

Abschlussbericht Teil II: Eingehende Darstellung

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 II: Eingehende Darstellung des Teilvorhabens „Verzerrungsfreie Schnittflächenhistologie“ im Verbundprojekt HORUS (BMBF 13GW0571D)

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

Inhaltsverzeichnis

Teil II: Eingehende Darstellung des Teilvorhabens „Verzerrungsfreie Schnittflächenhistologie“ im Verbundprojekt HORUS (BMBF 13GW0571D).....	1
Inhalte	3
Zusammenfassung.....	3
Einleitung	3
Der Stand von Wissenschaft und Technik	3
Bezug des Teilvorhabens zu den förderpolitischen Zielen	4
Bestehende Schutzrechte (eigene und Dritter)	4
Ergebnisse des Arbeitsplans.....	4
Erfolgreiche Bedarfsermittlung und Definition von Erfolgskriterien anhand zu erkennender Gewebestrukturen (AP1)	4
μ CT-Scans und Evaluation der 3D Daten: Phasenkontrast- μ CT lieferte die beste Darstellung humaner FFPE Tonsillenproben (AP2).....	5
Erfolgreiche Etablierung einer schnittflächenbasierten Histologie und 2D Annotationen an der Blockschnittfläche und der korrespondierenden, H&E gefärbten Objektträger (AP3)	6
Erfolgreiche 3D-Datenanalyse der gescannten Proben, Alignment (Ausrichtung) mit 2D-Slides und Entzerrung durch Expertentool zur synergetischen 2D-3D-Datenverarbeitung von Kontroll- und Tumorgewebe (AP4-6)	7
Erfolgreiche Definition notwendiger IT-Strukturen für die Pathologie zur zukünftigen Umsetzung einer virtuellen Histologie (AP7).....	8
Demonstrationsveranstaltung zum Projektabschluss und Ausblick.....	9
Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	9
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten	9
Voraussichtlicher Nutzen bzw. Verwertbarkeit der Ergebnisse - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	10
Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	10
Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse.....	11
Erfolgte Veröffentlichungen mit Ergebnissen, die im Rahmen dieses Teilvorhabens gewonnen wurden:	11
Geplante Veröffentlichungen mit Ergebnissen, die im Rahmen dieses Teilvorhabens gewonnen wurden:	11
Literaturverzeichnis	12

Inhalte

Zusammenfassung

Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand:

Histopathologische Verfahren sind der Goldstandard zur Krebsdiagnostik, jedoch nur zweidimensional und auf kleine Proben anwendbar. Ein dreidimensionales Verfahren fehlt. Zwei präanalytische Probleme wurden adressiert: (1) Die virtuelle Bildgebung benötigt die Identifikation vergleichbarer mikroanatomischer Strukturen zwischen virtuellem und histologischem Schnitt. (2) Es gibt keine digitalpathologischen Verfahren, die die diagnostische Präzision ohne Zusatzbelastung des Personals steigern.

Ablauf des Vorhabens: Zu Beginn wurde die Expertise der Projektpartner in mikroanatomischen Strukturen geschaffen und in einer Checkliste festgehalten. Oberflächenmikroskopische Verfahren wurden evaluiert und ein Färbeprotokoll entwickelt. Gewebeproben wurden zur μ CT-Untersuchung an das Fraunhofer EMI gesendet und anschließend histologisch aufgearbeitet. Die 2D/3D Bildfusion wurde mit Kollaborationspartnern durchgeführt und evaluiert. Eine integrierte Laborsoftware wurde erforscht und der Workflow gemeinsam evaluiert.

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit: In AP1 wurden Tonsillenproben ausgewählt und histologische Kriterien definiert. In AP2 wurden FFPE-Proben für μ CT-Scans bereitgestellt und die besten Ergebnisse mit Phasenkontrast μ CT erzielt. In AP3 wurde eine Färbung der Blockschnittfläche etabliert und konfokale Fluoreszenzmikroskopie als optimal identifiziert. In AP4 wurden 3D μ CT-Datensätze annotiert und ein erfolgreiches 2D/3D Alignment erreicht. In AP5 wurde ein Expertentool verwendet und in AP6 Proben aus Tumoren und Lymphknotenmetastasen getestet. In AP7 wurden IT-Prozesse für den Workflow identifiziert und in AP8 der gesamte Workflow abgebildet. Die Ergebnisse sind Teil zweier Dissertationen und führten zu mehreren Veröffentlichungen. Die Zusammenarbeit mit den HORUS Kooperationspartnern war erfolgreich und führte zu weiteren Forschungsanträgen.

Einleitung

Der Stand von Wissenschaft und Technik

Histologische Schnitte verwenden die H&E-Färbung als Standard zur Visualisierung von Gewebestrukturen. Immunhistochemische Färbungen ergänzen diese, um Proteine zu identifizieren. Beide Verfahren sind zeitaufwendig und die Ergebnisse variieren je nach Beobachter. Virtuelle 3D-Histologie mit Kontrastmitteln oder Phasenkontrast- μ CT bietet hohe Auflösungen, aber der vollständige Detailgrad eines H&E-Schnitts wurde noch nicht erreicht. Es gibt keinen Ansatz, der die a-priori-Kenntnisse eines H&E-Schnittes nutzt, um den entsprechenden Gewebebereich im μ CT-Scan direkt zu identifizieren. Dieses Teilvorhaben erforscht präanalytische Grundlagen für diese Identifikation und evaluiert oberflächenmikroskopische Verfahren.

Oberflächenmikroskopische Verfahren: Diese Verfahren erfassen die Schnittfläche eines histologischen Schnittes mit unterschiedlichen Qualitäten und Eindringtiefen. Moderne Anwendungen wie konfokale Mikroskopie produzieren digital verwertbare Ergebnisse und ermöglichen schärfere Bilder durch Fluoreszenzmarkierungen. Diese Methoden wurden bereits erfolgreich angewandt, um die histologische Aufarbeitung schneller und exakter zu gestalten. In diesem Projekt wurden die Verfahren zur Erstellung einer hochaufgelösten, schnittflächenbasierten Histologie evaluiert. Einige Verfahren bieten eine gewisse Eindringtiefe, die zur besseren Korrespondenz mit den μ CT-Schnittbildern genutzt werden kann.

Neuheit und Attraktivität des Lösungsansatzes: Der Innovationsgehalt liegt in der

fehlenden Verzerrung zwischen virtuellem und histologischem Schnitt. Der Gewebekblock wird gescannt und die Schnittfläche analysiert, um einen digitalen histologischen Schnitt zu gewinnen. Diese Technik wird bisher nicht angewendet. Das Problem der Verzerrung wird präanalytisch gelöst, was eine hoch aufgelöste Messgrundlage und Identifikationsgrundlage mikroanatomischer Strukturen im virtuellen Schnitt bietet. Der Ansatz integriert den gesamten Workflow, einschließlich der frühen Schritte der Gewebeparbeitung, was bisher in keinem etablierten digitalpathologischen Verfahren berücksichtigt wurde. Die bisherigen Lösungen arbeiten getrennt und beinhalten kein verlässliches Konzept zur Langzeitarchivierung.

Bezug des Teilvorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Unser Teilvorhaben liefert die notwendige wissenschaftlich-technische Grundlage für eine integrierte pathologische Diagnostik und unterstützt die digitale Gesundheitsversorgung. Durch hochaufgelöste virtuelle Bildgebung der gesamten Probe könnte die diagnostische Präzision erheblich gesteigert werden, was eine präzisere Bestimmung des Tumolvolumens und der Tumorheterogenität ermöglicht. Dies führt zu einer effizienteren Gesundheitsversorgung und verbesserten Therapiekonzepten. Die Themenfelder 1 (digitale Unterstützung) und 4 (Strukturen für eine digitale Gesundheitsversorgung) wurden direkt adressiert, während Themenfelder 2 (digitale Therapien) und 3 (integrierte Versorgungsketten) mittelbar unterstützt wurden. Ein allgemeiner Färbungsstandard und telematischer Datenaustausch werden ebenfalls ermöglicht.

Bestehende Schutzrechte (eigene und Dritter)

Die in diesem Teilvorhaben geplanten Arbeiten werden mithilfe der Software von ImFusion und Dorner umgesetzt, zu deren Verwendung wir durch die Kooperationspartner berechtigt sind. Darüber hinaus sind keine national oder international bestehenden Schutzrechte betroffen. Die Schutzrechte des Klinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden im Rahmen eines Kooperationsvertrages zwischen den Kooperationspartnern bzw. deren Institutionen geregelt.

Ergebnisse des Arbeitsplans

Erfolgreiche Bedarfsermittlung und Definition von Erfolgskriterien anhand zu erkennender Gewebestrukturen (AP1)

Grundlage lieferte Humangewebe, bestehend aus formalinfixiertem, paraffineingebetteten (FFPE) Gewebe: 12 Tonsillen sowie 30 Proben bestehend aus 15 Kopf-Hals-Tumoren und 15 jeweils zum Tumor gehörenden Lymphknotenmetastasen und gem. zustimmendem Ethikvotum zum Antrag 2020-943 (Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät). Die durch die Routinediagnostik bereits vorhandenen, H&E gefärbten, histologischen Schnittpräparate dienten im Rahmen des ersten Projekttreffens zur Schulung der Projektpartner in der Histologie (Gewebelehre). Im Rahmen des Workshops wurden weiterhin die relevanten diagnostischen Fragestellungen aus klinischer Sicht (z.B. Beurteilung der chirurgischen Schnittländer) sowie die potentiellen histologischen Landmarken vorgestellt. Die dadurch geschaffene, gemeinsame histologische Grundlage wurde im Lastenheft anhand beschrifteter histologischer Abbildungen festgehalten (Abb. 1):

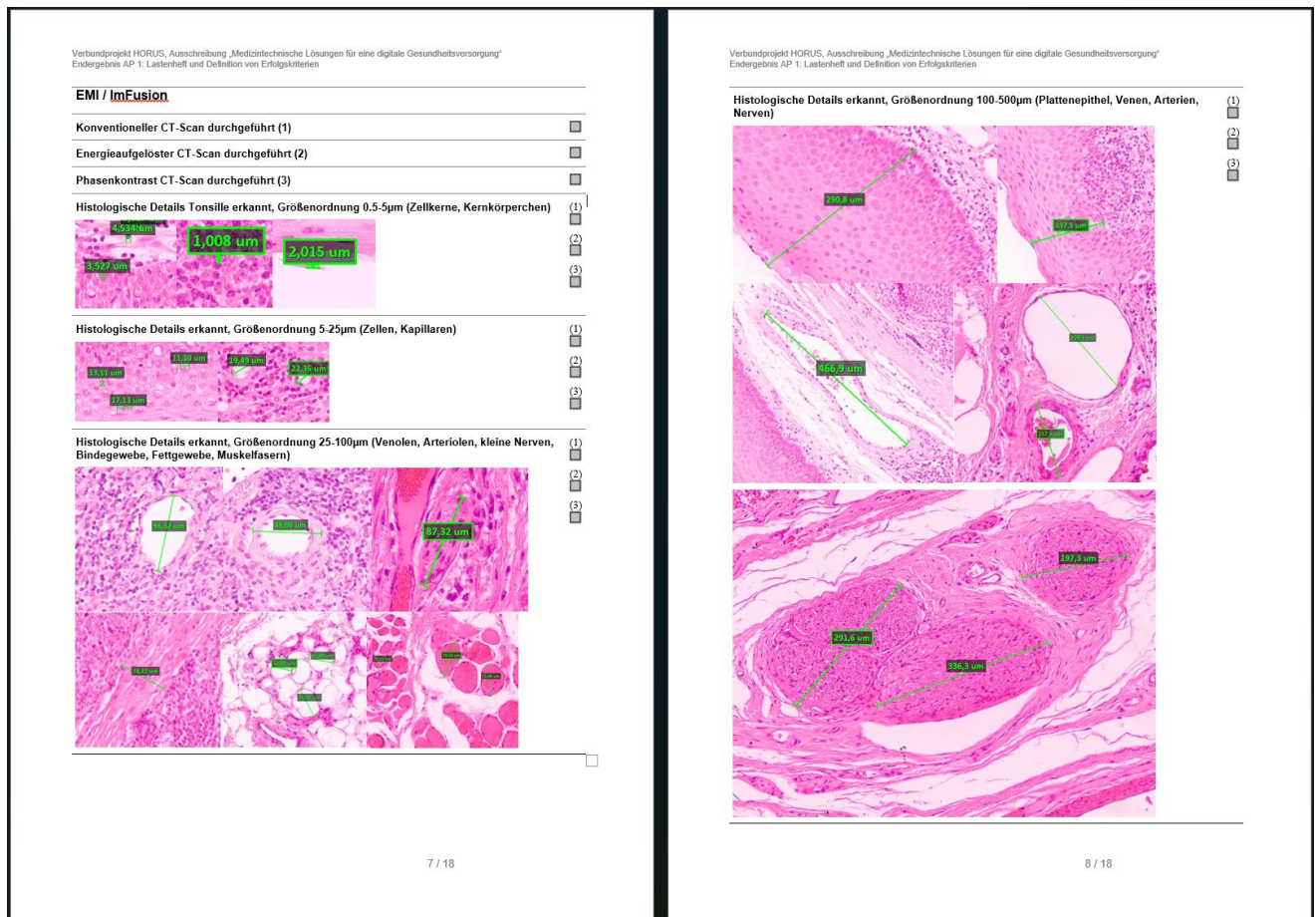


Abb. 1 Beispielhafter Ausschnitt aus dem Lastenheft zur Definition histologischer Strukturen und Größenordnungen.

µCT-Scans und Evaluation der 3D Daten: Phasenkontrast-µCT lieferte die beste Darstellung humaner FFPE Tonsillenproben (AP2)

In diesem Arbeitspaket wurden unsererseits FFPE Tonsillenproben an das EMI versandt, um dort mit verschiedenen µCT-Verfahren untersucht zu werden. Die Evaluation erfolgte in Korrespondenz mit dem EMI und dem UKF, hinsichtlich Identifikation grober Strukturmerkmale. Hierbei konnten wir folgende Modalitäten untersuchen: Auflösungen von 4,9 µm, 4,0 µm, 2,6 µm, 2,5 µm und 1,625 µm. Für die letzten drei Messmodalitäten wurde ein Phasenkontrast-µCT gewählt. Die letzten beiden Messungen fanden am Synchrotron des Paul-Scherrer-Institutes statt. Als Kompromiss zwischen Auflösung, ausreichendem Kontrast im Weichgewebe, Laborgerätegröße und Messzeit stellte sich die Messmodalität mit 2,6 µm Auflösung und Phasenkontrast heraus. Entsprechend orientierten sich die später erfolgten Messungen an Tumoren und Lymphknotenmetastasen an diesen Parametern. Weiterhin fiel im Zuge dieser Messreihen auf, dass es einerseits während der Aufnahmen zu Erwärmungen der FFPE-Blöcke kommt, dem mit einer automatischen Fokuskorrektur erfolgreich begegnet wurde. Zum anderen waren µCT-Geräte aus der Materialprüfung nicht optimal für FFPE Proben geeignet, da sie aufgrund der niedrigen Energieabsorption im Weichgewebe sehr lange Messzeiten erforderten (teils > 48h), was zu einem ungeplant hohen Filamentverbrauch der Wolframfilamente auf Seiten des EMI, mit konsekutiver Verzögerung im Projekt, führte.

Erfolgreiche Etablierung einer schnittflächenbasierten Histologie und 2D Annotationen an der Blockschnittfläche und der korrespondierenden, H&E gefärbten Objektträger (AP3)

Nach Austestung verschiedener organischer Lösungsmittel zur Entparaffinierung stellte sich Aceton als optimales Lösungsmittel heraus, um die Entparaffinierung einer sehr dünnen Gewebelage an der Blockschnittfläche zu erreichen. Weiterhin konnten während der Experimente mit dem anderen Lösungsmittel Ethanol reproduzierbar hydrophobe, nadelförmige Paraffinausfällungen verursacht, und dadurch die Ursache gleichartiger Artefakte bei Färbungen am FFPE-Gewebe identifiziert werden. Diese Ergebnisse fanden Eingang in ein Methodenpaper (1). Die entparaffinierte Gewebeschicht wurde fluoreszenzmikroskopisch mit einer Kombinationsfärbung aus CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) für das Zytoplasma und Ethidiumbromid für den Zellkern dargestellt. Der jeweils korrespondierende histologische Schnitt auf dem Objektträger wurde mit H&E gefärbt. Sowohl die fluoreszenzgefärbte Blockoberfläche als auch der H&E gefärbte Schnitt auf dem Objektträger wurden digitalisiert, den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt und unsererseits annotiert (Abb. 2). Dabei wurden 20 digitale H&E- und 20 korrespondierende Blockschnittflächen hinsichtlich verschiedener mikroanatomischer Kompartimente annotiert. Diese umfassen bislang durchschnittlich 10k-12k bzw. 1,5k-2,5k Zellen pro mm². Die unterschiedlichen Zelldichten bezogen auf die Gesamtfläche entsprechen dem Unterschied zwischen der näherungsweise 2D Oberfläche auf dem OT und der geringeren Fläche scharfer Fokusebenen auf dem Oberflächenrelief der FFPE-Blockanschnittfläche.

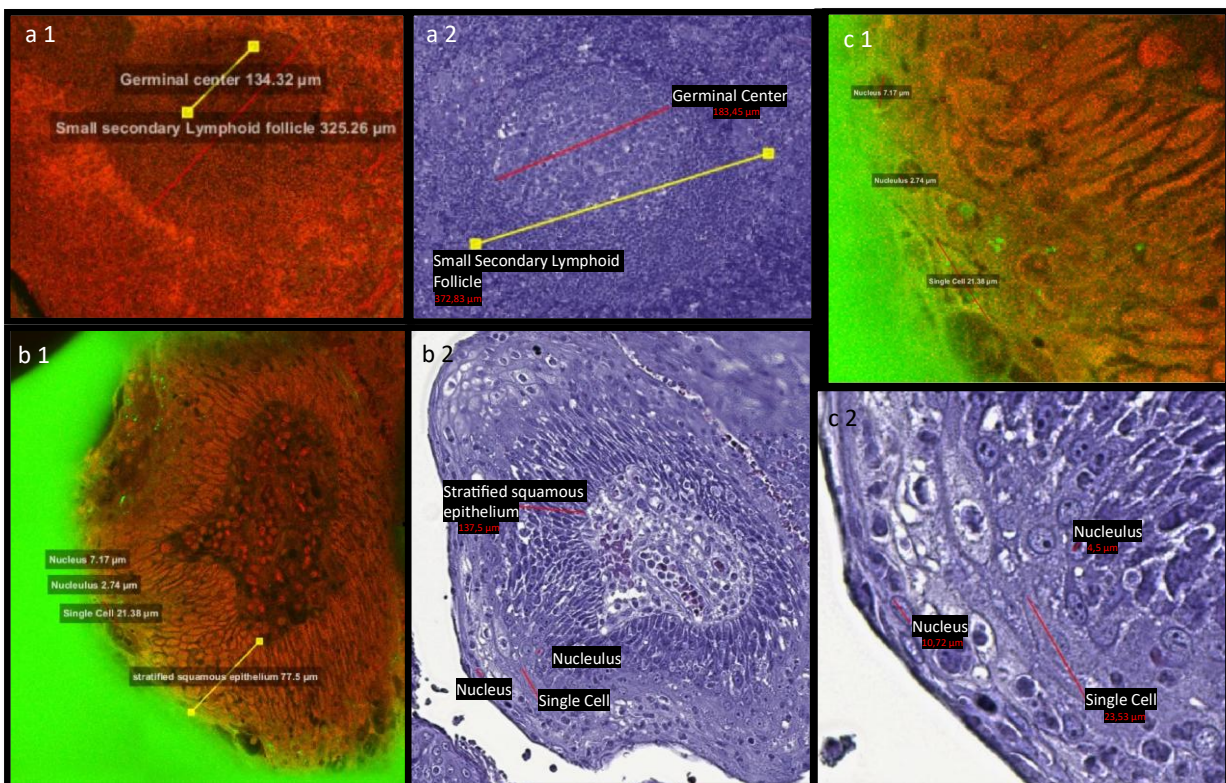


Abb. 2 Beispielabbildung einer fluoreszenzgefärbten Blockschnittfläche (a1, b1, c1) und korrespondierend dem HE gefärbten Objektträger (a2, b2, c2). Aus der Dissertationsschrift von Verena Stehl „HORUSkop: Gewebedarstellung mittels zerstörungsfreier Bildgebungsmethoden“, eingereicht 2025.

Die Annotationen schufen die Grundvoraussetzung für unsere Kooperationspartner, v.a. ImFusion, zur Relokalisation eines gefärbten, näherungsweise 2D Schnittes im zuvor

gewonnenen 3D μ CT-Datensatz.

Erfolgreiche 3D-Datenanalyse der gescannten Proben, Alignment (Ausrichtung) mit 2D-Slides und Entzerrung durch Expertentool zur synergetischen 2D-3D-Datenverarbeitung von Kontroll- und Tumorgewebe (AP4-6)

Für diese komplementären Arbeitspakete wurden unsererseits die 3D μ CT-Datensätze aus Tonsillen und Kopf-Hals-Tumoren annotiert, sowie die nach dem μ CT-Scan aus verschiedenen Tiefen des FFPE-Blocks gewonnenen, H&E-gefärbten und digitalisierten Objektträger. Letztere sind näherungsweise 2D. Die durch unsere Kooperationspartner ImFusion während der Annotationen rasch auf unseren Bedarf hin verbesserten Fähigkeiten der Software (= des Expertentools) ermöglichten die Annotationsarbeiten direkt in der ImFusion Software. Insgesamt wurden 708 Annotationsebenen in drei Tonsillen und 5100 Annotationsebenen in 17 Tumorproben (Tumor vs. Restgewebe) bzw. 1500 Annotationsebenen in fünf Tumorproben (Tumor vs. verschiedene Normalgewebe) an den jeweiligen μ CT-Datensätzen annotiert. Mithilfe dieser Daten wurden u.a. Landmarken zwischen dem 3D μ CT-Datensatz sowie den H&E-gefärbten Objektträgern identifiziert. Dadurch konnte von ImFusion ein Modell etabliert werden, welches die Identifikation des HE-Schnittes innerhalb eines zuvor gewonnenen μ CT-Datensatzes mit einer Genauigkeit von bis zu 20 μ m ermöglicht (Abb. 3, aus Publikation (3)):

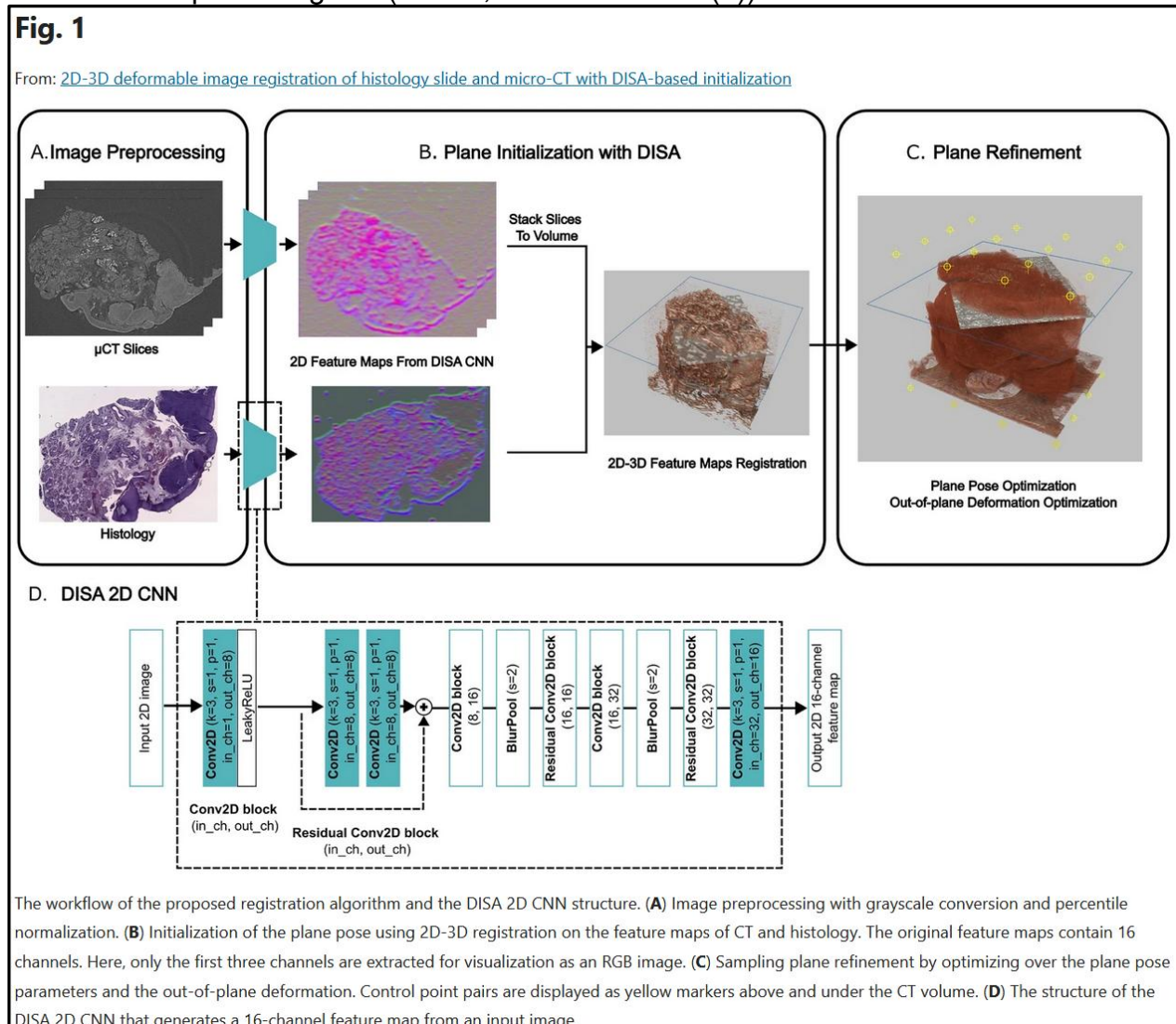


Abb. 3 Reidentifikation eines HE Schnittes (näherungsweise 2D) innerhalb eines zuvor

gewonnenen 3D μ CT Datensatzes. Aus (3), Open Access gemäß "Creative Commons licences".

Weiterhin wurde die Software iterativ dahingehend erweitert, dass mithilfe vereinfachter Markierungswerkzeuge relevante Bereiche innerhalb des μ CT-Datensatzes annotiert und als 3D Volumina im restlichen Datensatz visualisiert werden können. Dadurch ist eine Identifikation relevanter Bereiche im 3D Datensatz zur gezielten Schnittentnahme für objekträgerbasierte Färbungen möglich. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass über Messungen des Höhenprofils durch das EMI nach Anschnitt des FFPE Blockes mit dem Mikrotom bei 1,5 μ m Vorschub an der Oberfläche des Blockes Höhenunterschiede von bis zu ca. 160 μ m entstehen. Die gezielte Schnittentnahme nach Planung am μ CT sollte daher entweder anhand von mit dem bloßen Auge erkennbarer Landmarken während der Bedienung des Mikrotoms erfolgen oder anhand der tatsächlichen Dicke des FFPE Blockes. Weiterhin erlaubten die Annotationen Aussagen zu Oberflächen-Volumendaten der verschiedenen Gewebetypen (z.B. Anteil lymphatischen Gewebes, Muskulatur, etc., Tumolvolumen/-Anteil) und lieferten darüber hinaus die Grundlage, im Rahmen eines Proof-of-Concept ein Modell zur automatischen Identifikation verschiedener Gewebetypen sowie Tumorgewebe zu etablieren und zu testen. Dabei zeigte sich zwischen manueller Annotation und der KI eine hohe Übereinstimmung bez. Bindegewebe, lymphatischem Gewebe, Plattenepithel und Speicheldrüsen, während Muskulatur in der KI-basierten Annotation deutlich schlechter erkannt wurde (Korrelationskoeffizient nach Spearman rho für die verschiedenen Gewebetypen manuelle Annotation vs. KI insgesamt 0,79; p = 0,00984). Bei der Identifikation verhornten und unverhornten Tumorgewebes ergab sich zwischen der manuellen Annotation und der KI eine nahezu vollständige Übereinstimmung im gemessenen Volumenanteil (Korrelationskoeffizient nach Spearman rho = 1).

Erfolgreiche Definition notwendiger IT-Strukturen für die Pathologie zur zukünftigen Umsetzung einer virtuellen Histologie (AP7)

Die Ergebnisse während der vorausgehenden Arbeitspakete lieferten die Grundlage, mit unseren Kooperationspartnern von Dorner IT und dem Universitätsklinikum Freiburg gemeinsam die notwendige IT-Infrastruktur für die μ CT-basierte Histologie zu definieren. Aufgrund der derzeitigen Dauer eines μ CT-Scans handelt es sich um ein Verfahren, welches an zuvor ausgewählten Paraffinblöcken durchgeführt werden sollte. Diesem Umstand wird bereits im präanalytischen Teil, d.h. der einsendenden Klinik, im Rahmen des Order-entry begegnet. Dieser erlaubt eine zielgerichtete Vorauswahl der Probe, welche für das μ CT vorgemerkt wird. In Abhängigkeit der eingesandten Probe werden klinische Daten für die Histopathologie aus dem klinischen Informationssystem (KIS) exportiert und der ärztlichen, histopathologischen Befundung visualisiert. Der μ CT-Datensatz wird nach Fertigstellung über die ImFusion Software dargestellt, welche sich direkt aus der Software von Dorner IT starten lässt. Die Befundung erfolgt in der Software von Dorner IT, welche die Einbindung standardisierter, automatisierter Textbausteine erlaubt, die sich z.B. aus den morphometrischen Tumordaten (z.B. Tumordurchmesser) ergeben könnten. Der Befundexport erfolgt aus der Software von Dorner IT über die HL7- und / oder FHIR-Schnittstelle zurück an das KIS.

Die aus unserer Sicht zu erwartenden, größten Veränderungen zur Erlangung notwendiger Funktionalitäten, der Kompatibilität mit und Integrierbarkeit in die gängigen Abläufe in der Pathologie für die Zukunft wären:

- Ausreichende Verfügbarkeit von Speicherplatz für μ CT-Scans: Bei zu erwartender Größe von derzeit ca. 80 GB pro FFPE-Block würden bei voller Umstellung auf den HORUS-Workflow bei ca. 120k Blöcken pro Jahr (circa Jahreszahlen UKD

Pathologie) z.B. 9.600 TB an Daten pro Jahr anfallen. Bei Speicherung lediglich der zur Diagnose relevanten Bereiche könnten einzelne 2D Slices exportiert werden und den Speicherbedarf auf ca. 1-2 GB pro Block reduzieren (120-240 TB pro Jahr).

- Ausreichende Rechenleistung zur 3D Rekonstruktion der μ CT-Datensätze und deren flüssigen Annotation zur Identifikation und Morphometrie relevanter Bereiche: z.B. Arbeitsspeicher > 100 GB für einen Datensatz oder Bereitstellung eines pyramidalen/streamingfähigen 3D-Formats. Bei intramuraler Lösung wäre die Leistung analog zu einem HPC zu erwarten, bei extramuraler Lösung ist ein ausreichend hoher Datendurchsatz über ein ausfallsicheres Netzwerk zu gewährleisten (Glasfaseranbindung).
- Bildschirme analog zum Befundungsstandard der Radiologie.

Demonstrationsveranstaltung zum Projektabschluss und Ausblick

Die unter AP7 erfolgte Integration des Workflows in ein frühes Demonstratorniveau wurde im Rahmen der Abschlussveranstaltung am Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg in Form begehrter Stationen gezeigt. Die Ziele wurden in einem dabei erstellten Video zusammengefasst (<https://dorner.de/horus-ki-mikro-ct-digitale-pathologie/>, Zugriff am 23.09.2025) Bei der Abschlussveranstaltung nahm u.a. Histomography teil, ein neuer Hersteller von μ CT-Geräten speziell für die Histopathologie. Dies konnte im direkten Dialog eine unmittelbare Integration in einen potentiellen, zukünftigen Workflow mit optimierter μ CT-Hardware beispielhaft ermöglichen. Sofern man den derzeitigen FFPE-Workload des Instituts für Pathologie des UKD vollständig auf den HORUS-Workflow umstellte, würden ca. 545 FFPE-Blöcke pro Arbeitstag anfallen, bei voll automatisiertem 24/7 Betrieb ca. 329 Blöcke pro Tag, bzw. 13,7 Blöcke pro Stunde. Die tatsächlich verwertbare Auflösung sollte bei ca. 0,4 μ m liegen. Anhand der getesteten Geräte würden wir aus klinisch-pathologischer Sicht solche mit Phasenkontrast bevorzugen.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises umfassten die Stelle der PhD Studentin Verena Stehl (TVL E13, 65%), der technischen Assistenz (TVL E9, 100%) und einer wissenschaftlichen Hilfskraft. Die genauen Buchungsangaben werden über die Drittmittelverwaltung des UKD im seitens des DLR bereitgestellten Formulars in profi-online bereitgestellt.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die im initialen Antrag von HORUS formulierten Ziele stellten ein hohes Forschungsrisiko dar. Es konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht sichergestellt werden, dass der gewählte Ansatz mit dem gewählten Gewebe zufriedenstellende Ergebnisse liefert; der im Erfolgsfall sehr hohe Nutzen und die vielversprechende Vorstudie ließen die Risikoabschätzung positiv ausfallen. Dennoch war das Risiko so hoch, dass eine im Vorfeld bei der eITT erörterte Förderung dieser Forschung durch z.B. einen Konzern nicht in Aussicht stand. Daher wäre eine Durchführung des Forschungsvorhabens in Deutschland ohne öffentliche Förderung nicht möglich gewesen. Die Zuwendung war daher notwendig.

Die im Teilvorhaben durchgeführten Arbeiten zur Etablierung der schnittflächenbasierten Histologie, Bereitstellung der Gewebeproben für unsere Kooperationspartner im HORUS Verbund, Anfertigung und Annotation histologischer Schnittpräparate, Identifikation und Annotation der relevanten Strukturen im μ CT-Datensatz lieferte unseren Kooperationspartnern die notwendigen Grundlagen zur Erreichung ihrer Ziele und der

übergeordneten Ziele. Die Resultate werden im Teil „Ergebnisse des Arbeitsplans“ dargestellt. Am Ende entstand dadurch ein erfolgreiches Verfahren, welches die präzise Reidentifikation eines objektträgerbasierten Schnittes in einem zuvor zerstörungsfrei gewonnenen 3D μ CT-Datensatz mit hoher Auflösung erlaubt. Es konnte weiterhin festgestellt werden, welche Leistungskriterien ein μ CT-basierter Ansatz zur Etablierung eines histopathologischen Workflows auf Hard- und Softwareebene notwendig sind. Schließlich konnte gezeigt werden, dass mithilfe eines zerstörungs- und färbefreien Verfahrens die Identifikation relevanter Strukturen bereits im FFPE Block automatisch unterstützt möglich ist.

Die im Rahmen dieses Teilvorhabens geleisteten Projektarbeiten waren daher notwendig und angemessen.

Voraussichtlicher Nutzen bzw. Verwertbarkeit der Ergebnisse - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

- Bez. Der erfolgten und geplanten wissenschaftlichen Verwertung in Form von Veröffentlichungen s. Kapitel „Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse“.
- Weiterhin wurden basierend auf den Vordaten von HORUS Forschungsanträge gestellt, die methodisch u.a. mithilfe von μ CT die Verbindung zwischen hoch aufgelösten Ultraschalldaten und Histologie erlauben. Der diesbezügliche BMBF Antrag mit Schwerpunkt 3D Darstellung von Gefäßen befindet sich noch in Prüfung, der DFG Antrag mit Schwerpunkt Identifikation von Mikrometastasen wurde positiv beschieden (DFG SE 3822/1-1). In beiden Anträgen ist Histomography Unterauftragnehmer zur Erstellung der μ CT-Scans. Beide Anträge entsprechen einer unmittelbaren wissenschaftlichen Verwertung von in HORUS generierten Vordaten, der BMBF Antrag beinhaltet eine mögliche, zukünftige wirtschaftliche Verwertung der dann neu generierten Ergebnisse. Beide Anträge sind auf eine Laufzeit von 36 Monaten ausgelegt.
- Zur Erforschung virtueller histologischer Färbungen wurde bereits während des HORUS Projekts eine Kooperation mit der Hochschule Düsseldorf (Prof. André Stuhlsatz) begonnen, in deren Zusammenhang durch eine Masterarbeit auftretende Verzerrungen während der histologischen Schnittgewinnung direkt am Mikrotom analysiert wurden. Die Kooperation wird weiterhin fortgesetzt mit dem Ziel, weitere hoch aufgelöste Messdaten zu gewinnen, um ein präzises Verzerrungs-Entzerrungs-Modell zu lernen. Der Zeitaufwand liegt je nach bewilligten Mitteln bzw. Transfermöglichkeit von Ergebnissen aus anderen Forschungsprojekten bei ca. 24-60 Monaten.
- Die gewonnene Expertise in der μ CT-basierten Gewebeanalytik wird kooperativ für Forschungsfragestellungen anderer Gruppen am UKD verwendet (u.a. der Kliniken für Orthopädie und Pädiatrie). Ein aktuelles Kooperationsprojekt wird wahrscheinlich in 12-18 Monaten abgeschlossen.

Ziel der benannten Punkte ist die Etablierung eines histopathologischen Workflows, basierend auf zerstörungsfreien Verfahren und zur zukünftigen Anwendbarkeit in der histopathologischen Routine.

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) in 2023 kam es zum Kontakt mit der Firma Histomography (<https://histomography.com/>, Zugriff am

23.09.2025), einem jungen Unternehmen mit Schwerpunkt, μ CT-Geräte für den histopathologischen Bedarf zu etablieren. Das Unternehmen nahm an der HORUS Abschlussveranstaltung teil und ist Unterauftragnehmer in zwei nachfolgenden Forschungsanträgen.

Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Erfolgte Veröffentlichungen mit Ergebnissen, die im Rahmen dieses Teilvorhabens gewonnen wurden:

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.

Im Rahmen der Etablierungsarbeiten zur Erforschung der Färbung von Blockanschnittflächen wurde bei der Austestung verschiedener Lösungsmittel eine Fällungsreaktion feiner, nadelförmiger Paraffinflocken beobachtet, die unmittelbar und sehr fest an den Objektträger banden. Diese kristallartigen, hydrophoben Strukturen stellten sich als eine große Fehlerquelle von immunhistochemischen Färbungen bei unvollständiger Entparaffinierung auch in etlichen anderen Anwendungsfeldern dar und konnten durch die experimentellen Arbeiten zweifelsfrei identifiziert werden. Die Kenntnis dieser möglichen Fehlerquelle fand daher Eingang in die o.g. Methodenarbeit und wird die Robustheit der Methode erhöhen.

2. Lakkimsetty, S. S., A. Weber, K. A. Bemis, V. Stehl, P. Bronsert, M. C. Föll, and O. Vitek. 2024. MSlreg: an R package for unsupervised coregistration of mass spectrometry and H&E images. *Bioinformatics* 40.

Die im Rahmen unseres Teilprojekts erstellten und annotierten HE Schnitte von Kontrollgewebe wurden unseren Kooperationspartnern am UKF zur Verfügung gestellt, um die publizierte Methode zu etablieren.

3. Chen, J., M. Ronchetti, V. Stehl, V. Nguyen, M. Al Kallaa, M. T. Gedara, C. Lölkes, S. Moser, M. Seidl, and M. Wieczorek. 2025. 2D-3D deformable image registration of histology slide and micro-CT with DISA-based initialization. *Scientific Reports* 2025 15:1 15: 1–9.

Im Rahmen unseres Teilprojekts wurden die zentralen Grundvoraussetzungen zur Etablierung des publizierten Algorithmus geliefert. Dies umfasste die Bereitstellung der FFPE Blöcke, Erstellung und Annotation der objektträgerbasierten Schnitte und die Annotationen der 3D μ CT-Datensätze.

Verena Stehl gewann für das Teilvorhaben den Ideenwettbewerb des Center for Entrepreneurship Düsseldorf (CEDUS) mit dem 1. Platz in der Kategorie "Forschende" am 11.07.2024.

Geplante Veröffentlichungen mit Ergebnissen, die im Rahmen dieses Teilvorhabens gewonnen wurden:

- Eine Veröffentlichung mit immunologischem Schwerpunkt, die die erhobenen Tumor- und Lymphknotendaten der μ CT-Aufnahmen mit immunologischen Markern in Form von Multiplex-Färbungen verbindet. Die Multiplexfärbungen werden mit einem externen Kooperationspartner durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1. Schoenfeld, A. von, P. Bronsert, M. Poc, A. Fuller, A. Filby, S. Kraft, K. Kurowski, K. Sørensen, 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.
4. Busse, M., M. Müller, M. A. Kimm, S. Ferstl, S. Allner, K. Achterhold, J. Herzen, and F. Pfeiffer. 2018. Three-dimensional virtual histology enabled through cytoplasm-specific X-ray stain for microscopic and nanoscopic computed tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 2293–2298.
5. Müller, M., M. A. Kimm, S. Ferstl, S. Allner, K. Achterhold, J. Herzen, F. Pfeiffer, and M. Busse. 2018. Nucleus-specific X-ray stain for 3D virtual histology. *Sci Rep* 8: 17855.
6. Müller, M., I. de Sena Oliveira, S. Allner, S. Ferstl, P. Bidola, K. Mechlem, A. Fehringer, L. Hehn, M. Dierolf, K. Achterhold, B. Gleich, J. U. Hammel, H. Jahn, G. Mayer, and F. Pfeiffer. 2017. Myoanatomy of the velvet worm leg revealed by laboratory-based nanofocus X-ray source tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 12378–12383.
7. Töpferwien, M., F. van der Meer, C. Stadelmann, and T. Salditt. 2018. Three-dimensional virtual histology of human cerebellum by X-ray phase-contrast tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 6940–6945.
8. de Bournonville, S., S. Vangrunderbeeck, and G. Kerckhofs. 2019. Contrast-Enhanced MicroCT for Virtual 3D Anatomical Pathology of Biological Tissues: A Literature Review. *Contrast Media Mol Imaging* 2019: 1–9.
9. Albers, J., S. Pacilé, M. A. Markus, M. Wiart, G. Vande Velde, G. Tromba, and C. Dullin. 2018. X-ray-Based 3D Virtual Histology—Adding the Next Dimension to Histological Analysis. *Mol Imaging Biol* .
10. Khimchenko, A., H. Deyhle, G. Schulz, G. Schweighauser, J. Hench, N. Chicherova, C. Bikis, S. E. Hieber, and B. Müller. 2016. Extending two-dimensional histology into the third dimension through conventional micro computed tomography. *Neuroimage* .
11. Katsamenis, O. L., M. Olding, J. A. Warner, D. S. Chatelet, M. G. Jones, G. Sgalla, B. Smit, O. J. Larkin, I. Haig, L. Richeldi, I. Sinclair, P. M. Lackie, and P. Schneider. 2019. X-ray Micro-Computed Tomography for Nondestructive Three-Dimensional (3D) X-ray Histology. *American Journal of Pathology* .
12. Eckermann, M., M. Töpferwien, A.-L. Robisch, F. van der Meer, C. Stadelmann, and T. Salditt. 2019. Phase-contrast x-ray tomography of neuronal tissue at laboratory sources with submicron resolution. In.
13. Cahill, L. C., M. G. Giacomelli, T. Yoshitake, H. Vardeh, B. E. Faulkner-Jones, J. L. Connolly, C. K. Sun, and J. G. Fujimoto. 2018. Rapid virtual hematoxylin and eosin histology of breast tissue specimens using a compact fluorescence nonlinear microscope. *Laboratory Investigation* 98: 150–160.
14. Bini, J., J. Spain, K. Nehal, V. Hazelwood, C. DiMarzio, and M. Rajadhyaksha. 2011. Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance. *J Biomed Opt* 16: 076008.
15. Gareau, D. S., J. K. Karen, S. W. Dusza, M. Tudisco, K. S. Nehal, and M. Rajadhyaksha. 2009. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 14: 034012.
16. Lee, M., C. S. Herrington, M. Ravindra, K. Sepp, A. Davies, A. N. Hulme, and V. G. Brunton. 2021. Recent advances in the use of stimulated Raman scattering in histopathology. *Analyst* 146: 789–802.
17. Kio, T. M., and S. Park. 2020. Nano-scientific application of atomic force microscopy in pathology: From molecules to tissues. *Int J Med Sci* 17: 844–858.
18. Wang, L. V., and J. Yao. 2016. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nat Methods* 13: 627–638.
19. Emil Tampu, I., M. Maintz, D. Koller, K. Johansson, O. Gimm, A. Capitanio, A. Eklund, and N. Haj-Hosseini. 2020. Optical coherence tomography for thyroid pathology: 3D analysis of tissue microstructure. *Biomed Opt Express* 11: 4130.