De humani corporis fabrica*, 639 Seiten umfassendes Werk über den Bau des menschlichen Körpers

sucher vor weitaus größere Aufgaben. Erschwert wird der moderne Ansatz der computergestützten Visualisierung dieser anatomischen Bilddaten wenn es sich um Präparate handelt, die schon Jahre oder Jahrzehnte alt sind und bei deren Erstellung an die technischen Möglichkeiten unserer Zeit noch nicht zu denken war.

Eben eine derartige Schnittserie war Gegenstand dieser Arbeit. Im Folgenden soll aufgezeigt werden, als wie brauchbar und praktikabel sich eine kommerzielle Visualisierungssoftware zur dreidimensionalen Rekonstruktion einer histologischen Schnittbildserie aus dem Archiv erweisen kann und an welche Grenzen sie stößt. Des Weiteren soll eine Literaturübersicht über den Wissensstand zum Mesonephros, der Teil der vorliegenden Schnittbildserie ist, gegeben werden und die erhaltenen Visualisierungen mit den bisherigen Beschreibungen und Vorstellungen zu den Organstrukturen verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Dreidimensionale Rekonstruktion aus zweidimensionalen Schnittbildern

Die visuelle Datenanalyse soll entscheidende Eigenschaften von Ausgangsdaten einfangen und verständlich aufbereiten und durch intuitive sowie interaktive Erforschung selbst komplexe Beziehungen transparent machen (Hege 2004). Hierzu ist es von großem wissenschaftlichem Interesse, die limitierte Volumeninformation hochauflösender Untersuchungsmethoden wie Elektronen- oder Lichtmikroskopie zu überwinden (Kriete und Magdowski 1990).

2.1.1 Geschichte der dreidimensionalen Rekonstruktion

Born beschrieb 1884 die „Plattenmodelliermethode“, ein Verfahren, bei dem die Rekonstruktion dadurch ermöglicht wird, dass die Umriss eines Objektes, das in Schnittbildern vorliegt, auf Wachsplatten übertragen werden. Werden die einzelnen Wachsplatten aufeinander gelegt und die Kanten geglättet, ergibt sich ein dreidimensionales, maßstabgetreues Modell. Diese sehr aufwendige Methode war lange Zeit der einzige Weg, befriedigende Darstellungen morphologischer Strukturen zu liefern, die sich aufgrund ihrer Größe anderen Betrachtungsweisen entzogen (Born 1884).

Eine leichte Abwandlung erfuhr dieses Verfahren im Jahre 1913 durch Waterston, der die Umriss von Embryonen auf Lehmschichten übertrug und daraus Rekonstruktionen modellierte (Waterston 1913).

Ameil et al. übernahmen 1984, also ein Jahrhundert nach Born prinzipiell die Plattenmodelliermethode. Schnitte von 0,5 cm Dicke eines menschlichen Herzens wurden abfotografiert und anschließend die äußeren Umriss auf Pauspapier übertragen. In jeder Ebene wurde die gleiche Anzahl von Punkten auf der Umrisslinie gewählt, damit zwischen diesen eindeutige Beziehungen hergestellt und die Koordinaten in den Computer übertragen werden konnten, der die Berechnung und Darstellung der Konturen in den verschiedenen Schichten übernahm. Die Darstellungsweise konnte in zwei Modi gewählt werden: zum einen durch Stapelung der Umriss der einzelnen Schichten und außerdem durch eine

sehr rechenaufwendige geglättete und farbige Visualisierung. In beiden Fällen konnte der Betrachtungswinkel verändert werden (Ameil et al. 1984).

Ähnlich stellte eine Arbeitsgruppe um Baba 1986 Drüsen im menschlichen Kolon dar. Schnitte von 3 bis 5 μm Dicke wurden angefertigt, die relevanten Konturen mit einem Stift abgezeichnet, digitalisiert und anschließend die Linien in viele Punkte unterteilt. Im Rechensystem, das damals über einen Hauptspeicher von 16 MB verfügte, wurden Abfolge und Schichtdicke der Stapel von Konturpunkten vermerkt und durch die Verbindung der Punkte zu Dreiecken erfolgte die Oberflächendarstellung. Im Rahmen der technischen Möglichkeiten konnte das entstandene 3D-Objekt rotiert und seine inneren und äußeren Strukturen separat betrachtet sowie innere Lagen im Blick durch äußere Lagen dargestellt werden (Baba und Kanaya 1988).

Ebenfalls mit Hilfe von Konturen histologischer Strukturen, die auf ein *Tableau* zur Digitalisierung übertragen wurden, konnte die Urniere der Maus dargestellt werden (Vazquez et al. 1998b). Zur Verfeinerung wurde hier schon ein Verfahren zur Interpolierung angewendet, das aufgetretene Artefakte zum Teil ausgleichen konnte (*Discrete Smooth Interpolation*).

Mit der Entwicklung der Computertomographie in den 70er Jahren wurde es möglich, Schnittbilder in vivo anzufertigen. Zahlreiche Arbeitsgruppen entwickelten Methoden, um die erhaltenen Daten auf Rechensystemen zur Gewinnung dreidimensionaler Bilder zu nutzen. Die Rechen- und Grafikleistung sowie die Geschwindigkeit des Datendurchsatzes waren und sind hierbei stets der limitierende Faktor und es müssen Algorithmen gefunden werden, die die vorhandenen Ressourcen so effizient wie möglich nutzen (Ameil et al. 1984, Huijsmans et al. 1986). Erst Ende der Neunziger Jahre wurden Computersysteme sowohl schnell als auch günstig genug, um einer breiteren Masse von Wissenschaftlern, die sich mit der Visualisierung von Bilddaten beschäftigte, zur Verfügung zu stehen. Durch das zunehmende Angebot kommerzieller Visualisierungssoftware und auch Freeware (z.B. *Reconstruct*¹) kann nun auf das individuelle Programmieren verzichtet werden. Diese Programme bieten meist eine gute Kompatibilität mit vielen Dateiformaten und verfügen über ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Güte der grafischen Darstellung und Belastung der Hardware. Als Einschränkung ist jedoch zu berücksichtigen, dass kommerzielle Soft-

¹ <http://synapses.clm.utexas.edu/index.asp> (06.04.10)

ware nur selten über Tools zum automatisierten Alignment und Segmentieren verfügt, die beispielsweise für einen Anatomen von großem Nutzen wären (Haas und Fischer 1997) oder aber automatische Verfahren bereitstellt, die nur bei sehr einfachen Strukturen zuverlässig arbeiten können (Fiala 2005).

2.1.2 Funktionsprinzip der computergestützten Rekonstruktion anatomischer Bilddaten

Erst wenn anatomische Bilddaten digitalisiert und archiviert vorliegen, können sie mit dem Computer analysiert werden. Moderne Tomographiegeräte erzeugen Tomogramme, also Bilder, die man sich durch das geschnittene Objekt gelegt vorstellen kann. Wie ein Fernsehbild sind diese zweidimensionalen Bilder aus *Pixeln* (picture elements) aufgebaut, die durch eine physikalische Größe, den Grauwert, gekennzeichnet sind. Stapelt man mehrere dieser Bilder übereinander, so erhält man nunmehr einen Datenquader, ein dreidimensionales Gebilde, bestehend aus *Voxeln* (volume elements). Das Ziel der weiteren Bearbeitung und Berechnung der Datenmengen ist die Visualisierung für einen Betrachter. Hierzu muss jedem Voxel zunächst eine Kennung zugewiesen werden, die die Zugehörigkeit zu einer anatomischen Struktur festlegt. Diesen Bildverarbeitungsprozess nennt man Segmentierung und zu dessen Bewerkstelligung muss neben physikalischen Parametern oft auch händische Bearbeitung basierend auf dem Wissen des Anatomen herangezogen werden. Jedes automatische Segmentierungsverfahren greift auf mehr oder weniger komplexe Algorithmen zurück.

Kaufmann beschreibt die entscheidenden Verfahren der dreidimensionalen Visualisierung (Kaufmann 1991). Um die Dimensionen eines Objektes darzustellen wird dieses auf seine Oberflächenmerkmale reduziert (*Surface-Rendering*). Dabei wird die Oberfläche je nach Verfahren in Polygone zerlegt und als Netz dieser aneinandergrenzenden Vielecke dargestellt. Schließlich wird durch bestimmte Beleuchtungsmodelle (*shading*) der Anschein von Räumlichkeit und Plastizität erweckt.

2.1.3 Der Prozess der Visualisierung

In den meisten Fällen lässt sich für den Bereich der Mikroskopie das Prozedere in die im Folgenden beschriebenen Schritte unterteilen (Jirkovska et al. 2005).

2.1.3.1 Gewinnung der Ausgangsdaten

Zu Beginn steht die Auftrennung der zu bearbeitenden Struktur in serielle Schnitte. Diese Schnitte können optischer Natur sein, beispielsweise unter Verwendung eines Konfokalmikroskops, oder physikalisch durch Schneidetechniken (Mikrotom, Ultramikrotom) gewonnen werden. Die Arbeit mit dem Konfokalmikroskop bietet den großen Vorteil, dass die Schnittbilder optimal ausgerichtet bleiben und somit das zum Teil sehr aufwendige Alignment entfällt.

Für das Untersuchungsmaterial muss eine den Anforderungen und der Verfahrenstechnik entsprechende Färbung ausgewählt und angefertigt werden.

Erst die Datenerfassung macht die Übertragung auf ein Rechensystem und die Nutzung moderner Software möglich. Hierzu wird beispielsweise ein mit einer digitalen Kamera ausgestattetes Mikroskop benötigt.

2.1.3.2 Registrierung und Alignment

Die Registrierung hat die Aufgabe, eine Transformation T zu finden, die die Pixel eines Bildes M (*movable*) auf die korrespondierenden Pixel eines anderen Bildes F (*fix*) abbildet. Bei Transformationen handelt es sich um mathematische Werkzeuge, die dazu dienen, Informationen aus einer Szene zu filtern (Kahn et al. 1996, Weinert 2007). Auf die unterschiedlichen relevanten Transformation wie Fourier-Transformation und Hauptachsentransformation soll hier nicht eingegangen werden.

Digitalisierte Schnittbilder unterliegen in den allermeisten Fällen Translation und Rotation. Dies erfordert die manuelle oder in unterschiedlichem Maße automatisierte Ausrichtung der aufeinanderfolgenden Bilder. Erschwerend kommen bei histologischen Bildmaterialien bedingt durch den Herstellungsprozess Deformationen und Artefakte wie Risse, Falten und Gewebsverluste hinzu.

Je nach Ausgangsmaterial kann zwischen einer *Intrasubjekt*-Registrierung, bei der Daten des gleichen Patienten zu verschiedenen Zeiten bearbeitet werden,

und einer *Intersubjekt*-Registrierung zur statistischen oder vergleichenden Darstellung von Datensätzen verschiedener Patienten unterschieden werden. Beim *mono-modalen* Alignment findet nur ein bildgebendes Verfahren (Modalität) Verwendung, während beim *multi-modalen* Alignment Bilder verschiedener Verfahren aufeinander ausgerichtet werden (Krevert 2005).

Hinsichtlich der Möglichkeit, in welchem Maße vorhandene Deformationen ausgeglichen werden können, muss zwischen rigiden Transformationen, die nur Rotation, Translation und Spiegelung erlauben und elastischen, nicht-affinen Transformationen unterschieden werden. Rigide Transformationen ändern nichts an der Struktur selbst. Alle Bildpunkte bleiben in ihrer relativen Lage zueinander. Elastische Transformationen hingegen sind dazu geeignet, stark verzerrte Bilder aufeinander abzubilden. Hierbei wird eines der Bilder so lange verformt, bis es mit der geringst möglichen Abweichung auf das andere Bild gemappt werden kann (Krevert 2005). Dies ist jedoch mit erheblich höherem Rechenaufwand verbunden.

Sofern in einem zu untersuchenden Objekt deutlich hervorstechende Oberflächen bzw. Grenzen zwischen Oberflächen vorhanden sind, ist es für Segmentierungsalgorithmen möglich, diese zu erkennen (*Surface Matching*). Als Beispiel ist hier vor allem die Oberfläche der Haut in einem tomographischen Bild zu nennen (Krevert 2005).

Viele der modernen 3D Rekonstruktionstechniken nutzen künstliche Marker (*landmarks*), die in die Schnitte eingefügt sind. Dies lässt geometrische Verformungen routinemäßig zu einem hohen Grad korrigieren, verkompliziert jedoch die Nutzung bereits angefertigter, älterer Schnittserien (Stoltenberg et al. 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Registrierung bietet SSD (engl. sum of square differences). Hierbei wird versucht, durch bestmögliche Angleichung der Graustufenhistogramme zweier benachbarter Bilder deren Deckung zu erreichen. Voraussetzung ist hierfür jedoch eine gleichmäßige Färbung des Bildstapels (Weinert 2007).

Wirtz et. al zeigten anhand der Rekonstruktion eines Rattenhirns aus histologischen Serienschnitten die Notwendigkeit eines möglichst exakten nichtlinearen Alignment-Prozesses, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten (Wirtz et al. 2004).

2.1.3.3 Segmentierung (Labelling)

Bei der Segmentierung werden automatisch oder von Hand die Umrisse von Objekten in allen Schnitten markiert und einem Material zugewiesen. Das Volumen wird in Teilvolumina (Segmente) partitioniert. Diese Trennung der relevanten anatomischen Strukturen voneinander und von weniger wichtigen Bildbereichen stellt häufig die größte Herausforderung im gesamten Visualisierungsprozess dar, da hierbei der rohe Bilddatensatz sorgfältig mit medizinischem Wissen gefüllt werden muss (Weiler und Dettmann 1996, Zöckler et al. 2001). Eine erste, pixelorientierte Aussage zu welcher anatomischen Struktur ein Bildpunkt zu zählen ist, kann aufgrund seines Grauwertes (bei CT-Daten der Hounsfield-Wert) getroffen werden. Der sogenannte Partialvolumeneffekt beschreibt hierbei die Tatsache, dass die Grenzen zweier Objekte meist in ein oder mehrere Pixel fallen und die exakte Trennung somit dann nur auf Subpixel-Ebene möglich ist.

Um einzelne, nicht zusammenhängende Strukturen auch getrennt behandeln zu können, muss man auf das Keimzellenwachstumsverfahren, eines der regionenorientierten Verfahren, zurückgreifen. Im Bereich frei wählbarer Grenzwerte untersucht der Computer, ob Nachbarpixel bzw. -voxel aufgrund eines Homogenitätskriteriums wie Grauwert oder Textur zu dem anfangs ausgewählten Bildpunkt, der so genannten Keimzelle passen und somit zu der anatomischen Struktur gehören sollten. Beim Bereichswachstumsverfahren (*Region-Growing-Verfahren*) dient ein ganzer Bereich als Startvolumen. Beide Verfahren stellen Schwellenwertverfahren dar, da sie im Bereich vorgegebener Werte arbeiten. Mit zunehmendem Grad der Komplexität des zu untersuchenden Gewebes stoßen diese Methoden jedoch schnell an ihre Grenzen. Während das menschliche Auge ohne weiteres in der Lage ist, Gewebe aufgrund dünner Grenzen oder unterschiedlicher Texturen (zum Beispiel Tumor in umgebendem gesunden Gewebe) zu unterscheiden, stellt es eine große Herausforderung dar, diese Leistung in programmierbare Anweisungen zu fassen (Jendrysiak 1997). Es bedarf der Schaffung von Klassifikationssystemen, die gefüllt mit Expertenwissen und Referenzsegmentierungen in der Lage sind, automatische Segmentierungsvorgänge zu produzieren (Beller et al. 2004).

Die Segmentierung von Hand ist sehr zeitaufwendig und liefert überdies nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse. Bis zu einem gewissen Maße kann hier das Verfahren der aktiven Konturen (*snakes*) Abhilfe schaffen, bei dem der Un-

tersucher nur ungenau die Umrisse umfährt und ein Computerprogramm die Markierungen an nahe gelegene Kanten angleicht.

Für die Abgrenzung komplexer Strukturen ist es häufig nicht möglich, optimale Schwellenwerte festzulegen. Zu eng gesetzte Grenzen markieren beim Bereichswachstumsverfahren beispielsweise zu wenige Voxel, zu weit gewählte lassen den markierten Bereich ins umgebende Gewebe auslaufen. Lösungsansätze bietet hier die Wasserscheidentransformation bzw. der Flutungs-Algorithmus. Zum Verständnis muss man sich die einzelnen Grauwerte als Graphen über einem Grundniveau vorstellen, wobei hohe Graphen hohen Grauwerten entsprechen. Betrachtet man nun diese graphische Darstellung der untersuchten Struktur, so erinnert sie an ein Becken. Da die Konturen in Schnittbildern häufig lückenhaft abgebildet und der Wall um das Becken dadurch nicht geschlossen ist, würde die Anwendung des Bereichswachstumsverfahren hier zum „Auslaufen“ führen. Um dies zu verhindern, hat man den Flutungsalgorithmus eingeführt. Lässt man die „Grauwertlandschaft“ von unten her vergleichbar des Grundwassers fluten, bilden sich zunächst viele kleine Seen, die sich bei einem bestimmten Wasserspiegel zu größeren Seen vereinigen werden. Die Grenzen dieses Zusammenflusses markiert der Algorithmus und lässt an deren Stellen Wasserscheiden mit dem Wasserspiegel ansteigen. Einmal getrennte Strukturen können also nicht mehr ineinander übergehen. Selbst bei vollständiger Flutung der gesamten Landschaft wird doch durch die Wasserscheiden die Segmentierung markiert (Fleck et al. 1997). Die durch dieses Verfahren häufig erreichte Übersegmentierung muss im Folgenden, wenn nicht schon vorher eingedämmt, durch eine Vergrößerung aufgehoben werden.

Kantenbasierte Verfahren versuchen, die schnelle Intensitätsänderung der Grauwerte an den Grenzen zwischen den einzelnen Segmenten zur Zuordnung zu einzelnen Strukturen zu nutzen. Sie werden häufig mit regionenorientierten Verfahren kombiniert.

Die Morphologie oder auch modellbasierte Segmentierung stellt einen Ansatz dar, bei dem versucht wird, Objekte über ihre Form zu identifizieren. Form- und Abbildungsvariabilität sowie perspektivische Verzerrungen begrenzen die Nutzbarkeit dieses Verfahrens. Aus einer Vielzahl von Datensätzen muss zunächst ein statistisches Formmodell generiert werden, das dann an einen individuellen Datensatz adaptiert und zur automatischen Segmentierung herangezogen wer-

den kann (Lange et al. 2003). Derartige Verfahren können vielversprechende Ansätze beispielsweise zur standardisierten Visualisierung von CT- und MRT-Daten an Kliniken liefern (Weiler und Dettmann 1996).

Alle genannten Verfahren können letztendlich nur auf Objekte hinweisen, sie jedoch nicht zu einhundert Prozent verlässlich im Bild markieren. Die Bildsegmentierung kann also als eines der wichtigsten ungelösten Probleme in der Bildverarbeitung angesehen werden (Weiler und Dettmann 1996). Sowohl manuelle als auch semi-automatische Segmentierungsvorgänge sind, obwohl sie belastbare Ergebnisse liefern, zumeist zu zeitaufwendig und damit nicht für den routinemäßigen Einsatz geeignet. Hierzu bedarf es vollautomatischer, reproduzierbarer Algorithmen (Tingelhoff et al. 2007).

2.1.3.4 Mapping und Rendering

Mapping bezeichnet die Berechnung von Oberflächen aus einem segmentierten Datensatz. Mathematisch ist hierfür immer noch der Marching-Cubes-Algorithmus der Goldstandard.

Das Rendering erzeugt realistische Abbilder des bearbeiteten Materials. Mit einer geeigneten Anwendersoftware werden die Daten den Anforderungen entsprechend verknüpft, dargestellt und ausgewertet. Als indirektes Visualisierungsverfahren ist das *Surface-Rendering* zu nennen. Hierbei wird die Oberfläche durch Verbindung der heraussegmentierten Umrisse modelliert. Zur Verwendung kommen *Punkt-Matching-* sowie *Kontur-Matching-Verfahren*. Beim Vergleich zweier segmentierter Schnitte sucht ein Algorithmus nach Polygon-Paaren, die anschließend zueinander zugeordnet werden. Ein Rekonstruktionsalgorithmus bildet durch optimale Kantenverbindung der benachbarten Polygone für jedes Polygon-Paar eine geschlossene, meist aus Dreieckspolygonen bestehende Hülle (Dohrmann et al. 2004). Dreiecke sind besonders geeignet, da ihre Ecken stets in einer Ebene liegen.

Zur Visualisierung müssen geeignete Beleuchtungsmodelle gefunden werden (*shading*). Lokale Beleuchtungsmodelle dienen der Darstellung von Objektoberflächen, indem das Verhalten von Licht simuliert wird. Im einfachsten Verfahren, dem sogenannten *Flat-Shading*, sind noch die Kanten zwischen den aneinandergrenzenden Polygonen erkennbar, da jeder Pixel eines Polygons den glei-

chen Lichtwert und die gleiche Farbe erhält. Dies lässt das Objekt relativ unrealistisch erscheinen. Eine detailgetreuere Darstellung ist nur über die Verkleinerung der einzelnen Vielecke realisierbar, was aber wiederum mit einem erhöhten Rechenaufwand verbunden ist. Beim komplizierteren *Gouraud-Shading* entsteht durch zeilenweise Interpolation der Beleuchtungswerte der Flächen aus den Intensitäten der Kanten eine Schattierung (Gouraud 1971). Die Oberflächen des Objektes erscheinen also anders als beim Flat-Shading weich und fließender. Die Umrisse des Objektes bleiben jedoch kantig. Die weitaus realistischste Darstellungsweise bietet das *Phong-Shading*. Hierbei wird durch Interpolation der Eckvektoren und der Kanten ein Normalvektor in jedem Punkt des Polygons dargestellt aus dem schließlich die Beleuchtung der einzelnen Punkte berechnet wird (Phong 1975). Hieraus resultiert eine Oberflächendarstellung mit sehr weichen Übergängen und der Möglichkeit, Glanzpunkte darzustellen. Der nötige Rechenaufwand ist jedoch weitaus größer. Die Qualitätsunterschiede der Beleuchtungsmodelle in der Darstellung desselben Objekts zeigt Abbildung 1.

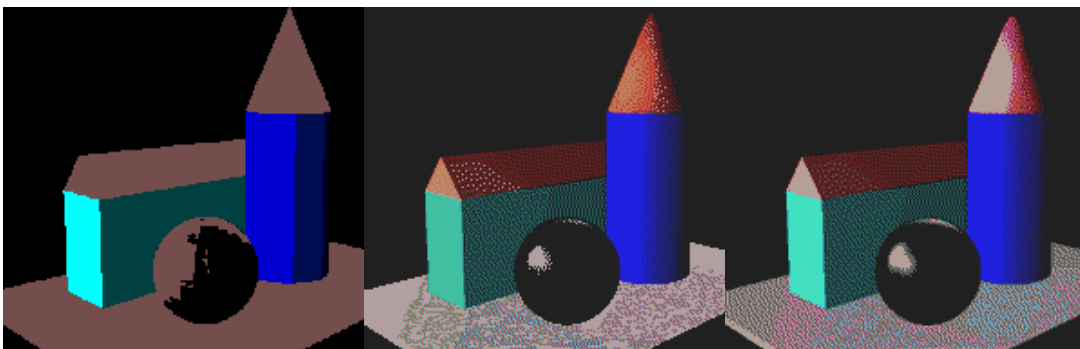


Abbildung 1: Vergleich der Oberflächendarstellung mittels Flat-, Gouraud- und Phong-Shading; aus http://www.glossar.de/glossar/z_shading.htm

Ein weiteres, sehr rechenintensives Beleuchtungsmodell stellt das *Ray Tracing* (engl.: Lichtstrahlverfolgung) dar. Hierbei wird der natürliche Verlauf eines Lichtstrahles und sein Auftreffen auf die Netzhaut in größter Genauigkeit simuliert. Da die Ausbreitung von Licht in einer Szene nachempfunden wird, handelt es sich um ein sogenanntes globales Beleuchtungsmodell. Mathematisch können Lichtphänomene an der Objektoberfläche wie Absorption und Brechung dargestellt werden. Hierzu wird der zu berechnende Lichtstrahl in seinem Verlauf aufgespalten. Die resultierenden Bilder wirken sehr realistisch (Glassner 1989). Das

Verfahren ist jedoch aufgrund des enormen Rechenaufwandes zum heutigen Stand der Technik für einen Einsatz im Echtzeitrendern nicht geeignet.

Das *Volume-Rendering* verwendet direkt die Farbinformation der Voxel. Anatomisches Wissen und die vorherige Segmentierung sind nicht zwingend Voraussetzung. Dies ist bei vielen Anwendungen, bei denen die Abgrenzung von Strukturen sehr diffizil ist (z.B. infiltratives Tumorwachstum) von großem Vorteil. Die Gesamtheit der Voxelinformationen bleibt erhalten (Abb. 2) und der Prozess der Extraktion einer Oberfläche, der hohes Fehlerpotential bergen kann ist überflüssig. Allerdings werden große Ansprüche an den Speicherplatz und die Plattform gestellt und die Orientierung in diesen Modellen ist aufgrund ihrer hohen Plastizität oft erschwert (Böttcher 2000, Heine 2004).

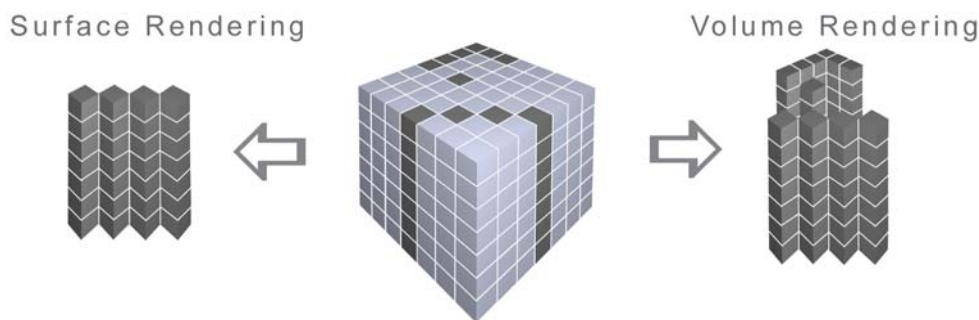


Abbildung 2: Prinzip von Surface- und Volume-Rendering; aus Heine 2004

2.1.3.5 Cuberille-Modell und Marching-Cubes-Algorithmus

Oberflächenmodelle können aus Voxel-Datenmengen modelliert werden, wie sie bei bildgebenden Verfahren wie etwa dem CT automatisch ausgegeben werden. Diese Modelle wirken sehr detailgetreu und realistisch, haben jedoch den Nachteil, dass der benötigte Speicherplatz sehr schnell in den Gigabyte-Bereich steigen kann und Visualisierungen hierdurch erheblich verlangsamt werden.

Das Cuberille-Verfahren ist der erste für die Computertomographie optimierte Algorithmus. Mit Hilfe eines sogenannten Graphensuchverfahrens werden ausgehend von einem ersten, die Oberfläche repräsentierenden Voxel weitere Oberflächenelemente gesucht, die in ihrer Gesamtheit schließlich die Oberfläche des Objektes darstellen (Che et al. 1985).

Der Marching Cubes Algorithmus, der 1987 von William E. Lorensen und Harvey E. Cline entwickelt wurde, ermöglichte es erstmals, sich den recht sperrigen Volumen-Modellen durch weitaus praktikablere Polygon-Modelle anzunähern. Eckige Flächen – in der Regel Dreiecke, da hier alle Ecken in einer Ebene liegen – werden so aneinander gefügt, dass sie die Oberfläche des Objektes nachbilden (Drahtgittermodell). Der Speicherbedarf bleibt relativ gering und die Möglichkeiten weiterer Manipulationen am Modell sind flexibler (Lorensen und Cline 1987). Nachteil dieser Verfahren ist, dass nur Oberflächen (Isoflächen) dargestellt werden können und die Information über innere Strukturen, die insbesondere bei vielen medizinischen Fragestellungen maßgeblich ist, verloren geht (Tiede et al. 1998).

2.1.4 Arbeit mit optischen Schnitten

Die Arbeit mit optischen Schnitten (*virtual sectioning*), wie sie ein Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop liefert, bietet den großen Vorteil, dass man mit dicken Schnitten arbeiten kann und optimal ausgerichtete Schnitte erhält, die kein weiteres Alignment nötig machen und bereits dreidimensionale Informationen liefern (Huijsmans et al. 1986, Karen et al. 2003). Allerdings reicht die Detailgenauigkeit oft nicht an die von konventionellen lichtmikroskopischen Präparaten heran (Fiala 2005). Das Gesichtsfeld ist meist auf 200 x 200 µm, die Eindringtiefe in das Objekt auf 100 µm beschränkt (Karen et al. 2003).

Konfokalmikroskope lassen außerhalb des Fokus verlaufende Lichtstrahlen außer Acht und liefern eine große Auflösung (Laurent et al. 1992). Limitierend ist hierbei jedoch die Dicke des zu untersuchenden Materials und als Störgrößen spielen die Lichtdurchlässigkeit sowie Lichtabschwächung in tieferen Gewebeschichten eine Rolle. Bildverformungen durch Abbildungsfehler können auftreten. Zur Darstellung von größeren Strukturen muss also auf optische Schnitte von mehreren physikalisch hintereinander geschnittenen Blöcken zurückgegriffen werden (Karen et al. 2003). Jirkovska et al. verwendeten für die Rekonstruktion mesonephraler Strukturen in Hühnerembryonen beispielsweise 2 µm dicke optische Serienschnitte in vier sukzessiven 30 µm dicken Gewebelöcken. In dieser Studie wurde darüber hinaus bewusst auf eine Deparaffinisierung des fixierten Materials verzichtet, um die räumliche Anordnung struktureller Ein-

zelheiten zu bewahren und Artefakte sowie Verschiebungen zu vermeiden (Jirkovska et al. 2005).

Geeignete Algorithmen sind in der Lage, korrespondierende Objekte problemlos einander zuzuordnen und auch sich aufzweigende Strukturen wie etwa Kapillargefäße, bei denen die sogenannte *branching*-Problematik auftritt, zu verarbeiten und darzustellen (Chen et al. 2007).

Karen et al. konnten mit Hilfe der Softwarepakete GlueMRC und LinkMRC vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf teilautomatisierte Bildregistrierung von optischen Schnitten erhalten. GlueMRC dient dabei dem Zusammensetzen benachbarter Bilder ähnlich einem Mosaik. LinkMRC übernimmt die Anordnung und Aneinanderreihung der hintereinander geschnittenen und untersuchten Blöcke. In beiden Fällen muss manuell nur eine grobe Ausrichtung vorgegeben werden. Das exakte Alignment wird auf Basis von Intensitätskriterien der Farbinformationen der Bilder berechnet. Voraussetzung für dieses Verfahren ist jedoch, dass weder zu große Verformungen noch Gewebsverluste zwischen den einzelnen Bildstapeln aufgetreten sind (Karen et al. 2003).

2.1.5 Arbeit mit physikalischen Schnitten

Bei der Arbeit mit physikalischen Schnitten (*real sectioning*) werden als initiale Arbeitsschritte ausgehend von dem in Paraffin eingebetteten Substrat das Schneiden mittels Mikrotom, die Deparaffinisierung, Rehydrierung und das Einfärben nötig. Serielles Schneiden eines Gewebeblocks ist sehr zeit- und arbeitsintensiv. Die Anzahl der zur Visualisierung eines Objektes zur Verfügung stehenden Schnitte bestimmt maßgeblich deren Qualität (Funnell 1984). Der Erfolg der Rekonstruktion aus histologischen Schnitten hängt des Weiteren sehr stark von Faktoren wie Gewebsveränderungen und –verformungen beim Konservieren, Einbetten und Schneiden sowie der Genauigkeit der Datenakquisition und Bildausrichtung ab (Haas und Fischer 1997). Artefakte wie Zerrung und Stauchung sowie mechanische Beschädigung und Verlust einzelner Schnitte können leicht auftreten (Jirkovska et al. 2005, Manconi et al. 2001) und ihr Grad steht in engem Zusammenhang mit Art und räumlicher Anordnung der zu untersuchenden Strukturen (Scarborough et al. 1997). Dies kann für die weiteren Arbeitsschritte Verformungen und Verlagerungen von Strukturen mit sich

bringen, die eine Ausrichtung und Rekonstruktion unmöglich machen. Die Verwendung von Kunststoff als stabilisierendes Medium vermag dies zum Teil zu verhindern (Fujimura und Nozaka 2002).

Die Arbeit mit episkopischen Bildern, die von der Objektoberfläche aufgenommen werden, stellt ein schnelles Verfahren dar, da keinerlei Verschiebungen stattfinden und zeitraubende Arbeitsschritte der Reorientierung nicht nötig sind. Dieses Vorgehen ist vor allem geeignet, wenn keine hohe histologische Auflösung bis auf zelluläre Ebene gefordert ist (Weninger et al. 1998). Technische Grundlage der Färbung der Objektoberfläche war in der Arbeit von Weninger et al. eine Blei-Sulfid-Reaktion. Der fixierte und mit Bleiazetat gründlich vorgefärbte Objektblock (*on block staining*) wurde auf dem Mikrotom geschnitten, wobei in jeder Schnittebene mit einer festinstallierten Kamera zunächst ein natives Bild erstellt wurde. Im Folgenden erfolgte das Auftragen einer Natriumsulfidlösung und mittels eines Luftstrahls das Entfernen von überschüssigen Lösungsmengen. Schließlich wurde eine zweite Aufnahme, diesmal von der gefärbten Oberfläche (*stained image*) vorgenommen. Dieses Prozedere wurde über den gesamten Schneideprozess hinweg fortgesetzt und die Bilder vollautomatisch digitalisiert. Weitere Programmfunktionen glichen die Helligkeit der einzelnen Bilder an. Durch die Subtraktion des Nativbildes von dem gefärbten wurde ein Konturbild der Probe erzeugt, auf das eine automatische Segmentation mittels eines *dynamic-threshold*-Algorithmus angewendet werden konnte (Weninger et al. 1998). Die dreidimensionale Rekonstruktion wurde auf Basis des Marching-Cubes-Algorithmus durchgeführt.

2.1.6 Verwendung histologischer Schnittbildserien

Methoden zur dreidimensionalen Rekonstruktion sind gefragte und unentbehrliche Verfahrensweisen in der Embryologie und Entwicklungsbiologie, da sie Türen zum besseren Verständnis komplexer Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge öffnen. Sie stellen Wissenschaftler aber gleichzeitig im Hinblick auf Zeit- und Arbeitsintensität vor große Herausforderungen und Probleme. Während 3D-Visualisierungen in Techniken, die wie CT, MRT und CLSM virtuelle Schnitte liefern bereits routinemäßig eingesetzt werden, haben sie sich im Zusammenhang mit physikalischen Schnitten noch nicht durchsetzen können. Dies

ist auf drei große, regelmäßig bei physikalischen Serienschritten auftretende Phänomene zurückzuführen. Hierbei handelt es sich um Fehlaustrichtung, Verformung und Variationen in der Färbungsintensität (Streicher et al. 1997). Stellt man sich Serienschritte in einer Sequenz filmähnlich abgespielt vor, so entsteht aus der Summe der Abweichungen ein dynamisches Rauschen. Bedingt durch die Methodik kommt es bei der Präparation der Schichtpräparate zu Translation, Rotation und Skalierung der einzelnen Bilder gegeneinander, die manuell oder mittels geeigneter Algorithmen korrigiert werden müssen (Kahn et al. 1996). Die Abhängigkeit von externen, künstlich angelegten Anhaltspunkten, sogenannten *landmarks*, macht die Nutzung einiger hierauf ausgerichteter Verfahrensweisen für die Visualisierung konventioneller oder archivierter Schnittbildserien problematisch, obgleich sie gute Möglichkeiten bieten, geometrische Abweichungen automatisch zu korrigieren und den Alignment-Prozess weitestgehend zu automatisieren (Stoltenberg et al. 1997).

2.1.6.1 Darstellung tubulärer Strukturen

Die Visualisierung komplexer tubulärer Strukturen, wie sie etwa in Hoden, Nebenhoden, Prostata oder Niere vorkommen, stellt hohe Anforderungen an die Genauigkeit der weiteren Bildverarbeitung. Ineinander gewundene Röhrensysteme stellen sich im zweidimensionalen Schnittbild in dementsprechend unmittelbar benachbarten runden bis längsovalen Strukturen dar. Schon beim Schneideprozess können sich durch mechanische Einwirkungen geometrische Verschiebungen manifestieren, die ein späteres Alignment zweier benachbarter Bilder nahezu unmöglich machen und in der Rekonstruktion auf falsche räumliche Beziehungen schließen lassen.

Stoltenberg et al. (1997) rekonstruierten aus einer histologischen Schnittbildserie des Nebenhodens einer Ratte den Ductus epididymidis. Die Schnitte waren ohne Marker angefertigt worden. Nach dem Alignment konnte durch Darstellung virtueller Schnitte entlang der z-Achse der Erfolg der Angleichung überprüft werden. Solch virtuelle Schnitte können überdies auch vollkommen neue Erkenntnisse über Organstrukturen eröffnen (Stoltenberg et al. 1997).

2.1.6.2 Marker-basierte Vorgehensweisen

Die mangelhafte Ausrichtung der einzelnen Schnitte eines Bilderstapels zueinander stellt oft die größte Hürde in der Rekonstruktion dar. Auf der Suche nach einer größtmöglichen Vereinfachung und gegebenenfalls Automatisierung des gesamten Reorientierungsprozesses kann versucht werden, Bezugspunkte in der Probe festzulegen, die nach dem Schneiden und Färben ermöglichen, die räumlichen Ausgangsverhältnisse wiederherzustellen. Ideale Bezugspunkte müssen sowohl Aufschluss über die Originalgröße der Probe als auch über deren geometrische Orientierung geben. Sie sollten über die gesamte Schnittlänge der Probe identisch sein und von einem geeigneten Algorithmus unmissverständlich erkannt werden können (Streicher et al. 1997). Man unterscheidet zwischen internen Markern, die in den meisten Fällen Teil des zu untersuchenden Gewebes sind und externen Bezugspunkten, die im Rahmen der Fixierung artifiziell in das zu bearbeitende Objekt eingefügt wurden.

Der Bezug auf markante, interne Strukturen zum Alignment scheitert oft bereits daran, Strukturen zu definieren, die sich über die gesamte zu untersuchende Länge der Probe konstant oder zumindest nachvollziehbar genug verhalten. Es ist nicht möglich, ein objektives Maß für Verschiebung und Verformung aus ihnen zu erhalten. Das Alignment findet daher stets nur unter Berücksichtigung der einzelnen Bilder untereinander, nicht jedoch gegenüber der Ausgangsgeometrie statt. Man kann in diesem Fall von einer gemittelten oder auch idealisierten Rekonstruktion sprechen (Streicher et al. 1997).

Die Verwendung von externen Markern bietet eine Reihe von Vorteilen. Durch die Einführung von simplen Materialien ist sichergestellt, dass deren Form in allen Schnitten gleich bleibend ist und sie ohne großen Rechenaufwand automatisch zugeordnet werden können. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren verschiedene organische und anorganische Substanzen wie etwa Nervenfasern, Fäden oder Drähte mit in den Präparatblock eingebettet (Andreasen et al. 1991, Burston und Thurley 1957, Johnson et al. 1989, Prothero und Prothero 1986). Eine weitere Möglichkeit ist das Anfertigen von Bohr- oder Laserlöchern in dem Block (Kriete und Magdowski 1990). Laserlöcher haben jedoch den Nachteil, dass sie eine konische Form annehmen und die Verarbeitung damit erschweren sowie die Länge des Präparatblockes mit der maximalen Eindringtiefe des Lasers begrenzt ist (Streicher et al. 1997).

Eine Arbeitsgruppe aus Wien (Streicher et al. 1997) wählte zur dreidimensionalen Rekonstruktion 183 histologischer Schnitte von Gliedmaßenanlagen der Maus das im folgenden beschriebene Prozedere, die sogenannte EMAC-Methode (*External Marker-based Congruencing*).

Die Probe wurde nach vollständiger Entwässerung in einem Kunststoffmedium eingebettet, da beispielsweise Paraffin in den herkömmlichen histologischen Arbeitsgängen wieder entfernt wird, für die zuverlässige Verwendung externer Marker jedoch eine permanente Einbettung notwendig ist. Nach Aushärtung des Mediums wurden vier parallele Bohrlöcher in Längsrichtung angefertigt, deren Abmessungen zur späteren Kontrolle dokumentiert wurden. Es folgte die Anfertigung der 10 µm dicken Schnitte und die Färbung mit Alzianblau zur Hervorhebung der Knorpelsubstanz sowie mit Eosin, um die Umrisse der Probe und die Bohrlöcher zu markieren. Hiernach wurden nach einer groben Vorausrichtung unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Kamera Grauwert-Bilder der einzelnen Schnitte auf dem Datenträger gespeichert. Zur Automatisierung des Bildverarbeitungsprozesses wurden zwei Programme, sogenannte *Makros* geschrieben. Das erste Programm analysierte zunächst die Färbung des Hintergrundes und passte die Grauwerte durch Abgleich mit einem leeren Referenzobjektträger an. Des Weiteren erkannte das Makro die externen Marker (die Bohrlöcher) anhand ihrer sehr hellen Färbung und markierte sie als schwarze Bereiche. Automatisch wurde jede Bilddatei fortlaufend benannt und gespeichert. Das zweite Makro diente der Erkennung der externen Marker, generierte deren zwei Diagonalen zueinander und verschob und rotierte die Bilder in eine durch Ermittlung größtmöglicher Deckungsgleichheit der Marker und deren Diagonalen ausgerichtete Position. Dabei wurden auch Stauchungen und Zerrungen ausgeglichen. Schließlich segmentierte es die relevanten Strukturen und die Bohrlöcher mit Hilfe eines Schwellenwertverfahrens und speicherte die Daten als binäre Bilder, die so von jeder Rekonstruktionssoftware weiterverarbeitet werden konnten. Der Zeitaufwand von der Bildgewinnung bis hin zum 3D-Modell betrug in diesem Fall ungefähr fünf Stunden. Der Erfolg und die Genauigkeit des Alignments und der Segmentierung konnten an der Gestalt der rekonstruierten Bohrlöcher nachvollzogen werden.

Ein ähnliches Vorgehen wurde von Knabe et al. (2002) zur dreidimensionalen Rekonstruktion eines Nagetier-Gehirnes gewählt. Der kunststoffeingebettete

Präparatblock wurde zum einen hochauflösend in einer *Arbeits-Serie* in einer entsprechenden Färbung digitalisiert und gespeichert, zum anderen in einer *Referenz-Serie* mit einer geringeren Auflösung, die vor allem der Darstellung der Konturen des Resin-Blockes diene. Die so gewonnenen *Hybrid-Schnitte* wurden mit Hilfe von Bildbearbeitungs- und Renderingtools zu einem dreidimensionalen Modell verarbeitet (Knabe et al. 2002).

2.1.7 Die Software-Anwendung „Amira“

2.1.7.1 Grundgedanke

Die Anwendung „Amira“ dient der *High-End-Visualisierung* und soll die meist einfache Handhabung einer Software, die für bestimmte Anforderungen programmiert wurde mit der Möglichkeit, eben diese Software durch eigene Modifizierung ganz individuell an den jeweiligen Forschungsanspruch anzupassen, vereinen. Dazu wurde das Programm mit der Zielsetzung entwickelt, dass auch ungeübte Benutzer einfache Visualisierungen mit nur wenigen Maus-Klicks darstellen können, gleichzeitig jedoch über die Integration eines *Scripting-Interfaces* auch sehr hohe Flexibilitätsansprüche befriedigt werden können, da hiermit die Möglichkeit zum selbständigen Einfügen von Modulen und automatisierten Prozeduren besteht. „Amira“ unterstützt eine Vielzahl gängiger Dateiformate und verschiedene Rechen-Plattformen, insbesondere Windows 32- und 64-bit, Macintosh, Linux und andere Unix-Varianten. Durch die Verwendung aktuellster Algorithmen soll erreicht werden, dass eine Optimierung sowohl im Hinblick auf die Hardware Performance als auch auf die Bildqualität erfolgt (Stalling et al. 2005).

2.1.7.2 Programmbasis

„Amira“ basiert auf *Open Inventor*, einer in der Programmiersprache C++ verfassten Programmbibliothek zur Erstellung von 3D-Grafiken unter Verwendung von *OpenGL*. Es verfügt über eine modulare Software-Architektur, in der verwandte Module in Einheiten zusammengefasst sind. Diese sind in *shared libraries* (DLL unter Windows) hinterlegt, was die jeweils auszuführende Daten-größe klein hält und Aktualisierungen im Fall von Programm-Updates erleichtert. Die graphische Benutzeroberfläche von „Amira“ wurde mit Hilfe von *Qt* pro-

grammiert, einer Datenbank, die Kompatibilität mit allen unterstützten Betriebssystemen erreicht.

Das *scripting-interface*, eine Möglichkeit, Routine-Prozeduren durch die Eingabe von Programmierbefehlen weitestgehend zu automatisieren bzw. neue Module zu integrieren verwendet *Tcl*, eine weit verbreitete *Open-Source*-Skriptsprache.

2.1.7.3 Benutzeroberfläche, Bedienung, Funktionen

Die Benutzeroberfläche von „Amira“ setzt sich aus drei Fenstern zusammen. Dadurch wird die Zahl offener Fenster, zwischen denen man wechseln muss minimiert und sich überlappende Fenster weitestgehend vermieden.

In einem Grafik-Fenster werden die Visualisierungsergebnisse dargestellt und mit verschiedenen Grafikinstrumenten können Ansichtsoptionen geändert werden. Das Konsolen-Fenster dient zur Anzeige von Meldungen und zur Eingabe von zusätzlichen Befehlszeilen. Der „Objekt-Pool“ schließlich stellt eine Art Schaltzentrale der Software dar. Hier werden per *drag-and-drop* oder mit dem Datei-Browser Grafikdateien hinzugefügt und in Form eines Netzwerkes, das den Datenfluss darstellt, mit verschiedenen Visualisierungstools verknüpft. Diese Tools werden in Form eines Icons angezeigt und man kann sie aus einem kontextgesteuerten Menü, das nur die für den vorhandenen Datensatz relevanten Anwendungen anzeigt, auswählen. Die jeweiligen Einstellungen können unterhalb in den sogenannten *ports* geändert werden (Abb. 3).

Die Verbindung der Objekte im *Pool* durch Linien lässt klar nachvollziehen, welcher Datensatz mit welchen Werkzeugen verknüpft ist und welches Rechenergebnis beispielsweise daraus resultiert. In dieser Art entstandene Netzwerke können in einem *Tcl*-Skript abgespeichert und in der nächsten Arbeitssitzung somit leicht wiederhergestellt werden.

Die Ports können meist über eine Schaltfläche im dazugehörigen Icon zu- bzw. abgeschaltet werden und ihre Modifizierung geschieht über Schieber, Eingabefelder oder Ähnliches. Veränderungen im Visualisierungsergebnis können je nach Rechenaufwand und Hardware-Performance mehr oder weniger zeitnah im Grafik-Fenster betrachtet werden.

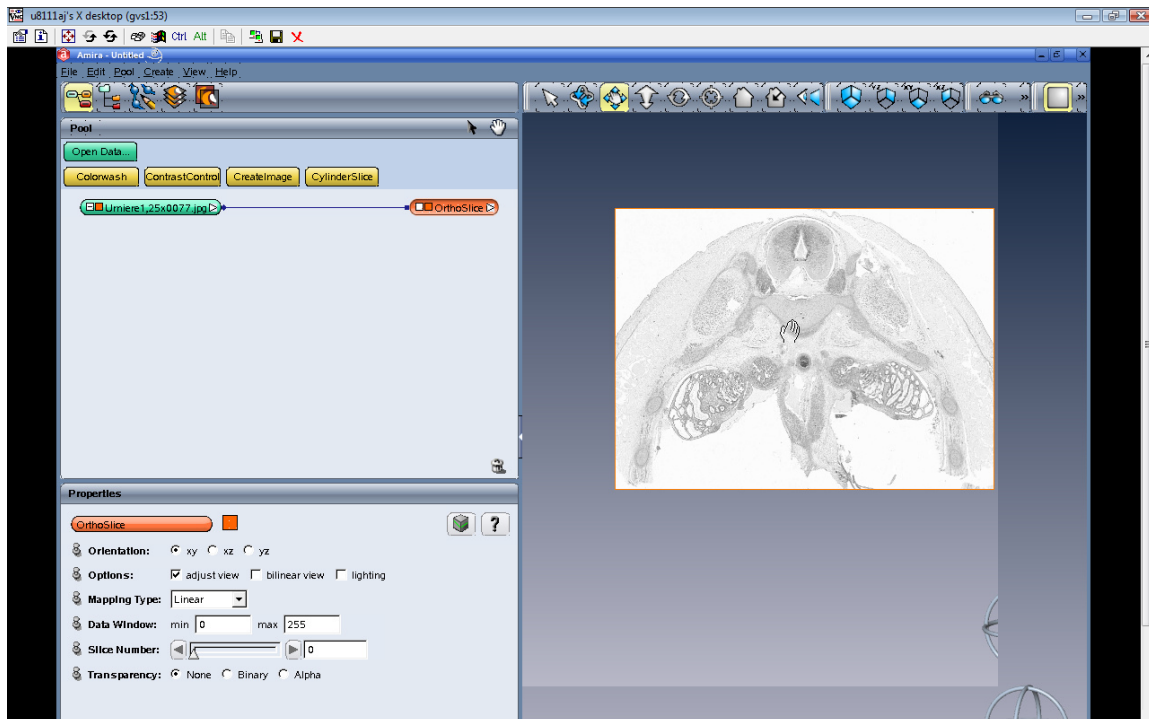


Abbildung 3: Benutzeroberfläche in „Amira“; links: Objekt-Pool und Konsolen-Fenster; rechts: Grafik-Fenster

Neben Daten wie von CT, MRT, Ultraschall und CLSM können auch konventionelle mikroskopische Bilddaten Verwendung in „Amira“ finden. Zur Betrachtung der 2D-Schnitte wird zum einen *OrthoSlice* angeboten, das z-Achsen-orientierte Schnitte anzeigt und zum anderen *ObliqueSlice*, bei dem die Achse willkürlich gewählt werden kann.

Vor allem bei der Arbeit mit physikalischen Schnitten wird eine Ausrichtung der Bilder nötig, um vorausgegangene Verschiebungen auszugleichen. Hierzu bietet „Amira“ *AlignSlices*, ein Tool mit dem wahlweise händisch, semi-automatisch oder automatisch ein Alignment ausgeführt wird. Bei der manuellen Ausrichtung kann durch die semitransparente Darstellung zweier aufeinanderfolgender Schnittbilder mittels Translation und Rotation ein guter Angleich erfolgen. Durch das Setzen von *landmarks* ist das Programm in der Lage, selbständig Verschiebungen durchzuführen. Ebenso ist es möglich, das Alignment vollautomatisch nur auf Basis der Berechnung einer minimalen Grauwertabweichung zu vollziehen. Die alignierten Bildstapel werden im *Amira-mesh* Dateiformat gespeichert. Die Segmentierung, also der Prozess, der jedem Pixel bzw. Voxel Zugehörigkeit zu einem bestimmten Material oder einer Struktur zuweist, geschieht in „Amira“ über die Erstellung von *labels*, in welchen diese Informationen hinterlegt sind.

Der *segmentation-editor* bietet verschiedene Tools an. Im einfachsten Fall können Bereiche mit einem Lasso, einem Pinsel oder mithilfe des Grenzwertes ausgewählt werden. Anspruchsvollere Verfahren sind 2D- oder 3D-Bereichswachstumsverfahren. Beliebig viele Materialien können benannt und Farben ausgewählt werden. Der Segmentierungsprozess kann anhand der Anzeige entlang aller drei Achsen kontrolliert werden. Mithilfe von Filtern (Glätten, Rauschfilter) und Interpolationsfunktionen kann das Ergebnis verfeinert werden.

Nachdem die *labels* für einen Bildstapel editiert wurden, kann ein polygonales Oberflächenmodell errechnet werden, bei dem die Konturen benachbarter Bilder passend verbunden werden. Dies geschieht auf Basis des *Marching-Cubes-Algorithmus*. Sollte die resultierende Oberfläche für weitere Rechenschritte zu detailliert sein, kann sie vereinfacht bzw. mit dem *surface editor* vielfältig bearbeitet werden.

2.1.7.4 Anwendungsbeispiele

Dreidimensionale Darstellungstechniken haben einen weiten Anwendungsbereich in Medizin und Biologie gefunden. Aktuell dienen sie zunehmend dazu, diagnostische Möglichkeiten zu erweitern oder überhaupt erst zu erschließen und in der Chirurgie mittels quantitativer Analyse und Simulation operative Zugänge in Lehre und Praxis aufzuzeigen bzw. zu planen (Hege 2003). „Amira“ unterstützt den gesamten Prozess, vom Einlesen der Bilddaten bis hin zur dreidimensionalen Rekonstruktion und ermöglicht die Betrachtung stereoskopischer Bildpaare sowie numerische Simulation und Optimierung von Daten.

Anwendung findet die Software beispielsweise in der Hyperthermie-Krebstherapie. Durch die Bestrahlungsplanung an einem zuvor generierten, detaillierten Patientenmodell kann die Belastung für das umgebende, gesunde Gewebe minimiert werden, während im Tumorgewebe ein maximaler Effekt erreicht wird.

Auch in der chirurgischen Operationsplanung kann die Visualisierung eine entscheidende Rolle spielen. Der Operateur kann beispielsweise verschiedene Zugänge zu einem tiefer gelegenen Hirntumor durchspielen und den schonendsten, sinnvollsten auswählen. Ästhetische Aspekte, wie etwa Folgen eines operativen Eingriffs am Gesichtsschädel können dem Patienten gegenüber anschaulicher und differenzierter kommuniziert werden.

Studien über komplexe Strukturen wie etwa die Situation der Gefäßversorgung und des Blutflusses im menschlichen Kortex im Rahmen der Schlaganfall-Forschung können zum besseren Verständnis führen und über den Vergleich von Daten verschiedener Probanden Risikomerkmale erkennen lassen¹.

Basierend auf „Amira“ wurden in „Virtual Insect Brain“², einem Projekt, das sich intensiv mit der Erforschung des Drosophila-Gehirnes beschäftigte, Ausprägungen und Varianzen des Gehirns untersucht und eine Art „Standardgehirn“ durch den Vergleich mehrerer Datensätze entwickelt (Jenett et al. 2006, Zöckler et al. 2001).

2.1.8 Anwendungen der Rekonstruktion in der Veterinär- und Humanmedizin

Bei einer Vielzahl medizinischer Fragestellungen stellt die computergestützte Verarbeitung tomographischer Daten die einzige Methode dar, um befriedigende und verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Vor allem auch die topographische Situation komplexer Strukturen und die Morphogenese von Organsystemen können nur im dreidimensionalen Kontext vollkommen verstanden werden (Arnold und Lang 2001). Virtuelle Rekonstruktionen bringen einige klare Vorteile gegenüber zum Beispiel dem Anfertigen von Modellen mit sich. Sie können vermessen und genauestens analysiert werden und es ist möglich, sie in beliebig vielen Ebenen und Orientierungen zu schneiden und zu betrachten. Einmal auf einem Datenträger gespeichert können sie leicht kopiert, an Kollegen weitergegeben oder beispielweise in Internetinhalten präsentiert werden (Haas und Fischer 1997, Scarborough et al. 1997).

Die Erstellung sogenannter Voxel-Modelle begann in den 1980er Jahren und hat in den letzten Jahren massiv zugenommen (Caon 2004). Aus Daten, die zum Teil von Leichen, zum Teil aber auch von Patienten gewonnen wurden, erstellten verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedlich umfangreiche Modellsätze. Zumeist handelt es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Rekonstruktionen kryogeschchnittener bzw. radiologisch untersuchter menschlicher Leichen oder Teilen davon, da sich bei Patienten das Problem einer nicht vertretbaren Strah

¹ <http://www.amiravis.com/images/stories/pdf/web-amira-brochure.pdf> (06.04.10)

² <http://www.neurofly.de> (06.04.10)

lenexposition ergibt. Die Ergebnisse sind zum Teil auch im Internet zugänglich (Abb. 4 und 5). Beispiele hierfür sind das *Visible-Human-Project*¹ sowie *Voxel-Man*².

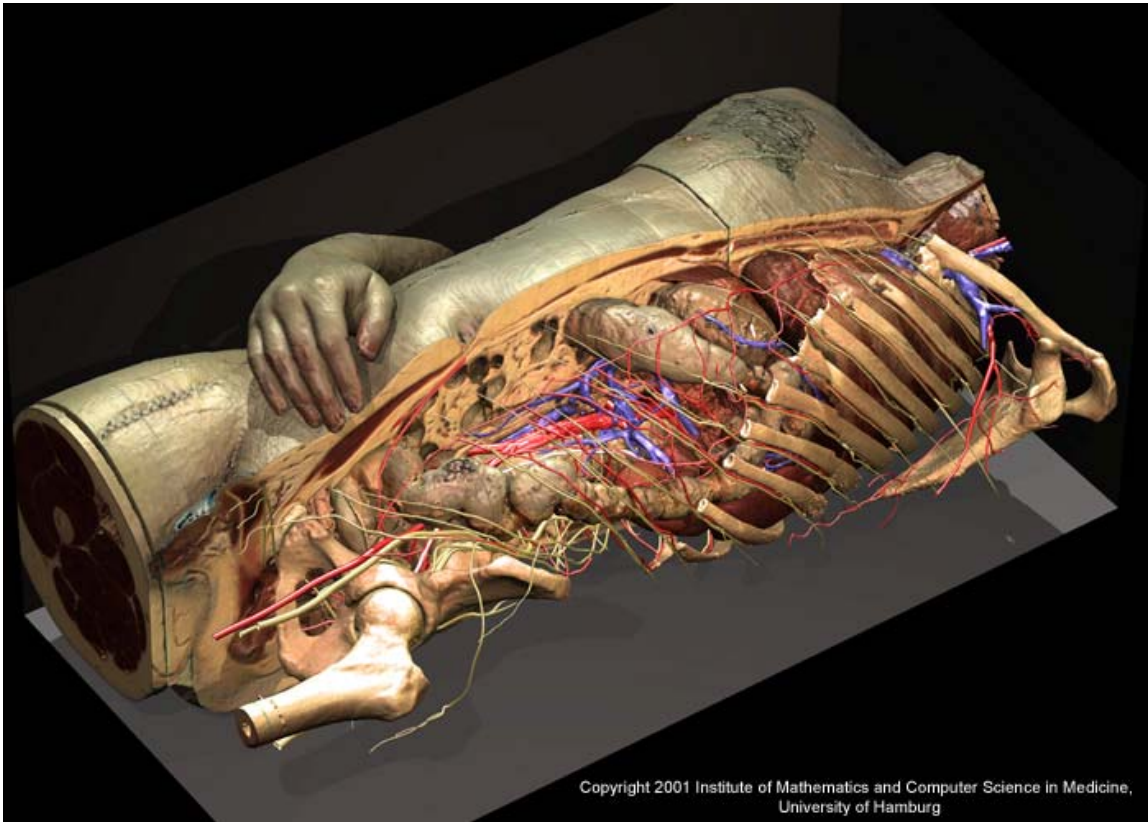


Abbildung 4: Darstellung der inneren Organe in Voxel-Man; aus <http://voxel-man.de>

Die große Bedeutung dieser Modelle liegt darin, dass sie eine verlässliche Anatomie bieten, da sie von realen Körpern abgeleitet sind. Auf ihrer Grundlage können beispielsweise Berechnungen zur Dosimetrie an einem standardisierten Durchschnittskörper (*Reference Man*) in der diagnostischen Radiologie durchgeführt werden. Nachteile sind unter anderem darin zu sehen, dass Strukturen, die wie etwa Periost oder Epidermis unterhalb der Pixelebene anzusiedeln sind, nicht oder nur schwer zu segmentieren sind und ihre Proportionen falsch dargestellt werden (Caon 2004).

¹ http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible_human.html (06.04.10)

² <http://www.voxel-man.de> (06.04.10)

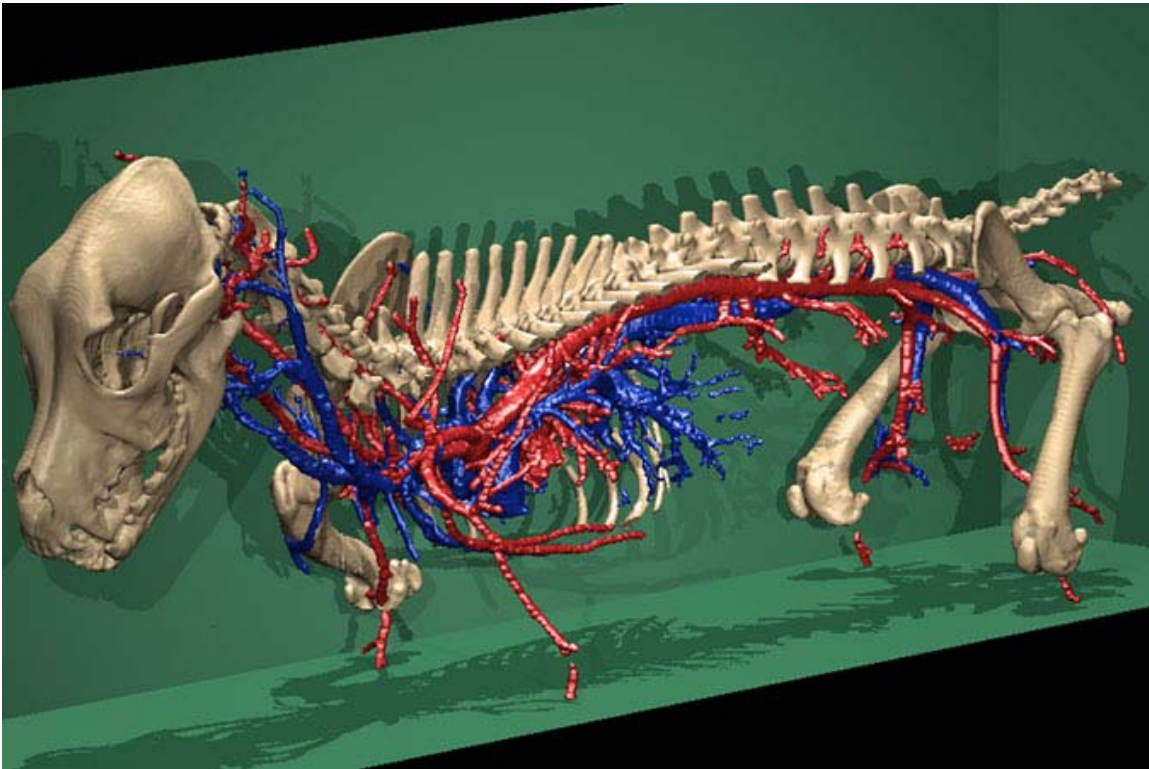


Abbildung 5: Anatomie eines Hundes im "Visible Animal Project"¹

Sakas et al. entwickelten ein Softwarepaket, das es ermöglicht, Ultraschalldaten in Voxel-Daten, analog denen von Tomogrammen, umzuwandeln. Die Software *InViVo* ist in der Lage, am Videoausgang nahezu jeden Ultraschallgerätes Bild-daten abzugreifen, zu digitalisieren und abzuspeichern. Mittels eines elektro-magnetischen Systems wird die Position des Schallkopfes zum Zeitpunkt der Aufnahme erfasst, sodass die zweidimensionalen Ultraschallbilder in ein regulä-res 3D-Gitter übersetzt werden können. Die Grauwerte der Pixel werden durch verschiedene Algorithmen in jene der neu entstandenen Voxel interpoliert und die Bildqualität, die beim Ultraschall jenen anderer bildgebender Verfahren un-terlegen ist, durch den Einsatz bestimmter digitaler Filter optimiert. Da automati-sche Segmentierungsergebnisse meist nicht befriedigend sind, wird die Visuali-sierung über Volume-Rendering dargestellt. Als Ergebnis erhält der Untersucher dreidimensionale Bilddaten, in denen er unter anderem Strecken und Volumina ausmessen, beliebige Schnittebenen anlegen und Operationszugänge planen kann (Sakas 1997).

¹ <http://www2.vetmed.uni-muenchen.de/anat1/rekonstruktionen.htm> (06.04.10)

Viele Hersteller arbeiten an der Integration von 3D-Verfahren in Gerätesoftware zweidimensionaler Diagnostikgeräte und *PACS* (Picture Archiving and Communications Systeme).

Dreidimensionale Bilddaten, die den Prozess der Segmentierung durchlaufen haben, können neben Visualisierungen auch realistische Drahtgittermodelle des Patienten liefern. Diese sind Ausgangspunkt für die Planung von Operationen und Therapien. Die Medizin erhofft sich hiervon bessere Operationsergebnisse sowie befriedigendere Heilungsverläufe. Als Beispieldisziplin ist hier die Mund-Kiefer-Chirurgie zu nennen. Es kann eine möglichst detaillierte Vorhersage über den postoperativen Zustand gegeben werden und selbst die Simulation der neu geschaffenen Mimik ist möglich (Hege 2004).

Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ist in der Humanmedizin die häufigste kraniofaziale Fehlbildung. Dohrmann et al. entwickelten mit Hilfe eines Softwaresystems aus hochauflösenden histologischen Schnittbildaufnahmen aus dem kraniofazialen Bereich menschlicher Feten ein dreidimensionales Modell der relevanten Strukturen. Dieses Modell ist Grundlage für den Vergleich der unterschiedlichen Operationsverfahren untereinander und mit den Verhältnissen beim gesunden Feten mittels *Finite-Element-Analyse* (Dohrmann et al. 2004).

Als weiteres Anwendungsbeispiel ist die Rekonstruktion der individuellen Anatomie von Spenderorganen vor einer Transplantation zu nennen. Hierdurch können Operationsrisiken reduziert und gegebenenfalls passendere Spender gefunden werden. Wang konnte dies am Beispiel der Nierentransplantation aufzeigen (Wang et al. 2007).

Bei allen Möglichkeiten, die die Visualisierung eröffnet, darf jedoch nicht übersehen werden, dass sich durch die Vielzahl von Rechenschritten und durch Visualisierungseffekte Fehlinformationen manifestieren können, die in einem schlicht falschen Modell resultieren (Ziegler 2005). Dies kann in der Medizin fatale Folgen haben. Daten, die zur medizinischen Entscheidungsfindung herangezogen werden, müssen normierbar sein.

2.1.8.1 Anwendungen in Anatomie und Embryologie

3D-Präsentationen finden in der Lehre zunehmend Beachtung, um den Lernenden beispielsweise Organsysteme zu erläutern, die komplizierten Transformationen in Morphologie und Funktion unterliegen.

Form und Größe von Strukturen und Geweben können ebenso wie ihre Beziehungen zueinander anschaulich dargestellt werden und es ist möglich, beispielsweise Messungen im Hinblick auf Längen und Volumina von Organen vorzunehmen (Manconi et al. 2001).

In digitalen anatomischen Atlanten können Datensätze des gleichen Organs vieler Individuen einer Spezies akkumuliert werden. Es entstehen Referenzsysteme, die über die Berechnung von Mittelwerten eine Durchschnittsanatomie abbilden (Krevert 2005). Als Beispiel hierfür ist unter anderem das bereits erwähnte *Standard Drosophila Brain* zu nennen (Zöckler et al. 2001).

Im "Edinburgh Mouse Atlas Project"¹ (*Emap*) wird die Entwicklung von Maus-Embryonen der Theiler-Stadien 1 bis 23 visualisiert. Als Ausgangsmaterial dienten histologische Schnitte, die elastisch mittels *landmarks* registriert und anschließend manuell segmentiert wurden. Der Atlas bildet den Rahmen für *Emage* (Edinburgh Mouse Atlas Gene Expression), eine Genexpressions-Datenbank. Hierdurch werden Genexpression und anatomische Strukturen verknüpft. Der Atlas und die Datenbank stehen im Internet frei zur Verfügung².

Das „Multidimensional Human Embryo Project“³ ist ein weiteres im Internet verfügbares Projekt. Menschliche Embryonen der Stadien 10 bis 23 wurden mittels MR-Mikroskop (T1, T2 und Diffusion) erfasst. Die Daten wurden in Adobe Photoshop segmentiert und an Silikon-Graphics-Arbeitsplätzen über Volume-Rendering dargestellt. Die Stadien können in Apple-Quicktime-Animationen dargestellt werden.

¹ <http://genex.hgu.mrc.ac.uk> (06.04.10)

² <http://www.emouseatlas.org/emage/home.php> (06.04.10)

³ <http://embryo.soad.umich.edu> (06.04.10)

2.2 Mesonephros

2.2.1 Einführung

Die gemeinsame Anlage des Harn- und Geschlechtsapparates wird vom mittleren Keimblatt gebildet. Aufgrund der engen funktionellen und morphologischen Verbindung der beiden Organsysteme spricht man auch vom Urogenitalsystem. Vertebraten besitzen Nieren, die kompakte Organe sind und sich aus dem Mesoderm entwickeln. Die Organentwicklung schreitet von kranial nach kaudal fort. An zwei Stellen wird dieser Prozess unterbrochen, wodurch die vorderen, mittleren und hinteren Abschnitte zeitlich nacheinander gebildet werden. Zumeist degenerieren die vorderen Abschnitte sobald die hinteren Funktionsfähigkeit erlangen. Rückbildungsvorgänge vollziehen sich also ebenfalls in der Richtung von vorn nach hinten.

Am weitesten kranial bzw. anterior gelegen findet sich der Pronephros, der je nach Spezies über ein bis zwölf Nephrotom-Paare verfügt, meist jedoch nicht mehr als vier aufweist (Hildebrand und Goslow 2003). Er ist streng segmental angelegt. Wenigstens rudimentär tritt der Pronephros bei allen Vertebraten in Erscheinung, funktionsfähig ist er jedoch nur bei Larven von Knochenfischen und Amphibien und möglicherweise über eine kurze Zeitspanne bei Embryonen von Reptilien. Seine tierartlich große Variabilität erklärt sich durch seinen sehr alten Ursprung und eine sehr reduzierte Funktion. Glomerula als einstülpende Gefäßknäuel fehlen. Die Vornierenkanälchen verschwinden rasch wieder (Zietzschmann und Krölling 1955). Der Ausführungsgang, der primäre Harnleiter oder auch Wolffsche Gang, entsteht durch Verschmelzung der Vornierenkanälchen sowie Lumenbildung und bleibt nach der Degeneration des Organs bestehen.

Die mittlere Niere wird Mesonephros genannt und soll als Inhalt dieser Arbeit im Folgenden detailliert behandelt werden.

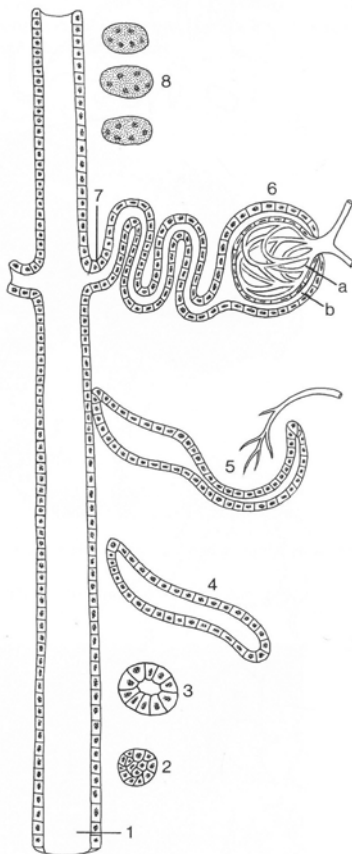
Der am weitesten kaudal gelegene Teil der Nieren, der sich außerdem sowohl onto- als auch phylogenetisch zuletzt entwickelt, ist der Metanephros, der uns als das bleibende Organ beim adulten Tier bekannt ist. Auf ihn soll hier nicht weiter eingegangen werden.

2.2.2 Entwicklung und Struktur der Urniere

Der Mesonephros im engeren Sinne ist nur bei Föten von Amnioten vorhanden. Diese Tiere verfügen als Adulte ausschließlich über die posteriore Niere, den Metanephros. Bei Anamnioten bildet sich kaudal des Pronephros ausschließlich eine Niere aus, die bei diesen Tierarten dann als Opisthonephros bezeichnet wird.

In der embryonalen Entwicklung spielt der Mesonephros als exkretorisches und endokrines Organ sowie aufgrund seiner Beteiligung an der Bildung der Gonaden und der Nebenniere eine wichtige Rolle (Moritz und Wintour 1999).

Die Urniere entwickelt sich zeitlich nach der Vorniere aus dem intermediären Anteil des Mesoderms, stets eine lange Reihe von Somiten umfassend. Dieser Abschnitt des Urnierenblastems wird als Urogenitalplatte bezeichnet. Hier bilden sich aus provesikulären Zellhaufen auf induktiven Reiz des Wolffschen Ganges hin zunächst von kranial nach kaudal fortschreitend Urnierenkugeln. Durch Lumenbildung werden sie zu Urnierenbläschen mit kolumnaren Epithel, die noch durch eine Basalmembran vom Wolffschen Gang getrennt sind. Sie dehnen sich weiter zu Urnierenkanälchen aus und treten einerseits mit dem Urnierengang,



andererseits mit Nebenästen der Aorta in Kontakt (Bremer 1915). Die Nephronanlage wird durch eine Basallamina vom umgebenden Bindegewebe abgegrenzt. Löffelartige Vertiefungen nehmen die Aa. mesonephridicae auf (Abb. 6). So entsteht die Bowmansche Kapsel, die die Gefäßknäuel umschließt. Sie besteht aus zwei Lamellen. Die viszerale Lamelle wird von einem kubischen, die parietale von einem abgeplatteten Epithel gebildet. Elektronenmikroskopisch kann eine deutlich entwickelte Blut-

Abbildung 6: Bildung der Urnierenkanälchen.

1 = Wolffscher Gang; 2 = Urnierenkugel; 3 = Urnierenbläschen; 4 = Urnierenkanälchen; 5 = Bildung von löffelartigen Vertiefungen; 6 = Urnierenkörperchen; 7 = Anschluss des Urnierenkörperchens an den Wolffschen Gang; 8 = degenerierende Urnierenkanälchen

aus Rüsse 1998

Harn-Schranke nachgewiesen werden (Sticklat 2009). Gemeinsam bilden sie das Urnierenkörperchen. Dieser Zustand ist beim Schwein am 17. Graviditätstag erreicht.

Die Anlage des Nephrons hat zu diesem Zeitpunkt die Form eines Destillierkolbens. Die Bildung neuer Nephrone ist beim Menschen mit 5 bis 7 mm SSL und einer Anzahl zwischen 35 und 38 Nephrone abgeschlossen (Ludwig und Landmann 2005).

Bei der Katze ist im 8 bis 10 Somitenstadium eine Verdickung ein erster Hinweis auf die Entwicklung des Mesonephros. Tubuli treten ab 20 Somiten kaudal des 11. Somiten auf, Glomerula finden sich mit 35 bis 36 Somiten kaudal des 12. Somiten (Fraser 1920). Die Urniere der Katze wächst bis zu einer SSL von 32 mm (Bremer 1916) bzw. bis zum 21. Tag der Entwicklung und hat zu diesem Zeitpunkt mit 6,5 mm Länge sowie ca. 50 Nephrone ihre maximale Ausdehnung erreicht (Tiedemann 1976). Beim Schaf sind bei Embryonen von 12,5 mm SSL 70 bis 80 Paare von Urnierenkanälchen angelegt. Seine funktionelle Reife erreicht das Organ bei dieser Tierart am 16. bis 19. Tag. Beim Rind sind am 23. Tag die Tubuli differenziert und die Glomerula sind am 26. Tag ausgereift (Shumkina 1960). Bei Schaf und Rind entwickeln sich im Vergleich zu anderen Säugetieren schon früh die Urnieren, da die Implantation bei Paarhufern vergleichsweise spät stattfindet.

Beim Kaninchen kann das Organ am zehnten Tag zum ersten Mal gefunden werden und bleibt vom 13. bis zum 19. Trächtigkeitstag voll entwickelt (Leeson und Baxter 1957). Auch bei der Maus zeigen sich am zehnten Tag post coitum erste Anzeichen für eine Tubulusformation (Smith und Mackay 1991).

Das Schwein ist dasjenige domestizierte Säugetier mit dem größten Mesonephros, der gleichzeitig über die längste Zeitspanne aktiv ist. Sein erstes Auftreten ist bei 7 mm SSL. Bei 8 mm SSL können 40 Nephron-Paare gefunden werden (MacCallum 1902), zwischen 21 und 40 mm SSL sind es 80 Glomerula (Bremer 1916). Degenerative Prozesse beginnen bei Embryonen größer als 100 mm SSL. Die funktionelle Periode reicht bis zum 45. Tag p.c..

Die paarigen Wülste des Mesonephros liegen beiderseits der Aorta zwischen der Körperwand und dem dorsalen Gekröse. Die Leibeshöhle wird durch das Organ in der Plica mesonephridica ausgestülpt. Eine metamere Gliederung ist bei Säugetieren und insbesondere beim Rind an metamere über das Organ verlaufenden

Querfurchen erkennbar (Zietzschmann und Krölling 1955). Bei vollständiger Entwicklung erstreckt sich die Urniere beim Rind über 18 Somitenpaare, von der Lungenanlage bis in die Beckenhöhle reichend (Rüsse 1998). Die Oberfläche des Organs wird ventromedial sowie dorsomedial durch den Druck der Keimdrüsenanlage bzw. der Niere abgeflacht. Die laterale Kontur ist rund (MacCallum 1902). Die Glomerula sind meist intern, die Tubuli sind gewunden und entleeren sich in den als primären Harnleiter bereits angelegten Mesonephrogang. Die Ausprägung des Mesonephros ist tierartlich sehr unterschiedlich. Bei manchen Nagetieren bleibt er sehr klein, bei Carnivoren und Primaten ist er mittelgroß und bei einigen Ungulaten kann er einen großen Teil der Leibeshöhle einnehmen. Bremer zählt Tierarten nach abnehmender Organgröße folgendermaßen auf: Schwein, Schaf, Katze, Kaninchen, Meerschwein, Mensch, Ratte und Maus (Bremer 1916). Bemerkenswert ist, dass das Kaninchen einen gut entwickelten Mesonephros ausbildet (Davies 1952). Ihre proportional größte Ausdehnung erreicht die Urniere mit 4 bis 6 mm Länge beim Rinderembryo von 15 bis 19 mm SSL und beim Schaf von 12 mm SSL.

Durch Degeneration im kranialen Bereich wird die Urniere nach kaudal verlagert und in den mittleren sowie hinteren Abschnitten voluminöser während sie kranial spitzkonisch zuläuft (Abb. 7).

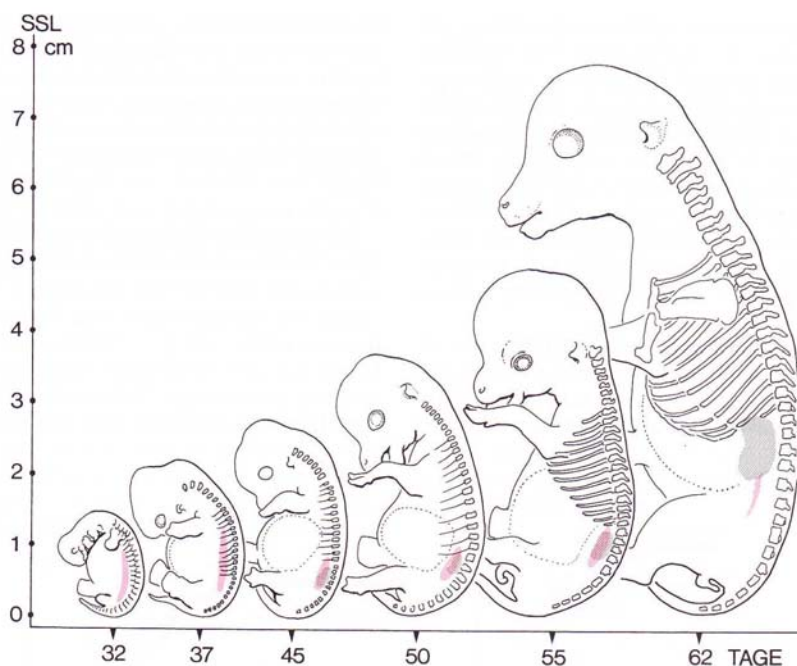


Abbildung 7: Ausdehnung der Urniere des Rindes (rot) zu verschiedenen Trächtigkeitsstadien; aus Rüsse 1998

Zum Zeitpunkt der vollen Organausprägung bestehen die Nephrone aus einem gewundenen sekretorischen Abschnitt und einem gestreckten kollektiven Teil und sind bei vielen Tierarten zumindest theoretisch voll funktionsfähig. Der sekretorische Abschnitt liegt medial und besitzt ein zylindrisches Epithel. Der sammelnde Tubulusabschnitt führt von lateral kommend in einen in der Literatur als „Mesoureter“ bezeichneten, vom Wolffschen Gang stammenden und daher ebenso mit kubischem Epithel ausgestatteten konischen Abschnitt. Seine Ausprägung ist im Epi- und Paragenitale, die sich beim Fötus des Menschen zu etwa gleichen Teilen aus den 27 kaudalen Nephronen entwickeln, unterschiedlich gestaltet. Die weiter kranial gelegenen Urnierenkanälchen des Epigenitale liefern beim weiblichen Tier die Querkanälchen des Epophoron (Rosenmüllersches Organ), beim männlichen Tier die Ductuli efferentes. Die Kanälchen des kaudal gelegenen Paragenitale tragen zur Bildung des Paroophoron bzw. des Paradidymidis bei (Altschule 1930). MacCallum verwendet die Begriffe Pars sexualis für die kranialen Tubuli und Pars renalis für die kaudalen (MacCallum 1902). Während der Mesoureter sich im Epigenitale nach sehr kurzem Verlauf dem kollektiven Tubulus anschließt, kreuzt er im paragenitalen Anteil dorsal die gewundenen Tubuli und findet am Organende Anschluss an die korrespondierenden kollektiven Abschnitte (Ludwig und Landmann 2005). Der Raum zwischen den Tubuli wird von einem lockeren Fibrozytennetz ausgefüllt (Sticklat 2009).

2.2.2.1 Entwicklung und Struktur der Urniere des Wiederkäuers im Besonderen

Der Mesonephros des Schafes entwickelt sich früh und zeigt eine hoch differenzierte Organisation der Glomerula und Tubuli im Bereich der 7. bis 15. Somiten. Rind und Schaf bilden in diesem vorderen Abschnitt des Organs sogenannte „Riesenglomerula“ aus, die durch Fusionierung von 15 bis 20 Glomerula entstehen (Davies und Davies 1950). Von diesen geht der Anschluss der Gonaden an die weiblichen und männlichen Geschlechtsgänge aus. Wrobel et al. beschreiben ein Riesenglomerulum, das beim Rind in der kranialen Organhälfte ab dem 29. Tag p.c. voll ausgebildet zu finden ist. Dieses „kombinierte Malphigische Körperchen“ (Wrobel 2001) erhält an seiner medialen Seite zahlreiche afferente

und efferente Arterien. Lateral entlässt es aufgereiht eine Vielzahl von Harnpölen. Auch Bremer beschreibt beim Schaf im Bereich der kranialen 15 bis 20 Nephrone einen Nephrontypus, der sich durch Abwesenheit einer Bowmanschen Kapsel im klassischen Sinne mit benachbarten Urnierenkörperchen zu einer Kavität verbindet, der sich zahlreiche Tubuli anschließen. In diesem Organabschnitt besteht vielseitiger Kontakt zu den Blutgefäßen. Bremer führt das darauf zurück, dass die frühzeitige Entwicklung der Urnierenkörperchen beim Wiederkäuer in dem in Länge und Breite noch gering entwickelten Wolffschen Körper räumlich stark begrenzt wird (Bremer 1915).

Bei anderen untersuchten Tierarten wie beispielsweise dem Schwein sind die exkretorischen Organe dieser Somitenabschnitte rudimentär bzw. sie werden noch von dem Pronephros eingenommen (Davies und Davies 1950). Beim Vogel und einigen Reptilien sind in diesen Entwicklungsstadien mehrere, zu einer Art „Riesenglomerulum“ verschmolzene innere und äußere Glomerula als bemerkenswerte Gemeinsamkeit zu finden,

Ähnlich wie von Bremer bei Rind und Wildwiederkäuer beschrieben, besitzt das Schaf keinen Pronephros im engen Sinne, da ihm externe Glomerula und Zöliumkammern fehlen (Bremer 1915, Davies und Davies 1950). Dafür verfügt es ebenso wie andere Wiederkäuer über einen außergewöhnlich früh entwickelten Mesonephros. Dies kann mit der im Vergleich zu anderen Tierarten spät stattfindenden Implantation der Paarhufer erklärt werden (Davies 1952).

Der Wolffsche Gang entwickelt sich aus einem Zellstrang, der sich vom nephrogenen Strang trennt und erreicht die Kloake im 19-Somiten Stadium.

Korrelierend zu der raschen Ausdehnung der Allantois wird die embryonale Urniere beim Wiederkäuer schon früh im 23 bis 29-Somiten Stadium funktionell. Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der Allantois mit dem Zeitpunkt der Ausprägung der Urniere rasant an Geschwindigkeit zunimmt (Davies 1952). Die funktionelle Reife erlangt das Organ beim Schaf am 19. Tag p.c. und beim Rind am 23. Tag p.c. (Shumkina 1960).

Beim Schaf scheinen die Nephrone im kranialen Drittel des Organs eingeeengt zu sein und bleiben S-förmig (Davies 1952).

2.2.2.2 Verschmelzung einzelner Urnierenkörperchen

Verschmolzene Nierenkörperchen bzw. Abschnitte, in denen zwei oder mehr Tubuli durch die Bildung einer Anastomose von einer Kavität ableiten, konnten verschiedentlich gezeigt werden (Bremer 1915, MacCallum 1902). Hierbei bleiben nach der Fusion vermutlich entweder wie beim Auftreten der Riesenglomerula beim Wiederkäuer mehrere Gefäßknäuel in der Kapsel bestehen oder aber es bilden sich alle bis auf eines zurück und lassen die verschmolzenen Kavitäten als eine einzige erscheinen (MacCallum 1902).

2.2.2.3 Gefäßversorgung der Urniere

Das arterielle System des Mesonephros wird unmittelbar von Ästen der Aorta gespeist. Die Anzahl der Arterien variiert je nach Entwicklungszustand und auch zwischen dem linkem und dem rechtem Mesonephros ein und desselben Embryonen können Unterschiede bestehen (Carretero et al. 1995). Der Ein- und Austritt der Gefäße findet an der medialen Organseite statt (MacCallum 1902). Vollmerhaus et al. wiesen anhand von korrosionsanatomischen Untersuchungen zwei völlig voneinander getrennte Blutgefäßnetze in der bovinen Urniere nach, wie sie schon von den Nieren der Knochenfische und Amphibien bekannt sind. Sie versorgen die Glomerula und den Tubulusapparat separat (Vollmerhaus et al. 2004).

Die afferente Arteriole (A. mesonephrica) des Glomerulums entspringt segmental über Sekundär- und Tertiäräste der primitiven Aorta und tritt von medial, gegenüber des proximalen Tubulus gelegen, verzweigungsfrei in das Glomerulum ein (Vollmerhaus et al. 2004). Sie weist einen relativ hohen Blutdruck auf und führt Blut, das reich an Ausscheidungsprodukten ist. Nachdem sich das Gefäß in das glomeruläre Kapillargeflecht verzweigt hat, vereint es sich wieder in ein dünnwandiges efferentes Gefäß, das in einem separaten Gefäßpol aus dem Glomerulum austritt. Es ähnelt in seinem Aufbau einer Venole, da Tunica media und Adventitia fehlen. Noch bevor es in die hinteren Kardinalvenen mündet gibt es sekundäre Äste ab, die sich im Interstitium der Urniere verzweigen (De Martino und Zamboni 1966). Diese Gefäße sind ebenfalls dünnwandig, was bei den niedrigen Blutdruckverhältnissen im fetalen Kreislauf eine wichtige Rolle für

den Transport von Substanzen in das Gefäß hinein und aus ihm heraus spielen könnte.

Die Tubuli mesonephrici werden von einem selbständigen Kapillarnetz, das als Urnierenpfortadersystem aus den kaudalen Kardinalvenen versorgt wird und streng metamer angeordnet ist mit sinusoiden Endbahnen umgeben. Die Tubulusgefäße verlaufen parallel zu den Tubuluswindungen (Vollmerhaus et al. 2004). Dieses Kapillarnetz stellt ein Niederdrucksystem dar.

Im kranialen Drittel des Organs wird der Tubulus von einem parallel verlaufenden Längsgefäß begleitet, das ihn mit Kapillarabzweigungen links und rechts zwingenartig umschließt. In den hinteren Abschnitten werden häufiger zwei Längsgefäße gefunden, die durch Kapillaren strickleiterartig verbunden sind und dem Tubulus auf diese Art anliegen.

Das Blut wird sowohl aus dem Tubulus-eigenen System als auch aus den Vasa efferentia der Glomerula über die Vv. mesonephricae in die V. subcardinalis und schließlich ins Herz transportiert.

Im Zuge der Degeneration des Organs verlieren die glomerulären Kapillaren ihre relativ gleichförmigen Konturen und Diameter. Einzelne Glomerula verschmelzen mit benachbarten (Carretero et al. 1995).

2.2.3 Funktion als harnproduzierendes Organ

Die Entwicklung des Mesonephros und damit seine Funktionsfähigkeit kann man umgekehrt proportional zur exkretorischen Wirksamkeit der Plazenta setzen. Hingegen ist die Ausprägung der Allantois positiv mit der Funktionsfähigkeit der Urniere korreliert. Individuen mit primitiveren Plazentationstypen (epithelio- und endochorial) verfügen über besser entwickelte Urnieren, während bei Spezies mit weiter entwickelter Plazentation (hämochozial) nur kleinere, nicht funktionelle Urnieren angelegt werden.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit werden histochemische sowie histologisch-morphologische Untersuchungen herangezogen (Leeson und Baxter 1957). Die Urniere erlangt ihre funktionelle Reife beim Embryo von Schaf und Katze lange vor anderen Organsystemen. Die Katze verfügt vom 26. bis zum 40. Tag p.c. und somit in einem Drittel der Trächtigkeit über eine funktionelle Urniere (Tiedemann 1976). Beim Schaf beginnt die Harnproduktion am 18. Trächtigkeit-

tag mit der Entwicklung der Allantois und endet am 55. Tag (Davies 1952). Die Exkretion von Allantoisflüssigkeit wird bei dieser Tierart vom 18. Tag p.c. bis zum 30. Tag p.c. von 3,0 ml auf 20,0 ml gesteigert. Die gesamte Harnproduktion aller aktiven harnproduzierenden Organe des Schafes erreicht am 117. Tag ein Maximum und nimmt dann zur Geburt hin ab (Alexander et al. 1958).

Bei Maus und Ratte können im Mesonephros keine Glomerula gefunden werden und er tritt nur rudimentär in Erscheinung (Davies 1952).

Durch den Einfluss auf die Ausdehnung der Allantois, die wichtig für den Gefäßkontakt in den Karunkeln ist, erfüllt der Mesonephros auch bei der Plazentation eine wichtige Funktion (Grinsted und Aagesen 1984).

Der niedrige Filtrationsdruck, der in den Gefäßen der Urniere herrscht, wird vermutlich zum Teil durch die Größe und Ausdehnung der glomerulären Kapillarnetze kompensiert (Davies 1952). Im morphologischen Aufbau des Malphigischen Körperchens konnten auffällige Gemeinsamkeiten mit dem des Metanephros aufgezeigt werden. Ein gefenstertes Endothel, eine gemeinsame Basallamina sowie die Fortsätze der Podozyten bilden eine gemeinsame Filtrationsbarriere (Krause et al. 1979, Leeson 1960).

Beim Schwein mit 58 mm SSL ist die Funktion maximal bei einer Länge des Organs von 9 mm. Die Osmolarität und die Chloridkonzentration in der Allantoisflüssigkeit bei dieser Tierart sowie beim Kaninchen sind niedriger als die im fetalen Serum (Stanier 1960). Die Zusammensetzung der ausgeschiedenen Flüssigkeit ist aufgrund einer niedrigen Natrium- und Chloridkonzentration hypoton, jedoch reich an Harnstoff und Kalium (Davies und Routh 1957).

Wiederkäuer, Fleischfresser, das Pferd sowie das Schwein bilden den Allantois- oder Plazentarkreislauf aus. Auszuscheidende Stoffe werden über die Allantoiswand in das Blut abgegeben. Primaten und Nagetiere verfügen über eine schwächere plazentäre Barriere und die Allantois bleibt rudimentär. Stoffe gelangen über die Nabelarterien zur Plazenta. Die Urniere degeneriert bei diesen Spezies noch bevor die Nachniere funktionsfähig wird (Tabelle in Abb. 8). Eine Ausnahme bildet hier das Kaninchen, bei dessen Urniere eine Funktion zumindest aufgrund der hohen strukturellen Ausreifung vermutet werden muss (Leeson 1960).

Spezies	Exkretorische Funktion		Morphologische Rückbildung	
	Beginn	Einstellung	Beginn	Abschluss
Schwein	29	45	45	54-61
Schaf	16-21	55	27	57
Rind	23-26	?	33	?
Katze	35-38	26-40	21-36	40-42
Kaninchen	12-21	?	13-16	23-25
Meerschwein	23	26	25	?
Mensch	?	?	45	90
Ratte	keine		?	?
Maus	keine		?	?

Abbildung 8: Zeiträume mesonephraler Funktion und Degeneration, Tage post coitum; modifiziert nach Grinsted und Aagesen 1984

2.2.4 Einfluss auf die Gonadenbildung

Die Gonadenbildung beginnt als Verdickung in der Mitte des nephrogenen Strangs. Durch Elongation und Epithelauskleidung entsteht schließlich ein zweiter, dem Mesonephros gang lateral gelegener Gang. Zellen des Mesonephros sind bei der Differenzierung von Ovarien und Hoden von großer Bedeutung. Er gibt Zellen an die Gonadenanlage beider Geschlechter ab und beeinflusst über sezernierte, hormonähnliche Substanzen (*meiosis-inducing-substance* und *meiosis-preventing-substance*) den Ablauf von Meiosen in bestimmten Geweben der Gonadenanlage (Grinsted und Aagesen 1984).

Untersuchungen belegen, dass es in frühen Entwicklungsstadien keine strukturellen Barrieren zwischen Zellen des Mesonephros und der Keimdrüsenanlagen gibt und die Auswanderung von Zellen aus dem Zellverband also prinzipiell möglich ist (Smith und Mackay 1991). Zellen des Mesonephros sind eng mit den sich entwickelnden samenbereitenden Abschnitten des Hodens verbunden und es wird vermutet, dass die Sertoli-Zellen mesonephralen Ursprungs sind (Zamboni und Upadhyay 1982). Gleiches wird für die Granulosa-Zellen des Follikels bei der weiblichen Maus angenommen (Byskov und Lintern-Moore 1973).

Bei Maus und Ratte bleiben die am weitesten kranial gelegenen Tubuli als epididymale Gänge bestehen und der Wolffsche Gang dient beim adulten Tier als Vas deferens. Das weibliche Tier bewahrt zumindest das Rete ovarii als meso-

nephrales Derivat. Bei der Maus konnte in vitro eine Beeinflussung der Geschlechtsdifferenzierung durch die Urniere nachgewiesen werden (Grinsted und Aagesen 1984). Vazquez et al. stellten einen frühen Dimorphismus in der Organisation der weiblichen und männlichen Tubuli fest (Vazquez et al. 1998a). Beim Schaf wandern an Tag 24 bis 29 p.c. Zellen aus den Glomerula des Mesonephros aus und bilden neue Verbände, die sich über die Länge des Genitalstranges erstrecken und Kontakt mit primordialen Keimzellen aufnehmen (Zamboni et al. 1979). Beim caprinen Fetus scheinen vor allem Zellen aus dem kranialen Bereich des Mesonephros, die in Richtung des sich entwickelnden Gonadenstranges auswandern, eine wesentliche Rolle zu spielen. Ähnlich wie bei Schaf und Rind scheint also der Abbau des Riesenglomerulums nicht nur einen degenerativen Prozess darzustellen sondern auch aktiven Einfluss auf die Gonadenentwicklung zu nehmen. (Magras et al. 1997). Beim männlichen Organismus kommt es durch experimentelle Entfernung des Mesonephros zu Fehlern in der Hodenentwicklung (Buehr et al. 1993). Bei der Maus induziert hinzugefügtes mesonephrales Gewebe in vitro beim noch undifferenzierten männlichen Fötus eine Ovar-ähnliche Weiterentwicklung (Grinsted und Aagesen 1984).

Der Beitrag zur Gonadenentwicklung wirft die Frage auf, inwieweit Zelldifferenzierung reversibel ist (Smith und Mackay 1991). Nach Wartenbergs Ansicht verlieren die Zellen ihre Differenzierung und schlagen anschließend einen neuen Weg zu Zellen der Keimdrüsen ein (Wartenberg 1985).

Bei Kaninchenföten und Gonaden neugeborener Kaninchen nimmt der Mesonephros Einfluss auf die Produktion von Steroidhormonen (Grinsted und Aagesen 1984).

2.2.5 Weitere Funktionen des Mesonephros

Studien in den letzten Jahrzehnten haben belegt, dass der Mesonephros mehr ist als nur ein transientes Organ in der Fetalentwicklung mit nicht oder nur kaum ausgeprägter Funktion. Er kann als Modell zu Studien der epithelialen Differenzierung und Organentwicklung, der Regulierung von Apoptose, Geschlechtsdetermination und der Stammzell-Differenzierung herangezogen werden (Sainio und Raatikainen-Ahokas 1999).

Der Mesonephros enthält die sogenannten Stroma-Zellen, die als Quelle einer Vielzahl von Vorläuferzellen diskutiert werden (endotheliale Zellen des Hodens und Leydig-Zellen beim männlichen Organismus, eventuell auch prä-Sertoli-Zellen).

Weitere Bedeutung erlangt die Urniere über die AGM-Region. Diese befindet sich im Bereich der dorsalen Aorta, der Gonaden und des Mesonephros und erfüllt neueren Erkenntnissen zur Folge viele Funktionen, die zuvor dem Dottersack zugezählt worden sind. So wird ihr beim primitiven Embryo eine entscheidende Rolle bei der Erythro- und Hämatopoese zugeschrieben (Medvinsky und Dzierzak 1996). Bis die Leber volle Funktionsfähigkeit erlangt, gilt die AGM-Region als Organ der Blutbildung. Da Fische als bleibende Nierenform die Urniere beibehalten, findet bei ihnen die Erythropoese hauptsächlich hier statt.

Mit der Expression der Gene für Erythropoetin und das Renin-Angiotensin-System übernimmt die Urniere eine wichtige endokrine Funktion (Wintour et al. 1996).

Ein Beitrag zur Entwicklung der Nebennierenrinde wird diskutiert. Dieser wurde beim Schaf propagiert (Upadhyay und Zamboni 1982). Bei der Maus konnten keine eindeutigen Hinweise auf eine Verbindung gefunden werden. Die Zellen des adrenalen Kortex scheinen aus dem embryonalen Bindegewebe zu erwachsen (Smith und Mackay 1991).

2.2.6 Degeneration

Die Rückbildung des Mesonephros vollzieht sich zwischen 40 und 100 mm SSL (Davies und Davies 1950) in kranio-kaudaler Richtung während sich die Niere entwickelt (programmierter Zelltod). Beim Schaf beginnt die Regression mit 40 mm SSL und ist im 3. Graviditätsmonat bei 10 cm SSL ebenso wie beim Rind abgeschlossen (Davies und Davies 1950, Rüsse 1998). Shumkina beschreibt bei Schaf und Rind erste Anzeichen einer Degeneration am kranialen Urnierenpol am 27. Tag (Shumkina 1960). Die Urniere des Schweines wird zwischen 60 und 70 mm SSL zurückgebildet.

Mit zunehmender Größe der Leber und des Metanephros wird der Mesonephros zurückgedrängt und seine relative Größe im Fötus nimmt stark ab (Aly 2007).

Am 14. embryonalen Tag der Maus ist die Urniere bis auf ihre den Genitaltrakt bildenden Anteile vollkommen zurückgebildet.

Beim Menschen mit 13 bis 17 mm SSL sind nur noch 32 bis 33 Nephrone zu finden wobei die sechs am weitesten kranial gelegenen bereits in Rückbildung begriffen sind. Sie besitzen kein Urnierenkörperchen mehr und der Tubulus ist von einem homogenen Epithel ausgekleidet (Ludwig und Landmann 2005). Altschule beschreibt im kranialen Teil der Urniere des menschlichen Embryos zwischen 31 und 42 mm SSL Vorgänge an den Nephrone im Sinne einer Dedifferenzierung. Die Zahl der glomerulären Kapillaren nimmt ab, Tubuli verlieren an Länge, Durchmesser und Windungen und sind oft mit Zelldetritus gefüllt oder es bestehen bereits Zusammenhangstrennungen an verschiedenen Stellen. Die Nephrone im kaudalen Teil wirken histologisch zu diesem Zeitpunkt scheinbar noch voll entwickelt, in der räumlichen Rekonstruktion offenbaren sich jedoch einige Unterbrechungen im Tubulusverlauf (Altschule 1930).

Bei der Degeneration des Organs entsteht am kranialen Pol das Urnieren-Zwerchfellband, das an der Bildung des Zwerchfells beteiligt ist.

2.2.7 Die Urniere des Menschen

Beim Menschen tritt das Organ zum ersten Mal bei Embryonen zwischen 2,6 und 4 mm Länge in Erscheinung. Der mesonephrogene Strang teilt sich in 35 bis 40 provesikuläre Zellhaufen auf (Ludwig und Landmann 2005). Es werden zwischen 20 und 30 Nephrone angelegt (MacCallum 1902). Die Urnierenkanälchen formieren sich vom 24. bis 26. Tag p.c. an und die Entwicklung der Urniere ist 8 Wochen p.c. abgeschlossen (De Martino und Zamboni 1966). Die Tatsache, ob die Urniere beim Menschen eine funktionelle Periode erreicht ist umstritten. Felix und Fischel sprechen dem Organ eine Funktionsfähigkeit ab (Felix 1911, Fischel 1929).

Die Nephron-Struktur ist S-förmig mit einem ampullenartigen Abschnitt. Eine Henle-Schleife fehlt ebenso wie ein juxttaglomerulärer Apparat (De Martino und Zamboni 1966).

Mit 22 mm SSL beginnt die Regression (MacCallum 1902), der paragenitale Anteil ist bei 27 bis 31 mm SSL noch voll funktionsfähig (Ludwig und Landmann 2005) und noch mit 36 mm SSL sind intakte Tubuli vorhanden (Altschule 1930).

Das Organ ist 16 Wochen p.c. vollständig abgebaut (De Martino und Zamboni 1966).

2.2.8 Die Urniere bei Vögeln und Reptilien

Im Hühnerembryo finden sich schon am 3. Bebrütungstag erste Urnierenkanälchen, die ab dem 4. Tag funktionsfähig werden und zwischen dem 9. und 11. Bebrütungstag ihre maximale Funktion erreichen. Externe Glomerula, also frei in die Peritonealhöhle ragende Gefäßschlingen, sind ab dem 3. Tag in wechselnder Ausprägung und Anzahl vorhanden. Es können vier verschiedene Nephron-Populationen an der Oberfläche der Urniere unterschieden werden, die ihrem Alter nach in ventrodorsalem Verlauf angeordnet sind. Der größte Teil der dorsalen Hälfte des Mesonephros wird von einer fünften, jungen und heterogenen Population von Nephronen ausgefüllt (Friebová-Zemanová und Goncharevskaya 1982). Im kranialen Teil des Mesonephros des Hühnerembryo finden sich zu meist rudimentäre Nephronen mit schwach ausgeprägten Tubuli und kurze Nephronen mit ungleichmäßigem Verlauf. Die Nephronen des kaudalen Anteils weisen ein starkes Längenwachstum auf und entwickeln Sekundär- sowie Tertiärfaltungen. Ventrale Nephronen sind zur Längsachse des Organs segmental in senkrechten Ebenen angeordnet während sich die dorsalen Nephronen in vielfältigen Orientierungen im Organ entfalten. Aufweitungen des Tubuluslumens werden als zystische Dilatationen von Friebová beim Huhn beschrieben. Ebenso sind beim Huhn „zweiköpfige Nephronen“ zu finden. Hierunter versteht man Nephronen mit zwei Bowmanschen Kapseln. Die Gesamtzahl an Nephronen pro Urniere liegt beim Huhn bei ca. 100. Die Involution des Organs ist am 15. Tag vollständig (Friebová-Zemanová 1981).

Im Embryo der Ente wird eine Reihe externer Glomerula angelegt. Im selben Bereich bilden sich später interne Glomerula aus, die sich mit den externen verbinden. Anders als beim Huhn ist der Wolffsche Gang im gesamten Bereich der Glomerula deutlich ausgeprägt. Davies verglich 1950 das frühe exkretorische System der Ente mit denen von Krokodil und Schildkröte und stellte hierbei auffällige Gemeinsamkeiten fest. Die Ente scheint also in dieser Beziehung primitiver und reptilienverwandter zu sein als beispielsweise das Huhn. Denn auch beim Reptil finden sich regelmäßig neben den internen Glomerula gut entwi-

ckelte externe Glomerula. Die zugehörigen Tubuli sind allerdings stärker entwickelt und es können ziliotragende Nephrostomen gefunden werden (Davies 1950).

2.2.9 Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse zur Struktur von Glomerula, Wolffschem Gang und Tubulussystem

Strukturen der Urniere und vor allem deren Tubulussysteme stellen während der Fixierung und des Schneidens sehr fragile Untersuchungsobjekte dar. Oft kommt es beim Färben zum Lösen und Verrutschen, was ein Alignment und damit eine dreidimensionale Rekonstruktion sehr schwierig macht (Jirkovska et al. 2005). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Entwicklung des Mesonephros bisher hauptsächlich im Bezug auf die allgemeine Struktur sowie das Gefäßsystem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und die Erstellung von Korrosionspräparaten beschrieben worden ist (Vollmerhaus et al. 2004).

2.2.9.1 Gestalt und Anordnung der Glomerula

Die Glomerula fügen sich scheinbar in den jeweils verfügbaren Raum im Organ ein. Sie liegen aneinandergereiht im ventromedialen Bereich der Urniere (MacCallum 1902). Der kraniale Abschnitt ist durch diskusartige Glomerula gekennzeichnet, während im mittleren und kaudalen Drittel scheiben- und birnenförmige (bis 300 μm) und halb- und vollkugelige (100 bis 200 μm) hinzutreten (Vollmerhaus et al. 2004). Die Glomerula der Urniere sind größer als die der Nachniere (MacCallum 1902), ihre Anzahl im Organ jedoch weitaus kleiner. Die Nephrone sind im Gegensatz zur Vorniere nicht mehr segmental angeordnet sondern lösen sich in einen segmentübergreifenden Verband auf (Fiorino 1992, Fraser 1920).

2.2.9.2 Verlauf des Ductus mesonephricus

Der Verlauf des Ductus mesonephricus und die Veränderung der Tubulusstrukturen von kranial nach kaudal wurden nur vereinzelt untersucht.

Der Wolffsche Gang verläuft in Relation zum Organ im vorderen Bereich dorso-lateral und ventrolateral im hinteren Abschnitt (Altschule 1930, Tiedemann

1976). Beim Dromedar ist ein Verlauf von ventrolateral über ventral nach ventromedial beschrieben (Aly 2007). Das Lumen ist rund oder oval und wird ganzheitlich durch kuboidale Zellen begrenzt (Ludwig und Landmann 2005).

2.2.9.3 Entwicklung und Gestalt der Nephrone

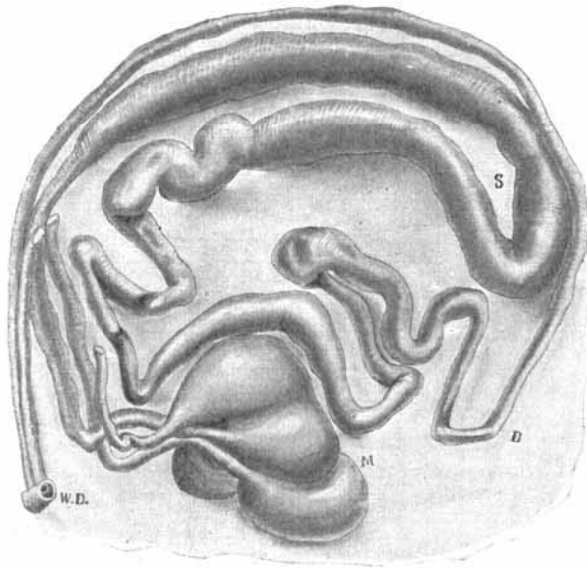


Abbildung 9: Wachsrekonstruktion eines Schweine-Nephrons; aus MacCallum 1902

Die Tubuli entspringen in gleichmäßigen Abständen dorsal oder medial vom Wolffschen Gang und sind nicht linear angeordnet sondern überlappen sich in vielfältiger Weise (Altschule 1930). Im kranialen Abschnitt des Wolffschen Ganges verlaufen sie eher nach ventral, während sie sich kaudal eher dorsal orientieren (MacCallum 1902).

Die räumliche Entwicklung der Nephrone verläuft von einem S-förmigen Körper hin zu mehr oder

weniger kompliziert gewundenen Tubulusformationen, deren Gestalt in Schnittbildern allein nicht nachvollzogen werden kann (Tiedemann 1979). Typischerweise besitzt ein Tubulus zwei Hauptbiegungen: die weiter proximal gelegene an der Stelle, an der er den Wolffschen Gang am nächsten passiert und die distale gegenüber der Bowmanschen Kapsel. Diese S-förmige Grundstruktur wurde schon früh in der Literatur beschrieben (Kölliker 1879, MacCallum 1902, Mihalkovics 1885). MacCallum rekonstruierte mit Hilfe der Plattenmodelliermethode nach Born ein Nephron eines 80 mm langen Schweineembryonen (Abb. 9).

Die Länge des Tubulusabschnitts zwischen Bowmanscher Kapsel und der ersten Flexur (proximales Segment) entspricht ungefähr der Länge des Abschnitts zwischen den beiden Biegungen (intermediäres Segment). Die Länge des distalen Segmentes, das in den Wolffschen Gang mündet, variiert (Friebová-Zemanová 1981). Ausgehend von dieser Grundstruktur kann versucht werden, die weitere

räumliche Ausgestaltung der Nephronen nachzuvollziehen. In menschlichen Embryonen ist bei 6 mm SSL noch die S-Form, bei 7,5 mm SSL schon eine Doppelspirale vorzufinden (Abb. 10) (Lewis 1920).

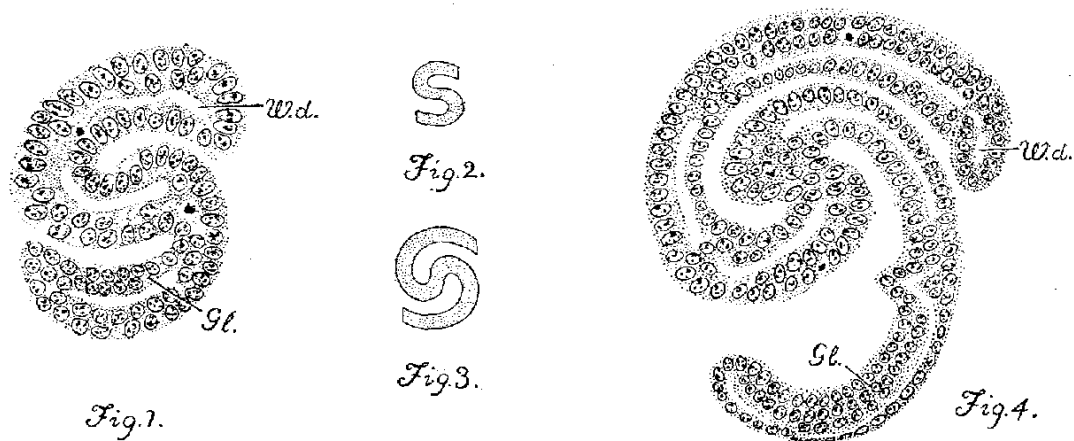


Abbildung 10: Skizzen eines S-förmigen sowie eines Doppelspiral-förmigen Tubulus; aus Lewis 1920

Im Zuge weiteren Längenwachstums und räumlicher Interaktionen verkompliziert sich die Binnenstruktur der Nephronen weiter. Das Maß an Komplexität lässt verlässliche Aussagen über den Organisationsgrad des Organs zu (Tiedemann 1979). Lewis führte zur Beschreibung dieser komplexeren Formationen weitere Tubulusabschnitte ein, die jedoch nicht funktionell unterteilt wurden sondern aufgrund ihres Aussehens (Lewis 1920). Der bezeichnende Buchstabe (C, U, V) beschreibt hierbei meist die schematische Form des Abschnittes. Z steht für den terminalen Abschnitt vor der Einmündung in den Wolffschen Gang (Abb. 11). Der Querschnitt des gesamten Mittelteils ist weitaus größer als diejenigen der proximalen bzw. distalen Abschnitte (MacCallum 1902).

In der Urniere des Opossums kann eine Reihe von Nephronen gefunden werden, deren Tubulus jeweils in einen proximalen, einen distalen sowie einen kollektiven Abschnitt unterteilt werden kann. Im ventromedialen Quadranten des Organs liegen 35 bis 45 gut entwickelte Urnierenkörperchen. Eine Henlesche Schleife fehlt ebenso wie ein juxtaglomerulärer Apparat (Krause et al. 1979).

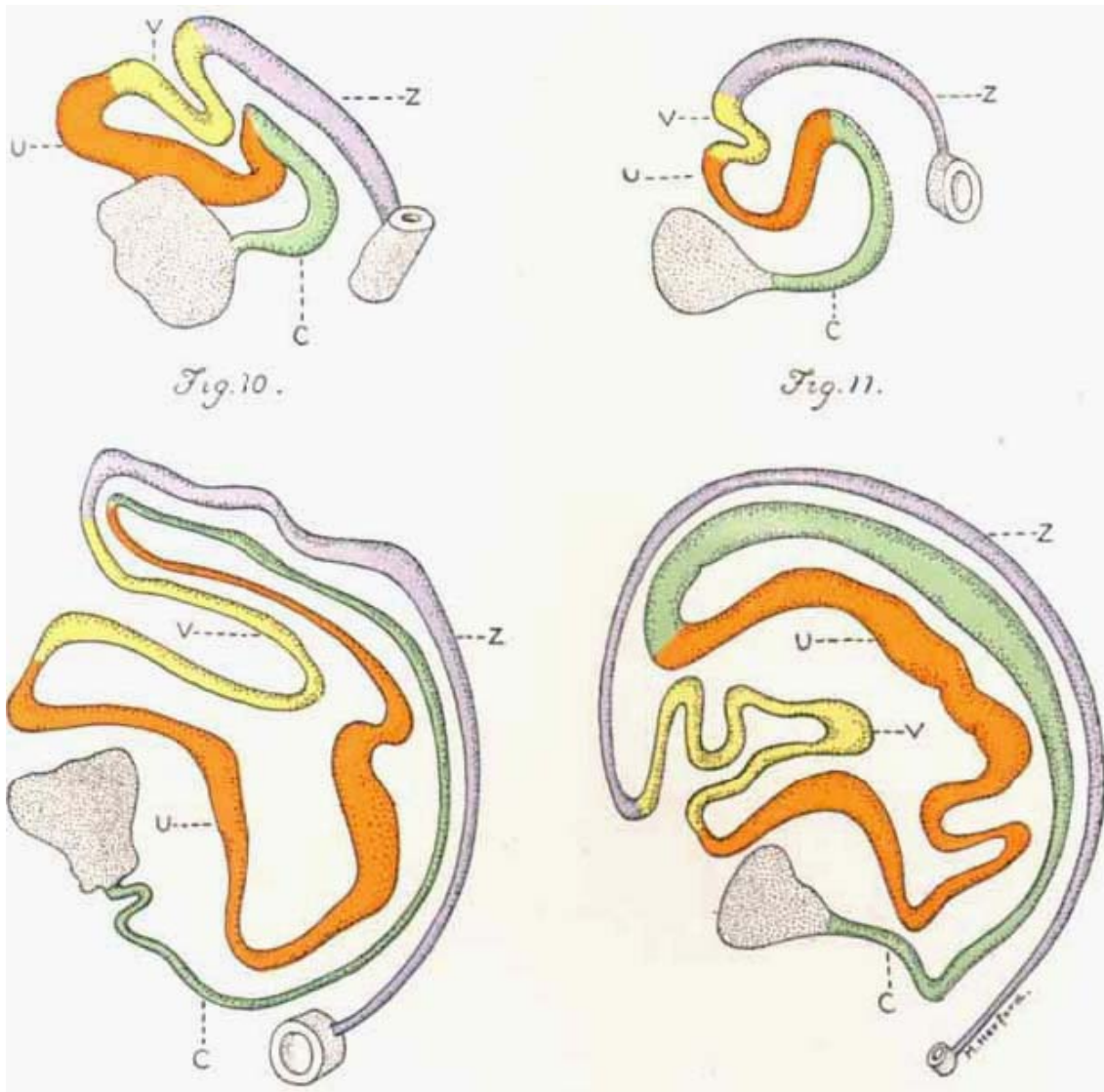


Abbildung 11: Segmente im Tubulusverlauf des Schweine-Mesonephros, aus Lewis 1920

Beim Kamel kann in der Urniere bei 9 mm SSL eine dorsale Schicht gefunden werden, die durch relativ kurze, leicht gewundene Tubuli dominiert wird. Eine ventrale Schicht beinhaltet eine einzelne Reihe Glomerula. Bei 1,9 cm SSL haben die Tubuli bereits an Länge zugenommen und sind wesentlich stärker gewunden. Sie nehmen in einer Anordnung von acht bis zehn Reihen den gesamten Raum zwischen den Glomerula und dem Dach der Körperhöhle ein. Gleichzeitig nimmt die Anzahl und Größe der Gefäßknäuel sowie ihre Durchblutung zu (Aly 2007).

Beim Schwein, dem Säugetier mit dem am stärksten ausgebildeten Mesonephros, finden sich annähernd 80 Nephronen in einem Organ (Bremer 1916), die eine Länge von bis zu 30 mm erreichen und somit halb so lang sind wie die Nephronen

der bleibenden Niere (Tiedemann und Zaar 1983). Die Tubuli sind deutlich stärker aufgewunden als beispielsweise beim Menschen und bilden Doppelspiralen mit zentripetalem sowie zentrifugalem Schenkel (Zietzschmann und Krölling 1955). Bei anderen Säugetieren wie etwa dem Kaninchen oder der Katze erreichen die Nephronlängen nur Werte von 4 bzw. 5,5 mm. Diese Gesamtausdehnung kann als wichtiges Maß für die Organausprägung betrachtet werden (Tiedemann 1979).

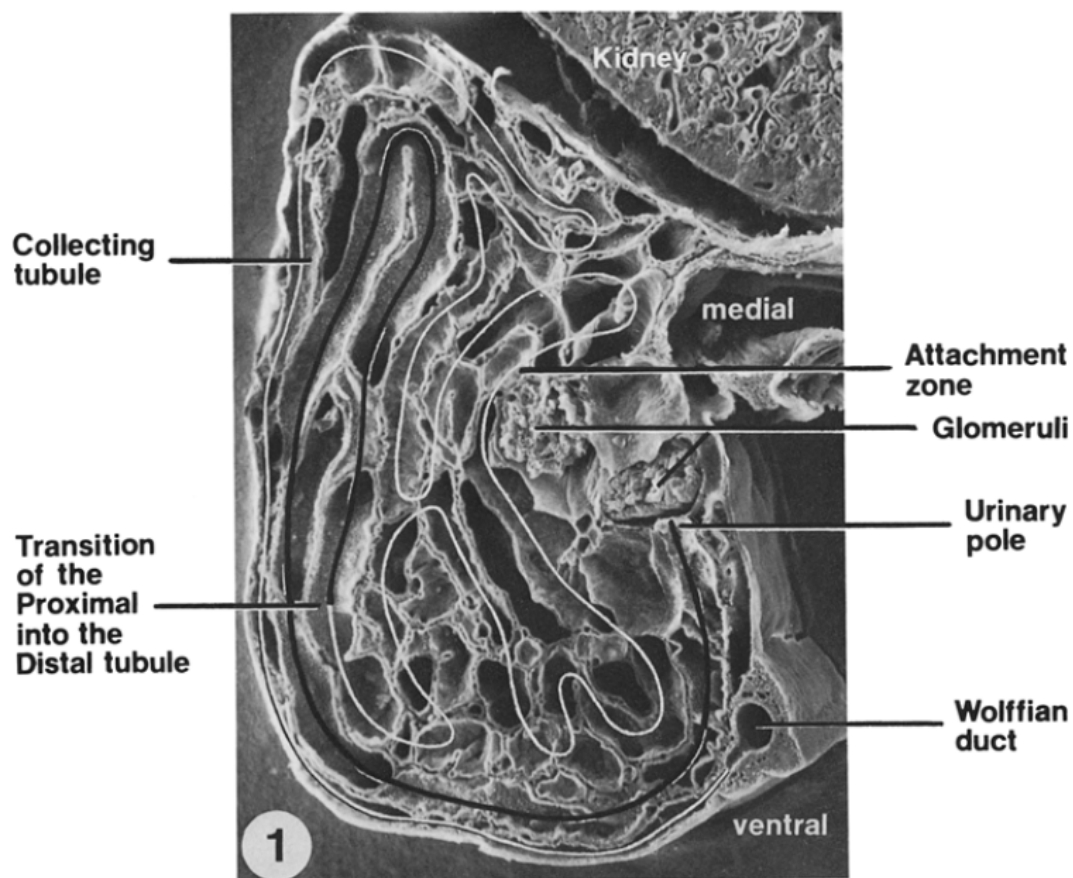


Abbildung 12: Elektronenmikroskopischer Querschnitt eines linken Mesonephros des Schweines; aus Tiedemann und Zaar 1983

Die Nephrene des Mäusefötus stellen sehr rudimentäre Gebilde dar, die je aus einer einzigen Kapillare bestehen, die sich dem Tubulus an dessen ventraler Extremität in einer leichten Kavität anschmiegt (Zamboni und Upadhyay 1981). Beim Menschen weisen alle Mesonephrone bei einer SSL von 7 bis 9 mm eine charakteristische S-förmige Krümmung auf (Ludwig und Landmann 2005). Diese Ausgestaltung mit zwei Hauptbiegungen manifestiert sich schon früh bei der Bildung eines S-förmigen Körpers aus den Vesikeln (Friebová-Zemanová 1981).

Weiter kranial gelegene Tubuli sind zumeist stärker gewunden als diejenigen in kaudalen Organabschnitten (Vazquez et al. 1998b).

Felix beschreibt sogenannte „Mesoureteren“. Darunter versteht er Tubulusabschnitte, die aus dem Wolffschen Gang entspringen und kaudale Tubuli des Mesonephros vereinen (Felix 1911).

Der Verlauf des Tubulus lässt sich in ein postglomeruläres, sekretorisches Segment sowie in einen exkretorischen Anteil, der in den Wolffschen Gang mündet, unterteilen. Der Übergang zwischen diesen Segmenten erfolgt abrupt. Die proximalen und distalen Abschnitte des Tubulus secretorius der Urniere unterscheiden sich maßgeblich in ihrem histologischen Aufbau (Ludwig und Landmann 2005). Der proximale Tubulusanteil ist durch isoprismatische Zellen begrenzt, die deutliche, spheroidale Nuclei im Basal-Zytoplasma aufweisen. Die apikalen Plasma-Membranen sind zu einer Vielzahl von Mikrovilli in Form eines Bürstensaumes ausgezogen, der an den des Tubulus contortus proximalis des Metanephros erinnert (De Martino und Zamboni 1966, Tiedemann 1979, Tiedemann et al. 1987). Beim Embryo des Schweines sind die Zellen des proximalen Tubulus weit ausgereift, so dass sie hier anhand des mikroskopischen Bildes zum Teil nicht von den korrespondierenden Zellen des Metanephros unterschieden werden können (Tiedemann und Zaar 1983). Im Querschnitt zeigt sich ein weites Lumen, die Wand ist dünn und der Abschnitt ist weniger gewunden. Beim Embryo des Schweins mit 80 mm SSL beträgt der Durchmesser des proximalen Tubulus 140 bis 190 μm , in einzelnen ampullenartigen Erweiterungen bis zu 450 μm (Tiedemann 1979). Nahezu das gesamte Zentrum des Organs wird von diesen Abschnitten eingenommen (Aly 2007).

Der Verlauf des distalen Tubulus ist deutlich stärker gewunden und kann große Varianzen zeigen (Aly 2007). Er kann sowohl aufgrund seiner Architektur als auch histochemischer Untersuchungen in drei Untersegmente unterteilt werden, die sich dem proximalen Tubulus direkt, also ohne das Vorkommen einer Henleschen Schleife, anschließen (Tiedemann 1985). Tiedemann konnte als charakterischen Abschnitt bei 85 Prozent der untersuchten Nephrone von Schweine-Embryonen eine Hufeisen-ähnliche Windung als initiales Segment des distalen Tubulus nachweisen. Der distale Tubulus schmiegt sich in seinem weiteren Verlauf dem Glomerulum von lateral an und bildet hier seine sogenannte *attachment-Zone* während dementsprechend die Segmente proximal bzw. distal

hiervon als *pre-* bzw. *post-attachment*-Abschnitte benannt werden. Eine *post-attachment*-Schleife ist charakteristisch für den hoch entwickelten Mesonephros des Schweins (Abb. 13). Bei Katze und Schaf sind die korrespondierenden Abschnitte nur leicht gewunden. Der Durchmesser der distalen Tubulussegmente ist mit 200 bis 280 μm etwas größer als derjenige der proximalen Abschnitte (Tiedemann 1979).

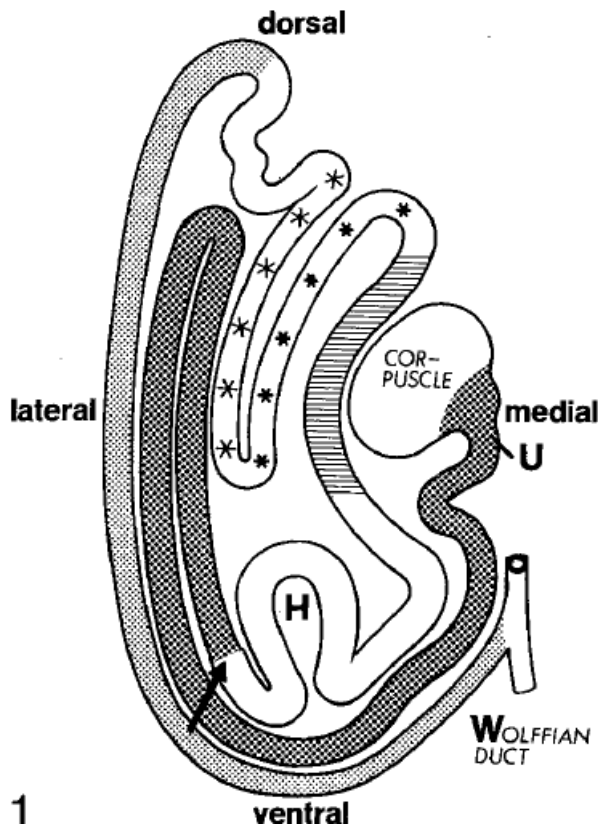


Abbildung 13: Schema des Nephrons eines Schweine-Embryonen und Unterteilung in seine Segmente; U = Harnpol, H = Hufeisen-ähnliche Schleife; dunkler Bereich = proximaler Tubulus, schraffierter Bereich = attachment Zone, grauer Bereich = sammelnder Tubulus; aus Tiedemann 1979

Die Tubuli colligentes liegen lateral und ventral dicht unter der Organkapsel. Das Zytoplasma der Zellen ist scharf in zwei Bereiche unterteilt, der eine mit einer großen Anzahl dicht gepackter Mitochondrien, der andere vollkommen ohne Organellen (De Martino und Zamboni 1966). Der Querschnitt ist durch ein schmales Lumen und dicke Wände, die von einem hochprismatischen Epithel ausgekleidet sind, geprägt.

Eine Differenzierung in einen sekretorischen sowie einen sammelnden Anteil ist beim Fetus des Kamels erstmals bei einer SSL von 3 cm vornehmbar. Beim Embryo des Kaninchens ist zwischen 8,5 und 10 mm SSL erstmals eine Trennung möglich (Leeson und Baxter 1957).

Bei der Maus sind die kranialen Tubuli 10 Tage p.c. bereits charakteristisch S-förmig gebogen und jeder besitzt einen gewundenen Anteil dorsal der Einmündung in den Mesonephrogang. An Tag 12 hat sich der Wolffsche Gang bereits bis auf Höhe der indifferenten Gonaden zurückgebildet und der Paramesonephrogang ist vorhanden. Große Teile der kranialen Tubuli sind bereits degeneriert, die überbleibenden Tubuli sind stark gewunden. Glomerulum-ähnliche Strukturen bestehen wenn überhaupt aus wenigen, dem jeweiligen Tubulus angefügten Kapillaren und degenerieren sehr zeitig (Smith und Mackay 1991). Die murine Urniere kann also als nicht funktionell betrachtet werden (Kaufman 1992, Zamboni und Upadhyay 1981).

Jirkovska et al. 2005 verwendeten 30 µm dicke, nicht deparaffinisierte Serienschnitte von Hühnerembryonen, die mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie dargestellt wurden. Durch Alignment von vier aufeinanderfolgenden Schnittblöcken konnten Strukturen des Tubulus- und des Gefäßsystems dargestellt werden, ohne dass Artefakte durch Schneiden oder Färben auftraten, da räumliche Beziehungen durch das vorhandene Paraffin unterstützt und konserviert wurden. Gezeigt werden konnten Glomerula nahe der mittleren Begrenzung der Urniere, der zentrale Teil des Organs, der weitestgehend von Tubuli ausgefüllt wird und der dorsolaterale Bereich mit Müllerschem und Wolffschem Gang sowie Gefäßen. Auch hier konnten zwei Hauptbiegungen der Nephrone dargestellt werden: eine an dem vom Malphigischen Körper am weitesten entfernten Punkt und eine unmittelbar neben der Bowmanschen Kapsel (Jirkovska et al. 2005).

Im Zuge der Degeneration verlieren die Tubuli ihre Form und scheinen an einzelnen Stellen zu zerbrechen (Felix 1911).

3 Material und Methoden

Ausgangsmaterial für diese Arbeit war eine histologische Schnittbildserie eines Rinderembryonen aus 902 einzelnen Transversalschnitten. Der Embryo mit einer Scheitel-Steiß-Länge von 35 mm stammte aus dem Schlachthof München. Die Schnitte in HE-Färbung lagen schon seit einigen Jahren im Archiv des Instituts für Tieranatomie.

3.1 Genutzte Rechensysteme

3.1.1 Arbeit auf dem Fakultätsrechner

Zu Beginn der praktischen Arbeit mit den Bilddaten wurde zunächst der Ansatz verfolgt, mit einer von der Fakultät erworbenen Lizenz der Software „Amira“ an einem der vorhandenen Rechner-Arbeitsplätze alle Arbeits- und Visualisierungsprozesse zu bewältigen. Um hierzu die Bilddaten in überschaubare Datenpakete zu unterteilen, wurden aus den über 900 Einzelbildern, die jeweils einen Speicherplatz von ca. 9 Megabyte beanspruchten, Stapel von jeweils 50 aufeinanderfolgenden Schnittbildern gebildet, auf die alle im folgenden genauer beschriebenen Arbeitsschritte, vom Alignment über die Eingrenzung einer ROI bis hin zur Segmentierung angewendet wurden.

Ergebnis dieser anfangs sehr zeit- und arbeitsaufwendigen Prozedur waren Stapel, in denen der Wolfsche Gang, das Organ selber sowie alle Tubulusstrukturen ohne Unterscheidung einzelner Nephrone segmentiert vorlagen. Ziel war es nun, die einzelnen Stapel in „Amira“ zu verknüpfen und das Organ sowie seine Strukturen als Ganzes zu rekonstruieren. Wie sich jedoch schnell zeigte, überstieg die Datenmenge die vorhandene Rechenkapazität bei Weitem, was immer wieder zum Absturz führte und das sich darstellende Gewirr aller markierten Tubulusanteile machte ein weiteres Arbeiten mit und eine Orientierung in den erhaltenen Daten unmöglich. Es musste daher ein alternativer Ansatz gewählt werden.

3.1.2 Arbeit mit der Remote Visualisierung¹

Glücklicherweise bot sich zeitnah zu dem Ergebnis, dass eine Visualisierung auf den in der Fakultät verfügbaren Ressourcen nicht möglich war, die Möglichkeit, über einen Remote-Zugang auf die Hochleistungsrechner des Leibniz-Rechen-Zentrums in Garching bei München zugreifen zu können.

3.1.2.1 Remote-Visualisierung und das gvs1-System

Beim *Remote-Computing* kann der eigene Rechner in der Funktion eines Terminals auf einen entfernten Server und dessen Prozessorleistung sowie Festplatten- und Arbeitsspeicher zugreifen. Es müssen jedoch immer ganze Datensätze über die Verbindung ausgetauscht werden und die Nutzung weiterer Hardware wie etwa von Grafikkarten auf dem Serversystem ist nicht möglich. Hier bietet die *Remote-Visualisierung* den entscheidenden Vorteil, dass der lokale Rechner nur der grafischen Ausgabe von Visualisierungsergebnissen dient, während die Rohdaten auf dem Server liegen und sämtliche Rechenprozesse auch auf eben diesem ablaufen. Es bestehen also zwei Verbindungen zu dem Server. Auf der ersten werden die Tastatur- und Mausbefehle vom lokalen auf den entfernten Rechner übertragen, die zweite übermittelt die Visualisierungsergebnisse, vergleichbar mit *screenshots* an den lokalen Arbeitsplatz. In beide Richtungen sind nur relativ geringe Bandbreiten nötig.

Das LRZ betreibt drei Server zur Remote-Visualisierung. Für Nutzer des HLRB-II², die über registrierte IP-Adressen verfügen existiert RVS1 (rvs1.hlrb2.lrz-muenchen.de). Nutzern des Linux-Clusters stehen mit GVS1 und GVS2 zwei Server zur Verfügung, die im Unterschied zu RVS1 von jedem Rechner mit einer Internetverbindung aus zugänglich sind.

Bei GVS1 und 2 handelt es sich jeweils um einen Sun x4600 Server mit 32 CPU Prozessorkernen (8 quad-core Opterons), jeder mit 256 GB RAM ausgestattet. Sie werden unter SuSE Linux Enterprise Server (SLES 10.2) betrieben und verfügen jeweils über vier Nvidia Quadro FX5800 Grafikkarten, von denen wiederum jede 4 GB Grafikarbeitspeicher bietet. Durch den möglichen Zugang zum

¹ <http://www.lrz-muenchen.de/services/compute/visualisation> (06.04.10)

² Höchstleistungsrechner Bayern II; Supercomputer, der im Neubau des Leibniz-Rechenzentrums in Garching bei München betrieben wird

lustre-Dateisystem wird dem Nutzer ein übersichtliches System zur Verwaltung der Daten geboten.

Die Anbindung des lokalen Rechners geschah im sogenannten *raw mode*. Hierbei wurde auf dem Server ein weiterer, virtueller Server (*vncserver*) ausgeführt, der die Bildschirmhalte an den Arbeitsplatz übertrug, auf dem sie ein *vncclient* entgegennahm. Auf dem Microsoft Windows Rechner musste hierzu die TurboVNC-Software¹ installiert sein.

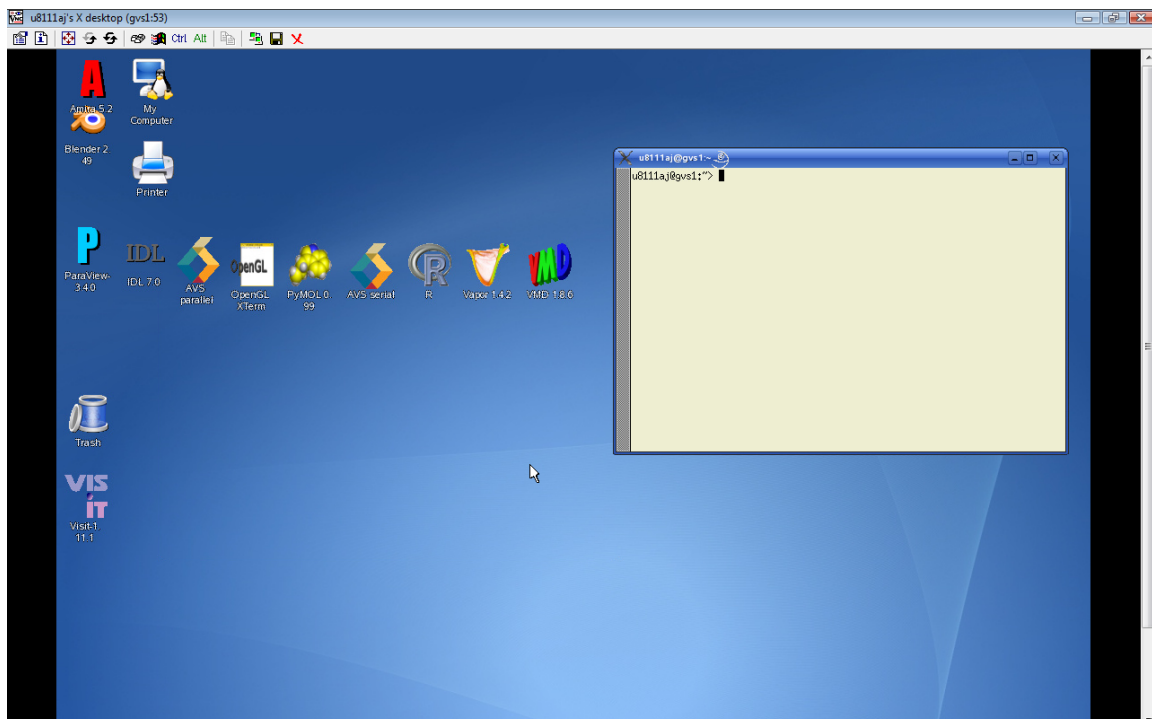


Abbildung 14: Benutzeroberfläche des Remote-Desktops in gvs1

Als weiteres Tool benötigte man als Windows Nutzer auf seinem Rechner ein sogenanntes *putty*, das dazu diente, die Verbindung zu einem Server herzustellen (Abb. 15). Nachdem hier die Anmeldung mit der LRZ-Kennung und dem Passwort stattgefunden hatte, war der Zugriff auf des Reservierungssystem des GVS-Servers möglich. Der Befehl *rvstat* zeigte die momentane Verwendung der Grafikkarten an.

¹ <http://www.virtualgl.org/Downloads/TurboVNC> (06.04.10)

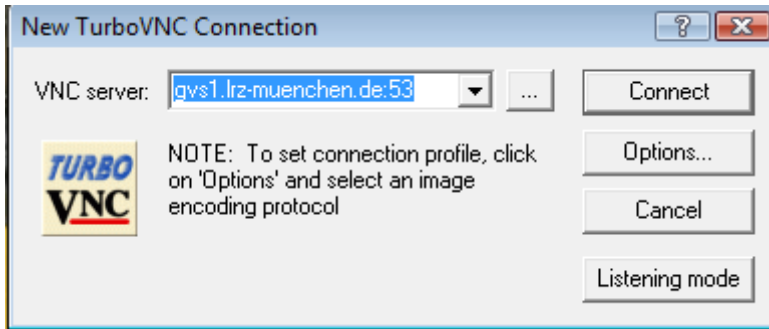


Abbildung 16: tvnc-Zugangsfenster

Es öffnete sich schließlich eine Benutzeroberfläche, mit der man sich auf dem System des LRZ befand. Von hier aus konnte „Amira“ gestartet werden (Abb. 14).

3.2 Digitalisierung der Bilddaten

Mit einer leihweise im Institut verfügbaren hochauflösenden Digitalkamera zur mikroskopischen Fotografie wurden die Schnitte einzeln aufgenommen und als *tif*-Dateien auf einem Datenträger abgespeichert. Auf diese bereits vorhandenen Daten konnte ich für meine Arbeit zurückgreifen.

3.3 Wandlung der Bilddaten

Da die vorhandenen Bilder einen Schnitt durch den Rinderembryo im Ganzen darstellten und durch ihre Farbinformation eine Dateigröße beanspruchten, die eine weitere Bearbeitung auf den vorhandenen Rechnerplätzen unmöglich gemacht hätte, mussten die Ausgangsdaten in einem Maße vereinfacht werden, das die Rechenkapazität berücksichtigte, ohne dass wichtige Detailinformationen verloren gingen.

Mit der Freeware *IrfanView*¹ wurde die Farbinformation des Bildmaterials mittels *Batch-Konvertierung* stapelweise in Grauwerte umgewandelt und im komprimierten *jpeg* -Dateiformat abgespeichert (Abb. 17).

¹ <http://www.irfanview.de> (06.04.10)

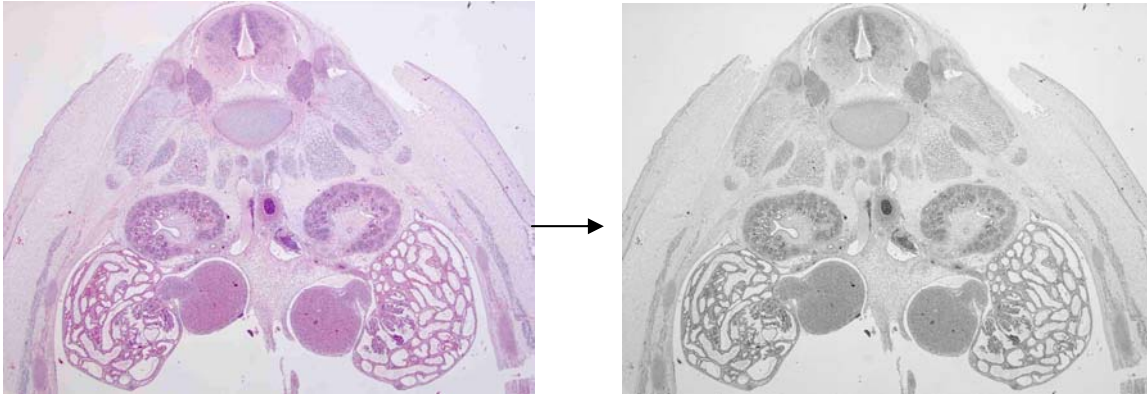


Abbildung 17: Umwandlung der Farbinformation der HE-Färbung in Graustufen

3.4 Eingrenzung der interessierenden Region (ROI)

Nach der rechnerischen Vereinfachung der Schnittbildserie war die Informationsvielfalt immer noch unnötig umfangreich, da nach wie vor Querschnitte durch den gesamten Embryo vorlagen und außerdem für den weiteren Arbeitsprozess nur die Urniere einer Körperseite herangezogen werden sollte. Um schließlich brauchbare Daten zu erhalten, die von der Rechenkapazität bewältigt werden konnten, wurde deshalb in „Amira“ eine sogenannte „*region of interest*“ (ROI) eingegrenzt, die nur die rechte Urniere und die unmittelbar benachbarten Strukturen einschloss (Abb. 18). Die rechte Urniere wies in der Durchsicht des Bildstapels tendenziell weniger Artefakte und Transformationen auf. Da die Auswahl dieser Region mit einem viereckigen Auswahlinstrument geschah und sich die Organgrenzen des Mesonephros in der z-Ebene von Schicht zu Schicht verschoben, musste auf die gesamte Schnittlänge überprüft werden, dass in keinem Bild relevante Strukturen ausgegrenzt wurden.

Das Speichern dieser neu gewonnenen Bilddaten erfolgte im *Amira-mesh*-Format.

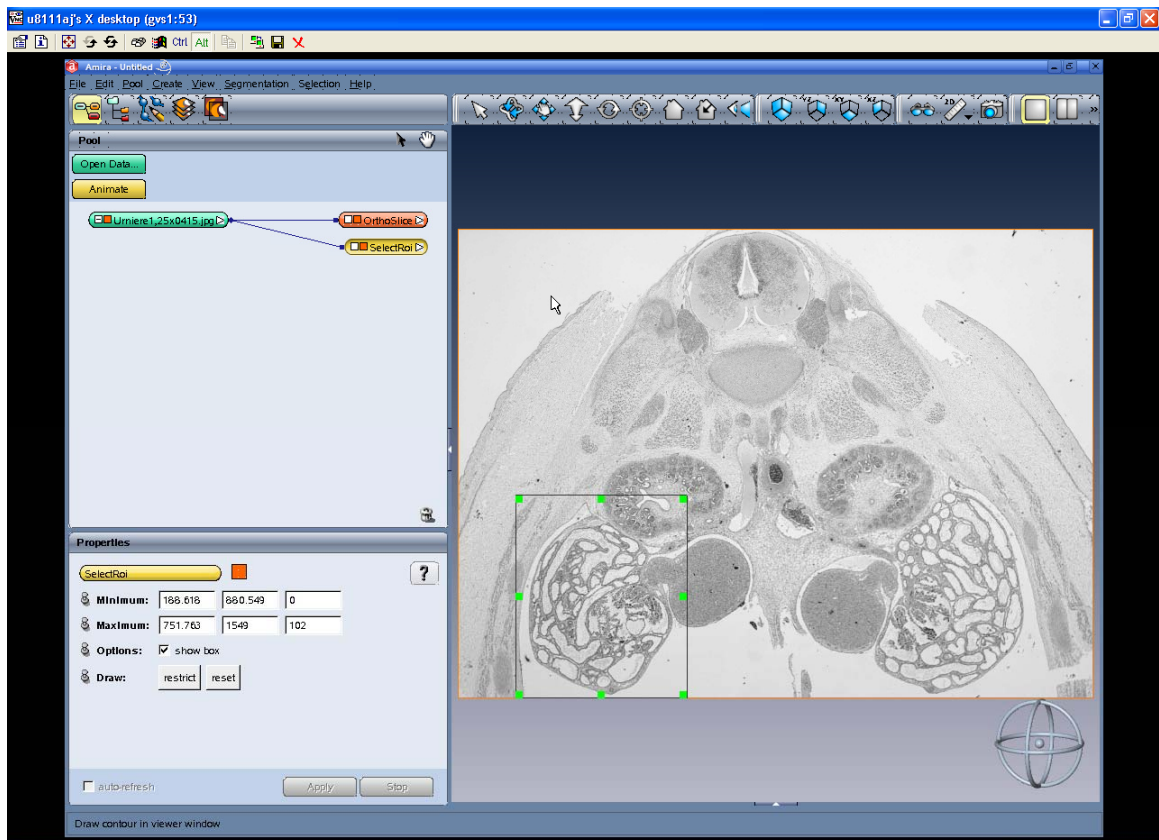


Abbildung 18: Auswahl und Beschneiden der ROI in „Amira“

3.5 Ausrichtung der zweidimensionalen Schnittbilder

Der histotechnische Arbeitsprozess führte unvermeidlich zu unterschiedlich stark ausgeprägten Artefakten im Sinne von Translation, Rotation, Stauchung, Streckung und Zerreißen von Strukturen. Zum Ausrichten der zweidimensionalen Bilder aufeinander bot „Amira“ das *AlignSlices* Modul. Die *Amira-Mesh*-Datei, die alle Bildinformationen und auch bereits eine räumliche Referenzierung in allen drei Ebenen beinhaltet, wurde in den Objekt-Pool von „Amira“ geladen und mit dem Modul *AlignSlices* verknüpft. Dieses Werkzeug stellte im Betrachtungsfenster jeweils zwei benachbarte Schnitte übereinandergeblendet dar, wobei gewählt werden konnte, ob jeweils der vordere oder der hintere der beiden transparent dargestellt werden sollte. Diese Art der Darstellung ermöglichte eine direkte und ergebniskontrollierte Möglichkeit, die Schnittebenen aneinander auszurichten.

Die zur Verfügung stehenden automatischen Alignment-Verfahren (SSD, landmarks) wurden auf ihre Praktikabilität und Genauigkeit hin getestet, konnten jedoch keine befriedigenden Ergebnisse liefern.

Nicht zuletzt Stauchungs- und Dehnungsartefakte, die sich nichtlinear und gleichförmig nachvollziehbar über die gesamte Bildebene verhielten und sich somit einer Korrektur in Bildbearbeitungsprogrammen entzogen, machten schließlich eine manuelle Ausrichtung der 902 Einzelbilder nötig.

Beginnend bei der äußeren Organstruktur wurde unter Sichtkontrolle durch Drücken und Halten der linken Maustaste eine Bildebene auf die folgende ausgerichtet (Abb. 19). Hierzu bot die Software verschiedene *Shortcuts* zum Rotieren und Verschieben der Objektebenen. Die größte Bedeutung wurde dabei dem Ziel beigemessen, die Anschnitte des Wolffschen Ganges und des Tubulussystems zur Deckung zu bringen. Zweifelsohne mussten häufig Kompromisse eingegangen und einzelne Übergänge nach eigenem Ermessen interpoliert werden.

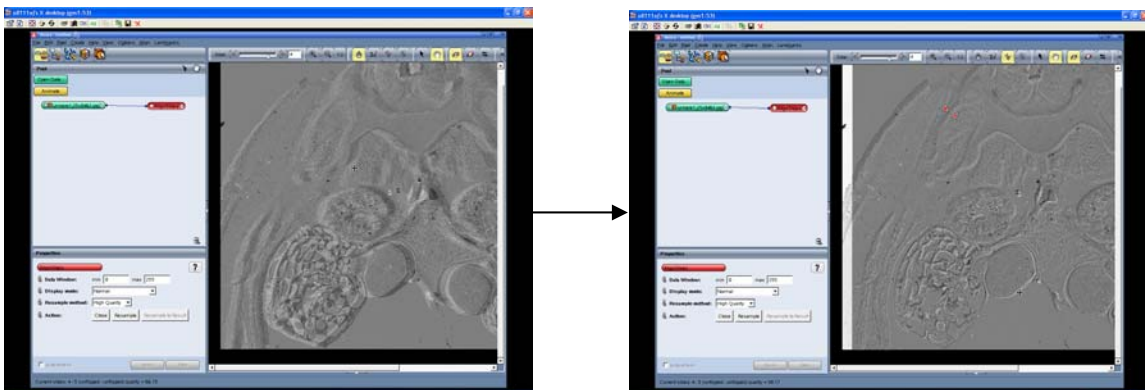


Abbildung 19: Transparente Darstellung zweier Schnitte übereinander im AlignSlices-Modul vor und nach dem Prozess des Alignments

Mehrere Schnittbilder lagen seitenerkehrt in dem Bildstapel vor. Dies konnte entweder bereits beim Prozess des Schneidens und Aufbringens auf die Objektträger erfolgt sein oder aber beim Digitalisieren der Objekte mittels Fotografie. Die betroffenen Schnitte wurden mit dem dafür vorhandenen Werkzeug gespiegelt und ebenso ausgerichtet.

Um die Genauigkeit der erzielten Ausrichtung zu kontrollieren, wurde der entstandene Bildstapel, der von „Amira“ im Objektpool durch die Anhängung von „align“ an den Dateinamen gekennzeichnet wurde, mit einem *OrthoSlice*-Modul

verknüpft, für das als Orientierung die z-Ebene gewählt wurde. Mit diesen virtuellen Schnitten konnten nun also zum ersten Mal Strukturen aus der x/y-Ebene herausgelöst betrachtet und der Erfolg des Alignments abgeschätzt werden (Abb. 20).

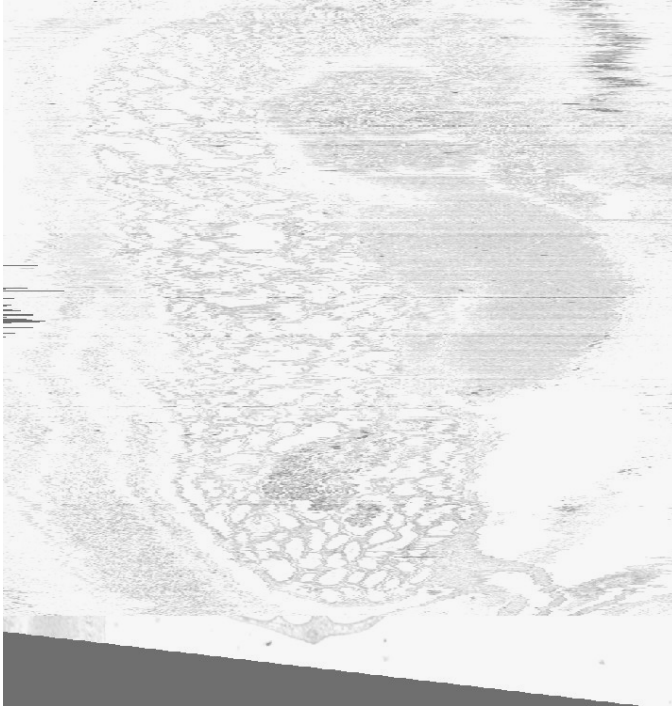


Abbildung 20: Virtueller Sagittalschnitt durch den Mesonephros nach erfolgreichem Alignment

3.6 Segmentierung der Urniere und deren Strukturen

Das Modul zum Labelling wurde dem Datensatz angefügt. In dem sich öffnenden Grafikfenster konnte zwischen verschiedenen Darstellungsweisen entlang der drei Achsen des Raumes gewählt werden. In diesem Fall sollte die Segmentierung in der Ursprungsebene der Schnittbilder erfolgen. Der *segmentation-editor*, die „Steuerungszentrale“ des Segmentierungs-Prozesses ermöglichte das Anlegen beliebig vieler Materialien, denen jeweils aus einer Farbskala eine Farbe frei zugewiesen werden konnte. Als Materialien wurden die Urniere selbst, der Ductus mesonephricus und drei anhand ihrer Konstanz und Unversehrtheit ausgewählte Tubuli in verschiedenen Organabschnitten von kranial nach kaudal segmentiert. Prinzipiell wurde hierzu in den Grauwertbildern die Struktur farbig markiert und durch einen Klick auf den +-Button (*add*) bei gleichzeitig blau unterlegtem Material die markierten Pixel dem Material hinzugefügt. Da in dem Amira-mesh-Format auch eine Bilddimension in z festgehalten ist, die letztend-

lich die Schichtdicke ausdrückt, handelte es sich streng genommen um markierte Voxel, die als sogenannte *label fields* abgelegt wurden.

Die von „Amira“ angebotenen Tools zur semi-automatischen Segmentierung waren vielfältig. Dasjenige Verfahren, das den Eigenschaften der Bilddaten am ehesten gerecht wurde, war der *magic wand* (Zauberstab). Er stellte ein Keimzellenwachstumsverfahren in frei wählbaren Grenzwerten dar. Mit der Maus wurde zunächst Bild für Bild ein Voxel in dem Organgewebe der Urniere markiert. Im Rahmen von vorgegeben Schwellenwerten weitete die Software den markierten Bereich auf eine bestimmte Anzahl von Bildpunkten aus. Bedingt durch die Ähnlichkeit von Grauwerten in verschiedenen Strukturen und den fließenden Übergang zum Beispiel zu den Gonadenanlagen oder dem Darmrohr neigte der markierte Bereich dazu, weit in diese Gewebe auszulaufen. Deshalb wurden anschließend individuelle *border-lines* eingefügt. Hierbei handelte es sich um Hilfslinien, die mit der Computermaus frei eingezeichnet werden konnten und den segmentierten Bereich nach außen hin begrenzten.

Der Ductus mesonephricus konnte relativ leicht segmentiert werden, da sein Verlauf kontinuierlich war und sich die äußeren Grenzen deutlich vom umgebenden Gewebe abgrenzen ließen (Abb. 21). Die erkennbaren Mündungen der Tubuli wurden solange dem Ductus zugezählt, bis sie sich gänzlich von ihm trennten. Hierdurch sollte später die Anzahl der Tubuli genauer rekonstruiert werden können.

Am aufwendigsten gestaltete sich die Markierung der Tubuli. Ihre Umrisse konnten zumeist sehr deutlich erkannt werden. Die Schwierigkeit lag jedoch darin, dass – wie bereits erwähnt – Röhrenstrukturen die zweidimensionale Ebene mehrfach durchstoßen und ihr Verlauf erst durch das Verfolgen eines Tubulusanschnittes durch alle Schnittbilder bis zum Erkennen einer Umschlagsstelle, dem rückläufigen Verfolgen der Fortsetzung bis zu einer weiteren Windung und so fort erfasst werden konnte. Zur Auswahl mehrerer Markierungen in einer Bildebene musste die Strg-Taste gedrückt gehalten werden.

Beginnend bei der eindeutigsten Stelle des Tubulus, der Mündung in den Wolffschen Gang, wurden also auf die genannte Art und Weise drei Tubuli segmentiert. Zumeist waren letztendlich in einer Bildebene eine Vielzahl von Anschnitten markiert, die man zuvor bei bloßem Betrachten eines einzelnen Schnittbildes in keinerlei Beziehung hätte bringen können.

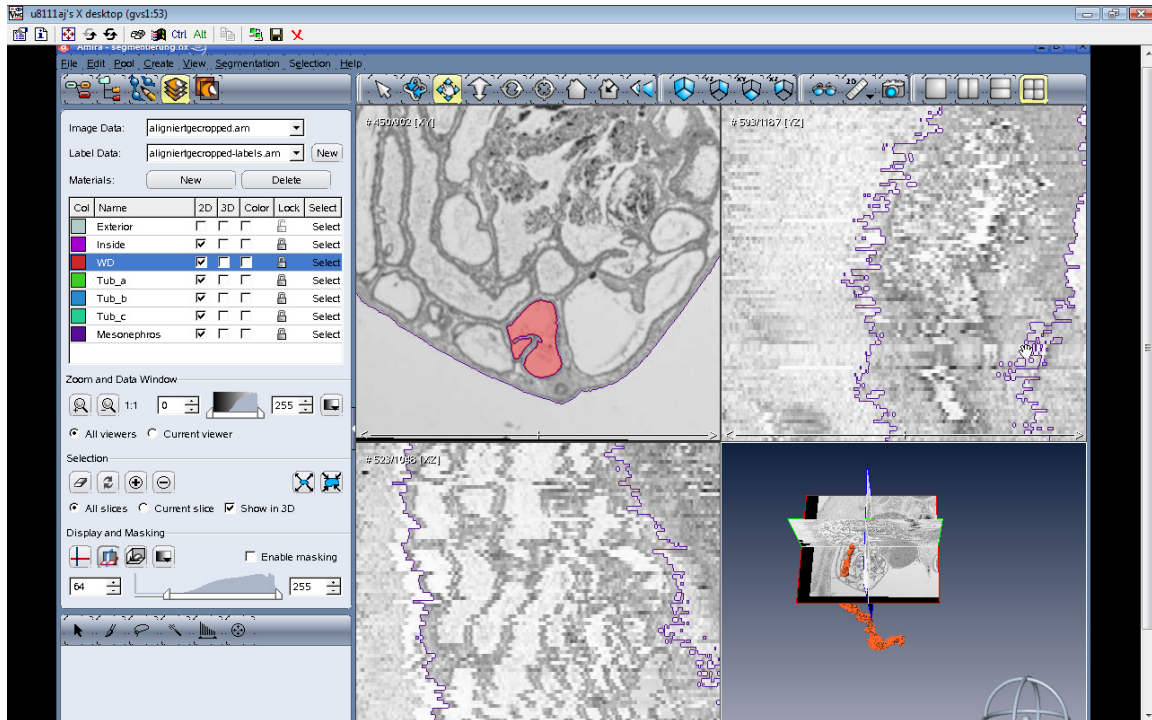


Abbildung 21: Benutzeroberfläche im Segmentierungseditor während der Markierung des Wolffschen Ganges

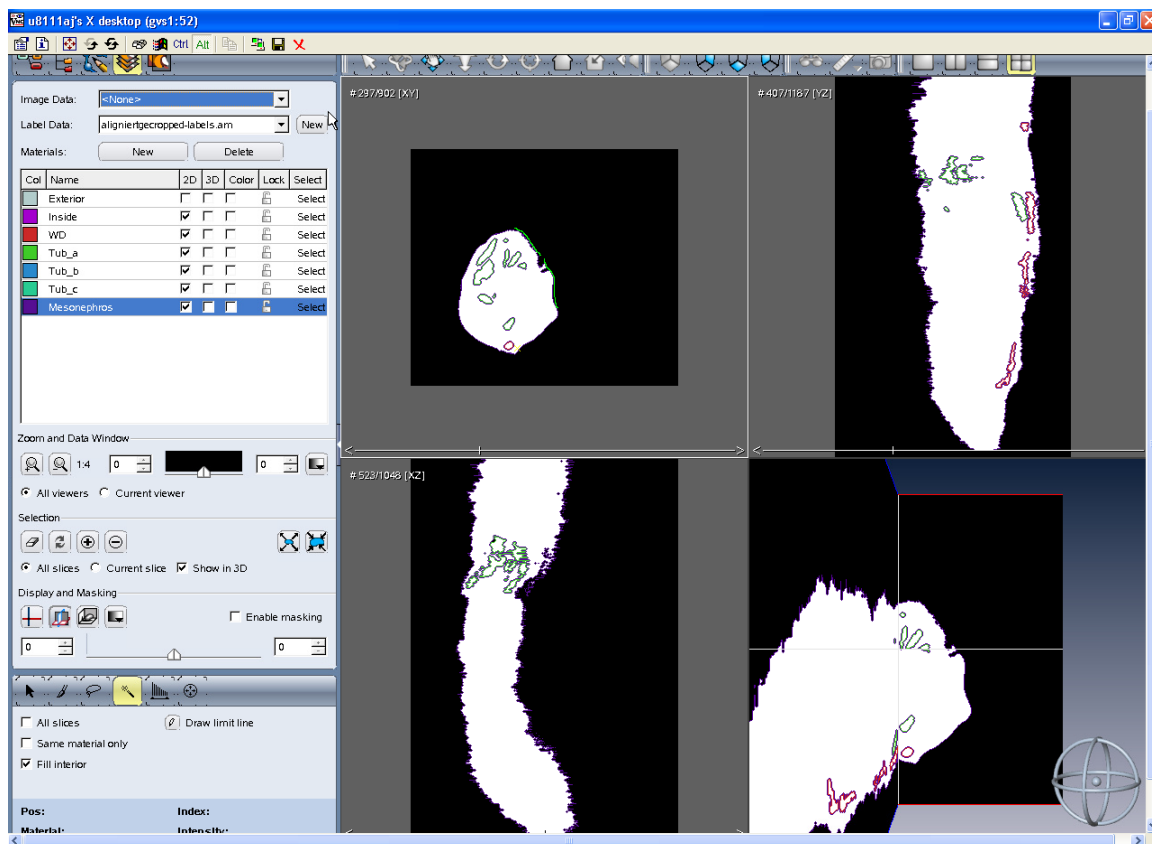


Abbildung 22: Anzeige der sogenannten label fields im Segmentierungseditor

Eine erste Beurteilung des Ergebnisses der Segmentierung konnte durch das Betrachten der *label fields* entlang einer anderen Achse erfolgen (Abb. 22).

Eine weitere Schwierigkeit stellten im Segmentierungsprozess Bildartefakte wie Zerreißungen, fehlende Schnittbereiche und extreme Aufblähungen der Schnittstrukturen dar. Der Informationsgehalt dieser Bildebenen konnte für die Rekonstruktion nicht genutzt werden, sondern hätte sie ganz im Gegenteil nachteilig beeinflusst. Um dennoch die Ausdehnung in der Längsachse durch das bloße Auslassen dieser Schnittebenen nicht zu verfälschen, wurde auf ein Instrument zur Interpolierung von Markierungen in „Amira“ zurückgegriffen. Hierzu musste die jeweils zu bearbeitende Struktur kranial und kaudal des fehlerhaften Bildes markiert werden und sichergestellt sein, dass in dem Bildstapel keine weiteren Strukturen ausgewählt waren. Durch Klicken auf die entsprechende Schaltfläche berechnete der Computer den idealen Übergang zwischen den benachbarten Bildern. Dieses Prozedere wurde in dem Bildstapel mehrfach durchgeführt, immer dann, wenn durch die Verwendung der Originaldaten eine zu große Verfälschung des Ergebnisses befürchtet werden musste.

Die derart segmentierten Labels wurden in einem "Amira"-eigenen Dateiformat abgespeichert.

3.7 Rendering und weitere Darstellung der gewonnenen Rekonstruktionen

Entsprechend der beschriebenen Möglichkeiten zur dreidimensionalen Darstellung von Volumendaten bot „Amira“ oberflächenbasierte Renderingverfahren an. Diese werden im folgenden näher beschrieben.

3.7.1 Berechnung einer Isosurface

Die Segmentierung und hierbei insbesondere die der äußeren Organkonturen lieferte Daten, die für eine schnelle Visualisierung herangezogen werden konnten. Hierzu wurde das Modul *Isosurface* mit dem die Labels enthaltende Datensatz verknüpft. Im Grafikfenster erfolgte die Anzeige der Visualisierung. Sie konnte modifiziert werden, indem zwischen transparenten und robusten Darstellungsweisen gewechselt werden konnte. Die Einstellung eines Opazitätsgrades

ließ in der transparenten Darstellungsweise innen gelegene Strukturen unterschiedlich stark durchscheinen.

Vor dem Rendern der Strukturen wurden die Labels mit dem *Resample*-Modul vereinfacht, da insbesondere bei der transparenten Visualisierung die Rechenzeit ansonsten auffallend verlängert wurde. Im Konsolenfenster des *Resample*-Moduls konnte hierzu entlang x-, y- und z-Achse ein Faktor eingegeben werden, um den die Auflösung reduziert werden sollte. Das Ergebnis der Berechnung wurde automatisch in einem neuen Objekt im Object-Pool von „Amira“ abgelegt und mit der Endung „resample“ gekennzeichnet. Beim Faktor 2 konnten keine nennenswerten Detailverluste bemerkt werden, der Rechenaufwand wurde jedoch erheblich vermindert.

3.7.2 Oberflächenberechnung und Visualisierung

Um eine Rekonstruktion anhand der heraussegmentierten Objektoberflächen zu ermöglichen, wurde dem Datensatz zunächst das Modul *SurfaceGen* zugeordnet. Dieses berechnete die Objektoberflächen und stellte verschiedene Einstellungsmöglichkeiten bereit. Für die Berechnung konnte bestimmt werden, ob keine, eine leichte oder aber eine starke Glättung der Konturen vorgenommen werden sollte (*none, unconstrained oder constrained smoothing*). Des Weiteren konnte der Datensatz über die Funktion „*downsample*“ unterschiedlich stark vereinfacht werden. Die Voreinstellungen wurden mit „*Apply*“ bestätigt und die Berechnung erfolgte.

Dem resultierenden Datensatz wurde das Modul *SurfaceView* angebunden. Hierdurch wurde es möglich, Oberflächen einzeln und kombiniert darzustellen. Jedes vorher segmentierte Material konnte visualisiert werden und über Schaltflächen war es möglich, jedes Material der Gesamtvisualisierung hinzuzufügen oder aus dieser zu entfernen. Die Darstellung konnte je nach Voreinstellung mit Punkten, Flächen, schattiert oder transparent erfolgen.

Der Inhalt des Grafikfensters konnte interaktiv rotiert, skaliert und verschoben werden und über die entsprechende Schaltfläche als Screenshot abgespeichert werden. Die Vermessung von Winkeln und Längen sowie Beschriftungen konnten dem Visualisierungsergebnis angefügt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Ergebnisse

Der anfangs verfolgte Ansatz der Visualisierung der Schnittbilder auf dem Fakultätsrechner musste wie bereits oben beschrieben als nicht praktikabel verworfen werden, obwohl hier bereits eine sehr exakte Segmentierung der Strukturen stattgefunden hatte. Alle im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden demnach durch die Nutzung der Remote-Visualisierung auf den Rechnern des LRZ gewonnen.

4.1.1 Ergebnisse der Digitalisierung der Bilddaten

Im Hinblick auf die Datenmenge von ca. 8 Gigabyte und die damit verbundene herabgesetzte Geschwindigkeit von Rechenprozessen wurde die Farbinformation der HE-Färbung in 8-Bit Graustufen umgewandelt. Die Detailinformation dieser vereinfachten Daten war für die weitere Fragestellung jedoch vollkommen ausreichend und ermöglichte auf dem genutzten Rechensystem ein zügiges Arbeiten. Eine weitere Beschleunigung und Vereinfachung brachte die enge Eingrenzung der interessierenden Region (ROI).

4.1.2 Ergebnisse des Alignments

Die programmgesteuerte Ausrichtung der Schnitte nach dem händischen Setzen mehrerer *landmarks* musste aufgrund des Fehlens eben solcher konstanter Strukturen als nicht brauchbar eingestuft werden. Selbst der Ductus mesonephricus als durchgängige Struktur passte sich in die Organform ein und variierte stark in Lage, Querschnitt und Krümmung.

Die zweite automatische Registrierungsmöglichkeit, die rechnerermittelte Optimierung der Histogrammabweichung, das heißt der Grauwertverteilung zweier benachbarter Schnittbilder war unter anderem aufgrund unterschiedlicher Färbungsintensitäten der histologischen Schnitte ebenso nicht zielführend. Darüber hinaus wurde die Anwendung dieses Verfahrens in vielen Schnittbildpaaren durch zu umfangreiche Artefakte unmöglich gemacht.

Zum Alignment des Bildstapels erfolgte daher die manuelle Ausrichtung, die zwar das zeitaufwendigste Verfahren darstellte, jedoch auch die Möglichkeit bot, auf individuelle Verformungen und spiegelverkehrt eingefügte Schnittbilder zu reagieren, was ein Algorithmus nicht zu leisten vermocht hätte.

Strukturveränderungen, die durch den histotechnischen Prozess zu erklären waren, wurden von Fall zu Fall nach eigenem Ermessen korrigiert bzw. interpoliert. Der Erfolg dieses Vorgehens wurde anhand virtueller Schnitte überprüft und konnte im Bezug auf die äußeren Organkonturen und den Verlauf des Ductus mesonephricus als befriedigend eingestuft werden. Das feine System der Tubuli wies jedoch zweifelsohne zum Teil grobe Sprünge und Abweichungen zwischen benachbarten Bildern auf.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand, der zum manuellen Alignment nötig war, kann im Hinblick auf die hohe Anzahl von Einzelbildern als angemessen angesehen werden. Durch die Nutzung von Tastaturkürzeln in Kombination mit Bewegungen der Maus konnte im Verlauf des Arbeitsvorganges in das manuelle Vorgehen ein hohes Maß an Routine und hierdurch eine Art Automatisierung eingebracht werden.

4.1.3 Ergebnisse und Qualität des Segmentierungsprozesses

Zur Darstellung der Tubulusstrukturen musste in den meisten Schnittbildern eine Vielzahl von Konturen segmentiert werden. Dies manuell unter Nutzung eines Pinsel-Tools in „Amira“ zu leisten wäre sowohl im Hinblick auf den Zeitaufwand als auch auf die Genauigkeit unbefriedigend gewesen. Deshalb wurden die verschiedenen von „Amira“ angebotenen Instrumente zur semi-automatischen Segmentierung auf ihre Praktikabilität und Verlässlichkeit hin überprüft.

Aufgrund von Variationen in der Färbungsintensität und sehr ähnlicher Grauwerte verschiedener Gewebearten in der Schnittebene konnten reine Schwellenwertverfahren nicht greifen. Als befriedigend und anwendungsfreundlich erwies sich das „Zauberstab“-Tool (*magic wand*) kombiniert mit der Einfügung von Grenzlinien (*border lines*), die das Auslaufen der Markierung in Bereiche mit gleichen Grauwerten verhinderte. Durch das Einstellen individueller Grenzwerte je nach Färbungsintensität und Material konnten zufriedenstellende Segmentierungsergebnisse erzielt werden.

Das Problem der „Ausreißer“, also einzelner Schnittbilder, deren Information als allzu fehlerhaft eingestuft werden musste, wurde über Interpolationsberechnungen gelöst. Auch wenn hier abermals das Eingreifen im Einzelfall nötig war, konnten durch dieses Vorgehen eine Vielzahl von Artefakten ausgelöscht werden, ohne dass diese Schnitte zu Beginn der Visualisierungspipeline aufwendig aus dem Bildstapel hätten entfernt und ersetzt werden müssen. Der Informationsverlust durch die Interpolation von ungefähr 25 Schnitten hatte in Anbetracht der Gesamtzahl von 902 Ebenen eine zu vernachlässigende Auswirkung auf das Gesamtergebnis.

Ständige Korrektur und Nachsegmentieren verlangte die Markierung der Tubulusanschnitte, da sich immer wieder neue Umschlagstellen ergaben, die zurückverfolgt werden mussten. Zur endgültigen Kontrolle eines Tubulus mussten abschließend zum Teil mehrere hundert Einzelbilder per *Scrollen* durchlaufen werden. Nach vorhergehender Markierung des entsprechenden Materials konnte hierbei anhand der filmähnlichen Sequenz und des entstehenden Bildrauschens die Qualität des *Labellings* abgeschätzt werden.

4.1.4 Das dreidimensionale Modell

Ziel aller Arbeitsschritte war schließlich die Rekonstruktion und Visualisierung des Organs. Daher konnte auch erst in diesem abschließenden Prozess tatsächlich entschieden werden, ob die Vorbereitungsschritte sinnvolle Ergebnisse und Voraussetzungen liefern konnten.

Die Berechnung des vereinfachten Datensatzes (*Resample*) mittels *Isosurface* ergab ein Modell, mit dem gut hantiert werden konnte. Es offenbarte anschaulich die Organoberfläche und in der transparenten Darstellungsweise den Einblick in Lage und Ausdehnung des Ductus mesonephricus und der Tubuli (Abb. 23). Da bei dieser Art der Berechnung eine Unterscheidung der einzelnen segmentierten Materialien nicht stattfand, war der Kontrast innerhalb des Modells zum Teil nicht ausreichend, um verschiedenen Strukturen verlässlich voneinander zu trennen. Außerdem auffallend waren vor allem an der äußeren Kontur mehr oder minder große Stufenbildungen entlang der Schnittebenen. Auch wenn die Übergänge aufgrund des Resamplings weicher als im unveränderten Datensatz erschienen,

zeigten sich hier doch klar die Auswirkungen der Dehnungs- und Stauchungsartefakte der Schnittbilder.

Die Segmentierung der Glomerula wäre zur Darstellung des Nephrons in seiner ganzen Länge wünschenswert gewesen. Da die Gefäßschlingen im histotechnischen Prozess jedoch ein weitaus fragileres Untersuchungsobjekt darstellten und anfälliger für Verformungen waren, lag ihre Markierung und Visualisierung außerhalb des Machbaren. Dieses Vorhaben wurde auch dadurch limitiert, dass es mit den vorhandenen Segmentierungstools nicht möglich gewesen wäre, die Kapillarstrukturen mit einem vertretbaren Zeitaufwand mit der nötigen Sorgfalt zu bearbeiten.

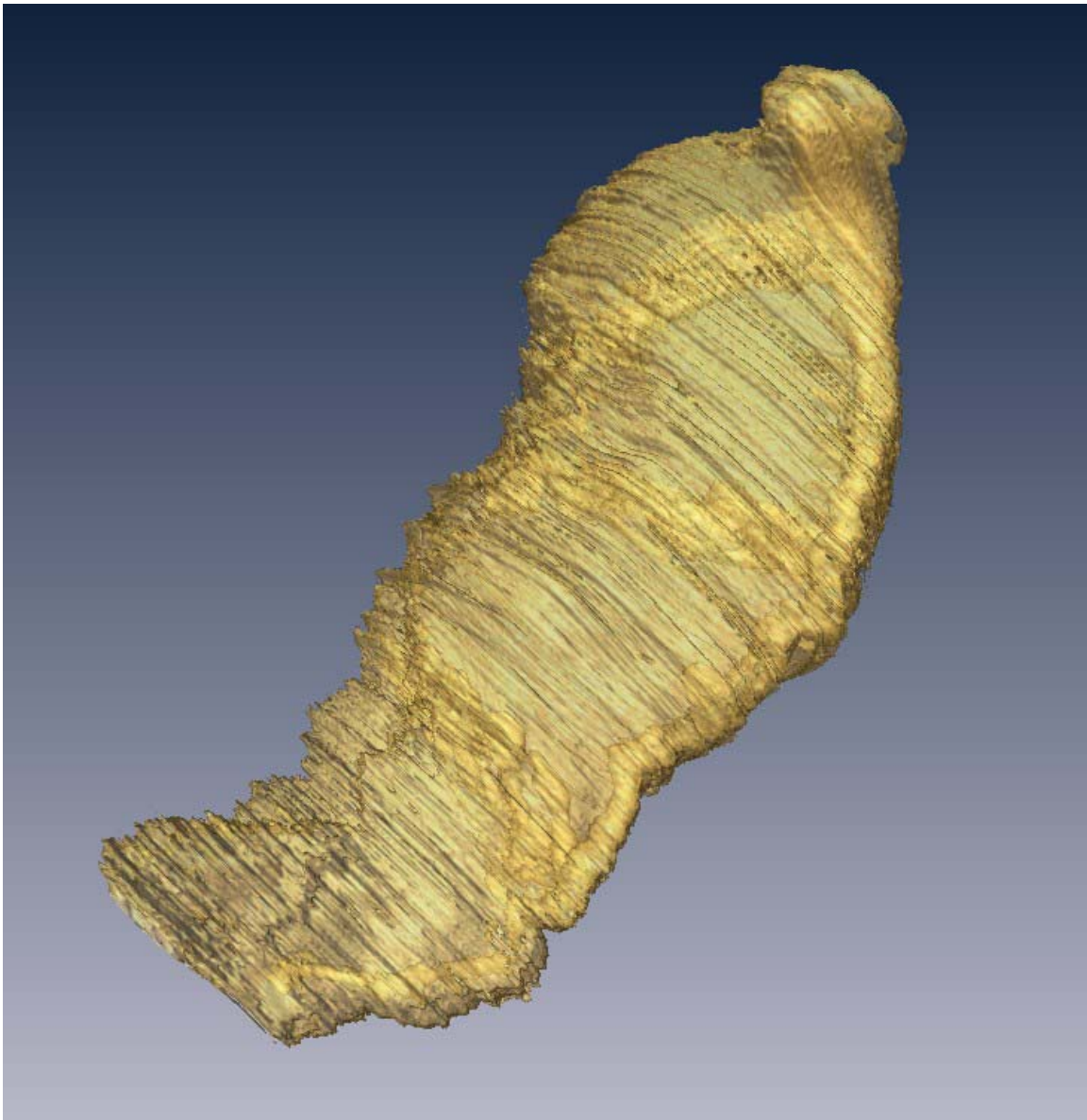


Abbildung 23: Transparente Darstellung des Mesonephros und seiner inneren Strukturen

Zur Visualisierung des oberflächenbasierten Modells wurden die segmentierten Konturen getrennt gerendert. Ein Vergleich der Berechnung mit und ohne Nutzung eines Glättungsalgorithmus ergab, dass eine Glättung zwar die Detailinformation reduzierte, das visuelle Ergebnis hierdurch jedoch klarer und übersichtlicher wurde (Abb. 24). Vor allem im Bereich der Tubuli, die abschnittsweise sehr feine Strukturen aufwiesen, konnte die erhaltene dreidimensionale Information die tatsächlichen Verhältnisse aufgrund der genannten Artefakte nicht widerspiegeln. So war es nicht möglich, einen eindeutig verfolgbaren Tubulusverlauf zu rekonstruieren, der keinerlei Verschmelzungen mit benachbarten Abschnitten aufwies.

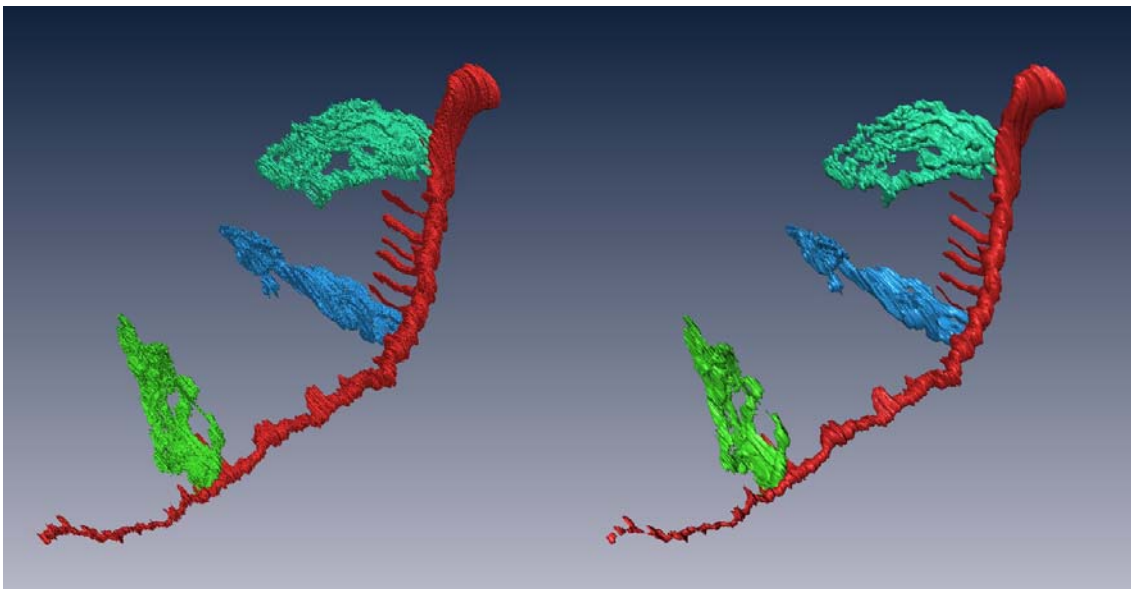


Abbildung 24: Rendering der Oberflächen des Wolffschen Ganges und der drei segmentierten Tubuli ohne und mit Glättungsalgorithmus

Die Rekonstruktion mit den Modulen *SurfaceGen* und *SurfaceView* erlaubte im Unterschied zu dem *Isosurface* die Aufschlüsselung des Modells in seine einzelnen Materialien sowie das Entfernen einzelner Strukturen aus dem Visualisierungsergebnis. Hierdurch wurde das Modell übersichtlicher und die Möglichkeiten der Interaktion vielseitiger.

Durch die kombinierte Darstellung von histologischen Schnitten und dreidimensionalen Modellen im Grafikfenster konnte sowohl der Prozess der Visualisierung nachvollzogen als auch der Zugewinn an räumlicher Information eindrucksvoll dargestellt werden (Abb. 25).

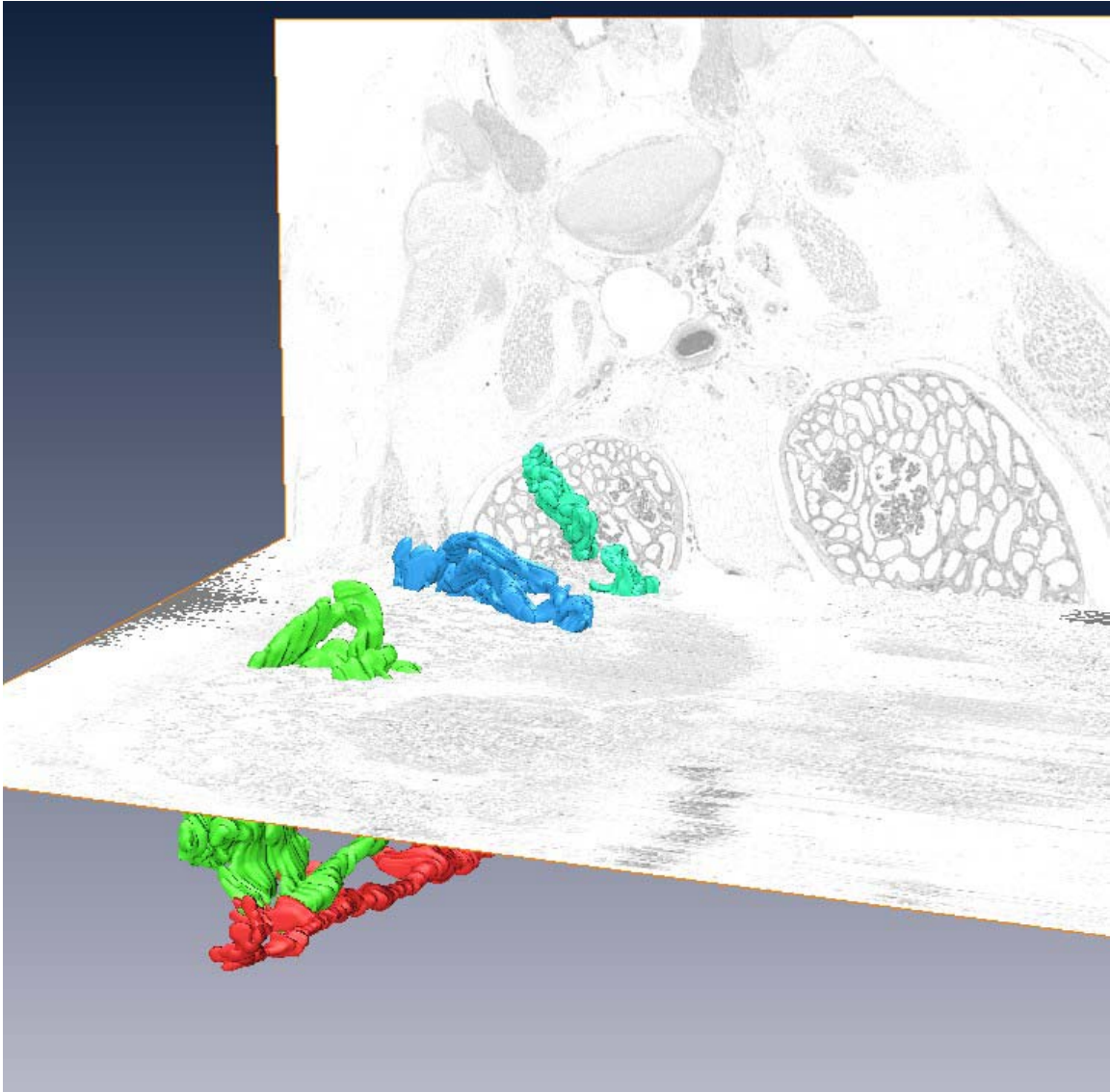


Abbildung 25: Rekonstruktion, virtueller Schnitt und histologischer Schnitt in einer Grafik kombiniert dargestellt

4.2 Morphologische Ergebnisse

4.2.1 Das Organ als Ganzes

Der Mesonephros liegt dorsal längsoval in der Leibeshöhle. Kaudal legt sich ihm die Gonadenanlage von medial an. Seine laterale Oberfläche ist der Körperwand unmittelbar benachbart und daher entspricht er in seiner Wölbung der Formung der Körperhöhle. Die Oberfläche ist glatt. Die in der Visualisierung auftretenden Stufen sind wie bereits beschrieben technisch bedingt. Der Organdurchmesser ist relativ gleichmäßig. Kaudal entlässt die Urniere den Wolffschen Gang (Abb. 26).

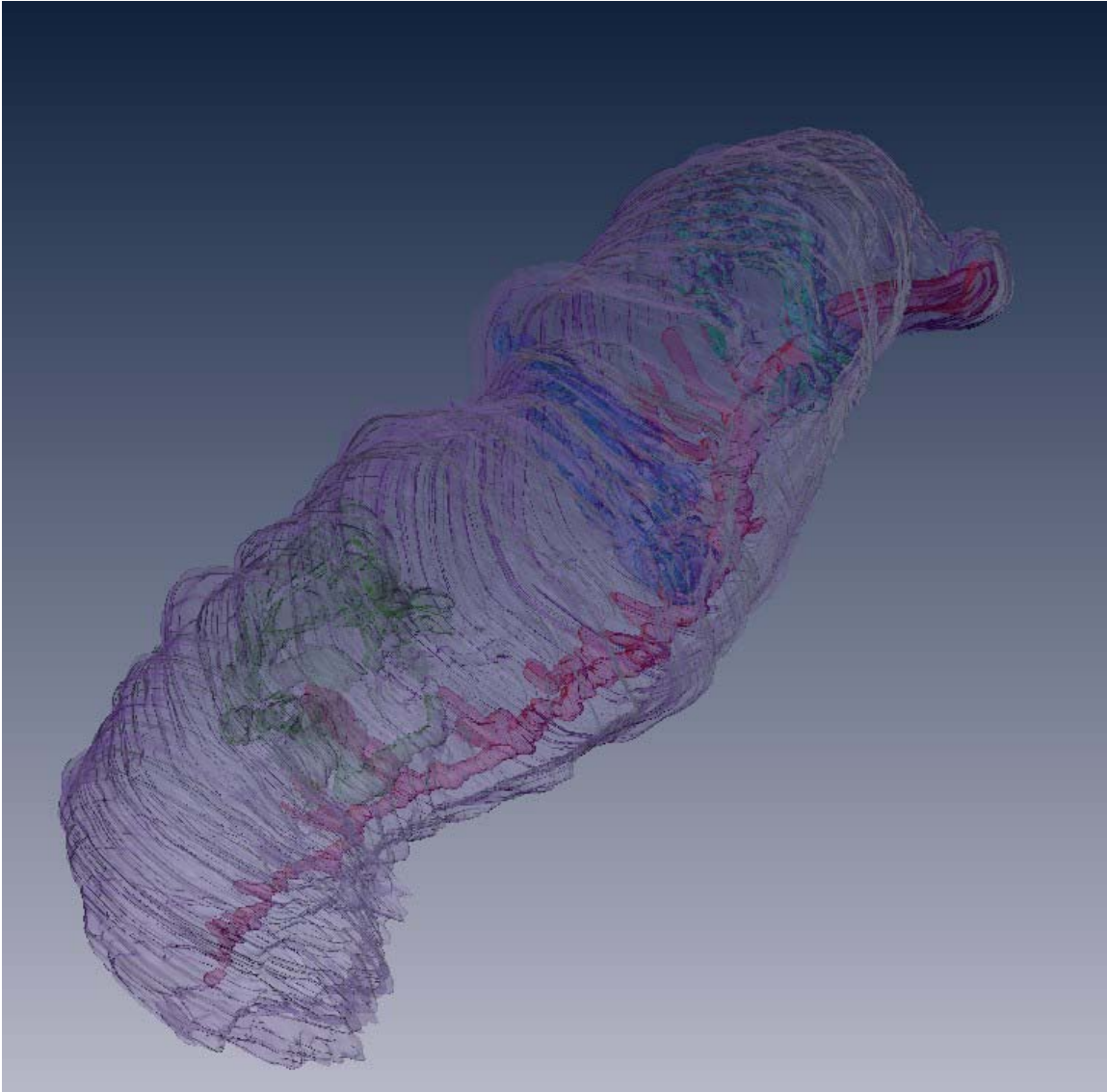


Abbildung 26: SurfaceView; Transparente Visualisierung aller segmentierten Strukturen

4.2.2 Gestalt und Verlauf des Ductus mesonephricus

Der Wolffsche Gang durchzieht das Organ in voller Länge wobei sein Lumen meist leicht oval ist und von kranial nach kaudal unter Aufnahme der Tubulismündungen kontinuierlich zunimmt (Abb. 27). Kaudal verlässt er die Urniere und mündet in die Kloake. Seine Lage im Organ variiert von ventrolateral im kranialen Bereich über ventral nach ventromedial in den kaudalen Abschnitten. Die Endabschnitte der Nephronen treten von lateral und dorsal an ihn heran.

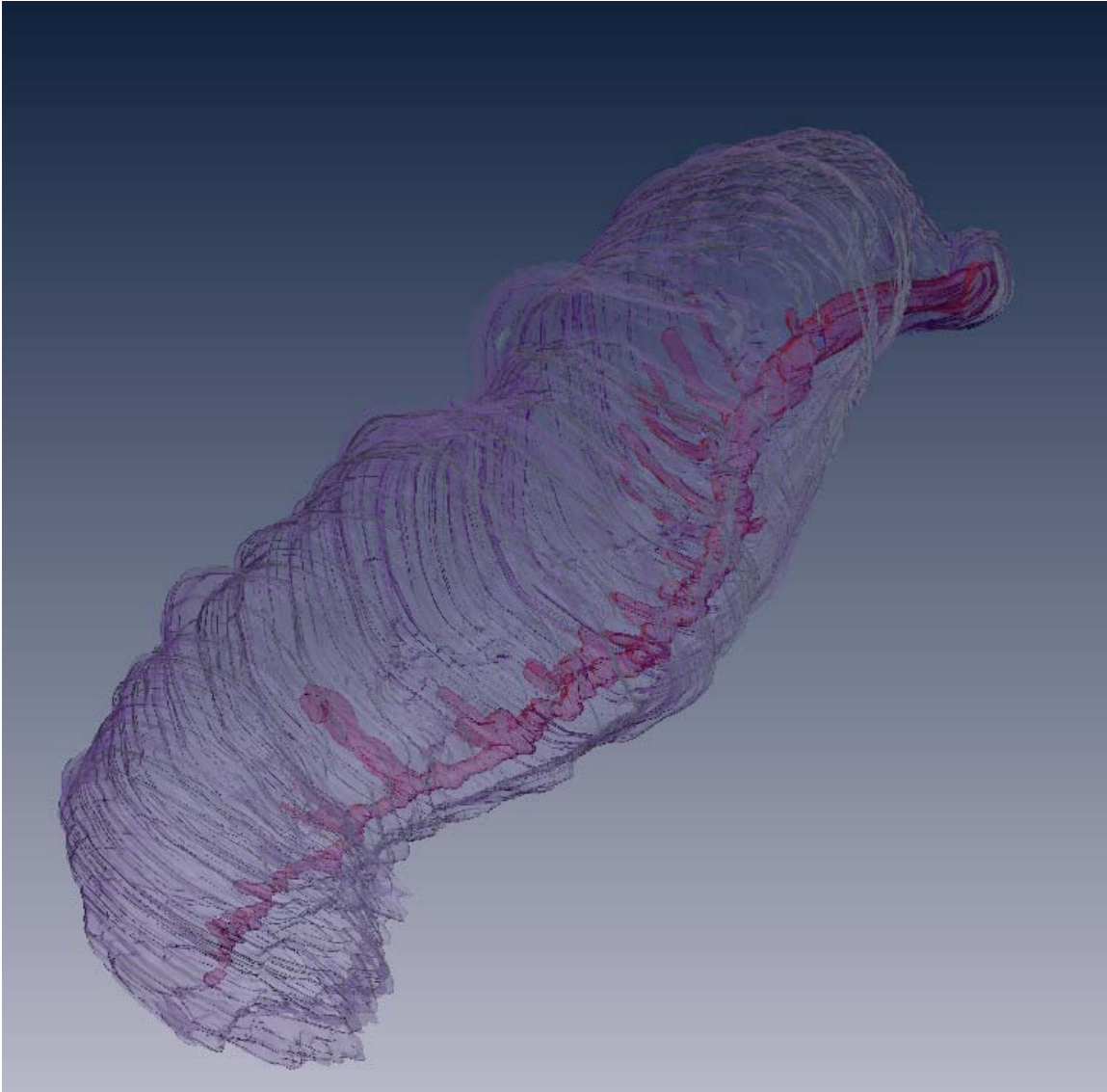


Abbildung 27: SurfaceView; Modell der äußeren Organkontur und des Ductus mesonephricus

Bei dem hier visualisierten Mesonephros eines Rinderembryos von 35 mm SSL kann anhand der dem Ductus zugeordneten Einmündungen der Nephrone deren Gesamtzahl zu diesem Entwicklungszeitpunkt auf 24 abgeschätzt werden (Abb. 28). Der kraniale Abschnitt des Wolffschen Ganges weist wenige kurze Unterbrechungen auf, die als ein Anzeichen für Degeneration gewertet werden können.

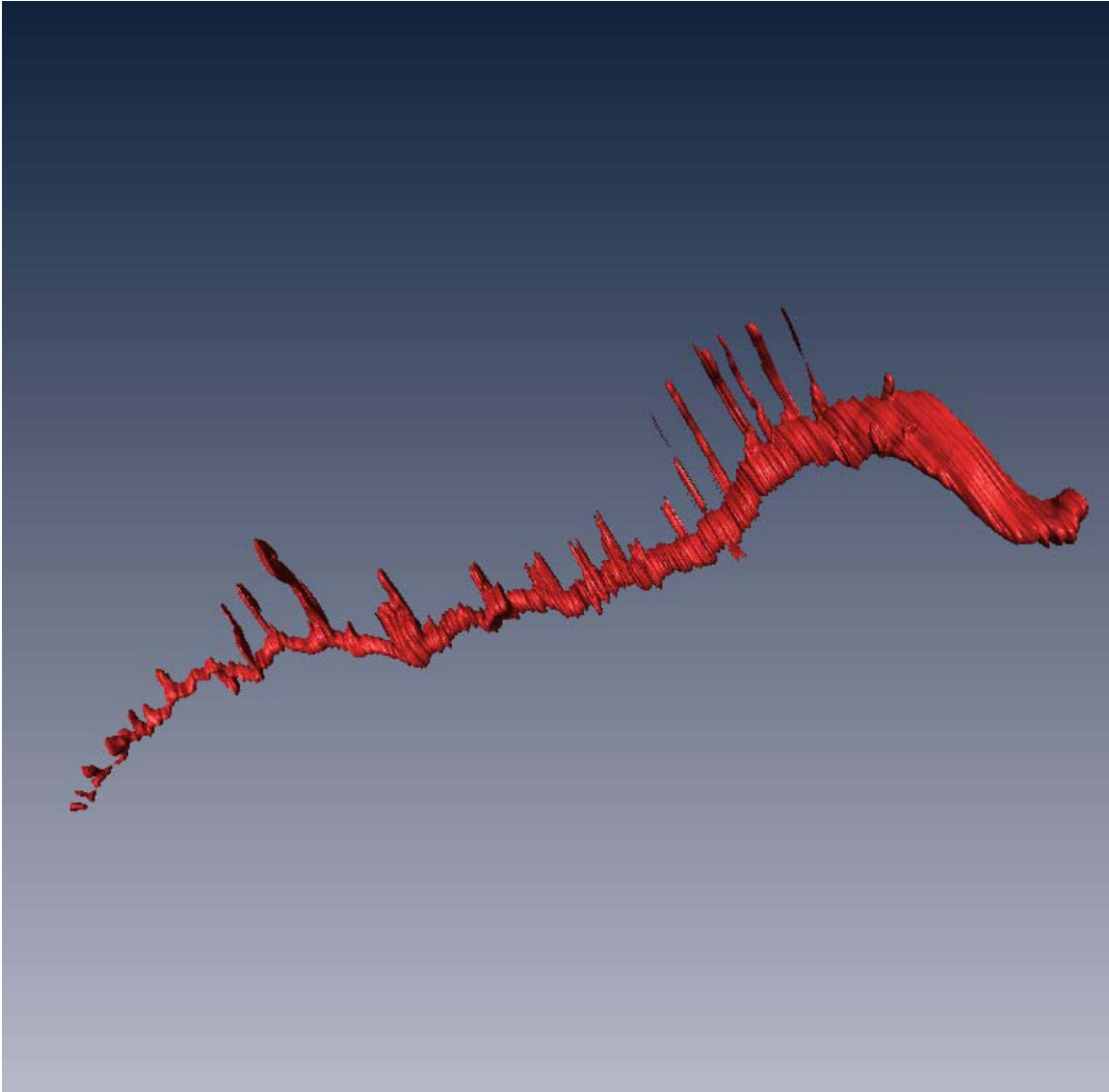


Abbildung 28: Modell des Ductus mesonephricus: Ansicht von dorsomedial zur besseren Sicht auf die Tubuluseinmündungen

4.2.3 Gestalt der Nephrone

Der grundsätzliche Verlauf der Tubuli konnte trotz der in den Ausgangsdaten aufgetretenen Artefakte sowie der Stufenbildung in der Visualisierung gut beurteilt werden.

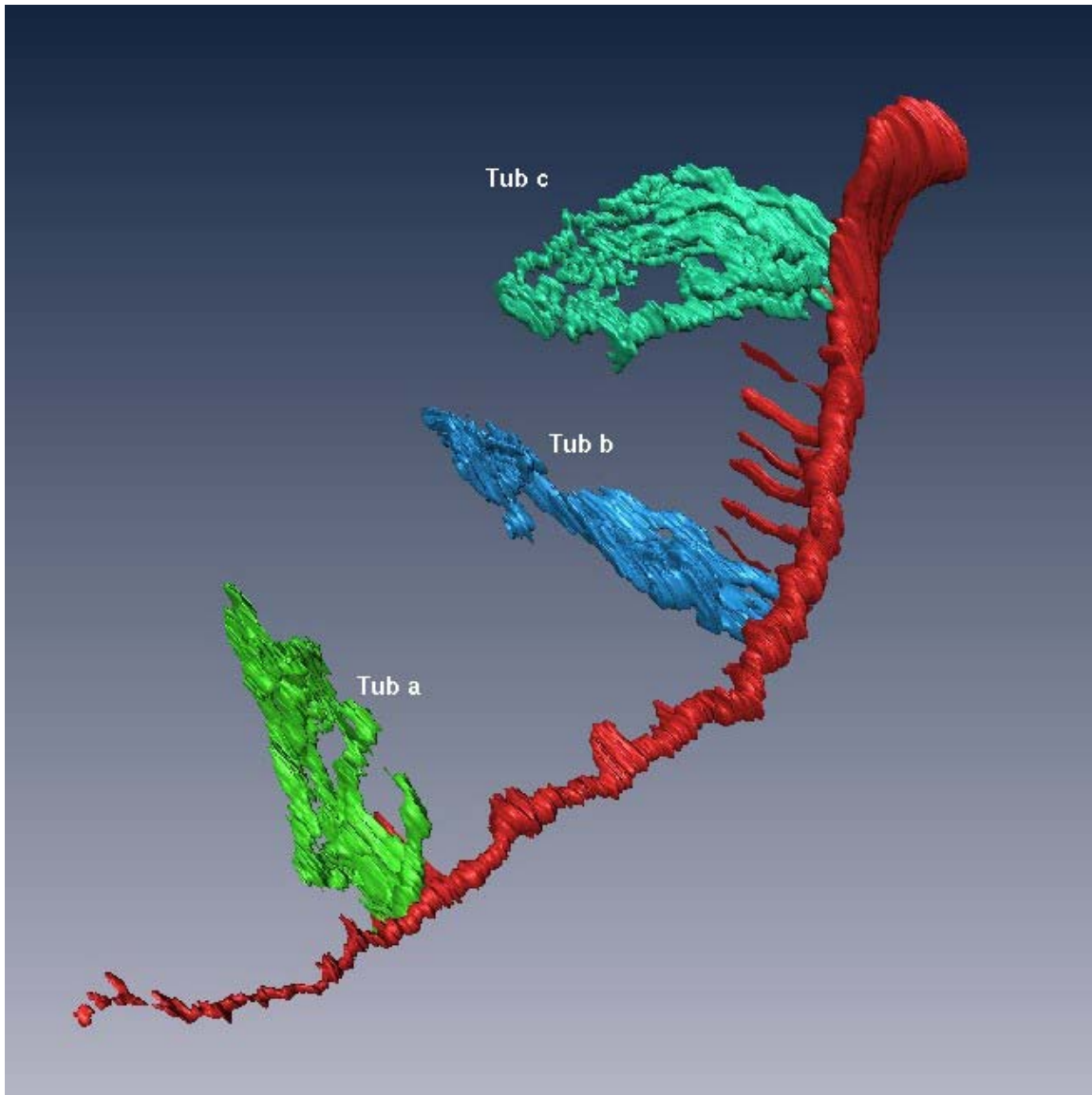


Abbildung 29: Visualisierung des Ductus mesonephricus und der drei Tubuli

Ausgehend vom medial gelegenen Glomerulum beginnt der Tubulus proximal mit einem mehr oder minder geraden Abschnitt, der sich nach einem kurzen Verlauf nahezu parallel zum Wolffschen Gang in mehreren, schwer differenzierbaren, hufeisenförmigen Windungen umschlägt. Das Lumen ist in diesem Bereich weiter als im proximalen Abschnitt. Unter Verengung des Lumens legt sich der Tubulus in seinem weiteren Verlauf dem Glomerulum an, bevor er sich abermals zunächst in einer kleinen Schleife und dann in einer Vielzahl von Windungen umkehrt und unterhalb der lateralen Organoberfläche über wenig gewundene Abschnitte mit geringerem Durchmesser der Einmündung in den Wolffschen Gang nähert, in den er sich schließlich ergießt (Abb. 30). Diese Struktur

des Tubulus lässt sich an dem am weitesten kaudal rekonstruierten Tubulus c am besten nachvollziehen. Die weiter kranial gelegenen Tubuli a und b sind weniger differenziert und wie in Abbildung 31 ersichtlich in ihrer räumlichen Ausdehnung weniger prominent.

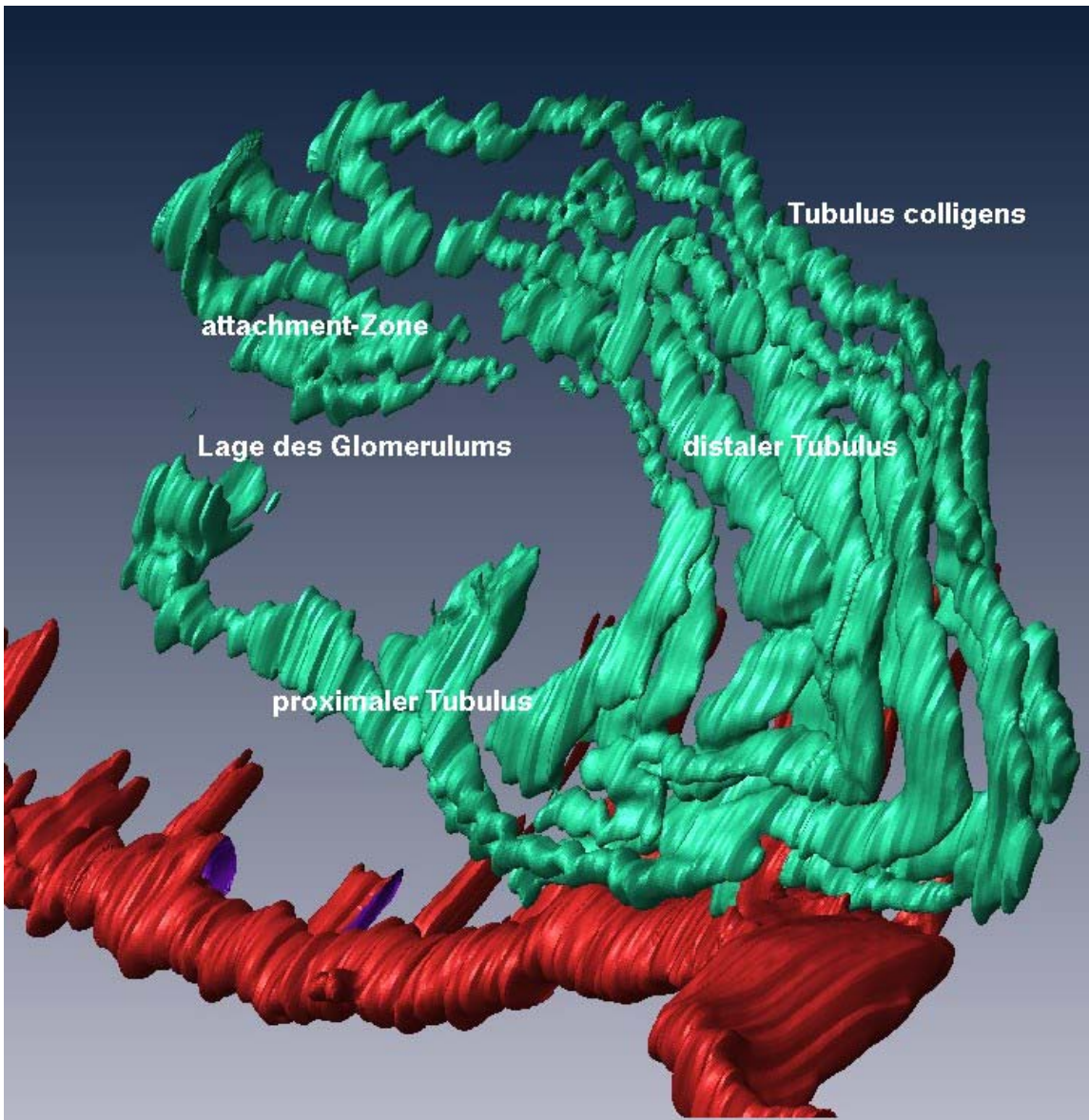


Abbildung 30: Rekonstruktion des Tubulus c; Ansicht von medial

Die Verschmelzung einzelner Tubuli bzw. der Abgang mehrerer Tubuli von einem Glomerulum lassen sich vermuten. In Tubulus c sind dies zum Beispiel zwei Anteile des proximalen Tubulus, die sich im weiteren Verlauf vereinen.

Der Tubulusverlauf ist in der Visualisierung immer wieder unterbrochen. In Abbildung 30 ist dies etwa proximal des Übergangs in die attachment-Zone zu er-

kennen. Diese Lücken können entweder durch fehlerhafte Informationen in den Schnittbildern erklärt werden oder aber ein Anzeichen für beginnende Degeneration sein.

Die Komplexität des Tubulussystems nimmt von kranial nach kaudal zu. Die Nephrone stehen nahezu senkrecht zu der Achse des Ductus (Abb. 31). Da dieser gebogen verläuft, verändert sich ihre Stellung im Körper sowie im Organ von einer transversalen in kranialen Abschnitten zu einer mehr diagonalen im kaudalen Bereich. Ruft man sich die Lage der histologischen Schnittebene vor Augen, erklärt sich hierdurch, dass vor allem der Tubulus c im Organ eine weite Ausdehnung besitzt und dadurch in mehreren hundert Schnittbildern repräsentiert ist.

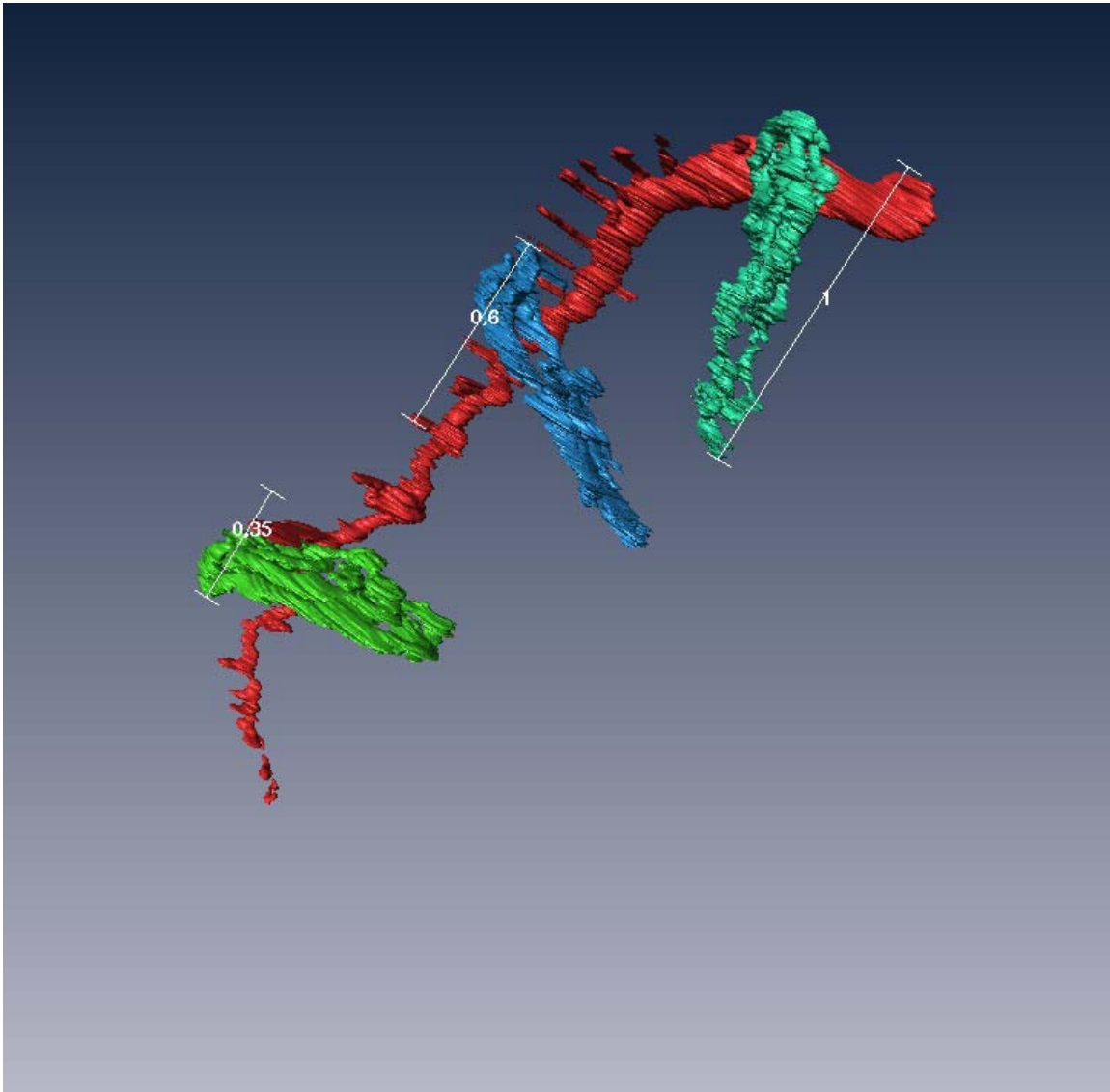


Abbildung 31: Relative räumliche Ausdehnung der drei rekonstruierten Tubuli

Eine Vermessung und Angabe von Größen war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Die Aufnahme eines Längenmaßes zur Referenzierung bei der Digitalisierung der histologischen Schnitte wurde entweder versäumt oder die betreffende Datei war nicht mehr auffindbar. Verlässliche Strukturen beziehungsweise zelluläre Bestandteile wie etwa Erythrozyten zur exakten Bestimmung von Dimensionen konnten nicht herangezogen werden, da in Schnittbildern die Größe eines Objektes stark je nach Ebene und Orientierung des angelegten Schnittes variieren kann. Auf die Angabe von Größen wurde daher verzichtet.

5 Diskussion

5.1 Computergestützte Visualisierung der histologischen Schnittbildserie

Eine große Herausforderung in dieser Arbeit lag darin, dass ein seit Jahren archiviertes Präparat verwendet wurde, das nicht für diesen Zweck vorgesehen war. Außerdem handelt es sich bei dem untersuchten Objekt um ein Organ mit einem hohen Anteil an tubulären Strukturen, das sehr anfällig für geometrische Verschiebungen ist. Methodisch sinnvoll ist bei der Visualisierung insbesondere derartiger histologischer Schnittbildserien die Nutzung von Markersystemen zur Verbesserung und Beschleunigung des Alignments (Stoltenberg et al. 1997). Im vorliegenden Fall wurden externe Marker im histotechnischen Prozess jedoch nicht eingefügt, da die Möglichkeit einer computergestützten Visualisierung zum Zeitpunkt der Anfertigung noch nicht bekannt war. Interne Marker, also präparateigene Strukturen, die sich als sichere Referenzen geeignet hätten, boten der Mesonephros und benachbarte Organe nicht. Überdies sollte in dieser Arbeit überprüft werden, inwieweit eine konventionelle Schnittbildserie für modernste Visualisierungsvorhaben verwendbar sein konnte. Deshalb musste den klassischen Phänomenen bei der Arbeit mit physikalischen Serienschnitten (Streicher et al. 1997) in den allermeisten Fällen durch manuelle Verfahrensweisen und subjektives, ergebnisorientiertes Eingreifen begegnet werden. Das Auftreten von räumlichen Verschiebungen, die vor allem bei der Mikrotomie und dem Streckbad auftreten, kann wie bereits von Streicher beschrieben auch in dieser Arbeit als die größte Schwierigkeit im Arbeitsprozess eingestuft werden. Das Alignment der einzelnen Schnitte ist jedoch die Grundlage für die folgende Segmentierung sowie das abschließende Rendering und Mapping. Zu grobe Fehler hierbei addieren sich von Schnitt zu Schnitt und führen zu ungenauen oder ungültigen Resultaten.

Eine zufriedenstellende Segmentierung ist im Fall der Urniere, und damit auch zumindest für Schnittserien ähnlich strukturierter Organe wie etwa des Metanephros oder des Hodens, mit automatischen Verfahren nicht möglich, da diese nicht in der Lage sind, den zum Teil sehr homogenen oder unübersichtlichen Datensatz ohne menschlichen Verstand mit medizinischem Wissen zu füllen

(Zöckler et al. 2001). Mit den bereitgestellten Tools zum semiautomatischen Labelling in „Amira“ konnten jedoch mit höherem Zeitaufwand und der gebotenen Sorgfalt gute Resultate erzielt werden. Durch Vereinfachung der segmentierten Labels und Verwendung der Interpolations- und Glättungsinstrumente konnte die beim Alignment entstandene Stufenbildung in der Visualisierung reduziert werden. Hierdurch wurden jedoch feinere Strukturen zum Teil nicht mehr in der korrekten räumlichen Beziehung zueinander angezeigt.

Die kommerzielle Software „Amira“ wird in vielen Forschungsbereichen bereits seit langem verwendet. Hierzu gehören die Ingenieurs- und Geowissenschaften ebenso wie medizinische Anwendungen¹. Auch zur Visualisierung anatomisch-histologischer Daten kann sich „Amira“ als ein Programm mit einem hohen Maß an Interaktivität, Benutzerfreundlichkeit und guten technischen Möglichkeiten als sehr hilfreich erweisen. Die Ergebnisse, die die Software liefern kann, werden jedoch maßgeblich durch die Qualität der Ausgangsdaten und die Leistung der Hardware bestimmt. Die Tatsache, dass „Amira“ zum Alignment nur rigide Transformationsmöglichkeiten bietet, begrenzt die Anwendbarkeit auf konventionelle histologische Schnittserien nicht unerheblich.

Als einziger wirklich limitierender Faktor für die Berechnung und Darstellung des Modells (*Rendering* und *Mapping*) kann die Performance der Rechensysteme angesehen werden (Huijsmans et al. 1986). Aus diesem Grund musste in der vorliegenden Arbeit auch die Verwendung der Fakultätsrechner eingestellt werden. Mit zunehmender Datengröße und Komplexität der Visualisierungsansprüche in Bezug auf Darstellung und Beleuchtungsmodelle muss nach Lösungen wie in diesem Fall der Nutzung der Remote-Visualisierung auf Hochleistungsrechnern gesucht werden.

Methodisch sind also zur Optimierung der Rekonstruktionsergebnisse aus histologischen Schnitten zwei Voraussetzungen anzustreben. Zum einen ist bereits beim Anfertigen der Schnitte die Überlegung anzustellen, ob und inwiefern es möglich ist, interne Marker zu nutzen beziehungsweise externe Marker einzufügen, die später als klares Bezugssystem zur geometrischen Reorientierung dienen können. Präparatserien, die derartige Marker enthalten sind dann auch für Methoden des automatischen Alignments besser zugänglich. Inwiefern für die jeweilige Fragestellung andere Techniken wie etwa die Konfokalmikroskopie, die

¹ <http://www.amira.com/images/stories/pdf/web-amira-brochure.pdf> (06.04.10)

keine Ausrichtung der Schnitte nötig macht dafür jedoch die Präparatdicke eingrenzt, einsetzbar sind, muss im Einzelfall entschieden werden. Weitere Ansätze bestehen in dem Verzicht auf die Deparaffinisierung (Jirkovska et al. 2005) oder der Kombination von mikroskopischen und episkopischen Bildern (Knabe et al. 2002, Streicher et al. 1997).

Als weitere Voraussetzung müssen noch leistungsfähigere Algorithmen und Segmentierungstools entwickelt werden, die den Markierungsprozess beschleunigen sowie dessen Qualität verbessern. Als Ideal ist dasjenige Verfahren anzustreben, das ohne menschliches Eingreifen vollkommen automatisch arbeitet und damit objektive, gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Hierzu gibt es bereits einige Ansätze, die meist jedoch auf wenige Spezialfälle zugeschnitten sind. Aufgrund einer Vielzahl von Schwierigkeiten besteht noch ein sehr großer Handlungsbedarf und jedes automatische Verfahren muss sich im Vergleich zu den erzielten Ergebnissen eines sachkundigen Wissenschaftlers messen lassen. Ein routinemäßiger Einzug computergestützter Visualisierungstechniken kann erst stattfinden, wenn die Programme in der Lage sind, sowohl schnell als auch zuverlässig genug zu arbeiten.

So übersteigt der Aufwand zur Herstellung räumlicher Modelle aus histologischen Schnittbildserien diffiziler Präparate wie etwa des Mesonephros mit der Software „Amira“ bei dem momentanen Stand der Technik für die Nutzung in der Lehre noch weit ihren Nutzen. Je weniger Einzelschnitte jedoch eine Serie bilden und je übersichtlicher sich die morphologischen Beziehungen im Präparat präsentieren, desto eher wird es für das Lehrpersonal möglich sein, Lerninhalte entsprechend aufzubereiten.

Für definierte Fragestellungen in Forschung und Wissenschaft konnte mit der beschriebenen Methode jedoch eine praktikable Möglichkeit gezeigt werden, die Volumeninformation histologischer Schnittbildserien zu erschließen. In der vorliegenden Arbeit konnten durch dieses Verfahren beispielsweise neue Ergebnisse zur räumlichen Anordnung der Nephrone gewonnen werden.

Der Nutzen dreidimensionaler Rekonstruktionen steht außer Frage. Das menschliche Gehirn ist in seiner räumlichen Vorstellungskraft eingeschränkt. Mikroskopische Techniken bieten hohe zweidimensionale Auflösungen. Aber erst Computermodelle können die räumliche Anordnung erschließen und neue Zusammenhänge offenbaren. Die Vorteile dieser digitalen Modelle sind vielseitig:

Sie können beliebig versendet, abgespeichert und verglichen werden. Wissenschaftlern und Studierenden ist es möglich, sie an jedem geeigneten PC zu zerlegen und aus frei wählbaren Perspektiven zu betrachten.

5.2 Die Urniere und ihre Strukturen

Zu der Urniere existieren im Vergleich zu anderen Organen und embryonalen Strukturen vergleichsweise wenige Beschreibungen in der Literatur. Dies mag auch daran liegen, dass es sich speziesspezifisch um eine morphologisch unterschiedlich ausgeprägte Struktur handelt, die in der Embryonalzeit nur über einen variabel kurzen Zeitraum angelegt wird. Auch der funktionellen Phase – sofern überhaupt vorhanden – wird von den verschiedenen Autoren unterschiedliche Bedeutung beigemessen (Davies 1952, Grinsted und Aagesen 1984, Tiedemann 1976). Dreidimensionale Untersuchungen existieren kaum, da die technischen Möglichkeiten hierzu noch nicht sehr lange zur Verfügung stehen und das Organ ein schwieriges Untersuchungsobjekt darstellt. Zu der Gefäßversorgung des Organs gibt es recht detaillierte Darstellungen (Carretero et al. 1995, Vollmerhaus et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten die bisherigen Beschreibungen der Urnierenstrukturen weitestgehend bestätigt werden. Um kraniokaudale Veränderungen im Organ deutlich zu machen, wurden drei Tubuli in unterschiedlichen Positionen ausgewählt, deren Verlauf in den Schnittbildern bei einer vorhergehenden Überprüfung keine allzu großen Ausreißer oder Fehler aufwies. Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexität und Ausdehnung der Nephrone von kranial nach kaudal stetig zunehmen. Dies ist schon seit längerem bekannt. Wie bereits von anderen Autoren beschrieben, sind die Nephrone im Gegensatz zur Vorniere nicht mehr segmental sondern segmentübergreifend angeordnet (Fiorino 1992, Fraser 1920). In der Rekonstruktion wird deutlich, dass sie sich am Verlauf des Ductus mesonephricus orientieren zu scheinen und senkrecht zu ihm stehen. Da sich der Wolffsche Gang in seinem Verlauf im Organ krümmt, verändert sich auch die Stellung der Nephrone in Beziehung zur Urniere. Während sie in kranialen Bereichen noch in einer transversalen Ebene zum Organ und dem gesamten Körper liegen, sind sie kaudal eher diagonal angeordnet. Frühere Beschreibungen der Nephronstruktur müssen aufgrund dieser Tatsache hinterfragt wer-

den, da die Autoren bei der Arbeit mit zweidimensionalen Bildern und der Annahme, dass sich die Nephrone weitestgehend parallel zur Schnittebene orientierten, zu falschen Ergebnissen gelangt sein könnten.

So erklärt sich, dass sich in der Urniere trotz der relativ geringen Anzahl von Nephronen ein eng verflochtenes Tubulusgeflecht ergibt. Diese Anzahl wurde im untersuchten Rinderembryo von 35 mm SSL anhand der Zuflüsse in den Wolffschen Gang auf ca. 24 geschätzt und liegt damit deutlich unter den von anderen Autoren zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten genannten Zahlen (Shumkina 1960, Tiedemann 1976). In ihrer räumlichen Ausdehnung sind die drei rekonstruierten Nephrone eher scheibenartig und nicht voluminös rund.

Der Wolffsche Gang ist kranial im ventrolateralen und kaudal im ventromedialen Quadranten des Organs zu finden. Dies widerspricht den Beschreibungen von Altschule (1930) und Tiedemann (1976). Ein ähnlicher Verlauf ist beim Dromedar beschrieben (Aly 2007). Sein Lumen nimmt stetig zu und er verlässt das Organ kaudal. Die Sammelrohre der Nephrone treten erwartungsgemäß von dorsal und lateral an ihn heran (MacCallum 1902). Die Glomerula fügen sich medial in den verfügbaren Raum ein, zum Teil leicht nach ventromedial sowie dorsomedial versetzt. Eine Rekonstruktion dieser feinen kapillären Strukturen war aus den oben genannten Gründen nicht möglich. Deshalb konnte das Vorkommen des beschriebenen Riesenglomerulums nicht gezeigt werden (Bremer 1915, MacCallum 1902).

Die Grundform des Tubulus im Sinne eines mehrfach spiralförmigen Verlaufs (Lewis 1920, MacCallum 1902) und die von Tiedemann (1979) an Schweineembryonen beschriebene Struktur des Nephrons konnten vor allem an der als Tubulus c benannten, kaudalen Rekonstruktion gut nachempfunden werden. Ein Tubulus beginnt medial vom Glomerulum ausgehend am Harnpol und setzt sich in den proximalen, relativ geradlinigen Abschnitt fort. Das Lumen ist geringfügig enger als das der distalen Windungen und zum Teil ampullenartig erweitert. Nach mehreren hufeisenförmigen Windungen legt sich der distale Tubulus dem Glomerulum von lateral in der attachment-Zone an, bevor er in die post-attachment-Abschnitte mit wesentlich stärker gewundenem Verlauf übergeht (Aly 2007). Der Beginn dieser Abschnitte wird durch eine Schleife markiert, die kleiner als die beim Schwein beschriebene ausfällt (Tiedemann 1979). Eine Henle-sche Schleife konnte erwartungsgemäß nicht dargestellt werden (Tiedemann

1985) Die distalen Tubuli colligentes wiederum sind durch ein schmales Lumen und einen weitestgehend ungewundenen Verlauf lateral und ventral unmittelbar unter der Organkapsel gekennzeichnet. Sie münden in den Ductus mesonephricus.

Der präparierte Embryo hatte eine SSL von 35 mm, was einem Alter von ungefähr 40 Tagen p.c. entspricht und müsste daher im Mesonephros der Literatur entsprechend bereits Anzeichen von Degeneration zeigen (Davies und Davies 1950, Rüsse 1998, Shumkina 1960). Hinweise hierauf konnten kranial im Verlauf des Wolffschen Ganges sowie im Verlauf der Tubuli in Form vereinzelter Unterbrechungen gefunden werden. Aufgrund der aufgetretenen Artefakte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Lücken auch künstlich entstanden sein könnten.

6 Schlussfolgerung

Die Verwendung dreidimensionaler Visualisierungen ist im medizinischen Bereich auf dem Vormarsch. Fortschritte ergeben sich hierdurch nicht nur in Forschung und Lehre, sondern beispielsweise auch in der Operationsplanung sowie in der Kommunikation mit dem Patienten. In Anbetracht der Vielzahl der bildgebenden Verfahren und der Unterschiede in Qualität und Charakter der Bilddaten bestehen jedoch noch große Unterschiede. Während MRT, CT und auch Ultraschall oft schon routinemäßig mit Hard- und Software zur 3D-Rekonstruktion betrieben werden, existieren diese Techniken für die Lichtmikroskopie, die aufgrund ihrer hohen Auflösung für viele Fragestellungen immer noch unentbehrlich ist, kaum. Der Bedarf an Lösungen zur Erstellung dreidimensionaler Modelle in diesem Bereich ist groß. Die gängigen Verfahrenstechniken zur 3D-Visualisierung sind wie in der in dieser Arbeit verwendeten Software „Amira“ vorhanden und erprobt, erwiesen sich für die routinemäßige Anwendung im Umgang mit histologischen Schnittbildserien aber als nur bedingt geeignet. Es bedarf weiterhin großer Anstrengungen in der Entwicklung intelligenter Berechnungsalgorithmen sowie automatischer Instrumente zum Alignment und zur Segmentierung, um den manuellen Nachbearbeitungsaufwand deutlich zu reduzieren. Diese Algorithmen müssen an die speziellen Anforderungen beim Arbeiten mit histologischen Bilddaten angepasst und lernfähig sein, um valide Ergebnisse erzielen zu können. Die Performance der Hardware kann nicht als limitierend angesehen werden, da schon heute sehr leistungsfähige Systeme zur Verfügung stehen und ständig Weiterentwicklungen stattfinden. Ob zukünftige Softwarepakete in der Lage sein werden, Schnittbildserien komplexer Strukturen vollautomatisch zu verarbeiten und zu visualisieren ist im Augenblick noch nicht abzusehen und bedarf noch einer langjährigen Entwicklungsarbeit. Nur dann wird die computer-gestützte Visualisierung mikroskopischer Schnittbilder jedoch nicht nur für gezielte wissenschaftliche Fragestellungen verwendet werden können sondern auch als Routineverfahren einsetzbar sein.

7 Zusammenfassung

Der rechte Mesonephros, sein Ductus mesonephricus sowie drei Tubuli eines bovinen Embryo mit 35 mm SSL wurden aus 902 histologischen Einzelbildern am Computer rekonstruiert. Zur Verwendung kam die kommerzielle Software „Amira“. Die Arbeit wurde über einen Remote-Zugang auf den Rechenystemen des Leibniz-Rechenzentrums in Garching bei München durchgeführt. Die Schwierigkeiten und Grenzen der computergestützten Visualisierung aus konventionellen Schnittbildserien konnten gezeigt werden. Das Vorgehen mit physikalischen Schnitten brachte vor allem Probleme beim Ausrichten der Schnitte sowie beim Zuordnen von Bildpunkten zu Strukturen mit sich. Bei der bearbeiteten histologischen Serie handelte es sich um archivierte Bilder. Diese waren zum Zeitpunkt ihrer Herstellung nicht zum Zwecke der Bearbeitung an einem PC bestimmt und daher nicht mit Markersystemen zur besseren Reorientierung ausgestattet. Konventionelle Schnittbildserien komplizierter Strukturen können also als Ausgangsdaten zur digitalen Weiterverarbeitung als nicht optimal bezeichnet werden. Im Ergebnis konnten jedoch mit größtenteils zeitaufwendigen, händischen Verfahren dank der sehr guten Hardware-Performance befriedigende Ergebnisse erzielt werden.

Diese bestätigten größtenteils die bisherigen Beschreibungen des Mesonephros. Hinweise auf einen kraniokaudalen Gradienten in der Entwicklung und Degeneration konnte ebenso gezeigt werden wie grundsätzliche morphologische Beziehungen. Ein Nephron besteht aus dem medial gelegenen Glomerulum, dem gestreckten proximalen Tubulus und einem stark gewundenen, distalen Tubulus mit attachment-Zone in direkter Nachbarschaft zum Glomerulum. Ein unmittelbar unter der Organkapsel verlaufender, kollektiver Abschnitt mündet schließlich in den Wolffschen Gang. Die Stellung der Nephrone ist segmentübergreifend und nahezu senkrecht zum Verlauf des Wolffschen Gangs.

Der mit der Visualisierung der Schnittbildserie verbundene hohe Zeitaufwand sowie die Notwendigkeit ständiger manueller Kontrolle zeigt deutlich, dass bis zum routinemäßigen Einsatz dreidimensionaler Techniken im lichtmikroskopischen Forschungsbereich noch großer Handlungsbedarf besteht. 3D-Modelle sind in der Lage, Wissenschaftlern neue Einblicke und Zugänge zu gewähren

sowie Studierenden den Lernstoff auf anschauliche Art und Weise zu vermitteln. Der Aufwand zu ihrer Herstellung muss jedoch in einem sinnvollen Verhältnis zu ihrem Nutzen stehen.

8 Summary

Computer-based 3D visualisation of histological serial sections using the example of the bovine mesonephros

A mesonephros, its Wolffian duct and three of its tubuli of a bovine embryo measuring 35 mm CRL have been reconstructed out of 902 histological slices on a computer platform using the commercial visualisation software “Amira”. Main work has been done using a remote-access to the systems of the Leibniz-Rechenzentrum in Garching near Munich. Difficulties and limits of computer-based visualisation of conventional serial slices could be shown. Proceeding with physical sections lead to problems in alignment and labelling. The series used was an archived one that hasn't been prepared for modern digital techniques and so has not been provided with any marker-systems. Thus, conventional serial thin sections of complicated structures are not optimal for creating visualisations. However, satisfying results could be achieved by the use of time-consuming manual work and thanks to the excellent hardware performance.

These results mostly confirmed former descriptions of the mesonephros. There were signs that development and degeneration proceed in a craniocaudal direction. One nephron consists of the glomerulum situated medially, a straight proximal tubule and a highly contorted distal tubule with the attachment-zone next to the glomerulum. The collecting tubule runs directly subcapsular and empties into the Wolffian duct. The position of the nephrons reaches across multiple segments and is nearly perpendicular to the Wolffian duct.

The time needed for operations and the need of permanent manual interactions clearly shows the necessity of progress in three-dimensional visualisation of light microscopical data to make it easy and fast enough for routine use. 3D-models are able to provide new insights to scientists and a more interactive way of learning for students. But efforts in achieving them must remain in reasonable relation to their value.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der Oberflächendarstellung mittels Flat-, Gouraud- und Phong-Shading; aus http://www.glossar.de/glossar/z_shading.htm	11
Abbildung 2: Prinzip von Surface- und Volume-Rendering; aus Heine 2004	12
Abbildung 3: Benutzeroberfläche in „Amira“; links: Objekt-Pool und Konsolen-Fenster; rechts: Grafik-Fenster	21
Abbildung 4: Darstellung der inneren Organe in Voxel-Man; aus http://voxel-man.de	24
Abbildung 5: Anatomie eines Hundes im "Visible Animal Project"	25
Abbildung 6: Bildung der Urnierenkanälchen.	29
Abbildung 7: Ausdehnung der Urniere des Rindes (rot) zu verschiedenen Trächtigkeitsstadien; aus Rüsse 1998	31
Abbildung 8: Zeiträume mesonephraler Funktion und Degeneration, Tage post coitum; modifiziert nach Grinsted und Aagesen 1984	37
Abbildung 10: Skizzen eines S-förmigen sowie eines Doppelspiral-förmigen Tubulus; aus Lewis 1920.....	44
Abbildung 11: Segmente im Tubulusverlauf des Schweine-Mesonephros, aus Lewis 1920	45
Abbildung 12: Elektronenmikroskopischer Querschnitt eines linken Mesonephros des Schweines; aus Tiedemann und Zaar 1983	46
Abbildung 14: Benutzeroberfläche des Remote-Desktops in gvs1	52
Abbildung 15: putty-Oberfläche in gvs1.....	53
Abbildung 16: tvnc-Zugangsfenster	54
Abbildung 17: Umwandlung der Farbinformation der HE-Färbung in Graustufen	55
Abbildung 18: Auswahl und Beschneiden der ROI in „Amira“	56
Abbildung 19: Transparente Darstellung zweier Schnitte übereinander im AlignSlices-Modul vor und nach dem Prozess des Alignments.....	57
Abbildung 21: Benutzeroberfläche im Segmentierungseditor während der Markierung des Wolffschen Ganges	60
Abbildung 22: Anzeige der sogenannten label fields im Segmentierungseditor .	60

Abbildung 23: Transparente Darstellung des Mesonephros und seiner inneren Strukturen.....	66
Abbildung 24: Rendering der Oberflächen des Wolffschen Ganges und der drei segmentierten Tubuli ohne und mit Glättungsalgorithmus	67
Abbildung 25: Rekonstruktion, virtueller Schnitt und histologischer Schnitt in einer Grafik kombiniert dargestellt.....	68
Abbildung 26: SurfaceView; Transparente Visualisierung aller segmentierter Strukturen.....	69
Abbildung 27: SurfaceView; Modell der äußeren Organkontur und des Ductus mesonephricus	70
Abbildung 28: Modell des Ductus mesonephricus: Ansicht von dorsomedial zur besseren Sicht auf die Tubuluseinmündungen	71
Abbildung 29: Visualisierung des Ductus mesonephricus und der drei Tubuli ...	72
Abbildung 30: Rekonstruktion des Tubulus c; Ansicht von medial	73
Abbildung 31: Relative räumliche Ausdehnung der drei rekonstruierten Tubuli .	74

10 Literaturverzeichnis

Alexander DP, Nixon DA, Widdas WF, Wohlzogen FX (1958)

Renal function in the sheep foetus.

J Physiol; **140**: 14-22.

Altschule MD (1930)

The changes in the mesonephric tubules of human embryos ten to twelve weeks old.

Anat Rec; **46**: 81-91.

Aly KH (2007)

Development of the mesonephros in camel (*Camelus dromedarius*).

Anat Histol Embryol; **36**: 58-61.

Ameil M, Delattre JF, Cordobes B, Flament JB (1984)

Computerized reconstruction of an anatomical structure based on digitized sections. Preliminary study.

Anat Clin; **5**: 261-4.

Andreasen A, Drewes AM, Assentoft JE, Larsen NE, Nielsen H, Holm IE, et al. (1991)

Computer-assisted three-dimensional reconstruction of the hippocampal region based on serial sections.

J Neurosci Methods; **37**: 151-60.

Arnold WH, Lang T (2001)

Development of the membranous labyrinth of human embryos and fetuses using computer aided 3D-reconstruction.

Ann Anat; **183**: 61-6.

Baba N, Kanaya K (1988)

Three-dimensional reconstruction from serial section images by computer graphics.

Scanning Microsc Suppl; **2**: 303-14.

Beller M, Stotzka R, Gemmeke H (2004)

Merkmalsgesteuerte Segmentierung in der medizinischen Mustererkennung.

Bildverarbeitung für die Medizin: 184-8.

Born G (1884)

Die Plattenmodelliermethode.

Z Wiss Mikrosk Tech; **1**: 278-80.

Böttcher P (2000)

The Visible Animal Project - Virtuelle Realität in der Veterinäranatomie [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bremer JL (1915)

The mesonephric corpuscles of the sheep, cow and deer.

The Anatomical Record; **10**.

Bremer JL (1916)

The interrelations of the mesonephros, kidney and placenta in different classes of animals.

Am J Anat; **19**: 179-210.

Buehr M, Gu S, McLaren A (1993)

Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse.

Development; **117**: 273-81.

Burston WR, Thurley K (1957)

A technique for the orientation of serial histological sections.

J Anat; **91**: 409-12.

Byskov AG, Lintern-Moore S (1973)

Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii.
J Anat; **116**: 207-17.

Caon M (2004)

Voxel-based computational models of real human anatomy: a review.
Radiat Environ Biophys; **42**: 229-35.

Carretero A, Ditrich H, Perez-Aparicio FJ, Splechtna H, Ruberte J (1995)

Development and degeneration of the arterial system in the mesonephros and metanephros of chicken embryos.
Anat Rec; **243**: 120-8.

Che L-s, Herman GT, Reynolds R, Udupa J (1985)

Surface Shading in the Cyberille Environment.
IEEE Computer Graphics and Applications; **5**: 33-43.

Chen YC, Chen YC, Chiang AS, Hsieh KS (2007)

A reliable surface reconstruction system in biomedicine.
Comput Methods Programs Biomed; **86**: 141-52.

Davies J (1950)

The pronephros and the early development of the mesonephros in the duck.
J Anat; **84**: 95-103.

Davies J, Davies DV (1950)

The development of the mesonephros of the sheep.
Proc Zool Soc Lond; **120**: 73-93.

Davies J (1952)

Correlated anatomical and histochemical studies on the mesonephros and placenta of the sheep.
Am J Anat; **91**: 263-99.

Davies J, Routh JI (1957)

Composition of the foetal fluids of the rabbit.

J Embryol Exp Morphol; **5**: 32-9.

De Martino C, Zamboni L (1966)

A morphologic study of the mesonephros of the human embryo.

J Ultrastruct Res; **16**: 399-427.

Dohrmann M, Weichert F, Uebing A, Geis P, Landes C, Meller K, et al. (2004)

Registrierung und 3D-Rekonstruktion histologischer Schnitte als Grundlage eines operativen Behandlungskonzeptes bei Lippen-, Kiefer-Gaumenspalten.

Proceedings of Bildverarbeitung für die Medizin: 424-8.

Felix W (1911)

Die Entwicklung der Harn- und Geschlechtsorgane.

In: Keibel F, Mall F. Handbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen.

Leipzig: Hirzel. p. 732-955.

Fiala JC (2005)

Reconstruct: a free editor for serial section microscopy.

J Microsc; **218**: 52-61.

Fiorino P (1992)

Exkretions- und Osmoregulationsorgane.

In: Fiorino P, editor. Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere.

Berlin: Springer. p. 281-3.

Fischel A (1929)

Lehrbuch der Entwicklung des Menschen. Wien/Berlin: Springer.

Fleck E, Oswald H, Wegner S, Wust P (1997)

Segmentierung mit der Wasserscheidentransformation.

Spektrum der Wissenschaft: 113.

Fraser EA (1920)

The pronephros and early development of the mesonephros in the cat.

J Anat (Lond); **54**: 287-304.

Friebová-Zemanová Z (1981)

Formation of the chick mesonephros. 4. Course and architecture of the developing nephrons.

Anat Embryol (Berl); **161**: 341-54.

Friebová-Zemanová Z, Goncharevskaya OA (1982)

Formation of the Chick Mesonephros 5. Spatial Distribution of the Nephron Populations.

Anat Embryol; **165**: 125-39.

Fujimura A, Nozaka Y (2002)

Analysis of the three-dimensional lymphatic architecture of the periodontal tissue using a new 3D reconstruction method.

Microsc Res Tech; **56**: 60-5.

Funnell WR (1984)

On the calculation of surface areas of objects reconstructed from serial sections.

J Neurosci Methods; **11**: 205-10.

Glassner AS (1989)

An Introduction to Ray Tracing. San Francisco, CA: Morgan Kaufmann.

Gouraud H (1971)

Continuous Shading of Curved Surfaces.

IEEE Transactions on Computers; **6**: 623-9.

Grinsted J, Aagesen L (1984)

Mesonephric excretory function related to its influence on differentiation of fetal gonads.

Anat Rec; **210**: 551-6.

Haas A, Fischer MS (1997)

Three-dimensional reconstruction of histological sections using modern product-design software.

Anat Rec; **249**: 510-6.

Hege H-C (2003)

Creation and Visualization of Anatomical Models with Amira.

Proc of 3D Modelling 2003; Paris; 2003. p. 7.

Hege H-C (2004)

Aktuelle Anwendungen der Wissenschaftlichen Visualisierung.

Heine CN (2004)

Dreidimensionale Darstellung der Hirnnerven V-VIII mittels virtueller Zisternoskopie [Dissertation]. Berlin: Charité Berlin.

Hildebrand M, Goslow GE (2003)

Exkretionssystem und Osmoregulation.

In: Hildebrand M, Goslow GE. Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere. Berlin: Springer. p. 305ff.

Huijsmans DP, Lamers WH, Los JA, Strackee J (1986)

Toward computerized morphometric facilities: a review of 58 software packages for computer-aided three-dimensional reconstruction, quantification, and picture generation from parallel serial sections.

Anat Rec; **216**: 449-70.

Jendrysiak U (1997)

Segmentierung von Schnittbildern.

Spektrum der Wissenschaft.

Jenett A, Schindelin JE, Heisenberg M (2006)

The Virtual Insect Brain protocol: creating and comparing standardized neuroanatomy.

BMC Bioinformatics; **7**: 544.

Jirkovska M, Naprstkova I, Janacek J, Kucera T, Macasek J, Karen P, et al. (2005)

Three-dimensional reconstructions from non-deparaffinized tissue sections.

Anat Embryol (Berl); **210**: 163-73.

Johnson CL, Underwood RA, Holbrook KA (1989)

Embedding prolene for the development of fiducial markers.

Anat Rec; **223**: 104-7.

Kahn N, Hektor J, Grebe R (1996)

Dreidimensionale Rekonstruktion von Organen aus histologischen Serienschnitten.

Bildverarbeitung für die Medizin; Trier: Institut für Physiologie RWTH Aachen; 1996.

Karen P, Jirkovska M, Tomori Z, Demjenova E, Janacek J, Kubinova L (2003)

Three-dimensional computer reconstruction of large tissue volumes based on composing series of high-resolution confocal images by GlueMRC and LinkMRC software.

Microsc Res Tech; **62**: 415-22.

Kaufman H (1992)

The atlas of Mouse development. London Academic Press.

Kaufmann A (1991)

Volume visualisation. Los Alamitos, CA.

Knabe W, Washausen S, Brunnett G, Kuhn HJ (2002)

Use of "reference series" to realign histological serial sections for three-dimensional reconstructions of the positions of cellular events in the developing brain.

J Neurosci Methods; **121**: 169-80.

Kölliker A (1879)

Entwicklungsgeschichte des Menschen.

2 ed. Leipzig: Engelmann.

Krause WJ, Cutts JH, Leeson CR (1979)

Morphological observations on the mesonephros in the postnatal opossum, *Didelphis virginiana*.

J Anat; **129**: 377-97.

Krevert B (2005)

Registration of Medical Images.

Kriete A, Magdowski G (1990)

Computerized three-dimensional reconstructions of serial sections in electron microscopy.

Ultramicroscopy; **32**: 48-54.

Lange T, Lamecker H, Seebaß M (2003)

Ein Softwarepaket für die modellbasierte Segmentierung anatomischer Strukturen. Berlin: Robert-Rössle-Klinik, Charité Zuse Institut Berlin (ZIB).

Laurent M, Johannin G, Guyader HL, Fleury A (1992)

Confocal scanning optical microscopy and three-dimensional imaging.

Biol Cell; **76**: 113-24.

Leeson TS, Baxter JS (1957)

The correlation of structure and function in the mesonephros and metanephros of the rabbit.

J Anat; **91**: 383-90.

Leeson TS (1960)

Electron microscopy of the developing kidney: an investigation into the fine structure of the mesonephros and metanephros of the rabbit.

J Anat; **94**: 100-6.

Lewis FT (1920)

The course of the Wolffian tubules in mammalian embryos.

Am J Anat; **26**: 423-35.

Lorensen WE, Cline HE (1987)

Marching Cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm.

Comp Graphics; **21**: 163-9.

Ludwig KS, Landmann L (2005)

Early development of the human mesonephros.

Anat Embryol (Berl); **209**: 439-47.

MacCallum JB (1902)

Notes on the Wolffian Body of higher mammals.

Am J Anat; **1**: 245-59.

Magras IN, Alifakiotis T, Pampoukidou A (1997)

The developmental relation among mesonephros, gonad and external genitalia in the fetus of goat (*Capra prisca*).

Anat Histol Embryol; **26**: 195-7.

Manconi F, Markham R, Cox G, Kable E, Fraser IS (2001)

Computer-generated, three-dimensional reconstruction of histological parallel serial sections displaying microvascular and glandular structures in human endometrium.

Micron; **32**: 449-53.

Medvinsky A, Dzierzak E (1996)

Definitive hematopoiesis autonomously initiated by the AGM region.

Cell; **86**: 897-906.

Mihalkovics GV (1885)

Untersuchungen über die Entwicklung des Harn- und Geschlechtsapparates der Amnioten.

Internat Monatschr f Anat u Physiol; **2**: 76-9.

Moritz KM, Wintour EM (1999)

Functional development of the meso- and metanephros.

Pediatr Nephrol; **13**: 171-8.

Phong BT (1975)

Illumination for Computer Generated Pictures.

Communications of the ACM; **18**: 311-7.

Prothero JS, Prothero JW (1986)

Three-dimensional reconstruction from serial sections. IV. The reassembly problem.

Comput Biomed Res; **19**: 361-73.

Rüsse I (1998)

Urnieren.

In: Rüsse I, Sinowatz F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 2 ed. Berlin: Parey. p. 305-7.

Sainio K, Raatikainen-Ahokas A (1999)

Mesonephric kidney - a stem cell factory?

Int J Dev Biol; **43**: 435-9.

Sakas G (1997)

Dreidimensionale Bildrekonstruktion aus Ultraschall-Daten.

Spektrum der Wissenschaft; **6**: 103.

Scarborough J, Aiton JF, McLachlan JC, Smart SD, Whiten SC (1997)

The study of early human embryos using interactive 3-dimensional computer reconstructions.

J Anat; **191**: 117-22.

Shumkina OB (1960)

Development of the mesonephros in sheep and cow embryos.

Proc Acad Sci USSR, Biol Sci; **127**: 618-22.

Smith C, Mackay S (1991)

Morphological development and fate of the mouse mesonephros.

J Anat; **174**: 171-84.

Stalling D, Westerhoff M, Hege H-C (2005)

Amira: A highly interactive system for visual data analysis.

In: Hansen CD, Johnson CR. The Visualization Handbook: Elsevier. p. 749-67.

Stanier MW (1960)

The function of the mammalian mesonephros.

J Physiol; **151**: 472-8.

Sticklat RM (2009)

Entwicklung von Mesonephros und Nachniere beim Rind [Dissertation].
München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Stoltenberg M, Andreasen A, Jensen KB, Juhl S, Danscher G, Ernst E (1997)

PC-assisted three-dimensional description of organs containing tubular structures, applied on the epididymis of the rat.

Comput Med Imaging Graph; **21**: 323-9.

Streicher J, Weninger WJ, Muller GB (1997)

External marker-based automatic congruencing: a new method of 3D reconstruction from serial sections.

Anat Rec; **248**: 583-602.

Tiede U, Schiemann T, Höhne KH (1998)

High Quality Rendering of Attributed Volume Data. Research Triangle Park, North Carolina, United States: IEEE Computer Society Press Los Alamitos, CA, USA; 1998. p. 255-62.

Tiedemann K (1976)

The mesonephros of cat and sheep. Comparative morphological and histochemical studies.

Adv Anat Embryol Cell Biol; **52**: 3-119.

Tiedemann K (1979)

Architecture of the mesonephric nephron in pig and rabbit.

Anat Embryol (Berl); **157**: 105-12.

Tiedemann K, Zaar K (1983)

The pig mesonephros. II. The proximal tubule: SEM, TEM and freeze-fracture images.

Anat Embryol (Berl); **168**: 241-52.

Tiedemann K (1985)

The pig mesonephros. III. Distal tubule, collecting tubule, and Wolffian duct: SEM- and TEM-studies.

Anat Embryol (Berl); **172**: 123-32.

Tiedemann K, Welling LW, Basto P (1987)

Structural and functional comparison of mesonephric and metanephric proximal tubules.

Pediatr Nephrol; **1**: 297-305.

Tingelhoff K, Moral AI, Kunkel ME, Rilk M, Wagner I, Eichhorn KG, et al. (2007)

Comparison between manual and semi-automatic segmentation of nasal cavity and paranasal sinuses from CT images.

Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc; **2007**: 5505-8.

Upadhyay S, Zamboni L (1982)

Preliminary observations on the role of the mesonephros in the development of the adrenal cortex.

Anat Rec; **202**: 105-11.

Vazquez MD, Bouchet P, Foliguet B, Gerard H, Mallet JL, Leheup B (1998a)

Differentiated aspect of female and male mouse mesonephroi.

Int J Dev Biol; **42**: 621-4.

Vazquez MD, Bouchet P, Mallet JL, Foliguet B, Gerard H, LeHeup B (1998b)

3D reconstruction of the mouse's mesonephros.

Anat Histol Embryol; **27**: 283-7.

Vollmerhaus B, Reese S, Roos H (2004)

Die Blutgefäße der Urniere (Mesonephros) des Hausrindes (*Bos taurus*), eine korrosionsanatomische Untersuchung.

Anat Histol Embryol; **33**: 200-7.

Wang Z, Zeng F, Li H, Ye Z, Bai Y, Xia W, et al. (2007)

Three-dimensional reconstruction on PC-Windows platform for evaluation of living donor nephrectomy.

Comput Methods Programs Biomed; **86**: 39-44.

Wartenberg H (1985)

Origin of gonadal blastemal cells in mammalian gonadogenesis.

Arch Anat Microsc Morphol Exp; **74**: 60-3.

Waterston D (1913)

Reconstruction in Modelling Clay: A Rapid Method of Plastic Reconstruction from Serial Sections.

J Anat Physiol; **48**: 19-23.

Weiler F, Dettmann J (1996)

Bildsegmentierung mit modellbasierten, aktiven Konturmodellen. Aachen: RWTH Aachen.

Weinert P (2007)

Computergestützte Visualisierung eines human-embryonalen Gehirns [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Weninger WJ, Meng S, Streicher J, Muller GB (1998)

A new episcopic method for rapid 3-D reconstruction: applications in anatomy and embryology.

Anat Embryol (Berl); **197**: 341-8.

Wintour EM, Butkus A, Earnest L, Pompolo S (1996)

The erythropoietin gene is expressed strongly in the mammalian mesonephric kidney.

Blood; **88**: 3349-53.

Wirtz S, Fischer B, Modesitzki J, Schmitt O (2004)

Vollständige Rekonstruktion eines Rattenhirns aus hochaufgelösten Bildern von histologischen Serienschnitten.

Bildverarbeitung für die Medizin: 204 - 8.

Wrobel KH (2001)

Morphogenesis of the bovine rete testis: extratesticular rete, mesonephros and establishment of the definitive urogenital junction.

Anat Embryol; **203**: 293-307.

Zamboni L, Bezard J, Mauleon P (1979)

The role of the mesonephros in the development of the fetal sheep ovary.

Ann Biol Anim Biochem Biophys; **19**: 1153-78.

Zamboni L, Upadhyay S (1981)

Ephemeral, rudimentary glomerular structures in the mesonephros of the mouse.

Anat Rec; **201**: 641-4.

Zamboni L, Upadhyay S (1982)

The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis.

Am J Anat; **165**: 339-56.

Ziegler GM (2005)

Neue Bilder für die Medizin.

DMV-Mitteilungen; **13**: 163 - 7.

Zietzschmann O, Krölling O (1955)

Die Entwicklung des Harn-Geschlechtsapparates.

In: Zietzschmann O, Krölling O. Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere. Berlin und Hamburg: Parey. p. 374-95.

Zöckler M, Rein K, Brandt R, Stalling D, Hege H-C. Creating Virtual Insect Brains with Amira. Zuse-Institut Berlin; 2001.

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Reese für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Hilfestellung in technischen ebenso wie in thematischen Fragen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Tieranatomie möchte ich für das entgegengebrachte Verständnis und die Unterstützung danken, insbesondere auch für die Möglichkeit, den Rechnerplatz an den Fakultätsrechnern zu nutzen. Herrn Dr. Satzger vom LRZ danke ich für den technischen Support bei der Arbeit mit der Remote-Visualisierung.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar, dass sie mich auf dem Weg zu meinem Traumberuf immer unterstützt haben.

Bei meinen Arbeitgebern und Kolleginnen möchte ich mich für das Entgegenkommen während der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gilt schließlich meiner Frau, die mir in allen Stresssituationen uneingeschränkten Rückhalt bietet und bei Motivationsproblemen immer ein kluges Wort findet.