

Verfahren zur hochgenauen 3D-Rekonstruktion aus histologischen Schliffbildern

Waldemar Würfel¹, Andreas Hussong², Anna Herzog², Peter Erfurt¹,
Omid Majdani¹, Thomas S. Rau¹

¹Klinik und Poliklinik für HNO, Medizinische Hochschule Hannover

²Institut für Mechatronische Systeme, Leibniz Universität Hannover

rau.thomas@mh-hannover.de

Kurzfassung. Vorgestellt wird ein Verfahren zur präzisen Erstellung von 3D-Modellen anatomischer Strukturen aus äquidistanten, histologischen Schliffbildern. Dazu wird der Bildstapel zueinander registriert und ins DICOM-Format konvertiert. Der so entstandene Schliffbild-Datensatz bietet eine hochdetaillierte Auflösung und kann analog zu bzw. in Kombination mit konventionellen Bildgebungsverfahren verwendet werden. So wird die Segmentierung sehr feiner Weichgewebsstrukturen ermöglicht, die sich in herkömmlichen Modalitäten nicht oder nur schlecht abbilden. Erstmals wurde dabei die Rekonstruktionsgenauigkeit eines auf histologischen Schnitten basierenden Verfahrens anhand eines Referenzobjektes untersucht, und das Potential des vorgestellten Verfahrens validiert.

1 Einleitung

In den vergangenen Jahren treten zunehmend Anwendungsfälle auf, in denen die Forderung nach hoher Auflösung in Kombination mit der Notwendigkeit einer adäquaten Weichgewebsdifferenzierung mit aktuellen Bildgebungsverfahren wie Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) nicht zufriedenstellend gelöst werden kann. Im Bereich der lateralen Schädelbasis ist z.B. im Kontext der Cochlea-Implantat-Versorgung die Darstellung und Bestimmung der Lage membranöser Strukturen der Hörschnecke (Cochlea) wie der Basilarmembran von großem Interesse. Verfügbare Mikro-CT ermöglicht nur bei Hochkontraststrukturen wie Knochen ausreichend detaillierte Aufnahmen; Weichgewebsstrukturen wie die Basilarmembran müssen erst aufwendig durch Einsatz von Kontrastmitteln der Bildgebung zugänglich gemacht werden [1].

Daher sind für die Erstellung detaillierter Anatomiemodelle mit submillimetrischer Genauigkeit schichtweise Präparationsverfahren das aktuelle Mittel der Wahl. Im Bereich der Modellierung des Mittelohres wurden dazu bereits Verfahren ausführlich beschrieben [2]. Ebenso verwendeten Sørensen et al. ein schneidendes Verfahren zur Gewinnung der Daten für das „Visible Ear Project“ [3, 4]. Besonders nennenswert in diesem Kontext ist zudem die Erstellung der „mouse cochlea database“ [5], bei dem durch ein optisches Verfahren (orthogonal-plane fluorescence optical sectioning microscopy, OPFOS) gewonnene Schichtbilder zu

einem 3D-Modell zusammengefügt wurden. Allen Verfahren ist jedoch gemein, dass die Genauigkeit der Rekonstruktion nicht untersucht wurde und zudem häufig komplexe chemische Vorbereitungsschritte einschließlich Dekalzifizierung notwendig sind, deren Einfluss auf die geometrische Gestalt der anatomischen Strukturen unbekannt ist. Bei dem hier vorgestellten, leicht zu reproduzierenden Verfahren kann durch die Verwendung einer Schlißtechnik auf den Schritt der Dekalzifizierung verzichtet werden. Zudem wurde die Methodik hinsichtlich der Rekonstruktionsgenauigkeit untersucht, für welche die Realisierung eines präzise bestimmbar Schichtabtrages notwendig ist. Hintergrund dieser Entwicklung ist das Ziel, aus diesen Schlißbildern einen Anatomieatlas einschließlich der relevanter Weichgewebsanatomie zu erstellen, durch welchen die patientenindividuellen CT-Aufnahmen um fehlende Informationen, wie z.B. die Lage der Basilar membran, ergänzt werden können. Um die Fusion mit anderen Modalitäten einfach zu gestalten und die Verwendung in konventioneller Software zu gewährleisten, war es Ziel, aus den Schlißbildern DICOM-Daten zu generieren.

2 Material und Methode

2.1 Probenvorbereitung

Das Präparationsverfahren basiert auf einem Kalteinbettverfahren mit Epoxidharz. Die zugeschnittenen, in einem Phosphatpuffer fixierten und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrierten Proben wurden mit Hilfe einer Silikongussform in gefärbtem Epoxidharz eingebettet (Abb. 1a), welches mit Hilfe einer Vakuumkammer entgast wurde, um sämtliche Gasblasen aus Kavitäten der Probe zu entfernen. Durch das Färben des Harzes mit undurchsichtigem Farbstoff wird sichergestellt, dass lediglich in der Schlißebene liegende Strukturen sichtbar sind (Abb. 1b), was die Identifizierung von Konturen bei der späteren Segmentierung erleichtert. Zur Erprobung des Präparationsverfahrens wurde zunächst ein Referenzkörper herangezogen, dessen bekannte geometrische Dimensionen eine Beurteilung der Rekonstruktionsgüte erlaubten (LEGO®Group, Billund, Dänemark). Im Folgenden wurde das Verfahren dann auf frisch entnommene, humane Mittel- und Innenohrpräparate angewendet.

Nach dem Aushärten wurden die Proben auf das Maß eines speziell angefertigten Handprobenhalters (Abschn. 2.2) abgedreht. Im Falle der Humanpräparate wurden zusätzliche Nuten auf dem Zylindermantel gefräst, um für die Beurteilung der Güte der Fusion der verschiedenen Datensätze über Referenzmarkierungen zu verfügen. Anschließend erfolgte der Scan der Proben mittels flächendetektorbasierter Volumen-CT (fd-VCT, GE Corporate R&D).

Für die Registrierung der einzelnen Schlißbilder wurden mit Hilfe einer CNC-Maschine 3,2 mm durchmessende Bohrungen senkrecht zur Schlißebene eingebracht und diese mit kontraststarken Kunststoffstiften gefüllt (Abb. 1b). Die Lage der Bohrungen wurde mit Hilfe des jeweiligen fd-VCT Datensatzes geplant, um keine relevanten anatomischen Strukturen zu beschädigen. Für die Übertragung der Planungsdaten auf die Probe wurden die gefrästen Nuten her-

angezogen. Der bekannte Abstand der Registrierungsmarker diene später zudem zur Skalierung der Bilder.

2.2 Schliffpräparation

Um einen präzisen, äquidistanten Abstand der Schliffbilder zu realisieren, wurde ein spezieller Probenhalter entwickelt (Abb. 1b), welcher über ein Feingewinde die genaue Einstellung des gewünschten Schichtabtrages erlaubt. Dazu wird ein abriebsfester Hartkeramikring bezogen auf die Probenoberfläche derart verstellt, dass die gewünschte Probendicke diesen überragt und bei Druck auf die Schleifscheibe bis auf die Ebene des Keramikringes abgetragen wird. Im konkreten Fall wurden $100\ \mu\text{m}$ Schritte gewählt, was einen Kompromiss zwischen Rekonstruktionsgenauigkeit und zeitlichem Gesamtaufwand bei ca. 5 min Bearbeitungszeit pro Schichtbild darstellt. Geringere Schichtabstände sind technisch jedoch ohne weiteres möglich.

Nach jedem Schleifschritt wurde der tatsächliche Abtrag mit einem Wegsensor (Heidenhain Specto ST 3078, Dr. Johannes Heidenhain GmbH, Traunreut) mikrometergenau vermessen und dokumentiert. Die Bilddatenakquirierung erfolgte mittels Auflichtmikroskopie und 5-Megapixel Digitalkamera.

2.3 Bildregistrierung und DICOM-Generierung

Für die automatisierte Registrierung der Schichtbilder wurde in Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) ein entsprechender Algorithmus realisiert, welcher nach geeigneter Bildvorverarbeitung mittels Hough-Transformation die

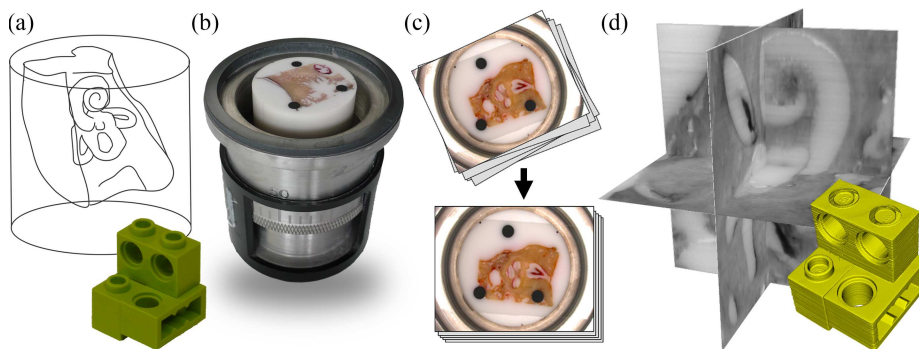


Abb. 1. (a) Schemazeichnung des eingebetteten und auf Mittel- und Innenohr beschnittenes Felsenbeinpräparat sowie der LEGO-Baugruppe. (b) Handprobenhalter mit eingespannter Probe. Sichtbar sind die drei eingebrachten Registrierungsmarker. (c) Schema der Registrierung des Bildstapels unter Verwendung der eingebrachten Registrierungsmarker. (d) 3D-Ansicht des als DICOM exportierten Schichtbilddatensatzes sowie die durch Segmentierung gewonnene 3D-Rekonstruktion des Referenzobjektes im STL-Format.

Registrierungsmarker detektiert (Abb. 1c) und entsprechend zum Basisbild ausgerichtet. Der so entstandene Bildstapel wurde anschließend auf die relevanten Strukturen beschnitten und diente als Grundlage für den DICOM-Export.

Der DICOM-Export erfolgte ebenfalls aus Matlab, um die für das DICOM-Format notwendigen Header-Einträge für jedes Bild spezifisch generieren zu können. Der Header-Einträge `pixel spacing` wurde aus dem tatsächlichen Abstand der Registrierungsmarker und dem entsprechenden Pixelabstand im Bild berechnet. Des Weiteren wurde die `slice thickness` zu 0,001 mm gewählt, um den zweidimensionalen Charakter der Schlifffbilder zu repräsentieren. Die `slice location` für jedes Schlifffbild errechnete sich als kumulativer Abstand aller bis dahin gemessenen Schichtabstände.

3 Ergebnisse

Der generierte DICOM-Datensatz konnte erfolgreich mit der kommerziellen Software PatXfer 5.2 eingelesen und in die Planungs- und Segmentierungssoftware iPlan 2.6 ENT (beide BrainLAB AG, Feldkirchen) übertragen werden. Damit stehen die histologischen Schlifffbilder als 3D-Datensatz gleichberechtigt zu anderen Modalitäten wie CT oder MRT zur Verfügung (Abb. 1d). Die Fusion dieser verschiedenen Bildgebungsverfahren ist damit möglich.

Die Segmentierung des Referenzobjektes erfolgte unter Verwendung eines schwellenwertbasierten Algorithmus. Dabei zeigte sich die zuverlässige Reproduktion der einstigen LEGO-Steine als nun virtuelles Modell (Abb. 1d). Nach der Segmentierung erfolgte der Export über die VVLink Schnittstelle ins STL-Format. Dies erlaubt die weitere Nutzung der Segmentierungsdaten in beliebigen CAD- oder FEM-Anwendungen. Konkret erfolgte der Import der STL-Datei in eine in C++ programmierte Vermessungssoftware – basierend auf dem Visualization Toolkit (Kitware, Clifton Park, NY, USA). Die dortige Vermessung der LEGO-Baugruppe diente zur Evaluierung der Zuverlässigkeit und Präzision der Rekonstruktion. So konnten rechte Winkel bzw. die Parallelität von Ebenen und Körperkanten mit einem mittleren Fehler von $0,3^\circ \pm 0,1^\circ$ erhalten werden. Die Länge von Körperkanten innerhalb der Schliffebene gelang mit einem mittleren Fehler von $2,0\% \pm 0,4\%$; Längen in Richtung des kritischen Schliffabtrages waren lediglich mit einem mittleren Fehler von $0,6\% \pm 0,3\%$ behaftet.

Bei den Felsenbeinpräparaten dienten die gefrästen Referenznuten zur Überprüfung der Rekonstruktionsgenauigkeit. Diese Strukturen sind sowohl im fdVCT-Datensatz als auch in den Schlifffbildern sichtbar, so dass nach der Fusion der beiden Datensätze deren Übereinstimmung vermessen werden konnte. Hier zeigten sich maximal Abweichungen von 0,2 mm, was in der Größenordnung der Auflösung der fdVCT-Daten liegt.

4 Diskussion

Die vorgestellte Methode erlaubt die hochgenaue 3D-Rekonstruktion anatomischer Strukturen aus histologischen Schlifffbildern. Diese können als Grundlage

zur Gewinnung von Anatomieatlanten für die modellbasierte Bildgebung dienen oder auch direkt als Basis für FEM-Untersuchungen genutzt werden.

Das gewählte Kalteinbettverfahren sichert den strukturellen Erhalt der wichtigen Weichgewebsstrukturen, wie z.B. der Basilarmembran, Stria vascularis oder Bänder und Muskel des Mittelohres. Darüber hinaus hat der Einsatz eines Schleifverfahrens im Gegensatz zum weitverbreiteten Schneiden mittels Mikrotom weitere Vorteile. So können harte Materialien wie Knochen direkt verarbeitet werden (wodurch der chemische Schritt der Dekalzifizierung entfällt) und metallische Implantate mit fixiert und ausgewertet werden. Die Einbettung in das harte Epoxidharz sichert zudem besser den Erhalt der geometrischen Abmessungen und Lagebeziehungen, als z. B. eine Einbettung in Paraffin, bei welcher durch die geringe mechanische Festigkeit der Einbettung, für eine exakte räumliche Rekonstruktion inakzeptable Gewebsverzerrungen zu verzeichnen sind.

In dieser Studie wurde erstmalig die Rekonstruktionsgenauigkeit anhand eines Referenzobjektes für eine derartige Präparationsmethode untersucht. Der mittlere Rekonstruktionsfehler von $0,6\% \pm 0,3\%$ zeigt deutlich, dass die Ausmessung des aktuellen Schichtabtrages und dessen spezifische Berücksichtigung beim Generieren der DICOM-Header ein zuverlässiges Verfahren ist.

Auch bei der Anwendung des Verfahrens auf Felsenbeinpräparate bestätigte sich die Zuverlässigkeit der Methodik. Da sich die Nuten im peripheren Bereich der Proben befinden und für den Fusionsalgorithmus nur die im Inneren liegenden Bereiche der eingebetteten Felsenbeine verwendet wurden, kann dort mit einem nochmals geringeren Fehler gerechnet werden. Im weiteren Verlauf der Arbeiten wird nun kontinuierlich die Stückzahl der aufbereiteten Proben erhöht und diese Daten als Grundlage für die Erstellung von hochaufgelösten 3D-Modellen des Mittel- und Innenohres einschließlich der Weichgewebsstrukturen verwendet.

Danksagung. Die Arbeiten wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter den Kennzeichen 01EZ-0832 /-0833 gefördert.

Literaturverzeichnis

1. Poznyakovskiy AA, Zahnert T, Kalaidzidis Y, et al. The creation of geometric three-dimensional models of the inner ear based on micro computer tomography data. *Hear Res.* 2008 Sep;243(1-2):95–104.
2. Sun Q, Chang KH, Dormer KJ, et al. An advanced computer-aided geometric modeling and fabrication method for human middle ear. *Med Eng Phys.* 2002 Nov;24(9):595–606.
3. Sørensen MS, Dobrzeniecki AB, Larsen P, et al. The visible ear: a digital image library of the temporal bone. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2002;64(6):378–81.
4. Wang H, Northrop C, Burgess B, et al. Three-dimensional virtual model of the human temporal bone: a stand-alone, downloadable teaching tool. *Otol Neurotol.* 2006 Jun;27(4):452–57.
5. Santi PA, Rapson I, Voie A. Development of the mouse cochlea database (MCD). *Hear Res.* 2008 Sep;243(1-2):11–7.