Registrierung einer hochaufgelösten histologischen Schnittserie eines Rattenhirns

Oliver Schmitt[a)] und Jan Modersitzki[b)]

Institute für Anatomie[a)] und Mathematik[b)]
Medizinische Universität zu Lübeck, 23538 Lübeck
Email: schmitt@anat.mu-luebeck.de, modersitzki@math.mu-luebeck.de

Zusammenfassung. Die dreidimensionale Darstellung von Bildfolgen, die auf makroskopischen oder mikroskopischen Serienschnitten basieren, ist ein in der Anatomie häufig auftauchendes Problem. Die meist linear und nicht-linear deformierten umfangreichen Bilddaten erfordern eine effiziente und morphologisch befriedigende Korrektur, um anatomisch relevante 3D-Rekonstruktionen zu erzeugen. Um eine mikroskopisch interessante Information zu erhalten, müssen histologische Schnitte hochaufgelöst digitalisiert werden. Es wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Artefakt anfälligen hochaufgelösten Bilder effizient registriert, um so einen hinreichenden Ausgangsunkt für eine nicht-lineare elastische Registrierung zu erhalten. Die Ergebnisse verschiedener Parameter-Konfigurationen und eine Beurteilung der resultierenden 3D-Morphologie werden hier vorgestellt.

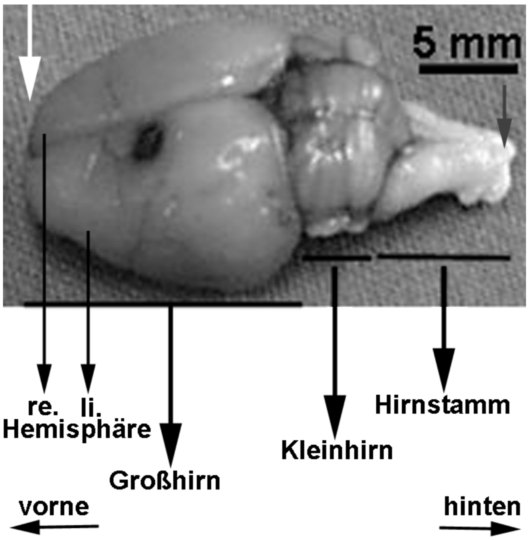
1 Einleitung

Die Registrierung von histologischen Schnitten beinhaltet besondere Probleme, die bei der Anpassung von tomographischen oder episkopischen Bildserien nicht auftreten. Hierbei handelt es sich z.B. um Einbettungs-, Schneide-, Streckungs-, Färbe- und Eindeckartefakte, die in den histologischen Schnitten unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Zu den nicht-linearen Artefakten zählen Einrisse, Ausrisse, Fragmentierungen und Faltenbildung des histologischen Gewebes (Abb. 2). Bei Schnittserien komplexer, windungsreicher Hirne, wie z.B. dem menschlichen Gehirn oder aber auch schon im Bereich des Kleinhirns einer Ratte, treten multiple Kappenanschnitte auf. In folgenden Schnitten ist dann eine Zusammenführung dieser multiplen Objekte auf ein einziges Objekt zu erwarten.

Hier werden drei Verfahren zur linearen Registrierung eines kompletten Hirnes untersucht. Das Resultat einer qualitativ hochwertigen linearen Registrierung kommt als Ausgang für eine anschließende nicht-lineare Registrierung, wie z.B. dem sogenannten Elastic-Matching, eine besondere Bedeutung zu.

Da aus den histologischen Schnitten monomodale Bilder erzeugt werden, die sich anhand statistischer Kenngrößen homogenisieren lassen, wurde der Registrierung ein Grauwert-basiertes Distanzmaß zugrunde gelegt. Auf einen rechenintensiveren Mutual-Information basierten Ansatz konnte daher verzichtet werden.

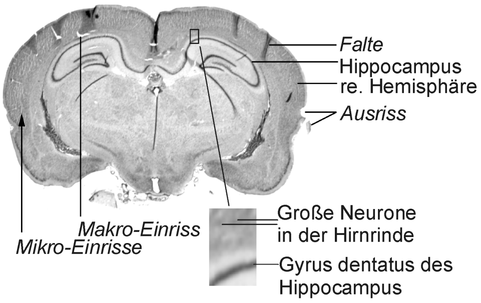
Abb. 1. Gehirn einer Ratte, nachdem es aus dem Schädel präpariert wurde. Die Hemisphären des Großhirns, das Kleinhirn und der Hirnstamm lassen sich auf den Rekonstruktionen eindeutig wiederfinden. Die für das Kleinhirn typische Faltenbildung ist in dieser Abbildung ebenfalls erkennbar. Der helle Pfeil (links) markiert die Lage des letzten und der graue Pfeil (rechts) des ersten histologischen Schnittes. Das Präparat ist also von hinten nach vorne in der sog. Frontalebene (=Koronarebene) aufgeschnitten worden.



2 Material und Methode

Das Gehirn einer Sprague-Dawley Ratte (Abb. 1) wurde in einer 4% Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Eine Schnittserie von insgesamt 503 Schnitten mit einer Schnittdicke von ca. 20 x 10^{-6} m wurde mit Gallocyanin Chromalaun gefärbt [1, 2]. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem hochauflösenden transparenten Flachbettscanner (Duoscan, Agfa) bei einer Auflösung von 4000 ppi digitalisiert (ca. 2300 x 2000 Pixel große Bilder) (Abb. 2).
Die Grauwertverteilungen der Bilder wurden anhand statistischer Kenngrößen homogenisiert. Die Grauwertcharakteristika Mittelwert und Varianz eines jeden Bildes wurden standardisiert. Als Referenzgröße diente eine Medianfilterung der Charakteristika der umgebenden Bilder. Kleinere Artefakte und abgerissene Gewebepartikel wurden mit einem morphologischen Opening-Filter entfernt. Das Gewebe wurde durch Schwellwertfilter segmentiert und in ein standardisiertes Bild eingebettet, so dass nun alle Bilder dieselbe Größe und vergleichbare Dynamik, Mittelwert und Hintergrundwert aufweisen.

Abb. 2. Beispiel eines hochaufgelösten histologischen Schnittes (426) durch das Rattenhirn. Typische Artefakte sind kursiv bezeichnet. In der gefensterten ROI lassen sich bei dieser Auflösung die unscharfen Umrisse sehr großer Nervenzellen (Neurone) erkennen.



Die monomodalen Bilder 2-dimensionaler Projektionen weisen globale und lokale Verzerrungen auf. Zu den globalen Verzerrungen gehören insbesondere affin-lineare Verzerrungen, d.h. Translation (T), Rotation (R) aber auch Scherung und Skalierung (SS) [3]. Global projektive und nicht-lineare sowie lokale Verzerrungstypen sollen hier zunächst nicht betrachtet werden, da die globalen TRSS-Komponenten, physikalisch bedingt, den größten Anteil an den Verzerrungen zwischen aufeinanderfolgenden Bildern besitzen. Das vorliegende Anpassungsproblem lässt sich nach [4] wie folgt spezifizieren:

- Merkmalsraum: Bildintensitäten
- Suchraum: affin-lineare Transformationen bzw. geeignete Teilmengen
- Suchstrategie: Minimierung des Distanzmaßes

  $$\|T \circ \phi - R\|$$

  mittels Gauss-Newton-Verfahren (ϕ: Abbildung, T: Template-Bildes, R: Referenz-Bild),
- Ähnlichkeitsmaß: mittlere Grauwertdistanz der Bilder.

Zur Lösung des globalen Anpassungsproblems wurden vier Ansätze verfolgt:

(a) principal axis transformation (PAT) [5–9]
(b) PAT mit Minimierung der Scherung
(c) PAT mit Minimierung der Translation, Rotation und Scherung bei Vorgabe von statistischen geschätzten Skalierungskomponenten (α optimal)
(d) PAT mit Minimierung der Parameter Translation, Rotation, Scherung und Skalierung (partial optimal).

Als Startwerte für die Minimierungsverfahren dienten dabei die aus der PAT [5–9] gewonnenen Referenzgrößen. Hierbei wurde eine robuste Variante ausgenutzt. Diese basiert hier auf der Schätzung der unimodalen Dichten durch eine Cauchy-Dichte mittels der sogenannten Kullback-Leibler-Distanz [10, 11]. Im Vergleich zum Standardverfahren erwies sich dieser Ansatz bei den mit relativ großen Artefakten versehenen Rattenbildern als vorteilhaft. Zur Regularisierung der Optimierung wurde ein Haar-Wavelets Mehrskalenansatz verfolgt.

3 Ergebnisse

Alle vier Registrierungen des Rattenhirns zeigten in der dreidimensionalen Rekonstruktion ein morphologisch deutlich besseres Ergebnis als der nicht registrierte Datensatz (Abb. 3). Das anatomisch beste Ergebnis wurde mit Verfahren (c) erzielt. Exemplarisch ist ein feineres Detail des Hirns in einer 3D-ROI dargestellt (Abb. 4). Es zeigt eine realistische und konsistente Morphologie, wobei die Geometrie des konvergenten Interhemisphärenspaltens erhalten bleibt und die Ränder eine realistische Glattheit aufweisen.

Abb. 3. Links ist die 3D-Rekonstruktion des nicht registrierten Datensatzes dargestellt, auf der rechten Seite jene nach der PAT partial optimalen Anpassung.

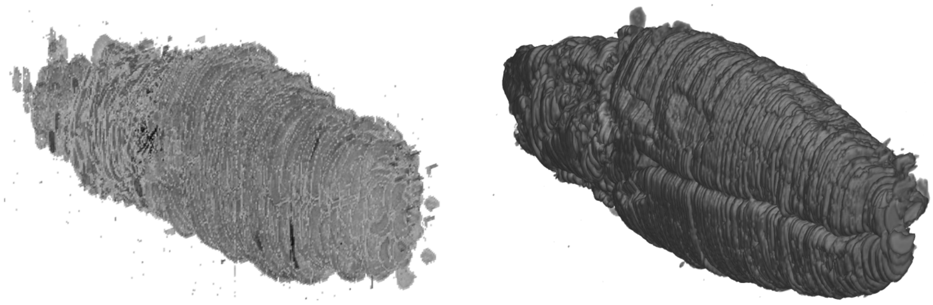
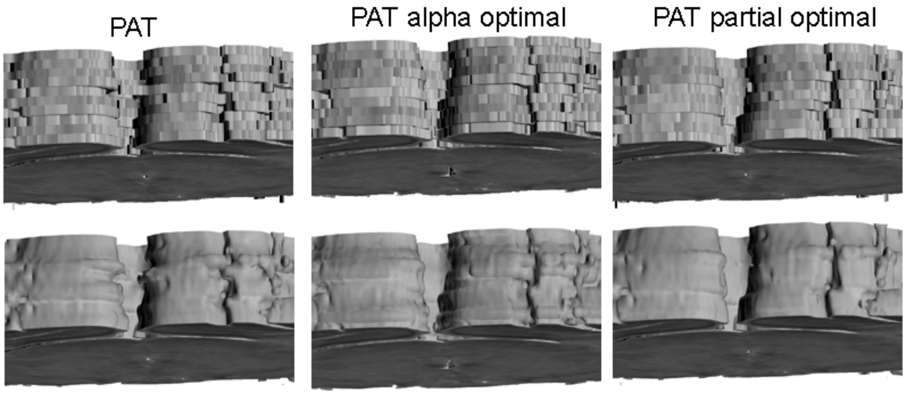


Abb. 4. Der Interhemisphärenspalt wurde als ROI von den Schnittbildern 229 bis 238 vergrößert. Das partial-optimale PAT Verfahren ergibt das morphologisch günstigste Resultat. Die unteren 3D-Rekonstruktionen wurden geglättet.



4 Diskussion

Alle drei Registrierungstechniken erzielten bei den mit relativ starken Artefakten versehenen Schnittbildern des Rattenhirns befriedigende Ergebnisse. Insbesondere konnte hier das gesamte Gehirn unter Berücksichtigung der Gewebegröße registriert werden. Für eine weitere nicht-lineare Registrierung, auf die bei dem Rattenhirn aufgrund der erwähnten Artefakte verzichtet wurde, ergibt insbesondere die Variante (c) eine gute Ausgangssituation für die nachfolgende nicht-lineare Registrierung. Dies zeigen auch erste Ergebnisse einer auf Gewebeelastizität beruhenden, nicht-linearen 3D-Registrierung von hochaufgelösten Schnitten eines Teils des menschlichen Gehirns.

Bevor jedoch eine Bildregistrierung durchgeführt wird, müssen die Bilddaten restauriert werden, um Fehler bei der Anpassung zu vermeiden und das Anpassungsergebnis zu verbessern. Noch erfordert dieser Schritt einen Experten, der sowohl über ausreichende morphologische Vorstellungskraft als auch über Wissen von den spezifischen Effekten von Bildverarbeitungsprozeduren verfügt. Inwieweit eine derartige Vorverarbeitung gerade in Hinblick auf Rissbildung und Fragmentierung automatisierbar ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5 Literatur

1. Schmitt O, Eggers R High contrast and homogeneous staining of paraffin sections of whole human brains for three dimensional ultrahigh resolution image analysis. Biotech Histochem 73: 44-51, 1997.
2. Schmitt O, Eggers R: Systematic investigations of the contrast results of histochemical stainings of neurons and glial cells in the human brain by means of image analysis. Micron 28: 197-215, 1997.
3. Elsen PA van den, Pol E-JD, Viergever MA: Medical image matching – a review with classification. IEEE Eng. Med. Biol. 12: 26-39, 1993.
4. Brown LG: A survey of image registration techniques. ACM Computing Surveys 24: 325-276, 1992.
5. Alpert NM, Bradshaw JF, Kennedy D, Correia JA: The principal axes transformation - a method for image registration. J Nuc Med 31: 1717-1722, 1990.
6. Banerjee PK, Toga AW: Image alignment by integrated rotational and translational transformation matrix. Phys Med Biol 39: 1969-1988, 1994.
7. Toga AW, Ambach K, Quinn B, Hutchin M, Burton JS: Postmortem anatomy from cryosectioned whole human brain. J Neurosci Meth 54: 239-252, 1994.
8. Schormann T, Zilles K (1997) Limitations of the principal axes theory. IEEE Trans Med Imag 16: 942-947
9. Schormann T, Darbinghaus A, Zilles K (1997) Extension of the principle axes theory for the determination of affine transformations Proceedings of the 19. DAGM-Symposium: Mustererkennung 1997. Informatik Aktuell: 384-391
10. Kullback S, Leibler RA: On information and sufficiency. Ann. Math. Statist. 22: 79-86, 1951.
11. Linhart H, Zuchini W: Model Sellection. Wiley, New York, 1986.