

Vollständige Rekonstruktion eines Rattenhirns aus hochaufgelösten Bildern von histologischen Serienschnitten

Stefan Wirtz¹, Bernd Fischer¹, Jan Modersitzki¹ und Oliver Schmitt²

¹Institut für Mathematik, Universität zu Lübeck, 23560 Lübeck

²Institut für Anatomie, Universität Rostock, 18055 Rostock

Email: wirtz@math.uni-luebeck.de

Zusammenfassung. Parameterfreie Algorithmen im Bereich der nicht-linearen Registrierung von Schnittbilddaten weisen relativ lange Laufzeiten auf. Werden hochaufgelöste Datensätze registriert, so ergibt sich die Forderung nach effizienten und stabilen Verfahren. Hochaufgelöste Schnittbilddaten werden bei der mikroskopischen Analyse zellulärer Strukturen erzeugt, um funktionelle Bilddaten von Zellverteilungen zu korrelieren. Die Bilddaten sind sehr umfangreich und weisen häufig Artefakte auf. Die Registrierung wird als Minimierungsproblem eines Funktionals aus Distanzmaß und Regularisierer formuliert. Die Minimierung führt zu einem System nichtlinearer partieller Differentialgleichungen, das direkt und effizient gelöst wird. Nach der Registrierung können histologische Details erkannt und neuroanatomische Strukturen korrekt zugeordnet werden, was ohne Registrierung unmöglich ist.

1 Einleitung

In den Neurowissenschaften ist es unerlässlich, den genauen Ort einzelner Neuronen bzw. bestimmter Strukturen und funktioneller Einheiten bestimmen zu können. Daher muss das biologische Material adäquat aufgearbeitet werden, um Strukturen im Mikrometerbereich und damit auf Zellebene sichtbar machen zu können. Hierzu wird das Gehirn in ca. $20\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte zerlegt, welche dann histologisch gefärbt werden. Diese gefärbten Gewebeschnitte können dann mit Hilfe eines Flachbettscanners oder eines motorisierten Videomikroskops in sehr hohen Auflösungen digitalisiert werden. Dadurch erhält man eine Serie von aufeinander folgenden und unausgerichteten Schichten, den sogenannten Serienschnitten.

Die im Herstellungsprozess entstandenen Deformationen und Artefakte wie Falten, Risse und Gewebeverlust, machen eine direkte Superpositionierung der Schichten unmöglich, d.h. ursprünglich kohärente Regionen benachbarter Schichten passen nicht mehr zu- bzw. aufeinander. Somit müssen die Gehirnschichten bei maximaler Auflösung registriert werden, um die kompletten dreidimensionalen Informationen wieder zu erhalten.

Die Digitalisierung der Gehirnschichten mit einer Auflösung von $6 \mu\text{m}/\text{Pixel}$, führt zu ca. 500 Bildern der Größe (1900×1900) Pixel mit Grauwerten (Intensitätswerten) zwischen 0 und 255. Wegen dieser enormen Datengröße (ca. 1.7 GB) sind extrem schnelle und effiziente Algorithmen notwendig.

Aufgrund der Art der Deformation haben wir den sogenannten elastischen Registrierungsansatz gewählt [1,2], der das elastische Verhalten der histologischen Schichten modelliert.

2 Methoden

Zu Beginn der Registrierung führen wir eine auf der Hauptachsentransformation basierende rigide Vorregistrierung durch, um Rotationsartefakte zu kompensieren und die zentrale Lage des Objekts im Bild zu gewährleisten [3]. Für den nichtlinearen Teil des Registrierungsprozesses benutzen wir einen variationellen Ansatz, um so zu einer schnellen und flexiblen Implementierung zu gelangen [4].

Ziel der Registrierung von Serienschichten mit Schichten $R := (R^{(1)}, \dots, R^{(M)})$, $R^{(\nu)} : \Omega \subset \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$, $\nu = 1, \dots, M$, ist es, Transformationen, bestehend aus dem Ort x und einem Verrückungsfeld $u := (u^{(1)}(x), \dots, u^{(M)}(x))$, $u^{(\nu)}(x) : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}^2$, $\nu = 1, \dots, M$, für jede einzelne Schicht zu finden, so dass benachbarte Regionen wieder korrekt zueinander ausgerichtet sind. Variationell formuliert bedeutet dies die Minimierung eines Funktionals

$$\mathcal{J}[R; u] := \mathcal{D}[R; u] + \alpha \cdot \mathcal{S}[u], \quad (1)$$

bestehend aus einem Distanzmaß \mathcal{D} und einem durch $\alpha \in \mathbb{R}^+$ gewichteten Regularisierer \mathcal{S} der auf dem linearen elastischen Potential der Verrückung u basiert

$$\mathcal{S}[u] := \sum_{\nu=1}^M \int_{\Omega} \frac{\mu}{4} \sum_{j,k=1}^2 \left(\partial_{x_j} u_k^{(\nu)} + \partial_{x_k} u_j^{(\nu)} \right)^2 + \frac{\lambda}{2} \left(\operatorname{div} u^{(\nu)} \right)^2 dx, \quad (2)$$

mit den Materialkonstanten λ und μ [1,5]. Als Distanzmaß haben wir das sogenannte *sum of squared differences* Maß als geeignet erachtet

$$\mathcal{D}[R; u] := \frac{1}{2} \sum_{\nu=2}^M \int_{\Omega} \left[R^{(\nu)}(x - u^{(\nu)}(x)) - R^{(\nu-1)}(x - u^{(\nu-1)}(x)) \right]^2 dx. \quad (3)$$

Dieses Distanzmaß wird gleichzeitig als Fehlermaß eingesetzt, um den Registrierungsverlauf messen zu können.

Als notwendige Bedingung für ein Minimum des Funktionals \mathcal{J} bzgl. u muss die Ableitung für alle Variationsrichtungen von u verschwinden, d.h.

$$d\mathcal{J}[R; u, v] = 0 \quad \text{für alle Variationen } v. \quad (4)$$

Dies führt zu einem System partieller Differentialgleichungen, den Navier-Lamé-Gleichungen (NLG) für Serienschichtbilder

$$\sum_{\nu} \left(f^{(\nu)} - \alpha \cdot (\mu \Delta u^{(\nu)} + (\lambda + \mu) \nabla \operatorname{div} u^{(\nu)}) \right) = 0. \quad (5)$$

Durch Gleichung (5) wird die elastische Verformung eines Objekts bei einwirkender Kraft f beschrieben. Hier entspricht die Kraft der Gâteaux-Ableitung des Distanzmaßes \mathcal{D}

$$f^{(\nu)} := \left(R^{(\nu-1)} \circ \varphi^{(\nu-1)} - 2R^{(\nu)} \circ \varphi^{(\nu)} + R^{(\nu+1)} \circ \varphi^{(\nu+1)} \right) \nabla R^{(\nu)} \circ \varphi^{(\nu)} \quad (6)$$

mit $\varphi^{(k)} := x - u^{(k)}(x)$.

Durch Approximation der NLG mit Finiten Differenzen und einer Fixpunktiteration wird aus den partiellen Differentialgleichungen ein lineares Gleichungssystem (LGS) mit $2N$ Unbekannten, wobei N die Anzahl der Pixel eines Schichtbildes ist. Dieses Gleichungssystem muss in jedem Iterationsschritt für jede einzelne Schicht gelöst werden. Die extrem große Matrix des LGS muss nicht gespeichert werden, da eine optimale Umordnung der Koordinaten zu einer gut strukturierten Matrix mit zirkulanten Blöcken führt, die mit Fouriermatrizen diagonalisierbar sind [6]. Daher müssen nur die Diagonaleinträge gespeichert werden. Dies und die Verwendung eines nichtlinearen Gauß-Seidel-Verfahrens ergibt einen besonders schnellen und effizienten Algorithmus für die Registrierung. Statt kubischer Komplexität mit quadratischem Speicherbedarf klassischer Algorithmen direkter Verfahren, liegt die asymptotische Komplexität bei $\mathcal{O}(M N \log N)$, mit der Anzahl der Schichten, M und linearem Speicherbedarf. Um die Registrierungsgeschwindigkeit weiter zu steigern und (wenn nötig) große Deformationen in wenigen Iterationsschritten zu ermöglichen, verwenden wir einen Mehrskalensatz, basierend auf einer Gaußpyramide [7].

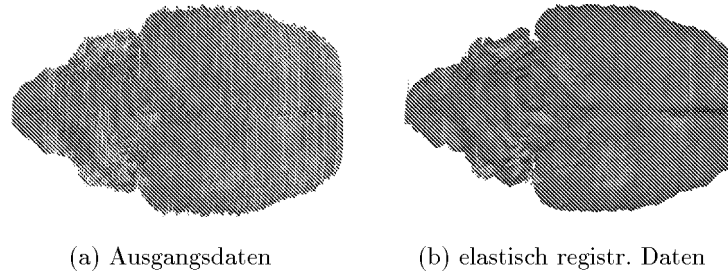
Bei der elastischen Registrierung ist es stets schwierig, die Materialkonstanten λ und μ , die sich aus dem elastischen Potential ergeben, geeignet zu wählen. Unterschiedliche Bildgrößen und Grauwertverteilungen bedingen eine unterschiedliche Wahl der Konstanten, um zu morphologisch sinnvollen Registrierungsergebnissen zu gelangen. Eine ungünstige Wahl der Konstanten kann sogar zum Fehlschlagen der Registrierung führen. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein automatischer Schätzer für die Materialkonstanten entwickelt [5]. In einem initialen Schritt werden die Konstanten so geschätzt, dass ein fortschreitender und damit erfolgreicher Registrierungsprozess, ohne zeitraubenden Oszillationen über die Iterationen hin, gesichert ist.

3 Ergebnisse

Ein vollständiges Rattenhirn, bestehend aus 503 Schichten mit einer Auflösung von jeweils (1900×1900) Pixel (gesamtes Datenvolumen: ca. 1.7 GB) konnte mit unserem Ansatz registriert und anschließend dreidimensional rekonstruiert werden.

In Abb. 1 ist das vollständige Rattenhirn vor und nach der Registrierung abgebildet. In Abb. 2(a) lassen sich die einzelnen Gehirnregionen nur erahnen, während in Abb. 2(b) deutlich das Kleinhirn und das Großhirn mit den beiden Hemisphären zu erkennen ist.

Abb. 1. Ansicht des vollständigen Rattenhirns von oben, linke Seite entspricht hinterem Teil des Gehirns, rechte Seite vorderem Teil (zur Nase hin).



Vor der elastischen Registrierung wendeten wir eine lineare Vorregistrierung in Form einer Hauptachsentransformation an. Die Distanz reduzierte sich dabei um 27%, d.h. $\mathcal{D}[R; u_{linear}]/\mathcal{D}[R; \mathbf{0}] = 0.73$.

Bei der anschließenden elastischen Registrierung verwendeten wir eine Gaußpyramide mit 5 Stufen. Die Implementierung erfolgte in MATLAB auf einem Linux-System mit 1 GB Arbeitsspeicher und einem AMD Athlon XP 2700+ Prozessor. Der gesamte Registrierungsprozess benötigte 35 Iterationen in ca. 10 Stunden (zum Vergleich: bei Auflösung (512×512) und 3 Ebenen, Laufzeit 1.5 Stunden; bei Auflösung (256×256) und 2 Ebenen, Laufzeit 0.8 Stunden).

Die Distanz nach der Registrierung $\mathcal{D}[R; u_{elastic}]$ sank im Vergleich zur Ausgangsdistanz $\mathcal{D}[R; \mathbf{0}]$ um 79%, d.h.

$$\frac{\mathcal{D}[R; u_{elastic}]}{\mathcal{D}[R; \mathbf{0}]} = 0.21. \quad (7)$$

Auf eine weitere Reduzierung des Fehlers wurde verzichtet, um die anatomischen Unterschiede der einzelnen Schichten zu erhalten.

Neben der Messung der Distanz durch das Distanzmaß \mathcal{D} wurden die Ergebnisse von einem Experten begutachtet. Wichtiges Kriterium für eine visuelle Beurteilung des Registrierungsergebnisses ist die Verbesserung der Erkennbar-

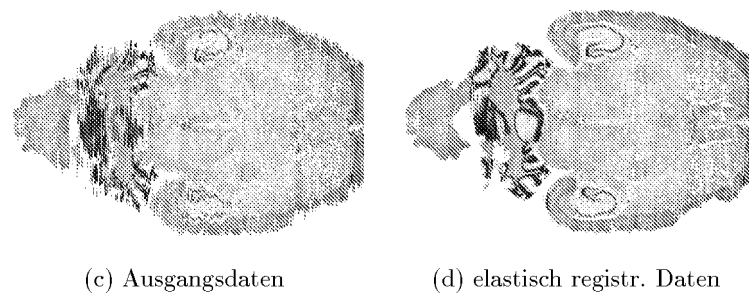


Abb. 2. Horizontale Schnitte des Rattenhirns orthogonal zur Schnittrichtung.

keit kleiner Strukturen (Kerngebiete, Hirnrindenabgrenzung) und die Glattheit von inneren und äußeren Grenzflächen. So lässt sich beispielsweise nach der Registrierung und Rekonstruktion in Abb. 2(d) deutlich die Fascia denta in der Hippocampusformation erkennen. Diese Erkennung ist in den Ausgangsdaten ohne zusätzliche Information unmöglich. Gehirnabschnitte mit äußeren Grenzflächen wie das Kleinhirn sind nach der Registrierung derart deutlich dargestellt, dass nun Foliae cerebellares (Kleinhirnwindungen) sichtbar werden.

4 Diskussion

Wir haben einen neuen elastischen Registrierungsansatz vorgestellt, mit dem histologische Schnittbilder eines Rattenhirns korrekt zueinander ausgerichtet werden. Der wesentliche Teil dieses Verfahrens besteht aus einer sehr schnellen Lösungstechnik für das innere lineare System. Zusätzlich wird mit Hilfe des Multiskalenansatzes und der Schätzung der Materialkonstanten des elastischen Potentials, die äußere Iteration beschleunigt.

Die hier vorgestellten Registrierungsergebnisse belegen zum einen die Notwendigkeit einer nichtlinearen Schnittbildausrichtung und zum anderen die Korrektheit der neu entwickelten Lösungstechnik. Aufgrund des äußerst effizienten Lösungsansatzes wurden erstmals hochaufgelöste und damit sehr große Bilddatensätze registriert. Die hier vorgestellte Registrierungsstrategie kann nach der erfolgreichen Testimplementation nun gezielt zur Registrierung noch größerer menschlicher Gehirnschnitte angewendet werden.

Literaturverzeichnis

1. Broit C: Optimal Registration of Deformed Images. PhD thesis, University of Pennsylvania, 1981.
2. Bajcsy R, Kovacic S: Multiresolution elastic matching. *Comp. Vision, Graphics and Image Process.* 46, pp. 1-21, 1989
3. Toga AW: *Brain Mapping: The Methods*. 2. Aufl., Academic Press, 2002
4. Fischer B, Modersitzki J: Fast inversion of matrices arising in image processing. *Numerical Algorithms* 22, pp. 1-11, 1999.
5. Modersitzki J: *Numerical Methods for Image Registration*. To appear in Oxford University Press, 2004.
6. Davis PJ: *Circulant Matrices*. Chelsea Publishing, New York, 1979
7. Jähne B: *Digitale Bildverarbeitung*. 5. Aufl., Springer, 2002