Aus dem
C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Karl Zilles

Struktur und Anwendung eines Programms (NucleoScope) zur effizienten Volumenbestimmung in morphologischen Schnittpräparaten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Anastasios Mpotsaris

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Prof. Dr. Dr. Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. Rehkämper
Korreferent: Prof. Novotny, PhD

In Liebe meinem Großvater Anastasios gewidmet, der mir nicht nur Vorbild, sondern auch Freund gewesen ist

GLIEDERUNG / INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
1	**EINLEITUNG**	7
1.1	Definition Morphometrie	7
1.2	Morphometrie im Kontext moderner bildgebender Verfahren	8
1.3	Nachteile und spezielle Probleme der histologischen Morphometrie	8
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	10
2	**MATERIAL UND METHODEN**	11
2.1	Tiere	11
2.1.1	Verwendete Rassen	11
2.1.2	Herkunft, Anzahl und Geschlecht der Tiere	12
2.1.3	Perfusion, Präparation, Hirngewichtsbestimmung und individuelle Schrumpfung	13
2.1.4	Fixierung und histologische Aufarbeitung	14
2.2	Untersuchte Kerngebiete	15
2.3	Mikroskopietechnik mit Einspiegelung, Umfahrung und Abgrenzungskriterien	16
2.4	Der Logitech IO-Pen und Papier mit Anoto-Funktionalität	17
2.4.1	Markteinführung und Anwendungsbereiche	17
2.4.2	Technik und Funktionsprinzip	17
2.4.3	Papier mit Anoto-Funktionalität	19
2.4.4	Zusammenspiel IO-Pen und Papier mit Anoto-Funktionalität	21
2.4.5	Akkulaufzeit, Speichervolumen und optische Auflösung des IO-Pen	22
2.5	Umfahrung und methodenübergreifendes Prinzip der Volumenbestimmung	22
2.6	Vorbestehende Methodik mittels Zeichentablett	24
2.6.1	Kalibrierung	24
2.6.2	Digitalisierung	25
2.6.3	Volumenberechnung	26
2.7	Eigenentwickelte Methodik mittels IO-Pen	26
2.7.1	Voraussetzungen für den Einsatz der eigenentwickelten Methodik	26
2.7.1.1	Speicherung der Daten im IO-Pen	26
2.7.1.2	Datenübertragung zum PC und Funktionsumfang der Logitech IO-Software	26
2.7.1.3	Potentielle Lücken und manuelle Schließung	27

2.7.2	Programmierung NucleoScope	28
2.7.2.1	Programm-Konzept, -Plattform und -Sprache	28
2.7.2.2	Überwachung des Zielordners und Initiierung Photoshop CS	29
2.7.2.3	Morphometrische Analyse Photoshop CS mit Erweiterung Fovea Pro 3.0	29
2.7.2.4	Import Textdatei, Namenscodierung und Volumenberechnung	35
2.7.2.5	Ablage in Datenbank	36
2.7.3	Zusätzliche Programm-Features	37
2.7.3.1	Grafische Benutzeroberfläche	37
2.7.3.2	Benutzerdefinierte Eingaben	37
2.7.3.3	Kompatibilität und Exportfunktion	38
2.7.4	Kalibrierung Fovea Pro 3.0	38
2.7.4.1	Bestehende Kalibrierungsmethode und Problemstellung	38
2.7.4.2	Minimierung des Kalibrierungsfehlers	39
2.7.5	Entwicklung eines automatisierten Schließungsalgorithmus in VBA	41
2.7.5.1	Nachbarschaftsdefinitionen im Pixelraster	42
2.7.5.2	Nachbarschaftsdefinition in Fovea Pro 3.0 und Stufen-Phänomen	44
2.7.5.3	Implementierung morphologischer Operatoren	45
2.8	Methode der statistischen Auswertung und EDV	45
2.8.1	Methode nach Bland und Altman	46
2.8.2	Volumina als zusammengesetzte Größen	48
3	**ERGEBNISSE**	48
3.1	Volumenanalysen	48
3.1.1	Volumina mittels Zeichentablett	48
3.1.2	Volumina mittels NucleoScope	49
3.1.3	Methodenvergleich nach Bland und Altman	50
3.1.3.1	Grafische Darstellung der Volumina mit line of equality	50
3.1.3.2	Grafische Darstellung der Einzelschichten aller Tiere mit line of equality	51
3.1.3.3	Grafische Darstellung der Einzelschichten pro Tier mit line of equality	52
3.1.3.4	Grafische Darstellung der kumulierten Flächeninhalte mit Vertrauensbereich	53
3.1.3.5	Bland-Altman-plot	55
3.2	Effekt des Kalibrierungsfehlers	57
3.3	Optimierung des Schließungs-Algorithmus	59
3.3.1	Anzahl der Iterationen der morphologischen Schließung	60
3.3.2	Effekt des automatisierten Schließungs-Algorithmus auf die Kernvolumina	63

4 DISKUSSION 64
4.1 Vergleich der Ergebnisse beider Methoden 64
4.2 Methodische und technische Vorteile des neuen Algorithmus 66
4.3 Methodische und technische Nachteile des neuen Algorithmus 67
4.4 Vorteile und Möglichkeiten der Software NucleoScope 67
4.5 Hardware-Anforderungen und Kosten der Methode mit IO-Pen und NucleoScope 68
4.6 Vergleich mit alternativen Methoden 69

DANKSAGUNGEN 72

5 LITERATURANGABEN 73

6 CURRICULUM VITAE 76

7 ANHANG 78

8 ZUSAMMENFASSUNG 94

1. Einleitung

1.1 Definition Morphometrie

Unter Morphometrie versteht man die quantitative Erfassung und vergleichende Analyse biologischer Formen. In der Neurobiologie wird sie in vielfältiger Form angewandt. Zielsetzung ist dabei das Auffinden signifikanter struktureller Unterschiede zwischen den Untersuchungsobjekten (z.B. Größen von Gehirnen und ihrer anatomischen Komponenten), und die Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse – auf der Basis einer initialen neurobiologischen Fragestellung – in den übergeordneten biologischen Zusammenhang.

Man geht davon aus, dass die besondere Leistungsfähigkeit eines Organismus – z.B. im Bereich der Somatosensorik – mit einer Größenzunahme korrespondierender Hirnareale einhergeht. Zahlreiche Publikationen auf diesem Gebiet konnten einen solchen Zusammenhang zeigen. So fanden z.B. Stephan et al. (1988) bei terrestrischen Insektivoren mit stark ausgeprägtem olfaktorischen System im Vergleich zu Primaten mit schlechter ausgeprägtem olfaktorischen System eine Größenzunahme des Bulbus olfactorius. Ameisen-Spezies, die neben olfaktorisch geprägten Verhaltensmustern auch visuell geprägte Verhaltensmuster aufweisen, zeigen – gegenüber Ameisen ohne visuell geprägten Verhaltensmustern – im Gehirn eine deutliche Größenzunahme des visuellen Systems, welche eng mit der Anzahl visuell bestimmter Verhaltensmuster und der Größe der Augen korreliert (Gronenberg and Holldobler, 1999).

Analog lassen sich auch beim Menschen neuropathologisch bei zahlreichen degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems volumetrische Veränderungen in den betroffenen Hirnarealen finden, die mit einem Funktionsverlust und entsprechender klinischer Symptomatik einhergehen können. Diesen Zusammenhang konnten Lange und Thörner (1974) auf histologischer Basis am Beispiel der Chorea Huntington dokumentieren. Solche Erkenntnisse der histomorphologischen Untersuchungen konnten analog auch in aktuellen Studien mittels bildgebender Verfahren bestätigt werden, so z.B. für die Herpes simplex Encephalitis, deren negativer Einfluss auf das Volumen der grauen Substanz des limbischen und paralimbischen Systems von Gitelman et al. (2001) demonstriert werden konnte.

1.2 Morphometrie im Kontext moderner bildgebender Verfahren

Die Morphometrie ist heute ein vielfältiges Werkzeug, um Strukturdaten aus verschiedensten Quellen zu quantifizieren. In der medizinischen Routine verlässt kaum ein Patient mehr ein Krankenhaus, ohne mit einem bildgebenden Verfahren in Berührung gekommen zu sein.
Diese dienen in den einfachsten Fällen der Erhebung morphometrischer Parameter im zweidimensionalen Bild wie Durchmesser, Abstand oder Fläche der betrachteten Struktur. Modernste bildgebende Verfahren wie z. B. Positronen – Emissions – Tomographie (PET) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erlauben dreidimensionale Rekonstruktionen und eine Vermessung erfasster Strukturen (Whalley and Wardlaw, 2001) sowie eine Voxel (Volume – Pixel) – basierte morphometrische Analyse (Good et al., 2001). Da die Auflösung der Magnetresonanztomographie aufgrund kontinuierlicher Verbesserung der Technik mit Erhöhung der magnetischen Feldstärke immer weiter zunimmt, ist davon auszugehen, dass die Auflösungen, die heute nur mittels Mikroskop direkt am histologischen Schnitt erreicht werden, in Zukunft auch am lebenden Objekt im MRT erreicht werden können. Bereits heute ist mit der MRT bei einer Feldstärke von 9,4 Tesla eine Darstellung der kortikalen Schichten im Formalin – fixierten Gehirn möglich (Fatterpekar et al., 2002).
Wenn es um räumliche Auflösung und Vermessung anatomischer Strukturen geht, gilt weiterhin die volumetrische Rekonstruktion aus histologischen Präparaten als Standard, an dessen Ergebnissen die Qualität von Resultaten der bildgebenden Verfahren beurteilt wird (Weber et al., 2005).

1.3 Nachteile und spezielle Probleme der histologischen Morphometrie

Das bestehende zentrale Problem in der praktischen Anwendung der histologischen Morphometrie ist der personelle und materielle Aufwand, der notwendig ist, um zuverlässige Daten aus aussagekräftigen Präparaten zu gewinnen. Von der zeitaufwändigen Herstellung der Präparate abgesehen, die Voraussetzung für jede manuelle oder automatisierte histomorphometrische Messung ist, wird bei manuellen Meßverfahren mindestens ein fachkundiger Untersucher benötigt. Er identifiziert Strukturgrenzen und umfährt diese zunächst zur initialen Markierung und später erneut zur Digitalisierung auf einem Digitalisiertablett. Der notwendige Zeitaufwand zur Bestimmung der Fläche verdoppelt sich aufgrund der zweimaligen Umfahrung. In einem praktischen Beispiel verdeutlicht, bedeutet dies für einen erfahrenen Untersucher:

Er benötigt ca. 5 Minuten, um 30 Kernschnittebenen beider Nuclei rotundi im Gehirn eines Hühnervogels erstmalig zu umfahren. Weitere 5 Minuten, um sie zu digitalisieren und ca. 1 Minute, um den Flächeninhalt und konsekutiv das Volumen zu berechnen. Insgesamt sind dies ca. 11 Minuten, um das Gesamtvolumen beider Nuclei rotundi bei einem Tier zu erfassen. Soll als Fragestellung z.B. ein allometrischer Vergleich der Nuclei rotundi zwischen 10 Taubenrassen und 10 Haushuhnrassen mit jeweils 10 Individuen pro Rasse erstellt werden, so würde allein für die Volumenbestimmung der Kerne dieser 200 Tiere mindestens ein Zeitumfang von 2200 Minuten (ca. 37 Stunden) reiner Arbeitszeit notwendig sein.
Dieses Beispiel aus der Praxis verdeutlicht die zeitlich bedingten Limitierungen, die umfangreicheren Untersuchungen an großen Populationen auferlegt sind. Auch in der Literatur wird häufig von den Autoren auf den großen Zeitaufwand hingewiesen und daraus der Wunsch nach zeitsparenden, effizienteren und möglichst automatisierten Methoden abgeleitet. So weisen Masseroli et al. (1998) im Rahmen ihrer Studie auf die bedeutende Zeitersparnis der automatisierten Quantifizierung von Nierenglomerula gegenüber konventionellen Methoden mittels Digitalisiertablett hin, und betonen ebenfalls die erweiterten Möglichkeiten der Erfassung neuer, zusätzlicher Parameter über das Flächenmaß hinaus, sowie der direkten Applikation logischer Operatoren durch den PC bzw. die angebundene Software.
Auch Guo et al. (2004) stellen in ihrer Arbeit über die automatisierte Detektion und Abgrenzung humaner Mitochondrien im histologischen Präparat dar, dass die Qualität der Ergebnisse mit der des manuellen histomorphometrischen Verfahrens äquivalent sei, und der Untersuchungsaufwand von 2-3 Minuten pro Präparat auf wenige Sekunden reduziert werden könne.

Die maschinelle Identifikation histomorphologischer Grenzen und somit die Abgrenzung der untersuchten Struktur gegen ihre Umgebung stellt – trotz großer Fortschritte – die Technik vor erhebliche Probleme. Nach ihrem gegenwärtigen Stand bleibt die Identifikation von Strukturgrenzen durch den Untersucher notwendige Voraussetzung der meisten quantitativen Meßprozeduren. Trotz bestehender Probleme sind der zu hohe Zeit- und Datenaufwand einerseits und die sich ständig fortentwickelnde Technik andererseits beständiger Antrieb für die Entwicklung immer besserer mathematischer Algorithmen zur automatischen Erkennung und Abgrenzung von Strukturen (Berman, 2000).
Vor allem gut und zuverlässig gegen einen weitgehend homogenen bzw. indifferenten Hintergrund abgrenzbare anatomische Strukturen wie z.B. humane Spermien im

Spermiogramm sind mit vollautomatisierten histomorphometrischen Analysen bereits heute sicher quantifizierbar (Garrett and Baker, 1995).
Weitere Anwendungsmöglichkeiten, die die genannte Voraussetzung der guten und zuverlässigen Abgrenzbarkeit erfüllen, eröffnen sich im Bereich der industriellen Qualitätskontrolle. Hier ist vor allem der Kostendruck ein Garant für beständige Innovation.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Algorithmus der klassischen histologischen Morphometrie birgt Potential, um bei mindestens gleicher Güte der Messungen mit Hilfe digitaler Techniken und einer Optimierung des Arbeitsablaufes Zeit einzusparen, oder im gleichen Zeitrahmen ein Vielfaches an Daten zu erfassen.
So ließe sich im bereits geschilderten Praxisbeispiel mit einer Einsparung der zweiten Umfahrung auf dem Digitalisiertablett und einer automatischen Volumenkalkulation der Zeitaufwand von ca. 11 Minuten auf ca. 5 Minuten pro Tier für beide Nuclei rotundi reduzieren. Auf die obige, hypothetische Fragestellung mit ihrem Pool von 200 Tieren bezogen, verringerte sich der Aufwand von ca. 37 h auf 17 h: Eine Reduktion um mehr als 50%.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, den bestehenden Algorithmus der klassischen Morphometrie mittels Digitalisiertablett unter dem Aspekt einer möglichen Zeitersparnis und Steigerung der Effizienz kritisch zu analysieren, und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung einen neuen, effizienteren Algorithmus zu generieren, ohne Kompromisse bei der Güte der erhobenen Daten eingehen zu müssen.

Im Folgenden soll zunächst der etablierte Arbeitsablauf der Datenerhebung und –auswertung mittels eines Digitalisiertabletts der Firma Jandel Scientific vorgestellt und analysiert werden.
Anschließend wird ein alternativer Arbeitsablauf entwickelt, der auf einem digitalen Stift der Firma Logitech beruht. Die eigenständige Entwicklung dieses Algorithmus und seine Implementierung in eine ebenfalls selbst entwickelte Software namens „NucleoScope“ werden beschrieben.
Die auf diese Weise erhobenen morphometrischen Daten werden mit den Ergebnissen der etablierten Methode nach dem statistischen Verfahren von Bland und Altman verglichen (Bland and Altman, 1986).

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 Verwendete Rassen

Die in diesem Methodenvergleich untersuchten Hirnschnittserien stammen von Zuchthühnern der Rassen „Breda“, „Holländer Haubenhuhn“ und „Italiener“.

Abbildung 1: Breda-Henne (mit freundlicher Genehmigung von M. Vossieck, Erkelenz)

Breda sind eine alte niederländische Rasse unbekannten Ursprungs. Sie sind mittelgroß, langschnäblig und hochgestellt und besitzen ein hartes Gefieder. Ihre Farbe ist zumeist rein schwarz (siehe Abbildung 1) (Standardkommission BDRG e.V., 1995).

Abbildung 2: Holländer Haubenhuhn

Holländer Haubenhühner stammen ebenfalls aus den Niederlanden. Sie sind ein seit Jahrhunderten in Mitteleuropa gezüchtetes Zierhuhn. Sie sind mittelgroß und zeichnen sich durch eine schlanke Form mit großer, voller Rundhaube aus. Die Haubenfarbe ist zumeist rein weiß in Kombination mit schwarzem oder andersfarbigen Körpergefieder (siehe Abbildung 2) (Standardkommission BDRG e.V., 1995).

Abbildung 3: Italiener-Henne (mit freundlicher Genehmigung von E. Meckenstock, Ratingen)

Italiener sind aus italienischen Landhühnern herausgezüchtet. Sie sind mittelgroß und kräftig mit ausladender Form und fest anliegendem Gefieder. Es existieren zahlreiche Farbvarianten und –kombinationen (siehe Abbildung 3) (Standardkommission BDRG e.V., 1995).

2.1.2 Herkunft, Anzahl und Geschlecht der Tiere

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hirnschnitte lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor. Der Prozess ihrer Fertigung wird im Folgenden dargestellt.

Von jeweils 10 Tieren pro Rasse – bei einem Geschlechter-Verhältnis von 1:1 – wurden histologische Hirnschnittserien des gesamten Gehirnes hergestellt (siehe Tabelle 1). Bei den Tieren handelt es sich um typische Vertreter ihrer Rasse. Sie stammen allesamt von Züchtern, die im Bund Deutscher Rassegeflügelzüchter e.V. organisiert sind.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Tiere

Übersicht der verwendeten Tiere		
Rasse des Tieres	**Geschlecht**	**Sammlungsnummer**
Italiener	m	497
Italiener	m	498
Italiener	m	499
Italiener	m	500
Italiener	m	501
Italiener	f	502
Italiener	f	503
Italiener	f	504
Italiener	f	505
Italiener	f	506
Holländer Haubenhuhn	m	518
Holländer Haubenhuhn	f	519
Holländer Haubenhuhn	f	520
Holländer Haubenhuhn	f	521
Holländer Haubenhuhn	f	522
Holländer Haubenhuhn	f	523
Holländer Haubenhuhn	m	524
Holländer Haubenhuhn	m	525
Holländer Haubenhuhn	m	526
Holländer Haubenhuhn	m	527
Breda	m	683
Breda	f	684
Breda	m	685
Breda	f	686
Breda	f	687
Breda	m	705
Breda	m	706
Breda	f	707
Breda	m	708
Breda	f	709

2.1.3 Perfusion, Präparation, Hirngewichtsbestimmung und individuelle Schrumpfung

Nach Betäubung der Tiere durch Injektion von Ketanest und Rompun in den Brustmuskel erfolgte die Einschläferung mittels Eutha 77 durch paravertebrale Injektion in die Luftsäcke. Mit einem Stethoskop wurde der eingetretene Herzstillstand bestätigt.
Die anschließende Gewichtsbestimmung erfolgte mit einer Rhewa Neigungswaage.
Unter Durchtrennung des Brustbeines neben der Crista sterni erfolgte der Zugang zur Brusthöhle. Das nun freiliegende Perikard wurde gespalten und der linke Ventrikel sowie das rechte Atrium eröffnet. Über die in den linken Ventrikel eingebrachte Knopfkanüle wurde mit physiologischer NaCl-Lösung vorgespült und anschließend mit Bodian-Lösung perfundiert.

Nach der Perfusion wurde der Kopf abgetrennt, die Haut abpräpariert, und der Schädel eröffnet, um das Gehirn herauszupräparieren. Hierbei wurde initial die Medulla oblongata vom Rückenmark getrennt und anschließend die Nervi optici rostral des Chiasma opticum abgesetzt. Nach dem Abziehen der Hirnhäute und dem Abtupfen der Fixierflüssigkeit wurde das Gehirn auf Unversehrtheit geprüft. Das Gewicht des Gehirnes wurde sodann bestimmt, der gemessene Wert entspricht nach Stephan (1960) dem Frischgewicht (f).

Die durch die histologische Aufarbeitung der Gehirne unumgängliche, individuell unterschiedlich ausgeprägte Schrumpfung muss bei der Ermittlung des Frischvolumens berücksichtigt werden (Stephan, 1960).
Voraussetzung für die Berechnung des benötigten Korrekturfaktors (K) ist die Kenntnis des spezifischen Hirngewichtes. Dabei liegt die Annahme zu Grunde, dass das spezifische Hirngewicht der Vögel gleich dem der Säugetiere ist: ρ=1,036 g/cm³ (Stephan, 1960).
So berechnet man initial aus dem Frischgewicht (f) das Frischvolumen (V_{frisch}), indem man das Frischgewicht durch das spezifische Hirngewicht (ρ) dividiert. Im Anschluß bildet man den Quotienten aus dem Frischvolumen und dem planimetrisch bestimmten Volumen ($V_{fixiert}$) des Gesamthirnes aus der Schnittserie und erhält so den schrumpfungsbedingten Korrekturfaktor. Der Korrekturfaktor wurde für jedes Gehirn individuell bestimmt.

2.1.4 Fixierung und histologische Aufarbeitung

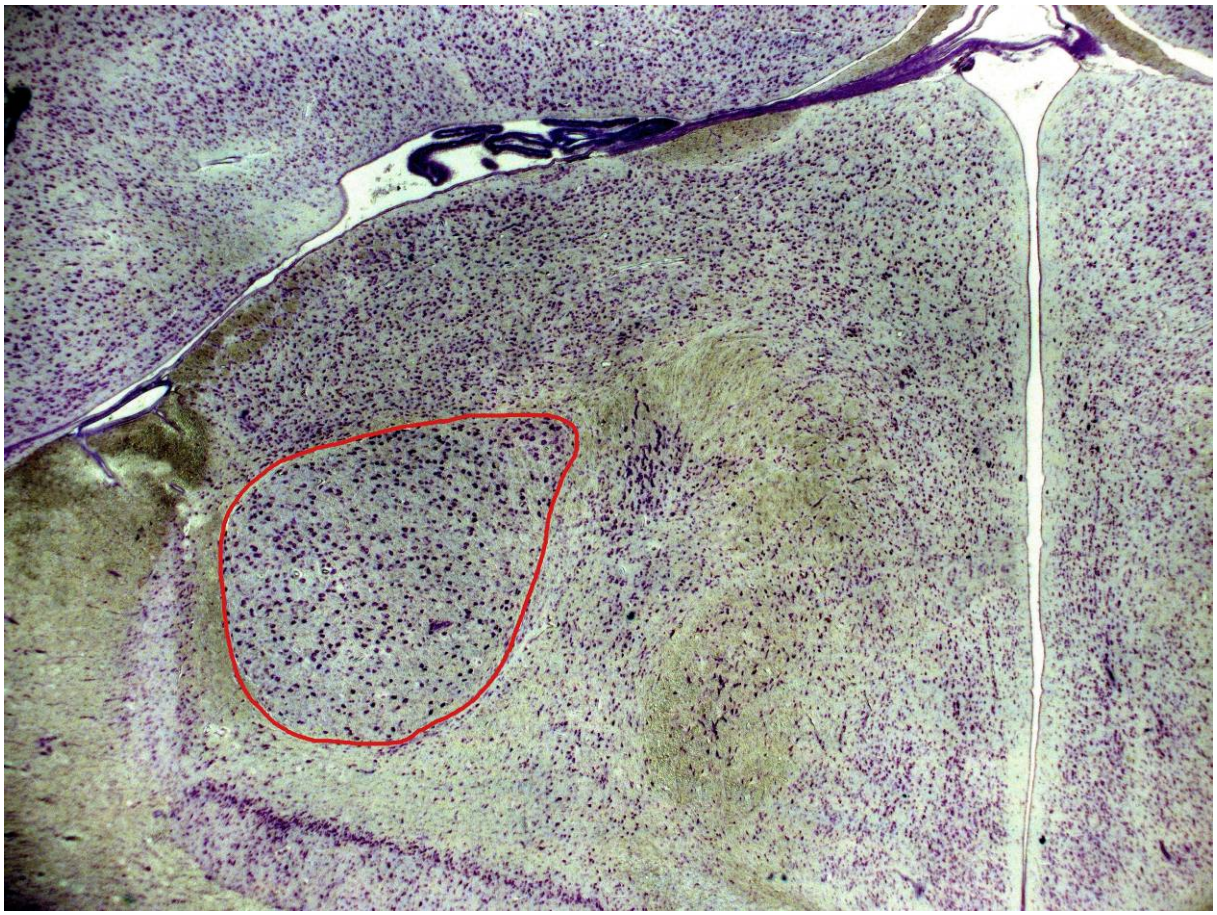
Nach dem Wiegen wurden die Gehirne drei Tage in Bodian-Lösung nachfixiert. Im Anschluß erfolgte ihre Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin.
Die Gehirne wurden in frontaler Richtung mit einem Rotationsmikrotom (Leica) geschnitten (siehe Abbildung 4), die Schnittdicke betrug 20 µm. Je nach Größe des Gehirnes wurde jeder 5-8 Schnitt aufgezogen und nach initialer Nissl-Färbung mit Silbernitrat gefärbt (Merker, 1983, modifiziert nach Gallyas, 1993).

Abbildung 4: Erstellung einer Schnittserie am Mikrotom

2.2 Untersuchte Kerngebiete

Als Messobjekt für beide Methoden diente der Nucleus rotundus. Seine regelmäßige Form bedingt einen geringen Meßfehler und seine gut anfärbbaren und abgrenzbaren Zellkerne (siehe Abbildung 5) erleichterten die Routinearbeit am Mikroskop (Hennig, 1960).
Die Flächen der Kernschnittebenen wurden nicht nach Hemisphären getrennt gezeichnet, so dass das konsekutiv ermittelte Volumen das Gesamtvolumen beider Nuclei rotundi darstellt. Da der Nucleus triangularis sich kappenförmig an den Nucleus rotundus anlegt und somit eine sehr enge räumliche Beziehung aufweist, ist eine Trennung der Strukturen im Rahmen der Fragestellung nicht sinnvoll. Beide Kerne wurden in dieser Arbeit morphometrisch als Einheit betrachtet und vermessen, der Nucleus triangularis wird im Weiteren nicht mehr getrennt aufgeführt.

Abbildung 5: Kernschnittebene Nucleus rotundus, Zwerg-Cochin (Nr. 693), Objektiv 2,5-fach, Färbung: Kresyl-Violett, Vergrößerung: 30-fach



2.3 Mikroskopietechnik mit Einspiegelung, Umfahrung und Abgrenzungskriterien

Über ein Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 20) mit Zwischentubus für Bildeinspiegelung wurde mit der dokumentenechten Mine des digitalen Stiftes „IO-Pen“ der ersten Generation der Firma Logitech auf einem einzelnen Blatt „Optik Paper“ vom Format A4 aus einem „Oxford Office Easybook“ (Ref. Nr.: 770104) der Umfang des Nucleus rotundus in äquidistanten Abständen (20 µm, siehe Kapitel 2.1.4) gezeichnet.

Die Abgrenzung der zu messenden Areale erfolgte auf Basis der morphologisch-anatomischen Kriterien der Größe, Form und histologischen Anfärbbarkeit. Grundsätzlich wurden beim Zeichnen der Kompartimente in den einzelnen Schnitten die Perikarya als Grenzen gewählt, die noch eindeutig nach den obigen Kriterien dem Nucleus rotundus und korrespondierenden Nucleus triangularis zuzuordnen waren, und durch ihre räumliche Nähe eine eindeutige Beziehung aufzeigten.

Das Lokalisieren der Kerne erfolgte nach Karten und Hodos (1967).

2.4 Der Logitech IO-PEN und Papier mit Anoto-Funktionalität

2.4.1 Markteinführung und Anwendungsbereiche

Der IO-Pen der Firma Logitech wurde im 4. Quartal 2003 auf dem deutschen Markt eingeführt. Er ermöglicht die unverfälschte, zeitgleiche digitale Speicherung mit ihm erstellter handschriftlicher Dokumente und ihre anschließende Übertragung auf den PC.
Diese Technologie eröffnet eine Reihe neuer Anwendungsmöglichkeiten in Bereichen, die ein hohes Maß an Mobilität verlangen und wo die Einsatzmöglichkeiten von Laptops oder Tablet-PCs beschränkt sind, wie z.B. Konferenzen, Meetings oder Außeneinsätze. Erstellte Notizen, Kalendereinträge, Zeichnungen und e-mails können dabei gesondert verwaltet werden.
Insbesondere Tätigkeiten, die das Festhalten wichtiger Daten in standardisierten Formularen erforderlich machen, wie z.B. Patientendaten und Untersuchungsbefunde auf medizinischen Stationen, lassen sich beschleunigen und reduzieren den personellen Aufwand (Hewlett-Packard, 2005).
So konnten Despont-Gros et al. (2005) zeigen, dass der Einsatz des IO-Pen in der klinischen Routine zur Dokumentation von Befunden hinreichend zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert.
Andere Projekte führen die Grundidee weiter und erproben neue Möglichkeiten im Bereich der Lehre durch Digitalisierung des klassischen Schulheftes (Kaeser, 2005).

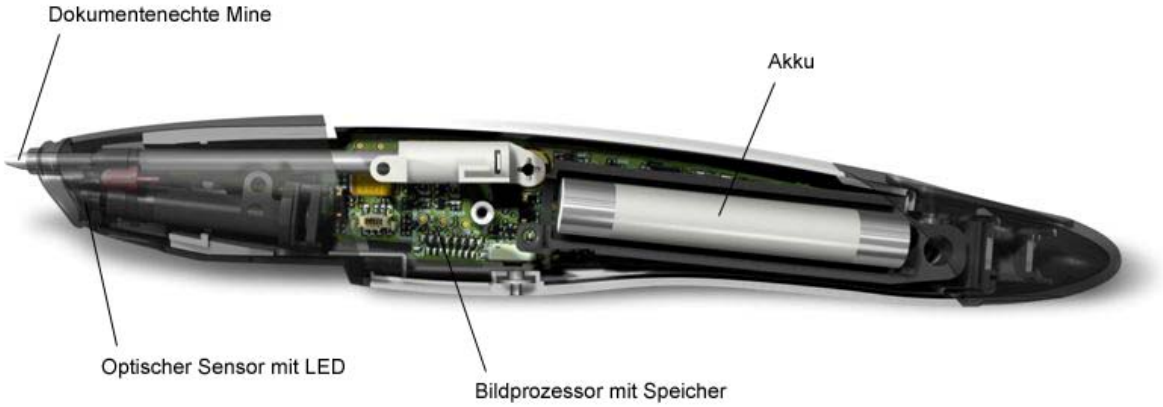
2.4.2 Technik und Funktionsprinzip

Beim Logitech IO-Pen handelt es sich um einen „Hybrid-Stift“, d.h. er besteht aus einer klassischen, dokumentenechten Tintenmine einerseits und einer digitalen Optik andererseits. Abbildung 6 stellt den IO-Pen in der Übersicht dar.

Abbildung 6: Übersicht Logitech IO-Pen

Die technische Ausstattung, bestehend aus einem Drucksensor, einem Bild-Prozessor mit Speicher und einem Akku verdeutlicht Abbildung 7, welche das Innenleben des Stiftes zeigt. Desweiteren verfügt er über eine seitliche Anzeige des Speicher- und Akkustatus und wird durch Entfernen bzw. Aufstecken der Kappe aktiviert und deaktiviert.

Abbildung 7: Querschnitt des Logitech IO-Pen (modifiziert nach Alan Watts, datax.com)

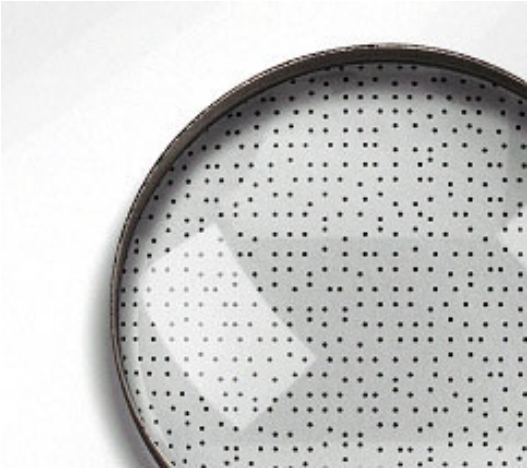


Die Spitze des Stiftes bilden die Mine und die Optik, die aus einer LED und einer Infrarotkamera besteht. Bei der LED handelt es um eine Diode der Klasse 1M mit einer Leistung von 20 mW. Sie emittiert ein monochromatisches Licht im Spektralbereich des infraroten Lichtes der Wellenlänge 850 nm bei einer Frequenz von 75 Hz. Exakt darauf abgestimmt ist die detektierende Infrarotkamera, die wenige Millimeter neben der LED platziert ist. Sobald auf die Tintenmine ein Druck durch einen Schreibvorgang ausgeübt wird, werden die LED und die Infrarotkamera aktiviert. Um jetzt Informationen aufzunehmen, ist die Optik auf das Zusammenspiel mit dem Spezialpapier angewiesen.

2.4.3 Papier mit Anoto-Funktionalität

Die Firma Anoto SA Schweden hat ein Verfahren zur eindeutigen Erkennung des Geschriebenen entwickelt und besitzt das weltweite Patent auf diese Technologie.

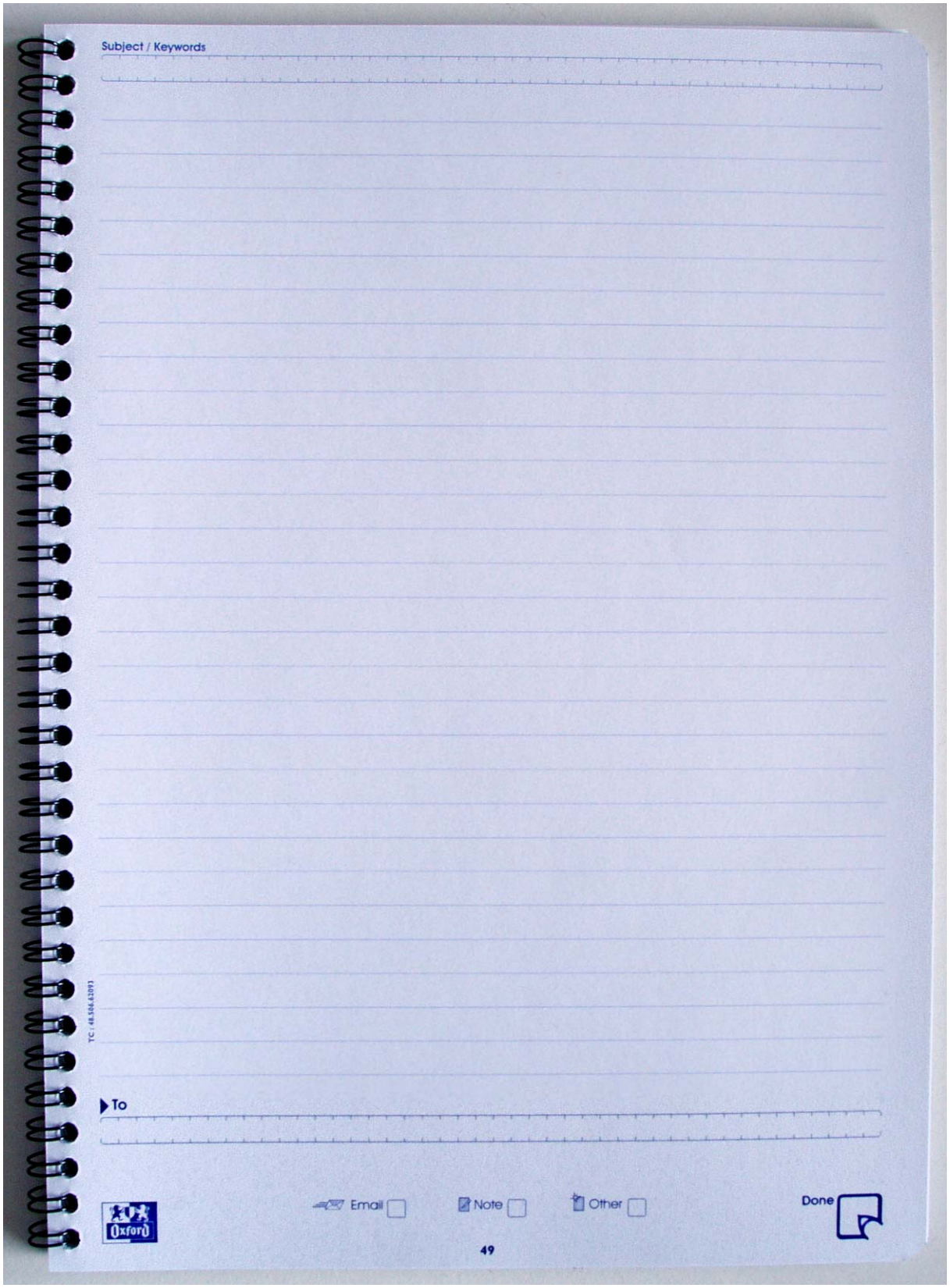
Abbildung 8: Ausschnittsvergrößerung des Anoto-Musters (modifiziert nach Anoto SA)



Das Prinzip beruht auf der Entwicklung eines Musters aus winzigen, 0,1mm breiten schwarzen Punkten, welches eine Gesamtgröße von 60 Millionen km² besitzt. Dies entspricht ungefähr einer Fläche von der gemeinsamen Größe des asiatischen und europäischen Kontinents. Das Verteilungsmuster der schwarzen Punkte innerhalb dieser Fläche wiederholt sich niemals (siehe Abbildung 8).

Jedem Punkt innerhalb der 60 Millionen km² können so unter Analyse einer definierten minimalen Anzahl von Nachbarpunkten eindeutige Flächenkoordinaten zugewiesen werden. Dies bedeutet in der Praxis, dass bereits aus der Analyse eines kleinen, definierten Feldes die exakte Position der Stiftmine in diesem riesigen Muster eindeutig identifiziert werden kann. Durch dieses als „Anoto Funktionalität“ bezeichnete Prinzip ist die räumliche Struktur des Geschriebenen rekonstruierbar (Anoto SA Sweden, 2005). Der Papierhersteller lizenziert aus dieser enormen Gesamtfläche die für seine Zwecke notwendige Fläche und bekommt sie zugewiesen (siehe Abbildung 9).

Abbildung 9: „Optik-Paper“ der Firma Oxford in A4 mit Anoto-Funktionalität



Bestimmte Bereiche des Gesamtmusters sind für spezielle Aufgaben reserviert. Ihre Markierung signalisiert dem System die Ausführung einer bestimmten zugehörigen Funktion. So bereitet das Ankreuzen des Sonderfeldes „e-mail“ die spätere Versendung des auf diesem Blatt geschriebenen Inhaltes als e-mail vor. Sobald die Niederschrift auf einem Blatt beendet ist, markiert der Benutzer das Sonderfeld „Done“, und das Blatt wird als abgeschlossen in den Speicher abgelegt.
Prinzipiell kann jede Art von Papier mit dem lizenzierten Muster bedruckt werden. Das Papier kann darüber hinaus jeglichen anderen gewünschten Inhalt haben und so z.B. einem Formularvordruck entsprechen. Einzige Bedingung ist, dass die Farbe Schwarz nicht für den Inhalt verwendet wird. Sie ist exklusiv dem Muster vorbehalten (Hallgren, 2002).

2.4.4 Zusammenspiel IO-Pen und Papier mit Anoto-Funktionalität

Das initiale Aufsetzen der Mine auf das Papier wird vom Drucksensor registriert und die Optik aktiviert. Die LED strahlt nun das infrarote Licht ab, welches in einem charakteristischen, dem Muster der schwarzen Punkte entsprechenden Bild vom Papier reflektiert wird. Die Infrarotkamera empfängt dies auf einer Sensorfläche von 7 x 7 mm². Diese Fläche reicht aus, um – wie oben beschrieben – die exakte Position auf dem Anoto – Muster zu bestimmen. Die Kamera registriert laufend die Position der Mine solange Druck auf sie appliziert wird. Wichtig für die Verwendung des Stiftes im Rahmen der hier zu beschreibenden morphometrischen Methode ist, dass die Position der Mine immer eindeutig registriert wird. Sie ist vollkommen unabhängig vom Winkel und der Ausrichtung der Optik. Dieser Zusammenhang beruht auf der geschilderten Anoto-Funktionalität und ist anschaulich nachvollziehbar: Ein senkrecht auf das Papier gezeichneter Punkt mit anschließender Drehung des Stiftes um 360 Grad um die eigene Achse generiert keinen Kreis, sondern unverändert den initialen Punkt.
Entsprechend der geschilderten Funktionsweise ist die blaue Tinte der Mine für die Optik selbst unsichtbar und interferiert nicht mit ihrer Funktion. Optimal auf die Optik abgestimmt ist blaue Tinte der Norm ISO 12757-1 D1. Sie dient allein der Visualisierung des Geschriebenen für das menschliche Auge.
Es ist sinnvoll, vor dem Beginn des eigentlichen Schreibvorgangs auf dem Spezialpapier, einen Namen und / oder eine Nummer für das Blatt und seinen Inhalt zu vergeben. Dies ist in einer dafür reservierten Kopfzeile möglich und erleichtert später die Identifikation der aus dem Inhalt des Blattes erstellten Datei.

2.4.5 Akkulaufzeit, Speichervolumen und optische Auflösung des IO-Pen

Die im Akku gespeicherte Energie reicht für die Aufnahme und Speicherung von bis zu 25 DIN A4 Seiten. Der Ladestatus wird über eine Anzeige signalisiert. Vollständiges Laden dauert maximal zwei Stunden. Der integrierte Speicher erlaubt die Ablage von bis zu 40 Seiten.
Die Auflösung der Optik kann vom Anwender auf 72, 100, 150 oder 300 dpi (dots oder pixel per inch) in der mitgelieferten Software eingestellt werden.

2.5 Umfahrung und methodenübergreifendes Prinzip der Volumenbestimmung

Zur Volumenbestimmung regelmäßig geformter Körper benötigt man nicht mehr als acht Schnitte, um einen maximalen Volumenfehler von 5% sicher zu unterschreiten (Zilles et al., 1982).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden für jeden Kern alle vorhandenen Schnittebenen gezeichnet. Eine Übersicht ermöglicht Tabelle 2. Die kleinste vorkommende Schnitt-Anzahl beträgt 8, die maximale 17. Nur 4 von 60 Nuclei rotundi haben eine Schnitt-Anzahl von weniger als 10, so dass der maximale Fehler für alle anderen Kerne unter 2,2% liegt.

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der gezeichneten Kernschnittebenen pro Tier

Übersicht über die Anzahl der gezeichneten Kernschnittebenen pro Tier				
Sammlungsnr.	**Rasse des Tieres**	**Anzahl [n] der gezeichneten Kernschnittebenen rechts**	**Anzahl [n] der gezeichneten Kernschnittebenen links**	**Summe [n] rechts und links**
497	Italiener	13	13	26
498	Italiener	13	13	26
499	Italiener	12	12	24
500	Italiener	12	12	24
501	Italiener	12	13	25
502	Italiener	11	11	22
503	Italiener	11	11	22
504	Italiener	11	11	22
505	Italiener	11	11	22
506	Italiener	11	12	23
518	Holländer Haubenhuhn	10	10	20
519	Holländer Haubenhuhn	11	11	22
520	Holländer Haubenhuhn	11	10	21
521	Holländer Haubenhuhn	10	10	20
522	Holländer Haubenhuhn	9	10	19
523	Holländer Haubenhuhn	11	11	22
524	Holländer Haubenhuhn	13	13	26
525	Holländer Haubenhuhn	11	8	19
526	Holländer Haubenhuhn	9	9	18
527	Holländer Haubenhuhn	10	10	20
683	Breda	16	16	32
684	Breda	15	16	31
685	Breda	13	13	26
686	Breda	14	14	28
687	Breda	16	16	32
705	Breda	15	15	30
706	Breda	16	17	33
707	Breda	16	16	32
708	Breda	13	13	26
709	Breda	14	13	27

Die eingangs geforderte Regelmäßigkeit der Form trifft für die im Rahmen dieser Arbeit vermessenen Kerne Nucleus rotundus und Nucleus triangularis zu (Dubbeldam, 1998).

Bei beiden Verfahren erfolgte die Berechnung des Volumens des fixierten Kernes aus der Summe der Schnittflächen (F) beider Hemisphären, dem Schnittabstand (H) und der Dicke der einzelnen Schnitte (D) nach der Formel: $V = F \cdot H \cdot D$ (Stephan et al., 1991).

Dieses Prinzip der Volumenbestimmung liegt beiden zu vergleichenden Methoden zu Grunde, wobei die Berechnung im Ablauf der vorbestehenden Methodik manuell erfolgte, und für die neue Methodik in die Programmstruktur von NucleoScope implementiert wurde.

Die Umfahrung der Strukturen erfolgte nur unter Benutzung des IO-Pen auf dem oben beschriebenen Papier mit Anoto-Funktionalität. Die Tatsache, dass der Stift parallel auch reell

mit Tinte schrieb, erlaubte es, einen methodischen Fehler, der zwangsläufig durch eine andernfalls zu erfolgende, zeitversetzte erneute Identifikation der Struktur und Umfahrung entstanden wäre, als methodische Fehlerquelle zu vermeiden. So war es möglich, ausgehend von ein und derselben Umfahrung, die Messergebnisse beider Methoden zu vergleichen, ohne Trübung durch einen sonst unumgänglichen Fehler aufgrund erneut erforderlicher Identifikation von Strukturgrenzen.

Whalley und Wardlaw (2001) haben diesen Untersucher – abhängigen Fehler in ihrer Studie untersucht, indem ein und dieselbe Struktur im Abstand von Wochen insgesamt drei Mal vom selben Untersucher umfahren wurde. Dabei stellten sie fest, dass der mittlere Fehler von der Größe der zu umfahrenden Struktur abhängt und im Bereich von 0,2% für die größte (humanes Corpus callosum) bis 2,8% für die kleinste (humaner Hippocampus) vermessene Struktur variiert.

Die Anzahl der zu umfahrenden Kernschnittebenen pro Tier variierte im untersuchten Kollektiv zwischen 18 und 33. In allen Fällen war ein einzelnes Blatt Spezialpapier für die Erfassung beider Nuclei rotundi eines Tieres ausreichend.

Die bisher beschriebenen Schritte der Erstellung des Präparates, der Identifikation und Umfahrung der Strukturgrenzen sind Voraussetzung für beide Meßverfahren. Von diesem Arbeitsschritt an unterscheidet sich das weitere Vorgehen deutlich und soll im Folgenden für beide Methoden getrennt dargestellt werden.

2.6 Vorbestehende Methodik mittels Zeichentablett

2.6.1 Kalibrierung

Voraussetzung einer jeden Flächenmessung mit dem Zeichentablett ist eine exakte Kalibrierung des Systems. Dazu wurde von einem Objektträger mit einem Eichquadrat von 10 x 10 mm² über den Zeichentubus des Mikroskops eine Fläche von 4 x 4 mm² markiert. Diese Fläche wurde anschließend auf dem Zeichentablett digitalisiert und die Menge der darin enthaltenen Pixel als 16 mm² definiert. So war bei konstanten Bedingungen im Mikroskop die Fläche jeder Kernschnittebene bestimmbar.

2.6.2 Digitalisierung

Nach initialer Identifikation der Strukturgrenzen und erster Umfahrung derselben auf allen angeschnittenen Ebenen erfolgte die Digitalisierung der Zeichnungen auf einem Zeichentablett des Herstellers Numonics Corporation, Modell 2210, welches von der Firma Jandel Scientific gemeinsam mit der Software SigmaScan Version 3.92 für MS-DOS (Microsoft Corporation) ausgeliefert wurde. Die optische Auflösung des Tabletts beträgt 72 dpi. Die Begriffe „Zeichentablett“ und „Digitalisiertablett“ sind synonym zu gebrauchen.

Abbildung 10: Numonics 2210 mit Handdigitizer

Das Blatt mit den gezeichneten Kernschnittebenen wurde auf das Zeichentablett gelegt und jede einzelne bestehende Umfahrung noch einmal mit dem Handdigitizer nachgefahren (zweite Umfahrung). Dabei erschien zeitgleich auf dem Monitor in der laufenden Software SigmaScan die entstandene Linie, so dass der Benutzer ein visuelles Feedback erhielt. Erreichte man nach vollständiger Umfahrung wieder den Ausgangspunkt, so wurde über einen Tastendruck am Handdigitizer (siehe Abbildung 10) die softwareseitige Verbindung zwischen dem ersten und letzten Pixel auf dem kürzesten Weg ausgelöst. Dieser – zur Bestimmung der Anzahl der umfassten Pixel absolut notwendige – Schritt erfolgte mit größter Sorgfalt, da bei vorzeitiger Auslösung der Verbindungsfunktion das originale Aussehen der Umfahrung digital nicht korrekt erfasst worden wäre. Nach abgeschlossener Umfahrung jeder Kernschnittebene gab SigmaScan die Größe der Fläche aus. Diese wurde handschriftlich auf einem gesonderten Blatt festgehalten.
Nach Hennig (1960) ist ein einmaliges Umfahren hinreichend genau. Entsprechend seiner Empfehlung wurde auch eine Kontrollmessung durchgeführt.

2.6.3 Volumenberechnung

Sobald die individuellen Flächen aller Nuclei rotundi von allen Tieren durch Digitalisierung bestimmt waren, wurde mit Hilfe eines Taschenrechners nach der oben genannten Formel das Volumen der fixierten Kerne ermittelt und durch Multiplikation mit dem individuellen Schrumpfungsfaktor das Frischvolumen berechnet.
Alle zum jeweiligen Tier ermittelten Kenngrößen wurden abschließend auf einem Formular eingetragen und in Papierform archiviert.

2.7 Eigenentwickelte Methodik mittels IO-Pen

2.7.1 Voraussetzungen für den Einsatz der eigenentwickelten Methodik

Bevor die selbst programmierte Software NucleoScope mit der Rekonstruktion der Volumina beginnen kann, müssen einige wenige Voraussetzungen beachtet werden. Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

2.7.1.1 Speicherung der Daten im IO-Pen

Erster Schritt des alternativen Algorithmus ist die Vergabe eines codierten Namens in das Namensfeld der Kopfzeile (siehe Abbildung 9, Kapitel 2.4.3). Seine genaue Formatierung ist bedeutsam für die spätere Automatisierung der Volumenberechnung und wird in Kapitel 2.7.2.4 separat erläutert.
Wie bereits in Kapitel 2.4 geschildert, legte der IO-Pen kontinuierlich die während des Zeichenvorganges ausgeführten Bewegungen der Stiftmine als Koordinaten codiert in seinem Speicher ab. Die synchrone digitale Erfassung machte eine zweite Umfahrung überflüssig. Zum Abschluß wurde durch Markieren des Sonderfeldes „Other“ (siehe Abbildung 9, Kapitel 2.4.3) ein notwendiger Schritt der späteren Datenverarbeitung vorbereitet und die Erfassung eines Blattes mit „Done“ abgeschlossen.

2.7.1.2 Datenübertragung zum PC und Funktionsumfang der Logitech IO-Software

Im Lieferumfang des IO-Pen ist eine USB-Station enthalten, welche den Stift aufnehmen kann, um ihn aufzuladen und die in ihm gespeicherten Daten auf den PC zu übertragen.

Voraussetzung für die Übertragung der Daten ist die initiale Installation der Logitech IO-Software (Version 2.10). Die Software ist in der Lage, aus den Daten des IO-Pen den vorher zu Papier gebrachten Inhalt exakt zu rekonstruieren, und zeigt diesen in ihrer Benutzeroberfläche an. Dort bietet sich die Möglichkeit, den Inhalt zu editieren und ihn im Format DOC (Microsoft Word Dokument) oder auch als Bild in Standard – Formaten wie z.B. jpeg (Joint Photographic Experts Group) abzuspeichern. Die Software erlaubt ferner die Zuordnung von Prozeduren zu den Sonderfeldern des Anoto-Papiers.
So war es möglich, als Algorithmus der neuen Methode festzulegen, dass beim Markieren des Sonderfeldes „Other“ der Inhalt des Blattes automatisch als Bild im Format jpeg in der Auflösung von 300 dpi in einen definierten Dateiordner abgelegt wird. Als Name der Datei sollte ohne weiteren Zusatz der vom Benutzer in das Sonderfeld der Kopfzeile eingetragene Name gewählt werden.
Nach Abschluß der Umfahrung und Ablage des IO-Pen in seine Station lagen die korrespondierenden Bilder ohne jegliche Benutzer-Interaktion in wenigen Minuten im definierten Ordner.

2.7.1.3 Potentielle Lücken und manuelle Schließung

Während der Umfahrung der Kernschnittebenen mit dem IO-Pen kann es trotz höchster Sorgfalt vorkommen, dass in der späteren digitalen Form einige der Umfahrungen nicht vollständig geschlossen sind, wenn sich nicht alle Pixel berühren. Ähnlich wie bei der Digitalisierung mittels Zeichentablett ist ein lückenloser Schluß Voraussetzung für eine fehlerfreie Bestimmung der eingeschlossenen Pixel und konsekutiv der Fläche. Da die Güte der neuen Methode in dieser Arbeit an den Ergebnissen der etablierten Methode gemessen wurde, war es an dieser Stelle notwendig, für exakt gleiche Ausgangsbedingungen zu sorgen:
Die Lücken in den digital erfassten Umfahrungen, die in keinem Fall größer waren als eine Strichbreite (4 Pixel), mussten nach dem selben Prinzip geschlossen werden wie auf dem Numonics Zeichentablett.
Die generierten Bilder wiesen insgesamt 29 offene Umfahrungen auf, welche unter Anwendung der Software Photoshop CS (Adobe Systems Inc.) bei maximaler Vergrößerung durch eine Verbindungsstrecke zwischen den Randpixeln mit dem geringsten Abstand geschlossen wurden. Dies entspricht dem Prozedere der Schließung beim Digitalisieren auf dem Zeichentablett durch Druck der rechten Taste auf dem Handdigitizer (siehe Kapitel 2.6.2).

2.7.2 Programmierung NucleoScope

Die Erfüllung der formulierten Zielsetzung der Effizienzsteigerung und Zeitersparnis ohne Qualitätseinbußen erforderte die Entwicklung und Programmierung einer Software, die in der Lage war, den Prozess der Volumenberechnung und Datenarchivierung schnell, zuverlässig und vollautomatisiert durchzuführen. Die in Kapitel 2.7.1.3 beschriebene manuelle Schließung der Umfahrungen sollte nur die Voraussetzungen für den erstmaligen Vergleich der Methoden schaffen und in der endgültigen Version des neuen Algorithmus ebenfalls durch Neu-Entwicklung eines Subalgorithmus vollautomatisiert werden.
Essentielle bestehende Komponenten, die in den Gesamtablauf des neuen, selbst entwickelten methodischen Ansatzes implementiert wurden, sind:
a) Logitech IO Software v. 2.10 zur Übertragung und Erstellung der digitalen Bilder
b) Adobe Systems Photoshop CS mit dem Erweiterungsmodul Fovea Pro 3.0 der Firma Reindeer Graphics Inc. für die mathematische Durchführung morphometrischer Aufgaben.

Die im Rahmen dieser Arbeit neu programmierte Software NucleoScope steuert den gesamten Prozess der Datenanalyse indem es die von der Logitech IO Software erstellten Bilder in Photoshop CS überträgt, und diese Software exakt steuert, um die im Folgenden beschriebene Prozessierung der Bilder umzusetzen. Die resultierenden Ergebnisse der Einzelflächen verarbeitet NucleoScope selbständig weiter, um das Volumen zu rekonstruieren und es in seine Datenbank inklusive aller weiteren relevanten Informationen zu übernehmen.

2.7.2.1 Programm-Konzept, -Plattform und -Sprache

Ausgehend von dem erstellten Konzept der Vollautomatisierung der Volumenberechnung und der Verwaltung aller relevanten Daten in einer Softwareumgebung, war vor Beginn des Programmiervorganges eine dafür geeignete Plattform zu wählen. Drei elementare Bedingungen mussten dabei berücksichtigt werden.
Sie musste:
1) Die Möglichkeit bieten, andere Programme steuern zu können, um im konkreten Fall den Analyseprozess in Photoshop CS bei Bedarf initiieren und die Messergebnisse auslesen zu können.

2) Ein Konzept für die Implementierung und Pflege relationaler Datenbanken beinhalten, um unter einer übergeordneten Tiernummer vielgestaltige, miteinander in Beziehung stehende Datensätze verknüpfen zu können.
3) Werkzeuge bereitstellen, die es erlauben, eine benutzerfreundliche, funktionelle Oberfläche zu kreieren.
Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen und vorhandener Programmierkenntnisse wurde als Programmierplattform Access 2003 (Microsoft Corporation) und als Programmiersprache VBA (Visual Basic for Applications, Microsoft Corporation) gewählt.
Das entstandene Programm erhielt den Namen NucleoScope und liegt aktuell in der Version 1.9 vor.

2.7.2.2 Überwachung des Zielordners und Initiierung Photoshop CS

NucleoScope wurde so vorkonfiguriert, dass es minimiert im Systemtray den definierten Zielordner überwachte und die Ankunft neuer Bilddateien registrierte. Daraufhin initiierte es Photoshop CS, um die morphometrische Analyse durchzuführen.

2.7.2.3 Morphometrische Analyse Photoshop CS mit Erweiterung Fovea Pro 3.0

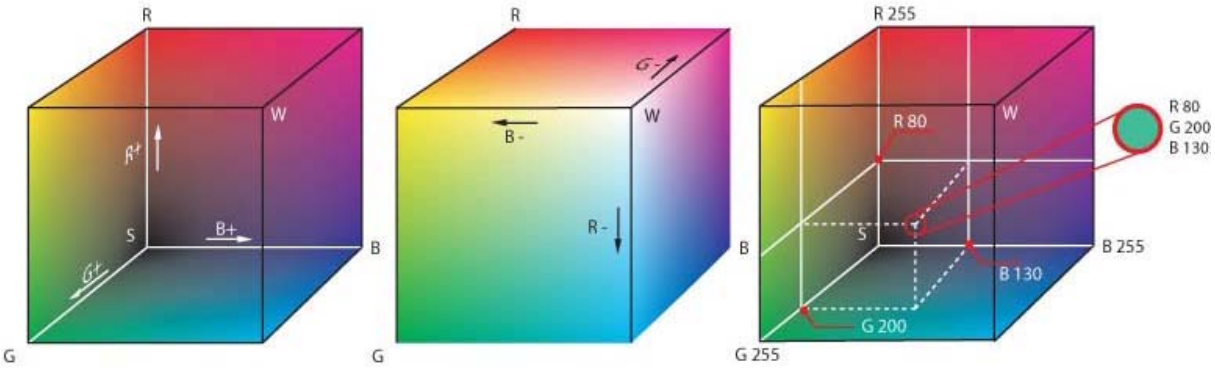
Bei Photoshop CS handelt es sich um ein Bildverarbeitungsprogramm, welches durch seinen modularen Aufbau die Implementierung zusätzlicher Funktionen durch sogenannte „plug-ins“ (Zusatzmodule) erlaubt. Reindeer Graphics Inc. bietet unter dem Programmnamen „Fovea Pro 3.0“ eine Sammlung von plug-ins an, welche die Analyse von Bilddateien, die Erkennung und Separation von Bildelementen und die Messung morphologischer Parameter ermöglichen (ReindeerGraphics, 2005).
Der notwendige exakte Ablauf der einzelnen Funktionen für die Analyse der vom IO-Pen gelieferten Bilder wurde eigenständig erarbeitet und in NucleoScope einprogrammiert, d.h. NucleoScope initiiert, steuert und überwacht die Programme Photoshop CS und Fovea Pro 3.0. Dieser Ablauf soll im Folgenden beschrieben und sein theoretischer Hintergrund erläutert werden.
Voraussetzung für die im letzten Schritt des Algorithmus erfolgende Bestimmung des Flächeninhaltes der Umfahrungen ist eine korrekte Kalibrierung des Systems. Da sie jedoch auch eine potentielle Fehlerquelle darstellt, wird sie separat in Kapitel 2.7.4 behandelt.

1) Der Algorithmus beginnt mit einer Vergrößerung der Arbeitsfläche auf das Format DIN A4 (210 x 297 mm²). Dieser Schritt erweist sich als notwendig, da die Logitech IO Software die erstellten Bilder nicht in einer einheitlichen Größe abspeichert, sondern dem Format des Inhaltes anpasst. Diese Vorgehensweise bedingt, dass ein Teil der Umfahrungen den Bildrand berührt. Solche Umfahrungen können mathematisch durch den Algorithmus nicht erfasst werden, so dass ihre Flächen bei der Berechnung nicht mit einfließen würden.
Die Vereinheitlichung der Arbeitsfläche auf DIN A4 Format löst die randständigen Umfahrungen los und ermöglicht ihre Berücksichtigung bei der Kalkulation der Gesamtfläche.

2) Im zweiten Schritt werden die Voraussetzungen geschaffen, um den Inhalt der umfahrenen Fläche berechnen zu können. Die gelieferten Bilder sind im Farbraum RGB (Rot, Grün, Blau) in einer Farbtiefe von 8 Bit pro Kanal codiert. Die Farbe der Umfahrungen ist – entsprechend der Minenfarbe – blau in verschiedenen Helligkeitsnuancen: In der Strichmitte am dunkelsten mit Aufhellung zum Rand hin. Nun muss für jedes Pixel entschieden werden, ob es zum Vordergrund gehört oder zum Hintergrund. Gehört ein Pixel zum Vordergrund, wird ihm der Wert 1 zugewiesen, gehört es zum Hintergrund der Wert 0. Diesen Prozess der eindeutigen Zuordnung eines jeden Bildelementes bezeichnet man als Segmentierung (Russ, 2002). Dadurch wird ein Binärbild generiert, in dem Vordergrundpixel mit dem Wert 1 die Farbe Schwarz, und Hintergrundpixel mit dem Wert 0 die Farbe Weiß zugewiesen bekommen. Prinzipiell sollten dem Vordergrund alle Pixel zugeordnet werden, die eine Bedeutung haben und zur Bildinformation beitragen. Die Segmentierung teilt das Bild in Regionen, die Diskontinuitäten im Bild ergeben ihre Ränder (Jähne, 2002).
Die Schwierigkeit liegt nun darin, ein geeignetes Kriterium zu finden, anhand dessen die Segmentierung in Vordergrund / Hintergrund sinnvoll erfolgen kann. Laut Russ (2002) ist die einfachste Möglichkeit eine Entscheidung auf Basis des Kriteriums des Helligkeitswertes eines individuellen Pixels. Dabei wird ein Schwellenwert (threshold) für diesen Helligkeitswert definiert und Pixel mit einem Helligkeitswert kleiner oder gleich dem Schwellenwert dem Vordergrund und die verbliebenen Pixel dem Hintergrund zugeteilt.
Die Tatsache, dass die generierten Bilder im RGB – Farbraum codiert sind, ist bedeutsam für die Extraktion des Helligkeitswertes. Die Definition des RGB – Farbraumes (siehe Abbildung 11) wurde durch die CIE (Commission International de l'Eclairage) erstellt (Süsstrunk et al., 1999). Sie basiert auf der Theorie von Grassmann (1853) über zusammengesetzte Farben, in der er ein vektorbasiertes, additives Farbmodell beschreibt.

Daher addieren sich im RGB-Farbraum die drei Grundfarben Rot, Grün und Blau zu Weiß. Entsprechend kann jede Farbe durch drei Werte charakterisiert werden: Ihrem Rot-, Grün- und Blauanteil. Jeder Farbanteil kann dabei zwischen 0% und 100% variieren. So ergibt beispielsweise die Codierung 100% Rot, 100% Grün und 0% Blau die hellste Form von Gelb.

Abbildung 11: RGB-Farbraum (modifiziert nach: http://de.wikipedia.org/wiki/RGB)

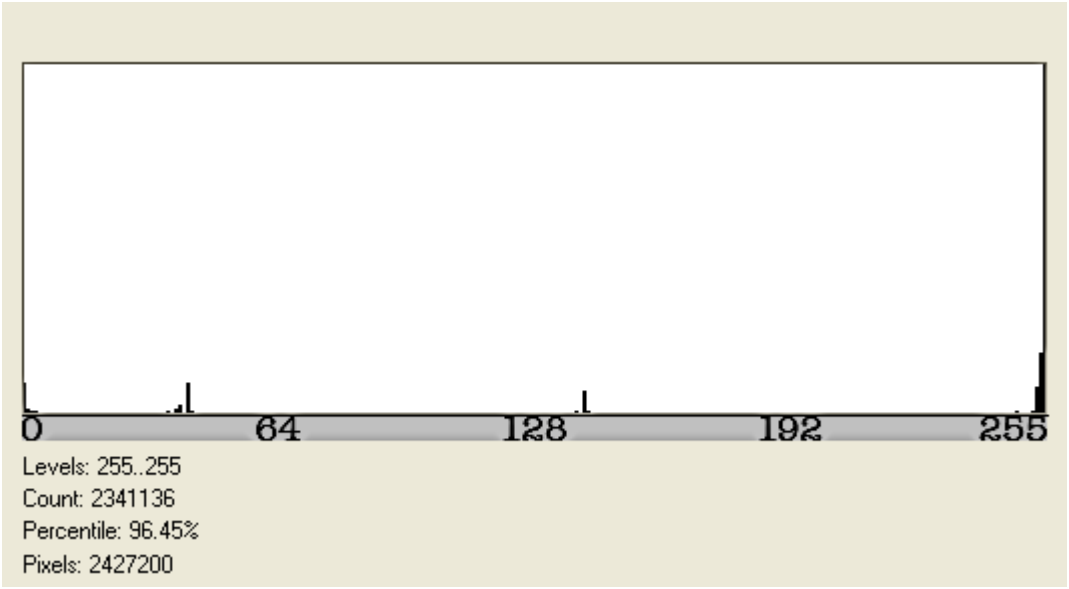


Wie bereits erwähnt besitzen die gelieferten Bilder eine Farbtiefe von 8 Bit pro Farbkanal. Dies bedeutet, dass für jede der drei Grundfarben 256 (= 2^8 = 8 Bit) Abstufungen zwischen 0 und 255 möglich sind. Dabei steht 0 für die geringste und 255 für die höchste Intensität einer Farbe. Jedes einzelne Pixel des Bildes besitzt folglich eine Farbe, die gemischt ist aus einer von jeweils 256 möglichen Intensitäten der Grundfarben Rot, Grün und Blau. Das obige Beispiel des hellsten Gelb entspräche der Codierung R 255 G 255 B 0, das in der Abbildung dargestellte Türkis der Codierung R 80 G 200 B130.
Der für die Festlegung eines Schwellenwertes benötigte Helligkeitswert eines jeden Pixels ist das arithmetische Mittel μ der Intensitäten der Einzelkanäle R, G und B:

$$\mu = \frac{R+G+B}{3}$$

Aus dieser Beziehung folgt, dass die Helligkeit selbst ebenfalls einen Wert zwischen 0 und 255 annehmen muss. Eine Übersicht aller in einem Bild vorkommenden Helligkeitswerte liefert eine grafische Darstellung in Form eines Histogramms (siehe Abbildung 12). Dabei sind auf der Abszisse die Helligkeitswerte zwischen 0 und 255 und auf der Ordinate die Anzahl der Pixel, die diesen Wert im Bild aufweisen, aufgetragen.

Abbildung 12: Histogramm der Helligkeitswerte



Anhand des Histogramms kann der Benutzer manuell einen Schwellenwert zwischen 0 und 255 bestimmen und in einem Vorschaufenster das aus diesem Schwellenwert resultierende Binärbild sehen. Zahlreiche Autoren haben sich mit der Problematik befasst, diese manuelle Auswahl eines Schwellenwertes zu automatisieren (Parker, 1997). Die meisten der vorgestellten Algorithmen sind für die Erkennung von auf Papier gedrucktem Text entwickelt worden, eine Aufgabe, welche aufgrund gleicher Voraussetzungen (eine Farbe auf homogenem Hintergrund) der Erkennung der Umfahrungen analog ist. Breite Anwendung findet aufgrund der Güte seiner Ergebnisse der Algorithmus von Trussell (Russ, 2002). Trussell (1979) schlug vor, denjenigen Schwellenwert zu suchen, der die Gesamtheit der Pixel in zwei Gruppen (helle und dunkle) separiert, die einen maximal unterschiedlichen Mittelwert in ihrer Helligkeit aufweisen. Dies wird mit Hilfe des Student's t-test berechnet. Der größte Unterschied der Mittelwerte liefert den größten t-Wert. Nach diesem Verfahren wird das Binärbild der Umfahrungen generiert.

3) Im resultierenden Binärbild sind nur Pixel, die ein Teil der Umfahrung sind, auf den Wert 1 gesetzt. Sie allein zählen zum Vordergrund und haben die Farbe Schwarz. Zur Kernschnittebene eines umfahrenen Nucleus rotundus zählt jedoch auch die Fläche, welche von der Umfahrung umschlossen ist und zu diesem Zeitpunkt noch dem Hintergrund zugeordnet wird. Um diese Fläche bei der Messung mit zu berücksichtigen, muss sie ebenfalls dem Vordergrund zugeordnet werden durch einen Wechsel der Werte ihrer Pixel von 0 auf 1. Bewerkstelligt wird diese Aufgabe durch einen Subalgorithmus:

Zunächst wird das Binärbild intern dupliziert und das Duplikat invertiert. Dies bedeutet, die weißen Pixel werden schwarz und umgekehrt. Abbildung 13 zeigt das originale Binärbild vor der Inversion. Abbildung 14 verdeutlicht das Resultat der Inversion.

Abbildung 13: Kernschnittebenen vor der Inversion

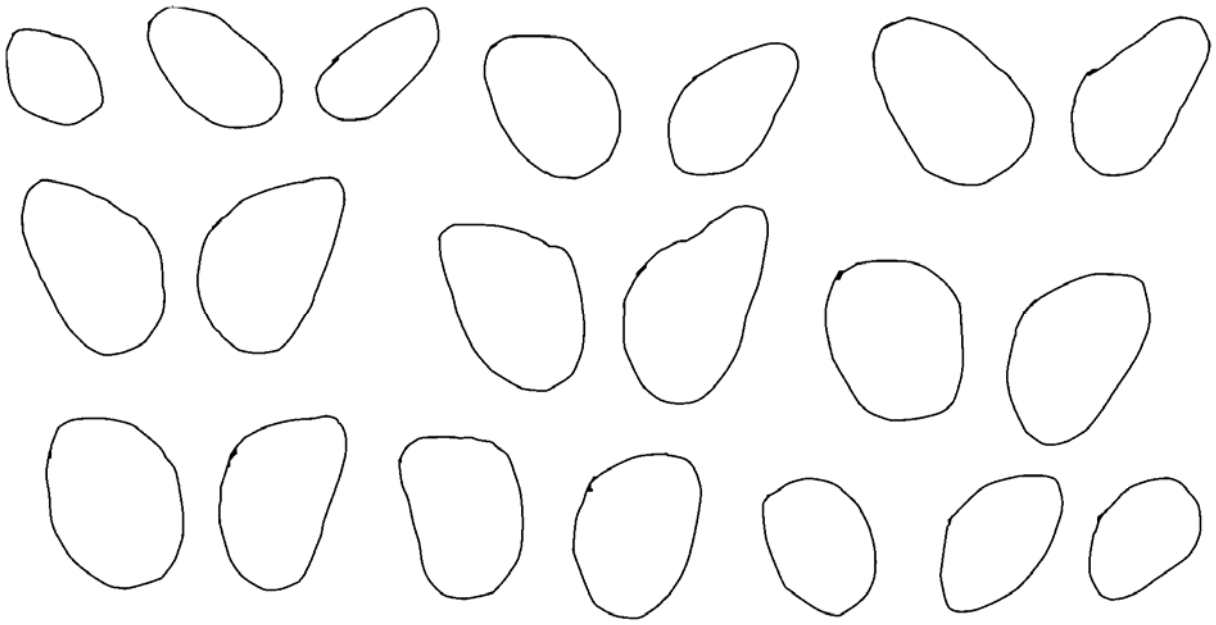
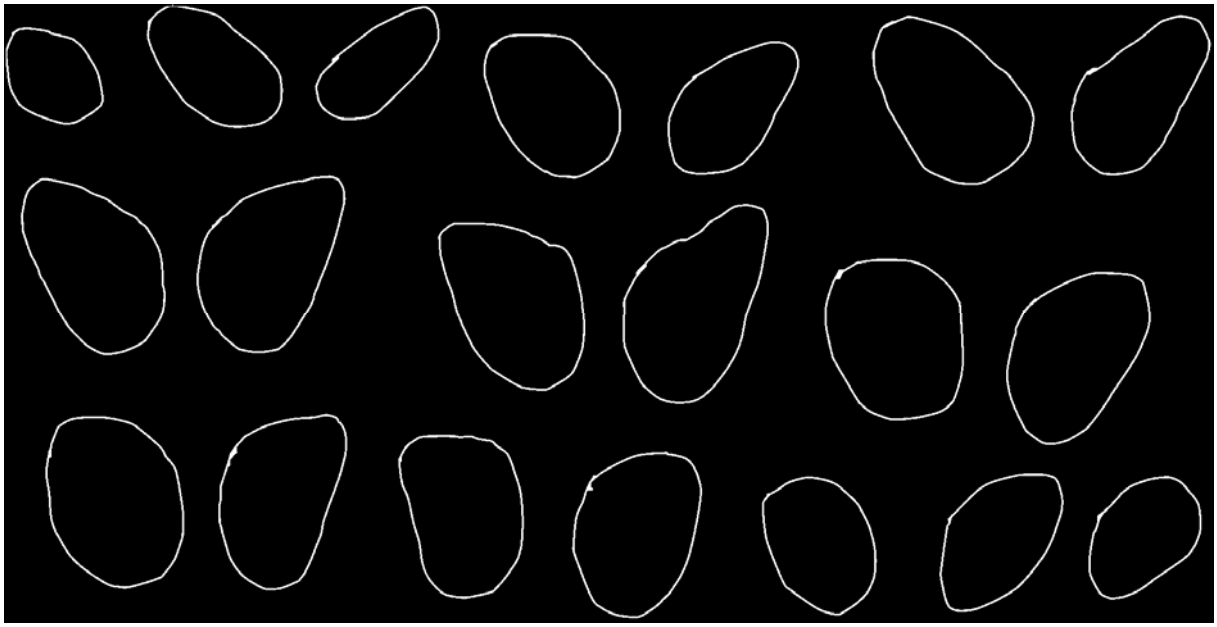


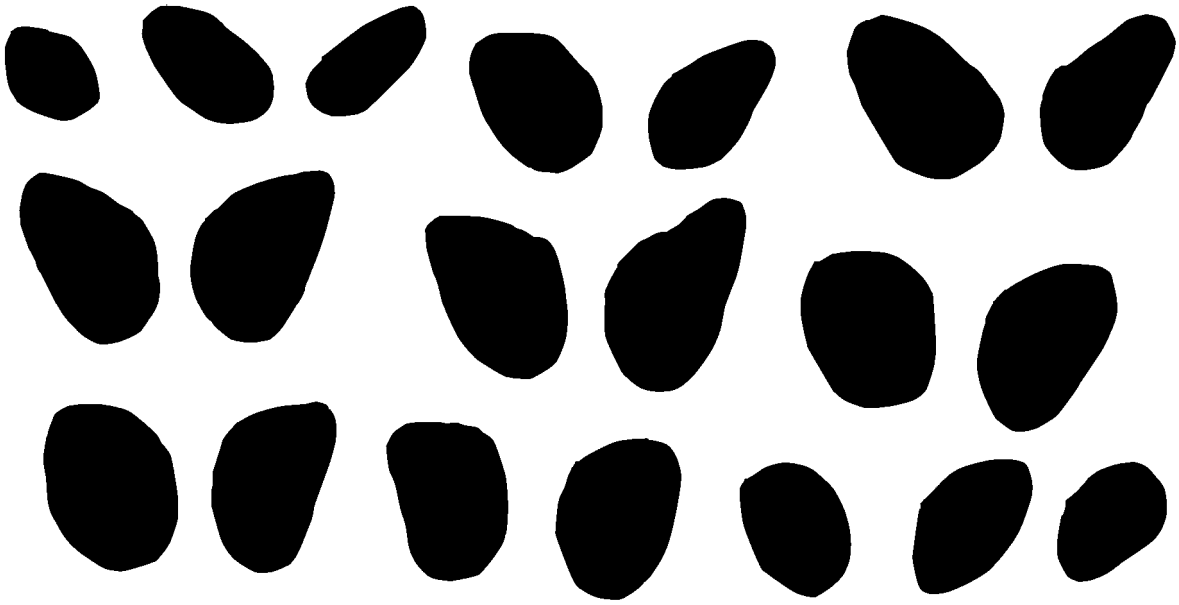
Abbildung 14: Kernschnittebenen nach der Inversion



Das inverse Duplikat beinhaltet nun in Schwarz den im Original fehlenden Anteil der Fläche, umschlossen von weißen Umfahrungen. Die übrigen schwarzen, nicht gewünschten Pixel müssen durch einen geeigneten Operator entfernt werden. Da sie alle miteinander verbunden

sind, formen sie eine einzelne Struktur, welche an allen vier Seiten den Rand berührt. Der Befehl, schwarze Strukturen zu entfernen, welche den Rand berühren, lässt ein Bild entstehen, dass nur noch die umfahrenen Flächen in der Farbe Schwarz enthält.
Als nächstes müssen das Original und das Duplikat überlagert werden. Der notwendige Operator ist ein OR (ODER) der Booleschen Algebra. Die Verknüpfung der beiden Bilder mit OR bedingt, dass im resultierenden Bild ein Pixel auf den Vordergrund-Wert 1 (d.h. schwarz) gesetzt wird, falls es entweder im Original-Bild oder im Duplikat bereits den Wert 1 besitzt. Wie in Abbildung 15 zu sehen, werden auf diese Weise die Inhalte der Umfahrungen schwarz gefüllt und somit alle Kernschnittebenen vollständig erfasst.

Abbildung 15: Kernschnittebenen nach Füllung der Binnenflächen



4) Der letzte Schritt ist die Messung der Flächeninhalte eines jeden Kernes. Fovea Pro 3.0 erlaubt die Messung zahlreicher Parameter neben dem Flächeninhalt, wie Umfang, größter Durchmesser etc. und erstellt eine Textdatei mit allen Messwerten in einem Standardformat, welches kompatibel ist zu Daten verarbeitenden Programmen wie z.B. Excel (Microsoft Corporation) oder Statistikprogrammen. Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit ist allein die Bestimmung des Flächeninhaltes erforderlich.
Bis zu diesem Zeitpunkt sind alle Operationen des von NucleoScope gesteuerten Algorithmus auf der Ebene einzelner Pixel erfolgt. Die Berechnung des Flächeninhaltes setzt voraus, dass die Einzel-Pixel der individuellen Kernschnittebenen als zusammenhängende Struktur erkannt und erfasst werden. Dieser Prozess wird „Gruppierung“ genannt und erlaubt einen Wechsel

von der Pixel-Ebene auf die Objektebene des Bildes: Aus Pixeln werden Objekte (Ritter and Wilson, 2001).

Der Subalgorithmus der Gruppierung beginnt bei einem beliebigen Vordergrund-Pixel (zugeordneter Wert = 1). Es wird als Objekt gesetzt, seine Koordinaten werden registriert und seine direkten Nachbarn untersucht, ob auch sie den Wert 1 besitzen oder nicht. Jedes Nachbar-Pixel, welches den Wert 1 besitzt, wird dem Objekt zugeteilt. Dies wiederholt sich, bis alle Nachbarn erfasst sind. Die Prozedur beginnt von Neuem. Stößt die Überprüfung nun auf ein Nachbar-Pixel, welches bereits einem anderen Objekt zugehörig ist, so werden die Objekte zu einem zusammengefasst. Diese Routine wird solange durchlaufen, bis alle Pixel mit dem Wert 1 einem Objekt zugeordnet sind. Hintergrund-Pixel mit dem Wert 0 (weiß) ergeben automatisch die Begrenzung eines Objektes: Sobald alle Rand-Pixel des Objektes an Nachbarn mit dem Wert 0 grenzen ist das Objekt vollständig erfasst (Russ, 2002).

Auf Basis der bestehenden Kalibrierung ist im Anschluß die Kalkulation des Flächeninhaltes möglich, denn die Pixel-Anzahl eines jeden Bildobjektes und der Flächeninhalt eines einzelnen Pixels sind bekannt. Fovea Pro 3.0 speichert die Ergebnisse in einer Textdatei und diese in einem definierten Ordner ab.

2.7.2.4 Import Textdatei, Namenscodierung und Volumenberechnung

NucleoScope greift auf die Textdatei zu, öffnet diese und importiert die Einzelflächeninhalte eines vermessenen Nucleus rotundus. An dieser Stelle ist es notwendig, dem Programm Zusatzinformationen zu den erhobenen Daten zu übermitteln, um ihre korrekte Einordnung in die Datenbank von NucleoScope zu ermöglichen. Es wurde ein System entwickelt, welches dem Benutzer erlaubt, die benötigten Angaben als Namen, der in die Kopfzeile des Blattes mit Anoto-Funktionalität eingetragen wird, zu codieren. Eine Unterbrechung der Automatisierung an dieser Stelle wird dadurch vermieden.

Die für die Verarbeitung des Datensatzes benötigten Angaben sind:

1) Die Nummer des Tieres, von dem das untersuchte Präparat stammt.

2) Die Nummer der Struktur. NucleoScope erlaubt die Vergabe von Nummern für zu untersuchende Strukturen. So erhielt z.B. die Struktur „Nucleus rotundus“ die Nummer 1.

3) Die Angabe eines Multiplikationsfaktors. Dieser Faktor wird nur benötigt, falls der Untersucher nicht alle Kernschnittebenen einer Struktur umfahren möchte, sondern mit hinreichender Genauigkeit nur einen repräsentativen Teil davon (Zilles et al., 1982). Würde man z.B. nur jeden dritten Schnitt zeichnen, müsste dies bei der Volumenberechnung

entsprechend berücksichtigt werden. Der Multiplikationsfaktor ergibt sich allgemein aus der Summe der vorhandenen Kernschnittebenen dividiert durch die Anzahl der tatsächlich umfahrenen Kernschnittebenen. Werden alle Kernschnittebenen gezeichnet, ist der Multiplikationsfaktor überflüssig.

Die Codierung des Namens folgt strikt der Sequenz:

NUMMER DES TIERES-NUMMER DER STRUKTUR-MULTIPLIKATIONSFAKTOR

Die einzelnen Angaben sind durch Bindestrich zu trennen. So bedeutet beispielsweise der Name „497-1-3“, dass das aus den Einzelflächen zu berechnende Struktur-Volumen dem Nucleus rotundus des Tieres mit der Nummer 497 zuzuordnen ist, und dass das Ergebnis mit dem Faktor 3 zu multiplizieren ist.
Bei besonders großen Strukturen (z.B. dem Gesamthirn) kann es vorkommen, dass nicht alle Umfahrungen der Struktur auf das selbe Blatt passen. Setzt man das Zeichnen auf weiteren Blättern fort, so kann man diesen den gleichen Name geben. Die Logitech IO-Software erkennt, dass der gleiche Name mehrfach vergeben ist, und nummeriert selbständig die betroffenen Dateien durch. Dies geschieht durch Zusatz einer Nummer in Klammern beginnend bei der Ziffer 2. NucleoScope erkennt diesen Zusatz und ordnet die sich über mehrere Blätter erstreckenden Umfahrungen korrekt zu.
Die Volumenberechnung führt das Programm nach dem in Kapitel 2.5 beschriebenen Prinzip unter Berücksichtigung des ggf. vorhandenen Multiplikationsfaktors durch.

2.7.2.5 Ablage in Datenbank

Das ermittelte Volumen sowie der ggf. angegebene Multiplikationsfaktor werden in der Datenbank - zusammen mit dem Datum und der Uhrzeit des Importes - der gemessenen Struktur des bearbeiteten Tieres zugeordnet. Die dort gespeicherten Daten sind über eine Benutzeroberfläche jederzeit zugänglich und können in unterschiedlicher Form weiterverwendet werden. Für den Fall, dass beim Import in die Datenbank Daten einer Struktur zugeordnet werden sollen, zu der bereits Daten existieren, erfolgt eine Sicherheitsabfrage, ob die bestehenden Daten zu überschreiben sind oder nicht. Sollten die Zeichnungen der Kernschnittebenen einer Struktur über mehrere Blätter gehen und daher

sequentiell importiert werden, würde diese Sicherheitsabfrage die Automatisierung unnötigerweise unterbrechen. Daher kann sie auf Wunsch vom Benutzer deaktiviert werden.

2.7.3 Zusätzliche Programm-Features

Neben dem beschriebenen, zentralen Steuerungs-Algorithmus wurden noch weitere Elemente in die Software implementiert. Die Auswahl zusätzlicher Funktionen vollzog sich dabei ebenfalls nach dem Kriterium der Effizienzsteigerung, so dass sich als weitere Komponenten des Programms ergaben:
1) Eine grafische Benutzeroberfläche für einfache Bedienbarkeit.
2) Eine Option zur Eingabe benutzerdefinierter Tierrassen und beliebiger anatomischer Strukturen für größtmögliche Flexibilität.
3) Kompatibilität zu anderen Anwendungen durch Integration einer Export-Funktion.

2.7.3.1 Grafische Benutzeroberfläche

Nach dem Start von NucleoScope präsentiert sich dem Benutzer eine Oberfläche bestehend aus einem Hintergrund und darauf positionierten Schaltflächen (Buttons). Diese gewähren einen vollständigen Überblick aller vorhandenen Funktionen. Jeder Schaltfläche ist direkt eine weitere Unterkategorie zugeordnet, welche die gewünschte Funktion oder Einstellung beinhaltet. Jede Auswahl kann mit Hilfe der Maus durch einmaliges Klicken getätigt werden, eine Navigation mittels Tastatur ist durch die Definition von Steuerungstasten ebenfalls möglich. Schwebt der Mauszeiger wenige Sekunden über einem Auswahlfeld oder einem Button, wird eine kurze Erklärung der zugehörigen Funktion eingeblendet. Mit der Schaltfläche „Datenübersicht“ ist der Aufruf der Datenbank verbunden, welche ebenfalls durch eine grafische Oberfläche (Maske) die Einsicht und den Ausdruck aller gespeicherten Daten ermöglicht.

2.7.3.2 Benutzerdefinierte Eingaben

Durch Eingabe unterschiedlicher, benutzerdefinierter Tierrassen und anatomischer Strukturen ist dem Benutzer kein Limit bei der Auswahl des Untersuchungsobjektes gesetzt. Jeder neu zu vermessenden Struktur kann eine individuelle Strukturnummer zugewiesen werden, die, im Namen des Bildes codiert, eine eindeutige Zuweisung der morphometrischen Daten erlaubt.

Über eine separate Maske können bereits vorhandene Bestandsdaten in die Datenbank eingepflegt werden, um sie der digitalen Weiterverarbeitung zugänglich zu machen.

2.7.3.3 Kompatibilität und Exportfunktion

Die Verwendung internationaler Standardformate ist Voraussetzung für eine weiterführende Nutzung der erhobenen Datensätze. Die in NucleoScope integrierte Exportfunktion erlaubt den Export der durch NucleoScope erstellten Datensätze. Wurden auch Bestandsdaten eingepflegt, können auch diese exportiert werden.
Die Daten können in den folgenden Formaten unter beliebigem Namen exportiert werden:
1) ASP (Active Server Pages), für die dynamische Implementierung in Web-basierte Anwendungen.
2) HTML (Hypertext Markup Language) für die Anzeige der Daten in einer Webseite.
3) RTF (Microsoft Rich-Text-Format) für den Import in beliebige Textverarbeitungsprogramme.
4) TXT (Textformat) für maximale Kompatibilität zu verschiedensten Programmen und Betriebssystemen.
5) XLS (Microsoft Excel-Format) für den Import in Excel (Microsoft Corporation) oder dazu kompatiblen Programmen.

2.7.4 Kalibrierung Fovea Pro 3.0

Wie in Kapitel 2.7.2.3 erwähnt, kann eine korrekte Bestimmung der Flächeninhalte nur nach initialer Kalibrierung des Systems erfolgen. Die Kalibrierung sollte präzise erfolgen, um einen durch sie bedingten Messfehler weitgehend auszuschließen.
Die Flächenberechnung im Arbeitsalgorithmus von NucleoScope basiert auf einer Kalibrierung von Fovea Pro 3.0 in Photoshop CS, welche vor dem Start von NucleoScope erfolgen muss.

2.7.4.1 Bestehende Kalibrierungsmethode und Problemstellung

Zur Kalibrierung von Fovea Pro 3.0 diente das digitale Bild des in Kapitel 2.6.1 beschriebenen, 4 x 4 mm² großen Quadrates, welches auf Anoto-Papier mit dem IO-Pen aus der Projektion des Eichquadrates im Mikroskop erstellt worden war. Nach Öffnung der

Kalibrierungs-Bilddatei in Photoshop CS und Aufrufen des Kalibrierungsmoduls von Fovea Pro 3.0 erscheint eine Maske mit einem Vorschau-Fenster. In ihm zeigt sich – deutlich verkleinert – das geladene Kalibrierungsbild, und ein Startpunkt und Endpunkt der Kalibrierungsstrecke kann durch Anklicken und Setzen zweier kleiner weißer Cursor-Kreuze festgelegt werden. Desweiteren wird in der Maske die im Mikroskopbild originär markierte Länge und ihre Einheit eingegeben. Eine Speicherung der Kalibrierung ist in einer Textdatei möglich, um ihren späteren Import zu ermöglichen.
Im Unterschied zu SigmaScan vollzieht Fovea Pro 3.0 die Kalibrierung nicht an einer Fläche, sondern an einer Strecke. Dies erhöht das Risiko eines Kalibrierungsfehlers durch unpräzises Setzen des Start- bzw. Endpunktes der Kalibrierungsstrecke. Die Möglichkeit, mindestens einen weiteren Kalibrierungspunkt zu setzen, würde eine Kalibrierungsfläche erzeugen, die durch ihre Größe den relativen Anteil eines an einer ihrer Kanten gemachten Fehlers sinken ließe (Beverly and van Iersel, 1998).
In der Praxis zeigte sich, dass das präzise Setzen der Cursor-Kreuze im Vorschau-Fenster wegen des verkleinerten Kalibrierungsbildes sehr schwierig war, und oftmals die Markierungen der Kalibrierungsstrecke nicht exakt getroffen wurden. Dies führte zu einer Unsicherheit bezüglich der Güte der Kalibrierung. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich untersucht, wie stark sich eine nicht exakte Kalibrierung auf die Berechnung der Kernvolumina auswirkt. Dabei wurde vorausgesetzt, dass der Anwender beim Setzen der Cursor-Kreuze mindestens so präzise war, dass die Start und Endpunkte der Kalibrierungsstrecke – dargestellt durch schwarze Kreuze (siehe Abbildung 16) – berührt wurden.

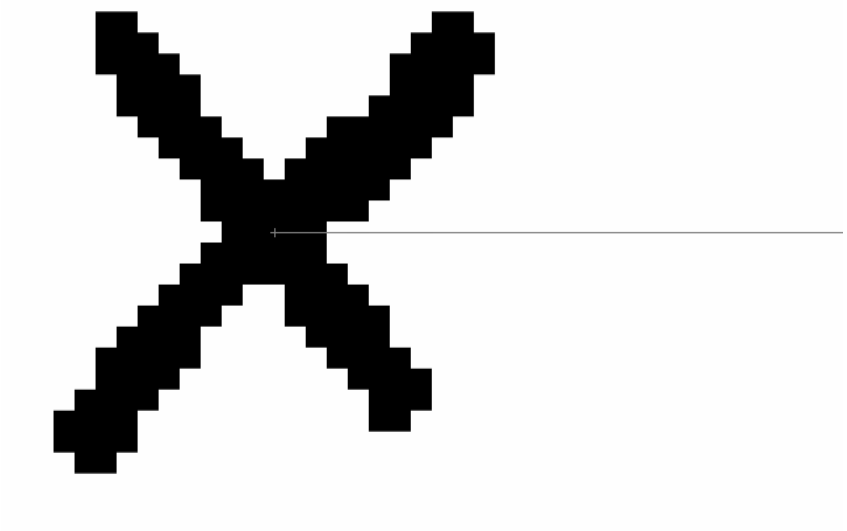
Abbildung 16: Markierungen der Kalibrierungsstrecke

2.7.4.2 Minimierung des Kalibrierungsfehlers

Die Ergebnisse dieser Untersuchung (siehe Kapitel 3.2) führten zur Entwicklung einer alternativen Kalibrierungsmethode. So wurde nach dem Öffnen der Kalibrierungsbilddatei in Photoshop mit der Lupenfunktion die maximale Vergrößerung der Bildansicht eingestellt. Mit dem in Photoshop CS vorhandenen Messwerkzeug wurden nun in maximaler Vergrößerung die Cursor-Kreuze exakt in den Schnittpunkt der Schenkel der Kalibrierungskreuze gelegt.

Abbildung 17 verdeutlicht dies. Abweichungen durch mangelnde Präzision wurden so vermieden.

Abbildung 17: Kalibrierungskreuz mit Photoshop Messwerkzeug in max. Vergrößerung



Die Länge der Kalibrierungsstrecke gibt Photoshop CS direkt in Pixel an. Fovea Pro 3.0 berechnet den Quotienten aus der Streckenlänge im Eichquadrat [mm] und der Streckenlänge zwischen den gesetzten Cursor-Kreuzen [Pixel]. Daraus ergibt sich das Äquivalent der Kalibrierung für die Kantenlänge von einem Pixelquadrat:

$$\frac{\text{Länge markierte Strecke Eichquadrat}}{\text{Länge markierte Strecke Kalibrierungsbild}}\ \frac{[\text{mm}]}{[\text{Pixel}]} = \text{Kalibrierte Kantenlänge eines Pixels}\ \frac{[\text{mm}]}{[\text{Pixel}]}$$

Ein konkretes Beispiel veranschaulicht die Vorgehensweise: Vom 10 x 10 mm² messenden Eichquadrat auf dem Objektträger wurden über die Bildeinspiegelung die Ecken eines 4 x 4 mm² messenden Quadrates mit einem Kreuz markiert. Ein größeres Quadrat zu markieren war aufgrund des gewählten Objektives nicht möglich. Das vom Logitech IO-Pen erstellte digitale Bild der Kreuze ergab in Photoshop einen Abstand derselben von 582 Pixeln. Somit entsprachen 4 mm im Mikroskop 582 Pixeln im Bild. In obige Formel eingesetzt ergab sich für die Kantenlänge eines einzelnen Pixels der Wert von 0,00687 mm/Pixel. Ein Pixelquadrat hätte demnach einen Flächeninhalt von $4{,}71969\ 10^{-5}$ mm². Bestünde ein umfahrenes Objekt aus 10^4 Pixeln wäre sein reeller Flächeninhalt 0,471969 mm².

Pixel sind nicht grundsätzlich Quadrate. Quadrate sind das einfachste Repräsentationsmodell eines Pixels. In dieser Form können sie bei ihrer Darstellung auf einem Monitor auflösungsbedingt verzerrt werden, so dass Stauchungen oder Streckungen möglich sind. Die Berechnung der Flächeninhalte – basierend auf der Kalibrierung – ist davon völlig unabhängig, die eingestellte Bildschirmauflösung spielt keine Rolle für den Messprozess. Der IO-Pen liefert ein Pixelraster in der Auflösung 300 dpi sowohl in horizontaler, als auch in vertikaler Ausrichtung. Die Anzahl der zwischen den Kalibrierungsmarkierungen liegenden Pixel ist daher ebenfalls unabhängig von der Bildschirmauflösung.
Fovea Pro 3.0 erkennt dies durch Auslesen der Auflösung. Die beschriebene manuelle Messung der Strecke zwischen den Kalibrierungsmarkierungen liefert demnach die korrekte Pixelanzahl und die Berechnung nach obiger Formel die korrekte Kantenlänge (a) des Pixelquadrates.

Die selbst entwickelte Methode der manuellen Kalibrierung wurde dadurch abgeschlossen, dass der rechnerisch ermittelte Wert für die Kantenlänge eines Pixels in eine Textdatei eingetragen wurde. Diese konnte bei Bedarf durch Aufruf des Kalibrierungsmoduls von Fovea Pro 3.0 über die Import-Funktion eingelesen werden.

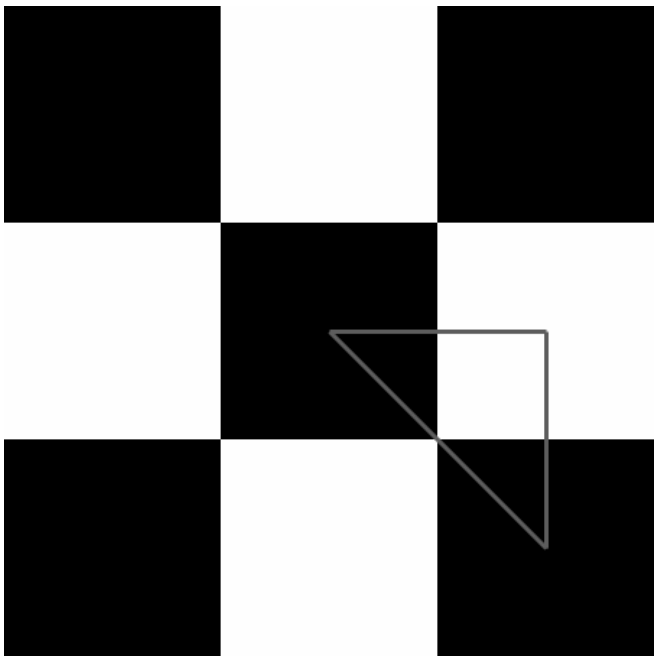
2.7.5 Entwicklung eines automatisierten Schließungsalgorithmus in VBA

Der in Kapitel 2.7.2.3 vorgestellte Algorithmus setzt Bilder voraus, die keine Lücken in den Umfahrungen aufweisen. Eine durchgehende Lücke vom Durchmesser eines Pixels genügt, um die Füllung und Objekt-Klassifizierung der betroffenen Kernschnittebene zu verhindern, so dass Messfehler durch Auslassung dieser Kernschnittebene resultieren. Für den Methodenvergleich wurden die Umfahrungen auf den erstellten Bildern manuell geschlossen (siehe Kapitel 2.7.1.3); für die Zielsetzung dieser Arbeit ist eine automatisierte Schließung jedoch unumgänglich.
Es erfolgte die Entwicklung eines weiteren Subalgorithmus, der in den bestehenden Kontext des allgemeinen Algorithmus (siehe Kapitel 2.7.2.3) eingefügt wurde. Die automatische Schließung der Umfahrungen ist folglich Voraussetzung für die korrekte Füllung der Fläche (siehe Kapitel 2.7.2.3, Schritt 3) und muss nach der Erstellung des Binärbildes (Kapitel 2.7.2.3, Schritt 2) vollzogen werden.

2.7.5.1 Nachbarschaftsdefinitionen im Pixelraster

Die Problematik der automatisierten Schließung einer Umfahrung erfordert zunächst eine Betrachtung des grundsätzlichen Aufbaus von Binärbildern, welche aus Pixeln bestehen.
Grundlage der Pixel-basierten Darstellung der Grafiken ist ein Raster, welches eine definierte Pixel-Anzahl pro Zeile und Spalte besitzt, definiert als absolute Auflösung. Ist die Pixel-Anzahl horizontal und vertikal gleich, resultieren modellhaft quadratische Pixel.
Ein einzelnes Pixel des Rasters kann abhängig von der Betrachtungsweise 4 oder 8 Nachbar-Pixel besitzen. Die Rasterstruktur bedingt, dass seine 4 diagonalen Nachbarn weiter von seinem Zentrum entfernt sind als seine 4 direkt angrenzenden Nachbarn. Abbildung 18 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

Abbildung 18: Nachbarschaftstypen im Pixelraster

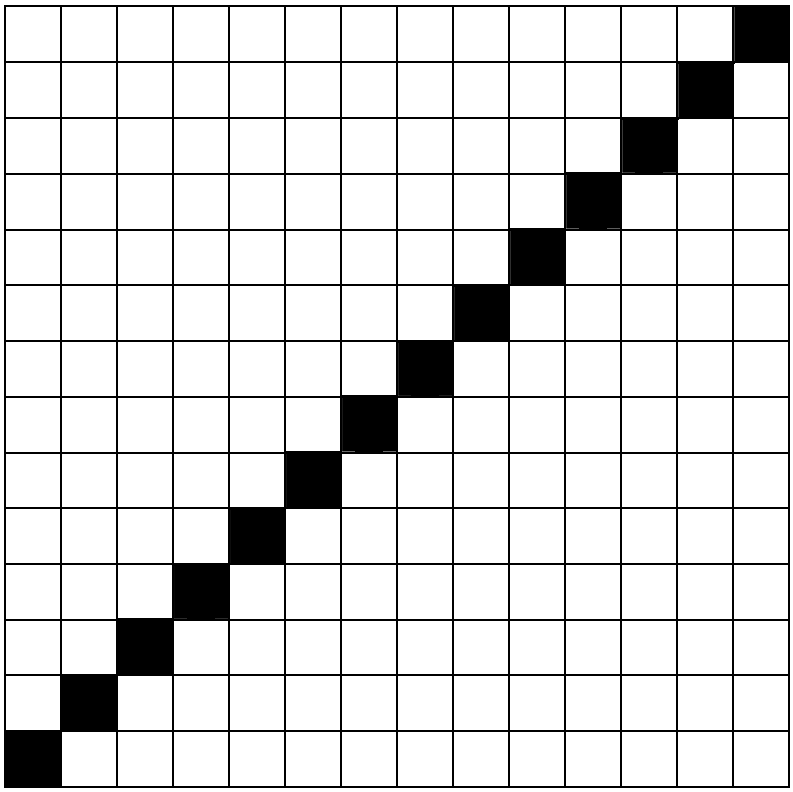


Der Abstand zum Zentrum des diagonalen Nachbarn beträgt eine Kantenlänge (a) multipliziert mit $\sqrt{2}$.
Definiert man nun, dass ein Pixel als Nachbar gilt, falls sein Zentrum genau eine Kantenlänge (a) vom eigenen Zentrum entfernt ist, dann sind die diagonal angrenzenden Pixel keine Nachbarn, da ihre Entfernung $a \cdot \sqrt{2}$ beträgt. Eine solchen Nachbarschaftstypus des Rasters bezeichnet man als 4er-Nachbarschaft (4-connectedness).
Umgekehrt lässt sich auch definieren, dass ein Pixel als Nachbar gilt, falls der Abstand zu seinem Zentrum maximal $a \cdot \sqrt{2}$ beträgt. In diesem Fall sind die diagonal angrenzenden Pixel

Nachbarn. Dieser Nachbarschaftstypus wird analog als 8er-Nachbarschaft (8-connectedness) bezeichnet (Jähne, 2002).

Je nach Definition kann ein und das selbe Binärbild eine völlig unterschiedliche Bedeutung haben. Abbildung 19 zeigt je nach Nachbarschaftstypus der schwarzen Vordergrundpixel zwei verschiedene Dinge:

Abbildung 19: Informationsgehalt in Abhängigkeit vom Nachbarschaftstypus



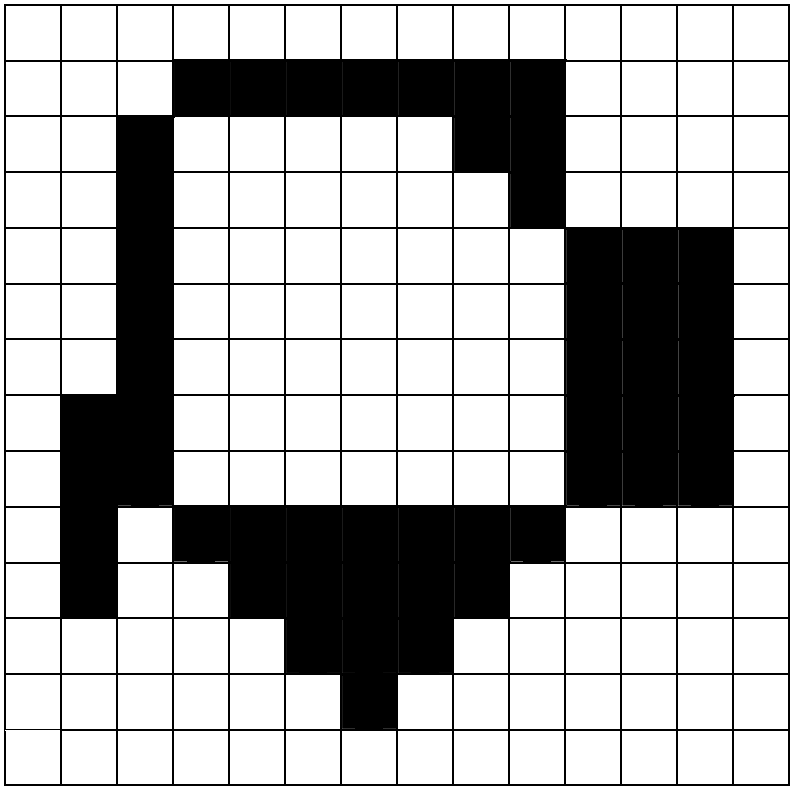
Die dargestellten, diagonal verlaufenden schwarzen Vordergrundpixel wären in einem 4er-Nachbarschaftsraum mit ihren diagonalen Nachbarn nicht verbunden. Symbolhaft stellten sie demnach „Inseln“ in einem zusammenhängenden weißen „Meer“ dar. Ginge man im entgegen gesetzten Fall von einer 8er-Nachbarschaft aus, so stellten die demnach verbundenen, diagonal verlaufenden schwarzen Pixel eine Linie dar, die den Hintergrund in zwei nicht verbundene Flächen teilte.

Vor der Verarbeitung des Binärbildes muss daher die Betrachtungsweise definiert werden. Eine Konvention dafür gibt es nicht. Beachtet werden sollte in diesem Zusammenhang, dass die Festlegung eines Nachbarschaftstypus für den Vordergrund gleichzeitig den Hintergrund auf den gegenteiligen Nachbarschaftstypus festlegt und umgekehrt (Russ, 2002).

2.7.5.2 Nachbarschaftsdefinition in Fovea Pro 3.0 und Stufen-Phänomen

Fovea Pro 3.0 arbeitet auf der Grundlage des 8er-Nachbarschaftstypus für die schwarzen Vordergrundpixel und des 4er-Nachbarschaftstypus für die weißen Hintergrundpixel. Diese Vorgabe hat für die Bestimmung des Flächeninhaltes der Umfahrungen Konsequenzen und musste bei der folgenden Eigen-Entwicklung und Programmierung der automatisierten Schließung berücksichtigt werden. Abbildung 20 stellt diese Situation dar:

Abbildung 20: Objektklassifizierung im 8er-Nachbarschaftstypus



Die schwarzen Pixel stellen auf dieser Basis nicht vier individuelle Objekte dar, sondern sie sind miteinander verbunden, d.h. sie umschließen die weiße Fläche. In Zusammenhang mit der Umfahrung einer Kernschnittebene reichen solche Pixel-Konstellationen theoretisch für den gewünschten diagonalen Übergang. In der Praxis ist eine korrekte Füllung ihrer eingeschlossenen Fläche – wie in Kapitel 2.7.2.3 im dritten Schritt beschrieben – aber technisch ausgeschlossen. Das Phänomen der Stufenbildung durch allein diagonal benachbarte Randpixel verhindert während der Inversion des Bildes (siehe Kapitel 2.7.2.3, Schritt 3) die korrekte Klassifizierung der Binnenfläche. Im invertierten Bild sind die ehemals weißen Hintergrundpixel schwarz, sie gelten somit als Vordergrundpixel mit 8er-Nachbarschaftsbeziehung. Die Folge ist, dass die Pixel, welche die beschriebene Stufe bilden

jetzt als Hintergrundpixel nur noch in 4er-Nachbarschaftsbeziehung stehen und folglich keinen Übergang mehr bilden. Die Ermittlung der Binnenfläche von Umfahrungen, die eine Stufenbildung aufweisen, kann ohne Modifikation des Algorithmus nicht erfolgen.

2.7.5.3 Implementierung morphologischer Operatoren

Die Lösung des Problems liegt in der Anwendung morphologischer Operatoren (Serra, 1982). Sie erfordert eine initiale Dilatation (DILATION) der Umfahrungen mit konsekutiver Applikation einer Schließung (CLOSING) vor der Füllung der Binnenflächen (wie beschrieben in Kapitel 2.7.2.3) und abschließend eine Erosion (EROSION), um die hinzugefügten Pixel wieder zu entfernen. Die morphologische Dilatation im Binärbild setzt den Wert eines jeden Hintergrundpixels, welches ein Vordergrundpixel berührt, auf den Wert 1 (schwarz) und teilt es so dem Vordergrund zu. Für die Umfahrungen bedeutet dies, dass sich ein Ring schwarzer Pixel innen und außen anlegt, der die potentiell vorhandenen Stufen ausgleicht. Als morphologische Schließung bezeichnet man die Applikation einer Dilatation direkt gefolgt von einer Erosion. Der resultierende Effekt dieser Kombination ist der Verschluss von Lücken in der individuellen Umfahrung, so dass die Binnenflächen erfolgreich gefüllt werden können (Russ, 2002). Eine abschließende, separate Erosion bewirkt die Entfernung der Pixelringe, welche durch die initiale Dilatation hinzugefügt wurden. Eine Verfälschung der Pixel-Anzahl wird so vermieden.
Der morphologische Operator der Schließung erlaubt durch Angabe eines Parameters (Depth) eine präzise Steuerung der Anzahl seiner Wiederholungen (Iterationen). Die optimale Anzahl der Wiederholungen wurde in einer Untersuchung ermittelt (siehe Kapitel 3.3) und in den Algorithmus von NucleoScope implementiert.

2.8 Methode der statistischen Auswertung und EDV

Die statistische Auswertung des Methodenvergleiches erfolgte nach der Methode von Bland und Altman (1986). Die Methode zeigt, ob eine hinreichende Übereinstimmung zwischen den methodisch unterschiedlich erfassten Volumina besteht, und ermöglicht eine Aussage über die Gleichwertigkeit der Methoden hinsichtlich der Güte ihrer Ergebnisse.
Die Graphen wurden mit der Software Origin 7G SR4 (OriginLab Corporation) erstellt.
Die für die Erstellung der Graphen notwendigen Berechnungen erfolgten in Excel 2003 (Microsoft Corporation).

2.8.1 Methode nach Bland und Altman

Häufig wird für den Vergleich zweier Methoden der Korrelationskoeffizient berechnet und die Null-Hypothese, dass die Daten nicht linear verbunden seien, mit einem Signifikanztest überprüft. Der Korrelationskoeffizient „r“ misst die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen, nicht ihre Übereinstimmung. Der Test auf Signifikanz trägt zur Klärung der Übereinstimmung ebenfalls nicht bei, da er lediglich die Irrtumswahrscheinlichkeit der Annahme, dass die beiden Methoden nicht korrelieren, angibt (Bland and Altman, 1995). Daher basiert die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse nicht auf der Korrelation. Lediglich aus Gründen der vollständigen Dokumentation werden sie in den grafischen Darstellungen als Zusatz angegeben.

Im Gegensatz dazu ermöglicht die statistische Methode nach Bland und Altman (1986) den Vergleich zweier Methoden. Sie basiert auf einer spezifischen, grafischen Darstellung der Messdaten und den daraus zu ziehenden Schlussfolgerungen. Von zentraler Bedeutung ist dabei die initiale Definition eines Vertrauensbereiches innerhalb dessen sich die Abweichung der neuen Methode bewegen darf, um für den geforderten Anwendungsbereich als gleichwertig in ihrer Güte gelten zu können. Dabei gibt es keine allgemeingültigen Kriterien. Der Vertrauensbereich ist ein Maß, welches von der Fragestellung, dem Messobjekt und der Messmethode selbst abhängig ist (Bland and Altman, 1986). Basierend auf dem in Kapitel 2.5 dargestellten methodischen Hintergrund wurde der Vertrauensbereich für die maximale methodische Abweichung auf 5% festgelegt.

Der erste Schritt ist die Visualisierung der ermittelten Daten in Form einer grafischen Gegenüberstellung der Messwerte beider Methoden. Zusätzlich wird eine Ursprungsgerade eingezeichnet, die sich ergäbe, falls jeder Messwert der einen Methode mit dem der anderen Methode übereinstimmte (line of equality). Diese Darstellung hat den Vorteil, dass man direkt einen ersten Überblick über den Grad der Übereinstimmung erhält. Sollte z.B. ein mittels NucleoScope bestimmter Volumenwert deutlich von dem per Zeichentablett bestimmten Wert abweichen, so würde der resultierende Punkt in Richtung der Achse verschoben und durch seine Distanz zur line of equality auffallen.

Zwei unterschiedliche Methoden werden nur im unwahrscheinlichsten Fall exakt übereinstimmende Messwerte liefern. Um eine neue Methode gleichberechtigt einsetzen zu können, ist es wichtig zu wissen, mit welcher Schwankungsbreite sich die Messwerte der neuen von denjenigen der alten Methode unterscheiden. Erst wenn diese Schwankungsbreite sich innerhalb des definierten Vertrauensbereiches bewegt, kann von einer Gleichwertigkeit

gesprochen werden (Bland and Altman, 1986). Um diese Entscheidung treffen zu können, schlugen Bland und Altman (1986) im nächsten Schritt eine grafische Darstellung vor, die die Differenz der Messwerte beider Methoden dem Mittelwert aus beiden Messwerten gegenüber stellt (Bland-Altman-plot).

Zunächst erfolgt die Berechnung des Mittelwertes ($\bar{x}$) der Differenzen und ihrer Standardabweichung (s). Im Intervall $\bar{x} \pm 2s$ werden erwartungsgemäß die meisten Differenzen liegen. Man kann davon ausgehen, dass die Differenzen der Normalverteilung unterliegen, so dass 95% aller Differenzen im Intervall $\bar{x} \pm 1{,}96s$ liegen werden. Vorausgesetzt, dass Messunterschiede im Bereich bis zur 2-fachen Standardabweichung beim Einsatz der neuen Methode in der Praxis keine Rolle spielen, können beide Methoden gleichberechtigt eingesetzt werden. Die Grenzen von +2s und -2s werden als „limits of agreement“ bezeichnet. Sie sind spezifisch für das untersuchte Kollektiv.

Die Verallgemeinerung der erhobenen Daten auf eine Gesamtpopulation erfordert die Ermittlung der limits of agreement auf Basis der Konfidenzintervalle für die 2-fache Standardabweichung (s). Hierbei wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu Grunde gelegt, dass sich die entsprechende 2-fache Standardabweichung der Grundgesamtheit nicht innerhalb des Konfidenzintervalls befindet (Bland and Altman, 1986). Für den Vergleich der Schwankungsbreite der Messwerte der vorgeschlagenen Methode mit dem gesetzten Kriterium des 5%-igen Vertrauensbereiches sind die äußeren Grenzen der positiven ($(\bar{x} + 2s)_{+95}$) und negativen ($(\bar{x} - 2s)_{-95}$) 2-fachen Standardabweichung maßgeblich. Solange diese Grenzen innerhalb des vom Kriterium festgelegten Intervalls liegen, ist eine hinreichende Übereinstimmung der Methoden in Bezug auf die zu Grunde liegende Gesamtpopulation gegeben.

Bei der Auswertung der vorliegenden Messwerte wurde – da es sich im vorliegenden Vergleich bei der Methode mittels Zeichentablett um die Referenzmethode handelt – in Abweichung davon nicht der Volumen-Mittelwert aus beiden Methoden eingesetzt, sondern das mittels Zeichentablett gemessene Volumen.

2.8.2 Volumina als zusammengesetzte Größen

Auch die Einzelflächen aller umfahrenen Kernschnittebenen zusammen und für jedes Tier separat wurden in einem Diagramm mit line of equality gegenüber gestellt. Der Grund hierfür ist, dass es sich bei den Volumina um abhängige Größen handelt, welche aus den Flächeninhalten berechnet werden, so dass eine rein zufällige Übereinstimmung der Volumina ausgeschlossen werden muss.
In einer weiteren grafischen Darstellung wurde überprüft, ob die kumulierten Flächeninhalte der Einzelschnitte der Nuclei rotundi, die mittels NucleoScope ermittelt wurden, stetig von der ersten umfahrenen Kernschnittebene bis zur letzten den Vertrauensbereich von 5% nicht verließen. Dazu wurde auf der Abszisse die Anzahl (n) der kumulierten Flächen gegen den kumulierten Flächeninhalt der Einzelschnitte aufgetragen. Als obere und untere Intervall-Grenze des Vertrauensbereiches wurden die Referenz-Flächeninhalte des Zeichentabletts +5% respektive -5% eingezeichnet. Diese Darstellung erfolgte exemplarisch für die Nuclei rotundi zweier Tiere: Tier 525 mit dem höchsten und Tier 521 mit dem niedrigsten Korrelationskoeffizienten für die Flächeninhalte der Einzelschnitte. Beide Koeffizienten lagen auf dem Niveau von 0,99.

3. Ergebnisse

3.1 Volumenanalysen

Die Flächeninhalte der Kernschnittebenen als Berechnungsgrundlage des Struktur-Volumens wurden bei beiden Methoden auf zwei Dezimalstellen mathematisch gerundet. Die Angabe weiterer Dezimalstellen ist methodisch bedingt nicht sinnvoll. Analog wurde bei der Angabe der Struktur-Volumina verfahren.

3.1.1 Volumina mittels Zeichentablett

In Tabelle 3 sind die mittels Zeichentablett ermittelten Volumina [mm³] der Nuclei rotundi eines jeden Tieres dargestellt. Diese wurden zur Kontrolle in einer zweiten Messung erneut bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle und ihre prozentuale Abweichung sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 3: Gesamtvolumen beider Ncll. rotundi eines Tieres mittels Zeichentablett

Gesamtvolumen beider Nuclei rotundi eines Tieres mittels Zeichentablett				
Sammlungsnummer	**Tierrasse**	**Volumen Zeichentablett [mm³]**	**Kontrolle Volumen Zeichentablett [mm³]**	**Abweichung Kontrolle [%]**
497	Italiener	10,40	10,41	0,10
498	Italiener	10,50	10,52	0,19
499	Italiener	10,42	10,42	0,00
500	Italiener	10,89	10,86	-0,28
501	Italiener	10,85	10,87	0,18
502	Italiener	8,74	8,74	0,00
503	Italiener	10,31	10,31	0,00
504	Italiener	10,41	10,42	0,10
505	Italiener	9,88	9,87	-0,10
506	Italiener	10,86	10,85	-0,09
518	Holländer Hauben	9,90	9,90	0,00
519	Holländer Hauben	9,35	9,35	0,00
520	Holländer Hauben	10,00	10,00	0,00
521	Holländer Hauben	9,21	9,19	-0,22
522	Holländer Hauben	9,52	9,53	0,11
523	Holländer Hauben	10,10	10,11	0,10
524	Holländer Hauben	12,75	12,79	0,31
525	Holländer Hauben	7,02	7,02	0,00
526	Holländer Hauben	8,26	8,24	-0,24
527	Holländer Hauben	9,18	9,17	-0,11
683	Breda	9,04	9,04	0,00
684	Breda	8,46	8,47	0,12
685	Breda	7,96	7,97	0,13
686	Breda	9,12	9,12	0,00
687	Breda	9,50	9,50	0,00
705	Breda	9,37	9,37	0,00
706	Breda	9,47	9,48	0,11
707	Breda	8,64	8,63	-0,12
708	Breda	8,34	8,33	-0,12
709	Breda	7,54	7,54	0,00

Hierbei zeigte sich in der Kontrollmessung eine hohe Übereinstimmung mit den initial bestimmten Flächeninhalten. Die Kontrollmessung wies eine mittlere Abweichung von 0,091% auf, die maximale Abweichung betrug 0,31%.

3.1.2 Volumina mittels NucleoScope

Tabelle 4 stellt die mittels NucleoScope ermittelten Volumina [mm³] der Nuclei rotundi eines jeden Tieres dar. Die Umfahrungen wurden – wie in Kapitel 2.7.1.3 beschrieben – manuell geschlossen.

Tabelle 4: Gesamtvolumen beider Nuclei rotundi eines Tieres mittels NucleoScope

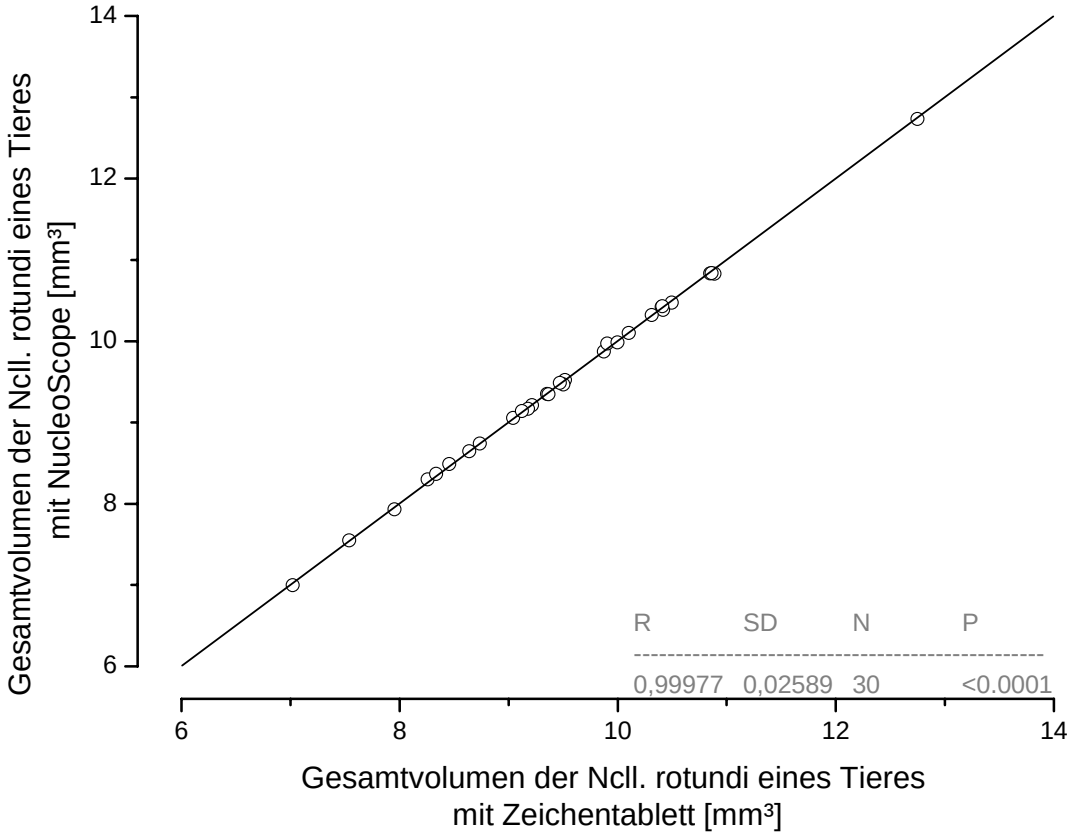
Gesamtvolumen beider Nuclei rotundi eines Tieres mittels NucleoScope		
Sammlungsnummer	**Tierrasse**	**Volumen NucleoScope [mm³]**
497	Italiener	10,42
498	Italiener	10,47
499	Italiener	10,39
500	Italiener	10,83
501	Italiener	10,83
502	Italiener	8,74
503	Italiener	10,32
504	Italiener	10,43
505	Italiener	9,87
506	Italiener	10,84
518	Holländer Hauben	9,97
519	Holländer Hauben	9,35
520	Holländer Hauben	9,98
521	Holländer Hauben	9,21
522	Holländer Hauben	9,52
523	Holländer Hauben	10,10
524	Holländer Hauben	12,73
525	Holländer Hauben	7,00
526	Holländer Hauben	8,30
527	Holländer Hauben	9,17
683	Breda	9,05
684	Breda	8,49
685	Breda	7,93
686	Breda	9,14
687	Breda	9,47
705	Breda	9,35
706	Breda	9,49
707	Breda	8,65
708	Breda	8,37
709	Breda	7,55

3.1.3 Methodenvergleich nach Bland und Altman

3.1.3.1 Grafische Darstellung der Volumina mit line of equality

Abbildung 21 zeigt die grafische Gegenüberstellung beider Methoden. Für die Nuclei rotundi eines jeden Tieres wurde ein Koordinatenpaar aus dem per Zeichentablett (siehe Tabelle 3) und dem per NucleoScope (siehe Tabelle 4) ermittelten Kern-Volumen gebildet. Auf der Abszisse wurden die mittels Zeichentablett ermittelten Volumina [mm³] und auf der Ordinate die mittels NucleoScope ermittelten Volumina [mm³] aufgetragen.

Abbildung 21: Volumina beider Methoden mit line of equality

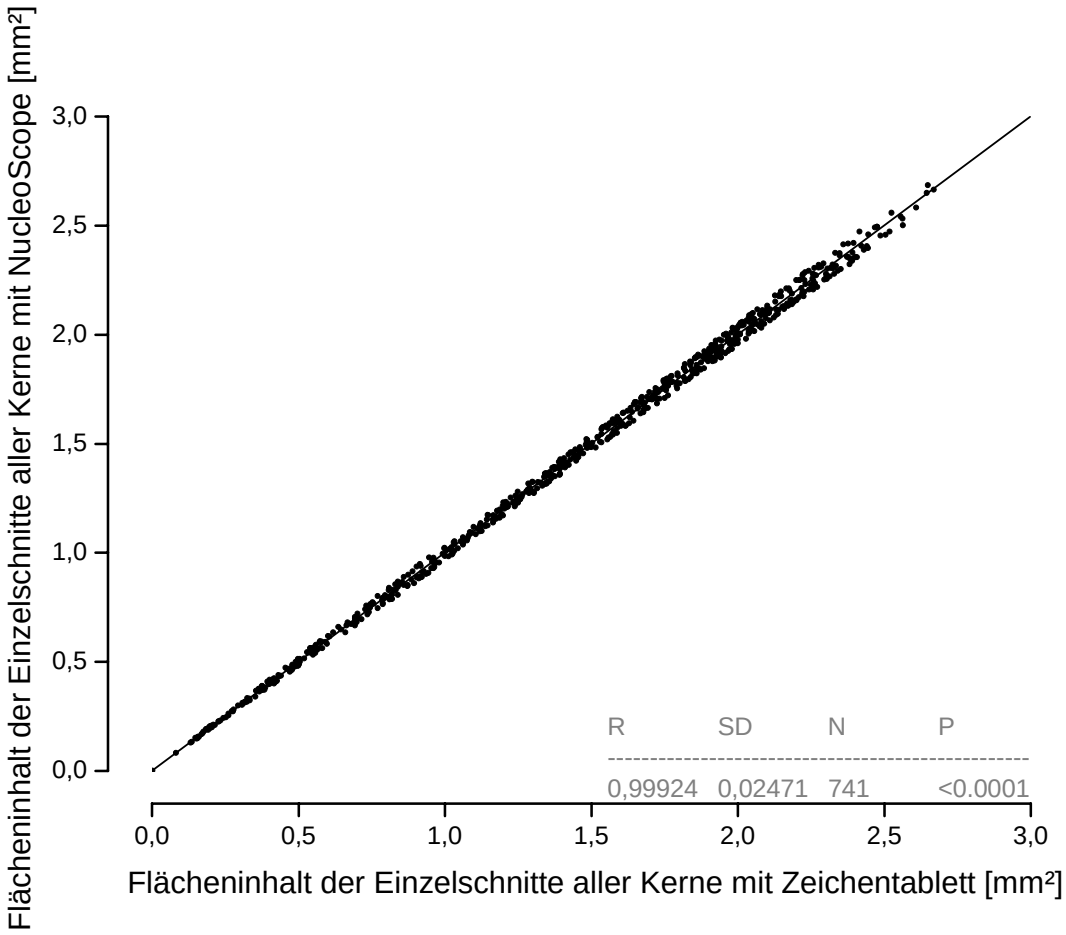


In der Abbildung 21 ist keine auffällige Abweichung der Punkte erkennbar, alle liegen dicht an der line of equality.

3.1.3.2 Grafische Darstellung der Einzelschichten aller Tiere mit line of equality

In Abbildung 22 ist die Größe der Flächen aller mit beiden Methoden ermittelten Einzelschichten aller Nuclei rotundi des untersuchten Kollektivs in [mm²] in einem Diagramm mit line of equality dargestellt.

Abbildung 22: Übersicht aller Flächen über alle Tiere mit line of equality

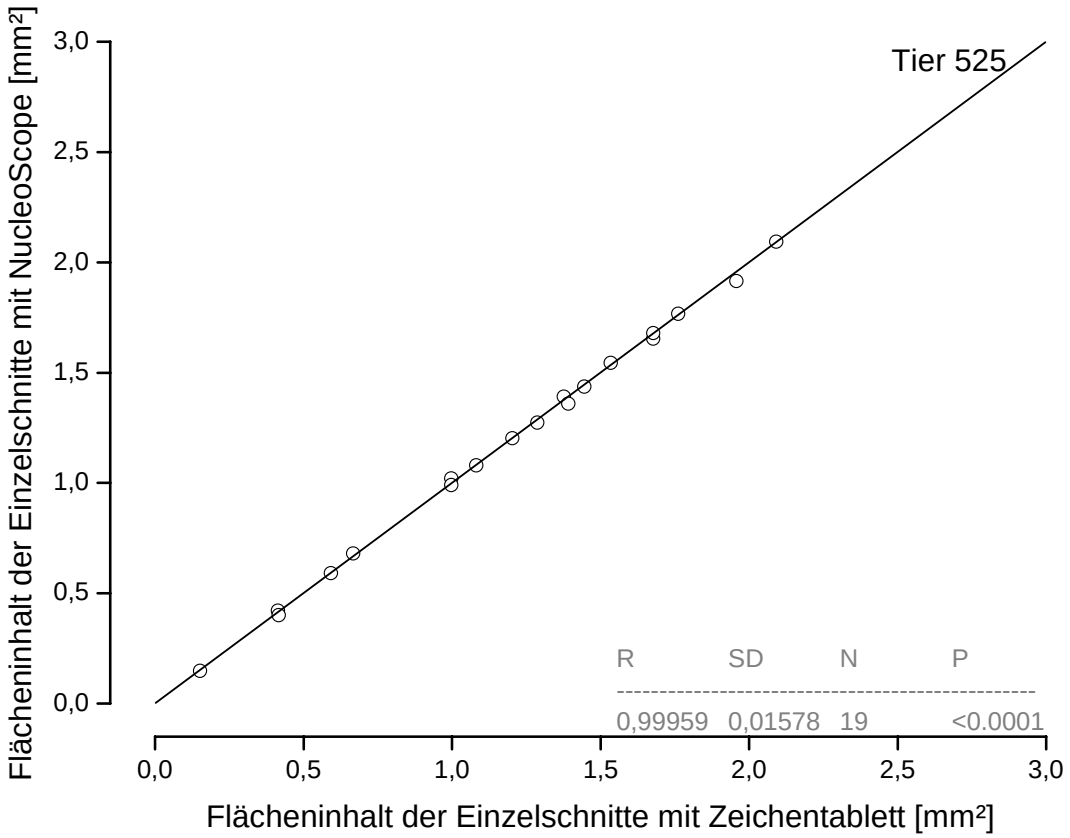


In dieser Übersicht über die Gesamtheit aller umfahrenen Einzelschichten sind keine auffälligen Abweichungen von der line of equality feststellbar. Somit zeigen – wie in Kapitel 2.8.2 gefordert – die Flächeninhalte aller umfahrenen Einzelschichten über den gesamten Größenbereich eine gute Übereinstimmung zwischen den Methoden.

3.1.3.3 Grafische Darstellung der Einzelschichten pro Tier mit line of equality

Abbildung 23 verdeutlicht die Übereinstimmung der Methoden auf der Ebene der Flächeninhalte der Einzelschichten [mm²] des einzelnen Tieres. Exemplarisch ist der Graph für Tier 525 dargestellt. Um – wie vorausgesetzt – die Übereinstimmung für jedes Tier dokumentieren zu können, wurden alle 30 Graphen erstellt und sind im Anhang abgebildet.

Abbildung 23: Flächeninhalte der Einzelschnitte (Tier 525) mit line of equality

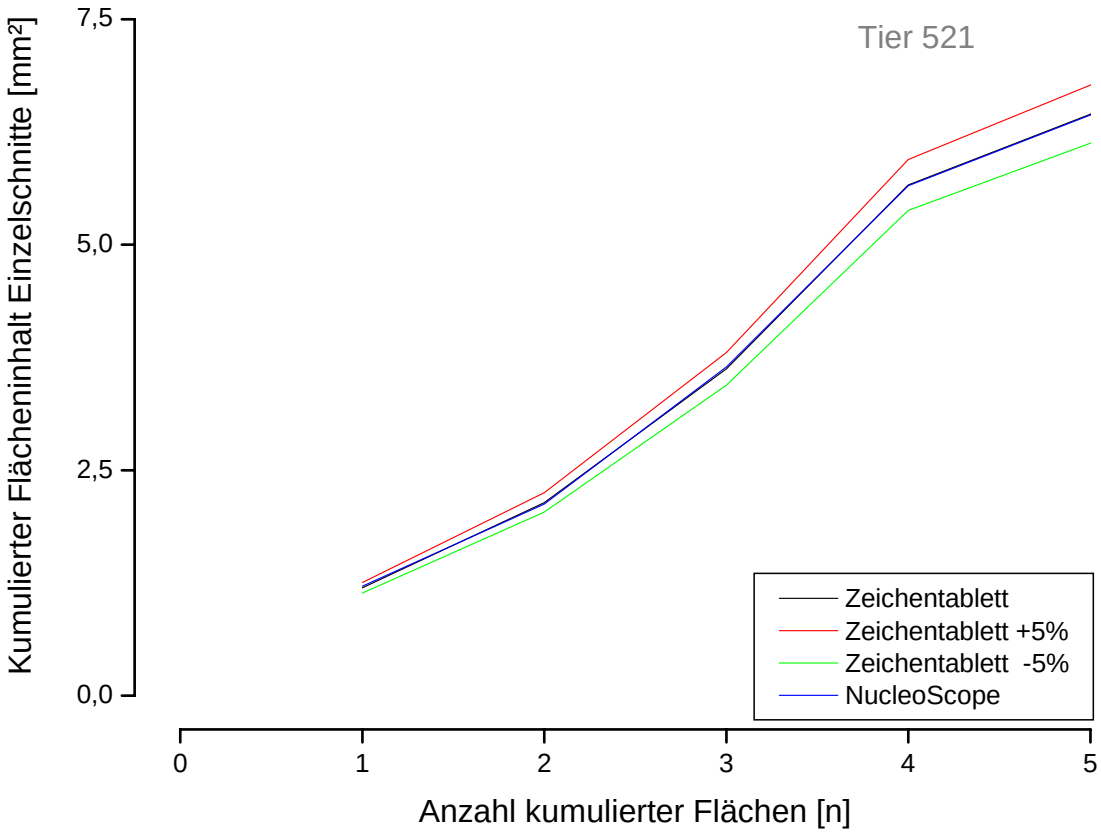


Wie im Übersichtsdiagramm aller Einzelschichten (Abbildung 23) ist auch auf der Ebene der Einzelschichten sowohl von Tier 525, als auch aller anderen Tiere (siehe Anhang) keine auffällige Abweichung der Messwerte von der line of equality feststellbar.

3.1.3.4 Grafische Darstellung der kumulierten Flächeninhalte mit Vertrauensbereich

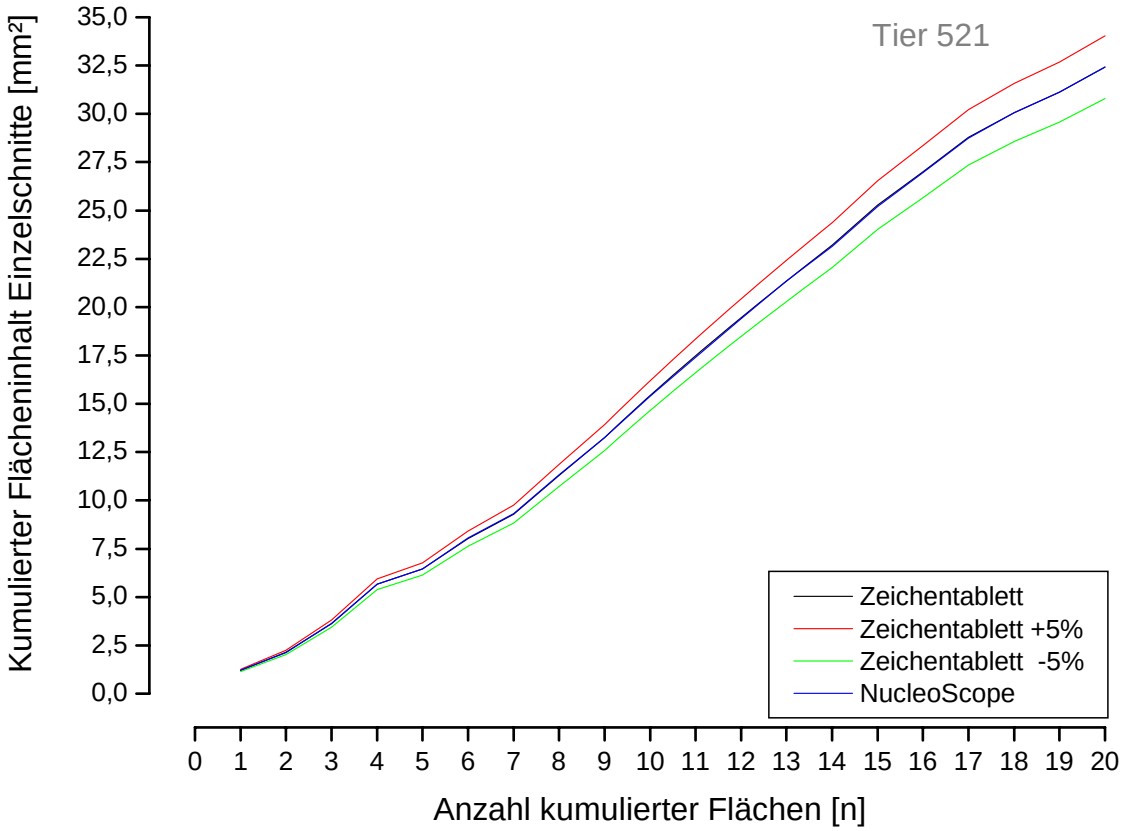
Wie in Kapitel 2.8.2 erläutert, sollte auch für die Aufsummierung der mit NucleoScope gemessenen Flächeninhalte [mm²] ein stetiger Verlauf innerhalb des Vertrauensintervalls von ± 5% vom Referenzwert (Zeichentablett) für eine hinreichende Übereinstimmung der Methoden vorausgesetzt werden. Abbildungen 24 und 25 stellen diesen Verlauf für Tier 521 in zweigeteilter Form dar: Abbildung 24 bis zu einer kumulierten Flächen-Anzahl von n=5, um den initialen Verlauf grafisch besser dokumentieren zu können, und Abbildung 25 in der Übersicht für alle Flächen (n=20). Die für Tier 525 ebenfalls erstellte Abbildung ist dem Anhang beigefügt.

Abbildung 24: Kumulierte Flächen (Tier 521) bis n=5



Im Diagramm zeigt sich, dass für die ersten fünf gezeichneten Einzelschnitte bei Tier 521 die kumulierten, mit IO-Pen und NucleoScope ermittelten Flächeninhalte stets innerhalb des Vertrauensintervalls verlaufen. Der zusätzlich abgebildete Kurven-Verlauf der mittels Zeichentablett ermittelten Werte wird aufgrund der farblichen Überlagerung nicht separat ersichtlich.

Abbildung 25: Übersicht aller kumulierten Flächen (Tier 521)



Auch in der Übersicht aller kumulierten Flächen zeigt sich ein zum Anfangsteil der Kurve analoger Verlauf. Die mit NucleoScope bestimmten Flächeninhalte liegen für den gesamten Verlauf der Kurve innerhalb der Intervall-Grenzen des definierten Vertrauensbereiches.

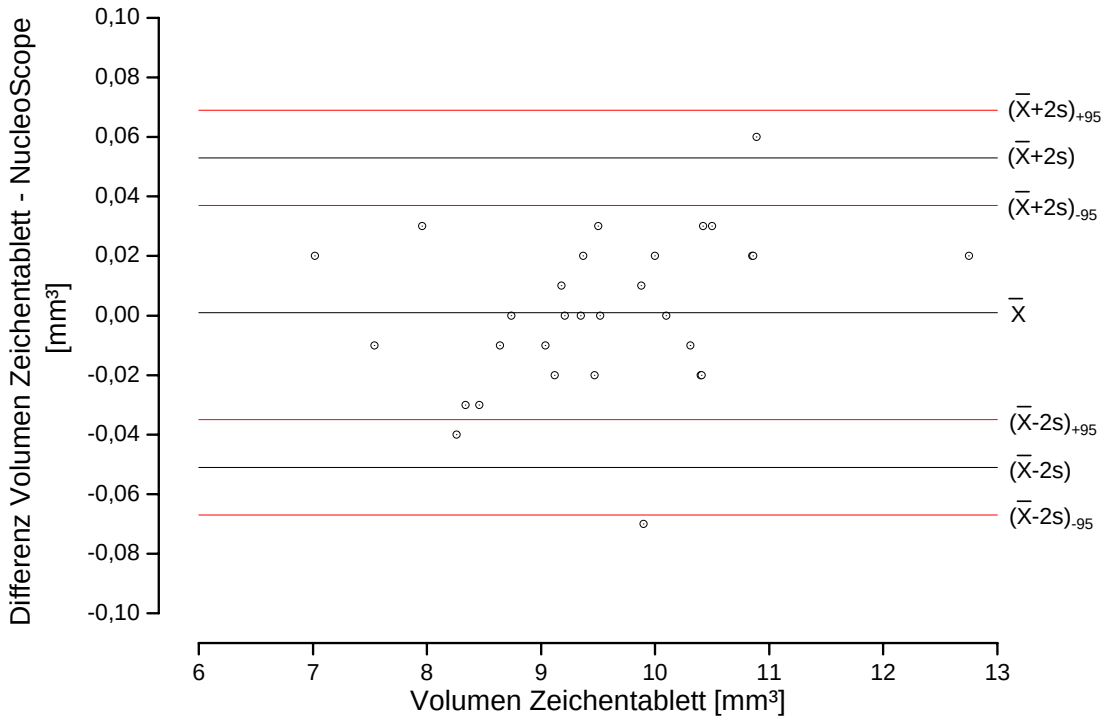
3.1.3.5 Bland-Altman-plot

Die Erstellung des Bland-Altman-plots erfordert auf Basis der mit beiden Methoden erhobenen Volumen-Messwerte die Berechnung der in Kapitel 2.8.1 dargestellten Größen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Der Mittelwert ($\bar{x}$) der Differenzen beträgt $\bar{x}$ =0,001 mm³. Ihre Standardabweichung (s) beträgt s=0,026 mm³, der Wert für $\bar{x}$ + 2s = 0,053 mm³ und $\bar{x}$ - 2s = (-0,051) mm³.

Die korrespondierenden Konfidenzintervalle lauten $(\bar{x} + 2s)_{+95}$ = 0,069 mm³, $(\bar{x} + 2s)_{-95}$ = 0,037 mm³, $(\bar{x} - 2s)_{+95}$ = (-0,035) mm³ und $(\bar{x} - 2s)_{-95}$ = (-0,067) mm³. Abbildung 26 stellt den Bland-Altman-plot dar.

Abbildung 26: Bland-Altman-plot

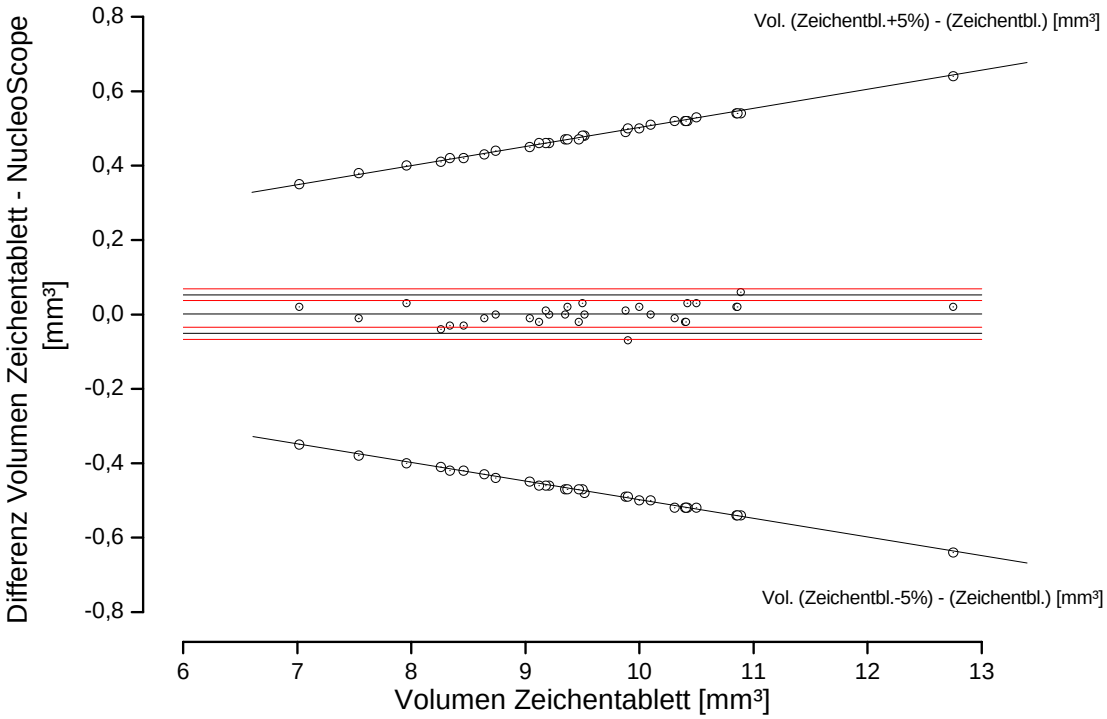


Im Intervall $\bar{x} \pm 2s$ liegen erwartungsgemäß die meisten Differenzen. Als limits of agreement ergeben sich die Grenzen von +2s = 0,053 mm³ und -2s = (- 0,051) mm³. Es ist davon auszugehen, dass die Differenzen in der untersuchten Population der Normalverteilung unterliegen, so dass 95% der mit IO-Pen und NucleoScope ermittelten Volumina auf Basis der limits of agreement weniger als 1% vom korrespondierenden Referenzwert abweichen. Diese Schlussfolgerung gilt für die Gesamtheit des untersuchten Kollektivs.

Für eine Verallgemeinerung der vorliegenden Daten wurden die Konfidenzintervalle der 2-fachen Standardabweichung (rot dargestellt) ebenfalls eingezeichnet. Auch für die äußeren Grenzen der Konfidenzintervalle (limits of agreement der Verallgemeinerung) von $(\bar{x} + 2s)_{+95}$ = 0,069 mm³ und $(\bar{x} - 2s)_{-95}$ = (-0,067) mm³ gilt, dass 95% der mit IO-Pen und NucleoScope ermittelten Volumina bis zu einer minimalen Volumengröße von 7 mm³ weniger als ein 1% vom Referenzwert differieren. In diesem Sinne ist auch der in Abbildung 26 ersichtliche Messwert zu interpretieren, welcher außerhalb der Grenze des $(\bar{x} - 2s)_{-95}$ Intervalls liegt. Er zeigt für diese Einzelmessung eine Differenz von 1,04% zur Referenz. Da es sich aber nur um einen von insgesamt 30 Messwerten handelt, verstößt er nicht gegen das beschriebene 95% - Kriterium, und liegt deutlich innerhalb des definierten Vertrauensbereiches von 5%.

In Abbildung 27 ist zusätzlich der Vertrauensbereich von ± 5% der mittels Zeichentablett ermittelten Referenz-Volumina eingezeichnet. Zur besseren Übersicht wurde jeweils eine Ausgleichsgerade durch die oberen (+5%) und unteren (-5%) Intervallgrenzen gezeichnet.

Abbildung 27: Bland-Altman-plot mit Vertrauensbereich



Die limits of agreement der äußeren Grenzen der Konfidenzintervalle bleiben deutlich innerhalb des gewählten Vertrauensbereiches von 5%. Dabei nähern sie sich für kleine Volumina den Grenzen des definierten 5% - Vertrauensbereiches an. Daraus folgt eine minimal bestimmbare Volumengröße, die der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% für die limits of agreement genügt.

3.2 Effekt des Kalibrierungsfehlers

Wie in Kapitel 2.7.4.2 beschrieben, wurde der Effekt einer fehlerhaften Kalibrierung in Fovea Pro 3.0 auf die Berechnung der Volumina exemplarisch für Tier 500 untersucht. Das mit NucleoScope initial ermittelte Gesamtvolumen der Nuclei rotundi betrug 10,83 mm³ (siehe Tabelle 4). In der Betrachtung des Kalibrierungsfehlers wird dieses Volumen als Referenzvolumen definiert.

Unter der Annahme, dass mit den Cursor-Kreuzen zumindest die Markierungen der Kalibrierungsstrecke randständig getroffen werden, ergibt sich bei einem mittleren Durchmesser der Strichdicke des IO-Pen von 4 Pixeln (bei 300 dpi im Format jpeg) eine maximale Abweichung zum Strich-Rand von 2 Pixeln in beide Richtungen.

Der Fehler kann an beiden Enden der Kalibrierungsstrecke auftreten, so dass sich als Schwankungsbreite ± 4 Pixel ergeben. Tabelle 5 stellt die Ergebnisse der über die Schwankungsbreite ermittelten Volumina dar, inklusive der prozentualen Abweichung vom Referenzvolumen.

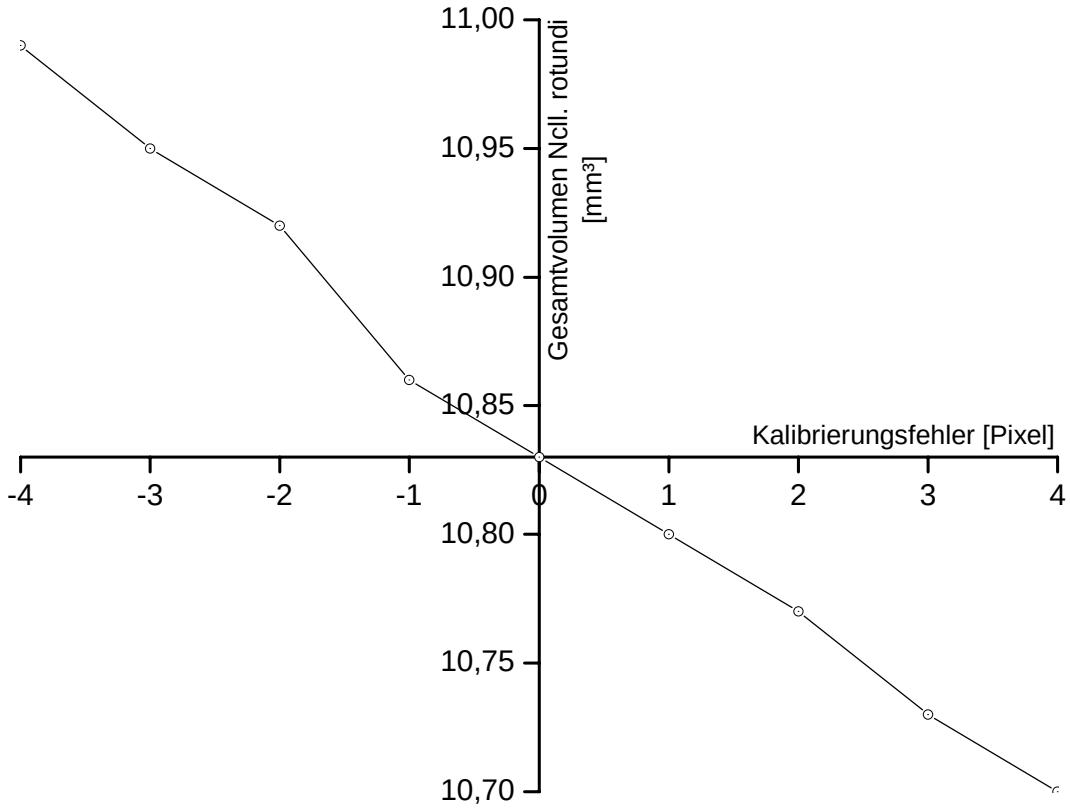
Tabelle 5: Ergebnisse der Kern-Volumina (Tier 500) für die gesamte Schwankungsbreite der Kalibrierung

Ergebnisse der Kern-Volumina bei Tier 500 für die Schwankungsbreite der Kalibrierung		
Kalibrierungsabweichung [Pixel]	**Volumen [mm³]**	**Abweichung von Referenz [%]**
-4	10,99	1,48
-3	10,95	1,11
-2	10,92	0,83
-1	10,86	0,28
0 (Referenz)	10,83	0,00
1	10,80	-0,28
2	10,77	-0,55
3	10,73	-0,92
4	10,70	-1,20

Der resultierende Volumenfehler nimmt mit der Höhe der Kalibrierungsabweichung zu. Eine zu kleine Markierung bedingt zu große Kern-Volumina und umgekehrt. Für die eingangs formulierte Annahme der Schwankungsbreite ergeben sich maximale Abweichungen von 1,48%, respektive -1,2%.

Abbildung 28 verdeutlicht den Effekt. Dabei ist auf der Abszisse die Abweichung [Pixel] gegen das resultierende Gesamtvolumen [mm³] der Nuclei rotundi für Tier 500 aufgetragen.

Abbildung 28: Gesamtvolumen (Tier 500) in Abhängigkeit von der Schwankunksbreite des Kalibrierungsfehlers



3.3 Optimierung des Schließungs-Algorithmus

Im unbearbeiteten Rohzustand wiesen die 30 Bilder mit insgesamt 740 Umfahrungen insgesamt 29 Lücken auf. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Anzahl (n) der initial offenen Umfahrungen pro Tier.

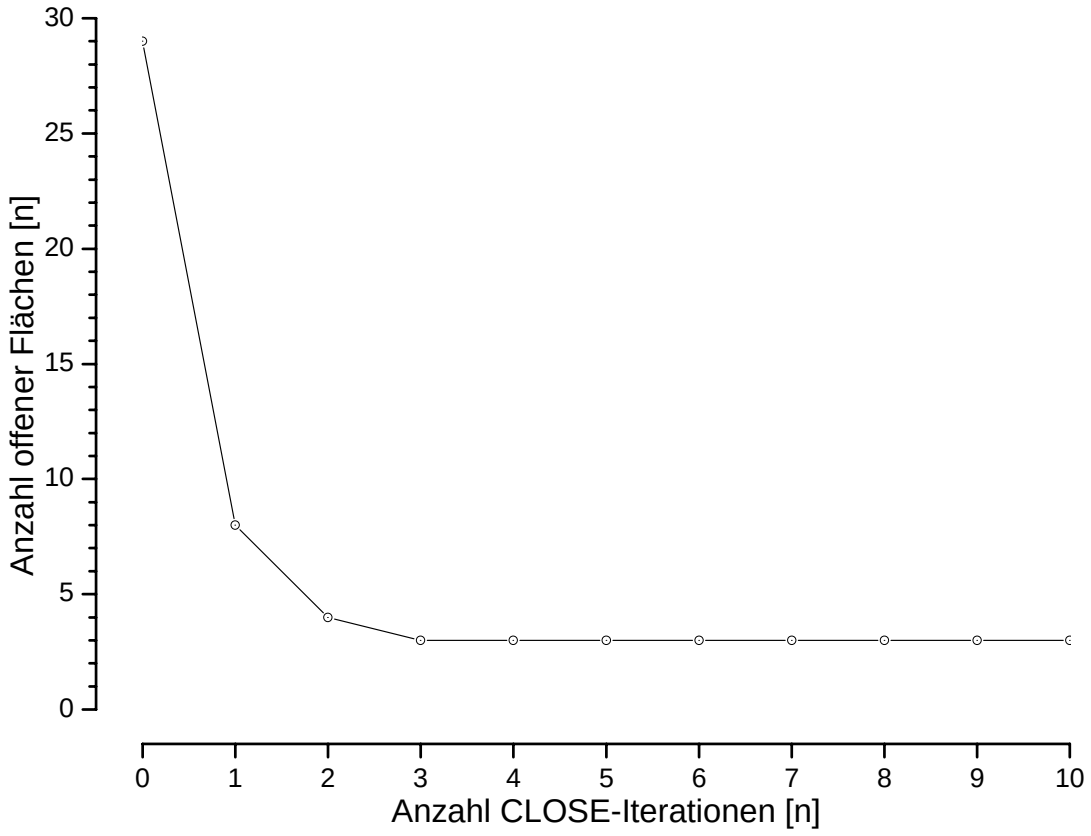
Tabelle 6: Anzahl der offenen Umfahrungen pro Tier

Anzahl der offenen Umfahrungen pro Tier	
Sammlungsnummer	**Anzahl [n]**
497	1
498	1
499	1
500	0
501	0
502	1
503	0
504	0
505	0
506	0
518	0
519	1
520	2
521	1
522	2
523	2
524	4
525	1
526	2
527	4
683	0
684	2
685	1
686	0
687	0
705	0
706	2
707	0
708	0
709	1

3.3.1 Anzahl der Iterationen der morphologischen Schließung

Eine variable Anzahl an Wiederholungen der morphologischen Schließung führte konsekutiv zu einer unterschiedlichen Anzahl geschlossener Umfahrungen. Für eine Anzahl [n] von 1 – 10 Iterationen wurde der Effekt der morphologischen Schließung auf die Anzahl [n] der initial offen gebliebenen Umfahrungen untersucht. Abbildung 29 zeigt die Resultate.

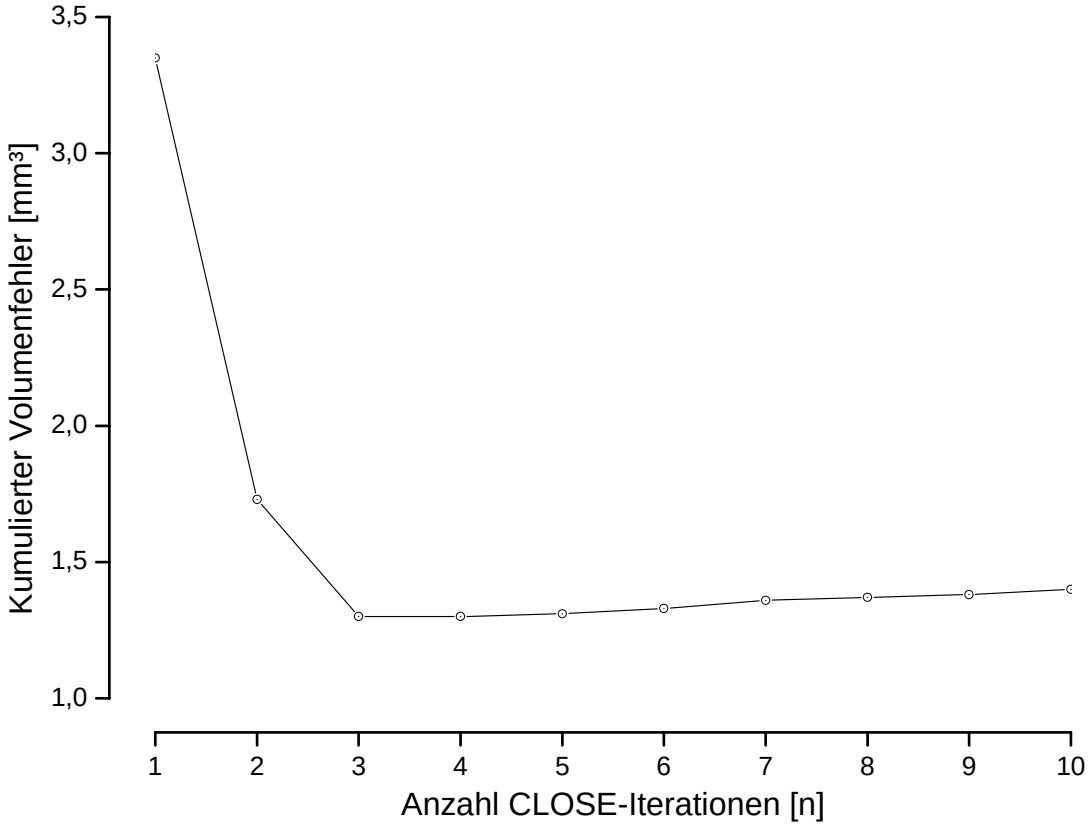
Abbildung 29: Anzahl offener Umfahrungen in Abhängigkeit von der Anzahl der Close-Iterationen



Wie aus der Abbildung 29 ersichtlich, sinkt die Anzahl der offenen Flächen bereits durch die Applikation einer einmaligen morphologischen Schließung auf n=8. Bei einer Anzahl von 3 Iterationen verbleiben noch 3 offene Umfahrungen, welche auch durch Applikation von bis zu 10 seriellen Schließungen unverändert offen blieben. Eine genaue Betrachtung der Bilder offenbarte eine Stufen-Bildung (siehe Kapitel 2.7.5.2) bei den betroffenen Umfahrungen, welche somit durch den Operator der morphologischen Schließung allein nicht korrigierbar war.

Desweiteren wurde der Effekt der wiederholten Iterationen auf das Kern-Volumen untersucht. Abbildung 30 fasst die Ergebnisse grafisch zusammen. Dabei wurde die Anzahl [n] der Iterationen gegen den nach Applikation der Schließungen resultierenden, kumulierten Betrag des Volumenfehlers [mm³] aufgetragen.

Abbildung 30: Betrag kumulierter Volumenfehler in Abhängigkeit von der Anzahl der Close-Iterationen



Dabei zeigte sich, dass der initial hohe Betrag des Fehlers durch die offenen und dadurch nicht in die Volumenkalkulation eingegangenen Flächen bedingt war. Die Anzahl von n=3 und n=4 Iterationen resultierte im minimalen Volumenfehler. Ab einer Anzahl von n=5 stieg der Betrag des kumulierten Volumenfehlers wieder an. Da – wie aus der vorherigen Abbildung 29 ersichtlich – die Anzahl an offenen Flächen nicht weiter absank, resultierte der Fehler aus den durch die Anzahl der Iterationen zusätzlich ins Bild eingefügten Pixel.
Eine morphologische Schließung mit einer Anzahl von n=3 Iterationen hatte den maximalen Effekt auf die Anzahl der zusätzlich geschlossenen Umfahrungen bei einem minimalen kumulierten Volumenfehler und wurde in den Algorithmus implementiert.

3.3.2 Effekt des automatisierten Schließungs-Algorithmus auf die Kernvolumina

Der automatisierte Schließungsalgorithmus (siehe Kapitel 2.7.5.3) bestand aus der Applikation der morphologischen Operatoren DILATE Depth 1, CLOSE Depth 3, der Füllung der Binnenflächen und ERODE Depth 1. Dieser Algorithmus vermochte alle offenen Umfahrungen zu schließen, inklusive derjenigen mit Stufen-Bildung. Der Effekt dieses Algorithmus auf das resultierende Kern-Volumen wurde für alle Tiere überprüft. Als Referenz galt dabei das Volumen, welches sich ohne diesen Algorithmus nach manueller Schließung der Umfahrungen ergeben hatte. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Resultate.

Tabelle 7: Einfluss des automatisierten Schließungsalgorithmus auf das Kernvolumen im Vergleich zur Referenz

Einfluss des automatisierten Schließungsalgorithmus auf das Kernvolumen im Vergleich zur Referenz			
Sammlungsnummer	**Referenz-Volumen [mm³] (manuelle Schließung)**	**Volumen automatisierter Schließungsalgorithmus [mm³]**	**Abweichung zu Referenz [%]**
497	10,42	10,42	0,00
498	10,47	10,47	0,00
499	10,39	10,39	0,00
500	10,83	10,83	0,00
501	10,83	10,83	0,00
502	8,74	8,74	0,00
503	10,32	10,32	0,00
504	10,43	10,43	0,00
505	9,87	9,88	0,10
506	10,84	10,84	0,00
518	9,97	9,98	0,10
519	9,35	9,35	0,00
520	9,98	9,99	0,10
521	9,21	9,21	0,00
522	9,52	9,53	0,11
523	10,10	10,11	0,10
524	12,73	12,75	0,16
525	7,00	7,00	0,00
526	8,30	8,30	0,00
527	9,17	9,17	0,00
683	9,05	9,05	0,00
684	8,49	8,50	0,12
685	7,93	7,93	0,00
686	9,14	9,14	0,00
687	9,47	9,47	0,00
705	9,35	9,35	0,00
706	9,49	9,49	0,00
707	8,65	8,65	0,00
708	8,37	8,37	0,00
709	7,55	7,55	0,00

Wie in der Tabelle 7 ersichtlich, beeinflusste der automatisierte Schließungsalgorithmus in 7 von 30 Fällen das resultierende Volumen in Relation zur Referenz. Alle 7 Volumina zeigten dabei eine Abweichung nach oben. Die minimale Abweichung betrug dabei 0,1%, die maximale Abweichung 0,16%, bei einer mittleren Abweichung von 0,026%, bezogen auf alle 30 ermittelten Volumina.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der Ergebnisse beider Methoden

Für die Erfüllung der Zielsetzung dieser Arbeit war es notwendig zu zeigen, dass beide Methoden gleichwertige Resultate liefern. Dabei war der neue Algorithmus am etablierten Verfahren zu messen, ohne zunächst einmal weitere methodische Vor- oder Nachteile zu berücksichtigen. So wurde zunächst das Volumen der Kerne mittels Zeichentablett bestimmt und – wie von Hennig (1960) gefordert – einer Kontrollmessung unterzogen. Hennig (1960) hatte in seiner Arbeit die selbe Struktur mehrfach vermessen, um zu prüfen, ob durch die wiederholten Umfahrungen am Planimetriertablett mit konsekutiver Berechnung eines Mittelwertes die Präzision der Messung erhöht werden kann. Dabei zeigte sich, dass der maximale Fehler ± 1% vom mittleren Wert nicht überschritt, und somit dieses Resultat den zusätzlich erforderlichen Zeitaufwand nicht rechtfertigte. Durch die Kontrollmessung für die mittels Zeichentablett ermittelten Volumina (siehe Kapitel 3.1.1, Tabelle 3) konnten Hennigs (1960) Ergebnisse bestätigt werden: Die maximale Abweichung betrug 0,31%, so dass durch die Kontrollmessung die erste Messreihe reproduzierbar bestätigt werden konnte. Somit war die Voraussetzung gegeben, die erste Messreihe als Referenz für den Vergleich mit dem neuen Algorithmus definieren zu können.

In der anschließenden grafischen Gegenüberstellung der Messwerte beider Methoden (siehe Abbildungen 21, 22 und 23) zeigte sich sowohl für die Volumina als auch für ihre individuellen Einzelflächen keine auffällige Abweichung von der line of equality. Die daraus implizit und über den gesamten Größenbereich ersichtliche, gute methodische Übereinstimmung bestätigte sich anschließend ebenfalls in der Darstellung der kumulierten Flächeninhalte (siehe Abbildungen 24 und 25). Über alle kumulierten Einzelflächen der Tiere 521 (niedrigster Korrelationskoeffizient) und 525 (höchster Korrelationskoeffizient) wurde ersichtlich, dass die mit dem Logitech IO-Pen und NucleoScope ermittelten Einzelflächen eng mit der Referenz übereinstimmen und stets innerhalb der Intervall-Grenzen der Referenz

liegen. Somit konnte demonstriert werden, dass die resultierenden Volumina nicht zufällig mit der Referenz übereinstimmen, z.B. aufgrund der Möglichkeit, dass sich falsch zu hohe und falsch zu niedrige Einzelflächen-Messungen in der Summe zum korrekten Volumen ausgleichen könnten.

In der abschließend durchgeführten statistischen Analyse nach Bland und Altman (1986) wurden die limits of agreement für das untersuchte Kollektiv ermittelt (siehe Kapitel 3.1.3.5).

Es zeigte sich, dass 95% der mit IO-Pen und NucleoScope ermittelten Volumina weniger als 1% vom korrespondierenden Referenzwert abweichen. Somit wurde in einem ersten Schritt gezeigt, dass für die Bestimmung des Kern-Volumens der 30 untersuchten Tiere beide Methoden gleichwertig eingesetzt werden können, da die limits of agreement eine in der Praxis unbedeutende maximale Schwankungsbreite der Methoden aufweisen, welche weit unterhalb des definierten Vertrauensintervalls von ± 5% liegt.

Im zweiten Schritt wurden die Konfidenzintervalle der 2-fachen Standardabweichung ermittelt, um die Gleichwertigkeit beider Methoden verallgemeinern zu können (siehe Kapitel 2.8.1 und 3.1.3.5). Die limits of agreement der Verallgemeinerung erlauben die Schlussfolgerung, dass bis zu einem minimalen Kernvolumen von 7 mm³ 95% der mittels der neuen Methode ermittelten Volumina weniger als 1% vom Referenzwert differieren. Auch unterhalb von 7 mm³ liegen 95% aller Volumina deutlich innerhalb des 5%-igen Vertrauensintervalls. Abbildung 27 verdeutlicht dabei, dass in der Projektion des oberen und unteren Vertrauensintervalls – dargestellt durch eine Ausgleichsgerade durch die vorhandenen Punkte – die Grenzen des Vertrauensintervalls für besonders kleine Volumina an die Grenzen der Konfidenzintervalle stoßen. Dies bedeutet für die Praxis, dass nicht beliebig kleine Volumen / Flächen mit hinreichender Übereinstimmung bzw. Reproduzierbarkeit gemessen werden können. Diese Grenzen sind jedoch rein technischer Natur und nicht auf den Logitech IO-Pen beschränkt, sondern gelten ebenfalls für das Zeichentablett mit dem Handdigitizer. Bis zu einer gewissen Grenze (Auflösung des Mikroskops) kann man diesem Umstand durch das Wählen einer geeigneteren Vergrößerung begegnen.

Somit konnte gezeigt werden, dass der neue Algorithmus mittels IO-Pen und NucleoScope hinsichtlich der Güte seiner Ergebnisse gleichwertig mit der Referenzmethode ist und diese zu ersetzen vermag.

4.2 Methodische und technische Vorteile des neuen Algorithmus

Der im Hinblick auf den notwendigen Zeitaufwand kritische Schritt bei der Erhebung morphometrischer Parameter ist bei der Referenzmethode mittels Zeichentablett die unvermeidbare zweite Umfahrung für die Digitalisierung der Kernschnittebenen. Sie bedingt, dass sich der Zeitaufwand der Methode insgesamt verdoppelt (siehe Kapitel 1.3).
Ein Wegfall dieses Schrittes – wie im neuen Algorithmus realisiert – bedeutet in der Praxis eine erhebliche Erleichterung für den Untersucher. Der halbierte Zeitaufwand steigert die Effizienz deutlich, so dass durch diesen Vorteil allein im gleichen Zeitraum die doppelte Datenmenge bewältigt werden kann.
Ein weiterer bedeutender Vorteil, der sich durch den Wegfall dieses Schrittes im Algorithmus von NucleoScope ergibt, ist die Vermeidung einer zusätzlichen methodischen Fehlerquelle. Der Umstand, dass man bei der Referenzmethode die mit Bleistift vormarkierten Grenzen mit dem Handdigitizer nachfährt, hat zur Folge, dass eine visuelle Kontrolle durch die bei der Erstumfahrung vorhandene anatomische Struktur fehlt. So zeigte sich in der Praxis wiederholt, dass dadurch die Gefahr, Flächen vorschnell zu schließen und somit zu verfälschen, steigt. Es obliegt bei der Referenzmethode allein der Aufmerksamkeit des Untersuchers solche Fehler zu vermeiden (Hennig, 1960). Da bei der hier vorgestellten Methode mittels NucleoScope eine nachträgliche Digitalisierung nicht erforderlich ist, sondern stets am Mikroskop direkt mit Blick auf die anatomische Struktur umfahren wird, ist diese Vorgehensweise der Referenzmethode überlegen; eine zusätzliche methodische, Untersucher-abhängige Fehlerquelle wird somit ausgeschaltet.
Ein weiterer entscheidender, technischer Vorteil der neuen Methode ist die direkte Berechnung der Volumina aus den erfassten Kernschnittebenen und ihre Einbindung in eine Datenbank. So spart der Wegfall der manuellen Berechnung der Volumina zusätzlich Zeit ein und verhindert Berechnungsfehler, die durch falsches Abtippen von Flächeninhalten entstehen können. Die Speicherung der Daten in einer Datenbank erlaubt ihre mannigfaltige Portierung auf alle gängigen elektronischen Medien und die rasche Auswertung der erhobenen Daten in Statistik-Programmen. Somit trägt auch dieser Umstand dazu bei, die Effizienz der neuen gegenüber der etablierten Methode weiter zu steigern.
Alle technisch-methodischen Vorteile der neuen Methode ermöglichen – basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen – eine Reduktion des gesamten Zeitaufwandes auf ca. ein Drittel der mit der Referenzmethode benötigten Zeit (siehe Beispiel Kapitel 1.3) bei zusätzlichem Ausschluss zweier methodischer Fehlerquellen.

4.3 Methodische und technische Nachteile des neuen Algorithmus

Als Nachteil gegenüber der Referenzmethode stellte sich die ursprünglich im Zusatzmodul Fovea Pro 3.0 vorgesehene Art der Kalibrierung an einer Strecke heraus. Insbesondere das in Kapitel 2.7.4.1 beschriebene, zu kleine Vorschaufenster des Kalibrierungsmoduls erwies sich in der Praxis als untauglich, da ein präzises Setzen der Kalibrierungskreuze nicht möglich war. Dass der Effekt einer unpräzisen Kalibrierung in nicht zu unterschätzendem Maß Einfluss auf die berechneten Volumina nimmt, konnte in Kapitel 3.2 gezeigt werden. Die exemplarisch für Tier 500 durchgeführte Analyse der Abhängigkeit des Kernvolumens von der Präzision der Kalibrierung offenbarte einen maximalen Fehler von bis zu 1,48%, unter der Voraussetzung, dass im kleinen Vorschaufenster die Markierungen der Kalibrierungsstrecke (siehe Abbildung 16) sichtbar getroffen wurden. Der so zusätzlich mögliche Fehler übertrifft somit den durch die zweite Umfahrung am Zeichentablett möglichen Fehler von bis zu 1%.
Dieses Problem wurde konsequent gelöst durch Entwicklung und Implementierung einer technisch präzisen Möglichkeit der Kalibrierung, welche in Kapitel 2.7.4.2 dargestellt wird, so dass dieser initial vorhandene methodische Nachteil ausgeschlossen werden konnte.
Ein anderer potentieller Nachteil der Verwendung des IO-Pen ist seine Abhängigkeit von Spezialpapier mit Anoto-Funktionalität, wobei dessen Verfügbarkeit zur Zeit problemlos ist. Eine Verschlechterung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch nicht zu erwarten, da zahlreiche Firmen wie Hewlett-Packard, Nokia und Maxell ebenfalls digitale Stifte mit Anoto-Funktionalität anbieten und die Anwendungsmöglichkeiten beständig zunehmen.

4.4 Vorteile und Möglichkeiten der Software NucleoScope

Die Implementierung des entwickelten Algorithmus in eine Softwareumgebung hat neben einer Steigerung des Komforts für den Anwender eine Reihe weiterer Vorteile. Der Umfang der Software beträgt nur wenige Megabyte. NucleoScope ist zukunftsfähig durch die Möglichkeit, Änderungen und zusätzliche Features bei Bedarf zu programmieren. Es kann grundsätzlich auch im Netzwerkbetrieb eingesetzt werden.

Der bedeutendste Vorteil gegenüber der Referenzmethode ist jedoch die mögliche Vollautomatisierung des Analyseprozesses ab dem Zeitpunkt der Ablage des Stiftes in seine Station mit Transfer der Bilder in den vorgegebenen Zielordner (siehe Kapitel 2.7.1.2). NucleoScope kann so vorkonfiguriert werden (siehe Kapitel 2.7.2.4 und 2.7.2.5), dass selbst umfangreiche Strukturen, deren Kernschnittebenen über mehrere Blätter gehen, ohne weitere Interaktion durch den Untersucher korrekt berechnet und in die Datenbank eingefügt werden. Im Verbund mit der Möglichkeit der Angabe eines Multiplikationsfaktors (siehe Kapitel 2.7.2.4) kann der Untersucher mit Hilfe der Software den notwendigen Zeitaufwand noch weiter reduzieren.

Die vollautomatisierte Analyse wurde erst durch die Entwicklung des automatisierten Schließungsalgorithmus möglich (siehe Kapitel 2.7.5). Der dadurch bedingte Einfluss auf das berechnete Volumen wurde untersucht und anschließend auf ein Minimum hin optimiert (siehe Kapitel 3.3). Die dabei ermittelte mittlere Abweichung vom Referenzwert der manuell geschlossenen Umfahrungen von 0,026% bei einer maximalen Abweichung von 0,16% im untersuchten Kollektiv ist methodisch vernachlässigbar und erlaubt die uneingeschränkte Nutzung der vollautomatisierten morphometrischen Analyse. Der Untersucher kann sich während des Ablaufs der Berechnungen anderen Aufgaben widmen, wie z.B. der Fortsetzung der Arbeit am Mikroskop.
Die Implementierung des neuen Algorithmus in eine Softwareumgebung führte im Sinne der Zielsetzung der Arbeit zu einer weiteren Reduzierung des Zeitaufwandes, einer Maximierung der Effizienz und einer Entlastung des Untersuchers.

4.5 Hardware-Anforderungen und Kosten der Methode mit IO-Pen und NucleoScope

Das komplette System, um mit der beschriebenen Methode morphometrische Daten erfassen und auswerten zu können, besteht zusammengefasst aus folgenden Komponenten:
1) Logitech IO-Pen
2) Papier mit Anoto-Funktionalität
3) Adobe Photoshop CS
4) ReindeerGraphics Fovea Pro 3.0
5) NucleoScope

Die Hardware-Anforderungen des Gesamtsystems werden von jedem zur Zeit handelsüblichen PC-System, wie es auch große Handelsketten offerieren, erfüllt.
Die Kosten für die einzelnen Komponenten des Systems belaufen sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand: Januar 2006) auf ca. 150 € für einen Logitech IO-Pen, ca. 160 € für eine Universitätslizenz von Adobe Photoshop CS und ca. 650 € für Fovea Pro 3.0. Die Gesamtkosten betragen rund 960 €. Die Verwendung des Spezialpapiers mit Anoto-Funktionalität verursacht Kosten von ca. 0,08 € pro Blatt.

4.6 Vergleich mit alternativen Methoden

Alternativen zur vorgestellten Methode unterscheiden sich in einem wichtigen, grundsätzlichen Punkt. Sie alle setzen die Existenz eines Bildes der Kernschnittebene voraus, welches einer digitalen Bildquelle entstammen muss. Als Quelle kommen dabei Scanner, digitale Kameras und digitale Fotokameras in Frage. Insbesondere die Hersteller digitaler Mikroskope (Zeiss, Nikon, Olympus etc.) bieten in diesem Zusammenhang Softwarepakete an (z.B. Zeiss Axiovision, ca. 2000 €), welche die digitalen Bilder unabhängig von der Quelle analysieren können. Wichtig ist zu betonen, dass insbesondere die häufig genutzte Kombination dieser Software mit einer Kamera mit Live-Bild dem Nutzer die Messung einer Struktur in diesem Live-Bild technisch nicht ermöglicht (Jähne, 2002). Die initiale Aufnahme eines Standbildes ist auch bei diesen Systemen zwingende Voraussetzung einer anschließenden Messung. In der Praxis bedeutet dies, dass zunächst Bilder aller zu messenden Kernschnittebenen zu erstellen sind, so dass der dazu notwendige Zeitaufwand berücksichtigt werden muss. Ferner müssen diese Bilder gespeichert werden. Der erforderliche Speicherplatz läge – in Abhängigkeit von der Bildqualität – für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kernschnittebenen bereits in der Größenordnung von mehreren Gigabyte und übertrifft somit den Speicherbedarf von NucleoScope um mehr als das 100-fache. Für den Fall, dass der Untersucher die Bilder nicht auch für andere Zwecke benötigt, sondern nur die morphometrischen Daten gewinnen möchte, ist der zusätzliche Arbeits- und Zeitaufwand für die Erstellung der digitalen Aufnahmen ein deutlicher Nachteil gegenüber der vorgestellten Methode. Dies gilt für alle digitalen Bildquellen, seien es Kameras, Fotokameras oder Scanner.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt besteht keine Möglichkeit, einen Hirnkern oder eine andere anatomische Struktur automatisch erkennen zu lassen (siehe Kap. 1.3). So ist auch bei den digitalen Mikroskopen nach der beschriebenen Bildaufnahme die manuelle Struktur-Identifikation absolut notwendig. Die Umfahrung erfolgt auf dem Monitor in der Regel mit Hilfe der Maus. Sowohl die Maus, als auch alternativ eingesetzte Touch-Screen-Monitore sind als Instrumente der Umfahrung unpräzise und umständlich (Russ, 2002). Besserung in der Präzision verspricht allenfalls die Möglichkeit der Nutzung eines Hybriden aus TFT-Flachbildschirm und Zeichentablett, sogenannte Pen-Displays, wie sie die Firma Wacom als Neuheit mit der „Cintiq"-Reihe seit kurzem anbietet. Auf Anfrage konnte aber z.B. die Firma Zeiss keine Angaben zur Kompatibilität dieses Gerätes mit ihrer Software AxioVision machen, es lägen keinerlei Erfahrungen zum Anschluss eines solchen Gerätes an ein Digital-Mikroskop vor. Neben der fraglichen Kompatibilität müssen auch die Kosten dieses Gerätes von ca. 3000 € berücksichtigt werden.

Ein weiterer wichtiger Vorteil der vorgestellten Methode ist die beschriebene Nutzer-unabhängige Option der Vollautomatisierung sowie die Anbindung an eine Datenbank. Eine Vollautomatisierung der Analyse der Umfahrungen wird von den Firmen für ihre Software nicht angeboten, es besteht z.B. bei der Software AxioVision lediglich die Möglichkeit, über den Kauf zusätzlicher Module die Programmierfähigkeit nachzurüsten. Diese Programmierung müsste dann erst durch den Nutzer erfolgen. Auch hier fallen zusätzliche Kosten im Bereich von ca. 6000 - 7000 € (Module AxioVision „Commander", „AutMess Plus" und „VBA") an. Ferner wird die Anbindung an eine Datenbank nicht geboten, es besteht lediglich die Möglichkeit, die gemessenen Daten der Einzelflächen in gängigen Formaten zu exportieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bestehenden Alternativen zur morphometrischen Bestimmung von Volumina deutliche Nachteile aufweisen in Bezug auf den Zeitaufwand, den Komfort und die anfallenden Kosten. Lediglich unter der Voraussetzung, dass alle Bilder der zu messenden Kernschnittebenen in digitaler Form benötigt werden, sind sie die bessere Alternative.

Der Verzicht auf die umständliche Erfassung der Kernschnittebenen als digitale Bilder, die Möglichkeit der präzisen Umfahrung mit einem ergonomischen Stift unter Sicht auf das histologische Präparat, die Möglichkeit der Vollautomatisierung und die Anbindung an die Datenbank mit Exportfunktion bei sehr niedrigen Anschaffungskosten sind die bedeutenden Vorteile der in dieser Arbeit vorgestellten Methode. Die geringfügig höheren laufenden Kosten für das Spezialpapier werden durch die Vorteile mehr als aufgewogen. Die Methode mittels IO-Pen und NucleoScope ist gegenwärtig die schnellste und preiswerteste Methode zur Erfassung von Volumina beliebiger anatomischer Strukturen, und bietet zudem den Komfort einer automatisierten Erfassung der Messwerte in einer Datenbank, welche einer schnellen statistischen Auswertung den Weg bahnt.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Gerd Rehkämper möchte ich herzlich für seine engagierte und motivierte Betreuung dieser Arbeit danken. Er verstand es mit seiner geduldigen und humorvollen Art auch in schwierigen Situationen stets neue Wege aufzuzeigen und Freude an der wissenschaftlichen Forschung zu vermitteln. Die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte mir Einblicke in neurobiologische Fragen und Zusammenhänge, die weit über das Thema dieser Arbeit hinausgingen.

Herrn Prof. Dr. G.E.K. Novotny möchte ich für die Übernahme des Korreferates und so manche vergnügsam-lehrreiche Stunde im weiten Feld der Anatomie danken.

Herrn Dr. H. D. Frahm gebührt ein großer Dank für seine stete Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft insbesondere bei akuten Problemen.

Herrn Dr. Christian Werner möchte ich für seine freundschaftliche Verbundenheit danken. Sie war mir in vielen Momenten ein Rückhalt und half mir mit frischen Ideen und neuen Blickwinkeln weiter. Insbesondere seine profunden Kenntnisse in der Welt der Statistik ermöglichten erst eine über den Korrelationskoeffizienten hinaus gehende, produktive Auseinendersetzung mit den gewonnenen Daten.

Ein großes Danke an Frau Claudia Stolze, die mit ihrem Wissen und ihrem Talent exzellente Schnittserien hergestellt hat, welche die Arbeit am Mikroskop deutlich vereinfacht und kurzweilig gemacht haben.

Herrn Dr. Janpeter Nickel danke ich sehr für seine Bereitschaft, diese Arbeit mehrmals Korrektur zu lesen. Seine zahlreichen Anregungen haben diese Arbeit bereichert und wesentlich zur Realisierung dieser Methode beigetragen.

Herrn cand. med. Human Asgarouladi bin ich zu großem Dank verpflichtet für seine wertvollen Ratschläge und profunden Kenntnisse im Bereich der grafischen Darstellung wissenschaftlicher Daten. Seine Expertise hat mich vor zahlreichen Frustrationen bewahrt.

Herrn Fotios Monachelis möchte ich für seine zahlreichen und wertvollen Ratschläge bei der Programmierung der Software danken. Ohne seine umfassenden Kenntnisse in Bezug auf relationale Datenbanken und ihre Anbindung hätte sich dieser Schritt wesentlich schwieriger gestaltet.

Meinem Lehrer Herrn Studienrat Raphael Biere habe ich das Interesse an neurobiologischen und neurologischen Fragestellungen zu verdanken. In seinem Unterricht vermittelte er mit hohem Engagement nicht nur spielerisch wichtige Zusammenhänge, sondern auch die wesentlichen Grundzüge selbständiger wissenschaftlicher Arbeits- und Denkweise.

Meinen Eltern danke ich zutiefst für ihre Liebe und Unterstützung meines Werdeganges, der ohne sie nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank auch an meine wundervolle Frau und unseren kleinen Sohn, die mir mit ihrer Liebe immer Kraft geschenkt haben.

Mein Dank auch an meinen Großvater Anastasios, der – obwohl selbst ein Analphabet – mir in jungen Jahren die fundamentale Bedeutung einer profunden Ausbildung zeigte und mit seinen Erzählungen meine Neugier weckte und meinen Werdegang prägte.

5. Literaturangaben

Anoto SA Sweden (2005), "Anoto Functionality." from http://www.anotofunctionality.com/.

Berman M (2000) Image analysis. Statistics and Computing 10:91-93.

Beverly RB, van Iersel MW (1998) Calibration of a video image analysis system for measurement of stem length, leaf area, and percent ground coverage. Communications in Soil Science and Plant Analysis 29:1071-1081.

Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between 2 methods of clinical measurement. Lancet 1:307-310.

Bland JM, Altman DG (1995) Comparing 2 Methods of Clinical Measurement - a Personal History. International Journal of Epidemiology 24:S7-S14.

Despont-Gros C, Landau R, Rutschmann O, Simon J, Lovis C (2005) The digital pen and paper - Evaluation and acceptance of a new data acquisition device in clinical settings. Methods of Information in Medicine 44:359-368.

Dubbeldam JL (1998) Birds. In: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C. The Central Nervous System of Vertebrates, 3. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag**:**1584

Fatterpekar GM, Naidich TP, Delman BN, Aguinaldo JG, Gultekin SH, Sherwood CC, Hof PR, Drayer BP, Fayad ZA (2002) Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. American Journal of Neuroradiology 23:1313-1321.

Garrett C, Baker HWG (1995) A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. Fertility and Sterility 63:1306-1317.

Gitelman DR, Ashburner J, Friston KJ, Tyler LK, Price CJ (2001) Voxel-Based Morphometry of Herpes Simplex Encephalitis. NeuroImage 13:623.

Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RNA, Friston KJ, Frackowiak RSJ (2001) A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. Neuroimage 14:21-36.

Grassmann HG (1853) Zur Theorie der Farbenmischung. Poggendorffs Annalen der Physik und Chemie 89:69-84.

Gronenberg W, Holldobler B (1999) Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. Journal of Comparative Neurology 412:229-240.

Guo Y, Gong BA, Levesque S, Manfredi T, Sun Y (2004) Automated detection and delineation of mitochondria in electron micrographs of human skeletal muscles. Microscopy Research and Technique 63:133-139.

Hallgren L (2002), Use of digital pen technologies in home healthcare: Scenarios and investigation of the Anoto technology. IMT Department of Biomedical Engineering. Linköping, Linköping University. Master's degree thesis.

Hennig A (1960) Fehler der Volumenbestimmung aus dem Flächeninhalt periodischer Schnitte. Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung 66:513-530.

Hewlett-Packard (2005), "HP Forms Automation System: Success story Hôpitaux de Paris." from http://www.hp.com/go/fas.

Jähne B (2002) Digitale Bildverarbeitung. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Kaeser M (2005), "Scribit - Analoges Medium im digitalen Raum." from http://www.scribit.ch.

Karten HJ, Hodos W (1967) A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon. Baltimore, Johns Hopkins Press.

Lange H, Thörner G (1974), Zur Neuroanatomie und Neuropathologie des Corpus striatum, Globus pallidus und Nucleus subthalamicus beim Menschen. Eine morphometrisch-statistische Strukturanalyse an 13 Normal- und 15 Choreagehirnen. C. und O. Vogt Institut für Hirnforschung., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dissertation.

Masseroli M, O'Valle F, Andujar M, Ramirez C, Gomez-Morales M, Luna JD, Aguilar M, Aguilar D, Rodriguez-Puyol M, Del Moral RG (1998) Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. Laboratory Investigation 78:511-522.

Merker B (1983) Silver staining of cell-bodies by means of physical development. Journal of Neuroscience Methods 9:235-241.

Parker JR (1997) Algorithms for Image Processing and Computer Vision. New York, John Wiley & Sons.

ReindeerGraphics (2005), "Fovea Pro 3.0." from http://www.reindeergraphics.com/foveapro.

Ritter GX, Wilson JN (2001) Handbook of Computer Vision Algorithms in Image Algebra. Boca Raton, CRC Press.

Russ JC (2002) The Image Processing Handbook - 4th Edition. Boca Raton, CRC Press.

Serra J (1982) Image Analysis and Mathematical Morphology. London, Academic Press.

Standardkommission BDRG (1995) Deutscher Rassegeflügel-Standard. Nürnberg, Howa Druck & Satz GmbH für BDRG e.V. .

Stephan H (1960) Methodische Studien über den quantitativen Vergleich architektonischer Struktureinheiten des Gehirns. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 164:143-172.

Stephan H, Baron G, Frahm HD (1988) Comparative Size of Brain and Brain Components. In: Steklis HD, Erwin J. Comparative Primate Biology, 4. Neurosciences New York, Liss, A.R.**:**341-352

Stephan H, Baron G, Frahm HD (1991) Comparative Brain Research in Mammals Volume 1. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Süsstrunk S, Buckley R, Sven S (1999), Standard RGB color spaces. IS&T/SID Seventh Color Imaging Conference: Color Science, Systems and Applications. Scottsdale, Arizona.

Trussell HJ (1979) Picture thresholding using an iterative selection method - comments. Ieee Transactions on Systems Man and Cybernetics 9:311-311.

Weber MH, Sharp JC, Latta P, Sramek M, Hassard HT, Orr FW (2005) Magnetic resonance imaging of trabecular and cortical bone in mice: comparison of high resolution in vivo and ex vivo MR images with corresponding histology. European Journal of Radiology 53:96-102.

Whalley HC, Wardlaw JM (2001) Accuracy and reproducibility of simple cross-sectional linear and area measurements of brain structures and their comparison with volume measurements. Neuroradiology 43:263-271.

Zilles K, Schleicher A, Pehlemann FW (1982) How many sections must be measured in order to reconstruct the volume of a structure using serial sections. Microscopica Acta 86:339-346.

6. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Mpotsaris, Anastasios
Anschrift:	Birkenstr. 47, 40233 Düsseldorf
Geburtsdatum, Ort:	26. März 1975, Hagen (Westf.)
Staatsangehörigkeit:	griechisch
Familienstand:	verheiratet, 1 Sohn
Eltern:	Angelos Mpotsaris, geb. am 06. Juni 1944
	Maria Mpotsari, geborene Komini, geb. am 12. Oktober 1957
Geschwister:	Dimitrios Mpotsaris, geb. am 05. April 1981

Schulausbildung / Berufliche Ausbildung

1981 – 1985	Parkschule, Städtische Grundschule, Hagen
1985 – 1994	Theodor – Heuss – Gymnasium, Hagen, Abschluß mit dem Abitur
09 – 10/1994	Besuch der Sprachschule der Europäischen Stiftung für Sprache und Kultur in Madrid, Spanien.
04/1995	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der HHU Düsseldorf
03/1998	Abschluß des vorklinischen Abschnitts mit dem Physikum
03/2000	Erstes Staatsexamen
09/2001	Zweites Staatsexamen
10/2001 – 09/2002	PJ mit Wahlfach Pädiatrie, Universitätsklinikum Düsseldorf
26.11.2002	Drittes Staatsexamen und Teilapprobation als Arzt
07/2003	Beginn der Dissertation im C. und O. Vogt – Institut für Hirnforschung bei Herrn Prof. Dr. Gerd Rehkämper, Titel der Arbeit: „Struktur und Anwendung eines Programms (NucleoScope) zur effizienten Volumenbestimmung in morphologischen Schnittpräparaten“
10/2004	Vollapprobation als Arzt
seit 07/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft am C. und O. Vogt – Institut

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen

02 – 03/1999	Klinik für Orthopädie, Filiates, Griechenland (Prof. Borodimos)
08 – 10/1999	Klinik für Neurochirurgie, HHU Düsseldorf (Prof. Bock)
03/2001	Klinik für Augenheilkunde, Thessaloniki, Griechenland (Dr. Zachariadis)

Studentische Hilfskraft

10/1998 – 02/1999	Vorpräparant im Makroskopischen Präparierkurs, Institut für Anatomie, HHU Düsseldorf (Prof. Novotny)
10/1999 – 02/2000	Vorpräparant im Makroskopischen Präparierkurs, Institut für Anatomie, HHU Düsseldorf (Prof. Hartwig)

Wissenschaftliche Tätigkeiten

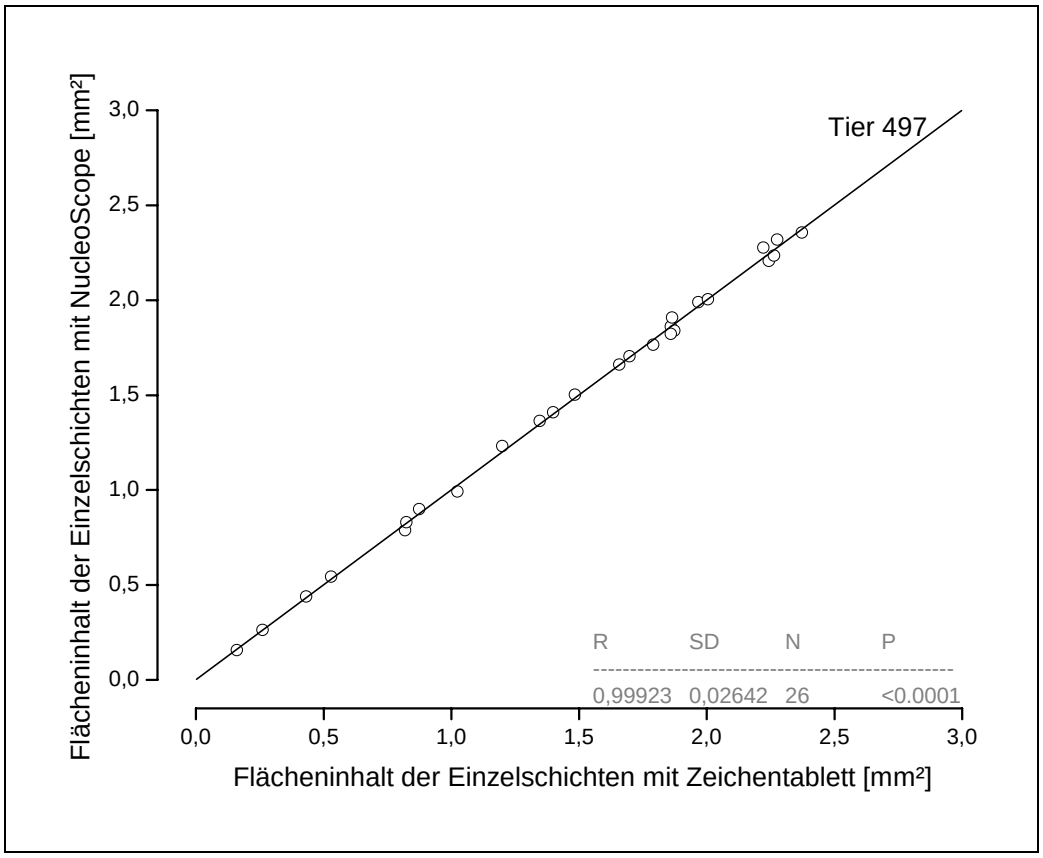
04 – 07/1996	Neurobiologisches Seminar, Tierexperimentelle Studie zur visuellen Diskriminationsfähigkeit, HHU Düsseldorf (Prof. Rehkämper)
10/1996 – 02/1997	Neurobiologisches Seminar, Studie zum funktionellen Aufbau des visuellen Cortex, HHU Düsseldorf (Prof. Rehkämper)
seit 01/2005	Entwicklung und Programmierung der Software „NucleoScope“ zur vollautomatisierten Rekonstruktion morphologischer Daten

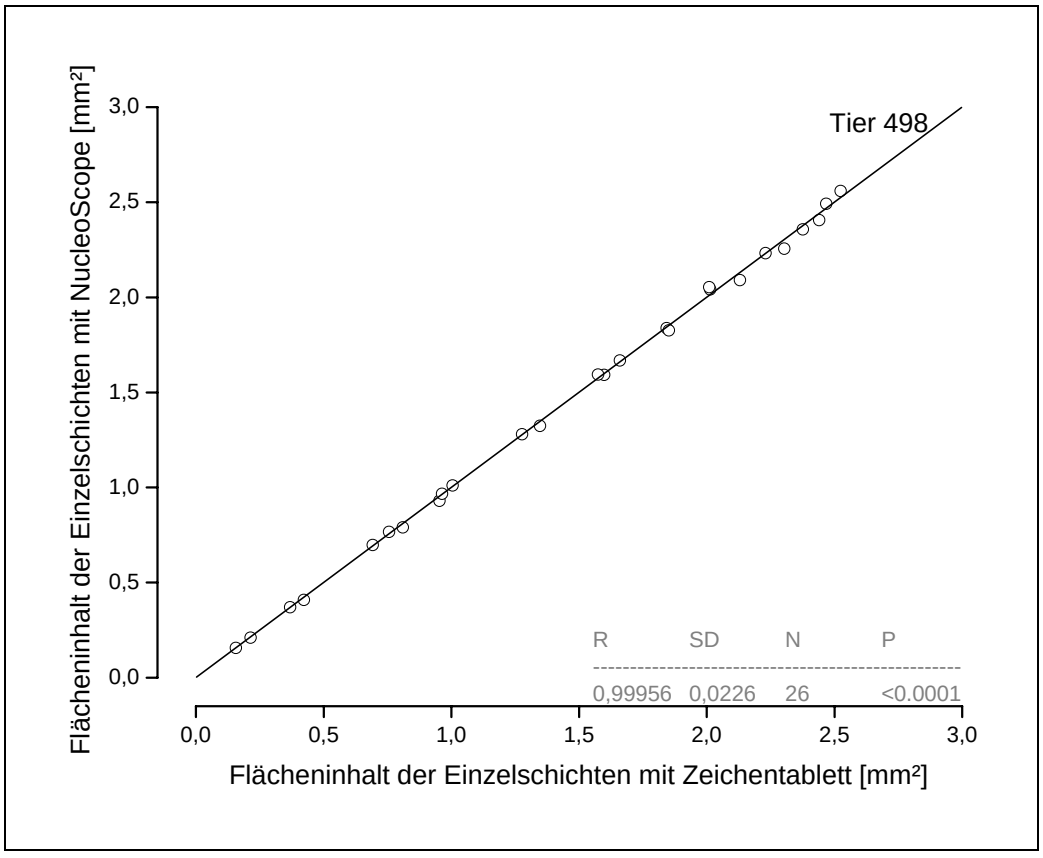
Sprachkenntnisse

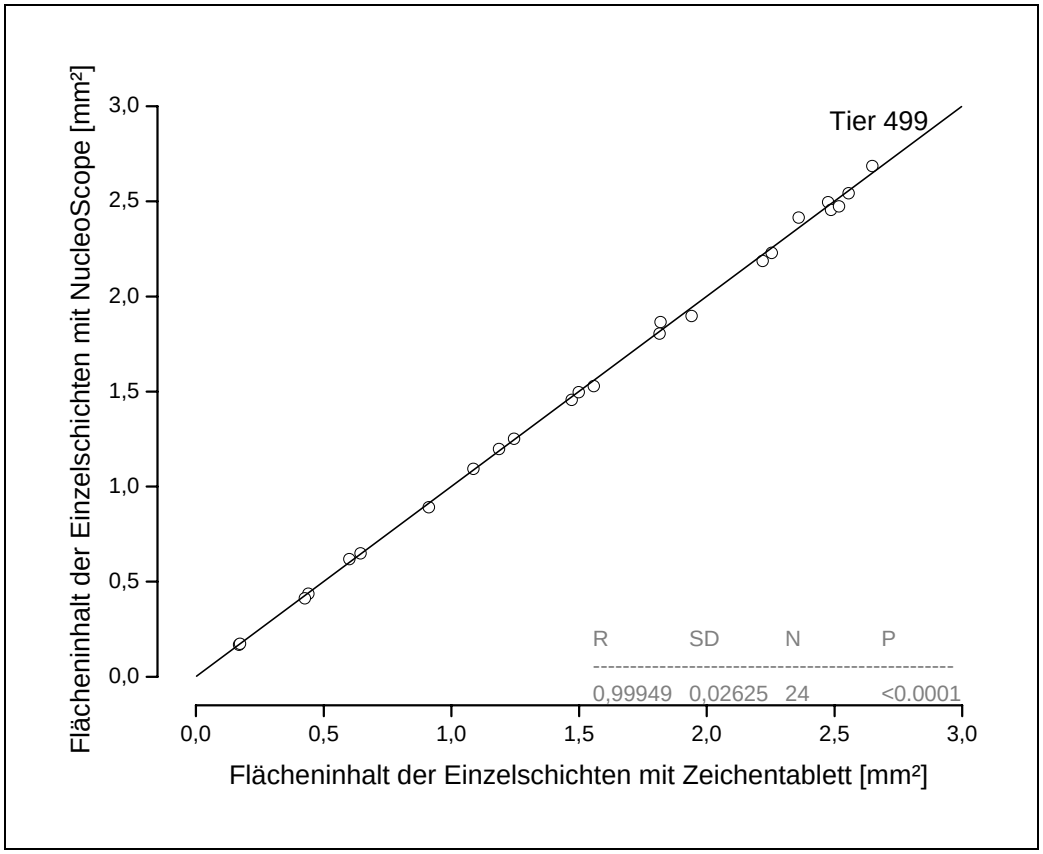
Deutsch	muttersprachliche Kenntnisse in Wort und Schrift
Griechisch	muttersprachliche Kenntnisse in Wort und Schrift
Englisch	sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Französisch	gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Spanisch	Grundkenntnisse in Wort und Schrift

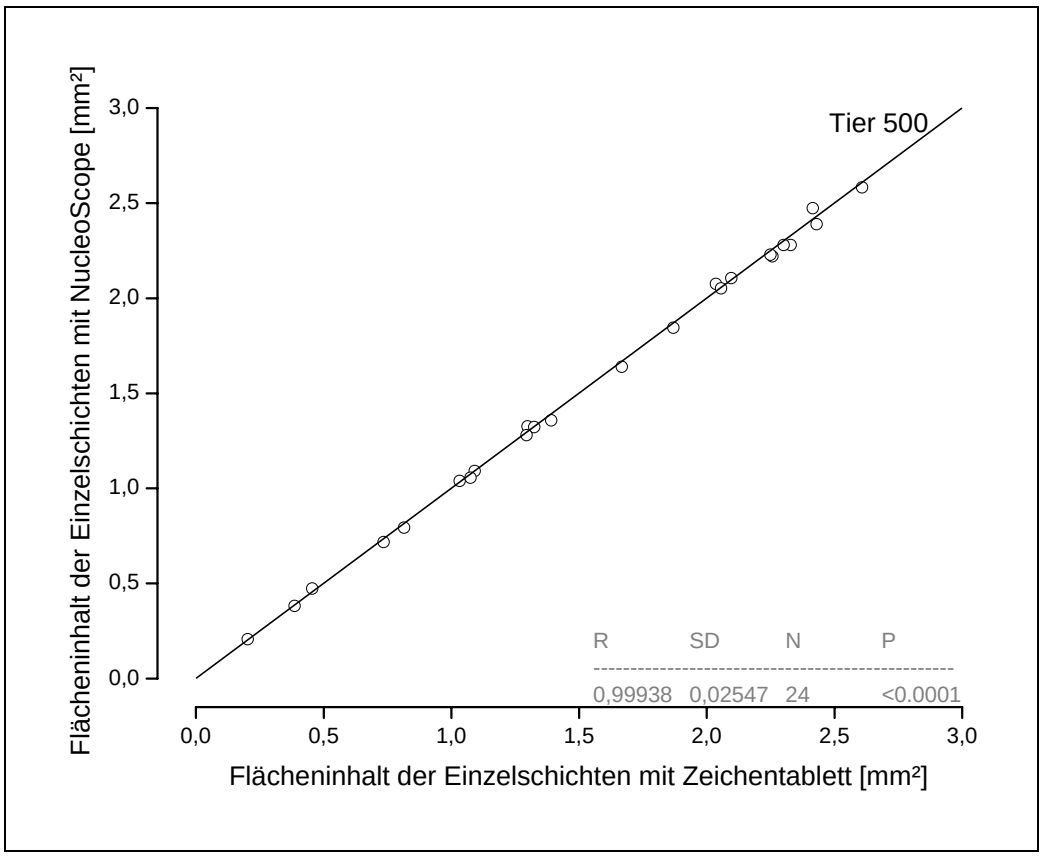
7. Anhang

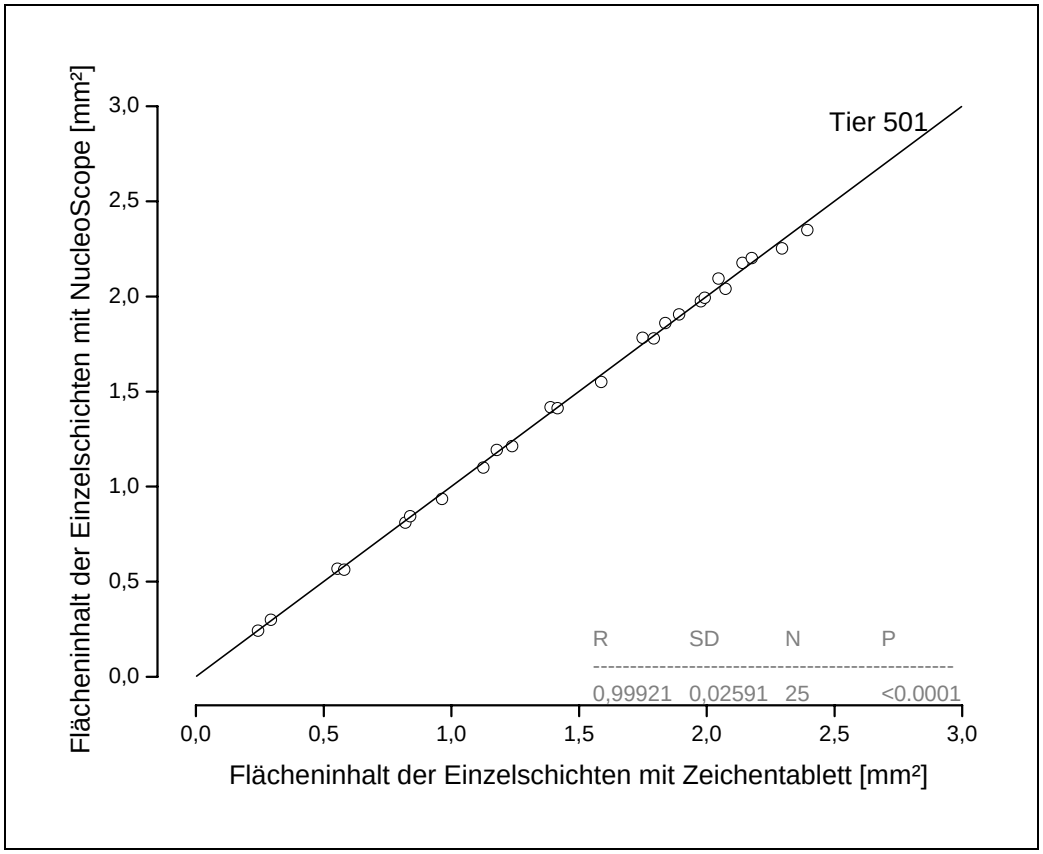
7.1 Flächeninhalte der Einzelschichten aller Tiere

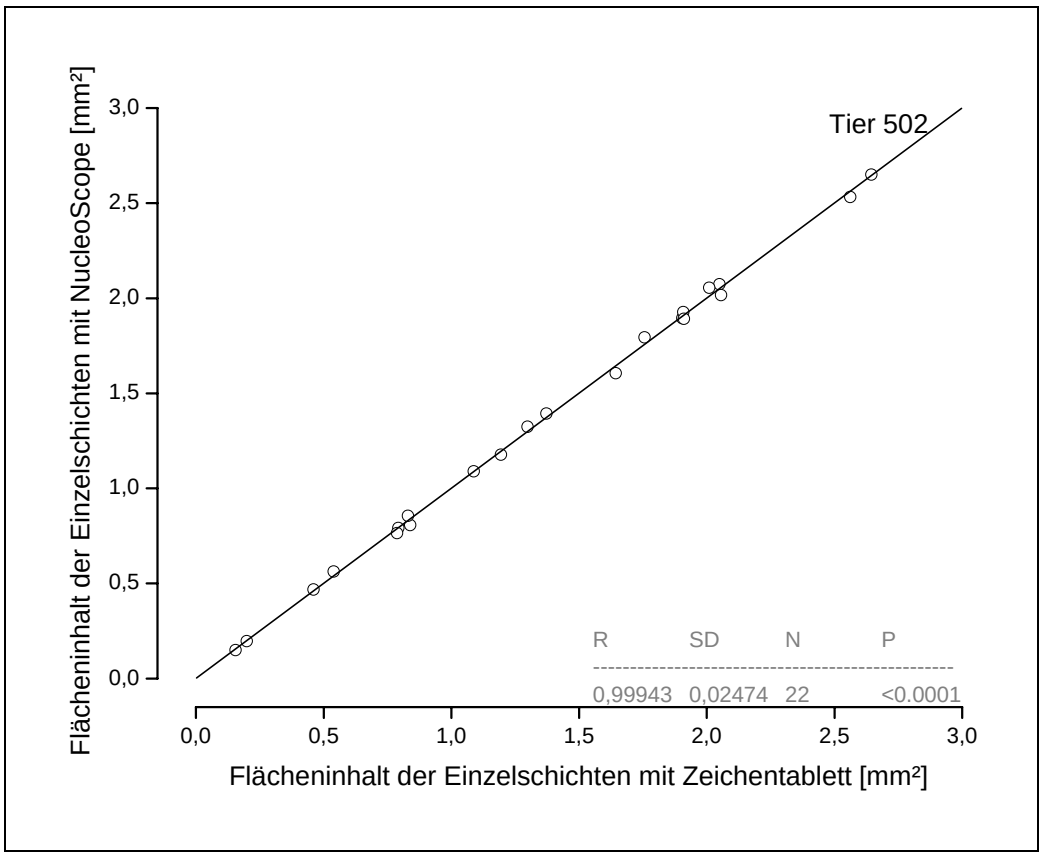


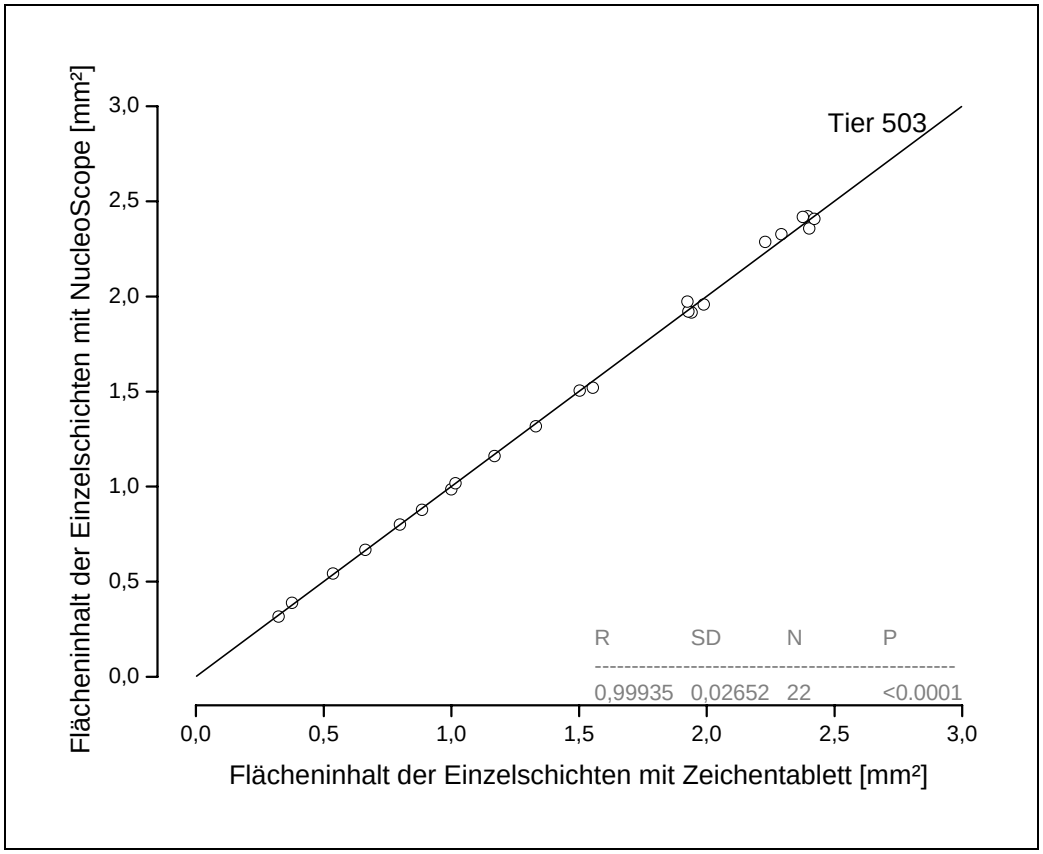


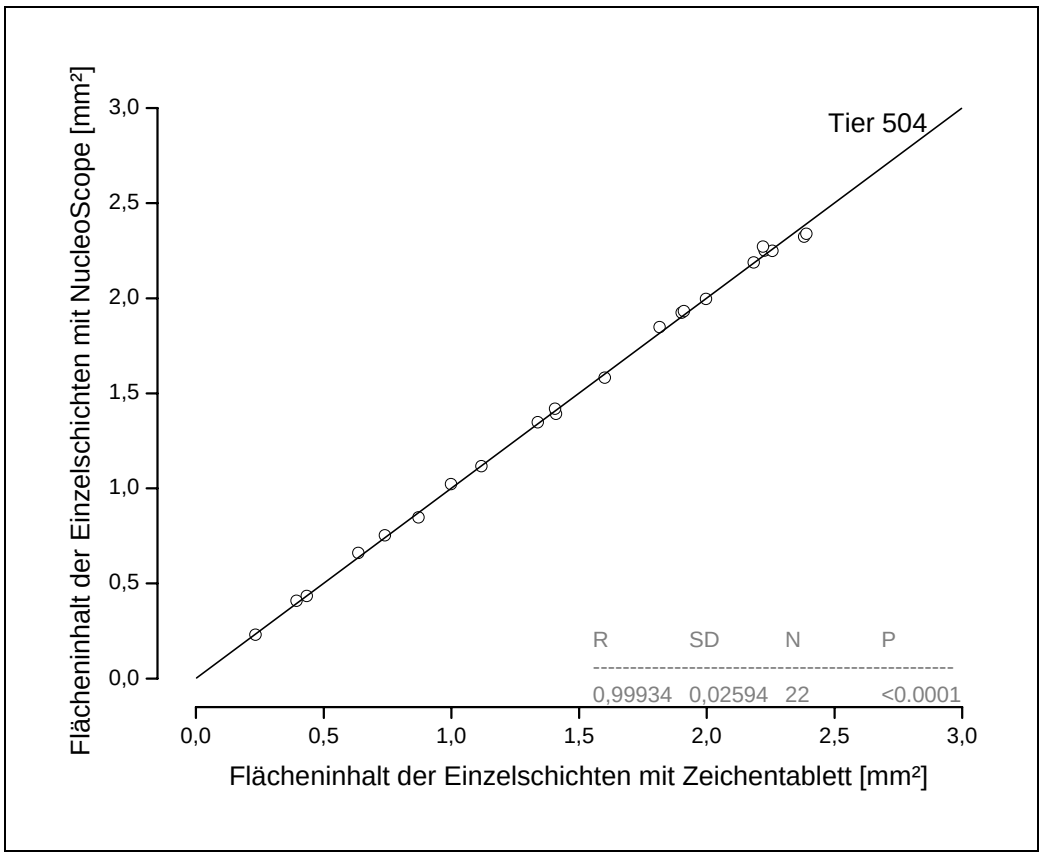

Tier 499
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99949 0,02625 24 <0.0001

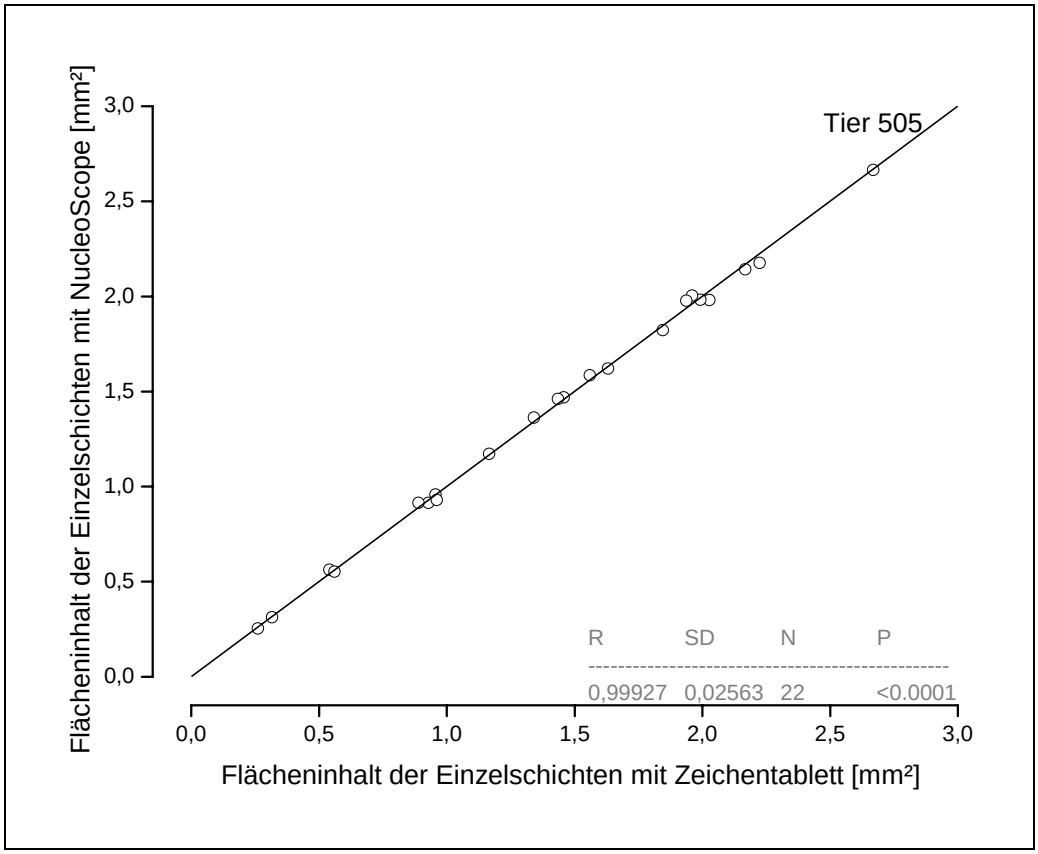

Tier 500
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99938 0,02547 24 <0.0001

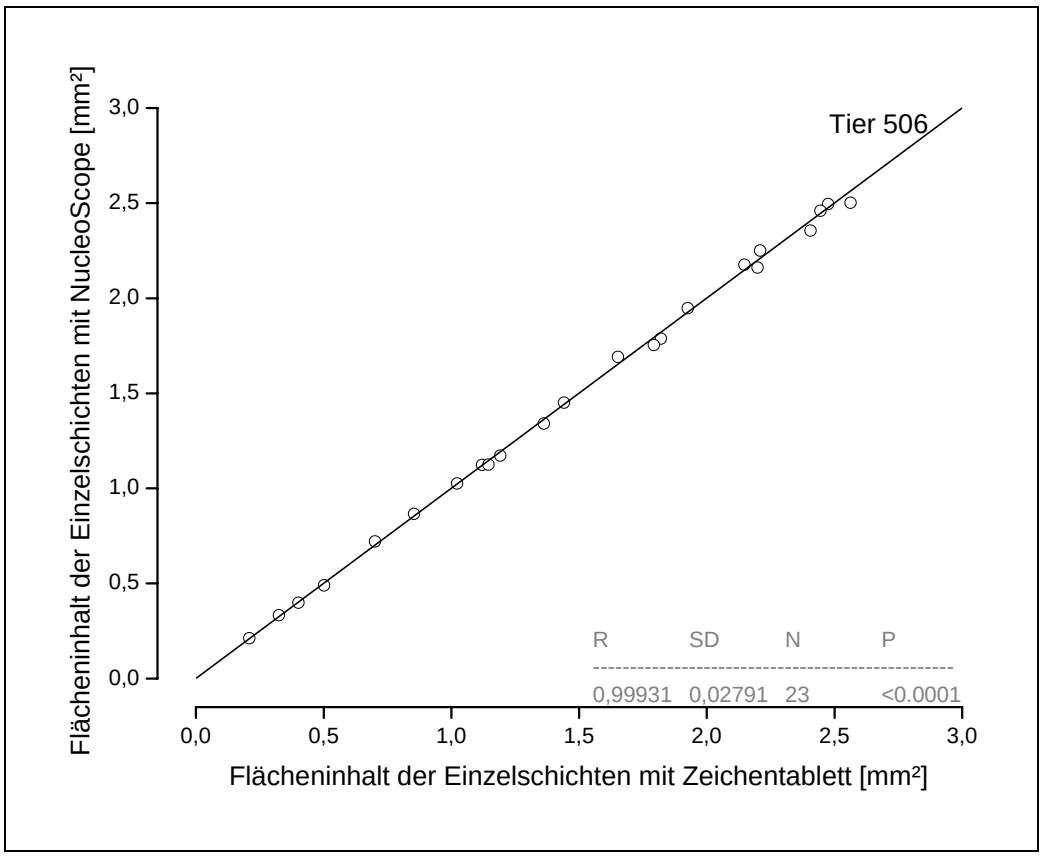

Tier 501
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99921 0,02591 25 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

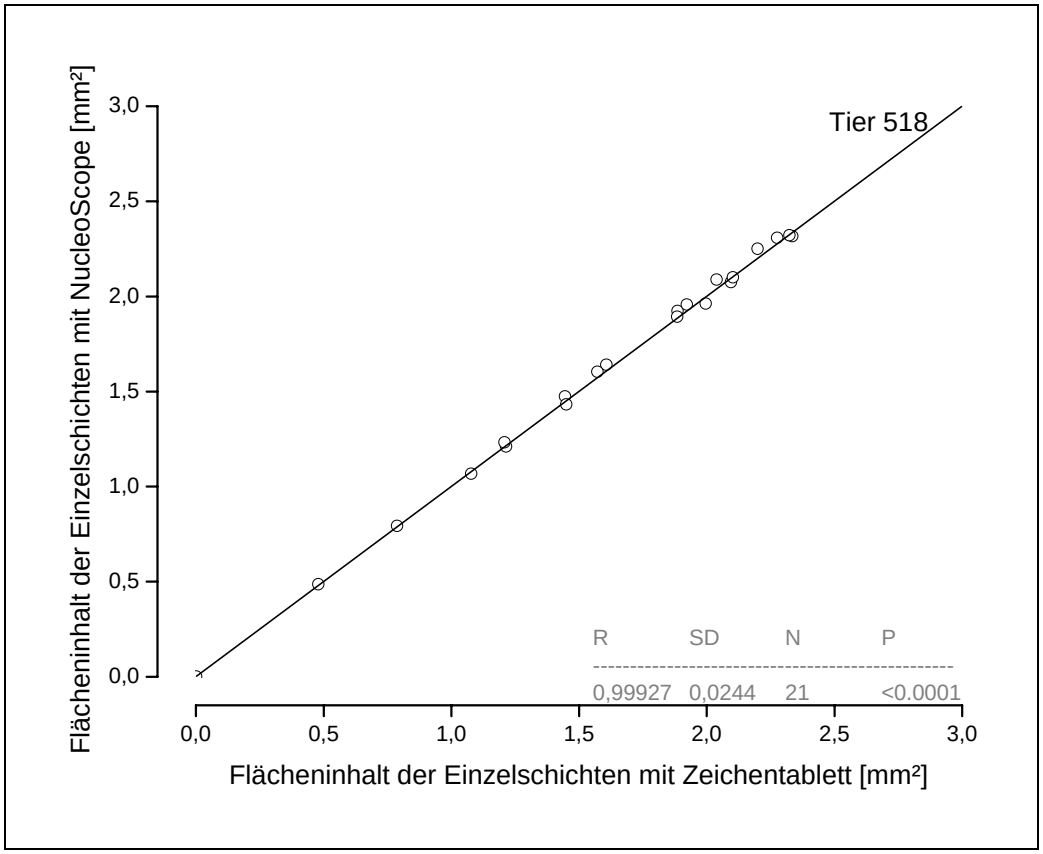

Tier 502
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99943 0,02474 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

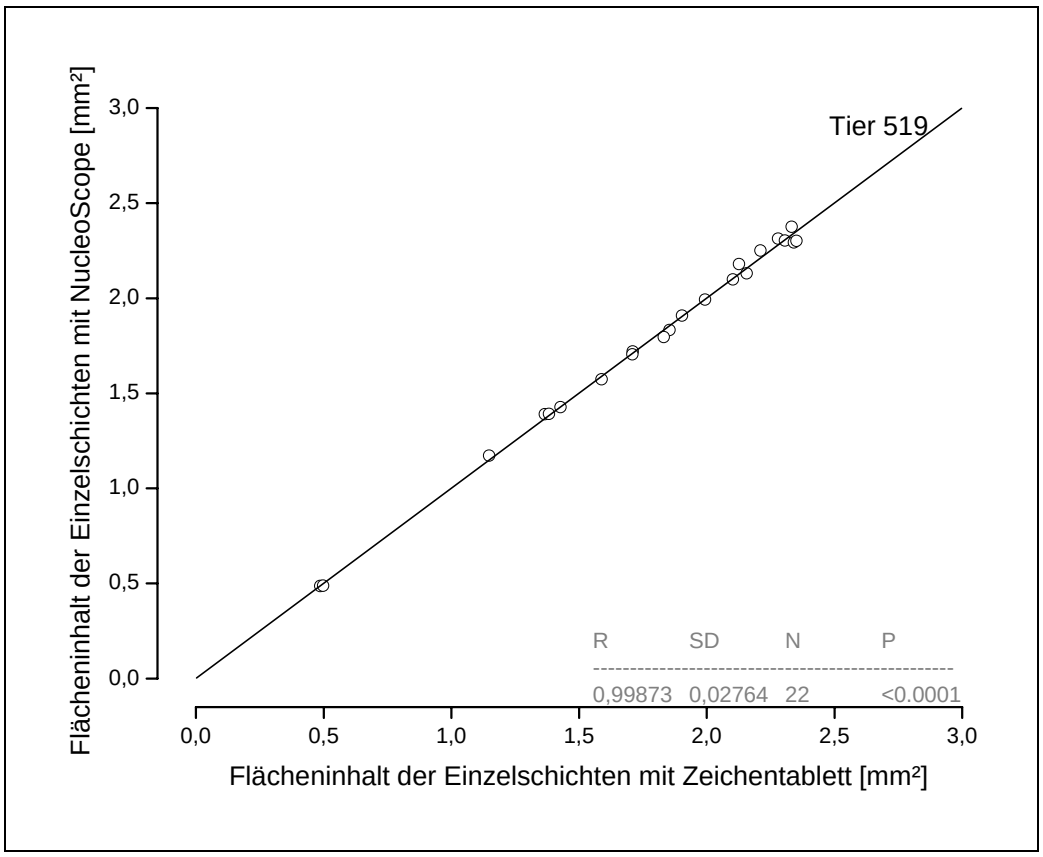

Tier 503
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99935 0,02652 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

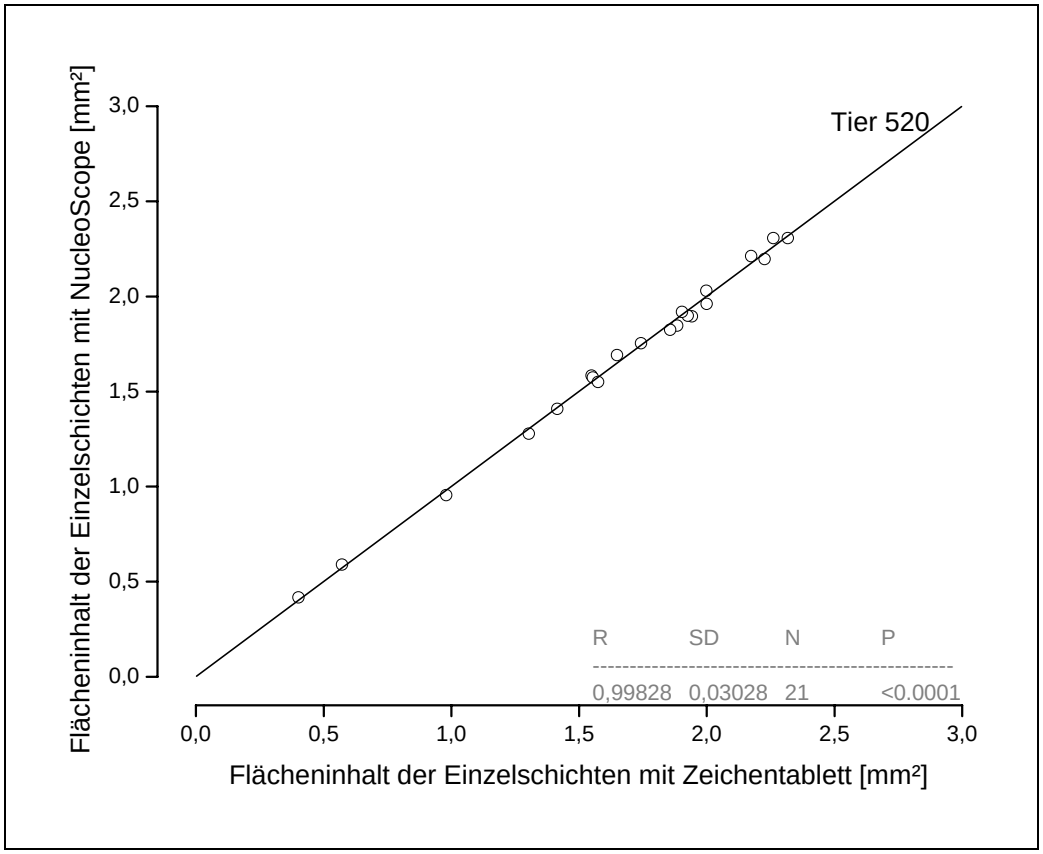

Tier 504
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99934 0,02594 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

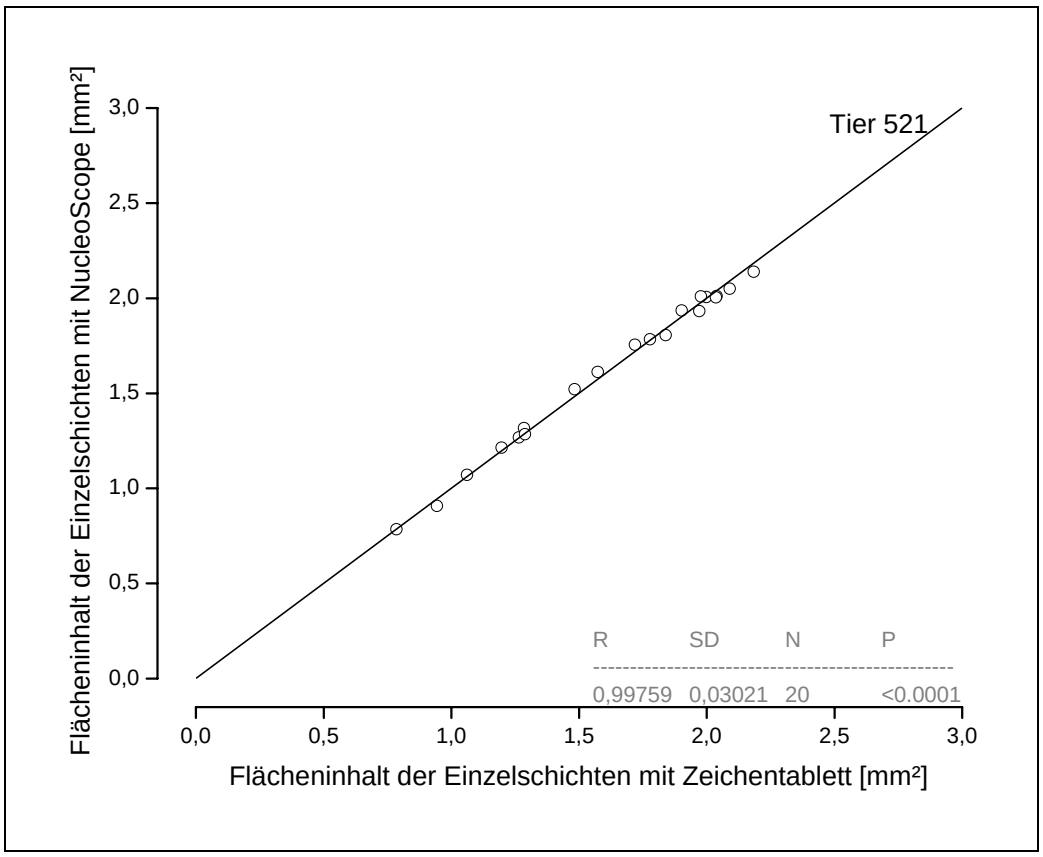

Tier 505
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99927 0,02563 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

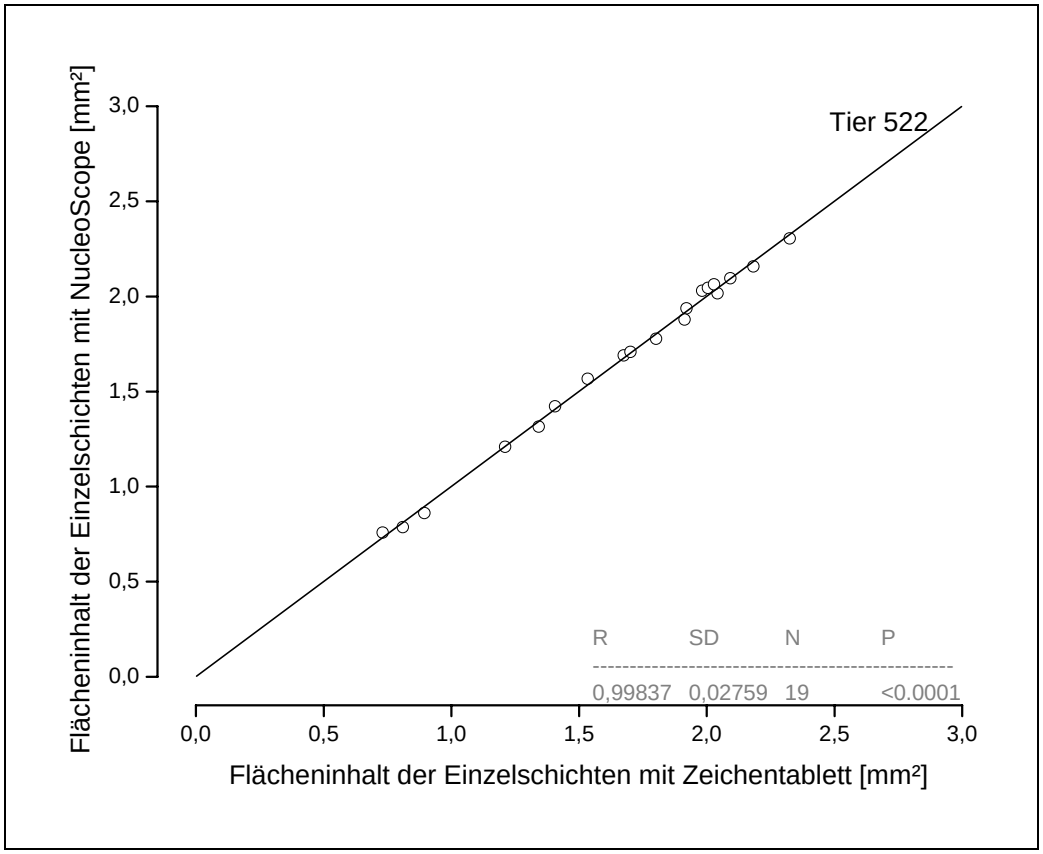

Tier 506
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99931 0,02791 23 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

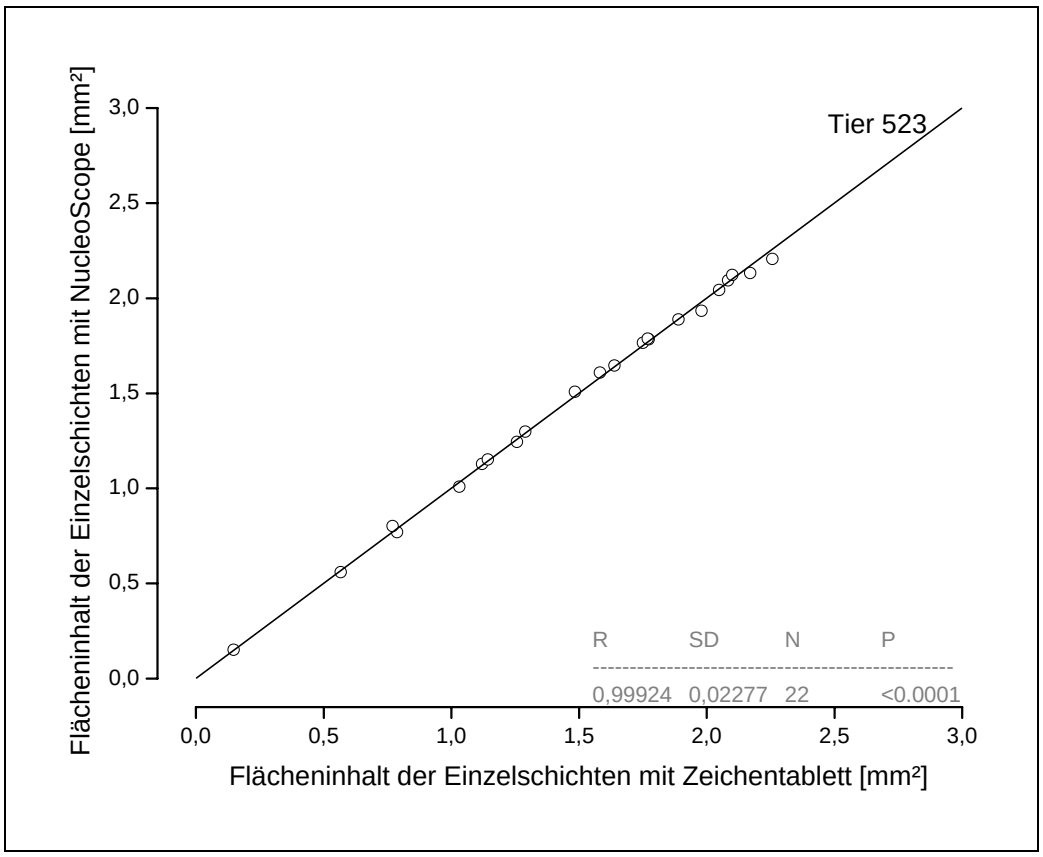

Tier 518
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99927 0,0244 21 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

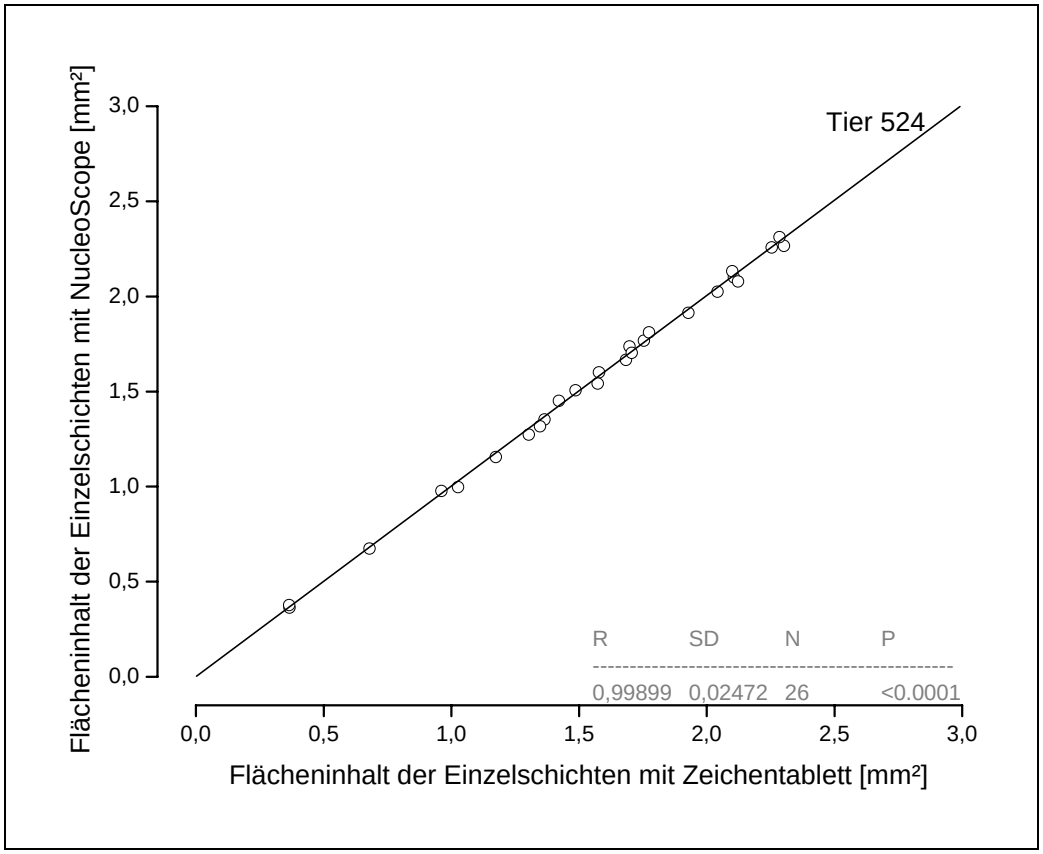

Tier 519
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99873 0,02764 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

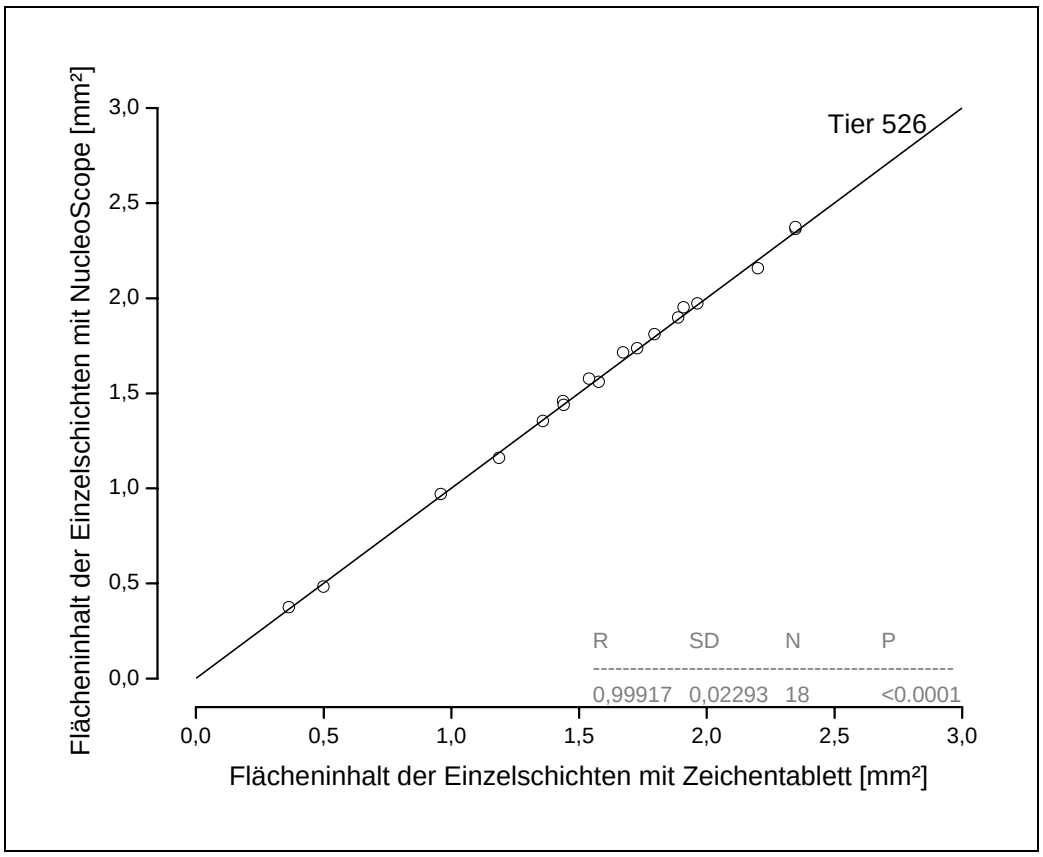

Tier 520
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99828 0,03028 21 <0.0001

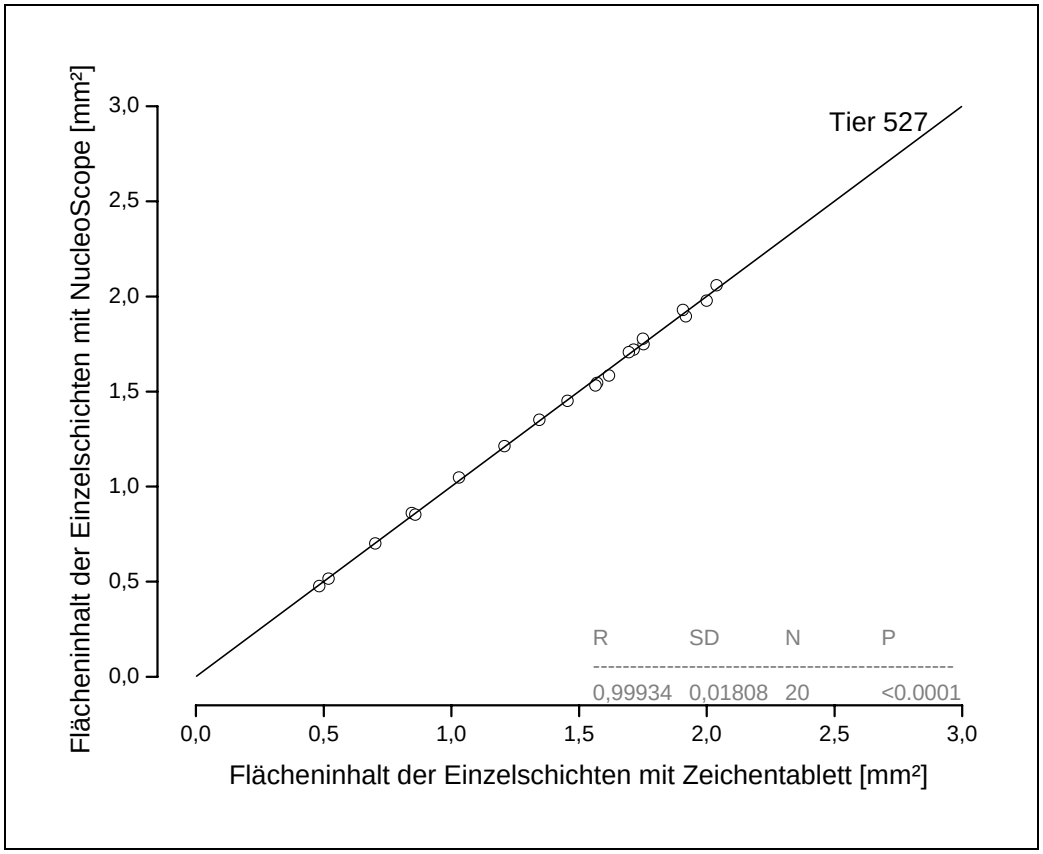

Tier 521
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99759 0,03021 20 <0.0001

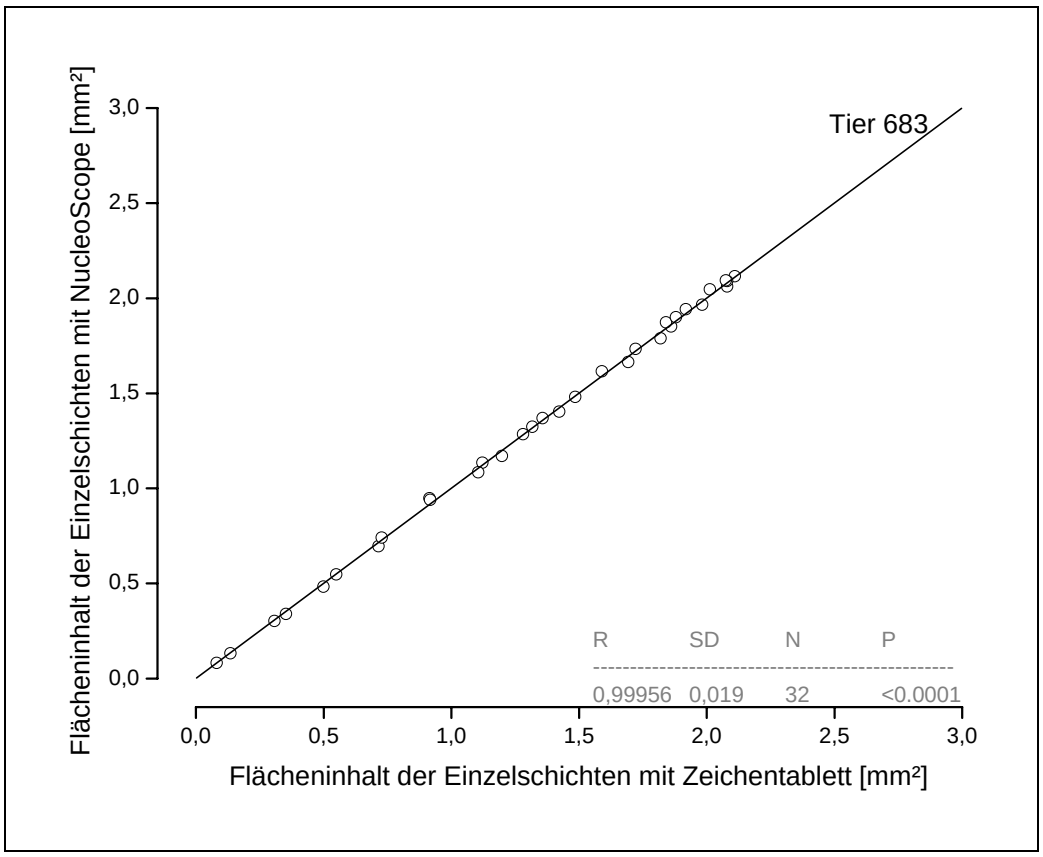

Tier 522
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99837 0,02759 19 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

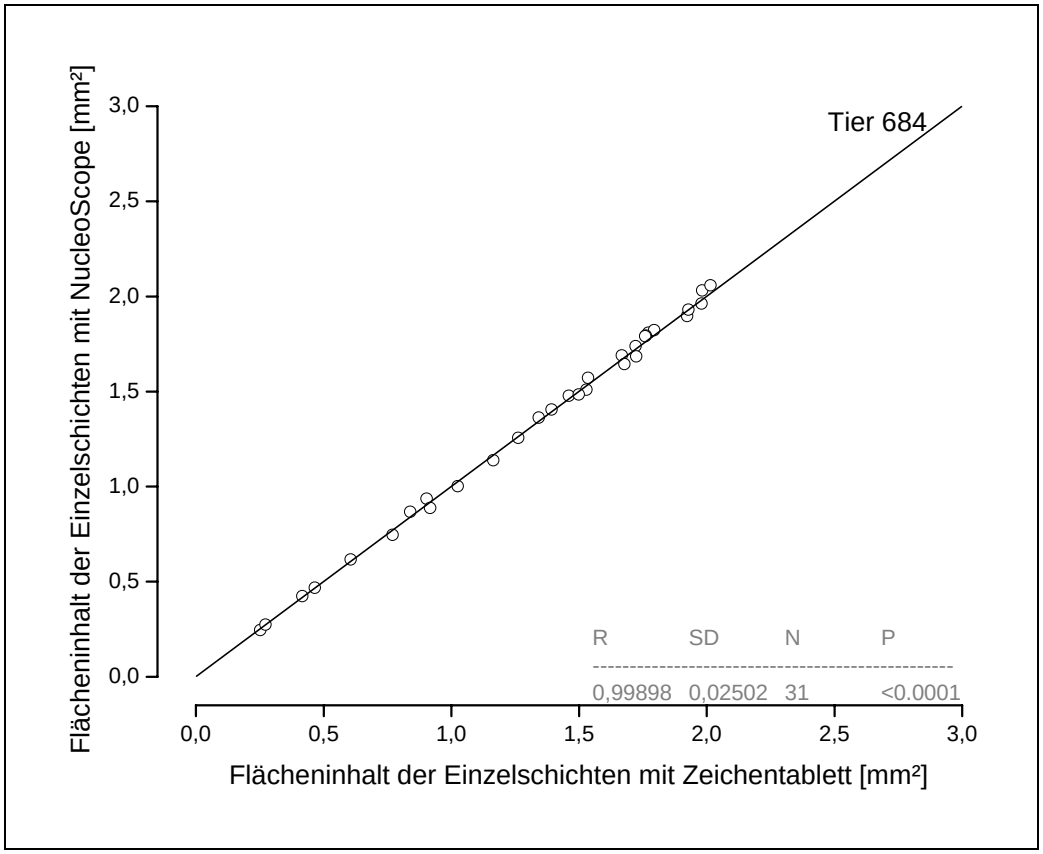

Tier 523
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99924 0,02277 22 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

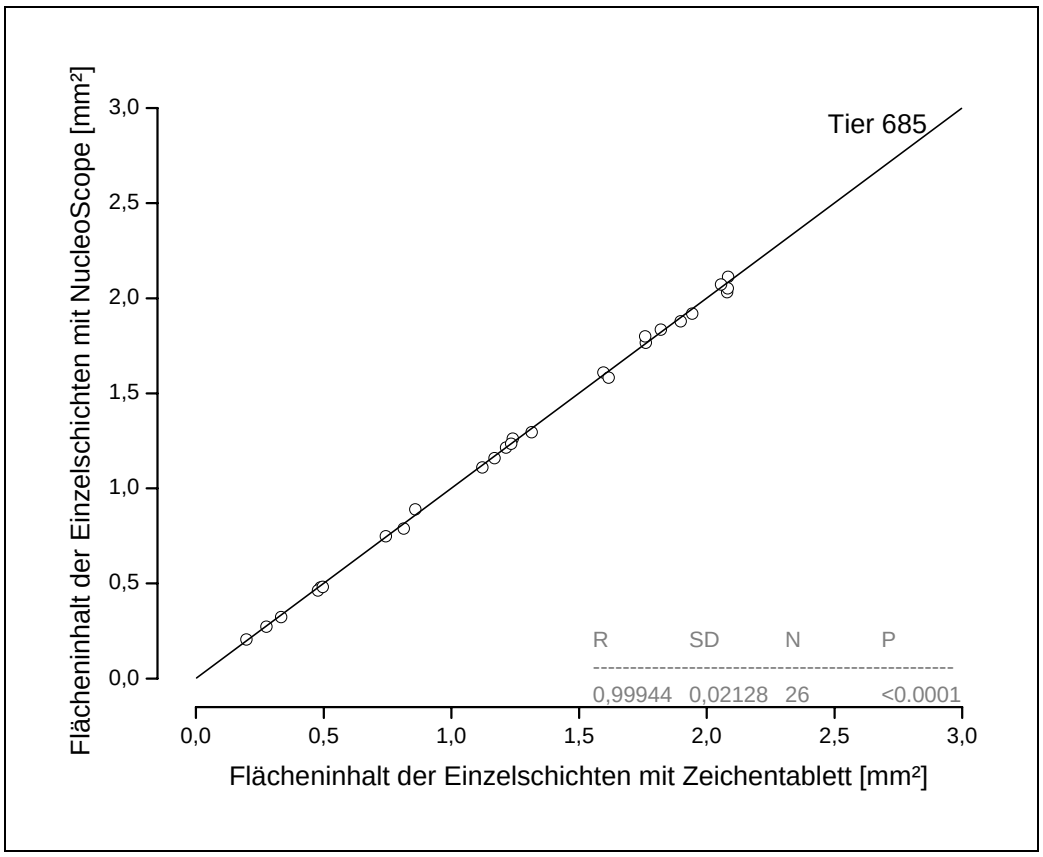

Tier 524
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99899 0,02472 26 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

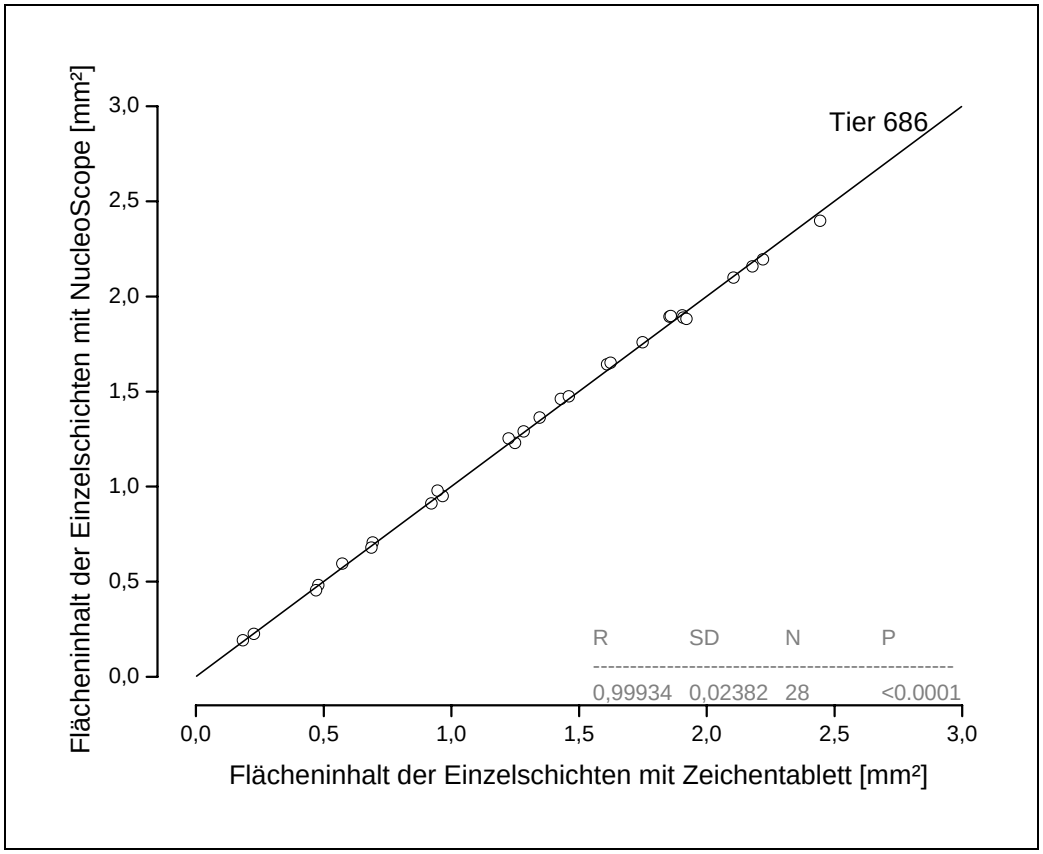

Tier 526
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
R SD N P
0,99917 0,02293 18 <0.0001
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

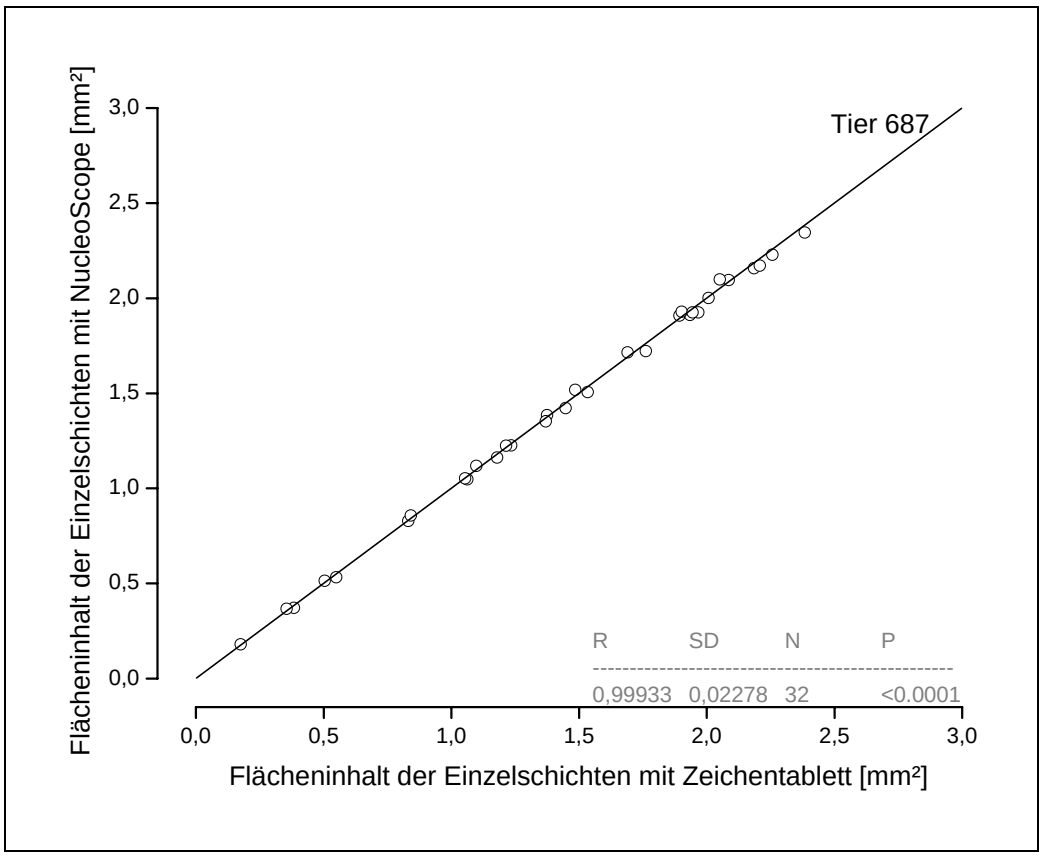

Tier 527
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99934 0,01808 20 <0.0001

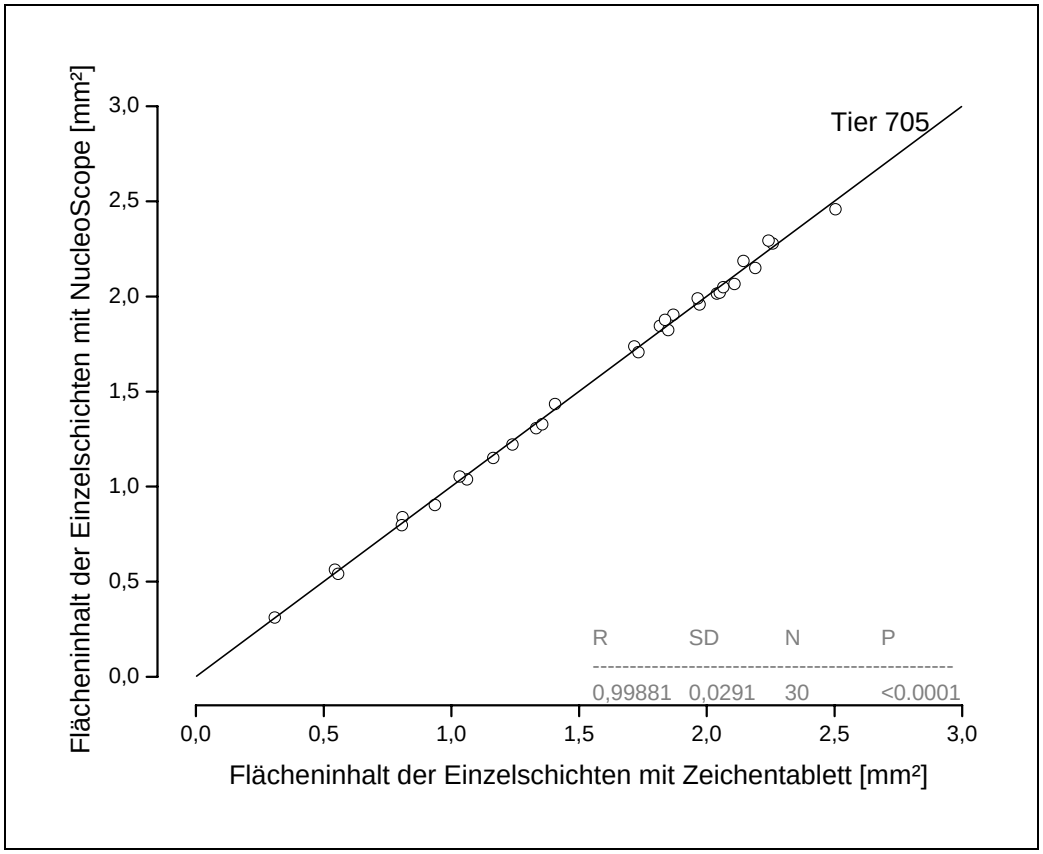

Tier 683
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99956 0,019 32 <0.0001

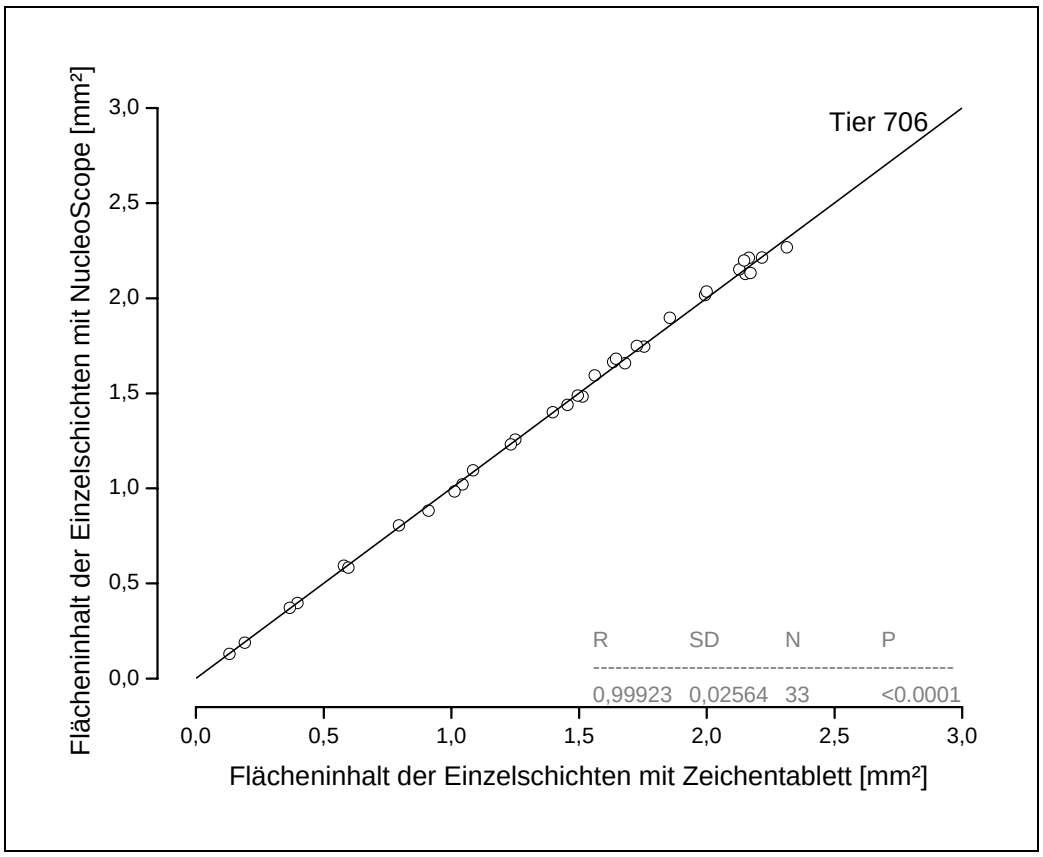

Tier 684
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99898 0,02502 31 <0.0001

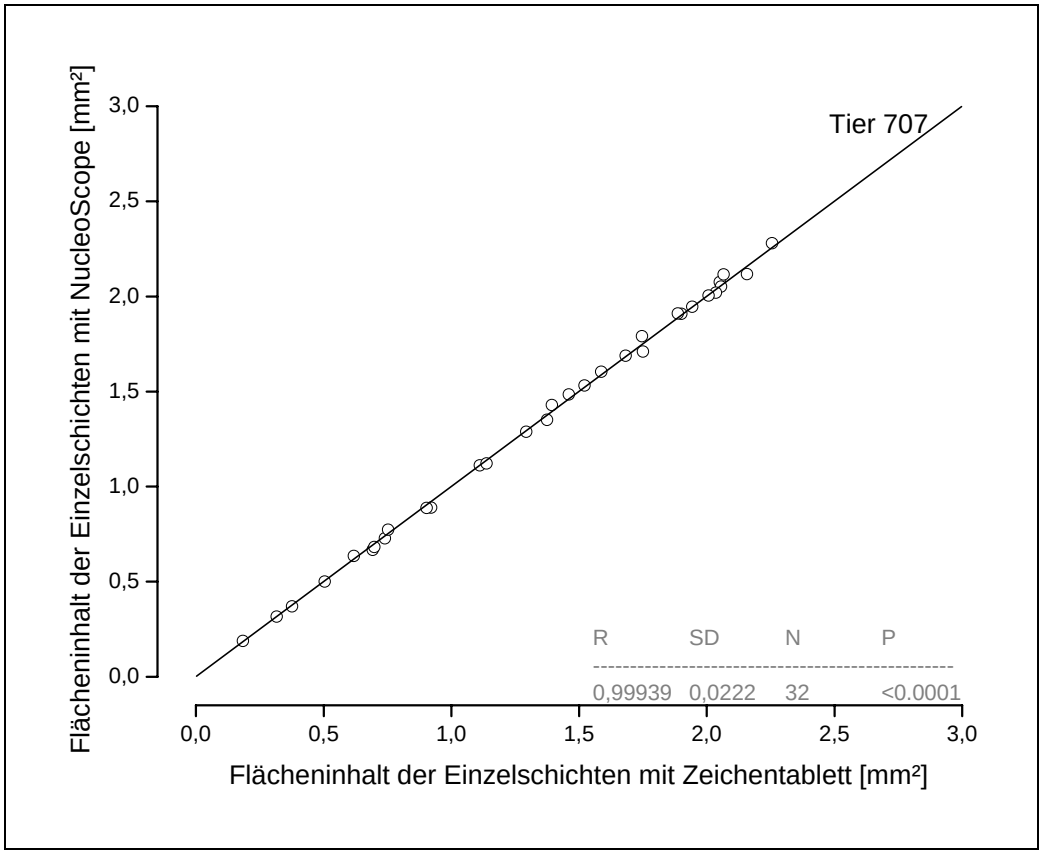

Tier 685
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99944 0,02128 26 <0.0001

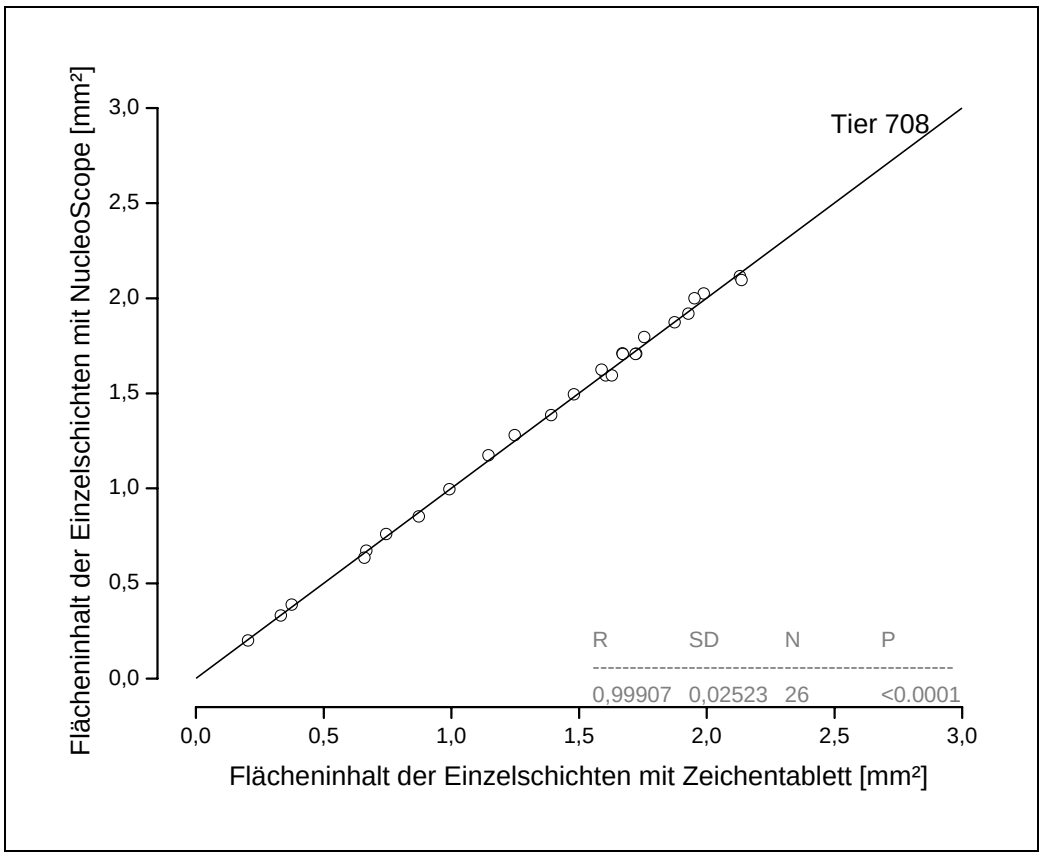

Tier 686
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99934 0,02382 28 <0.0001

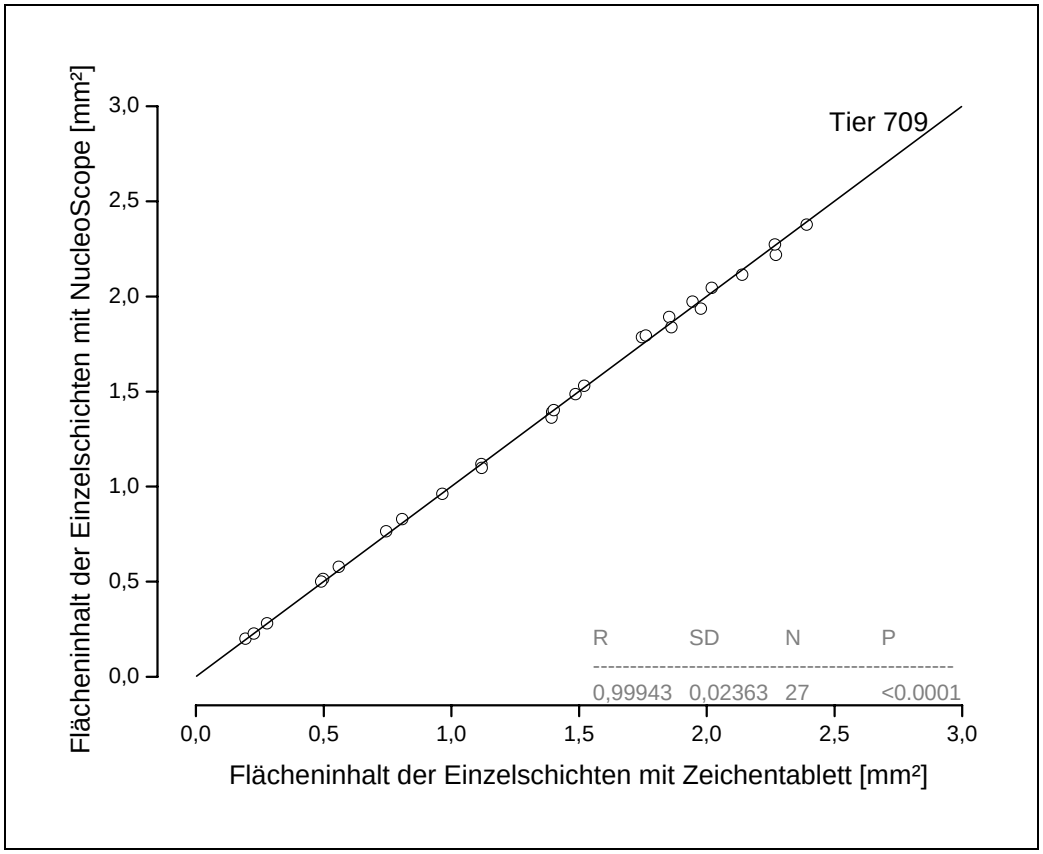

Tier 687
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99933 0,02278 32 <0.0001


Tier 705
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99881 0,0291 30 <0.0001

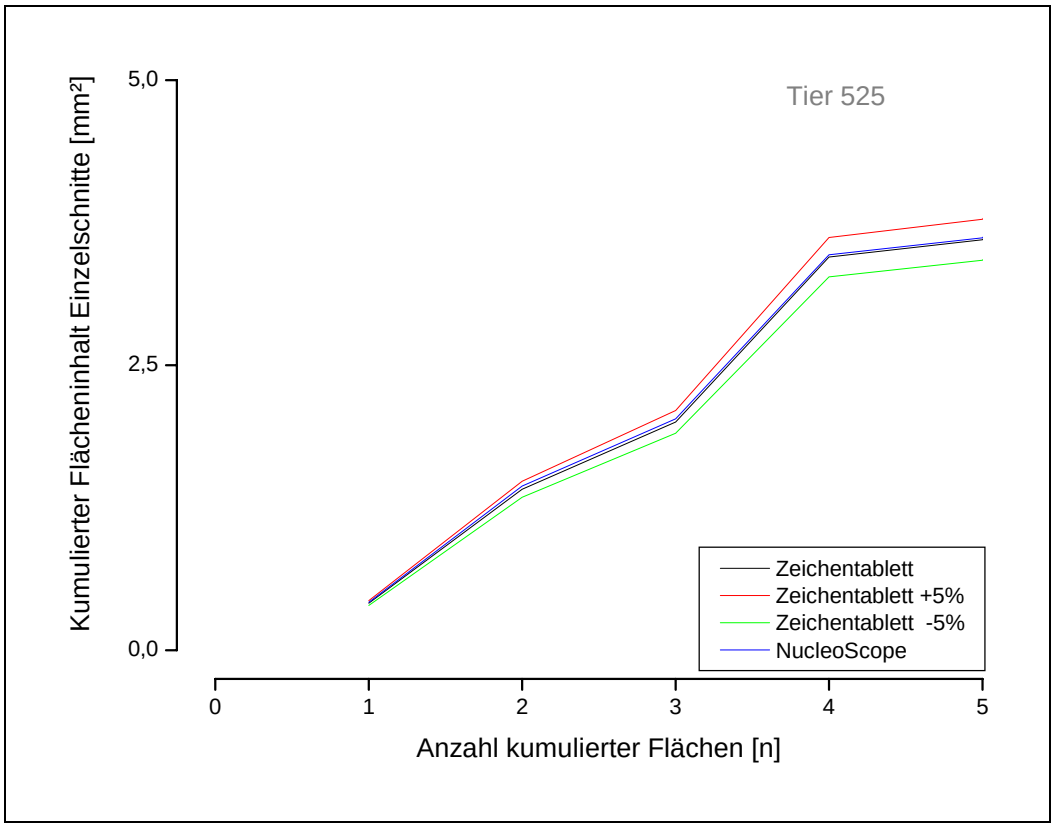

Tier 706
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99923 0,02564 33 <0.0001

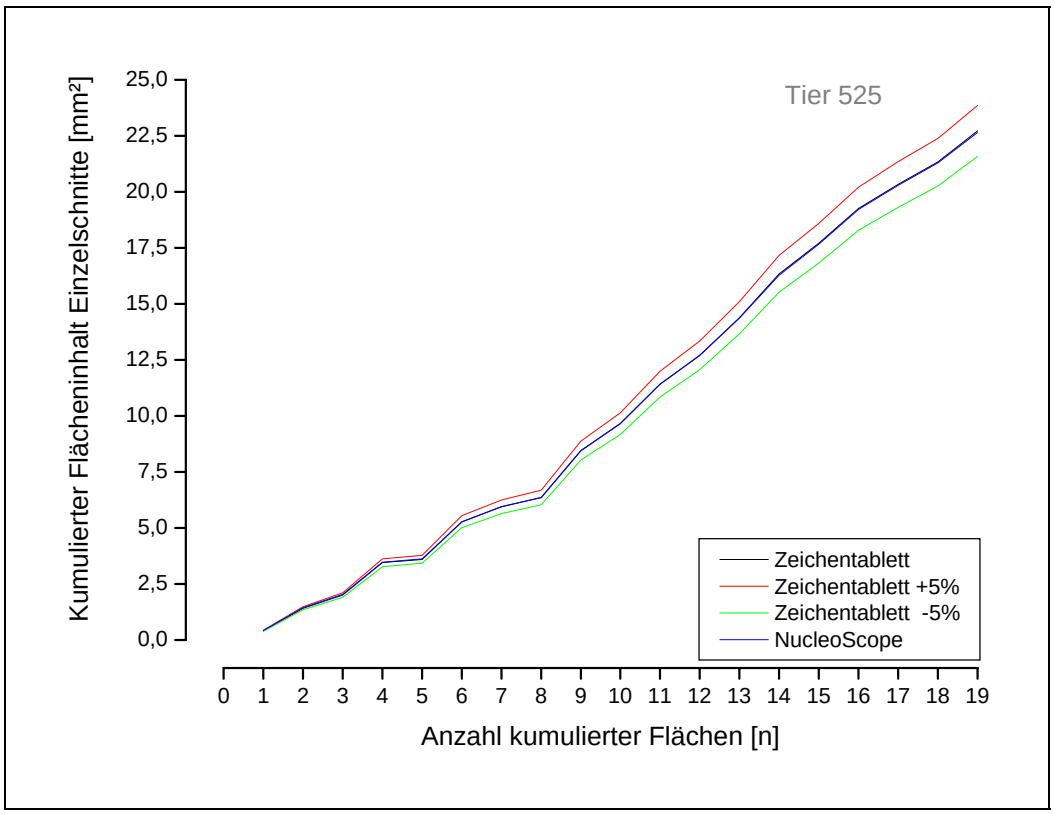

Tier 707
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99939 0,0222 32 <0.0001


Tier 708
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99907 0,02523 26 <0.0001


Tier 709
Flächeninhalt der Einzelschichten mit NucleoScope [mm²]
Flächeninhalt der Einzelschichten mit Zeichentablett [mm²]
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
R SD N P
0,99943 0,02363 27 <0.0001

7.2 Kumulierte Flächen für Tier 525





Struktur und Anwendung eines Programms (NucleoScope) zur effizienten Volumenbestimmung in morphologischen Schnittpräparaten (Zusammenfassung)

Morphometrie ist die quantitative Erfassung und vergleichende Analyse biologischer Formen zur Auffindung struktureller Unterschiede zwischen Untersuchungsobjekten. Dabei ist bei praktischer Anwendung etablierter Methoden der personelle und materielle Aufwand durch die manuelle Identifizierung und Umfahrung der Strukturgrenzen sowie die nachfolgende Digitalisierung per Zeichentablett häufig ein begrenzender Faktor für umfangreichere Untersuchungen an großen Populationen. Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines Computer-Programms, das diese Probleme überwindet und in einer vergleichenden Testung am Beispiel des Nucleus rotundus bei Hühnervögeln seine Reliabilität beweist.

Dazu wurde bei 30 Hühnervögeln (3 Rassen à 10 Tiere, Geschlechterverhältnis 1:1) der Nucleus rotundus über ein Lichtmikroskop mit Zwischentubus für Bildeinspiegelung umfahren. Hierzu wurde der Logitech IO-Pen verwendet. Dieser ist ein Hybrid-Stift, bestehend aus einer klassischen, dokumentenechten Tintenmine und einer digitalen Optik, der die unverfälschte, zeitgleiche digitale Speicherung mit ihm erstellter handschriftlicher Dokumente und ihre anschließende Übertragung auf den PC ermöglicht. In Kombination mit einem Spezialpapier wird die Position seiner Mine immer eindeutig und unabhängig vom Winkel und der Ausrichtung der Optik registriert. Die neu entwickelte Software NucleoScope steuert den Prozess der Datenanalyse der vom IO-Pen generierten Bilder, rekonstruiert aus den Ergebnissen der Einzelflächen die zugehörigen Volumina und überträgt diese in ihre interne Datenbank. Alle Datensätze können zur statistischen Weiterverarbeitung in allen gängigen Dateiformaten exportiert werden. Abschließend wurde ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse der neuen, automatisierten und digitalen mit der etablierten Vorgehensweise durch die statistische Methode nach Bland und Altman (1986) durchgeführt.

Dabei zeigten sich über die Gesamtheit aller umfahrenen Einzelschichten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden. Es lagen 95% der mit IO-Pen und NucleoScope ermittelten Volumina unterhalb einer Abweichung von 1% bezogen auf den Referenzwert. Der methodisch notwendige Zeitaufwand wurde insgesamt um mehr als 60% reduziert.

Es konnte gezeigt werden, dass der neue Algorithmus mittels IO-Pen und NucleoScope bezogen auf die Referenzmethode gleichwertige Ergebnisse liefert und diese zu ersetzen vermag. Der bedeutendste Vorteil jedoch ist die mögliche Vollautomatisierung des Analyseprozesses, so dass die hier vorgestellte Alternative gegenwärtig die schnellste und preiswerteste Methode zur Erfassung von Volumina beliebiger anatomischer Strukturen ist.