

3D Visualisierung von Organismen

H. Thiele^{1,2}, S. Heldmann², B. Fischer²

¹Steinbeis Innovation Center SCiLS,

Richard-Dehmel-Strasse 69

D-28211 Bremen, Germany

ht@scils.de

²Fraunhofer MEVIS Institute for Medical Image Computing, Lübeck, Germany

Abstract: Mit dem 3D MALDI Imaging Verfahren können wichtige klinisch-onkologische Fragestellungen zu Stoffwechselfvorgängen direkt in Organen und Geweben erforscht werden. Die ungeheuer großen Datenmengen erfordern automatisierte Algorithmen zur Datenauswertung, Visualisierung und zur Aufbereitung der klinisch-relevanten Informationen. Dies erfordert mathematische Forschung insbesondere zur Daten-Vorverarbeitung, zur Registrierung, zur Auswertung von Serien-Schnitten und Rekonstruktion eines 3D Objektes sowie zur Segmentierung der 3D MALDI Imaging Datensätzen. Dieser Artikel enthält eine Zusammenfassung von Visualisierungskonzepten zur Verarbeitung und Integration von multi-modalen Bilddaten. Der Artikel richtet sich nicht an MALDI Imaging Experten sondern allgemein an interessierte Wissenschaftler, die einen ersten Eindruck von der Komplexität des MALDI Imaging und der damit verbundenen wissenschaftlichen Herausforderungen gewinnen wollen.

1 Einführung

Sowohl die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Medikamentenforschung als auch die Suche nach krankheitsspezifischen Biomarkern in der diagnostischen Medizin sowie eine individualisierte Therapieplanung erfordern eine detaillierte Kenntnis über den Metabolismus des untersuchten Organismus und dessen pathologische Veränderungen [AD09].

Da die komplette metabolische Information eines Individuums in seinem Protein-Spektrum enthalten ist, kommt der Suche nach einem bildgebenden Verfahren, welches in der Lage ist, dieses Spektrum zu bestimmen und gleichzeitig anatomisch punktgenau zuzuordnen eine entscheidende, wenn nicht sogar bahnbrechende Rolle zu.

Eine Analyse der etablierten Verfahren zeigt auf, dass **keines** die oben genannten Forderungen erfüllt. Die klassischen bildgebenden tomographischen Verfahren (CT, MR) bilden lediglich die Anatomie ab oder sie liefern über die Lokalisierung spezifischer Tracer-Substanzen nur partielle unvollständige Informationen über den Metabolismus (molecular imaging, PET, SPECT). Die gesuchte komplette metabolische Information kann prinzipiell über Verfahren der Massenspektrometrie (MS) bestimmt werden. Allerdings liefern die klassischen MS-Verfahren keine räumlichen, bzw. im Fall der MR-Spektroskopie nur grob räumlich aufgelöste Informationen.

Ein wichtiger Schritt wurde vor knapp zehn Jahren mit der Entwicklung der **Matrix unterstützten Laser Desorption / Ionisation (MALDI)** Technik geleistet. Sie bestimmt nicht nur das Massenspektrum, sondern ist gleichzeitig in der Lage, dieses hochpräzise räumlich zuzuordnen! Allerdings ist das Verfahren bisher auf 2D-Gewebeschnitte beschränkt (2D-MALDI MS).

Die Erweiterung dieser 2D-Technik zu einer 3D-Technik stellt ein bildgebendes Verfahren zur Verfügung, dessen klinisches, diagnostisches und therapeutisches Potential nicht hoch genug einzuschätzen ist.

Mit 3D-MALDI-Imaging können **erstmal**s wichtige klinisch-onkologische Fragestellungen direkt in Organen und Geweben erforscht werden, die den Kontext des hochkomplexen (heterogenen) 3D-Gewebeverbands voraussetzen. Dazu zählen die Verteilung und Metabolisierung von Wirkstoffen in den typischerweise sehr komplex aufgebauten, krankhaft veränderten Geweben (z.B. Tumoren) und das damit unmittelbar zusammenhängende Therapieansprechen, das mit einem 3D-MALDI Imaging Verfahren erstmals direkt in Organen und Geweben systembiologisch analysiert werden könnte.

2 MALDI Imaging und klassische Datenauswertung

Die Präparation von Gewebeschnitten für das MALDI-Imaging Verfahren ist ein aufwändiger und technisch schwieriger Prozess. Die Durchführung eines hochaufgelösten 2D-MALDI Experimentes dauert inklusive Probenpräparation, Transport und Erfassen der MS-Spektren ca. 4-6 Stunden. Die Durchführung eines 3D-MALDI Experimentes mit 50 - 100 Schnitten liegt damit zur gegenwärtig außerhalb der Zeiten, die im klinischen Routine-Betrieb zur Verfügung stehen.

Der Hauptgrund, der einem zukünftigen Routineeinsatz heute noch im Wege steht, sind die ungeheuer großen Datenmengen, die selbst bei dem 2D-MALDI Imaging nicht ohne die automatisierten Auswertalgorithmen handhabbar sind: typischerweise werden einzelne charakteristische m/z Werte ausgewählt und die räumliche Verteilung der Spektralwerte an diesem m/z Wert als 2D-Bild ausgegeben. Durch die kontinuierliche Veränderung des m/z Werts entsteht ein "Film" der räumlichen Verteilungen der zugehörigen Spektralwerte. Eine rein visuelle Auswertung dieser Filmsequenz durch den

Anwender ist nicht mehr möglich, eine Übertragung auf das 3D-MALDI Imaging Verfahren ist sinnlos.

Die im diesem Beitrag vorgestellten technischen Ziele und Innovationen betreffen die Entwicklungen von adäquaten Verarbeitungs-, Analyse- und Visualisierungswerkzeugen für das 2D-MALDI und 3D-MALDI Imaging Verfahren.

Vor der Durchführung einer 3D MALDI Imaging Analyse ist es notwendig, die Reproduzierbarkeit der Messungen der einzelnen Gewebeschnitte sicher zu stellen. Dies geschieht durch die visuelle Betrachtung und Beurteilung mehrerer einzelner Schnitte. Um die Qualität der Gewebe-Präparation und die Herstellung der Serienschnitte von der Gewebeprobe zu bewerten, werden zunächst hochaufgelöste Histologie-Bilder, in denen die anatomischen Strukturen durch Einfärbung (H & E Färbung) sichtbar gemacht sind (s. Abbildung 1) verglichen. Im weiteren beurteilt man die Reproduzierbarkeit der Massenspektrometrie-Daten innerhalb der einzelnen Schnitte. Die Abbildung 1 zeigt für drei ausgewählte m/z -Werte die räumliche Verteilung der Intensitäten (farb-kodiert) in den entsprechenden "Massen-Bildern". Für den Wert $m/z = 4801$ zeigt die Abbildung die Darstellungen mit und ohne Berücksichtigung des kanten-erhaltenden Entrauschens-Verfahrens. In der Darstellung des Massenbildes $m/z = 4801$ auf der Basis der Ausgangsdaten zeigt sich eine starke und multiplikative Variation von Bildpunkt-zu-Bildpunkt und damit von Spektrum zu Spektrum. Die Anwendung des kanten-erhaltenden Verfahrens des Entrauschens (2D Chambolle Algorithmus) reduziert diese Variation und führt zu einer deutlichen Verbesserung in der Visualisierung.

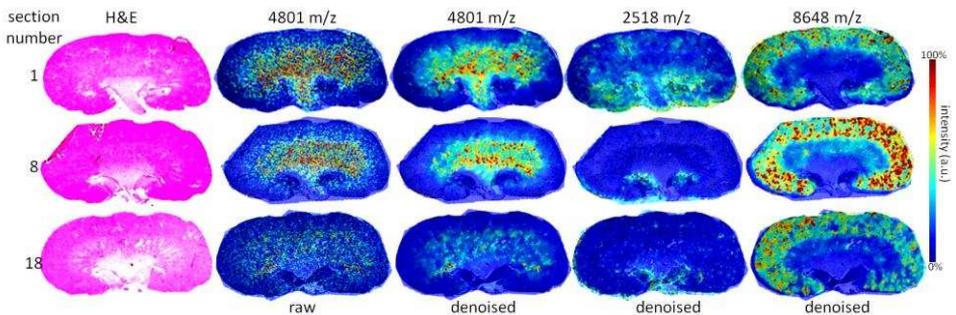


Abbildung 1. Hochaufgelöste, eingefärbte (H&E Färbung) histologische Aufnahmen von drei unterschiedlichen Serienschnitten der Maus-Niere und die Darstellung exemplarischer Massenbilder für diese Gewebeschnitte. Das Massenbild zeigt die räumliche Verteilung der Intensitätswerte für den m/z -Wert; jedes Bild hat eine eigene Intensitäts-Skalierung (blau = niedrigster Wert; rot = höchster Wert) (Abb. entstammt [TS12]).

3 Vorverarbeitung der MALDI-Rohdaten

Bei der 3D-MALDI Imaging Technik sollen ca. 50 - 100 Schnitte analysiert werden. dadurch entsteht eine Datenmenge, die ohne weiteres nicht auswertbar ist. Zur automatischen Nutzung der Daten in der klinisch-pharmakologisch-medizinischen Anwendung müssen die Informationen mit mathematischen Methoden auf die wichtigsten Details reduziert werden, so dass sie vom Endanwender zuverlässig interpretiert werden können. Ziel der Vorverarbeitung ist es, die einzelnen Schnittbilder für das nachfolgende Clustering und zur 3D-Visualisierung aufzubereiten. Die erforderlichen Schritte dazu sind Basislinien-Korrektur, Normalisierung der Spektren und Dimensionsreduzierung. Wie bereits erwähnt, wird in diesem Artikel zu Gunsten der Lesbarkeit gelegentlich auf das letzte Detail an wissenschaftlicher Genauigkeit verzichtet.

3.1 Basislinien-Korrektur

Für die Basislinien-Korrektur werden klassischerweise Methoden der morphologischen Bildverarbeitung eingesetzt. Alternativ dazu ist am Zentrum für Technomathematik, Universität Bremen, ein iteratives Verfahren entwickelt worden, das sich aus den folgenden Schritten zusammensetzt:

1. Berechnen einer geglätteten Version des Spektrums durch Faltung mit einem normalisierten Gauß-Kern.
2. Als Schätzung für die Basislinie dient das punktweise Minimum des Spektrums und der geglätteten Version. Für die nächste Iteration wird die geschätzte Basislinie als Input für Schritt 1 eingesetzt. Nach wenigen Iterationen approximiert die Basislinie die untere Einhüllende des Spektrums, welche die lokalen Minima des Spektrums verbindet. Dabei gibt es zwei Parameter. Erstens die Anzahl der Iterationen. Sie muss so groß sein, dass die Basislinie unter dem Spektrum liegt. Der zweite Parameter ist die Breite σ des Gauß-Kerns; er bestimmt, wie detailliert die Basislinie ist. Je größer das σ , desto glatter ist die Basislinie. Für kleine σ nähert sich die Basislinie immer mehr dem Spektrum selbst an [TK12].

3.2 Normalisierung

Nach Entfernen der Basislinie müssen die Spektren normalisiert werden. Der Grund dafür ist, dass alle Spektren unabhängig voneinander aufgenommen worden sind und diese für die weitere Bearbeitung daher vereinheitlicht werden müssen. Standardmäßig wird bezüglich des Total Ion Count (TIC) normalisiert, d.h. das Spektrum wird so skaliert, dass die Summe über das Spektrum eins ist. Kürzlich wurden in [DC11] weitere Nichtstandard-Normalisierungs-Methoden für 2D-MALDI Imaging vorgestellt, z.B. Normalisierungen, die Rausch-Eigenschaften mit berücksichtigen.

3.3 Dimensionsreduzierung

Zur Dimensionsreduzierung werden Ansätze aus [AM11], [TK11] berücksichtigt. Dabei wird ein Spektrum als Folge von Delta-Peaks mit einem Peak-Modell (modifizierter Gauß-Kern) gefaltet und mit additivem Rauschen modelliert. Dieses Modell ermöglicht das Auffinden von Peaks in einem Spektrum als Entfaltungsproblem, dass mit dem Orthogonal Matching Pursuit Verfahren approximativ gelöst werden kann. Die Methode ist weit verbreitet und kann sehr effizient implementiert werden. Sie eignet sich gut für die Volumendaten beim 3D-MALDI Imaging. Es gibt zwei einfach zu wählende Parameter, die Breite des Gauß-Kerns und die Anzahl der gesuchten Peaks. Die Breite des Gauß-Kerns wird empirisch ermittelt. Um mit diesem Ansatz eine Dimensionsreduzierung zu erreichen, sucht der Algorithmus zunächst in jedem Spektrum ca. 40 Peaks. Anschließend werden alle m/z -Werte notiert, an denen mindestens 1% aller Spektren einen Peak aufgewiesen haben. Sämtliche Spektren schränkt der Algorithmus auf diese m/z -Werte ein.

Effiziente Implementierungen ermöglichen die Anwendung auf 3D-MALDI Daten. Die nun erheblich kürzeren Spektren eines Datensatzes können im Arbeitsspeicher üblicher PCs weiter verarbeitet werden. Dies ist insbesondere für die folgende, räumliche Vorverarbeitung nötig.

4 Registrierung 2D/3D-MALDI Imaging

Als Basis für das 3D-MALDI Imaging sind Registrierungsalgorithmen erforderlich, die es ermöglichen, aus einem Satz von 2D-MALDI Schichten die ursprüngliche 3D-Probe zu rekonstruieren. In der Literatur gibt es eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Registrierung von Serienschnitten beschäftigen. Allerdings ist keine Arbeit bekannt, die sich der Registrierung von MALDI-Schnitten annimmt. Eine Übertragung der bekannten Techniken erscheint schwierig, da die MALDI-Modalität sich nicht mit herkömmlichen (histologischen) Schnitten vergleichen lässt. Um zu einer verlässlichen Registrierung zu kommen, ist es aber unabdingbar, die speziellen Eigenschaften des zugrundeliegenden Bildmaterials zu modellieren und algorithmisch umzusetzen.

Die 3D-Rekonstruktion der MALDI Daten basierend auf 2D-Schnittbildern erfolgt mit Methoden der Serienschnitt-Registrierung, bei der die automatisch generierten Lichtbildaufnahmen der histologischen Schnittbilder bei MALDI-Messungen verwendet werden. Da die Lage der MALDI-Messpunkte für jeden dieser Punkte bekannt ist, lässt sich die 3D-Rekonstruktion der Lichtbilder respektive die Serienschnittregistrierung auf die MALDI-Messungen übertragen.

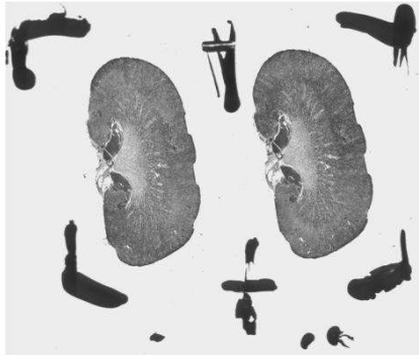


Abbildung 2. Lichtbild eines Objektträgers mit zwei histologischen Schnitten vor der MALDI-Messung und zusätzlichen Markierungen auf dem Objektträger.

4.1 Vorverarbeitung der Daten für die Serienschchnittregistrierung

Zur Vorbereitung der Daten für die Registrierung sind einige grundlegende Verarbeitungsschritte notwendig. Die verwendeten Lichtbilder für die Registrierung zeigen einen kompletten Objektträger, auf dem mehrere histologische Schnitte aufgebracht sind, sowie weitere Markierungen (siehe Abb. 2). Für die Registrierung werden folgende Vorverarbeitungsschritte implementiert: (i) Separierung der einzelnen Schnitte und (ii) Entfernen von Artefakten (Markierungen). Am Ende der Verarbeitungskette liegt ein geordneter Bildstapel als Eingabe für die Serienschchnittregistrierung vor.

4.2 Rigide Serienschchnittregistrierung

Zur 3D-Rekonstruktion wird der Bildstapel bestehend aus 2D-Schnitten untereinander registriert. Hierbei werden grundsätzlich zwei verschiedene Strategien untersucht:

1. Sequentielle Serienschchnittregistrierung

In diesem Ansatz werden die Schnitte nacheinander unabhängig voneinander sequentiell registriert. D.h. es erfolgt eine 2D-rigide Registrierung von Schnitt #2 auf Schnitt #1, dann erfolgt die Registrierung von Schnitt #3 auf den registrierten Schnitt #2, dann Schnitt #4 auf den registrierten Schnitt #3, usw.

2. Globale Serienschchnittregistrierung.

Bei diesem Ansatz sollen gleichzeitig alle Schnitte miteinander registriert werden. D.h. im Falle von N Schnittbildern werden nicht $(N-1)$ 2D-Registrierungen, bei denen nacheinander $(N-1)$ Transformationen unabhängig voneinander bestimmt werden, durchgeführt. Bei der globalen Serienschchnittregistrierung sollen die $(N-1)$ Transformationen in einem Schritt gleichzeitig und voneinander abhängig berechnet werden. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen sequentiellen Vorgehen erfordert dies einen höheren Rechen- und Speicheraufwand.

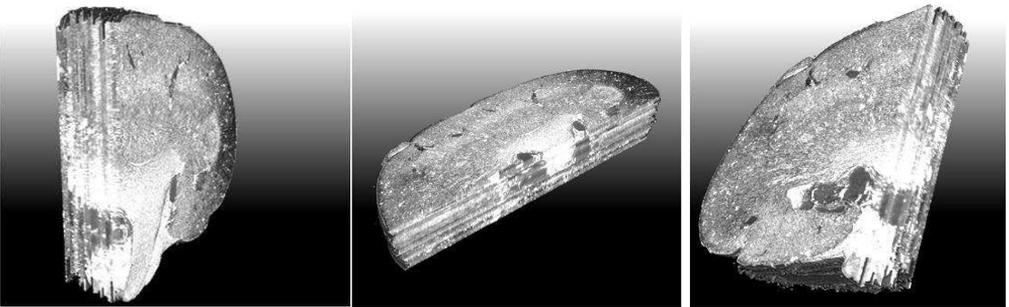


Abbildung 3. Ein Stapel optischer Schnittbilder bestehend aus 33 Schnitten der Maus-Niere nach der Registrierung der Serienschritte. Es wird nur ein Ausschnitt des Stapels visualisiert um die Qualität der Ausrichtung der einzelnen Schnitte beurteilen zu können (Abb. entstammt [TS12]).

5 3D Vorverarbeitung

Bisher wurde im wesentlichen die Datenvorverarbeitung eines 2D MALDI Imaging Datensatzes beschrieben. Die Vorverarbeitung von 3D MALDI Imaging Daten steht vor einer weiteren Hürde: Um die 3D Daten verarbeiten zu können, muss zunächst die Registrierung angewendet werden. Dadurch bilden die Spektren räumlich gesehen allerdings kein reguläres Gitter mehr im Raum. Die Bildverarbeitung muss also von normalen Voxel- Daten auf Punktwolken bzw. Graphen verallgemeinert werden. Im Allgemeinen basieren Rauschreduktions-Verfahren darauf, dass die Grauwerte lokal gemittelt werden. Ein Pixel bekommt also den Mittelwert aus dem eigenen Wert und den Werten der Nachbarpixel zugewiesen. Auch für 3D-MALDI konnten solche örtlichen Nachbarn zu jedem Knoten gefunden und die Verfahren verallgemeinert werden (digitale Topologie des Datensatzes). Die bereits untersuchte räumliche Vorverarbeitung besteht zunächst aus einem Median-Filter, d.h. ein Pixel bekommt als neuen Wert den

Median aus seinem alten Wert und den alten Werten seiner Nachbarn. Danach wird ein Verfahren über TV-Minimierung angewendet, das sich in ähnlicher Weise auf Graphen übertragen lässt. Der Vorteil dieses Verfahren im Vergleich zu linearem Filtern, wie es in der klassischen Bildverarbeitung angewendet wird, ist seine kantenerhaltende Eigenschaft [AB10].

6 Anwendung von Cluster-Algorithmen

Das räumliche Segmentieren von 3D-MALDI Imaging Daten wird durch Clustering von Spektren in disjunkten Gruppen ausgeführt, wobei jedes Spektrum genau einer solchen Gruppe zugeordnet wird. Im Prinzip können Clustering-Methoden auf die vollen vorverarbeiteten Spektren angewendet werden, d.h. ohne vorherige Peak-Erkennung und räumliche Vorverarbeitung. Um allerdings die Effizienz des Clustering-Algorithmus zu steigern und das Ergebnis weniger anfällig bzgl. Rauschen zu machen, wird auf den dimensions-reduzierten Daten nach der Peak-Erkennung gearbeitet. Das 3D-Entrauschen der Daten verbessert die Ergebnisse und unterdrückt das Rauschen signifikant. Das Standardverfahren im Bereich MALDI Imaging zur Clusteranalyse ist das hierarchische Clustering. Aufgrund der Datenmenge ist dieses Verfahren für 3D-MALDI Imaging nicht anwendbar, da der Speicheraufwand quadratisch anwächst. Um mehr als eine Million Spektren zu analysieren, wird auf die entwickelte Bisecting-Methode ausgewichen. Im Kontrast zum klassischen hierarchischen Clustering werden hier nicht, angefangen mit einzelnen Spektren, sukzessive einzelne Klassen zusammengefasst. Stattdessen werden nun, angefangen mit der Menge aller Spektren, die Mengen sukzessive in 2 Teile aufgeteilt. Der Speicherbedarf wird dadurch soweit reduziert, dass mehrere Millionen Spektren problemlos verarbeitet werden können. Auch die Rechenzeit ist deutlich verkürzt. Das entwickelte Verfahren wird als Bisecting K-Means bezeichnet, da das Aufteilen der Mengen in zwei Teile mit dem Standardverfahren K-Means erfolgt. Durch Variation der Distanzmaße, die im K-Means benutzt werden, bzw. durch den Austausch von K-Means selbst durch ähnliche Verfahren können die Ergebnisse vermutlich weiter verbessert werden.

7 Segmentierungskarten und co-lokalisierte Massen

Die Ergebnisse des Clustering-Verfahrens werden als sog. Segmentierungskarten dargestellt. Eine Segmentierungskarte entsteht dadurch, dass jedem Cluster eine Farbe zugeordnet und jeder Bildpunkt entsprechend der Cluster-Zugehörigkeit des entsprechenden MS-Spektrums eingefärbt wird. Die Abbildung 4 zeigt eine 3D Segmentierungskarte für 3 verschiedene Cluster. Für jeden einzelnen Cluster werden zusätzlich die 3D m/z Bilder von zwei co-lokalisierten Massen in der Intensitätsverteilung dargestellt. Aus der Abbildung 4 heraus lässt sich leicht feststellen, dass die Segmentierungskarte die vereinfachte anatomische Struktur der Maus-Niere wiedergibt.

3D Segmentierungskarten stellt eine Möglichkeit dar, besondere Regionen (region of interest, ROI) innerhalb einer 3D Struktur zu selektieren. Im Gegensatz zu einer 2D MALDI Imaging Datenanalyse ist eine manuelle Festlegung eines ROI Bereichs im dreidimensionalen Raum nicht sinnvoll bzw. unmöglich. Die gezielte Wahl von Regionen in den Organismen ist von großer Bedeutung für die Interpretation von 3D MALDI Imaging Datensätzen. Diese Vorgehensweise erlaubt es, Interpretationen und weitergehende molekulare Aussagen auf der Basis von m/z Werten zu treffen, die mit den ausgewählten Bereichen in starkem Maße co-lokalisieren. Das Auffinden co-lokalisierter Massen ist der Ausgangspunkt für eine gezielte Identifikation der mit den m/z -Werten verknüpften Molekülen als Summenformel oder auch in der dreidimensionalen molekularen Struktur. Eine so gerichtete Datenauswertung des MALDI-Imaging Experiments unterstützt den Forscher in der Korrelation krankheits-spezifischer Veränderungen im Gewebe mit den molekularen Ursachen; ein Forschungsschwerpunkt in den aktuellen Lebenswissenschaften [TS12].

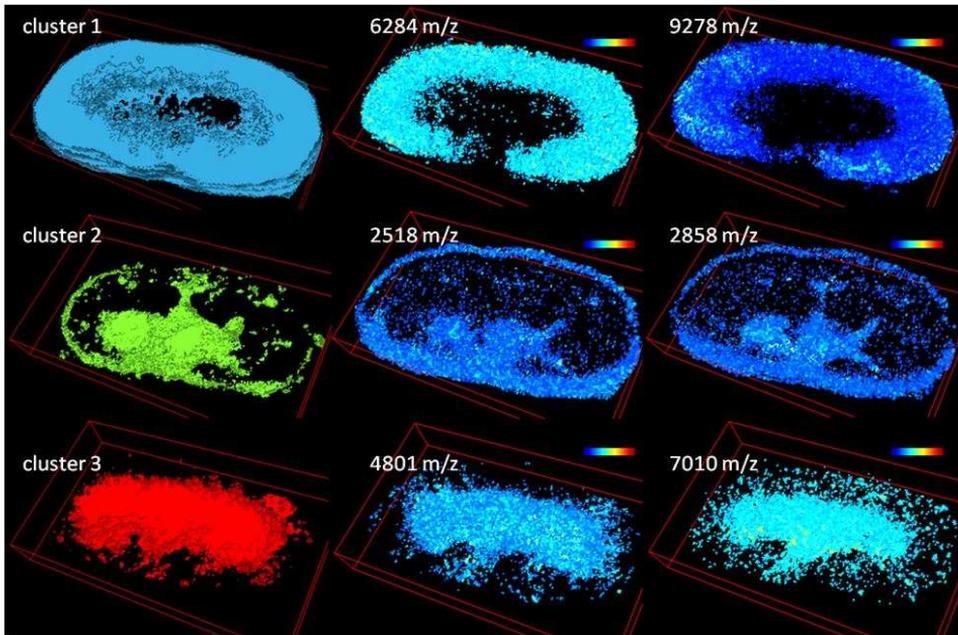


Abbildung 4. Interpretation einer 3D Segmentierungskarte für 3 verschiedene Cluster, die durch die Farben blau, grün, und rot gekennzeichnet sind. Für jeden einzelnen Cluster werden zusätzlich die 3D m/z Bilder von zwei co-lokalisierten Massen in der Intensitätsverteilung dargestellt (Abb. entstammt [TS12]).

8 3D Visualisierung

Eine besondere Herausforderung stellt die 3D Visualisierung der 3D MALDI Daten und die direkte Interaktion mit diesen 3D Daten dar. Da es sich bei den 3D MALDI Aufnahmen um Daten handelt, die in jedem Raumpunkt ein ein-dimensionales Spektrum abbilden, sind hier klassische Visualisierungstechniken aus der medizinischen Bildverarbeitung nicht geeignet. Die visuelle Aufbereitung der Daten muss eine schnelle und klare Analyse der multi-modalen metabolischen und anatomischen Informationen ermöglichen. Verschiedene Varianten werden an experimentellen Daten vorgestellt.

Literaturverzeichnis

- [AB10] Alexandrov T, Becker M, Deininger SO, Ernst G, Wehder L, Grasmair M, von Eggeling F, Thiele H, Maass P (2010) Spatial segmentation of imaging mass spectrometry data with edge-preserving image denoising and clustering. *J. Proteome Res.*, 9(12), 6535–6546
- [AD09] Alexandrov T, Decker J, Mertens B, Deelder AM, Tollenaar RAEM, Maass P, Thiele H (2009) Biomarker discovery in MALDI-TOF serum protein profiles using discrete wavelet transformation. *Bioinformatics*, 25(5), 643–649
- [AM11] Alexandrov T, Meding S, Trede D, Kobarg JH, Balluff B, Walch A, Thiele H, Maass P (2011) Super-resolution segmentation of imaging mass spectrometry data: solving the issue of low lateral resolution, *Journal of Proteomics*, 75 (2011) 237-245.
- [DC11] Deininger S, Cornett D.s, Paape R, Becker M, Pineau C, Rauser S, Walch A, Wolski E (2011) Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: practical considerations *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2011, DOI 10.1007/s00216-011-4929-z
- [TK11] Trede D, Kobarg JH, Steinhorst K, Alexandrov T (2011) Mathematical Methods for Imaging Mass Spectrometry. Proc. 14th Joint International IMEKO TC1+TC7+TC13 Symposium, Jena, Germany.
- [TK12] Trede D, Kobarg J,H, Oetjen J, Thiele H, Maass P, Alexandrov T (2012) On the Importance of Mathematical Methods for analysis of MALDI-Imaging Mass Spectrometry Data. *Journal of Integrative Bioinformatics*, doi:10.2390/biecoll-jib-2012
- [TS12] Trede D, Schiffler St, Becker M, Wirtz St, Steinhorst K, Strehlow J, Aichler M, Kobarg J,H, Oetjen J, Dyatlov A, Heldmann St, Walch a, Thiele H, Maass P, Alexandrov T (2012) Exploring Three-Dimensional Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Imaging Mass Spectrometry data: Three-Dimensional Spatial Segmentation of Mouse Kidney. *Analytical Chemistry* 2012, 84, 6079-6087