

# Vollautomatische Vorverarbeitung und rigide Registrierung zur Rekonstruktion von Bildern histologischer Stufenschnitte der Rattenleber

Anna Weinhold<sup>1,2</sup>, Stefan Wirtz<sup>1</sup>, Andrea Schenk<sup>1</sup>, Tobias Böhler<sup>1</sup>,  
Xiaoyi Jiang<sup>2</sup>, Uta Dahmen<sup>3</sup>, Olaf Dirsch<sup>4</sup>, Heinz-Otto Peitgen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MeVis Research, <sup>2</sup>Westfälische Wilhelms-Universität Münster,

<sup>3</sup>Universitätsklinikum Essen, <sup>4</sup>Klinikum der Universität Köln

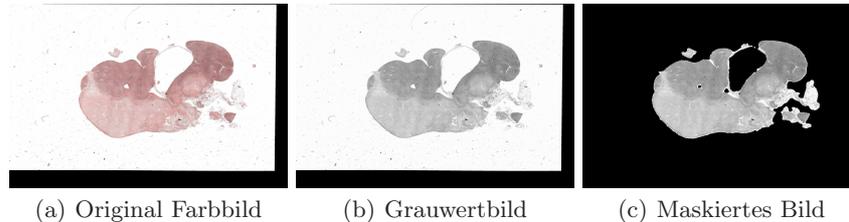
Email: anna.weinhold@uni-muenster.de

**Zusammenfassung.** Im klinischen Einsatz ist die Leberlebenspende, bei der vom Spender ein Teil der Leber entfernt und dem Empfänger eingesetzt wird, bereits ein vielfach durchgeführter Eingriff. Die Leber ist eines der wenigen Organe, das sich vollständig regenerieren kann. Der genaue Regenerationsprozess und die notwendigen Voraussetzungen dafür sind allerdings noch nicht geklärt. Im Laborversuch werden regenerierte Restlebern von Ratten histologisch untersucht, um so Einflussfaktoren der Regeneration genau studieren zu können. In dieser Arbeit wird erstmals ein Verfahren vorgestellt, dass die Verarbeitung der histologischen Schnitte von der vollautomatischen Vorverarbeitung bis hin zur rigiden Registrierung vereint. Dadurch wird der zeitaufwändige Prozess der Rekonstruktion nicht nur erheblich verkürzt, sondern auch robust und reproduzierbar gemacht.

## 1 Einleitung

Die Leber ist ein Organ, das in der Lage ist, sich vollständig zu regenerieren. Daher wird in der Leberchirurgie die Leberlebenspende durchgeführt, bei der der Empfänger statt einer vollständigen Leber nur einen Teil der Leber erhält, die sich dann zu einem vollwertigen Organ regenerieren kann. Ebenso regeneriert sich die Leber des Spenders. Um die Regenerationsleistung der Leber genau analysieren zu können, wurden bei dieser Studie im Laborversuch Rattenlebern untersucht. Den Ratten wird durch Resektion 90% des Lebervolumens entfernt. Nach einer Regenerationszeit von 24 bis 72 Stunden wird das regenerierende Organ vollständig entnommen und histologisch zu Stufenschnitten weiterverarbeitet [1]. Dazu wird die Restleber in Paraffin eingebettet und anschließend werden in axialer Ausrichtung in einem Abstand von  $500\mu\text{m}$  Schichten mit einer Dicke von  $4\mu\text{m}$  vom Paraffinblock abgeschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt. Mit einem Videomikroskop werden die Gewebeschnitte mit einer Auflösung von  $10\mu\text{m}$  pro Pixel digitalisiert. Pro Datensatz entstehen 50-62 Farbbilder mit ca.  $(1000\times 800)$  bis  $(2200\times 1800)$  Pixeln. Eine direkte Superpositionierung der Schichten ist durch die manuelle Datenakquisition nicht möglich. Vor weitergehen-

**Abb. 1.** Eine Schicht aus der Serie der Bilder histologischer Schnitte zu verschiedenen Zeitpunkten der ersten Phase der Registrierung. (a) Original Farbbild mit Hintergrundrauschen durch Verunreinigungen und bei der Digitalisierung entstandenen schwarzen Rand. (b) Grauwertbild nach der Hauptachsentransformation der RGB-Kanäle. (c) Maskiertes Grauwertbild. Die Verunreinigungen wurden eliminiert und der Hintergrund auf einen homogenen Grauwert gesetzt



den 3D-Analysen, z.B. einer Gefäßbaumextraktion, ist die Korrektur der Verformungen der Präparate essenziell. Durch den Herstellungsprozess entstehen Verunreinigungen durch Staub, Haare oder Fingerabdrücke, Verformungen und Unterschiede in der Repräsentierung durch unterschiedliche Färbung. Bei der Digitalisierung wird zusätzlich in jedem Bild ein unterschiedlich ausgeprägter schwarzer Randbereich (Abb. 1) erzeugt. Das vorgestellte Verfahren extrahiert den Hintergrund vollautomatisch, so dass eine dreidimensionale Rekonstruktion der Schnitte möglich wird.

## 2 Stand der Forschung und Fortschritt durch den Beitrag

Um eine dreidimensionale Rekonstruktion der Bilder zu ermöglichen, ist eine besonders zeitaufwändige Vorverarbeitung notwendig. Diese Vorverarbeitung wird in der Regel von Hand mit einem Grafikprogramm durchgeführt (siehe [2]), indem nach einer einfachen Konvertierung der Farb- in Grauwertbilder und der Beseitigung von Störungen im Hintergrund die Bilder gedreht und zentriert werden. Diese Arbeit ist daher nicht einfach reproduzierbar. Erst nach einer guten Vorverarbeitung und affiner Korrektur lassen sich High-Level Verfahren, wie in [3, 4, 5] vorgestellt, einsetzen. Der wesentliche Fortschritt durch diesen Beitrag besteht damit in der vollautomatischen Verarbeitung vom ersten Bild bis hin zur linearen Rekonstruktion. Anschließende Frei-Form-Registrierungen wie die elastische Registrierung lassen sich dadurch mit idealen und reproduzierbaren Voraussetzungen anwenden. Die Integration einer solchen Registrierung in den vollautomatischen Prozess ist in der Planung.

## 3 Methoden

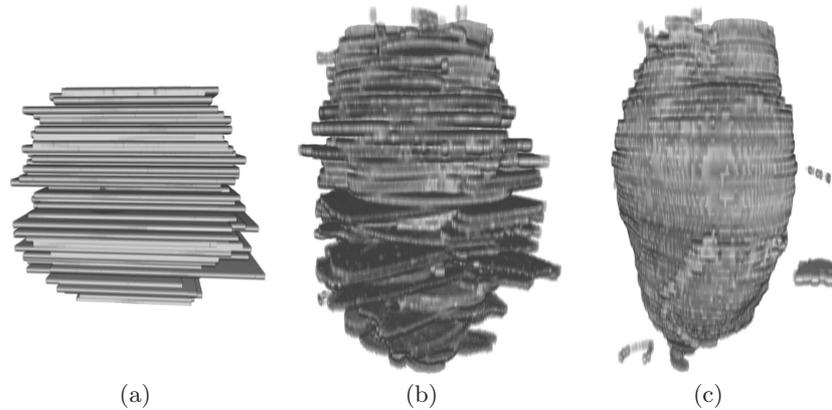
Zur Konvertierung der Bilder in Grauwertdaten wird eine Hauptachsentransformation [6] auf den Farbkanälen durchgeführt, um die redundante Information in den RGB-Kanälen auf einen essentiellen Kanal zu reduzieren. Die Maskierung

des Präparates wird in mehrere Schritte unterteilt. Zunächst wird der künstliche schwarze Rand im Hintergrund entfernt. Mit einem Laplacefilter wird das Objekt vom Hintergrund getrennt. Staub, Haare, Fingerabdrücke und andere Artefakte im Bereich des Hintergrunds bleiben neben dem Objekt zunächst erhalten. Eine geschickte Kombination verschiedener morphologischer Operatoren erlaubt die Verkleinerung, teilweise Eliminierung dieser Verunreinigungen. Anschließend werden zusammenhängende Komponenten detektiert und die Objekt-Komponenten anhand ihrer Größe ausgewählt. Die so entstandenen binären Masken werden morphologisch geglättet, um kleine Löcher und Randartefakte in den Masken zu beseitigen. Für die Registrierung der maskierten Grauwertbilder wird zunächst der Schwerpunkt des Präparats in jeder Schicht berechnet und eine Überlagerung dieser Schwerpunkte durch Translation erreicht. Im zweiten Schritt der Rekonstruktion wird für alle Schichten sukzessive eine rigide Transformation berechnet, wobei mit der Schicht mit dem größten Präparatsvolumen begonnen und zu den Enden der Leber hin fortgeschritten wird. Zur Registrierung wird eine Gauß-Newton Optimierung zur Minimierung des Least-Squares-Fehlers zwischen je zwei Schichten verwendet [7]. Zur weiteren Effizienzsteigerung, Beschleunigung und Umgehung lokaler Minima wird ein Multiresolutionsansatz, basierend auf einer Gaußpyramide, verwendet. Um die Schichten, die zueinander stark rotiert sind, korrekt registrieren zu können, werden insgesamt für eine Schicht vier Registrierungsdurchläufe gestartet, die sich ausschließlich in der Ausrichtung der zu registrierenden Schicht unterscheiden. Die Ausrichtung wird durch Rotation um den Schwerpunkt um  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  und  $270^\circ$  variiert. Das bzgl. des Fehlermaßes beste Ergebnis gilt dann als Korrektur (*best-of-four*-Registrierung). Um eine optische Kontrolle zu ermöglichen, werden die Ergebnisse dreidimensional durch ein Volumenrendering und zweidimensional in Orthogonalansichten dargestellt.

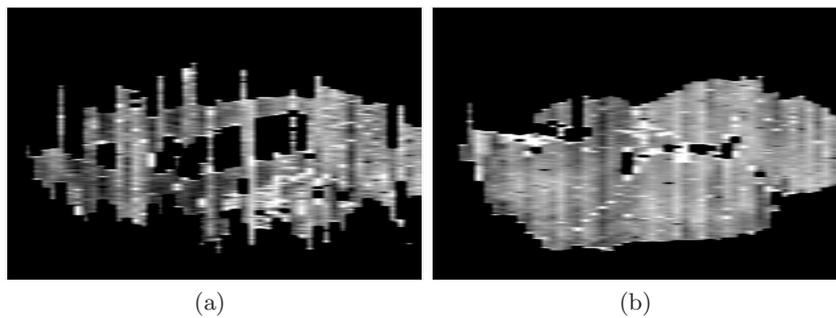
## 4 Ergebnisse

Die vorgestellte Methode wurde vollständig in MeVisLab [8] implementiert. Nach der Auswahl eines Datensatzes erfolgen alle Schritte der Rekonstruktion (Farbanalyse, Maskierung, Registrierung) vollautomatisch. Bei einem Datensatz wie in unseren Versuchsreihen mit 50-62 Bildern und einer Auflösung von bis zu  $(2200 \times 1800)$  Pixeln pro Bild kann nach einer Rechenzeit von ca. einer Stunde auf einem PC die fertige Rekonstruktion analysiert werden. Die Analyse der Farbkanäle ergab im Mittel eine Gewichtung der Kanäle Rot, Grün und Blau von  $(0.3223, 0.339, 0.3387)$ . Die Maskierung des Präparates erfolgte zuverlässig. Verunreinigungen konnten eliminiert und abgetrennte Präparatstücke gefunden und mit einbezogen werden. In den drei durchgeführten Versuchsreihen, in denen Datensätze ohne weitere Vorverarbeitung dem Verfahren zugeführt wurden, konnten bei 93% der Schnitte die Artefakte vollständig eliminiert werden. Bei den übrig gebliebenen Schichten handelt es sich bei den Artefakten um Fingerabdrücke bzw. Farbflecken, die aufgrund ihrer Größe und farblichen Darstellung nicht vom Objekt automatisch unterschieden werden konnten. Eine visuelle Kontrolle durch einen Experten ergab, dass die Qualität der automatischen Objekt-

**Abb. 2.** 3D-Darstellung des gesamten Datensatzes: komplette Schichten nach Überlagerung der Schwerpunkte (a), maskierte Bilder (b), Rekonstruktion nach Registrierung mit glatter Oberfläche (c)



**Abb. 3.** Orthogonaler Schnitt durch das rekonstruierte Volumen: nach dem Schwerpunkt ausgerichtete Schichten (a), Schichten nach der Registrierung (b)



Hintergrund-Trennung eine Volumenanalyse ermöglicht. In Abb. 1c ist zu erkennen, dass die Maskierung sinnvolle Ergebnisse lieferte. Zur Bestimmung des Schwerpunktes wurde das Maskenbild verwendet und anschließend die Schwerpunkte der Bilder durch Translation in der Mitte neu ausgerichtet (bb. 2a). Nach Anwendung der Masken konnte in der dreidimensionalen Darstellung bereits die grobe Form der Restleber erkannt werden (Abb. 2b). Im nächsten Schritt wurden die verbliebenen Rotationen und Translationen durch die rigide *best-of-four*-Registrierung korrigiert, so dass die Schichten sich sehr gut überlagerten und insgesamt eine glatte Oberfläche erzeugt werden konnte (Abb. 2c). Wird zusätzlich zur Oberfläche auch das Innere des Volumens betrachtet, so lassen sich feine Strukturen und Gefäße gut erkennen (Abb. 3).

## 5 Diskussion

Es wurde ein vollautomatischer Algorithmus zur Vorverarbeitung und rigiden Registrierung histologischer Schnitte entwickelt. Die vorgestellte Methode erlaubt eine schnelle und effiziente rigide Rekonstruktion eines 3D-Volumens aus den Bildern der histologischen Schnitte. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte bislang optisch durch einen Experten. Weitere Analysen zur Genauigkeit stehen noch aus. Die Ergebnisse sind aufgrund der Automatisierung reproduzierbar und bieten damit eine zuverlässige Möglichkeit, histologische Präparate zu rekonstruieren. In weiterführenden Arbeiten werden die restlichen Verformungen in den Daten, die aufgrund des Herstellungsprozesses nur durch nichtlineare Methoden zu rekonstruieren sind, mit Hilfe eines elastischen Registrierungsverfahrens korrigiert. Zur Erhöhung der örtlichen Auflösung soll der Abstand zwischen zwei Schichten weiter verringert und damit die Gesamtzahl der Schichten erhöht werden. Dadurch lassen sich weitere Details wie kleinere Gefäße, etc. in der Rekonstruktion erkennen. Auf diesen verbesserten Daten lassen sich dann Gefäßsegmentierungen effizienter durchführen und damit eine genauere Analyse der Regenerationsleistung der Lebergefäße erzielen.

## Literaturverzeichnis

1. Horn LC, Riethdorf L, Löning T. Leitfaden für die Präparation uteriner Operationspräparate. *Der Pathologe* 1999;20(1):9–14.
2. Em G, Vanderloos H. A semi-automatic computer-microscope for the analysis of neuronal morphology. *IEEE Trans Biomed Eng* 1965;12:22–31.
3. Braumann UD, Kuska JP, Eikel J, et al. Three-dimensional reconstruction and quantification of cervical carcinoma invasion fronts from histological serial sections. *IEEE Trans Med Imaging* 2005;24(10):1286–1307.
4. Ourselin S, Roche A, Subsol G, Pennec X, Ayache N. Reconstructing a 3D structure from serial histological sections. *Image Vis Comp* 2001;19(1):25–31.
5. Wirtz S, Fischer B, Modersitzki J, Schmitt O. Vollständige Rekonstruktion eines Rattenhirns aus hochaufgelösten Bildern von histologischen Serienschnitten. *Procs BVM* 2004; 204–208.
6. Alleysson D, Süsstrunk S. Spatio-chromatic PCA of a mosaiced color image. *Procs European Conf on Color in Graphics, Imaging and Vision* 2004.
7. Baker S, Matthews I. Lucas-Kanade 20 years on: A unifying framework. *Int J Comp Vis* 2004;56(3):221–255.
8. Rexilius J, Spindler W, Jomier J, et al. A Framework for algorithm evaluation and clinical application prototyping using ITK. *The Insight Journal* 2005.