

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung

Computerunterstützte und automatische Analyse von
Transmissions-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der
Leber

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Markus Urbani
aus Lippstadt
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. M. Kleen
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Diebold Priv. Doz. Dr. med. M. Bilzer
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. Maria Athelougou
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Geschichtliche Entwicklungen in der Licht- und Elektronenmikroskopie und Grundbegriffe.....	5
1.2. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Tiermodell.....	12
2.2. Operatives Prozedere und Bilderzeugung.....	12
2.2.1. Operationsvorbereitung und Anästhesie	12
2.2.2. Kontrollgruppe.....	14
2.2.3. Ischämiegruppe.....	14
2.2.4. Spendertiere	15
2.2.5. Transplantationsgruppe	15
2.2.6. Gewinnung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.....	16
2.2.7. Erzeugung der digitalisierten Bilddaten.....	17
2.2.8. Verwendete Hard- und Software	20
2.3. Beschreibung der Inhalte der verwendeten transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen	20
2.3.1. In den TEM-Aufnahmen erkennbare Strukturen.....	21
2.3.2. Läppchenarchitektur der Leber.....	23
2.3.3. Zeichen der Gewebe- und Zellschädigung.....	24
2.4. Beschreibung von Cellenger®	27
2.4.1. Einführung.....	27
2.4.2. Bildobjektdomäne.....	29
2.4.3. Klassendomäne.....	31
2.4.4. Algorith mendomäne	32
2.4.5. Prozessdomäne	36
2.5. Durchführung der Bildanalyse	37
2.5.1. Erstellung des semiautomatischen Regelsatzes.....	37
2.5.2. Segmentierung der Bilder (semiautomatische Bildanalyse)	38
2.5.3. Klassifikation (semiautomatische Analyse).....	40
2.5.4. Automatische Erkennung von Mitochondrien.....	45
2.5.5. Berechnungen mittels Cellenger und Export der Daten.....	48
2.5.6. Statistische Auswertung	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Computerunterstützte Bildanalyse des Sinusoids.....	49
3.1.1. Regelrechtes Endothel.....	51
3.1.2. Geschädigtes Endothel.....	53
3.1.3. Abgelöstes Endothel	56
3.1.4. Gesamt-Endothel	58
3.1.5. Lumeninhalte	61
3.1.6. Freies Lumen	63
3.1.7. Fehlende Endothelbedeckung.....	66
3.1.8. Gesamt-Sinusoid.....	68
3.2. Automatische Bildanalyse der Hepatozyten	70

3.2.1. Automatische Erkennung von Mitochondrien.....	70
4. Diskussion.....	72
4.1. Diskussion des Ischämie-/Reperfusionsschadens (IRS).....	72
4.1.1. Leberzell-Schäden	72
4.1.2. Schäden außerhalb der Leberzellen	74
4.2. Diskussion prinzipieller Schwierigkeiten bei der computerunterstützten oder automatischen Bildanalyse	75
4.2.1. Bildkontrast bei TEM-Aufnahmen	76
4.2.2. Bildtextur und Bildrauschen in TEM-Aufnahmen	81
4.2.3. Bildobjektform und Pixelraster in digitalisierten TEM-Aufnahmen	82
4.2.4. Bildhomogenität der verwendeten TEM-Aufnahmen	84
4.2.5. Merkmalsraum.....	85
4.2.6. Visuelle Signalverarbeitung beim Menschen.....	88
4.3. Diskussion der Ergebnisse der computerunterstützten Bildanalyse.....	92
4.3.1. Regelrechtes Endothel.....	92
4.3.2. Geschädigtes Endothel.....	93
4.3.3. Abgelöstes Endothel	93
4.3.4. Gesamt-Endothel	94
4.3.5. Lumeninhalte	94
4.3.6. Freies Lumen	95
4.3.7. Fehlende Endothelbedeckung.....	98
4.3.8. Gesamt-Sinusoid.....	98
4.3.9. Vergleich mit den Ergebnissen einer visuellen Auswertung.....	101
4.4. Diskussion der automatischen Bildanalyse.....	106
4.5. Andere Bildanalyse-Systeme in der Medizin.....	107
4.5.1. MetaMorph [®] (Universal Imaging Corporation [™] , Downingtown, PA, USA)	108
4.5.2. analySIS [®] (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland)	109
4.5.3. TissueAnalytics [™] (TissueInformatics Incorporation [®] , Pittsburgh, Pennsylvania, USA).....	110
4.5.4. BioApplications (Cellomics Incorporation [™] , Pittsburgh, Pennsylvania, USA)..	110
4.5.5. DiffMaster [™] (CellaVision, Lund, Schweden).....	110
4.5.6. Bildanalyse-System der Firma Morphoscope Software GbR, Aachen, Deutschland	111
4.6. Stereologische Methoden der quantitativen Bildanalyse in der TEM.....	111
4.6.1. Bestimmung der Anzahl von Strukturen.....	112
4.6.2. Volumenmessungen.....	113
4.6.3. Oberflächen	115
5. Zusammenfassung	116
6. Abkürzungsverzeichnis.....	118
7. Literaturverzeichnis	120
8. Danksagung.....	129
9. Lebenslauf.....	130

1. Einleitung

1.1. Geschichtliche Entwicklungen in der Licht- und Elektronenmikroskopie und Grundbegriffe

Anfang des 17. Jahrhunderts fand die Verwendung von Mikroskopen Eingang in die Naturwissenschaften. In den darauffolgenden vier Jahrhunderten führte diese technische Neuerung zur Entstehung und beständigen Weiterentwicklung von wissenschaftlichen Disziplinen wie Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie oder Bakteriologie. Unsere Vorstellungen vom Aufbau lebendiger Organismen und dem Entstehen von Krankheiten wurden revolutioniert.

Konvexe Linsen (Sammellinsen) waren schon im Altertum bekannt. Die Verwendung gläserner „Lesesteine“ zur Vergrößerung einer Schrift erwähnte *Ibn al Haitham*, lat. *Alhazen* (etwa 962-1035 unserer Zeitrechnung) (zitiert nach: Ruska E, 1979). Brillen mit konvexen Gläsern kamen nach 1285 in Europa in Gebrauch. Mit Hilfe von Lupen hergestellte Zeichnungen finden sich in dem Buch „*Theatrum insectorum sive minimorum animalium*“ des Engländers *Thomas Moufet* (1553-1604) (zitiert nach: Ruska E, 1979).

Zunehmend besserten sich die technischen Voraussetzungen für die Erforschung der Morphologie. Die zunächst praktizierte Arbeit mit ungefärbten Präparaten stieß schnell an ihre Grenzen. Mit einfachen Lichtmikroskopen sind so nur wenige Details zu erkennen. Erst die Entwicklung einer Vielzahl von Färbeverfahren für die unterschiedlichsten Fragestellungen brachte einen weiteren Durchbruch.

Eine Zusammenarbeit mit anderen wissenschaftlichen Disziplinen wie der Physiologie führte dann zu einem Verständnis der **Funktion** von Geweben und Organen. Funktionsstörungen

wurden erklärbar. Dem Holländers *Antoni van Leeuwenhoek* (1632-1723) dürfte die Funktion der Mikroorganismen, die er im Zahnbelag gefunden hatte, noch weitgehend unverständlich gewesen sein. Der Italiener *Marcello Malpighi* (1628-1694) jedoch leistete schon früh einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der nach ihm benannten Nierenkörperchen (Ruska E, 1979). Diese bilden den Primärharn und messen im Mittel beim Erwachsenen circa 170 Mikrometer (Leonhardt H, 1985).

Ein weiteres Beispiel für das sich entwickelnde, funktionelle Verständnis von Beobachtungen sind Parasiten: 1840 noch konnte *Henle* sich die Entstehung der Eingeweidewürmer nicht erklären. Er forderte, dass der Beweis für die parasitäre Natur einer Krankheit folgende Bedingungen erfüllen müsse: Das Agens müsse konstant in den kontagiösen Materialien gefunden werden. Es müsse weiterhin auch außerhalb eines befallenen Körpers isoliert und beobachtet werden können. 1876 konnte *Robert Koch* nach Vorarbeiten von Pollender und Davaine die Ätiologie des Milzbrandes klären. (Brandis H, Pulverer G, 1988). Es gelang ihm damit, die von *Henle* aufgestellten Forderungen für den Beweis der bakteriellen Natur einer Krankheit zu führen.

Die meisten Bakterien messen in der Länge zwischen 0,5 und 20 Mikrometern (Brandis H, Pulverer G, 1988, S. 15) und können mit dem freien Auge nicht mehr aufgelöst, das heißt, gesehen werden. Das **Auflösungsvermögen** des menschlichen Auges liegt im Bereich von 100 Mikrometern (Leonhardt H, 1985, S. 6). Die (bei weitem) größte menschliche Zelle, die Eizelle, kann mit einem Durchmesser von bis zu 140 Mikrometern mit freiem Auge unter günstigen Umständen gerade erkannt werden. Mit Lichtmikroskopen werden Auflösungen in der Größenordnung von 100 Nanometern (= 0,1 Mikrometer) erreicht. Die Bakterien liegen also im Auflösungsbereich des Lichtmikroskops. Viren messen zwischen 20 und 800 Nanometern (Brandis H, Pulverer G, 1988, S. 585). Sehr große Viren, etwa aus der Familie der Poxviridae, können mit Lichtmikroskopen eben noch erkannt werden. In der Praxis aber benötigt man ein Elektronenmikroskop zum visuellen Nachweis von Viren.

Die optische Auflösung bezeichnet den kleinsten Abstand, den zwei Punkte haben dürfen, um noch getrennt wahrgenommen zu werden. Die Vergrößerung hingegen ist der Abbildungsmaßstab und stellt das Verhältnis aus Bildgröße zur Gegenstandsgröße dar (Kamke D, Walcher W, 1994). Eine Erhöhung des Abbildungsmaßstabs ohne Erhöhung der Auflösung ist wertlos, da das Bild zwar größer wird, aber nicht mehr Details unterschieden werden können. Es werden dann lediglich die einzelnen, unterscheidbaren Punkte des Bildes größer, ihre Anzahl jedoch bleibt konstant (Welsch U, 1994).

Die den Lichtmikroskopen zugrunde liegenden physikalischen Prinzipien verhindern, dass zwei Punkte als getrennt gesehen werden, wenn ihr Abstand kleiner ist als etwa ein Drittel der Wellenlänge des sichtbaren Lichts (Ruska E, 1979, S. 11). Diese beträgt 380 bis 780 Nanometer (Kamke D, Walcher W, 1994, S. 490). Das heißt, um die Auflösung zu erhöhen, musste eine Strahlung gefunden werden, die zwar eine kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht hat, aber andererseits mit Materie in Wechselwirkung tritt. Röntgenstrahlung wird beim Durchtritt durch Materie kaum abgelenkt. Die 1895 erstmals von *Röntgen* beschriebenen Elektronenstrahlen besitzen jedoch die geforderten Eigenschaften. *Ruska* und *v. Borries* bauten 1931 das erste Elektronenmikroskop (Junqueira LC, Carneiro J, 1991).

In der **Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)** wird ein Präparat statt mit Licht mit Elektronenstrahlen „durchleuchtet“. Diese haben eine Wellenlänge von circa 4 Pikometern (= 0,004 Nanometer) bei 100 Kiloelektronenvolt (keV). Die kinetische Energie der Elektronen wird in keV angegeben. Eine Zunahme der Energie der Elektronen bedeutet eine Abnahme der Wellenlänge des Elektronenstrahls und damit eine Erhöhung der erzielbaren Auflösung. Die Wellenlängen können so klein gewählt werden, dass man bereits in atomare Dimensionen hineinsehen könnte, aus folgendem technischen Grund liegt die Auflösungsgrenze jedoch nur bei circa 0,5 Nanometer: Die numerische Apertur, die für Elektronenmikroskope bei etwa 0,01 liegt, verhindert dies. Die **numerische Apertur** (siehe Abbildung (Abb.) 1 unten) ist das Produkt aus Brechzahl eines Objektivs und dem Sinus des Winkels vom Objektpunkt (welcher betrachtet werden soll) und dem Objektivrand einerseits, und der Senkrechten vom Objektpunkt auf das Objektiv andererseits. Die numerische Apertur ist ein Maß für den Licht- (beziehungsweise (bzw.) Elektronen-)strom, der durch ein Objektiv fallen kann. Je höher der Licht- (bzw. Elektronen-)strom, desto mehr Wellen (von mehr Objektpunkten) fallen auf das Auge des Betrachters. Es werden also mehr Bildpunkte gesehen, das heißt, die Auflösung ist größer (Kamke D, Walcher W, 1994, S. 499).

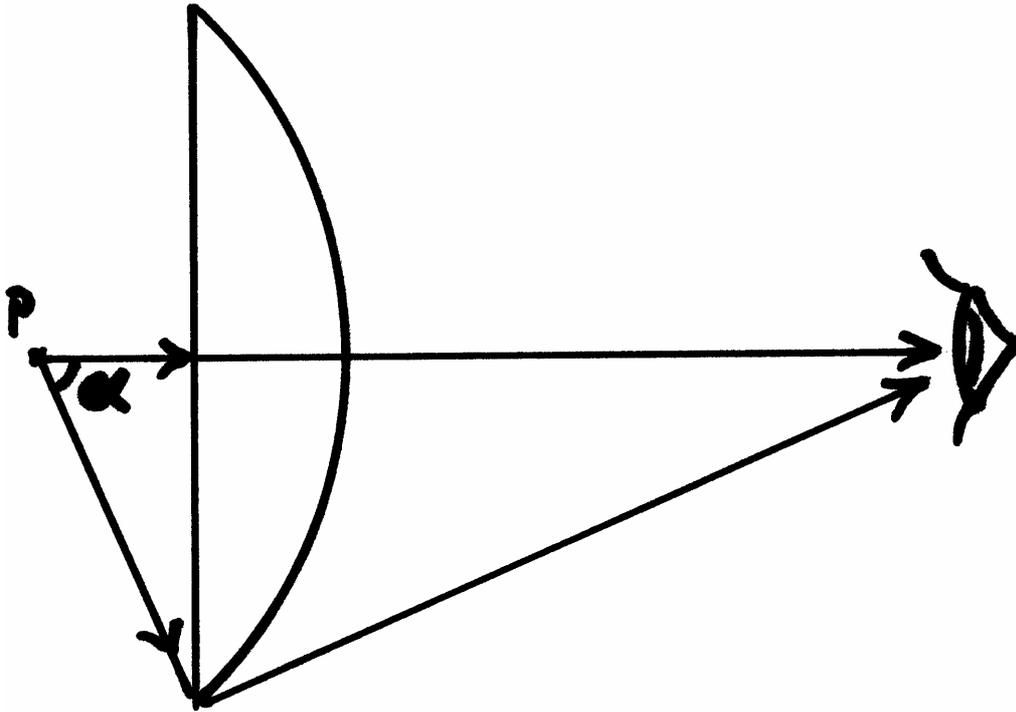


Abbildung 1: Numerische Apertur (Schema). Links der Objektpunkt P. Die Senkrechte zur Linse und der Lichtstrahl zum Objektivrand schließen den Winkel α ein. Je mehr sich α dem 90° -Winkel nähert, desto mehr Lichtquanten ausgehend vom Objektpunkt P treffen auf das Auge rechts im Bild (aus: Kamke, Walcher: Physik für Mediziner, 1994).

Die um nahezu 1000fach höhere Auflösung der Elektronenmikroskope im Vergleich zu Lichtmikroskopen führte zu einer sprunghaften Zunahme der Kenntnisse in allen „Lebenswissenschaften“. Beginnend mit den ersten serienmäßig gebauten Elektronenmikroskopen 1939 (Ruska E, 1979), fand zunächst allerdings die TEM in den vierziger Jahren noch eine zögerliche Verbreitung. Erst in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts fanden Elektronenmikroskope eine weitere Verbreitung. Sie schafften die Möglichkeit, detailliert in das Innere von Zellen zu blicken. So konnte beispielsweise die lichtmikroskopisch lange bekannte basale Basophilie vom azinösen Endstück des exogenen Pankreas entschlüsselt werden. Sie entspricht elektronenmikroskopisch dem rauen endoplasmatischen Retikulum (RER).

Nach der Entdeckung der Zellorganellen wurden umfangreiche Studien durchgeführt, diese zu quantifizieren. Insbesondere in den 60er Jahren wurde hierzu auch Lebergewebe untersucht. Eine dreidimensionale Rekonstruktion von Serienschnitten erlaubte beispielsweise eine genaue Modellvorstellung von der Form und Verteilung von Mitochondrien zu entwickeln. **Stereologie (quantitative Morphometrie)** (siehe Kapitel 4.6. Stereologische Methoden der

quantitativen Bildanalyse in der TEM, Seite 111) im engeren Sinne bedeutet, aus zweidimensionalen Schnittbildern auf die räumliche Dimension zu schließen. Eine Vorgehensweise benutzt Gitterraster, die auf fotografische Abzüge von TEM-Aufnahmen gelegt werden. Die Schnittpunkte des Rasters mit Membranen von interessierenden Strukturen im Bild werden gezählt. Die ermittelte Punktzahl dient als Grundlage zur Berechnung beispielsweise von Volumina von Zellorganellen (Steer MW, 1984). Voraussetzung hierfür ist die Auswertung einer großen Anzahl zufällig ausgewählter Bilder.

So wurden in einer Studie von Loud (1968) die Zellvolumina von Hepatozyten der Rattenleber bestimmt, ebenso das durchschnittliche Mitochondrienvolumen und die Mitochondrienanzahl pro Zelle. Die relativen Oberflächen des RER, der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran wurden berechnet. Verwendung fanden hierzu 3 verschiedene Vergrößerungsstufen in lichtmikroskopischen Aufnahmen (1:1000), sowie in TEM-Aufnahmen (1:12500 und 1:50000). 45 Gewebelöckchen wurden untersucht (5 Löckchen von je 3 verschiedenen Leberläppchen von 3 Ratten).

1969 wurden von Weibel und Mitarbeiter (et al.) die Ergebnisse von Loud in einer ähnlichen Studie bestätigt, lediglich die Berechnungen der Oberfläche des RER waren in der Arbeit von Loud um ein Drittel niedriger als in der Arbeit von Weibel.

Nach Erforschung von gesundem Gewebe konnten auch pathologische Veränderungen quantifiziert werden. So wurde in einer Studie von Stäubli et al. (1969) die Auswirkungen von Phenobarbitursäure auf die Struktur der Leber untersucht. Es fand sich ein dramatischer Anstieg von Volumen und Oberfläche des glatten endoplasmatischen Retikulums nach 5 Tagen Applikation von Phenobarbitursäure.

Solche quantitativen, stereologischen Verfahren sind in der Auswertung ausgesprochen zeitaufwändig. Automatisierung in der **Bildakquisition** ist heute zwar weit verbreitet. Elektronisch gesteuerte Mikroskope mit integrierten Digital- oder Videokameras erlauben es, sehr große Datenmengen zu erzeugen. Es fehlen hingegen Möglichkeiten, diese automatisch oder halbautomatisch auszuwerten. Nur in Einzelfällen können heute computerunterstützt etwa speziell angefärbte Zellen mit den Methoden der Bildanalyse gezählt werden (Grobe M, et al., 2003).

In der TEM sind bislang keine automatischen Bildanalyseverfahren bekannt geworden. Eine **semi-/ bzw. vollautomatische Objekterkennung**, möglichst gekoppelt mit einer dreidimensionalen (3-D) Rekonstruktion, würde hier eine erhebliche Verbesserung in der Erforschung der von Geweben, Zellen, Zellorganellen und Mikroorganismen bedeuten. Sie

erbrächte eine beträchtliche **Zeitersparnis** während der Untersuchung. Es könnten dann sehr große Datenmenge untersucht werden. Auch geringe Abweichungen von einer Norm könnten so erkannt werden. Es ist durch eine solche technische Neuerung also eine weitere, bedeutende Zunahme wissenschaftlicher Erkenntnisse zu erwarten.

1.2. Fragestellung

Von der Firma Definiens AG, München, wurde in den letzten 3 Jahren ein allgemeines Bildanalyzesystem entwickelt (Cellenger®, im weiteren Text bezeichnet als: Cellenger). Das zugrunde liegende Prinzip wird bereits seit Mitte 2000 erfolgreich in der Analyse von Satellitenaufnahmen verwendet (eCognition®, im Weiteren: eCognition). Es beruht auf dem Ansatz, Wissen modellhaft abzubilden (siehe Kapitel 2.4. Beschreibung von Cellenger®, Seite 27). Mittels einer graphischen Benutzeroberfläche kann auch von „Nichtprogrammierern“ eine Anwendung entwickelt werden (**Regelsatz**), welche in der Lage ist, ein bestimmtes Bildanalyseproblem zu lösen.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode gefunden werden, schnell und soweit möglich automatisch mit Hilfe der Software Cellenger TEM-Aufnahmen der Leber auszuwerten.

Hierzu konnte auf Bildmaterial des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München zurückgegriffen werden. Es handelte sich um Aufnahmen von Rattenlebern aus drei Gruppen von Tieren: Eine Kontrollgruppe (im Folgenden: Kontrolle), eine Gruppe, deren Tiere einer Leberischämie unterzogen worden waren (im Folgenden: Ischämie) und eine dritte Gruppe orthotop lebertransplantierte Tiere (im Folgenden: Transplantation). In der Ischämiegruppe kam es zu einer partiellen Unterbrechung der Leberdurchblutung in situ für einen Zeitraum von 60 Minuten bei Körpertemperatur, während in der Transplantationsgruppe die Organe einer sogenannten kalten Ischämie ausgesetzt waren. In dieser Studie waren insgesamt 750 elektronenmikroskopische Aufnahmen visuell ausgewertet worden. Es war die Fragestellung untersucht worden, durch welche quantifizierbaren Schadensparameter die drei Gruppen sich unterscheiden lassen (Leiderer R, unveröffentlichte Daten) (siehe Kapitel 4.3.9. Vergleich mit den Ergebnissen einer visuellen Auswertung, Seite 101).

In vorliegender Arbeit wurde das **Sinusoid** der TEM-Aufnahmen **computerunterstützt** untersucht. Das Sinusoid wurde markiert, mittels der o.g. Software auf einheitliche Weise automatisch segmentiert, manuell klassifiziert, sowie statistisch ausgewertet. Es wurden jeweils 50 Bilder in jeder Gruppe ausgewertet.

Es wurden weiterhin die Bildbereiche der **Hepatozyten** untersucht. Es wurde ein Regelsatz entwickelt, der **vollautomatisch** die **Mitochondrien** erkennen sollte.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich die Sinusoide der drei Bildgruppen Kontrolle, Ischämie und Transplantation in der mit Hilfe von Cellenger vorgenommenen, computerunterstützten Bildanalyse signifikant?
2. Sind die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Ergebnissen oben genannter, visueller Untersuchung?
3. Erlauben die computerunterstützt berechneten Merkmale eine sinnvolle und reproduzierbare Beschreibung der drei Bildgruppen?
4. Sind Mitochondrien automatisch erkennbar? Dies würde beispielhaft beweisen, dass komplexe Bildstrukturen mit Hilfe von Cellenger beschrieben werden können.

2. Material und Methoden

Für die Herstellung der verwendeten TEM-Aufnahmen wurden in den Jahren 1998 bis 2001 die nötigen Tierversuche von Operateuren des Instituts für Chirurgische Forschung (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer) der LMU München durchgeführt. Die Zustimmung erteilte die Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-30/98 und AZ 211-2531-25/99).

2.1. Tiermodell

Insgesamt wurde Lebergewebe von 20 männlichen Lewis-Ratten verwendet. Davon dienten fünf Tiere als Kontrolle und fünf wurden einer warmen Ischämie unterzogen. Fünf Tiere wurden orthotop lebertransplantiert. Fünf Tiere dienten als Leberspender. Das Körpergewicht der Tiere betrug 200 bis 300 g. Alle Tiere kamen aus der Versuchstierzucht Charles River, Sulzfeld, Deutschland.

Die Versuchstiere wurden in Käfigen bei 12-stündigem Hell-, Dunkelzyklus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Raumtemperatur lag reguliert bei 21°C, die Luftfeuchtigkeit bei 60 ± 5 %. Das Futter der Tiere (Ssniff rat diet, ssniff Spezialdiäten, Soest) enthielt folgende Inhaltsstoffe: 19% Rohprotein, 0,3% Methionin, 1,0% Lysin, 3,0% Rohfett, 5,2% Rohfaser, 6,7% Rohasche, 1,1% Calcium, 0,8% Phosphor, 0,25% Natrium und 0,2% Magnesium. An Zusatzstoffen pro kg Futter waren enthalten: 18000 I.E. Vitamin A, 1280 I.E. Vitamin D3 und 120 mg Vitamin E.

2.2. Operatives Prozedere und Bilderzeugung

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Bei der Kontrolle wurde lediglich eine Laparotomie durchgeführt. Bei den Tieren der Ischämiegruppe wurden 70% der Leber für einen Zeitraum von 60 Minuten von der Durchblutung abgeschnitten (warme Ischämie). Daran schloss sich eine 120minütige Reperfusionphase an. Den Tieren der dritten Gruppe wurden die Lebern der Spendertiere orthotop syngen (das heißt, zwischen Tieren desselben Inzuchtstammes) transplantiert. Zwischen Explantation und Implantation wurden die Organe 24 Stunden bei 4°C gelagert (kalte Ischämie).

2.2.1. Operationsvorbereitung und Anästhesie

Während einer präoperativen, 12-stündigen Nahrungskarenz hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser. Als Prämedikation erhielten sie Atropinsulfat (0,2 mg/kg KG s.c.) zur Reduktion einer narkosebedingten, bronchialen Hypersekretion und zur Prophylaxe eines Laryngospasmus. In einem gläsernen Äthertopf (Äther für Narkose, Firma Hoechst, Frankfurt) wurden die Tiere unter ständiger Kontrolle ihrer Vitalfunktionen (Atmungsmuster, Bewegungsverhalten) narkotisiert. Nach Rasur des Fells an Bauch und Hals folgte die alkoholische Desinfektion. Die Operation wurde unter sauberen, jedoch nicht aseptischen Bedingungen und unter Verwendung eines Operationsmikroskops (M650, Firma Wild, Heerbrugg, Schweiz) durchgeführt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Operationsplatte mit integriertem Heizteil (Firma Effenberger, München) gelagert. Extremitäten und Schwanz wurden mit Klebepflaster und Haltemagneten fixiert. Zur kontinuierlichen Messung der Körperkerntemperatur wurde rektal ein Thermometer eingeführt. So konnte die Körpertemperatur während der Operation konstant zwischen 36,5°C und 37,5°C gehalten werden.

Die Narkose wurde im offenen System unter Verwendung einer Atemmaske durchgeführt. Diese war mit einer äthergetränkten Kompresse bestückt und dem Kopf des Versuchstieres vorgelagert. Um bei Narkosezwischenfällen eine rasche arterielle Sauerstoffaufsättigung erzielen zu können, lag auf dem Präparationstablett eine Sauerstoffleitung bereit, um bei Bedarf die Atemluft mit reinem Sauerstoff anreichern zu können.

Zum kontinuierlichen intraoperativen Monitoring des mittleren arteriellen Druckes und der Herzfrequenz, sowie zur Entnahme von arteriellen Blutgasproben wurde in die linke Arteria carotis communis ein Polyethylenverweilkatheter (PE 50, Außen-/Innendurchmesser 0,96/0,58 mm, Firma Portex, Hythe, England) platziert. Ein weiterer Katheter (PE 50) diente der kontinuierlichen Registrierung des zentralvenösen Druckes sowie zur Applikation von Pharmaka. Er wurde über die rechte Vena jugularis interna in die Vena cava superior vorgeschoben. Die perioperative Infusionstherapie richtete sich nach dem jeweiligem Blutverlust und Blutdruck. Dabei kam sterile Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Firma Baxter, Unterschleißheim) und Human-Albumin Infusionslösung 5% (Centeon Pharma GmbH, Marburg) zur Anwendung. Anhand von Blutgaswerten konnte der Säure-Basen-Haushalt der Tiere kontrolliert und gegebenenfalls durch die Gabe von NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4%, Firma Delta-Pharm, Pfullingen) korrigiert werden. Beide Katheter wurden durch kontinuierliche Infusion von Vollelektrolytlösung (Tutofusin) mit jeweils 2 ml/h offengehalten. Diese Infusion diente auch zur Substitution des laparatomiebedingten Volumenverlustes.

2.2.2. Kontrollgruppe

Nach transversaler Laparotomie wurde das Abdomen mit Hilfe zweier Haken offen gehalten. Die Haltebänder der Leber wurden gelöst, die Leber mit Folie abgedeckt, um Austrocknung zu vermeiden. Der Darm wurde nach Mobilisierung nach links ausgelagert und ebenfalls vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurden die Tiere für drei Stunden in Narkose gehalten. Dies entspricht der Dauer der Ischämie und Reperfusion in der Ischämiegruppe (eine Stunde Ischämie gefolgt von zwei Stunden Reperfusion). Danach wurde Gewebe entnommen und der Versuch beendet.

2.2.3. Ischämiegruppe

Es wurde ebenso wie bei der Kontrollgruppe transversal die Bauchwand eröffnet und die Leber mobilisiert. Der Darm wurde ausgelagert und abgedeckt. Der Ductus choledochus wurde zur Messung der Galleproduktion kanüliert (Polyethylenkatheter PE 50, Außen-/Innendurchmesser 0,80/0,40 mm, Fa. Portex, England). Der rechte Leberlappen wurde mit Folie abgedeckt. Die Präparation der zum linken und medianen Leberlappen führenden Arterien- und Pfortaderäste entsprach der Technik nach Kawano et al. (1989). Allerdings wurde durch die Ischämie in lediglich zwei Leberlappen (70% der Leberdurchblutung) eine portale Hypertension mit Kongestion im mesenterialen Strombett und nachfolgender systemischer Hypotension vermieden (Meer et al. 1971). Die freipräparierten Gefäße wurden durch mikrovaskuläre Gefäßclips nach Biemer (Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland) reversibel okkludiert.

Die Ischämiezeit betrug 60 Minuten. Danach schloss sich eine 120minütige Reperusionsphase an, gefolgt von Gewebeentnahmen und Versuchsende.

2.2.4. Spendertiere

Die Tiere wurden quer laparotomiert und das Abdomen mittels zweier Haken offen gehalten. Nach Mobilisation der Leber wurde diese mit Folie zum Schutz vor Austrocknung bedeckt. Auslagerung des Darmpakets und Abdeckung. Kanülierung des Ductus choledochus zur Messung der Galleproduktion. Verbleib des Katheters während der 24stündigen Konservierung und der Implantation bis zum Versuchsende.

Abgangsnahe Ligatur und Durchtrennung der Arteria gastroduodenalis, danach Präparation des Truncus coeliacus bis zum Ursprung aus der Aorta. Präparation von Pfortader, sowie von Aorta und Vena cava. Systemische Heparinisierung (200 I.E. über die V. jugularis interna). Retrograde Kanülierung der infrarenalen Aorta mittels einer Teflon-Kanüle 18 G (Durchmesser 1,3/0,9 mm, Firma Abbott, Wiesbaden). Abklemmen der Aorta abdominalis proximal des Truncus coeliacus und breite Inzision der infrahepatischen Vena cava auf Höhe der linken Nierenvene. Beginn der retrograden aortalen Perfusion der abdominalen Organe mit 10ml 4°C kalter University-of-Wisconsin-Lösung (UW) (Firma Du Pont Pharma, Bad Homburg) mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 120 ml/h. Zugleich Oberflächenkühlung der Leber mit 4°C kalter Ringerlaktatlösung. Nach Abschluss der Perfusion und Entbluten des Spenders in tiefer Narkose Beginn der Explantation der Leber. Durchtrennung der suprahepatischen Vena cava inferior am Zwerchfelleintritt, der infrahepatischen Vena cava inferior an der Einmündung der linken Nierenvene und Absetzen der Pfortader am Zufluss der Vena mesenterica inferior. Exzision des Truncus coeliacus.

Unmittelbar nach der Hepatektomie wurde die Leber gewogen und in eine Schale mit kalter UW-Lösung eingelegt und die für die spätere Anastomosierung der Gefäße notwendige Präparation vorgenommen. Nach Abschluss der Kaltpräparation wurde die Leber in einer mit 50 ml frischer UW-Lösung gefüllten Schale gelagert und in einem Kühlschrank bei konstant 4°C über 24 Stunden, d.h. bis unmittelbar vor Ausspülung und Implantation aufbewahrt.

2.2.5. Transplantationsgruppe

Die Laparotomie und Mobilisierung der Leber wurde auf gleiche Weise wie bei den Spendertieren durchgeführt. Der Ductus choledochus wurde hilusnah durchtrennt. Ligatur der

Arteria hepatica propria. Präparation der Pfortader im Leberhilus. Präparation der infra- und suprahepatischen Vena cava inferior. Vorbereitung der Spenderleber durch Ausspülen der kaliumreichen UW-Lösung mit 10 ml raumtemperierter Ringer-Spüllösung (Delta Pharma/Boehringer Ingelheim, Pfullingen), Spüldruck 10 cm H₂O über der Pfortader. Nach Abklemmen der supra- und infrahepatischen Vena cava inferior sowie der Pfortader Hepatektomie der empfängereigenen Leber mit Erhalt möglichst langer Gefäßstümpfe zur Erleichterung der Anastomosierung. Entfernung der Narkosemaske und Übergang zu spontaner Sauerstoffatmung, da während der anhepatischen Phase der Äther nicht metabolisiert wird. Vorsetzen der bereitliegenden Sauerstoffleitung vor den Kopf des Versuchstieres (2-4 Liter Sauerstoff/Minute). Naht der suprahepatischen Vena-cava-Anastomose. Anastomosierung von Pfortader und der infrahepatischen Vena cava inferior. Arterielle Anastomose. Nach Lösen der Klemme an der suprahepatischen Vena cava inferior Reperfusion des Transplantates durch simultane Freigabe des portalvenösen und arteriellen Blutstromes. Zuletzt Eröffnen der Klemme an der infrahepatischen Vena cava inferior. Während der anhepatischen Phase kommt es zu einer Volumenverschiebung ins Interstitium. Zur rascheren Stabilisierung des Kreislaufes nach Reperfusion kurz nach Eröffnen der Klemmen wurden deshalb intravenös appliziert: 1-2 ml Vollelektrolytlösung (Tutofusin) und 1-2 ml Humanalbuminlösung 5%. Zusätzlich wurde nach arterieller Blutgasanalyse durch bilanzierte Gabe von Natriumbicarbonat eine metabolische Azidose ausgeglichen. Eine solche entwickelte sich typischerweise während der Abklemmphase mit ausgeprägter systemischer Hypotonie mit arteriellen Drücken von 30-40 mmHg. Nach einer 120minütigen Reperfusionphase wurden Gewebeproben entnommen und die Versuche beendet.

2.2.6. Gewinnung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Je fünf Tiere der drei Gruppen Kontrolle, Ischaemie und Transplantation wurden untersucht. Pro Tier wurden fünf Gewebelöckchen entnommen. Insgesamt wurden also 75 Blöckchen hergestellt.

Am Versuchsende wurde hierzu über die Aorta abdominalis das Lebergewebe zunächst mit NaCl-Lösung (Natriumchlorid-Lösung) gespült und anschließend mit 30 ml Karnovskylösung (15 ml Glutaraldehyd 25%, 6 ml Paraformaldehyd 7%, 9 ml Sörensen-Puffer)

perfusionsfixiert. Die Vena cava inferior wurde zur Volumenentlastung inzidiert. Um Perfusionsartefakte zu vermeiden, wurde die Karnovsky-Pufferlösung über einen Perfusor kontrolliert mit Druckwerten von unter 70 mm Hg infundiert (Frenzel, 1976).

Aus den hilusnahen Bereichen des linken Leberlappens wurden pro Tier fünf circa 1 x 1 x 3 mm große Gewebeproben entnommen. Nach Osmierung und Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe folgte die Einbettung in Epoxidharz (Araldit®). Nach Aushärtung über 24 Stunden bei 60°C wurden 70-Nanometer-Ultradünnschnitte (Ultracut, Reichert-Jung/Leica, München) angefertigt. Nach Kontrastierung der Schnitte mit Bleicitrat und Uranylacetat konnte die elektronenmikroskopische Untersuchung bei 80 kV (EM 900, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt werden. Es wurde eine 3000fache Vergrößerung gewählt.

Aus jedem Blöcken wurde jeder zehnte Gewebeschnitt in die Untersuchung einbezogen. Von jedem dieser Schnitte wurden vom Leuchtschirm des Elektronenmikroskops mit der im Mikroskop integrierten Kamera drei bis vier Sinusoide abfotografiert. Einschlusskriterium hierfür war, dass das Sinusoid soweit möglich vollständig abgebildet war, zusammen mit Teilen der angrenzenden Hepatozyten (Agfa® Scientia Planfilm, 4 x 5, Agfa® Refinal Entwickler). Insgesamt entstanden so 750 fotografische Aufnahmen. Es wurde Fotopapier der Härte 2 verwendet. Hierbei wurde beim Abzug der Bilder vom Negativ eine Vergrößerung um den Faktor zwei erzielt. Es ergab sich somit eine Endvergrößerung von 1:6000.

Für die vorliegende Arbeit konnten circa 120 Aufnahmen pro Gruppe zur Verfügung gestellt werden. Aus denjenigen TEM-Aufnahmen, deren Sinusoid gänzlich im Bild lag, das heißt, von einem Hepatozytensaum vollständig umschlossen war, wurden je 50 Bilder pro Gruppe zufällig ausgewählt.

2.2.7. Erzeugung der digitalisierten Bilddaten

Je 50 fotografische Abzüge der TEM-Bilder der drei Gruppen wurden mit einem „Epson GT 10000“-Scanner digitalisiert. Dabei wurde mit 800 dpi (dots per inch) räumlicher Auflösung und 24 Bit Farbtiefe (zu Bit siehe Kapitel 2.4.3. Klassendomäne, Seite 31) gearbeitet. Die Bilder wurden im Tif-Format (Tagged Image File Format) gespeichert. Dabei wurde eine Reduktion der Auflösung auf 1200 x 1300 Bildpunkte vorgenommen, um die Verarbeitung der Bilder mit einem handelsüblichen Laptop-Computer zu ermöglichen. Dies war nötig

geworden, da die digitalisierten Daten etwa 30 Megabyte (MB) pro Bild umfassten. Zwischenschritte der Bildverarbeitung in Cellenger benötigten aber im Arbeitsspeicher ein Vielfaches dieses Speicherplatzes. Zur Kompression der Bilder wurden diese mit Hilfe der Software Paint Shop Pro™ (Jasc Software®, Eden Prairie, Minnesota, USA) bikubisch auf 25% der Originalgröße **verkleinert**. (siehe Abb. 2 unten).

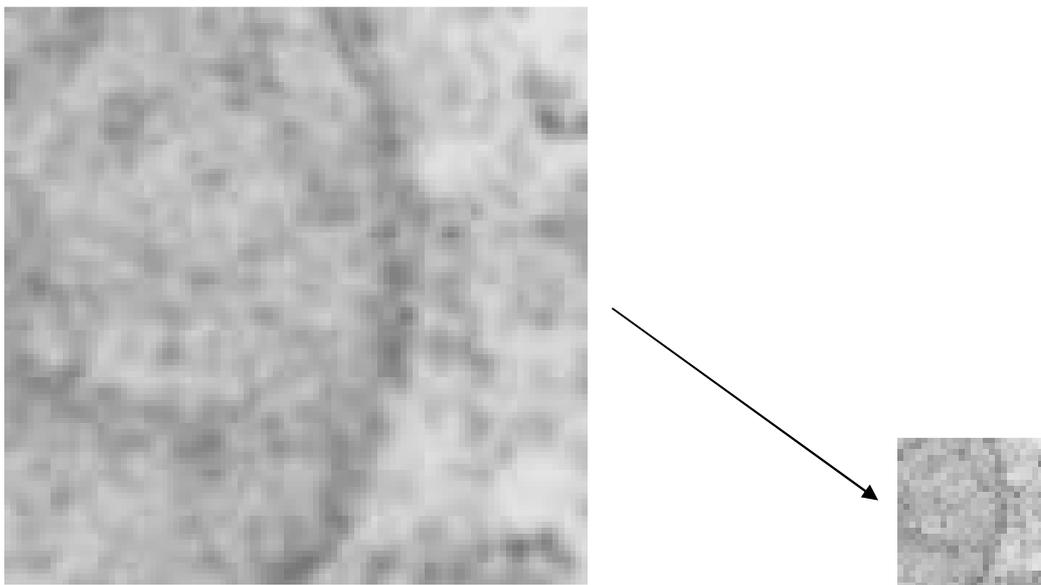


Abbildung 2: Mitochondrium (Ausschnitt). Durch die bikubische Bildverkleinerung auf 25% wird ein Quadrat mit 100 Bildpunkten Kantenlänge (links) in ein Quadrat mit 25 Bildpunkten Kantenlänge (rechts) überführt. Der Grauwert-Mittelwert der beiden Quadrate hat sich praktisch nicht verändert. Er betrug in diesem Beispiel links 181,8 und rechts 181,3 (auf einer Skala von 0 bis 255).

Als Dateiformat wurde wiederum das Tif-Format gewählt, aber jetzt mit **8 Bit** Farbtiefe. Das heißt, es existierten 256 Grauwerte. Die resultierenden Dateien erforderten nur noch eine Speichergröße von circa 1 MB pro Bild. Durch die Reduktion auf 8 Bit Farbtiefe geht für das Auge kaum Information verloren. Das menschliche Auge ist nur fähig, etwa 20 Grautöne zu unterscheiden (Kauffmann GW, Moser E, Sauer R, 2001). Zur Erläuterung der Auswirkung der Kompression auf einzelne Bildstrukturen siehe unten stehende Abbildungen.

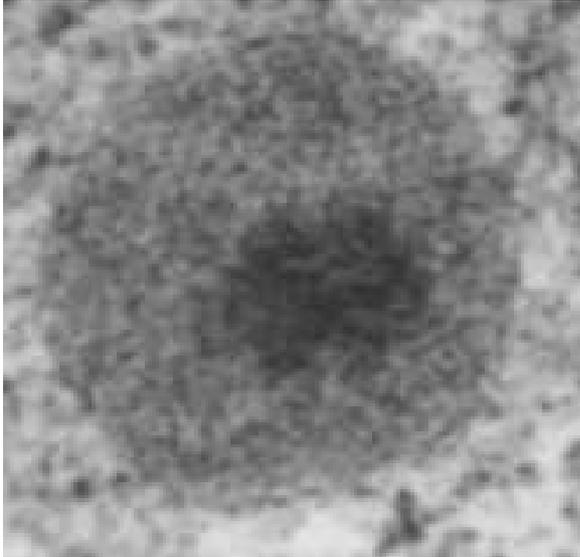


Abbildung 3: Peroxisom. Unkomprimierte Aufnahme.

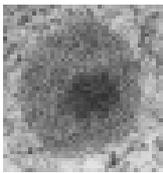


Abbildung 4: Gleicher Bildausschnitt wie oben. Komprimierte Aufnahme. Das Peroxisom hat an Kontrast zur Umgebung verloren, ist aber noch klar vom Zytoplasma zu unterscheiden.



Abbildung 5: Gleicher Bildausschnitt wie oben. Komprimierte Aufnahme. Nach Segmentierung des Bildes (zu Segmentierung siehe Kapitel 2.4.4. Algorithmendomäne, Seite 32) mit Cellenger. Die rote Linie umschließt ein Bildobjekt (zu Bildobjekt siehe Kapitel 2.4. Beschreibung von Cellenger, Seite 27), welches dem Peroxisom nahezu fehlerfrei entspricht. Die Kompression der Bilder hat zwar zu Informationsverlusten geführt, aber die Segmentierbarkeit der Bilder ist noch gegeben.

Nachfolgend wurden die Bilder mit einem Histogramm-Werkzeug, welches Cellenger zur Verfügung stellt, analysiert. Dieses „Tool“ erlaubt es, die Verteilung der Grauwerte der Pixel (zu Pixel siehe Kapitel Bildobjektdomäne, Seite 29) eines Bildes darzustellen. Auf der Abszisse werden dabei alle 256 Grauwerte ($8 \text{ Bit} = 2^8 = 256$) gegen die Häufigkeit der Pixel (Ordinate) aufgetragen. Auf einer Skala, die von 0 bis 255 reicht, entspricht hierbei der

Wert: 0 der Farbe tiefstes Schwarz und 255 der Farbe reines Weiß. Dazwischen liegen 254 Grauwerte.

In den verwendeten TEM-Aufnahmen war die Grauwert-Verteilung in grober Näherung glockenförmig. Allerdings war die Basis der Glockenkurve von sehr unterschiedlicher Breite. In manchen Bildern hatten die hellsten Bildbereiche (der weiße Bildrand) Grauwerte von 240, in anderen 220. Die schwarzen Bildbereiche verhielten sich analog. Dieses weist auf eine wechselnde Bildqualität zwischen den einzelnen Bildern hin, da sich entsprechende Bildgegenstände in unterschiedlichen Bildern unterschiedlich „gefärbt“ waren. Um diese Unterschiede in der Bildqualität auszugleichen, wurden mittels einer **Histogrammtransformationen** (Lehmann T et al., 1997, S. 344) zunächst die Glockenkurven so verschoben, dass für jede Kurve der maximale y-Wert beim Grauwert von 127 auf der x-Achse lag. In einem zweiten Schritt wurden die hellsten Werte der Glockenkurve auf den Wert 255 gesetzt und die dunkelsten auf 0. Glockenkurven mit schmaler Basis wurden so verbreitert.

Histogrammtransformationen führen allerdings nur zu einer **Bildverbesserung** (Lehmann T et al., 1997, S. 322). Die **subjektive** Qualität eines Bildes wird erhöht. Eine **Bildkorrektur**, das heißt, eine Kompensation systematischer Aufnahmefehler leisten sie nicht.

2.2.8. Verwendete Hard- und Software

Cellenger arbeitete auf einem „E-Series Lifebook“, (Fujitsu-Siemens) mit Pentium-3-Prozessor und 260 MB Arbeitsspeicher. Als Betriebssystem wurde Windows 2000 Professional verwendet.

2.3. Beschreibung der Inhalte der verwendeten transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen

2.3.1. In den TEM-Aufnahmen erkennbare Strukturen

Die verwendeten TEM - Bilder zeigen zentral ein quergetroffenes **Sinusoid** (siehe Abbildungen in Kapitel 2.3.3. Zeichen der Gewebe- und Zellschädigung, Seite 24). Es handelt sich hierbei um eine von **Endothelzellen** ausgekleidete Kapillare, in der das Blut aus den Venae und Arteriae interlobulares in Richtung Zentralvene fließt. Ein Sinusoid wird also gleichzeitig von arteriellem Blut (via Truncus coeliacus - Arteria hepatica) und venösem Blut (aus der Pfortader) versorgt (Junqueira LC, Carneiro J, 1991, S. 535). Allseits umgeben ist das Sinusoid hauptsächlich von Leberzellen, selten von Itozellen.

Das Lumen der Sinusoide enthält **Kupfferzellen**. Diese für die Leber typischen Abwehrzellen sind zur Phagozytose befähigt. Sie nehmen aus dem Blut Zellen (z.B. zugrunde gehende Erythrozyten) und Zellbruchstücke auf, ebenso Bakterien und Fremdkörper. Die Kupfferzellen sind teilweise Bestandteile der Wand der Sinusoide, teilweise liegen sie den Endothelzellen auf. Sie haben stets lange Fortsätze (deswegen wurden sie früher Kupffer-Sternzellen genannt). Die Fortsätze verbinden die Kupfferzellen mit der nächstliegenden, aber auch mit der gegenüberliegenden Kapillarwand.

In den Sinusoiden findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Leberzellen statt. Die Endothelzellauskleidung der Sinusoide ist an die besonderen Anforderungen des intensiven Leberstoffwechsels angepasst: Sie enthält Poren und interzelluläre Öffnungen mit Durchmessern von bis zu 500 Nanometern. Blutbestandteile aber keine Zellen können so in den Raum zwischen Endothelzelle und Leberzelle gelangen. Dies ist der **perisinusoidale Raum** (Disse-Raum). Eine Basalmembran fehlt hier. Zur Oberflächenvergrößerung bildet die Zellmembran der Hepatozyten zahlreiche Mikrovilli. Der Disse-Raum ist zwischen 0,5 und 2 Mikrometer breit und enthält vereinzelt **Itozellen**. Deren Bedeutung ist nicht vollständig geklärt, fest steht, dass sie Vitamin A speichern und pathophysiologisch bei der Entstehung einer Leberzirrhose maßgeblich beteiligt sind.

Die **Leberzellen** haben einen Durchmesser von 20 bis 30 Mikrometer. Meist wird ein Sinusoid (in Schnittbildern) begrenzt von 4 bis 7 Hepatozyten. Ihre Zellkerne sind auffällig rund und beinhalten ein oder zwei Nukleolen. Etwa 25% der Leberzellen haben zwei Zellkerne. Nur ungefähr ein Drittel der Zellkerne sind diploid und haben einen Durchmesser von 10 Mikrometern, über die Hälfte der Leberzellkerne sind tetraploid mit einem

Durchmesser von etwa 15 Mikrometern. Auch bis 25 Mikrometer messende, oktaploide Zellkerne kommen vor.

Das Zytoplasma der Hepatozyten enthält bis zu 2000 **Mitochondrien** vom Christatyp. Diese Bezeichnung deutet auf die innere Mitochondrienmembran hin, die flache, brettförmige, nach innen gerichtete Falten bildet (Zellen, die Steroide synthetisieren, weisen tubuläre Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran auf - Tubuli mitochondriales). In der Innenmembran sind die Bestandteile der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung lokalisiert (Riede UN, Schaefer HE, 1995).

Ferner erkennt man in den verwendeten TEM-Aufnahmen **Lysosomen** in den Hepatozyten. Diese Organellen enthalten hydrolytische Enzyme und weisen sehr starke Größenunterschiede auf. Durchschnittlich sind sie 200 bis 500 Nanometer groß, es kommen aber auch bedeutend kleinere oder größere vor. Lysosomen sind an katabolen Stoffwechselprozessen beteiligt. Im noch inaktiven Zustand sind sie rundlich und klein (primäre Lysosomen). Im aktiven Zustand (sekundäre Lysosomen) bauen sie zelleigenes Material wie beispielsweise Mitochondrien ab (Autophagie), oder sie enthalten zellfremde Einschlüsse (Heterophagie). Die Lysosomen sind häufig allein aus dem elektronenmikroskopischen Bild heraus nicht sicher zu erkennen. Sicherer ist der zytochemische Nachweis einer der Hydrolasen (saure Phosphatase) (Leonhardt H, 1985, S. 35).

Peroxisomen (Microbodies) sind bis 500 Nanometer große, rundliche Körperchen. Sie haben beim Menschen einen homogenen, elektronendichten Inhalt. In den hier verwendeten Aufnahmen von Ratten sind Einschlüsse sichtbar (siehe Abb. 3). Es handelt sich hierbei um Enzyme in kristalliner Form. Peroxisomen enthalten wasserstoffperoxid-bildende Oxidasen und Katalase. Sie sind unter anderem am Fettsäureabbau beteiligt.

Als weitere gut zu erkennende Struktur ist das **raue endoplasmatische Retikulum** (RER) zu nennen. Das RER besteht aus einem System von Zytoplasmembranen. Diese schließen den wenigstens 40 bis 70 Nanometer breiten intermembranösen Raum ein. So wird ein ausgedehntes Spalten- und Kanälchensystem gebildet. An der zytoplasmatischen Seite der Membranen befinden sich Ribosomen. Im Innenraum des RER sammeln sich die von den **Ribosomen** gebildeten Proteine. Die Proteine werden durch Abschnüren von Vesikeln transportiert.

Vakuolen kommen auch in ungeschädigten Leberzellen vereinzelt vor. Es handelt sich um rundliche, elektronenoptisch leere, zum Teil von Membranen umgebene Strukturen. Es kann sich um Fettvesikel handeln, deren Fett durch die Vorgänge der Herstellung der mikroskopischen Schnitte herausgelöst wurde. Hier kommt unter anderem die Dehydrierung

in einer Alkoholreihe als Ursache in Frage. Die Vesikel erscheinen in der TEM-Aufnahme dann weiß. Vakuolen können auch durch Veränderungen am RER, hervorgerufen durch Zellschädigungen entstehen (siehe Kapitel 4.1.1. Leberzell-Schäden, Seite 72).

2.3.2. Läppchenarchitektur der Leber

Histologische Leberschnitte enthalten typischerweise:

- periportale Felder mit mindestens je einer Arteria und einer Vena interlobularis und einem Gallengang.
- Venae centrales (Zentralvenen).
- Leberzellreihen. Diese sind radiär und anastomosierend auf die Zentralvenen hin angeordnet. Zwischen den Leberzellreihen liegen, ebenfalls radiär verlaufend, die Sinusoide.

Die deskriptive, klassische Einheit des **Leberläppchens** fasst die Zentralvene als Läppchenzentrum auf. Räumlich ist die Zentralvene umgeben von Leberzellplatten (im histologischen Schnitt die oben erwähnten Leberzellreihen). Das klassische Leberläppchen bildet ein circa 0,7 Millimeter breites und bis zu 2 Millimeter langes Gebilde. Die Ecken des Läppchens im Schnittbild werden gebildet von 3 bis 6 periportalen Feldern. Diese sind beim Menschen oder bei Ratten nicht miteinander verbunden. Bei einigen Tieren hingegen, zum Beispiel bei Schweinen, findet sich zwischen den periportalen Feldern Bindegewebe. In dieser Umgrenzung der Läppchen finden sich die aus den Arteriae und Venae interlobulares hervorgehenden terminalen Arteriolen und Venolen. Sie münden in die Sinusoide, welche radiär auf die Zentralvenen zulaufen.

Die oben erwähnten terminalen Arteriolen und Venolen bilden die Achsen des **Leberazinus** (nach Rappaport). Sie sind von Leberzellen umgeben. In den Ecken der Azini befinden sich die periportalen Felder und die Zentralvenen. Auf diese Weise sind am Aufbau eines Leberazinus Teile von zwei klassischen Leberläppchen beteiligt. Grund für diese Betrachtungsweise sind funktionelle Erwägungen. Man kann die im Azinus um die terminalen Arteriolen und Venolen liegenden Hepatozyten in drei Zonen einteilen:

- Zone I: Sie umgibt die terminalen Gefäße unmittelbar. Die hier gelegenen Leberzellen kommen als erste mit dem der Leber zufließenden Blut in Kontakt.

- Zone II: Die hier liegenden Zellen werden nach Zone I von Blut durchflossen.
- Zone III: Das Blut hat bereits Zone I und II passiert und ist dort verändert worden.

Diese Zonengliederung spielt bei einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen eine Rolle. So ist die Enzymausstattung der Hepatozyten der drei Zonen eine andere. In Zone I sind beispielsweise mehr Enzyme für den Aminosäureabbau zu finden, in Zone III mehr Enzyme des Glukosestoffwechsels. Toxische Substanzen können, dieser zonalen Gliederung entsprechend, die Leberzellen unterschiedlich stark schädigen.

2.3.3. Zeichen der Gewebe- und Zellschädigung

Die Tiere der Ischämiegruppe wurden einer warmen Ischämie unterzogen, d.h. normotherme Verhältnisse während der Ischämiezeit von 60 Minuten, gefolgt von 120 Minuten der Reperfusion. Bei den transplantierten Lebern kam es im Wesentlichen zu einer kalten Ischämie, d.h. einer 24stündigen Lagerung des explantierten Organs bei 4°C, gefolgt von einer 120minütigen Reperfuionszeit wie in der Ischämiegruppe. Einerseits verursacht eine Ischämie Gewebeschäden, andererseits entsteht ein zusätzlicher Gewebeschaden durch die anschließende Reperfusion. Insgesamt spricht man von Ischämie-/Reperfusionsschäden (IRS) (Flaherty JT, Weisfeldt ML, 1988).

Bei einer **Ischämie** steht die unterbrochene Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und oxidierbaren Substraten im Vordergrund. CO₂ kann nicht abtransportiert werden. Nur kurze Zeit kann die Entstehung einer Azidose durch den anaeroben Stoffwechsel hinausgezögert werden (Riede UN, Schaefer HE, 1995, S. 23, S. 78). Der Ischämieschaden ist nicht nur zeitsondern auch temperaturabhängig. Normotherme Ischämiezeiten induzieren größere Schäden als hypotherme (Heijnen BH et al., 2003).

Der durch die **Reperfusion** induzierte Schaden folgt einem regelhaften Verlauf:

- In einer frühen Phase (< 2 Stunden nach Reperfuionsbeginn) kommt es zu einer Kupffierzell-Aktivierung mit konsekutiver Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species) (Jaeschke et al., 1988, 1991, 1998).

- In einer späten Phase (> 2 Stunden nach Reperfusion) dominiert eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMN, polymorphkernige Neutrophile) (Jaeschke et al., 1996).

Für eine weitere Beschreibung des IRS siehe Kapitel 4.1. Diskussion des Ischämie-/Reperfusionsschadens, Seite 72).

Die hier verwendeten Aufnahmen zeigen noch eine **frühe** Phase des IRS. Die auftretenden Schäden sind einerseits intrazellulär in den Leberzellen erkennbar, andererseits im Sinusoid.

In den Hepatozyten kommt es zu:

- einer Zunahme der Anzahl der Vakuolen.
- einer Volumenzunahme der Vakuolen.
- Veränderungen an den Mitochondrien. Es kommt zu einem Abbau der inneren Mitochondrienmembranen. In einem späteren Stadium der Schädigung kommt es durch Wassereinstrom zu einer Größenzunahme der Mitochondrien (Mitochondrienschwellung).
- einer Zunahme der Anzahl von sekundären Lysosomen.
- Veränderungen am Zellkern. Die für Hepatozyten typische Rundheit der Nuklei geht verloren.

Im Sinusoid:

- kommt es zu einer Ablösung des Endothels von den Hepatozyten.
- sind die Mikrovilli im Disse-Raum rarefiziert.
- imponieren in den Kupfferzellen vermehrt sekundäre Lysosomen.
- finden sich vermehrt Lumeninhalte verschiedenster Art.

Nachfolgend je eine beispielhafte TEM-Aufnahme für jede der drei Gruppen Kontrolle, Ischämie und Transplantation:

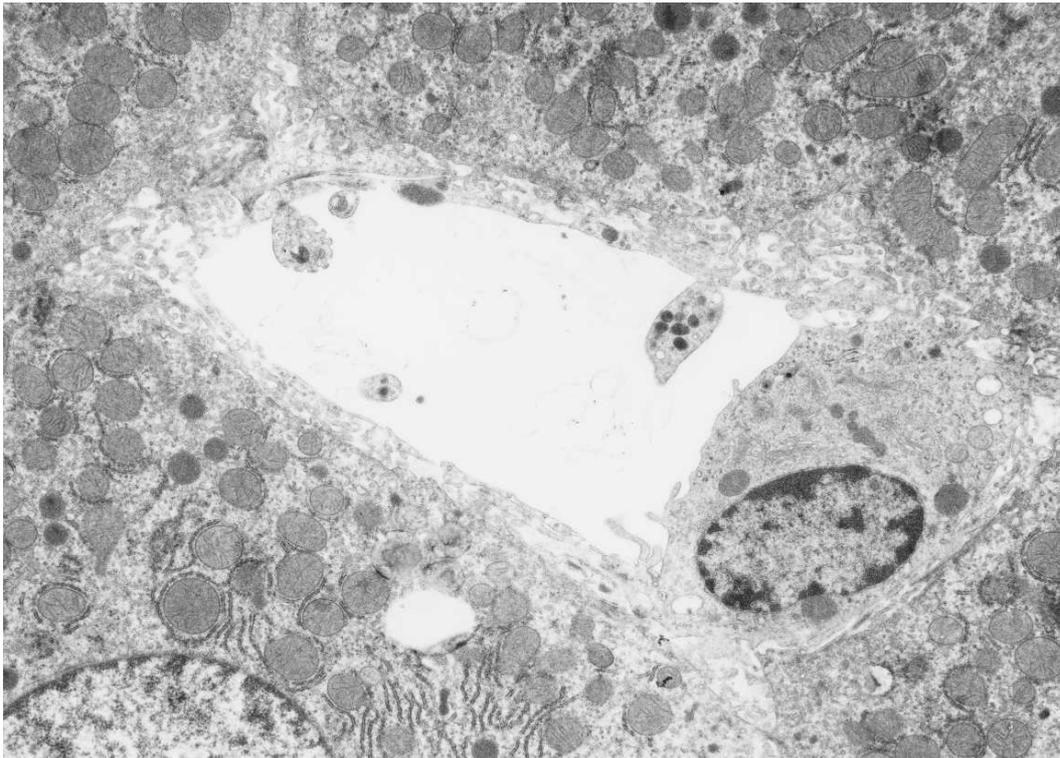


Abbildung 6: Kontrollgruppe. Sinusoid. Am rechten Sinusoidrand eine Kupferzelle.

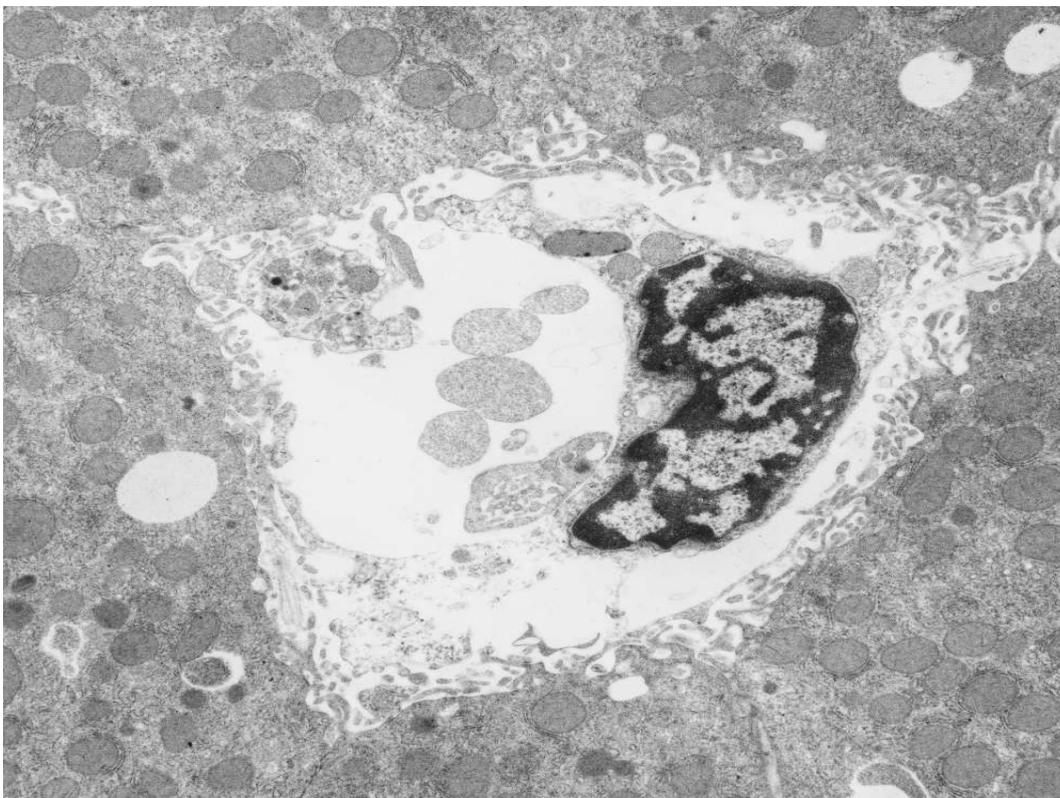


Abbildung 7: Ischämiegruppe. Sinusoid. Ablösung eines Großteils der Endothelzelle.

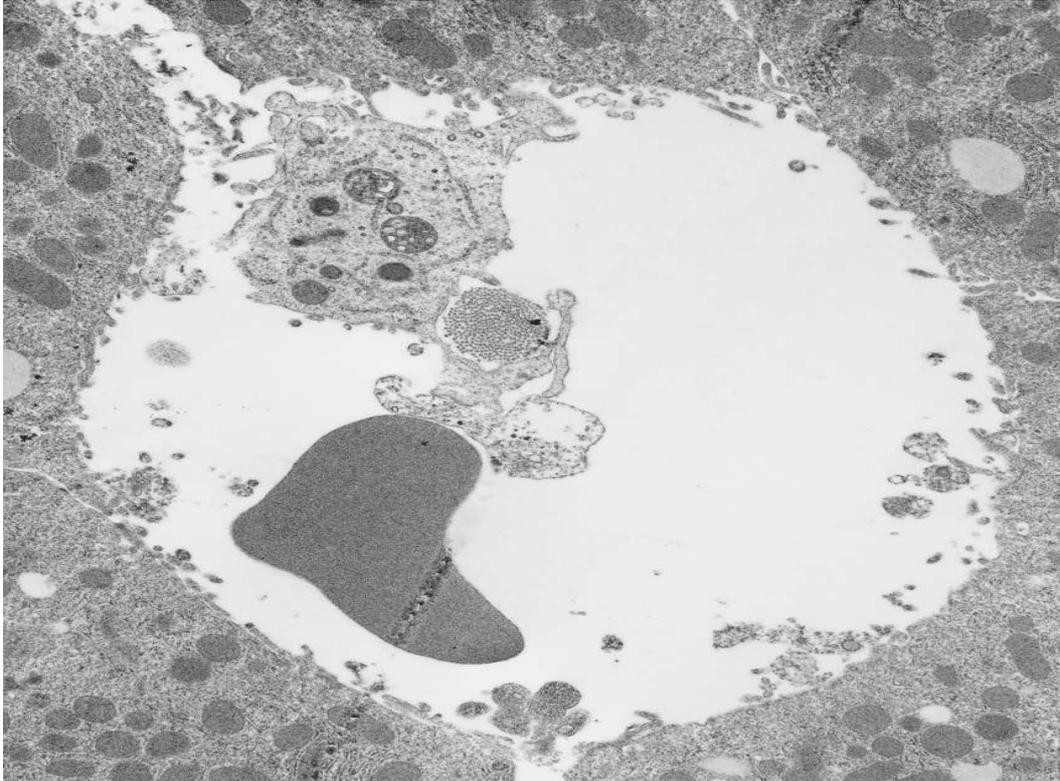


Abbildung 8: Transplantationsgruppe. Sinusoid. Völliges Verschwinden des Endothels.

2.4. Beschreibung von Cellenger®

2.4.1. Einführung

Das Bildanalyse-System Cellenger der Firma Definiens AG, München ist ein **wissensbasiertes System**. In wissensbasierten Systemen wird **Expertenwissen**, also beispielsweise Fachwissen aus dem Bereich der Medizin, im Computer modellhaft repräsentiert (Wiltgen M, 1999).

Dieses Modell besteht aus **Modell-Objekten**, die miteinander verknüpft werden. Die Modell-Objekte des Computers repräsentieren Objekte der realen Welt. Die Modell-Objekte sind unterscheidbare Einheiten, die Informationen tragen. Man nennt sie **Klassen**. Sie werden verknüpft durch ebenfalls Informationen tragende Einheiten, die man **Verknüpfungsobjekte** nennen kann. Ein mehrdimensionales Verknüpfungsmuster ist möglich.

Ein Beispiel soll dies veranschaulichen:

In einer von einem Satelliten aus fotografierten Landschaft wird man verschiedene grüne Regionen finden. Ein bestimmter Grünton der Fotografie trägt die Information: „Laubbäume“. Ein grünes **Bildobjekt** (eine unterscheidbare Einheit auf der Fotografie, der zunächst noch keine Bedeutung zugeordnet ist) wird nun der Klasse „Laubbäume“ zugewiesen und zwar aufgrund des **Merkmals** des Bildobjekts. Das Merkmal ist eben (unter anderem) der typische Grünton, der das Bildobjekt von anderen grünen Bildobjekten unterscheidet. Das Merkmal wurden vor der Klassifikation festgelegt. Grundlage für die Festlegung des Merkmals ist das Expertenwissen. Dieses Wissen ist entstanden aus der langjährigen Arbeit mit Satellitenbildern unterschiedlicher Art (Licht, Infrarot, Radar) und mit Bildern unterschiedlicher Auflösungen. Das Bildobjekt wird so zu einem **Klassenobjekt**, es wird **klassifiziert**, das heißt es wird identifiziert.

Gleiches kann geschehen mit rötlichen Bildobjekten, die aufgrund des Merkmals „rot“ der Klasse „Häuser“ zugeordnet werden.

In einem dritten Schritt kann geprüft werden, ob zwischen einem Objekt der Klasse „Laubbäume“ und einem Objekt der Klasse „Häuser“ eine enge räumliche Nachbarschaft besteht. Kann man die beiden Klassenobjekte verknüpfen? Das Verknüpfungsobjekt ist hier gekennzeichnet durch eine maximale Abstandsangabe, die beide Objekte nicht überschreiten dürfen, um verknüpft zu werden. Ist die Bedingung erfüllt, so wird das Objekt der Klasse „Laubbäume“ „umklassifiziert“, es wird nun der Klasse „Stadtpark“ zugeordnet.

Die Nachbarschaft von „Häuser“ und „Stadtpark“ ist eine horizontale Beziehung. Es handelt sich um **Nachbarobjekte**. Gemeinsam bilden sie ein **Oberobjekt**, dieses gehört zur Klasse „Stadt“. Anders formuliert: Das Klassenobjekt „Stadt“ beinhaltet die beiden **Unterobjekte** „Häuser“ und „Laubbäume“. Dies ist eine vertikale Beziehung (Hierarchie). Insgesamt ist ein dreidimensionales Modell aus verknüpften Objekten entstanden.

Auf diese Weise, Objekte mit Verknüpfungsobjekten zu verbinden, können komplexe Systeme beschrieben werden (Binnig G, et al., 1998, 1999, 2001), (Baatz M, Schäpe A, Schmidt G, 1999).

Etabliert ist dieses Modell, Objekte zu verknüpfen, bereits in dem Bildanalyzesystem eCognition der oben genannten Firma. Es wird in der Fernerkundung eingesetzt. Cellenger ist eine Weiterentwicklung von eCognition. So ist in Cellenger die gesamte Prozessdomäne (siehe Kapitel 2.4.5. Prozessdomäne, Seite 36) implementiert (das heißt, in die Software

integriert) worden. Diese Prozessdomäne erst erlaubt eine echte Automatisierung in der Bildanalyse.

Das oben erwähnte Konzept, Wissensnetze zu bilden, wurde im Bildanalyse-System Cellenger so umgesetzt, dass man vier sinngemäß zusammengehörige Gebiete (**Domänen**) unterscheiden kann. Diese Domänen werden auf der graphischen Benutzeroberfläche von Cellenger in einem Fenster miteinander verknüpft.

Es sind dies die vier Domänen:

- Bildobjektdomäne
- Klassendomäne
- Algorithmdomäne
- Prozessdomäne

2.4.2. Bildobjektdomäne

Sie beinhaltet alle Bildobjekte innerhalb des Bildes. Im einfachsten Fall kann schon ein einzelner Bildpunkt (**Pixel**) ein Bildobjekt sein (Ein Pixel, vom Englischen: picture element, ist der Grundbaustein bei der gerasterten, digitalisierten Darstellung von Bildern). Oder mehrere Pixel von ähnlichen Farb- oder Grauwerten, die von ihrer Umgebung abgegrenzt werden können, sind zu einem Bildobjekt zusammengefasst. Ein Bildobjekt ist charakterisiert durch Merkmale: Beispielsweise durch seine Fläche oder seinen mittleren Farb- oder Grauwert (Summe der Farbwerte der einzelnen Pixel dividiert durch die Anzahl der Pixel). Weitere Merkmale sind der Abstand des Bildobjekts zum Bildrand, die jeweilige gemeinsame Kantenlänge zu seinen Nachbarobjekten und viele andere mehr.

Die Bildobjekte wurden erzeugt durch eine **Bildsegmentierung**. Eine Segmentierung ist ein Rechenvorgang, der ein Bild in Bildobjekte unterteilt. Idealerweise erkennt ein Segmentieralgorithmus die Konturen der in einem Bild dargestellten Strukturen (zum Begriff Bildstruktur siehe Kapitel 2.4.4 Algorithmdomäne, Seite 32).

Die durch die Bildsegmentierung erzeugten Bildobjekte sind noch nicht klassifiziert, sie tragen noch keine Bedeutung. Diese Bildobjekte sind nur Bildregionen, die vom Segmentieralgorithmus als zusammengehörig erkannt wurden. Trotzdem sind diese Bildobjekte bereits vernetzt, beispielsweise „kennt“ ein Bildobjekt seine Nachbar-

Bildobjekte. Es können mehrere, hierarchisch geordnete **Bildobjektebenen** erzeugt werden. Beispielsweise wird ein Bild durch eine „**feine**“ Segmentierung in viele **kleine** Bildobjekte zerlegt. Es ist so eine neue Ebene entstanden. „Unten“ kann man sich das ursprüngliche Bild vorstellen (Ebene 0). Es besteht aus Pixeln. Ein Pixel trägt die Information seines Farb- oder Grauwertes sowie die Information seiner Position im Bild. „Darüber“ liegt die Ebene der Bildobjekte (Ebene 1). Ein Bildobjekt „kennt“ diejenigen Pixel der unteren Ebene, aus denen es gebildet wurde. Es trägt eine Vielzahl von Informationen, wie beispielsweise seine Flächengröße (in Pixel), die Länge seines Umfangs, seine Länge, seine Breite und so weiter. Ein Pixel der Bildebene (Ebene 0) kann nur ein Bildobjekt der Ebene 1 (ein Oberobjekt) haben, es kann nicht gleichzeitig zu zwei Oberobjekten gehören. Wenn die Bildobjektebene (Ebene 1) in einem zweiten Schritt von einer jetzt „**größeren**“ Segmentierung bearbeitet wird, entsteht eine weitere Ebene (Ebene 2) (siehe Abb. 9 unten). Diese liegt über den beiden anderen und enthält **größere** Objekte als Ebene 1. Es werden durch die zweite Segmentierung Bildobjekte aus Ebene 1 zu größeren Bildobjekten in Ebene 2 **zusammengefasst**. So kann nun ein Bildobjekt aus Ebene 2 zum Beispiel zwei Unterobjekte in Ebene 1 haben. Eines dieser Unterobjekte aus Ebene 1 wurde gebildet aus beispielsweise 8 Pixeln der Ebene 0.

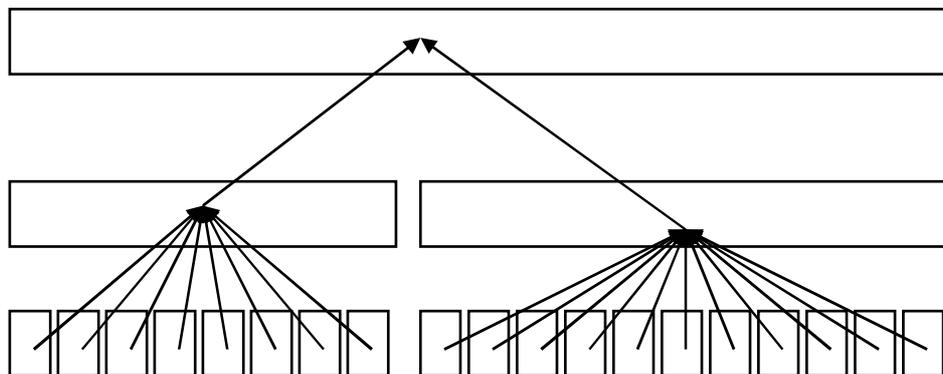


Abbildung 9: Es werden 3 Hierarchieebenen in einer seitlichen Ansicht dargestellt. Die unterste Ebene symbolisiert die einzelnen Pixel des Bildes (Ebene 0). Diese Pixel werden zusammengefasst zu zwei Bildobjekten in der mittleren Ebene (Ebene 1). Diese beiden Bildobjekte werden zu einem Bildobjekt in der obersten Ebene (Ebene 2) zusammengefasst.

Es kann in der Benutzeroberfläche von Cellenger für jeden einzelnen Teilschritt der Bildanalyse ein Fenster geöffnet werden. Diese Fenster werden „aneinandergehängt“. Es können so beliebig viele Teilschritte automatisch in einer definierten Reihenfolge ablaufen (siehe Kapitel 2.4.5. Prozessdomäne, Seite 36). In diesen Fenstern können bestimmte Bildobjekte angesprochen werden, unter anderem durch folgende Auswahlmöglichkeiten in Listefeldern der Fenster:

- „Bildobjektebene“: Es kann eine bestimmte Hierarchieebene angegeben werden. Gleichzeitig wird eine bestimmte Rechenoperation ausgewählt. Diese Rechenoperation wird dann nur auf der gewählten Ebene ausgeführt.
- „Unterobjekte“: Es können die Unterobjekte einer definierten Klasse einer bestimmten Ebene gezielt bearbeitet werden.
- „Oberobjekte“: Analog zu „Unterobjekte“ können die Oberobjekte einer Klasse in einer übergeordneten Ebene ausgesucht werden.

2.4.3. Klassendomäne

Bildobjekte, die anhand ihrer Merkmale identifiziert werden können, werden einer Klasse zugeordnet, sie werden klassifiziert (siehe Kapitel 2.4.1. Einführung, Seite 27).

Die Klassendomäne beinhaltet die Klassen. Eine Klasse besteht aus dem Namen der Klasse und ihren Merkmalen. Merkmale einer Klassen sind etwa: ein **Grauwertbereich**.

Beispielsweise werden in 8-**Bit**-Grauwertbildern 256 Grauwerte zur Verfügung gestellt (Bit, Kurzwort von englisch: binary digit. Es handelt sich hierbei um die kleinste Informationseinheit im binären Zahlensystem. Sie kann zwei Werte annehmen, üblicherweise bezeichnet als 0 oder 1. Zwei Bits entsprechen dann $2 \times 2 = 4$ möglichen Werten. Acht Bits ergeben ein Byte, das sind: $2 \text{ hoch } 8 = 256$ Werte). Diese 256 Grauwerte werden in Cellenger dargestellt als Werte im Dezimalsystem von 0 bis 255. Jeder dieser Zahlenwerte entspricht dann einem Grauwert. 0 steht für schwarz, 255 steht für weiß.

Ein Grauwertbereich als Merkmal einer Klasse könnte sein: „Werte von 220 bis 255“. Die Lumina der Sinusoide in den verwendeten TEM-Bildern wiesen diese Grauwerte auf. Der Grauwert allein reichte aber nicht aus, um sie von Vakuolen abzugrenzen. Eine Vakuole erscheint in den Schnittbildern meist rundlich, das Lumen hingegen ist unregelmäßiger geformt. Ein weiteres Merkmal, um die Bildobjekte beider Strukturen voneinander zu

unterscheiden wäre also ein **Formmerkmal**, etwa „Abweichung der Form des Bildobjektes von der Form einer Ellipse“.

Als weitere Merkmale können nicht selten **Lagemerkmale** verwendet werden Sie beschreiben die relative Lage von Bildobjekten, wie die Lage relativ zum Gesamtbild, oder relativ zu einem Oberobjekt.

Die Klassen sowie ihre Merkmale werden in einer „Trainingsphase“ definiert. Die in Frage kommenden Merkmale müssen im Allgemeinen empirisch durch Analysieren eines **Trainingsbild-Datensatzes** mit Hilfe von Cellenger ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass der Trainingsbild-Datensatz möglichst alle Ausprägungen abbildet, die im später automatisch zu analysierenden Bildmaterial zu erwarten sind. Ein Trainingsbild-Datensatz sollte also ausreichend viele Bilder enthalten. So sollte etwa ein Bild mit einem möglichst kleinen und ein Bild mit einem möglichst großen Sinusoid im Trainingsatz vorhanden sein. Auf diese Weise kann man einen **Wertebereich** für die Größe der Fläche eines Sinusoids ermitteln.

2.4.4. Algorithmandomäne

Algorithmen sind Rechenanweisungen, also Operationen, die Bildobjekte erzeugen und verändern. Beispiele hierfür sind:

Segmentierung:

Die Segmentierung nimmt eine Schlüsselrolle ein bei der computerunterstützten Analyse von Bilddaten. Sie unterteilt ein Bild in verschiedene Bildobjekte. Die elementaren Bildelemente der Analyse sind dann nicht länger Pixel, sondern zusammenhängende Pixelmengen (Soille P, 1998). Ziel der Segmentierung ist es letztlich, eine **Bildstruktur** „richtig“ zu erkennen. Eine Bildstruktur ist eine visuell erkennbare, funktionell beschreibbare Komponente eines Bildes. „Richtig“ erkennen bedeutet, dass die von der Segmentierung erzeugten **Bildobjekte** mit den Bildstrukturen übereinstimmen.

Eine Vielzahl von Segmentieralgorithmen sind in der Literatur beschrieben (Lehmann T, Oberschelp W, Pelikan E, Repges R, 1997). So ermitteln **Regionenwachstumsverfahren**

zuerst homogene Regionen (bezogen auf Farb- oder Grauwerte) im Bild. Von diesen homogenen Regionen aus werden Wachstumsprozesse gestartet. Für jedes Pixel, das zu einer homogenen Region benachbart ist, wird entschieden, ob es zu dieser Region noch gehören soll, oder nicht. **Kantendetektionsverfahren** gehen in umgekehrter Weise vor. Kantenpixel, also Pixel, die am Rand einer Bildstruktur liegen, weisen häufig eine hohe Grauwertvariation in ihrer Nachbarschaft auf, im Gegensatz zu relativ homogenen Bereichen im Strukturinneren. Die Aufgabe der Kantendetektion besteht in dem Auffinden dieser Bildbereiche mit hoher Variation.

Im Bildanalyse-System Cellenger sind verschiedene Segmentieralgorithmen implementiert. Das patentierte Verfahren der **“Multiresolution Segmentation®“** (im weiteren Text: Multiresolution Segmentation) (Baatz M, Schäpe A, 1999), (Baatz M, Binnig G et al., 1997) ist ein Regionenwachstumsverfahren und erzeugt Bildobjekte durch sukzessives, paarweises Fusionieren (im einfachsten Fall: Zusammenfassung von zwei Pixeln zu einem Bildobjekt; der Grauwert des entstehenden Bildobjekts ist der Mittelwert der Grauwerte der beiden Pixel). Hierzu wird am Beginn einer Bildanalyse eine „Kopie“ des Bildes erzeugt (eine zweite Bildebene, siehe Kapitel 2.4.2. Bildobjektdomäne, Seite 29). In diese zweiten Ebene wird zunächst jedes Pixel in ein Bildobjekt umgewandelt. Diese Bildobjekte werden nun Schritt für Schritt zu größeren zusammengefügt. Die Fusion von zwei Bildobjekten wird mit „Kosten“ bewertet, die den resultierenden Informationsverlust widerspiegeln sollen. Da einem Bildobjekt der durchschnittliche Grauwert der zugrundeliegenden Pixel zugewiesen wird, geht zwangsläufig Information verloren.

Es werden solange Fusionen durchgeführt, bis die Fusionskosten eine vordefinierte Schwelle überschreiten. Die Fusionskosten berechnen sich aus einer gewichteten Summe eines Grauwertanteils und eines Formanteils. Man kann die Gewichtung von Grauwert- und Formanteil frei bestimmen. Die Gewichtung könnte beispielsweise für den Grauwertanteil („color“) 60% betragen und für den Formanteil („shape“) 40%. Die beiden Anteile ergänzen sich stets zu 100%. Durch Änderung der Variablen des Formanteils kann man beispielsweise bewirken, dass der Segmentieralgorithmus relativ kompakte Bildobjekte erzeugt, oder dass die erzeugten Bildobjekte „ausgefranst“ erscheinen.

Durch eine lokale Suchstrategie wird gewährleistet, daß diejenigen Bildobjekte fusionieren, für welche die Kosten lokal minimal sind. Die hier beschriebene Fusion von Bildobjekten ist zu unterscheiden von der Fusion von Klassenobjekten (siehe unten: Bildobjekt-Fusion).

Weitere Segmentieralgorithmen sind eine „Schachbrett-Segmentierung“ und eine „Quad-Tree-Segmentierung“. Die Schachbrett-Segmentierung erzeugt quadratische Bildobjekte unabhängig von den Farb- oder Grauwertverteilungen im Bildes. Ihre Kantenlänge ist frei wählbar und beträgt ein oder mehrere (beliebig viele) Pixel. Die Quad-Tree-Segmentierung erzeugt ebenfalls quadratische (bzw. rechteckige) Bildobjekte, allerdings abhängig von den Grauwertverteilungen. In homogenen Bildbereichen werden große Quadrate erzeugt. In den Bereichen der Konturen eines Bildes entstehen kleine Quadrate. Die Quad-Tree-Segmentierung wurde für diese Arbeit nicht verwendet.

Die Segmentieralgorithmen können nicht nur global auf das gesamte Bild angewandt werden. Es ist möglich, nach einer ersten Segmentierung und nachfolgender Klassifikation (siehe unten) lokal einen weiteren Segmentierschritt auf ausgewählten Klassenobjekten durchzuführen. Dazu wird das Klassenobjekt erst wieder in seine einzelnen Pixel zerlegt. Anschließend können diese zu Bildobjekten zusammengefasst werden, die kleiner sind, als das ursprüngliche Klassenobjekt. Auf diese Weise könnten beispielsweise alle relativ weißen Bildregionen zunächst als „Weiß“ klassifiziert werden. Für eine genauere Untersuchung werden diese Klassenobjekte dann in kleinere Objekte unterteilt, das heißt: segmentiert.

Klassifikation:

Durch Segmentierung erzeugte Bildobjekte werden anhand ihrer Merkmale einer Klasse zugeordnet. Merkmale können Farb-, Form- oder Lagemerkmale sein (siehe Kapitel 2.4.3. Klassendomäne, Seite 31). Der Definition der Klassen liegt ein wissensbasiertes Modell zugrunde. Zur Erstellung dieses Modells ist Expertenwissen erforderlich. Die Merkmale wurden empirisch bestimmt anhand eines Trainings-Bilddatensatzes. Die Merkmale spannen einen **Merkmalsraum** auf (siehe Kapitel 4.2.5 Merkmalsraum, Seite 85). In diesem Merkmalsraum liegen idealerweise die Bildobjekte unterschiedlicher Bildstrukturen in verschiedenen Regionen des Merkmalsraums (in unterschiedlichen Clustern). Beispielsweise bilden die Bildobjekte der primären Lysosomen einen Cluster und die Bildobjekte der Peroxisomen einen weiteren. Dann kann man die Bildobjekte unterscheiden und somit klassifizieren.

Weitere Algorithmen sind (Auswahl):

Fusion: Ermöglicht die Fusion von Klassenobjekten. Im Gegensatz zur oben genannte Fusion im Rahmen der Segmentierung werden hier bereits klassifizierte Objekte fusioniert.

Fusionskriterien sind vom Benutzer festgelegte Merkmale. Beispiel: Es wurde bereits ein weißes Bildareal als Klasse „Lumen“ klassifiziert. Automatisch soll das Programm in einem weiteren Schritt die unmittelbaren Nachbarobjekte daraufhin überprüfen, ob sie noch zur Bildstruktur Lumen gehören, oder nicht. Wenn ja, sollen diese Nachbarn mit der Klasse „Lumen“ fusionieren und dieser Klasse angehören. Fusionskriterium könnte sein, dass das fusionierte Nachbarobjekt nicht dunkler sein soll als ein bestimmter Schwellwert. (Das Lumen erscheint in den TEM-Aufnahme meist nicht homogen weiß, sondern es ist zentral am hellsten und peripher oft deutlich dunkler).

Erosion: Beispiel: Es wurde von einem Klassifizierungsalgorithmus ein rundes Objekt gefunden, das aufgrund seiner Größe und seines Grauwertes der Klasse: „fragliches Mitochondrium“ zugeordnet wurde. Das Klassenobjekt ist relativ rund, ist aber fingerförmig „ausgelaufen“ an der Stelle, an der die Mitochondrienmembran aufgrund des tangentialen Anschnitts der Membran in diesem Bereich nicht zu sehen ist (siehe Kapitel 4.2.1. Bildkontrast bei TEM-Aufnahmen, Seite 76) (siehe Abb. 10 unten).

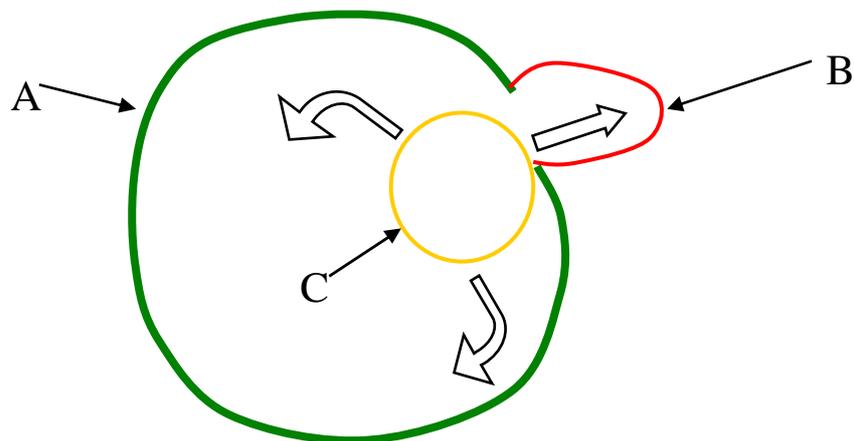


Abbildung 10: Die grüne (A) und die rote (B) Linie stellen die Grenze eines Mitochondrien-Klassenobjektes dar. (A) wurde richtig segmentiert, (B) offensichtlich falsch. Im Bereich von (B) ist im Bild keine Mitochondrienmembran zu sehen. Ein Erosionsalgorithmus lässt nun die gelbe Kreisfläche (C) in alle

Richtungen über das Bildobjekt laufen. Alle Flächenanteile des Bildobjekts, die (C) nicht vollständig fassen können, werden vom Bildobjekt entfernt. Das Ergebnis der Operation ist ein Abtrennen des Bereichs von (B).

Ein Erosionsalgorithmus ist in der Lage, solche ausgelaufenen Areale „abzuschneiden“. Anschließend kann das nun runde Objekt daraufhin überprüft werden, ob es die Merkmale der Klasse „Mitochondrium“ erfüllt.

Der Erosionsalgorithmus prüft also, ob eine Kreisscheibe mit definiertem Durchmesser vollständig in ein Klassenobjekt passt (Soille P, 1998, S. 54).

Dilatation: Die Dilatation ist die Umkehrung einer „Erosion“. Einziehungen der Umrisslinie eines Klassenobjektes werden begradigt.

Lokaler Extremwert: Dieser Algorithmus findet einen Extremwert (Minimum oder Maximum) innerhalb eines Klassenobjekts bezogen auf ein frei wählbares Merkmal. Beispiel: Innerhalb des Klassenobjekts „fragliches Peroxisom“ werden durch diesen Algorithmus die dunkelsten Bereiche erkannt und als „mögliches kristallines Einschlusskörperchen“ klassifiziert. Wenn nun dieses „mögliche kristalline Einschlusskörperchen“ bestimmten Größen- und Formmerkmalen entspricht, kann das „fragliche Peroxisom“ endgültig als „Peroxisom“ klassifiziert werden (siehe Abb. 3).

Globaler Extremwert: Analog zum Algorithmus: „lokaler Extremwert“ wird hier das gesamte Bild nach Minima oder Maxima bezogen auf eine Merkmal durchsucht.

Einschlüsse suchen: Dieser Algorithmus klassifiziert alle Objekte, die vollständig von einem bestimmten Klassenobjekt umgeben sind.

2.4.5. Prozessdomäne

Ein Prozess fügt gewissermaßen die drei oben genannten Domänen zusammen. Im Prozessfenster kann ausgewählt werden, **in welcher Bildobjektdomäne** etwas passieren soll. Beispielsweise in der Ebene 1, die Ebene der feinsten Segmentierung (mit den kleinsten

Bildobjekten). Weiterhin kann hier angegeben werden, was passieren soll: **Welcher Algorithmus** soll ausgeführt werden? Schließlich können eine oder mehrere **Klassen** selektiert werden. Beispiel: Man hat den Algorithmus „Einschlüsse suchen“ aktiviert und wählt die Klasse „Einschluss“ aus. Dann werden alle Objekte, die von einer ebenfalls zu bestimmenden Klasse vollständig umgeben sind, als „Einschluss“ klassifiziert. Letztlich können im Prozessfenster noch zusätzliche Bedingungen angegeben werden, etwa ein Größenkriterium. Dann werden nur Objekte, die diese Bedingung erfüllen, vom Algorithmus bearbeitet.

In der Prozessdomäne kann eine baumartige Struktur erzeugt werden. Für ein komplexes Bildanalyseproblem müssen eine Vielzahl von Rechenoperationen in einer definierten Reihenfolge durchgeführt werden. Auf der Benutzeroberfläche von Cellenger können hierzu beliebig viele Prozessfenster verbunden werden. Es können Schleifen gebildet werden, etwa eine „while“-Schleife. In einer while-Schleife wird der Programmteil der Schleife solange ausgeführt, solange eine Bedingung erfüllt ist.

Insgesamt kann so eine **Ablaufsteuerung** (Regelsatz) erstellt werden, die es erlaubt, ein oder beliebig viele Bilder automatisch zu bearbeiten. Die Ergebnisse, beispielsweise die Anzahl der gefundenen Mitochondrien pro Bild, können in einer Datenbank gespeichert werden.

2.5. Durchführung der Bildanalyse

2.5.1. Erstellung des semiautomatischen Regelsatzes

Ein **Regelsatz** in Cellenger ist eine Ablaufsteuerung und besteht aus einer Aneinanderreihung von Rechenanweisungen. Er wird anhand eines Trainingsbild-Datensatzes erarbeitet und kann zur Auswertung einer beliebigen Anzahl von Bildern verwendet werden.

Der Regelsatz für die semiautomatische Auswertung der Sinusoide von TEM-Aufnahmen der Leber bestand aus einem Segmentieralgorithmus (Multiresolution-Segmentierung), Klassifikationsalgorithmen, Fusionsalgorithmen, sowie den nötigen Klassen.

2.5.2. Segmentierung der Bilder (semiautomatische Bildanalyse)

Cellenger erlaubte zur Zeit der Erstellung der Arbeit nur eingeschränkt die Möglichkeit des interaktiven Arbeitens, da mit einem Prototyp der Software gearbeitet wurde. So konnten Bildbereiche nicht durch eine Markierung in Form einer gezeichneten Linie ausgewählt werden. Nachdem eine exakte automatische Extraktion der Sinusoide nicht gelang, wurden die Grenzen des Sinusoids manuell mit Hilfe eines kommerziellen Programms für Bildbearbeitung (Paint Shop Pro™) gekennzeichnet.

Nach Öffnen eines Bildes mit diesem Werkzeug wurde das Sinusoid mit einem schwarzen Strich definierter Dicke umfahren. Der schwarze Strich wurde später in Cellenger klassifiziert (Klasse: „**Ring**“). Bei dieser Kennzeichnung des Sinusoids wurden die (selten) vorhandenen Itozellen als nicht zum Sinusoid gehörig betrachtet, da sie nicht untersucht werden sollten (siehe Abb. 11 unten). Untersucht werden sollte nur das Lumen mit seinen Inhalten sowie das Endothel.

Die Einzeichnung dieser Grenze geschah nicht exakt; ein dünner Randsaum der das Sinusoid umgebenden Leber-(bzw. Ito-)zellen (kurz: **Randsaum**) wurde miterfasst, d.h. als Teil des Sinusoids angesehen. Dies war nötig, um ein Längenverhältnis von nicht mit Endothel bedeckter Sinusoidbegrenzung im Verhältnis zum Sinusoidumfang berechnen zu können. Hierzu der Randsaum in Bereichen der Endothelzellablösung als „Fehlende Endothelbedeckung“ klassifiziert. Die gemeinsame Kantenlänge dieser „Hilfsklasse“ mit der Klasse „Ring“ (gemessen in Anzahl von Pixeln) konnte bestimmt werden, da die Klasse „Ring“ der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ unmittelbar anlag. Die gemeinsame Kantenlänge mit „Ring“ diente also zur Berechnung des relativen Sinusoidumfangs, der keine Endothelbedeckung aufwies. (siehe Kapitel 2.5.3. Klassifikation, Zu 4.: Fehlende Endothelbedeckung, Seite 43).

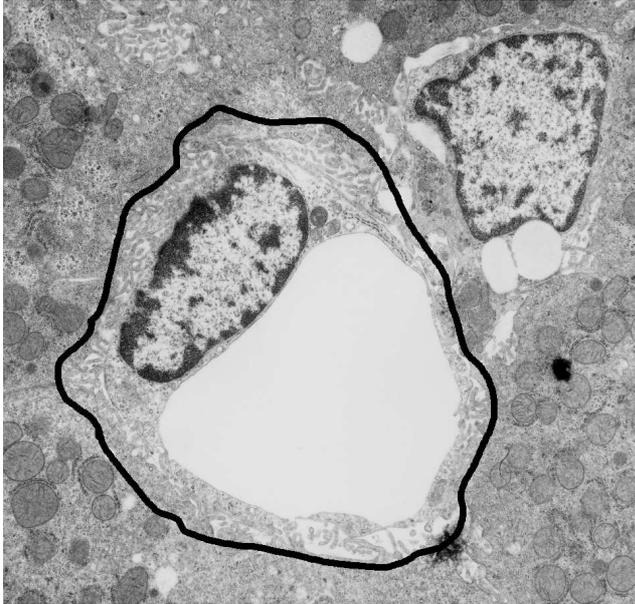


Abbildung 11: Sinusoid mit „Ring“

Anschließend wurden das so markierte Bild sowie der Regelsatz in Cellenger geladen. Nach Speicherung dieser Information als Projekt wurde das Bild nach einem für alle Bilder identischen Schema segmentiert. Es wurde das Multiresolution-Segmentierverfahren angewendet. Wichtig war es hierbei, den „**Scale Parameter**“ festzulegen. Je kleiner der „Scale Parameter“, desto kleiner die durch die Segmentierung erzeugten Bildobjekte. Empirisch war ein „Scale Parameter“ von 100 ermittelt worden (bei möglichen Werten für natürliche Zahlen zwischen 0 und Unendlich). Es hatte sich während der Trainingsphase gezeigt, dass dieser Wert gute Segmentierergebnisse liefert (verglichen mit einer visuellen Analyse). Einerseits wurden die Konturen der Objekte zufriedenstellend erkannt, andererseits waren die Bildobjekte groß genug, um im Anschluss in circa drei Minuten die manuelle Klassifikation durchführen zu können. Mit einem „Scale Parameter“ von 5 war es zwar möglich gewesen, alle Mikrovilli eines Sinusoids „richtig“ segmentiert werden. Die manuelle Klassifikation der etwa viertausend Bildobjekte eines Sinusoids dauerte dann jedoch eine Stunde, da hierzu jedes einzelne Bildobjekt mit dem Mauszeiger ausgewählt werden musste. Für die bereits genannten Parameter „Color“ und „Shape“ (siehe Kapitel 2.4.4. Algorithmendomäne, Seite 32) wurde zur Wichtung des Farb- und Formanteils der Segmentierung jeweils 50% ausgewählt, beide Parameter waren also gleich gewichtet. Die beiden Parameter „Smoothness“ und „Compactness“ haben einen Einfluss auf die „Glattheit“ der Umfangslinie der Bildobjekte. Für sie wurde ebenfalls jeweils 50% ausgewählt. Auch für diese beiden Parameter ergänzen sich die Werte stets zu 100%.

Die Segmentierung erzeugte aus der digitalisierten TEM-Aufnahme Bildobjekte. Die Bereiche außerhalb des Sinusoids wurden nicht beachtet. Die Sinusoide wurden, je nach Größe und Bildkontrast, in 20 bis 150 Bildobjekte unterteilt.

2.5.3. Klassifikation (semiautomatische Analyse)

Nach der Segmentierung wurden die Bilder manuell klassifiziert. Dazu mussten die Bildobjekte mit dem Mauszeiger ausgewählt werden.

Verwendet wurden folgende Klassen:

1. Regelrechtes Endothel
2. Geschädigtes Endothel
3. Abgelöstes Endothel
4. Fehlende Endothelbedeckung
5. Lumeninhalte
6. Freies Lumen
7. Eingezeichnete Sinusoidbegrenzung („Ring“)

Zu 1.: Regelrechtes Endothel

Als „regelrechtes Endothel“ wurde auch Endothel angesehen, wenn eine **Ablösung der Zelle** von den Hepatozyten (bzw. von einer selten vorhandenen Itozelle) in Teilbereichen (<50% des Sinusoidumfangs) bestand (siehe Abb. 12 unten). Auch in unbehandeltem Gewebe treten kurze Bereiche auf, in denen kein Kontakt zwischen Endothelzelle und Mikrovilli nachweisbar ist.

Die verwendeten TEM-Aufnahmen waren für eine anderer Studie visuell ausgewertet worden. Dabei wurden unter anderem die Mikrovilli in den drei Gruppen beurteilt. Die Anzahl der Mikrovilli im Vergleich zu einem „Erwartungswert“ für gesunde Hepatozyten wurde geschätzt. Hier wurde ein Wert von unter 50 Prozent des Erwartungswertes als noch normal beurteilt und als gut einschätzbar erachtet. (siehe Kapitel 4.3.9. Vergleich mit den Ergebnissen einer visuellen Auswertung, Seite 101).

Analog haben wir daher eine Grenze von 50% für die computerunterstützte Auswertung übernommen.

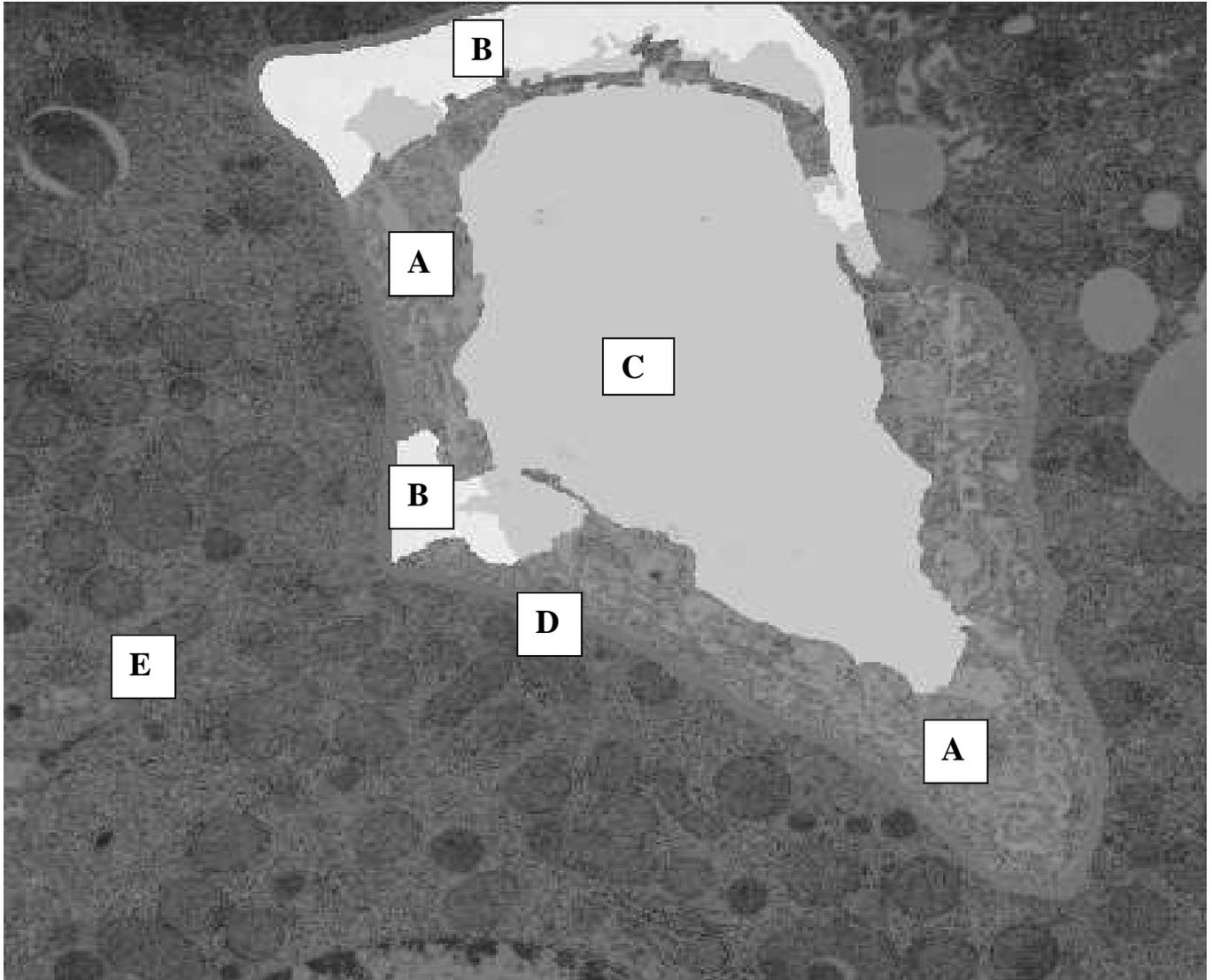


Abbildung 12: Klassifikationsergebnis (Ischämiegruppe). Grün (A): „regelrechtes Endothel“, gelb (B): „fehlende Endothelbedeckung“, türkis (C): „freies Lumen“, braunrot (D): „Ring“, violett (E): nicht untersuchte Bildbereiche. Die Klassenobjekte „regelrechtes Endothel“ und „fehlende Endothelbedeckung“ im oberen Bildbereich scheinen sich zu berühren. Tatsächlich aber ist das Endothel in diesem Bereich vom Lebergewebe abgehoben.

Zu 2.: Geschädigtes Endothel

Bestand eine partielle Ablösung der Endothelzelle von mehr als 50% des Sinusoidumfangs, so wurde diese Endothelzelle als „geschädigtes Endothel“ klassifiziert. Zur Erläuterung siehe unten stehende Abbildung.

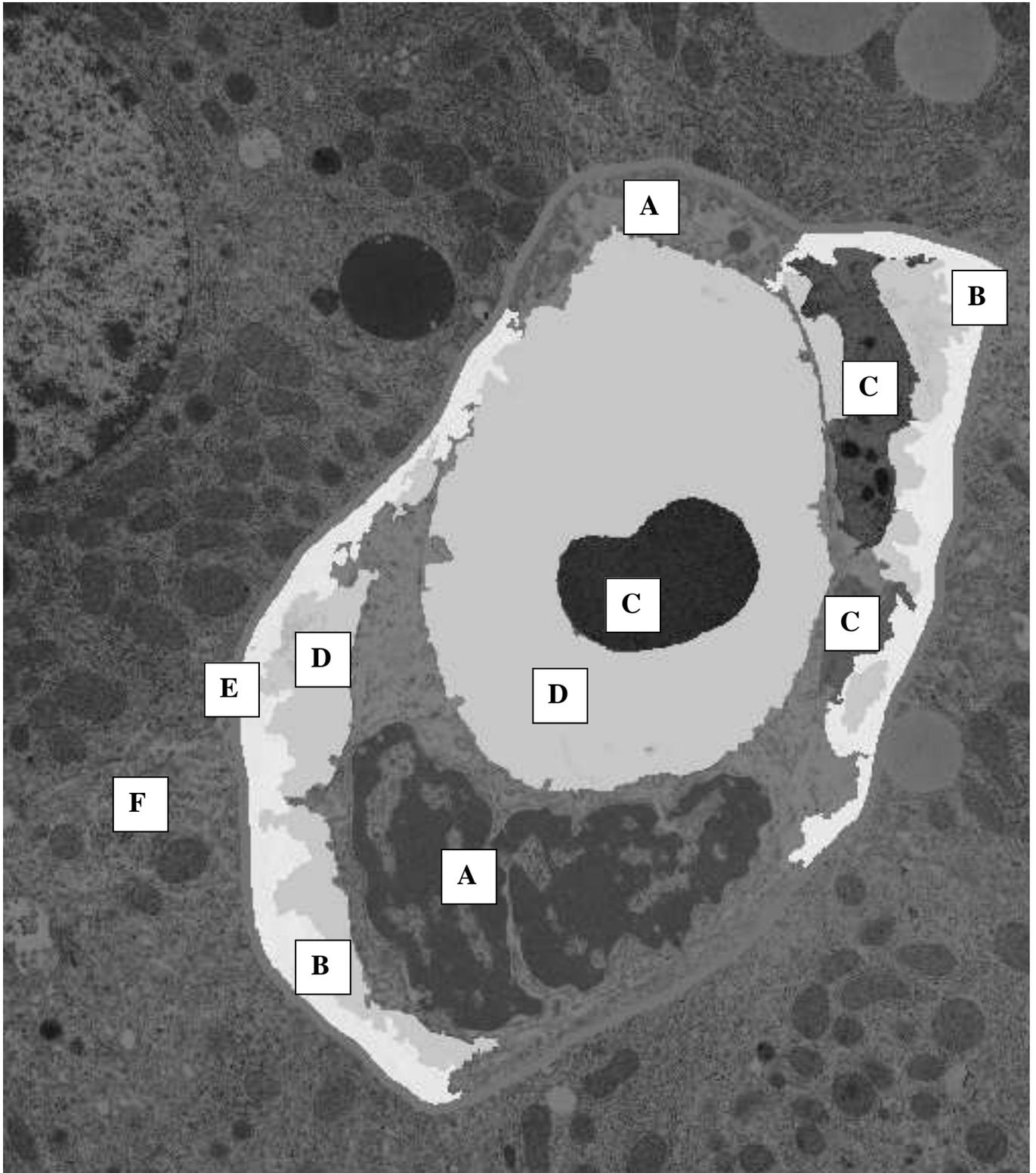


Abbildung 13: Klassifikationsergebnis (Ischämiegruppe). Rot (A): „geschädigtes Endothel“, gelb (B): „fehlende Endothelbedeckung“, blau (C): „Lumeninhalt“, türkis (D): „freies Lumen“, braunrot (E): „Ring“, violett (F):

nicht untersuchte Bildbereiche. Die Endothelzelle ist in weiten Bereichen (> 50% des Sinusoidumfangs) vom Lebergewebe abgehoben. Im stark erweiterten Disse-Raum sind zelluläre Strukturen als „Lumeninhalt“ klassifiziert worden.

Zu 3.: Abgelöstes Endothel

Klar erkennbare Endothelzellen, die an keiner Stelle Kontakt zu den das Sinusoid umschließenden Leberzellen hatten, wurden dieser Klasse zugeordnet. Schwerst geschädigte Zellen wurde hinzugerechnet, auch wenn sie noch vereinzelt Mikrovilli von Leberzellen berührten. Abgelöstes Endothel wurde zugleich als „Lumeninhalte“ klassifiziert.

„Lumeninhalte“ ist ein Oberobjekt von „abgelöstes Endothel“ (siehe Kapitel 2.4.1. Einführung, Seite 27).

Zu 4.: Fehlende Endothelbedeckung

Der dünne Randsaum des Leberparenchyms (Hepatozyten oder Itozellen), der nicht von Endothel bedeckt war, wurde als „fehlende Endothelbedeckung“ klassifiziert. Die Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ diente der Berechnung des Anteils am Sinusoidumfangs, der nicht von Endothel bedeckt war. Aus den in Kapitel 2.5.2. Segmentierung der Bilder (Siehe Seite 38) beschriebenen Gründen musste eine Klasse im Bereich der Ablösung definiert werden, deren gemeinsame Kantenlänge mit der Klasse „Ring“ zur Berechnung der gesuchten Streckenlänge diente. Die Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ wurde also benötigt, um ein Längenverhältnis zu bestimmen.

In den Bereichen, in denen das Endothel Kontakt zu den Leberzellen hatte, wurde der Randsaum wie die darüberliegende Endothelzelle klassifiziert (regelrecht, geschädigt oder abgelöst). Es hatte sich gezeigt, dass nur eine sehr feine Segmentierung es erlaubt hätte, das Lebergewebe, den Disse-Raum und das Endothel genau zu unterscheiden. Unter der Vorgabe einer schnellen Bearbeitung der Bilder aber war es unumgänglich, eine grobe Segmentierung zu wählen, da ansonsten eine übergroße Anzahl von Bildobjekten zur Klassifikation manuell hätte ausgewählt werden müssen. Eine feinere Segmentierung hatte circa viertausend Bildobjekte erzeugt, die Klassifikation eines Bildes erforderte dann einen Zeitaufwand von einer Stunde. Die gewählte, gröbere Segmentierung führte zu circa 20 bis 150 Bildobjekten. Der Flächenanteil der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ am Sinusoid betrug in Einzelfällen bis zu 15 %. Dies hätte zu einer Verfälschung der Flächenanteile der drei Klassen regelrechtes, beschädigtes und abgelöstes Endothel geführt, da diese **nur** in den Bereichen des

Kontakts zum Leberparenchym die Fläche des Randsaums enthalten. Deshalb wurden nach Export der berechneten Klassenflächen aus Cellenger der Flächenanteil der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ und der Flächenanteil der jeweiligen, im Sinusoid vorkommenden Endothelzelle addiert.

Die Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ war somit eine „Hilfsklasse“, um eine Steckenlänge zu messen. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung unten.

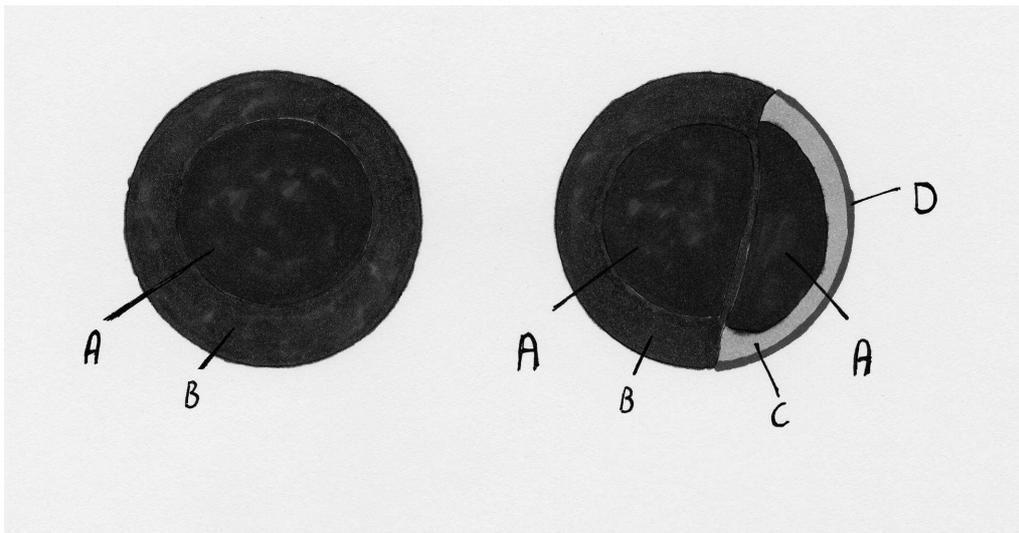


Abbildung 14: Links: Sinusoid bestehend aus den Klassen „regelrechtes Endothel“ (grün, B) und „freies Lumen“ (blau, A). Rechts: Sinusoid mit einer Endothelablösung kleiner 50%. „Regelrechtes Endothel“ (grün, B), „freies Lumen“ (blau, A) und „fehlende Endothelbedeckung“ (gelb, C). Der relative Sinusoidumfang ohne regelrechte Endothelbedeckung ist als rote Linie dargestellt (D). Bei der Auswertung der Daten wurde die Fläche B um den Inhalt der Fläche C erweitert. Ohne diese Erweiterung wäre sonst der Flächenanteil von B links größer als rechts, obwohl die **tatsächlichen** Flächen des Endothels identisch sind.

Im **linken** Teil der Abbildung oben ist der Kontakt zwischen Endothel (grün) und Sinusoidbegrenzung völlig erhalten. **Rechts** ist das Endothel des ansonsten völlig identischen Sinusoids in einem Bereich von weniger als 50 % des Sinusoidumfangs abgelöst. Betrüge hier der Flächenanteil des Randsaums (gelb) am Sinusoid 5%, so reduzierte sich der Flächenanteil von „regelrechtes Endothel“ um diese 5% im Vergleich zum linken Sinusoid.

Beide Endothelzellen wurden derselben Gruppe zugeordnet, aber der Flächenanteil der rechten Endothelzelle erschiene um 5 % (bezogen auf die Sinusoidfläche) geringer.

Um diesen Fehler auszugleichen, wurde die Fläche der jeweiligen Endothelzell-Klasse eines Sinusoids um den Inhalt der Fläche von „fehlendes Endothel“ erweitert.

Zu 6.: Lumeninhalte

Lumeninhalte waren Kupfferzellen, Blutzellen wie Erythrozyten und Granulozyten, sowie Zelltrümmer. Auch völlig abgelöste Endothelzellen wurden als „Lumeninhalte“ klassifiziert. Kupfferzellen sind zwar auch als regulärer Bestandteil der Kapillarwand zu beobachten, meist liegen sie aber den Endothelzellen auf.

Zu 7.: Freies Lumen

Die elektronenoptisch leeren (weißen) Bereiche des Sinusoids wurden als „freies Lumen“ klassifiziert. Darunter fielen auch erweiterte Disse-Räume, in denen kein Kontakt zwischen Endothel und Leberzelle bestand.

Zu 8.: Eingzeichnete Sinusoidbegrenzung („Ring“)

Der eingzeichnete Ring wurde klassifiziert, um ein Maß für den Sinusoidumfang zu erhalten.

2.5.4. Automatische Erkennung von Mitochondrien

Für die automatische Erkennung der Mitochondrien in den Hepatozyten wurde ein Regelsatz entwickelt. Die Sinusoide mit den dort vorkommenden Mitochondrien, vor allem in den Endothelzellen, wurden nicht berücksichtigt, da sie sich von den Mitochondrien in den Hepatozyten, beispielsweise hinsichtlich ihrer Größe, unterscheiden. Es handelt sich also um gleichartige Bildstrukturen, die aber unterschiedliche Bildobjekte erzeugen (siehe Kapitel 4.4. Diskussion der automatischen Bildanalyse, Seite 106).

Für die Erstellung des Regelsatzes wurden aus der Kontrollgruppe 5 **Trainingsbilder** zufällig ausgewählt und zunächst geeignete **Segmentierverfahren** empirisch ermittelt.

Zwei Multiresolution-Segmentierungen stellten sich als geeignet heraus. Eine feine Segmentierstufe erzeugte in Ebene 1 (zu Hierarchieebenen siehe Kapitel 2.4.2.

Bildobjektdomäne, Seite 29) im Mittel kleine Bildobjekte, eine grobere Stufe in Ebene 2

größere Bildobjekte. In der Ebene 1 wurden dann Bildobjekte von kleinen Mitochondrien klassifiziert. Die Bildstruktur von kleinen Mitochondrien zeigte in Ebene 1 eine „gute“ Übereinstimmung mit den entsprechenden Bildobjekten (verglichen mit einer visuellen Auswertung) (zu Bildstruktur siehe Kapitel 2.4.4. Algorithmendomäne, Seite 32). Große Mitochondrien waren in dieser Ebene 1 ungenügend segmentiert. Ihre Bildstruktur wurde in mehrere Bildobjekte unterteilt. Deshalb war die zweite Ebene nötig. Im Laufe der Trainingsphase hatte sich keine **einzelne** Segmentierstufe finden lassen, die sowohl kleinen als auch großen Mitochondrien „richtig“ finden konnte.

Erst in Ebene 2 wurden große Mitochondrien „richtig“ segmentiert, das heißt, das die Fläche ihrer Bildstruktur mit einem maximalen Fehler von $\pm 10\%$ gefunden wurde.

Anschließend wurden eine **Merkmalsliste** mit allen sinnvoll erscheinenden Merkmalen von 100 der „richtig“ segmentierten Mitochondrien-Bildobjekte erstellt.

Jedes der 100 Mitochondrien-Bildobjekte wurde hierzu mit dem Mauszeiger ausgewählt.

Cellenger berechnete dann die gewünschten, in einem Fenster der Benutzeroberfläche vorher ausgewählten Merkmale. Die Messwerte wurden in eine Tabelle übertragen. Die Tabelle diente als Grundlage für die Auswahl von 7 Merkmalen, da sich hier eine nur geringe Streuung der Messwerte herausstellte (Clusterbildung im Merkmalsraum, siehe Kapitel Merkmalsraum, Seite 85). Diese Auswahl konnte ohne statistische Verfahren durch kritisches Betrachten der Zahlenwerte geschehen. Es sollten Merkmale benutzt werden, die deutlich erkennbar die Bildstrukturen charakterisieren.

Es wurden folgende Merkmale verwendet:

- Relativer mittlerer Grauwert des Bildobjekts im Verhältnis zum mittleren Grauwert des Gesamtbildes.
- Kontrast zur näheren Umgebung des Bildobjekts. Dieser ist das Verhältnis aus dem mittleren Grauwert des Bildobjektes zum mittleren Grauwert eines fünf Pixel messenden Saumes um das Bildobjekt herum. Je größer dieser Saum, desto länger dauert die Berechnung des Merkmals. Dieser Zeitfaktor kann bei umfangreichen Regelsätzen deren Anwendung limitieren.
- Fläche des Bildobjektes.
- Rundheit des Bildobjekts („elliptic fit“). Hierbei wird um den Mittelpunkt des Bildobjekts herum eine Ellipse berechnet. Diese hat den gleichen Flächeninhalt wie das Bildobjekt und ein vergleichbares Verhältnis aus Länge zu Breite. Der Grad der

Überschneidung dieser beiden Flächen wird berechnet und ist ein Maß für die Rundheit des Bildobjektes.

- Verhältnis aus Länge zu Breite des Bildobjektes.
- Verhältnis aus Umfang U des Bildobjekts zu seiner Fläche A ($\frac{U}{4 \times \sqrt{A}}$ „shape index“).

Der „Shape Index“ steht in keinem Zusammenhang zu „Shape“ (siehe Kapitel 2.4.4. Algorithmendomäne, Seite 32). Er ist ein Klassifikationsmerkmal, das in Cellenger implementiert ist. Es beschreibt, wie „ausgefranst“ ein Klassenobjekt ist. Je kleiner U (bei konstantem A), desto mehr nähert sich das Bildobjekt einem Kreis.

- Standardabweichung der Grauwerte der einzelnen Pixel des Bildobjektes.

Aus den so gefundenen Werten für die Merkmale der Mitochondrien-Bildobjekte wurden **Wertebereiche** bestimmt (siehe Kapitel 4.2.5. Merkmalsraum, Seite 85).

Nach Ermittlung von Segmentierstufen, sowie Merkmalen und deren Wertebereiche konnten **Klassen** für die Mitochondrien gebildet werden. Es wurden circa 30 Mitochondrien-Klassen mit unterschiedlichen Klassenbedingungen gebildet. Die **Klassenbedingungen** wurden aus den oben genannten Merkmalen konstruiert.

Klassifizierungsalgorithmen überprüften dann für jedes bisher unklassifizierte Bildobjekt, ob es die Bedingungen einer Klasse erfüllt.

Beispiele hierfür sind die Klassen: „Kleine, dunkle Mitochondrien“ oder „sehr große, sehr runde Mitochondrien“. Unterschiedliche Teil-Wertebereiche der oben genannten Merkmale definierten also unterschiedliche Klassen (zur Unterteilung eines Clusters im Merkmalsraum siehe Abb. 20 und 21, Kapitel 4.2.5. Merkmalsraum, Seite 85).

Der so entwickelte Regelsatz wurde an einer zufälligen Auswahl von 10 Bildern getestet. Es ist für die Anfertigung eines Regelsatzes nötig, dass der Trainingsdatensatz möglichst **repräsentativ** ausgewählt wird. Die Trainings- und die Testdaten müssen hinsichtlich der verwendeten Merkmale vergleichbar sein. Da die Mitochondrien der Ischämie- und der Transplantationsgruppe sich teilweise deutlich von denjenigen der Kontrollgruppe unterscheiden (siehe Kapitel 2.3.3. Zeichen der Gewebe- und Zellschädigung, Seite 24), wurden deshalb die Testbilder ebenfalls aus der Kontrollgruppe ausgewählt.

Die Testbilder wurden jeweils mit dem Regelsatz in Cellenger geladen und als Projekt gespeichert. Anschließend wurden die Bilder von dem Regelsatz automatisch und in einer für alle Bilder identischen Weise segmentiert und klassifiziert. (siehe Kapitel 3.2.1. Automatische Erkennung von Mitochondrien, Seite 70).

2.5.5. Berechnungen mittels Cellenger und Export der Daten

Cellenger stellt ein Modul für Berechnungen zur Verfügung. Zwei Berechnungen wurden mit diesem Werkzeug durchgeführt:

Zunächst wurden die Flächen der sechs Klassen der computerunterstützten Auswertung der Sinusoide in Pixeln bestimmt und die sich daraus ergebende Gesamtfläche des Sinusoids. Sodann wurde die in Kapitel 2.5.2. Segmentierung der Bilder, Seite 38, erwähnte gemeinsame Grenzlinie des Klassenobjekts „Ring“ zu „fehlende Endothelbedeckung“ ermittelt. Diese konnte maximal knapp 50 Prozent (49,9%) betragen, da nur die innere Ringseite Kontakt zu dieser Klasse haben konnte und der Innenrand minimal kürzer war, als der Außenrand des nur 7 bis 8 Pixel breiten Ringstreifens.

Die Ergebnisse beider Berechnungen wurden in eine Datei im ASCII-Format gespeichert.

2.5.6. Statistische Auswertung

Aus der Summe der Flächen der Klassen „regelrechtes Endothel“, „geschädigtes Endothel“ und „abgelöstes Endothel“ wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corp., Seattle, USA) die gesamte Endothelfläche eines Sinusoids berechnet („Gesamt-**Endothel**“).

Ebenso wurde aus der Summe der Flächen aller in einem Sinusoid vorkommenden Klassen (außer „Ring“) die Fläche jeweils des gesamten Sinusoids („Gesamt-**Sinusoid**“) ermittelt. Für die Berechnung der Flächenanteile am Sinusoid sowie für die graphische Darstellung wurde ebenfalls diese Software eingesetzt.

Für die Ermittlung von Median, Mittelwert, 1. und 3. Quartil sowie der Standardabweichung und zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde das Statistikprogramm SigmaStat (SigmaStat for Windows, Version 2.03, SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet.

Histogramme wurden mit der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, USA) erstellt.

Die drei Gruppen Kontrolle, Ischämie, Transplantation wurden mit dem **Kolmogorov-Smirnov-Test** auf Normalverteilung untersucht (das heißt, eine fehlende Normalverteilung wurde nachgewiesen).

Mit dem **Kruskal-Wallis Test** (Anova on Ranks) wurden, da meist keine Normalverteilung vorlag, die drei Gruppen auf signifikante Unterschiede getestet.

Signifikante Unterschiede wurden dann zwischen jeweils 2 der 3 Gruppen durch einem **Dunn-Test** geprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Zur Beurteilung des Klassifikationsergebnisses der **automatische** Ermittlung der Anzahl der Mitochondrien in den Bildbereichen der Hepatozyten wurden mithilfe der bereits erwähnten Bildbearbeitungs-Software Paint Shop Pro™ „Masken“ hergestellt. In Kopien der Testbilder wurden hierzu die Mitochondrien mit einer definierten Farbe übermalt. Cellenger konnte dann nach Laden von Testprojekt und zugehöriger Maske automatisch die Anzahl der vorhandenen sowie der gefundenen Objekte ermitteln.

3. Ergebnisse

3.1. Computerunterstützte Bildanalyse des Sinusoids

TEM-Aufnahmen der Rattenleber wurden semiautomatisch mit Hilfe der Software Cellenger ausgewertet. Drei Gruppen von Tieren wurden gebildet: Kontrolle, Ischämie und Transplantation. Die Bilder stellten ein Sinusoid mit umgebenden Hepatozyten dar. Die Bildbereiche der Sinusoide wurden untersucht. Dieses wurde markiert, mittels der o.g. Software auf einheitliche Weise automatisch segmentiert, manuell klassifiziert, sowie die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Flächenanteile am Sinusoid

Der Flächenanteil am Sinusoid der Klassen **„Regelrechtes Endothel“**, **„Geschädigtes Endothel“**, **„Abgelöstes Endothel“**, **„Gesamt-Endothel“**, **„Lumeninhalte“** und **„Freies Lumen“** (siehe nachfolgende Unterkapitel 3.1.1. bis 3.1.6.) in den jeweils 50 Bildern der 3 Gruppen wurde bestimmt. Es wurde eine Rangliste der Urwerte erstellt. In jeder Gruppe wurden 10 Intervalle gleicher Breite gebildet. Das Intervall mit der Nummer 1 war: [0; 0,1). Diese Schreibweise bedeutet, dass die 0,1 nicht mehr zu diesem Intervall gehörte, sondern zum nächsten, zum Intervall 2, mit den Werten [0,1; 0,2). Intervall Nummer 10 war [0,9; 1,0]. Wurde also beispielsweise in einem Bild genau 40% der Sinusoidfläche als „Regelrechtes Endothel“ klassifiziert (=0,4), so wurde dieses Bild dem Intervall 5 zugeordnet. Die Anzahl der Bilder in jedem Intervall wurde gezählt und in je einem Histogramm für jede der 3 Gruppen dargestellt.

Längenanteil am Sinusoidumfang

Für den Längenanteil am Sinusoidumfang (**„Fehlende Endothelbedeckung“**) (siehe nachfolgendes Unterkapitel 3.1.7.) wurde analog verfahren. Hier wurden ebenfalls 10 Intervalle gebildet. Ein Wert von 0,4 bedeutete hier, dass 40% des Sinusoidumfangs nicht von Endothel bedeckt war. Wie oben wurde dieser Wert dem Intervall 5 zugeordnet.

Absolute Größe der Sinusoide

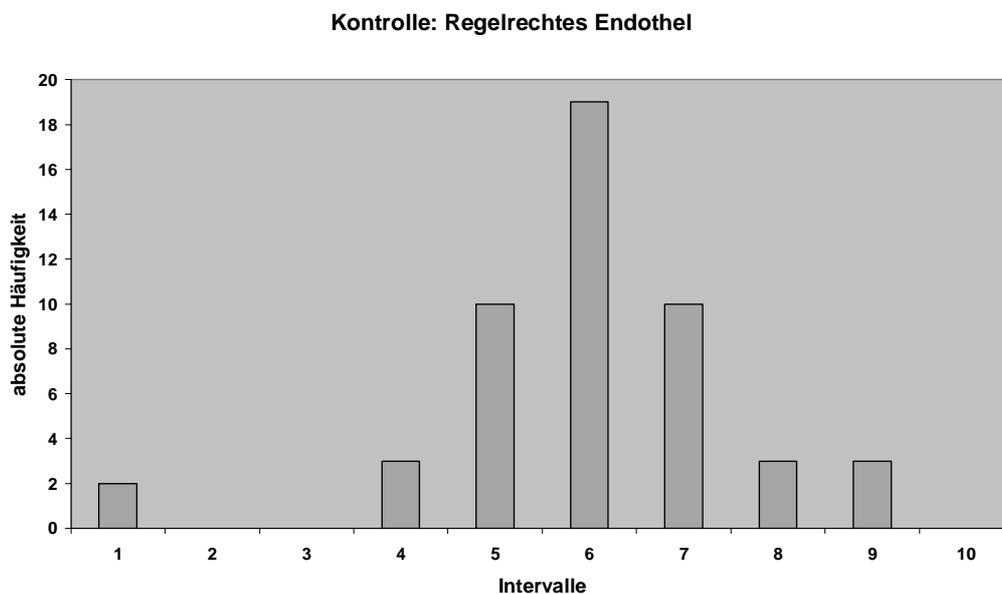
Auf gleiche Weise wurde für die Klasse **„Gesamt-Sinusoid“** (siehe nachfolgendes Unterkapitel 3.1.8.) vorgegangen. Hier wurde die absolute Größe der Sinusoide in Tausend Pixeln bestimmt. Es wurden 10 Intervalle gleicher Breite gebildet. Intervall 1 war: [0; 100). Es reichte als von 0 bis 100 Tausend Pixel. Intervall 10 war: [900; 1000].

Für die Mehrzahl der Datensätze (der Klassen: „Regelrechtes Endothel“, „Geschädigtes Endothel“, „Abgelöstes Endothel“, „Lumeninhalte“ und „Fehlende Endothelbedeckung“) wurde durch einen **Kolmogorov-Smirnov-Test** eine fehlende Normalverteilung der Flächen- oder Längenanteile nachgewiesen. Für die Flächenanteile oder die Flächengröße der Klassen „Gesamt-Endothel“, „Freies Lumen“ und „Gesamt-Sinusoid“ gelang dies nicht. Es wurden deshalb, um eine einheitliche Darstellung und gute Vergleichbarkeit zu erzielen, jeweils der Median und das 1. und 3. Quartil berechnet.

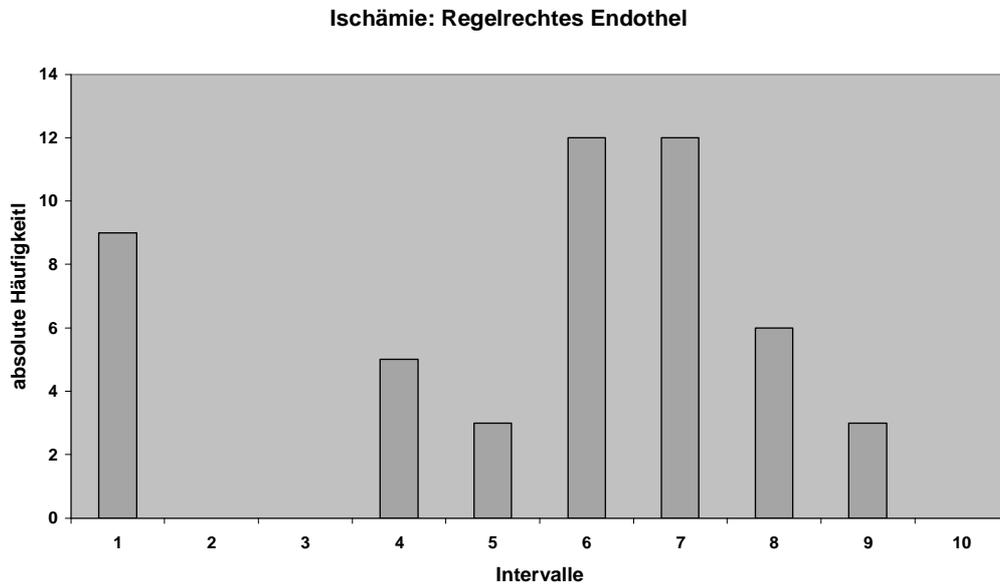
Mittels eines **Kruskal-Wallis-Tests** wurden zunächst für jede Klasse jeweils die drei Gruppen Kontrolle, Ischämie und Transplantation auf signifikante Unterschiede getestet. Anschließend wurden durch einen **Dunn-Test** jeweils 2 Gruppen gegeneinander auf Signifikanz getestet. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

In einem Histogramm wurden die **Mittelwerte** (Flächenanteil oder Längenanteil oder absolute Fläche) jeweils der 3 Gruppen direkt miteinander verglichen.

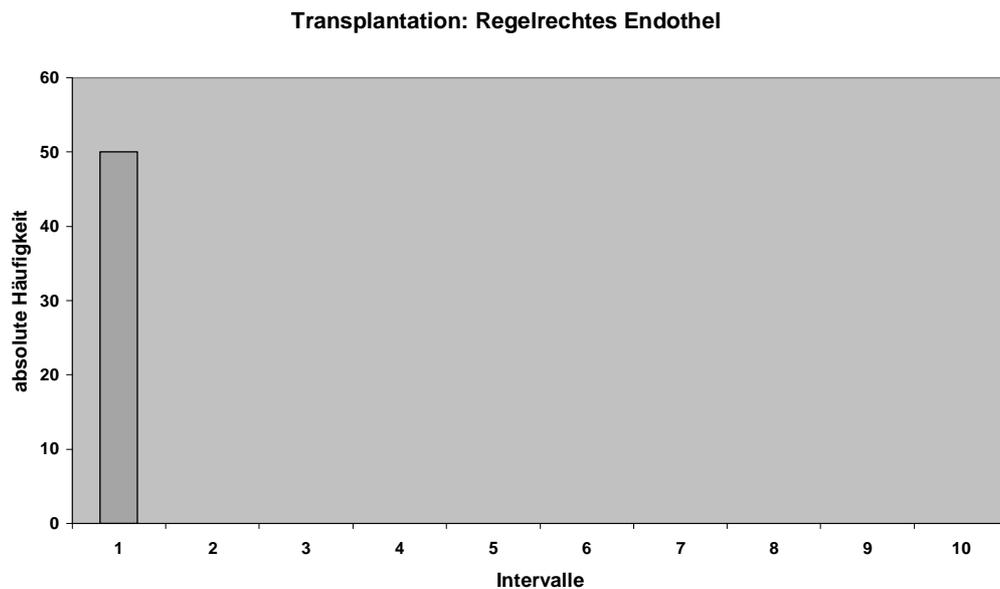
3.1.1. Regelrechtes Endothel



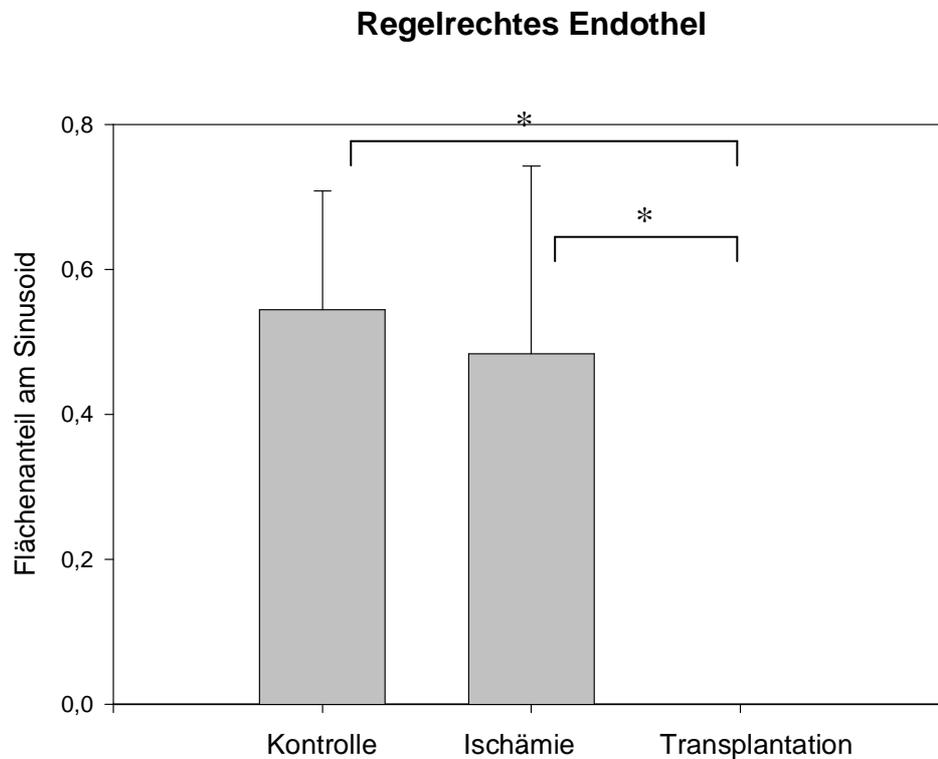
Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,57, das 1. Quartil 0,46 und das 3. Quartil 0,64.



Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,56, das 1. Quartil 0,37 und das 3. Quartil 0,67.



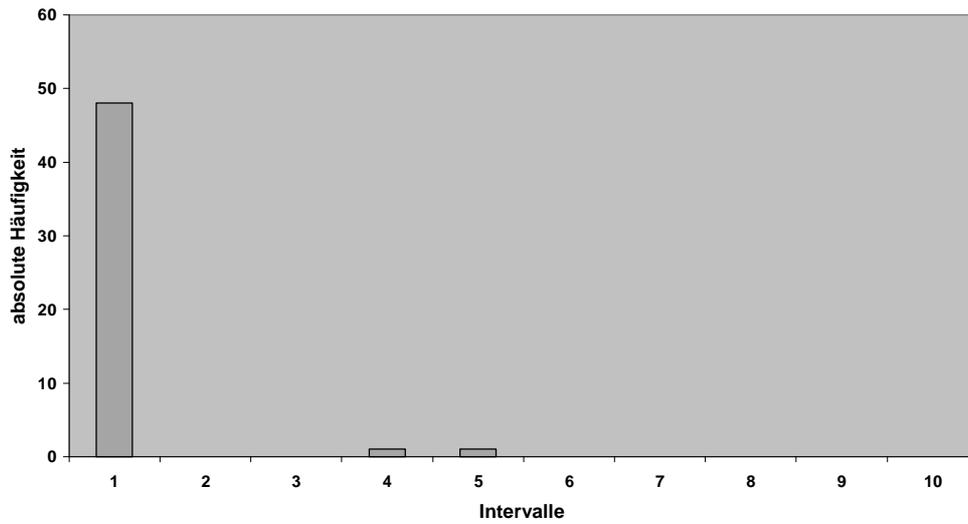
Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: [0; 0,1), Intervall 2: [0,1; 0,2), ...Intervall 10: [0,9; 1,0]. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.



Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Regelrechtes Endothel“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: 0,54±16, Ischämie: 0,48±26, Transplantation: 0±0. **Kontrolle versus (vs) Transplantation und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Ischämie.

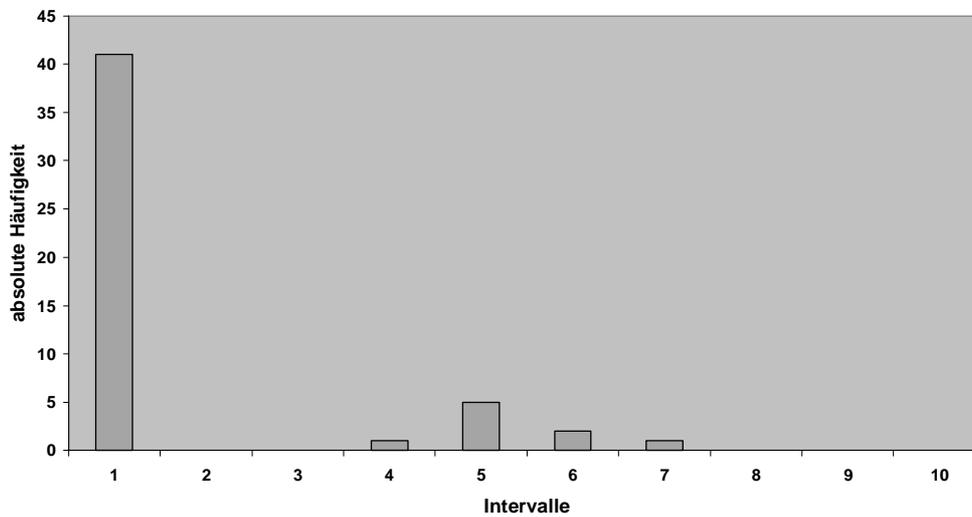
3.1.2. Geschädigtes Endothel

Kontrolle: Geschädigtes Endothel



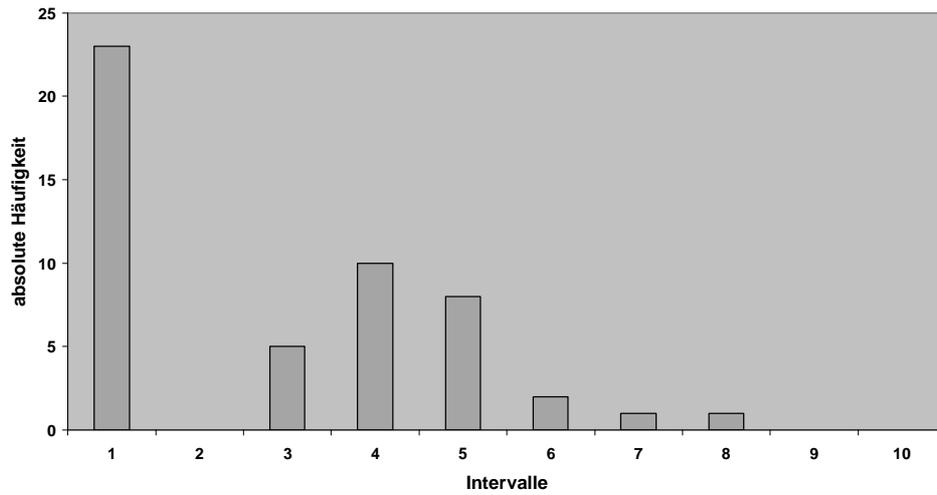
Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.

Ischämie: Geschädigtes Endothel



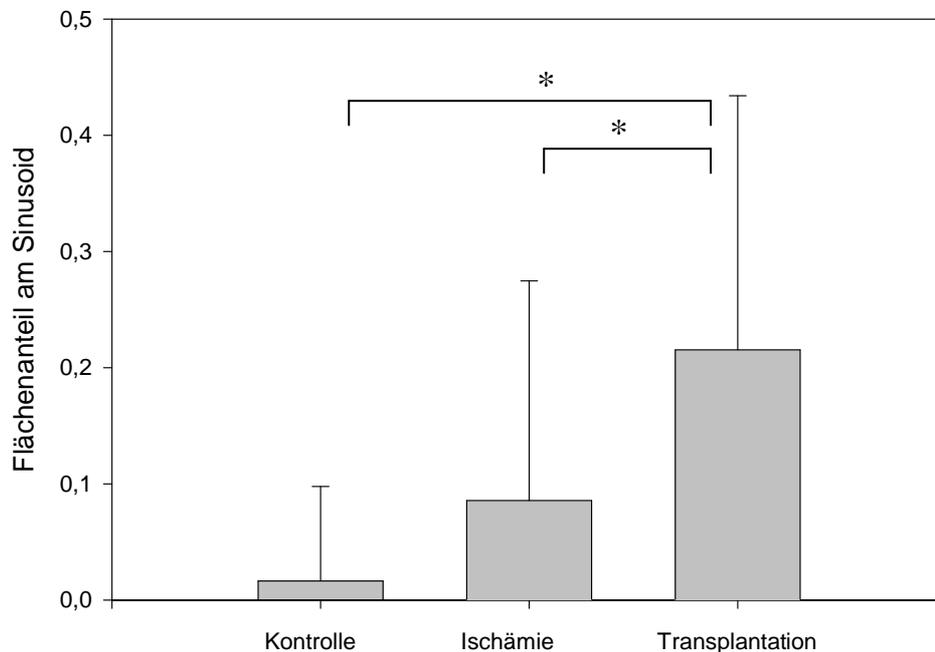
Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.

Transplantation: Geschädigtes Endothel



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: [0; 0,1), Intervall 2: [0,1; 0,2), ...Intervall 10: [0,9; 1,0]. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,23, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,38.

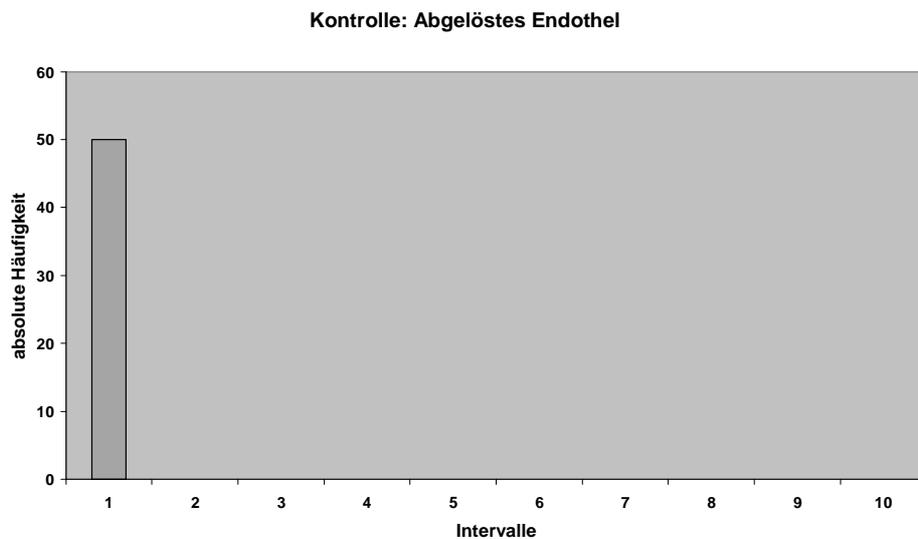
Geschädigtes Endothel



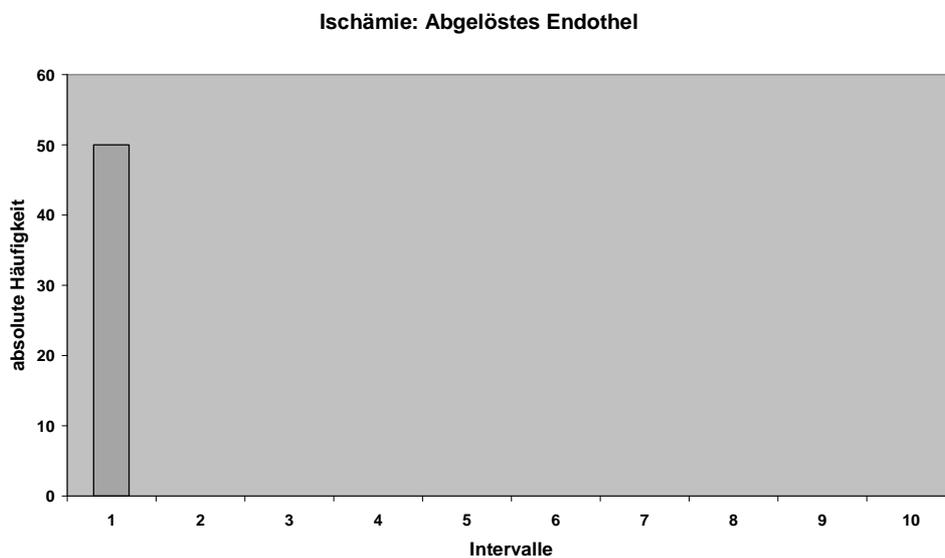
Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Geschädigtes Endothel“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,02 \pm 0,08$, Ischämie: $0,09 \pm 0,19$, Transplantation: $0,22 \pm 0,22$. **Kontrolle vs Transplantation und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Ischämie.

3.1.3. Abgelöstes Endothel

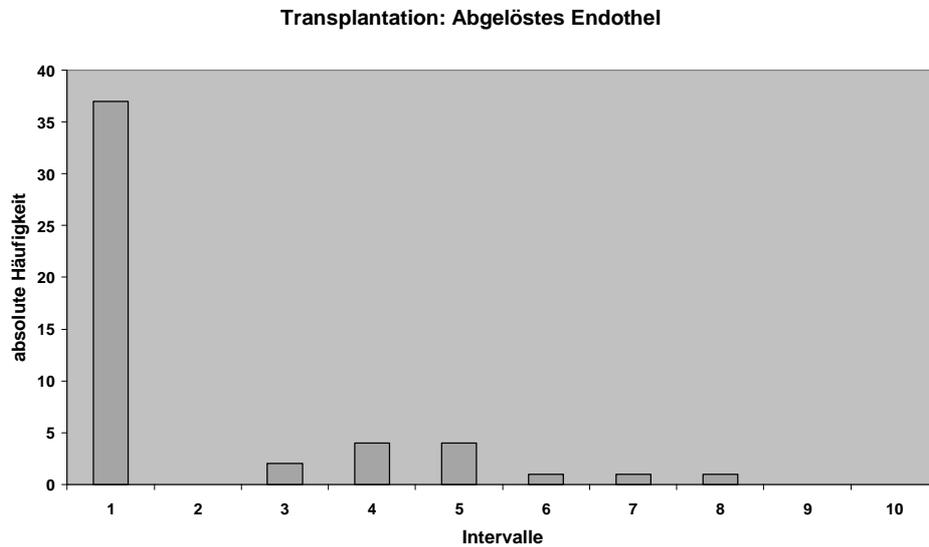
Endothelzellen, die an keiner Stelle Kontakt zu den umschließenden Leberzellen hatten, wurden dieser Klasse zugeordnet.



Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.

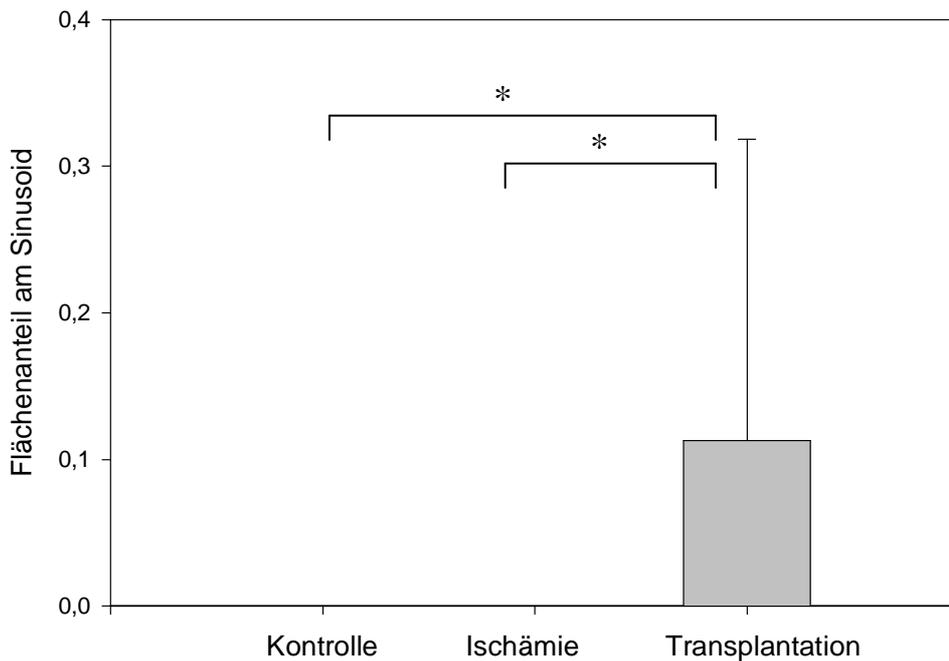


Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,26.

Abgelöstes Endothel



Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Abgelöstes Endothel“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,00 \pm 0,00$, Ischämie: $0,00 \pm 0,00$, Transplantation: $0,11 \pm 0,21$. **Kontrolle vs Transplantation und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Ischämie.

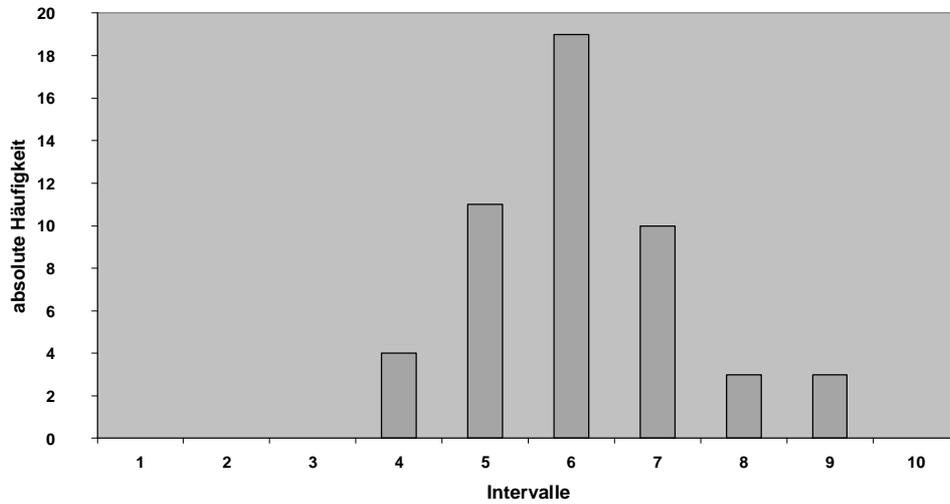
3.1.4. Gesamt-Endothel

Der Flächenanteil von „Gesamt-Endothel“ kommt zustande durch die Addition der Flächenanteile von „regelrechtes Endothel“, „beschädigtes Endothel“ und „abgelöstes Endothel“.

Die beiden Gruppen Kontrolle und Ischämie enthalten in jedem Bild entweder „regelrechtes Endothel“ oder „beschädigtes Endothel“. Diese beiden Klassen sind bereits um den Flächeninhalt von „fehlende Endothelbedeckung“ (=Randsaum) korrigiert (Siehe Kapitel 2.5.3. Klassifikation, Zu 4.: Fehlende Endothelbedeckung, Seite 40).

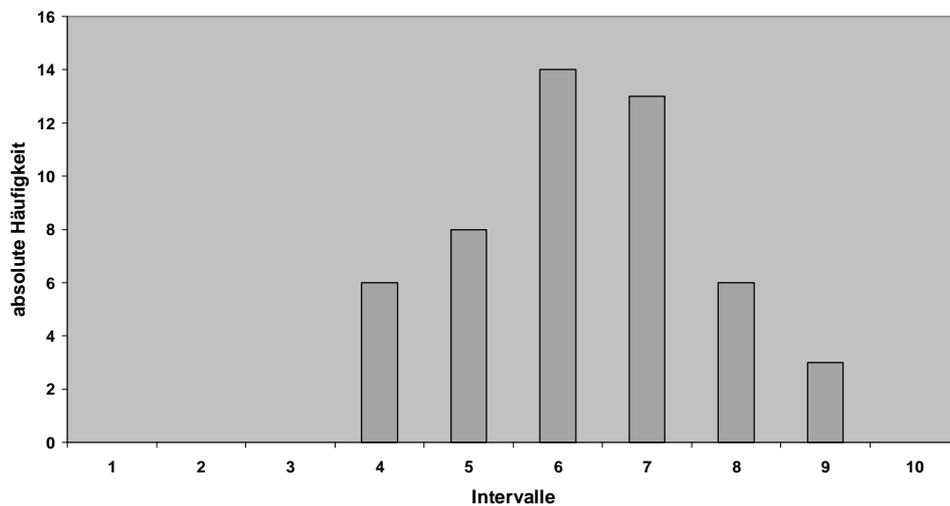
In der Transplantationsgruppe hingegen enthalten mehrere Bilder keine der drei Endothelzellklassen („regelrecht-“, „geschädigt-“ oder „abgelöst-“). Hier wurde der Flächeninhalt von „fehlende Endothelbedeckung“ als zu „Gesamt-Endothel“ gehörig gewertet.

Kontrolle: Gesamt-Endothel



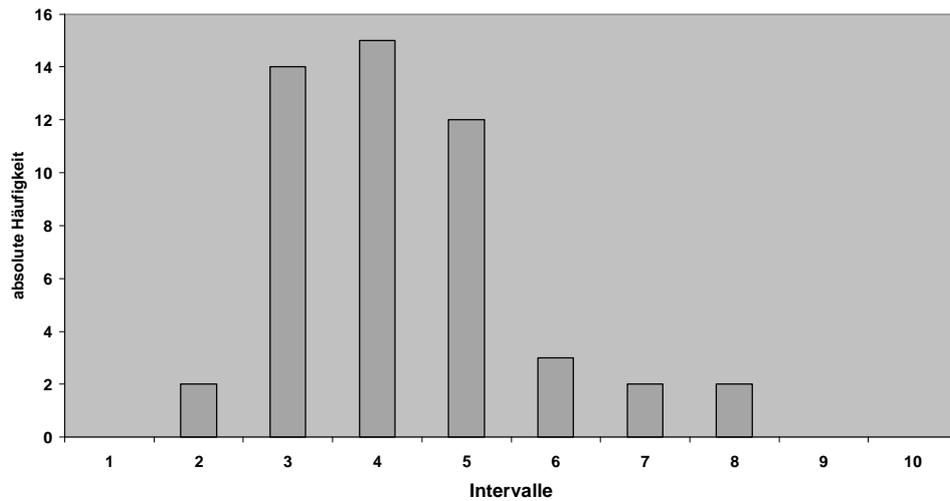
Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,57, das 1. Quartil 0,47 und das 3. Quartil 0,64.

Ischämie: Gesamt-Endothel



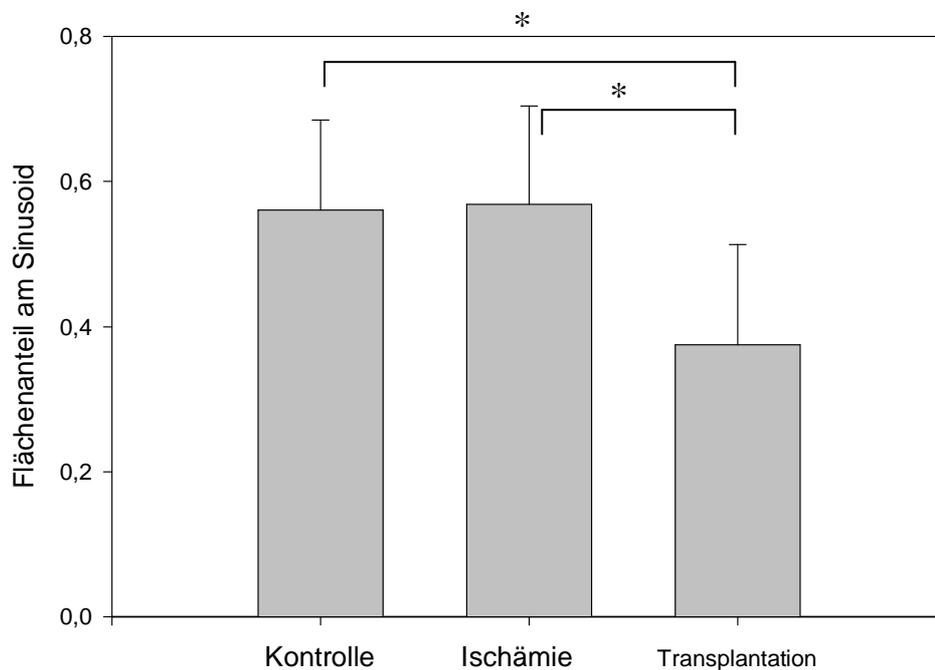
Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,56, das 1. Quartil 0,47 und das 3. Quartil 0,66.

Transplantation: Gesamt-Endothel



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: [0; 0,1), Intervall 2: [0,1; 0,2), ...Intervall 10: [0,9; 1,0]. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,36, das 1. Quartil 0,24 und das 3. Quartil 0,46.

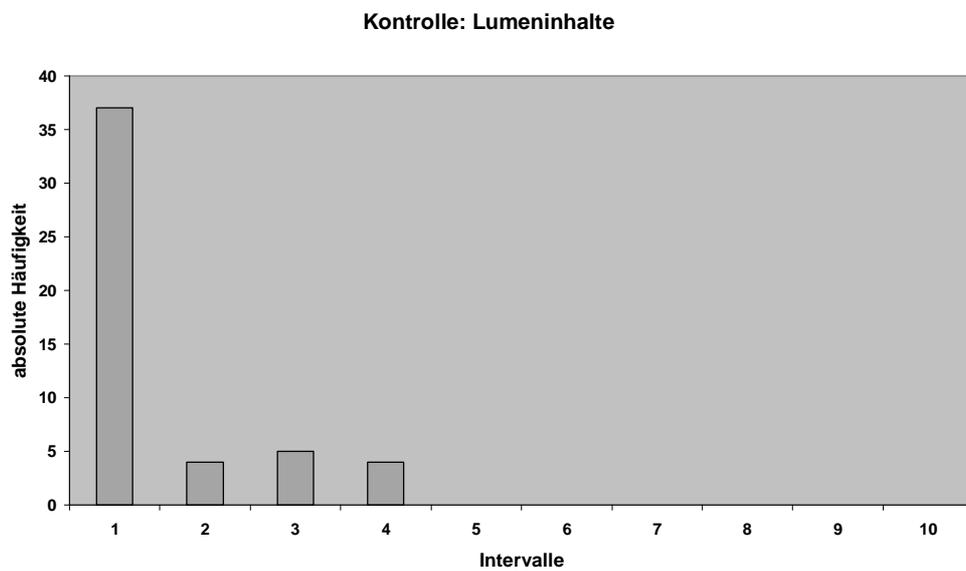
Gesamt-Endothel



Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Gesamt-Endothel“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,56 \pm 0,12$, Ischämie: $0,57 \pm 0,14$, Transplantation: $0,38 \pm 0,14$. Abweichung von der Normalverteilung konnte nicht nachgewiesen werden. **Kontrolle vs Transplantation und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Ischämie.

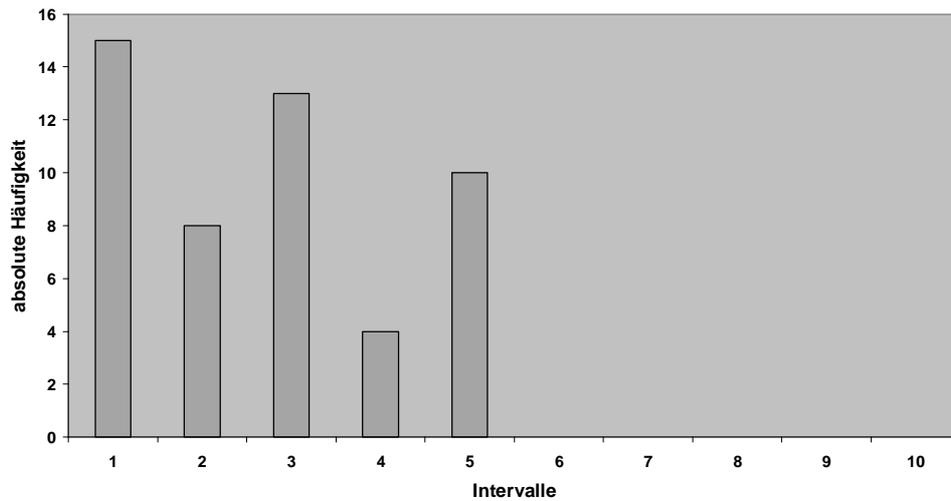
3.1.5. Lumeninhalte

Als Lumeninhalte wurden neben Blutzellen und Zelltrümmern auch abgelöste Endothelzellen angesehen, wenn sie keinen Kontakt zu den umschließenden Leberzellen hatten.



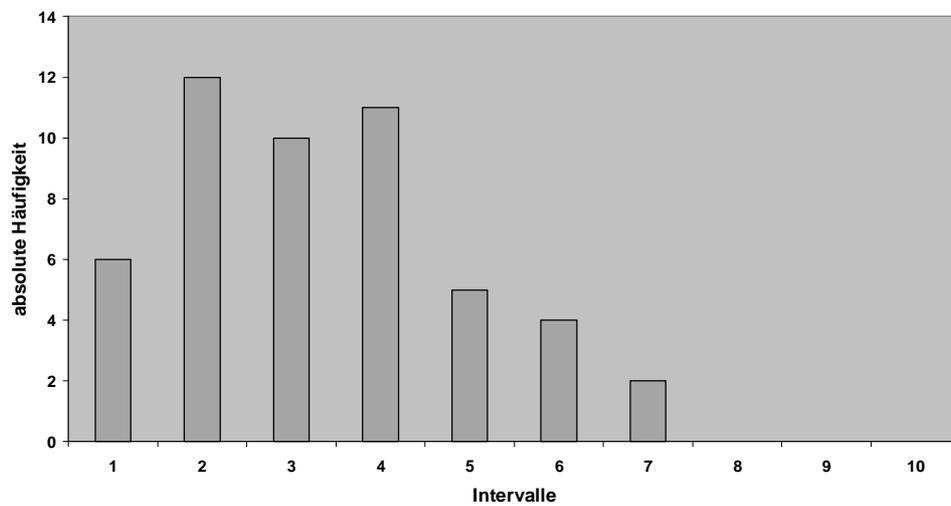
Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,10.

Ischämie: Lumeninhalte



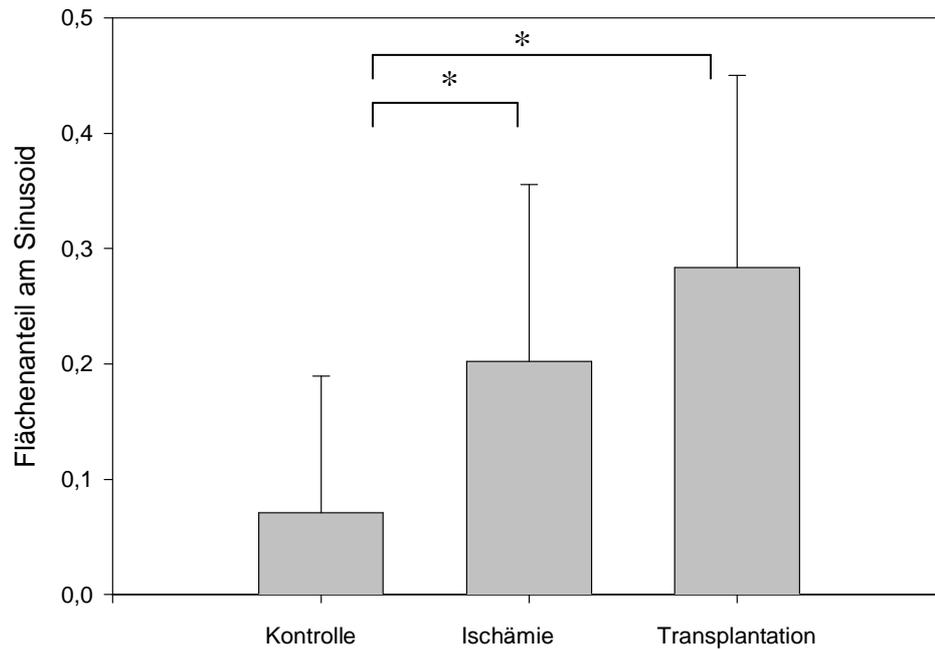
Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,20, das 1. Quartil 0,08 und das 3. Quartil 0,34.

Transplantation: Lumeninhalte



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,27, das 1. Quartil 0,17 und das 3. Quartil 0,36.

Lumeninhalte

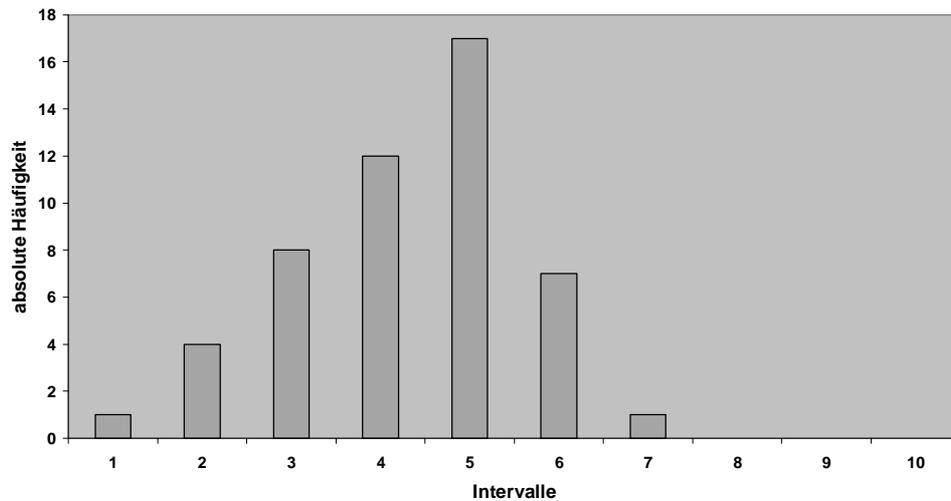


Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Lumeninhalte“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,07 \pm 0,12$, Ischämie: $0,20 \pm 0,15$, Transplantation: $0,28 \pm 0,17$. **Kontrolle vs Ischämie und Kontrolle vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Ischämie und Transplantation.

3.1.6. Freies Lumen

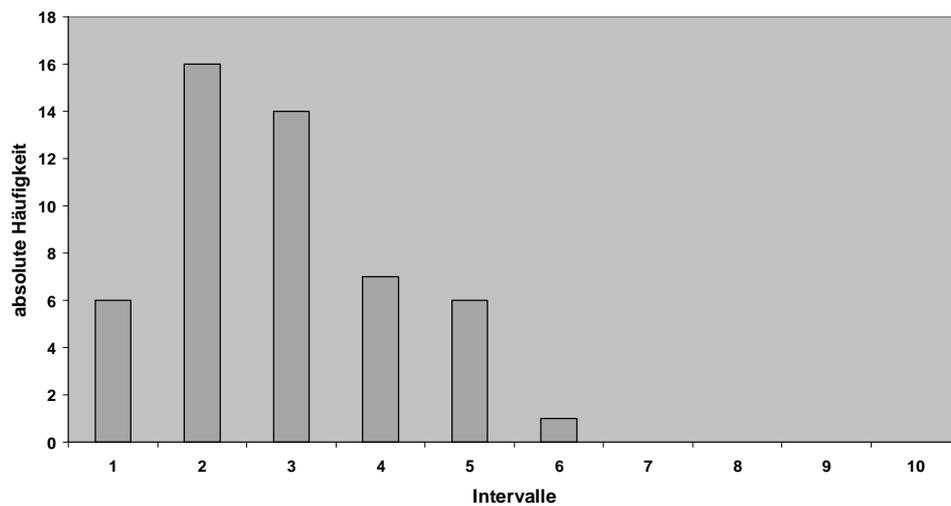
Die elektronenoptisch leeren Bereiche des Sinusoidlumens wurden hier erfasst.

Kontrolle: Freies Lumen

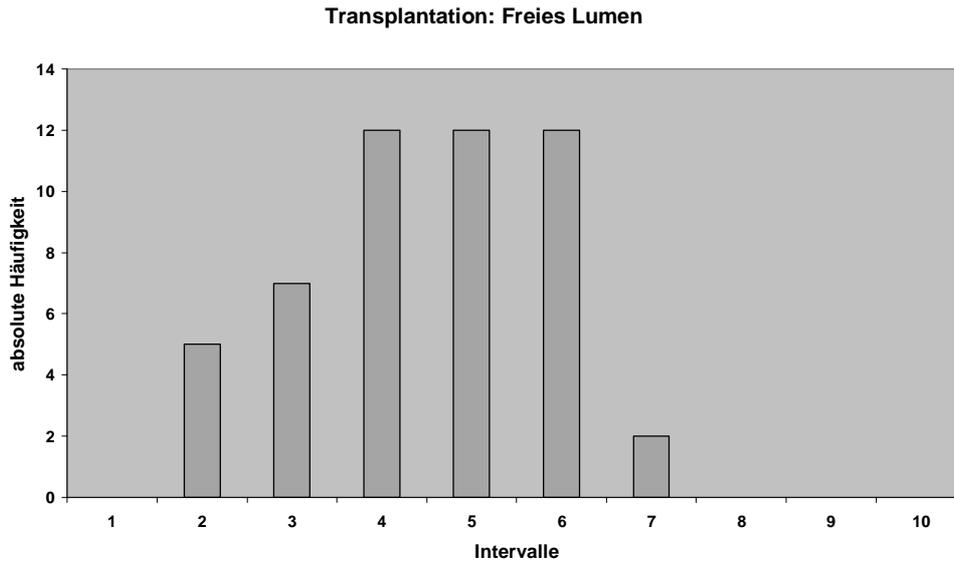


Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,39, das 1. Quartil 0,29 und das 3. Quartil 0,45.

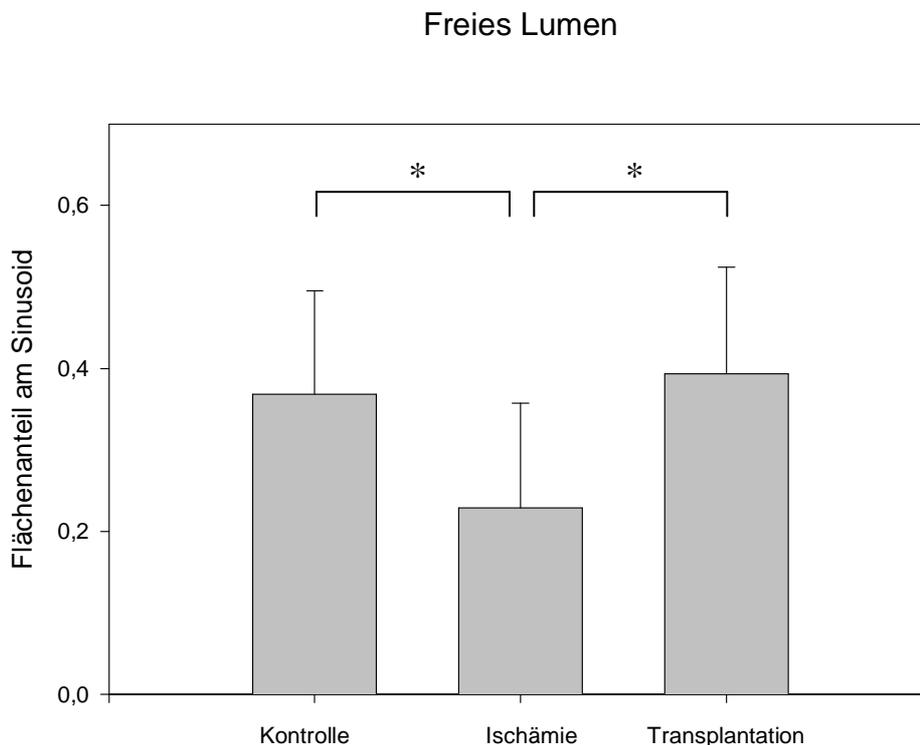
Ischämie: Freies Lumen



Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,22, das 1. Quartil 0,12 und das 3. Quartil 0,31.



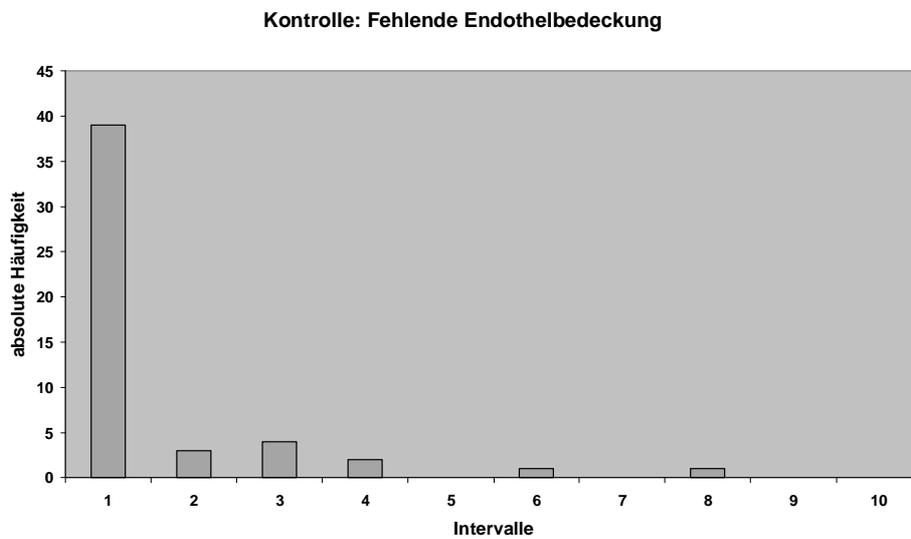
Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: [0; 0,1), Intervall 2: [0,1; 0,2), ...Intervall 10: [0,9; 1,0]. Dargestellt ist der **Anteil an der Sinusoidfläche** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,42, das 1. Quartil 0,30 und das 3. Quartil 0,51.



Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Freies Lumen“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,37 \pm 0,13$, Ischämie: $0,23 \pm 0,13$, Transplantation: $0,39 \pm 0,13$. Abweichung von der Normalverteilung konnte nicht nachgewiesen werden. **Kontrolle vs Ischämie und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Transplantation.

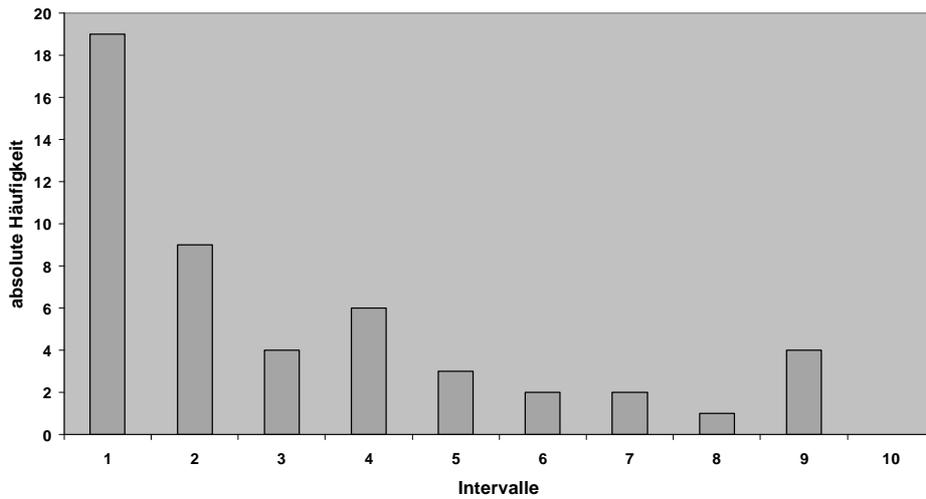
3.1.7. Fehlende Endothelbedeckung

Der Randsaum diente zur Ermittlung des Anteils am Sinusoidumfang ohne Kontakt zwischen Mikrovilli und Endothel.



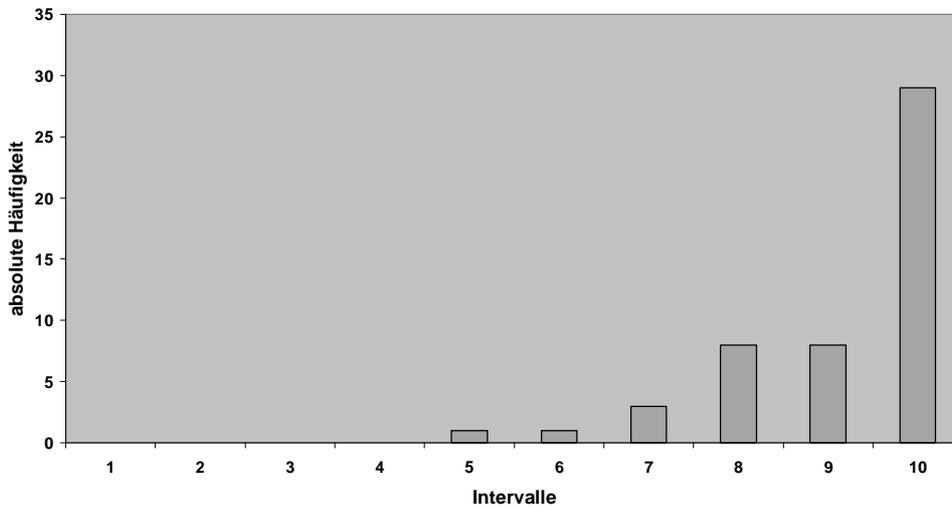
Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil am Sinusoidumfang** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,00, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,00.

Ischämie: Fehlende Endothelbedeckung



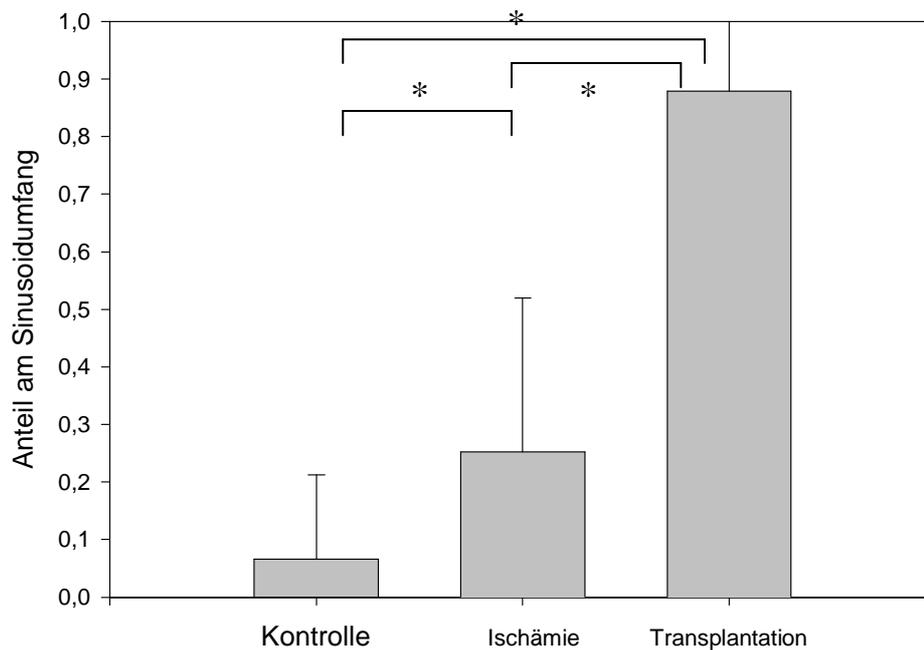
Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$. Dargestellt ist der **Anteil am Sinusoidumfang** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,17, das 1. Quartil 0,00 und das 3. Quartil 0,39.

Transplantation: Fehlende Endothelbedeckung



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: $[0; 0,1)$, Intervall 2: $[0,1; 0,2)$, ...Intervall 10: $[0,9; 1,0]$ Dargestellt ist der **Anteil am Sinusoidumfang** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 0,93, das 1. Quartil 0,79 und das 3. Quartil 0,99.

Fehlende Endothelbedeckung

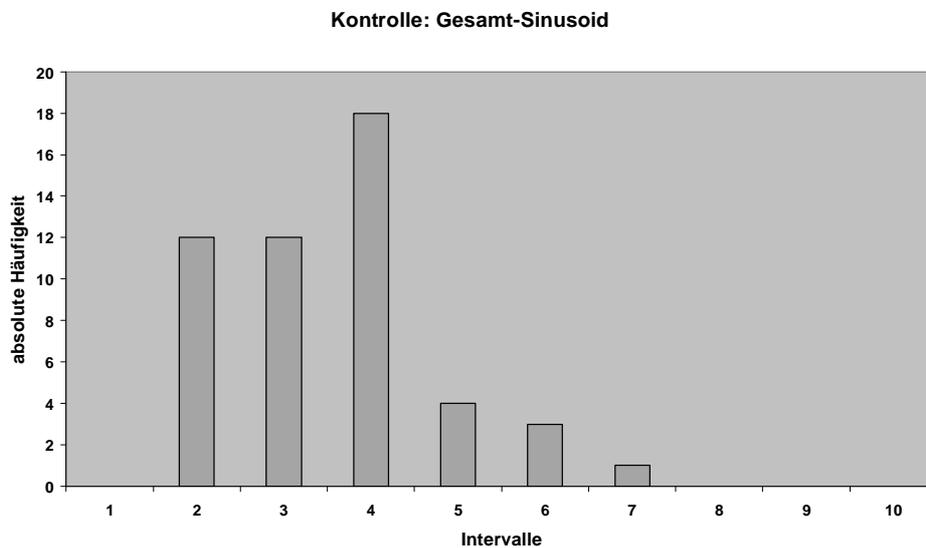


Histogramm der Flächenanteile am Sinusoid der Klasse „Fehlende Endothelbedeckung“. Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: $0,07 \pm 0,15$, Ischämie: $0,25 \pm 0,27$, Transplantation: $0,88 \pm 0,13$.

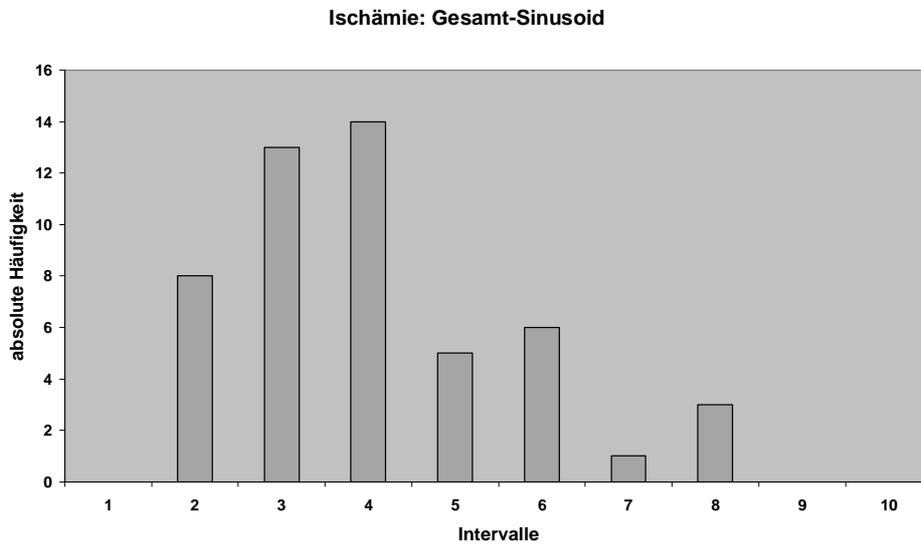
Kontrolle vs Ischämie, Kontrolle vs Transplantation und Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$

(gekennzeichnet durch Klammern und *).

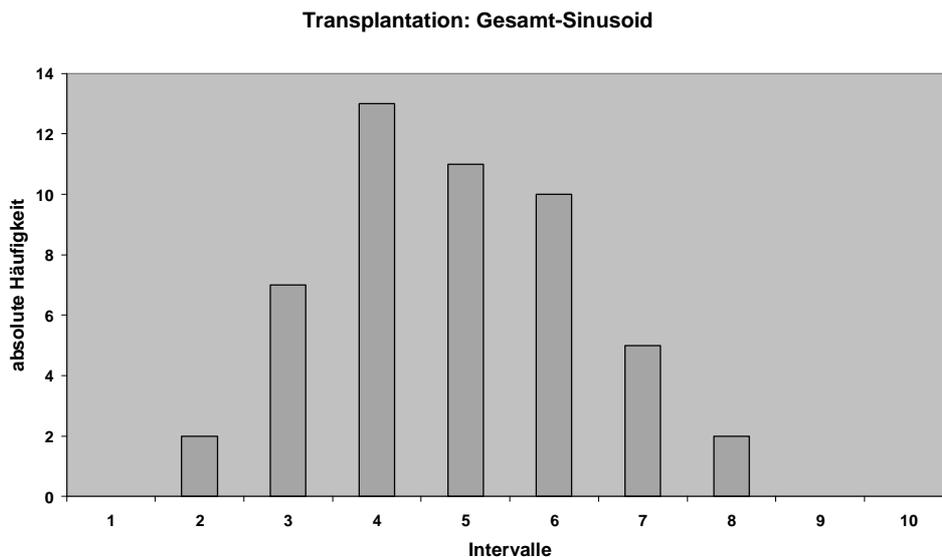
3.1.8. Gesamt-Sinusoid



Histogramm der Urdaten der Kontrollgruppe. Intervall 1: [0; 100), Intervall 2: [100; 200), ...Intervall 10: [900; 1000]. Dargestellt ist die **Sinusoidfläche (in tausend Pixel)** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 300, das 1. Quartil 201 und das 3. Quartil 367.

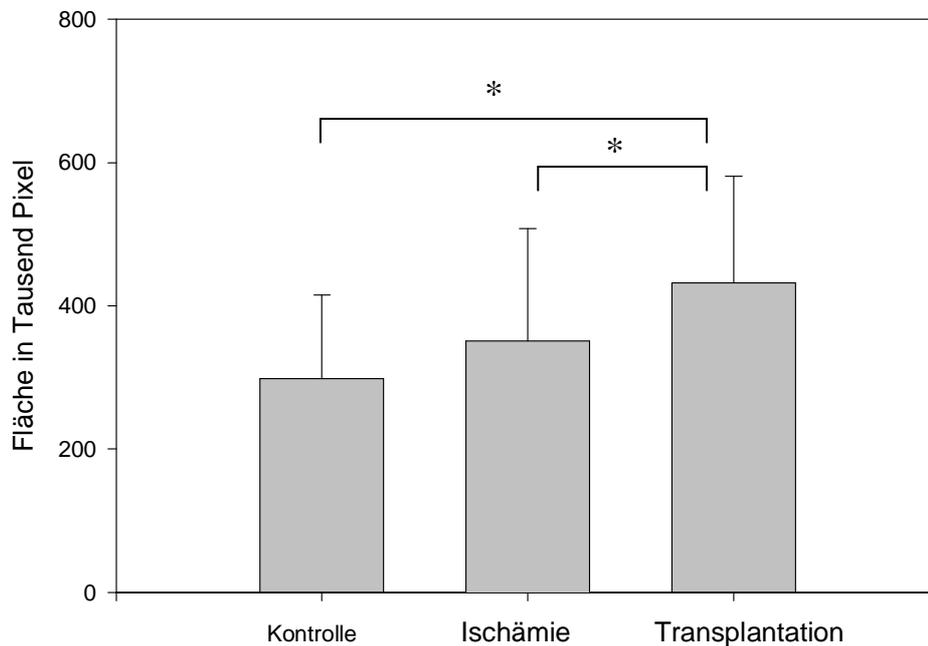


Histogramm der Urdaten der Ischämiegruppe. Intervall 1: [0; 100), Intervall 2: [100; 200), ...Intervall 10: [900; 1000] Dargestellt ist die **Sinusoidfläche (in tausend Pixel)** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse). Der Median betrug 312, das 1. Quartil 230 und das 3. Quartil 445.



Histogramm der Urdaten der Transplantationsgruppe. Intervall 1: [0; 100), Intervall 2: [100; 200), ...Intervall 10: [900; 1000] Dargestellt ist die **Sinusoidfläche (in tausend Pixel)** (x-Achse). Absolute Häufigkeit der Bilder jedes Intervalls (y-Achse).. Der Median betrug 418, das 1. Quartil 318 und das 3. Quartil 547.

Gesamt-Sinusoid



Histogramm der Flächengröße der Sinusoide (Klasse „Gesamt-Sinusoid“) (in Tausend Pixel). Mittelwerte der drei Gruppen und Standardabweichung. Kontrolle: 298 ± 118 , Ischämie: 351 ± 157 , Transplantation: 433 ± 149 . Abweichung von der Normalverteilung konnte nicht nachgewiesen werden. **Kontrolle vs Transplantation, Ischämie vs Transplantation: $p < 0,05$** (gekennzeichnet durch Klammern und *). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Ischämie.

3.2. Automatische Bildanalyse der Hepatozyten

3.2.1. Automatische Erkennung von Mitochondrien

Ein zweiter Regelsatz wurde zur **automatischen** Analyse von Mitochondrien in den Bereichen der Hepatozyten erstellt. Beispielhaft sollte so gezeigt werden, ob Cellenger komplexe Bildstrukturen finden kann.

Die Mitochondrien der drei Bildgruppen unterscheiden sich. So sind in den Mitochondrien der Transplantationsgruppe nur selten Cristae zu sehen (siehe Kapitel 2.3.3. Zeichen der Gewebe- und Zellschädigung, Seite 24). Es sollten hier nur gleichartige Mitochondrien untersucht werden. Der Regelsatz wurde deshalb anhand von 5 Aufnahmen der Kontrolle erstellt. Er wurde an 10 Bildern der Kontrollgruppe getestet. Diese 15 TEM-Aufnahmen wurden zufällig ausgewählt.

Zur Überprüfung des Klassifikationsergebnisses wurden „Masken“ hergestellt (siehe Kapitel 2.5.6. Statistische Auswertung, Seite 48). So konnte die tatsächliche Anzahl der Mitochondrien pro Bild der Anzahl der klassifizierten Mitochondrien gegenübergestellt werden.

Visuell wurde das Klassifikationsergebnis durch genaues Durchmusterung überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass von den gefundenen Mitochondrien nur 2 mit einem größeren Fehler als 10% gefunden wurden (zu Fehler siehe Kapitel 2.5.4. Automatische Erkennung von Mitochondrien, Seite 45). Das Endergebnis wurde um diese beiden Mitochondrien korrigiert. In diesem Arbeitsschritt wurden auch die falsch als Mitochondrien klassifizierten Bildobjekte gezählt.

Ergebnis:

In den 10 Testbildern waren insgesamt 1449 Mitochondrien in den Bildbereichen der Hepatozyten vorhanden. Pro Bild lag die Anzahl der Mitochondrien zwischen 98 und 192.

Richtig gefunden wurden insgesamt 278 Mitochondrien. Pro Bild wurden zwischen einem und 84 Mitochondrien richtig gefunden. Es wurden also **19%** der Mitochondrien automatisch erkannt.

Die Anzahl der falsch positiv gefundenen Mitochondrien in allen 10 Testbildern betrug: 8. Hierbei wurden 5 Peroxisomen falsch als Mitochondrium klassifiziert. Ein Lysosom und zwei Mitochondrienanteile wurden ebenfalls als Mitochondrium klassifiziert und als falsch positiv bewertet.

4. Diskussion

4.1. Diskussion des Ischämie-/Reperfusionsschadens (IRS)

Während einer Ischämie kommt es durch eine Unterbrechung des Blutflusses zu einer mangelhaften Gewebeversorgung mit Sauerstoff und Substraten. Entstehendes CO₂ führt letztlich zu einer Azidose. Das Adenosintriphosphat (ATP) wird verbraucht und Zelltod kann die Folge sein.

Wird das Gewebe vor seinem Untergang reperfundiert, so entsteht ein zusätzlicher Schaden. Hierzu führen pathophysiologische Mechanismen (siehe unten), deren Wirkungen schon wenige Minuten nach der Freigabe des Blutstroms zu beobachten sind. Der regelhafte Verlauf des IRS der Rattenleber kann in eine **frühe** (<2 Stunden nach Beginn der Reperfusion) und in eine **späte Phase** unterteilt werden (>2 Stunden nach Beginn der Reperfusion) (Jaeschke et al., 1988, 1991, 1998).

Es werden Schäden innerhalb und außerhalb der Leberzellen manifest.

4.1.1. Leberzell-Schäden

Der akute Sauerstoffmangel während einer Ischämieperiode kann zu einem Zusammenbruch der an der Mitochondrien-Innenmembran (Cristaemembran) lokalisierten **oxidativen Phosphorylierung** führen. Die mitochondriale Proteinsynthese kommt zum Stillstand. Morphologisch manifestiert sich diese Schädigung als zunehmender Verlust der Cristaemembranen. Der entstehende zelluläre Mangel an ATP kann durch eine anaerobe Glykolyse für kurze Zeit ausgeglichen werden. Das dabei entstehende Laktat senkt im Verlauf den pH-Wert. In der Folge sinkt aber doch, abhängig von der Ausprägung der Unterbrechung der Blutzufuhr und von der Temperatur, der ATP-Spiegel in der Zelle (Gutierrez G, 1991). Dies zieht ein **Versagen von ATP-abhängigen Ionenpumpen** der Zellmembranen nach sich. Unter Verbrauch von ATP wird von den Pumpen Natrium aus der Zelle transportiert. Kalium

gelangt energieabhängig in die Zelle. So wird ein Membranpotential erzeugt. Bei Ausfall der Pumpen infolge ATP-Mangel steigt die Natriumkonzentration in der Zelle an. Es kommt nachfolgend zu einem Einstrom von Wasser in die Zelle, aber auch in Zellkompartimente. Mit der gesamten Zelle schwellen auch die Mitochondrien an (Riede UN, Schaefer HE, Seite 78). Das Membransystem des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) zerfällt in kleine Einheiten. Die entstehenden Fragmente wandeln sich in kleine Bläschen um. In diese Bläschen strömt Wasser ein, es kommt so zu einer **Vakuolenbildung** in den Hepatozyten. Als vakuolige Degeneration ist dieser Zustand auch lichtmikroskopisch zu erkennen. Unumkehrbar wird die Schädigung bei einem vollständigen Zusammenbruch des Zellstoffwechsels: Einzelne Vakuolen können einen Großteil des Zellvolumens einnehmen. Lichtmikroskopisch spricht man von hydropischer Schwellung (Riede UN, Schaefer HE, Seite 17).

Gesteigerte Autophagie bewirkt eine Zunahme von sekundären **Lysosomen**.

Im **Disse-Raum** verringert der Untergang von Mikrovilli die Oberfläche der Leberzelle zum perisinusoidalen Raum hin. Der Stoffaustausch zwischen Sinusoid und Hepatozyt wird so erschwert.

Neben Schäden, die als Folge eines sinkenden ATP-Spiegels auftreten, kann es zu Schäden durch **freie Sauerstoffradikale (ROS)** kommen. Für die Bildung von ROS im Rahmen eines IRS wird in erster Linie eine Störung der in den Mitochondrien lokalisierten Atmungskette verantwortlich gemacht. Die Leberzelle enthält in hohen Konzentrationen schützende Substanzen, um sich gegen die bereits physiologischerweise permanent entstehenden Radikale zu schützen (Yu BP, 1994). Enzymatisch werden ROS durch Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-Peroxidase (GP) abgebaut. Glutathion (GSH) wird als Koenzym durch die GP zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG kann als Indikator für die Fähigkeit von Zellen oder Systemen dienen, Radikale zu beseitigen (Jaeschke H, 1990). Hohe GSH-Werte deuten darauf hin, dass deren Entgiftungskapazitäten in Hinblick auf Radikale noch nicht ausgeschöpft sind.

An isoliert perfundierten Rattenlebern konnte nach Reperfusion kein relevanter Anstieg des intrazellulären GSSG nachgewiesen werden (Metzger J et al., 1988). Weiterhin konnte in diesem Modell durch Zufuhr von Oxidantien kein zusätzlicher Leberzellschaden hervorgerufen werden (Jaeschke H et al., 1988). Es scheint, dass die vermehrte ROS-Bildung während einer Ischämie/Reperfusion in Leberzellen nur eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung eines IRS hat.

In dieser Arbeit wurden Leberzellschäden nicht berücksichtigt. Es wurde in den Gruppen nur das Sinusoid untersucht. Für die automatische Analyse der Mitochondrien der Leberzellen wurden nur TEM-Aufnahmen der Kontrollgruppe verwendet.

4.1.2. Schäden außerhalb der Leberzellen

In den verwendeten TEM-Aufnahmen, die eine frühe Phase des IRS zeigen, konnten **Endothelzellschwellung** und **Endothelzellablösung** beobachtet werden. Kupfferzellen (KC) zeigen eine zum Teil massive Zunahme sekundäre Lysosomen. Die Lumina der Sinusoide enthalten vermehrt Granulozyten und andere Blutzellen und Zelltrümmer.

Intravitalmikroskopisch konnte, bereits in der frühen Phase beginnend, eine Adhärenz von **neutrophilen Granulozyten (PMN)** nachgewiesen werden (Menger MD et al., 1991), (Marzi I et al., 1992). Mehrere Stunden nach Reperfusion emigrieren die PMN in den perisinusoidalen Raum (Hernandez LA et al., 1987).

Bereits Minuten nach Beginn der Reperfusion steigt im Blutplasma die Konzentration von **oxidiertem Glutathion (GSSG)** (Jaeschke H, Farhood A, 1991). Es gelang der direkte Nachweis von erhöhten ROS im Plasma (Kunz R et al., 1991). Gabe von GSH sowie die Gabe anderer Antioxidantien (SOD, Katalase) senkte den IRS (Nagel E et al., 1997), (Land W et al. 1994). KC können durch Gadolinium partiell blockiert werden. Dies senkte den GSSG-Spiegel im Plasma in vivo nach warmer Ischämie und nach orthotoper Lebertransplantation (Schauer RJ, 2002). Kupfferzell-Aktivierung durch Retinol hingegen führte zu einer Zunahme von GSSG (Jaeschke H, Farhood A, 1991). KC scheinen also ursächlich am Entstehen von IRS beteiligt zu sein.

Als Hauptort der Entstehung von ROS während des IRS wird heute die Plasmamembran **aktivierter KC** und (in späteren Phasen des IRS) von Leukozyten angesehen. Freie Radikale entstehen hier über die Aktivierung der membranständigen Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) (Jaeschke H, Bautista AP et al., 1991). Freie Radikale führen zu Lipidperoxidation, zu Protein- und zu DNA-Schäden (DNA: Desoxy-Ribonukleinsäure). In erster Linie auf ROS zurückgeführte Schäden treten aber schon in Konzentrationen auf, die durch direkte Schädigungsmechanismen nicht vollständig zu erklären sind (Mathews WR et al. 1994). Auf dem Wege der Signaltransduktion könnten ROS durch Aktivierung von Enzymkaskaden zu IRS führen. So ist eine durch ROS bewirkte

Modulation von mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen) nachgewiesen worden (Guyton KZ, 1996). Weiterhin wird durch ROS eine Adhärenz von PMN am sinusoidalen Endothel begünstigt (Koo A et al., 1992).

Nach Freigabe des Blutstroms nach (warmer oder kalter) Ischämie kann es zu Mikrozirkulationsstörungen kommen. Ein primäres Versagen der Zirkulation wird in der Literatur als „**no reflow**“ Phänomen bezeichnet. Dieses kann durch Hemmung der KC-Aktivierung vermindert werden (Vollmar B et al., 1994), (Imamura H et al., 1997).

Eine sekundäre Zirkulationsstörung, ein sogenanntes „**reflow paradox**“, könnte durch die Akkumulation und Adhärenz von PMN verursacht werden. Allerdings scheint die sinusoidale Perfusion durch PMN nur verzögert und nicht verhindert zu werden (Vollmar B et al., 1996). Ein Überwiegen vasokonstriktorisch wirkender Mediatoren wird als Ursache einer Mikrozirkulationsstörung nach einer Reperfusion diskutiert. Prostaglandine und Leukotriene könnten dabei eine Rolle spielen (Jaeschke H, 1998). Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- α) soll eine PMN-aktivierende Rolle spielen (Okajima K et al., 2002) und sekundäre Zirkulationsstörungen verstärken.

Der durch kalte Ischämie ausgelöste IRS führt überwiegend zu einer Schädigung der Endothelzellen, während eine warme Ischämie vermehrt die Hepatozyten schädigt. (Otto G et al. 1984). Vorliegende Ergebnisse bestätigen diese Auffassung. Die Lebern der Tiere der Transplantationsgruppe haben eine kalte Ischämie erlitten, die Lebern der Ischämiegruppe eine warme Ischämie. Die Flächenanteile von „Regelrechtes Endothel“ und von „Gesamt-Endothel“ sind in der Transplantationsgruppe signifikant ($p < 0,05$) geringer als in der Ischämiegruppe. Die Flächenanteile der Klassen „geschädigtes Endothel“, „abgelöstes Endothel“ und „fehlende Endothelbedeckung“ sind in der Transplantationsgruppe signifikant größer als in der Ischämiegruppe. (Siehe auch Kapitel 4.3. Diskussion der Ergebnisse der computerunterstützten Bildanalyse, Seite 92).

4.2. Diskussion prinzipieller Schwierigkeiten bei der computerunterstützten oder automatischen Bildanalyse

4.2.1. Bildkontrast bei TEM-Aufnahmen

Je stärker TEM-Bilder kontrastiert sind, desto größer sind die Unterschiede der mittleren Grauwerte benachbarter Bildstrukturen. Kontraste sind eine unabdingbare Voraussetzung für das menschliche Sehen. Bildanalysesysteme verfügen nicht über die Fähigkeit des menschlichen Auges, durch Zusammenschalten mehrerer Rezeptoren der Netzhaut zu rezeptiven Feldern (siehe Kapitel 4.2.6. Signalverarbeitung beim Menschen, Seite 88) auch schwache Kontraste noch relativ gut wahrzunehmen (Lehmann T et al., 1997, Seite 78).

Vielerlei Faktoren haben Einfluss auf den Kontrast in TEM-Bilder: Das Gewebe sollte möglichst lebensfrisch und unbeschädigt sein, wenn mit der **Fixierung** begonnen wird. Hat bereits eine Selbstersetzung (Autolyse) des Gewebes eingesetzt, so verschlechtert dies den Bildkontrast. Insbesondere in der Transplantationsgruppe bestand der subjektive Eindruck einer schlechteren Kontrastierung der verwendeten Aufnahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sehr deutlich sah man dies an den Leberzellkernen: Die Grauwertunterschiede zwischen Eu- und Heterochromatin waren geringer als in der Kontrollgruppe.

Nach der Fixierung kann jeder weitere Teilschritt der Bilderzeugung den Kontrast der Bilder beeinflussen. Modifikationen im Arbeitsablauf oder Konzentrationsunterschiede bei den verwendeten Chemikalien können eine Ursache sein für unterschiedlich kontrastierte Bilder. Die Gewebeentnahme und -fixierung, die Kontrastierung, die Entwässerung, die Polymerisation sowie die Nachkontrastierung müssen möglichst standardisiert erfolgen. Auch die Einstellungen am Elektronenmikroskop sowie die Entwicklung des Films spielen eine Rolle. Einige der verwendeten Aufnahmen wirkten leicht „verwaschen“. Eine nicht mehr frische **Entwicklerfüssigkeit** könnte die Erklärung hierfür sein. Weiterhin ist die Herstellung der fotografischen Abzüge sowie das verwendete **Fotopapier** wichtig. Die Härte des Fotopapiers wird in 6 Stufen angegeben. Sie reicht von 0 für weiches Papier bis 5 für sehr hart. Diese Skala gibt die Beziehung zwischen der Belichtungszeit und der dadurch erzielten Schwärzung des Papiers wieder. Weiches Papier wird weniger schnell geschwärzt als hartes, es steht ein größerer Belichtungsspielraum zur Verfügung. Die Kontraste zwischen benachbarten Bildstrukturen sind geringer, aber mehr Details sind zu sehen.

Beim **Scannen** von Fotografien kann es zu Qualitätsverlusten kommen. So lassen die verwendeten TEM-Aufnahmen die doppelte Mitochondrienmembran beim Betrachten der Fotografien mit der Lupe noch erkennen. In den digitalisierten Bildern ist die Doppelkontur

der Mitochondrienmembran nicht mehr vorhanden. Nur eine einfach konturierte Linie ist zu sehen.

Bei den verwendeten TEM-Aufnahmen bestimmen zu einem großen Teil Membranen die Kontraste im Bild. Diese von **Membranen** verursachten Kontraste sind schnittabhängig: Wird eine Membran im 90°-Winkel vom Schnitt erfasst, erscheint sie im TEM-Bild entsprechender Vergrößerung unter optimalen Bedingungen als schwarze Linie. Wird die Membran in einem flacheren Winkel angeschnitten, erscheint sie bei ansonsten gleichen Bedingungen verbreitert, unscharf, weniger schwarz oder sie ist überhaupt nicht als Membran zu erkennen. Es wird selten vorkommen, dass eine der vielen in einer Zelle vorhandenen Membranen (Zellmembran, Kernmembran, RER, Mitochondrienmembranen) senkrecht getroffen wird. Dieses wird deutlich, wenn man sich folgendes Modell vor Augen führt: Eine von einer Membran umgebene Kugel soll in beliebiger Weise geschnitten werden. Es gibt hierbei nur einen Querschnitt (der durch den Mittelpunkt der Kugel), der die Membran an allen Stellen senkrecht trifft. Meist also ist der Anschnittswinkel mehr oder weniger flach, was eine unterschiedliche Kontrastierung der Membranen zur Folge hat.

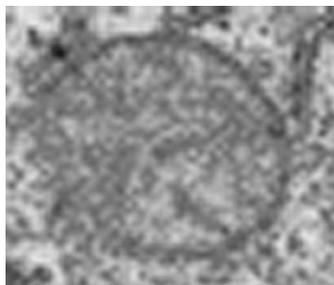


Abbildung 15: Mitochondrium. Einfluss des Schnittwinkels auf die Sichtbarkeit von Membranen in TEM-Aufnahmen. Die Mitochondrienmembran ist links nicht zu sehen, da hier der Anschnittswinkel flacher ist als im restlichen Membranbereich (Junqueira L. C, Carneiro J: Histologie. Interpretation von Gewebeschnitten, 1991, Seite 21-23).

Die verwendeten TEM-Aufnahmen lassen sich hinsichtlich des Kontrastes gut visuell auswerten.

Eine computerunterstützte Bildanalyse setzt im Allgemeinen eine Segmentierung des Bildes voraus. Die **Segmentierung** ist bei Grauwertbildern der Schritt der Bildanalyse, der entscheidend vom Bildkontrast abhängt. Ein Bildanalyse-System wie Cellenger „sieht“ nicht a priori Bildobjekte, wie der Mensch schon in einem frühen Stadium der Objekterkennung (in

Area V2, siehe Kapitel 4.2.6.: Visuelle Signalverarbeitung beim Menschen, 88), sondern es bearbeitet Pixel. In der Abb. 17 unten ist ein stark vergrößerter Ausschnitt aus einer Mitochondrienmembran dargestellt. So „sieht“ Cellenger Bilder. Aus dieser zeilenförmigen Anordnung von Bildpunkten (Pixeln) muss ein Segmentieralgorithmus Bildobjekte erzeugen.

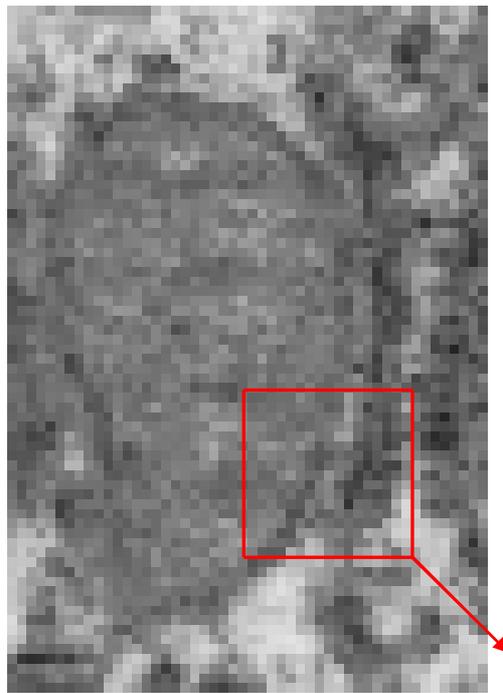


Abbildung 16: Mitochondrium, dem rechts RER anliegt. Der Bildausschnitt ist in der Abb. 17 unten vergrößert dargestellt.

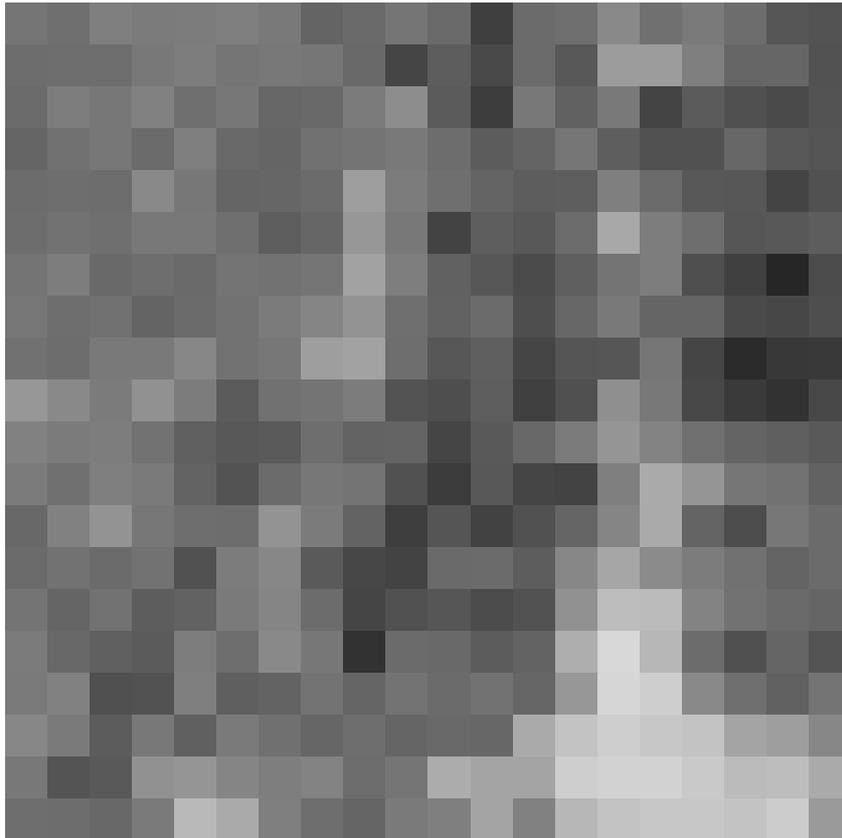


Abbildung 17: Ausschnitt aus der Mitochondrienmembran und angrenzendem RER der Abb. 16 oben. Die Abbildung soll veranschaulichen, dass für Cellenger Bilder zunächst nur eine zeilenförmige Anordnung von Pixeln sind. Wenn ein Mensch eine TEM-Aufnahme in dieser Vergrößerung präsentiert bekäme, mit der Aufforderung, die Mitochondriengrenzen einzuzeichnen, würde dies sicherlich nur in einem geringen Umfang gelingen.

Beim Menschen hingegen ist schon auf der Ebene der Netzhaut eine Überlappung der rezeptiven Felder gegeben. Es kommt bereits hier zu einer Kontrastverstärkung (ON-Zentrum- und OFF-Zentrum-Neuronen, siehe Kapitel 4.2.6.: Visuelle Signalverarbeitung beim Menschen, Seite 88).

Kontrastkorrektur:

Es werden in der Literatur eine Vielzahl von Möglichkeiten genannt, den Kontrast von Bildern zu verbessern (Lehmann T et al., 1997, Seite 342).

Zweck einer automatischen/semiautomatischen Bildanalyse ist insbesondere eine Zeitersparnis. Eine an jedes Einzelbild angepasste Kontrastkorrektur ist in großen Datensätzen sicherlich für die meisten Fragestellungen sinnlos, da zu zeitaufwändig. Deshalb wurde in dieser Arbeit auch für alle Bilder einheitlich eine Kontrastkorrektur vorgenommen (siehe

Kapitel 2.2.7. Erzeugung der digitalisierten Bilddaten, Seite 17). Da aber kein systematischer Aufnahmefehler über alle Bilder vorlag, führten diese Maßnahmen nur zu einer **Bildverbesserung**, das heißt zu subjektiv korrigierten Kontrasten in den meisten Aufnahmen (Lehmann T et al., 1997, Seite 321). Es gibt bei zufälligen Aufnahme Fehlern wie in den verwendeten Bildern keine Möglichkeit einer **Bildkorrektur** hinsichtlich des Bildkontrastes.

Aus allen genannten Gründen werden für eine maschinelle Analyse von Grauwertbildern **höhere** Bildkontraste als für das menschliche Auge benötigt.

Um die Ergebnisse einer automatischen/semiautomatischen Bildanalyse mit Cellenger zu verbessern, kann versucht werden, schon bei der **Präparaterzeugung** stärker zu kontrastieren. Dieses könnte mit histochemischen oder immunhistochemischen Methoden geschehen.

Eine relativ selektive histochemische Methode führt zu einer starken Kontrastierung von Vesikeln und Zisternen (Kontrastierverfahren nach Thiéry) (Steer MW, 1984). Lysosomen können selektiv durch den Nachweis der sauren Phosphatase dargestellt werden (Junqueira L. C, Carneiro J, 1991, S.35).

Immunhistochemische Methoden sind zum Beispiel das Immuno-Peroxidase-Verfahren oder das Immuno-Gold-Verfahren. Sie können **selektiv** den Golgiapparat einer TEM-Aufnahme kontrastieren. So kann Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie miteinander kombiniert werden. Die interessierenden Zellorganellen oder -strukturen werden selektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Die dynamischen Vorgänge der lebenden Zelle können beobachtet werden. Zu einem gewünschten Zeitpunkt wird dann ein Präparat für eine TEM-Untersuchung hergestellt. Hierbei werden die interessierenden Strukturen (beziehungsweise die in den Strukturen vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe) mit einem Immuno-Goldverfahren selektiv für das TEM sichtbar gemacht. Zeitaufwändig kann dann das visuelle Auffinden der gesuchten Strukturen in den TEM-Bildern sein. Es müssen eine große Anzahl von Schnitten hergestellt und gesichtet werden (Polishchuk RS et al., 2003).

Diese Verfahren werden limitiert durch verschiedene Nachteile. So kommt es meist auch zur Kontrastierung von anderen Strukturen. Gold- oder Osmiumpartikel können zu Artefakten führen. Bildung flüchtiger Radikale bei der Immuno-Peroxidase-Reaktion können das Verfahren auf membranumschlossene Kompartimente einer Zelle beschränken.

Weiterhin sind diese Methoden kostenintensiv.

4.2.2. Bildtextur und Bildrauschen in TEM-Aufnahmen

Die Textur eines Bildobjekts könnte man als ihr „Muster“ bezeichnen. Ist ein Bildobjekt homogen texturiert, so besteht es aus Elementarstrukturen, die sich regelmäßig wiederholen. Diese Elementarstrukturen (Textone, oder englisch: Textel, von texture element) können sehr klein sein. Sie erlauben eine mathematische Beschreibung der flächigen, inneren Anteile eines Bildobjekts. Bildobjekte unterschiedlicher Texturen können relativ einfach voneinander abgegrenzt werden. Die **Mustererkennung** stellt eine Fülle von Verfahren zur Verfügung, Texturen zu beschreiben. Die Entwicklung eines solchen Verfahrens (um eine bestimmte Textur zu beschreiben) kann aufwändig sein.

Medizinische Bilder wie TEM-Aufnahmen enthalten jedoch zufällige Elemente. Ein bestimmter, von einem menschlichen Betrachter als homogen und „einfarbig“ empfundener Bildbereich weist bei diesen Bildern auf Pixelebene eine sehr breite Streuung der Grauwerte auf. Diese Streuung lässt sich mathematisch (bisher) nicht ausreichend fassen (Lehmann T et al., 1997, S. 383).

Filter können hier nur in beschränktem Umfang korrigierend wirken. Filter sind bildanalytische Operationen, die zum Beispiel in der Lage sind, Bildrauschen zu reduzieren. Wenn ein Bild durch unregelmäßige Störsignale überlagert ist, spricht man von Bildrauschen. Einfache Filter zur Rauschunterdrückung „glätten“ ein Bild, indem beispielsweise von jeweils 3x3 nebeneinander liegenden Pixeln der Graustufen-Mittelwert berechnet wird (Wiltgen M, 1999, S. 101). Nachteil ist eine abnehmende Bildschärfe. Filter können hilfreich sein, wenn nur vereinzelte Pixel eines Bildobjekts weit vom durchschnittlichen Grauwert des Objektes entfernt liegen. Wenn aber die Streuung aller Pixel sehr stark ist, ist die Anwendung von derartigen Filtern limitiert.

In vorliegender Arbeit wurden einfache Histogrammtransformationen verwendet, die Unterschiede in der Bildqualität zwischen den einzelnen TEM-Aufnahmen ausgleichen sollten.

Die unregelmäßige Texturierung in den vorliegenden TEM-Aufnahmen führte zu einer Erschwerung der Bildsegmentierung (ebenso wie eine nicht ausreichende Kontrastierung der Bilder). Durch Segmentierverfahren sollen Bildbereiche relativ homogener Grauwert-Verteilung erkannt und zu Bildobjekten zusammengefügt werden. Starke und unregelmäßige

Streuung der Grauwerte einer im Bild dargestellten Struktur um einen Graustufen-Mittelwert führen zu Segmentierfehlern. Diese Schwierigkeiten zeigten sich beispielsweise darin, dass eine bestimmte Segmentierung nur bis zu 60% der Mitochondrien in **einem** Bild gut segmentieren konnte.

4.2.3. Bildobjektform und Pixelraster in digitalisierten TEM-Aufnahmen

Die TEM-Aufnahmen vorliegender Arbeit weisen eine **hohe Formenvielfalt** der abgebildeten Strukturen auf. Mitochondrien beispielsweise erscheinen dem menschlichen Betrachter als „rundlich“. Diese rundliche Form ist aber sehr variabel (siehe Abb. 18 unten).

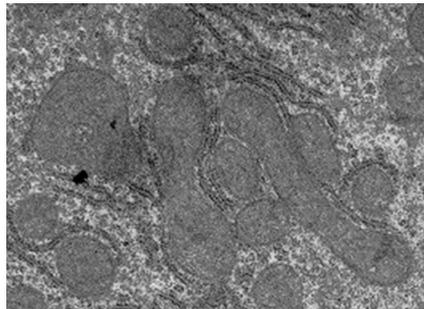
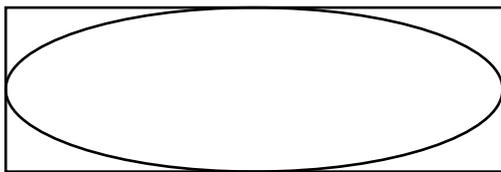


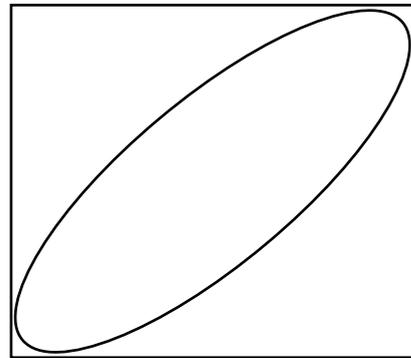
Abbildung 18: Mitochondrien. Unterschiedliche Formen im TEM-Bild. Mehrere runde Anschnitte neben zwei schlauchförmigen Mitochondrien. Links oben ein klobiges Mitochondrium von beinahe dreieckiger Form.

In dieser Arbeit wurde untersucht, **Maße für die „Rundheit“** von Mitochondrien zu finden. So war ein verwendeter Parameter: „Wie sehr weicht der Umfang eines Bildobjekts von dem Umfang einer Ellipse um den Bildobjektmittelpunkt ab?“ Dabei ist der Flächeninhalt der Ellipse gleich dem Flächeninhalt des Bildobjekts („elliptic fit“). Ein weiterer Parameter war: Verhältnis von Länge zu Breite („length/width“). Ein dritter Parameter, der „shape index“, setzte den Umfang eines Bildobjekts in ein Verhältnis zu seinem Flächeninhalt (siehe Kapitel 2.5.4. Automatische Erkennung von Mitochondrien, Seite 45).

Bei der mathematischen Beschreibung dieser rundlichen Formen wirkt sich das zugrundeliegende **Pixelraster** der digitalisierten TEM-Aufnahmen erschwerend aus. Ein Beispiel soll dies zeigen: Die Form eines Bildobjekts kann auch beschrieben werden durch den Flächeninhalt seiner „bounding box“. Die „bounding box“ ist das kleinste umschließende Rechteck eines Bildobjekts parallel zum Pixelraster. Das Pixelraster kann aufgefasst werden als ein Gitter bestehend aus senkrechten und waagrechten Linien. Das Merkmal „bounding box“ berechnet demnach unterschiedliche Werte für ein längsovales Bildobjekt, je nach Orientierung des Bildobjekts im Bild (siehe Abb. 19 unten).



A)



B)

Abbildung 19: A) Eine parallel zum Pixelraster liegende Ellipse mit ihrem kleinsten, umschließenden Rechteck. B) Der Längsdurchmesser der Ellipse bildet einen Winkel von 45° mit den horizontalen und vertikalen Linien des Pixelrasters. Obwohl beide Ellipsen in Form und Größe identisch sind, ist die „bounding box“ in B) erheblich größer als in A).

Das Beispiel illustriert, dass der intuitive Begriff „rund“ für ein auf einem Pixelraster arbeitendem Bildanalyseystem wie Cellenger schon bei relativ einfachen rundlichen Formen auf Schwierigkeiten stoßen kann.

Die Verwendung eines Vektormodells bei der Darstellung von Bilddaten vermeidet den Nachteil des Pixel-Rastermodells der ungenauen Abbildung der Geometrie. In einem Vektormodell werden Bildobjekte durch Vektoren räumlich exakt beschrieben. Ein Kreis etwa wird definiert durch die Koordinaten des Mittelpunktes und durch den Radius. Die Linie des Kreisumfangs ist dann nicht mehr treppenförmig wie im Pixelraster sondern eben kreisrund. Die **Darstellung** des Kreises auf dem Monitor eines Rechners ist dabei aus technischen Gründen allerdings weiterhin treppenförmig. Lediglich die Zahlen, mit denen der Computer intern rechnet, sind andere.

Nachteil eines Vektormodells sind häufig ein komplexeres Datenmodell. Dieses Datenmodell muss aufwändig programmiert werden.

4.2.4. Bildhomogenität der verwendeten TEM-Aufnahmen

Bei einer computerunterstützten oder automatischen Bildanalyse müssen sehr hohe Anforderungen an die Homogenität des Bildmaterials gestellt werden. Das heißt beispielsweise, dass die primären Lysosomen in **allen** Bildern ähnliche Grauwerte haben sollten. Die Grauwerte der einzelnen Pixel der Bildobjekte einer Struktur sollten weiterhin vergleichbar sein in ihrer Streuung um den Graustufen-Mittelwert. Dieses ist wichtig, da ja ein Regelsatz auf alle auszuwertenden Bilder angewendet werden soll. Der Regelsatz soll **übertragbar** (portierbar) sein.

Hierbei kann eine visuelle Beurteilung der Homogenität des Bildmaterials täuschen. Mittels Cellenger können auf unterschiedliche Weise Bilder hinsichtlich ihrer Homogenität untersucht werden. So können durch Segmentierung in unterschiedlichen Bildern Bildobjekte erzeugt werden. Miteinander vergleichbare Bildobjekte, wie beispielsweise ähnlich aussehende Mitochondrien, können dann untersucht werden. Die Standardabweichung der Grauwerte (in der 256-stufigen, dimensionslosen Skala der 8-Bit-Bilder) der Pixel von **einzelnen** Mitochondrien-Bildobjekten in den verwendeten Aufnahmen unterschieden sich erheblich. Die Standardabweichungen lagen für einzelne Mitochondrien-Bildobjekte in visuell „verwaschen“ erscheinenden Bildern bei 10. In anderen, „gekörnt“ erscheinenden Bildern lag sie bei 30.

Die Verteilung der Grauwerte eines gesamten Bildes kann in Form eines **Histogramms** betrachtet werden. Der in erster Näherung glockenförmige Verlauf der Histogrammkurve wies bei visuell ähnlichen Bildern (mit ähnlich großem Zellkern und ähnlich großem Sinusoid) erhebliche Unterschiede in der Breite der Kurve auf (siehe Kapitel: 2.2.7. Erzeugung der digitalisierten Bilddaten, Seite 17).

Die Bilder enthalten im oberen Bildbereich ein schwarzes Feld welches Angaben über das Entstehungsdatum der Aufnahmen und ähnliches enthält. Dieses schwarze Feld sollte zum weißen Bildrand einen scharfen Rand besitzen. Dieser Rand ist aber teilweise leicht verwaschen. Dies weist auf die Möglichkeit hin, dass die teilweise inhomogene Bildqualität durch Prozesse bei der Filmentwicklung entstanden ist.

Die Braunverfärbungen bei mehreren Bildern sind hingegen die Folge ungenügender Fixierung der Fotografien.

Diese Inhomogenitäten können während der visuellen Bildanalyse vom Auswerter unbewusst oder bewusst korrigiert werden., die automatische Analyse jedoch muss hier explizit vom Anwender unterstützt werden. Die Bilder waren ursprünglich für die visuelle Auswertung angefertigt worden. Die beschriebenen Effekte führen dazu, dass ein Regelsatz nur eingeschränkt auf andere Bildserien übertragbar ist.

4.2.5. Merkmalsraum

Nötig für die **automatische** Analyse von Bildern ist es, **Merkmale** zu finden, in denen sich die gesuchten Bildobjekte vom restlichen Bild unterscheiden.

Für die Klassifikation von Mitochondrien wurde zunächst eine Tabelle erstellt, die alle Merkmale enthielt, welche von Cellenger berechnet werden können und die geeignet schienen, Mitochondrien zu beschreiben. Die Tabelle enthielt Grauwert-, Form- und Homogenitätsmerkmale.

Anschließend wurden 5 Trainingsbilder segmentiert. Die Parameter der Multiresolution-Segmentierung wurden so gewählt, dass in den einzelnen Bildern ein Teil der Mitochondrien

„richtig“ segmentiert wurden. Von 100 derartigen „Mitochondrien-Bildobjekten“ wurden nun die oben erwähnten Merkmale bestimmt und in die Tabelle eingetragen. Dazu musste jedes einzelne Objekt „angeklickt“ werden. Alle in Cellenger zur Verfügung gestellten Merkmale können dann automatisch berechnet werden. Die Werte wurden in eine Tabelle übertragen werden. Diese Auswahl der Mitochondrien-Bildobjekte kann nicht als zufällig angesehen werden, da es sich um Mitochondrien handelte, die von einem Segmentieralgorithmus gut segmentiert wurden. Sie müssen sich also von den nicht gut segmentierten Mitochondrien unterscheiden. Es wurde dieses Verfahren gewählt, da Cellenger zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit noch keine Möglichkeit des interaktiven Arbeitens bot. Es war nicht möglich, zufällig ausgewählte Mitochondrien manuell zu umfahren und dann zu untersuchen. Das verwendete Verfahren diente einer groben Orientierung.

Es wurden nun aus der Vielzahl der Merkmale diejenigen ausgewählt, deren Messwerte einen Häufung aufwiesen (siehe Kapitel 2.5.4. Automatische Erkennung von Mitochondrien, Seite 45).

Für jedes der so ausgewählten Merkmale wurden dann **Wertebereiche** bestimmt.

Beispielsweise wurden Mitochondrien von bis zu 4000 Pixel Größe gefunden. Hierzu wurde ein „Sicherheitsabstand“ von 1000 Pixeln addiert. Auf diese Weise wurde die obere Grenze für die Größe von Mitochondrien bei 5000 Pixel festgelegt. Mit der unteren Grenze wurde analog verfahren. Hier wurde die Grenze bei 500 Pixel gesetzt. Der Wertebereich für die Fläche der Mitochondrien umfasste also den Bereich zwischen 500 und 5000 Pixel. Es wurde so ein eindimensionale **Merkmalsraum** geschaffen. Allgemein spannen m Merkmale einen m -dimensionalen Merkmalsraum auf.

Es wurde auf diese Weise ein **Stichprobenverfahren** zur Bestimmung der Merkmale einer Klasse im Merkmalsraum verwendet (Wiltgen M, 1999, S. 206).

Für alle ausgewählten Merkmale wurden analog Wertebereiche bestimmt. Keines der Merkmale erwies sich aber als **spezifisch** für die Klassifikation von Mitochondrien. Deshalb wurden (zunächst) zwei **Merkmale** miteinander **kombiniert**. Das zweite Merkmal war „Standardabweichung der Grauwerte der Pixel jedes einzelnen Mitochondrien-Bildobjekts“ (kurz: Standardabweichung) (siehe Abb. 20 unten). So wurde bereits ein zweidimensionaler Merkmalsraum geschaffen.

Befinden sich alle Bildobjekte einer Bildstruktur (beispielsweise Mitochondrien) in derselben Region des Merkmalsraums, so wird diese Gruppierung **Cluster** genannt. Liegen die Cluster der Bildobjekte verschiedener Bildstrukturen voneinander getrennt im Merkmalsraum, können sie durch Trennlinien (oder Trennflächen) auf einfache Weise voneinander abgegrenzt werden. Es existieren jedoch für die meisten Anwendungen in medizinischen Grauwertbildern keine idealen Merkmale (Soille P, 1998, S. 261 ff).

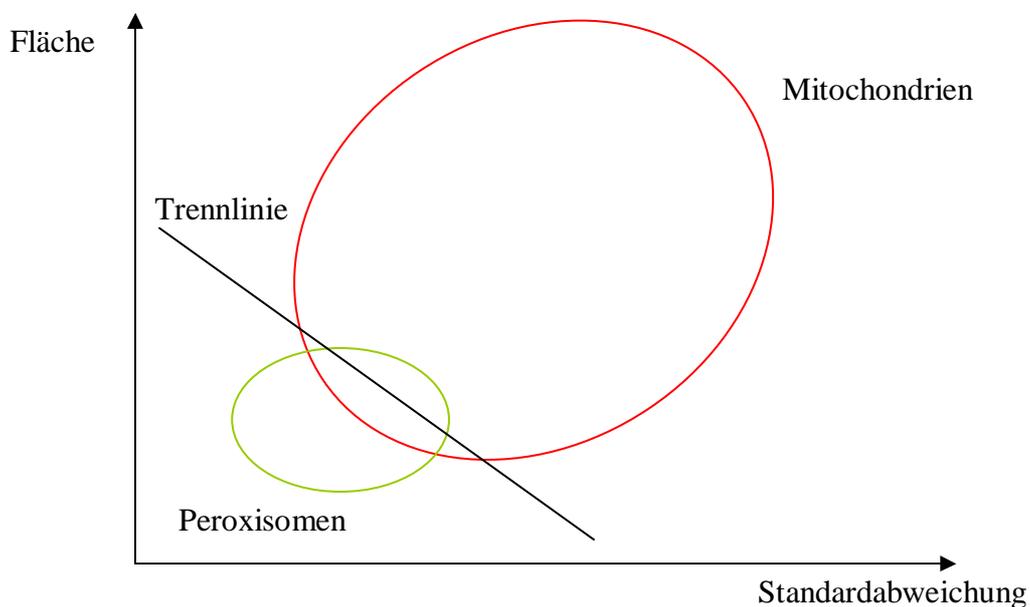


Abbildung 20: Zweidimensionaler Merkmalsraum. Idealerweise bilden die Bildobjekte einer Bildstruktur im Merkmalsraum einen Cluster, dargestellt durch die beiden Ellipsen. Im hier gezeigten Fall überschneiden sich allerdings die Cluster von Peroxisomen und Mitochondrien. Meist sind die Mitochondrien größer als die Peroxisomen. Es existieren aber auch Mitochondrien, die kleiner sind als große Peroxisomen; analoges gilt für die Standardabweichung. Deshalb existiert keine Trennlinie, die fehlerfrei die Cluster voneinander trennt.

Es bestand deshalb die Notwendigkeit, für Mitochondrien mehrere Klassen zu bilden. Eine Klasse war: „große, inhomogene Mitochondrien“. So wurde vermieden, dass fälschlich Peroxisomen als Mitochondrien klassifiziert wurden. Nachteil war, dass ein Teil der Mitochondrien nicht klassifiziert werden konnte (siehe Abb. 21 unten).

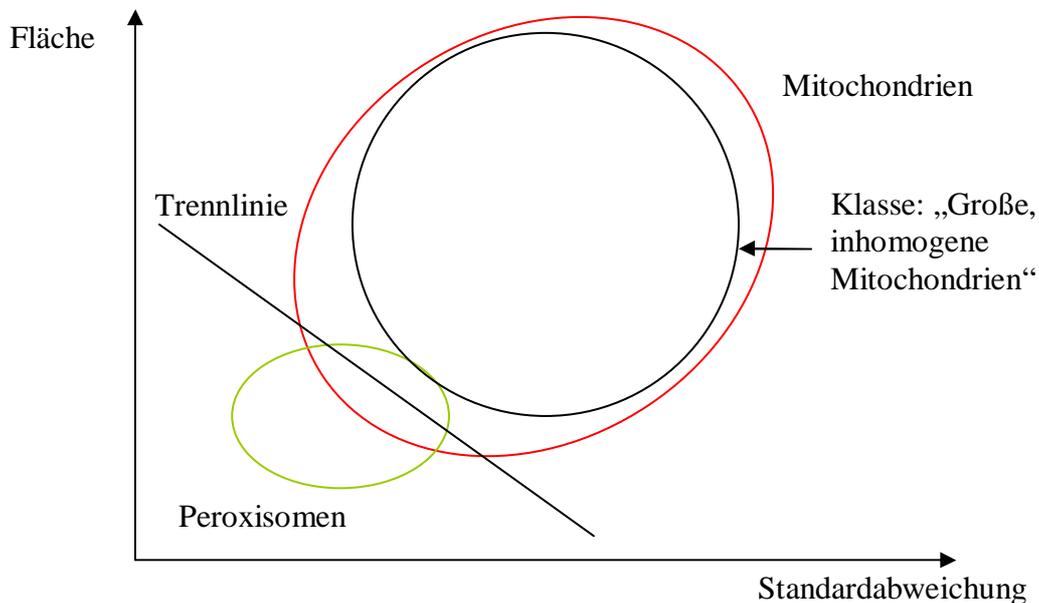


Abbildung 21: Der schwarze Kreis symbolisiert die Klasse „Große, inhomogene Mitochondrien“. Er deckt einen Großteil der Fläche des Mitochondrienclusters ab. Es liegen keine Peroxisomen im Bereich dieser Klasse.

Um eine größere Anzahl der Mitochondrien zu klassifizieren, und um sie auch gegen die Bildobjekte weiterer Bildstrukturen abzugrenzen, wurden ein 7-dimensionaler Merkmalsraum aufgespannt. Es wurden circa 30 Mitochondrienklassen gebildet.

Trotzdem konnten die Mitochondrien nicht eindeutig beschrieben werden. Der immer komplexer werdende Regelsatz spiegelte die Mehrdimensionalität des Merkmalsraums wieder.

4.2.6. Visuelle Signalverarbeitung beim Menschen

In der Netzhaut (Retina) des Auges wird von Rezeptorzellen das einfallende Licht in eine Hyperpolarisation der Membranen der Rezeptoren umgewandelt, abweichend von der üblichen Depolarisation bei anderen Sinnessystemen.

Die Signale laufen von den Sinneszellen (Stäbchen und Zapfen) durch mehrere Zellschichten der Netzhaut. Die Zellschichten bestehen aus Horizontalzellen, Off-Bipolarzellen, On-

Bipolarzellen, On-off-Amakrine, sowie den On-Zentrums-, Off- Zentrums- und On-Off-Zentrums-Ganglienzellen.

Zwischen den Zellen werden die Signale umgeschaltet. Signale können hierbei von mehreren Rezeptoren auf eine Ganglienzelle zusammenlaufen (**Signalkonvergenz**), oder von einem Rezeptor auf mehrere Ganglienzellen (**Signaldivergenz**). Die letzte Zellschicht im Signalfluss in der Retina, die **On- und Off- Zentrums-Ganglienzellen** sind bereits Neuronen des Nervus opticus.

Jedes dieser Neuronen erhält Signale aus einem oder mehreren **rezeptiven Feldern (RF)**, umschriebene Areale der Netzhaut, die einen Bereich des Gesichtsfeldes repräsentieren. Die adäquate Stimulation eines RF führt zu einer Aktivitätsänderung von Neuronen. Die RF benachbarter Neuronen überlagern sich. Diese Überlagerung entsteht durch die oben beschriebene Signaldivergenz und Signalkonvergenz. Ein Lichtpunkt kann also zwei benachbarte Ganglienzellen stimulieren. Die RF der Netzhaut sind meist konzentrisch aufgebaut: Ein **RF-Zentrum** ist von einer **RF-Peripherie** umgeben. On-Zentrums-Neuronen werden durch Stimulation durch einen Lichtpunkt im Zentrum ihres RF stark **erregt**, durch Stimulation der Peripherie **gehemmt**. Bei Off-Zentrums-Neuronen ist es umgekehrt. Siehe Abbildung 22 unten.

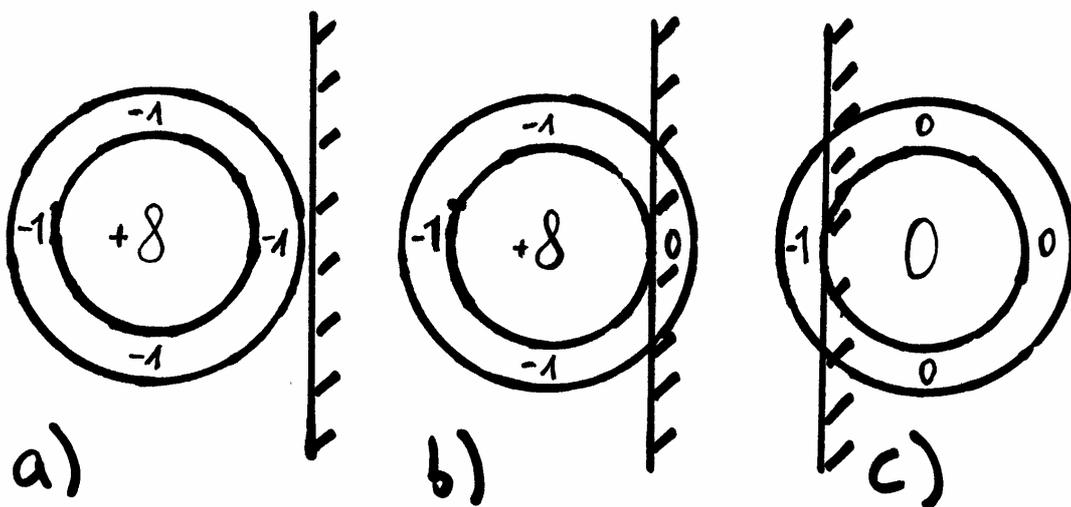


Abbildung 22: **Rezeptives Feld (RF)** eines **On-Zentrum**-Neurons. Jeweils von rechts nähert sich ein dunkler Schatten (nur die Kontrastgrenze des Schattens ist dargestellt). Links der Kontrastgrenze wird das RF gleichmäßig hell beleuchtet, rechts der Kontrastgrenze gleichmäßig weniger hell. Die relative neuronale Erregung des Neurons ergibt sich aus den Gesamteinflüssen von Erregung im Zentrum und Hemmung in der

Peripherie. Der Absolutwert der möglichen Erregung im Zentrum sei doppelt so hoch wie der Absolutwert für der möglichen peripheren Hemmung, hier im Beispiel 8 und 4.

a) Eine Kontrastgrenze liegt rechts vom RF. Das RF wird vollständig stimuliert. Die relative neuronale Erregung beträgt $8-4=4$

b) Die Kontrastgrenze liegt rechts des Zentrums des RF. Die relative neuronale Erregung beträgt $8-3=5$.

c) Die Kontrastgrenze hat das Zentrum des RF überschritten. Die relative neuronale Erregung beträgt $0-1=-1$.

Nach: Schmidt/Thews. Pysiologie des Menschen.

Läuft eine Kontrastlinie zwischen den sich überlappenden RF eines On-Zentrum- und eines Off-Zentrum-Neurons, so wird ersteres stark erregt (siehe Abb. 22, oben, b). Das Off-Zentrum-Neuron wird aber ebenfalls stark erregt, da bei ihm Hemmung und Erregung gegensätzlich zum On-Zentrum-Neuron verlaufen. So wird ein **Kontrast verstärkt**. Ein Kontrastgrenze wird auf der einen Seite von aktiven On- und auf der anderen Seite von aktiven Off-Zentrum-Neuronen gekennzeichnet.

Im **Nervus opticus** werden die Signale aus den rezeptiven Feldern parallel übertragen. Im **Chiasma opticum** kreuzen die Fasern von den nasalen Retinahälften zur Gegenseite. So erhält die linke Hemisphäre Afferenzen über die rechte Hälfte des Gesichtsfeldes und die rechte Hemisphäre über die linke Gesichtsfeldhälfte. Der Tractus opticus leitet die Signale weiter zum **Corpus geniculatum laterale (CGL)**. Bereits im CGL erfolgen Modifikationen der visuellen Signale durch nicht-visuelle Afferenzen aus dem Hirnstamm. So kann eine räumlich gerichtete Aufmerksamkeit auf bestimmte Anteile des Gesichtsfeldes entstehen. Im CGL zweigen Bahnen ab zum Hypothalamus (Beeinflussung des endokrinen Systems). Bahnen zur Area praetectalis, zu den Colliculi superiores sowie zum Kern des optischen Traktes dienen zur Steuerung der Blickmotorik.

Der Hauptteil der Afferenzen von der Retina aber werden im CGL über die Sehstrahlung (Radiatio optica) zur **primären Sehrinde (Area striata =Area V1)** der okzipitalen Großhirnrinde weitergeleitet.

Im CGL und in Teilen der Area V1 besteht eine retinotopie Organisation der visuellen Zentren. Das Bild auf der Netzhaut spiegelt sich in räumlichen Erregungsmustern der Neuronenfelder.

In der Area V1 bilden vertikal zur Hirnoberfläche angeordnete Zellsäulen funktionelle Einheiten: Neurone einer Säule haben die gleichen rezeptiven Felder in der Retina.

Dabei werden von den funktionellen Einheiten jeweils entweder Farb-, Form-, oder Bewegungskomponenten des visuellen Reizmusters bevorzugt verarbeitet.

Von Area V1 werden die Signale weiterübertragen in die Areas V2, V3 und V4. Diese Übertragung geschieht parallel und rückgekoppelt.

Die **Area V2** leistet visuelle Gestalterkennung von stationären Reizmustern. Es werden hierbei **Konturen ergänzt**. Viele Phänomene der optischen Täuschung lassen sich durch diese Ergänzung von Konturen erklären.

In der **Area V3** geschieht eine Gestalterkennung bewegter Objekte.

In **Area V4** werden Objekte aufgrund von charakteristischen Farben erkannt.

Von den extrastriären visuellen Arealen V2, V3 und V4 der okzipitalen Hirnrinde werden die Signale in die **Assoziations- und Integrationsregionen** des Parietal- und Temporallappens übertragen. Dabei wird zunehmend die retinotopische Organisation der Neuronengruppen erweitert. Schließlich ist in einigen der visuellen Assoziations- und Integrationsregionen das nahezu gesamte Gesichtsfeld zusammengefügt. Hierbei kommt es zu einer Rückkopplung zu den primären und sekundären visuellen Hirnrindengebieten im Okzipitallappen.

Erregungsmuster können so selektiert werden. Es findet eine parallele Signalverarbeitung statt.

Die Assoziationsfelder im unteren Temporallappen dienen der **Objekterkennung**. Sie sind in Blöcke aufgeteilt. Hierbei reagiert ein funktionell zusammengehöriges Neuronenblöckchen auf bestimmte Gestaltkomponenten (Winkel, sternförmige Strukturen, farbige Streifenmuster, Konturen bestimmter Krümmungen, kreisförmige Mehrfach-Kontraste). Auf ein Sehding reagieren mehrere Blöcke kohärent, jedes davon repräsentiert eine elementare visuelle Eigenschaft des Sehdinges. Dabei kommt es zu einer Beeinflussung durch Lernprozesse.

Bilaterale Läsionen im inferioren Temporallappen führen zu einer Objektagnosie: Ein Gegenstand kann zwar in seiner Lage im Raum erkannt werden, nicht aber in seiner Gegenständlichkeit. Eine taktile Objekterkennung ist dabei meist möglich.

Bei der Objekterkennung besonders wichtig sind neuronale Verknüpfungen zum **limbischen System** (Gyrus parahippocampalis, Hippocampus, Area entorhinalis, Corpora amygdala). Sie ermöglichen einen Vergleich des Sehdinges mit bereits Bekanntem (**visuelles Gedächtnis**).

Für die Objektlokalisierung sind Assoziationsfelder im Parietallappen zuständig.

Die Kontrolle visuell gesteuerter Bewegungen geschieht in Feldern in der präfrontalen Hirnrinde.

Kognitive Hirnleistungen kommen auch zustande durch eine Verbindung von Area V4 mit dem **Gyrus angularis** des parieto-temporalen Übergangsbereiches. Die „**visuelle Pars-pro-**

toto“-Erkennung ist eine solche Hirnleistung. Dabei wird von einem sichtbaren Teil auf den ganzen Gegenstand geschlossen (Schmidt RF, Thews G, 2000).

4.3. Diskussion der Ergebnisse der computerunterstützten Bildanalyse

Ziel der vorgestellten Methode war es, schnell und computerunterstützt TEM-Aufnahmen der Leber zu analysieren. Die Erhebung der hier vorgestellten Ergebnisse benötigten pro Bild insgesamt circa 6,25 Minuten. Diese Zeit war nötig, um das Sinusoid manuell zu markieren und das so veränderte Bild und den Regelsatz zu laden. In diese Zeit inbegriffen ist die Dauer der vom Regelsatz durchgeführten Berechnungen. Die manuelle Klassifikation benötigte 3 Minuten. Weiterhin wurden manuell für jedes Bild einzeln die aus den Klassifikationsergebnissen berechneten Daten exportiert. Für vorliegende Arbeit wurde ein Prototyp von Cellenger verwandt, der keine Automatisierung der Abläufe zuließ. Durch eine Automatisierung des Datenexports hätte die Zeitdauer um circa 1,5 Minuten verkürzt werden können.

4.3.1. Regelrechtes Endothel

Als regelrechtes Endothel wurden Endothelzellen klassifiziert, welche höchstens eine Ablösung von 50 % vom Leberparenchym aufwiesen. Der Flächenanteil am Sinusoid wurde bestimmt.

Heute nimmt man an, dass eine kalte Ischämie im Gegensatz zur warmen Ischämie größere Endothelschäden nach sich zieht (IkedaT et. al., 1992). Die Ergebnisse für „regelrechtes Endothel“ bestätigen diese Auffassung. Zwischen Kontrolle und Ischämie konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Kontrolle: $54\% \pm 16\%$, Ischämie: $48\% \pm 26\%$), Ischämie aber unterschied sich von Transplantation erheblich, da in der Transplantationsgruppe kein „regelrechtes Endothel“ vorhanden war.

Die angenommene Schwelle der Endothelzellablösung, welche zwischen regelrechtem und geschädigtem Endothel unterschied, war bei 50% (Anteil am Sinusoidumfang). Dieser Schwellwert war gut geeignet, Unterschiede zwischen Ischämiegruppe einerseits und Transplantationsgruppe andererseits aufzuzeigen. In allen Bildern der Transplantationsgruppe lag der Grad der Endothelablösung weit über diesem Schwellwert. Die Endothelablösung nach Ischämie war $25\% \pm 27\%$ des Sinusoidumfangs, nach Transplantation war sie $88\% \pm 13\%$.

4.3.2. Geschädigtes Endothel

Die Klasse „geschädigtes Endothel“ beinhaltet Endothelzellen, die zu mehr als 50% vom Untergrund abgehoben sind. Der Flächenanteil am Sinusoid wurde bestimmt.

Auch hier konnte die Auffassung einer vermehrten Schädigung des Endothels nach kalter Ischämie im Gegensatz zur warmen Ischämie bestätigt werden. Während Kontrolle und Ischämie sich nicht signifikant unterschieden (Kontrolle: $2\% \pm 8\%$, Ischämie: $9\% \pm 19\%$), war der Unterschied zwischen Ischämie und Transplantation signifikant (Transplantation: $22\% \pm 22\%$).

4.3.3. Abgelöstes Endothel

Als „abgelöstes Endothel“ wurden Endothelzellen klassifiziert, die keinen Kontakt zum Lebergewebe hatten. Der Flächenanteil am Sinusoid wurde bestimmt.

Es wurde hier Lumeninhalt klassifiziert, der als Endothelzelle erkennbar war. Die Herkunft eines Teils des Lumeninhalts konnte nicht bestimmt werden. Es ist anzunehmen, dass Anteile der unbestimmten Zelltrümmer im Lumen Reste ehemaligen Endothels sind. Die Klassifizierung als „abgelöstes Endothel“ ist deshalb besonders untersucherabhängig. Ein sehr erfahrener Untersucher wird mehr Zellmaterial im Lumen als „abgelöstes Endothel“ erkennen, als ein unerfahrener.

Auch dieses Ergebnis stimmt überein mit der heute vorherrschenden Auffassung einer vermehrten Schädigung des Endothels nach kalter Ischämie im Vergleich zu einer warmen

Ischämie. Während in Kontrolle und in Ischämie kein „abgelöstes Endothel“ vorhanden war, betrug sein Anteil nach Transplantation $11\% \pm 21\%$.

4.3.4. Gesamt-Endothel

Es wurde der Flächeanteil am Sinusoid vom Endothel insgesamt („regelrechtes -“ plus „geschädigtes -“ plus „abgelöstes Endothel“) betrachtet.

Als Zeichen einer Endothelschädigung ist unter anderem eine **Schwellung des Endothels** beschrieben. Diese kommt durch Wassereinstrom als Folge des Versagens von Ionenpumpen zustande. Man kann, (bei senkrecht zum Sinusoid verlaufendem Schnitt) eine Zunahme der Endotheldicke (im Vergleich zu der Vorstellung von einer „normalen“ Endothelzelle) als Schwellung interpretieren. Trotz der visuell erkennbaren Schwellung des Endothels in vielen Sinusoiden konnten insgesamt mittels der Klasse „Gesamtendothel“ keine signifikanten Unterschiede des Endothels zwischen Kontrolle und Ischämie beobachtet werden (Kontrolle: $56\% \pm 12\%$, Ischämie: $57\% \pm 14\%$). Es war in der Ischämiegruppe bereits in einigen Sinusoiden Endothel völlig untergegangen. Diese Endothel ist mit dem Blutstrom beziehungsweise durch die Perfusionsfixierung aus den Sinusoiden gespült worden. Offensichtlich wurde nach warmer Ischämie eine Flächenzunahme des Gesamt-Endothels durch Zellschwellung durch **Endothelzell-Untergang** wieder ausgeglichen. Es konnte also mit der Klasse Gesamt-Endothel kein Endothelzellschaden in der Ischämiegruppe nachgewiesen werden.

In der Transplantationsgruppe war ein deutlicher Endotheluntergang nachweisbar (Transplantation: $38\% \pm 14\%$). Dieser Untergang war signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zur Ischämie. Es konnte somit die Auffassung einer vermehrten Endothelzell-Schädigung durch eine kalte Ischämie im Vergleich zu einer warmen Ischämie bestätigt werden.

4.3.5. Lumeninhalte

Als Lumeninhalt wurden alle Blutzellen und im Lumen befindliche Zellteile klassifiziert, ebenso die Kupfferzellen und die Klasse „abgelöstes Endothel“. Der Flächenanteil am Sinusoid wurde bestimmt.

Als Folge eines IRS kommt es zur Bildung von Mikrothromben. Diese Mikrothromben imponieren in TEM-Aufnahmen als Lumeninhalt. Die Mikrothrombenbildung ist nicht spezifisch für eine kalte oder warme Ischämie. Beispielsweise Sepsis führt ebenfalls zu Mikrothrombenbildung (Kume M et. al., 2003). Die Klasse „Lumeninhalte“ zeigt dem entsprechend signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle ($7\% \pm 12\%$) und Ischämie ($20\% \pm 15\%$) sowie Kontrolle und Transplantation ($28\% \pm 17\%$), nicht hingegen zwischen Ischämie und Transplantation.

Die Klassifikation einer eindeutig als Endothelzelle erkennbaren Struktur als „Lumeninhalt“ ist nur für die jeweilige Schnittebene gültig. Es ist denkbar, dass diese Endothelzelle in einer **anderen** Schnittebene einen Kontakt zur Sinusoidwand hat und dort als „regelrechtes“ oder „beschädigtes Endothel“ klassifiziert werden müsste.

Die Ergebnisse von „Lumeninhalte“ könnten durch die Spülung mit NaCl-Lösung vor der Perfusionsfixierung beeinflusst sein. Es ist denkbar, dass ein reduzierter Fluss der NaCl-Lösung (beispielsweise durch eine Lumenverlegung stromaufwärts des Schnittes) zu einer Zunahme von „Lumeninhalte“ führt. Durch die Spülung werden alle nicht am Sinusoidrand haftenden Inhalte des Lumens eliminiert.

4.3.6. Freies Lumen

Die elektronenoptisch leeren Bereiche des Sinusoids wurden als „freies Lumen“ klassifiziert. Der Flächenanteil am Sinusoid wurde bestimmt.

Das Klassifikationsergebnis von „freies Lumen“ spiegelt gegenläufige Entwicklungen wieder: Einerseits ist in der Kontrollgruppe ($7\% \pm 12\%$) der Flächenanteil von „**Lumeninhalte**“ kleiner als in der Ischämiegruppe ($20\% \pm 15\%$), und in dieser kleiner als in der Transplantationsgruppe ($28\% \pm 17\%$).

Bei ansonsten gleichen Flächenverhältnissen der Endothelzell-Klassen würde dies jeweils einen **geringeren Flächenanteil** von „**freies Lumen**“ in Ischämie und Transplantation im Vergleich zur Kontrolle bedeuten.

Andererseits ist aber der relative Flächeninhalt von „**Gesamtendothel**“ in der Kontroll- ($56\% \pm 12\%$) und Ischämiegruppe ($57\% \pm 14\%$) größer als in der Transplantationsgruppe ($38\% \pm 14\%$). Ein kleinerer Anteil von „Gesamtendothel“ führt bei gleichbleibendem „Lumeninhalt“ zu einem **größeren Flächenanteil** von „freies Lumen“ in Ischämie und Transplantation, da dieser Anteil den Raum des zugrunde gegangenen Endothels einnimmt (siehe Abb. 23 unten).

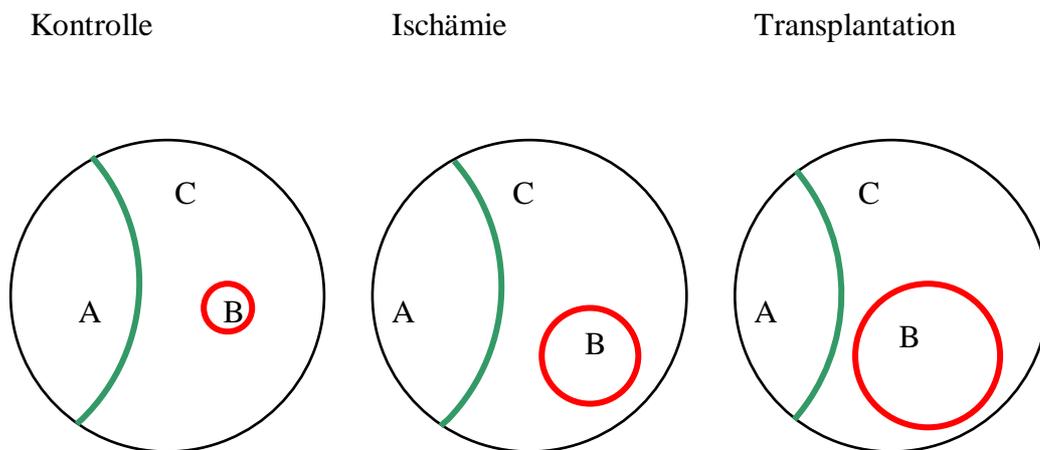


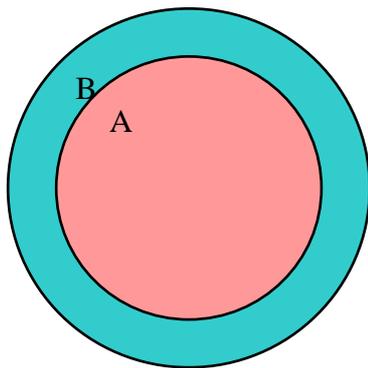
Abbildung 23: Freies Lumen. Schematische Darstellung des Sinusoid-Querschnitts in den drei Gruppen Kontrolle, Ischämie und Transplantation. Das Gefäß enthält drei Bereiche: A: Gesamtendothel (grüne Linie). B: Lumeninhalte (rote Linie). C: Freies Lumen (restliche Fläche). Die Flächenanteile von A sind in Kontrolle und Ischämie nahezu identisch. In der Transplantationsgruppe ist A kleiner als in den beiden anderen Gruppen. Die Flächenanteile von B sind in der Ischämiegruppe größer als in der Kontrolle und am größten in der Transplantationsgruppe. Das freie Lumen ist in der Ischämiegruppe geringer als in Kontroll- und Transplantationsgruppe.

„**Freies Lumen**“ repräsentiert den Gefäßquerschnitt, der dem Blut zur Zirkulation zur Verfügung steht. Er ist in der Ischämiegruppe ($23\% \pm 13\%$) signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe ($37\% \pm 13\%$). Ursache ist der größere Flächenanteil von „Lumeninhalte“, da „Gesamt-Endothel“ nicht signifikant verändert ist. Die Ergebnisse deuten eine Verringerung des mittleren, perfundierbaren Sinusoidquerschnitts in der Ischämiegruppe an.

In der Transplantationsgruppe ($39\% \pm 13\%$) besteht kein signifikanter Unterschied im Flächenanteil von „freies Lumen“ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($37\% \pm 13\%$), da zwar „Lumeninhalte“ hier größer ist, aber „Gesamtendothel“ eine geringere Fläche einnimmt.

Es ist schwierig, aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf den Gefäßwiderstand im Bereich einzelner Gewebeschnitte zu schließen, da nur ungenau eingeschätzt werden kann, ob die Schnittführung immer senkrecht zum Verlauf des Sinusoids ist. Ein kugelförmiger „Lumeninhalt“ führt in einem schrägen Anschnitt zu einer relativ größeren Fläche von „freies Lumen“ im Vergleich zu einem senkrechten Anschnitt (siehe Abb. 24 unten).

Sinusoid im senkrechten
Anschnitt



Sinusoid im schrägen
Anschnitt

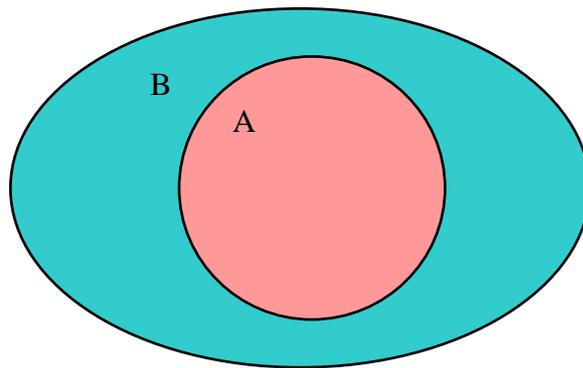


Abbildung 24: Sinusoidanschnitte senkrecht und schräg. Einfluss des Anschnittwinkels auf den relativen Flächenanteil von „freies Lumen“. A: „Lumeninhalt“, B: „freies Lumen“. Beide Sinusoide haben den gleichen Durchmesser. Der kugelförmige Inhalt des Lumens hat in beiden Fällen ein identisches Volumen. Im schrägen Anschnitt rechts erscheint aber „freies Lumen“ größer als links.

Allerdings kann man annehmen, dass viele Mikrothromben, die zur Fläche von „Lumeninhalte“ beitragen, eine längliche Form besitzen, entsprechend der Röhrenform des Sinusoids. Dann ist keine ausgeprägte Beeinflussung von „freies Lumen“ durch schräge Gefäßanschnitte zu erwarten.

Analog zu „Lumeninhalte“ ist auch „freies Lumen“ durch eine Mikrothrombenbildung stromaufwärts des Schnittes beeinflusst. Eine verminderte NaCl-Spülung vor der Perfusionsfixierung könnte so zu einer Abnahme von „freies Lumen“ führen.

4.3.7. Fehlende Endothelbedeckung

Als Maß für den Anteil des Sinusoidumfangs ohne Kontakt zwischen Leberparenchym und Endothel diene die Klasse „fehlende Endothelbedeckung“.

Die Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ ist ein Maß für die Zerstörung des Endothels im Rahmen eines IRS. Wie oben beschrieben, wird heute einer kalten Ischämie im Gegensatz zur warmen Ischämie eine bevorzugte Schädigung von Endothelzellen zugeschrieben. Die Ergebnisse der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ bestätigen diese Ansicht.

Die Klassifizierung als „fehlende Endothelbedeckung“ ist besonders untersucherabhängig, da das Merkmal „Kontakt zwischen Endothel und Mikrovilli“ häufig „unscharf“ ist.

4.3.8. Gesamt-Sinusoid

Die Gesamtfläche des Sinusoids wurde gemessen (in Tausend Pixel).

Ein IRS führt zu einer Beschädigung der Hepatozyten. Nach kalter Ischämie ist im Vergleich zur warmen Ischämie ein Gewebeschaden vor allem im Bereich der Endothelzellen zu beobachten. Trotzdem kommt es auch während einer kalten Ischämie zu einem Absinken des intrazellulären ATP-Spiegels in den Hepatozyten. Abhängig unter anderem von der Ischämiedauer kann dies zu einem Zusammenbruch der Ionenpumpen mit nachfolgendem Wassereinstrom in die Zellen führen. Dies führt zu einer Zellschwellung der Hepatozyten (Kim RD, Stein GS, Chari RS, 2001). Eine primäre Störung der Mikrozirkulation nach IRS („no-reflow“) wurde auch zurückgeführt auf Lumeneinengung der Sinusoide durch Schwellung der Hepatozyten (Frederiks et al., 1983).

Eine Lumeneinengung müsste mit der vorgestellten Methode durch eine kleinere Fläche des Gesamt-Sinusoids nach IRS im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar sein. Nach Ischämie (351 ± 157) ist im Vergleich zur Kontrolle (298 ± 118) kein signifikanter Unterschied feststellbar. Nach Transplantation (433 ± 149) ist die Sinusoidfläche sogar signifikant **vergrößert**, im Vergleich zu Kontrolle und Ischämie.

Vorstellbar ist, dass primär verschlossene Lumina für die visuelle Auswertung und somit auch für die vorliegende Arbeit seltener verwendet wurden. Möglicherweise sind die am Leuchtschirm des Elektronenmikroskops besser zu erkennenden, offenen Sinusoide (da leuchtend weiß) häufiger fotografiert worden.

Trotzdem hätte man vermuten können, dass es nach IRS diffus zu einer Leberzellschwellung kommt und dass somit die Gesamt-Sinusoidfläche abnehmen sollte. Aber im Mittel ist in der Transplantationsgruppe das Sinusoid um 40% größer als in der Kontrollgruppe.

Schnittphänomene könnten die Flächengrößen der Sinusoide erklären:

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass in allen Aufnahmen das Sinusoid senkrecht zu seinem Verlauf getroffen wurde. Dieses ist visuell nur sehr ungenau abschätzbar. Ein runder Anschnitt beweist, dass ein Gefäß mit rundem Querschnitt rechtwinklig getroffen wurden. Ein ovaler Anschnitt aber beweist nicht einen schrägen Anschnitt, da das Gefäß einen ellipsoiden Querschnitt haben könnte.

Bei intaktem Endothel ist ein gleichförmig breiter Disse-Raum ein Zeichen für senkrechten Gefäßanschnitt.

Wenn ein röhrenförmiges Sinusoid von kreisrundem Querschnitt und mit einem Radius von 0,5 Längeneinheiten im **rechten Winkel** angeschnitten wird, so beträgt die kreisrunde Querschnittsfläche des Anschnitts:

$$r^2\pi = 0,5^2\pi = 0,785 \sim 0,8.$$

Nach **schrägem** Anschnitt berechnet sich die elliptische Anschnittsfläche aus dem Produkt der beiden Halbmesser multipliziert mit π (siehe Abb. 25 unten):

Der erste Halbmesser ist unverändert 0,5.

Der zweite Halbmesser ist $c/2$;

$$\text{da } c^2 = a^2 + b^2,$$

ist c gleich der Wurzel aus $a^2 + b^2$;

a ist 1, da $a/2 = 0,5$;

$b = a$, da ein gleichseitiges Dreieck vorliegt (Winkel von 90 Grad sowie zweimal 45 Grad).

also ist c gleich der Wurzel aus $1^2 + 1^2$;

c ist gleich der Wurzel aus 2 $\sim 1,4$;

$c/2 = 1/2 \times 1,4 \sim 0,7$.

Dann gilt für die Fläche des elliptischen Anschnitts:

$ab\pi = (0,5 \times 0,7)\pi = 1,099 \sim 1,1$.

Die Fläche des elliptischen Anschnitts ist um 37,5%, das heißt um angenähert 40% größer als der kreisrunde Querschnitt der Röhre.

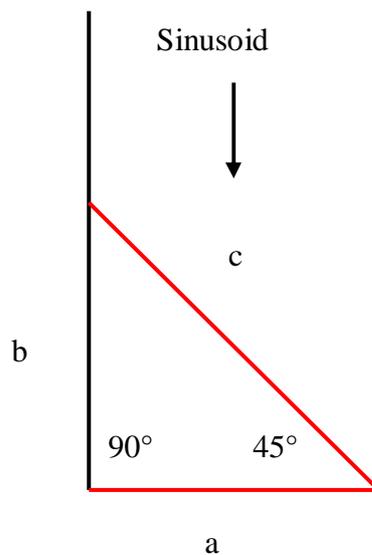


Abbildung 25: Sinusoid mit kreisrundem Querschnitt, Verlauf des Sinusoids von oben nach unten (Schema). Der rot eingezeichnete Linie (a) ist der Durchmesser des Sinusoids, der Radius ist: $a/2$. Der schräge Anschnitt (c) erzeugt ein elliptisches Schnittbild. Der erste Halbmesser der Ellipsenfläche ist gleich dem Radius der kreisrunden Querschnitts ($a/2$). Der zweite Halbmesser ist: $c/2$. Die Länge von c ist die Wurzel aus a^2+b^2 (Pythagoras). b aber ist gleich a (gleichseitiges Dreieck). a ist 1, da $a/2=0,5$.

Ein mehr oder weniger schräger Anschnitt der Sinusoide dürfte die Regel sein. Dies kann visuell aus den Querschnittsbildern nur ungenau eingeschätzt werden. Erschwerend für diese Einschätzung ist, dass die Sinusoide kaum wirklich kreisrund oder oval, sondern immer ein wenig unregelmäßig geformt sind.

Unterschiedliche Anschnitte der Sinusoide könnten die Unterschiede der Sinusoidgrößen erklären, da nur 50 Sinusoide pro Gruppe ausgewertet wurden. Um hier den zufälligen Fehler des Anschnittswinkels zwischen den drei Gruppen auszugleichen, ist eine deutlich größere Anzahl von Bildern nötig. Allgemein ist für die visuelle stereologische (morphometrische) Auswertung von TEM-Aufnahmen die Auswertung einer **großen** Anzahl von Bildern nötig. So wurde untersucht, wieviele Schnittbilder nötig sind, um aus den zweidimensionalen Anschnitten einer bestimmten Struktur auf ihre räumlichen Ausdehnungen schließen zu können. Für die Bestimmung des mittleren Durchmessers von kugelförmigen Strukturen mit normalverteiltem Durchmesser etwa benötigt man 200 bis 500 Schnitte (Giger-Riedwyl-Methode zur Bestimmung der Kugelgröße) (Steer MW, 1984, S. 32).

4.3.9. Vergleich mit den Ergebnissen einer visuellen Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten 150 TEM-Aufnahmen wurden zufällig aus einer Serie von circa 330 Bildern ausgewählt. Diese konnten aus einer Bildserie von 750 TEM-Aufnahmen zur Verfügung gestellt werden. Die 750 Fotografien waren entstanden im Rahmen einer Forschungsarbeit im Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München. Es handelte sich um Aufnahmen von Rattenlebern von drei Gruppen von Tieren (Kontrolle, Ischämie und Transplantation). Jede Gruppe bestand aus 5 Tieren. Pro Tier wurden 5 Gewebeprobe entnommen. Jeder zehnte Gewebeschnitt einer Probe wurde ausgewählt. Von jedem Schnitt wurden 3 bis 4 Sinusoide abfotografiert.

Diese 750 Aufnahmen wurden von einer erfahrenen Untersucherin visuell ausgewertet. Es sollten diejenigen Merkmale gefunden werden, in denen sich die drei Gruppen unterscheiden und die als Parameter für einen Zellschaden geeignet sind. Die Merkmale sollten möglichst quantitativ erfassbar sein, es wurden aber auch deskriptive Merkmale untersucht und beschrieben. Zunächst wurden aus den Bildern möglichst viele Merkmale, die sich als Schadensparameter eignen könnten, „zusammengetragen“. Dazu wurden in einem ersten

Schritt die Bilder verbal beschrieben. Aus den in Papierform vorliegenden Beschreibungen wurden Merkmalslisten erstellt.

Es wurden dabei Merkmale quantitativ erfasst, es wurden Merkmale verbal beschrieben und es wurden Ausprägungen von Merkmalen geschätzt.

Die Bilder wurden nach morphologischen Kriterien in Bildbereiche unterteilt. Bildbereiche waren unter anderem:

- Jede einzelne Leberzelle, die Kontakt zu dem in Bildmitte befindlichen Sinusoid hatte. Es waren in der Regel nur Teilbereiche der Hepatozyten zu sehen. Der Bildausschnitt war zu klein, um die Leberzellen in ihrem gesamten Umfang abzulichten.
- Der Disse-Raum.
- Die Endothelzellen.
- Die Kupfferzellen.
- Die Itozellen.
- Das Sinusoid als Ganzes.

Das Endothel wurde aus zwei Blickwinkeln beurteilt. Einmal aus der Sicht der darunterliegenden Leberzelle und einmal in Hinblick auf das gesamte Sinusoid.

Für jeden dieser Bildbereiche wurde eine Merkmalsliste erstellt. Merkmale waren zu Beispiel:

1. Leberzelle:

- Zellkern: Normal rund?
- Rauhes Endoplasmatisches Retikulum (RER): Stapel mit mehr als 5 Lamellen vorhanden?
- Mitochondrien: Cristae: Deutlich/schwach/nicht sichtbar; Größe: Einheitlich/nicht einheitlich.
- Lysosomen: Anzahl.
- Peroxisomen: Anzahl.
- Vakuolen: Anzahl.
- Mikrovilli: Mehr als 50% der Mikrovilli vorhanden? (Verglichen mit der in jahrelanger Arbeit erworbenen Vorstellung von einer intakten Leberzelle).

2. Endothelzelle:

- Position der Zelle: Normaler Kontakt zu den Mikrovilli, oder: Entfernung der Zelle von ihrem normalen Platz in Richtung Lumen.
- Form: Flach/rund.
- Mitochondrien: Anzahl. Cristae: Sichtbar?
- Lysosomen: Anzahl.

3. Sinusoid:

- Endothel umschließt Lumen vollständig?

In einen weiteren Schritt wurden nun 10 aus 750 Bildern zufällig ausgewählt und ausgewertet. Für jedes der 10 Bilder wurden die Merkmalslisten ausgefüllt. Die Werte wurden anschließend in eine Tabelle übertragen (Excel, Microsoft Corp., Seattle, USA). Bei dichotomen Merkmalen wurde für: ja eine „1“, für: nein eine „0“ eingegeben. Für jede der drei Gruppen wurden für diejenigen Merkmale, die ein entsprechendes Skalenniveau hatten, Mittelwerte berechnet. Es wurde geprüft, ob sich die Mittelwerte signifikant unterschieden. Da dies nicht überall der Fall war, wurden erst nochmals 10, dann nochmals 5 Bilder untersucht. Insgesamt wurden so 25 Bilder mithilfe der Merkmalslisten ausgewertet. Aus der Vielzahl der Merkmale wurden dann diejenigen ausgewählt, die signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten. Diejenigen Merkmale, welche signifikante Unterschiede zwischen den 25 Aufnahmen zeigten, bildeten das Ergebnis der Untersuchung (Ergebnisliste).

Das am ehesten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbare Merkmal aus der oben genannten Ergebnisliste schien das Merkmal: „Endothel umschließt Lumen vollständig“ zu sein. Kriterium für dieses Merkmal in der visuellen Untersuchung war, ob die Endothelzelle einen normalen Kontakt zu den Mikrovilli der darunter liegenden Leberzellen hatte (beziehungsweise einen normalen Kontakt zur manchmal vorhandenen Itozelle). War das Endothel in seiner Position regelrecht, so wurde das Sinusoid als normal gezählt. Dabei wurde ein fehlender Kontakt zwischen Mikrovilli und Endothelzellen in einem Bereich von bis zu 25% bezogen auf den Sinusoidumfang als normal angesehen.

In dieser Betrachtungsweise waren 88% der Sinusoide in der Kontrollgruppe normal, in der Ischämiegruppe waren es 72% und in der Transplantationsgruppe 0%.

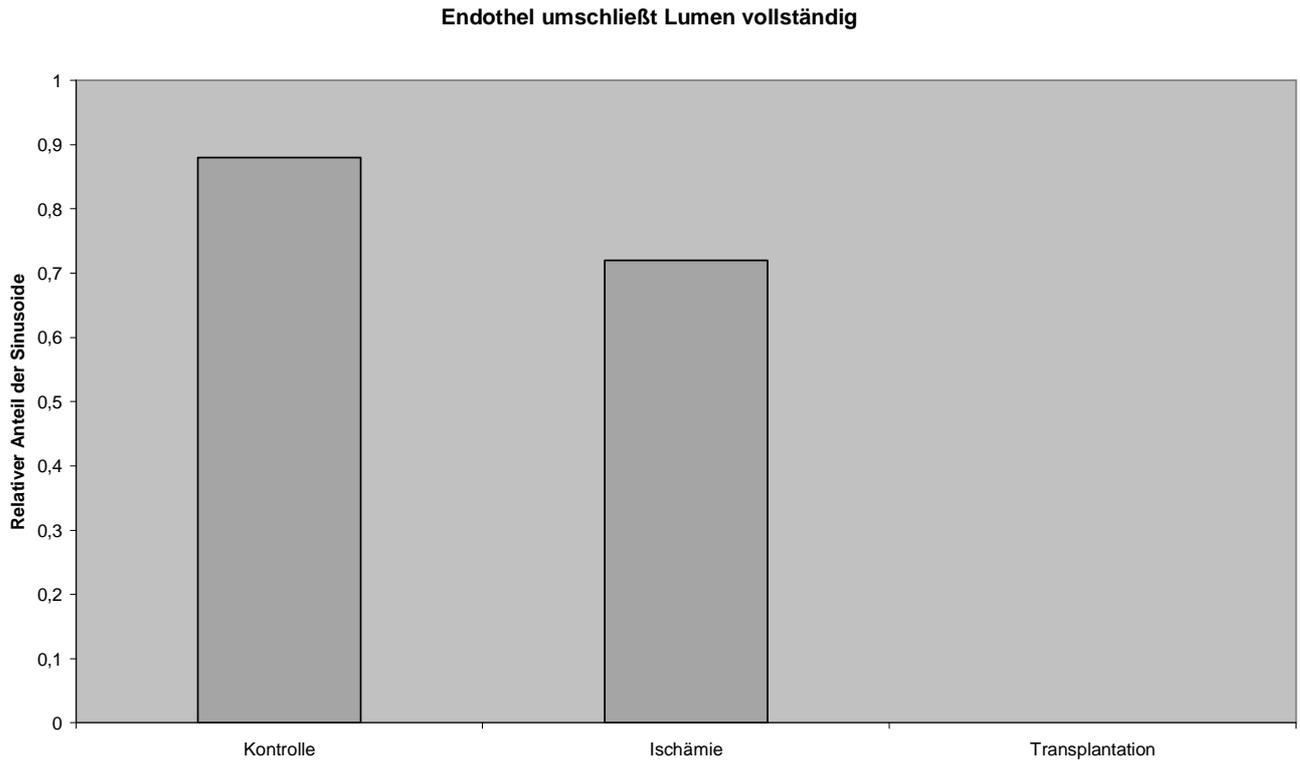


Abbildung 26: Teilergebnis einer **visuellen** Auswertung der Bilder. Relativer Anteil der Sinusoide, deren Lumen vollständig von Endothel umschlossen ist.

Dieses visuelle Ergebnis war nicht unmittelbar vergleichbar mit den Ergebnissen der computerunterstützten Auswertung vorliegender Arbeit. Um Vergleichszahlen zu ermitteln, wurden aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diejenigen Sinusoide gezählt, deren Wert der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ einen Anteil am Sinusoidumfang von bis zu 25% betrug. Dieser Wert der Klasse „fehlende Endothelbedeckung“ gibt den relativen Sinusoidumfang an, der von einer Endothelablösung betroffen ist.

Die Anzahl der Sinusoide mit einer Endothelablösung von bis zu 25% wurde für jede der drei Gruppen gezählt. Der prozentuale Anteil der betroffenen Sinusoide an der Sinusoid-Gesamtzahl wurde bestimmt.

In der Kontrollgruppe waren in der computerunterstützten Auswertung 90% der Sinusoide vollständig von Endothel umschlossen, in der Ischämiegruppe waren es 58% und in der Transplantationsgruppe 0%.

Endothel umschließt Lumen vollständig

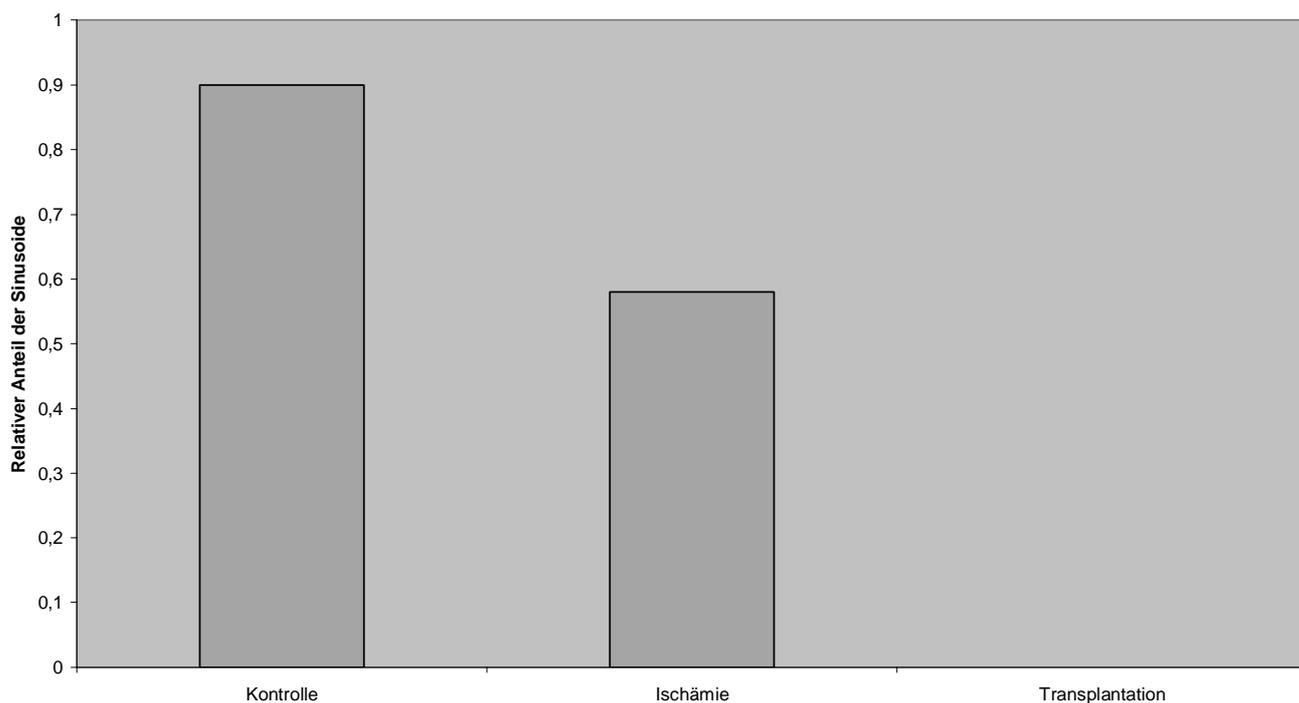


Abbildung 27: Teilergebnis der **computerunterstützten** Auswertung der Bilder. Relativer Anteil der Sinusoide, deren Lumen vollständig von Endothel umschlossen ist.

In der Kontroll- und in der Transplantationsgruppe stimmen die Ergebnisse der visuellen Auswertung mit den Ergebnissen der computerunterstützten Auswertung sehr gut überein. In der Ischämiegruppe hingegen waren in der visuellen Auswertung circa 25% mehr Sinusoide vollständig von Endothel umschlossen als in der computerunterstützten Untersuchung. Allerdings lagen in der computerunterstützten Auswertung sieben Sinusoide in der Nähe des Schwellwerts einer noch tolerierten Ablösung von 25%. In diesen Sinusoiden betrug die Ablösung zwischen 26% und 35%. Das Merkmal „Kontakt der Mikrovilli zur Endothelzelle“ ist besonders untersucherabhängig. Bei einer nur geringfügig weniger „strengen“ Beurteilung hätten diese Sinusoide als ebenfalls „vollständig umschlossen“ gezählt werden können. Unter Einbeziehung dieser sieben Sinusoide hätte dann das Ergebnis vorliegender Arbeit für: „Sinusoid umschließt Lumen vollständig“ in der Ischämiegruppe 72% betragen. Dies ist (zufällig) der gleiche Wert, wie in der visuellen Auswertung. Für die visuelle Untersuchung wurde nicht gemessen, wie groß der prozentuale Anteil der Ablösung war. Es wurden nur die beiden Klassen „Endothel umschließt Lumen vollständig“

oder „Entfernung der Zelle von ihrem normalen Platz“ gebildet. Es ist unbekannt, wieviele Messwerte sich hier in der Nähe der Schwelle von 25% befanden.

4.4. Diskussion der automatischen Bildanalyse

Anhand von fünf Trainingsbildern wurde ein Regelsatz entwickelt. Ziel war es, vollautomatisch die Mitochondrien aus den Bereichen der Hepatozyten aus TEM-Aufnahmen der Kontrollgruppe zu extrahieren. Der Regelsatz wurde an einem Datensatz von 10 TEM-Aufnahmen der Kontrolle getestet (Testbilder).

Von 1449 Mitochondrien in den 10 Testbildern wurden 278 Mitochondrien richtig gefunden. Der Mittelwert der richtig gefundenen pro Bild betrug 18%. Falsch positiv wurden 8 Bildobjekte als Mitochondrium klassifiziert. Hierbei handelte es sich um Peroxisomen, Anteilen von Mitochondrien und um ein Lysosom.

Der Anteil der richtig gefundenen Mitochondrien pro Bild betrug zwischen 1 und 54%. Diese erhebliche Streuung ist auf die Unterschiede in der Bildqualität zurückzuführen. Die Bilder waren für eine visuelle Bildauswertung erstellt worden. Hierfür ist die Bildqualität völlig ausreichend. Erst bei der Untersuchung der TEM-Aufnahmen mit Cellenger wurden die Bildunterschiede deutlich. Für eine automatische Bildanalyse müssen sehr hohe Forderungen an die Homogenität des Bildmaterials gestellt werden.

Mitochondrien waren in TEM-Aufnahmen automatisch nur im begrenztem Umfang automatisch zu finden. Es ließen sich keine eindeutigen Merkmale finden, um sie zu beschreiben.

So sind Mitochondrien in ihrer Form und Größe in Schnittbildern recht variabel. Es gibt runde Anschnitte, aber auch lange Gebilde und unregelmäßige Formen. Die Matrix der Mitochondrien in den verwendeten Bildern wies eine unterschiedliche Anzahl von Christae auf. Teilweise waren keine Christae erkennbar.

Die Kontur der Mitochondrien ist nicht selten unterbrochen. In Bereichen, in denen die Mitochondrienmembran sehr tangential angeschnitten ist, ist sie auf den TEM-Aufnahmen nicht zu sehen.

Die Mitochondrien wiesen einen unterschiedlichen Kontrast zu ihrer Umgebung auf. Dies kann beispielsweise verursacht werden durch Unterschiede im Proteingehalt der Mitochondrien (Riede UN, Schaefer HE, 1995, S. 21).

Durch das Scannen der fotografischen Aufnahmen und die Datenkompression ihrer digitalen Repräsentation war die Doppelkontur der Mitochondrienmembran verloren gegangen. Die Membran erschien nur als einfache, schwarze Linie.

Das vorgestellte **Klassifikationsergebnis spiegelt die Segmentierungsergebnisse** wieder.

Cellenger bietet die Möglichkeit, lokal auf Bildobjekten zu operieren und diese zu verändern. Viele dieser Möglichkeiten wurden bei der Erstellung des Regelsatzes getestet. Auf einzelnen Bildern gelang es so, **alle** Mitochondrien zu erkennen.

So kann Cellenger Bildobjekte als „fragliches Mitochondrium“ klassifizieren und in anschließenden Schritte weiter untersuchen. „Fragliche Mitochondrien“, die größer sind, als die zugrundeliegende Struktur im TEM-Bild könnten als „zu groß“ klassifiziert werden.

Anschließend könnten diese Klassenobjekte so verändert werden, dass

Klassifikationsergebnis und Struktur übereinstimmen (siehe Kapitel 2.4.4.

Algorithmendomäne/Erosion, Seite 32). Die Anwendung einer solchen Möglichkeit auf vielen Bildern ist aber mit „Kosten“ verbunden. Dies bedeutet, dass ein Teil der als „zu groß“ klassifizierten Mitochondrien-Klassenobjekte zwar in einem zweiten Schritt durch einen Erosionsalgorithmus verkleinert werden. Es können aber auch andere Klassenobjekte verändert werden, die fälschlich als „zu groß“ klassifiziert worden waren. Es stehen für die Entscheidung, ob ein Bildobjekt richtig klassifiziert worden ist, nur die gleichen von Cellenger zur Verfügung gestellten Merkmale zur Verfügung, wie für die erste Klassifikation als „fragliches Mitochondrium“.

Ein solcher Regelsatzes war nur eingeschränkt auf andere Bilder übertragbar. So wurden durch einen auf **einem** Bild gut funktionierenden Regelsatz auf anderen Bildern eine erhebliche Anzahl von Bildobjekten fälschlich als Mitochondrium klassifiziert (falsch Positive). Letztlich kamen diese Möglichkeiten deshalb nicht zur Anwendung.

4.5. Andere Bildanalyse-Systeme in der Medizin

4.5.1. MetaMorph® (Universal Imaging Corporation™, Downingtown, PA, USA)

Es handelt sich um ein Bildakquisitions- und analysesystem. So beinhaltet MetaMorph® Möglichkeiten der Steuerung von Mikroskop und Kamera. Eine Bildanalyse von insbesondere fluoreszenzmikroskopischen Bildern kann interaktiv und automatisch geschehen. Die automatische Analyse beruht auf Schwellwertverfahren. Das heißt, es können Bildobjekte extrahiert werden, wenn ein bestimmter Farbwert unter oder über einer vom Benutzer festgelegten Schwelle liegt. Interaktiv können Bildobjekte gezählt und vermessen werden. So können Flächen bestimmt werden, ebenso Entfernungen, Durchmesser, Umfang und anderes mehr.

Es können mehrdimensionale Datensätze verarbeitet werden. 3-D-Datensätze können in Form einer räumlichen dritten Dimension als Gewebe-Serienschnitte erzeugt werden, beispielsweise durch ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop (confocal laser scanning microscope, CLSM). Aber auch eine zeitliche dritte Dimension als Bildsequenz ist möglich. Noch mehr Dimensionen können durch die Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe entstehen. Pro verwendete Wellenlänge wird je ein Bild in jeder Mikroskop-Position erzeugt. Dekonvolution erlaubt die Verbesserung von CLSM-Bildern. Unschärfen im Bild können durch diese Bildfilterung reduziert werden.

Besonders geeignet zur automatischen/interaktiven Bildanalyse ist das System für gefärbte Bilder, insbesondere Fluoreszenzbilder.

MetaMorph® kam für die in dieser Arbeit durchgeführte automatische Analyse von TEM-Aufnahmen nicht in Frage. Schwellwertverfahren sind nur geeignet, wenn die gesuchten Bildobjekte sich in mindestens einem Merkmal völlig von allen anderen Bildobjekte unterscheiden. Durch das Schwellwertverfahren wird in dem Merkmalsraum eine Trenngerade oder -fläche gelegt. Diese Gerade oder Fläche trennt den Cluster der gesuchten Bildobjekte von den anderen Bildobjekten. In den verwendeten TEM-Aufnahmen existieren solche eindeutigen Cluster nicht.

(Quelle: Internetseite der Firma Universal Imaging Corp™.: <http://www.universal-imaging.com>).

4.5.2. analySIS[®] (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland)

analySIS[®] ist ein Bildakquisitions- und -analysesystem. Es sind Funktionen zur Bildanalyse integriert.

Die Software ist kompatibel mit vielen Mikroskopen und Kameras. Eine Mikroskopsteuerung mit automatischer Speicherung aller Aufnahmeparameter ist implementiert.

Eine Bilddarstellung kann auch auf zwei oder mehreren Bildschirmen erfolgen. Eine gleichzeitige Darstellung mehrerer Bilder auf einem Bildschirm ist möglich.

Die Bildarchivierung erlaubt eine Speicherung der Aufnahmedaten mit dem Bild in eine frei konfigurierbare Datenbank. Die Archivierung ist netzwerkfähig.

Die Bildverarbeitung ist durch Filter möglich. So ist ein Filter zur Kontrastverstärkung verfügbar. Ein Rauschfilter reduziert interaktiv Rauschen in ausgewählten Bildbereichen. Nach Aufzeichnung von Bildern von unterschiedlichen Fokuspositionen berechnet analySIS[®] ein Summationsbild unendlicher Tiefenschärfe.

Ein automatischer Bildanschluss erzeugt ein Gesamtbild aus kleinen Einzelbildern.

Interaktiv kann mit einem Messbalken gearbeitet werden. Aus den Kalibrierdaten des Bildes berechnet er automatisch die tatsächlichen Längenmaße des gemessenen Objekts.

Die **Bildanalyse** stellt Funktionen zur Bildsegmentierung zur Verfügung. Ein Segmentieralgorithmus ist in der Lage, punktförmige Bildverunreinigungen zu ignorieren. Bildobjekte können mittels Standardparametern oder benutzerdefiniert detektiert werden. Diese Bildobjekte können dann interaktiv klassifiziert und vermessen werden.

Die automatische Bildanalyse ist auch hier (wie unter 5.1.) ein Schwellwertverfahren und ist in ihrer Anwendung begrenzt auf im Merkmalsraum eindeutig unterscheidbare Bildobjekte.

(Quelle: Internetseite der Firma Soft Imaging System: <http://www.soft-imaging.de>)

4.5.3. TissueAnalytics™ (TissueInformatics Incorporation®, Pittsburgh, Pennsylvania, USA)

TissueAnalytics™ kann mit einem vollautomatischen Bildakquisitionssystem gekoppelt werden. Es kann ein automatisches Analyseprotokoll erstellt werden, das insbesondere immunhistochemisch gefärbte mikroskopische Aufnahme auswertet.

Eine automatische Bildanalyse erfolgt auch hier, wie oben, mittels Schwellwertverfahren und kam deshalb für diese Untersuchung nicht in Betracht.

(Quelle: Internet-Seite der Firma TissueInformatics Inc.™:

<http://www.tissueinformatics.com>).

4.5.4. BioApplications (Cellomics Incorporation™, Pittsburgh, Pennsylvania, USA)

BioApplications ist ein Bildanalyse-System, welches Messungen in mikroskopischen Bildern erlaubt. Meßparameter können sein: Anzahl von Bildobjekten, Flächeninhalt, Umfang. Ein Maß bestimmt die Signalintensität eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffs.

Ein automatische Bildanalyse ist hier nicht vorgesehen.

(Quelle: Internetseite der Firma Cellomics Inc.™: <http://www.cellomics.com>).

4.5.5. DiffMaster™ (CellaVision, Lund, Schweden)

Das Bildanalyse-System DiffMaster™ ist in der Lage, automatisch Leukozyten in Blutaussstrichen aufzufinden.

(Quelle: Internet-Seite der Firma CellaVision: <http://www.cellavision.com>).

4.5.6. Bildanalyzesystem der Firma Morphoscope Software GbR, Aachen, Deutschland

Das Bildanalyzesystem der Firma Morphoscope erkennt automatisch Zellen in zytologischen Präparaten, insbesondere nach Fluoreszenzfärbung. Eine spezifische Färbung der gesuchten Bildobjekte ist nötig, da auch hier, wie oben, Schwellwertverfahren die Grundlage der Analyse sind.

(Quelle: Internet-Seite der Firma Morposcope: <http://www.morphoscope.com>)

4.6. Stereologische Methoden der quantitativen Bildanalyse in der TEM

Die Analyse von Geweben, Zellen und Zellorganellen mithilfe von Mikroskopen ist zum Verständnis von Struktur und Funktion unerlässlich. Allerdings liefert die Mikroskopie zunächst nur visuelle Eindrücke. Diese sind eine subjektive Interpretation des Gesehenen. Experimentell induzierte oder pathologische Veränderungen lassen sich beim bloßen Betrachten von TEM-Bildern oftmals kaum quantitativ erfassen (Sitte H, 1967).

Die Erzeugung von Schnittbildern bedeutet einen Verlust an räumlicher Information. Die Stereologie (quantitative Morphometrie) bedient sich statistischer und geometrischer Methoden, um zweidimensionale (2-D-) Schnittbilder quantitativ auszuwerten. Ziel ist es, aus 2-D-Bildern Informationen über die zugrundeliegende, dreidimensionale Struktur zu erhalten (Weibel ER, 1963).

Eine **qualitative** Methode, räumliche Strukturen mithilfe von 2-D-Bildern zu untersuchen kann auf verschiedene Weise geschehen: Durch Rekonstruktion von Serienschnitten kann man sich eine Vorstellung von der Form der Struktur machen. Die Rekonstruktion kann gedanklich durch Betrachten der Schnittfolgen geschehen. Es wurden aber auch sehr aufwändig Styrolmodelle gebaut. Aus einzelnen TEM-Aufnahmen einer Chlorellazelle könnte man beispielsweise zu dem Schluss kommen, dass die Mitochondrien dieser Grünalge

ellipsoid geformt sind. Im räumlichen Modell sieht man aber, dass die Zelle nur ein einziges Mitochondrium besitzt. Dieses ist schlauchförmig geformt und windet sich in mehreren Schleifen durch die Zelle (Steer MW, 1984, S. 15).

Quantitative Morphometrie benötigt eine **zufällige, genügend große** Auswahl von Gewebe- oder Zellschnitten. In diesen Bildern kann man Objekte zählen, Längen bestimmen und Flächen messen. Dabei werden häufig Relativwerte bestimmt. Diese beziehen sich auf eine Referenzfläche oder ein Referenzvolumen. Es können aber auch absolute Werte, beispielsweise mittlere Anzahl der Lysosomen pro Leberzelle bestimmt werden.

Cellenger war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht in der Lage, dreidimensionale Objekte zu rekonstruieren. Da das vorliegende Bildmaterial nicht aus Serienschnitten bestand, sondern von jedem Sinusoid immer nur eine TEM-Aufnahme gefertigt wurde, hatte die fehlende 3-D-Fähigkeit von Cellenger keine Relevanz.

4.6.1. Bestimmung der Anzahl von Strukturen

Aus der Anzahl der Strukturen einer bestimmten Art (beispielsweise Mitochondrien) in einer zufälligen Auswahl von 2-D-Schnitten kann man auf die Anzahl in einem Referenzvolumen schließen.

Bei der Auszählung von Bildobjekten auf transparenten Schnitten (Licht-, Elektronenmikroskopie) kommt es zwangsläufig zu nicht vermeidbaren, „objektiven“ Fehlern. Objektive (das heißt, der Methode innewohnende) Fehler können (zumindest theoretisch) durch Korrekturverfahren ausgeglichen werden.

Beispiel: Verhältnis von Schnittdicke zum Durchmesser der zu zählenden Strukturen (Haug H, 1967):

Vorausgesetzt, es werden kugelförmige Strukturen in TEM-Aufnahmen gezählt und der Durchmesser der Strukturen ist kleiner als die Schnittdicke, so sind folgende Fälle denkbar: Eine Struktur kann vollständig im Schnitt liegen, oder sie liegt nur teilweise im Schnitt. In Abbildung 28 unten) sind 2 Kugeln vollständig im Schnitt enthalten, 4 Kugeln nur teilweise. Gezählt werden alle 6 Kugeln, da der Auswerter hier nicht entscheiden kann, ob eine Kugel nur teilweise im Schnitt liegt oder ob sie kleiner als andere ist. Angenommen, die 4 teilweise

im Schnitt enthaltenen Kugeln liegen jeweils zur Hälfte im Schnitt. Dann liegen also 4 halbe Kugeln im Schnitt, das entspricht dem Volumen von 2 ganzen Kugeln. Zusammen mit den 2 tatsächlich ganz im Schnitt liegenden Kugeln ergibt dies: 4 Kugeln. Gezählt aber wurden: 6 Kugeln. Die ermittelte Anzahl von Strukturen in einem Referenzvolumen wäre **zu groß**. Mittels eines **Korrekturfaktors** „a“ kann dieser Fehler ausgeglichen werden.

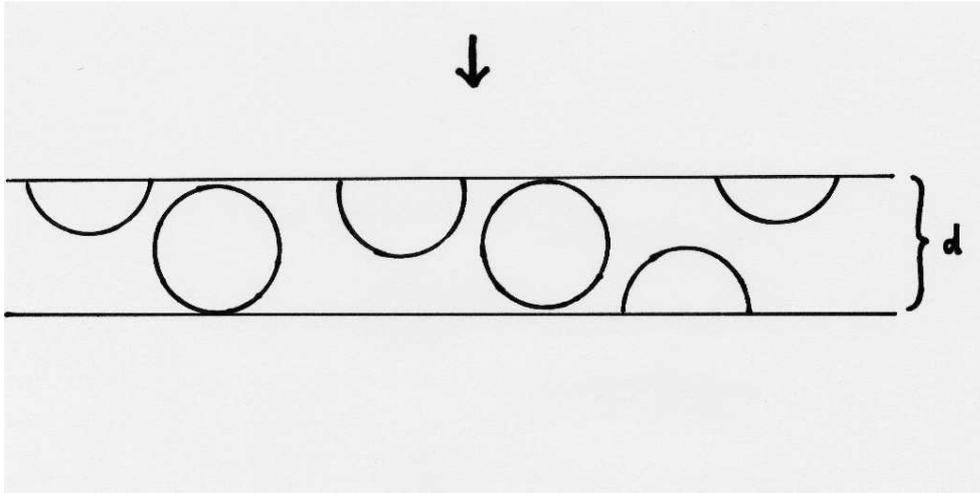


Abbildung 28: Einfluss von Schnittdicke und Strukturdurchmesser auf die gezählte Anzahl der Strukturen und die daraus berechnete Anzahl der Strukturen in einem Referenzvolumen. Der Pfeil gibt die Blickrichtung auf einen transparenten Schnitt der Dicke d an. 6 kugelförmige Strukturen sind erfasst, 2 davon liegen vollständig im Schnitt. Erläuterungen siehe Text.

Bei kugelförmigen Objekten mit einem Durchmesser größer als die Schnittdicke würde ebenfalls die Anzahl überschätzt werden. Auch hier kann ein Korrekturfaktor („A“) nötig sein. Korrekturfaktor „A“ ist von „a“ verschieden. Das heißt, bei Untersuchung von Bildobjektklassen unterschiedlicher Größe (zum Beispiel: Lysosomen und Peroxisomen), müssen Korrekturfaktoren entsprechend der mittleren Durchmesser der zugrundeliegenden Strukturen gewählt werden.

4.6.2. Volumenmessungen

Quantitative Morphometrie deutet räumliche Gebilde aufgrund ihre Erscheinung in zweidimensionalen Schnittbildern. Volumenbestimmungen von Zellorganellen oder Zellen sind hierbei von besonderem Interesse. So ist bekannt, dass Mitochondrien unterschiedlich auf Zellschädigungen reagieren können (Riede UN, Schaefer HE, 1995, S. 21). Die zu beobachtenden mitochondrialen Läsionen sind abhängig von Schadensart, Schadensintensität und Schadensdauer. Eine Erholungsphase zwischen der Einwirkung einer Noxe und der Herstellung eines TEM-Präparats spielt neben einer Vielzahl anderer Faktoren eine Rolle. So können Mitochondrien nach Schadenseinwirkungen vermehrt oder vermindert beziehungsweise verkleinert oder vergrößert sein (Megamitochondrienbildung durch Ausbleiben der Spaltteilung). Durch Wassereinstrom kann es zur Mitochondrienschwellung kommen. Durch Flächenbestimmungen in Schnittbildern lassen sich nach Delesse Volumina berechnen.

Delesse, ein Geologe, arbeitete an Schlifften von Konglomeratgestein, an dem die Volumina angeschnittener Kiesel zu berechnen waren. 1894 stellte er das Prinzip auf, dass man aus den mittleren Flächenanteilen von Kiesel in Steinschliffen auf ihre mittleren Volumenanteile schließen kann (Hennig A, 1958). Die Anteile beziehen sich auf Referenzflächen beziehungsweise -volumina. Dieses Verfahren wurde auf die Mikroskopie übertragen. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Dicke des Schnittes (siehe oben) zur systematischen Überschätzung von Volumina führen kann.

Ein Schnitt der Dicke d in Abb. 29a) enthält 3 Strukturen, beispielsweise Zellorganellen in einer seitlichen Ansicht (schwarz schraffiert). In Abb. 29b) sind dieselben 3 Organellen in der Aufsicht zu sehen.

Wenn auf beiden Seiten des Schnittes in a) die Fläche der Strukturen gleich ist, gilt: Das Verhältnis der Volumina ist gleich dem Verhältnis der Flächen in der Aufsicht. Bearbeitet man viele, zufällig ausgewählte Schnitte, kann man so für jede Struktur ein mittleres relatives Volumen bestimmen.

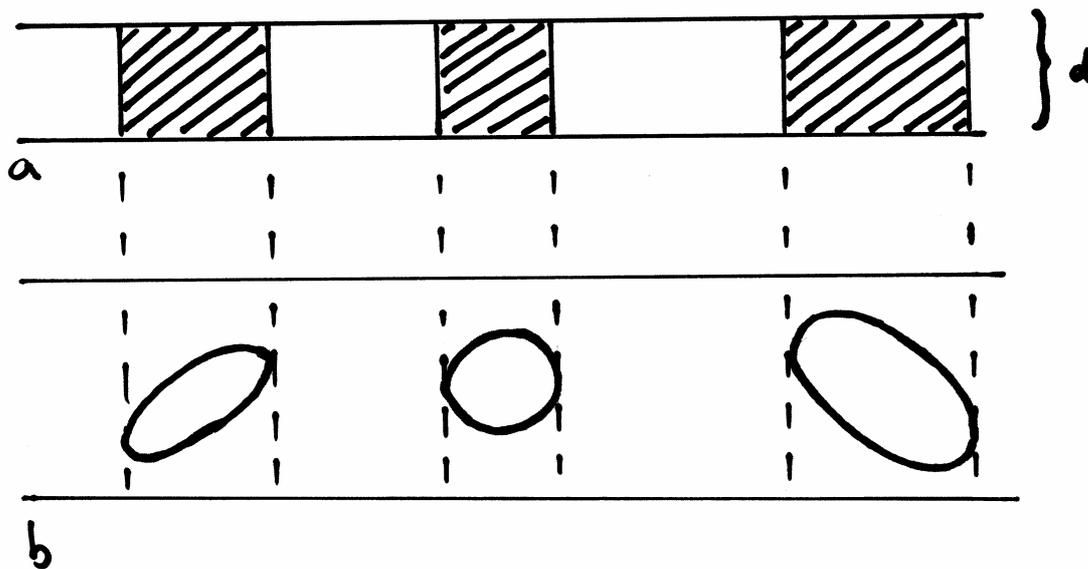


Abbildung 29: Beziehung zwischen relativen Volumina und Flächen.

a) Schematische Seitenansicht eines Schnittes der Dicke d . Die schraffierten Anteile sind die Seitenansichten der Strukturen in b). Die 3 Strukturen reichen durch den Schnitt hindurch. Die obere Anschnittsfläche der Struktur ist gleich der unteren.

b) Aufsicht auf den Schnitt.

Das Problem, relative Volumina von Strukturen zu bestimmen, reduziert sich so auf die Bestimmung von Flächeninhalten auf mikroskopischen Aufnahmen. Die Schnittdicke muss bekannt sein.

Durch Auflegen von Gitterrastern auf TEM-Aufnahmen kann durch Zählen der Gitterquadrate, die innerhalb eines Bildobjektes liegen, dessen Flächeninhalt bestimmt werden. Weiterentwicklungen der Methode benutzen nur Punktnetze.

4.6.3. Oberflächen

Auf ähnliche Art wie die Bestimmung von Volumina können Oberflächen berechnet werden.

Durch Auflegen von Testlinien-Schablonen auf TEM-Aufnahmen und Zählen von Schnittpunkten zwischen Membranen und den Testlinien können die Oberflächen von Membranen bestimmt werden. Beispielsweise ist die innere Mitochondrienmembran ein

empfindlicher Indikator des Energiestoffwechsels einer Zelle. Bei einer akuten Schädigung werden die Cristaemembranen nach und nach zerstört (Riede UN, Schaefer HE, 1995, S. 24). Eine genügend große Vergrößerung der TEM-Aufnahmen vorausgesetzt (zum Beispiel 1:60000), kann nach Auszählen der Schnittpunkte mit den Testlinien unter anderem die Gesamtfläche der Cristaemembranen in einer Leberzelle berechnet werden.

5. Zusammenfassung

In den „Lebenswissenschaften“ können heute automatisiert enorme Mengen mikroskopischer Aufnahmen erzeugt werden. Häufig ist die Bildauswertung ein zeitraubender und somit limitierender Faktor in Forschungsarbeiten. Eine automatische oder computerunterstützte Auswertung dieser Aufnahmen könnte einen Durchbruch in der Mikroskopie bedeuten. Anhand von TEM-Aufnahmen wurden deshalb Möglichkeiten einer automatischen bzw. halbautomatischen Bildanalyse untersucht. Es wurde das Bildanalysewerkzeug Cellenger verwendet. Das zugrunde liegende Prinzip wird bereits in der Fernerkundung angewendet (Gomes A, Marçal AR, 2003).

Die TEM-Aufnahmen entstanden im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit im Institut für Chirurgische Forschung an der LMU München. Sie zeigten Leberschnitte von Ratten nach warmer und kalter Ischämie. Eine dritte Tiergruppe diente als Kontrolle. Die Aufnahmen waren visuell ausgewertet worden. Die Fragestellung lautete, in welchen quantifizierbaren Schadensparametern sich die Gruppen unterscheiden.

Vorliegende Arbeit versuchte, computerunterstützt die Sinusoide eines Teils der Bilder auszuwerten. Die ermittelte Ergebnisse wurden, soweit möglich, mit Ergebnissen der oben genannten visuellen Auswertung verglichen.

Weiterhin wurde versucht einzuschätzen, ob die computerunterstützt ermittelten Ergebnisse sinnvoll und reproduzierbar sind. Hierzu wurden grundlegende Prinzipien der quantitativen Morphometrie beachtet.

Des Weiteren wurden TEM-Aufnahmen automatisch mit Hilfe von Cellenger ausgewertet. Es wurden Mitochondrien in den Hepatozyten erkannt und gezählt.

Ergebnisse

Es konnte in vorliegender Arbeit eine Methode entwickelt werden, mit der **halbautomatisch** die Sinusoide in den TEM-Aufnahmen ausgewertet wurden. Der nötige Zeitaufwand pro Bild betrug hierbei 6,25 Minuten. Es wurden Klassen definiert, die signifikante Unterscheidungen der drei Gruppen ermöglichen:

- Nach **kalter Ischämie** war kein „**Regelrechtes Endothel**“ mehr nachweisbar, die relative Fläche von „**Geschädigtes Endothel**“ war im Vergleich zur warmen Ischämie und Kontrolle signifikant größer. „**Abgelöstes Endothel**“ war im Vergleich zu diesen beiden Gruppen signifikant größer. Die relative Fläche des Endothels insgesamt („**Gesamt-Endothel**“) war im Vergleich zu beiden Gruppen signifikant kleiner. Die relative Fläche von „**Lumeninhalte**“ war im Vergleich zu diesen beiden Gruppen signifikant größer. „**Fehlende Endothelbedeckung**“ war signifikant größer nach Transplantation.
- Nach **warmer Ischämie** fand sich eine signifikant größere Fläche von „**Lumeninhalte**“ im Vergleich zur Kontrolle. In „**Fehlende Endothelbedeckung**“ unterschieden sich die drei Gruppen signifikant hinsichtlich der Endothelzellablösung.
- Ein Vergleich der Endothelzellablösung mit einer visuellen Bildauswertung wies in der Kontrolle und in der Transplantation eine sehr gute Übereinstimmung auf.

In 10 TEM-Aufnahmen wurden automatisch die Mitochondrien der Hepatozyten analysiert. Es wurden 19% der Mitochondrien gefunden. Insgesamt wurden 8 Bildobjekte falsch als Mitochondrium klassifiziert.

Schlussfolgerungen

Die zur computerunterstützten Bildauswertung definierten Klassen wurden entsprechend den Möglichkeiten eines Bildanalyse-Systems definiert. Sie erlauben eine Unterscheidung der 3 Gruppen Kontrolle, Ischämie und Transplantation. Die Klassen beschreiben komplexe

Strukturen räumlicher Ausdehnung. Diese räumliche Dimension führt zu schnittbedingten Effekten.

Die Klassen erlauben es, Flächeninhalte zu bestimmen. Einige der Flächeninhalte der Klassen sind teilweise voneinander abhängig. So ist beispielsweise der Flächeninhalt von „freies Lumen“ beeinflusst von einer Endothelzellschwellung und einem Endotheluntergang. Insgesamt könnten die oben genannten Merkmale aber dazu dienen, die drei Gruppen miteinander zu vergleichen. Eine Auswertung einer ausreichend großen Anzahl von Bildern ist hierfür die Voraussetzung.

Die Methode erlaubt im Wesentlichen, einen ausgeprägten Endothelzellschaden von nur gering geschädigtem Endothel zu unterscheiden.

Es konnte ein Teilergebnis der halbautomatischen Bildanalyse mit einer visuellen Auswertung verglichen werden. Hier zeigte sich ein hoher Grad an Übereinstimmung. Es wurde aber auch hierbei deutlich, dass die Klassifikation einiger Klassen besonders untersucherabhängig ist. Eine Reproduzierbarkeit ist somit nur bedingt gegeben.

Mitochondrien in TEM-Aufnahmen sind automatisch mit Cellenger nur in eingeschränktem Maße zu erkennen. Selektive Kontrastierung mit immunhistochemischen Methoden könnte hier einen bedeutenden Fortschritt bringen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CGL	Corpus geniculatum laterale
CLSM	confocal laser scanning microscope

2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
DNA	Desoxi-Ribonukleinsäure
exp.	Exponent
et al.	und Mitarbeiter
ff	und folgende
GP	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
IRS	Ischämie-/Reperfusionsschäden
Ischämie	Ischämiegruppe (warme Ischämie)
KC	Kupfferzelle
keV	Kiloelektronenvolt
Kontrolle	Kontrollgruppe
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MB	Megabyte
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Kinase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase
NO	Stickstoffmonoxid
PMN	neutrophile Granulozyten
RF	rezeptives Feld
RER	rauhes endoplasmatische Retikulum
Ring	eingezeichnete Umgrenzung des Sinusoids
ROS	freie Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
SOD	Superoxiddismutase
Randsaum	schmaler Gewebesaum, der das Sinusoid begrenzt
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
Transplantation	Transplantationsgruppe (kalte Ischämie)
UW	University-of-Wisconsin-Lösung
vs	versus

7.Literaturverzeichnis

Baatz M, Binnig G, Eschenbacher P, Melchinger A, Sögtrop M:

Verfahren zum Segmentieren eines digitalen Bildes.

Regionales Patent. Patentnummer: 98102285.8, EP-A-0 858 051. 10.12.1997.

Baatz M, Schäpe A:

Object-oriented and multi-scale image analysis in semantic networks.

Proc. of the 2nd international symposium on operationalization of remote sensing, Enschede, 1999.

Baatz M, Schäpe A, Schmidt G:

Verfahren zur Verarbeitung von Datenstrukturen.

Internationales Patent. Patentnummer: PCT/EP00/12681, WO01/450333. 14.12.1999.

Bieberthaler P, Athellogou M et al:

Evaluation of murine liver transmission electron micrographs by an innovative object-based quantitative image analysis system (Cellenger).

Eur J Med Res 2003; 8: 275-282.

Binnig G et al:

Nth order fractal network for handling complex structures.

German patent application Nr. DE 10945555.0 of 2. Oct. 1998 and DE 19908204.9 of 25 Feb. 1999. United States application 09/806,727 of Sept. 24,1999 and July 9,2001.

Brandis H, Pulverer G:

Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, ISBN 3-437-00484-0, 6. Auflage, 1988, S. 3.

Flaherty JT, Weisfeldt ML:

Reperfusion injury.

Free Radic Biol Med 1988; 5: 409-19.

Frederiks WM, Myagkaya GL, Bosch KS, Fronik GM, Veen HU, Vogels IM, James J:

The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia.

Histochemistry 1983; 78: 459-472.

Frenzel H:

Der Einfluß des Perfusionsdruckes bei der Perfusionsfixation auf die Feinstruktur der Lebersinusoide. Transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.

Res Exp Med 1976; 168: 229-241.

Gomes A, Marçal AR:

Land cover revision through object based supervised classification of RASTER data.

Proceedings of the ASPRS 2003 Annual Conference, Anchorage, USA, May 5-9.

Grobe M, Volk H, Münzenmayer C, Wittenberg T:

Segmentierung von überlappenden Zellen in Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen.

Bildverarbeitung für die Medizin 2003, Wittenberg T et al. (Herausgeber), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-00619-2, 2003, S. 201.

Gutierrez G:

Cellular energy metabolism during hypoxia.

Crit Care Med 1991; 19: 619-626.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ:

Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂.

J Biol Chem 1996; 271: 4138-4142.

Haug H:

Probleme und Methoden der Strukturzählung im Schnittpräparat.

Symposium über quantitative Methoden in der Morphologie, 8. Anat. Kongress, Wiesbaden 1965. Editoren: Weibel ER, Elias H.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1967.

Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM:

Decrease in core Liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs.

Surgery, 2003, 134(5): 806-17.

Hennig A:

Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie.

Zeiss-Werk-Ztg. 6, 1958.

Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN:

Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury.

Am J Physiol 1987; 253: 699-703.

Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K:

Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats.

Hepatology, 1992 Aug; 16(2):454-61.

Imamura H, Brault A, Huet PM:

Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation.

Hepatology 1997; 25: 664-671.

Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR:

Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver.

J Clin Invest 1988; 81: 1240-1246.

Jaeschke H:

Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia.

Am J Physiol 1990; 499-505.

Jaeschke H:

Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver.

Chem Biol Interact 1991; 79: 115-136.

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ:

Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia.

Free Rad Res Comm 1991; 15: 277-284.

Jaeschke H, Farhood A:

Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver.

Am J Physiol 1991; 260: 355-362.

Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA:

Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils.

Toxicol Appl Pharmacol 1996; 139: 213-226.

Jaeschke H:

Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver.

J Hepatobiliary Pancreat Surg 1998; 5: 402-408.

Junqueira LC, Carneiro J:

Histologie.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-53733-3, 3. Auflage, 1991, S. 10.

Kamke D, Walcher W:

Physik für Mediziner.

B.G. Teubner Stuttgart, ISBN 3-519-13048-3, 1994, S. 462 und folgende (ff).

Kauffmann GW, Moser E, Sauer R:

Radiologie.

Urban & Fischer Verlag München Jena, ISBN 3-437-42380-0, 2. Auflage, 2001, S.200).

Kawano K, Kim YI, Kaketani K, Kobayashi M:

The beneficial effect of cyclosporin on liver ischemia in rats.

Transplantation 1989; 48: 759-764.

Kim RD, Stein GS, Chari RS:

Impact of cell swelling on proliferative signal transduction in the liver.

J Cell Biochem 2001 Jun 26-Jul 25; 83(1):56-69.

Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N:

Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role of superoxide anion.

Hepatology 1992; 15: 507-514.

Kume M, Hayashi T, Yuasa H, Tanaka H, Nishioka J, Ido M, Gabazza EC, Kawarada Y, Suzuki K:

Bacterial lipopolysaccharide decreases thrombomodulin expression in the sinusoidal endothelial cells of rats—a possible mechanism of intrasinusoidal microthrombus formation and liver dysfunction.

J Hepatol, 2003 Jan;38(1):2.

Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Begler HG:

Ischemia/reperfusion damage of the liver caused by free radicals – direct radical detection using electron spin resonance.

Langenbecks Arch Chir 1991; 376: 139 -142.

Land W, Schneeberger H, Schleichner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K:

The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants.

Transplantation 1994; 57: 211-218.

Lehmann T, Oberschelp W, Pelikan E, Repges R:

Bildverarbeitung für die Medizin.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-61458-3, 1997, S. 359 ff.

Leonhardt H:

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, ISBN 3-13-371507-0, 1985, 7. Auflage, S. 413.

Loud AV:

A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells.

Journal of Cell Biology, 1968, 37: 27.

Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H:

Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia.

Free Radic Biol Med 1994; 16: 763-770.

Marzi I, Knee J, Bühren V, Menger M, Trentz O:

Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation.

Surgery 1992; 111: 90-97.

van der Meer C, Faber EG, Valkenburg PW:

Experiments on the cause of death in rats after permanent and temporary occlusion of the portal vein in rats.

Proc K Ned Akad Wet C. 1971;74(2):76-91.

Menger MD, Marzi I, Messmer K:

In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats.

Eur Surg Res 1991; 23: 158-169.

Metzger J, Dore SP, Lauterburg BH:

Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of xanthine oxidase.

Hepatology 1988; 8: 580-584.

Nagel E, Meyer zu Vilsendorf A, Bartels M, Pichlmayr R:

Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury.

Int J Vitam Nutr Res 1997; 67: 298-306.

Okajima K, Harada N, Kushimoto S, Uchiba M:

Role of microthrombus formation in the development of ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats.

Thromb Haemost 2002 Sep;88(3):473-80.

Otto G, Woll H, David H:

Preservation damage in liver transplantation: electron microscopic findings.

Transplantation Proc 1984;16:1247-1249.

Polishchuk RS, PolishchukEV, Trucco A, Mironov AA:

Pushing forward the resolution of time-lapse imaging by its correlation with electron microscopy.

Imaging and Microscopy, 2003, 5, S. 38-40.

Riede UN, Schaefer HE:

Allgemeine und spezielle Pathologie.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, ISBN 3-13-683304-X, 1995, 4. Auflage, S. 21.

Ruska E:

Die frühe Entwicklung der Elektronenlinsen und der Elektronenmikroskope.

Acta Historica Leopoldina, Kommissionsverlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig, ISSN 0001-5857, Nummer 12, 1979, S. 7 ff.

Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg.):

Physiologie des Menschen.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. ISBN 3-540-66733-4, 2000, 28. Auflage, S. 293 ff.

Schauer RJ:

Präventive Konzepte zur Reduktion hepatischer Ischämie-Reperfusionsschäden:

Postischämische Glutathion-Zufuhr und ischämische Präkonditionierung.

Habilitationsschrift zur Erlangung eines habilitierten Doktors der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002, S. 8).

Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M:

Induction of Cellular Resistance Against Kupffer Cell-Derived Oxidant Stress: A Novel Concept of Hepatoprotection by Ischemic Preconditioning.

Hepatology, 2003, 37, S. 286-295.

Sitte H:

Morphometrische Untersuchungen an Zellen.

Quantitative methods in morphology. Editors: Weibel ER, Elias H.

Springer Verlag, New York Inc. S. 167.

Soille P:

Morphologische Bildverarbeitung. Grundlagen, Methoden, Anwendungen.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-64323-0, 1998, S. 237 ff.

Stäubli W, Hess R, Weibel ER:

Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes.

Journal of Cell Biology, 1969, 42: S. 92 ff.

Steer MW:

Zellstrukturen – Stereologie und andere cytometrische Methoden.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, ISBN 3-437-20322-3, 1984, S. 15 ff.

Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD:

Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion.

Am J Pathol 1994; 145: 1421-1431.

Vollmar B, Richter S, Menger MD:

Leukocyte stasis in hepatic sinusoids.

Am J Physiol 1996; 270: 798-803.

Weibel ER:

Morphometry of the human lung.

Springer Verlag Berlin Göttingen Heidelberg, 1963.

Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR, Hess FA:

Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver.

Journal of Cell Biology, 1969, 42, S. 68 ff.

Welsch U:

Sobotta/Hammersen Histologie Farbatlas der Mikroskopischen Anatomie.

Urban & Schwarzenberg, München, ISBN 3-437-43140-4, 2002, 4. Auflage, S.6.

Wiltgen M:

Digitale Bildverarbeitung in der Medizin.

Shaker Verlag, Aachen, ISBN 3-8265-6212-7, 1999, S. 177 ff.

Yu BP:

Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.

Physiol Rev 1994; 74: 139-162.

8. Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, ehem. Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München, für die freundliche Aufnahme und Integration in sein Institut und seinem Nachfolger, kom. Direktor Prof. Dr. med. A. Baethmann für seine Weiterbetreuung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. M. Kleen für seine konstruktive und hilfreiche Kritik und für die viele Zeit, die er sich für mich genommen hat. Unter seiner Anleitung konnte ich Methoden wissenschaftlichen Arbeitens erlernen.

Herzlich bedanke ich mich bei meiner Mitbetreuerin Fr. Dr. rer. nat. Maria Athelou, die das Projekt „amobi2“ initiiert hat. Im Rahmen dieses Projektes wurden Anwendungsmöglichkeiten einer kommerziellen Software auf medizinische Grauwert-Bilder untersucht. Das Projekt wurde finanziert von der Bayerischen Forschungstiftung, der mein außerordentlicher Dank gilt.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Binnig für das großzügige Angebot, in seiner Firma Definiens über 2 Jahre arbeiten zu können, um die maßgeblich von ihm mitentwickelte Software unter medizinischen Gesichtspunkten zu prüfen.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei den beiden Mitarbeitern vom Institut für Chirurgische Forschung der LMU München, bei Frau Dr. Dr. R. Leiderer, die mir geduldig alle meine Fragen zur Transmissions-Elektronenmikroskopie beantwortet hat, und bei Herrn Dr. med. U. Grützner, der mir die Techniken der Lebertransplantation bei Ratten erläutert und demonstriert hat.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dipl.-math. A. Schäpe von der Firma Definiens für die vielen Erklärungen auf dem umfangreichen Gebiet der Bilderzeugung, der Bildverbesserung und der automatischen Bildanalyse.

Bei Frau Aschauer vom anatomischen Institut der LMU München bedanke ich mich für die praktischen Demonstrationen am Transmissions-Elektronenmikroskop.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung und den Mitarbeitern der Firma Definiens für die vielen kleine hilfreichen Gespräche, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. Lebenslauf

Markus Urbani
Gräfelinger Str. 158
81375 München
geb. am 01.10.63 in Lippstadt

- 1983 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Markt Schwaben
- 1985/1986 Zivildienst, Kreiskrankenhaus Erding
- 1986/1988 Berufsausbildung Bankkaufmann, Kreissparkasse Ebersberg
- 1988/1995 Studium Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1995/1997 Arzt i. P., Chirurgische Abteilung, Kreiskrankenhaus Schrobenhausen
- 1998/1999 Weiterbildung zur Erlangung der Zusatzausbildung 'Arzt f. med. Informatik'
- 2000 B&H GmbH Information Solutions, Starnberg
- 2000/2001 Chirurg. Dokumentation, Klinikum Großhadern, LMU München
- 2002/2004 Institut für Chirurgische Forschung, LMU München
- Seit 2004 Danuvius-Klinik, Ingolstadt