



Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz	Band 72 Heft 1	S. 97 - 104	2000
--	-------------------	-------------	------

ISSN 0373-7586

Vortrag zum 2. Milbenkundlichen Kolloquium
vom 14. bis 16. Oktober an der Universität Bremen

Methoden der computergestützten 3D-Rekonstruktion histologischer Schnittserien mit Anwendungsbeispielen aus der Acarologie

JENS BÜCKING

Universität Bremen, Institut für Ökologie und Evolutionsbiologie

Abstract

Methods of computer-assisted 3D-reconstruction of serial sections and application in acarology

This paper describes two different approaches for three-dimensional computer-assisted reconstructions of serial light microscopic sections. Different procedures used to reconstruct the female genital organs of an astigmatid mite and the alimentary canal of an oribatid mite are taken as examples, to discuss these methods with regard to performance, limitations and applicability in acarology.

1. Einleitung

Bei einer Reihe bildgebender Verfahren in Biologie und Medizin ist man mit dem Problem konfrontiert, dass komplexe dreidimensionale Strukturen in eine Serie zweidimensionaler Bilder aufgelöst werden, die für sich betrachtet die zugrundeliegende räumliche Struktur nicht mehr erkennen lassen. In der Medizin betrifft dies z.B. Magnet-Resonanz-Spektroskopie, Mammographie und Serien-Ultraschall, in der Biologie u.a. Fokussierserien bzw. Z-Scans an Licht- und confokalen Laser-Scanning Mikroskopen. Für diese Anwendungen, bei denen die Präparate in toto untersucht werden, gibt es integrierte Bildanalysesysteme, die oft eine weitgehend automatisierte 3D-Visualisierung der internen Strukturen erlauben. Ein eigenes Problemfeld stellen dagegen histologische Serienschnitte dar. Im Gegensatz zu den vorgenannten Verfahren geht hier die Ausrichtung der Schnitte während der Mikrotomie verloren, es treten häufig präparationsbedingte Artefakte oder Lücken in der Serie auf und die Bildinformation selber erlaubt meist keine automatische Selektion der zu rekonstruierenden Strukturen. Aufgrund der geringen Größe der Acari ist man bei der Rekonstruktion von Organsystemen jedoch weitgehend auf histologische Präparate angewiesen. Von der Mehrzahl der Autoren wird dabei aufgrund des hohen technischen und zeitlichen Aufwands auf exakte Rekonstruktionsmethoden verzichtet und lediglich über das Durchsichten von Schnittserien verschiedener Ebenen ein subjektives Bild erstellt. Als erster Schritt zu einer besser objektivierbaren Rekonstruktion

können bei Beteiligung kutikularer Strukturen, z.B. Gnathosoma oder Genitalsklerite, licht- oder rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Aufhellungspräparaten als Vorlage für perspektivisch korrekte Zeichnungen dienen, die dann um histologische Details ergänzt werden. Auf Serien von Umrißzeichnungen basierende, klassische Rekonstruktionsmethoden umfassen u.a. graphische Verfahren wie Stapelbilder (ROMEIS 1989), Schrägsichtprojektionen und perspektivische Projektionen (GAUNT & GAUNT 1978) sowie plastische Modelle, z.B. aus zusammengesetzten Wachs-, Balsaholz- oder Styroporplatten (BORN 1893, GAUNT & GAUNT 1978, ROMEIS 1989). In der Regel wird man heute auf computergestützte Methoden der 3D-Rekonstruktion zurückgreifen. Computermodelle bieten den Vorteil, dass sie einfach editiert, ergänzt und damit perfektioniert werden können. Viele Programme erlauben außerdem exakte morphometrische Messungen (KVASNICKA & THIELE 1995).

In dieser Arbeit soll zunächst die allgemeine Vorgehensweise bei der computergestützten Rekonstruktion beschrieben werden, um dann am Beispiel der für das Ovar einer astigmaten Milbe und des Darmtraktes einer Oribatide verwendeten Prozeduren die Leistungsfähigkeit und Grenzen verschiedener Methoden zu diskutieren.

2. Vorbereitung und Prinzipien der computergestützten Rekonstruktion

Grundvoraussetzung jeder 3D-Rekonstruktion ist das Vorliegen einer weitgehend vollständigen Schnittserie gleichbleibender Dicke ohne variiende Deformationen wie Schrumpfungen, Stauchungen, Überstreckungen oder Verlagerungen (Microshifts). Dies setzt eine standardisierte Einbettungsmethodik voraus, die je nach Präparateigenschaften sehr unterschiedlich sein kann und zunächst empirisch ermittelt werden muß. Die zu rekonstruierenden Strukturen sollten bei der verwendeten Methode deutlich hervortreten, was im Einzelfall durch spezifische, z.B. immunhistochemische Färbungen erreicht werden kann.

Zur Vorbereitung der computergestützten 3D-Visualisierung sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Bildaquisition: Umsetzen der mikroskopischen Bilder in eine Serie von Bilddateien, z.B. über das Einscannen von Camera lucida-Zeichnungen, Fotopositiven oder Negativen, Übertragen von Umrissen am Digitalisierbrett, digitalisierte Videobilder oder digitale Fotografie.
- Bildbearbeitung: Korrektur und Anpassung von Format, Schärfe, Tonwerten etc.
- Alignment (Registrierung): Wiederherstellung der ursprünglichen Schnittorientierung, entweder vor der Bildaquisition über das Ausrichten der Fotos oder Zeichnungen am Leuchttisch, während der Aquisition per Video-Overlaytechnik (KVASNICKA & THIELE 1995) oder nachträglich per Bildbearbeitung. Als Orientierungshilfe dienen miteingebettete Referenzstrukturen, Markierungen am Probenblock (GAUNT & GAUNT 1978) oder Kennstrukturen der Präparate selbst (Best-fit-Methode). MONTGOMERY & ROSS (1996) beschreiben die Prinzipien eines computergestützten, automatischen Alignments ohne Referenz-Punkte.
- Segmentierung: Manuelle oder semiautomatische Definition der zu rekonstruierenden Strukturen über Umrißlinien, farbige Markierung oder das Freistellen aus dem Gesamtbild.

Für die sich anschließende 3D-Visualisierung gibt es eine Vielzahl von Software-Paketen (KRIETE 1992, <http://biocomp.stanford.edu/3dreconstruction/>, <http://www.med.uni-giessen.de/ipl/iplcourse.html>), auf deren Arbeitsweise hier nur exemplarisch eingegangen wird. Grundsätzlich kann zwischen Volumen- und Oberflächen-berechnenden Programmen unterschieden werden. Bei ersteren werden die 3D-Modelle meist als solide Punktwolken dargestellt, wobei jedem Rasterelement (Voxel) außer den Raumkoordinaten noch ein Graustufen- oder Farb- sowie ein korrespondierender Transparenzwert (α) zugeordnet wird. Bei den sogenannten Ray-tracer und Ray-casting Programmen werden durch das vom Bitmap-Stapel repräsentierte Datenvolumen laufende Vektoren berechnet, die bei »Antreffen« eines Voxels dieses in Abhängigkeit von den genannten Eigenschaften als Bildpunkt in der Projektion darstellen. Durch Ändern der Vektorausrichtung lassen sich so für beliebige Blickrichtungen und Beobachtungsabstände entsprechende Projektionen erstellen, die rechnerisch um Schattierungen und Beleuchtungseffekte ergänzt werden. Bei den meisten Programmen zur Oberflächenberechnung werden demgegenüber geschlossene Objektkonturen als eine Serie von Knotenpunkten berechnet, die dann von Schnitt zu Schnitt über Dreiecke zu einem Gitternetzdiagramm verbunden werden (Triangulation). Diese aus geometrischen Daten berechneten Objekte bzw. Oberflächen können dann beliebig mit Farben oder Texturen belegt, skaliert, bewegt, editiert, geglättet oder transparent dargestellt werden.

3. Beispielmethode aus der Acarologie

Zur Herstellung vollständiger und artefaktarmer Serienschritte wurden Tritonymphen von *Hyadesia fusca* (Lohmann, 1894) (Astigmata, Hyadesiidae) und Männchen von *Ameronothrus lineatus* (Thorell, 1871) (Oribatida, Ameronothridae) in Formalin-Calcium n. Baker fixiert, in aufsteigender Ethanolreihe entwässert, in SPURR's Medium (*Ameronothrus*) oder LR-White (*Hyadesia*) eingebettet, mit dem Glasmesser am Ultramikrotom naß geschnitten (Schnittdicke 1 μ m) und mit Toluidin-Methylenblau monochrom gefärbt (Methoden s. BÖCK 1984). Zur Bildaquisition wurden mit einem Imaging-System, bestehend aus Mikroskop, CCD-Kamera, Video-Interface (frame grabber) und PC, Bitmap-Dateien (768 x 576 Pixel, 256 Graustufen) jedes zweiten (*Hyadesia*) oder dritten (*Ameronothrus*) Schnittes erstellt. Bei *Ameronothrus* dienten Ausdrucke dieser Bilddateien als Vorlage für exakte Umrisszeichnungen der Körperoberfläche und der Darmabschnitte auf technischem Transparentpapier. Für das Alignment wurden bei *Hyadesia* die Einzelbilder per Adobe Photoshop 4.0* nach dem Import in übereinanderliegenden, wechselseitig transparent gesetzten Ebenen ausgerichtet (Overlay-Technik). Bei *Ameronothrus* wurden die Umrisszeichnungen am Leuchttisch ausgerichtet und nach Herstellen einer passenden Anlegekante per Flachbettscanner digitalisiert. In beiden Fällen diente der Körperumriß als wichtigste Kennstruktur für das Alignment.

Für die Volumenberechnung mit T3D (früher SLICER), enthalten in dem Paket Noesys 1.1* von Fortner Software LLC, wurden bei *Hyadesia* per Photoshop die Bereiche des juvenilen Ovars aus dem Gesamtbild herausgeschnitten (freigestellt) und dann zu einem Datenvolumen zusammengefaßt. Nach Festlegen der Schnittdicke und Zuordnung von 100% Transparenz ($\alpha=0$) für den Graustufenwert 255 (Weiß) ergibt die Projektion das Bild eines Scheibenstapels, aus dem sich die dreidimensionale Struktur des Ovars ersehen läßt (Abb.1).

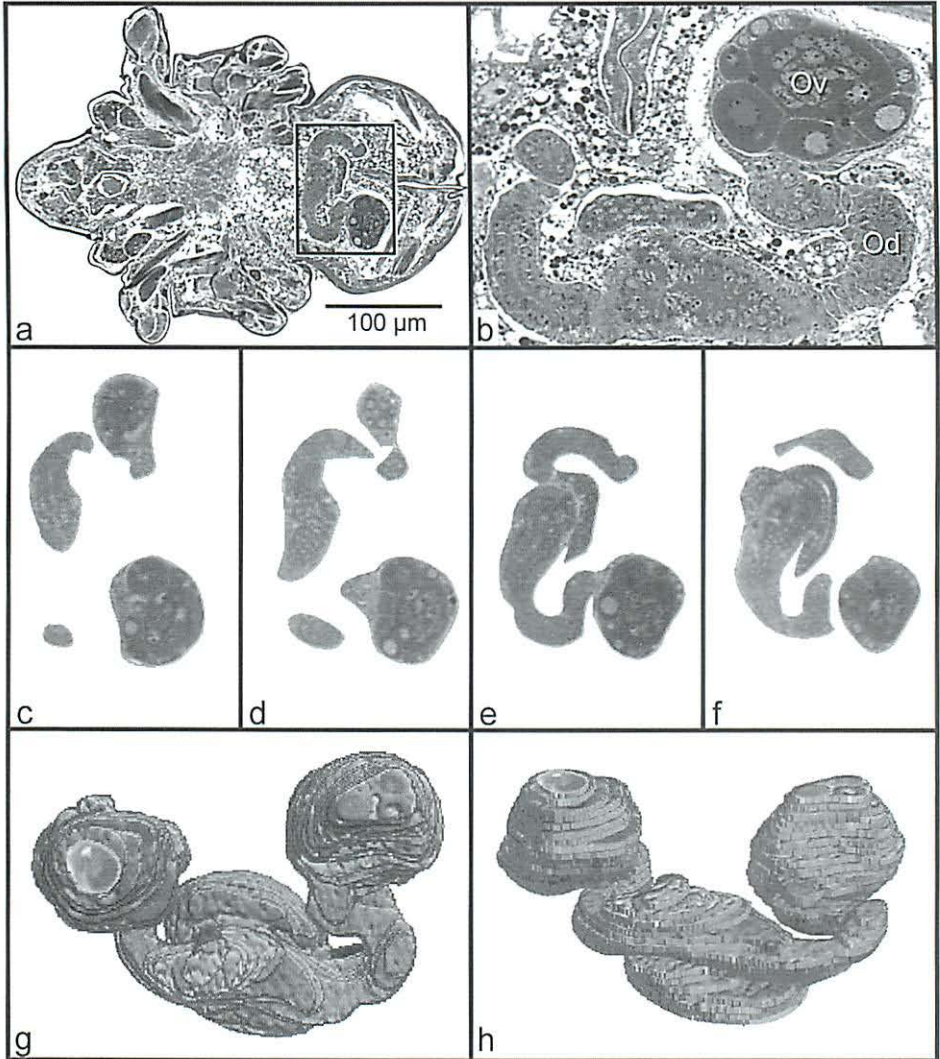


Abb. 1 Volumenberechnung der juvenilen weiblichen Genitalorgane von *Hyadesia fusca* (Tritonymphe) anhand einer Horizontalschnittserie. a) Videoaufnahme eines Schnittes auf Höhe der Ovidukte. b) Ausschnittsvergrößerung aus a, Linkes Ovar (Ov) und Ovidukt (Od). c-f) »Scherschnitte« aus einem Teil der Serie. Schrittweite 4 µm. g) Dorsalprojektion der Volumenberechnung aus 28 Einzelbildern (Auflösung 2 µm). h) Schrägsichtprojektion von anterodorsal. Kippwinkel gegenüber g. = 60°.

Das Setzen der Konturen für die Oberflächenberechnung mit SurfDriver 3.5.4® (S. Lozanoff/D. Moody) erfolgte mit dem Editier-Modul dieses Programms, wobei die

eingescannten Umrisszeichnungen des Darmsystems über die Autotrace-Funktion automatisch nachgezogen wurden. Bereiche, die später separat manipuliert werden sollten, z.B. linkes und rechtes Ovars oder die aufeinanderfolgenden Darmabschnitte, wurden dabei als getrennte Objekte definiert. Das Programm erlaubte anschließend eine Feinjustierung der Schnittausrichtung. Aus dem Konturstapel jedes Objektes berechnet das Programm zunächst ein Polygonnetz, aus dem sich dann nach Zuordnung einer Oberflächenfarbe bzw. Textur und Anwenden eines Glättungs-Algorithmus das 3D-Modell ergibt (Abb. 2).

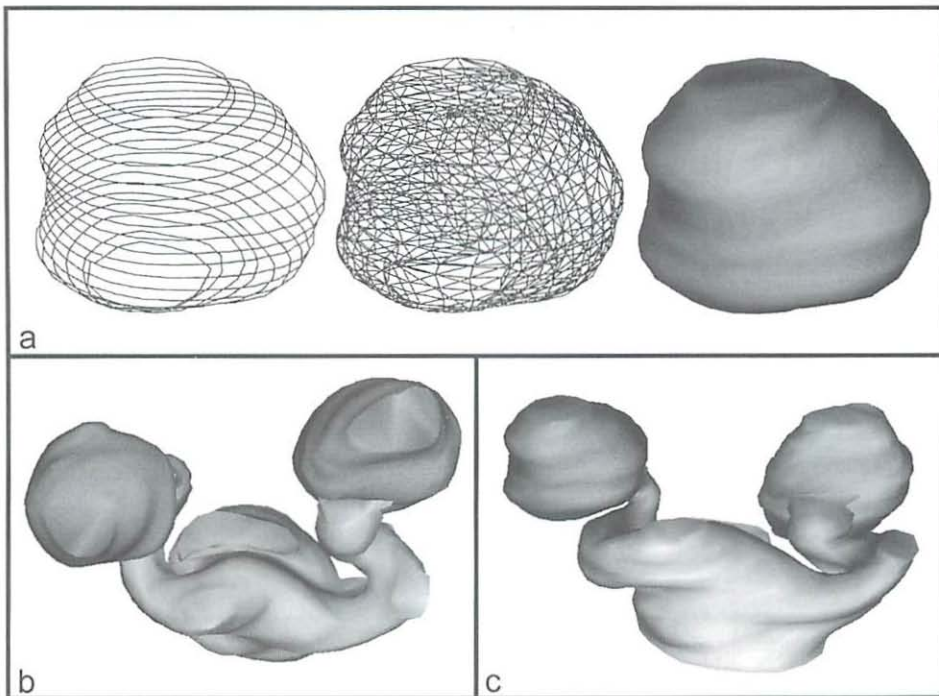


Abb. 2 Oberflächenberechnung der juvenilen weiblichen Genitalorgane von *Hyadesia fusca* (Tritonymphe) anhand einer Horizontalschnittserie. a) Rekonstruktionschritte für das rechte Ovar vom Konturenstapel (links) über die Triangulation (Mitte) bis zum vollständigen, geglätteten Modell (rechts). b) Dorsalansicht des Oberflächenmodells aller drei Objekte. c) Schrägsichtprojektion von anterodorsal. Kippwinkel gegenüber b. = 60° .

Über den Vergleich der fertigen Rekonstruktion mit der zuvor am ungeschnittenen Präparat per Camera lucida festgehaltenen Körperform wurden bei beiden Verfahren Alignment und Definition der Tiefenausdehnung überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Bei beiden Rekonstruktionsmethoden treten Details, die auf den Einzelbildern nur schwer erkennbar waren, deutlich hervor. Dies betrifft z.B. die dorsale Verbindung der Ovidukte oder die durch einen Darmschenkel hervorgerufene, anteriore Einbuchtung des linken Ovars. Am Beispiel der Oberflächenrekonstruktion des Darmtraktes von *Ameronothrus lineatus* ist zu erkennen, dass die Qualität des Modells wesentlich von der Auflösung, also der Zahl der Schnitte und der Knotenpunkte pro Umriß abhängt (Abb. 3). Durch Transparentsetzen (b) oder Weglassen (c) separat rekonstruierter Objekte, durch Änderung der Perspektive oder durch Vergrößerung von Teilbereichen (d) lassen sich Details wie die Übergänge von Colon zu Postcolon oder von Postcolon zu Analatrium sichtbar machen.

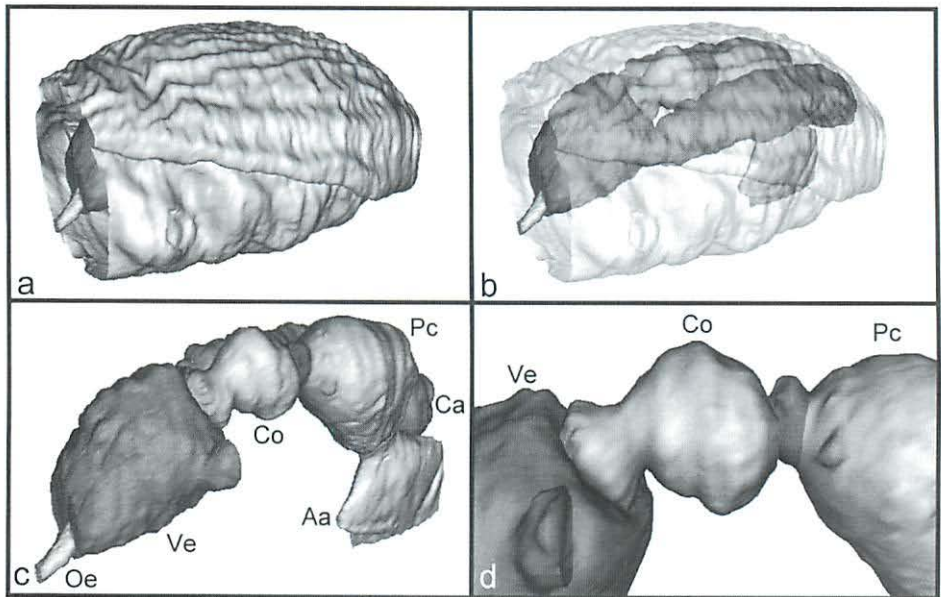


Abb. 3 Oberflächenmodell des Darmtraktes von *Ameronothrus lineatus*, basierend auf 169 Konturzeichnungen (Auflösung 3 μm). a) Schrägsicht von anterolateral auf die Körperoberfläche, vorderes Proterosoma weggelassen. b) Blick auf den Darmtrakt durch Transparentsetzen des Körpers, Perspektive wie a. c) Darmtrakt (ohne Pharynx und vorderem Oesophagusabschnitt), linkes Caecum weggelassen. Perspektive wie a. Oe = Oesophagus, Ve = Ventrikel, Ca = Caecum, Co = Colon, Pc = Postcolon, Aa = Analatrium. d) Ausschnittsvergrößerung des Colons in Lateralsicht

4. Diskussion

Die Programme zur Volumenberechnung erlauben die schnelle Rekonstruktion auch sehr komplizierter, verschachtelter oder mehrfach verzweigter Strukturen und von Hohlorganen, von denen dann problemlos Innenansichten in beliebiger Ebene produziert werden können. Nachteil ist hier die aufwendige Segmentierung und der hohe Rechenaufwand. Bei geringer Auflösung entsteht ein wenig realistisches Stapelbild, in dem der Zusammenhang zwischen nicht-überlappenden Objektanschnitten verloren geht. Der Vorteil der Programme zur Oberflächenberechnung liegt dagegen in der einfachen Segmentierung und den nahezu photorealistischen Modellen; nachteilig ist, dass komplizierte Strukturen (s.o.) nur schwer rekonstruiert werden können. So lassen sich bei multiplen Verzweigungen, z.B. bei Nervensystemen, und geringer Auflösung einzelne Umrisse nicht mehr eindeutig einem bestimmten Ast zuordnen. Die Oberflächenmorphologie ist bei Konturänderungen, die sich nur auf wenigen Schnitten wiederholen, häufig ungenau oder fehlerhaft. Bei nahezu jedem Objekt führt die rechnerische Glättung der Oberfläche zu einem stimmigen Bild, das sich dann aber von der zugrundeliegenden Datenbasis deutlich unterscheiden kann.

Angesichts des hohen technischen und zeitlichen Aufwands, der für eine detaillierte 3D-Rekonstruktion notwendig ist, stellt sich die Frage, bei welchen Fragestellungen der Einsatz der dargestellten Methoden sinnvoll ist. Geht es allein um eine allgemeine Darstellung der räumlichen Struktur, bei der eine exakte Histotopographie oder die intraspezifische Variabilität keine Rolle spielt, wird man auch heute noch unter Inkaufnahme der Subjektivität auf die einfache Interpretation von Serienschnitten zurückgreifen. Im Gegensatz zu den exakten Methoden, bei denen immer nur eine Momentaufnahme eines bestimmten Präparates entsteht, kann so außerdem über eine Reihe von Individuen integriert werden. Bei vergleichend-analytischen Fragestellungen, z.B. bei der Messung von Abständen, Oberflächen und Volumina oder bei der Analyse von dynamischen Prozessen (z.B. Verdauungszyklen), kann dagegen auf computergestützte Rekonstruktionen nicht verzichtet werden. Darüberhinaus gilt, dass histotopographische Details, Lagebeeinflussungen und funktionelle Beziehungen zwischen Organen oft erst durch eine exakte Rekonstruktion erkennbar werden. Als Beispiele seien hier der mutmaßliche Einfluß der Idiosomamuskulatur auf die Darmanatomie genannt; bei geschlechtsreifen Tieren werden Lage, Ausdehnung und damit möglicherweise auch die Funktion vieler Organe (z.B. des Darms) in hohem Maße von dem Reifezustand der Gonaden (Eientwicklung bzw. Spermienproduktion) beeinflußt. Der Vorteil der computergestützten Rekonstruktion liegt außer in der besseren Reproduzier- und Falsifizierbarkeit der Ergebnisse vor allem in den zahlreichen Visualisierungsmöglichkeiten, die die zeichnerische und fotografische Dokumentation histologischer Details sinnvoll ergänzen. Werden 3D-Modell und Gewebeschnitt parallel dargestellt, kann dies über das Lokalisieren der betreffenden Schnittebene wesentlich zum Verständnis der mikroskopischen Anatomie beitragen. Wie für die Verwendung von Aufhellungspräparaten erwähnt, können letztlich auch 3D-Modelle als Vorlage für räumlich korrekte Zeichnungen dienen, die dann um, sonst nur extrem aufwendig zu rekonstruierende, histologische Details ergänzt werden.

Einschränkend ist zu bemerken, dass jede 3D-Rekonstruktion anhand von Äquivalentbildern erstellt und über das Alignment und die nachfolgenden Rechenschritte weiter verfremdet wird. Das ComputermodeLL kann somit, wie die klassischen Rekonstruktionsmethoden auch, immer nur ein Äquivalent der tatsächlichen Verhältnisse wiedergeben und unterliegt denselben Einschränkungen hinsichtlich seiner Wirklichkeitstreue und Interpretierbarkeit wie das histologische Bild selber.

5. Literatur

- BÖCK, P. (1984): Der Semidünnschnitt. - J.F. Bergmann Verlag, München 1984, 172 S.
- BORN, G. (1893): Die Plattenmodellier Methode. - Arch. Micro. Anat. **22**: 584-599
- BOZZOLA, J. J. & L. D. RUSSEL (1992): Electron Microscopy. Principles and techniques for biologists. - Jones and Bartlett Publishers, Boston 1992, 542 S.
- GAUNT, W. A. & P. N. GAUNT (1978): Three dimensional reconstruction in biology. - Pitman Medical Pub. Co. Ltd., Tunbridge Wells 1978, 174 S.
- KRIETE, A. (ed.) (1992): Visualization in biomedical microscopies: 3D imaging and computer applications. - VCH-Verlag, Weinheim 1992, 404 S.
- KVASNICKA, H. M. & J. THIELE. (1995): Dreidimensionale Rekonstruktion von Serienschritten in der Lichtmikroskopie. - Pathologie **16**: 128-138
- MONTGOMERY, K. & M. ROSS (1996): Non-fiducial, shape-based registration of biological tissue. - SPIE **2655**: 224-232
- ROMEIS, B. (1989): Mikroskopische Technik. – 17. Auflage (Neubearb. und hrsg. von P. Böck). Urban & Schwarzenberg, München 1989, 697 S.

Manuskriptannahme: 25.11.1999

Anschrift des Verfassers:

Dr. Jens Bücking, Universität Bremen, Fachbereich 2 (Biologie/Chemie), Leobener Str.-NW 2,
D-28359 Bremen
email: jbueck@uni-bremen.de