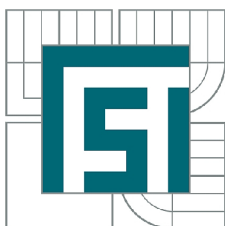


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING  
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

MATEMATICKÉ METODY PRO ZPRACOVÁNÍ OBRAZU  
V BIOLOGICKÝCH POZOROVÁNÍCH  
MATHEMATICAL METHODS FOR IMAGE PROCESSING IN BIOLOGICAL OBSERVATIONS

DIZERTAČNÍ PRÁCE  
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Ing. TOMÁŠ ZIKMUND

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

prof. RNDr. RADIM CHMELÍK, Ph.D.



## **Abstrakt**

Dizertační práce se zabývá zpracováním obrazu v digitální holografické mikroskopii a rentgenové počítačové tomografii. Těžiště práce spočívá v návrhu postupů pro zpracování dat v daných oblastech biologických experimentů.

Transmisní světelná holografická mikroskopie je použita zejména pro kvantitativní fázové zobrazení transparentních mikroskopických objektů, jako jsou živé buňky. Fázové obrazy jsou ovlivněny fázovými aberacemi, které ztěžují studium buněk. V této práci je prezentován nový algoritmus pro dynamické zpracování fázových obrazů živých buněk v časosběrné sérii. Algoritmus kompenzuje deformace fázového obrazu použitím metody vážených nejmenších čtverců. Navíc ve fázovém obrazu identifikuje a segmentuje individuální buňku. Tyto vlastnosti algoritmu jsou rozhodující pro kvantitativní fázové zobrazení buněk v reálném čase a řízení průběhu experimentu. Účinnost navrženého algoritmu je demonstrována na obrazech krysích nádorových buněk prostřednictvím mimoosového holografického mikroskopu.

Rentgenová počítačová tomografie s vysokým rozlišením je stále více používanou technikou pro studium mikroarchitektury kostí malých hlodavců. V této části práce je provedena analýza kortikální a trabekulární distální poloviny krysích stehenních kostí. Vyvinuli jsme metodu pro mapování pozice a rozměrů kortikálních povrchů od centrální podélné osy s jednostupňovým úhlovým rozlišením. Touto metodou jsou zkoumány tvarové odlišnosti krysích stehenních kostí mezi experimentálními skupinami. Orientace kostí je v tomografických řezech vyrovnána před mapováním pomocí navrženého postupu standardizace tomografických dat. Aktivita remodelačního procesu dlouhé kosti je také studována na systému kortikálních kanálků.

## **Summary**

The dissertation deals with the image processing in digital holographic microscopy and X-ray computed tomography. The focus of the work lies in the proposal of data processing techniques to meet the needs of the biological experiments.

Transmitted light holographic microscopy is particularly used for quantitative phase imaging of transparent microscopic objects such as living cells. The phase images are affected by the phase aberrations that make the analysis particularly difficult. Here, we present a novel algorithm for dynamical processing of living cells phase images in a time-lapse sequence. The algorithm compensates for the deformation of a phase image using weighted least squares surface fitting. Moreover, it identifies and segments the individual cells in the phase image. This property of the algorithm is important for real-time cell quantitative phase imaging and instantaneous control of the course of the experiment. The efficiency of the propounded algorithm is demonstrated on images of rat fibrosarcoma cells using an off-axis holographic microscope.

High resolution X-ray computed tomography is increasingly used technique for the study of the small rodent bones micro-structure. In this part of the work, the trabecular and cortical bone morphology is assessed in the distal half of rat femur. We developed new method for mapping the cortical position and dimensions from a central longitudinal axis with one degree angular resolution. This method was used to examine differences between experimental groups. The bone position in tomographic slices is aligned before the mapping using the propound standardization procedure. The activity of remodelling process of the long bone is studied on the system of cortical canals.

**Klíčová slova**

digitální holografická mikroskopie, holografie v reálném čase, kvantitativní fázové zobrazení, sledování buňky, rentgenová počítačová mikrotomografie, 3D analýza mikrostruktury, tomografické zpracování obrazu, růst kosti, krysí stehenní kost

**Keywords**

digital holographic microscopy, real-time holography, quantitative phase imaging, cell tracking, X-ray micro computed tomography, 3D microstructure analysis, tomographic image processing, bone growth, rat femur

ZIKMUND, T. *Matematické metody pro zpracování obrazu v biologických pozorováních*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 69 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D. a že veškerá použitá literatura je uvedena v seznamu zdrojů.

Ing. Tomáš Zikmund



Na tomto místě děkuji prof. Radimu Chmelíkovi za vedení dizertační práce, prof. Alanu Boydovi za inspiraci a pomoc při studiu. Dále děkuji svým kolegům z laboratoře optické mikroskopie, především Ing. Matěji Týčovi za odbornou podporu. V neposlední řadě chci poděkovat své přítelkyni a rodině za trpělivost a podporu při psaní práce.

Ing. Tomáš Zikmund





# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>3</b>
<b>I</b>	<b>Digitální holografická mikroskopie</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Holografický mikroskop</b>	<b>7</b>
2.1	Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM)	7
2.2	Optické schéma	7
2.3	Zpracování hologramu	8
<b>3</b>	<b>Fázové zobrazení</b>	<b>11</b>
3.1	Experimentální stanovení vývoje deformace fáze	11
3.2	Kompenzační metody	14
3.3	Cíle práce	15
<b>4</b>	<b>Princip dynamického zpracování fázových obrazů</b>	<b>17</b>
4.1	Stručný popis algoritmu	17
4.2	Zpracování prvního fázového obrazu	17
4.3	Dynamické zpracování dalších fázových obrazů	19
4.4	Experimentální výsledky	22
4.5	Závěr	26
<b>II</b>	<b>Rentgenová počítačová mikrotomografie</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Počítačová tomografie</b>	<b>31</b>
5.1	MikroCT	31
5.1.1	Laboratorní mikroCT systém	32
5.2	Voxelové rozlišení	32
<b>6</b>	<b>Morfologie kosti</b>	<b>33</b>
6.1	Základní stavba stehenní kosti	33
6.2	Označení směrů	34
6.3	Vývoj kosti	34
6.4	Vizualizace a měření vývoje kosti	36
<b>7</b>	<b>Analýza CT dat končetin laboratorních krys</b>	<b>39</b>
7.1	Značení vzorků	39
7.2	Použité přístroje	39
7.2.1	Rentgenografie levé končetiny	39
7.2.2	Mikrotomografie distální poloviny stehenní kosti	40
7.2.3	Mikrotomografie kortikální kosti	40
7.3	Standardní hodnocení kostní mikrostruktury	40
7.3.1	Analýza kortikální kosti	41
7.3.2	Analýza trabekulární kosti	41

## OBSAH

7.4	Cíle práce . . . . .	43
7.5	Nový přístup ke studiu kosti na $\mu$ CT datech . . . . .	44
7.5.1	Standardizace CT dat distální poloviny stehenní kosti . . . . .	44
7.5.2	Automatické odstranění obrazu trabekulární kosti . . . . .	45
7.5.3	Mapování kortexu: měření vzdáleností povrchu stěny kosti od centrální podélné osy . . . . .	46
7.6	Výsledky . . . . .	49
7.6.1	Morfologické analýzy v uživatelsky definovaných oblastech . . . . .	49
7.6.2	Vylepšené rendrování . . . . .	51
7.6.3	Studium změn tvaru kosti . . . . .	52
7.6.4	Mapování povrchu . . . . .	54
7.6.5	Systémy kortikálních kanálků . . . . .	56
7.7	Závěr . . . . .	59
<b>8</b>	<b>Shrnutí</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	<b>68</b>

# 1. Úvod

Dizertační práce je rozdělena do dvou částí kopírujících činnosti, kterými jsem se zabýval v průběhu doktorského studia. Cíle práce jsou uvedeny a jejich splnění diskutováno v každé dílčí části zvlášť. První část popisuje výsledky dosažené v digitální holografické mikroskopii a druhá část v rentgenové počítačové tomografii. V obou případech byla témata výzkumné práce zaměřena na zpracování obrazu biologických vzorků. V případě digitální holografické mikroskopie se konkrétně jedná o zpracování fázového obrazu buněk. Část s počítačovou tomografií je zaměřena na zpracování tomografických dat mikrostruktury kostí laboratorních krys.

V Centru inovativní mikroskopie na Fakultě strojního inženýrství Vysokého učení technického v Brně byl vyvinut nový unikátní koherenci řízený digitální holografický mikroskop. Nedílnou součástí tohoto systému je počítačové zpracování hologramu a následné zpracování obrazu navázané fáze. Tento mikroskop nachází uplatnění v biologii ke sledování živých buněk neinvazivním způsobem. Studium buněk je založeno na extrakci morfologických a fázových parametrů buňky. Deformace fázového obrazu nedovoluje buňky analyzovat. Tato deformace může být důsledkem optických aberací komponent mikroskopu, nepřesnosti sestavení komplikovaného optického systému, ale i samotného předmětu pozorování. V dlouhodobých experimentech zaměřených na pozorování života buňky, jejichž délka se v některých případech počítá až na dny, dochází ke změně deformace vlivem nestability mikroskopu a podmínek měření. Ve většině vědeckých publikací, které se zabývají kompenzací deformace, je korekce fázového obrazu řešena matematicky v rámci zpracování obrazu po dokončení experimentu. Kompenzační metody v těchto publikacích požadují ruční nastavení nebo používají kompletní sérii fázových obrázků. Tyto metody nesplňují požadavky, které jsou kladeny na nově vyvíjený holografický mikroskop, tj. automatické zpracování fázových obrazů k pozorování živých buněk v reálném čase. Tyto skutečnosti byly impulzem pro vytvoření nového algoritmu, který by řešil kompenzaci deformace fázových obrazů automaticky a zároveň online v režimu časosběrného snímání. Aby bylo možné řídit probíhající experiment na základě změn parametrů charakterizujících nitro-buněčnou aktivitu buňky, byla do algoritmu zakomponována automatická segmentace buněk.

Další část dizertační práce se zabývá zpracováním dat rentgenové počítačové tomografie, s kterou jsem se seznámil v rámci studijní stáže na Queen Mary University of London. Počítačová tomografie s vysokým rozlišením je stále více používanou technikou pro 3D studium mikroarchitektury kostí a pro kvantifikaci objemového podílu kosti. Tato zobrazovací technika má zjevné uplatnění pro studium kostní struktury a změn při osteoporóze nebo osteoartritidě. Naším hlavním úkolem bylo provést rentgenovou počítačovou tomografii a následnou analýzu krysích kostí. Výsledky analýzy byly součástí projektu zkoumajícího vliv různých léčiv na růst kostí. Zkoumání těchto vlivů bylo zaměřeno na mikrostrukturu krysí stehenní kosti v oblasti distální metafýzy, která podstupuje nejdrastičtější remodelační změny. Zcela nově byla požadována analýza mikrostruktury také v oblasti epifýzy kosti, která je v literatuře často opomíjena. Základním principem remodelačního mechanismu dlouhé kosti je formování nebo resorpce povrchu kosti, kterým se udržuje proporcionální tvar dlouhé kosti. Tento jev lze pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie s omezením jen na vybrané 2D mechanicky upravené řezy. Velký potenciál pro měření morfologických rozdílů kortikální kosti byl shledán právě v použití nedestruk-

tivně získaných tomografických dat. Proto byla vyvinuta nová metoda měření vzdáleností vnitřního a vnějšího povrchu kosti, na kterých by následně bylo možné pozorovat morfologické rozdíly napříč experimentálními skupinami. V rámci této metody byla zároveň vyřešena interpretace výsledků a standardizace kostí v tomografických datech. Dále jsme se v této práci zaměřili na hodnocení struktury cévních kanálků kortikální kosti. Pro tento účel byly vybrané segmenty kostí naměřeny s lepším voxelovým rozlišením než původní CT data kostí.

**Část I**

**Digitální holografická mikroskopie**



## 2. Holografický mikroskop

Tyto mikroskopy lze rozdělit do dvou základních skupin dle úhlu, který svírá předmětový a referenční svazek ve výstupní rovině interferometru [1].

*In-line (Interferometrické mikroskopy)*

Předmětový a referenční svazek svírají v detekční rovině téměř nulový úhel. Zaznamenává se interferogram vzniklý interferencí předmětového a referenčního svazku. K získání úplné informace o předmětové vlně (amplituda a fáze) je nutné zaznamenat nejméně tři interferogramy s definovaným fázovým posunem, který vzniká řízenou změnou fáze v referenční větvi (phase-shifting). Čas snímání série interferogramů znemožňuje pozorovat rychlé děje.

*Off-axis (Holografické mikroskopy)*

Svazky dopadají do roviny detekce pod nenulovým úhlem (mimoosová holografie). Tato technika umožňuje z jediného snímku (hologramu) vypočítat amplitudu a fázi. Tento typ mikroskopu je vhodný pro pozorování dynamických procesů buněk. V literatuře se uvádí zkratka DHM (Digitální holografický mikroskop).

V ÚFI FSI VUT v Brně byl vyvinut nový holografický mikroskop patřící do skupiny off-axis, který umožňuje využít plošného nekoherentního zdroje osvětlení [1]. V následující sekci je tento mikroskop popsán spolu se základním principem rekonstrukce fázového obrazu.

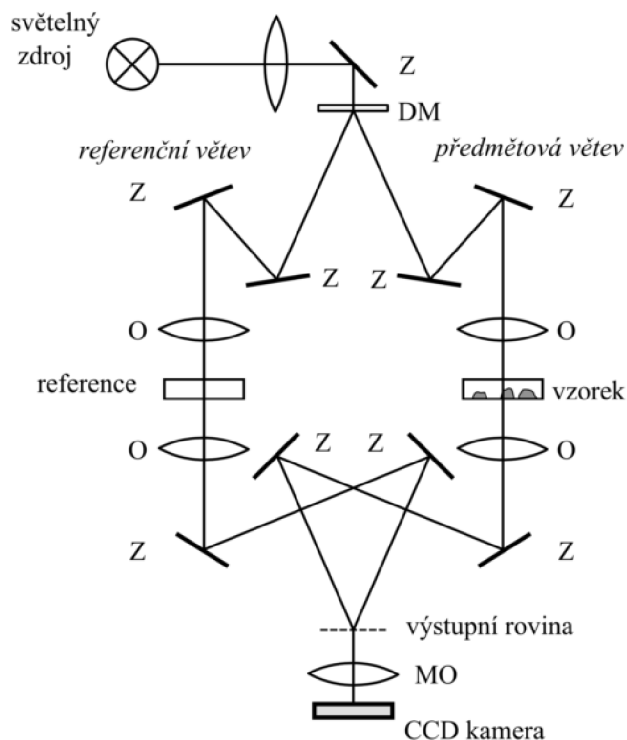
### 2.1. Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM)

### 2.2. Optické schéma

Základní architekturou tohoto mikroskopu je Mach-Zehnderův interferometr, který je upravený pro achromatickou mimoosovou holografii (pro každou vlnovou délku vznikne hologram o stejné frekvenci proužků), čehož je docíleno použitím difrakční mřížky jako děliče svazku [2]. Optický systém CCHM se skládá ze dvou opticky totožných větví (viz obr. 2.1). Rozdíl optických drah zaznamenaný v hologramu je tak v ideálním případě způsoben pouze průchodem světla vzorkem. Jedna z větví je nazvána předmětová větev, protože světelný svazek prochází pozorovaným vzorkem (komůrka s buňkami naplněná médiem) a druhá referenční větev, kde svazek prochází pouze referenčním objektem (obvykle komůrka s médiem bez buněk). Světelný svazek je do větví dělen fázovou difrakční mřížkou (DM), na níž svazek difraktuje a zrcátka je vybrán +1 a -1 řád pro referenční a předmětovou větev. Dráha světelného svazku je modifikována až do výstupní roviny systémem zrcátek. Každá větev obsahuje dva shodné mikroskopové objektivy (O) z nichž jeden plní funkci kondenzoru (tj. osvětluje pozorovaný předmět rovnoměrně) a druhý objektiv zobrazuje předmět do výstupní roviny, kde se oba svazky protínají a interferují. Tento výstup (hologram) je zvětšen výstupním objektivem a snímán CCD kamerou. V takto navrženém optickém systému lze použít zdroj s nízkou časovou koherencí (více vlnových délek) a nízkou prostorovou koherencí (plošný zdroj, nikoliv bodový). Zdrojem světla je obvykle halogenová lampa. Osvětlovací soustava je navržena na principu Köhlerova osvětlení. Toho je docíleno osvětlovací čočkou, která zdroj zobrazuje do předmětové ohniskové roviny obou kondenzorů a tím je zajištěno rovnoměrné osvětlení předmětu. Na rozdíl od konvenčních DHM mikroskopů tento mikroskop poskytuje velkou kvalitu zobrazování,

### 2.3. ZPRACOVÁNÍ HOLOGRAMU

lepší laterální rozlišení a optické řezy. Požadavek jediného hologramu pro holografickou rekonstrukci umožňuje pozorování v reálném čase. V tuto chvíli již existuje nová generace tohoto mikroskopu [3], která umožňuje použití plně prostorově nekoherentního světelného zdroje, redukuje počet objektivů a zvětšuje pracovní prostor mikroskopu.



Obrázek 2.1: Schéma optické soustavy CCHM. DM - difrakční mřížka, Z - zrcátko, O - objektiv, MO-výstupní objektiv.

## 2.3. Zpracování hologramu

Mimoosová holografie je technika poskytující úplné informace o předmětové vlně, lze tedy zrekonstruovat amplitudový a fázový obraz z jediného hologramu. Princip rekonstrukce je založen na separaci nosné frekvence z frekvenčního spektra hologramu [4]. Zaznamenaný hologram je převeden pomocí diskrétní rychlé Fourierovy transformace na spektrum prostorových frekvencí. Spektrum předmětové vlny je od středu posunuto o tzv. nosnou frekvenci. Dostatečně velká oblast okolo nosné frekvence je odseparována a pomocí dvou-rozměrné inverzní Fourierovy transformace (IFFT) je převedena na komplexní amplitudu. Matematický aparát rekonstrukce zobrazení je popsán v [5].

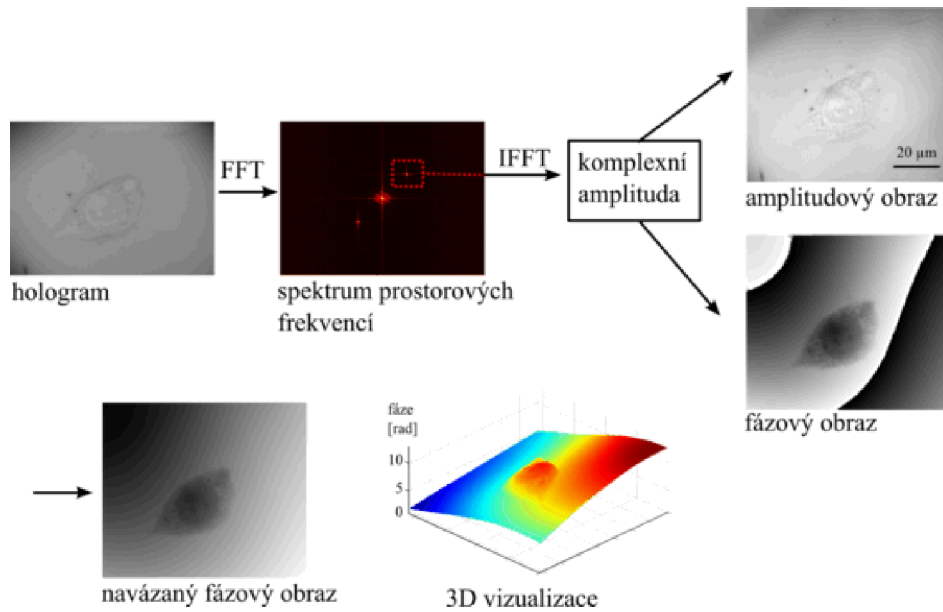
Z komplexní amplitudy je vypočítána amplituda (modul) a fáze (argument). Rekonstruovaná fáze je zaznamenána do dvourozměrného pole reálných čísel, které může být interpretováno jako fázový obraz.

Fáze nabývá hodnot v rozsahu  $(-\pi, \pi]$ , což se v případě větších změn fáze ve vzorku projeví v obraze ostrými skoky. Pro dosažení spojitého průběhu fáze je na obraz aplikován navazovací algoritmus založený na metodě nejmenších čtverců v blocích (BLS) [6]



## 2. HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

nebo algoritmus vycházející z Goldstein's Branch cuts metody [7]. Schéma zpracování je znázorněno na obr. 2.2.



Obrázek 2.2: Schéma zpracování hologramu.



## 3. Fázové zobrazení

Transmisní digitální holografická mikroskopie je široce používaný nástroj pro studium a analýzu chování živých buněk v reálném čase prostřednictvím kvantitativního fázového zobrazení (QPI) [8, 9]. Předností této techniky je pozorování buněk bez toxického efektu na jejich život.

Kvantitativní fázové obrazy mohou být interpretovány jako distribuce suché hmoty buněk (proteiny, cukry, tuky). Pozorování a měření dynamiky suché hmoty umožňují přístup k rozhodujícím informacím pro výzkum nitrobuněčných procesů. Tyto procesy jsou vyhodnocovány z časosběrné série fázových obrazů například použitím fázových parametrů [10], metody dynamických fázových rozdílů [11] nebo analýzou retrakce-protruze [12].

Fázové obrazy jsou reprezentací fázových rozdílů mezi dvěma svazky (tj. objektovým a referenčním svazkem). Teoreticky by měly být fázové rozdíly rovny nule s výjimkou fázových rozdílů představujících pozorované objekty (buňky). V reálném systému je fázový obraz poškozen deformací fáze vznikající nepřesností optického systému, aberací optických elementů nebo průchodem světla skrze dvě separované optické cesty, které se mohou odlišovat například vlivem odchytky teploty či proudění vzduchu. Deformace fáze se v obraze projeví jako zakřivené pozadí, které znemožňuje korektní manipulaci s obrazem či sledování buňky. Kromě toho se deformace fáze mění během dlouhodobého experimentu, což je důsledkem dlouhodobé nestability dvousvazkového interferenčního mikroskopu. Za příčiny fluktuace pozadí lze také považovat kontaminaci média buněčnými procesy v komoře předmětové větve, změnu podmínek prostředí (teplota, vlhkost), rozladění justážních prvků mikroskopu vlivem otřesů. Pro kvantifikaci fázových rozdílů souvisejících s buňkou je nutné deformace pozadí eliminovat.

Studium chování buňky je založeno na extrakci dynamických dat buňky z časosběrné série fázových obrazů. Data mohou obsahovat těžiště buňky, buněčnou hmotu, fázové a morfometrické parametry.

Ačkoliv tato data mohou být počítána v rámci zpracování obrazu po ukončení experimentu, je výhodnější počítat je v průběhu snímání. Díky tomu lze průběh experimentu ovlivňovat a řídit; např. úpravou snímací frekvence na základě pohybu nebo změny tvaru buňky, posunováním stolku nebo v případě buněk kultivovaných v průtokových komůrkách je možné měnit médium ve specifickém stádiu jejího života.

### 3.1. Experimentální stanovení vývoje deformace fáze

Cílem tohoto experimentu bylo stanovit změnu deformace fáze během dlouhodobého měření a ověřit možnou závislost na měřitelných veličinách jako jsou teplota a vlhkost vzduchu.

Měření bylo realizováno na mikroskopu CCHM v místnosti klimatizované na pokojovou teplotu. Měření probíhalo od 13:55 do 11:25 následujícího dne (21,5 hodin). Snímky byly pořizovány po 5 min a současně v těchto intervalech byla měřena teplota a vlhkost vzduchu v okolí mikroskopu. Světlo z prostorově koherentního zdroje (bodový zdroj) procházející vzorkem a objektivy 10x/0,25 interferovalo ve výstupní rovině, pak bylo 4x zvětšeno výstupním objektivem do roviny čipu kamery. Hologramy byly zpracovány dle postupu popsaného v sekci 2.3. Do referenční i předmětové větve byly vloženy komůrky

### 3.1. EXPERIMENTÁLNÍ STANOVENÍ VÝVOJE DEFORMACE FÁZE

s médii, aby byly simulovány podmínky nejbližší skutečnému měření buněk. Buňky mohou vylučováním různých látek měnit index lomu média a také ovlivňovat deformace fáze. Tento vliv je považován za nevýznamný v porovnání s optickými aberacemi. Proto jsme upřednostnili udržovat zorné pole bez buněk, aby všechny hodnoty obrazu mohly být využity ke studiu deformace.

Pro účely sledování vývoje je deformace kvantifikována pomocí matematického předpisu polynomu dvou proměnných  $n$ -tého stupně:

$$P(x, y) = \sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m a_{ij} x^i y^j$$

Tato funkce je prokládána metodou nejmenších čtverců (MNČ) všemi hodnotami fázového obrazu. Experimentálně bylo ověřeno, že deformace fáze jsou nejpřesněji aproximovány polynomem 3. stupně (tzv. bikubickou plochou).

$$P_3(x, y) = a_{00} + a_{10}x + a_{01}y + a_{20}x^2 + a_{11}xy + a_{02}y^2 + a_{30}x^3 + a_{21}x^2y + a_{12}xy^2 + a_{03}y^3 \quad (3.1)$$

Polynom byl proložen na každém fázovém obrazu z časosběrné série. Hodnoty vybraných koeficientů polynomu jsou vyneseny v časové závislosti do grafu. Grafy koeficientů  $a_{00}$  a  $a_{01}$  jsou zobrazeny na obrázku 3.1 a obrázku 3.2). Průběhy hodnot těchto koeficientů ukazují určitý trend, který dokazuje, že se během experimentu deformace výrazně mění.

Graf koeficientu  $a_{00}$  nazývaného také absolutní člen polynomu obsahuje v blízkosti 3. hodiny skok o hodnotu  $2\pi$ , který je způsoben navazovacím algoritmem BLS a posunem fázových skoků ve fázovém obraze. BLS metoda využívá postup, při němž se fázový obraz rozdělí na mřížku malých čtvercových bloků tak, aby každý blok obsahoval jen jeden skok o  $2\pi$ . Skok v každém bloku zvlášť je odstraněn jednoduchým globálním algoritmem [13] a takto upravené bloky jsou spojovány metodou nejmenších čtverců. Spojování probíhá tak, že hodnoty prvního bloku jsou ponechány v původním stavu a každý další blok je připojován pomocí MNČ. To znamená, že jestliže se v prvním bloku objeví skok, budou navázané hodnoty posunuty o konstantu  $c$ . Výsledkem navazovacího algoritmu je množina funkcí  $\Phi(x, y) + c$ , tzn. dva sousedící obrazy fáze se mohou po navázání lišit o konstantu.

Pro ověření závislosti vývoje deformace na teplotě nebo vlhkosti byl graf koeficientu  $a_{00}$  upraven do spojitého tvaru. Vizuální kontrolou vývoje koeficientu  $a_{00}$  s vývojem vlhkosti byl zjištěn podobný klesající trend, který má shodný nárůst hodnot v intervalech  $[0, 1]$  hod a  $[20, 21]$  hod. Pro určení závislosti mezi oběma veličinami je použit Pearsonův koeficient korelace  $r_p$ . Vypočítaný koeficient  $r_p = 0.57$  vypovídá, že mezi vlhkostí a koeficientem  $a_{00}$  existuje pozitivní vztah <sup>1</sup>. Rozhodnutí, zda je vypočítaný koeficient korelace vysoký, získáme testováním jeho statistické významnosti [14]. Nejdříve je formulována nulová  $H_0$  a alternativní hypotéza  $H_A$ .

$H_0$ : ( $r_p = 0$ ) Vypočítaná hodnota koeficientu korelace nevypovídá o závislosti mezi oběma proměnnými.

$H_A$ : ( $r_p \neq 0$ ) Vypočítaná hodnota koeficientu korelace vypovídá o vztahu mezi oběma proměnnými.

---

<sup>1</sup>Pearsonův koeficient korelace může nabývat hodnot z intervalu od -1 do +1. Hodnota 0 vypovídá o statistické nezávislosti, naopak hodnota +1 (resp. -1) vypovídá o naprosté funkční závislosti proměnných.

### 3. FÁZOVÉ ZOBRAZENÍ

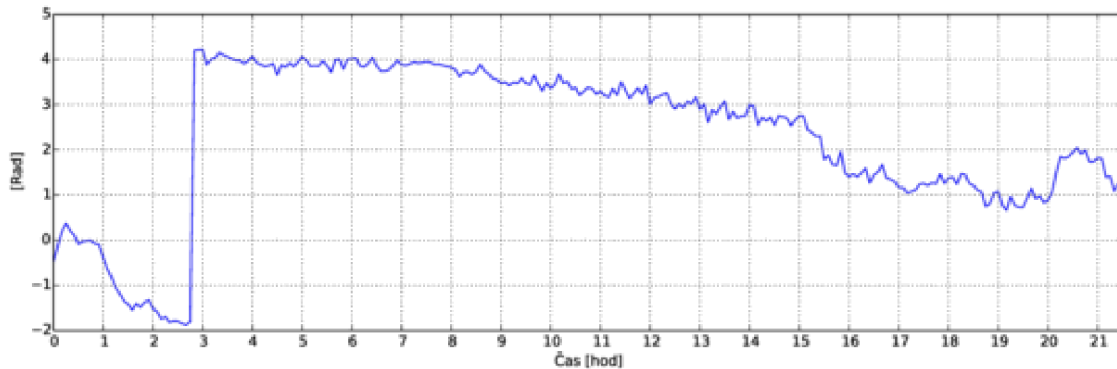
K ověření statistické významnosti korelačního koeficientu je nejčastěji použito testovacího kritéria  $t$ , které je dáno vztahem

$$t = \frac{r_p}{\sqrt{1 - r_p^2}} \sqrt{n - 2}, \quad (3.2)$$

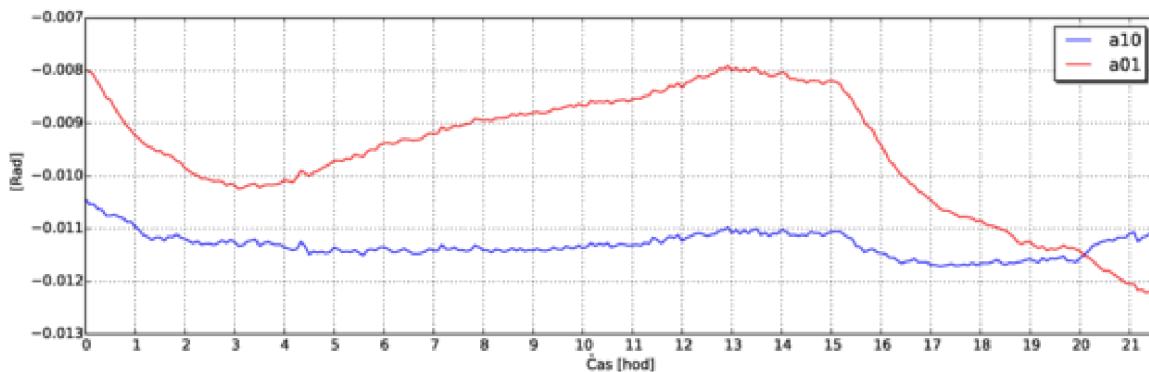
kde  $r_p$  je koeficient korelace a  $n$  je počet srovnaných dvojic hodnot. V našem případě vychází

$$t = \frac{0,57}{\sqrt{1 - 0,57^2}} \sqrt{259 - 2} = 11,308.$$

Vypočítaná hodnota testovacího kritéria je srovnána s kritickou hodnotou. Pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  a  $f = n - 2$  stupňů volnosti lze ve statistických tabulkách nalézt kritickou hodnotu  $t_{0,05}(257) = 1,970$ . Protože vypočítaná hodnota  $t = 11,308$  je větší než hodnota kritická, odmítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu. Vypočítaný koeficient korelace tedy vypovídá o statisticky významné závislosti mezi vlhkostí a koeficientem  $a_{00}$ .

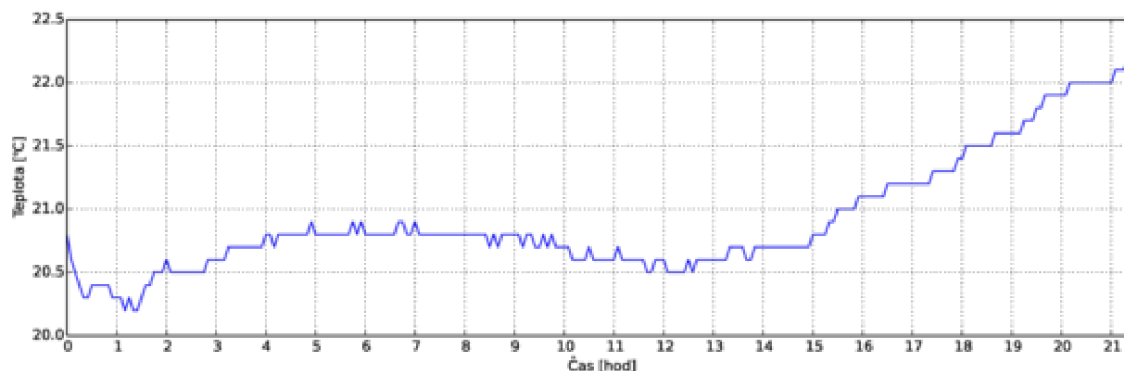


Obrázek 3.1: Graf časové závislosti absolutního členu  $a_{00}$ , který byl upraven pro získání spojitého průběhu.

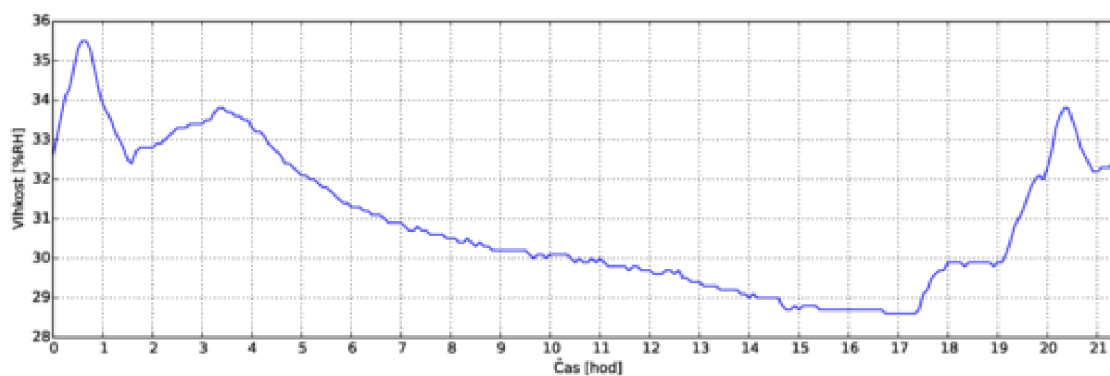


Obrázek 3.2: Graf časové závislosti členů prvních mocnin polynomu.

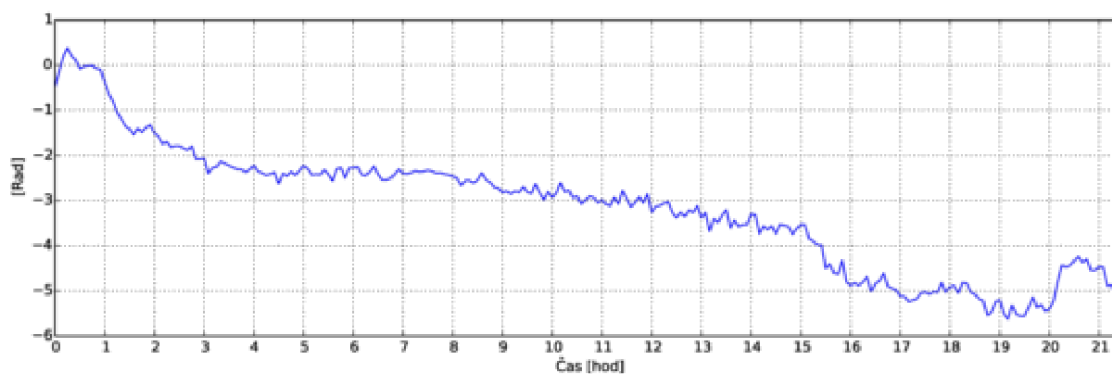
### 3.2. KOMPENZAČNÍ METODY



Obrázek 3.3: Graf časové závislosti teploty.



Obrázek 3.4: Graf časové závislosti vlhkosti.



Obrázek 3.5: Graf časové závislosti absolutního členu polynomu  $a_{00}$ .

## 3.2. Kompenzační metody

Mnoho prací se již zabývalo odstraněním deformace fáze. V literatuře je lze nalézt pod klíčovými slovy kompenzace fázových aberací v holografickém mikroskopu. Kompenzační metody lze kategorizovat do dvou skupin: fyzická a numerická. Fyzické metody [15, 16, 17] jsou založeny na zavedení obdobné deformace fáze do referenční větve pomocí ekvivalentní čočky jako v objektové větvi nebo čočky s nastavitelnou polohou. Avšak tyto metody vyžadují velice přesné uspořádání všech optických prvků a přesné sladění deformace mezi

objektovou a referenční větví, čehož je obtížné dosáhnout. Numerické metody odstraňují deformaci fáze v rámci zpracování hologramu. Ferraro [18] navrhl použít referenční hologram, který je nasnímán bez zkoumaného objektu a je následně použit ke korekci hologramu objektu pozorování. V případě změny deformace během dlouhodobých měření nelze referenční hologram použít pro kompenzaci celé série hologramů. Cuche [19] představil koncept digitální fázové masky (DPM). Tato metoda požaduje nastavení množiny rekonstrukčních parametrů (složek vlnového vektoru, ohniskové vzdálenosti, pozice optických komponent). Proces nastavování parametrů byl automatizován použitím fázových hodnot extrahovaných podél manuálně kreslené čáry [20]. Colomb [21] zavádí koncept numerického parametrického objektivu (NPL) umístěného v rovině hologramu. Tvar NPL je definován předpisem standardního nebo Zernikova polynomu. Parametry polynomu jsou vypočítány pomocí fitovacích technik aplikovaných na oblasti mimo buňky. Tyto techniky požadují manuální zásah, velice přesnou definici rekonstrukčních parametrů, znalosti optického systému a vzorku, a jsou proto obtížně aplikovatelné pro automatické hromadné zpracování obrazů celé časosběrné řady. Další metody pracují pouze s jediným hologramem. Jsou založeny na použití analýzy hlavních komponent [22], metody nejmenších čtverců [23], nebo profilu čáry v rekonstruované fázi [24]. Tyto numerické přístupy předpokládají pouze aberace způsobené mikroskopovým objektivem (poskytující zvětšení obrazu objektu) nebo tenké transparentní objekty, jejichž fázové fluktuace jsou tak malé, že mohou být považovány za odchylku deformace fáze. Tyto metody umožňují proces kompenzace plně automatizovat, nepotřebují žádné znalosti optického systému, ale zanechávají ve fázovém obraze reziduální chyby, které překážejí přesnému měření QPI [25]. Pro kompletní kompenzaci aberace fáze byl popsán přístup využívající všech fázových obrazů série. Nejdříve je použita kompenzační metoda spočívající ve fitování pozadí fáze bikubickou [26] nebo bikvadratickou [27] plochou a následně je odečten obraz rekonstruovaný ze všech kompenzovaných fázových obrazů série. Nevýhodou této metody je použití kompletní množiny obrázků časosběrné série. Dále je požadováno, aby buňky v obrazech migrovaly tak, že každá oblast obrázku zůstane nepokrytá buňkou. Za účelem řízení experimentu na základě měření QPI je důležité, aby byl fázový obraz korigován ihned po nasnímání a tento proces byl proveden automaticky.

### 3.3. Cíle práce

Cílem práce je navrhnout nový algoritmus pro zpracování navázaných fázových obrazů. Algoritmus musí kompenzovat deformace ihned po získání obrazu, aby bylo možné s obrazy okamžitě manipulovat. Dále musí pracovat automaticky v režimu časového sekvenčního snímání. Kompenzační procedura musí odstranit kompletní deformace fáze a zároveň vzít v úvahu přítomnost buněk v obraze. Tato procedura by měla být nezávislá na volbě objektivů mikroskopu a také by měla řešit možný posun fázových hodnot kvůli navazovacímu algoritmu. Kompenzační nástroj se musí adaptovat pro každý obraz série, kvůli vývoji deformace v obrazech fáze během dlouhodobého snímání. Po aplikaci kompenzační metody by algoritmus měl v obraze automaticky identifikovat a segmentovat buňku zvolenou uživatelem na začátku experimentu. Tato vlastnost algoritmu umožní uživateli pozorovat změny buňky během experimentu a zasáhnout do experimentu.





## 4. Princip dynamického zpracování fázových obrazů

Vstupními daty pro algoritmus jsou navázané fázové obrazy, které značíme symbolem  $\Phi_n$ , kde  $n$  znamená index konkrétního obrazu v časosběrné sérii. Algoritmus je složen ze zpracování prvního fázového obrazu  $\Phi_0$  a zpracování následných fázových obrazů  $\Phi_n$  (dynamické zpracování). Zpracování prvního fázového obrazu vyžaduje asistenci lidského operátora a následující obrazy jsou zpracovávány automaticky. První fázový obraz tak může být označen jako referenční obraz, na kterém proběhne nastavení parametrů pro automatické zpracování. Nastavení parametrů probíhá ještě před spuštěním časosběrného snímání, samotný fázový obraz nemusí být zařazen do výsledné série fázových obrazů. Podmínkou použití algoritmu je, aby buňky nepokrývaly celé zorné pole a nebuněčné oblasti byly distribuovány rovnoměrně po celém zorném poli. V optimálním případě by buňky neměly okupovat více než polovinu zorného pole [26]. Dále se předpokládá, že změny deformace pozadí obrazu, změny tvaru buněk a pohyb buněk mezi sousedícími fázovými obrazy v časosběrné sérii nejsou významné.

### 4.1. Stručný popis algoritmu

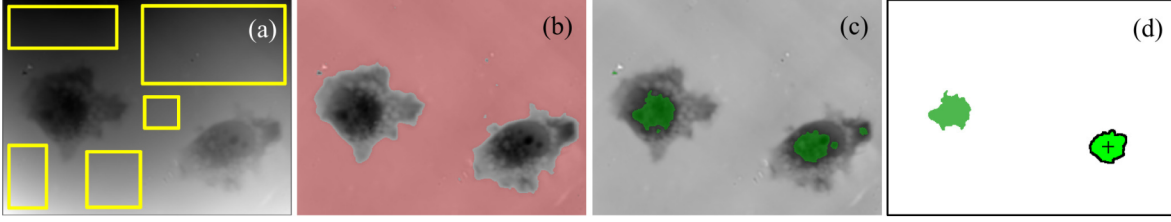
Procedura kompenzující deformace je založena na odečítání plochy, která popisuje tvar deformace fázového obrazu. Tato plocha je určena z hodnot nebuněčných oblastí. V prvním obraze jsou tyto oblasti specifikovány manuálně operátorem. V ostatních obrazech série jsou vymaskovány pomocí fuzzy prahování. Aby bylo možné proces prahování aplikovat, je nutné alespoň částečně eliminovat deformaci. Toto je provedeno odečtením plochy popisující deformace fáze v předchozím fázovém obraze. Tento krok je podmíněn dostatečně častým snímáním, aby se mezi sousedními snímkami deformace podstatně nezměnila. Procedura sledování buněk je založena na identifikaci jádra buňky s pomocí těžiště jádra v předchozím fázovém obraze. Důvod pro asociaci buněk prostřednictvím jader je, že jádra reprezentují největší fázové rozdíly a jsou jednoznačně separovatelná od pozadí. Tvar jádra je kompaktnější oproti tělu buňky. Tento postup zaručuje, že těžiště bude vždy přibližně v centru buňky a tento bod spolehlivě identifikuje příslušné jádro v následujícím obraze.

### 4.2. Zpracování prvního fázového obrazu

Celkem čtyři zásahy operátora jsou potřebné k nastavení parametrů pro automatický běh algoritmu: vybrat nebuněčné oblasti, vybrat sledovanou buňku, stanovit vhodné hodnoty pro prahování buněk a také jader). Prvním úkolem operátora je vyznačit v obraze nebuněčné oblasti pro kompenzace deformace pozadí obrazu [28]. Hodnotami těchto oblastí je proložena plocha pomocí metody nejmenších čtverců (MNČ). Experimentálně bylo ověřeno, že vhodnou plochou aproximující deformace pozadí obrazu je polynomiální funkce dvou proměnných řádu menšího nebo rovného 3 [26]. Kompenzační plocha  $P_0$  (pole stejných rozměrů jako fázový obraz) je vygenerována z předpisu polynomiální funkce a následně odečtena od fázového obrazu  $\Phi_0$ . Výsledkem je kompenzovaný fázový obraz

#### 4.2. ZPRACOVÁNÍ PRVNÍHO FÁZOVÉHO OBRAZU

$\Phi_{comp0}$ . Tento obraz je dále použit k určení parametrů pro automatické zpracování následných fázových obrazů.

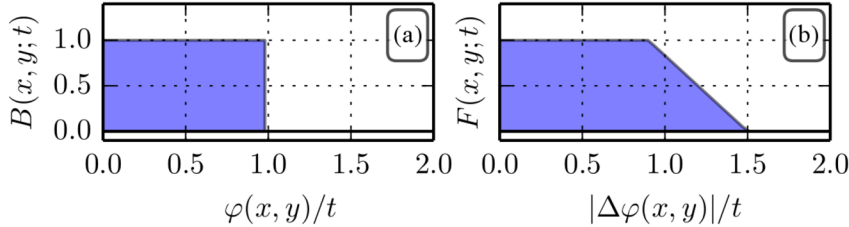


Obrázek 4.1: Ilustrace zpracování prvního fázového obrazu. (a) Navázaný fázový obraz s vybranými bezbuněčnými oblastmi, (b) kompenzovaný fázový obraz společně s maskou pozadí (červeně), (c) kompenzovaný fázový obraz společně s maskou jader (zeleně), (d) vybrané jádro sledované buňky po segmentaci masky jader.

Prvním parametrem je konstanta  $c$ , s pomocí které je počítán práh  $t_{CELL\ n}$  pro každý fázový obraz. Tento práh je použit pro maskování nebuněčné oblasti (pozadí) obrazu. Pro tyto účely byla použita fuzzy maska, kterou je klasifikováno, zda bod fázového obrazu patří do nebuněčné oblasti. Koncept fuzzy masky  $F(x, y; t)$  je rozšíření binární masky.

$$F(x, y; t) = \begin{cases} 1 & \text{if } |\Delta\varphi(x, y)| < 0,9t \\ 0 & \text{if } |\Delta\varphi(x, y)| > 1,5t \\ -\frac{|\Delta\varphi(x, y)| - 1,5t}{0,6t} & \text{jinak,} \end{cases} \quad (4.1)$$

kde  $\Delta\varphi(x, y) = \varphi(x, y) - \mu$  a  $\varphi(x, y)$  je fázová hodnota v bodě  $(x, y)$  a  $\mu$  je průměrná hodnota fáze z hodnot nebuněčné oblasti. Parametry 0,9 a 1,5 byly empiricky určeny na základě experimentů s buňkami. Průběh funkce je zobrazen na obrázku 4.2(b).



Obrázek 4.2: Prahovací funkce (a) binární, (b) fuzzy.

Hodnota prahu je počítána právě pomocí zmíněné konstanty  $c$  výrazem

$$t_{CELL\ 0} = c\sigma, \quad (4.2)$$

kde  $\sigma$  je standardní odchylka fázových hodnot obrazu  $\Phi_{comp0}$  z oblastí vybraných operátorem. Konstantou  $c$  se hodnota prahu dostane nad úroveň šumu pozadí. Tím se zaručí spolehlivá segmentace pozadí od buněk. Cílem je nastavit takovou konstantu  $c$ , aby vygenerovaná maska pozadí  $M_{BG0} = F(x, y; t_{CELL0})$  specifikovala nebuněčné oblasti ve fázovém obraze. Samotná maska může operátorovi pomoci nastavit konstantu. Pro tento účel je maska zobrazena jako barevná transparentní hladina současně s kompenzovaným fázovým obrazem  $\Phi_{comp0}$ . Výraz 4.2 je dále použit pro výpočet prahu  $t_{CELL\ n}$  v dalších fázových obrazech.

#### 4. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

Dalším neznámým parametrem je hodnota prahu  $t_{NUCL}$ . Pomocí této hodnoty se maskují jádra buněk ve všech fázových obrazech. K maskování jader je použita binární maska (Obr. 4.2(a))

$$B(x, y; t) = \begin{cases} 1 & \text{if } \varphi(x, y) > t \\ 0 & \text{else;} \end{cases} \quad (4.3)$$

kde  $\varphi(x, y)$  je hodnota fáze kompenzovaného obrazu v bodě  $(x, y)$ . Maska jader je vytvořena pomocí  $t_{NUCL}$  na obrazu  $\Phi_{comp0}$ . Maska jader může být stejně jako maska pozadí zobrazena společně s kompenzovaným fázovým obrazem a použita pro hledání vhodné hodnoty prahu. Tato hodnota musí být nastavena tak, aby specifikovala oblasti odpovídající jádrům buněk.

Posledním úkolem operátora je výběr pozorované buňky. Aby mohla být dynamika chování buněk monitorována, je nutné sledovat jednotlivé buňky skrze celou sérii obrázků. To umožňuje případné řízení experimentu na základě změn buněčných charakteristik počítaných během experimentu. Výběr pozorované buňky je proveden v masce jader  $M_{NUCL0}$ , která byla vygenerována v předchozím kroku. Oblasti reprezentující jádra jsou před výběrem segmentovány využitím In-place algoritmu [29]. Segmentační algoritmus označí každou spojitou oblast unikátním celým číslem, tzn. všem bodům jedné spojitě oblasti je přiřazena stejná hodnota. Po této segmentaci je pro každou oblast spočítána plocha, což v tomto případě představuje počet bodů se stejným celým číslem. Oblasti s menší plochou, než určitý limit (minimální standardní velikost buňky), jsou označeny jako nebuněčné oblasti, šum nebo část pozadí. Tyto oblasti jsou z masky odstraněny tak, že se jim přiřadí nulové hodnoty. V takto upravené masce vybírá operátor oblast představující jádro pozorované buňky. Po výběru se nakonec spočítá těžiště  $cg_0$  vybrané oblasti, které identifikuje buňku v následujícím obraze.

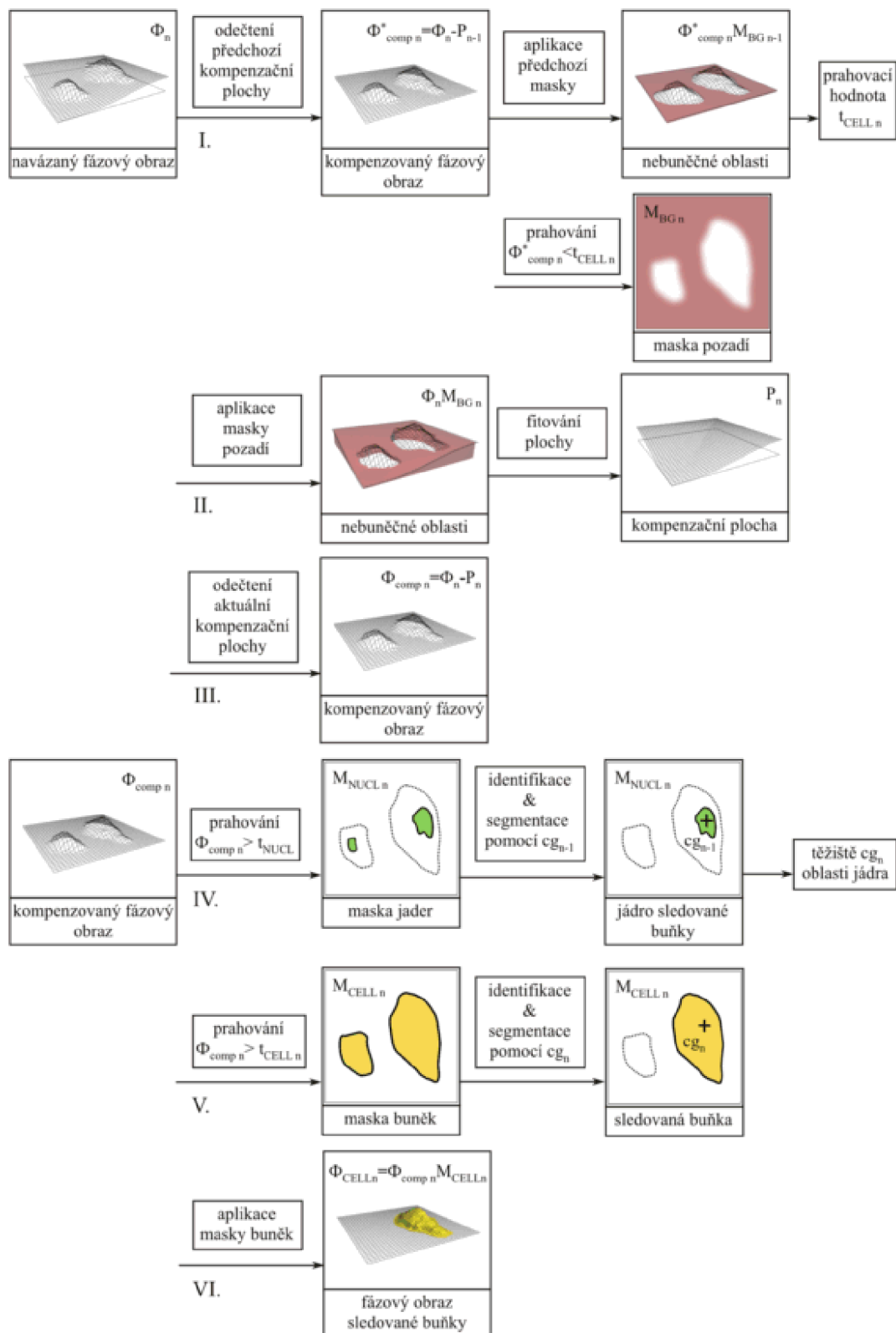
### 4.3. Dynamické zpracování dalších fázových obrazů

Zpracování všech následujících fázových obrazů pokračuje v automatickém režimu podle algoritmu, který je zobrazen na schématu (Obr. 4.3) pro  $n$ -tý navázaný fázový obraz ze série. Tento algoritmus je v této kapitole popsán pro zpracování druhého fázového obrazu  $\Phi_1$ . Pro zpracování tohoto obrazu jsou použity hodnoty  $M_{BG0}$ ,  $c$ ,  $t_{NUCL}$ ,  $cg_0$  vygenerované v prvním fázovém obraze. Algoritmus zpracování druhého fázového obrazu koresponduje se schématem (Obr. 4.3) pro index  $n = 1$ .

## I. Maskování nebuněčných oblastí

Nebuněčné oblasti jsou specifikovány pomocí fuzzy masky. Aby bylo možné použít prahování pro vytvoření masky, je nutné nejdříve eliminovat deformace pozadí v obraze. Pro tento účel je použita kompenzační plocha  $P_0$  vygenerovaná pro kompenzaci deformace pozadí předchozího obrazu. Kompenzovaný fázový obraz  $\Phi_{comp1}^*$  je vytvořen odečtením plochy  $P_0$  od původního obrazu navázané fáze  $\Phi_1$ . V tomto kroku se předpokládá, že změny v deformaci mezi sousedními fázovými obrazy nejsou významné. Potom je počítána nová hodnota prahu  $t_{CELL1}$  ze všech bodů  $\Phi_{comp1}^*$ , ve kterých je maska  $M_{BG0}$  rovna 1. Použitím masky  $M_{BG0}$  se předpokládá, že změny tvaru buňky nebo pohyb buněk není mezi sousedními obrazy tak velký, že by maska identifikovala podstatnou část buněk jako

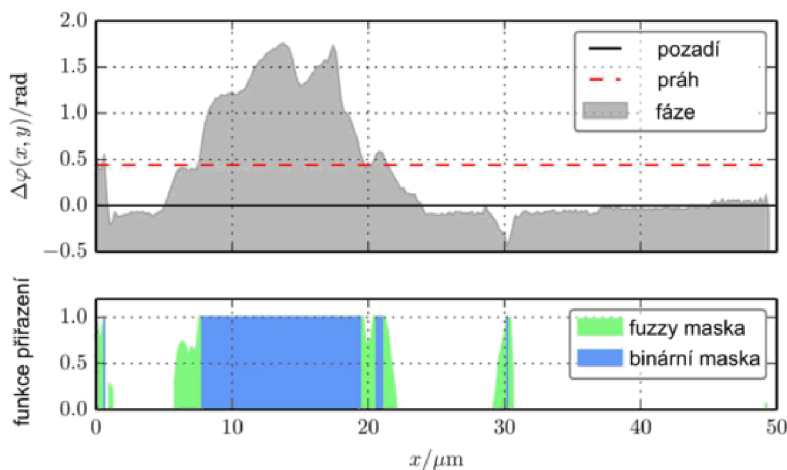
### 4.3. DYNAMICKÉ ZPRACOVÁNÍ DALŠÍCH FÁZOVÝCH OBRAZŮ



Obrázek 4.3: Schéma dynamického zpracování  $n$ -tého navázaného fázového obrazu. Index  $n - 1$  značí obraz vytvořený pro zpracování předchozího fázového obrazu série.  $\Phi_{comp\ n}$  značí fázový obraz kompenzovaný plochou popisující deformace předchozího obrazu.

#### 4. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

nebuněčné oblasti. Špatná identifikace buněk by měla dopad na hodnotu prahu. Hodnota  $t_{CELL1}$  je použita pro fuzzy prahování kompenzovaného fázového obrazu  $\Phi_{comp1}^*$  podle výrazu (4.1). Výstupem prahování je nová maska  $M_{BG1}$ , která specifikuje nebuněčné oblasti v obraze  $\Phi_1$ . Oba předpoklady malých změn mezi sousedními obrazy mohou být do praxe implementovány prostřednictvím vhodné frekvence snímání mikroskopu. Důvodem k zavedení fuzzy masky bylo snížení citlivosti výsledku na výpočet prahu. Jak je zobrazeno na obrázku 4.4, krajní části buňky mohou být velmi tenké. Vzhledem k tomu, že pozadí není perfektně rovinné, a to ani po eliminaci deformace snižování prahu mezi buňkou a pozadím, vede prahování k nesprávné klasifikaci velké části pozadí jako buněčné oblasti. S pomocí fuzzy masky je možné použít bezpečnou hodnotu prahu a nastavit jen nižší fuzzy práh. Je-li část pozadí identifikována jako buňka, tímto způsobem dostanou odpovídající body nízkou hodnotu přiřazení k buňce, takže toto špatné chování nebude mít silný efekt na výpočet kompenzační plochy.



Obrázek 4.4: Profil buňky s odlišným maskováním znázorněn na experimentálních datech.

## II. Výpočet kompenzační plochy

V navázaném fázovém obraze  $\Phi_1$  maska  $M_{BG1}$  určuje body, kterými je proložena polynomiální funkce dvou proměnných. Funkce je spočítána prostřednictvím metody vážených nejmenších čtverců (MVNČ), kde hodnoty fuzzy masky jsou použity jako váhové faktory. Hodnoty polynomiální funkce jsou zaznamenány do pole hodnot (kompenzační plocha  $P_1$ ), které má stejné rozměry jako původní fázový obraz.

## III. Kompenzace deformace

Kompenzační plocha  $P_1$  je odečtena od fázového obrazu  $\Phi_1$ . Výsledkem rozdílu je kompenzovaný fázový obraz  $\Phi_{comp1}$ . Za účelem zlepšení výsledku kompenzace je možné implementovat kroky I., II., III. na každý zpracovávaný obraz opakovaně. To znamená, že kompenzační procedura je aplikována znovu na kompenzovaný fázový obraz. Protože v kompenzovaném obraze jsou prahováním určeny rozdílné body jako pozadí, následně vygenerovaná kompenzační plocha odstraní deformace, které nebyly odstraněny během první aplikace kompenzační procedury. Tento proces je opakován do určitého konečného

#### 4.4. EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

počtu iterací. Ačkoliv tento iterační přístup prodlužuje výpočetní čas, podstatně zlepšuje přesnost kompenzačního procesu.

### IV. Identifikace jader a výpočet

Maska jader  $M_{NUCL1}$  je vytvořena z fázového obrazu  $\Phi_{comp1}$  prahováním dle rovnice (4.3), kde prahem je hodnota  $t_{NUCL}$  (nastavená v prvním fázovém obraze). Oblasti jader jsou v masce následně segmentovány stejným způsobem, jak bylo popsáno na konci kapitoly 4.2. To znamená, že všechny spojitě oblasti jsou označeny a nebuněčné oblasti jsou z masky odstraněny. V takto upravené masce je oblast jádra pozorované buňky identifikována pozicí bodu  $cg_0$  (těžiště jádra v předchozím obraze). Z identifikované oblasti je následně spočítáno těžiště  $cg_1$ . Počítáním těžiště v každém obraze je pozice bodu jako identifikačního prvku, aktualizována vzhledem k pohybu nebo změnám tvaru buňky. Záznam pozice těžiště pozorované buňky může být použit jako záznam pohybu buňky. V případě automatizovaného stolku mikroskopu je možné použít pozici těžiště k centrování pozorované buňky v zorném poli. Buňka by se tudíž nedostala mimo zorné pole během dlouhodobého experimentu.

### V. Generování masky pro pozorovanou buňku

Maska buněk  $M_{CELL1}$  je vytvořena jako binární maska podle rovnice (4.3) s použitím prahu  $t_{CELL1}$  na kompenzovaný fázový obraz  $\Phi_{comp1}$ . Na masce je provedena segmentace stejným způsobem, jak bylo popsáno na konci kapitoly 4.2. Oblast obsahující bod  $cg_1$  je oblast pozorované buňky a všechny hodnoty v masce jsou vynulovány s výjimkou vybrané oblasti.

### VI. Extrakce fáze pozorované buňky

Maska buněk je aplikována na kompenzovaný fázový obraz  $\Phi_{comp1}$ . Výsledkem je fázový obraz  $\Phi_{CELL1}$ , jehož hodnoty jsou nulové, kromě hodnot pozorované buňky. Jakákoliv další matematická procedura aplikovaná na tento obraz je vztažena pouze na pozorovanou buňku. Lze tak velice snadno získat parametry charakterizující buňku. Sledování individuální buňky může být rozšířeno na větší počet buněk. Způsob segmentace a identifikace zůstane stejný jako pro jednu buňku. Operátor však bude muset na začátku experimentu vybrat více buněk a program musí být upraven pro záznam množiny těžišť. V případě buněčného dělení vybere identifikační procedura jednu ze dvou nově vytvořených buněk. Jestliže se buňky budou překrývat, procedura vyhodnotí tyto buňky jako jednu.

## 4.4. Experimentální výsledky

*Buňky.* Pro experiment byly použity krysí rakovinné buňky, plným označením LW13K2 (nádorové embryonální fibroblasty). Buňky byly kultivovány ve standardním mediu (minimal essential medium Eagle) s 10 % telecího séra a za konstantní teploty 37°C. Použitá buněčná linie je adherentní k povrchu kultivační nádoby, což v mikroskopii umožňuje lépe definovat rovinu ostrosti.

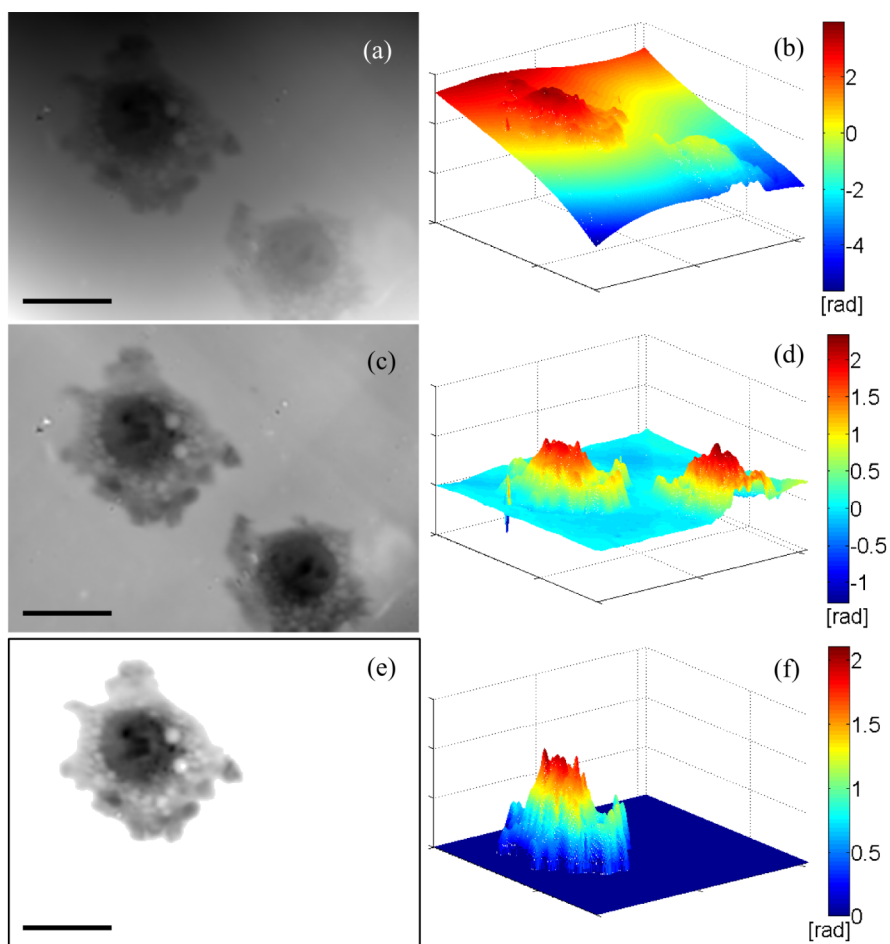
#### 4. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

*Experimentální nastavení CCHM.* Experiment byl realizován na CCHM mikroskopu. Při experimentu byl mikroskop umístěn do inkubačního boxu pro zajištění termální stability [30]. Sestava tohoto mikroskopu obsahovala halogenovou lampu kombinovanou s interferenčním filtrem  $\lambda = 650$  nm, s pološířkou 30 nm, dvěma objektivy  $20\times/NA=0,4$  a kamerou CCD Astropix 1.4 (velikost čipu:  $10.2$  mm  $\times$   $8.3$  mm,  $1376 \times 1038$  pixels, 12 bit).

*Snímání a zpracování hologramu.* Hologramy buněk byly nepřetržitě snímány po dobu 18 hodin s frekvencí 3 hologramy za minutu. Expoziční čas kamery byl 15 ms. Kvůli redukci šumu byl každý hologram spočítán jako průměr ze tří následujících hologramů. Z hologramu byla provedena rekonstrukce fázového obrazu, jak bylo popsáno v sekci 2.3. Na tento obraz byl aplikován navazovací algoritmus. Navázané fázové obrazy byly zpracovány podle navrženého dynamického algoritmu. Výpočetní čas algoritmu závisí na počtu bodů zahrnutých do nebuněčných oblastí. V případě, že nebuněčné oblasti pokrývaly přibližně 80 % bodů obrazu (o velikosti  $420 \times 360$  px), zpracování fázového obrazu na běžném kancelářském počítači proběhlo za 150 ms.

*Výsledky dynamického zpracování.* Průběh zpracování fázového obrazu dle navrženého dynamického algoritmu je ukázán na obraze z 15. hodiny experimentu. Pro tento účel je zobrazen původní fázový obraz (Obr. 4.5(a)), kompenzovaný fázový obraz (Obr. 4.5(c)) a fázový obraz sledované buňky (Obr. 4.5(e)). Pro zvýraznění změn obrazu během zpracování byly znázorněny také jejich 3D vizualizace v barevném kódování. Fuzzy maska pozadí (Obr. 4.6(a)) určující nebuněčné oblasti v původním fázovém obrazu je využita k fitování polynomiální funkce 3. řádu (Obr. 4.6(c)). Okrajům buňky a některým částem obrazu je přiřazena nižší příslušnost k nebuněčné oblasti a mají tak menší vliv na výpočet polynomiální funkce. Na obrázku 4.6(b) je zobrazena maska jader spolu a kompenzovaným obrazem pomocí transparentní hladiny. Bílý křížek v obraze značí pozici těžiště identifikujícího sledovanou buňku, která byla vybrána na začátku experimentu. Oblast identifikované buňky (žlutá oblast) je následně použita pro segmentaci fázových hodnot buňky. Výsledek segmentace buňky je zobrazen na obr. 4.5(e). Tři fázové obrazy byly vybrány z celé časosběrné série pro demonstraci funkčnosti automatického režimu algoritmu. V těchto obrazech se pozorovaná buňka (spodní buňka na obr. 4.7a) pohybuje a mění tvar. Na obrázku 4.7 jsou zobrazeny originální navázané fázové obrazy v čase experimentu (a) 5 hod, (b) 8 hod. a (c) 12 hod. Výsledky dynamického zpracování obrazů vzhledem k vybrané buňce jsou zobrazeny na obr. 4.7(d) - 4.7(f). Na těchto obrazech lze přímo hodnotit morfologii sledované buňky. Hmotu buňky, která je počítána podle rovnic uvedených v [8], byla na počátku 385.4 pg a na konci 549.2 pg. Průměrná rychlost růstu buňky tedy byla 23.4 pg/h. Pohyb buňky v 7 hodinovém intervalu experimentu je zaznamenán na obrázku 4.8 pomocí trajektorie geometrického těžiště. Celková délka trajektorie je 668  $\mu\text{m}$ . Z toho vyplývá průměrná rychlost 95.43  $\mu\text{m}/\text{h}$  mezi zaznamenanými body.

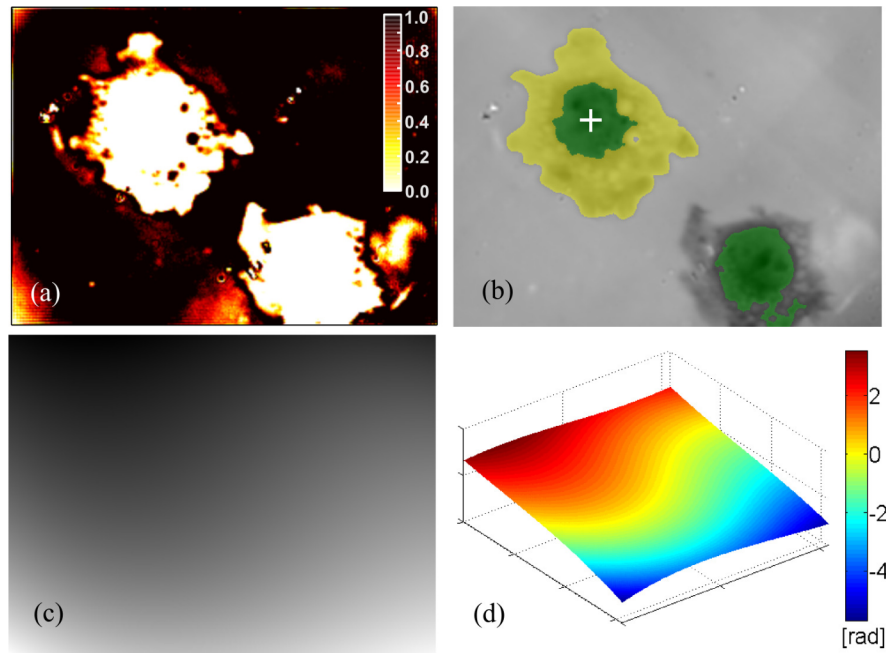
#### 4.4. EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY



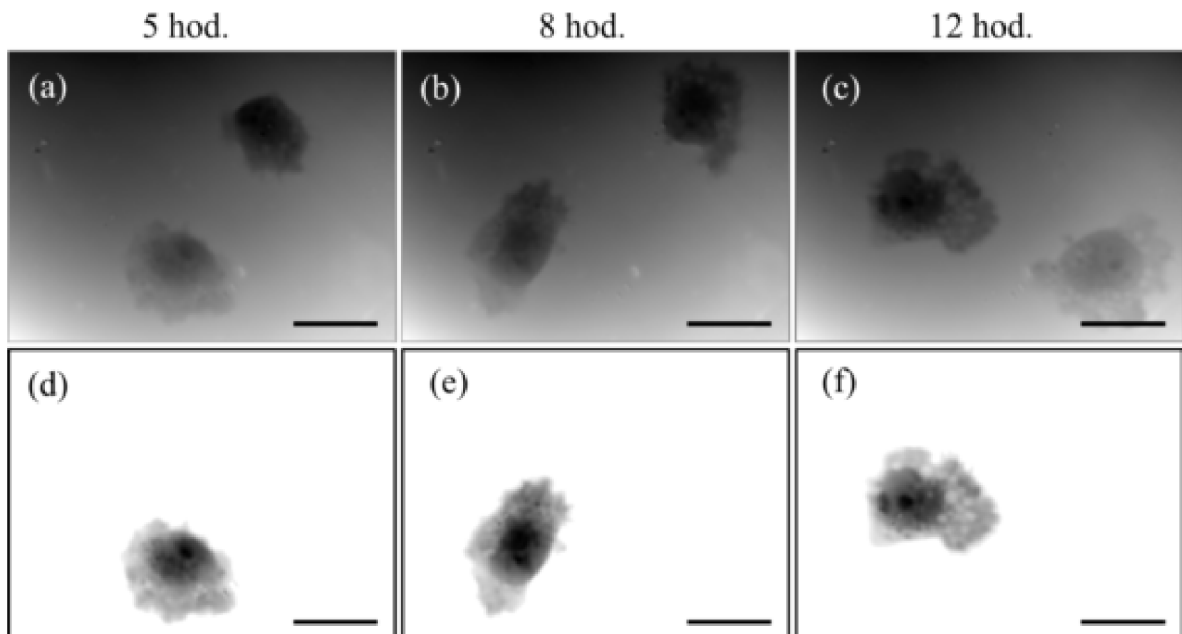
Obrázek 4.5: Zpracování fázového obrazu z 15. hodiny experimentu: (a) navázaný fázový obraz  $\Phi_{2700}$ , (c) kompenzovaný fázový obraz  $\Phi_{comp\ 2700}$  a (e) fázový obraz sledované buňky  $\Phi_{CELL\ 2700}$ . Měřítko v těchto obrazech představuje vzdálenost  $20\ \mu\text{m}$ . 3D vizualizace jednotlivých obrazů jsou zobrazeny v (b), (d), (f). Barevná škála ukazuje fázi v radiánech.



#### 4. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

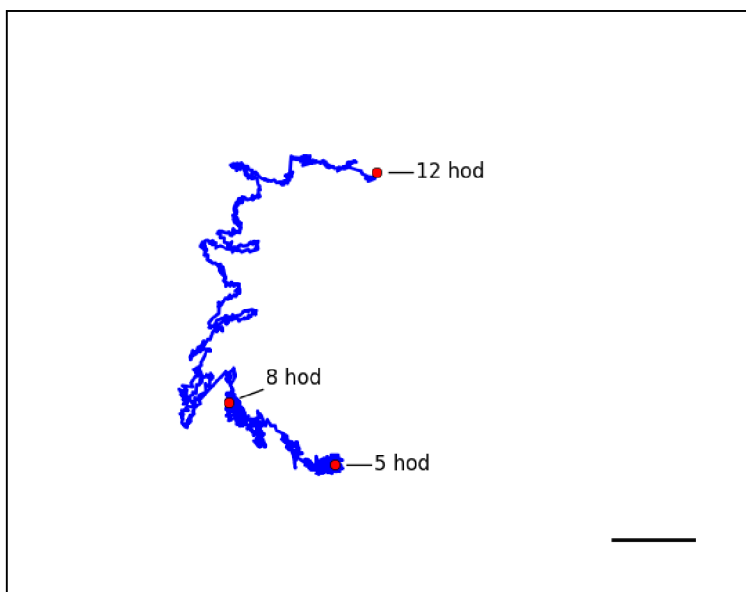


Obrázek 4.6: Vygenerovaná data použitá pro zpracování fázového obrazu  $\Phi_{2700}$  (Obr. 4.5). (a) Fuzzy maska pozadí  $M_{BG\ 2700}$ , (b) kompenzovaný fázový obraz zobrazen spolu s maskou jader (zelené oblasti), maska buněk (žlutá oblast) a těžiště (bílý kříž), (c) kompenzační plocha  $P_{2700}$  a (d) 3D vizualizace kompenzační plochy.



Obrázek 4.7: (a-c) Navázané fázové obrazy v různých časech experimentu, (d-f) fázové obrazy sledované buňky, odpovídající obrazům (a-c), zpracované navrženým dynamickým algoritmem. Měřítka v obrazech představuje vzdálenost  $20\ \mu\text{m}$ .

## 4.5. ZÁVĚR



Obrázek 4.8: Trajektorie těžiště plochy buňky získaná záznamem jeho polohy ve 20-ti sekundových intervalech během 7 hodin. Zobrazené měřítko představuje  $10 \mu\text{m}$ .

## 4.5. Závěr

Fázové deformace způsobené aberacemi optických prvků a mechanickými nepřesnostmi systému se mění kvůli nestabilitě DHM během dlouhodobých experimentů. Tato deformace zabraňuje přesnému kvantitativnímu měření fáze živých buněk.

V této práci byl popsán nový algoritmus, který dynamicky zpracovává navázané fázové obrazy živých buněk v časosběrné sérii. Tento algoritmus kompenzuje kompletní fázové deformace a sleduje vybranou buňku.

Kompenzační procedura je provedena automaticky na navázaných fázových obrazech. Oproti známým metodám jsou kompenzovány všechny aberace (nejen aberace způsobené mikroskopovým objektivem) a algoritmus nepožaduje žádné znalosti optického systému nebo kompletní sérii fázových obrazů. Tato procedura je aplikována na fázový obraz okamžitě po jeho získání, jinými slovy, zpracování probíhá v reálném čase. Použitím fuzzy masky pro výběr hodnot pozadí obrazu se zvýšila robustnost kompenzace.

Zásadní výhodou navržené metody sledování buňky je, že parametry popisující buňku jsou k dispozici již během experimentu. Na základě změn těchto parametrů lze řídit experiment, tzn. měnit snímací frekvenci vzhledem k buněčné aktivitě nebo v případě buněk fixovaných v průtokových komůrkách změnit médium ve specifickém stádiu života buňky. Procedura sledování buňky umožňuje zaznamenat pohyb buňky a znalosti pozice buňky během měření lze využít k centrování buňky do zorného pole pohybem mikroskopového stolku.

Použitelnost algoritmu byla demonstrována na fibroblastech krysích buněk použitím mimoosového holografického mikroskopu.

*Budoucí směry práce.*

Přepočítání fázových hodnot buňky na suchou hmotu (tzv. optické vážení buněk) je velmi citlivý na výběr oblasti buňky. Plynulý přechod buňky do pozadí obrazu může způsobit při jednoduchém prahování chybné přičtení hodnot pozadí k buňce nebo naopak ztrátu hodnot patřící buňce. Myšlenka použití fuzzy masky by mohla významně snížit

#### 4. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

citlivost měření suché hmoty v závislosti na segmentaci oblasti buněk. Tento nástroj by měl pomoci zohlednit nejednoznačné pásmo přechodu mezi buňkou a pozadím obrazu použitím proměnných hodnot příslušnosti k buňce. Vážení buněk pomocí fuzzy masky nebude citlivé na volbě prahu a přinese do výpočtu suché hmoty buňky větší přesnost.

Ve většině prací, které se zabývají kompenzací deformace, se požadují silné předpoklady pro optický systém, aby mohly být pro kompenzaci deformace fáze použity Zernikovy nebo kvadratické polynomy. V jiném případě se volba kompenzační funkce ověřuje experimentálně. Pro kompenzaci deformace v našem případě byl použit polynom 3. stupně. Dosud nebyla publikována práce, která by se detailněji a kvalitativně zabývala vyhodnocením použité kompenzační plochy. K hledání vhodné funkce se v matematice používá regresní analýza. Největší nesnázi při regresi funkce více proměnných je stanovení optimálního výběru nezávisle proměnných. Ne všechny proměnné mají stejný vliv na výsledný model. K tomu, abychom poznali, jak velkým dílem se zúčastňuje jistá nezávisle proměnná, slouží parciální koeficient korelace [31]. Studie významnosti jednotlivých nezávisle proměnných by mohla odhalit zbytečnost použití všech deseti nezávislých proměnných a ukázat vhodnější model pro aproximaci deformace fáze.



## Část II

# Rentgenová počítačová mikrotomografie



## 5. Počítačová tomografie

### 5.1. MikroCT

Počítačová tomografie (CT) je třídímní nedestruktivní zobrazovací metoda, která je založena na snímání rentgenových snímků z mnoha úhlů pohledu okolo osy rotace a následném aplikování rekonstrukčního algoritmu k vygenerování série obrázků (tomografických řezů) reprezentujících virtuální řezy objektem.

Rentgenová počítačová tomografie našla využití především v lékařství, kde se stala neodmyslitelnou součástí radiologické diagnostiky. V průběhu let byly lékařské CT skenery radikálně vylepšeny z hlediska kvality obrazu, rychlosti zobrazení a minimalizace dávky rentgenového záření. Prostorové rozlišení u těchto systémů naproti tomu zůstává limitováno na několik stovek mikrometrů kvůli rozměru zkoumaného objektu, tj. lidského pacienta. Nová oblast výzkumu představila rentgenovou počítačovou tomografii s vysokým rozlišením (s velikostí voxelu několik mikrometrů nebo dokonce v nejmodernějším měřítku se submikronovou velikostí), běžně nazývanou mikroCT ( $\mu$ CT). Tato metoda byla poprvé diskutována v 80. letech 19. století, kde byla jako rentgenový zdroj použita rentgenová trubice [32] nebo synchrotronové záření [33].

Zkonstruovat laboratorní CT systém s vysokým rozlišením umožnil vývoj hardwarových komponent. Posun přesnosti laboratorních systémů na rozhraní jednoho mikrometru a méně mohl být uskutečněn díky vývoji otevřených mikrofokusacích nebo dokonce nanofokusacích rentgenových trubic. Elektromagnetická fokusace elektronového svazku těchto trubic dovoluje generování kuželového rentgenového svazku s emisním bodem o průměru hluboko pod jeden mikrometr. Malý průměr emisního bodu je podstatný pro CT měření s rozměrem voxelu na submikronové úrovni. Další zásadní roli v dosažení vysokého rozlišení hrál vývoj vysoce výkonných a velkých plošných digitálních detektorů. Podstatou těchto rozměrných detektorů je zaznamenat co největší plochu kuželového svazku pomocí co nejhustší sítě jednotlivých snímačů.

Počítačová tomografie založená na synchrotronovém záření (SR $\mu$ CT) je v dnešní době pro uživatele z vědeckého prostředí standardním experimentem v mnoha laboratořích po celém světě. Hlavní výhodou tohoto systému je vysoce kolimovaný, téměř paralelní svazek a velký tok fotonů, který je o několik řádů vyšší než u konvenčních rentgenových zdrojů. Kvůli velkému toku fotonů mohou být efektivně použity monochromátory k realizaci CT měření s definovaným monochromatickým zářením.

Výhodou laboratorních CT systémů je velké zorné pole, snadná použitelnost, finanční dostupnost, přijatelná velikost v podobě stolních nebo skříňových zařízení. Navíc rentgenové trubice jsou schopny generovat vysoce pronikavé rentgenové záření. Naproti tomu SR $\mu$ CT poskytuje výbornou kontrastní rozlišovací schopnost, přesně nastavitelné monochromatické záření, kvůli němuž nedochází k efektu zvanému tvrdnutí svazku [34]. I přes nesporné výhody synchrotronového záření je počet těchto zařízení limitován a provozní náklady jsou příliš vysoké. Laboratorní  $\mu$ CT systémy jsou finančně méně náročné, proto nyní existuje velký počet stolních CT systémů.

Použití laboratorních  $\mu$ CT systémů se pro studium malých zvířat v posledním desetiletí významně zvýšilo. Z tomografií vyrobených na zakázku, které jsou aplikovány především na zobrazení kostí malých zvířat nebo kostních segmentů větších zvířat, vznikly komerčně dostupné přístroje navržené dokonce i pro in vivo zobrazení kostní i měkké

## 5.2. VOXELOVÉ ROZLIŠENÍ

tkáně. Díky dostupnosti komerčních  $\mu$ CT systémů pro velký počet vědeckých pracovníků se počítačová tomografie stala standardní technikou pro hodnocení kostní morfologie a mikrostruktury u myši, krysy a další malých zvířat.

### 5.1.1. Laboratorní mikroCT systém

Nejběžnější laboratorní mikroCT zařízení je systém využívající kuželový svazek a trajektorii po kružnici (CBCT-Cone Beam Computed Tomography). Kuželový svazek rentgenového záření umožňuje geometrické zvětšení umístěním zkoumaného objektu blízko ke zdroji záření. V tomto systému je nejvyšší dosažitelné rozlišení limitováno velikostí ohniskové stopy rentgenového zdroje. Při volbě zdroje musí být udělán kompromis mezi nízkým tokem záření u transmisních trubic, které dovolují velikost ohniskové stopy menší než  $1 \mu\text{m}$  a vysokým tokem záření u reflexních trubic, kde je ohnisková stopa větší. Obecně lze říci, že menší ohnisková stopa požaduje redukovaný tok rentgenového záření. Na straně detektoru je použita řada technologií v závislosti na geometrickém zvětšení a energii rentgenového záření. Ve většině případů je použit velký plošný detektor kombinovaný s relativně silnou vrstvou scintilátoru k obdržení velkého dynamického rozsahu.

Rentgenový kuželový svazek má tu výhodu, že zvětšuje rentgenový obraz, přitom však přináší do tomografických dat artefakty kuželového svazku. Nejrozšířenějším rekonstrukčním algoritmem pro CBCT je Feldkamp algoritmus [35]. I přestože tento algoritmus do velké míry redukuje zmíněné artefakty, tomografické řezy horní a dolní oblasti vzorku jsou stále náchylné k poškození. Tomuto vlivu může být zabráněno postupným skenováním vzorku v blocích, které se překrývají nebo použitím spirálové trajektorie. Další výhodou spirálovitého přístupu je skenování větší oblasti zájmu za stejný čas jako při kruhové trajektorii. Proto se laboratorní  $\mu$ CT systém se spirálovitou trajektorií nyní stává hlavním předmětem vývoje výrobců CT zařízení.

## 5.2. Voxelové rozlišení

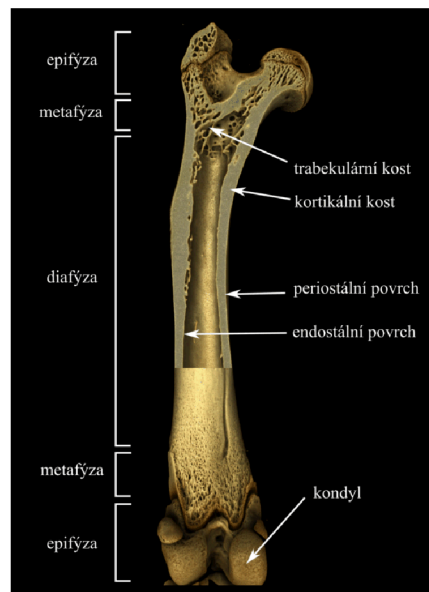
Požadavkem na tomografické měření je dosažení co nejlepšího prostorového rozlišení, od kterého se odvíjí přesnost a možnosti detekce mikroskopických rysů měřeného objektu. Prostorové rozlišení v tomografii závisí na mnoha faktorech a není lehké ho bez měření kalibračních vzorků spočítat. V literatuře se pro odhad prostorového rozlišení objevují různé výrazy [36]. Proto se mezi parametry popisující tomografické měření udává tzv. voxelové rozlišení, které je dané geometrií jednotlivých prvků (zvětšením a velikostí elementů detektoru). Voxelovým rozlišením se v tomografii označuje reálný rozměr elementu tomografických dat. Elementem obrazu v tomografii se myslí částice objemu představující hodnotu v pravidelné mřížce trojrozměrného prostoru, která je nazvána voxel. Jedná se tak o analogii k pixelu, který reprezentuje hodnotu v 2D. I přestože voxel má objemový charakter (jednotky  $\mu\text{m}^3$ ), nezřídka se v literatuře setkáváme s tím, že hodnota rozměru voxelu má jednotky pouze jedno-dimenzionální ( $\mu\text{m}$ ). Tím se myslí právě lineární rozměr pravidelného útvaru (krychle), z kterého lze explicitně objemový rozměr vypočítat. Pojmy rozlišení, rozměr voxelu, rozlišení voxelu jsou v tomografii ztotožňovány, ale vždy se používají pro vyjádření lineárního rozměru voxelu.



## 6. Morfologie kosti

Pro interpretaci výsledků zpracování tomografických dat krysích kostí je nutné uvést terminologii pro označení směrů kosti a stavby stehenní kosti [37]. Následující seznam vybraných anatomických termínů je nutné brát jako neúplnou pomůcku pro objasnění odborných názvů.

### 6.1. Základní stavba stehenní kosti



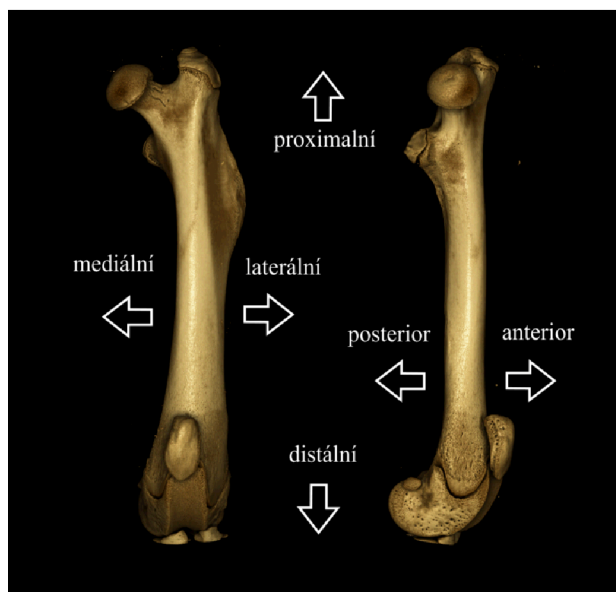
Obrázek 6.1: Základní složky dlouhé kosti znázorněné na modelu CT dat krysí stehenní kosti.

Diafýza	střední dlouhá část
Epifýza	konec dlouhé kosti
Metafýza	kuželový přechod mezi epifýzou a diafýzou
Kortikální kost	kůra kosti (kortex kosti)
Trabekulární kost	kost tvořená trámečky (trabekuly), někdy také nazývaná jako spongiozní kost
Endostální povrch	vnitřní povrch kosti
Periostální povrch	zvní povrch kosti
Kondyl	kloubní výběžek
Laterální kondyl	kloubní výběžek na laterální straně
Mediální kondyl	kloubní výběžek na mediální straně
Endokortikální kost	kompaktní kost na vnitřní straně povrchu kosti
Růstové chrupavky	chrupavčité vrstvičky mezi epifýzou a diafýzou, pomocí nichž dlouhá kost přirůstá do délky (růstové ploténky)

## 6.2. OZNAČENÍ SMĚRŮ

### 6.2. Označení směrů

Laterální	vnější
Mediální	vnitřní
Anterior	přední
Posterior	zadní
Proximální	blíže k trupu
Distální	směr k volnému konci končetiny

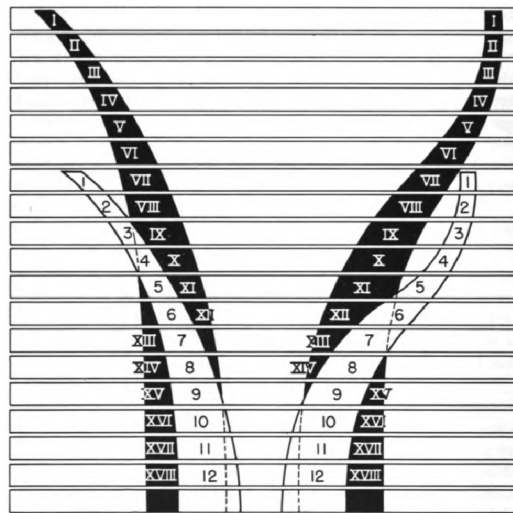


Obrázek 6.2: Označení hlavních směrů znázorněné na modelu CT dat krysí stehenní kosti.

### 6.3. Vývoj kosti

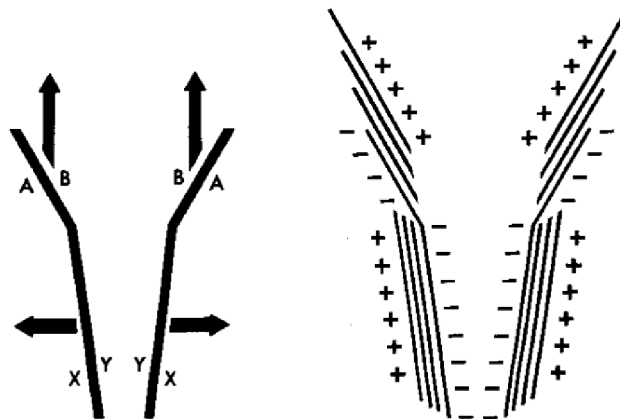
Dlouhé kosti se zužují do vnějšího průměru z maxima definovaného plošnou velikostí růstové ploténky k minimu někde ve střední části diafýzy. Jak je vysvětleno v několika pracích D. H. Enlow [38, 39], a jak je zřejmé při pohledu na krysí kost jakoukoliv zobrazovací technikou, procesu zužování kosti je dosaženo resorpcí periostálního povrchu a formování nové kosti na endostálním povrchu. Tyto procesy udržují tloušťku a pevnost těla kosti.

Nezbytnou součástí růstu kosti je remodelace. Tento proces představuje postupný mechanismus přestavby kosti, který udržuje konstantní tvar, proporce a poměr kosti během růstu. Pevnost a tvrdost kosti vytváří speciální růstový proces, který je založen na kombinaci depozice a resorpce povrchu kosti. Růst kosti nemůže probíhat jako u jiných měkkých tkání expanzí, tzn. dělením buněk uvnitř tkání. Kost proto roste apozicí, tj. přikládáním nově vytvořené tkáně ke tkáni starší. Tento typ růstu ovšem vyžaduje neustálou tvarovou úpravu protilehlého povrchu pomocí resorpce (odbourávání). Jak kost roste do délky a zvětšuje průměr, různé oblasti jsou přemísťovány na nové pozice. Tyto přemísťované oblasti budou zaujímat jiné relativní pozice vzhledem ke kosti. Například oblast 1 v obrázku 6.3 obsadí oblast VII nebo oblast 9 obsadí oblast XV.



Obrázek 6.3: Oblasti přemístění. Jak kost roste, každá oblast v mladší kosti (bílou barvou) se přemístí do jiné pozice. Například, oblast 5 je přemístěna do své relativní pozice v oblasti XI větší kosti (černou barvou). Obrázek je převzat z [39].

Dlouhá kost, jako je stehenní kost, vzniká endochondrální osifikací. To znamená, že kostní tkáň je formována nahrazením chrupavky v růstové ploténce jemnou pórovitou strukturou. Výsledkem následných remodelačních změn může být později růstová ploténka přemístěna do kůry kosti a změnit se v kompaktní kostní tkáň. Jak kost roste do délky přirůstáním na jejich koncích, starší části kosti jsou přemísťovány do jiných relativních pozic. Přemístění těchto oblastí s sebou přináší odpovídající změny v její velikosti, tvaru a také posunu v ose v každé oblasti. Tento proces remodelace zahrnuje depozici na určitém povrchu kosti doplněnou o resorpční odstranění kosti na opačném povrchu.



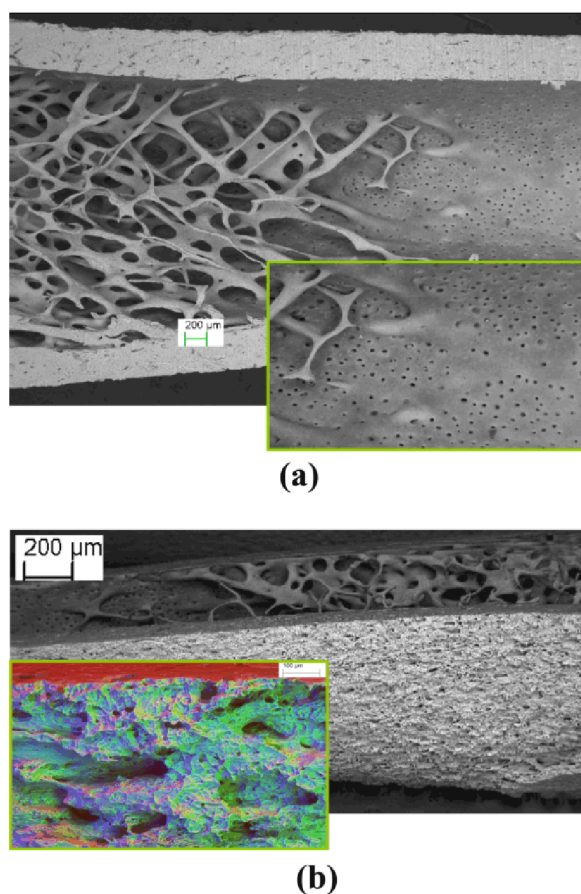
Obrázek 6.4: Směry růstu povrchů kosti jsou vyznačeny šipkami. Povrchy kosti v oblasti X a B tvoří novou kost (+) a povrchy Y a A podléhají resorpci (-). Obrázek je převzat z [38].

Povrch kosti, který směřuje k aktuálnímu směru růstu, je formován. Naopak povrch, který směřuje mimo směr růstu, podstupuje resorpci. Na obr. 6.4 jsou znázorněny směry růstu kostí i plochy depozice a resorpce plynoucí ze směrů růstu. Metafýza musí být postupně redukována v průměru do té doby, než se následně přemístí do úzkého tvaru diafýzy.

#### 6.4. VIZUALIZACE A MĚŘENÍ VÝVOJE KOSTI

Metafýza dlouhé kosti má trychtýřovitý tvar, nebo-li “V“ konfiguraci [38]. Růst v této oblasti je zařízen depozicí endostálního povrchu a resorpcí periostálního povrchu. Oba procesy tudíž zároveň redukuje průměr metafýzy a nárůst rozvoje kosti v podélném směru. Jak se metafýza remodeluje do diafýzy, proběhne v určitém bodě obrát ve směru růstu a průměr diafýzy začne být zvětšován depozicí na periostálním povrchu kosti. Z obecného pohledu lze říci, že rostoucí kost zachovává základní tvar, který je znám u dospělé kosti.

#### 6.4. Vizualizace a měření vývoje kosti

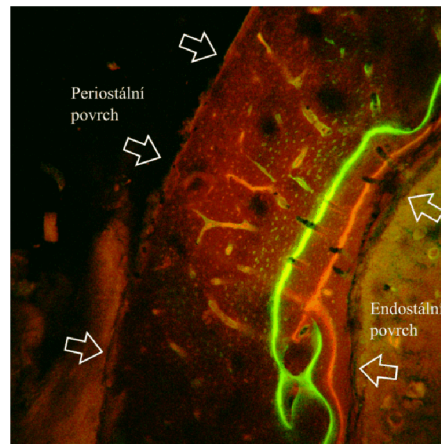


Obrázek 6.5: Endostální (a) a periostální (b) povrch krysí stehenní kosti v oblasti metafýzy. Mediální polovina vzorku zbavená měkké tkáně vyluhováním je zobrazena pomocí elektronového mikroskopu ZEISS EVO MA10 (autor obrázků A. Boyde).

Povrch vyprodukovaný depozicí periostální nebo endostální může být bez větších potíží odlišen od povrchu resorpčního. Povrch vytvořený přidáváním nové kosti je reprezentován v mikroskopické sekci jako relativně hladký povrch (Obr. 6.5(a)). V detailu obrázku je zřetelná aktivita povrchu také na jednotlivých trabekulách, které jsou začleňovány do kortikální kosti. Tato místa lze identifikovat pomocí chybějících otvorů v povrchu kosti. Naopak resorpční povrch je charakteristický zoubkovaným, erodovaným nebo vroubkovaným vzorem (Obr. 6.5(b)). Přesné rozpoznání těchto typů povrchu je základem pro interpretaci remodelačních změn. K vyšetření remodelovacího mechanismu bylo vyvinuto několik fluorescenčních barviv, které jsou schopny vizualizovat a kvantifikovat minerali-

## 6. MORFOLOGIE KOSTI

zaci kosti [40, 41, 42]. Fluorescenční látky jsou začleněny přímo do oblasti, jež prochází kalcifikací (zvápenatěním). Hladiny začlenění jsou vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 6.6). Měřením vzdálenosti obou hladin je získána informace o růstu kosti během určitého časového intervalu. Záznam růstu na vnitřní straně kortikální kosti je kvantifikován odměřováním vzdálenosti mezi fluorescenčními hladinami. Ovšem resorpční proces na vnější straně kosti znemožnil záznam fluorescenčních hladin.



Obrázek 6.6: Příklad dvojitého značení v části příčného řezu metafýzy stehenní kosti. Hladina tetracyklinu (zeleně), kalceinu (červeně). Snímek je pořízen konfokálním mikroskopem Leica SP2.



## 7. Analýza CT dat končetin laboratorních kryš

### 7.1. Značení vzorků

Předmětem pozorování byly samčí krysy Lewis vážící  $209 \pm 15$  gramů. V první skupině (kontrolní skupina) byly krysy ponechány neléčené. Ostatním bylo od prvního dne perorálně aplikováno léčivo Vehicle (0.04% HPMC, 20% PEG300, 36% HP-  $\beta$ -Cyclodextrin,  $n = 12$ ) nebo léčivo Vehicle obsahující Prednisolon v dávkách 1, 3, 10, 30 nebo 100 mg/kg. Dále v textu bude experimentální skupina léčená látkou Vehicle+Prednisolon značena jako Pred. V případě nutnosti vyjádření koncentrace látky Prednisolon bude využito symbolu "@", například kosti léčené dávkou Prednisolon 100 mg/kg budou značeny Pred@100. Kalcein byl injektován intraperitoneálně po 20 dnech života a tetracyklin po 32 dnech života. Život kryš byl ukončen po 35 dnech. Levé zadní končetiny byly odděleny a fixovány v 70% etanolu.

### 7.2. Použité přístroje

#### 7.2.1. Rentgenografie levé končetiny

Všechny končetiny byly zobrazeny s identickými podmínkami pomocí radiografického přístroje Qados Faxitron MX20 s urychlovacím napětím 26 kV a rozměrem ohniskové stopy menším než  $20 \mu\text{m}$ . Kosti byly při snímání v 70% etanolu uloženy v plastických trubičkách o průměru 15 mm. Trubičky byly orientovány tak, aby mezera mezi holenní a lýtkovou kostí byla maximální v rentgenovém snímku. Střední vzdálenost končetiny od detektoru byla 8 mm, vzdálenost zdroj-detektor byla 600 mm. Z těchto parametrů vyplývá velmi malé zvětšení 1,013. Rentgenové snímky byly využity pro měření délky stehenní kosti a pro první aproximaci odlišností končetin na základě kostní hmoty (Obr. 7.1).



Obrázek 7.1: Rentgenografie končetin krysy: (a) z kontrolní skupiny, (b) ze skupiny Vehicle, (c) z Pred@100. Vyznačené měřítko představuje 10 mm.

### 7.3. STANDARDNÍ HODNOCENÍ KOSTNÍ MIKROSTRUKTURY

#### 7.2.2. Mikrotomografie distální poloviny stehenní kosti

Před dalším zpracováním vzorků (příprava vzorku pro elektronovou a světelnou fluorescenční mikroskopii) bylo provedeno tomografické měření. Pro tento účel byl použit přístroj Scanco  $\mu$ CT 40 systém (ScanCo Medical AG, Bassersdorf, Switzerland) [43] s urychlovacím napětím 45 kV a proudem 114  $\mu$ A nebo 55 kV a 145  $\mu$ A. Rentgenové záření je modifikováno 0,5 mm silným hliníkovým filtrem. S expoziční dobou 200 ms CCD detektoru ( $2048 \times 252$  elementy o velikosti 24  $\mu$ m) bylo snímáno 2000 projekcí přes  $360^\circ$ . Kvůli malé výšce detektoru je oblast zájmu snímána na určitý počet bloků (8 – 10 bloků). Projekce nebyly průměrovány a skenovací doba vycházela přibližně na 4 hod. Voxelové rozlišení CT dat je určeno průměrem použité polyakrylátové trubičky, do které je vzorek vkládán. Dle zvolené velikosti trubičky přístroj následně umístí vzorek do definované pozice mezi detektor a zdroj rentgenového záření tak, aby byl rekonstruován celý vnitřní prostor trubičky. Jinými slovy, pomocí této techniky je zajištěno stejné voxelové rozlišení nezávisle na velikosti objektu uvnitř trubičky. V případě stehenních kostí byla použita trubička o průměru 16,4 mm, což v režimu vysokého rozlišení umožnilo vygenerovat CT data s lineárním rozměrem voxelu 8  $\mu$ m. Pro rekonstrukci tomografických dat je použit algoritmus filtrace zpětné projekce (FBP - Back Projection Filtration), který se používá pro asymetricky umístěný detektor pokrývající pouze polovinu projekce [44, 45]. Pro korekci tvrdnutí svazku byly použity linearizační techniky [46], které korigují hodnoty projekce použitím polynomu.

#### 7.2.3. Mikrotomografie kortikální kosti

Segmenty distální diafýzy stehenní kosti byly měřeny pomocí nejmodernějšího průmyslového CT systému GE phoenix v|tome|x L240 [47]. Tento systém je vybaven nanofokusační rentgenovou trubicí (180 kV, 15 W,  $<0,9 \mu$ m ohnisková stopa) a plošným digitálním detektorem (flat panel) DXR 250, který má velkou aktivní oblast ( $410 \text{ mm} \times 410 \text{ mm}$ )  $2048 \times 2048$  pixelů (rozměr pixelu 200  $\mu$ m  $\times$  200  $\mu$ m), dynamický rozsah 10 000 : 1 a rychlost snímání až 7,5 snímků/s. Vzorky byly fixovány v glycerolu v mikrozkuhavce typu Eppendorf. Viskozita této kapaliny byla dostatečná, aby zabránila pohybu vzorku při rotaci. Pro měření bylo zvoleno urychlovací napětí 70 kV a proud 140  $\mu$ A. Spektrum rentgenového záření bylo upraveno pomocí hliníkového filtru tloušťky 0,2 mm. Detektor s expoziční dobou 500 ms byl použit v režimu náhodného lineárního posunu pro odstranění kruhových artefaktů [48]. K potlačení šumu byly průměrovány 3 snímky. 1 snímek byl vynechán pro eliminaci artefaktu duchů [49]. Během otáčení o  $360^\circ$  bylo snímáno 2400 projekcí. Pro dané velikosti vzorků bylo nejlepší možné voxelové rozlišení mezi 2,5 a 3  $\mu$ m. Rekonstrukce byla provedena pomocí softwaru Datos|x 2.1.

### 7.3. Standardní hodnocení kostní mikrostruktury

Pro vyhodnocení mikrostruktury stehenních kostí byla analyzována trabekulární a kortikální morfologie kosti použitím počítačové tomografie podle směrnic hodnocení kostní mikrostruktury u hlodavců [50]. Do nedávné doby byly standardem pro hodnocení trabekulární a kortikální architektury kosti kvantitativní histologické techniky. Ačkoliv histologické analýzy poskytují unikátní informace o buněčné remodelaci kosti, parametry 3D mikrostruktury jsou odvozovány z několika 2D sekcí (stereologie). Naproti tomu 3D



## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ

zobrazovací techniky, jako je  $\mu$ CT, měří přímo mikrostrukturu kosti, aniž by se opíraly o stereologický model analýz.

V několika studiích byla prokázána výborná reprodukovatelnost a přesnost mikroCT měření morfologie kostí. Přesnost měření pomocí mikroCT byla hodnocena porovnáním s tradičními 2D histologickými technikami [51, 52]. Vysoká korelace mezi oběma přístupy poskytuje silné odůvodnění pro použití mikroCT analýzy k vyhodnocování kostní morfologie.  $\mu$ CT analýza pro hodnocení kostní hmoty a morfologie vzorků přináší ve srovnání s 2D histologií následující výhody: (1) dovoluje přímé 3D měření, např. tloušťku trabekulární kosti, (2) analyzuje podstatně větší oblast vzorku, (3) realizuje měření s mnohem větší rychlostí, (4) nepoškodí vzorek, který může být použit následně pro další analýzy. CT data mohou být použita k odhadu mineralizace kostní tkáně srovnáním útlumu rentgenového záření v kosti se standardy hydroxyapatitu. Dále morfologie kosti určená na základě CT dat může být použita k vytvoření výpočtového modelu kosti metodou konečných prvků pro testování mechanického chování kosti [53].

### 7.3.1. Analýza kortikální kosti

Pro srovnání morfologie kortikální kosti experimentálních skupin byly vybrány tři tomografické řezy ve 20 %, 30 % a 40 % totální délky stehenní kosti od distálního konce. Procentuální vyjádření vzdálenosti umístění řezů zajišťuje výběr odpovídajících řezů v jednotlivých kostech vzhledem k jejich velikosti. Hodnoty délek stehenních kostí byly získány z radiografických obrazů měřených pomocí přístroje Faxitron. Ve vybraných řezech byla manuálně odstraněna vnitřní struktura kosti překreslením hodnot trabekulární kosti hodnotami pozadí. Upravené obrazy byly analyzovány pomocí nástroje BoneJ [54] (rozšíření softwaru ImageJ). Pro každou kost byla v těchto řezech vypočítána plocha průřezu kosti (CSA,  $\text{mm}^2$ ), průměrná hustota počítaná z pixelových hodnot a kalibračních koeficientů (HA  $\text{g}/\text{cm}^3$ ), těžiště průřezu kosti (X cent, Y cent), obvod vnějšího povrchu (perimeter, mm) a maximální tloušťka, průměrná tloušťka a standardní odchylka tloušťky.

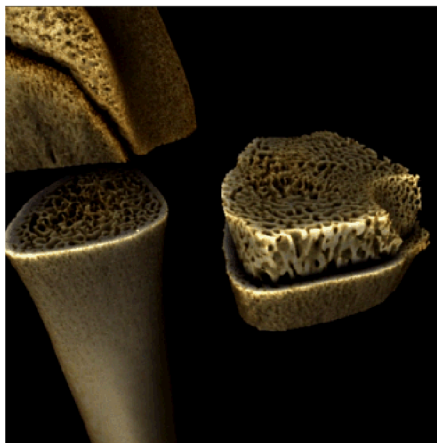
Tyto parametry byly silně ovlivněny orientací kosti v tomografických datech. Při používání trubiček, do kterých byly vzorky vkládány, nebylo možné držet stejný náklon kosti. Důsledkem odlišného náklonu byly kosti v tomografických řezech pod různým úhlem. Hodnoty obvodu jsou ovlivněny mírou resorpce periostálního povrchu. Čím více je povrch členitý, tím větší je vypočítán obvod. Navíc v oblasti metafýzy se vyskytují kanálky, které přerušují souvislou oblast kortikální kosti. V tomto případě je do hodnoty započítán i obvod vnitřní hranice kůry kosti.

### 7.3.2. Analýza trabekulární kosti

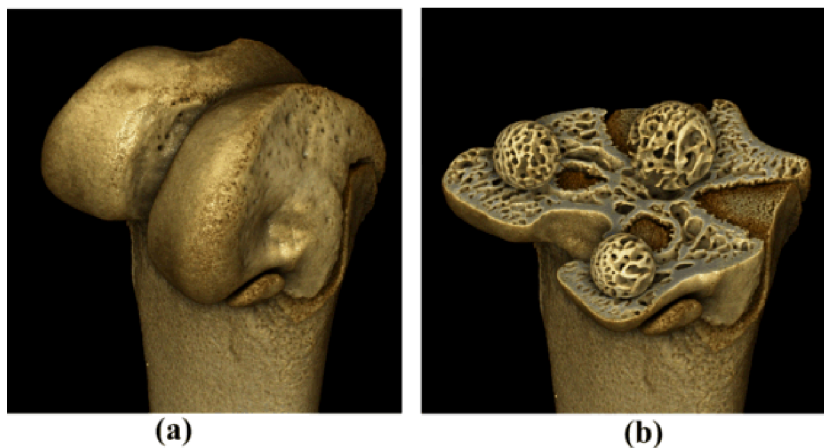
Základní morfometrickými ukazateli jsou hodnoty objemu kosti (BV) a totálního objemu analyzované oblasti (TV). Poměr těchto dvou veličin se nazývá objemový podíl kosti (bone volume fraction, BV/TV). Dalším základním ukazatelem je plocha kosti (BS), která je běžně vypočítána pomocí triangulace povrchu [55]. Trabekulární tloušťka (Tb.Th) je počítána jako průměrná hodnota všech průměrů koulí vepsaných do trabekul kosti. Ze souboru naměřených hodnot lze kromě průměrné hodnoty získat také průměr maximální koule nebo standardní odchylku. Obdobným způsobem je spočítána hodnota trabekulárního meziprostoru (Tb.Sp). V tomto případě se koule vepíší do meziprostoru trabekul. Posledním získaným parametrem je konektivita (Connectivity), která byla vyvinuta pro

### 7.3. STANDARDNÍ HODNOCENÍ KOSTNÍ MIKROSTRUKTURY

charakterizaci redundance spojení trabekul. Hodnota spojitosti je určena z Eulerova čísla. Toto číslo je základní topologickou mírou vyjadřující počet dutin kompletně obklopených kostí a počet spojení, která musí být přerušena, aby došlo k rozdělení struktury do dvou částí [56]. Protože konektivita závisí na velikosti analyzované oblasti dat, je vhodnější používat hustotu konektivity (Conn.D), což je konektivita vydělená objemem analyzované oblasti.



Obrázek 7.2: Polygonální oblast v metafýze distální stehenní kosti.



Obrázek 7.3: Definice sférických oblastí v epifýze distální stehenní kosti: (a) 3D model distálního konce kosti, (b) vizualizace sférických oblastí pomocí virtuálního řezu epifýzy.

Výběr oblasti zájmu je velmi citlivým bodem analýzy. U krysích kostí je trabekulární kost v oblasti distální metafýzy z velké části omezena na několik milimetrů od rostoucí ploténky. Prodloužením oblasti zájmu za tuto oblast by znamenalo započítání více volného prostoru. To by zapříčinilo snížení hodnoty  $BV/TV$  a pravděpodobně smazalo příslušné rozdíly mezi experimentálními skupinami. Při výběru oblasti zájmu by se měl vzít v potaz také věk zvířete. S rostoucím věkem se v oblasti metafýzy dlouhé kosti trabekulární kost ztrácí. Z těchto důvodů je důležité definovat umístění oblasti zájmu vzhledem k odlišné velikosti kosti. Pro tento účel je vhodné použít určité procento délky kosti nebo vybrat anatomický rys kosti, který lze jednoduše identifikovat napříč všemi experimentálními skupinami.

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYS

Analýza trabekulární kosti v metafýze distální kosti byla na začátku experimentu prováděna na objemových oblastech zájmu (VOI) tvaru kvádrů nebo válců vepsaných do vnitřku kosti. Výsledky z těchto oblastí však prokázaly významný vliv na umístění oblasti v kosti. Řešení bylo navrženo v podobě manuální segmentace trabekulární kosti pomocí polygonu, kterým jde docela přesně obkreslit konturu kortikální kosti. Pro vytvoření VOI, čítající 1000 řezů (2,4 mm), bylo napsáno makro v rámci ImageJ založené na manuálním kreslení polygonálních oblastí v referenčních rovinách a interpolaci oblastí v rovinách mezi referenčními rovinami. Touto procedurou se lze vyhnout manuálnímu kreslení polygonální oblasti řez po řezu. VOI byla tvořena v 25 % totální délky stehenní kosti od distálního konce směrem k diafýze kosti (Obr. 7.2). Experimentálně bylo ověřeno, že v této vzdálenosti již nebudou žádné části růstové ploténky a tato oblast spolehlivě pokryje nejhustší trabekulární strukturu.

Trabekulární kost v epifýze distální stehenní kosti rozhodně podstupuje významné mechanické zatížení během pohybové funkce končetiny, ale tyto oblasti jsou v publikacích obecně přehlíženy. Proto bylo rozhodnuto analyzovat strukturu trabekul také v této oblasti. V tomto případě nelze aplikovat manuální kreslení polygonální oblasti kvůli komplikovanému tvaru epifýzy, která je navíc propletena částmi růstové ploténky. Pro tento účel byl vyvinut postup extrahování sférických oblastí. Sféry jsou vytvořeny prostřednictvím fitovacího nástroje softwaru ImageJ v mediálním, laterálním kondyly a mezi nimi (Obr. 7.3). Sférami se navíc vyhneme možnému vlivu anizotropie.

### 7.4. Cíle práce

Základním principem růstu dlouhé kosti jsou remodelační mechanismy periostálního a endostálního povrchu kosti. Zda je povrch kosti formován nebo resorbován lze jednoduše rozlišit pomocí standardních zobrazovacích metod. Pro kvantifikaci přírůstku nové kosti se využívá fluorescenčních metod, které jsou založeny na měření vzdálenosti dvou fluorescenčních hladin, u nichž je znám časový odstup. Na základě rozdílů experimentálních skupin lze následně rozhodnout o vlivu podávaných látek na růst kosti. Nevýhodou tohoto přístupu je měření pouze ve vyřezaných tenkých sekcích, u kterých jsou velké nároky na mechanickou přípravu jejich povrchu. Fluorescenční hladiny lze také detekovat pouze v oblastech, kde se kost formuje nebo je v klidu. V oblastech kosti podléhajících resorpčnímu procesu jsou hladiny přirozeně odstraněny (Obr. 6.6).

K účelu posouzení rozdílného vývoje kostí vlivem aplikovaných léčiv lze s výhodou využít  $\mu$ CT data kostí, ve kterých je zaznamenána kompletní nepoškozená kost. V tomografických řezech není sice možné kvantifikovat absolutní hodnoty přírůstků jako u fluorescenční metody, ale vhodným zpracováním dat lze zkoumat morfologické rozdíly mezi kostmi. Cílem práce je navrhnout algoritmus pro kvantifikaci vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kosti, který by umožnil studium rozdílů tvaru krysích stehenních kostí napříč experimentálními skupinami.

## 7.5. Nový přístup ke studiu kosti na $\mu$ CT datech

### 7.5.1. Standardizace CT dat distální poloviny stehenní kosti

Biologický vzorek je obecně náročně upnout do tomografické stanice tak, aby byla zajištěna jeho definovaná poloha a vzorek byl držen v lázni konzervační látky. V tomografickém systému ScanCo je k držení vzorku použito plastových trubiček, do kterých je vzorek vkládán. To umožňuje držet vzorek v lázni 70% ethanolu i během měření. Obtížnější je stabilizace vzorku uvnitř trubiček, která byla vyřešena pomocí pružných plastových trubiček zapírajících kost končetiny vůči stěně trubičky. Tento systém upínání zjednodušuje také ovládání přístroje a následné zpracování dat. Trubičky jsou mechanicky přímo spojeny s hřídelí krokového motoru a tím je zafixován střed rotace, který je důležitým parametrem pro správnou rekonstrukci tomografických dat. I přestože byla používána standardní procedura fixace kostí končetin do držáku, v tomografických datech byly nalezeny velké variace polohy kostí. Původní CT data odhalila významné odlišnosti ve sklonu a otočení kostí. Srovnávání CT dat kostí tak mohlo být provedeno pouze s určitou nejistotou.



Obrázek 7.4: Ilustrace upevnění končetiny v držáku tomografické stanice ScanCo.

Standardizace tomografických dat je nezbytná ke srovnání výsledků následných analýz. Charakteristickým rysem distální části stehenní kosti je dostatečně přímý tvar těla kosti, který může být popsán přímkou (obr. 7.5). Tato přímka může být označena jako osa distální stehenní kosti. Procedura standardizace je založena na posunu osy kosti do vertikální polohy. V našem případě byla k určení osy kosti použita těžiště kortikální kosti v příčných řezech 20 %, 30 % a 40 % délky kosti. Těžiště byla vypočítána v rámci analýzy kortikální kosti (kapitola 7.3.1). Následně byla mezi body proložena přímka pomocí analýzy hlavních komponent (matematická technika pro hledání vzorů v datech vyšší dimenze). Ke spolehlivějšímu hledání přímky může být použit větší počet bodů, to by však musel být manuálně zpracován větší počet řezů.

Tomografická data generovaná  $\mu$ CT systémem představují sérii 2D obrázků (řezů). Tato data mohou být reprezentována 3D maticí popsanou kartézským souřadným systémem, kde osy  $x$ ,  $y$  jsou identické k osám 2D obrázku a osa  $z$  je ve směru řezů. Cílem je vyrovnat osu kosti do směru osy  $z$  pomocí maticových transformací. 3D matice je transformována pomocí otočení o úhel  $\alpha$  okolo osy  $z$  a o úhel  $\beta$  okolo osy  $y$ . Úhly  $\alpha$  a  $\beta$  jsou Eulerovy úhly, které jsou spočítány z pozice podélné osy kosti s ohledem k ose  $z$ . Dalším krokem je stanovit orientaci kosti kolem podélné osy. Posteriovní strana kosti může být jed-

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ

noduše detekována jako rovina dotýkající se mediálního a laterálního kondylu (Obr. 7.6). Otočení kosti do vertikální polohy dovoluje vygenerovat projekci tomografických dat kosti ve směru osy jednoduše pomocí průměrování řezů skrze osu  $z$ . V tomto obraze je položena tangenciální přímka k mediálnímu a laterálnímu kondylu. Úhel poslední rotace je určen tak, aby přímka byla rovnoběžná ke spodní hraně obrazu.

Realizace transformací:

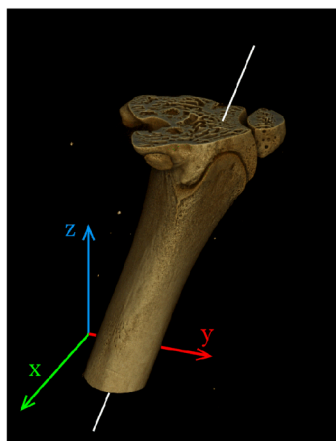
- i. Transformace obsahující dvě rotace  $\mathbf{R}_z(\alpha)$  a  $\mathbf{R}_y(\beta)$ .
- ii. Měření posledního úhlu  $\gamma$  v projekci podél podélné osy.
- iii. Transformace obsahující tři rotace  $\mathbf{R}_z(\alpha)$ ,  $\mathbf{R}_y(\beta)$  a  $\mathbf{R}_z(\gamma)$ .

Transformace lze zapsat ve tvaru

$$\mathbf{X}' = \mathbf{R}_z(\gamma)\mathbf{R}_y(\beta)\mathbf{R}_z(\alpha)\mathbf{X},$$

kde  $\mathbf{X}$  jsou souřadnice starého systému,  $\mathbf{X}'$  souřadnice nového,  $\mathbf{R}_z(\gamma)$  a  $\mathbf{R}_z(\alpha)$  rotace kolem osy  $z$  o úhel  $\gamma$ , resp. úhel  $\alpha$ .  $\mathbf{R}_y(\beta)$  rotace kolem osy  $y$  o úhel  $\beta$ . Transformační matice jsou tvaru  $\mathbf{R}_z(\gamma) = \begin{pmatrix} \cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ \sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$ ,  $\mathbf{R}_y(\beta) = \begin{pmatrix} \cos(\beta) & 0 & \sin(\beta) \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin(\beta) & 0 & \cos(\beta) \end{pmatrix}$ .

Pro převzorkování bodů v rámci transformace je použita trilineární interpolace.



Obrázek 7.5: Objemový render CT dat stehenní kysí kosti vizualizovaný pomocí softwaru Drishti. Stehenní kost je virtuálně uříznuta v XY rovině originálního CT data setu. Diafýza kosti je dostatečně přímá, aby byla popsána přímkou (znázorněno bílou čarou).

### 7.5.2. Automatické odstranění obrazu trabekulární kosti

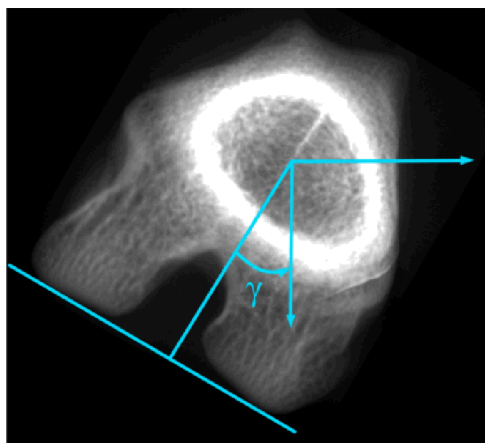
Ke studiu povrchu kortikální kosti je nutné se zbavit trámčitých elementů (trabekul) uvnitř kosti. K tomuto účelu byl ve spolupráci s Ing. L. Kvasnicou vyvinut automatický algoritmus popsany následujícími 3 kroky:

#### I. Prahování

Každý obraz tomografického řezu je prahován k segmentaci kostního materiálu od pozadí. Prahováním vznikne binární obraz (obr. 7.7(a)). Pro všechny obrazy je použita konstantní prahovací hodnota.

#### II. Segmentace kortikální kosti

## 7.5. NOVÝ PŘÍSTUP KE STUDIU KOSTI NA $\mu$ CT DATECH



Obrázek 7.6: Projekce CT dat distální stehenní kosti podél její podélné osy. Tangenciální přímka k laterálnímu a mediálnímu kondylu určuje úhel gama ( $\gamma$ ).

V binárním obraze jsou segmentovány spojitě oblasti dle algoritmu popsaného v 4.2. Pro každou oblast je vypočítán plošný obsah a je vybrána největší oblast. Kortikální kost má vždy největší plochu v příčných řezech diafýzy kosti. Tímto způsobem jsou z obrazu odstraněny všechny kostní části, které nejsou v příslušném řezu spojeny s kortikální kostí, například česka, úlomky kosti a některé trabekuly (obr. 7.7(b)).

### III. Filtrování

Na binární data je následně použit 3D mediánový filtr (obr. 7.7(c)), tzn. každý voxel ve filtrovaných datech obsahuje hodnotu mediánu binárních dat kulového okolí (jádra) o určitém průměru. Pro průměr jádra bylo použito experimentálně ověřených 40 voxelů.

Aplikací mediánového filtru na binárních datech se z filtru, který se používá na redukci šumu obrazu, stává nástroj odstraňující menší objekty. Binární 2D obrazy kortikálních kostí se mohou jevit jako rozdělené, kvůli vaskulárním kanálkům nebo kvůli tenké a řídké kortikální kosti. Obyčejný 2D filtr použitý na jeden obrázek příčného řezu by mohl identifikovat tyto podoblasti kortikální kosti jako nekortikální kost, protože struktura těchto oblastí je velmi podobná trabekulární kosti (obr. 7.8). Použitím sousedních řezů ve 3D filtrování prakticky eliminuje tento problém. Medián filtr navíc vytvoří povrch kosti hladší a vyplní díry reprezentující kanálky v kůře kosti. Pro každý příčný řez je vygenerována maska kortikální kosti.

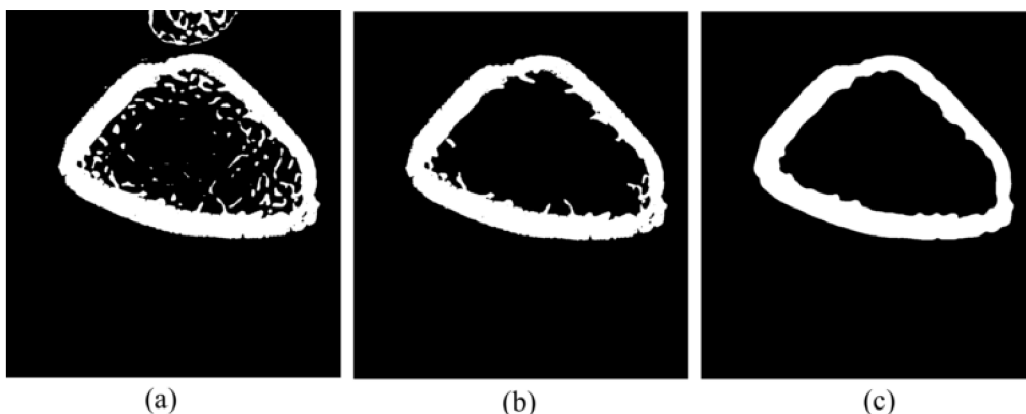
### 7.5.3. Mapování kortexu: měření vzdáleností povrchu stěny kosti od centrální podélné osy

V návaznosti na předchozí zpracování byla vyvinuta metoda, která měří vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kosti od centrální osy. Hodnoty vzdáleností jsou uloženy do 2D obrázků nazvaných mapy.

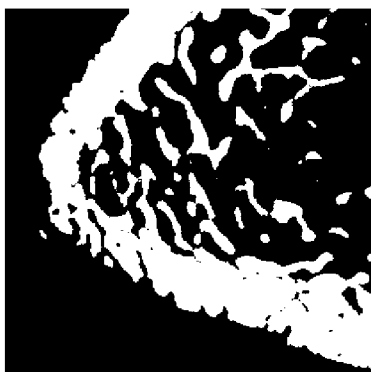
#### Stanovení mapovaného segmentu kosti

Aby bylo možné mapy kostí odlišných experimentálních skupin srovnat, je nutné v každé kosti identifikovat stejný segment. Délka analyzovaného segmentu je stanovena na 8 mm a začátek segmentu je 3,3 mm od referenční roviny. Referenční rovina je zvolena jako příčný

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ

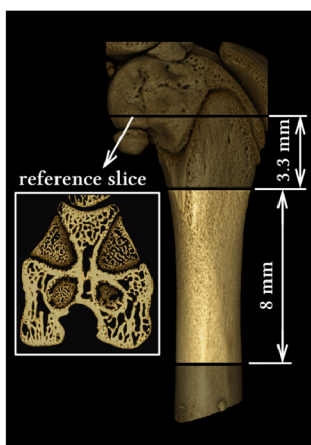


Obrázek 7.7: Postupné zpracování pro odstranění trabekulární kosti ukazuje: (a) binární obraz řezu distální stehenní kosti vygenerované pomocí prahování, (b) segmentovanou kortikální kost jako největší spojitou oblast, (c) výsledek 3D mediánového filtrování.



Obrázek 7.8: Detail příčného řezu binárních dat distální kosti v oblasti diafýzy. Tento příklad ukazuje porušenou část kortikální kosti, která přináší obtížnosti pro detekci kortikální kosti.

řez epifýzy v narovnaných CT datech. V tomto řezu se vyskytují části růstové ploténky jako čtyři tmavší oblasti, které jsou odděleny spojitou epifyzální strukturou (Obr. 7.9).

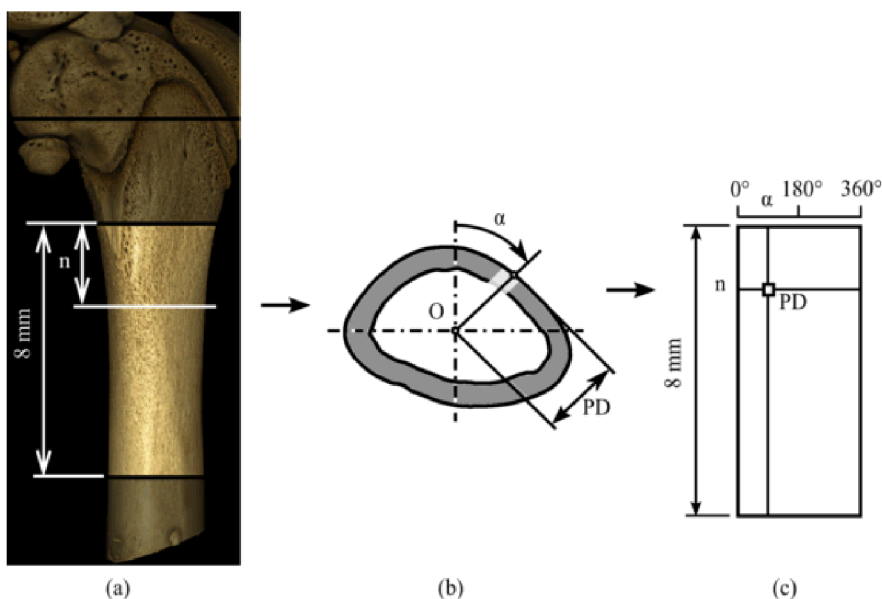


Obrázek 7.9: Pozice referenčního příčného řezu v narovnaných CT datech kosti, který specifikuje začátek mapované oblasti.

## 7.5. NOVÝ PŘÍSTUP KE STUDIU KOSTI NA $\mu$ CT DATECH

### Procedura mapování, orientace mapy a interpretace

Po určení podélné osy kosti a standardizaci CT dat jsou v každém příčném řezu  $n$  analyzovaného objemu měřeny vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kortikální kosti od centrální podélné osy s jednostupňovým úhlovým rozlišením (Obr. 7.10). Výsledky jsou ukládány do mapy, ve které je na vertikální ose značeno číslo řezu a na horizontální ose je úhel měření ( $0^\circ$  až  $360^\circ$ ).



Obrázek 7.10: Metoda mapování kortikální kosti. (a) Pozice  $n$ -tého příčného řezu, který je zpracován automatickou procedurou odstranění trabekulární kosti (b). Na tomto řezu je ilustrováno měření vzdálenosti (PD) od osy  $O$  k vnějšímu povrchu pod úhlem  $\alpha$ , jehož hodnota je zaznamenána do mapy (c).

Z naměřených vzdáleností mohou být vygenerovány tři základní typy map, a to jmenovitě, mapa vzdáleností vnějšího povrchu, mapa vzdáleností vnitřního povrchu a z rozdílu těchto dvou map tloušťky kůry kosti. Pro každý typ mapy byla navržena speciální barevná paleta. Horní okraj mapy se týká distální oblasti kosti. Levý ( $0^\circ$ ) okraj a pravý okraj ( $360^\circ$ ) mapy představují anteriorní stranu kosti. Střed mapy je posteriorní strana ( $180^\circ$ ). Směrem vlevo od středu je laterální strana ( $90^\circ$ ) a směrem napravo je mediální strana ( $270^\circ$ ).

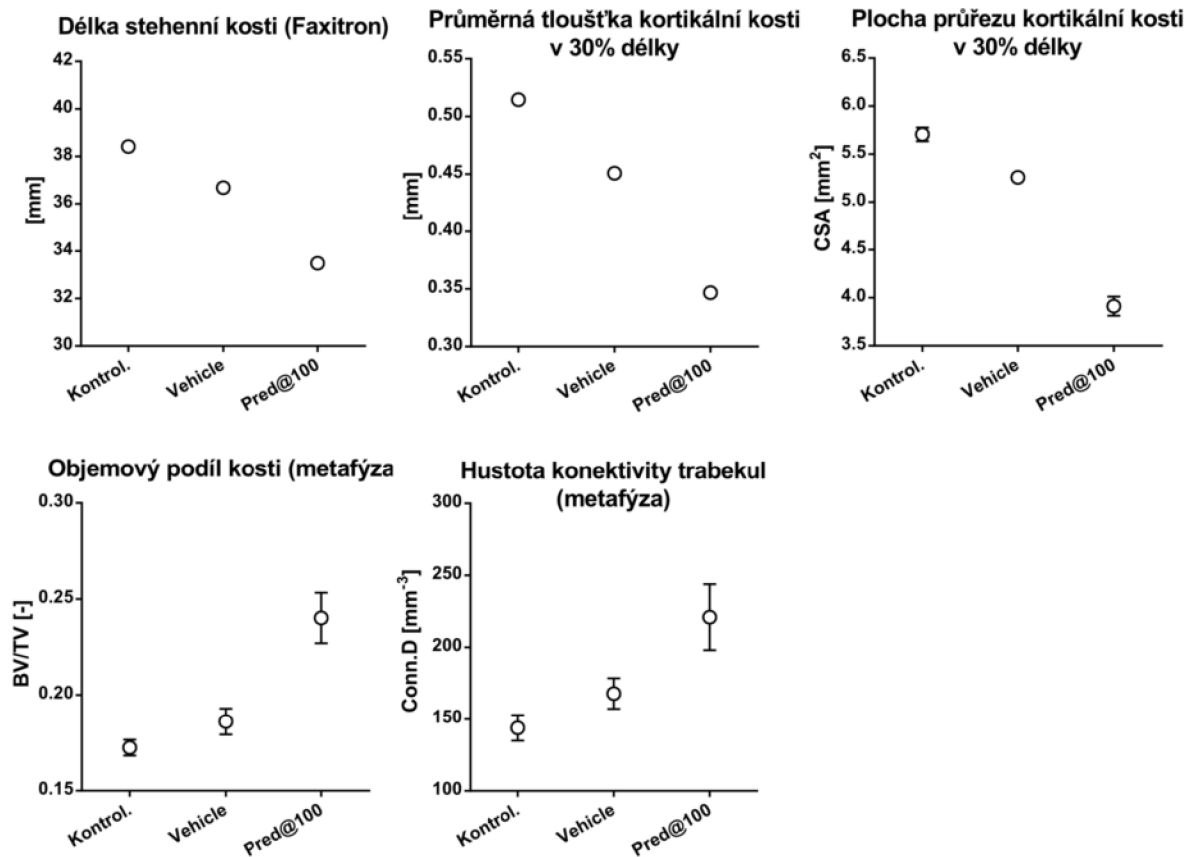
Rozdíly kostí jednotlivých zvířat nebo rozdíly kostí mezi experimentálními skupinami je možné zkoumat použitím jednoduchých aritmetických operací těchto map. Hodnoty vnitřních nebo vnějších map jsou průměrovány mezi kostmi v rámci skupiny k vygenerování průměrné kosti reprezentující danou experimentální skupinu. Odečtením těchto map jsou získány odlišnosti mezi jednotlivými skupinami.



## 7.6. Výsledky

### 7.6.1. Morfologické analýzy v uživatelsky definovaných oblastech

Výsledky analýzy kortikální kosti a trabekulární kosti ukazují významný vliv obou podávaných léčiv na velikost a stavbu kosti. Léčivo Prednisolon (v dávce 100 mg/kg) má u všech počítaných morfologických parametrů silnější vliv než léčivo Vehicle. Na základě grafů v obrázku 7.11 lze konstatovat, že všechna léčiva způsobují menší délku stehenní kosti, menší průřez kortikální kosti i její tloušťku oproti kostem z kontrolní skupiny. Tento jev je zřejmě kompenzován větší hustotou vnitřní struktury kosti, kterou lze pozorovat na objemovém podílu kosti a hustotě konektivity trabekulární kosti.



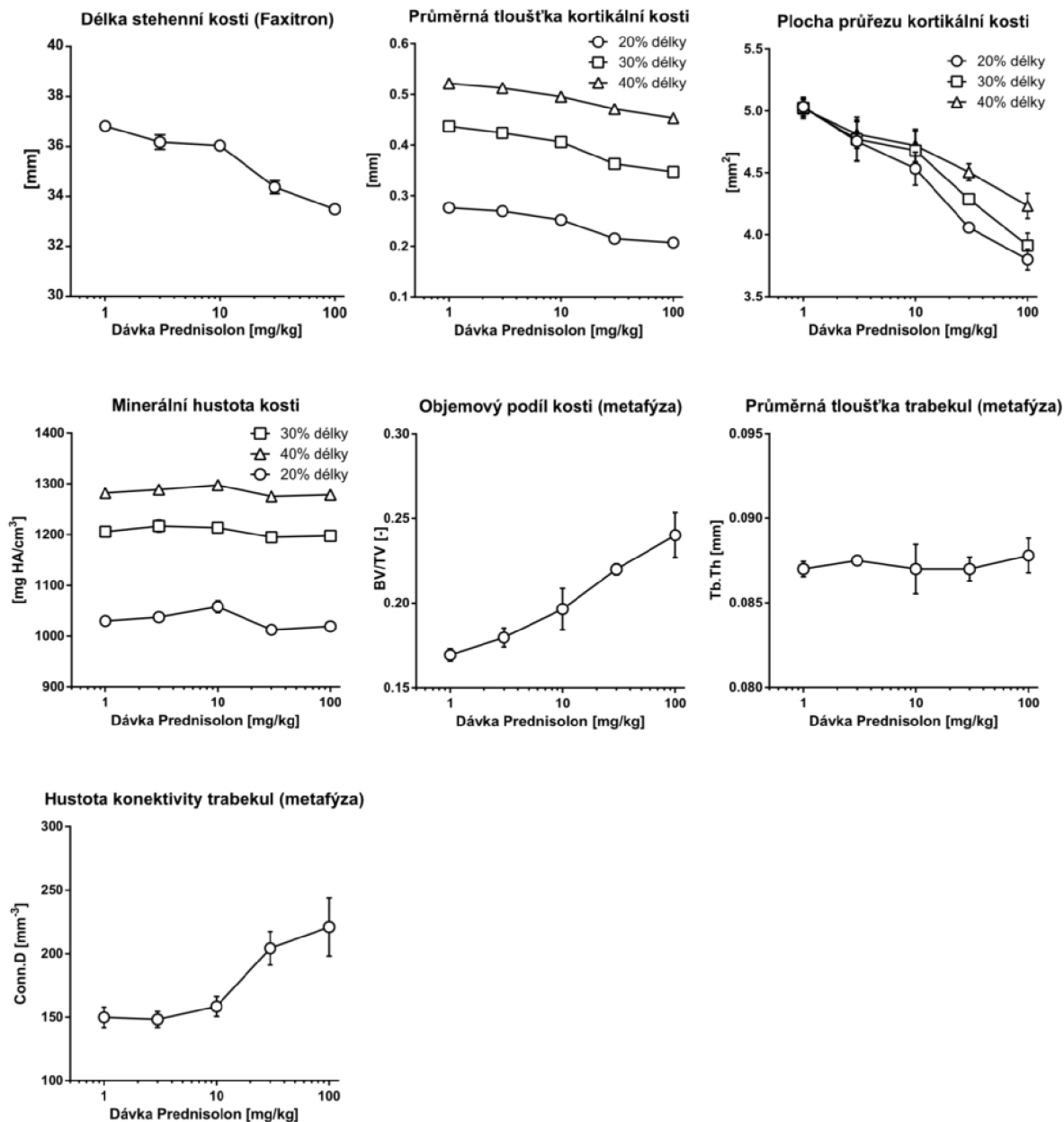
Obrázek 7.11: Rozdíly experimentálních skupin na vybraných morfologických parametrech. Pred@100 je značení pro skupinu kostí léčených Prednisolon o dávce 100 mg/kg.

V případě léčiva Prednisolon je zkoumána také účinnost dávky, proto se zjišťuje křivka závislosti na dávce léku [57]. Závislosti vybraných morfologických parametrů jsou vynešeny do grafů na obrázku 7.12. Prednisolon působí na stehenní kost komplexně. Toto léčivo redukuje růst kosti i kortikální tloušťku kosti. S vyšší dávkou léčivo zvyšuje objem trabekulární kostní hmoty spolu s hustotou konektivity trabekulární struktury. Zvýšení konektivity se však neprojevuje při nízké dávce léčiva (menší jak 10 mg/kg). Minerální hustota kosti a tloušťka trabekulární kosti zůstávají nezměněny.

Poprvé byla provedena analýza epifýzy trabekulární kosti na oblastech specifikovaných kulovou sférou v mediálním, laterálním kondylu a mezi nimi (inter). Výsledky morfolo-

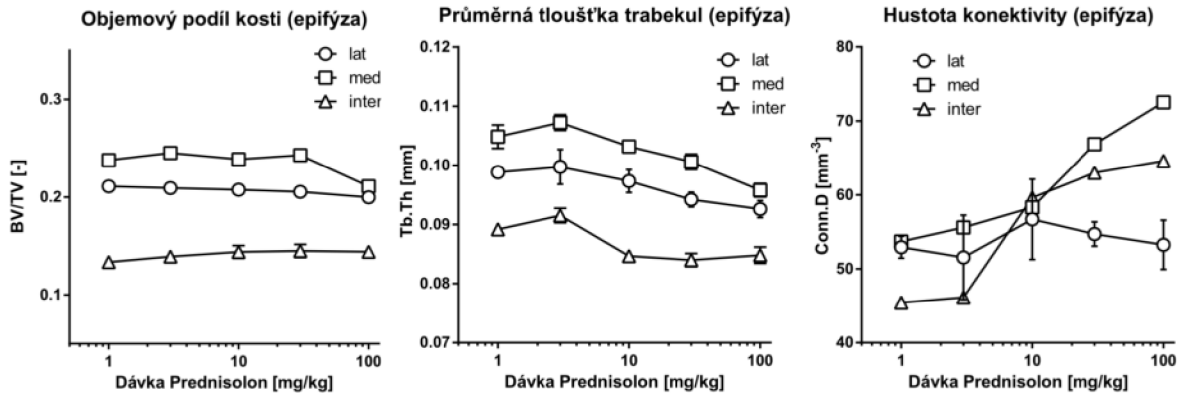
## 7.6. VÝSLEDKY

gických parametrů nepotvrdily významné změny v závislosti na dávce léčiva Prednisolon (Obr. 7.13) s výjimkou hustoty konektivity trabekulární struktury. Hustota konektivity má zvyšující se charakter v závislosti na větší dávce léčiva. V grafech jsou demonstrovány rozdílné výsledky hodnoty mezi jednotlivými sférami. Z tohoto důvodu je nutné morfologické parametry interpretovat zvlášť pro každou oblast.



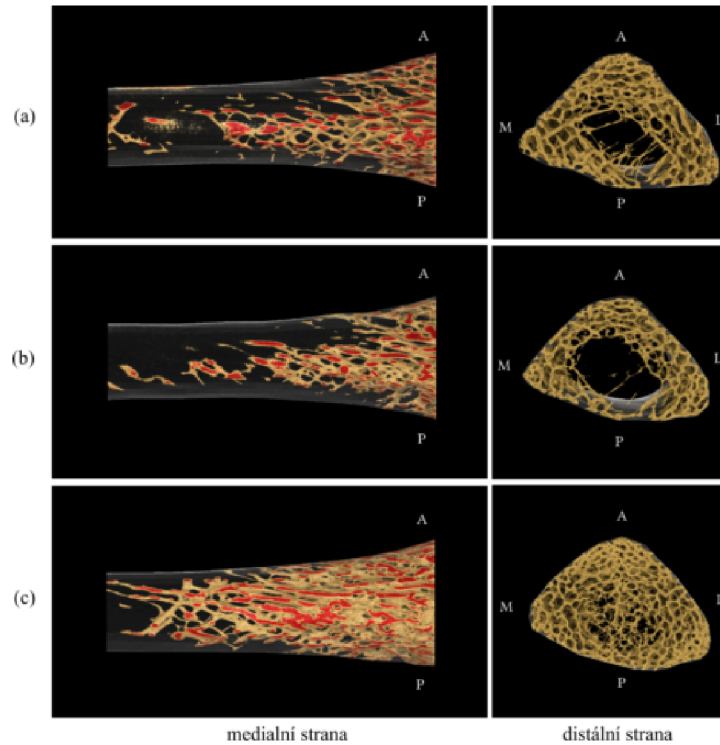
Obrázek 7.12: Závislost dávek Prednisolon. Dávky léčiva Prednisolon jsou zobrazeny pomocí logaritmického měřítka.

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ



Obrázek 7.13: Vybrané morfologické parametry trabekulární kosti v oblasti epifýzy.

### 7.6.2. Vylepšené rendrování



Obrázek 7.14: Vizualizace vnitřního prostoru analyzovaného segmentu stehenní kosti z mediálního a distálního pohledu (pomocí softwaru Drishti). Červenou barvou jsou zobrazeny oblasti připojení trabekul k endostálnímu povrchu kosti. K zobrazení rozdílů byly vybrány reprezentanti skupiny (a) kontrolní (b) Vehicle (c) Pred@100.

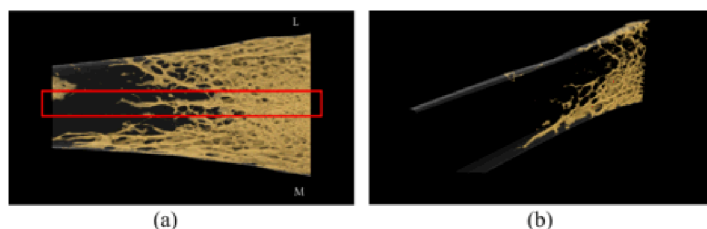
Pomocí vygenerované masky kortikální kosti (sekce 7.5.2) byla vizualizována část stehenní kosti. Masky segmentuje vnitřní a vnější část kosti, což umožňuje jednu z nich odstranit nebo ji přiřadit různé transparentní vlastnosti. Odstraněním kortikální kosti s výjimkou transparentního endostálního povrchu je zobrazena trabekulární struktura kosti. Na obrázku 7.14 jsou touto metodou zpracovány analyzované segmenty kostí z každé experimentální skupiny. U kostí z kontrolní skupiny a ze skupiny Vehicle se v proximálním směru vyskytuje trabekulární struktura převážně na mediální a laterální straně

## 7.6. VÝSLEDKY

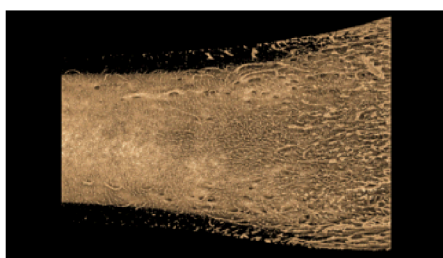
kosti, konkrétněji ve vrcholech trojúhelníkového tvaru. Naopak kost ze skupiny Pred@100 disponuje hustou sítí trabekul v celém vnitřním prostoru a do mnohem větší vzdálenosti v proximálním směru. Tato kost dále ukazuje větší kontaktní plochu trabekul s endostálním povrchem.

Pomocí tohoto zobrazení se podařilo objevit deskovitý útvar u kostí skupiny Pred@100. Tento útvar se vyskytuje vždy na anteriorní straně a prochází středem těla kosti směrem k posteriorní straně. Deskovité trabekulární kosti si lze všimnout na obrázku 7.14(c) distální pohled. Pro lepší ilustraci je přidán axonometrický pohled na výřez okolí útvaru 7.15. Tento útvar může být způsoben odlišným působením mechanického namáhání kosti, při kterém dochází k inicializaci růstu deskového útvaru. Nebo se může jednat pouze o důsledek rychlého růstu trabekulární kosti vlivem látky Prednisolon.

Na obrázku 7.16 je naopak zobrazena struktura kanálků uvnitř kortikální kosti pomocí odstranění periostálního povrchu a vykreslení hodnot pozadí. Tato vizualizace může pomoci k lepšímu porozumění složitosti endostálních cévních kanálků, zejména v případě rychle se modelující endostální kosti. Z tohoto zobrazení je zřejmé, že pro detailnější studium kortikálních kanálků je voxelové rozlišení  $8 \mu\text{m}$  nedostačující.



Obrázek 7.15: Vizualizace deskového útvaru segmentu stehenní kosti léčené látkou Pred@100 z posteriorního pohledu (a) a axonometrického pohledu výřezu segmentu (b), který je vyznačen červeně v obrázku (a).

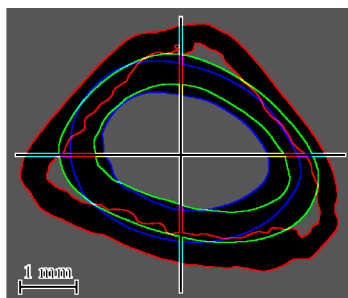


Obrázek 7.16: Vizualizace kortikálních kanálků analyzovaného segmentu stehenní kosti z kontrolní skupiny. Obraz je vytvořen pomocí povrchového vykreslení (renderování) a odstranění periostálního povrchu. Zobrazení je realizováno pomocí softwaru Drishti.

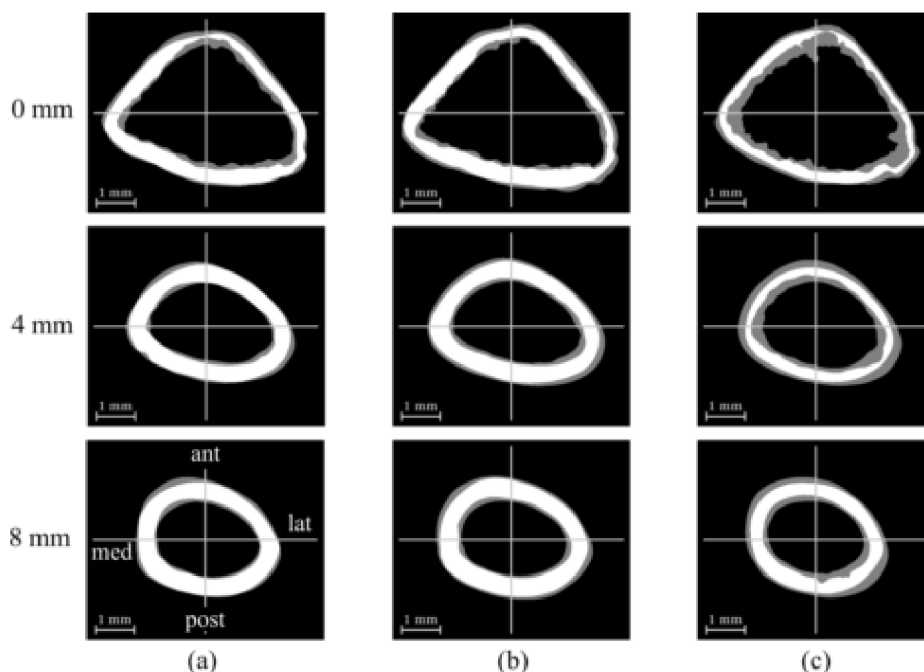
### 7.6.3. Studium změn tvaru kosti

Z binární masky kortikální kosti segmentu distální oblasti, který byl specifikován v sekci 7.5.3, byly vytvořeny obrázky v délce 0 mm, 4 mm a 8 mm podél segmentu. Po standardizaci kosti v souřadném systému mají příčné řezy stejnou orientaci. Posteriorní strana kosti je zobrazena ve spodním okraji a laterální na pravém okraji obrázku. Pozice centrální osy kosti je umístěna ve středu obrázku, aby bylo možné příčné řezy jednoduše překrýt.

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ



Obrázek 7.17: Příklad změny tvaru neléčené kosti s přiřazením barev: červená barva k hladině 0, zelená barva k hladině 4 a modrá barva k hladině 8.



Obrázek 7.18: Výsledek logických operací na hladinách 0 mm, 4 mm a 8 mm analyzovaného segmentu v rámci skupin (a) kontrolní, (b) Vehicle, (c) Pred@100. Společné oblasti kostí v rámci skupin jsou zobrazeny bílou barvou, oblasti obsažené ve všech kostech skupiny šedou barvou.

### *0-4-8 mm řezy*

Pro srovnání tvarů kortikální kosti v odlišných hladinách, je možné příčné řezy zobrazit jednoduše pomocí barevného RGB obrazu (Obr. 7.17). Tyto tři příčné řezy přináší globální náhled na síť endostálních přesunů kůry kosti během růstu. Ve většině případů je sekce s nejvíce trojúhelníkovým tvarem na hladině 0 vtěsnána do tvaru elipsy na hladině 4. Během růstu kosti lze předpokládat mnohem větší remodelaci ve všech rozích pomyslného trojúhelníku než po jeho stranách.

### *0-4-8 mm logické operace*

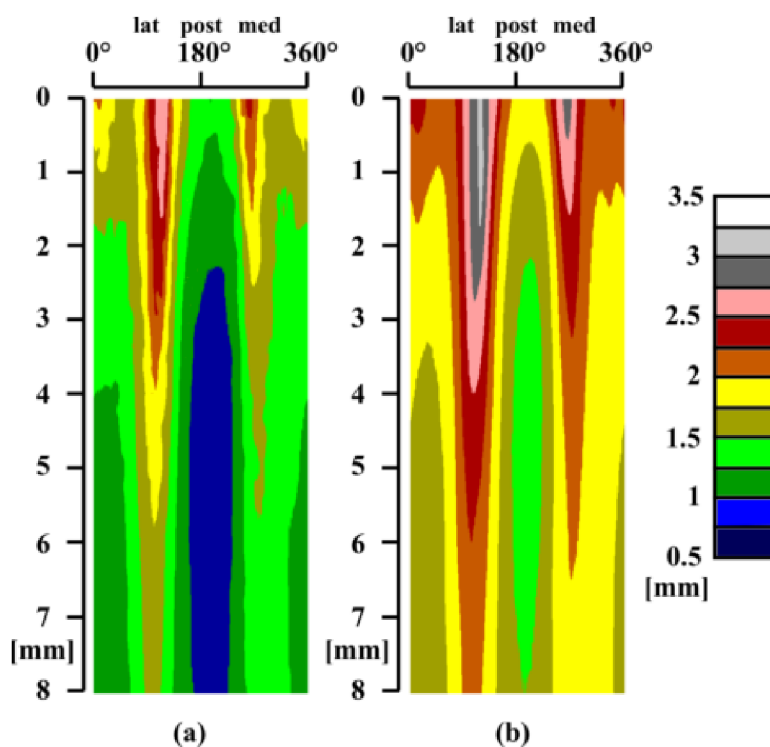
Kombinací příčných řezů v každé hladině analyzovaného segmentu lze zkoumat variabilitu tvaru v rámci jednotlivých skupin. Protože maska kortikální kosti je složena z binárních obrazů, je na daný počet kosti z každé experimentální skupiny aplikována logická ope-

## 7.6. VÝSLEDKY

race konjunkce (AND) nebo disjunkce (OR). První operace ukazuje oblast v rámci každé kosti ve skupině, která je společná. Naopak operace OR zachycuje oblasti, které se nachází v kůře jakékoliv kosti v rámci skupiny. Obrázek 7.18 ukazuje větší variabilitu tvaru kortikální kosti v případě kostí skupiny Pred@100.

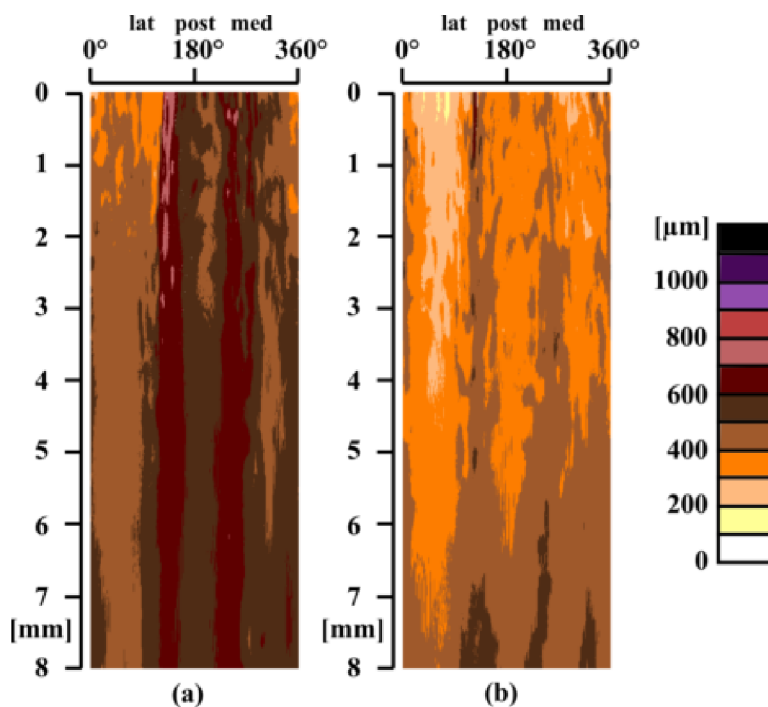
### 7.6.4. Mapování povrchu

Mapy jsou formální reprezentací vzdálenosti povrchu kortikální kosti od centrální osy kosti. V těchto obrazech jsou vzdálenosti podél kosti na vertikální ose a úhlová vzdálenost okolo obvodu kosti je na horizontální ose. Vzdálenosti byly měřeny s rozlišením jednoho stupně. Začátek měření ( $0^\circ$ ) odpovídá anteriornímu směru, ( $90^\circ$ ) laterálnímu, ( $180^\circ$ ) posteriornímu a ( $270^\circ$ ) mediálnímu. Hodnoty zaznamenané v reálných číslech byly převedeny do 8 bitů a zobrazeny pomocí standardní barevné palety. Tato paleta je použita, jak pro vzdálenosti periostálního, tak pro vzdálenosti endostálního povrchu kosti. Srovnáním horní části vnější mapy se spodní částí vnitřní mapy je možné do určité míry vidět překryv (Obr. 7.19). Odečtením vnitřní mapy od vnější je vyprodukována mapa tloušťky kortikální kosti celého segmentu. Pro barevnou interpretaci tlouštěk byla vyrobena speciální barevná škála. Na obrázku 7.20 jsou zřejmé rozdíly tlouštěk kosti z kontrolní skupiny a skupiny Pred@100. Vnější i vnitřní mapy mohou být zprůměrovány v rámci jednotlivých skupin k výpočtu průměrné kosti skupiny. Zprůměrované mapy lze následně odečíst pro zkoumání odlišností mezi skupinami (Obr. 7.21 a 7.22). Zaznamenané rozdíly ukazují podél celého analyzovaného segmentu kulatější tvar kosti ze skupiny Pred@100. Výrazně červené tmavé pruhy v oblasti laterální a mediální jsou přesně těmi místy, které představují vrcholy trojúhelníkového profilu kontrolované skupiny.

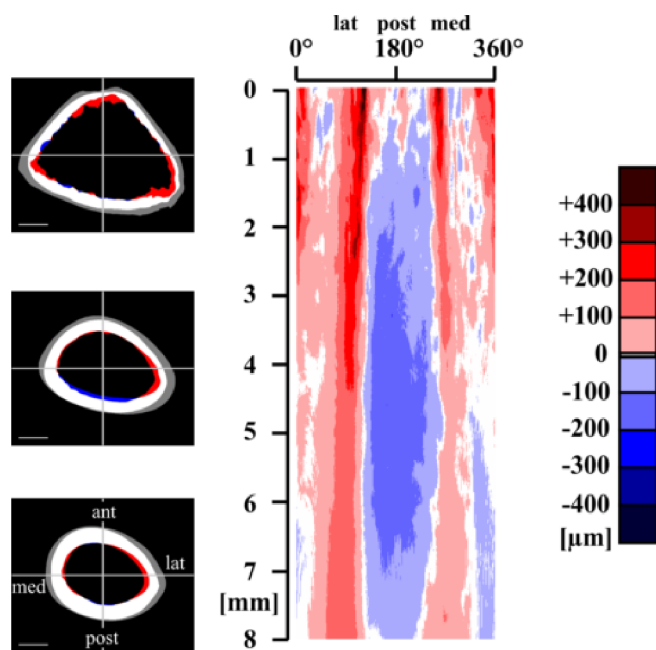


Obrázek 7.19: Příklad mapy vzdáleností endostálního (a) a periostálního (b) povrchu kosti krysy z kontrolní skupiny.

## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ

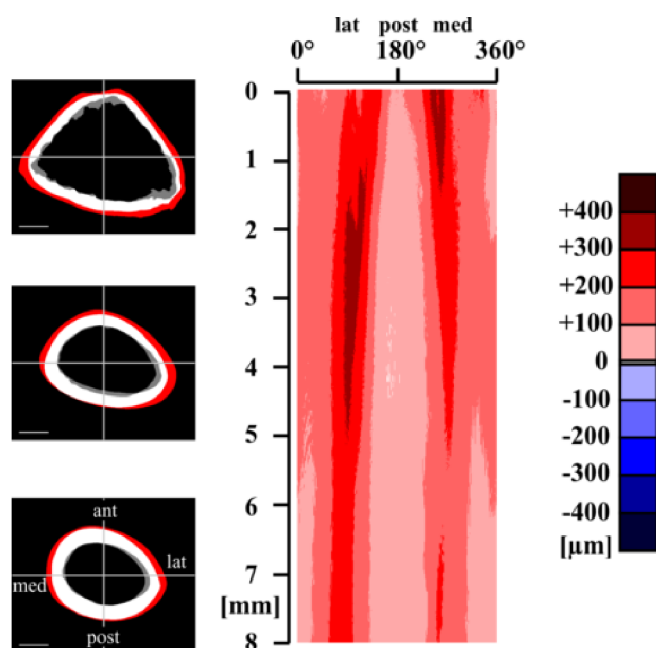


Obrázek 7.20: Mapa tloušťky kortikální kosti získané odečtením mapy vzdáleností endostálního a periostálního povrchu kosti (a) z kontrolní skupiny a (b) ze skupiny Pred@100



Obrázek 7.21: Mapa rozdílů vzdáleností endostálního povrchu mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou látkou Pred@100. Mapy všech kostí skupiny byly zprůměrovány a následně odečteny. Pro přehlednost jsou vlevo uvedeny interpretace rozdílů na příčných řezech od shora 0 mm, 4 mm a 8 mm délky analyzovaného segmentu.

## 7.6. VÝSLEDKY



Obrázek 7.22: Mapa rozdílu vzdáleností periostálního povrchu mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou látkou Pred@100. Mapy všech kostí příslušných skupin byly zprůměrovány a následně odečteny. Pro přehlednost jsou vlevo uvedeny interpretace rozdílu na příčných řezech od shora 0 mm, 4 mm a 8 mm délky analyzovaného segmentu.

### 7.6.5. Systémy kortikálních kanálků

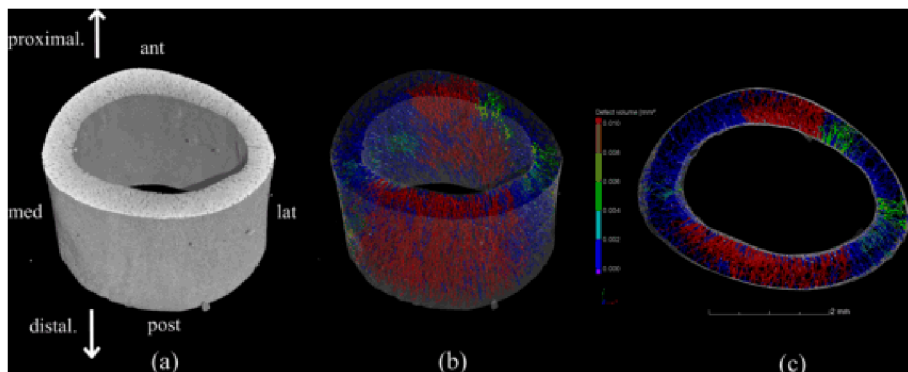
Na segment ze střední oblasti diafýzy kontrolní kosti a kosti léčené látkou Pred@100 byla aplikována analýza pórů v rámci softwaru VG Studio. Barevná vizualizace detekovaných objektů odhalila dva velké komplexy kanálků s objemem větším než  $0,01 \text{ mm}^3$ . Tyto systémy, které jsou vyznačeny červeně na obrázku 7.23, se u kontrolované kosti nachází v anteriorní a posteriorní oblasti, naopak u kosti léčené Pred@100 v laterální a mediální oblasti (Obr. 7.24). S ohledem na dosažené voxelové rozlišení lze ostatní kanálky zobrazené modře nebo zeleně označit za nespojené a odseparované od těchto dvou velkých sítí. V kontextu ostatních analýz realizovaných na kostech lze předpokládat, že větší spojitě sítě kanálků se vyskytují v oblastech se sníženou aktivitou remodelace. V místech, kde se kost formuje, je sice síť kanálků hustší, ale systémy kanálků tvoří jednu kompaktní síť. Pro potvrzení těchto závěrů je nutné provést tuto analýzu na významně větším souboru vzorků.

Stejně tak jako rychlost remodelace v různých částech kosti není stejná, tak ani síť kanálků není rozložena rovnoměrně podél obvodu kortikální kosti. Tento předpoklad podporují vizualizace na obrázku 7.25(a) a 7.26(a), které zobrazují výsledek detekce dutiny z pohledu shora. Obě kosti mají pás okolo vnitřní strany kortikální kosti, kde je znatelná hustší distribuce kanálků. Ty jsou převážně kratší a kolmé k povrchu kosti, což může souviset s endostálním formováním nové kosti. V případě kontrolní kosti se větší koncentrace kanálků nachází na posteriorní a anteriorní oblasti (Obr. 7.25(c)), naopak u kosti léčené Prednisolon na laterální a mediální oblasti (Obr. 7.26(c)). Vizuelní hodnocení je podloženo výpočtem porozity pro jednotlivé segmenty (tabulka 7.1). Tento trend odpovídá změnám tvaru kosti, které byly studovány na vybraných příčných řezech v metafýze (sekce 7.18). Také rozdílové mapy periostálního (Obr. 7.21) a endostálního (Obr. 7.22)

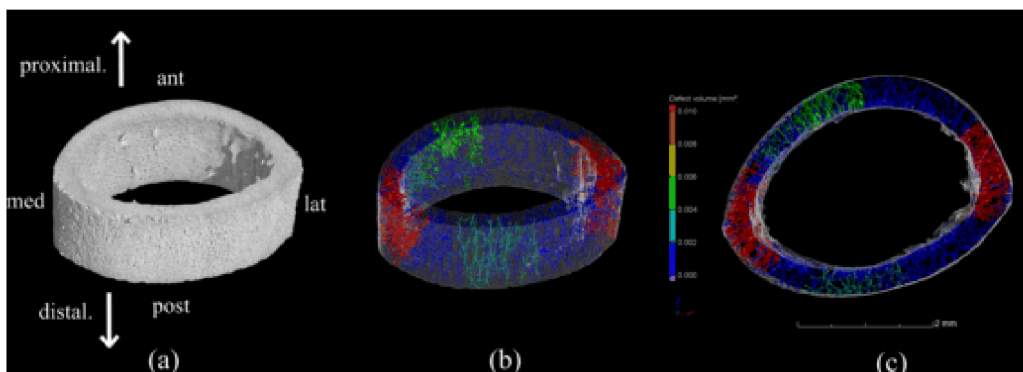


## 7. ANALÝZA CT DAT KONČETIN LABORATORNÍCH KRYŠ

povrchu ukazují mnohem větší přírůstek v laterální a mediální oblasti po celé délce kosti. Na základě těchto skutečností lze konstatovat, že u kosti skupiny Pred@100 je remodelace aktivnější na stranách laterální a mediální, aby mohla vytvořit mnohem kulatější profil kosti z trojúhelníkového tvaru, který je typický pro kosti neléčené.



Obrázek 7.23: Vizualizace systémů kortikálních kanálek distální části levé stehenní kosti z kontrolní skupiny. (a) Objemové rendrování oblasti zkoumané analýzou pórů, (b) zobrazení detekovaných systémů barevně kódovaných podle objemové velikosti, (c) pohled z proximálního směru.

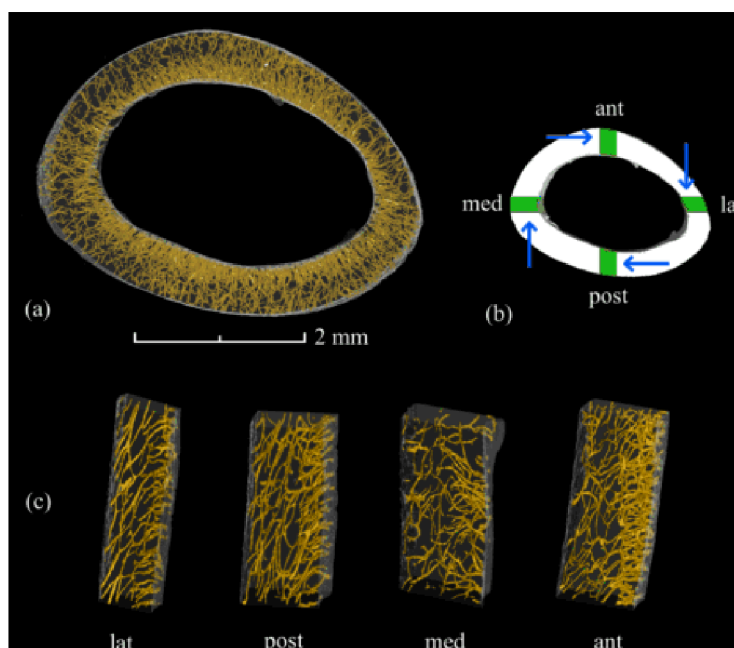


Obrázek 7.24: Vizualizace systémů kortikálních kanálek distální části levé stehenní kosti ze skupiny Pred@100. (a) Objemové rendrování oblasti zkoumané analýzou pórů, (b) zobrazení detekovaných systémů barevně kódovaných podle objemové velikosti, (c) pohled z proximálního směru.

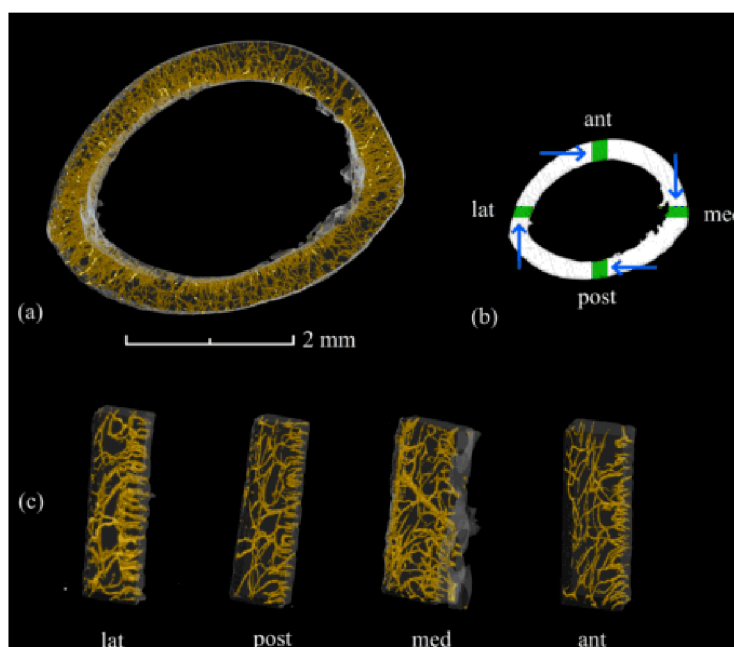
Tabulka 7.1: Procentuální vyjádření porozity v jednotlivých segmentech.

kost ze skupiny	lat	ant	med	post
neléčená	1.86%	2.55%	1.41%	2.24%
Pred@100	4.18%	1.38%	2.92%	1.65%

## 7.6. VÝSLEDKY



Obrázek 7.25: Hustota kortikálních kanálků v hlavních směrech levé stehenní kosti z kontrolní skupiny. (a) Proximální pohled na analyzovanou část stehenní kosti o výšce přibližně 1,4 mm, (b) vyznačení jednotlivých segmentů (zelené oblasti) a směrů (modré šipky), ze kterých byly segmenty zobrazeny, (c) axonometrický pohled na segmenty.



Obrázek 7.26: Hustota kortikálních kanálků v hlavních směrech levé stehenní kosti ze skupiny Pred@100. (a) Proximální pohled na analyzovanou část stehenní kosti o výšce přibližně 1,4 mm, (b) vyznačení jednotlivých segmentů (zelené oblasti) a směry (modré šipky), ze kterých byly segmenty zobrazeny, (c) axonometrický pohled na segmenty.

## 7.7. Závěr

V rámci této práce byla na tomografických datech krysích stehenních kostí realizována analýza kortikální a trabekulární kosti dle standardních postupů hodnocení mikrostruktury kostí hlodavců. Těmito postupy byla také zcela poprvé analyzována trabekulární struktura epifýzy kosti, která bývá v literatuře často opomíjena. Analýza epifýzy byla provedena pomocí programu BoneJ, pro který byl navržen způsob výběru analyzované oblasti.

Pro sjednocení orientace a pozice kostí v tomografických datech byla navržena metoda standardizace kosti v CT datech. Tato metoda srovnává anatomické směry kosti s okraji obrazu na základě charakteristických rysů kosti, tj. přímého těla distální poloviny stehenní kosti a pozice obou kondylů. Jednotná orientace kostí v CT datech umožňuje jednotlivé výsledky analýz kostí porovnat mezi experimentálními skupinami a ulehčuje orientaci v tomografických datech. Tento postup úpravy CT dat doporučujeme také provést před standardními technikami hodnocení mikrostruktury kosti, kde jsou výsledky ovlivněny náklonem kosti v CT datech.

Ve spolupraci s Ing. L. Kvasnicou byl vyvinut algoritmus pro automatické odstranění trabekulární kosti z CT zobrazení v oblasti metafýzy. Tento algoritmus je založen na 3D mediánové filtraci binárních dat. Výsledkem je binární maska, která idealizuje tvar kortikální kosti, to znamená, že neobsahuje kanálky a okraje kortexu jsou vyhlazeny. Pro takto upravená data byl navržen způsob studia změn tvaru průřezu kosti, které bylo demonstrováno na 3 vybraných virtuálních příčných řezech. Dále navrhuje, aby binární maska kortikální kosti byla použita pro výpočet obvodu kortikální kosti. Tímto postupem by byl potlačen vliv členitosti resorpčního povrchu a kortikálních kanálek vystupujících na povrch kosti. Pomocí binární masky kortikální kosti se také podařilo vizualizovat vnitřní prostor, díky němuž byl objeven deskovitý útvar trabekulární struktury v kostech skupiny léčené látkou Prednisolon.

Pro studium změn periostálního a endostálního povrchu kosti vlivem podávaných léků byla představena nová metoda pro měření vzdálenosti obou povrchů kortikální kosti od referenční osy kosti. Výsledky měření jsou interpretovány pomocí 2D matice nazývané mapa vzdáleností. Tato interpretace umožňuje s výsledky provádět matematické operace a získat tloušťku stěny kortikální kosti nebo rozdíly mezi experimentálními skupinami podél celého analyzovaného segmentu. Touto metodou je možné kvantifikovat morfologické rozdíly kostí mezi experimentálními skupinami, které jsou ovlivněny účinky daného léku.

Aktivita remodelačního mechanismu byla také studována na síti kortikálních kanálek. Pro tento účel bylo realizováno tomografické měření s voxelovým rozlišením  $3\ \mu\text{m}$ . Pro hodnocení sítě kanálek byl navržen způsob využití defektoskopického nástroje pro analýzu pórovitosti. Tímto způsobem byla po obvodu průřezu kostí zjištěna různorodá hustota kortikálních kanálek, která pravděpodobně souvisí s remodelací kostí.

*Budoucí směry práce.*

Oproti standardním analýzám kortikální kosti poskytují mapy vzdáleností informace podél celého analyzovaného segmentu dlouhé kosti. 2D maticová interpretace dovoluje jednoduchou manipulaci pro srovnání a zobrazení rozdílů mezi experimentálními skupinami. Orientace v samotných mapách může být bez 3D kontextu celé stehenní kosti náročnější. Proto navrhuje zobrazit mapy v příslušných barevných škálách na povrch modelu kosti, tím by měl operátor přehled o umístění jednotlivých oblastí.

## 7.7. ZÁVĚR

Analýza systému kortikálních kanálků na CT datech s vysokým rozlišením ukázala, že má potenciál pomoci porozumět remodelačním procesům dlouhé kosti. Z tohoto důvodu by mělo smysl vygenerovat také mapy hustoty kortikálních kanálků a připojení kanálků s endostálním nebo periostálním povrchem. Korelace těchto map s mapami tloušťek kortikální kosti nebo mapami rozdílů mezi experimentálními skupinami by mohla přinést nové informace k remodelaci kosti.

V uvedených přístupech analyzování stehenní kosti je nutné brát ohled na velikost zvířete, která je v experimentálních skupinách různá a negativně ovlivňuje získané výsledky. Rozdílná velikost stehenních kostí hraje roli především při porovnání experimentálních skupin. Průměr kosti v oblasti metafýzy je proměnný v poměru s délkou stehenní kosti. Mapování vzdáleností povrchu této oblasti by tak mělo začít v určitém procentu délky kosti od referenční hladiny, nikoliv v konstantní vzdálenosti. Navíc by i délka mapy musela mít známou závislost na velikosti kosti, aby bylo možné spolehlivě porovnat mapy prezentující shodnou oblast odlišných kostí.

## 8. Shrnutí

V dizertační práci jsem se zabýval zpracováním, vizualizací a interpretací dat biologických experimentů v digitální holografické mikroskopii a rentgenové počítačové tomografii. Práce je rozdělena do dvou částí dle jednotlivých zobrazovacích technik. V obou oblastech je věnována jedna kapitola biologickému pozadí problematiky k osvětlení podstaty požadavků na zpracování dat. Na základě těchto požadavků byly pro každou oblast stanoveny cíle práce.

První část je zaměřena na zpracování kvantitativního fázového obrazu z digitálního holografického mikroskopu, který je vhodným nástrojem pro neinvazivní pozorování živých buněk. Návrh nového algoritmu pro zpracování fázových obrazů buněk splňuje všechny stanovené cíle. Algoritmus pracuje automaticky v režimu časosběrného snímání, je nezávislý na volbě objektivů mikroskopu, řeší možný fázový posun mezi sousedními snímky a automaticky segmentuje zvolenou buňku. Popsaný algoritmus je již implementován v softwaru koherenci řízeného holografického mikroskopu nové generace. Princip zpracování fázových obrazů byl publikován v časopise *Journal of Microscopy*. Metoda zpracování fázových obrazů může být použita pro různé typy buněk, nejen rakovinných. Budoucí vývoj algoritmu by se měl ubírat směrem k přesnějšímu určení hranice buňky, která hraje roli při optickém vážení buňky.

Druhá část práce je zaměřena na zpracování tomografických dat krysích kostí, konkrétně na analýzu mikrostruktury distální poloviny stehenních kosti za účelem výzkumu vlivu různých léčiv na růst kosti. Pro studium změn vnitřního a vnějšího povrchu kosti, na základě nichž lze pozorovat vliv podávaných léčiv, byla vyvinuta nová metoda měření vzdálenosti obou povrchů kortikální kosti k centrální ose kosti. Ta umožňuje kvantifikovat morfologické rozdíly mezi experimentálními skupinami. Získáním těchto výstupů byly splněny stanovené cíle práce. Měření vzdáleností předchází příprava tomografických dat kosti. Pro tento účel byl navržen postup standardizace orientace kosti v tomografických řezech a algoritmus pro automatické odstranění trabekulární kosti. Tento postup standardizace CT dat navrhujeme provádět pro všechna měření, ve kterých je cílem srovnat výsledky analýz mezi jednotlivými vzorky. Nad rámec stanovených cílů práce byla také studována síť kortikálních kanálků na vybraných segmentech. Dílčí výsledky práce byly publikovány na vědeckých konferencích Winter Meeting of the Anatomical Society (2011), Winter Meeting of the Anatomical Society (2012) a 17th International Inflammation Research Association Conference (2012). Další vývoj metody měření vzdálenosti kortikálních povrchů vidím v doplnění informací o hustotě kortikálních kanálků a jejich připojení k endostálnímu povrchu. Tyto výsledky by mohly přispět k objasnění remodelačních procesů dlouhé kosti.

# Literatura

- [1] KOLMAN, P.: *Koherenci řízená holografická mikroskopie*. [Dizertační práce.], Brno: VUT, FSI, 2010, 69 s.
- [2] KOLMAN, P. and CHMELÍK, R.: Coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Express.*, 2010, vol. 18, p. 21990-22003. ISSN 1094-4087. DOI: 10.1364/OE.18.021990.
- [3] SLABÝ, T. et al.: Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Express.*, 2013, vol. 21, p. 14747-14762. ISSN 1094-4087. DOI: 10.1364/OE.21.014747.
- [4] KREIS, T.: Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1986, vol. 3, p. 847-855. ISSN 0740-3232. DOI: 10.1364/JOSAA.3.000847.
- [5] JANEČKOVÁ, H.: *Interferenční mikroskope biologických vzorků*. [Dizertační práce], Brno: VUT, FSI, 2006, 66 s.
- [6] STRAND, J., TAXT, T. and JAIN, A. K.: Two-dimensional phase unwrapping using a block least-square method. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1999, vol. 8, p. 375-386. ISSN 1057-7149. DOI: 10.1109/83.748892.
- [7] GHIGLIA, D. C. and PRITT, M. D.: *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms and Software*. New York: Wiley-Interscience, 1998. 512 p. ISBN: 978-0-471-24935-1.
- [8] DUNN, G. A. and ZICHA, D.: Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1993, vol. 47, p. 91-106.
- [9] MIR, M., et al.: Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.s*, 2011, vol. 108, p. 13124-13129.
- [10] GIRSHOVITZ, P. and SHAKED, N. T.: Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization. *Biomed Opt Express*, 2012, vol. 3, p. 1757-1773. ISSN: 2156-7085. DOI: 10.1364/BOE.3.001757.
- [11] JANEČKOVÁ, H., VESELÝ, P. and CHMELÍK, R.: Proving Tumour Cells by Acute Nutritional/Energy Deprivation as a Survival Threat: A Task for Microscopy. *Anti-cancer Res.*, 2009, vol. 29, p. 2339-2345. ISSN 0250-7005.
- [12] DUNN, G. A. and ZICHA, D.: Dynamics of fibroblast spreading. *J. Cell. Sci.*, 1995, vol. 108, p. 1239-1249.
- [13] MALINA, R.: *Optická tomografie a rentgenová mikrotomografie*. [Dizertační práce.] Brno: VUT, FSI, 2007. 96 s.
- [14] CHRÁSKA, M.: *Metody pedagogického výzkumu*. Grada Publishing, a.s., 2007. 265 s. ISBN 80-247-1369-1.

- [15] MANN, C. J., et al.: High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics Express*, 2005, vol. 13, p. 8693-8698. ISSN: 1094-4087. DOI: 10.1364/OPEX.13.008693.
- [16] QU, W., et al.: Quasi-physical phase compensation in digital holographic microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2009, vol. 26, p. 2005-2011. ISSN: 1084-7529. DOI: 10.1364/OL.34.001276.
- [17] WEIJUAN, Q., et al.: Digital holographic microscopy with physical phase compensation. *Optics Letters*, 2009, vol. 34, p. 1276-1278. ISSN: 0146-9592. DOI: 10.1364/OL.34.001276.
- [18] FERRARO, P., et al.: Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging. *Appl. Opt.*, 2003, vol. 42, p. 1938-1946. ISSN: 0003-6935. DOI: 10.1364/AO.42.001938.
- [19] CUCHE, E., MARQUET, P. and DEPEURSINGE, C.: Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl. Opt.*, 1999, vol. 38, p. 6994-7001. ISSN: 0003-6935. DOI: 10.1364/AO.38.006994.
- [20] COLOMB, T., et al.: Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation. *Appl. Opt.*, 2006, vol. 45, p. 851-883. ISSN: 0003-6935. DOI: 10.1364/AO.45.000851.
- [21] COLOMB, T., et al.: Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.*, 2006, vol. 23, p. 3177-3190. ISSN: 1084-7529. DOI: 10.1364/JOSA.23.003177.
- [22] ZUO, C., et al.: Phase aberration compensation in digital holographic microscopy based on principal component analysis. *Opt. Lett.*, 2013, vol. 38, p. 1724-1726. ISSN 1539-4794. DOI: 10.1364/OL.38.001724.
- [23] DI, J., et al.: Phase aberration compensation of digital holographic microscopy based on least squares surface fitting. *Opt. Commun.*, 2009, vol. 282, p. 3873-3877. ISSN: 0030-4018. DOI: 10.1016/j.optcom.2009.06.049.
- [24] SEO, K. W., et al.: Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy. *Opt. Lett.*, 2012, vol. 37, p. 4976-4978. ISSN: 0146-9592. DOI: 10.1364/OL.37.004976.
- [25] SÁNCHEZ-ORTIGA, E., et al.: Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy: comment. *Opt. Lett.*, 2014, vol. 39, p. 417-417. ISSN 0146-9592. DOI: 10.1364/OL.39.000417.
- [26] ZICHA, D. and DUNN, G. A.: An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *J. Microsc.*, 1995, vol. 179, p. 11-21. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1995.tb03609.x.

## LITERATURA

- [27] MINETTI, C., et al.: Fully automated digital holographic processing for monitoring the dynamics of vesicle suspension under shear flow. *Biomed. Opt. Express*, 2014, vol. 5, p. 1554-1568. ISSN: 2156-7085. DOI: 10.1364/BOE.5.001554.
- [28] ZIKMUND, T., et al.: Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of SPIE 7746, 2010, p. 77460-1. ISBN 978-80-554-0238-3.
- [29] ASANO, T. and TANAKA, H.: In-place Algorithm for Connected Components Labeling. *Journal of Pattern Recognition Research*, 2010, vol. 5, p. 10-22.
- [30] ANTOŠ, M., et al.: System for coherence-controlled holographic microscopy of living cells. In *18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proc. SPIE 8697, 2012, p. 869712-6. ISBN: 978-80-244-3408-7.
- [31] BENEŠ, M. a MAROŠ, B.: Vyjádření přetvárného odporu a měrné přetvárné práce materiálu 13240 v závislosti na teplotě a logaritmickém stupni přetvoření. *Hutnické listy*, 1985, roč. 3, s. 191-196.
- [32] ELLIOTT, J. C. and DOVER, S. D.: X-ray microtomography. *J. Microsc.*, 1982, vol. 126, p. 211-213. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1982.tb00376.x.
- [33] BONSE, U. and BUSCH, F.: X-ray computed microtomography ( $\mu$ CT) using synchrotron radiation (SR). *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1996, vol. 65, p. 133-169.
- [34] BRUNKE, O.: Comparison between X-ray tube based and synchrotron radiation based  $\mu$ CT. *Developments in X-Ray Tomography VI*. Proc. SPIE 7078, 2008, p. 1-9. ISSN: 0277-786X. DOI: 10.1117/12.794789.
- [35] FELDKAMP, L. A., DAVIS, L. C. and KRESS, J. W.: Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1984, vol. 1, p. 612-619. DOI: 10.1364/JOSAA.1.000612.
- [36] BAVENDIEK, K., et al.: New measurement methods of focal spot size and shape of X-ray tubes in digital radiological applications in comparison to current standards. In *Radiography*. Proceedings of 18th World Conference on Nondestructive Testing, Durban, South Africa, 2012, ISBN: 978-0-620-52872-6.
- [37] ČIHÁK, R.: *Anatomie 1*. Grada, 2001, 497 s. ISBN 80-7169-970-5.
- [38] ENLOW, D. H.: *The human face: an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton*. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row, 1968.
- [39] ENLOW, D. H.: *Principles of bone remodeling: an account of post-natal growth and remodeling processes in long bones and the mandible*. Springfield, Ill: Thomas, 1963.
- [40] BERNHARD, J., et al.: Use of the fluorescent calcite marker calcein to label foraminiferal tests. *Journal of Foraminiferal Research*, 2004, vol. 34, p. 96-101. ISSN: 0096-1191. DOI: 10.2113/0340096



- [41] PAUTKE, C., et al.: Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone*, 2005, vol. 37, p. 441-445. ISSN: 8756-3282. DOI: 10.1016/j.bone.2005.05.008.
- [42] SUZUKI, H. and MATHEWS, A.: Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein. *Stain Technology*, 1966, vol. 41, p. 57-60. DOI: 10.3109/10520296609116280
- [43]  $\mu$ CT 40. SCANCO Medical. [online]. 15.8.2014 [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: <http://www.scanco.ch/en/systems-solutions/specimen/microct40.html>
- [44] LI, L., et al.: A new cone-beam X-Ray CT system with a reduced size planar detector. *High energy physics and nuclear physics-chinese edition*, 2006, vol. 30, p. 812-817. ISSN: 0254-3052. DOI: 10.1016/j.apradiso.2007.01.023.
- [45] NOO, F., CLACKDOYLE, R. and PACK, J.: A two-step Hilbert Transform method for 2D image reconstruction. *Phys. Med. Biol.*, 2004, vol. 49, p. 3903-3923. ISSN: 0031-9155. DOI: 10.1088/0031-9155/49/17/006.
- [46] DAVIS, G., JAIN, N. and ELLIOTT, J.: A Modelling Approach to Beam Hardening Correction. In *Developments in X-ray tomography VI*. Proc. SPIE 7078, 2008, p. 70781E. ISBN: 9780819472984
- [47] Microfocus Computed Tomography System (micro CT) - v|tome|x l 240 - GE phoenix X-ray. GE Measurements & Control. [online]. 15.8.2014 [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: <http://www.ge-mcs.com/en/radiography-x-ray/ct-computed-tomography/vtomex-l-240.html>
- [48] HSIEH, J.: *Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances*. SPIE Press, 2003. 510 p. ISBN: 978-0-470-56353-3.
- [49] STARMAN, J.: *Lag correction in amorphous silicon flat-panel X-ray Computed Tomography*. [PhD thesis], Stanford University, United States, 2010. 113 p.
- [50] BOUXSEIN, M. L., et al.: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, vol. 25, p. 1468-1486. ISSN: 0884-0431, DOI: 10.1002/jbmr.141.
- [51] MULLER, R., et al.: Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*, 1998, vol. 23, p. 59-66. ISSN: 8756-3282. DOI: 10.1016/S8756-3282(98)00068-4.
- [52] THOMSEN, J., et al.: Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J. Microsc.* 2005, vol. 218, p. 171-179. ISSN: 0022-2720. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2005.01469.x.
- [53] MARCIÁN, P.: *Biomechanická studie zubních implantátů pro sníženou densitu kostní tkáně*. [Dizertační práce], Brno: VUT, FSI, 2012. 145 s.
- [54] DOUBE, M., et al.: BoneJ: free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, 2010, vol. 47, p. 1076-1079. ISSN 1873-2763.

## LITERATURA

- [55] LORENSEN, W. E. and CLINE, H. E.: Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm. In *Proceedings of the 14th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*. 1987, p. 163-169. ISBN:0-89791-227-6.
- [56] ODGAARD, A.: Quantification of Cancellous Bone Architecture. In COWIN, S.C.: *Bone Mechanics Handbook*. CRC Press, 2001, 19 p. ISBN: 978-1-4200-3658-9.
- [57] SEED, M., et al.: Development of a robust rat model of glucocorticoid induced osteoporosis as assessed by microCT, SEM, and confocal LM. In *Inflammation research*. 17th International Inflammation Research Association Conference, 2012, 23 p. ISSN 1023-3830.

## Seznam vlastních publikací

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., LOVICAR, L., UHLÍŘOVÁ, H., CHMELÍK, R.: Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In *Proceedings of SPIE*, 2010, p. 77460K-1. ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., BOYDE, A.: Correlation between 3D imaging methods in studying bone architecture: SEM, microCT and confocal LM. *Journal of Anatomy*, 2012, vol. 221, p. 86-86. ISSN: 0021-8782.

ZIKMUND, T., PETRILAK, M., NOVOTNÝ, J., LIŠKA, M., KAISER, J.: Kontrola rozměrů koncovky optického vlákna pomocí počítačové tomografie. *Jemná mechanika a optika*, 2013, roč. 2013, č. 6, s. 181-183. ISSN: 0447-6441.

ZIKMUND, T., PETRILAK, M., KAISER, J.: Rentgenová počítačová tomografie pro analýzu odlitků, defektoskopii a kontrolu rozměrů. In *Sborník recenzovaných příspěvků 2013 konference Zkoušení a jakost ve stavebnictví*, 2013, p. 429-438. ISBN: 978-80-214-4777-6.

HOBST, L., BÍLEK, P., ANTON, O., ZIKMUND, T.: Tomografické zjištění anomálního rozdělení drátků v kalibračních vzorcích drátkobetonu. In *20. Betonářské dny*, 2013. ISBN: 978-80-87158-34-0.

SEED, M., ZIKMUND, T., KVASNICA, L., BURNET, M., BOYDE, A., RAY, D.: Development of a robust rat model of glucocorticoid induced osteoporosis as assessed by microCT, SEM, and confocal LM. In *Inflammation research*. 17th International Inflammation Research Association Conference, 2012, 23 p. ISSN 1023-3830.

FRIML, J., PROCHÁZKOVÁ, K., MELNYK, G., ZIKMUND, T., KAISER, J.: Investigation of cheb relief intarsia and the study of the technological process of its production by micro computed tomography. *Journal of cultural heritage*, 2014, vol. 15: p. 1-5. ISSN: 1296-2074.

BÍLEK, P., HOBST, L., ZIKMUND, T.: Využití počítačové tomografie pro kontrolu homogenity drátkobetonu. In *Sborník příspěvků ExFoS - Expert Forensic Science XXIII. mezinárodní vědecká konference soudního inženýrství.*, 2014, p. 37-44. ISBN 978-80-214-4852-0.

BASSETT, J. H., BOYDE, A., ZIKMUND, T., EVANS, H., CROUVHER, P. I., ZHU, X., PARK, J. W., CHENG, S. Y., WILLIAMS, G. R.: Thyroid hormone receptor  $\alpha$  mutation causes a severe and thyroxine-resistant skeletal dysplasia in female mice. *Endocrinology*, 2014, p. 1-15, 2014. ISSN: 1945-7170.

BOYDE, A., DAVIS, G. R., MILLS, D., ZIKMUND, T., COX, T. M., ADAMS, V. L., NIKER, A., WILSON, P. J., DILLON, J. P., RANGANATH, L. R., JEFFERY, N., JARVIS, J. C., GALLAGHER, J. A.: On fragmenting, densely mineralised a cellular protrusions into articular cartilage and their possible role in osteoarthritis. *J. Anat.*, 2014, p. 1-11. ISSN 0021-8782.

ZIKMUND, T., BRADA, M., ZATOČILOVÁ, A., PETRILAK, M., KAISER, J.: Kontrola rozměrů redukce objektivu a kamery pomocí rentgenové počítačové tomografie. *Jemná mechanika a optika*, 2014, roč. 59, č. 6-7, s. 186-189. ISSN: 0447-6441.

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., TÝČ, M., KŘÍŽOVÁ, A., ČOLLÁKOVÁ, J., CHMELÍK, R.: Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*. 2014, 9 p. DOI: 10.1111/jmi.12165.

## Revidovaný rukopis

MINÁRIKOVÁ, A., FICTUM, P., ZIKMUND, T., JEKL. V.: Periodontitis in a pet guinea pig (*Cavia porcellus*). *Journal of Small Animal Practice*. Druhá revize 9. srpna 2014.

SVOBODA, J., HLADILOVÁ, Š., HORÁČEK, I., KAISER, J., KRÁLÍK, M., NOVÁK, J., NOVÁK, M., POKORNÝ, P., SÁZELOVÁ, S., SMOLÍKOVÁ, L., ZIKMUND, T.: Dolní Věstonice IIa. Gravettian microstatigraphy, environment, and the origin of baked clay production in Moravia. *Quaternary International*. Revize 3. června 2014.

## 9. Seznam použitých zkratek a symbolů

T-CCHM	Transmisní koherencí řízený holografický mikroskop
DHM	Digitální holografická mikroskopie
DM	Difrakční mřížka
MO	Mikroskopový objektiv
QPI	Kvantitativní fázové zobrazení
IFFT	Inverzní Fourierova transformace
BLS	Metoda nejmenších čtverců v blocích
MNČ	Metoda nejmenších čtverců
MVNČ	Metoda vážených nejmenších čtverců
$\Phi$	Navázaný fázový obraz
$\Phi_{comp}$	Kompenzovaný fázový obraz
$\Phi_{comp}^*$	Částečně kompenzovaný fázový obraz
$\Phi_{CELL}$	Fázový obraz sledované buňky
$M_{CELL}$	Maska buněk
$M_{NUCL}$	Maska jader
$M_{BG}$	Maska pozadí
$P$	Kompenzační plocha
$t$	Testovací kritérium
$t_{CELL}$	Prahovací hodnota pro buňky
$t_{NUCL}$	Prahovací hodnota pro jádra
$c$	Specifická konstanta
$F$	Fuzzy maska
$B$	Binární maska
$\varphi$	Hodnota fáze
$\mu$	Střední hodnota
$\sigma$	Směrodatná odchylka

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\mu$ CT	Rentgenová počítačová mikrotomografie
CBCT	Počítačová tomografie s trajektorií po kružnici
SR $\mu$ CT	Počítačová mikrotomografie se synchrotronovým zdrojem záření
Pred@100	Léčivo Prednisolon v dávce 100 mg/kg
VOI	Tří-dimenzionální oblast zájmu
CSA	Plocha průřezu kosti
BV	Objem kostní tkáně
TV	Celkový objem analyzované oblasti
BS	Plocha povrchu kosti
Tb.Th	Průměr trabekulární tloušťky
Tb.Sp	Průměr trabekulárního meziprostoru
Conn.D	Hustota konektivity