Untersuchungen zur Rekonstruktion netzartiger Tumorinvasionsfronten anhand histologischer Serienschnitte

Ulf-Dietrich Braumann[1] und Jörg Galle[2]

[1]Institut für Informatik Universität Leipzig, 04109 Leipzig
Email: ulf@informatik.uni-leipzig.de
[2]Interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik, Universität Leipzig, 04103 Leipzig
Email: jgalle@imise.uni-leipzig.de

Zusammenfassung. Zu einer besseren Beschreibung und Typisierung der Ausbreitungsmuster von Tumoren sollen deren Invasionsfronten in das umliegende gesunde Gewebe basierend auf histologischen Serienschnitten dreidimensional rekonstruiert werden. Im Vordergrund dieser Arbeit steht daher die Registrierung von VOIs aus dem Bereich dieser Invasionsfronten. Angewendet und gegenübergestellt werden zwei ridige intrinsische Verfahren: voxelbasierte und kantenbasierte Registrierung. Die Gewebestücken werden im Bereich der Invasionsfront rekonstruiert und die darin enthaltene räumliche Struktur des Tumorgewebes dreidimensional visualisiert.

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden Tumoren des Gebärmutterhalses (sog. Zervixkarzinome) untersucht. Für deren Prognose sind neben Metastasen auch histologische Faktoren entscheidend.

Mit Hilfe von eiweißabbauenden Enzymen eigener Produktion vermag sich das Karzinom im Gewebe auszubreiten. Diese Invasion kann in verschiedenen morphologisch abgrenzbaren Mustern erfolgen. Neben dem *geschlossenen* Ausbreitungsmuster mit einer kompakten Invasionsfront ohne Ausläufer treten bei Zervixkarzinomen auch deutlich weniger kompakte Typen mit schlechterer Prognose auf. Die Palette erstreckt sich von sog. *plumpen* bis hin zu *netzartig-diffusen* Formen. Diese Typisierung erfolgte bisher nur anhand von 2D-Einzelschnitten. Über die tatsächlichen morphologischen Details dieser Ausbreitungsmuster ist bisher wenig bekannt. Von ihrer genauen Untersuchung werden u. a. Schlußfolgerungen für die Bestimmung des erforderlichen Umfanges der operativen Tumorresektion erwartet. Eine konkrete Fragestellung ist dabei, ob die im 2D-Schnitt inselartig erscheinenden Tumorstrukturen tatsächlich isoliert oder angeschnittene Ausläufer eines räumlich zusammenhängenden Primärtumors sind.

Generell wird die Gewebsanalyse am bereits resezierten Zervixgewebe durchgeführt. Hierzu werden am Mikrotom routinemäßig histologische Schnitte gewonnen, diese einzeln präpariert und immunhistochemisch gefärbt, auf mikroskopische Objektträger aufgebracht und vom Pathologen lichtmikroskopisch ausgewertet. Während routinemäßige Untersuchungen auf Einzelschnitte beschränkt bleiben, ist für eine dreidimensionale Rekonstruktion zur Analyse der Grenzflächen des Tumors das Anlegen von Serienschnitten erforderlich. Die generell bei derartigen Schnitten (Schnittdicke: 5..10μm) auftretenden Artefakte erschweren eine derartige Rekonstruktion des *Gesamtpräparates* jedoch erheblich.

Im besonderen erfordern nichtlineare Verzerrungen aufwendigere nichtlineare Registrierungen (siehe z. B. [1]). Der dafür notwendige Aufwand verringert sich wesentlich, wenn bereits auf eine gute Registrierung der Serienschnitte durch lineare Transformationen zurückgegriffen werden kann (globale Verschiebungen müssen nicht lokal korrigiert werden). Eine grundsätzliche Vereinfachung ergibt sich im vorliegenden Fall aus der pragmatischen *Beschränkung auf VOIs*, die sich zentral im Präparat befinden. Zugleich soll die Frage beantwortet werden, ob die (nicht)linearen Verzerrungen hier hinreichend klein bleiben, um eine akzeptable Rekonstruktion der Invasionfront basierend auf einer *rigiden* Registrierung durchführen zu können.

Vorliegende Arbeiten zur Registrierung histologischer Serienschnitte befassen sich häufig mit der Rekonstruktion von Gehirnen [1–3] oder des Herzens [4], jedoch nur punktuell mit den Besonderheiten von Tumorgeweben (Beispiel für einen gynäkologischen Tumor in [5]). Grundlage für die Registrierung histologischer Serienschnitte allgemein sollten Strukturen bilden, die sich deutlich über zwei adjazente Schnitte hinaus fortsetzen. Für das konkrete Bildmaterial wird zunächst vermutet, daß für Einzelzellen und kleinere Zellverbände jedoch häufig eine direkte Entsprechung im Folgeschnitt fehlt. A priori ist zu erkennen, daß auf den Einzelschnitten gute Kontraste vorliegen und sich das dunkel erscheinende Tumorgewebe gut abgrenzen läßt (Abb. 1 links und Mitte). Vor diesem Hintergrund soll die Frage beantwortet werden, ob eine kantenbasierte Registierung (siehe z. B. [6]) für Serienschnitte von Tumorgeweben Vorteile gegenüber der voxelbasierten Registrierung besitzt und eine bessere Rekonstruktion erlaubt (Abb. 1 rechts: Kantenbild des geglätteten Ausgangsbildes).

2 Methodik

Die zugrundeliegenden Serienschnitte werden zunächst mit besonderer Sorgfalt präpariert (Schnitterstellung und immunhistochemische Färbung zur Kontrasterhöhung von Tumorgewebe vs. Parenchym) und auf mikroskopische Objektträger aufgebracht, bevor sie anschließend digitalisiert werden. Problematisch ist dabei, daß die Färbung einer zeitlichen Drift unterliegt und die Färbechemikalien häufig neu angesetzt werden müssen. Dennoch treten in adjazenten Schnitten stellenweise stark unterschiedliche Tumor-Parenchym-Kontraste auf. Durch Histogrammausgleich auf jedem Einzelschnitt konnten diese Diskontinuitäten gut kompensiert werden.

Da die Annahme getroffen wurde, daß am Bereich der VOIs nur geringe Verzerrungen auftreten, wird eine rigide Registrierung (nur Translationen und Rotationen) im Ortsraum verwendet. Kriterium ist die Minimierung der Summe der quadratischen Differenzen. Es wird eine hierarchische Technik in drei Stufen eingesetzt (Oktavabstand, zwei Oktaven Umfang) und die numerische Minimierung für die beiden unterabgetasteten Stufen des Luminanzbildes mittels Gauß-

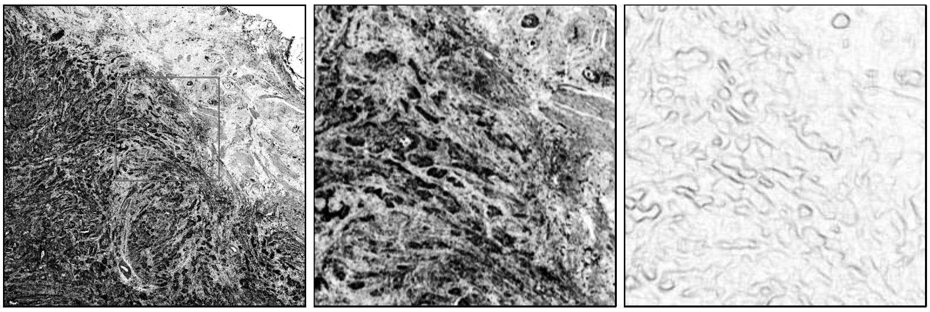

Abb. 1. Einzelschnitt durch das Zervixkarzinompräparat: Ausschnitt aus dem Verlauf der Invasionsfront des Tumors (links, Tumorzellen dunkelgrau bis schwarz) mit ROI (Mitte), in der das räumliche Ausbreitungsmusters rekonstruiert wird. Dargestellt ist bereits das durch Histogrammausgleich kontrastverstärkte Luminanzbild des originalen RGB-Farbbildes. Das Kantenbild der geglätteten ROI (rechts) wird alternativ als Registrierungsgrundlage (nur auf der Originalauflösungsstufe) herangezogen.

Newton-Verfahren vorgenommen. Auf der Stufe der Originalauflösung wurden gegenübergestellt:

1. direkte Verwendung der Luminanzbilder und
2. Verwendung kantengefilterter 3×3-mediangefilterter Luminanzbilder.

Die nichtlineare Glättung war zur Rauschunterdrückung für das empfindliche Sobel-Kantenfilter erforderlich.

3 Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Es wurden für ca. 100 Schnitte in zwei VOIs sowohl Abweichungen der Translation als auch der Rotation sowie die erforderlichen Iterationsschritte für die beiden Verfahrensweisen gegenübergestellt. Die Unterschiede blieben unter folgenden Werten: Translation 3 Pixel, Rotation 1,0°, Verhältnis der Iterationsschritte 2 : 3 (Verfahren 1 : 2). Die größere Schrittzahl bei Verfahren 2 zeigt, daß kantenbasiert die rigide Registrierung etwas unsicherer ist. Als Ursache dafür werden vorrangig die vernachlässigten nicht-rigiden Verzerrungen angesehen.

Die Unterschiede wirkten sich anschaulich in der Visualisierung der Rekonstruktion der Invasionsfronten jedoch kaum aus. Um das Verfahren handhabbar zu halten, wurde sich auf die Rekonstruktion eines Ausschnittes von 0,22mm$\times$ 3,25^{2}mm^2 (in Voxeln: 31×256^2 bei einer Schnittdicke von 7μm und 2000dpi Bildauflösung) beschränkt. Die Visualisierung des rekonstruierten Tumorgewebes im Bereich der Invasionsfront mit nahezu 250 000 Polygonen (Abb. 2) erfolgte mittels Polypaint-Polygonisierung und Gouraud-Schattierungsinterpolation. Zu erkennen ist, daß das gewählte VOI der Invasionsfront von Tumorzellschichten durchzogen ist, die sich meist über das VOI hinaus fortsetzen. Auch eine Vielzahl kleiner, eng begrenzter Inseln ist vorhanden, neben zwei bis drei sich durch alle Schichten erstreckenden dickeren röhrenfömigen Strukturen (oben).

Vorläufig kann zusammengefaßt werden, daß mit der verwendeten rigiden Registrierung eine akzeptable Grundlage zur Rekonstruktion gelegt wurde. Genauere Interpretationen der rekonstruierten Invasionsfronten in Zusammenarbeit mit den medizinischen Kooperationspartnern werden folgen. Zur Verbesserung der Rekonstruktion ist (ähnlich zu [1]) geplant, ein hochaufgelöstes Bild (Auflichtmikroskopie) jeder äußeren Schnittfläche *vor* der Ausführung jeden Schnitts am Mikrotom als Referenz anzufertigen und dann zusätzlich elastische Registrierungsmethoden einzusetzen.

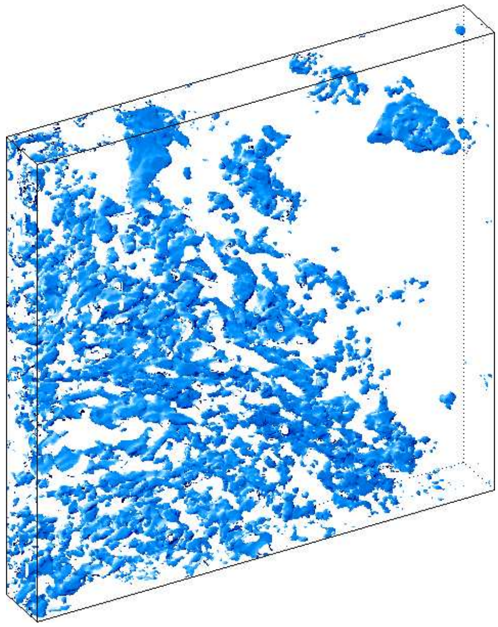

Abb. 2. Visualisierung der Rekonstruktion einer netzartigen Tumorinvasionsfront (korrespondierend zu Abb. 1).

Danksagung Die Autoren danken Dr. Jens Einenkel aus der Universitäts-Frauenklinik Leipzig für die Bereitstellung der zugrundeliegenden Gewebeproben.

Literatur

1. Schormann T, Zilles K: Three-Dimensional Linear and Nonlinear Transformations: An Integration of Light Microscopical and MRI Data. Hum Brain Mapp 6:339-347, 1998.
2. Modersitzki J, Schmitt O, Fischer B: Effiziente, nicht-lineare Registrierung eines histologischen Serienschnittes durch das menschliche Gehirn. Procs BVM 2001:179–183, 2001.
3. Schmitt O, Modersitzki J: Registrierung einer hochaufgelösten histologischen Schnittserie eines Rattenhirns. Procs BVM 2001:174–178, 2001.
4. Kahn N, Hektor J, Grebe R: Dreidimensionale Rekontruktion von Organene aus histologischen Serienschnitten. Procs BVM 1996:113–118, 1996.
5. Ourselin S, Roche A, Subsol G, Pennec X, Sattonnet, C: Automatic Alignment of Histological Sections for 3D Reconstruction and Analysis. TR INRIA Nr. 3595, 1998.
6. Maintz JBA, van den Elsen PA, Viergever MA: Using Geometrical Features to match CT and MR Brain Images. In: Studies in Health Technology and Informatics 19:43–52, 1995.