

Morphometrie mit Hilfe der Bildanalyse

Die Leistungsfähigkeit von Organsystemen ist anatomisch meßbar

Von Hans-Rainer Duncker und Andres Kriete *

In der Vergangenheit wurde die Struktur von Organen qualitativ beschrieben, während ihre Leistungsfähigkeit mit physiologischen Methoden unter verschiedenen Bedingungen gemessen wurde, so ihr Sauerstoffverbrauch oder ihre Arbeitsleistung. Nach der Entwicklung der elektronenmikroskopischen Darstellung der zellulären Bauelemente dieser Organe wurde es möglich, Größe und Ausdehnung dieser Bauelemente, die die maximale Leistungsfähigkeit dieser Organe bedingen, exakt zu bestimmen. Zur Messung dieser Bauelemente und Berechnung ihrer funktionell wichtigen Größen wurden in den letzten beiden Jahrzehnten die „Stereologischen Methoden“ entwickelt, speziell an Wirbeltierlungen. Die Messungen wurden anfangs von Hand durchgeführt, in den letzten Jahren wurden zur weitgehend automatischen Messung leistungsfähige Bildanalyse-systeme entwickelt. Die Möglichkeiten dieser quantitativen Analysen werden an den eigenen umfangreichen Untersuchungen am Atemapparat der Vögel dargestellt, zugleich wird das Bildanalyse-system des Instituts für Anatomie vorgestellt.

Die Vögel besitzen die leistungsfähigsten Lungen, wie vor Jahren bereits einmal im JLU-Forum (5/1981) dargestellt. Das ergaben nicht nur einzelne physiologische Messungen an Vögeln, deren Stoffwechsel im Fliegen in einem geschlossenen Windkanal gemessen wurde, sondern auch aus der außerordentlich komplizierten Struktur ihres Atemapparates. Sie besitzen den am höchsten differenzierten Apparat für den Gasaustausch unter allen Wirbeltieren. Alle landlebenden Wirbeltiere haben meist paarige Lungen ausgebildet, die durch Schluckvorgänge (bei Amphibien) oder durch die Atembewegungen des Rippenkorbes mit Frischluft ventiliert werden. Dabei werden die Lungen mit ihrem gekammerten Binnenraum erweitert. Die Wände dieser Kammern tragen die Blutkapillarnetze unter einem dünnen Deckepithel. Der Gasaustausch erfolgt zwischen der in die Kammern eingeatmeten Luft und dem in den Kapillaren strömenden Blut, speziell den roten Blutkörperchen, den Erythrozyten. Dabei müssen die Gase, das abzugebende Kohlendioxid aus den Erythrozyten, durch eine dünne Schicht von Blutplasma, durch die Kapillarwand, durch eine sehr dünne Zwischenschicht und durch das dünne Deck-

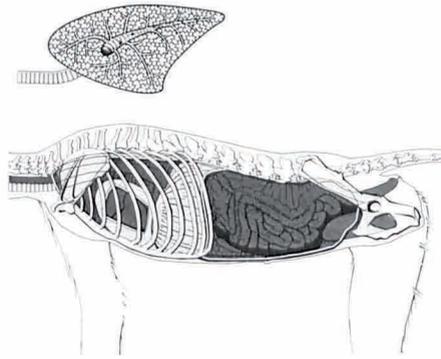


Abb. 1: Oben: Schema der bronchoalveolären Säugerlunge. Unten: Brust- und Bauchhöhle eines Rhesusaffen. Die Brusthöhle wird von dem Rippenkorb umschlossen und ist gegen die Bauchhöhle durch das Zwerchfell abgegrenzt. Im Brustkorb ist die linke Lungenhöhle nach Herausnahme der Lunge zu sehen sowie das Mittelfell mit dem Herzen, das die linke von der rechten Lungenhöhle trennt.

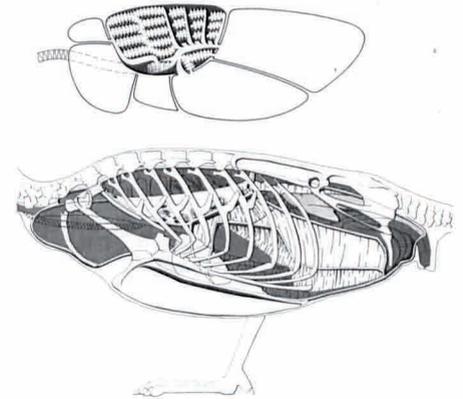


Abb. 2: Oben: Schema der parabronchialen Vogellunge mit ihren Luftsäcken. Unten: Brust- und Bauchhöhle einer Stockente. Unter den Brustwirbeln ist die linke Lungenhöhle zu sehen, aus der die Lunge herauspräpariert wurde, so daß ihre Abgrenzung nach unten durch das straffe Septum zu erkennen ist. Unter dem Septum liegen die Luftsäcke, die sich über den Brustkorb hinaus weit nach vorne und nach hinten in die Bauchhöhle ausdehnen.

epithel in die Luft der Lungenkammern hinausdiffundieren und der Sauerstoff in umgekehrter Richtung in die Erythrozyten hinein. Die Fähigkeit oder besser Kapazität zur Abgabe von CO₂ und Aufnahme von O₂ hängt nun davon ab, wie groß der Konzentrations- oder besser Partialdruckunterschied für diese Gase zwischen den Erythrozyten und der Luft in den Lungenkammern ist, wie dick die Barriere aus Lungenepithel, Zwischenschicht und Kapillarwand zwischen Erythrozyten und Lungenluft ist, und wie groß die gesamte Austauschoberfläche der Lunge ist, bezogen auf die zu versorgende Körpermasse.

Der Partialdruck der Gase ist in der eingeatmeten Frischluft für die auf Meereshöhe atmenden Landwirbeltiere gleich, der Partialdruck der Gase in ihrem Blut bewegt sich in einem vergleichbaren Bereich. Die großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Lungen der Landwirbeltiere liegen nun in der Größe der Austauschoberfläche, die sie pro Gramm Körpergewebe besitzen, und in der Dicke der Diffusionsbarriere zwischen Luft und Blut. Die Austauschoberfläche pro Gramm Körpergewebe, geteilt durch die mittlere Barriendicke, ergibt nun ein sehr gutes Maß, mit dem der von einer Lunge maximal zu leistende

Gasaustausch zu charakterisieren ist. Wir haben diesen Wert den „Anatomischen Diffusions-Faktor“ der jeweiligen Lunge genannt, der einen sehr guten Vergleich von Lungen ganz unabhängig von ihrer speziellen Bauweise gestattet. Die Barriendicke nimmt von den Amphibien und Reptilien zu den Säugern und besonders zu den Vögeln hin stetig ab. Besonders stark wächst aber die Größe der Austauschoberfläche von den einkammerigen Lungen der Amphibien, Eidechsen und Schlangen bis hin zu den mehrkammerigen Lungen der Schildkröten, Warane und Krokodile. Bei den Säugern ist die Lunge dann in eine Vielzahl von kleinen Lungenbläschen, Alveolen, unterteilt, die durch einen reich verzweigten Bronchialbaum angeschlossen sind (Abb. 1). Dadurch erreicht die Säugerlunge eine enorme Vergrößerung der Austauschoberfläche, die es diesen Warmblütern gestattet, ihren dauernd hohen Stoffwechsel zu unterhalten. Dieser strukturellen Entwicklung entsprechend nimmt der „Anatomische Diffusions-Faktor“ von den Amphibien zu den Schildkröten und Waranen hin zu, besonders hoch ist er dann bei den Säugetieren.

Bei den Amphibien, Reptilien und Säugern werden die Lungen durch die Atembewe-

* Zeichnungen von Christian Thiele, Institut für Anatomie und Zytobiologie

gungen Volumenänderungen unterworfen, sie sind die Blasebälge für ihre eigene Ventilation, während sie gleichzeitig in den Wänden ihrer Kammern oder Alveolen den Gasaustausch durchführen. Bei den Vögeln dagegen sind diese beiden Funktionen differenziert und auf zwei verschiedene Teile des Atemapparates verteilt. Die Lungen der Vögel führen nur den Gasaustausch durch, sie sind im Brustkorb zu beiden Seiten der Wirbelsäule allseitig verwachsen und gegen die Eingeweide durch ein straffes Septum abgegrenzt (Abb. 2). Diese starr gespannten Lungen bestehen aus dicht nebeneinander stehenden, miteinander verbundenen Parabronchien, die von Sekundärbronchien an der unteren und an der seitlichen Oberfläche der Lunge ausgehen. Die Sekundärbronchien entspringen vom Hauptbronchus, so daß die Luft vom Hauptbronchus aus über die seitlichen Sekundärbronchien die Parabronchien durchströmen kann, um über die unteren Sekundärbronchien zurückzukehren. Diese gleichgerichtete Durchströmung der Lunge wird von den unter dem Septum liegenden Luftsäcken bewirkt, die an die unteren Sekundärbronchien und an den Hauptbronchus angeschlossen sind, und die als Blasebälge durch die Atembewegungen ventiliert werden. Der starre Einbau der Vogellunge ermöglichte es, um die zahlreichen, in der Wand der Parabronchien radiär angeordneten Blutkapillaren herum, ein dichtes Geflecht dünner Luftkapillaren auszubilden. Dieses starke Maschenwerk von Blut- und Luftkapillaren ergibt gegenüber einer Säugerlunge eine ganz erhebliche Vergrößerung der Austauschoberfläche, außerdem gestattet es eine extrem dünne Ausbildung der Gewebearriere zwischen Luft und Blut. Diese Baueigentümlichkeiten ergeben einen im Vergleich zu Säugern viel höheren „Anatomischen Diffusions-Faktor“, der die maximale Leistungsfähigkeit der Vogellunge für den Gasaustausch präzise widerspiegelt.

Anatomischer Diffusions-Faktor

Bis zur Berechnung dieser „Anatomischen Diffusions-Faktoren“ war es jedoch ein weiter Weg. Nachdem wir die Grundstrukturen der Atemapparate der Vögel sowie der verschiedenen Reptiliengruppen dargestellt hatten und auch verstanden, wie sich aus dem gemeinsamen Reptilienstamm so grundsätzlich verschiedene Atemapparate wie der der Vögel und der der Säuger entwickeln konnten, stellte sich folgende Frage: Wo liegen über diese wesentlichen qualitativen Differenzen im Bau hinaus die wichtigen quantitativen Unterschiede in den für die Austauschfunktionen wichtigen Strukturen dieser verschiedenen Lungen, auf denen ihre unterschiedlichen Leistungsfähigkeiten beruhen? Dieser Frage gingen wir

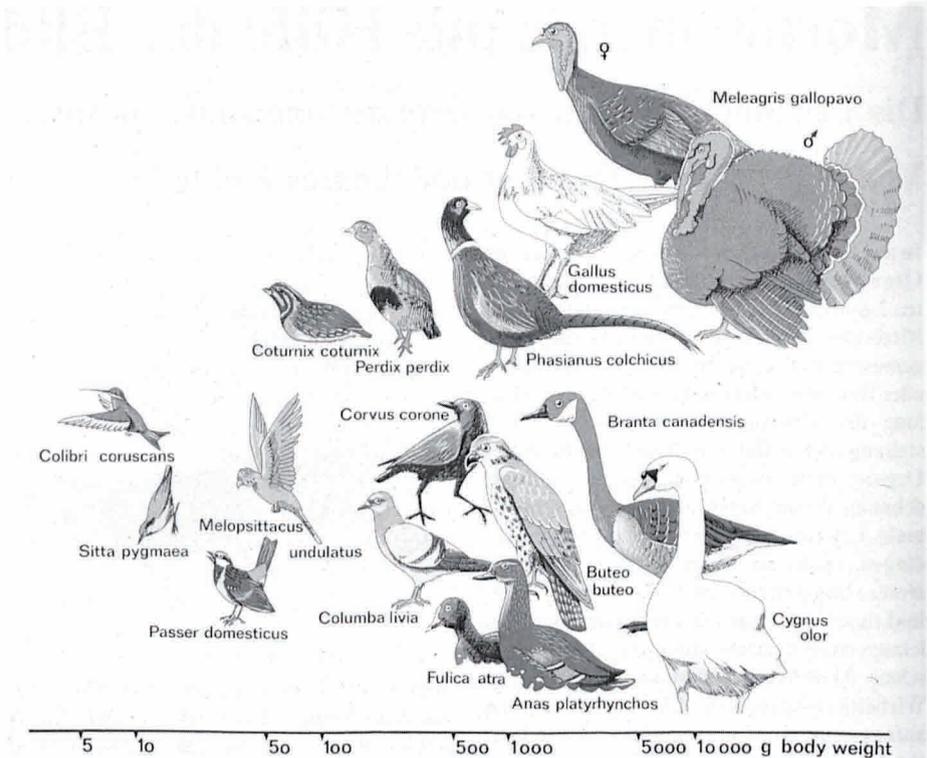


Abb. 3: Bei den dargestellten 16 Vogelarten wurde der quantitative Aufbau ihres Atemapparates analysiert: Obere Reihe: Europäische Wachtel, Rebhuhn, Jagdfasan, Haushuhn, Bronzeputen. Untere Reihe: Veilchenohrkolibri, Zwergkleiber, Haussperling, Wellensittich, Haustaube, Rabenkrähe, Bleßhuhn, Stockente, Mäusebussard, Kanadagans und Höckerschwan.

mehr als 15 Jahre zusammen mit mehreren Diplomanden und Doktoranden der Zoologie, Medizin und Veterinärmedizin nach. Dabei waren die Meßverfahren fast ausschließlich von Hand durchzuführen. Mit diesen Methoden haben wir inzwischen 16 Vogelarten vom Veilchenohrkolibri bis zum Höckerschwan untersucht (Abb. 3) und deren „Anatomische Diffusions-Faktoren“ berechnet. Ein ehemaliger Mitarbeiter bearbeitete außerdem eine Reihe von Reptilienlungen morphometrisch. Der Berner Arbeitsgruppe um den Anatomen Prof. Weibel, der als Pionier die Methoden der Stereologie und Lungenmorphometrie entscheidend entwickelt hat, verdanken wir die Daten von inzwischen 36 Säugerarten. Diese Daten von Reptilien, Säugern und Vögeln erlauben es jetzt, ganz unabhängig von der speziellen Struktur ihrer Atemorgane, ihre Lungen in Bezug auf ihre maximale Austauschleistung zu vergleichen.

Neues Verfahren

Die quantitative Untersuchung eines Organsystems beginnt mit der Messung von Gesamtkörper- und Organ-Frischgewichten an einer bestimmten Anzahl von Individuen, damit später die erhobenen Organdaten zu anderen Organsystemen und zur Gesamtmasse der Körpergewebe in Beziehung gesetzt werden können. Aufgrund der speziellen Struktur des Atemapparates der Vögel

mußten wir ein neues Verfahren entwickeln, um die Volumina ihrer Lungen und insbesondere ihrer Luftsäcke messen zu können, die so dünnwandig sind, daß sie nicht herauspräpariert und dann volumetriert werden können. Dazu wurden die Lungen und Luftsäcke, nachdem sie in einem Vakuumkasten evakuiert worden waren, mit einem dünnflüssigen Silikonkautschuk gefüllt, der dann in den Lungen und Luftsäcken ohne Schrumpfung polymerisierte. Diese Silikonkautschuk-Ausgüsse (Abb. 4) wurden herauspräpariert und das Volumen der einzelnen Anteile bestimmt. Im nächsten Schritt wurden Lungen im Körper fixiert und sorgfältig ohne Kompression herauspräpariert. Einige dieser Lungen wurden in 15–20 Scheiben gleicher Dicke zerlegt. An diesen Scheiben wurden nach stereologischen Methoden mit einem Punktzählverfahren mittels übergelegter Raster die Volumenanteile ermittelt, die 1) die Haupt- und Sekundärbronchien, 2) die versorgenden größeren Gefäße, und 3) die Parabronchien einnehmen (Abb. 5). Aus sechs definierten Regionen dieser Lunge wurden Gewebeproben von Parabronchien entnommen und in Paraffin eingebettet, um mikroskopische Serienschritte herzustellen. An diesen Serienschritten wurden mit gleichen stereologischen Methoden die Volumenanteile ermittelt, die 1) die Lumina der Parabronchien, 2) die zwischen ihnen liegenden Gefäße, und 3) das Blutkapillar-Luftkapil-

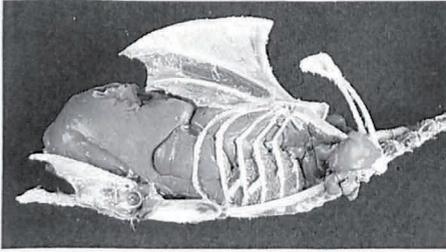


Abb. 4: Silikon-Kautschuk-Ausguß des Lungen-Luftsacksystems von einem Rebhuhn. In dem Skelett sind unter den oberen Rippen die Lungen zu sehen, die Luftsäcke füllen einen großen Teil des Rumpfes vor, unter und hinter den Lungen. Um Schulter- und Hüftgelenk herum liegen Aussackungen der Luftsäcke.

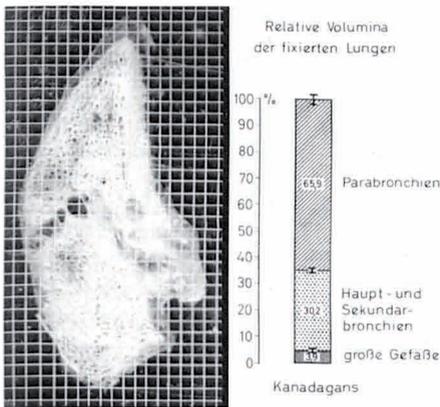


Abb. 5: Scheibe aus der Lunge einer Kanadagans mit übergelegtem Raster zur Bestimmung der relativen Volumina von 1) Haupt- und Sekundärbronchien, 2) größeren Gefäßen und 3) Parabronchien. Daneben die gewonnenen Daten grafisch dargestellt.

larnetzwerk ihrer Wand einnehmen (Abb. 6).

Das Meßverfahren

Aus speziell fixierten und herauspräparierten Lungen wurden dann aus den sechs definierten Regionen Gewebeproben des Blutkapillar-Luftkapillar-Netzwerkes der Parabronchien für die Elektronenmikroskopie eingebettet und ultradünn geschnitten. Von diesen Schnitten wurden Serien von Bildern bei ca. 5000facher Vergrößerung aufgenommen, an denen wieder mit übergelegten Rastern die Volumenanteile ermittelt, die 1) das Blut in den Blutkapillaren, 2) die Luft in den Luftkapillaren, und 3) das Gewebe zwischen Blut und Luft, also die Wandungen der Kapillaren, einnehmen (Abb. 7). Nun konnte aus allen bisher vorliegenden Meßschritten berechnet werden, wie groß das Volumen des gesamten Gefäßsystems in der Lunge ist, oder wieviel Blut sich nur in den Kapillaren der Lunge und damit im möglichen Gasaustausch befindet, oder wie groß das Volumen des Maschenwerks aus Blut- und Luftkapillaren

ist, also des eigentlichen Austauschgewebes.

An den Bildern der elektronenmikroskopischen Schnitte dieses Austauschgewebes wurden dann mit einem anderen stereologischen Verfahren mit Hilfe übergelegter Liniennetze die Größen der Oberflächen bestimmt, die 1) die Blutkapillaren und 2) die Luftkapillaren besitzen, und 3) die Anteile ihrer Oberflächen, die direkt aneinander grenzen, also die effektive Austauschoberfläche darstellen. Mit Hilfe der vorher gewonnenen Volumendaten der Lungen läßt sich nun berechnen, wie groß die gesamte sowie die effektive Austauschoberfläche der Lungen ist und wieviel Austauschoberfläche pro Gramm Körpergewebe ausgebildet ist. – An höher vergrößerten Aufnahmen der elektronenmikroskopischen Schnitte dieses Austauschgewebes aus den sechs Lungenregionen wurden dann nach einem weiteren stereologischen Verfahren die Dicke der Gewebeschicht zwischen Blutkapillaren und Luftkapillaren, also die Dicke der Diffusionsbarriere, gemessen. Aus diesen Meßwerten wurde das harmonische Mittel bestimmt, das am besten die physiologische Diffusionskapazität abbildet. Die Austauschoberfläche pro Gramm Körpergewebe, geteilt durch das harmonische Mittel der Dicke der Diffusionsbarriere, ergibt dann den „Anatomischen Diffusionsfaktor“ der einzelnen Art.

Umfangreiche Datensammlung

Um die Atemapparate der verschiedenen Landwirbeltiere miteinander zu vergleichen, haben wir alle verfügbaren, mit modernen morphometrischen Methoden gewonnenen Daten von Reptilien, Säugern und Vögeln zusammengestellt. So konnten wir die Volumina der ganzen Lungen, aber auch die Volumina des Gefäßsystems oder des Blutes in den Kapillaren, die Größe der Austauschoberfläche und die Barrierendicke der verschiedenen Atemapparate miteinander vergleichen. Wir errechneten den „Anatomischen Diffusionsfaktor“ nicht nur für die von uns untersuchten 16 Vogelarten, sondern auch für die untersuchten Reptilienarten und für 14 ausgewählte Säuger aller Körpergrößen nach den Daten von Weibel. Die Leistungsfähigkeit der Lungen steht nun direkt mit dem einer Tierart maximal möglichen Stoffwechsel in Beziehung. Betrachten wir den Stoffwechsel verschieden großer Tiere gleicher Bauweise und Physiologie, so wächst der Stoffwechsel nicht linear mit der Körpermasse, sondern er nimmt geringer zu: große Tiere setzen pro Gramm Körpergewebe weniger um als kleine, entsprechend verhält sich auch ihre CO₂-Abgabe und O₂-Aufnahme. Aus physiologischen Untersuchungen ist genau bekannt, daß Stoffwechsel und Gasaustausch

in Abhängigkeit vom Körpergewicht nur mit dem Exponenten 0,72–0,75 zum Körpergewicht steigen. Aus diesem Grund haben wir für den Vergleich der Lungen nach ihrem quantitativen Bau den „Anatomischen Diffusionsfaktor“ nicht zum direkten Körpergewicht, sondern zu dem mit dem Exponenten berechneten „Metabolischen Körpergewicht“ in Beziehung gesetzt, das der CO₂-Produktion und dem O₂-Verbrauch unmittelbar entspricht.

Nun können die in der Abb. 8 aufgetragenen Werte und Kurven interpretiert werden: Die Säugetiere besitzen einen 10mal so großen „Anatomischen Diffusionsfaktor“ ihrer Lungen wie die Reptilien, was wohl einer 10fach höheren maximalen Austauschkapazität entspricht und mit den physiologischen Stoffwechseldaten in guter Übereinstimmung steht. Die gut flugfähigen Vögel zeigen einen „Anatomischen Diffusionsfaktor“ und damit eine Austauschkapazität ihrer Lungen, die die der Säugetiere um den Faktor 6 bis 8 übertrifft, was der für

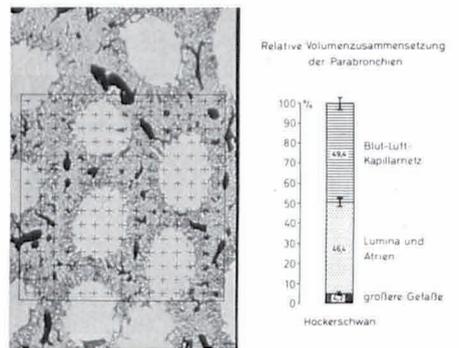


Abb. 6: Lichtmikroskopischer Schnitt durch die Parabronchien der Lunge eines Höckerchschwans mit übergelegtem Raster zur Bestimmung der relativen Volumenanteile von 1) Lumina der Parabronchien, 2) versorgenden Gefäßen und 3) dem Blutkapillar-Luftkapillar-Netzwerk. Rechts die Grafik der erhobenen Werte.

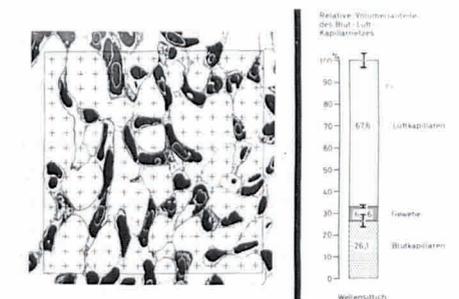


Abb. 7: Elektronenmikroskopischer Schnitt durch das Blutkapillar-Luftkapillar-Netzwerk der Parabronchien einer Wellensittich-Lunge mit übergelegtem Raster zur Bestimmung der relativen Volumina 1) des Blutes in den Blutkapillaren, 2) der Luft in den Luftkapillaren und 3) der Kapillarwandungen. Daneben die Darstellung der erhobenen Werte.

den Dauerschlagflug notwendigen Leistung wohl sehr gut entspricht. Die Regressionsgeraden (Abb. 8) für die Reptilien, Säuger und Vögel sind jeweils um den angegebenen Faktor parallel verschoben.

Ein sehr bemerkenswertes Ergebnis dieser Untersuchung liegt nun in der grundsätzlichen Abweichung der Steigerung der Regressionsgeraden, die den Diffusions-Faktor der Lungen der Hühnervögel abbildet: mit zunehmender Körpergröße nimmt ihr „Anatomischer Diffusions-Faktor“ drastisch ab. Das weist auf eine ganz andere stammesgeschichtliche Entwicklung des Stoffwechsel-Verhaltens der Hühnervögel hin: Während alle übrigen dargestellten Landwirbeltiere gerade für ihr Überleben durch Flucht einen maximal zu steigernden Leistungsstoffwechsel für maximale Tätigkeit ihrer roten Lauf- oder Flugmuskulatur ausbildeten, haben die größeren Hühnervögel darauf verzichtet. Ihre aus weißen Fasern bestehende, gewaltig vergrößerte Flugmuskulatur beladen sie durch ihren Grundstoffwechsel mit Nährstoffen, insbesondere Glykogen, aus dem sie die für den kurzen Fluchtflug notwendige Energie ohne Sauerstoffzufuhr, also anaerob gewinnen. Für diese Tätigkeit ihrer leicht erschöpfbaren Flugmuskulatur bedarf es keiner besonderen Stoffwechselsteigerung und damit auch keiner besonderen Austauschleistung der Lungen. Diese hier erstmals so klar dargestellte andersartige physiologische Konstruktion der größeren Hühnervögel wirft nun eine Fülle von Fragen auf, die Ansätze für weitere Untersuchungen enthalten, zumal diese Physiologie der Hühnervögel stammesgeschichtlich sicher das ursprünglichere Prinzip darstellt.

Die Darstellung der „Anatomischen Diffusions-Faktoren“ der Abb. 8 schlüsselt noch ein weiteres grundlegendes Konstruktionsprinzip der Atemapparate von Landwirbeltieren auf. Zuerst wies Weibel darauf hin, daß die mit diesem Faktor dargestellte anatomische Diffusionskapazität der Lungen von den kleinsten zu den größten untersuchten Säugern für die Aufnahme der gleichen Menge Sauerstoff auf den 10fachen Wert ansteigt. Die Darstellung der Abb. 8 zeigt nun, daß diese Zunahme der anatomischen Diffusionskapazität mit steigender Körpergröße pro Gramm metabolischen Körpergewichtes ebenso für die Reptilien wie für die gut flugfähigen Vögel zutrifft. Damit ist ein Konstruktionsprinzip der Lungen aller untersuchten hochleistungsfähigen Landwirbeltiere beschrieben.

Unterschiedliche Lungenkonstruktionen

Kürzlich publizierte Lindstedt nun für die Säuger eine Interpretationsmöglichkeit, die dieses quantitative Verhalten ihrer Lungen bei Körpergrößenzunahme jetzt verständ-

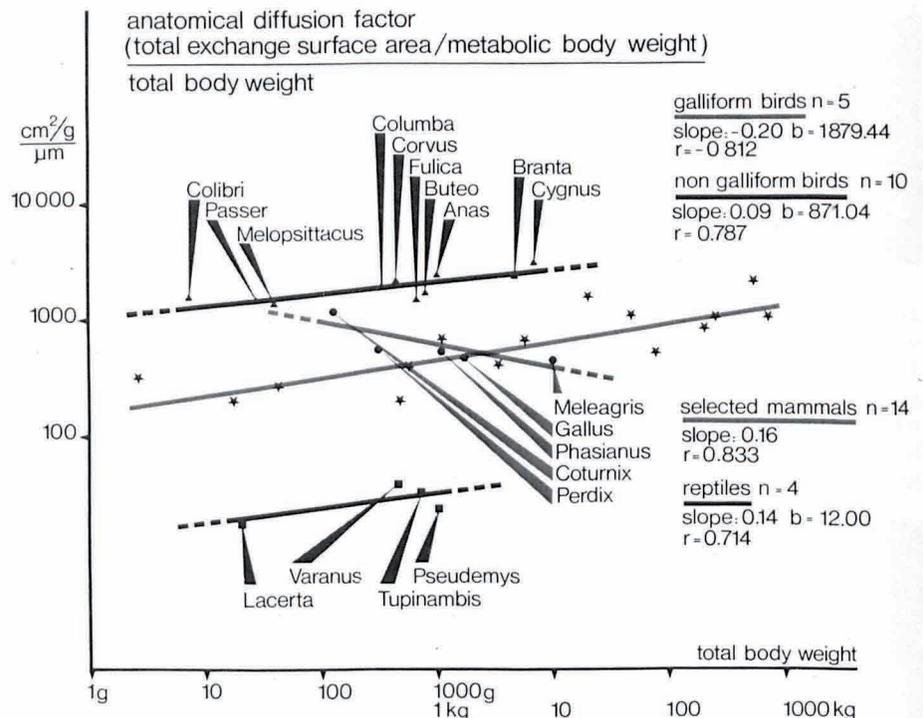


Abb. 8: Darstellung des „Anatomischen Diffusions-Faktors“ für die untersuchten gut flugfähigen Vögel (Dreiecke und oberste Regressionsgerade) und die Hühnervögel (Kreise und fallende Regressionsgerade). Darunter sind die entsprechenden Werte für 14 ausgewählte Säugerarten (Sterne mit mittlerer Regressionsgerade) und für die bisher untersuchten Reptilien (Vierecke mit unterster Regressionsgerade) aufgetragen.

lich macht. Mit der Zunahme der Körpergröße sinkt aus mechanischen Gründen die Atemfrequenz drastisch ab, große Tiere können viel seltener einatmen als kleine. Dadurch muß sich das Blut viel länger mit der bei einem Atemzug eingeatmeten Frischluft austauschen, wodurch also bei großen Tieren der in den Lungenkammern oder Alveolen vorhandene durchschnittliche Partialdruck für CO_2 höher, für O_2 niedriger ist als bei kleinen Tieren, wodurch die Austauschleistung pro Oberfläche bei großen Tieren viel kleiner ist als bei kleinen Tieren. Diese körpergrößenabhängige Konstruktionsbedingung kompensieren nun große Tiere dadurch, daß sie die Austauschoberfläche viel stärker vergrößern, als es ihrem absoluten Stoffwechselbedarf entsprechen würde. Das ist der Grund dafür, warum sich die Lungen, abweichend von den meisten anderen Organsystemen, linear mit zunehmendem Körpergewicht vergrößern. Wir konnten nun nachweisen, daß das nicht nur für die Säugetiere, sondern in ganz identischer Weise auch für Vögel und Reptilien zutrifft. Das gilt für alle von uns untersuchten quantitativen Lungenstrukturen, wodurch belegt wird, daß wir damit ein grundlegendes Bauprinzip der Atemorgane von Landwirbeltieren herausarbeiten konnten.

Dieses Ergebnis illustriert am besten, welche Aussagemöglichkeiten derart breit angelegte quantitative Untersuchungen besit-

zen. Wir setzen sie jetzt fort mit der quantitativen Analyse des Kreislaufsystems und der Muskulatur, speziell der Flugmuskulatur, bei den untersuchten Vogelarten. Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe befassen sich mit der quantitativen Analyse des Darmtraktes bestimmter Säugetiergruppen und dem quantitativen Aufbau spezialisierter Gefäßsysteme von Fischen. Während wir die Messungen oder Zählungen für die in diesem Aufsatz vorgestellten Ergebnisse vom Atemapparat noch ganz von Hand vornahmen, konnten wir für die Weiterführung dieser Untersuchungen vor einiger Zeit das Bildanalysegerät IBAS 2000 der Firma Kontron Bildanalyse, Eching bei München, anschaffen. Die für breit vergleichende Untersuchungen notwendigen Datenmengen sind so groß, daß sie nur durch eine weitgehend automatisierte Erhebung gewonnen werden können. Ohne diese apparative Unterstützung wären die nächsten wesentlichen Ergebnisse erst wieder in ein bis zwei Jahrzehnten zu erwarten.

Digitale Bildanalyse

Die Bildanalyse für quantitative Strukturuntersuchungen oder „Morphometrie“ stellt die apparative Anwendung der stereologischen Methoden mit Hilfe der digitalen Bildanalyse und Bildsynthese dar. Dabei liegt folgendes Prinzip zugrunde: Durch ei-

né Fernsehkamera wird ein Bild des zu untersuchenden Objektes, also von einer Organscheibe, einem mikroskopischen Präparat oder von einem elektronenmikroskopischen Bild aufgenommen und in die Apparatur eingelesen. Dazu müssen die Objekte oder Bilder so vorbehandelt werden, daß die verschiedenen, einzeln zu messenden Strukturen im Fernsbild in ihren Grau- oder Farbwerten sicher voneinander abzugrenzen sind. Dann kann das System die verschiedenen gewünschten Parameter, wie Anzahl und Flächen der Elemente, ihre Durchmesser, Umfänge und Größenklassierung mit Hilfe der vorhandenen Programme messen und grafisch darstellen sowie nach den stereologischen Methoden auch die gewünschten Aussagen über Volumenanteile, Oberflächengrößen oder Durchmesser kategorien berechnen. Für biologische Untersuchungen ist nun die interaktive Ergänzung der automatischen Objektunterscheidung ein ganz wesentliches Moment: Überall dort, wo die Farb- oder Grauwertstufenunterscheidung keine ausreichende Trennung der Elemente für die digitale Analyse ermöglicht, wird mit Hilfe eines Lichtpunktes im Fernsbild, der durch einen Cursor auf einem Digitalisierbrett gesteuert wird, die erforderliche Trennung von Hand ergänzt. Das für jedes Objekt neu zusammenzustellende Meßprogramm wird dann so angeordnet, daß es an den entscheidenden Punkten zur interaktiven Korrektur unterbrochen wird, nach der es dann automatisch weiterläuft. Die apparative morphometrische Bildanalyse wird durch ein reiches Bildbearbeitungsprogramm unterstützt, mit dem im Bildspeicher abgespeicherte Bilder in ihrer Grauwertdarstellung verändert werden können. Einzelne Bildelemente können herausgefiltert oder zu einer Maske für das ursprüngliche Bild verarbeitet und mit ihm verrechnet werden. Außerdem können störende Strukturen eliminiert, die Grauwertunterschiede vergrößert oder die vorhandenen Grauwerte umverteilt werden. Durch das Setzen von Grauwertschwellen können dann die verschiedenen zu messenden Strukturen automatisch abgegrenzt werden. Durch diese Bildverarbeitung kann das Bild so verbessert werden, daß die zu analysierenden Strukturen durch ihre Grauwerte zu differenzieren sind, so daß alle gewünschten Parameter apparativ meßbar werden.

Die Vorteile

Die Vorteile einer solchen Apparatur liegen darin, daß nach der Zusammenstellung des Programms und der Auswahl der Bildverarbeitungsschritte für eine zu untersuchende Art von Präparaten oder Bildern dann große Serien dieser Präparate oder Bilder

mit großer Geschwindigkeit, hoher Meßgenauigkeit und gleichzeitiger Erfassung mehrerer Parameter verarbeitet werden können. Der Computer dieser Anlage kann gleichzeitig die gewonnenen Daten weiterverarbeiten, die gewünschten Größen errechnen und nach der Messung der erforderlichen Zahl von Präparaten die Meßergebnisse numerisch und grafisch darstellen. Damit steht die Bildanalyse nicht nur für quantitative Untersuchungen, wie diese hier vorgestellte Grundlagenforschung zur Verfügung, sondern auch für diagnostische Aufgaben in der Medizin, so zum Beispiel in der Zytodiagnostik. Großen Einsatz haben Bildanalysegeräte inzwischen in der industriellen Produktionskontrolle gefunden.

Dreidimensionale Rekonstruktionen

Wir haben unser Bildanalyse-System in enger Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma *Kontron Bildanalyse* für einen speziellen Anwendungsbereich weiter ausgebaut, mit zusätzlicher umfangreicher Computerleistung und Datenspeicherkapazität, nämlich für die grafische dreidimensionale Rekonstruktion von Organstrukturen. Dazu wird ein Organ in eine regelmäßige Serie von makroskopischen, mikroskopischen oder elektronenmikroskopischen Scheiben oder Schnitten zerlegt. Auf Bildern dieser Scheiben oder Schnitte werden die Konturen der zu rekonstruierenden Strukturen mit dem Cursor auf dem Digitalisierbrett von Hand nachgefahren, wodurch die Koordinaten dieser Konturlinien abgespeichert werden. Aus den abgespeicherten Konturlinien der ganzen Schnittserie rekonstruiert der Rechner dann Schnitt für Schnitt das gewünschte Objekt unter jedem gewünschten Betrachtungswinkel. Dabei können mehrere Strukturen aus dem gleichen Organ nacheinander oder auch ineinander rekonstruiert werden. Durch eine filmartige Darstellungsabfolge einer Serie von Rekonstruktionen, die jeweils um 2–3 Grad gedreht sind, kann man dann das rekonstruierte Objekt auf dem Bildschirm um jede Raumachse rotieren lassen und von allen Seiten betrachten.

Weniger Zeitaufwand – mehr Möglichkeiten

Die klassische Weise der Rekonstruktion war das Herauszeichnen der Konturlinien am Mikroskop auf Wachs- oder Styroporplatten, aus denen die konturierten Flächen dann ausgeschnitten und zu einem Modell durch Aufeinanderkleben aufgebaut wurden. Dieses Verfahren ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Die grafische Rekonstruktion leistet Entsprechendes in einem Bruchteil der Zeit mit der Möglichkeit beliebiger Kombination mit anderen rekonstruierten Elementen. Dadurch sind jetzt Entwick-

lungsabläufe im Wachstum nicht nur durch einzelne Modelle, sondern durch Serien von Rekonstruktionen darstellbar. Die Abbildung im Inhaltsverzeichnis auf Seite 1 zeigt ein Beispiel aus einer Rekonstruktionsserie, mit der wir die komplizierte Umgestaltung des zweischichtigen Kapillarnetzes der Alveolenanlage in das einschichtige Kapillarnetz der fertigen Alveolenwand untersuchen.

Für die Weiterentwicklung dieser Rekonstruktionsmethode liegen die derzeitigen Aufgaben neben dem apparativen Ausbau zur Erhöhung der dreidimensionalen Verarbeitungskapazität in der Verbesserung und Beschleunigung der Programme für die Rekonstruktion. Die dazu notwendigen umfangreichen Programmentwicklungen führen wir in Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma durch. Dabei verfolgten wir vor allem zwei Entwicklungsziele: Die Konturengewinnung der zu rekonstruierenden Strukturen soll an den mit der Fernsehkamera in das Gerät eingezogenen Bildern weitgehend automatisiert werden, und die Rechenzeit für die Rekonstruktionen soll wesentlich verkürzt werden. Die bisher erreichten Fortschritte sind außerordentlich vielversprechend, so daß wir die Voraussage machen können, daß diese Rekonstruktionsmethode in wenigen Jahren in Biologie und Medizin gleichberechtigt neben der Rasterelektronenmikroskopie stehen wird. Während das Rasterelektronenmikroskop nur natürliche innere und äußere Oberflächen darstellen kann, kann diese apparative grafische Rekonstruktionsmethode jedes Strukturelement von Organen oder Organismen, dessen Konturen abgrenzbar sind, in seiner dreidimensionalen Erscheinung unter jedem gewünschten Betrachtungswinkel darstellen. Zugleich können für alle rekonstruierten Strukturen vom Gerät auch eine große Zahl quantitativer Daten geliefert werden, da es ja aus der quantitativen Bildanalyse hervorgegangen ist und deren sämtliche Meßmöglichkeiten enthält.

Zukunftsaussichten

Die heute vorhandenen Bildanalyse-Systeme stellen für alle morphometrischen Untersuchungen den wichtigsten methodischen Fortschritt der letzten Jahre dar. Durch die Entwicklung der grafischen dreidimensionalen Rekonstruktion können wir einen zweiten, zumindest ebenso wichtigen methodischen Fortschritt für Biologie und Medizin verzeichnen: In Zukunft können wir auch die uns bisher in ihrer komplizierten räumlichen Konfiguration unbekanntesten Strukturen von Organen, die bisher räumlich nicht vorstellbaren Anordnungen verschiedener Gewebe, mit einem vertretbaren Arbeits- und Zeitaufwand anschaulich dreidimensional darstellen.