



Rentgenová počítačová mikrotomografie měkkých tkání

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika

Autorka práce: **Veronika Smékalová**
Vedoucí práce: prof. Ing. Aleš Richter, CSc.





X-ray micro computed tomography of soft tissue

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology
Author: **Veronika Smékalová**
Supervisor: prof. Ing. Aleš Richter, CSc.



Ústav zdravotnických studií
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Smékalová**
Osobní číslo: **Z13000139**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Rentgenová počítačová mikro tomografie měkkých tkání**
Zadávací katedra: **Ústav zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

1. Realizovat tomografické měření vybraných biologických vzorků na odlišných CT systémech.
2. Popsat základní stavbu a principy použitých tomografických systémů.
3. Uvést přípravu vzorku pro tomografické měření.
4. Provést srovnání tomografických dat z jednotlivých měření, vyhodnotit kvalitu obrazu a stanovit výhody či nevýhody vzhledem k zobrazení biologických otázek.

K podložení výsledků je nutné provést segmentaci vybraných částí biologického vzorku.

Teoretická východiska:

K porozumění procesu vývoje živočichů je požadována přesná vizualizace a parametrizace tří-dimenzionálního embrya, například myši. Využití rentgenové počítačové tomografie v embryologii a vývojové biologii je limitováno nízkým kontrastem měkkých tkání. Limity jsou ošetřeny pomocí barvicích technik. S jednoduchým kontrastním barvením počítačová mikro tomografie může produkovat kvantitativní, velice kontrastní 3D zobrazení měkkých tkání s vysokým rozlišením, bez poškození vzorku a s možností kombinování s dalšími zobrazovacími technikami. Na kvalitu tomografických dat těchto vzorků mají bezpochyby vliv i dané prvky tomografického zařízení, konkrétněji snímač a zdroj rentgenového záření.

Výstup:

- 1) Protokol přípravy vybraného orgánu myši pro rentgenovou mikrotomografii.
- 2) Mikrotomografická data měkkých tkání.
- 3) 3D model vnitřní struktury.

Výzkumné předpoklady:

- 1) Cévní systém jater je doprovázen žlučovými kanálky
- rozlišení cév od žlučových kanálků pomocí mikro CT
- 2) Měkké tkáně mají na RTG snímcích špatný kontrast
- zhodocení různých barvicích technik k dosažení vhodného kontrastu s respektem k rozlišení žlučových a cévních systémů
- segmentace žlučových a cévních systémů v játrech

Metoda:

Zapojení se do realizace tomografického měření biologických vzorků, seznámení se s jejich zpracováním, naučení se ovládat profesionální software VGStudio MAX a schopnost vygenerování 3D modelu objektu pomocí různých renderovacích algoritmů. Ke zpracování dat bude použito různých metod segmentace. Samostatné studium principů rentgenové tomografie v rámci doporučené literatury.

Technika práce, vyhodnocení dat:

Metody zpracování obrazu, software pro zpracování tomografických dat, CT přístroje GE L240, Rigaku Nano3DX.

Místo a čas realizace výzkumu:

Laboratoře rentgenové počítačové mikro a nano tomografie

Vysoké učení technické v Brně

Středoevropský technologický institut

Technická 3058/10

616 00 Brno

Výzkum bude probíhat v rozmezí 1.10.2015 až 30.4.2016.

Vzorek:

Orgány laboratorních zvířat zajistí Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR.

Garant experimentální části: Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D. - Středoevropský technologický institut VUT - CEITEC, Laboratoř rentgenové počítačové mikro a nano tomografie.

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- 1) BENEŠ, Jiří et al. Základy lékařské biofyziky: učební text pro 1. lékařskou fakultu UK. 3. upravené vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2034-3.
- 2) FERDA, Jiří et al. Základy zobrazovacích metod. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-164-3.
- 3) HSIEH, Jiang. Computed tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances. 2nd ed. United States of America: SPIE and John Wiley & Sons. Inc., 2009. ISBN 978-0-8194-7533-6.
- 4) CHRISTOPH, Ralf and Hans Joachim NEUMANN. X-Ray Tomography in Industrial Metrology. 2nd ed. MESSTECHNIK Werth: Germany, 2012. ISBN 978-3-86236-045-1.
- 5) MARTYKÁNOVÁ, Eva. Rtg záření, jeho vlastnosti a využití: diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra fyziky, 2007. Vedoucí diplomové práce, Prof. RNDr. Vladislav Navrátil, CSc.
- 6) MOUREK, Jindřich. Fyziologie: Učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2., doplněné vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
- 7) RITTER, Felix, et al. Medical image analysis. Pulse, IEEE, 2011, 2.6: 60-70.
- 8) ROSINA, Jozef et al. Biofyzika: Pro zdravotnické a biomedicínské obory. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- 9) SPARKS, Erin E., et al. Defects in hepatic Notch signaling result in disruption of the communicating intrahepatic bile duct network in mice. Disease models & mechanisms, 2011, 4.3: 359-367.
- 10) WALEK, Petr, Martin LAMOŠ a Jiří JAN. Analýza biomedicínských obrazů. VUT: Brno, 2013. ISBN 978-80-214-4792-9.
- 11) ZIKMUND, Tomáš, Michal PETRILAK a Jozef KAISER. Rentgenová počítačová tomografie pro analýzu odlitků, defektoskopii a kontrolu rozměrů, s. 429-438. FAST VUT: Brno, 2013. ISBN 978-80-214-4777- 6.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 - 70 stran

Forma zpracování bakalářské práce:

tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

prof. Ing. Aleš Richter, CSc.

Ústav mechatroniky a technické informatiky

Datum zadání bakalářské práce:

29. května 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. dubna 2016

prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor



Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením ústavu

V Liberci dne 31. ledna 2016

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 26.4.2016

Podpis: *Barbora Šmelcova*



Poděkování

Na těchto řádcích bych ráda vyjádřila svůj dík lidem, kteří mi pomohli k dokončení bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu panu prof. Ing. Aleši Richterovi, CSc., za věcné rady a připomínky, konzultantovi Ing. Tomáši Zikmundovi, Ph.D., za nenahraditelnou pomoc při měření vzorků i jejich zpracování, Ing. Marii Šejnohové a Markétě Tesařové za rady při zpracovávání dat a prof. Ing. Jozefu Kaiserovi, Ph.D., za možnost realizování experimentu v laboratoři CEITEC VUT v Brně. Dále Karle Slavičkové za pomoc při barvení vzorků, Mgr. Simoně Hankeové za poskytnutí vzorku barveného Microfilem a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky za dodání vzorků jater. V neposlední řadě tímto děkuji i své rodině za neochvějnou podporu a pomoc při psaní celé práce.



Anotace

Jméno a příjmení autorky: Veronika Smékalová

Instituce: Technická univerzita v Liberci, Ústav zdravotnických studií

Název práce: Rentgenová počítačová mikrotomografie měkkých tkání

Vedoucí práce: prof. Ing. Aleš Richter, CSc.

Konzultant: Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D.

Počet stran: 60

Počet příloh: 5 stran

Rok obhajoby: 2016

Souhrn:

Tato práce popisuje vznik a využití rentgenového záření a základní principy stavby a fungování počítačového tomografu. Dále se zabývá metodami barvení biologických tkání a problematikou kontrastu podobných struktur na CT. Práce rovněž obsahuje popis několika barvicích technik měkkých tkání a srovnává výsledky barvení i s ohledem na náročnost postupu. Veškeré měření vzorků bylo prováděno na mikroCT ve výzkumném institutu CEITEC v Brně. Barvení se účastnilo několik pracovišť, vzorky jaterní tkáně poskytl Ústav embryologie a histologie Akademie věd ČR v Brně. Realizace měření umožnila popsat výhody a nevýhody manuálního segmentování vybraných částí tkáně oproti poloautomatickému segmentování. V praktické části práce jsou uvedeny 3D segmentované oblasti jaterní tkáně.

Klíčová slova: počítačová tomografie, CT, mikroCT, rentgenové záření, měkké tkáně, segmentace, barvení



Annotation

Name and surname: Veronika Smékalová

Institution: Technical University of Liberec, Institute of Health Studies

Title: X-ray micro computed tomography of soft tissue

Supervisor: prof. Ing. Aleš Richter, CSc.

Consultant: Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D.

Pages: 60

Appendix: 5 pages

Year: 2016

Summary:

This thesis describes creation and usage of X-rays, basic principles of structure and functioning of computer tomography. It also describes methods of staining biological structures and soft tissues and compares results considering difficulties of staining process. All measuring was performed at microCT at CEITEC institute in Brno. In process of contrasting biological tissues several workplaces took part. Samples of liver tissues were provided by Institute of embryology and histology Academy of science CR in Brno. This thesis also describes advantages and disadvantages of manual segmentation against semiautomatic segmentation. In empirical part are presented 3D partitioned part of liver tissue.

Key words: computed tomography, CT, microCT, X-Rays, soft tissues, segmentation, staining



Obsah:

Seznam zkratk	13
Seznam symbolů	14
I Úvod	15
II Teoretická část	16
1 Rentgenové záření	16
1.1 Dělení rentgenového záření	18
1.1 Oblasti využití RTG záření	19
1.2 Ochrana a osobní dozimetrie	20
2 Počítačová tomografie	21
2.1 Základní principy fungování počítačové tomografie	22
2.2 Komponenty CT přístrojů	23
2.3 Rozvoj využití technického CT	25
3 Kontrastní látky	26
3.1 Druhy kontrastních látek pro lékařské účely	26
3.2 Druhy kontrastních látek pro výzkumné účely	27
4 Stručná anatomie a fyziologie jater	28
4.1 Rozdíl mezi lidskými a myšími játry	30
III Praktická část	31
5 Barvení měkkých tkání	31
5.1 Postupy kontrastování	32
6 CT analýza	32
6.1 CT stanice	33
6.2 Hodnocení kvality obrazu	35
6.3 Zpracování obrazu	36
7 Výsledky	40
7.1 Zvolení vhodné metody barvení	40
7.2 Hodnocení kvality	42

7.3	Výsledné modely segmentace CT dat	46
7.4	Alternativní přístupy	47
8	Možnosti 3D tisku pro CT laboratoře	49
IV	Závěr	51
V	Literatura	52
	Seznam příloh.....	55
	Příloha.....	56

Seznam zkratek

2D	dvourozměrný (two dimensional)
3D	trojrozměrný (three dimensional)
AV	Akademie věd
CT	počítačová tomografie (computerised tomography)
DAS	systém pro sběr dat (Data Acquisistion System)
EMI	Electric and Musical Industries
FOV	zorné pole (Field Of View)
GE	General Electrical
HU	Hounsfieldovy jednotky (Hounsfield unit)
KI	jodid draselný
KL	kontrastní látky
PTA	kyselina fosfowolframová (phospotungstiac acid)
RTG	rentgen
TUL	Technická univerzita v Liberci
tzv.	takzvaný
Xe	xenon
UV	ultrafialové světlo

Seznam symbolů

C kontrast

I průměrná intenzita

ΔI změna průměrné intenzity

S signál

N šum

σ_I směrodatná odchylka z průměrné intenzity pozadí

SNR poměr signálu k šumu (Signal to Noise Ratio)

I Úvod

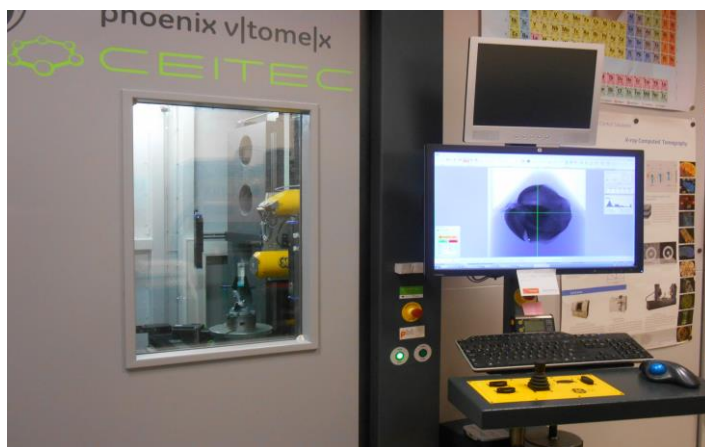
Bakalářská práce Rentgenová počítačová mikrotomografie měkkých tkání se zaměřuje na zpracování biologických vzorků a jejich zobrazení pomocí počítačové tomografie. Prvotním cílem bylo zobrazit cévní a současně žlučové systémy v játrech laboratorní myši. Cíl práce byl motivován výzkumem ojedinělého onemocnění jater, tzv. Alagillův syndrom, kde by zobrazení cévního a žlučového systému pomohlo porozumět disfunkci jater.

Játra mají v organismu nezastupitelnou funkci a proto je jejich zkoumání a detailní znalost struktury důležitá pro pochopení disfunkcí tohoto orgánu a tím i dosažení větší možnosti vyvinutí možné léčby.

Práce obecně popisuje princip vzniku, šíření a účinků rentgenového záření, mechanismy měření pomocí počítačového tomografu a představuje možnosti kontrastování měkkých tkání. K vlastnímu řešení kontrastování jater myši jsou testovány 3 přístupy: jód, lyofilizátor v kombinaci s jódem a Lugolův roztok.

Výsledky barvení jater jsou hodnoceny a jsou vybrána nejkvalitnější CT data jater, na kterých byla realizována segmentace a vizualizace cévního systému v játrech.

Výstupem zkoumání je 3D model segmentovaných částí cévního systému jater, který byl pro lepší názornost vytištěn na 3D tiskárně ve spolupráci s laboratoří prototypových technologií a procesů na Technické univerzitě v Liberci a protokoly popisující postup barvení měkké tkáně.



Obr. 1: Počítačový tomograf v laboratoři CEITEC – VUT [zdroj autor]

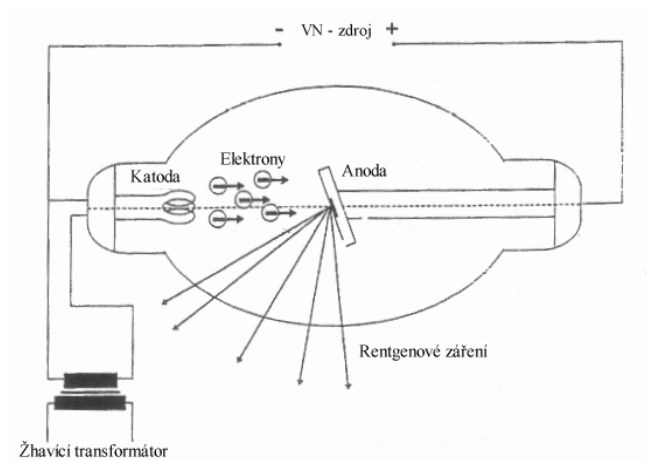
II Teoretická část

Teoretická část bakalářské práce se zabývá pojmy potřebnými pro vysvětlení a pochopení praktické části této práce. Konkrétně je zde popisován vznik a šíření rentgenových paprsků, technologie a použití počítačových tomografů a druhy těchto přístrojů. Jsou zde uvedené hlavní funkce orgánu jater a jeho důležitost. Dále techniky pro zlepšení obrazu měkkých tkání, tedy kontrastní látky a jejich druhy. Je zde sepsána i základní stavba a využití CT systémů.

1 Rentgenové záření

Rentgenové záření je svou podstatou elektromagnetické vlnění, kam se řadí i rádiové vlny či viditelné světlo, ovšem s velice krátkou vlnovou délkou a vysokou frekvencí. Vlnová délka se pohybuje v rozmezí $10^{-10} - 10^{-12}$ metrů. Toto záření jako první objevil Wilhelm Conrad Roentgen, který za svůj objev získal Nobelovu cenu za fyziku v roce 1901.

Záření vzniká interakcí částice s hmotou v elektronovém obalu. Čím větší je rychlost letících elektronů, tím větší je pronikavost záření. Interakce RTG záření s hmotou v zásadě probíhá dvěma způsoby a to fotoefektem nebo Comptonovým jevem. Zdroje RTG záření jsou různé. Mezi přirozené zdroje patří hvězdy, například naše Slunce. Pro výzkumné a diagnostické účely, kde se s výhodou uplatňuje základní vlastnost rentgenového záření, a to pronikavosti, se v medicíně i průmyslu využívají zdroje umělé. Nejznámějším a nejpoužívanějším umělým zdrojem je rentgenová trubice (rentgenová dioda, lampa), tzv. „rentgenka“ viz obr. 2.



Obr. 2: Schéma rentgenová lampa [1]

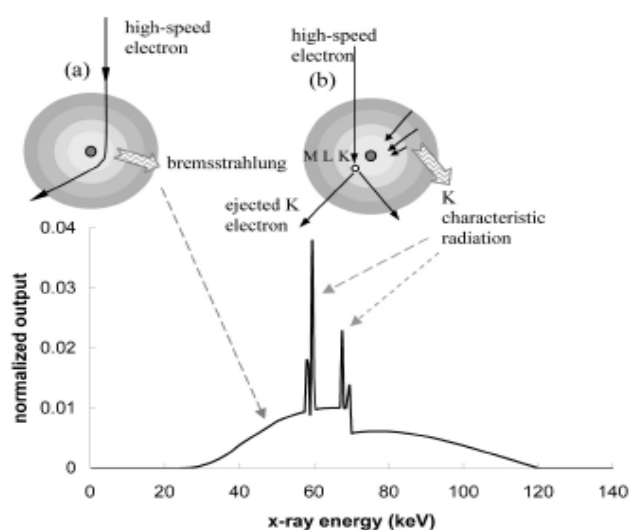
V dnešní době se pro lékařské účely používají tzv. Coolidgeovy rentgenky se dvěma elektrodami. Trubice se skládá z několika částí. V trubici – baňce, kde je vytvořeno vakuum, se nachází katoda, která je v rozžhaveném stavu zdrojem elektronů, a anoda, na kterou tyto elektrony, urychlené elektrickým polem o vysokém napětí, dopadají. Trubice, tedy obal pro katodu a anodu se dříve vyráběl ze skla, v dnešní době se už přechází na kovovou schránku, která poskytuje více výhod. Pronikavost RTG záření ovlivňujeme pomocí změny napětí mezi katodou a anodou.

Katoda i anoda jsou vyrobeny z kovu s vysokou teplotou tání, nejčastěji z wolframu. Kov musí být dobře vodivý, protože pouze asi 1 % letících elektronů je přeměněno na rentgenové záření. Zbytek (99 %) se mění na teplo a zahřívá anodu, která musí mít z tohoto důvodu vlastní chladicí mechanismus. Chlazení anody je nejčastěji zajištěno otáčením samotné anody, tak aby paprsky dopadaly na různá místa nebo se dutý prostor anody plní chladicí kapalinou (pro menší přístroje se může použít i vzduch). Možná je i kombinace obojího. Rentgenové trubice jsou často vybírány také podle schopnosti vést teplo. Proto popisujeme tepelné jednotky (HU = heat units), kde $1 \text{ HU} = 0,74 \text{ J}$ [2] [3] [4] [5] [6] [7].

1.1 Dělení rentgenového záření

Dle mechanismu vzniku je RTG záření rozdělováno na záření brzdné a charakteristické. Jak už název napovídá, **brzdné rentgenové záření** vychází z principu zbrzdění letícího elektronu. Elektrony emitované katodou dopadají na materiál anody, resp. do blízkosti atomových jader materiálu anody, a v důsledku působení coulombovských sil se v elektrostatickém poli jádra trajektorie elektronu zakřivuje a prudce se mění i jeho rychlost. Kinetická energie elektronu se v důsledku brždění přeměňuje na foton o odpovídající energii – tato energie závisí na náhodné trajektorii brždění, tedy i kinetická energie přeměněná na RTG záření je náhodná. Z toho vyplývá, že brzdné záření je spojité.

Oproti tomu **charakteristické záření** závisí na charakteru kovu, na který dopadají urychlované elektrony z katody. Elektrony s velice vysokou energií jsou schopny vyrazit elektrony nacházející se v blízkosti jádra atomu kovu anody. Excitované elektrony z obalu se pak vrací na uvolněné místo a přebytečnou energii vyzáří v podobě charakteristického záření. Jelikož tento typ záření závisí na materiálu anody, znamená to, že všechna vyzářená energie bude na stejné hladině, tedy se bude jednat o záření, které má čárový charakter. Graf a schéma vzniku brzdného a charakteristického záření je vidět na obr. 3.



Obr. 3: Schéma vzniku brzdného (a) a charakteristického (b) záření, včetně grafu energie těchto záření [7, upraveno]

Energie RTG záření se obvykle vyjadřuje v jednotkách elektron-voltů (eV), $1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$, což je velikost kinetické energie, se kterou je elektron urychlován skrz elektrický potenciál 1 V. RTG záření můžeme rozdělit do dvou dalších skupin, a to podle pronikavosti, s jakou prostupují látkami, a podle energie. Jednou skupinou je tzv. **měkké záření** (124 eV až 12,4 keV) a druhou **záření tvrdé** (12,4 až 124 keV).

Měkké RTG záření má větší vlnové délky (10 – 0,1 nm) a také méně prostupuje látkami, tzn. více se ve tkáních absorbuje. Proto se v medicíně využívá například v oblasti stomatologie. Naopak záření tvrdé má kratší vlnové délky (0,1 - 0,01 nm) a vyšší prostupnost látkami, tedy je vhodné pro rentgen kostí a např. plicního parenchymu. Někdy se může tvrdost záření vyjadřovat přímo napětím rentgenky. Menší napětí - měkké záření, větší napětí – tvrdé záření [2] [3] [7].

1.1 Oblasti využití RTG záření

Ihned po objevení rentgenového záření se s ním začalo detailněji pracovat a rozvíjet jej všemi směry možného využití. Největší přínos zaznamenalo RTG záření v oblasti medicíny v diagnostice a terapii. Dnes se s výhodou uplatňuje i při zkoumání vad materiálu v průmyslu. V **diagnostice** je několik druhů rentgenů, které se používají dle potřeby prozkoumat danou část těla. Jsou to stacionární rentgeny, mobilní rentgeny, a stomatologické rentgeny.

Diagnostika pomocí RTG záření je založena na různé absorpci tkání a následném vyvolání obrazu prošlého záření. Díky tomu je zřejmé, že na rentgenovém snímku nelze všechno vždy odlišit, pokud mají např. měkké tkáně podobné absorpční vlastnosti. Co se týče ostrosti obrazu, je snaha dosáhnout co největší rozlišení, avšak vyvolaný obraz bude mít vždy určitou míru neostrosti. Tato neostrost je způsobena několika příčinami. Pohybem rentgenovaného objektu, absorpcí tkáně a také tím, že ohnisko vzniku záření na anodě není nikdy bodové, ale je to spíše malá plocha.

V medicíně se běžně používají dva principy prosvěcování tkáně rentgenovými paprsky a těmi jsou **skiaskopie** a **skiagrafie**. S ohledem na různě velkou dávku ozáření je vždy

nutné uvažovat výhodnou metodu jak z hlediska pacienta, tak z hlediska požadovaného obrazu k danému výkonu. Skiaskopie je kontinuální prosvěcování tkáně, přičemž jsou okamžitě vidět vnitřní struktury. Umožňuje tedy v aktuálním čase hledat patologické nálezy nebo instrumenty zaváděné do pacienta. S výhodou se skiaskopie využívá při katetrizaci v angiografii. Naopak skiografie je tzv. snímkování, při němž je pacient jednorázově prosvěcován RTG paprsky a je vytvářen obraz. Výhodou skiografie je kratší snímkový čas a menší dávka ozáření. Veliký význam pro diagnostiku má počítačová tomografie, která využívá RTG záření k tvorbě 2D až 3D obrazu vnitřních struktur.

Díky ionizačním účinkům se RTG záření využívá i **v terapii**. Na živé tkáně má toto záření velice negativní vliv, přičemž inhibičně působí absorbovaná část záření. Tímto principem je schopno omezovat nebo úplně zastavit bujení nádorové tkáně, která je díky své rychlosti růstu na RTG záření velice citlivá. Absorbovaná dávka se vyjadřuje v jednotkách Grey – Gy, kde 1 Gy je energie 1 Joulu v látce o hmotnosti 1 kilogram. Účinek se sčítá při opakovaném ozařování [3] [4].

1.2 Ochrana a osobní dozimetrie

Rentgenové, ionizující, záření je lidskými smysly nerozpoznatelné. Aby bylo možné chránit se a určit, jaké dávce záření byl člověk vystaven, je nutné záření detekovat způsoby, kterými lze RTG záření rozpoznat a určit jeho dávku. Záření je zaznamenáváno pomocí detektorů. Jak už bylo zmíněno, detektory slouží k přeměně neviditelného záření na viditelnou formu. K tomuto účelu jsou vhodné především citlivé fotografické emulze, které při ozáření více či méně zčernají, v závislosti na velikosti ozáření. Dávka se určuje pomocí stínidel na filmu, které mají rozdílnou propustnost pro záření. Z odstínů šedi pod stínidly lze následně vypočítat dávku ozáření.

Osoby, které s ionizačním zářením pracují v rámci pracovního procesu, musejí povinně kontrolovat absorbovanou dávku záření pomocí osobních dozimetrů a řídit se dle předpisů zákona o jaderné ochraně. Osobní dozimetr je malý osobní detektor ionizujícího záření. Principy a velikosti osobních dozimetrů mohou být různé – filmové,

digitální, prstové, tužkové. Vždy je snaha dávku záření co nejvíce minimalizovat jak pro pacienty, tak pro obsluhující personál.

Aby nedocházelo k nepřiměřenému ozařování citlivých částí těla pacientů a zdravotnických pracovníků, je nutné RTG záření pečlivě stínit. K tomuto účelu se využívají olověné zástěry a rukavice pro zdravotnický personál a různé typy průhledných i neprůhledných bariér. Při běžném rentgenovém vyšetření musí být obsluhující rentgenolog při ozařování pacienta vždy mimo místnost [2] [3].

2 Počítačová tomografie

Počítačová tomografie je převratná zobrazovací metoda, díky níž je možné vyšetřovat vnitřní struktury objektu bez vnějšího zásahu. Princip CT popsal už v roce 1940 Gabriel Frank. Přestože tehdy ještě nebylo možné tomograf technicky zkonstruovat, nechal si svou vizi principu dnešního CT přístroje patentovat. Pro dnešní dobu má tato zobrazovací metoda široké pole využití. Počítačová tomografie se pro klinické účely vyvíjí už od roku 1967, kdy byl v Londýnské nemocnici instalován první CT přístroj z tzv. první generace. Toto CT mělo velice špatnou kvalitu obrazu a čas strávený měřením a zpracováním dat byl také velmi dlouhý.

Princip první generace spočíval v tenkém paprsku RTG záření, který se horizontálně posouval přes skenovaný objekt, následně se rentgenka otočila o 1° a cyklus se opakoval. Druhá generace CT přístrojů posunula metodu zase o kousek dál, když snížila čas vyšetření. Principem byly vícečetné tenké paprsky RTG záření, mezi kterými byl úhel 1° , rentgenka se tedy mohla potočit rovnou o 6° . V roce 1975 představila EMI přístroj s třiceti detektory, který byl schopný zvládnout kompletní sken za méně než 20 sekund. Třetí generace využívá mnoho detektorů soustředěných do místa vzniku RTG paprsků, které jsou zároveň umístěny přímo na oblouku přístroje naproti rentgence. Celý systém se po prozáření objektu otáčí, ačkoli zdroj RTG záření a detektory zůstávají navzájem stacionární. Generace počítačových tomografů se nadále vyvíjejí. Dnes se už převážně využívá prstenec s detektory po celém obvodu a jedna, či dvě rotující rentgenky.

Modifikace CT přístrojů je možné najít v oblasti vědy a výzkumu, zdravotnictví, strojírenství a průmyslu, také ve veterinární sféře. Typy tomografů jsou specifické podle svého využití. Největším rozdílem mezi klinickým a technickým, průmyslovým, CT je požadované rozlišení a vzájemná poloha přístroje a objektu. V medicíně se kvůli stabilizaci pacienta otáčí prstenec se zdrojem RTG záření a detektory kolem pacienta, u průmyslového CT je tomu opačně. Znamená to, že je natáčen sledovaný objekt a zdroj i detektory jsou stacionární [7] [8] [9].

2.1 Základní principy fungování počítačové tomografie

Základem počítačové tomografie jsou RTG obrazy sledovaného objektu (pacienta), snímání z různých úhlů a změřené v celém sledovaném objemu objektu. Ty se následně zpracovávají počítačem, který z těchto dat vytvoří šedo-tónový obraz vnitřní struktury sledovaného objektu.

Už název této zobrazovací metody napovídá něco o jejím principu. Tomografie je slovo složené z řeckého tomos – řezat, dělit a grafó – psát, kreslit. Rentgenovým zářením obrazně „řežeme“ sledovaný objekt na tenké pláty, jež snímáme z více úhlů. Takto se celý objekt rozdělí na jednotlivé obrazy – „slicy“. Počítač u těchto RTG snímků vyhodnocuje absorpci záření v objemu objektu, ve voxelu, a vyhodnocuje ji pomocí Hounsfieldových jednotek (HU) neboli CT-čísel.

Hounsfieldovy jednotky jsou vztahovány k referenční hodnotě vody, pro kterou $HU = 0$. Například pro kostní tkáň je CT-číslo rovno +1000 (od 250 až přes 1000 HU), pro vzduch je to -1000. Měkké tkáně, tuk a svaly mají CT-čísla od -100 do 60. Hounsfieldovy jednotky udávají míru vstřebání RTG záření v daném voxelu vzhledem k absorpci referenční hodnoty. Počítačový software vyhodnocuje a dává dohromady všechny hodnoty HU, kterými záření prošlo.

Teoreticky je možných asi 2000 HU, kterým by mohl odpovídat stejný počet odstínů šedi. Avšak ve výsledném obrazu na monitoru je přibližně 25 odstínů šedi, které je lidské oko bezpečně schopno rozeznat. Proto v reálném provozu není využit celý rozsah 2000 HU. Ve finálním obrazu je využíváno jen tzv. absorpční okno hodnot. Hodnota

Hounsfieldovy jednotky se vypočítá podle vztahu 1, kde k je domluvená bezrozměrná hodnota rovna 1000, μ je koeficient zeslabení vyšetřované tkáně a μ_w je koeficient zeslabení vody (adsorpční koeficient $\mu_w = 0,22 \text{ cm}^{-1}$).

$$HU = \frac{\mu - \mu_w}{\mu_w} \times k \quad (1)$$

Jak už z předchozího textu vyplývá, každá látka má v závislosti na svých vlastnostech jiné absorpční vlastnosti. Díky tomu je možné rozlišovat intenzitu prošlého záření a pak odlišit různé látky. Ovšem problém nastává v kontrastu, pokud mají být zobrazeny dvě tkáně či látky, které mají podobné složení, a není mezi nimi jasně viditelná hranice [2] [7] [9] [10].

2.2 Komponenty CT přístrojů

Každý počítačový tomograf se v podstatě skládá ze stejných komponent. Nedílnou součástí každého CT je zdroj RTG záření, tedy rentgenová trubice. U prvních CT přístrojů bylo používáno pulzní RTG pole, hlavně z důvodů omezených schopností tehdejší technologie, kdy detektory nebyly schopné přijímat další signál, zatímco jeden signál zpracovávaly.

Všechny součásti počítačových tomografů se opotřebovávají. Například rentgenové trubice se ničí převážně nadměrným teplem a únavou materiálu. V současné době se vyvíjejí a zpracovávají stále lepší chladicí algoritmy, které předchází poškození trubice právě nadměrným zahřátím. Tyto systémy už v protokolu nastavování měření upozorní na možné poškození trubice a doporučí vhodné metody snížení zátěže, například zkrácení expozičního času či jiná opatření šetrného provozu.

K rentgenové trubici se váže i další nezbytná součást každého CT, jíž jsou detektory RTG záření. Třetí generace počítačových tomografů využívá různých typů detektorů. Jedná se o detektory na bázi interakce záření a ionizace plynu (xenonové detektory) nebo pevné detektory, skládající se z bloků scintilačního materiálu. Detektory prvních

generací měly poměrně malé zorné pole (FOV), proto byly vhodné především pro snímání hlavy. Novější generace už FOV rozšířily a jsou schopné snímat celotělově.

Detektory třetí generace využívají principu vysoce stlačeného inertního plynu, často xenonu, nebo pevné scintilátory spárované s fotodiodami. Detektory využívající inertní plyn mají komory stlačeného plynu např. Xe. Komora je rozdělena přepážkou, na kterou je přiveden záporný náboj, a strany celé komory jsou pod kladným nábojem. Když dojde k ozáření, atomy plynu jsou rozděleny na kladné xenonové ionty, které jdou k záporně nabitě přepážce, a záporně nabitě elektrony, směřující ke stranám komory. Tyto volné elektrony podněcují signál na detektorech. Ionizace inertního plynu je proporcionálně lineární k intenzitě ozáření. Nevýhodou těchto detektorů jsou případy, kdy některé fotony rentgenového záření proletí plynovou komorou bez toho, aby ionizovaly atom xenonu. Proto se více využívají pevné detektory.

Pevné detektory jsou složeny z malých kousků scintilačního materiálu (např. CdWO_4 , $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$, HiLightTM, GEMS StoneTM), pokrytých reflexním materiálem a spojených s fotodiodami. U pevných detektorů dochází k interakci RTG fotonu a scintilačního materiálu, přičemž foton excituje elektrony materiálu, které při návratu do své původní hladiny vyzařují záření v podobě UV nebo ve formě viditelného spektra (první rychlost scintilátoru a dosvit). Vzniklé světlo se šíří všemi směry, proto jsou scintilátory pokryty vysoce reflexivním materiálem, který světlo usměrní k fotodiodám nacházejícím se na spodní straně celé soustavy. K fotodiodám se dostane pouze část fotonů, jež vyvolá elektrický signál. Na senzitivitě detektoru velmi závisí ostrost, přesnost i artefakty výsledného obrazu. Jestliže je detektor přetěžován, či namáhám jedním způsobem snímáním, lze ho časem poškodit termickou nebo radiační zátěží. Kvalita výstupu je ovlivněna kvalitou sběru dat – DAS (Data Acquisition System).

Neopomenutelnou součástí každého klinického CT a částí nejvíce viditelnou je portál, tzv. gantry, uprostřed něhož je patientské lehátko a uvnitř sběrný kroužek (slip ring), tedy napájení veškeré techniky uložené v gantry. Jelikož se u technického CT otáčí a posouvá vzorek, na rozdíl od klinického CT, kde je v pohybu i rentgenka, případně detektor, není nutné měřicí techniku umísťovat do otáčivého gantry a napájení nemusí být tak pohybově flexibilní.

K dalším základním prvkům je řazen kolimátor a filtrační prvky. Kolimátor má dvě základní funkce. Těmi jsou zmenšení nežádoucí dávky ionizujícího záření a zajištění kvalitního obrazu. Běžně máme dva typy kolimátorů, před-pacientské a po-pacientské. Před-pacientský kolimátor je umístěn mezi rentgenkou a pacientem (potažmo sledovaným objektem), po-pacientský kolimátor je umístěn mezi pacientem a detektorem. Před-pacientské kolimátory usměrňují směr RTG záření tak, že se skrz dostane jen homogenní část záření. Stejný význam má i po-pacientský kolimátor, který na detektor nepustí žádné jiné záření mimo rovnoběžných paprsků. Tímto způsobem zajišťují kolimátory nezkrácený a co nejčistší obraz. Filtry slouží ke zlepšení ostrosti a kvality obrazu a také zmenšují dávky ionizujícího záření vydané do zkoumaného objektu - pacienta.

Aby bylo možné dostat se k výslednému obrazu, musí být součástí celého systému počítačového tomografu vhodný softwarový nástroj. Moderní CT musí veškerá data několikrát projít a upravit. Proto získané informace z detektorů procházejí preprocesingem, rekonstrukcí obrazu a postprocesingem. Při předzpracování se data uspořádávají a kalibrují a během výsledného zpracování dat se odstraňují artefakty a je generován finální obraz. Dnešní CT jsou při zpracovávání dat velice rychlé. Je to i díky tomu, že hardwarové vybavení umožňuje realizovat všechny operace, pro každý řez objektem, současně [7].

2.3 Rozvoj využití technického CT

Zařízení GE Phoenix v|tome|x L 240, na kterém bylo měření prováděno, je průmyslové CT pro širokou oblast využití. V současné době v laboratoři probíhají měření jak na komerční úrovni pro průmyslové subjekty, tak měření výzkumná, kde se na spolupráci podílejí špičkové výzkumné ústavy napříč Evropou. Jedná se tedy o různorodou škálu využití a v současné době se stále hledají nové oblasti užitečnosti technického CT i pro vývoj medicíny a zkoumání biologických vzorků a tkání.

Důvodem rozvoje užívání technického CT pro výzkum v oblasti medicíny může způsobovat několik věcí. Prvním možným důvodem je snadnější manipulace vzorkem

a CT, s ohledem na dostupnost a přesnost ochranných pásem na takovémto pracovišti. Vzorek lze snadno umístit mezi detektor a rentgenku a snímat jenom požadovanou oblast. A také je velikou a nezpochybnitelnou výhodou technického CT, že může dosáhnout mnohem většího rozlišení, než je tomu u patientských tomografů. V případě mikro či nano tomografů je tento rozdíl obrovský.

Například měření, prováděno v rámci této práce, se, co do rozlišení, odehrávalo v rozměrech mikrometrů. Srovnání jaterních vzorků bylo nastaveno na $41\mu\text{m}$ a měření IKI_48 dokonce na rozlišení $13\mu\text{m}$. Kdyby byl skenován pouze některý z jaterních laloků, rozlišení by se, díky menším rozměrům takového vzorku, ještě zvětšilo.

Tyto důvody a to, že nejmenší klinické CT je pro zkoumání opravdu malých vzorků, i menších než zkoumané vzorky v této práci, stále nepřiměřeně velké, dělají z technického CT nástroj budoucnosti i pro medicínu a oblastí s ní spojených, byť to s názvem „technické“ příliš nekoresponduje.

3 Kontrastní látky

Pro zobrazování tkání, které jsou si svým složením chemických látek podobné, je zapotřebí zvýraznit kontrast měkkých tkání na rentgenovém snímku. Při zlepšování kontrastu, tedy rozdílu viditelné hranice mezi různými tkáněmi, jsou využívány tzv. kontrastní látky. Jejich princip je takový, že o hodně více nebo o hodně méně pohlcují RTG záření než okolní tkáň. To znamená, že se na výsledném snímku zobrazují jako velmi tmavé oblasti nebo naopak velice světlé [10] [11].

3.1 Druhy kontrastních látek pro lékařské účely

Rozlišují se tedy dva typy kontrastních látek. **Pozitivní kontrastní látky** záření pohlcují více než okolní tkáň. Příkladem takovýchto látek mohou být baryové KL, kde základ tvoří síran barnatý. Používají se na vyšetření trávicího traktu. Více využívané pro tento

účel jsou jodové KL vodné nebo viskózní. Viskózní se nyní využívají velmi zřídka - například k lymfografii. K jiným aplikacím se příliš nehodí, neboť se nevstřebávají do tkáně a mohou způsobovat až plicní embolii. Naopak vodné jsou nejběžněji používané a jsou dávkovány především intravaskulárně. Druhým typem KL jsou **negativní kontrastní látky**, které záření absorbují méně než okolní tkáň. Pro takový kontrast jsou využívány plyny, například kyslík nebo oxid dusičitý. Plynné KL jsou základ pro ultrasonografickou diagnostiku, kdy se pracuje s mikrobublinami, které jsou stabilizovány fosfolipidy.

Druh a způsob podání KL závisí na jednotlivém vyšetření a zobrazovací technice. Například barnaté kontrastní látky nelze podat pacientovi pro CT vyšetření. Částičky barya by na obrazu CT vytvořily rušivé artefakty podobně jako kovové implantáty. Pro vyšetření magnetickou rezonancí se využívají specifické KL vhodné pro tento účel. Zde se jedná zejména o látky s paramagnetickými vlastnostmi – například gadolinium.

U každého vyšetření pomocí KL musí být brán zřetel na možné nežádoucí účinky podaných kontrastních látek a komplikace s nimi spojenými. Nežádoucí účinky mohou být rozděleny na chemotoxické – představují přímou interakci daného orgánu, a na alergoidní – může nastat reakce podobná reakci alergické. Taková reakce vzniká nezávisle na množství podané kontrastní látky. Na pracovišti podávajícím KL pacientům musí být personál školen na zvládání případných nežádoucích reakcí vyvolaných podanou látkou [2] [11].

3.2 Druhy kontrastních látek pro výzkumné účely

Pro zobrazení biologických struktur laboratorních zvířat, obvykle krys, potkanů nebo myší, se používají různé techniky barvení. Zejména na tkáních a orgánech post mortem. Proto je možné jako kontrastovací látky použít i jiné sloučeniny, pro člověka i zvířata toxické, jako například těžké kovy.

Vzhledem k barvení biologických vzorků, tato práce vycházela ze zkušeností, zaznamenaných v článku od Briana Metchera. Zde se tkáň barvila 1% jódem, 10% IKI, PTA, osmiem a roztokem gallocyaninu. První dvě zmiňované látky byly proto

použity k výzkumu i v této práci. Nejedná se o ojedinělý postup takového barvení. Tyto kontrastní látky a další využívá mnoho vědců zabývajících se zobrazením nektrastních měkkých tkání [17] [18].

Jako alternativa k barvení celé tkáně, může být pro zobrazení cévních a žlučových systémů v játrech, injikování tuhneoucích látek do těchto systémů. Příkladem takové látky může být Microfil, což je syntetická pryskyřice, která se v tekutém stavu vstřikuje do cév a nechá se zatuhnout. Mikrofil pak lze použít dvěma způsoby. Zobrazit pomocí rentgenu nebo CT tkáň i s kontrastní látkou Microfil uvnitř, protože ta je na rentgenu kontrastní, nebo okolní tkáň nechat chemicky rozložit a získat tak pouze ztuhlý model. Příklad kontrastování touto látkou a postup barvení je zmíněn níže [22].

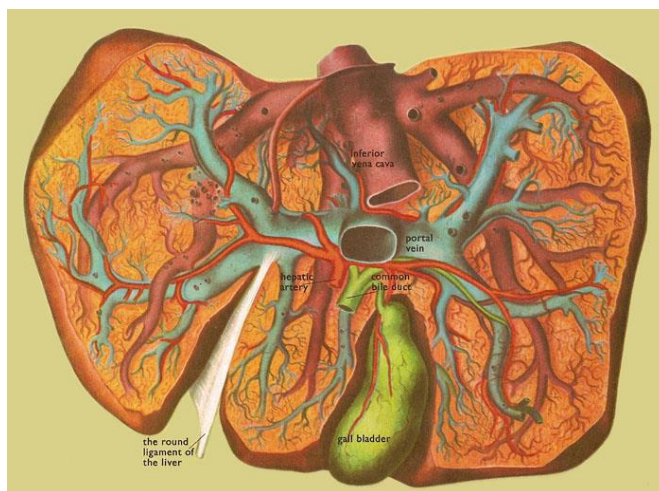
4 Stručná anatomie a fyziologie jater

V této kapitole jsou objasněny základní funkce a stavba jater jako důležitého orgánu v organismu.

Dospělá lidská játra jsou nejtěžším orgánem v těle s váhou okolo 1200 – 1500 g. U dospělého člověka tvoří zhruba jednu padesátinu celkové hmotnosti. Játra jsou velice důležitým orgánem s mnoha funkcemi. Vážné poškození jater či jejich nedostatečnost vede ke kolapsu organismu. Mezi nenahraditelné funkce jater patří detoxikace organismu. Eliminují a rozkládají toxické látky, například bakterie, alkohol a různá léčiva. Dále jsou pomyslnou zásobárnou organismu. Shromažďují v sobě záložní zásoby železa, energie a některých vitamínů, které v případě potřeby uvolňují do krevního oběhu. Jsou rovněž nepostradatelná pro svou funkci výroby a zpracování některých látek. Syntetizují se zde faktory pro hemokoagulaci a plazmatické bílkoviny. Produkují žluč, pomocnou trávicí šťávu, která vzniká v jaterních lalůčkách. Upravují bilirubin, syntetizují steroidy a mají glukostatickou funkci.

Pro plnění všech svých funkcí musejí být játra dostatečně zásobena krví, ať už jde o nutriční nebo funkční oběh. Játra dostávají 20 % srdečního výdeje krve ze dvou zdrojů, z portální žíly a z jaterní tepny. Portální žíla přivádí krev ze střev a sleziny a jaterní tepna zásobuje játra arteriální krví. Venózní krev je odváděna do dolní duté

žily. Zásobení tkáně krví je vidět na obr. 4. Tento orgán je nepostradatelný k udržování homeostázy organismu.



Obr. 4: Schématické zobrazení lidských jater s krevním zásobením a žlučovody [26]

Játra jsou uložena na pravé straně břišní dutiny, kde je částečně kryje hrudní koš. Makroskopicky jsou rozdělována do dvou anatomických laloků – levého a pravého, které se dále dělí. Pod spodní stranou jater se nachází žlučník – orgán hruškovitého tvaru, ve kterém se shromažďuje žluč tvořená jaterní tkání. Za den hepatocyty, jaterní buňky, vyprodukují asi 600 ml žluči.

Více než jakýkoli jiný orgán jsou játra schopná regenerace. Zničení nebo odejmutí části jaterní tkáně stimuluje buňky ke kontrolovanému růstu a nahrazení odebrané části. Tato regenerační funkce byla i experimentálně prokázána na potkaních játrech. Potkanovi byly odebrány dvě třetiny jater a bez jiných onemocnění nebo vedlejších efektů byla odebraná tkáň nahrazena do 6 až 8 dnů. Tato regenerační schopnost je důležitá v souvislosti s jaterní cirhózou a využívá se i při transplantaci části jater z žijícího dárce [12] [13] [14].

4.1 Rozdíl mezi lidskými a myšími játry

Savčí játra se, co do funkce orgánu, od těch lidských výrazně neliší. Proto i pro játra laboratorní myši, která byla využita v této bakalářské práci, platí stejné mechanismy fyziologie popsané v předešlé kapitole.

Játra domácích savců nalezneme v epigastriu v kopuli bránice a stejně jako u člověka se skládají z jaterních buněk – hepatocytů. Stejně významná jsou i pro zajištění filtrace krve a tvorby žluči. Podobně jako lidská játra i játra ostatních savců mají funkční a nutriční oběh krve, žlučovou drenáž a lymfatické cévy. Systém cirkulace krve v játrech je zajišťován četnými anastomózami. Myší játra mají namísto těch lidských členitější strukturu. Játra se skládají z více laloků, což je i zřetelně vidět na snímcích v experimentální části práce [16].

III Praktická část

Praktická část práce se zabývá barvením vzorků pro účely kontrastování tkáně, jakožto jedním z cílů práce. Jsou zde uvedeny protokoly o barvení vzorků a jejich přípravě na barvení samotné. Dále se v této části prezentuje příprava vzorku na tomografické měření a popis realizace měření vybraného biologického vzorku na CT. Pojednává se o jednotlivých měřeních, vyhodnocuje kvalita obrazu, stanovují výhody a nevýhody daných měření vzhledem k zobrazení biologických otázek. V neposlední řadě jsou srovnávána tomografická data z jednotlivých měření. K podložení výsledků byla provedena manuální a poloautomatickou segmentace vybraných částí biologického vzorku. K získání těchto informací bylo použito dvou rekonstrukčních softwarů pro úpravu tomografických dat.

Výstupem praktické části je, již podle zadání, protokol přípravy orgánu myši pro rentgenovou mikrotomografii, mikrotomografická data měkkých tkání a 3D model vnitřní struktury jater.

5 Barvení měkkých tkání

V případě této bakalářské práce se pracovalo se vzorky, které poskytl Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR. V rámci práce se experimentálně kontrastovalo třikrát.

Nejdříve se barvily kontrolní vzorky myších embryí metodou 1% jódu. Pět vzorků pouze v jódovém roztoku, další dva vzorky se umístily do lyofilizátoru a poté se také barvily jódem. Po zhodnocení výsledků se přistoupilo k dalšímu barvení, tentokrát se kontrastovaly játra dospělých myší pomocí roztoku 1% jódu a 10% Lugolova roztoku. Pro srovnání jsou zde uvedeny ještě další dvě metody kontrastování, ačkoli nebyly v rámci práce realizovány a slouží zde jen jako ukázka dalších možností. Všechny metody barvení byly zvoleny na základě odborného článku od Briana Metchera, jak již bylo zmíněno v podkapitole 3.2 [18].

5.1 Postupy kontrastování

Pro pilotní měření byla použita myší embrya, kontrastovaná v jódovém roztoku. Pro lepší orientaci v účincích barvení byly zvoleny různé časy kontrastování vzorků a to konkrétně 1, 3, 6, 9 a 24 hodin (vzorky E1, E2, E3, E4, E5). Dvě z testovaných embryí byla nejdříve vložena do lyofilizátoru, kde byla při teplotě -111°C a tlaku 495mBar ponechána 16 hodin. Následně byla vložena do jódového roztoku na 9 a 24 hodin (vzorky E6 a E7). Protokol postupu barvení kontrolních vzorků embryí lze najít v příloze práce.

Další barvení probíhalo se vzorky jater laboratorních myší. S ohledem na výsledky pilotního barvení byly na kontrastování použity roztoky 1% jódu a 10% Lugolova roztoku. Varianta barvení pomocí 10% IKI byla na základě nepřesvědčivého kontrastu jódu vybrána z odborných publikací. Protokol o postupu tohoto barvení je v příloze 2 [18].

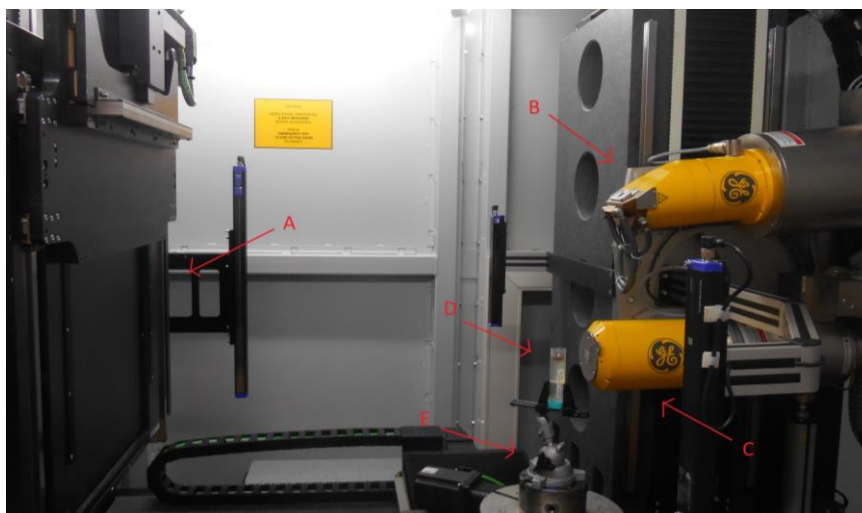
Pro možnost srovnání více vzorků a výsledků barvení jsou v příloze uvedeny ještě další dva protokoly o kontrastování měkké tkáně (příloha 3, 4). Jedná se o barvení pomocí PTA (kyselina fosfowolframová) a jako alternativa je uvedena i metoda zvýraznění cévního systému pomocí látky Microfil (syntetická pryskyřice). Ani jedna z těchto metod nebyla v rámci bakalářské práce provedena. Jsou zde pouze uvedeny možnosti takového kontrastování a jejich výsledky v podobě CT snímků.

6 CT analýza

Měření všech vzorků bylo prováděno v Laboratoři počítačové mikro a nano tomografie VUT - CEITEC v Brně. Veškeré měření probíhalo pod odborným dohledem a za pomoci pracovníků laboratoře. Zejména Ing. Tomáše Zikmunda, Ph.D., a Ing. Marie Šejnohové. Kontrolní rentgeny i samotné mikrotomografické měření probíhaly na přístroji GE Phoenix v|tome|x L 240. Tento přístroj od firmy General Electric je schopen měřit pod napětím až 180 kV a za výkonu 15 W v případě maximálního

nastavení pro nanofokus RTG trubice a 240 kV/320 W pro mikrofokus RTG trubice. Disponuje vysoko kontrastním plochým detektorem GE DXR250. Celý systém rentgenové trubice – detektoru je uložen na masivním žulovém bloku a je v ochranném kabinetu, který je klimatizován. Do prostoru pro měřený objekt se vejde předmět maximální velikosti o průměru 500 a výšce 800 mm. Nejvyšší únosná hmotnost rotačního stolku je 50 kg. S nano fokusační trubicí je možné dosáhnout až 1 μ m lineárního rozměru voxelu v CT datech.

Na obr. 5 je pohled skrz otevřené dveře do ochranného kabinetu, ve kterém jsou komponenty přístroje umístěny. Vlevo se nachází plochý detektor, vpravo pak dvě rentgenové trubice. Do prostoru mezi trubicí a detektorem je umístěn vzorek jater, upevněný na držáku.

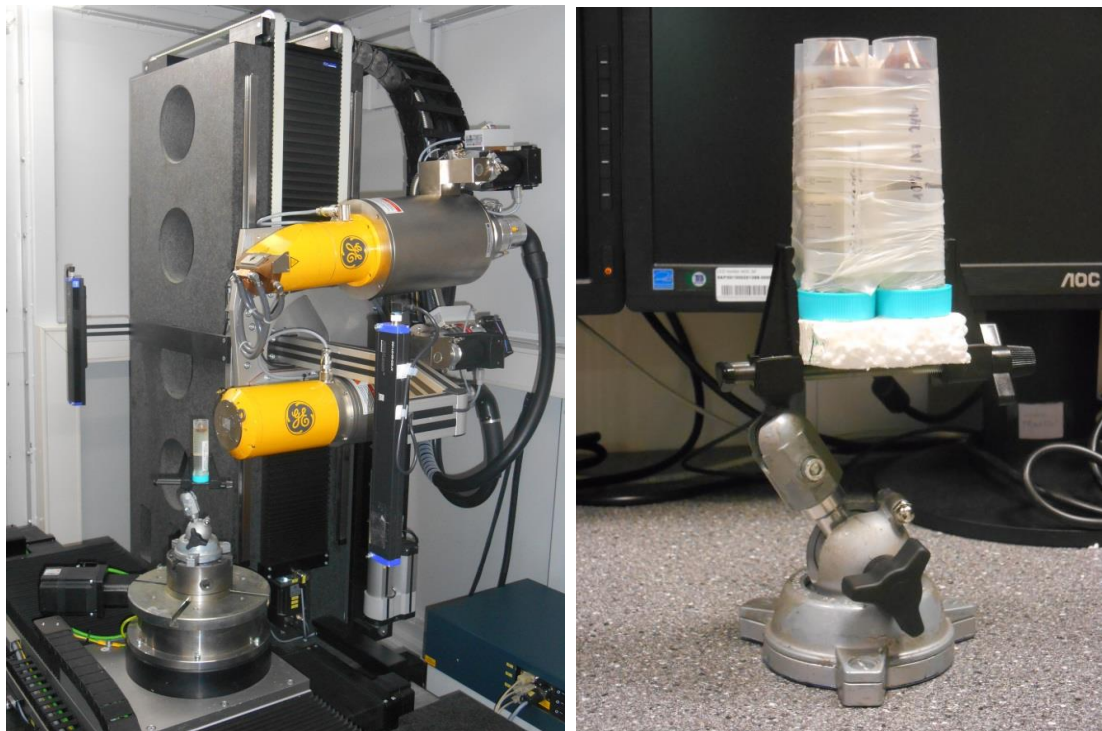


Obr. 5: Počítačový tomograf, pohled do ochranného kabinetu; A – plochý detektor, B – mikrofokus RTG trubice, C – nanofokus RTG trubice, D – vzorek jater ve zkumavce, E – držák zkumavky [zdroj autor]

6.1 CT stanice

Než lze přístroj nechat samostatně skenovat vybraný předmět, je nutné nastavit parametry tak, aby byl výsledný obraz co nejlepší. Prvním krokem je správné a dostatečně stabilní uchycení předmětu v držáku přístroje. Předmět se nesmí při měření

vůbec pohnout, jinak dojde ke znehodnocení všech dat. V případě tohoto měření byla fixace docílena zalitím vzorku jater do agaru a pevným uchycením zkumavky v držáku, jak lze vidět na obr. 6.



Obr. 6: Uchycení vzorků – vlevo vzorek jater ve zkumavce již v prostoru před nano tubicí, vpravo čtyři vzorky jater připraveny v držáku na srovnávací měření [zdroj autor]

Důležité parametry pro měření jsou velikost napětí, velikost proudu, filtrace trubice a senzitivita detektoru. Vše pro optimalizování času měření a kvality obrazu. V případě měření čtyř vzorků pro srovnání byly parametry nastaveny takto – napětí 100 kV, proud 120uA, filtr 0,2 Al, počet snímků 2400, rozlišení 41 μm . Byla použita nanofokusní trubice. V případě měření jednoho vzorku IKI_48 se hodnoty nastavily takto – napětí 100 kV, proud 120uA, filtr 0,2 Al, počet snímků 2400, rozlišení 41 μm . Opět byla použita nanofokusní trubice. Správně nastavit se musí i samotný detektor, což se provádí bez přítomnosti vzorku v obraze.

V případě vzorků v této práci probíhalo měření hodinu a půl. Doba měření totiž závisí na počtu pixelů vzorku v projekci. Nastavení je možné různě modifikovat. Podle potřeby lze přidávat či měnit filtry, zvětšovat napětí nebo tyto parametry kombinovat. To vše dává přístroji velkou variabilitu.

Na akviziční proceduru navazuje rekonstrukční proces. V tomto případě byl použit rekonstrukční program od GE phoenix datos|x 2.0, který používá rekonstrukční algoritmus pro kuželový svazek [27]. V rámci softwaru je použit medián filtr na potlačení šumu a korekce na tvrdnutí svazku. Rentgenové snímky prezentované v práci byly pořízeny na popisovaném tomografu se stejným nastavením [25].

6.2 Hodnocení kvality obrazu

Aby bylo možné kvalitativně vyjádřit, zda má výsledný obraz požadovaný kontrast, vyvážení šumu a zobrazuje i detaily snímaného objektu, je nutné umět data objektivně zpracovat. Obrazy se zde posuzují podle několika kritérií a to konkrétně dle kontrastu, parametrů signálu a velikosti šumu. Tato kritéria byla převzata z odborného článku od Michaela Reitera, kde se kvalita obrazu hodnotí právě takto [24].

Jako první byl tedy hodnocen kontrast, který byl spočítán dle vztahu 2.

$$C = \frac{\Delta I}{I} \quad (2)$$

Kontrast – C je z obrazu získán pomocí průměrné intenzity pozadí – I a pomocí změny této průměrné intenzity – ΔI . Průměrná intenzita obrazu byla zjištěna z histogramu a změna této intenzity je pouze odečtením intenzit jedna od druhé.

Kontrast není v radiodiagnostice užíván tak často, jako signál – S , jenž je měřen v odstínech šedé, a šum – N , který je definován směrodatnou odchylkou z průměrné intenzity pozadí – σ_I . Obě veličiny jsou jinak vyjádřeny ve vztazích 3 a 4 [24].

$$S = \Delta I \quad (3)$$

$$N = \sigma_I \quad (4)$$

Další užívaný výpočet pro zhodnocení obrazu je spočítání SNR (Signal to Noise Ratio), tedy poměr signálu k šumu nebo CNR (Contrast to Noise Ratio), poměr kontrastu k šumu. Vzorec pro SNR je popsán ve vztahu 5 [24].

$$SNR = \frac{S}{N} = \frac{\Delta I}{\sigma_I} \quad (5)$$

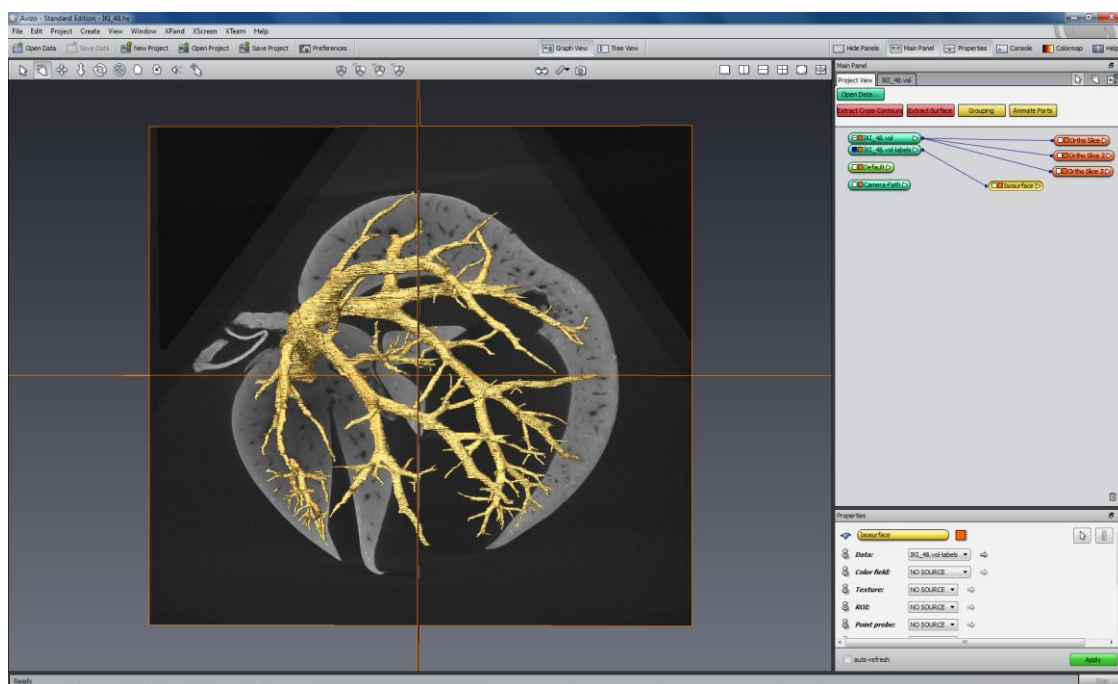
6.3 Zpracování obrazu

Ke zpracování získaných dat byly použity softwary VGStudio a Avizo. Nejprve se prováděla manuální segmentace v programu Avizo. Tato metoda je velice časově náročná, avšak dovoluje zvýraznit pouze vybrané části objektu. Pro tento experiment se nejvíce využil nástroj ‚blow tool‘ (narůstání oblastí). Tento nástroj se ovšem nehodil pro celý objem CT dat, protože kontrast nebyl všude dostatečný a to zapříčinilo nejasné, rozmazané hranice mezi jaterní tkání a cévami. Proto byly pro tyto případy použité jiné nástroje, jako například ‚brush‘ (štetce s různými rozměry) nebo ‚laso‘ (manuální obkreslení vybrané části).

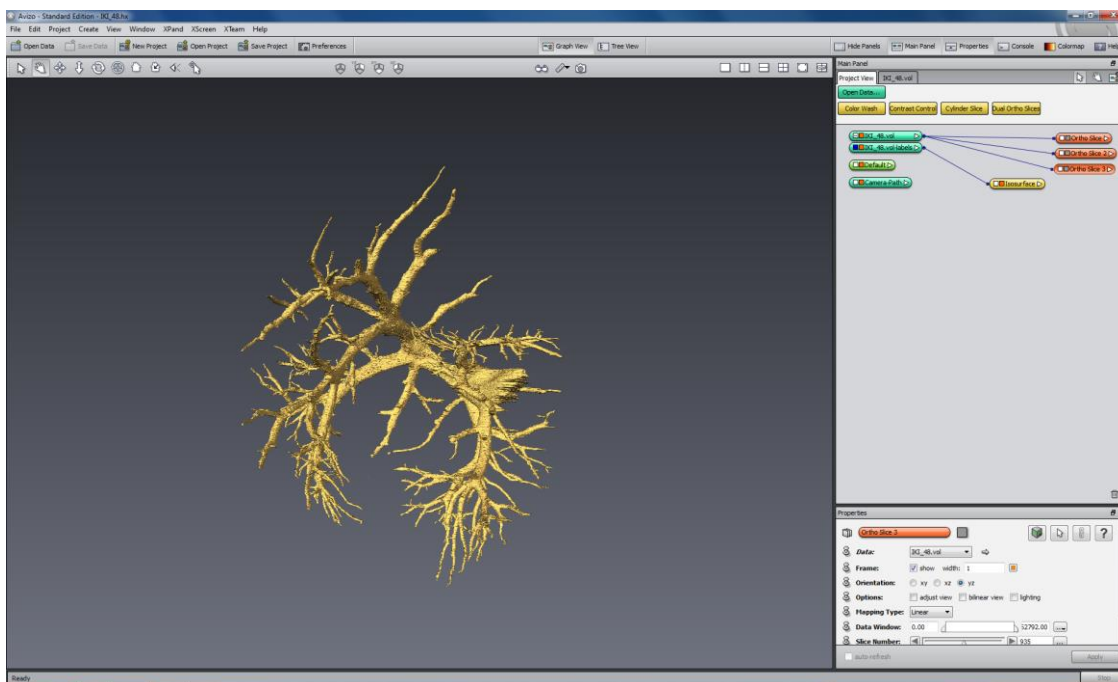
Postup segmentace sestával z postupného označování oblastí vybrané cévy od jejího vstupu do jater. Takto se vybraná céva i se všemi svými větvemi označovala až do okrajových částí tkáně. Hranice segmentované oblasti byly určovány na každém třetím až pátém snímku a mezi nimi byla oblast interpolována softwarem. Interpolace při práci výrazně pomohla, i přesto byla manuální segmentace časově náročná. Úprava dat v programu Avizo, data o dvou a půl tisíce snímcích, zabrala přibližně 24 hodin čistého času.

Po dokončení modelu lze data pomocí nástroje SurfaceGen mírně vyhladit. Pokud se výsledná data exportují, může se toto vyhlazení provést i ve VGStudio, kde je celý proces zpracován rychleji. Toho bylo využito i v této práci. Tedy vyhlazení i video části segmentované v Avizu bylo realizováno ve VG Studio. Vyhlazování je prováděno kvůli lepší vizuální stránce modelu, tedy se smažou zubaté hranice přechodů interpolovaných vrstev modelu.

Na obr. 7 je screenshot softwaru Avizo. Ve středu obrazu je žlutě zobrazena dosavadní vysegmentovaná oblast, vpravo pak je osnova vytvořeného projektu – orthoslíce jsou osy x, y, z; issosurface je záložka pro možnost segmentování dat. Model na obraze je vytvořen asi po 19 hodinách práce. Na obr. 8 je pak samostatný model segmentované části bez podkladu CT snímku [23].

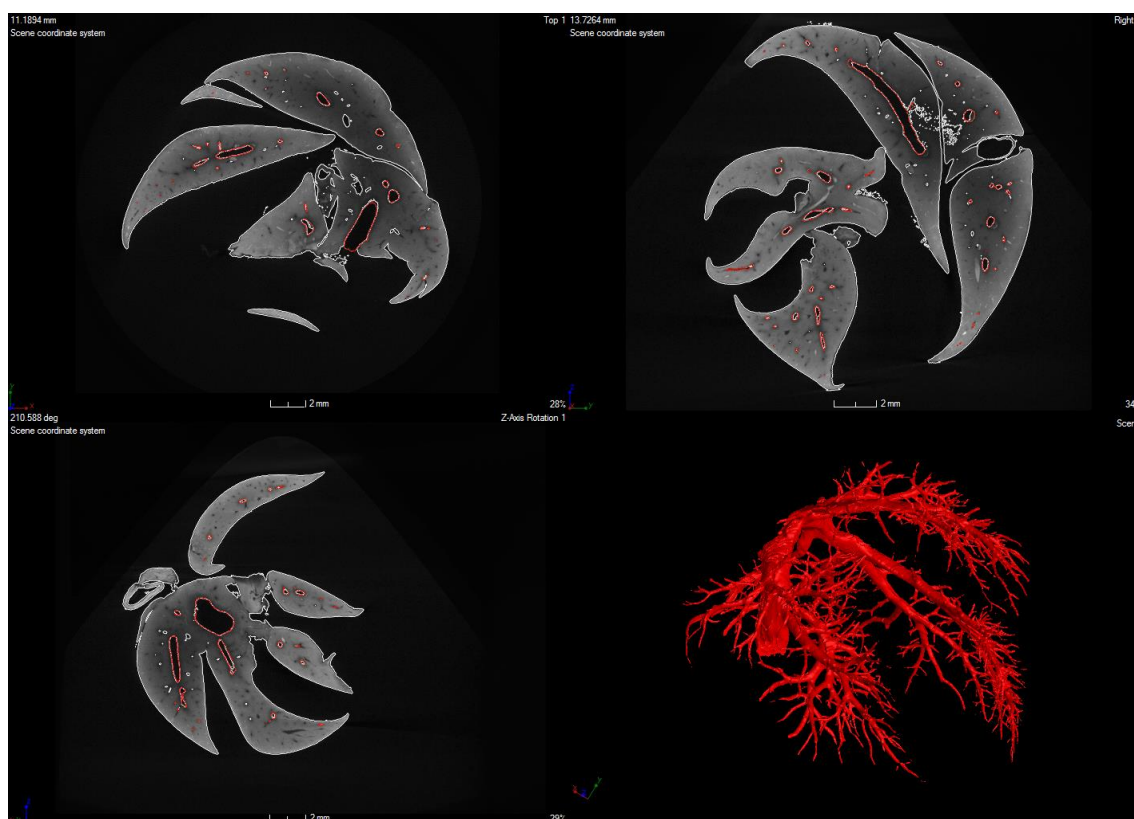


Obr. 7: Screenshot softwaru Avizo, žlutě je rozpracovaná segmentace cévního řečiště, vpravo je pak lišta záložek pro vytvoření tohoto projektu [zdroj autor]



Obr. 8: Screenshot softwaru Avizo, na hlavní pracovní ploše je model vysegmentované části cévního stromu bez pozadí CT snímku; rozpracovaný projekt [zdroj autor]

Na obr. 9 jsou vidět čtyři okna, která se zobrazí po otevření dat ve VGstudiu. Ukazují tři roviny obrazu, ve kterých lze vidět červeně ohraničené oblasti, které představují segmentované části, tvořící 3D model v pravé dolní části obr. 9. Dále jsou na snímcích ze tří rovin vidět i světle ohraničené oblasti, které upozorňují na jinou intenzitu tkáně a nevybrané oblasti při generování modelu.



Obr. 9: Hlavní část pracovní plochy ve VGStudiu, tři obrazy zobrazující tři roviny skenovaného objektu a jeden obraz pro vybranou vysegmentovanou část 3D modelu cévního řečiště [zdroj autor]

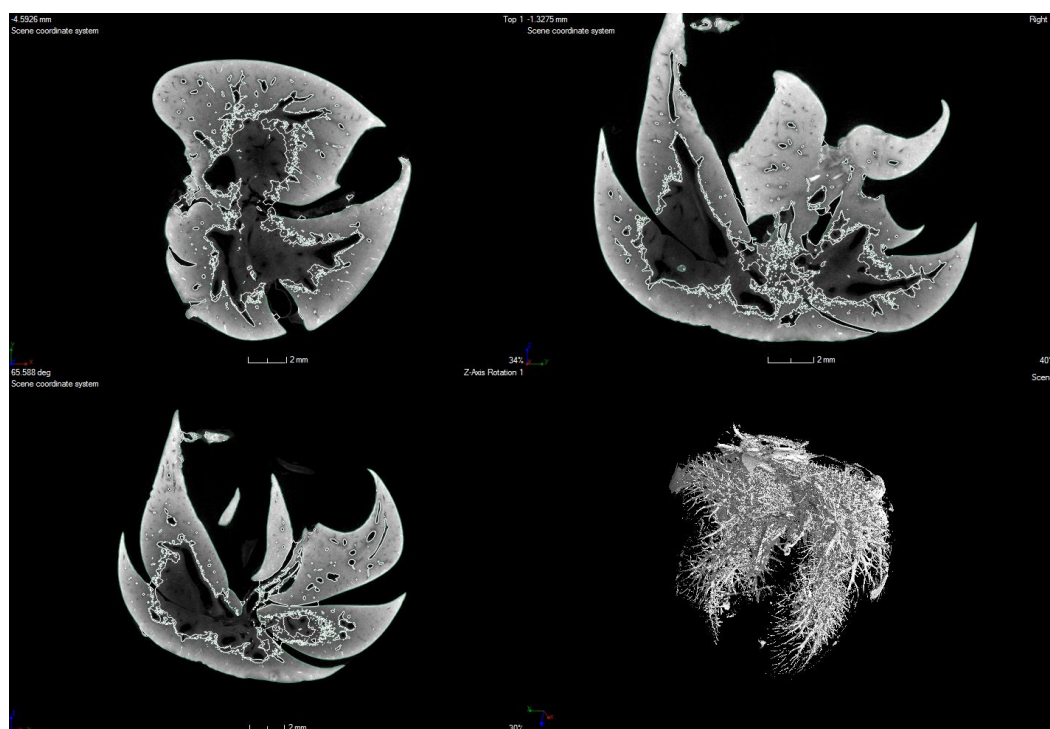
V softwaru VGStudio Max byla provedena poloautomatická segmentace celého cévního stromu v játrech a všechna videa, která jsou součástí elektronické přílohy práce. Konkrétně 2D průlet CT daty vzorku IKI_48, prezentace 3D modelu manuální segmentace a prezentace modelu poloautomatické segmentace cévního stromu jater.

Proces poloautomatické segmentace je pro finální výsledky z měření klíčový protože toto zpracování ušetří 100 % času při zpracování. K dosažení 3D modelu cévního řečiště byl nejprve označen celý vzorek, vytvořila se oblast ROI, která byla

zkopírována. Na jednu oblast ROI byl použit nástroj eroze/dilatace (rádius +5) a odmazány veškeré otvory, tedy tmavé oblasti označující cévy, následně byl nástroj eroze/dilatace použit znovu, tentokrát rádius -5. Tímto postupem bylo dosaženo označení samostatné tkáně (ROI 1) a cév spolu s okolím (ROI 2). Nakonec se tyto dvě oblasti od sebe odečetly, což vytvořilo požadovaný model.

U segmentace ve VGStudiosu nastal problém se zachycením přesně definovaných částí krevních cest, a to z důvodu špatné probarvenosti tkáně. Tím na výsledném 3D modelu vzniknou nechtěné plastické artefakty, což jsou nekontrastované části jaterní tkáně. I přes tyto nevýhody je částečně automatická segmentace nesrovnatelně rychlejší oproti manuálnímu označování oblastí krevního řečiště.

Na obr. 10 je rekonstrukce poloautomatické segmentace jater ve VGStudiosu. Vzhledem k manuální segmentaci je tento model velice rozvětvený, což je dáno tím, že tato segmentace zobrazila všechny krevní systémy – jaterní tepnu, dolní dutou žílu a portální žílu, proto tento model viditelně kopíruje tvar samotných jater.



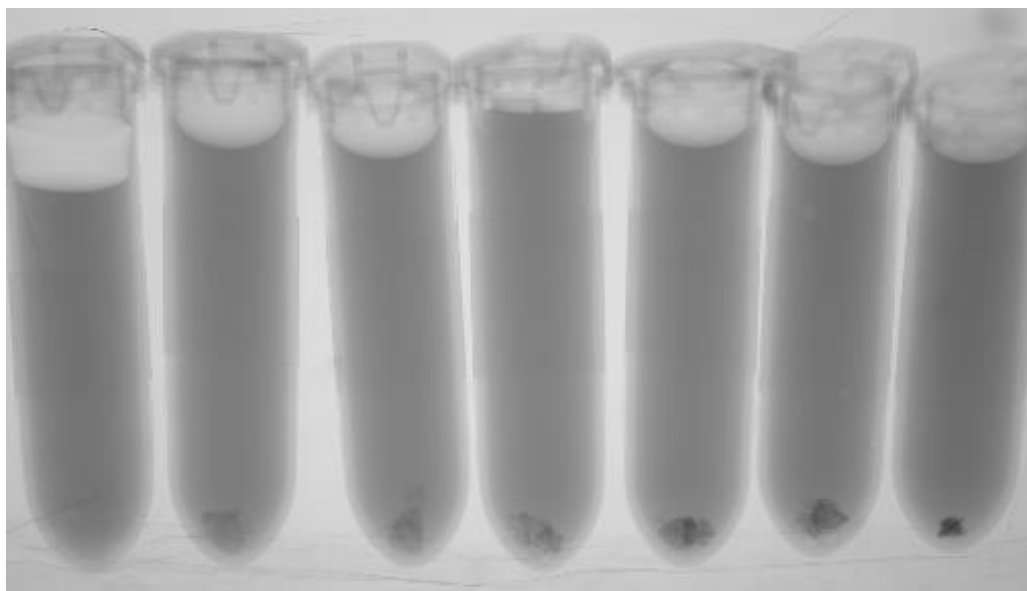
Obr. 10: Zobrazení oblastí ROI odečtených od sebe navzájem ve VGStudiosu; jedna hranice označuje tmavé části cév a okolí vzorku, druhá hranice označuje jaterní tkáň, vpravo dole je pak výsledný model po odečtení oblastí [zdroj autor]

7 Výsledky

V této kapitole budou diskutovány výsledky realizovaných barvicích technik a doplňkově také technik zmíněných pro ukázkou, dále zhodnocení výpočtu kontrastu obrazu a srovnání snímků barvených vzorků.

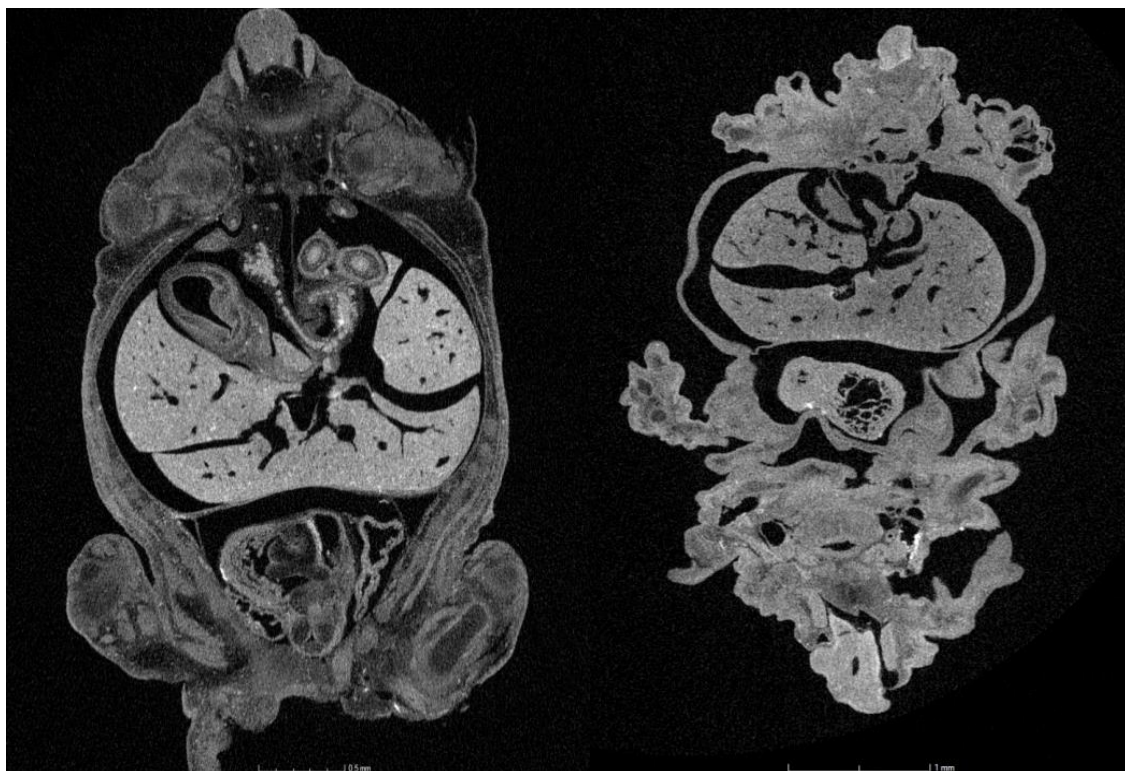
7.1 Zvolení vhodné metody barvení

Pilotní barvení proběhlo na vzorcích myších embryí. Vzorky byly barveny jednoprocenním jódem a dva ze vzorků byly ještě před barvením vloženy do lyofilizátoru. Podrobnosti o barvení v podkapitole 5.1. Z provedeného kontrolního rentgenu, kde se snímaly všechny vzorky, byly patrné jen malé rozdíly, viz obr. 11. Na základě kontrastu na tomto snímku se vybraly dva vzorky E5 a E6 pro další zkoumání. Vzorek E5 byl ponechán v jódě 24 hodin a vzorek E6, který byl dán do lyofilizátoru na 16 hodin a poté barven v 1% jódě 9 hodin.



Obr. 11: Kontrolní rentgen vzorků myších embryí, vzorky byly barveny jódem a ponechány v roztoku po dobu 1, 3, 6, 9, 24 a 9, 24 hodin – vzorky z leva E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 [zdroj autor]

Další měření ukázalo, že tkáň vzorku E6 je značně zdeformována (obr. 12 vpravo). Tato deformace byla patrně způsobena podmínkami v lyofilizátoru, který vzorek poškodil natolik, že už se nehodil k dalšímu zkoumání. Pro další barvení byl lyofilizátor kvůli deformaci tkáně vyloučen z procesu barvení.



Obr. 12: Bližší zkoumání vzorku E5 (vlevo) – tkáň se zdá být neporušená a probarvená - barveno 1% jódem; Bližší zkoumání vzorku E6 (vpravo) – tkáň je viditelně zdeformovaná a ačkoliv probarvení se zdá být lepší, vzorek je nepoužitelný [zdroj autor]

I přes nedostatky byla metoda barvení 1% jódem testována i dále, jelikož se jedná o snadno dostupnou kontrastní látku. K dalším pokusům byla přidána i technika barvení pomocí Lugolova roztoku, což byla v odborných publikacích další varianta k barvení jódem.

7.2 Hodnocení kvality

Aby bylo možné porovnávat kvalitu kontrastu objektivně, hlavní zkoumané vzorky - preparáty jater barveny 24 a 48 hodin v jódovém roztoku a v 10% roztoku IKI, byly měřeny najednou. Z výsledku tohoto měření byl vypočítán kontrast. Díky tomu, že jsou všechny vzorky součástí jednoho obrazu, je u všech těchto vzorků brána stejná intenzita pozadí. Tím jsou zaručeny srovnatelné podmínky pro všechny vzorky. Vypočítané hodnoty jsou zaznamenány v tabulce č. 1. Snímek, ze kterého bylo při výpočtech vycházeno, je na obr. 13. Tímto měřením a výpočtem jsou porovnávány nejen barvicí techniky ale taky doba kontrastování. Pro srovnání byla u obou kontrastovacích technik zvolena stejná doba barvení [24].

Tabulka č. 1 – Kontrasty vzorků z jednoho obrázku

	intenzita tkáně	intenzita pozadí	kontrast
Jód_24	62,029	46,391	0,3371
Jód_48	63,100	46,391	0,3602
IKI_24	63,228	46,391	0,3629
IKI_48	68,877	46,391	0,4847

Pokud se srovnají vypočtené hodnoty kontrastu, jež jsou zaznamenány v tabulce č. 1, ukáže se, že nejlepší kontrast měl vzorek barvený dva dny v 10% roztoku IKI – tedy vzorek IKI_48. Podle očekávání se na posledním místě objevil vzorek jód_24. Tedy vzorek barvený jeden den v roztoku 1% jódu.

$$\text{IKI}_48 > \text{IKI}_24 > \text{jód}_48 > \text{jód}_24$$

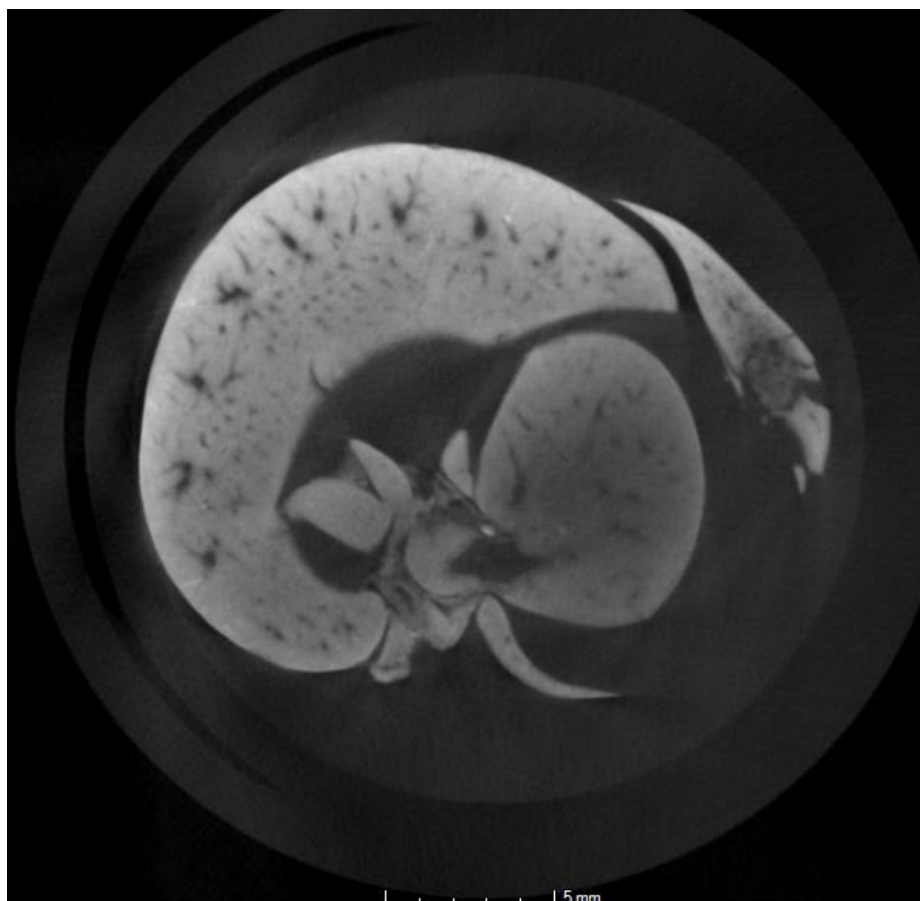
Tyto výsledky se shodují s předpokladem, že čím déle budou vzorky v roztoku, tím lépe budou probarveny. Z tabulky je také vidět, že rozdíl v kontrastu vzorku IKI_24 a jód_48 je velmi malý. Z experimentu lze tedy vyvozovat, že pomocí roztoku 10% IKI je možné

proces barvení zkrátit o celý den oproti roztoku 1% jódu a tím ušetřit i nezanedbatelný čas, a to při podobné náročnosti na přípravu roztoku.



Obr. 13: Vzorky jater na jednom snímku – horní vzorky z leva IKI_24, jód_24, spodní vzorky z leva IKI_48, jód_48, obraz pro porovnání intenzit tkání a vybrání nejvhodnějšího vzorku pro konečnou úpravu [zdroj autor]

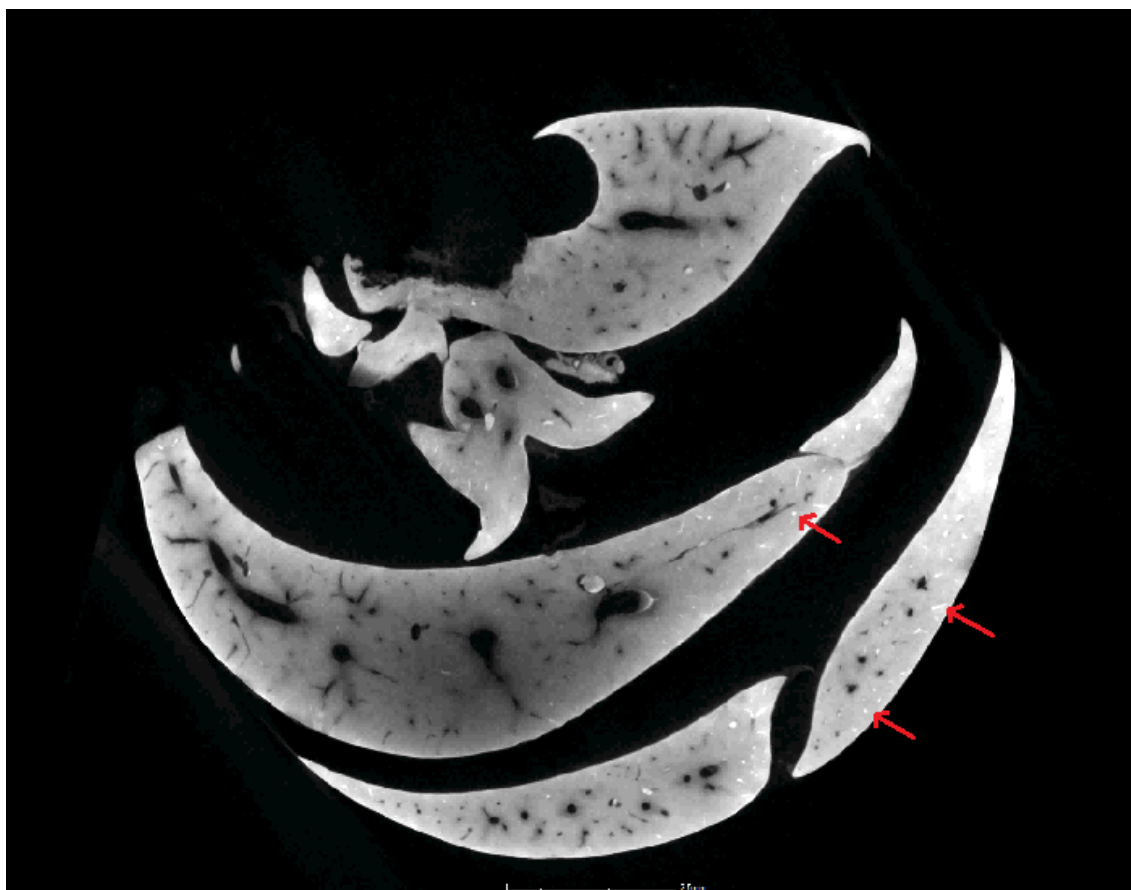
Ze snímku vzorku jód_48 (obr. 14), tedy vzorku jater barvených dva dny v roztoku jednoprocenního jódu je na první pohled patrný homogenní signál v celém objemu. Je jasné, že kontrast je o mnoho lepší oproti nebarvené jaterní tkáni, avšak ani toto zlepšení neposkytuje příliš prostoru pro další zpracování a už vůbec ne pro hledání menších struktur či defektů ve tkáni.



Obr. 14: Celá myší játra na snímku z mikroCT, barveno v roztoku 1% jódu po dobu 48 hodin, snímek pořízen s rozlišením 41 μm ve skupině dalších tří vzorků [zdroj autor]

Na obrázku 15 je snímek z měření vzorku IKI_48, jedná se tedy o preparát jater barvený dva dny v 10% roztoku IKI. Na první pohled vykazuje dobrý kontrast a probarvení celé tkáně. Po detailnějším zkoumání obrazu je patrné, že středy jednotlivých laloků nejsou v celém objemu dostatečně nabarveny. Nedostatečnost průniku barviva do tkání se projeví jako problém zejména při další práci s daty. Pro manuální segmentaci jde kontrast poměrně snadno upravit pomocí histogramu, pro poloautomatickou segmentaci představuje nejasný kontrast problém. Program totiž vezme oblasti stejné úrovně šedé, což v mnoha případech znamená, že se dle nastavení označí i poměrně velké oblasti tkáně a ne jenom cév nebo zachytí jenom část cév ve prospěch tmavší tkáně.

Dalším problémem této barvicí techniky je to, že látka zůstává v okrajových částech tkáně, kde potom vytváří opačný kontrast pro cévní systém – místo tmavých oblastí, velmi světlé, jak lze pozorovat na okrajových částech vzorku IKI_48 (obr. 15). Červené šipky ukazují na některé části cév zaplněné barvivem.



Obr. 15: CT řez játry, měřená celá myší játra, barveno v roztoku 10% IKI, 48 hodin, snímek pořízen z dat skenování pouze tohoto jednoho vzorku, měřeno s větším rozlišením, šipky ukazují oblasti zaplněné barvivem [zdroj autor]

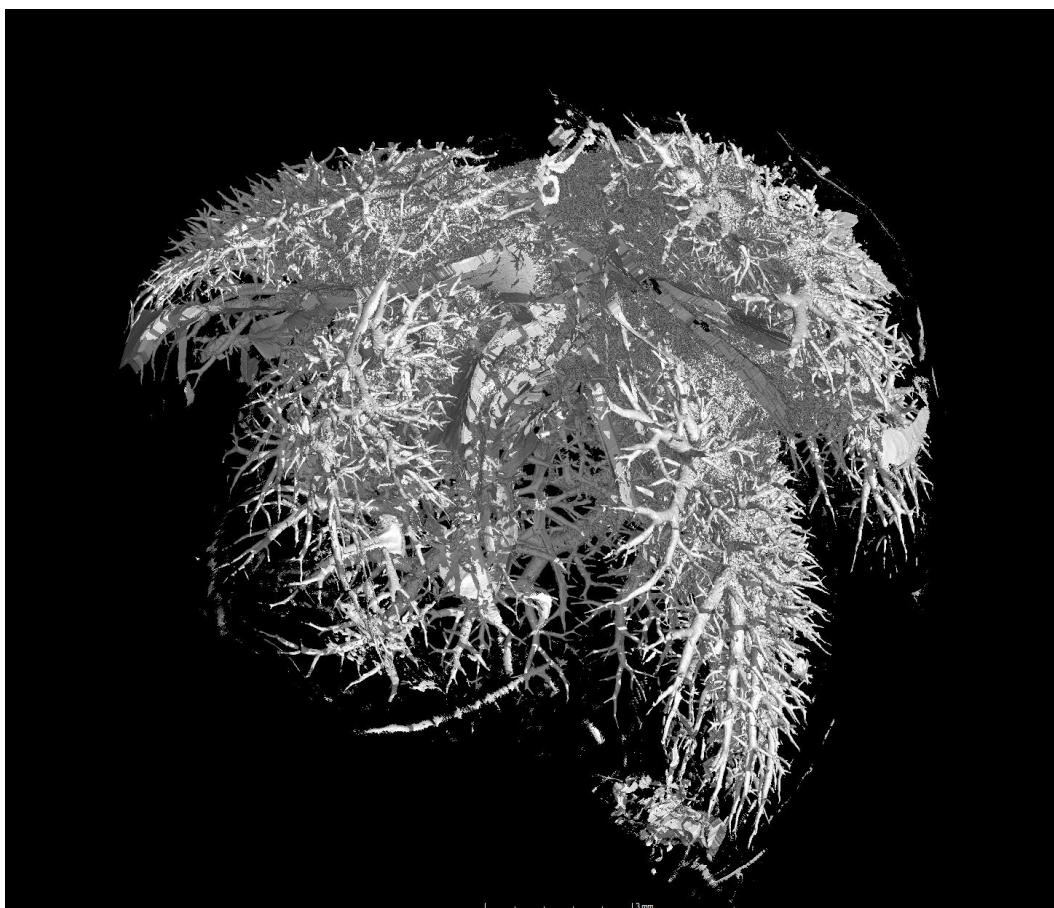
7.3 Výsledné modely segmentace CT dat

Obrazy uváděné v této podkapitole prezentují výsledky segmentací. Obrázek 16 ukazuje model cévního řečiště segmentovaný manuálně v programu Avizo. Model nepředstavuje plné krevní řečiště, ale jen jeho segmentovanou část, na rozdíl od segmentace na obr. 17. Model také nezobrazuje žlučové cesty, neboť nebyly na snímcích rozpoznatelné a nešlo je tak segmentovat. Po svém vytvoření byla segmentovaná oblast exportována do VGStudia, kde byla vyhlazena a obarvena pro názornost na červenou.



Obr 16: Výsledný model cévního řečiště manuálně segmentovaný v programu Avizo, vyhlazený a nabarvený na červenou v programu VGStudio, v modelu nejsou zobrazeny žlučové cesty, jelikož se je nepodařilo zobrazit a vysegmentovat [zdroj autor]

Obrázek 17 zobrazuje poloautomaticky segmentovaný model krevního řečiště. Díky tomu se zde prezentují všechny cévy ve vzorku spolu s artefakty segmentace. Model byl vytvořen a zpracován ve VGStudiu.



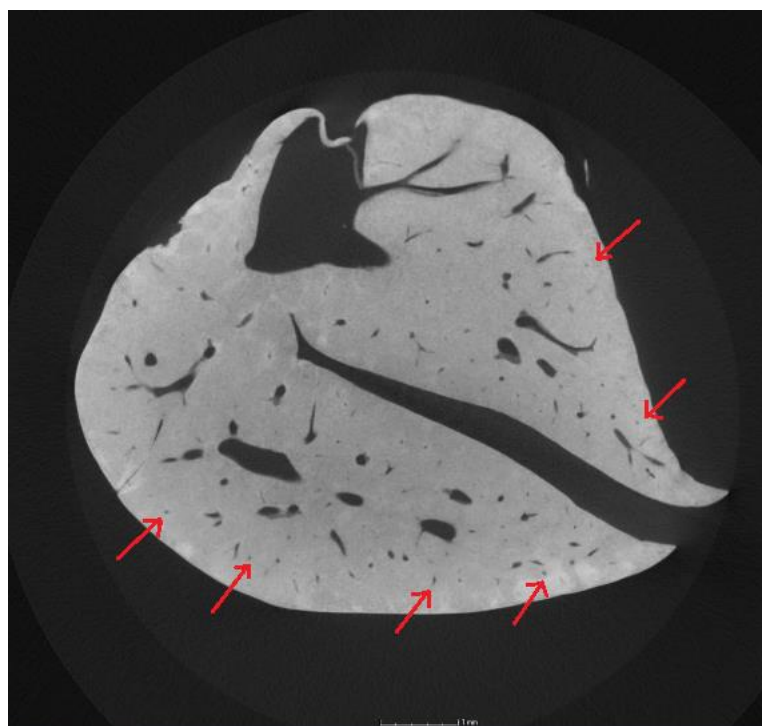
Obr. 17: Model poloautomatické segmentace cévního řečiště v játrech pomocí programu VGStudio, na obraze jsou patrné i artefakty – části které jsou takto zobrazeny, ale jsou to jen špatně probarvené části jaterní tkáně [zdroj autor]

7.4 Alternativní přístupy

Se svolením laboratoře rentgenové počítačové mikro a nanto tomografie na CEITEC-VUT jsou poskytnuty výsledky vzorku kontrastované pomocí roztoku PTA a alternativou je pak vzorek injikovaný látkou Microfil.

Biologické vzorky, které se barvily pomocí kyseliny fosfowolframové, budou dle dostupných odborných článků a jejich studií, vykazovat nejlepší kontrast, ale za cenu nejdelšího procesu barvení, v případě uváděného vzorku to je šest dnů. Ve srovnání s injikováním Microfilu do jaterních systémů, kde celý proces proběhl během jediného dne, je to značný rozdíl [17] [18] [19] [20] [21] [22].

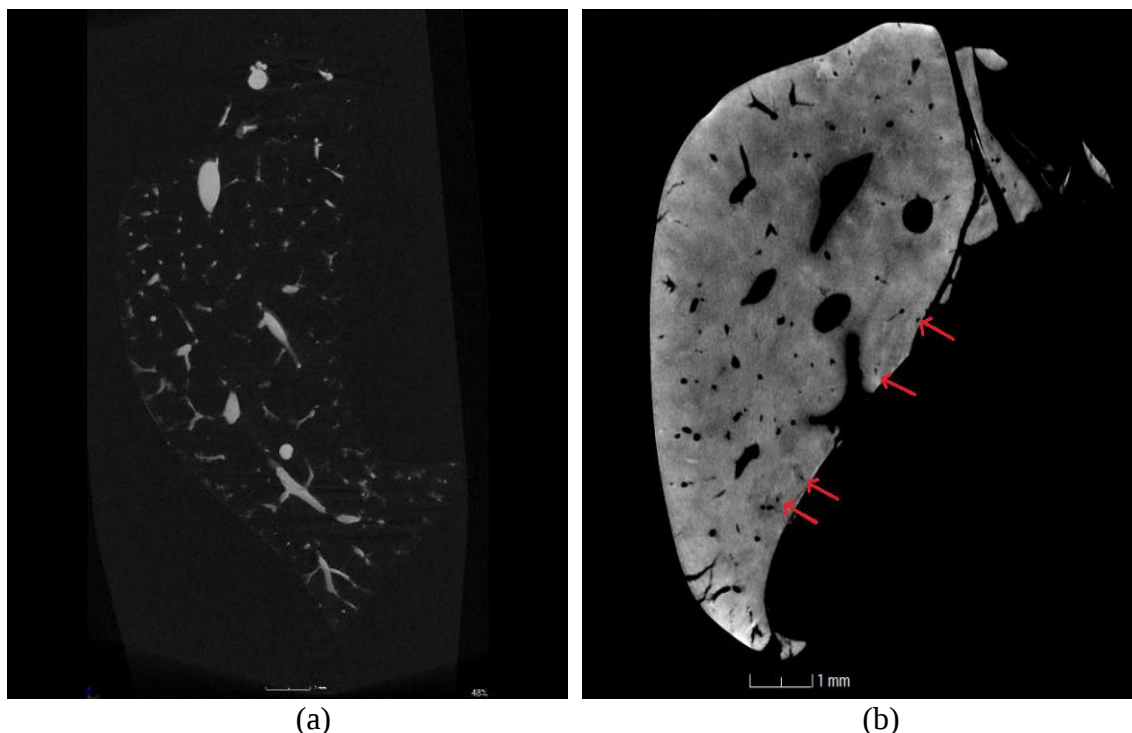
Obrázek 18 demonstruje kontrastovaný lalok jater pomocí PTA. Na první pohled je kontrast oproti předchozím metodám lepší. Vzorek je dobře homogenně nabarven. Toto homogenní proniknutí kontrastní látky může být způsobeno menším objemem kontrastovaného laloku nebo lepšími kontrastovacími vlastnostmi kyseliny fosfowolframové. Také hranice jaterních cév a vlastní tkáně jsou ostřejší. Tento jasný přechod výrazně pomáhá při segmentaci cévního stromu. V jaterní tkáni obr. 18 se též nevyskytuje nežádoucí výskyt barviva v okrajových částech cév, jak je tomu u vzorku IKI_48 na obr. 17. Šipky ukazují malé cévy v krajních částech laloku, které nejsou zaplněny barvivem. Obecně lze říct, že celkový obraz jaterní tkáně kontrastované pomocí PTA je jasově vyváženější a kontrastnější v celém snímku.



Obr. 18: Vzorek jater – jeden lalok, obrázek z CT dat měření tohoto vzorku, barveno pomocí PTA, patrný jasnější kontrast a lepší probarvení celé tkáně do hloubky, játra barvil Ing. Josef Jaroš, Ph.D., obrázek je publikován s jeho svolením

Obrázek číslo 19 je od předešlých tří obrazů z CT dat značně odlišný. Jedná se o alternativní metodu ve zviditelnění cévního řečiště. Světlé části v obraze jsou krevní cévy jater. S výhodou lze injikování Microfilu využít při kontrastování jaterní tkáně např. pomocí PTA při současném vyplnění cévního stromu Microfilem, jak to můžeme vidět na obr. 20. Pak u vzorku nedochází k nežádoucí stagnaci barvicí látky

v okrajových částech tkáně, jak tomu je u vzorku IKI_48 na obr. 15 (ukazují červené šipky).



Obr. 19 (a): Snímek laloku jater z mikroCT dat, barvicí technika – injikování Microfilu do cévního řečiště (světlé oblasti), barvila Mgr. Simona Hankeová, obrázek je použit s jejím svolením

Obr. 20 (b): CT obraz laloku jater, barveno kombinací látek Microfil a PTA, vidíme jasně patrné tmavé oblasti cév a kontrastní světlou tkáň, nedochází ke stagnaci barvicí látky v okrajových částech tkáně – označují červené šipky, barvila Mgr. Simona Hankeová a Ing. Josef Jaroš, Ph.D., obrázek je publikován s jejich svolením

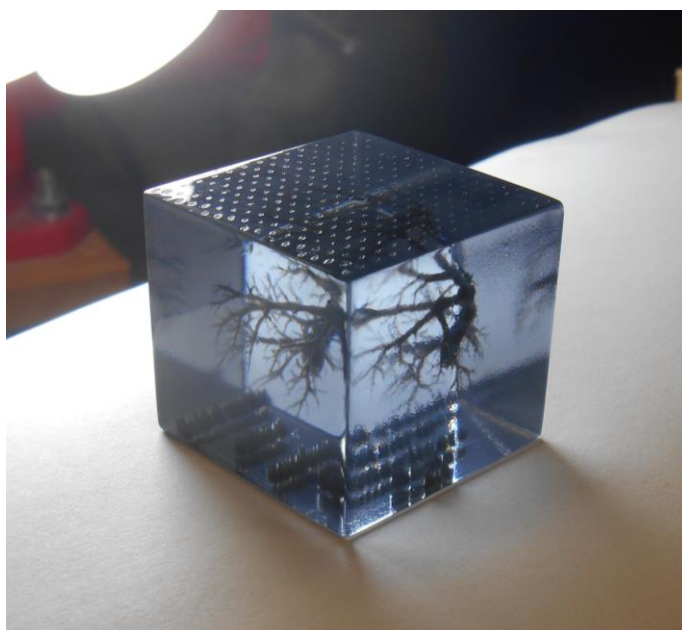
8 Možnosti 3D tisku pro CT laboratoře

Spojení možností 3D tiskáren a tomografických laboratoří může na první pohled vypadat zvláště, avšak je to spojení obohacující obě oblasti. I v této bakalářské práci se podařilo tato dvě odvětví spojit. Modely objektů měřených na počítačových tomografech nebo jen jejich části lze z virtuální roviny přenést do reálné, a to právě pomocí 3D tisku. V případě cévního řečiště se na tiskárně Objet Connex 500,

ve spolupráci s laboratoří prototypových technologií a procesů na TUL, podařilo vytisknout vysegmentovaný model. Jelikož byl vzorek jater a tím i výsledný model malého rozměru, pro lepší názornost se přistoupilo ke zvětšení fyzického modelu oproti virtuálnímu v poměru 4:1. Vytisknutý model je zobrazen na obr. 21.

Tisk probíhal na tiskárně Objet Connex 500 s technologií PolyJetMatrix. Tato technologie umožňuje tisknutí dvou různých materiálů zároveň. Ty jsou v tekuté formě nanášeny dle předlohy modelu ve vrstvách 16 nebo 30 μm tenkých. Výsledný objekt se vytvrzuje UV zářením. Toto zařízení tak poskytuje rychlý a kvalitní tisk s využitím různých materiálů. Pro stabilizaci vlastností jinak křehkého modelu se přistoupilo k dvoukomponentnímu tisku. Cévní strom je vytisknut tmavým materiálem uvnitř krychle z materiálu čirého. Tvrzený materiál se pro zajištění své průhlednosti musel vyleštit. Pro jasné určení modelu je i přímo na krychli popis tištěného objektu.

Spojování možností fyzického a rychlého tisku na 3D tiskárnách poskytuje laboratořím počítačových tomografů názornou vizualizaci výsledků měření. Takovýto tisk je vhodný například k prezentaci jinak skrytých částí objektů a mohl by nalézt využití v komerční sféře i ve školství jako výborný studijní materiál [21].



Obr. 21: Vytisknutý model cévního systému jater; rozměr 4 x 4 x 4 cm [zdroj autor]

IV Závěr

Celá tato bakalářská práce se zabývala problematikou barvení myších jater pro rentgenovou počítačovou tomografii. Cílem zobrazení vnitřní struktury jater byla vizualizace cévního a žlučového systému v játrech. Segmentací vybraného vzorku byl vytvořen model jaterního cévního systému.

Z tomografických dat jater bylo možné vysegmentovat a zobrazit v modelu pouze cévní systém. Žlučové kanálky jater byly vzhledem ke svému rozměru a vzhledem k výsledkům kontrastu snímků, nerozpoznatelné.

Výstupem z bakalářské práce jsou protokoly přípravy vybraného orgánu pro barvení jater pomocí jódu, Lugolova roztoku, PTA a Microfilu. Dále postup měření vzorků, mikrotomografická data měkkých tkání a 3D model cévního systému jater. Jako doplnění k původnímu zadání vznikl i 3D vytištěný model segmentované části cévního řečiště jater. V elektronické příloze práce jsou vložena i videa segmentovaných modelů, které mimo jiné demonstrují možnosti prezentace výsledků vytvořených v použitých grafických programech.

K vytištění modelu se přistoupilo z důvodu prezentace výsledku v podobě reálného modelu a demonstraci možností navazujících technik na zpracování CT dat. Možnost tisku reálného objektu z CT dat dává možnost lepšího zkoumání studovaného objektu a to například v oblastech zkoumání patologických změn tkání.

Do praxe tato práce ověřila využitelnost technických CT i pro účely medicíny. Pro svou velkou rozlišovací schopnost je průmyslové CT vhodné i pro zkoumání malých vzorků.

V Literatura

- [1] KUMPOVÁ, I. Plánování terapie ionizujícím zářením. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství, 2012. 48 s., 18 s. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
- [2] ROSINA, Jozef et al. *Biofyzika: Pro zdravotnické a biomedicínské obory*. První vydání. Grada: Praha, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- [3] BENEŠ, Jiří et al. *Základy lékařské biofyziky: učební text pro 1. lékařskou fakultu UK*. 3. upravené vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2034-3.
- [4] MARTYKÁNOVÁ, Eva. *Rtg záření, jeho vlastnosti a využití: diplomová práce*. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra fyziky, 2007. Vedoucí diplomové práce, Prof. RNDr. Vladislav Navrátil, CSc.
- [5] CARLSSON, Carl and Gudrun Alm CARLSSON. *Basic physics of X-ray imaging*. Sweden: Linköping university, Department of Radiation Physics, Faculty of Health Sciences, 1996. ISRN LIU-RAD-R-008.
- [6] FERDA, Jiří et al. *Základy zobrazovacích metod*. Praha: Galén, c2015. 148 s. ISBN 978-80-7492-164-3.
- [7] HSIEH, Jiang. *Computed tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances*. 2nd ed. United States of America: SPIE and John Wiley & Sons. Inc., 2009. ISBN-978-0-8194-7533-6.
- [8] CHRISTOPH, Ralf and Hans Joachim NEUMANN. *X-Ray Tomography in Industrial Metrology*. 2nd ed. MESSTECHNIK Werth: Germany, 2012. ISBN 978-3-86236-045-1.
- [9] ZIKMUND, Tomáš, Michal PETRILAK a Jozef KAISER. *Rentgenová počítačová tomografie pro analýzu odlitků, defektoskopii a kontrolu rozměrů*, FAST VUT: Brno, 2013.
- [10] RITTER, Felix, Tobias BOSKAMP, André HOMEYER and Hendrik LAUE. *Medical Image Analysis*, Browse Journals & Magazines, vol.2, p. 60-70, 2011.

- [11] SEIDL, Zdeněk a kol. *Radiologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2012. ISBN: 978-80-247-4108-6.
- [12] MOUREK, Jiří. Fyziologie: Učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2. doplněné vydání. Grada: Praha, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2
- [13] CHOPRA, Sanjiv. *Játra*. Praha: Pragma, 2004. ISBN 80-7205-221-7.
- [14] SHERLOCK Sheila a James DOOLEY. *Nemoci jater a žlučových cest*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2004. ISBN 80-86703-00-2.
- [15] BRONZIO, Joseph D. *The Biomedical Engineering HandBook*. Second Edition. USA: CRC Press LLC, 2000. ISBN: 0-8493-0461-X.
- [16] ČERVENÝ, Čeněk. *Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi*. Praha: Nakladatelství Bárzda, 2011. ISBN 978-80-209-0389-1.
- [17] DESCAMPS, Emilie, et al. Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning. *Belg J Zool*, 2014, 144: 20-40.
- [18] METSCHER, Brian D. MicroCT for developmental biology: A versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics*, 2009, 238.3: 632-640.
- [19] WONG, Michael D.; SPRING, Shoshana; HENKELMAN, R. Mark. Structural stabilization of tissue for embryo phenotyping using micro-CT with iodine staining. *PloS one*, 2013, 8.12: e84321.
- [20] Flow Tech Inc. – Microfil® Injection Compounds [online]. 2015 [cit. 9.3.2016] Dostupné z: <http://www.flowtech-inc.com/>
- [21] TESAŘOVÁ, Markéta, ZIKMUND, Tomáš, et al. Use of micro computed-tomography and 3D printing for reverse engineering of mouse embryo nasal capsule. *Journal of Instrumentation*, 2016, 11.03: C03006.
- [22] SPARKS, Erin E., et al. Defects in hepatic Notch signaling result in disruption of the communicating intrahepatic bile duct network in mice. *Disease Models and Mechanisms*, 2011, 4.3: 359-367.

- [23] WALEK, Petr, Martin LAMOŠ a Jiří JAN. *Analýza biomedicínských obrazů*. VUT: Brno, 2013. ISBN 978-80-214-4792-9.
- [24] REITER, Michael, et al. Evaluation of a histogram-based image quality measure for X-ray computed tomography. In: *Proceedings of Conference on Industrial Computed Tomography (iCT2014)*, Wels, Austria. 2014.
- [25] Laboratoř počítačové tomografie – Zařízení [online]. 2016 [cit. 9.3.2016] Dostupné z <http://www.ctlab.cz/vybaveni-laboratore/>
- [26] PathologyOutlines.com, Inc. – Liver normal anatomy [online]. 2012 [cit. 22.4.2016] Dostupné z <http://www.pathologyoutlines.com/topic/livernormalanatomy.html>
- [27] ZHAO, Jun, et al. Feldkamp-type reconstruction algorithms for spiral cone-beam CT with variable pitch. *Journal of X-ray Science and Technology*, 2007, 15.4: 177-196.

Vzorce zdroje

- 1 - WikiSkripta – Počítačová tomografie a Hounsfieldovy jednotky [online].2015 [cit. 29.10.2015]] Dostupné z:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Počítačová_tomografie_a_Hounsfieldovy_jednotky
- 2, 3, 4, 5 - REITER, Michael, et al. Evaluation of a histogram-based image quality measure for X-ray computed tomography. In: *Proceedings of Conference on Industrial Computed Tomography (iCT2014)*, Wels, Austria. 2014.

Seznam příloh

Příloha č. 1 – **Protokol 1: Kontrastní barvení měkkých tkání – embrya**

Příloha č. 2 – **Protokol 2: Kontrastní barvení měkkých tkání – játra**

Příloha č. 3 – **Protokol 3: Barvení měkkých tkání pomocí PTA**

Příloha č. 4 – **Protokol 4: Injekování žlutého Microfilu do jater**

Příloha

Příloha 1

Protokol 1: Kontrastní barvení měkkých tkání – embrya

Úvod:

Cílem této práce bylo zjistit, zda je roztok 1% jódu dostatečným barvivem pro kontrastování měkkých tkání. Jako doplněk barvení jsem na dvou vzorcích zkoušela využít i lyofilizátoru.

Pomůcky a chemikálie:

pinzeta, kádinka, váha, odměrná baňka, ependorfky, jód, destilovaná voda, agar, lyofilizátor, myší embrya

Pracovní postup:

Vzorky E1, E2, E3, E4 a E5 byly opláchnuty lihem denaturovaným methanolem a následně ponořeny do roztoku 1% jódu. V roztoku zůstaly 1, 3, 6, 9 a 24 hodin. Vzorky E6 a E7 byly také nejdříve opláchnuty lihem denaturovaným methanolem a poté byly v čistých ependorfkách vloženy do lyofilizátoru, kde byly při teplotě -111°C a tlaku 495mBar ponechány 16 hodin. Poté se vzorky ponořily do roztoku 1% jódu a zde byly ponechány 9 a 24 hodin. Všechny vzorky byly po uplynutí stanovených časů vloženy do 0,5% agaroza gelu.

Příprava roztoku:

1% jód – 1g práškového jódu se rozmíchal ve 100 ml destilované vody

0,5% agarozový gel – do 100ml destilované vody se přidalo 0,5g agaru; poté se směs zahřívala, dokud se agar nerozpustil a roztok nebyl opět čirý

Závěr:

Vzorky byly před barvením a po něm uchovávány v lednici. Během barvení se vzorky nacházely v pokojové teplotě 22°C. Po barvení se změnila barva všech vzorků a to tak že díky jódu zhnědly. Až další zkoumání ukázalo účinnost postupu a barvení.

Příloha 2

Protokol 2: Kontrastní barvení měkkých tkání - játra

Úvod:

Cílem této práce bylo nabarvit jaterní tkáň tak, aby se na CT snímcích zobrazovala s dostatečným kontrastem. Tento protokol uvádí dva postupy barvení.

Pomůcky a chemikálie:

pinzeta, kádinka, váha, odměrná baňka, ethanol, jód, jodid draselný, destilovaná voda, agar, játra březích myší

Pracovní postup:

Játra byla pinzetou vyjmuta z plastových zkumavek a opláchnuta etanolem denaturovaným metanolem. Následně byla vložena do připravených roztoků 1% jodu a 10% IKI a ponechána v roztocích 24 a 48 hodin. Po uplynutí tohoto času byla játra opět pinzetou vytažena z roztoku, opláchnuta etanolem denaturovaným metanolem a vložena do 0,5% agaru.

Příprava roztoků:

1% jód – 1g práškového jodu se rozmíchal ve 100 ml destilované vody

10% IKI (Lugolův roztok) - 5g jodu a 10g KI se nechalo rozpustit v 85ml destilované vody; z toho roztoku se vzalo 10 ml a toto množství se doplnilo opět destilovanou vodou do 100 ml v odměrné baňce.

0,5% agarozový gel – do 100 ml destilované vody se přidalo 0,5g agaru; poté se směs zahřívala, dokud se agar nerozpustil a roztok nebyl opět čirý

Závěr:

Vzorky byly před barvením i po něm uchovávány v lednici. Během barvení se vzorky nacházely v pokojové teplotě 22°C. Po obarvení nebyl patrný žádný rozdíl. Účinnost roztoků na kontrast při CT snímání byl patrný až po provedení snímkování.

Protokol 3: Barvení měkkých tkání pomocí PTA

Úvod:

Cílem tohoto postupu je dosáhnout potřebného kontrastu na datech z mikroCT.

Pomůcky a chemikálie:

pinzeta, kádinky, zkumavky, váha, odměrné baňky, ethanol, methanol, PTA, agar, destilovaná voda, PBS, vzorky jater

Pracovní postup:

- fixace vzorku v 4% formaldehydu (PBS)
- vzorky byly opláchnuty PBS a postupně dehydratovány ethanolem (30%, 50%, 70%)
- každý stupeň dehydratace probíhal jeden den
- vzorky byly vyjmuty ze 70% ethanolu a přesunuty do roztoku ethanol-methanol-voda (4:4:3) a následně do 80% a 90% methanolu, prodleva vzorku v jednotlivých roztocích trval 1 hodinu
- vzorek byl vložen do barvicího roztoku 0,7% PTA-methanolu po dobu 6 dnů
- po barvení následovala rehydratace v methanolu (90%, 80%, 70%, 50%, a 30%) a končila v destilované vodě
- vzorky byly v plastové zkumavce zality do 0,5% agarozového gelu

Závěr:

Výše popsany postup je modifikací protokolu barvení pomocí PTA od Briana Metchera. Vzorky byly po barvení skladovány v lednici.

Protokol 4: Injikování žlutého Microfilu do jater

Úvod:

Injekce syntetické pryskyřice MIKROFIL[®] slouží k vytvoření 3D odlitku cévního a žlučového systému v játrech. Předpokladem pro tuto metodu bylo zlepšení kontrastu na mikroCT.

Pomůcky a chemikálie:

polyethylenové hadičky, jehly 30G, injekční stříkačky, tenká hedvábná vlákna, nůžky, zkumavky, mikroskop, žlutý MICROFIL[®], ředicí látka, paraformaldehyd, agaróza, vzorky myších jater

Příprava roztoků:

příprava Microfilu – rozředit MICROFIL[®] (cat. #MV-122) s čistou ředicí látkou (cat. #MV-Diluent) v poměru 1:3, dobře promíchat a protřepat

Pracovní postup:

- pracuje se pod mikroskopem se zvětšením 0,63x
- lokalizovat a očistit portální žílu a žlučovod od okolní tkáně
- polyethylenovou hadičku (PE10) upevnit na jehlu velikosti 30G a vsunout do portální žíly nebo žlučovodu, upevnit tenkým hedvábným vláknem cca 4 cm dlouhým
- pokud injektujeme naráz oba systémy, začneme žlučovodem
- před začátkem samotného injikování přidat k roztoku Microfilu 10% tužidla (součást balení MICROFIL[®])
- naplnit stříkačku 1 ml roztoku Microfilu a spojit stříkačku s odpovídající jehlou s hadičkou
- injikování pomocí automatické pumpy – do žlučových cest dospělé myši asi 150 µl, do cévního systému asi 200 µl roztoku Microfilu
- po naplnění systému vyjmout hadičku s jehlou a podvázat příslušný vývod hedvábným vláknem, aby Microfil nemohl vytéct ven
- po plnění se játra umístí do zkumavky a uloží do lednice (4°C), kde vzorek zůstane přes noc, aby Microfil ve vzorku ztuhnul

- játra se poté fixují ve 4% roztoku paraformaldehydu a opět se nechají v lednici
- pro snímání pomocí mikroCT se játra zalijí do 0,5% roztoku agarózy

Závěr:

Tímto postupem jsme se snažili dosáhnout vyplnění cév a žlučových kanálků. Tím, že jsme systémy vyplnili, jsme docílili lepšího rozlišení na mikroCT snímcích. Dobrý výsledek vznikne za předpokladu, že se Microfil dostane do celého systému rovnoměrně.