

Abschlussbericht Teil I: Kurzbericht

zur Bekanntmachung
Medizintechnische Lösungen für eine digitale Gesundheitsversorgung

Verbundprojekt: Hochauflösende Röntgentomographie und intelligente Auswertung histologischer Gewebeproben für die Diagnostik (HORUS)

Teilvorhaben: Verzerrungsfreie Schnittflächenhistologie (BMBF 13GW0571D)

Abschlussbericht 2025 gemäß Nr. 4.4 NABF-BMBF

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2021 - 31.03.2025

Schlagworte zum Verbund:

Workflow in der Pathologie, Labor-Integration, Histologie, Krebsforschung, Tumor-Charakterisierung, Pathologie, Röntgenbildgebung, Tomographie, 2D/3D Registrierung

Teil I: Kurzbericht

Verena Stehl¹, Muhannad al Kallaa¹, Kathrin Scheckenbach² und Maximilian Seidl¹

¹Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität und Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Deutschland

²Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Heinrich-Heine-Universität und Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Deutschland

Korrespondenzadresse: maximilian.seidl@med.uni-duesseldorf.de

Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand

Histopathologische Verfahren sind der Goldstandard zur Krebsdiagnostik, werden jedoch nur an einer sehr kleinen und näherungsweise zweidimensionalen Stichprobe angewendet. Bislang gibt es kein in der Routine anwendbares, dreidimensionales histologisches Verfahren. In diesem Teilvorhaben wurden 2 verursachende, präanalytische Probleme adressiert: (1.) Virtuelle Bildgebung mit vergleichbarer Detailauflösung zur konventionellen Histologie benötigt die Identifikation vergleichbarer mikroanatomischer Strukturen zwischen virtuellem und histologischem Schnittpräparat. Dies ist nur möglich, wenn die räumliche Verzerrung zwischen virtuellem und histologischem Schnitt ausgeglichen werden kann. Dies wiederum ist nur möglich, wenn die Verzerrung mit vergleichbarer Auflösung zum histologischen Schnitt quantitativ erfasst werden kann. Dies ist gewährleistet, wenn der verzerrte und der nicht verzerrte Zustand des histologischen Schnittes bekannt ist. Der nicht verzerrte Zustand des histologischen Schnittes ist bislang jedoch unbekannt. Die Verzerrungen werden zwar z.T. simuliert, aber nur mit unzureichender räumlicher Auflösung tatsächlich gemessen. Der histologische Schnitt auf dem Objektträger liefert zwar eine hohe Auflösung, aber eben nicht verzerrungsfrei. Daher können die mikroskopischen Details eines histologischen Schnittes mit den bislang verwendeten Vorgehensweisen nicht zweifelsfrei aus dem 3D Datensatz extrahiert werden. (2.) Bislang gibt es keine digitalpathologischen Verfahren, die zu einer Steigerung der diagnostischen Präzision ohne erhebliche Zusatzbelastung des bereits ausgelasteten beteiligten Personals führen.

Ablauf des Vorhabens

Zu Projektbeginn wurde die Expertise aller Projektpartner in den zu erkennenden mikroanatomischen Grob- und Feinstrukturen geschaffen und anhand einer Checkliste festgehalten. Diese definierte gleichzeitig die benannten Strukturen als Erfolgskriterien der im Gesamtprojekt zu erforschenden, bildgebenden Software. Weiterhin diente die Checkliste der Erforschung einer verzerrungsfreien, schnittflächenbasierten Histologie in diesem Teilvorhaben. Die dazu in Frage kommenden oberflächenmikroskopischen Verfahren wurden auf ihre Eignung her evaluiert und ein adäquates Färbeprotokoll erforscht. Ein Teil dieser zu evaluierenden oberflächenmikroskopischen Verfahren (z.B. konfokale Laserscan-Mikroskopie) wurde durch die externe Core-Facility, dem CAI (Center of Advanced Imaging), an der Heinrich-Heine-Universität (HHU) als Unterauftrag in Form von Messzeit und speziellem Verbrauchsmaterial durchgeführt. Im weiteren Verlauf des Teilvorhabens wurden Gewebeproben zur zerstörungsfreien μ CT-Untersuchung an das Fraunhofer Ernst-Mach Institut (EMI) gesendet. Im Anschluss folgte die histologische Aufarbeitung zur Erstellung hoch aufgelöster, verzerrungsfreier, gemäß Checkliste annotierter 2D Bilddatensätze zur Extraktion relevanter Features für die 2D/3D Bildfusion mit unseren Kollaborationspartnern EMI und ImFusion. Die bei der Gewebeaufarbeitung entstehenden und verzerrten objektträgerbasierten Schnittpräparate wurden an unsere Kooperationspartner am Universitätsklinikum Freiburg (UKF) gereicht, während die resultierenden Schnittflächen auf dem Gewebeblock in unserem Teilvorhaben zur Erstellung einer verzerrungsfreien Histologie verwendet wurden. Anschließend wurde der Erfolg der 2D/3D Bildfusion im Rahmen unseres Teilvorhabens evaluiert und Tests mithilfe von Paaren aus Kopf-Hals-Tumor und Lymphknotenmetastase durchgeführt. Parallel wurden während der Projektlaufzeit die Kooperationspartner von Dörner in der Erforschung einer integrierten Laborsoftware mit pathologischer und klinischer Expertise unterstützt, um den diagnostischen Workflow optimal digital abzubilden und den Routineworkflow in der

pathologischen Diagnostik auch methodisch auf die präanalytischen Anforderungen des digitalen Workflows optimal abzustimmen. Nach Integration der bildgebenden Software wurde der Workflow gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern evaluiert.

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit

Im Arbeitspaket 1 (AP1) wurden erfolgreich Tonsillenproben für unsere Kooperationspartner ausgewählt, die histologischen Kriterien der zu erkennen Gewebestrukturen definiert, im Lastenheft grafisch festgehalten und im Rahmen einer Schulung ausgerollt. In AP2 wurden die histologischen Proben in Form von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebelöcken (FFPE) für die μ CT-Scans zur Verfügung gestellt und die verschiedenen Scanmodalitäten im Anschluss evaluiert. Hierbei lieferte das Phasenkontrast μ CT für die FFPE-Proben das beste Ergebnis. Parallel zu AP2 haben wir in AP3 erfolgreich eine Färbung der Blockschnittfläche etabliert, mit welcher verzerrungsfrei eine einzelne Zelle dargestellt werden kann. Im Ergebnis der getesteten Mikroskopietechniken stellte sich die konfokale Fluoreszenzmikroskopie als optimal heraus. Sowohl die gefärbten Blockschnittflächen, als auch die unmittelbar benachbarten, digitalisierten und HE gefärbten, histologischen Schnittpräparate wurden annotiert und quantitativ miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich eine äquivalente Detailgenauigkeit und ähnliche Größenverhältnisse, bei leichter Verzerrung der histologischen Schnitte. In AP4 wurden unseren Kooperationspartnern die unsererseits annotierten Gewebestrukturen der 3D μ CT-Datensätze zur Verfügung gestellt, um die Erforschung der Softwarealgorithmen zur Identifikation eines histologischen Schnittes im 3D μ CT-Datensatz zu erlauben. Hierbei resultierte ein erfolgreiches 2D/3D Alignment, entsprechend wurde der Halbzeitmeilenstein erfolgreich abgeschlossen. Im Rahmen von AP5 wurde dann das von unseren Kooperationspartnern erstellte Expertentool verwendet. Anschließend wurden im Rahmen von AP6 Proben aus Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sowie Lymphknotenmetastasen mit dem gleichen Verfahren getestet und die Anwendbarkeit gezeigt. Dazu wurden während der Laufzeit im Rahmen von AP7 wesentliche notwendige IT-Prozesse für den Workflow identifiziert, entsprechende Kriterien für eine praktische Anwendbarkeit festgelegt und in einem Testumfeld der Software von Dorner IT integriert. Im Rahmen von AP8 wurde der gesamte Workflow von der Ankunft der Probe bis hin zum Befund abgebildet.

Es resultierten bislang folgende Veröffentlichungen (1–3):

1. Schoenfeld, A. von, P. Bronsert, M. Poc, A. Fuller, A. Filby, S. Kraft, K. Kurowski, K. Sörensen, J. Huber, J. Pfeiffer, M. Proietti, V. Stehl, M. Werner, and M. Seidl. 2021. Multiple Immunostainings with Different Epitope Retrievals - The FOLGAS Protocol. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 223 23: 223.
2. Lakkimsetty, S. S., A. Weber, K. A. Bemis, V. Stehl, P. Bronsert, M. C. Föll, and O. Vitek. 2024. MSIreg: an R package for unsupervised coregistration of mass spectrometry and H&E images. *Bioinformatics* 40.
3. Chen, J., M. Ronchetti, V. Stehl, V. Nguyen, M. Al Kallaa, M. T. Gedara, C. Lölkes, S. Moser, M. Seidl, and M. Wiczorek. 2025. 2D-3D deformable image registration of histology slide and micro-CT with DISA-based initialization. *Scientific Reports* 2025 15:1 15: 1–9.

Die Zusammenarbeit mit den HORUS Kooperationspartnern erfolgte niederschwellig, wobei sich zwischen den Doktorandinnen und Doktoranden ein wöchentliches Meeting etablierte. Die jeweiligen Ergebnisse wurden in halbjährlichen Konferenzen mit allen Projektverantwortlichen präsentiert, und die nächsten strategischen Schritte geplant. Im Rahmen der Abschlussveranstaltung wurde der exemplarische Workflow des HORUS Projekts dargestellt, die weitere wissenschaftliche Verwertung besprochen und eine zukünftige Kooperation mit dem Unternehmen Histomography als jungem Hersteller von μ CT-Geräten für histopathologische Untersuchungen gebahnt. Die im Rahmen dieses Teilvorhabens gewonnenen Erkenntnisse fanden bereits Eingang in 2 Folgeanträge (DFG SE 3822/1-1, BMBF noch in Prüfung). In beiden Folgeanträgen werden die μ CT-Aufnahmen durch Histomography bereitgestellt.