



# Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné zobrazování

## Diplomová práce

*Studijní program:* N3963 – Biomedicínské inženýrství  
*Studijní obor:* 3901T009 – Biomedicínské inženýrství  
*Autor práce:* **Bc. Jakub Štoček**  
*Vedoucí práce:* doc. Ing. Daniel Jirák, Ph.D.





# Construction of three dimensional optical imaging scanner

## Master thesis

*Study programme:* N3963 – Biomedical engineering  
*Study branch:* 3901T009 – Biomedical Engineering  
*Author:* **Bc. Jakub Štoček**  
*Supervisor:* doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.



## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Štoček**  
Osobní číslo: **Z14000108**  
Studijní program: **N3963 Biomedicínské inženýrství**  
Studijní obor: **Biomedicínské inženýrství**  
Název tématu: **Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné  
zobrazování**  
Zadávající katedra: **Ústav zdravotnických studií**

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

Cíle práce:

1. Analýza dostupných hardwarových a softwarových možností a technologických podmínek pro konstrukci optického zobrazovače
2. Vývoj variant v 3D modelovacím prostředí Autodesk Inventor
3. Aplikace vybraného software pro rekonstrukci 3D obrazu
4. Porovnání variant navrhovaných modelů optického zobrazovače
5. Konstrukce optimální varianty optického zobrazovače

Teoretická východiska:

V odborné literatuře jsou popisovány optické zobrazovací metody ve viditelném spektru a v blízkém infračerveném světle pro zobrazování zvířecích modelů in vitro/in-vivo. Jedná se o laboratorní potkany a myši, užívané na oddělení experimentální medicíny v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). Práce bude realizována využitím CCD kamer, dostupného softwaru pro tomografické zobrazování, modelováním v Autodesk Inventoru a následným kompletováním. Výrobek bude otestován v IKEM v rámci probíhajícího výzkumu. Výstupem diplomové práce bude funkční přístroj určený pro optické zobrazování.

Výzkumné otázky:

1. Jaké konstrukční prvky jsou potřeba ke stavbě přístroje pro optické zobrazování?
2. Jsou všechny součásti komerčně dostupné nebo něco bude muset být vyrobeno na míru?
3. Jaký software je potřeba ke zpracování získaných obrazových dat?
4. Jaké parametry jsou potřeba pro konstrukci přístroje pro optické zobrazování?

Metoda:

Analýza, syntéza, stavba experimentálního stroje

Použitý software:

Autodesk Inventor, Matlab

Technika práce, vyhodnocení dat:

Analýza dostupných hardwarových možností a následné modelování v 3D vývojovém prostředí Autodesk Inventor. Aplikace vybraného software zpracování signálu pro rekonstrukci 3D obrazu v závislosti na použitém hardware. Nejvhodnější varianta se použije pro konstrukci optického zobrazovače. Tento přístroj se použije pro testování v IKEM v rámci probíhajícího výzkumu.

Místo a čas realizace výzkumu:

Technická univerzita v Liberci, říjen - listopad 2015

Institut klinické a experimentální medicíny, dle potřeby.



## Příloha zadání diplomové práce

### Seznam odborné literatury:

- KAČENKA M. et al.** Fluorescent magnetic nanoparticles for cell labeling: Flux synthesis of manganite particles and novel functionalization of silica shell. *Journal Colloid Interface Sci.* 2015, Jun 1;447:97-106. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.01.071. Epub 2015 Feb 4. PubMed PMID: 25702866.
- ŠMEJKALOVÁ, Daniela, et al.** Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan polymeric micelles. *Biomacromolecules.* 2014 Nov 10;15(11):4012-20. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1021/bm501065q. Epub 2014 Oct 13. PubMed PMID: 25268047.
- BERKOVA Z. et al.** Gadolinium- and manganite-based contrast agents with fluorescent probes for both magnetic resonance and fluorescence imaging of pancreatic islets: a comparative study. *ChemMedChem.* 2013 Apr;8(4):614-21. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1002/cmdc.201200439. Epub 2013 Jan 11. PubMed PMID: 23316021.
- FILIPPOV S. K. et al.** Glycogen as a biodegradable construction nanomaterial for in vivo use. *Macromol Biosci.* 2012 Dec;12(12):1731-8. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1002/mabi.201200294. Epub 2012 Nov 21. PubMed PMID: 23169686.
- HOTAŘ, Vlastimil.** Úvod do problematiky strojového vidění. Vyd. 1. Liberec: Technická univerzita, 2015, 132 s. ISBN 978-80-7494-156-6.
- NTZIACHRISTOS, Vasilis, Christoph BREMER a Ralph WEISSLEDER.** Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *European Radiology.* 2002, roč. 2003, č. 13, s. 195-208. [vid. 2015-04-01]. ISSN 0938-7994. DOI: 10.1007/s00330-002-1524-x.
- SHCHERBAKOVA D. M. a V. V. VERKHUSHA.** Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature Methods.* 2013-6-16, č. 10, 8 vydání, s. 751-754. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.2521. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nmeth.2521>
- PATTERSON, Aileen P., Stephanie A. BOOTH a Reuben SABA.** The Emerging Use of In Vivo Optical Imaging in the Study of Neurodegenerative Diseases. *BioMed Research International.* 2014, č. 2014, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 2314-6133. DOI: 10.1155/2014/401306. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/401306/>
- KOLITZ-DOMB, Michal, et al.** Engineering of near infrared fluorescent proteinoid-poly(L-lactic acid) particles for in vivo colon cancer detection. *Journal of Nanobiotechnology.* 2014, č. 12, vydání 1, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1477-3155. DOI: 10.1186/s12951-014-0030-z. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/12/1/30>
- COHEN, Sarit a Shlomo MARGEL.** Engineering of near IR fluorescent albumin nanoparticles for in vivo detection of colon cancer. *Journal of Nanobiotechnology.* 2012, č. 10, vydání 1, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1477-3155. DOI: 10.1186/1477-3155-10-36. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/36>
- ŠMEJKALOVÁ, Daniela, et al.** Selective In Vitro Anticancer Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Loaded in Hyaluronan Polymeric Micelles. *Biomacromolecules.* 2014-11-10, č. 15, vydání 11, s. 4012-4020. [vid. 2015-04-08]. ISSN 2014-11-10. DOI: 10.1021/bm501065q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm501065q>

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniel Jirák, Ph.D.**  
Ústav zdravotnických studií

Datum zadání diplomové práce: **29. května 2015**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2016**



prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs  
rektor



Mgr. Marie Froňková  
pověřena vedením ústavu



Student  
**Bc. Jakub ŠTOČEK**  
Z14000108  
Donská 945  
463 11 LIBEREC 30

Vyřizuje: Zuzana Janošíková / 485 353 762

V Liberci dne 5. května 2016  
č.j.: 16/8515/016276-02

### Vyjádření k žádosti o ponechání tématu a prodloužení termínu odevzdání diplomové práce

Vážený studente,

na základě Vaší žádosti ze dne 28. 4. 2016, zaevidované pod č.j.: 16/8515/016276-01, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním tématu „Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné zobrazování“ a prodloužením termínu odevzdání diplomové práce do 30. 4. 2017.

S pozdravem

  
Mgr. Marie Froňková  
pověřena vedením ústavu

**Technická univerzita v Liberci**  
Ústav zdravotnických studií  
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



## Prohlášení

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

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

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

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

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

Datum: 20.4.2017

Podpis: Štöckel

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat doc. Ing. Danielu Jirákovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, prof. Ing. Aleši Richterovi, CSc. za odbornou garanci, Mgr. Andree Gálisové za seznámení s experimenty probíhající v laboratoři IKEM. Dále bych chtěl poděkovat firmám ATEsystem s.r.o a Moravské přístroje a.s. za zapůjčení kamerové techniky a firmě Experientio s.r.o za poskytnutou finanční garanci pro zapůjčení kamer. Zároveň bych chtěl poděkovat Ing. Vlastimilu Hotařovi, Ph.D. a doc. Ing. Maroši Tunákovi, Ph.D. za konzultace ke kamerové technice a k programování Matlab.

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Jakub Štoček

**Instituce:** Technická univerzita v Liberci

**Název práce:** Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné zobrazování

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Daniel Jirák, Ph.D.

**Počet stran:** 94

**Počet příloh:** 27

**Rok obhajoby:** 2017

### **Anotace**

Diplomová práce se zabývá vývojem zařízení pro snímání bioluminiscenčního optického signálu v trojrozměrném prostoru. Dále je v ní popsáno testování vytypovaných kamer a konstrukce pro snímání pod různými úhly ve více variantách s modely vytvořenými v programu Autodesk Inventor. V programovacím jazyku Matlab byl vyvinut rekonstrukční algoritmus, který z naměřených dat vytváří tomografické řezy zobrazující pozici signálu v prostoru.

### **Klíčová slova**

trojrozměrný, zobrazovač, bioluminiscence, konstrukce, Radonova transformace



**Name and surname:** Bc. Jakub Štoček

**Institution:** Technical University of Liberec

**Title:** Construction of three dimensional optical imaging scanner

**Supervisor:** doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.

**Pages:** 94

**Appendix:** 27

**Year:** 2017

### **Annotation**

Master thesis deals with development of scanner for bioluminescence optical signal in three dimensional space. In this thesis is described testing particular selected cameras and construction for scanning at different angles in multiple variants with models made in program Autodesk Inventor. In Matlab programming language was developed reconstruction algorithm, which creates tomographic slices showing position of signal in space.

### **Keywords**

three dimensional, imaging device, bioluminescence, construction, Radon transform

## Obsah

Poděkování.....	8
Anotace .....	9
Klíčová slova .....	9
Annotation.....	10
Keywords .....	10
Obsah.....	12
Seznam použitých zkratek.....	16
Úvod.....	17
1 Světlo.....	18
1.1 Luminiscence .....	18
1.1.1 Bioluminiscence.....	18
1.1.2 Fluorescence.....	18
2 Získání a zpracování obrazu.....	20
2.1 Digitální obraz .....	20
2.1.1 Barevný obraz.....	20
2.1.2 Binning.....	21
2.2 Algoritmy rekonstrukce prostorového obrazu.....	21
2.2.1 Zpětná projekce.....	21
2.2.2 Filtrovaná zpětná projekce.....	21
2.2.2.1 Dolní propust' .....	22
2.2.2.2 Pásmová propust' a filtrace.....	22
2.2.2.3 Fourierova transformace.....	23
2.2.2.4 Korekce útlumu .....	23
2.2.3 Radonova transformace.....	24
2.2.3.1 Inverzní Radonova transformace.....	24
2.2.4 Iterační metoda .....	24
2.3 Zpracování obrazu – Postprocessing .....	26
2.3.1 Histogram, minimální a maximální hodnota.....	26
2.3.2 Průměrový filtr .....	26
2.3.3 Mediánový filtr .....	26
2.3.4 Gaussův filtr .....	27
2.3.5 Softwarový binning.....	27
3 Analýza hardwarových možností.....	28
3.1 Základní typy snímačů kamer .....	28

3.1.1	CCD snímače .....	28
3.1.2	CMOS snímače.....	29
3.1.2.1	Integrovaný IR-cut filter .....	30
3.2	3D kamery .....	30
3.2.1	Stereoskopie .....	30
3.2.2	Kamera se strukturovaným zdrojem světla .....	31
3.2.3	Lasarová triangulace .....	32
3.2.4	Time of Flight (TOF) .....	32
3.3	Optická soustava.....	33
3.3.1	Ohnisková vzdálenost.....	34
3.3.2	Zorný úhel, základní zvětšení objektivu, pracovní vzdálenost a zorné pole.....	34
3.3.3	Hloubka ostrosti.....	35
3.3.4	Expozice.....	36
4	Zmapování současného stavu.....	38
4.1	Pozorování probíhajících experimentů.....	38
4.2	IVIS Lumina XR.....	39
4.2.1	Technické parametry .....	39
4.3	Dostupné 3D řešení pro bioluminiscenci a fluorescenci.....	40
4.3.1	Kamera s laserovou triangulací .....	40
4.3.2	Kamera a MicroCT .....	40
4.3.3	FMT – Fluorescence transillumination tomography.....	41
5	Analýza dostupných softwarových možností.....	42
5.1	Autodesk 123D Catch .....	42
5.2	Autodesk Memento Beta .....	43
5.3	Blender .....	43
5.4	Matlab R2010.....	44
5.5	Další užitý software.....	44
5.5.1	SIPS.....	44
5.5.2	Total Commander.....	44
5.5.3	ImageJ.....	45
5.5.4	Autodesk Inventor Professional.....	45
6	Programování.....	46
6.1	Dekonstrukce a princip algoritmu .....	46
6.2	Testování s umělými daty a reálnou předlohou.....	49
6.3	Testování s reálnou předlohou v prostoru .....	52

6.4	Aplikace algoritmu na naměřená data.....	52
7	Návrh konstrukce .....	53
7.1	Konstrukce testovacího držáku.....	54
7.2	Konstrukce snímací komory .....	55
7.3	Varianta více kamer pod různými úhly .....	55
7.3.1	Finanční kalkulace.....	56
7.4	Varianta jedné kamery pod různými úhly .....	56
7.4.1	Modifikace s elektrickým posunem .....	57
7.4.2	Finanční kalkulace.....	58
8	Experiment .....	59
8.1	Testování I.....	59
8.1.1	Popis měření.....	59
8.1.1.1	Počáteční stav: .....	60
8.1.1.2	První záznam z kamery:.....	60
8.1.1.3	Záznamy z kamery v průběhu testování .....	61
8.1.1.4	Závěrečný stav: .....	63
8.1.2	Závěr testování I.....	63
8.2	Testování II .....	63
8.2.1	Popis měření.....	64
8.2.1.1	Sestava 1 modifikovaná .....	64
8.2.1.2	Sestava 2.....	64
8.2.1.3	Sestava 3.....	65
8.2.1.4	Kontrola teploty .....	65
8.2.2	Testování II.a a II.b.....	66
8.2.2.1	Úvodní ověření: .....	66
8.2.2.2	První snímání: .....	67
8.2.2.3	Druhé snímání: .....	67
8.2.3	Testování II.c .....	68
8.2.3.1	Třetí snímání: .....	68
8.2.3.2	Závěrečné ověření:.....	71
8.2.4	Závěr testování II.....	71
8.3	Testování III.....	71
8.3.1	Popis měření.....	72
8.3.1.1	Sestava.....	72
8.3.1.2	Kontrola teploty .....	72
8.3.2	Testování III.a.....	73

8.3.2.1	Úvodní ověření: .....	73
8.3.2.2	První snímání: .....	74
8.3.2.3	Druhé snímání: .....	75
8.3.2.4	Závěrečné ověření: .....	76
8.3.3	Testování III.b .....	77
8.3.3.1	Třetí snímání: .....	77
8.3.3.2	Závěrečné ověření: .....	79
8.3.4	Závěr testování III .....	79
8.4	Sumarizace .....	79
9	Zpracování dat a aplikace algoritmu .....	81
9.1	Úprava dat před použitím v algoritmu .....	81
9.1.1	Ekvalizace histogramu, ořez minimální a maximální hodnoty, lookup .....	81
9.1.2	Filtrace dat .....	82
9.1.3	Residual Bulk Image .....	83
9.1.4	Softwarový binning .....	83
9.2	Rekonstrukční algoritmus .....	84
9.3	Projekce výstupu z algoritmu .....	85
10	Diskuze .....	87
	Závěr .....	88
	Seznam užitých ilustrací .....	89
	Seznam vložených tabulek .....	90
	Seznam použité literatury .....	91
	Přílohy .....	94
	Přiložené DVD .....	94
	Seznam obrázkových příloh .....	94
	Obrázkové přílohy .....	95
	Dokumenty .....	114

## Seznam použitých zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Vysvětlení</b>
IKEM	Institut Klinické a Experimentální Medicíny
CCD	<i>Charged-couple device</i>
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
NIR	<i>Near Infra Red</i>
RGB, RGBE	<i>Red Green Blue Emerald</i>
CMY, CMYG	<i>Cyan Magenta Yellow Green</i>
FOV	<i>Field of View</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
e <sup>-</sup> , RMS	elektron, <i>Root Mean Square</i>
POE	<i>Power over Ethernet</i>
FFT	<i>Fast Fourier Transformation</i>
PNG	<i>Portable Network Graphics</i>
TIFF	<i>Tag Image File Format</i>



## Úvod

Cílem této diplomové práce je analyzovat možnosti rozšíření doposud užívaného optického planárního (dvojměrného) snímání na trojrozměrné zobrazení přidáním vypočteného třetího rozměru a získané poznatky zkombinovat a dále aplikovat pro vývoj samotného laboratorního zařízení. Pro návrh konstrukce se předpokládá využití trojrozměrného modelovacího prostředí programu Autodesk Inventor.

Realizace diplomové práce probíhá ve spolupráci s Pracovištěm experimentální a klinické spektroskopie při Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze, kde je již pro výzkum užíváno zařízení na principu optického planárního snímání bioluminiscenčního signálu v živém organismu (*in vivo*). Tato metoda slouží při výzkumu implantací, kde se sleduje viabilita (schopnost přežití) implantátu v příjemci neinvazivní zobrazovací metodou, kdy je subjekt sledován kamerou v temném prostoru. Geneticky modifikované buňky dárce reagují na luciferin a vytváří optický signál. Příjemce implantátu na luciferin nereaguje. Obohacení této metody o třetí rozměr by rozšířilo možnosti vědeckého bádání při detekci tkáně označené bioluminiscenčními nebo fluorescenčními markery *in vivo*, čímž budou získána 3D data obsahující pozici zdroje signálu ve zkoumaném prostoru s vysokým rozlišením.

Současně užívaná metoda totiž funguje pouze jako planární. Není tedy možné ze získaného měření zjistit rozložení signálu v prostoru, ale pouze jeho projekci vůči kameře. Pro porovnání lze uvést, že tato metoda je na úrovni konvekčního rentgenu, kterým se získá 2D obraz vnitřních struktur, ale pozorovateli nedá informaci o pořadí struktur v rámci prostoru. Pro získání 3D rozměru u rentgenu byla vyvinuta počítačová tomografie, která na svém výstupu poskytuje tomografické obrazy odpovídající řezům subjektu kolmé na osu rotace a tedy i kolmé na původní 2D rentgenový obraz.

## 1 Světlo

Pro potřeby diplomové práce je nutné definovat světlo kvantovým modelem, který vymezuje tok světla v tzv. energetických kvantech, které označujeme jako fotony. Ty se pohybují přímočaře od zdroje. energii jednotlivých fotonů popisuje vztah níže. V uvedeném vztahu odpovídají konstantám  $h = 6,6 \cdot 10^{-34}$  J s Planckova konstanta,  $c = 3 \cdot 10^8$  m·s<sup>-1</sup> rychlost šíření elektromagnetického vlnění ve vakuu a proměnné  $f$  frekvence,  $\lambda$  vlnová délka.

$$E = h \cdot f = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Světlo pro potřeby našeho vnímání se dělí na viditelné spektrum o vlnové délce 380 až 760 nm. Elektromagnetické vlnění v rozmezí těchto vlnových délek stimuluje naše fotoreceptory v sítnici našeho oka. Tyto vlnové frekvence poté vnímáme jako barvy nebo jejich kombinace. Dále se světlo dělí na infračervené s vlnovou délkou kratší než 380 nm a ultrafialové s vlnovou délkou delší než 760 nm. Tyto vlnové délky už nejsou viditelná lidským okem, ale sousedí s viditelným spektrem a mají pro nás další informační význam, taktéž je můžeme sledovat a měřit za použití speciálních kamer a přístrojů.

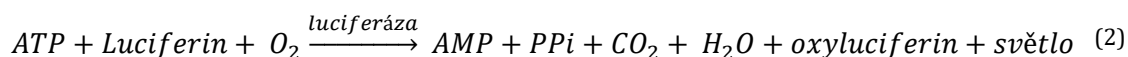
Zdroje světla se dělí na vlastní, které samy vyzařují ze svého povrchu nebo struktury, a nevlastní, které světlo ze svého povrchu pouze odráží. Vlastní zdroje dělíme podle typu emise záření, které vzniká vysokou vlastní teplotou zdroje (Slunce, žárovka) nebo absorpcí a přeměnou jiného druhu energie (např. chemické). [1][17][28]

### 1.1 Luminiscence

Luminiscence je popsána jako zářivý děj. Nastává u luminiscenčních látek, které disponují schopností přeměnit absorbovanou energii na viditelné světlo. Podle typu absorbované energie mluvíme o fotoluminiscenci (záření), chemiluminiscenci (chemická reakce), tribuloluminiscenci (mechanická) a elektroluminiscenci. Chemické látky s touto schopností se nazývají luminofory.

#### 1.1.1 Bioluminiscence

Bioluminiscencí je nazývána chemiluminiscenci probíhající v živých organismech, tento jev je známý od světlušek větších (*Lampyris noctiluca*). Dále touto schopností disponují některé druhy hub a někteří členové kmenu bakterií, prvoků, měkkýšů a ryb.



Ve výše uvedené rovnici je vysvětlen vznik světla za přítomnosti luciferinu, ATP (adenosintrifosfát) a kyslíku pomocí enzymu luciferázy. Celý proces lze označit jako oxidaci luciferinu, kdy se při této reakci uvolní 96 % energie jako světlo a 4 % energie jako teplo. Zobrazovací metoda bioluminiscence uvažuje rozsah vlnových délek vznikajících fotonů 400 až 700 nm. [1][17][28]

#### 1.1.2 Fluorescence

Fluorescence je druhem fotoluminiscence, tedy záření vyvolané absorpcí záření. Rozdíl mezi fluorescencí a více známou fosforescencí je délka trvání: fluorescence vyžaduje trvalý přísun energie, aby látka sama vyzařovala, ale fosforescence vyzařuje i po ukončení

přísunu energie, někdy i v řádu několika dní. Tento jev je známý pro svoji aplikaci na ciferníku hodin.

Princip obou zmíněných jevů je přechod mezi energetickými hladinami v atomu, kdy rozdíl v pravděpodobnosti přechodu na původní energetickou hladinu určuje délku trvání jevu po ukončení přísunu energie a tedy i rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí.

Při excitaci, která následuje okamžitým návratem do původní pozice dochází k vyzáření světla o stejné frekvenci jako záření absorbované, v takovém případě mluvíme o rezonanční fluorescenci. Za předpokladu, že jsou mezi energetickými hladinami, mezi kterými došlo k přeskoku, i jiné energetické hladiny, z pravidla dochází k emisi záření s nižší frekvencí, než bylo absorbované světlo. Tato frekvence odpovídá rozdílu energetických hladin.

Tento jev je využíván při fluorescenčních zobrazovacích metodách, kde je ku příkladu objekt osvětlován a jeho atomy excitovány ultrafialovým zářením a emitované záření je v infračerveném spektru, pomocí filtru na snímací kameře, který nepropustí ultrafialové záření, je získán obraz pouze emitovaného záření. Zobrazovací metoda fluorescence uvažuje rozsah vlnových délek vznikajících fotonů 515 až 875 nm. [1][28]

## 2 Získání a zpracování obrazu

Obraz představují dvojrozměrná data získaná snímáním trojrozměrné scény. Jak už bylo řečeno v kapitole 1 světlo je pro nás proud fotonů, energetických kvant. V tomto případě se jedná o fotony odražené od povrchu tělesa (scény) nebo fotony přímo uvolňující se z tělesa (scény), které dopadají na fotocitlivou vrstvu. Dříve tuto fotocitlivou vrstvu zastupoval tzv. fotografický film nebo kinofilm s citlivou vrstvou na základě chemického reakce.

Tato metoda je dnes zastaralá a používá se už výhradně pro umělecké nebo speciální aplikace, aktuální metoda je založena na digitálním záznamu a fotocitlivá vrstva je zde reprezentována maticí fotoelektrických elementů, které měří energii fotonů, které na ně dopadnou. Získané hodnoty často neformálně označované jako *jas* jsou hodnoty odpovídající intenzitě ozáření  $E \left[ \frac{W}{m^2} \right]$ . [2]

### 2.1 Digitální obraz

Od tohoto bodu se bude pro potřeby diplomové práce jednat již pouze o digitální obraz. Objem informací uložených v obrazu je definován vlastnostmi snímače a jejich obsah je konečný. Při uložení obrazu nelze daný objem informací v obraze navýšit, pouze snížit nebo přetvářet. To je způsobeno tím, že analogový obraz scény je do digitálního formátu převeden tzv. kvantováním, kdy dané energetické hodnotě na fotocitlivém elementu je v A/D převodníku přidělena celočíselná hodnota. Jelikož ale nelze ukládat nekonečně velké řady čísel, je rozlišovací schopnost kvantování rozdělena podle počtu bitů daného převodníku, například pro 8 bitový převodník je to 256 úrovní, pro 16 bitový převodník je to 65536 úrovní. Hodnoty lze převádět z vyššího na nižší bitový rozsah, ale nikoliv obráceně a vždy je to se ztrátou informací v obraze. [1] [2]

#### 2.1.1 Barevný obraz

Barva, jak ji vnímá lidské oko, je důsledkem vlivu vlnové délky světla dopadajícího na sítnici, kde je detekována čípkami rozlišující jednotlivé barevné složky. Barvy, jak je vnímáme, vznikají skládáním 3 základních barev tzv. složek – červená (*Red*), zelená (*Green*) a modrá (*Blue*), známe pod zkratkou RGB. Jejich poměrem lze složit jakoukoliv libovolnou barvu a to včetně černé (žádná složka) nebo bílé (stejný nenulový poměr všech).

Elektronika v zásadě není schopna rozlišovat barvy stejně jako lidské oko a tedy všechny její získané obrazy jsou monochromatické. Pokud chceme za pomoci elektroniky získat přímo barevný obraz, potřebujeme snímací zařízení se 3 čipy a hranolem rozdělující barevné složky, ta se nazývá *True Color* a bývá velmi cenově nákladná.

Dostupnější řešení je využití jednoho čipu, který má na sobě matici barevných filtrů tzv. **Bayerův filtr**, který seskupuje elementy na čipu po 4 elementech a každý element z této skupiny má určenou barvu, kterou má snímat. Výsledkem je matice obrazu, kde pro každý pixel je uložena hodnota jasu pro každou barevnou složku. Tento typ aplikace má další modifikace, jako SONY RGBE, který rozděluje filtr zelené na dva (E – *emerald*), CMY nebo CMYG filtr, které nepoužívají základní skládání barev, ale azurovou (*cyan*), pupurovou (*magenta*) a žlutou (*yellow*), případně navíc filtr pro zelenou (G – *green*).

U kamer s typem čipu CMOS APS je snaha nahradit Bayerův filtr silikonovou vrstvou samotného fotoelementu, který s tloušťkou absorbuje jednotlivé barevné složky, nejdříve

modrou, poté zelenou a nakonec červenou. V horní vrstvě fotoelementu se detekuje modrá barva, v prostřední vrstvě zelená barva, ve spodní vrstvě červená barva. Na jednom elementu jsou tedy odečteny hodnoty všech 3 barevných složek oproti použití Bayerova filtru, kde je pro 3 barevné složky potřeba minimálně 3 fotoelementů. Tento typ barevného snímání je znám pod obchodním názvem Foveon X3. [2][18]

### 2.1.2 Binning

Tato metoda je dána vlastností kamery a umožňuje slučování sousedních pixelů v horizontálním nebo vertikálním směru. Tímto sloučením se sousední pixely chovají jako jeden fotoelement, čímž se zvýší plocha jednoho výstupního pixelu, například při binningu 2x v horizontálním směru, se spojí dva pixely a plocha se zdvojnásobí, ale výsledné rozlišení se zmenší o polovinu. Horizontální a vertikální binning lze nastavovat nezávisle. Při nastavení binning 2x v obou směrech se plocha jednoho výsledného pixelu se zvětší 4x.

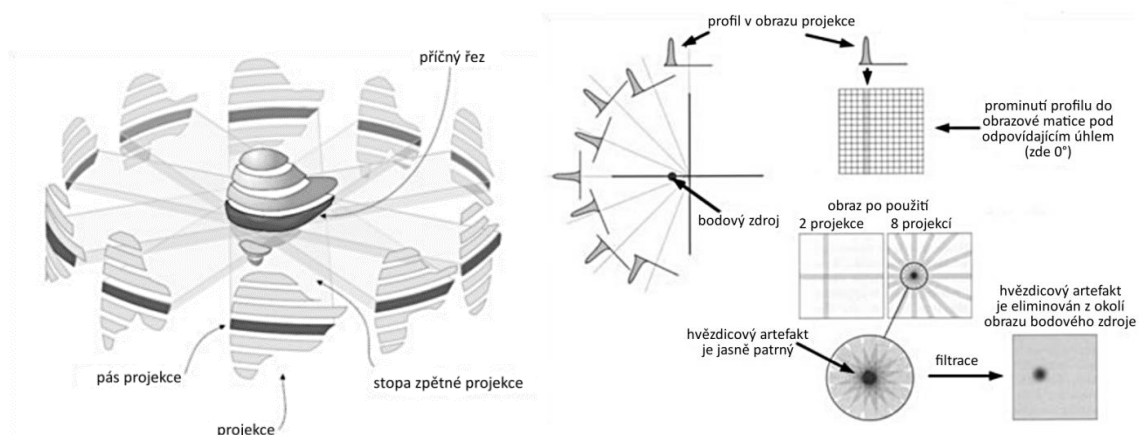
Tímto způsobem lze dosáhnout větší citlivosti čipu a zvýšení maximální snímkovací frekvence. Optická soustava se použitím této metody nemění a zorné pole zůstává stabilní jako bez použití binningu, mění se pouze výstupní pixelové rozlišení. [2]

## 2.2 Algoritmy rekonstrukce prostorového obrazu

Pro vytvoření trojrozměrného tzv. tomografického obrazu z optických planárních dat je nutno provést rekonstrukce podle vybraného algoritmu a počtu uskutečněných projekcí. Projekce je každý záznam z určeného úhlu a vzdálenosti od zkoumaného objektu.

### 2.2.1 Zpětná projekce

Tento nejjednodušší algoritmus vzniká z imaginární zpětné projekce signálů ze získaných obrazů, které jsou složeny v jedné rovině do výsledné matice. Jednotlivé projekce se protnou a sumačně je získána pozice objektů. Nevýhodou této metody je tzv. hvězdicový artefakt, který se při malém počtu projekcí projevuje jako cípy hvězdy kolem rekonstruovaného objektu a při dostatečném počtu projekcí jako záře kolem objektu, která rozmazává hrany. Tento artefakt lze po rekonstrukci obrazu odfiltrovat, ale z důvodu náročnosti se přešlo k jiným algoritmům. [19]



Obrázek 1 a obrázek 2 - ilustrace zpětné rekonstrukce, zdroj: [19]

### 2.2.2 Filtrovaná zpětná projekce

Oproti metodě zpětné projekci, jsou projekce filtrované sadou filtrů ještě před rekonstrukcí. Sníží se tím vliv hvězdicového efektu. Poté je rekonstrukce provedena

matematicky. Samotná filtrace je proces, kdy v prostorové oblasti nebo frekvenční oblasti části spektra propustí, zadrží nebo utlumí.

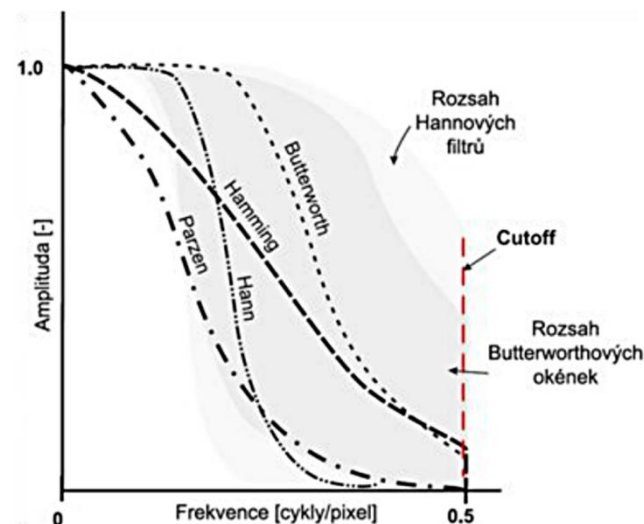
Filtrování v prostorové oblasti se provádí tzv. konvolucí, což je matematické vyjádření o rozdílu mezi nasnímaným obrazem a nezkresleným obrazem. Realizuje se tzv. dolní propustí a snižuje nebo eliminuje hvězdicový artefakt. Filtrace v prostorové oblasti je výpočetně náročná a proto se využívá filtrace v oblasti frekvenční.

Převodem z oblasti prostorové do oblasti frekvenční se využívá tzv. Fourierovy transformace, která je popsána v kapitole 2.2.2.3. Filtrace obrazu značí vynásobení harmonické složky určeným koeficientem, který danou složku propustí, zeslabí nebo vynuluje. Je prokázáno, že filtr v prostorové oblasti má stejný efekt, pokud je to Fourierův obraz filtru ve frekvenční oblasti.

Nejčastěji užívaný je tzv. *RAMP* filtr, jehož frekvenční charakteristika má doslovně vzhled náběžné rampy. Ten je zakončen takzvanou mezní frekvencí, která je označovaná jako „*cut-off*“. Tento konkrétní filtr eliminuje tzv. hvězdicový artefakt, jelikož jsou jednotlivé kmitočty lineárně zdůrazněny. Ten je následně doplněn uživatelským dolnoproputní filtrem, kterým se potlačí statické fluktuace. Výsledkem této filtrace je potlačení hvězdicového artefaktu a zvýšení kontrastu obrazu. [20]

### 2.2.2.1 Dolní propust'

Dolní propust' neboli „*Low-Pass*“ filtr slouží k vyhlazování, jelikož nepropustí vyšší harmonické frekvence. Filtr dle Hamminga má kromě *cut-off* frekvence i nastavitelnou strmost. Mezi nejvíce užívané dolnoproputní filtry je Butterworthův, který lze modifikovat pomocí tzv. řádu (*order*). Právě tato flexibilita je pro něj tak specifická a často používaná. [20]



Obrázek 3 – přehled frekvenční charakteristiky dolnoproputních filtrů, zdroj: [20]

### 2.2.2.2 Pásmová propust' a filtrace

Tento typ filtru je využíván kromě utlumení statických fluktuací k zaostřování a zvýrazňování detailů v obraze. Zvýšení lokálního kontrastu nebo zaostření lze dosáhnout zesílením amplitud pro vybrané části vyššího harmonického spektra. Navazující klesající



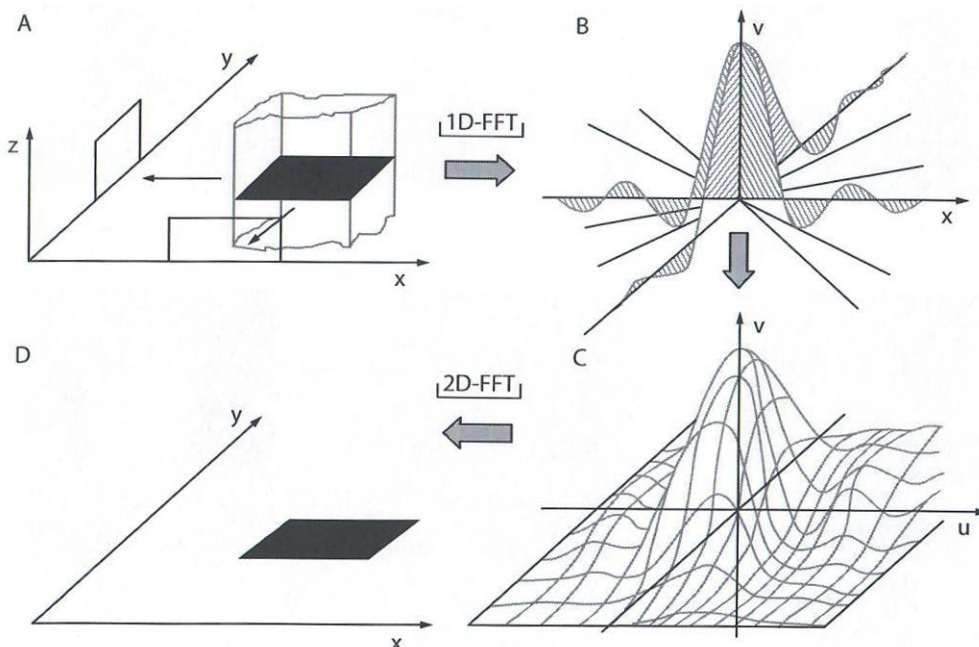
část napodobuje low-pass filtr a slouží k snížení defektů způsobenými nedokonalostí záznamové kamery. Nejpoužívanější pásmové filtry jsou typu Mezt a Wiener. [20]

### 2.2.2.3 Fourierova transformace

Fourierova transformace je funkce, která převádí signál z prostorové oblasti do frekvenční a inverzní Fourierova transformace jej převádí zpět. Ve frekvenční oblasti je vše vyjádřeno jako harmonické signály, tedy funkce sinus a cosinus. V případě rekonstrukce obrazu se převádí jednorozměrná do frekvenční oblasti. Interpolací se z nich stanou dvourozměrné funkce, které jsou zpětnou Fourierovou transformací převedeny zpátky do oblasti časové, čímž získáme výstupní obraz. Převod signálu z časové oblasti do frekvenční je definován vztahem:

$$s(\omega) = \int s(t) \cdot e^{-j\omega t} dt \quad (3)$$

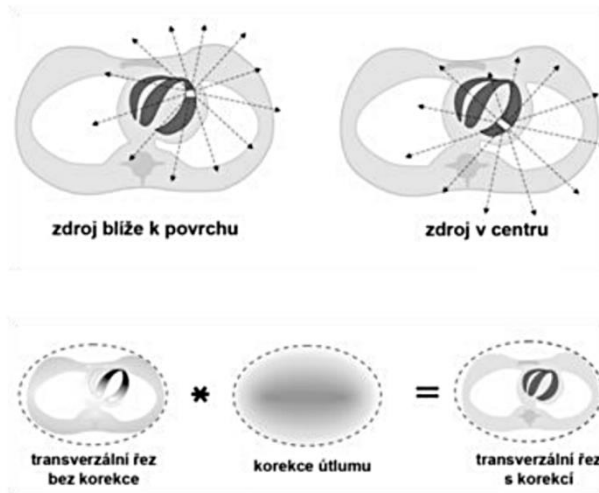
kde  $s(t)$  zastupuje funkci v časové oblasti,  $s(\omega)$  reprezentuje obraz funkce ve frekvenční doméně,  $t$  je čas a  $\omega$  je uhlová frekvence. [1][20]



Obrázek 4 - princip Fourierovy transformace, zdroj: [1]

### 2.2.2.4 Korekce útlumu

Útlum je definován jako ztráta detekcí v závislosti na hloubce zkoumaného materiálu nebo tkáně. Ta je způsobena absorpcí fotonů ve výše zmíněné tkáni nebo materiálu. Je empiricky dokázáno, že fotony vznikající uvnitř těla nebo tělesa jsou vstřebávány nebo rozptýleny více nežli fotony vznikající u povrchu těla nebo tělesa. Pro eliminaci toho artefaktu se užívá výpočet korekce útlumu dle Changa, který stanovuje průměrný útlum fotonů pohybujících se v těle nebo tělesu do všech možných úhlů. Následně je tento vypočtený průměrný útlum aplikován na obrazový příčný řez. Z tohoto důvodu je nutné znát přesně hranice tělesa na obraze, jinak by aplikace proběhla nevěrohodně a výsledný obraz by byl poškozen. [20]



Obrázek 5 - ilustrace korekce útlumu, zdroj: [20]

### 2.2.3 Radonova transformace

Historické zmínky o této matematické metodě zasahují do roku 1917, kdy ji definoval Johann Radon, jehož jméno převzala. Původně formulována pro funkce dvou proměnných, dnes používána pro funkce  $n$  proměnných, které umožnily její použití pro 3D rekonstrukce. [3][4][5]

$$\begin{aligned}
 \hat{f}(\theta, t) &= \hat{f}_\theta(t) = \mathcal{R}\{f\}(\theta, t) = \int_{\Omega=\{x \in \mathbb{R}^2: n_\theta^T x = t\}} f(x) dx = \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} f(t \cos \theta - \tau \sin \theta, \tau \cos \theta + t \sin \theta) d\tau \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x_1, x_2) \delta(x_1 \cos \theta + x_2 \sin \theta - t) dx_1 dx_2 \\
 &= \int_{n_\theta^\perp = \alpha \in \mathbb{R}^2: n_\theta^T \alpha = 0} f(t n_\theta + y) dy
 \end{aligned} \tag{4}$$

Kde  $\theta \in [0, \pi)$ ,  $t \in \mathbb{R}$ ,  $n_\theta^T = [\cos \theta, \sin \theta]$ ,  $x^T = [x^1, x^2]$  a obraz funkce  $f(x)$  v Radonově transformaci je  $\hat{f}(\theta, t)$ .

#### 2.2.3.1 Inverzní Radonova transformace

Společně s Radonovou transformací byla definována zároveň inverzní Radonova transformace, která převádí data z Radonova prostoru zpět do kartézské soustavy.

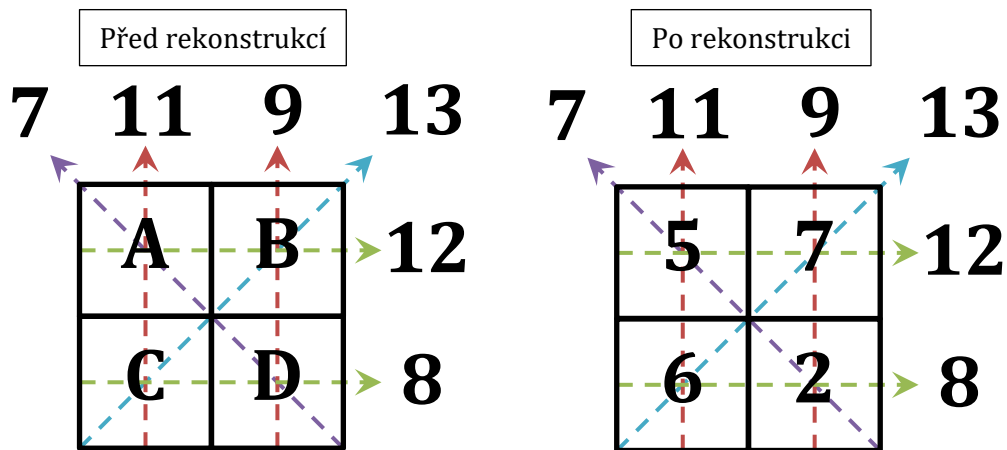
$$f(x) = \frac{1}{1\pi^2} \int_{S^1} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\partial \hat{f}(\theta, t)}{\partial t} y^T x - t dt dy \tag{5}$$

kde  $S^1 = \{x \in \mathbb{R}^2: \|x\| = 1\}$  je jednotková sféra v  $\mathbb{R}^2$ . [4][5]

### 2.2.4 Iterační metoda

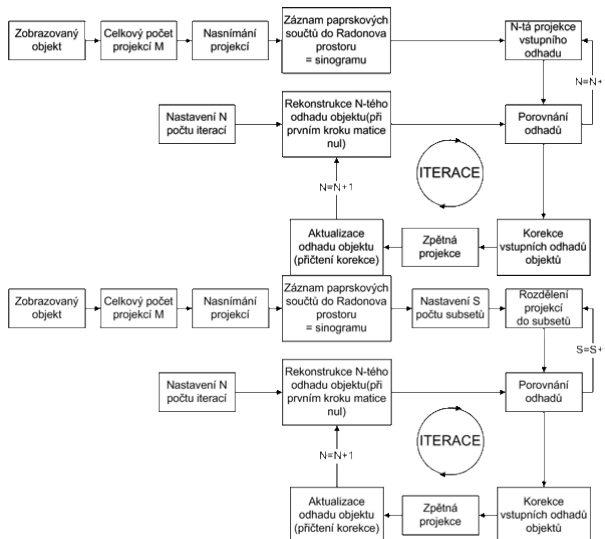
Tento algebraický algoritmus je založen na postupné iteraci výchozího odhadu. Na rozdíl od zpětných projekcí nevzniká hvězdicový artefakt a i další nežádoucí vlivy jsou potlačeny už principem rekonstrukce. Samotná metoda je založena na 3 modelech: model obrazu, systému a dat. Jako vstupní data lze použít prázdnou matici nebo filtrovanou zpětnou projekci.

Počet iterací se řídí snahou získat „nejlepší“ (nejkvalitnější) obraz. Iterační metoda obsahuje princip ML (*maximum likelihood*), který tento počet stanovuje standardně statisticky a algoritmus EM (*expectation maximization*), který hledá a vyhodnocuje nastavení pro získání „nejlepšího“ obrazu. Samotná iterace spočítá projekce, porovná je s naměřenými projekcemi, odečte korekční faktory, ty aplikuje na výchozí odhad, ze kterého složí nový rekonstruovaný objekt a ten je vstupem do dalšího cyklu iterace, jak je schématicky zobrazeno ilustrací dole. Pokud není v diplomové práci uvedeno jinak, jsou zdroje ilustrací vlastní (autorské).



Obrázek 6 - schéma iterační metody

V tomto bodě se metoda dělí na MLEM (*maximum likelihood expectation maximization*), kdy se iterace opakují, dokud není dosaženo maximální kvality obrazu. Tato metoda je velmi časově náročná, jelikož každá iterace přepočítává celý obraz. Z toho důvodu byla vyvinuta metoda OSEM (*ordered subsets expectation maximization*), která celkovou rekonstrukci rovnoměrně rozdělí do menších skupin tzv. subsetů, které jsou iterovány v oddělených sub-cyklech. Ty jsou v rámci celého cyklu opakovány podle potřeby konkrétního subsetu, který je porovnáván s ostatními. Samotný cyklus jedné iterace je dokončen až když doběhnou všechny subcykly a výstupní objekt je stejně jako u MLEM vstupem do další iterace. Pokud je počet subcyklů označen jako S, pak je metoda OSEM vůči metodě MLEM S-krát rychlejší. [20]



Obrázek 7 a obrázek 8 - algoritmus metody MLEM (nahore) a OSEM (dole), zdroj: [20]

## 2.3 Zpracování obrazu – Postprocessing

V následujícím textu je teoreticky popsáno zpracování obrazu užitě dále v praktické části diplomové práce.

### 2.3.1 Histogram, minimální a maximální hodnota

Histogram je matematická funkce popisující zkoumaný obrázek, který se zobrazuje funkcí, kdy na ose X se vyznačuje matematický rozsah obrazu (např. 0-255) a na ose Y se uvádí absolutní počet pixelů v obraze pro danou matematickou hodnotu. Případně pokud se uvádí normalizovaný histogram na ose X je poměrná část pixelů v obraze, přičemž suma všech poměrů je rovna 1.

$$h(r_k) = \frac{n_k}{M \cdot N}; 0 \leq k \leq L - 1 > \quad (6)$$

Rovnice výše definuje normalizovaný histogram, kde  $h(r_k)$  je samotný histogram,  $n_k$  je absolutní počet pixelů v obraze s hodnotou intenzity  $r_k$ .  $M$  a  $N$  je pixelová výška a šířka obrazu, jejichž násobek dává kompletní počet pixelů v obraze. Poměr počtu pixelů dané intenzity a kompletního počtu pixelů v obraze vytváří normalizaci.

Posunem minimální a maximální hodnoty jasu manuálně nebo za pomoci optimalizačního algoritmu a roztažením zbylých hodnot mezi minimální a maximální hodnotou na celý rozsah vznikne ekvalizovaný histogram. Hodnoty jasu pod nastavenou minimální hodnotou a nad maximální hodnotou jsou oříznuty. [3]

### 2.3.2 Průměrový filtr

Neboli aritmetický průměrový filtr slouží k potlačení šumu. Jeho funkce spočívá o vytvoření čtvercové submatice  $S_{xy}$  o velikosti  $m \times n$ , která obsahuje centrální pixel o koordinátech  $x,y$  a jeho okolí dle nastaveného rozsahu z původního obrázku.  $g(s, t)$  jsou matematické hodnoty jednotlivých bodů submatice. Do výstupního obrázku se uloží hodnota  $\hat{f}(x, y)$  odpovídající aritmetickému průměru submatice. Průměrový filtr lokálně vyhlazuje odchylky a k potlačení šumu dojde jako výsledek rozmazání ve výstupním obrázku. [3]

$$\hat{f}(x, y) = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{(s,t) \in S_{xy}} g(s, t); 0 \leq s \leq m - 1; 0 \leq t \leq n - 1 \quad (7)$$

### 2.3.3 Mediánový filtr

Tento statistický filtr se ukázal velmi užitečný pro potlačení šumu typu „sůl a pepř“, tedy šumu složeného z náhodného výskytu černých a bílých bodů. Jeho fungování je podobně jako u průměrového filtru založeno na vytvoření sub matice  $S_{xy}$  o rozměrech  $m \times n$  okolo centrálního pixelu s koordinátou  $x,y$  původního obrázku. Do výstupního obrázku je v hodnotě  $\hat{f}(x, y)$  uložena mediánová hodnota z matice, tedy statisticky hodnota která se v rámci daného souboru (submatice) vyskytuje uprostřed seřazených hodnot od nejmenší po největší, v případě sudého počtu elementů v souboru je rovna aritmetickému průměru dvou hodnot nejbližší středu. [3]

$$\hat{f}(x, y) = \text{median}_{(s,t) \in S_{xy}} \{g(s, t)\}; 0 \leq s \leq m - 1; 0 \leq t \leq n - 1 \quad (8)$$

#### 2.3.4 Gaussův filtr

GLPF neboli Gaussův nízko propustný (*Low Pass*) filtr se používá k odstranění šumu, který má z pravidla vysokou frekvenci. Jeho funkce spočívá v konvoluci obrazu maskou (maticí) obsahující elementy Gaussovy funkce. Filtr je matematicky definován ve vztahu níže. Výstupem funkce níže je 2D matice obsahující Gaussovu funkci se středem uprostřed 2D matice. [3]

$$H(u, v) = e^{-\frac{D^2(u,v)}{2\sigma^2}} \quad (9)$$

#### 2.3.5 Softwarový binning

Postprocessingový binning stejně jako kamerový binning má za účel zvýšit zisk intenzity v obraze na úkor ztráty pixelového rozlišení. Oproti kamerovému binningu (popsaném v kapitole 2.1.2) není softwarový binning limitován vlastnostmi kamery. Řády softwarového binningu se stejně jako klasický provádí v řadě hodnot odpovídající  $2^N$ , kdy  $N$  je řada celých kladných čísel. Typicky se jedná o 2, 4, 8, 16. Výstupní obrázek této transformace bude vždy menší než originál a to poměrově dle nastavení se směru X a Y. Pokud bude binning 2 ve směru X a binning 4 ve směru Y, bude výstupní obrázek 2x užší a 4x nižší.

Samotný softwarový binning může oproti kamerovému fungovat v různých módech. Kamerový binning je vždy sumační, tedy kdy hodnoty plochy reprezentující 1 výstupní pixel jsou sečteny. U softwarového lze kromě sumačního módu navíc provádět mód průměrový, kdy je uložena průměrná hodnota z plochy, mód mediánový, kde je z plochy vybrána hodnota odpovídající statistickému mediánu, mód minimální nebo maximální hodnoty. Softwarový binning je transformace nereverzibilní. [2]

## 3 Analýza hardwarových možností

### 3.1 Základní typy snímačů kamer

Současná technologie digitálního záznamu obrazu je založená na 2 typech polovodičových snímačů nazvaných *Charged-couple device* (CCD) a *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor* (CMOS). Rozdíl mezi těmito technologiemi je popsán níže. Nejvíce rozšířené jsou v kamerách a fotoaparátech čipy CMOS, jelikož jsou cenově dostupnější a vhodné pro komerční (profesionální fotoateliéry) i nekomerční využití (přenosné kamery).

#### 3.1.1 CCD snímače

CCD jinak možné přeložit jako zařízení s vázanými náboji. Jedná se o technologicky starší typ a jeho původ sahá do roku 1969. Konstruktivně se jedná o polovodičový posuvný registr, který využívá tzv. vnitřního fotoefektu. Foton při dopadu na polovodičový element svým nárazem přesune elektron atomu do excitovaného stavu. Tím je danému elementu přiřazen kladný náboj, který lze odvést elektrodami a detekovat. Oproti klasickým fotodiodám jsou elektrody elementů pro tuto aplikaci vybaveny tenkou vrstvičkou  $\text{SiO}_2$ , který funguje jako dokonalý izolant.

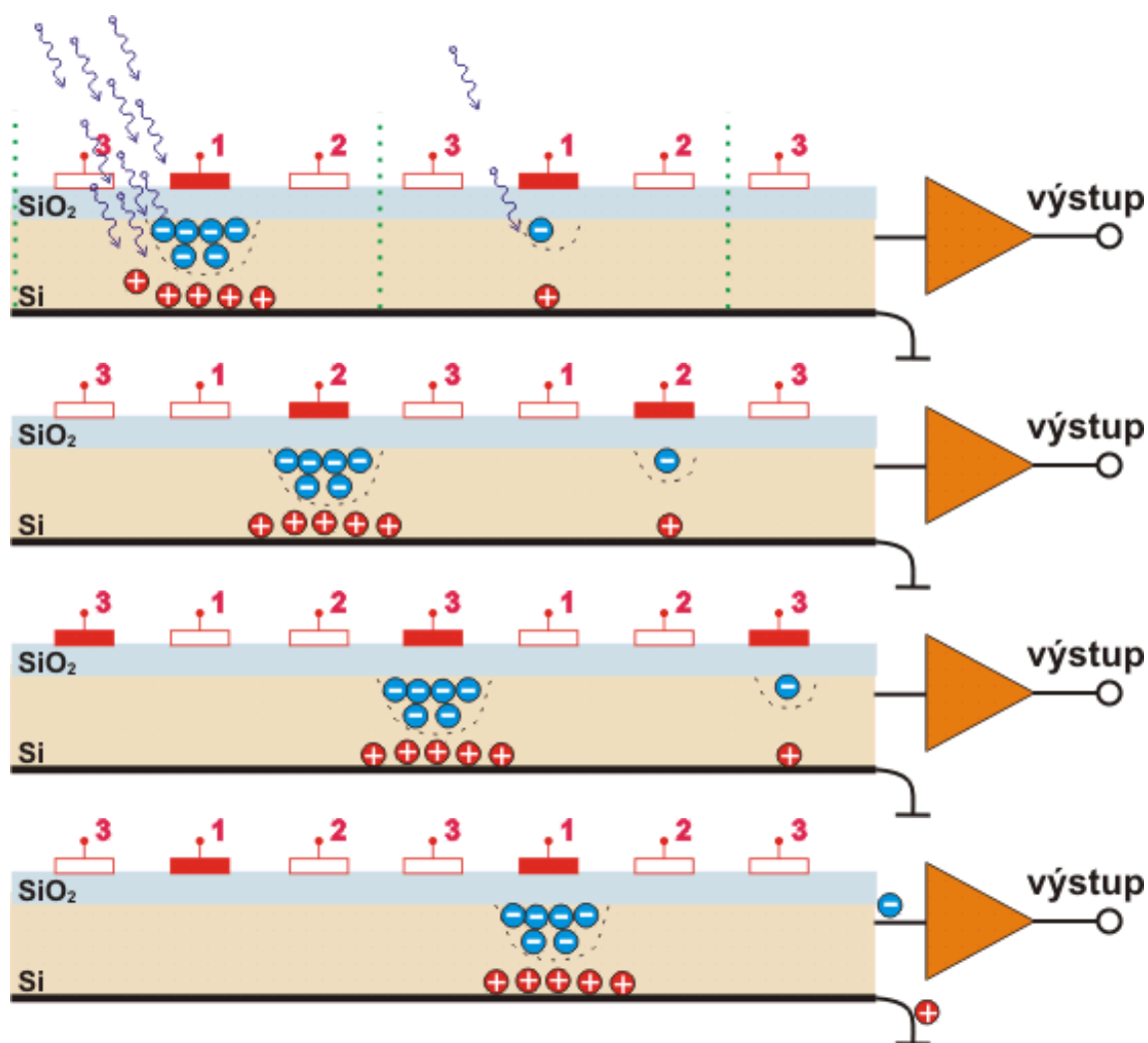
Před vlastním snímáním je nejprve vynulován celý snímač (odebrání volných elektronů) a dále během expozice elementu dopadají fotony viditelného záření a blízkého infračerveného spektra (NIR) a excitují elektrony daného elementu. Počet excitovaných elektronů je přímo úměrný množství dopadajícího světla. Vzniknou tzv. elektronové díry, které jsou přitahovány záporně nabitými elektrodami na spodku elementu. Následně dochází k čtení, kdy jsou jako posuvný registr náboje posouvány po řádku elementů a na jeho konci zesíleny a následně převedeny na diskrétní (digitální) signál.

Každý element dokáže vytvořit 0 - 5 mV (*miliVolt*) náboje. Tento analogový (spojitý) signál je převeden na číselnou hodnotu analogově-digitálního (A/D) převodníku. 0 mV odpovídá nulovému počtu zaznamenaných fotonů a 5 mV odpovídá maximálnímu počtu zaznamenaných fotonů. Lze to zobrazit jako stupnici šedi tzv. *grayscale*, kde černá barva je pro žádné fotony a bílá pro maximální možný počet. Výsledný rozsah lze následně rozdělit na odstíny šedi, které považujeme za úroveň jasu.

Pro 12 bitový A/D převodník lze stanovit 4096 hodnot, tedy pro bílou odpovídající 0 až černou odpovídající 4095. Pro 8 bitový převodník definuje 256 hodnot. Je všeobecně známo, že lidské oko umí rozlišit přibližně 50 odstínů šedi. Pro barevné signály je vždy potřeba pro každý barevný kanál vlastní jasový rozsah. Tedy pro barevné kamery na principu RGB (*red, green, blue*) a použití 8 bitového převodníku je získáno 256 hodnot pro každou barvu.

Tyto elementy jsou samostatné (izolované) jednotky seřazené do řádků. Řádky stejných rozměrů mohou být seřazeny pod sebe a vzniká matice obrazu. Počet elementů na řádek a počet sloupců poté uvádíme jako počet pixelů. Pokud uvažujeme použití jednoho řádku elementů, vzniká tzv. řádková kamera, která má speciální uplatnění v průmyslu.

Maticová aplikace se od řádkové příliš neliší, jelikož řádky dané matice jsou odečítány stejně jako jednořádková aplikace. To umožňuje při maticovém uspořádání odečítat řádek po řádku nebo ob řádek a vnikají tzv. půl snímky. Nejprve jsou odečteny liché řádky a následně sudé. Tato architektura čipu je označována jako prokládané čtení. [2]



Obrázek 9 - princip CCD, zdroj: [6]

### 3.1.2 CMOS snímače

Tato metoda sahá historicky až do roku 1963, plně funkční a konkurenčně schopný snímací čip byl sestaven až mezi lety 1993 a 1995. Teprve tehdy začal být konkurenceschopný CCD čipům díky levnějším výrobním nákladům, nižším energetickým nárokům a jednodušší aplikaci. To vedlo k masivnímu rozmachu digitálních fotoaparátů a kamer s CMOS. Rozdíl oproti CCD je v tom, že každý fotocitlivý element je adresovaný osami X a Y a čten zvlášť, což značně zjednodušuje konstrukci a zrychluje snímání.

Konstrukční nevýhodou oproti CCD snímačům je, že u CMOS zabírá zesilovač každého elementu část jeho plochy. Menší plocha fotodiody potřebuje pro použitelný signál větší zesílení což má za následek i zesílení šumu. V následující tabulce jsou přímo tyto dva typy porovnány. [2]

Tabulka 1 - porovnání CCD a CMOS, zdroj: [2]

Parametr	CCD	CMOS
Signál vystupující s pixelu	Paket elektronů	Napětí
Signál vystupující z čipu	Napětí (analogový signál)	Bity (digitální signál)
Rychlost	Nízká, sekvenční čtení	Vysoká, maticově adresované elementy
Citlivost	Velmi dobrá, lze dosáhnout kvalitního obrazu, lepší barevná věrnost snímků	Za snížených světelných podmínek může být problém dosáhnout kvalitního zobrazení, horší rozlišení barev
Dynamický rozsah	Vysoký	Průměrný
Šum	Malý, vysoká kvalita obrazu	Je větší s ohledem na menší funkční plochu elementů
Odběr energie	Odebírá více než CMOS, odhadováno až 50x	Relativně malý
Složitost čipu a náklady na vývoj	Menší	Velké
Složitost systému	Velké, mnoho obvodů mimo čip	Menší, většina obvodů přímo na čipu
Cena	Vysoká, jedná se o specializovanou výrobní technologii	Levnější, je užíváno standardní technologie výroby logických obvodů

### 3.1.2.1 Integrovaný IR-cut filter

Většina kamer s CMOS je konstruována pro viditelné spektrum světla tzv. *VIS*. Senzory mají i citlivost na větší rozsah vlnových délek a blízký infračervený signál (*NIR*), který se přirozeně vyskytuje a zaručuje snímání viditelného spektra. Z toho důvodů většina výrobců implementuje IR-cut filtry do svých kamer, které nepropustí infračervenou složku. Bývají konstruovány jako samotné sklíčko objektivu nebo implementovány do barevných filtrů kamer (barevné kamery). Mohou být implementovány i do objektivů.

Pro potřeby diplomové práce se uvažuje o snímání blízkého infračerveného spektra (*NIR*), a proto je využití těchto kamer vybavených IR-cut filtrem principiálně vyloučeno, jelikož zcela eliminuje infračervenou složku námi sledovaného signálu. [2]

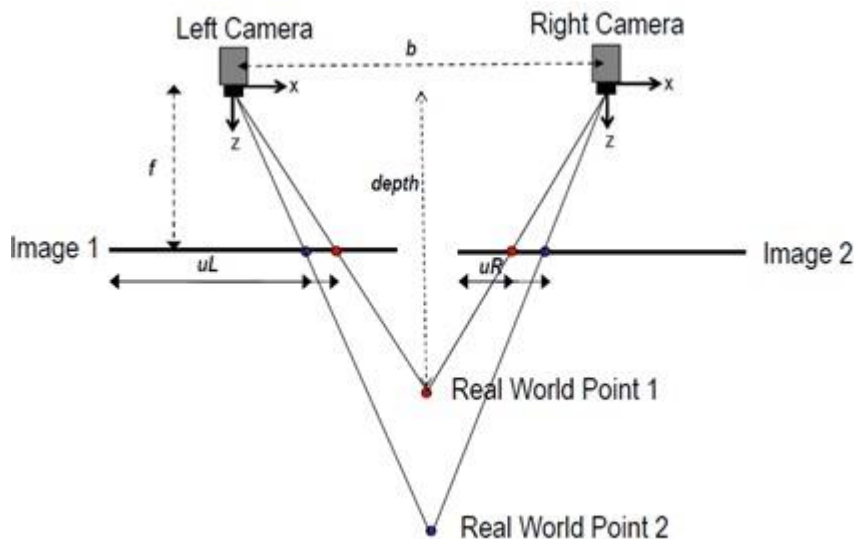
## 3.2 3D kamery

Tato kapitola popisuje dostupné metody trojrozměrných kamer pro optické snímání. Většina těchto metod je užívána hlavně v průmyslu.

### 3.2.1 Stereoskopie

Stereoskopie je základní vlastností lidského zraku, kdy pomocí dvou úhlu pohledu na jeden objekt získáváme informaci o vzdálenosti. Pro lidský zrak je to určeno vzdáleností mezi očima, pro technickou aplikaci se jedná o dvě kamery vzdálené od sebe v určené vzdálenosti zaostřené na jeden objekt nebo scénu. Případně existuje technické řešení speciální dvojité kamery (dva čipy, dva objektivy) nebo jedna kamera se speciálním 3D objektivem, který udělá obě projekce na jeden čip.





Obrázek 10 - ilustrace principu stereoskopie, zdroj: [22]

Pro elektronickou aplikaci je nutné snímací sestavu kalibrovat pomocí sady obrazů na kalibrační destičku s šachovnicovým vzorem, která leží na místě sledovaného objektu. Po této kalibraci je systém sledování k dispozici do doby, než je změněna pozice objektu nebo kamer. Na vztahu níže je uveden výpočet vzdálenosti bodu  $H$ , pomocí hodnot ohniskové vzdálenosti kamer  $f$ ,  $b$  je vzdálenost mezi kamerami a  $d$  je rozdíl bodu objektu mezi obrazy v hodnotě pixelů.

$$H = f \cdot \left(\frac{b}{d}\right) \quad (10)$$

Výstupem této metody mohou být dva zdrojové obrazy za denního světla, kombinovaný obraz s barevným posunem určený pro 3D brýle, obraz s vyznačením vzdálenosti bodu od kamery v barevné škále, prostorová rekonstrukce povrchu scény. [22]

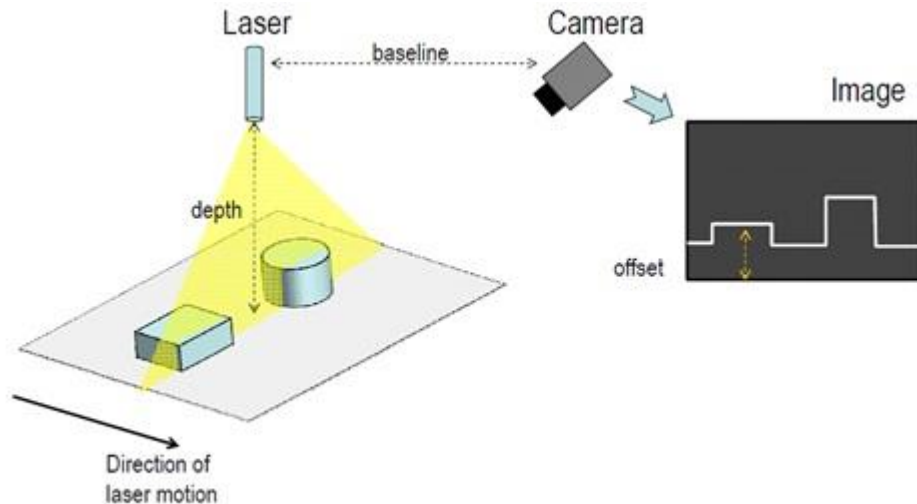
### 3.2.2 Kamera se strukturovaným zdrojem světla

Tato metoda nepotřebuje pro svoji aplikaci speciální kameru, ale strukturovaný zdroj světla a odpovídající software. Strukturovaný zdroj světla bývá většinou LED a vytváří na scéně přesně definovaný světelný vzor, po většinou to bývá šachovnice nebo pruhy různých velikostí. Software při použití definovaného vzoru vezme získaný obraz objektu a výpočtem deformace vzoru na povrchu sledovaného objektu je schopen zrekonstruovat prostorový reliéf povrchu objektu.

Přesnost metody lze zvýšit kombinací se stereoskopií (viz kapitola 3.2.1), kdy je objekt sledován dvojicí kamer. Z důvodu vzniku rušivých jevů se doporučuje tuto metodu užívat v temném boxu nebo tmavé místnosti, aby světlo, které není ze strukturovaného zdroje, nenarušovalo data. Čím jemnější je světelný vzor, tím jemnější je rekonstrukce reliéfu, ale na úkor navýšení chyb v obraze, z toho důvodu se většinou používá více snímků jednoho objektu (scény) s různými rozměry vzorů.

### 3.2.3 Laserová triangulace

Triangulace využívá, jak název napovídá trojúhelníkového vztahu, tedy pozice trojúhelníku mezi kamerou, lineárním laserem a snímaným objektem se známými vnitřními úhly. Lineární laser se na povrchu objektu deformuje, tuto změnu detekuje a zaznamenává kamera, která z této změny následně rekonstruuje povrch v dané linii. Zásadní nevýhodou této metody je, že vyžaduje mechanický pohyb, posun nebo rotaci buď objektu nebo sestavy laseru a kamery, aby byla získána data z povrchu objektu a nikoliv pouze z jedné linie. Tato metoda je považována jako jedna z nejpřesnějších.



Obrázek 11 - ilustrace laserové triangulace, zdroj: [22]

Existují zařízení založené na této metodě, které lze držet v ruce, u nich je poté rekonstrukce podmíněna výpočtem navazujících textur, které se skenují pohybem ruky kolem předmětu. Výstupem tohoto měření je prostorová síť bodů vytvářející reliéf objektu. V některých aplikacích se pracuje i se samotným lineárním profilem ze stabilního laseru a kamery, například při kontrole jednoho rozměru projíždějících výrobků nebo v monitoringu silniční dopravy, kdy při vjezdu do tunelu je tato soustava a analyzuje podle podélného profilu rozměr a typ vozidla, které právě vjíždí do tunelu, rozezná kamion (tahač a přívěs), autobus nebo kompaktní nákladní vůz, dodávku a osobní auto. [22]

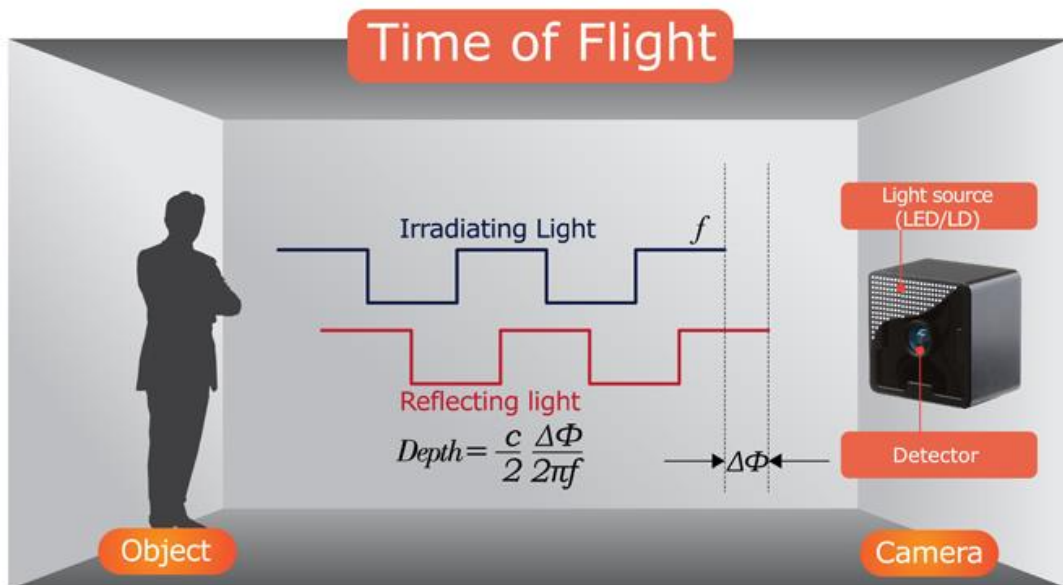
### 3.2.4 Time of Flight (TOF)

Tato metoda využívá rychlosti světla a vzdálenosti mezi kamerou a objektem. Kamera je vybavena specifickým světelným zdrojem, který vydává záblesky v naprogramované sekvenci. Poté při znalosti parametrů záblesku a detekci odraženého záblesku kamerou s časovým zpožděním je schopen příslušný software při znalosti rychlosti světla vypočítat vzdálenost jednotlivých bodů scény na základě doby, kdy záblesk putoval od kamery k objektu, odrazil a se doputoval zpět ke kameře. Čím delší je prodleva mezi zábleskem a detekcí, tím dále je bod ve scéně od kamery.

$$H = \frac{c \Delta\Phi}{2 \cdot 2\pi f} \quad (11)$$

Ve vztahu pro výpočet hloubky bodu scény  $H$  jsou zastoupeny  $c$  jako rychlost světla,  $f$  jako frekvence světelných pulsů a  $\Delta\Phi$  periodický posun mezi pulsem vyzářeným a odraženým. Výstupem této metody je obraz, kde je vzdálenost bodu scény od kamery

vyznačena barevnou stupnicí nebo prostorová síť bodů, kterým je přiřazena vypočtená vzdálenost s možností překrýt tuto síť texturou pořízenou za denního světla. Druhé zpracování by šlo popsat jako virtuální reliéf scény.



Obrázek 12 - princip Time of Flight, zdroj: [24]

Tato metoda nalézá uplatnění v průmyslu pro strojové vidění a robotiku, kde může sloužit jako kontrolní mechanismus s možností měření rozměrů, v automobilovém průmyslu jako rychlý způsob detekce vzdálenost objektu (překážky) před vozidlem, pro geomapování, kdy je takováto kamera umístěna na dron, který přelétá nad zájmovou oblastí a kombinací získaných obrazů a GPS dat skládá reliéfní mapu. [23]



Obrázek 13 - 3D kamera Basler ToF640-20gm 850nm, zdroj: [23]

### 3.3 Optická soustava

Optická soustava neboli objektiv slouží k přenesení reálného obrazu na čip kamery. V praxi dochází vždy ke zmenšení obrazu a jeho přetočení vzhůru nohama, tak abychom byli schopni prakticky sledovaný objekt v rozměrech od centimetrů až po kilometry (panoramatické fotky) promítnout na čip. Rozměry čipu se uvádí v mm nebo jeho uhlopříčka ve zlomcích palce (*inch*, americká míra délky). V případě uvedené uhlopříčky se přesný rozměr čipu určuje výrobcem nebo podle tabulky standardizovaných rozměrů.

Objektiv se může skládat z jediné čočky – optického elementu nebo ze soustavy více optických elementů. Mezi ně patří spojky a rozptylky, filtry, mechanické uzávěrky, mechanické clony, zrcadla. Zrcadlový objektiv je velmi speciální teleobjektiv na velkou vzdálenost s mnoha konstrukčními neduhy. Užívá se ve velmi specifických aplikacích (např. hvězdářské dalekohledy).

Objektivy jsou vyráběny sériově pro daný rozměr snímacího čipu a pevnou nebo nastavitelnou ohniskovou vzdáleností. Taktéž existují standardizované patice ve formu bajonetu (fotografické objektivy) nebo závitu se standardizovaným rozměrem (C-mount, T-mount, CS-mount). [2]

### 3.3.1 Ohnisková vzdálenost

Carl Friedrich Gauss definoval ohniskovou vzdálenost jako podíl lineární velikosti obrazu (předmět) ke zdánlivé velikosti předmětu (obraz) nekonečně vzdáleného. Pro každou optickou soustavu existují tedy dvě hodnoty ohniskové vzdálenosti, jedna před soustavou na straně předmětu a druhá za soustavou na straně čipu. Tyto dvě hodnoty můžou, ale nemusí být shodné. V případě nastavitelných objektivů je žádoucí, aby hodnota ohniskové vzdálenosti na straně předmětu byla proměnná a na straně čipu neměnná.

Z fyzikální podstaty závisí hodnota ohniskové vzdálenosti na indexu lomu skla, ze kterého je čočka vyrobena a indexu lomu okolního prostředí, který je až na výjimečné případy vzduch, taktéž na polovině křivosti optických ploch. Převrácená hodnota ohniskové vzdálenosti se nazývá optická mohutnost s jednotkou dioptrie.

$$\frac{1}{f} = \left(\frac{n_2}{n_1} - 1\right) \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) \quad (12)$$

Ve výše uvedeném vztahu pro výpočet ohniskové vzdálenosti čočky  $f$  jsou proměnné  $n_2$  index lomu skla,  $n_1$  index lomu okolního prostředí,  $r_2$  a  $r_1$  poloměry křivosti přední a zadní obrazové plochy. V případě, že výsledná hodnota je větší než nula  $f > 0$  označujeme čočku jako spojku, pokud je menší než nula  $f < 0$  označujeme čočku jako rozptylku. [2]

### 3.3.2 Zorný úhel, základní zvětšení objektivu, pracovní vzdálenost a zorné pole

Zorný úhel neboli jinak známý jako úhel záběru je výseč ze scény před objektivem, který je snímán a promítán na čip. Tento úhel se počítá od ohniskové vzdálenosti optické soustavy a velikosti snímacího čipu. Promítaný obraz je z fyzikální podstaty kruhový a čipy jsou konstruovány čtvercové nebo obdélníkové, z toho důvodu musí být projekce na čip větší, aby vzniklý kruh ozářil celou plochu čipu. V opačném případě by část čipu nebyla exponována a vznikl by kruhovitý obraz na černém pozadí, obdélníkovém nebo čtvercovém podkladu.

$$\alpha = 2 \cdot \arctan\left(\frac{u_s}{2f}\right) \quad (13)$$

Ve výše uvedeném vztahu pro výpočet zorného úhlu  $\alpha$  z hodnot uvažovaného rozměru snímacího čipu  $u_s$  (dáno výrobcem kamery) a ohnisková vzdálenost  $f$ . Pro výpočet zorného pole nebo výběr objektivu podle velikosti čipu a předpokládaného zorného pole potřebujeme znát základní zvětšení objektivu, který vypočteme podle vztahu níže. V tomto vztahu je  $u_s$  zvolený rozměr snímacího čipu a  $U_s$  rozměr zorného pole.

$$M_{PMGA} = \frac{u_S}{U_S} \quad (14)$$

Vybrané rozměry se musí shodovat orientací, pokud vybereme kratší hranu čipu, zároveň bereme kratší hranu zorného pole, pokud delší hranu čipu, počítáme s delší hranou zorného pole. Kombinace obou hran zorného pole nám udává tzv. FOV neboli anglicky „Field-Of-View“. Vynásobení základního zvětšení  $M_{PMGA}$  a pracovní vzdálenosti  $L_{WD}$  nám vyjde ohnisková vzdálenost (viz vztah níže). Obě hodnoty ve vztahu musí být dosazeny v mm, jelikož je konvence udávat ohniskovou vzdálenost v této jednotce. Pracovní vzdáleností („Work Distance“) nazýváme vzdálenost mezi objektem a předmětem, v případně mezi objektem a scénou.

$$f = L_{WD} \cdot M_{PMGA} \quad (15)$$

Kombinací dvou výše uvedených vztahů dostaneme vztah pro přepočítání ohniskové vzdálenosti  $f$  na rozměr zorného pole  $U_S$  nebo výpočet ohniskové vzdálenosti v závislosti na žádaném zorném poli a rozměru snímacího čipu  $u_S$ , viz níže. [2]

$$\frac{u_S}{U_S} = \frac{f}{L_{WD}} \quad (16)$$

### 3.3.3 Hloubka ostrosti

*Deep of Field* (DOF) neboli přeloženo jako hloubka ostrosti je jev, kdy předměty před nebo za ostřicí rovinou scény se jeví jako zaostřené. Tento jev lze využít, pokud chceme sledovat více objektů s různou vzdáleností od kamery, tak aby všechny byly viditelné ostře. V takovém případě se snažíme o hloubku ostrosti co největší. Nebo naopak pokud chceme sledovat jeden hlavní objekt a všechny ostatní (pozadí) chceme rozostřené nebo ideálně co nejméně viditelné, v takovém případě se snažíme o hloubku ostrosti co nejmenší a ostřicí rovinu nastavujeme pouze na objekt.

Hloubku ostrosti lze ovlivnit několika faktory. Základním faktorem pro hloubku ostrosti je clonové číslo (viz kapitola 3.3.4). Čím vyšší je clonové číslo, tím vyšší je hodnota hloubky ostrosti. Zvýšením hodnoty expozice EV o 2 se zdvojnásobí hloubka ostrosti. Dalším faktorem je ohnisková vzdálenost a pracovní vzdálenost (WD), neboli vzdálenost optická soustava – objekt (případně celá scéna), zde platí, že čím delší pracovní vzdálenost, tím vyšší je hodnota hloubky ostrosti. Zároveň platí, že čím vyšší hodnota ohniskové vzdálenosti  $f$ , tím nižší je hloubka ostrosti.

$$DOF = c \cdot N \cdot \frac{1 + \frac{f}{s - f}}{p} \cdot \frac{1}{M^2 \cdot \left( 1 \pm \frac{N \cdot c}{f \cdot \frac{f}{s - f}} \right)} \quad (17)$$

Ve vztahu pro výpočet hloubky ostrosti ( $DOF$ ) výše zastupuje  $c$  průměr kruhu rozostření v mm,  $N$  clonové číslo,  $f$  ohnisková vzdálenost,  $s$  ohnisková vzdálenost k čipu,  $p$  je parametr objektivu, obvykle  $p = 1$  a pro širokoúhlé objektivy  $p > 1$ . Pro získání maximální hloubky ostrosti je pro každou optickou soustavu určována tzv. **hyperfokální vzdálenost**,

na kterou je potřeba nastavit optickou soustavu podle vzorce níže. V něm je zastoupena  $H$  jako hyperfokální vzdálenost v mm,  $f$  jako ohnisková vzdálenost,  $N$  jako clonové číslo a  $c$  jako průměr kruhu rozostření. [25]

$$H = \frac{f^2}{N \cdot c} \quad (18)$$

### 3.3.4 Expozice

Expozice je soubor regulací, jak ovlivnit množství fotonů dopadající na čip. Skládá se ze 3 metod: doba expozice, clona a zisk. Nastavením těchto tří parametrů ovlivňujeme získaný obraz. Pokud je jas obrazu nedostatečný, označujeme obraz jako *podexponovaný*, v případě že má obraz nad míru vysoký jas či dokonce dosáhne saturace, je označován jako *přexponovaný*.

Základní metodou regulace je **doba expozice**, ta přímo definuje, po jak dlouho dobu je čip vystaven dopadu fotonů ze scény. Určována je standardně v sekundách [s] nebo jejich zlomcích. V případě průmyslových kamer nebo obecně video kamer se jedná o milisekundy [ms], jelikož obraz je pohyblivý. V případě kamer se častěji než doba expozice uvádí tzv. FPS neboli *Frames Per Second*, doslovně přeloženo počet snímků za sekundu. Aby byl pro lidské oko pohyblivý obraz spojitý, musí být FPS vyšší nebo rovno 25. Opačným extrémem jsou expoziční časy u snímání objektů s nízkým nebo až velmi nízkým zdrojem fotonů, v takovém případě dosahují řádů minut až hodin.

Technicky je doba expozice řešena dvojím způsobem – mechanicky nebo elektronicky. Mechanické řešení je fyzická překážka mezi scénou a čipem tzv. uzávěrka, která je po nastavenou dobu expozice odsunuta (mechanicky nebo servopohonem) a po ukončení tohoto času vrácena do výchozí pozice, kdy zakrývá čip. Výhodou tohoto řešení je, že v době, kdy není žádoucí expozice čipu, žádné světlo se na něj nedostane, nevýhodou je pomalá reakce, jelikož mechanika má své rychlostní omezení. Alternativou je tzv. elektronická uzávěrka, která funguje na principu časového řízení odečítání hodnot z čipu. Toto řešení je velmi rychlé, levnější (nevyžaduje nic navíc) a umožňuje i natáčení videí s vysokým FPS, ale neexistuje možnost, jak zabránit osvětlení čipu mimo expoziční čas.

Další metodou regulace je **clona**, ta je definována jako průměr otvoru, kterým prochází světlo k čipu. Tato regulace má pouze mechanické řešení a to pomocí lamel a servopohonu, který úpravou jejich pozice může snížit průměr otvoru a tím zvýšit tzv. clonové číslo. To je definováno vždy pro danou optickou soustavu a jeho úprava záleží na vlastnosti objektivu. Ve vztahu níže je clonové číslo  $N$ ,  $f$  je ohnisková vzdálenost a  $C$  je průměr clony.

$$N = \frac{f}{C} \quad (19)$$

Ze vztahu výše lze odvodit, že pro změnu plochy (kruhu), kterým prochází světlo se počítá s druhou mocninou průměru clony. Pokud chci clonové číslo snížit 2x, musím zvýšit průměr clony 4x. S touto závislostí se počítá již při konstrukci optických soustav a proto jsou clonová čísla dělána do řady odpovídající  $N = \sqrt{2^n}$ , kde  $n$  je celé kladné číslo. Clonové číslo je často uváděno jako *f/clonové číslo*, například: f/1.4, f/2.8, f/4.

Poslední metodou regulace je **zisk** (anglicky *gain*), který určuje zesílení signálu na samotném čipu nebo příslušné elektronice. Tato metoda má pouze elektrické řešení. Zesílení je přímo úměrné míře šumu. Vlastní zesílení kamery je různé pro každý vyrobený typ čipu. Normalizovat lze pouze fotoaparáty a průmyslové kamery, kde je zisk z čipu normalizován zesilovačem. Standardizovaná jednotka zesílení se nazývá ISO a je také uváděna v číselné řadě. Pokud se hodnota v řadě zdvojnásobí, stačí pro stejný výstup jako pro předchozí ISO hodnotu poloviční expoziční čas.

Všechny tři výše zmíněné metody regulace, respektive jejich číselné výstupy lze zkombinovat do EV, tzv. *Exposure Value*, která je zároveň výstupem přístroje nazvaného expoziometr. Tato EV vzniká kombinací výše zmíněných, ale dosažení žádané hodnoty lze jejich různým poměrem. Způsob tohoto poměru závisí na typu aplikace, pro kterou expozici určujeme. Například pro záznam pohyblivého obrazu musíme mít nízký expoziční čas a všechny ostatní hodnoty tomu musíme přizpůsobit. Ve vzorci pro výpočet EV zastupuje  $N$  číslo clony,  $T_E$  a expoziční čas a platí pro hodnotu ISO 100.

$$EV = \frac{\log\left(\frac{N^2}{T_E}\right)}{\log 2} \quad (20)$$

Hodnotu EV lze použít pro vyjádření intenzity osvětlení  $E_f$  v *luxech*. Tato hodnota určuje osvětlení dopadající na čip skrze optikou soustavu v závislosti na jejich vlastnostech a aktuálním nastavení. Vztah níže vychází z hodnoty  $E_f$  pro EV 0, který je roven 2,69, do výpočtu se vkládá pouze hodnota EV ze vztahu výše. Tento vztah platí pro ISO 100. [2]

$$E_f[\text{lux}] = 2,69 \cdot 2^{EV} \quad (21)$$

## 4 Zmapování současného stavu

V následující kapitole je analyzován současný stav na pracovišti IKEM, tak jak byl v čase zadání diplomové práce.

### 4.1 Pozorování probíhajících experimentů

Pro účely diplomové práce proběhlo pozorování na pracovišti IKEM probíhajících experimentů za účelem zjištění podrobností a kritických bodů pro návrh konstrukce přístroje, který by měl sloužit k těmto experimentům.

V době sledování probíhaly experimenty na výzkum substituce výroby inzulínu u diabetických jedinců za pomoci tkáňového implantátu **Langerhansových ostrůvků** ze zdravých dárců uložené do „komůrek“, podobných implantačním plastovým shantům. Tyto komůrky byly implantovány *sub cutálně* laboratorním potkanům v oblasti abdomen (dolní část trupu) po dvou kusech. Do jednoho kusu byl vložen implantát z dárce – „celosvítícího“ potkana a druhá komůrka zůstala prázdná jako referenční. Dárce je potkan, který je geneticky modifikován (GMO), tak že všechny jeho buňky při podání luciferinu začnou generovat fotony pomocí tzv. bioluminiscence, viz kapitola 1.1.1.

Experiment sleduje takto léčené potkany ode dne implantace po žádanou dobu v pravidelných intervalech kontrol pomocí magnetické rezonance (MRI) a bioluminiscenčního měření. Pro potřeby kontroly je potkanovi podána inhalační anestezie Isofluranu míseného se vzduchem v 5 % poměru pro zahájení anestezie, 2-3 % poměru při kanylaci a 1 % poměru v průběhu měření.

Po začátku anestezie je potkanovi napíchnuta kanyla do ocasní žíly, která bude sloužit pro podání kontrastní látky pro MRI a luciferinu pro bioluminiscenční měření. Potkanovi je elektrickým strojkem oholeno břicho, jelikož bylo zjištěno, že jeho srst komplikuje bioluminiscenční měření. Srst výrazně až někdy zcela utlumuje vznikající optický signál.

Po této přípravě je potkan umístěn do zařízení magnetické rezonance. Pomocí snímání je vytvořen scout snímek, který zjistí, zda je potkan umístěn správně. Následně dojde k ladění cívek zařízení magnetické rezonance. Následuje série měření, kde první je nativní a následně je podána injekčně do kanyly kontrastní látka pro MRI (*Gadolinium*). Výstupem tohoto měření jsou tomografické anatomické řezy s pixelovým rozlišením 256 x 256, kde 1 px odpovídá reálnému rozměru 204  $\mu\text{m}$ .

Následně je stále v anestezii potkan přemístěn na pracoviště bioluminiscenčního měření, kde se nachází zařízení IVIS Lumina XR (popsaná v kapitole 4.2), společně s anesteziologickou jednotkou a řídicím počítačem. Místnost je aktivní cirkulací temperována na maximálně 24°C, je koncipována jako temná komora bez oken, označená jako „Laboratorní box“. Potkan je umístěn do boxu přístroje IVIS Lumina, srovnán dle vyznačené plochy snímání. Zařízení pořídí nejprve obraz za „denního“ světla, který poslouží jako topografický podklad pro naměřená data. Následuje bioluminiscenční měření s expozicí 1 minuty (nastavení 60 sekund). První snímání vychází negativně a slouží ke kontrole.

Poté je do kanyly potkanovi podán luciferin a zahajuje se znovu stejná série měření denní obraz + bioluminiscenční měření. Začátek každého dalšího měření je po 2 minutách (1 minuta expozice, 1 minuta čekání) až do délky 20 minut). Následně jsou data exportována



ve formě obrázku a post procesingově jsou pomocí ROI (*Region of Interest*) vyexportovány průměrné hodnoty jasu bioluminiscenčního signálu ze dvou sledovaných ROI, kde jedna zahrnuje testovací komůrku a druhá je referenční. Vyexportovaná data dávají křivku vývoje signálu v obou ROI v časové ose 20 minut. V této experimentální skupině bylo 6 potkanů.

## 4.2 IVIS Lumina XR

Zařízení IVIS Lumina XR od výrobce Caliper Life Sciences, Inc. (USA), který je dnes součástí PerkinElmer, Inc. (USA), je užívána na pracovišti IKEM k testování buněčné aktivity *in vivo* pomocí bioluminiscenční a fluorescenční metody. Tento model umožňuje i snímání vestavěným dvourozměrným rentgenovým zařízením. Zařízení je primárně určeno pro myši, potkany a *in vitro* vzorky v průhledném stabilním obalu.

Zařízení se skládá z následujících částí: Snímací temné komory s ovládací elektronikou a vertikálně posuvnou pracovní deskou uvnitř komory, jejíž součástí je otočná scintilační destička pro RTG. V horní části komory je umístěna chlazená CCD kamera a optická soustava, filtry a výstupy zdroje světla a pracovní LED osvětlení komory. V dolní části pod komorou je uložen zdroj rentgenového záření. Části s kamerou i s RTG zdrojem jsou nepřístupné bez demontáže zařízení. Komora je uzavřena světlotěsnými dveřmi s dvojitým jištěním proti nechtěnému otevření – mechanické a elektromagnetické a bezpečnostním vypínačem napájení RTG zdroje.

Další součástí zařízení je monitor a ovládací počítač s operačním softwarem z rodiny Windows, akvizičním a ovládacím software pro kameru, snímací komoru a RTG zařízení. Fluorescenční modul skládající se ze zdroje světla a excitačních filtrů, který je se snímací komorou propojen optickými vlákny.

Volitelnou součástí zařízení je XGI-8 anestetický systém od stejného výrobce, který je určen pro anesteziologický plyn Isofluran. Zařízení je vybaveno odpařovačem kapalného isofluranu, který je směšován v nastaveném poměru s čistým vzduchem nebo kyslíkem. Zařízení má pro kontrolu dva vodní průtokoměry a rozvody pro snímací komoru a průhledný uzavíratelný box, sloužící k začátku anestezie. [26][27]

### 4.2.1 Technické parametry

Tabulka 2 - technické parametry přístroje IVIS Lumina XR, zdroj: [26][27]

<b>Kamera CCD</b>	
Nízký temný proud, termoelektrické chlazení, 16 bit CCD digitalizace, elektronický odečet s nízkým šumem pro obrazy s extrémně nízkým signálem	
Typ senzoru	Chlazený CCD se zadním osvitem ( <i>back illuminated</i> )
Pixelové rozlišení	1024 x 1024
Velikost pixelu	13 x 13 $\mu\text{m}$
Kvantová účinnost	> 85 % 400 - 700 nm > 50 % 350 - 900 nm 550-650 nm
Readout noise pro binning 1	$\leq 2 e^-$ RMS
Světelná citlivost	$< 0,0015 e^-/\text{pixel}/\text{sec}$
<b>Optika</b>	
Objektiv f/stop	f/.95 – f/16

Zorné pole (FOV)	Fluorescence nebo bioluminiscence: A (5 cm <sup>2</sup> ), B (7,5 cm <sup>2</sup> ), C (10 cm <sup>2</sup> ) a D (12,5 cm <sup>2</sup> ) Rentgen: A, B a C
<b>Zdroj rentgenového záření</b>	
Vysokonapěťový potenciál	20 až 40 kV
Maximální proud	100 mA
Typ anody	Wolfram
Typ okna zdroje	Beryllium
Velikost bodu	~ 300 mm
Úhel kužele	46°
Zorné pole (FOV)	5 cm, 7,5 cm, 10 cm
Filtr	Hliník, 0,4 mm silný
<b>Snímací komora</b>	
Požadavky na napájení	2,0 A při 240 V, 50 – 60 Hz
Rozměry	48 x 71 x 100 cm
Rozměry dveří	38 x 51 cm
Hmotnost	73 kg
<b>Fluorescenční modul (samostatná jednotka)</b>	
Požadavky na napájení	200W, 240 VAC, 50/60 Hz
Lampa	150W Quart Tungsten Halogen 21 V Barevná teplota: 3250 K
Rozměry	21,9 x 18,5 x 17,7 cm
Hmotnost	2,24 kg

### 4.3 Dostupné 3D řešení pro bioluminiscenci a fluorescenci

V současné době jsou známé 3 metody pro získání 3D informací o umístění a intenzitě zdroje bioluminiscenčního nebo fluorescenčního signálu.

#### 4.3.1 Kamera s laserovou triangulací

Tato metoda vychází z kapitoly 3.2.3, jelikož je aplikovaný stejný princip získání prostorového modelu za použití laserového paprsku, jehož deformace na povrchu objektu (potkana nebo myši) je snímána kamerou a následně přepočítaná do povrchového modelu. Navíc tato metoda užívá 2D nasnímaná luminiscenční data jako v případě přístroje popsaného v kapitole 4.2. Ty však pomocí získaného povrchového modelu přepočítá z povrchu modelu do jeho vnitřku, za pomoci vyzkoumané distribuce fluorescenčního nebo bioluminiscenčního záření uvnitř živého organismu.

Výstupem této metody je kromě klasického 2D snímání i povrchový 3D model sledovaného zvířete a uvnitř tohoto modelu přepočítaná bioluminiscenční nebo fluorescenční data. Příkladem užití této metody jsou přístroje IVIS Spectrum a IVIS SpetrumBL. Tuto metodu lze zkombinovat i daty z jiného rentgenového počítačového tomografu díky povrchovému 3D modelu a vzájemně prostorově zakótovaným bioluminiscenčním nebo fluorescenčním datům. [29][30]

#### 4.3.2 Kamera a MicroCT

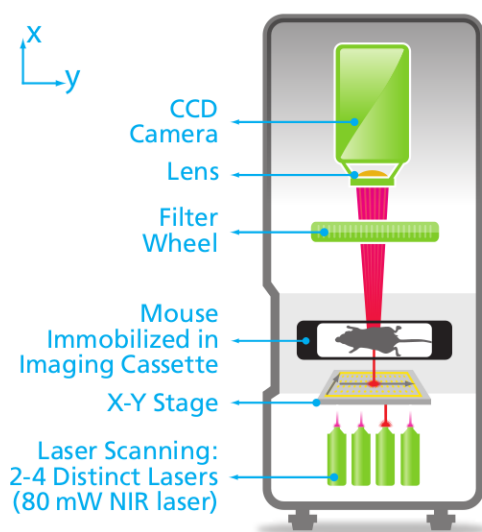
Další metoda pro získání trojrozměrných bioluminiscenčních dat využívá MicroCT neboli rentgenový počítačový tomograf malých rozměrů a s nízkou dávkou záření. Tento typ zařízení má pracovní desku s možností kontinuálního rotačního pohybu sledovaného

objektu (myš) mezi zdrojem rentgenového záření a deskovým scintilačním detektorem. Z metody MicroCT se získají kompletní anatomická trojrozměrná data včetně přesného topografického povrchu sledovaného objektu. Následně probíhá expozice CCD kamery bioluminiscenčním nebo fluorescenčním signálem ze sledovaného objektu.

Pozice sledovaného objektu se v průběhu měření nemění a proto je nutné následně v rámci této metody nasnímaná 2D data přepočítat z povrchového topografického modelu za pomoci distribuční funkce pro bioluminiscenční nebo fluorescenční signál v živém organismu. Výstupem této metody jsou trojrozměrná anatomická a topografická data z rentgenové počítačové tomografie a trojrozměrná vypočtená bioluminiscenční nebo fluorescenční data. Příkladem této metody je přístroj IVIS SpetrumCT. [31]

#### 4.3.3 FMT – *Fluorescence transillumination tomography*

Metoda FMT neboli volně přeloženo fluorescenční prosvěcovací tomografie je založena na principu, že excitační záření v podobě laserů osvětluje objekt z jedné strany a z druhé strany je pozorován CCD kamerou. Osvětlování je řízeno přes XY rastrovou matici, která určuje směr jednotlivých excitačních záblesků pod objektem. Sledovaný objekt (potkan, myš, laboratorní vzorek) je imobilizován a zajištěn v kazetě, kde musí být stlačen. Kazeta je poté zasunuta do přístroje.



Obrázek 14 - princip FMT 4000, zdroj: [32]

Tomografická fluorescenční data jsou vypočtena z kompozice koordinátů XY zdrojového excitačního záření a s ním souvisejícím detekovaným emisním zářením. Poté je vypočten zdroj fluorescenčního signálu ve sledovaném objektu. Tento výpočet je podmíněn kalibrací před měřením, která určí prostorový útlum fluorescenčního signálu. Příkladem této metody jsou přístroje FMT 1000, FMT 2000 a FMT 4000, jež se liší v počtu excitačních zdrojů (laserů) v počtu 1, 2 a 4. Více zdrojové varianty umožňují detekci více typů fluorescenční agens najednou. [32]

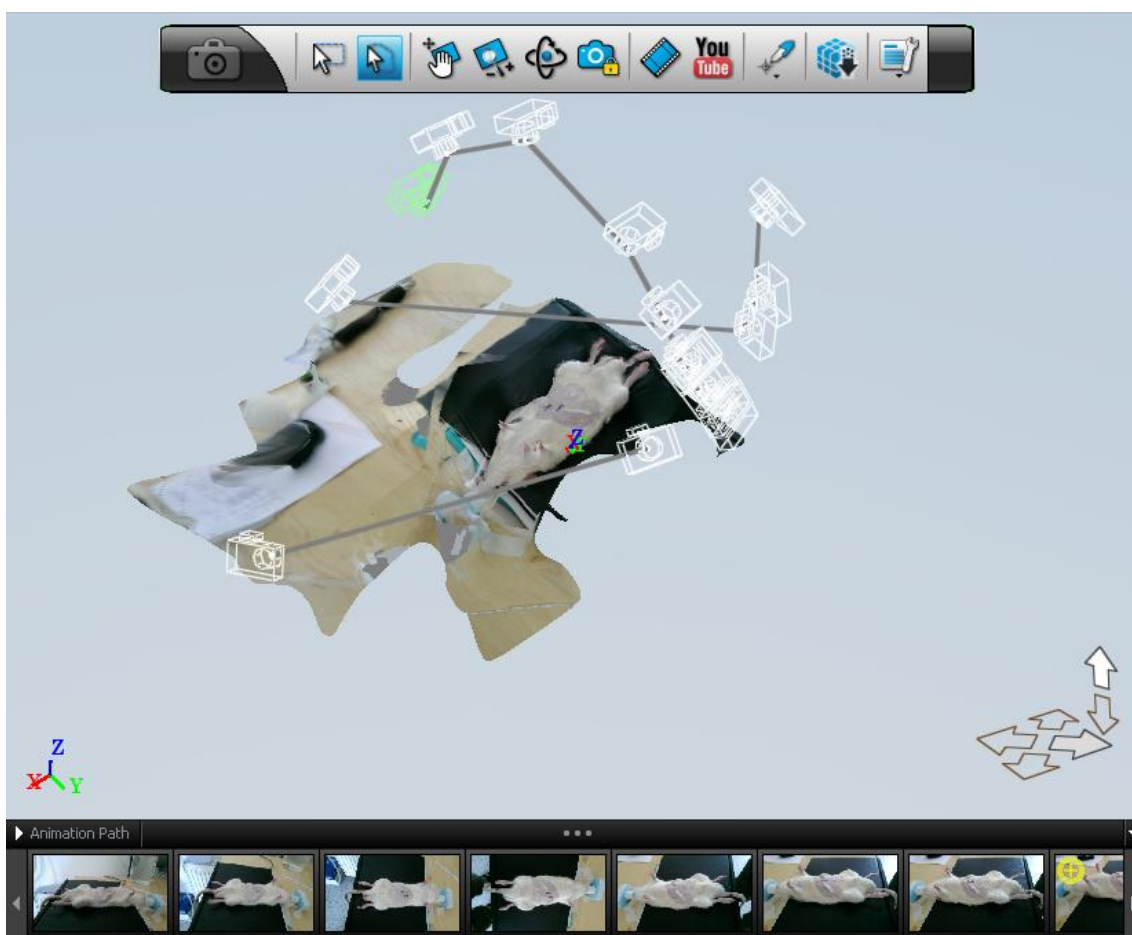
## 5 Analýza dostupných softwarových možností

Pro účely této diplomové práce je potřeba software schopný rekonstrukce obrazu z libovolného nebo pevného počtu úhlů snímání, který by se následně složil do tomografických vrstev nebo do strukturovaného trojrozměrného objektu. Pro účely testování vybraných programů byly využity fotografie pořízené za denního světla v průběhu právě probíhajícího experimentu v zařízení IKEM. Zásadním kritériem bylo zjistit, který software by byl pro tuto diplomovou práci nejvhodnější.

### 5.1 Autodesk 123D Catch

Autodesk® 123D Catch, Dostupné po přihlášení: <http://www.123dapp.com/>

Firma Autodesk vytvořila bezplatný software pro přeměnu konvenčních fotografií na trojrozměrné modely včetně grafického povrchu odpovídajícího realitě. Obecně jejich projekt 123D slouží k přiblížení technologií trojrozměrných obrazů lidem za pomoci jejich počítačů, tabletů a mobilních telefonů. Cílem je zavést trojrozměrné obrazy a trojrozměrný tisk do všední praxe. Tento program vyžaduje registraci Autodesk.



Obrázek 15 – výstup programu Autodesk 123D

Konkrétně software 123D se však ukázal pro účely této diplomové práce nevhodný, jelikož pro svoji funkci vyžaduje velké množství fotografií ideálně snímané ve vodorovné ose v kruhu kolem objektu. V diplomové práci se předpokládá malý počet kamer v půl oblouku nad snímaným objektem, což jak se ukázalo při testování je nedostatečným

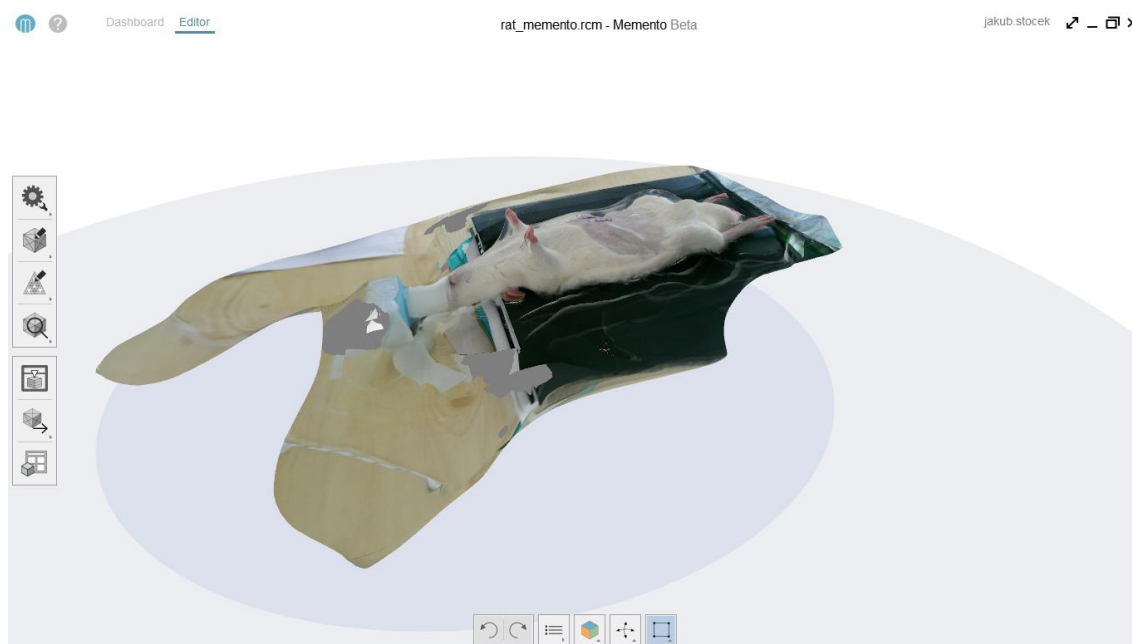
zdrojem. Kromě toho algoritmus určující pozici kamery pro dané snímání je v tomto software uzamčen a nelze pozici určit nebo modifikovat.

## 5.2 Autodesk Memento Beta

Autodesk® Memento Beta (online), Dostupné po přihlášení: <https://memento.autodesk.com/about>

Další program od firmy Autodesk, stále ještě ve verzi *Beta*, má stejné cíle jako obdobný 123D Catch, avšak spojuje v sobě *end-to-end* řešení, tedy výstupem tohoto software mají být produkty vhodné k publikaci nebo trojrozměrnému tisku přímo. Výhodou tohoto software je, že rekonstrukce probíhá přímo na serverech Autodesk. Nezatěžuje tak počítač nebo jiného zařízení, na kterém běží (např. tablet) a není závislé na jeho skutečném výkonu. Tento software taktéž vyžaduje registraci Autodesk.

Samotná rekonstrukce probíhá tak, že na *cloud* se nahraje sada fotografií k danému modelu, server bez vnějšího zásahu (uživatele) složí objekt a následně jej nabídne ke stažení. Výsledný model je stažen do zařízení a následně prohlížen. V zařízení se dá model ještě dodatečně editovat, ale opět nelze upravit postup rekonstrukce ani pozice zdrojových dat.



Obrázek 16 - výstup programu Autodesk Memento Beta

## 5.3 Blender

Blender, verze 2.76, Dostupné z: <https://www.blender.org/about/>

Tento volně dostupný a open-source software (skupina programů s otevřeným volně dostupným a editovatelným zdrojovým kódem) je velmi populární pro vytváření, editaci a prezentaci trojrozměrných objektů. Bohužel bylo v průběhu testování zjištěno, že přes všechny jeho možné funkce a využití ve všech možných oborech průmyslu a informatiky není možné v něm aplikovat trojrozměrnou rekonstrukci na základě optických planárních dat. Všechny pokusy v tomto programu skončily nezdarem. Tento program není vhodný pro tuto aplikaci.

## 5.4 Matlab R2010

*Matlab® R2010b 64 bit, verze 7.11.0.584, Studentská verze*

Po předchozích neúspěších bylo rozhodnuto použít software Matlab, který není primárně určený software na manipulaci s obrazem, avšak v něm lze provádět výpočty Fourierovy a Radonovy transformace, které se využívají při rekonstrukci trojrozměrného obrazu v počítačové tomografii. Tyto všechny výpočty má Matlab ve svých základních knihovnách a není potřeba dalších knihoven nebo rozšíření.

Z tohoto důvodu byl pro účely diplomové práce vybrán software Matlab a v jeho programování započal vytváření vlastního kódu pro rekonstrukci obrazu z více kamer. Manipulace se zdrojovými daty je v tomto programu velmi příhodná, jelikož s nimi počítá jako s maticemi obsahující hodnoty jasů pro jednotlivý pixel.

## 5.5 Další užitý software

V této kapitole jsou uvedeny programy použité dále v diplomové práci pro jejich teoretický a technický popis.

### 5.5.1 SIPS

*SIPS CZ 64 bit (Scientific Image Processing System), © 2001-2016 Moravské přístroje a.s., verze 3.3*

Dostupné z: <http://www.gxccd.com/cat?id=146&lang=405>, dodávané na USB

Software SIPS je dodáván společně s kamerami firmy Moravské přístroje a.s., které jsou primárně určeny jako astronomické. Slouží k jejich ovládání (snímání, nastavení), dále umožňuje elektronické řízení dalekohledů, rotace kopulí hvězdáren, pointace, řízení filtračního kola a elektromechanické ostření. Dále obsahuje nástroje pro obrazovou kalibraci, skládání a kombinace obrazů a jejich zpracování, astrometrie, histogramy, GPS koregistrace.

Všechny obrazy jsou ve výchozím nastavení získané v 16bitovém rozlišení a uloženy v obrazovém kontejneru s příponou *.fits*, který obsahuje nekomprimovaná syrová data (*raw data*) a vlastnosti snímání (typ obrazu, bitové rozlišení, pixelové rozměry, délka expozice, gain, X a Y binning, použitý optický filtr, teplota CCD, datum a čas). Z programu lze exportovat data v 16 bitovém (formáty: PNG, TIFF) i 8bitovém rozlišení (formáty: PNG, JPEG, BMP, TIFF, GIF).

### 5.5.2 Total Commander

*Total Commander 64bit, © 1993-2017 Christiano Ghister, verze 9.0a*

Dostupné z: <https://www.ghisler.com/>

Tento shareware, který lze po dobu jednoho měsíce volně užívat, je správce souborů s grafickým rozhraním pro různé operační systémy od původních Windows 3.1 až po dnešní Windows 10, Android. Nabízí správu souborů ve dvou oknech pomocí stromové struktury složek a souborů, jejich prohlížení, úpravy. Také má podporu a úpravu archivů (ZIP, RAR, 7ZIP atd.) a implementovaný FTP klient pro práci se síťovými disky a servery. K dispozici jsou další pluginy a možnost vývoje vlastních, přidávající další funkce a možnosti.

### 5.5.3 ImageJ

*ImageJ 1.51k, Wayne Rasband – National Institutes of Health, USA, Java 1.8.0\_91 (64bit)*

Dostupné z: <https://imagej.nih.gov/ij/>

Tento program je multiplatformní freeware (*public domain software*) vyvíjený americkým národním institutem pro zdraví k manipulaci a zpracování obrazu. Tento program je dlouhodobě užíván a uznáván pro zpracování laboratorních obrazů do výzkumu a publikací. Podporuje všechny možné obrazové formáty (TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, *raw data*). Umožňuje vytváření a manipulaci se *stacky*, což je množina obrazů uložených ve vrstvách.

V programu jsou implementovány všechny možné obrazové manipulace: geometrické transformace (ořez, škálování, rotace, překlopení), zobrazení a úpravy histogramu, logické i matematické funkce mezi více obrazy, statistika, obrazová analýza, měření (vzdálenost, plocha, úhel) obrazové a matematické filtry, FFT, možnosti generování obrazů na základě programu nebo výpočtu. Mnoho dalších funkcí lze doplnit instalací pluginů a maker, které si lze i samostatně vytvářet (Javascript, Python, ByanShell, Java).

### 5.5.4 Autodesk Inventor Professional

*Autodesk® Inventor® Professional 2015, 64 bit, Build: 159, Release: 2015 – RTM, Studentská verze*

Program Inventor je ze skupiny 3D CAD aplikací firmy Autodesk vyvinutý k vyvážení 3D modelů a 2D výkresů pro funkční navrhování. V programu lze z vytvořených součástí (importované, narýsované) skládat pomocí vazeb v funkční celky (přístroje) a v reálném čase si je zobrazovat ve 3D prostředí. Lze tak vytvářet geometricky přesné, pohyblivé modely s kontrolou kolizí jednotlivých součástí, generovat výkresy a provádět konstrukční analýzy. Mimo vlastně rýsovaných dílů přímo programem, případně importovaných externě (2D výkresy nebo 3D modely) je k dispozici databáze normovaných dílů (DIN, ISO, ANSI apod.). V programu lze provést kompletní vývoj zařízení libovolných konstrukčních rozměrů (od milimetrových součástek po deseti metrové turbíny) a na jeho výstupu získat vygenerované kompletní technické nákresy.

## 6 Programování

Kapitola se zabývá postupem vývoje 3D rekonstrukčního algoritmu sestaveného v programovacím prostředí MATLAB, jeho jednotlivé fáze vývoje až po výsledný funkční algoritmus. Po vzoru rentgenové počítačové tomografie, známé pod zkratkou CT byl zvolen postup výpočtu Radonovy transformace, která je popsána v kapitole 2.2.3.

### 6.1 Dekonstrukce a princip algoritmu

V první fázi vývoje jsem se soustředil na pochopení principu interpretace Radonovy transformace v programovacím prostředí MATLAB, která je zastoupena funkcemi  $R = \text{radon}(I, \theta)$ , kde  $R$  je proměnná ukládající výstup Radonovy transformace,  $I$  je vstupní matice (obrázek), kterou vkládáme do transformace a  $\theta$  je úhel nebo sada úhlů, pod kterými chceme transformaci uvést. Pokud není uvedeno jinak implicitně se provádí Radonova transformace pro  $\theta = 0:180$  neboli pro úhly  $0^\circ$  až  $180^\circ$ . Funkce u vloženého obrazu předpokládá, že střed rotace je shodný s pixelovým středem obrazu, který je v případě sudého rozměru zaokrouhlen dolů. Například u teoretického obrazu s rozměry  $200 \times 150$  pixelů, bude považován koordinacním střed v bodě  $[100, 75]$ .

Pro převod matice z Radonova prostoru zpět je v programovací prostředí definována funkce  $I = \text{iradon}(R, d\theta)$ , kde  $I$  je proměnná ukládající výsledek inverzní Radonovy transformace,  $R$  je vstupní matice projekcí v Radonově prostoru a  $\theta$  jsou úhly projekce, který musí mít shodný počet s projekčními maticemi a musí mít konstantní rozdíl. Pokud tyto úhly nejsou přesně definované je možné dosadit za  $\theta$  proměnnou  $d\theta$ , která definuje úhlový rozdíl mezi projekcemi. Pokud je použita proměnná  $d\theta$  funkce spočítá počet projekcí (matic) v proměnné  $R$  a poté je skládá v Radonově prostoru za sebou od úhlu  $0^\circ$  proti směru hodinových ručiček. Úhel  $0^\circ$  je pro funkci definován úplně nahoře (na hodinách právě poledne).

Pro první osvojení manipulace s obrazem byly v rámci skriptu vytvořeny tři testovací obrazy, jejichž generování je popsáno v úryvku kódu dole (viz Zdrojový kód 1) ze souboru *prog1.m*. Obrázky jsou vytvářeny do 2D matice o rozměrech proměnné *matice* a do ní je následně matematicky vepsán objekt. Matematický rozsah v obrázku je 0 až 1, objekty jsou v hodnotách 1, 0,8 a 0,3, pozadí v hodnotě 0, tento matematický rozsah matice je jinak označován jako *double*.

```
9 velikost = 200;
10 P1 = ones (velikost, velikost);
11 P2 = ones (velikost, velikost);
12 P3 = ones (velikost, velikost);
13
14 imageSizeX = velikost;
15 imageSizeY = velikost;
16 [columnsInImage rowsInImage] = meshgrid(1:imageSizeX,
17 1:imageSizeY);
18 centerX = velikost/2;
19 centerY = velikost/2;
20 radius = velikost/4;
21 circlePixels = (rowsInImage - centerY).^2 ...
22 + (columnsInImage - centerX).^2 <= radius.^2;
23
24 centerX = velikost/4;
25 centerY = velikost/4;
```



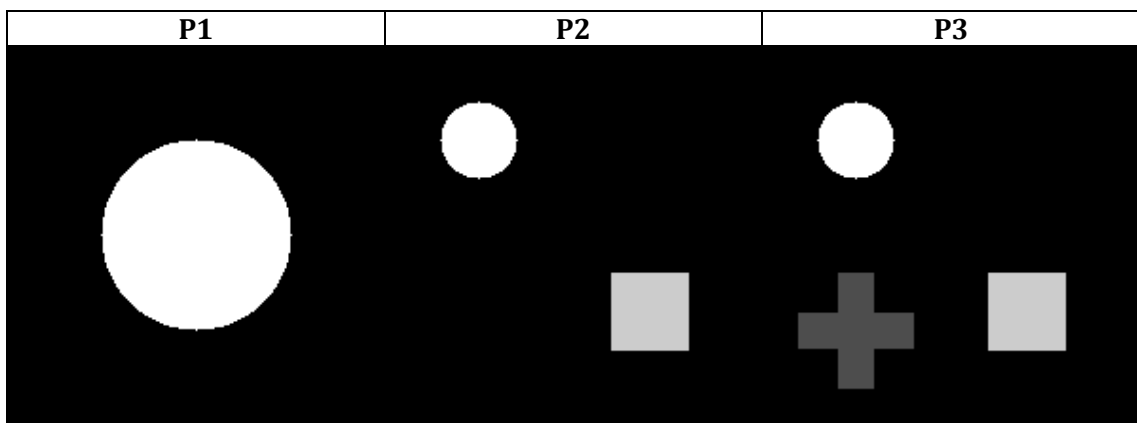
```

26 radius = velikost/10;
27 circlePixels = (rowsInImage - centerY).^2 ...
28     + (columnsInImage - centerX).^2 <= radius.^2;
29 P2 = mat2gray(circlePixels);
30
31 for m = round(6/10*velikost):round(8/10*velikost)
32     for n = round(6/10*velikost):round(8/10*velikost)
33         P2(m,n) = 0.8;
34     end
35 end;
36
37 P3 = P2;
38
39 for m = round(6/10*velikost):round(9/10*velikost)
40     for n = round(1/10*velikost):round(4/10*velikost)
41         if m > round(7/10*velikost) && m < round(8/10*velikost)
42             P3(m,n) = 0.3;
43         elseif n > round(2/10*velikost) && n <
44             round(3/10*velikost)
45             P3(m,n) = 0.3;
46         end
47     end
48 end;
49 P = P3; %výber generovaného obrázku

```

Zdrojový kód 1 - část kódu ze souboru prog1.m

Na řádcích 10 až 12 jsou vytvořeny matice pro testovací obrázky, které jsou naplněny definovanými obrázky na řádcích 14-22 pro obrázek P1, 24-35 pro obrázek P2 a 39-47 pro obrázek P3, všechny generované obrázky jsou k vidění níže. Ty jsou užity v souborech *prog1.m*, *prog2.m*, *prog3.m*, *prog5.m*.



Obrázek 17 - náhled generovaných obrázků P1, P2, P3

Tyto obrázky byly užity v souboru *prog1.m* k testování dekonstrukce Radonovou transformací a poté zobrazení jednotlivých projekcí v rozsahu  $0^\circ$ - $170^\circ$  s  $10^\circ$  krokem. Účelem tohoto programu bylo zjistit pojetí jednotlivé projekce z pohledu funkce *radon*, výstup jedné projekce odpovídá vstupu projekce do dané funkce pro daný úhel. Ačkoliv se jedná o řádkovou informaci, kterou lze vyjádřit jako křivkový graf, funkce *radon* a *iradon* jej vyžadují v čtvercové matici, kde je daný řádkový vektor replikován po celé výši matice.

```

53 output_size = max(size(P));
54
55 theta1 = 0:10:170;
56 i = 3;

```

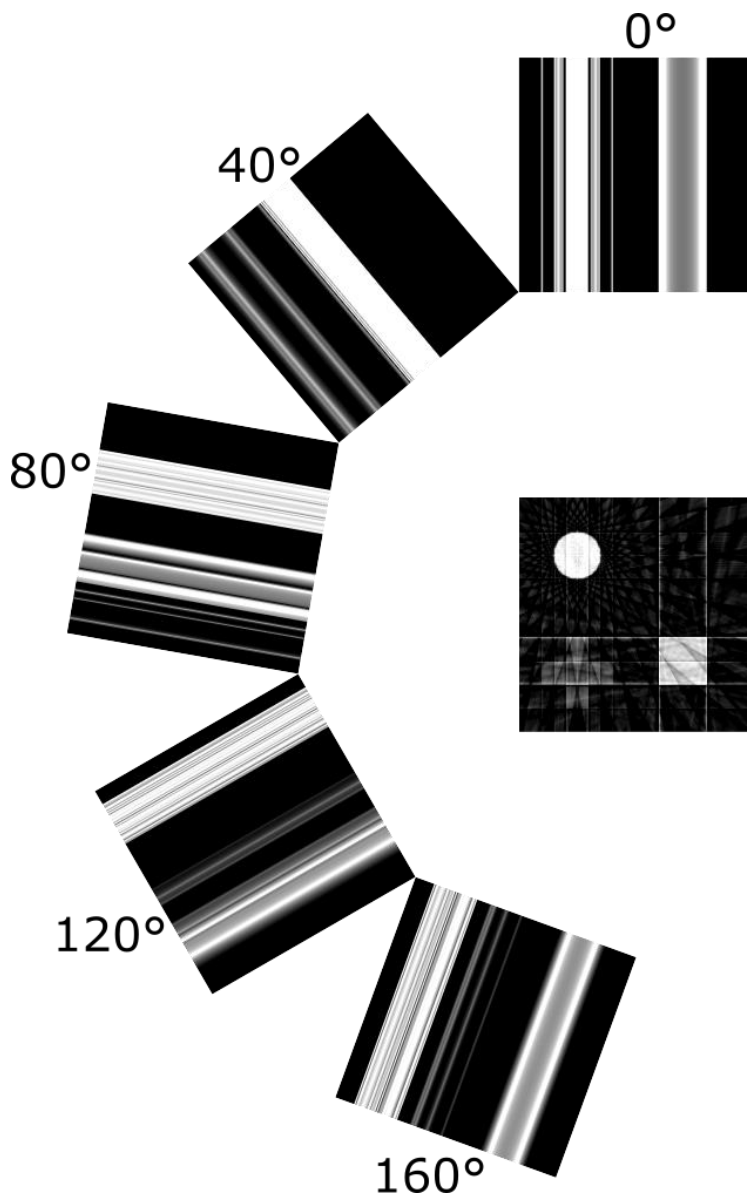
```

57 for uhel = 0:10:170; %zobrazení jednotlivých projekcí
58 subplot(4,5,i); imshow (iradon (radon(P,uhel),10,output_size));
59 title(uhel);
60 i=i+1;
61 end
62 [R1,~] = radon(P,thetal);
63 num_angles_Rad1 = size(R1,2);
64
65 N_R1 = size(R1,1);
66
67 dthetal = thetal(2) - thetal(1);
68 I1 = iradon(R1,dthetal,output_size);
69 subplot(4,5,2); imshow(I1); title 'Rekonstrukce'; %zobrazení celé
rekonstrukce

```

Zdrojový kód 2 - část kódu ze souboru prog1.m

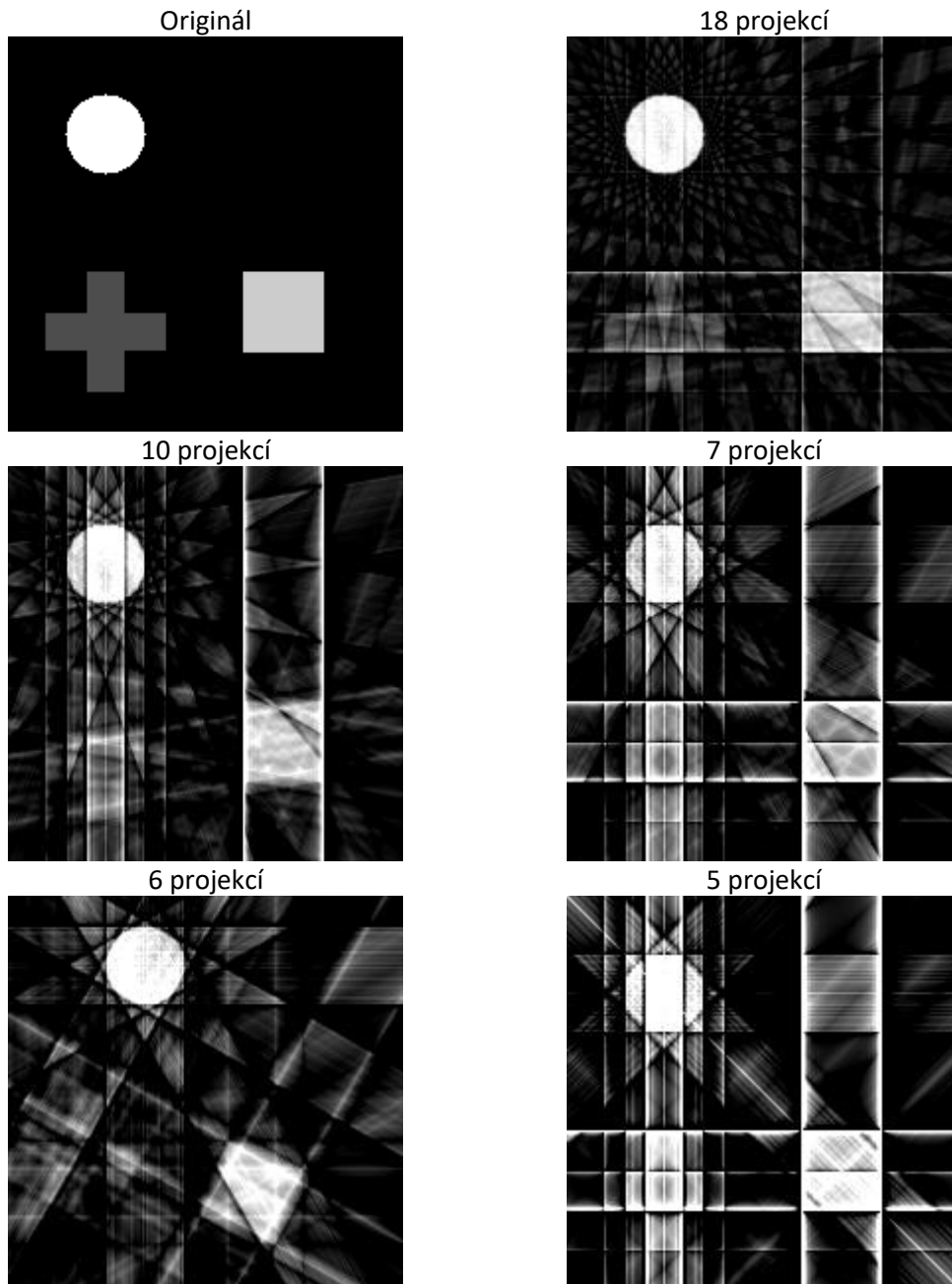
Výstup z části zdrojového kódu výše byl zpracován do ilustrace popisující fungování algoritmu Radonovy transformace, bylo vybráno pro ilustraci 5 projekcí z 17 vypočtených a uprostřed byl usazen rekonstruovaný obraz. [33][34][35][36]

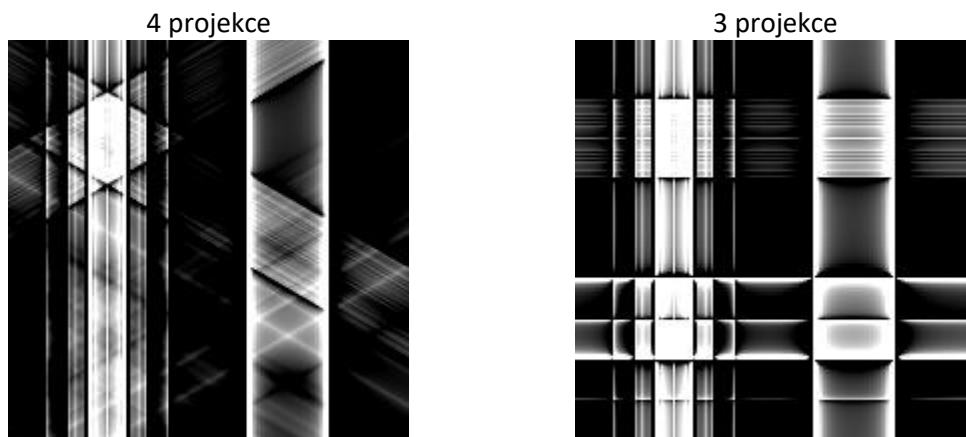


Obrázek 18 - ilustrace fungování Radonova algoritmu na generovaných datech

## 6.2 Testování s umělými daty a reálnou předlohou

Další fáze vývoje byla zaměřena na kvalitu rekonstrukce při použití definovaného počtu projekcí a závislost jejich pozice (úhlu), to se vztahuje na soubory *prog2.m*, *prog3.m*, *prog5.m* a *prog6.m*. Na obrázcích dole je zřejmé, že s klesajícím počtem projekcí velmi rapidně klesá kvalita a hlavně přesnost rekonstrukce výsledného obrazu. U 3 projekcí a 5 projekcí dokonce vzniká falešný zdroj signálu v pravém horním rohu. Zřejmé je, že nejméně náchylné na klesající kvalitu rekonstrukce je signál ve formě kruhu (plošného bodu).

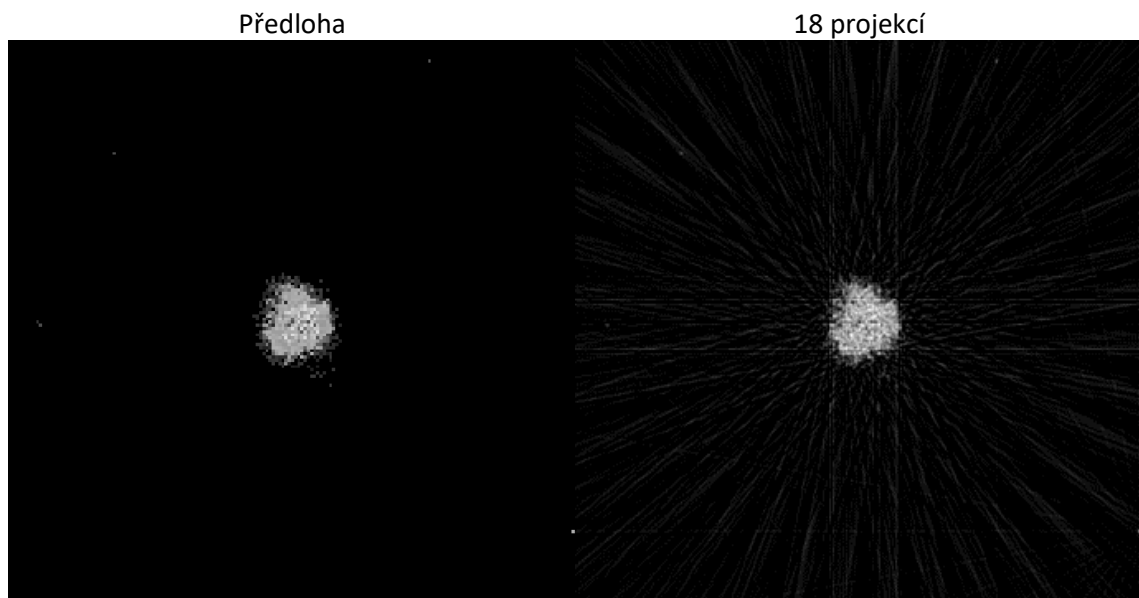


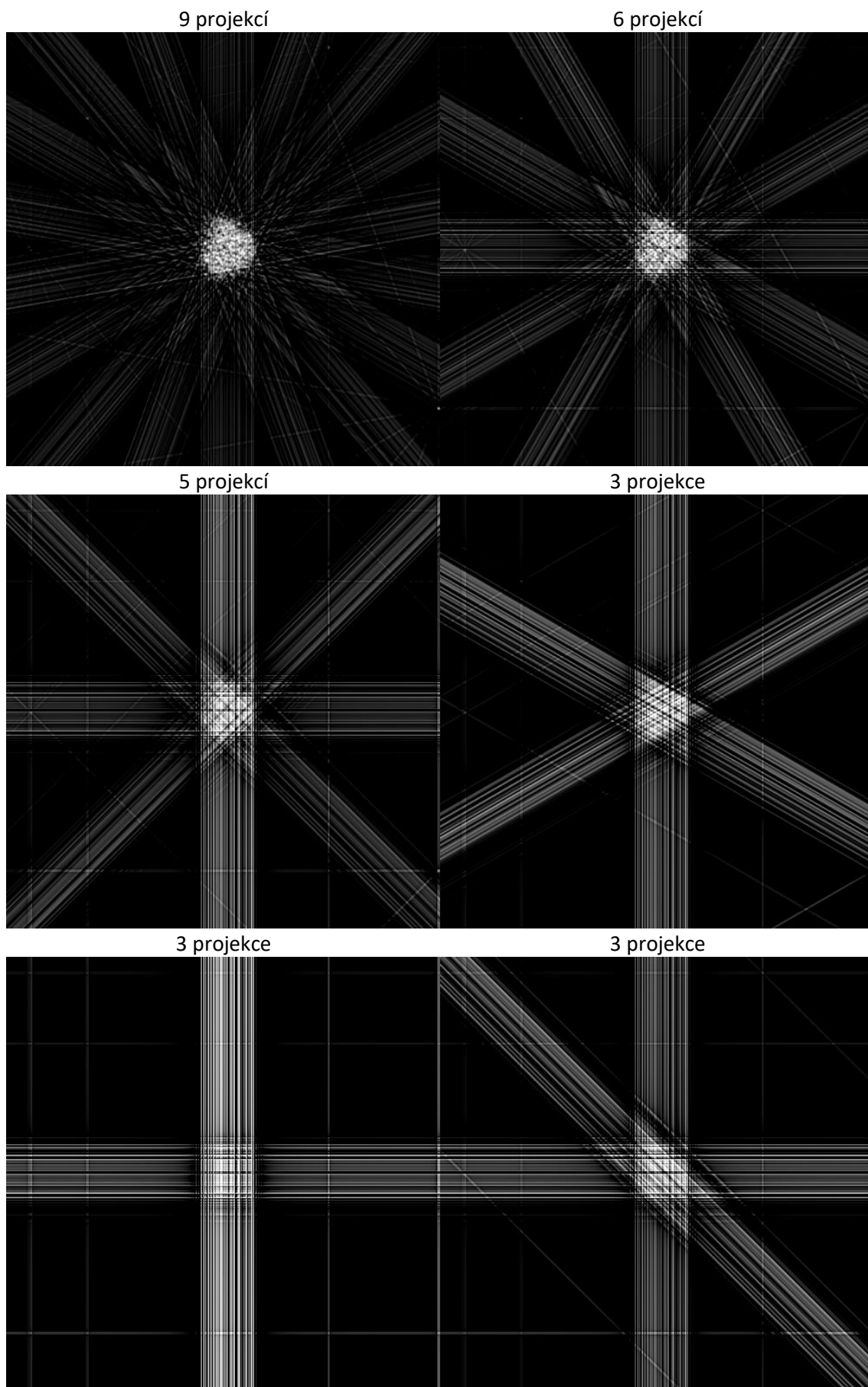


Obrázek 19 - výstup rekonstrukcí na generovaných datech s různým počtem projekcí

Následně byla využita data z přístroje IVIS Lumina XR z probíhajících experimentů na pracovišti IKEM (viz kapitola 4) a vytvořena data blíže odpovídající reálnému signálu. Stejně jako u generovaných dat byl rozložen 2D obraz Radonovou transformací a dán jako předloha výsledného tomografického řezu. Bodový kruhový zdroj s rozdílnou intenzitou směrem k okraji je považován za předlohu bodového signálu zářícího v homogenním prostředí.

Na obrázcích dole je vidět výstup při použití stejného algoritmu jako u generovaných dat s použitím reálné předlohy, jelikož jsou data vysoce kontrastní s pozadím a téměř centralizovaná, je možné získat informaci o zdroji signálu ze všech rekonstrukcí, jeho přesnost tvaru však s klesajícím počtem projekcí klesá stejně jako u testování na generovaných datech. Tato část se týká souborů *prog4.m*, *prog7.m* a *prog8.m*, který obsahoval modifikaci, kdy duplikací dat na obrazu vznikla předloha vícebodových zdrojů signálu modelující reálnou situaci, kdy je v rámci měření detekováno více než jedno ložisko.





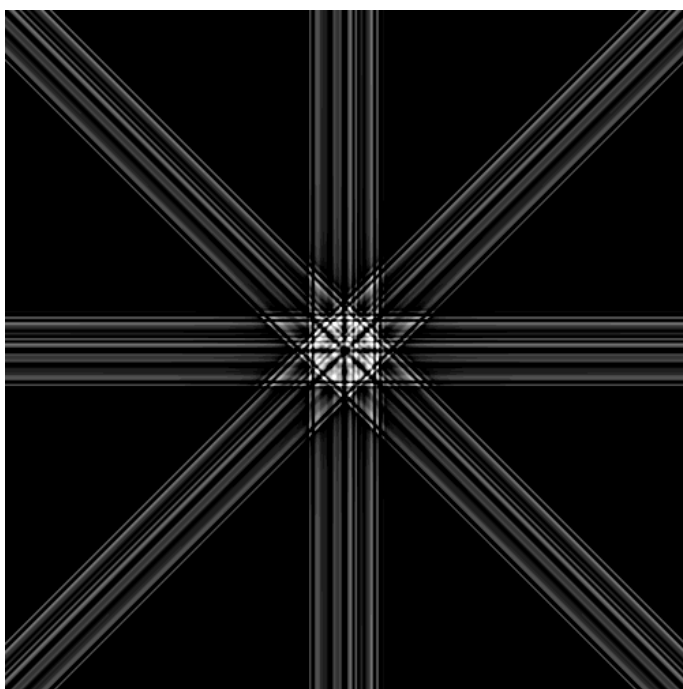
Obrázek 20 - výstup rekonstrukcí z reálné předlohy s různým počtem projekcí

### 6.3 Testování s reálnou předlohou v prostoru

Poslední fáze programování byla zaměřena na uzpůsobení algoritmu pro zdrojová data, která budou získána z kamery, tedy 2D obrazy – matice se společnou osou rotace ve středu rekonstruovaného prostoru. V této době ještě nebyla k dispozici naměřená data a pro testování algoritmu byla užita opět předloha na základě reálných dat ze zařízení IVIS Lumina XR, avšak tentokrát byly užity jako zdrojové obrazy z teoretických kamer s různými úhly.

Každý obraz zastupoval jednu kameru a rekonstrukce zájmového prostoru probíhala vodorovně, tedy společná osa rotace obrazů byla horizontální, jeden sloupec každého obrazu vyznačoval jednu řádkovou projekci pro inverzní Radonově transformaci. Výsledný počet vrstev odpovídal pixelové šíři obrazu a velikost rekonstruovaných obrazů odpovídala výšce zdrojového obrazu. V případě tohoto testování byly rozměry shodné (čtvercový zdrojový obraz). Jelikož se data nachází pouze uprostřed prostoru, byl výpočet rekonstrukce omezen na 100 vrstev (201 až 300).

Výstupem tohoto algoritmu je trojrozměrná matice, jejíž první dva rozměry (X,Y) jsou 2D tomografické rekonstrukce, které jsou výstupem inverzní Radonovy transformace a třetí rozměr (Z) je pořadí těchto 2D matic za sebou. V případě tohoto testování se jednalo o matici o rozměru 500 x 500 x 500, přičemž výpočet rekonstrukce proběhl pouze u vrstev (Z) 201 až 300. Na obrázku dole je tomografická rekonstruovaná vrstva s pořadovým číslem 250. Tento vývoj zahrnuje soubory *prog9.m* a jeho modifikace (označené podtržítkem a číslem).



Obrázek 21- rekonstruovaný tomografický řez, vrstva 250

### 6.4 Aplikace algoritmu na naměřená data

Pro finální fázi programování jsou zapotřebí reálná data, která budou získána během testování a případně dle nich lze rekonstrukční algoritmus modifikovat. Tato aplikace a případná adaptace proběhne až následně po testování uvedeném níže.

## 7 Návrh konstrukce

Zásadním společným parametrem všech návrhů jsou technické vlastnosti setu kamery a optické soustavy (objektivu), které jsou pro každou sestavu unikátní. Z nich nejvýznamnější je parametr pracovní vzdálenosti optické soustavy, která je popsána v kapitole 3.3.2. Vzdálenost objektivu a sledovaného předmětu totiž určuje minimální poloměr oblouku rotace kamery kolem předmětu v jakékoliv variantě a s tím i minimální rozměry snímací komory, aby se do ní takovýto oblouk vešel i s příslušenstvím a pracovním prostorem okolo (např. pro příslušenství, datové a napájecí kabely apod.).

Z výše zmíněné kapitoly byl převzat teoretický vzorec a upraven pro výpočet pracovní vzdálenosti, byly dosazeny parametry kamery G2-3200 použité při testování (viz 8.3) včetně použité optiky. V prvním kroku byla delší hrana zájmové oblasti (FOV) určena na 17 cm (170 mm) v závislosti na rozměrech laboratorního potkana, aby byl podélně vidět celý (od čenichu, po kořen ocasu), tato hodnota byla dosazena jako  $U_S$ . Delší hrana čipu odpovídající protiklad delší hrany zájmové oblasti je výrobcem definována na 14,9 mm, tato hodnota byla dosazena jako  $u_S$ . Ohnisková vzdálenost  $f$  byla určena jako nejmenší možná hodnota nastavitelná na optické soustavě a to 18 mm.

$$f = 18 \text{ mm}; U_S = 170 \text{ mm}; u_S = 14,9 \text{ mm}; L_{WD} = ? \text{ mm}$$
$$L_{WD} = \frac{f \cdot U_S}{u_S} = \frac{18 \cdot 170}{14,9} = 205,37 \text{ mm} \quad (22)$$

Vypočtená hodnota pracovní vzdálenosti 205,37 mm (20,537 cm) se však při přípravě kamery pro testování ukázala jako nedosažitelná, minimální reálná hodnota, které bylo pro vzdálenost objektiv – předmět dosaženo byla 25 cm (250 mm). Následnou manipulací bylo zjištěno, že lze dosáhnout pracovní vzdálenosti 20 cm, ale při použití ohniskové vzdálenosti  $f$  24 mm. Změna ohniskové vzdálenosti zmenšila delší hranu zorného pole a jeho matematický výpočet je uveden níže. Snížení pracovní vzdálenosti navzdory zvýšení ohniskové vzdálenosti lze vysvětlit mechanikou optické soustavy, která pro ohniskové vzdálenosti menší než 24 mm (tedy 24 až 18 mm) a větší než 24 mm (24 až 55 mm) se vysunuje směrem dopředu.

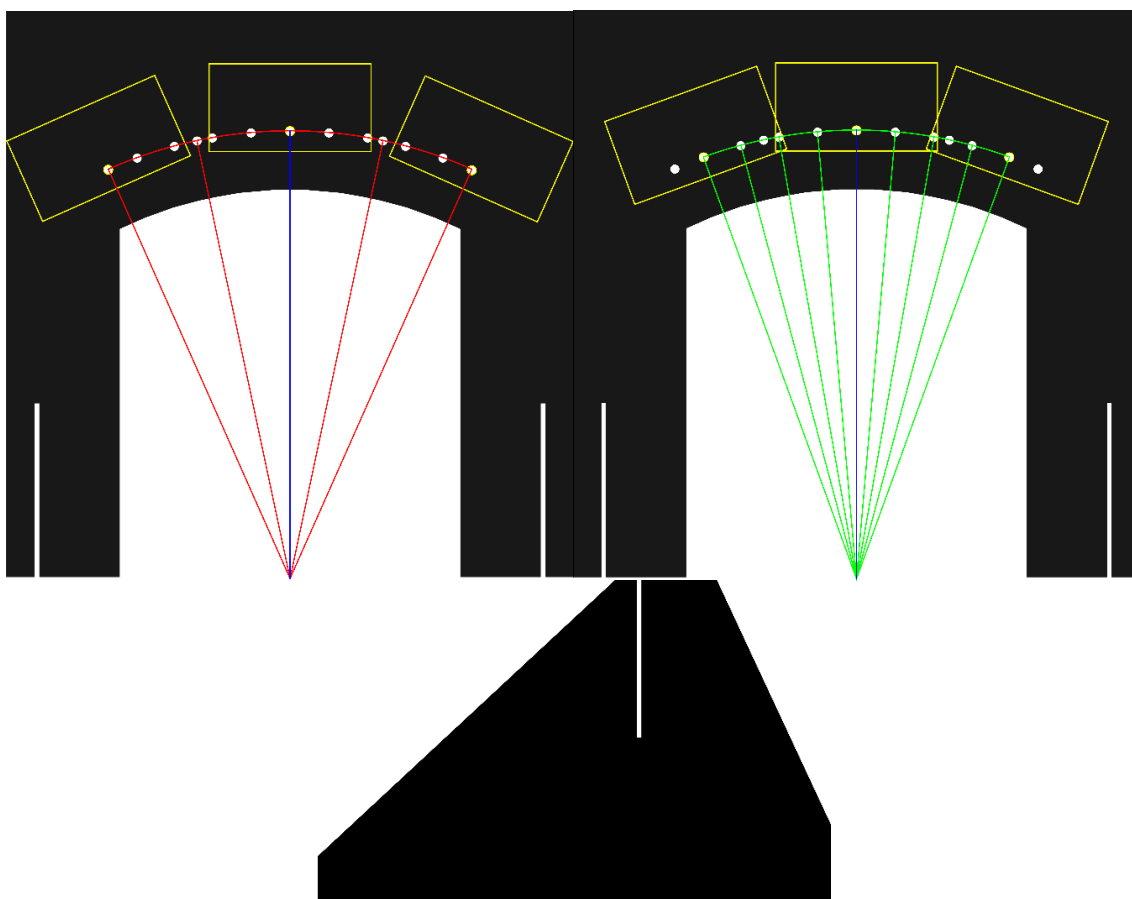
$$f = 24 \text{ mm}; ; u_S = 14,9 \text{ mm}; L_{WD} = 200 \text{ mm}, U_S = ? \text{ mm}$$
$$U_S = \frac{u_S \cdot L_{WD}}{f} = \frac{14,9 \cdot 200}{24} = 124,1\bar{6} \text{ mm} \quad (23)$$

Vypočtenou hodnotu delší hrany zorného pole 124,16 mm (12,42 cm) lze považovat za spolehlivou, jelikož se do obrazu takto nastavené kamery vešel s rezervou objekt o podélném rozměru 11 cm. Pro aplikaci v konstrukci bylo změřeno, že rozměr od hrany objektivu k fixačnímu šroubu je 315 mm, tato hodnota platí pro nastavení objektivu na hodnotu ohniskové vzdálenost 24 mm, tedy kdy je objektiv zasunut.

Fixační šroub této kamery je definován jako normovaný šroub s whitworthovým závitem 1/4", který je označován jako fotografický šroub a je standardní součástí fotografických stativů. Rozměry tohoto šroubu jsou popsány v normě ČSN 01 4030: *Základní pravidla zaměnitelnosti WITHWORTHŮV ZÁVIT*. 1988. 8 s. Třídící znak 014030.

## 7.1 Konstrukce testovacího držáku

Pro účely testování kamery, která prošla výběrem a byla u ni prokázána funkční schopnost snímání bioluminiscenčního signálu, byl vytvořen držák. Z důvodu nutnosti umístění do současného přístroje, užívaného pro porovnání, byly rozměry držáku limitovány vnitřními rozměry snímací komory přístroje IVIS Lumina XR. Držák byl konstrukčně definován na kameru G2-3200 s užitím rozměrů vypočtených v kapitole 7 a následně otestovaných. S pomocí tohoto držáku má být ověřena funkčnost rekonstrukčního algoritmu popsaného v kapitole 6.



Obrázek 22 - návrh konstrukce testovacího držáku

Počet úhlů a rozsah snímání byl omezen vnitřními rozměry snímací komory přístroje IVIS Lumina, které jsou uvedeny v [27] jako *Imaging Chamber Interior Dimension* s rozměry 43 x 38 x 43 cm (W x D x H), neboli šířka x hloubka x výška. Rozměr základní desky držáku byl tedy určen na 40 x 40 cm z důvodu manipulační rezervy. Zdvojená podstava kolmá k základní desce byla se stejného důvodu stanovena na spodní hraně na 35 cm. Na ilustraci nahoře (viz Obrázek 22) je vyznačený díl černě. Červeně jsou vyznačeny úhly snímání  $-24^\circ$ ,  $-12^\circ$ ,  $12^\circ$ ,  $24^\circ$  a zeleně úhly  $-20^\circ$ ,  $-15^\circ$ ,  $-10^\circ$ ,  $-5^\circ$ ,  $5^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $20^\circ$  a modře je vyznačena společná výchozí pozice  $0^\circ$ . Žlutě je uveden obrys kamery v odpovídajících rozměrech ve výchozích a krajních pozicích. Zároveň ilustrace vysvětluje maximální rozsah  $-24^\circ$  až  $24^\circ$ , jelikož v těchto pozicích je kamera na hraně vymezeného prostoru limitovaného vnitřními rozměry snímací komory (viz Příloha 1, Příloha 2, Příloha 3).



## 7.2 Konstrukce snímací komory

Na základě testování bylo odpozorováno, že je potřeba konstrukce samostatné komory nebo jinak *black boxu*, jelikož je nutné zajistit světlotěsnost při snímání bioluminiscenčního signálu. Tato komora bude shodná pro všechny následující návrhy a lišit se může pouze v rozměrech. Základní konstrukci zajistí montované hliníkové profily čtyřhranné s drážkou, které se konvenčně užívají při výrobě jednoúčelových laboratorních přístrojů. Konstrukce z tohoto materiálu je pevná, dá se snadno smontovat a do vzniklých drážek se dá zasunou výplňový materiál dle volby. Zároveň už se pro tyto účely vyrábí i standardizované příslušenství – madla, šroubovací nohy, panty, zavírací systémy, úpony.

Výplní vložené do drážek pro tuto konstrukci by byl nejlepší plech, uříznutý dle konstrukčních rozměrů, aby co nejpřesněji pasoval mezi dva (případně 4) hliníkové profily. Následně by byl plech zafixovaný gumovou výplní z jedné strany, která zajistí nepropustnost světla. Výhodou tohoto materiálu je vysoká odolnost a možnost přesných úprav pro případné pracovní otvory, pro vložení světlostěsných průchodek pro elektroinstalaci nebo plyn (anesteziologické zařízení, vzduchotechnika). Pozice otvorů by byla určena konstrukčně a na výsledném díle by byla realizována výřezem (např. laserem).

Základní snímací prostor by byl ve tvaru kvádru s rozměry definované z nároků optické soustavy s kamerou, jehož přední stěna by tvořila dveře pro vkládání sledovaného objektu a manipulaci uvnitř komory. Dveře by byly čtvercového nebo obdélníkového tvaru z rámu ze shodného hliníkového profilu. Výplň dveří by byla shodná se zbytkem komory a jejich utěsnění při zavření by bylo dáno vzájemným přitlakem dvou hliníkových profilů (konstrukce - dveře), na jedné straně vymezené panty a na druhé straně uzavíracím systémem zajišťující mechanický přitlak dveří ze zbytku konstrukce. Mezera mezi konstrukcí a dveřmi by byla vyplněna černou pěnovitou lištou, která by mechanickou kompresí mezi dvěma profily spolehlivě utěsnila tento prostor.

Samotná komora by mohla být realizovaná jako zařízení na stůl nebo samostatně stojící zařízení s tím, že by hliníková konstrukce bez výplně byla prodloužena pod snímací komoru a osazena šroubovými nohami. Šroubem nastavitelné nohy slouží k vyrovnaní komory do vodorovné pozice v obou směrech při instalaci v prostoru. Výška této konstrukce by se odvíjela podle určení, zda u ní bude pracováno v sedě nebo ve stoje, tak aby byla podlaha snímací komory v komfortní výšce (přibližně jako výška pracovního stolu).

## 7.3 Varianta více kamer pod různými úhly

Za účelem získání obrazových dat z více úhlů se nabízí možnost užití více kamer, pevně konstrukčně vázané ve svých pozicích vůči společné ose rotace. Tato varianta by byla ze své podstaty nejpřesnější, jelikož by nedocházelo k žádné mechanické změně, kamery stejného typu řízené jedním počítačem by snímaly signál současně se stejným nastavením.

Tato varianta by vyžadovala zapojení kamer umožňující propojení kamer s počítačem, což by při použití USB bylo velmi náročné a maximální počet kamer by byl limitován počtem USB portů na řídicím PC, zároveň bylo by nutné extra vést elektrické napájení kamer. Možnou modifikací je propojení kamer s řídicím počítačem přes ethernet kabely umožňující zároveň napájení POE, toto zapojení zahrnuje speciální router s technologií POE, do kterého jsou kamery zapojeny a z něj už pouze jedním datovým kabelem je zapojený řídicí počítač. Jelikož v současné době tato technika operuje na

rozhraní GigE (Gigabyte ethernet), jsou datové přenosové rychlosti celé soustavy dostatečně vysoké, aby zajistila hladký průběh měření.

Zásadním bodem proti této variantě je finanční náročnost celé soustavy, která ji eliminuje z řešení. Z vývoje algoritmu (viz kapitola 6) vyšlo najevo, že pro získání použitelných dat by bylo zapotřebí 5 úhlů snímání, což by znamenalo cenu 5 kamer a 5 objektivů.

### 7.3.1 Finanční kalkulace

V následující finanční kalkulaci jsou započítány pouze náklady na pořízení kamerových sestav (kamera + objektiv) včetně propojovací techniky nutné pro jejich provoz. Kalkulace nezahrnuje konstrukci komory ani potřebných držáků. K porovnání byly vybrány dvě kamery dále užití v diplomové práci, přičemž jedna je z kategorie průmyslových kamer a druhá kamera je určena pro vědecké aplikace.

Tabulka 3 a 4 – finanční kalkulace variant s 5 kamerami

Název položky	Jednotková cena	Počet kusů	Cena bez DPH
Basler acA2000-50gmNIR	36 810,00 Kč	5	184 050,00 Kč
M1214-MP2	2 990,00 Kč	5	14 950,00 Kč
Ethernet kabel UTP	100,00 Kč	6	600,00 Kč
8x POE power switch	3 470,00 Kč	1	3 470,00 Kč
	<b>Suma</b>		203 070,00 Kč
	<b>Suma vč. DPH (21%)</b>		245 714,70 Kč

Název položky	Jednotková cena	Počet kusů	Cena bez DPH
G2-3200	110 610,00 Kč	5	553 050,00 Kč
Adaptér Canon EOS dlouhý	2 670,00 Kč	5	13 350,00 Kč
Canon EFS 18-55 mm	4 124,00 Kč	5	20 620,00 Kč
Napájecí zdroj	Včetně	5	0,00 Kč
USB kabel 4m	Včetně	5	0,00 Kč
	<b>Suma</b>		587 020,00 Kč
	<b>Suma vč. DPH (21%)</b>		710 294,20 Kč

Už na první pohled je zřejmé, že konstrukce za použití 5 a více kamer je finančně zcela nerealizovatelná, jelikož samotné náklady na pořízení snímací techniky převyšují teoretický přínos zařízení takové konstrukce. Navíc v této fázi vývoje není zřejmé, jaký typ kamery je vhodný pro tuto diplomovou práci.

### 7.4 Varianta jedné kamery pod různými úhly

Pro vytvoření funkční varianty, která by kombinovala výše zmíněný princip a byla konstrukčně a finančně dostupná je řešením použití jedné kamery, která by měnila svoji polohu, jako to bylo u návrhu konstrukce testovacího držáku. Ten měl však zásadní nedostatek s časovými prodlevami při přendávání kamery z pozice na pozici.

V tomto řešení by byla kamera umístěna na rameni, které by rotovalo podle mechanické osy shodné s osou zobrazovací. Upevnění kamery na tomto rameni by garantovalo konstantní pracovní vzdálenost od sledovaného objektu umístěného v ose rotace a oproti testovacímu návrh by odpadlo korigování středu obrazu po každém

přendání. Rameno by se otáčelo před deskou, kterou pracovně můžeme nazvat jako úhelník, jelikož na něm budou vyznačeny úhly snímání, vůči kterému bude rameno s kamerou zaaretováno. Aretace by probíhala spojovacím kolíkem, který by pevně spojil rameno kamery v jejím geometrickém středu a úhelník v otvoru vymezující předem nastavený úhel snímání.

Toto základní řešení by vyžadovalo otevření komory a manuální změnu polohy kamery po každém snímání a zavření komory. Toto přemísťování by mělo hned dva negativní vlivy, časové prodlevy způsobené manipulací by zkracovaly čas snímání a i jeho návaznost, zvláště by pak omezily možnost opakovaného snímání pod stejným úhlem v jiném časovém odstupu. S velkou pravděpodobností by při použití více jak 5 snímacích úhlů v jedné sérii a expozici 60 s bylo možné vytvořit jen jednu sérii. Časová náročnost takového měření pro jedno snímání (jeden úhel) by odpovídala 1 s – obraz za konvenčního osvětlení, 60 s snímání bioluminiscenčního signálu, 60 s měření dark obrazu pro korekci a čas na změnu polohy (viz Příloha 4, Příloha 5, Příloha 6, Příloha 7, Příloha 8).

#### **7.4.1 Modifikace s elektrickým posunem**

Pro získání lepší kvality měření a více dat z více sérii sledování by bylo potřeba ponechat po celou dobu měření uzavřenou komoru a zefektivnit přesun mezi pozicemi bez časových pauz. Toho lze dosáhnout motorizovaným posunem kamery mezi pozicemi, který by garantoval změnu pozice rychlejší než manuální přenastavení a dostatečnou přesnost pro rekonstrukční algoritmus.

Zůstane tedy zachována stejná konstrukce, jak je popsána v kapitole 7.4, kdy je kamera umístěna na ramenu a rotuje kolem společné osy mechanické i zobrazovací. Do osy otáčení je vložen krokový motor s redukční převodovkou pro dosažení dostatečného kroutícího momentu, aby otáčení bylo plynulé a hmotnost kamery a ramene neovlivňovala přesnost polohování. Krokový motor má definovaný počet pulsů na otáčku. Otočení osy motoru o  $180^\circ$  je tedy definováno určitým počtem pulsů, pokud se použije redukční převodovka s poměrem 1:4, je počet pulsů na otočení celé osy o  $180^\circ$  čtyřnásobek.

Při obloukové trajektorii vodorovné směrem nahoru se musí zohlednit vliv gravitace, přesnost posunu by neměla být ovlivněna, jelikož úhlové otočení je závislé u krokového motoru na počtu pulsů, ale vůle převodovky se projeví při změně polohy přes střední polohu (označené jako  $0^\circ$ ). Tuto vlastnost lze ošetřit programově, kdy se při nastavování úhlů vlevo (v pásmu  $-90^\circ$  až  $0^\circ$ ) postupovalo od spodní polohy, poté by se při použití úhlů vpravo ( $0^\circ$  až  $90^\circ$ ) najelo nejprve do krajní pozice a poté teprve najelo do pozice blíže k středu, kde se započítá vůle převodovky, tedy například při vůli převodovky  $0,5^\circ$  musí být pro naprogramovaný úhel  $25^\circ$  reálný úhel  $24,5^\circ$ .

Pokud by bylo nutné zajistit vyšší přesnost polohování lze celou osu vybavit inkrementálním snímačem, který by přesně definoval aktuální úhel soustavy v digitálním rozlišení pro řídicí počítač. Poté by započítávání vůle převodovky a nutnost polohování od krajních pozic odpadlo, jelikož by se nastavení do pozice řídilo informací z inkrementálního snímače a počet pulsů by se řídil aktuální pozicí. Za předpokladu, že by nebylo dosaženo přesného úhlu, byla by použita metoda nejmenšího rozdílu, kdy by se k pozici přiblížila osa z obou stran a byla by zvolena pulsní pozice krokového motoru s nejmenším rozdílem. Například pro pozici  $25^\circ$  by reálně byla z jedné strany  $24,51^\circ$  a o puls dále (z druhé strany)

25,03°, byla by vybrána ta s menším rozdílem (viz Příloha 9, Příloha 10, Příloha 11, Příloha 12, Příloha 13).

#### 7.4.2 Finanční kalkulace

Následující finanční kalkulace zahrnuje variantu s elektrickým posunem kamery mezi pozicemi. Z pohledu konstrukčního i finančního se zdá prokazatelně nejvýhodnější. Tato varianta je doporučena ke konstrukci, jelikož za pomoci jedné kamery (jak bylo prokázáno testováním), světlotěsnému boxu (zaručeno konstrukcí) a možností kontinuálního snímání bez vnější zásahu (otevírání komory), vznikne ideální varianta pro kombinaci s rekonstrukčním algoritmem.

Tabulka 5 - finanční kalkulace varianty s elektrickým posunem

Název položky	Jednotková cena	Počet kusů	Cena bez DPH
G2-3200	110 610,00 Kč	1	110 610,00 Kč
Adaptér Canon EOS dlouhý	2 670,00 Kč	1	2 670,00 Kč
Canon EFS 18-55 mm	4 124,00 Kč	1	4 124,00 Kč
Napájecí zdroj	Včetně	1	0,00 Kč
USB kabel 4m	Včetně	1	0,00 Kč
Komora	30 000,00 Kč	1	30 000,00 Kč
Krokový motor	15 000, 00 Kč	1	15 000,00 Kč
Apex Dynamics PD 053 - 040	20 000, 00 Kč	1	25 000,00 Kč
Řídící elektronika motoru	13 000, 00 Kč	1	25 000,00 Kč
<b>Suma</b>			<b>212 404,00 Kč</b>
<b>Suma vč. DPH (21%)</b>			<b>257 008,84 Kč</b>

## 8 Experiment

Pro potřeby diplomové práce bylo nutné ověřit získané teoretické poznatky v praktickém měření. Vytypované kamery bylo nutné otestovat přímo v laboratoři IKEM, kde jsou k dispozici žijící subjekty schopné generovat bioluminiscenční optický signál. Kamery na testování od výrobce Basler byly zapůjčeny firmou ATSystem, s.r.o a kamera G2-3200 byla zapůjčena firmou Moravské přístroje a.s., obě zápůjčky byly finančně garantovány firmou Experientio, s.r.o.

### 8.1 Testování I

Účelem tohoto testování je zjistit možnost aplikace průmyslové kamery BASLER acA2000 – 50gmNIR pro možnosti snímání bioluminiscenčního signálu. Tato kamera byla vytypována společně s dodavatelem na základě znalosti emisních vlastností bioluminiscenčního měření. Kamera je osazena čipem typu CMOS a je specializována i pro snímání blízkého infračerveného spektra (NIR). Kamera byla po celou dobu testování usazena ve stojanu ve svislé pozici nad subjektem. K ověření přítomnosti signálu před a po konci testování bylo užito měření přístroje IVIS Lumina XR, konvenčně užívaného pro tuto zobrazovací metodu.

#### 8.1.1 Popis měření

**Datum:** 13. ledna 2017

**Lokace:** Instituce Klinické a Experimentální Medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4-Krč

**Okolní podmínky:** Laboratorní místnost bez oken s aktivní ventilací udržující teplotu místnosti pod 24°C, v místnosti se nachází optické zobrazovací zařízení s anesteziologickým přístrojem s otevřeným inhalačním okruhem (anestetický plyn je vydechován do prostoru), kamera byla umístěna do temného boxu, zdrojem světla pro manipulaci bylo konvenční osvětlení místnosti, které bylo v průběhu testování vypnuto a kamera byla ovládána mimo místnost

**Subjekt:** celosvítlící laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) reagující na luciferin– samička  
**Agens:** 0,2 ml luciferin, intraperitoneální injekční aplikace

**Kamera:** BASLER acA2000 – 50gmNIR, ID: 106159 - 19, S/N: 21961203, GigE (UTP kabel)

**Objektiv:** Computar 12 mm, M1214-MP2, f12mm, C-mount, 2/3“, M30.5x0.5

**Napájecí zdroj kamery:** Switching power supply 12 V / 1500 mA DC (Model: NR120P150PGS)

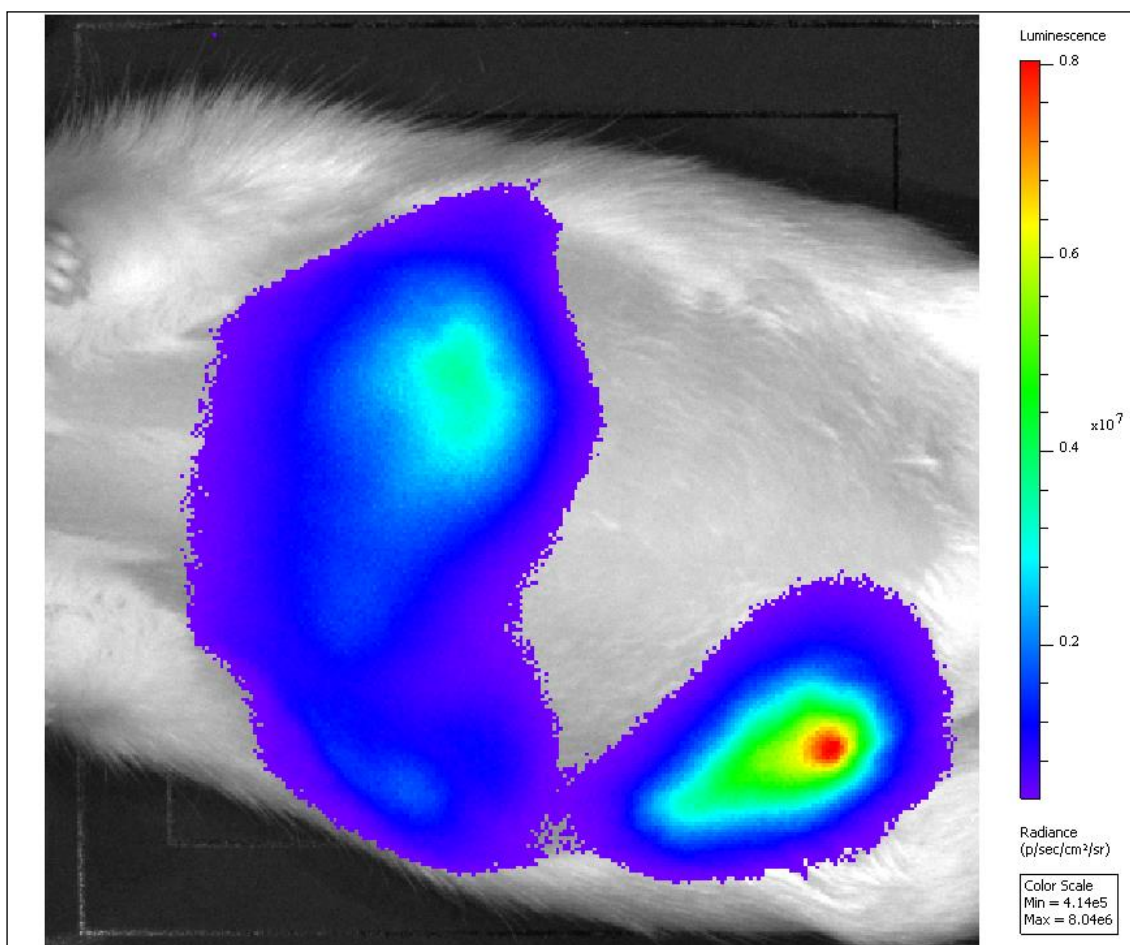
**Software:** pylon Viewer 64bit, version 5.0.5.8999 64bit

**Připojený počítač:** DELL Latitude E5450, Intel i7, RAM 8 GB, Windows 10 Pro 64bit

**Porovnání:** IVIS Lumina XR

### 8.1.1.1 Počáteční stav:

IVIS Lumina XR, 60 s expozice, ihned po aplikaci injekce



Obrázek 23 - počáteční stav, IVIS Lumina XR, 60 s expozice, černý rám

### 8.1.1.2 První záznam z kamery:

90 sekund od aplikace injekce

*Binning:* 4x vertikálně, 4x horizontálně

*Exposure Auto:* off

*Exposure Time (Raw):* 10 000 000

*Iris:* zcela otevřena (manuálně na objektivu)

*Image size:* 470 x 270 px

Objektiv byl nastaven před testování za konvenčního osvětlení v režimu tzv. živého obrazu (z kamery přímo na monitor) a zaostřen na povrch objektu. V rámci předpokládaného nízkého zdroje signálu byla nastavení maximální expoziční doba a maximální možný binning ve snaze získat co nejvíce dat.



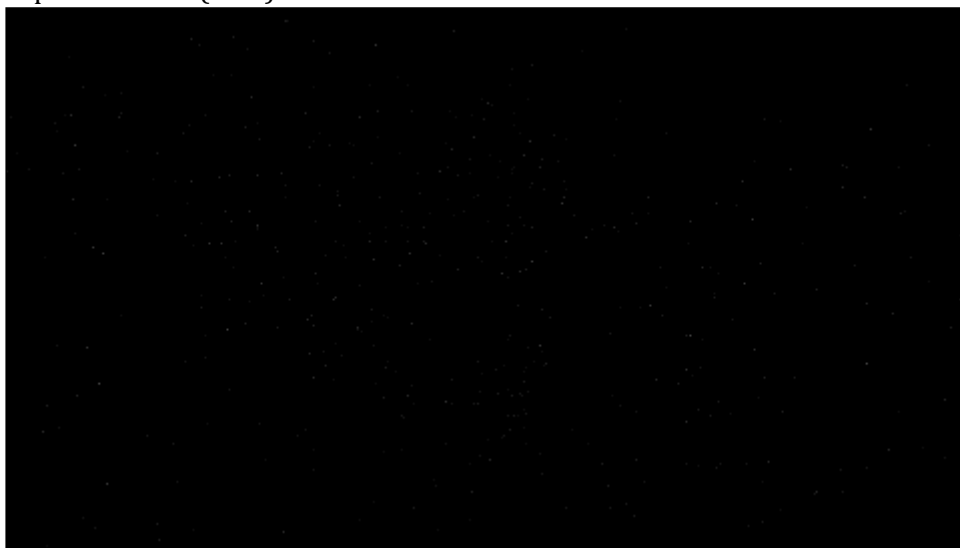
Maximální hodnota jasu v každém pixelu

Obrázek 24 - výstup kamery při expozici 10 000 000, černý rám

**Výstup:** Obrázek v celé jeho ploše saturovaný (maximální hodnoty jasu v každém pixelu), reprezentováno bílou barvou

### **8.1.1.3 Záznamy z kamery v průběhu testování**

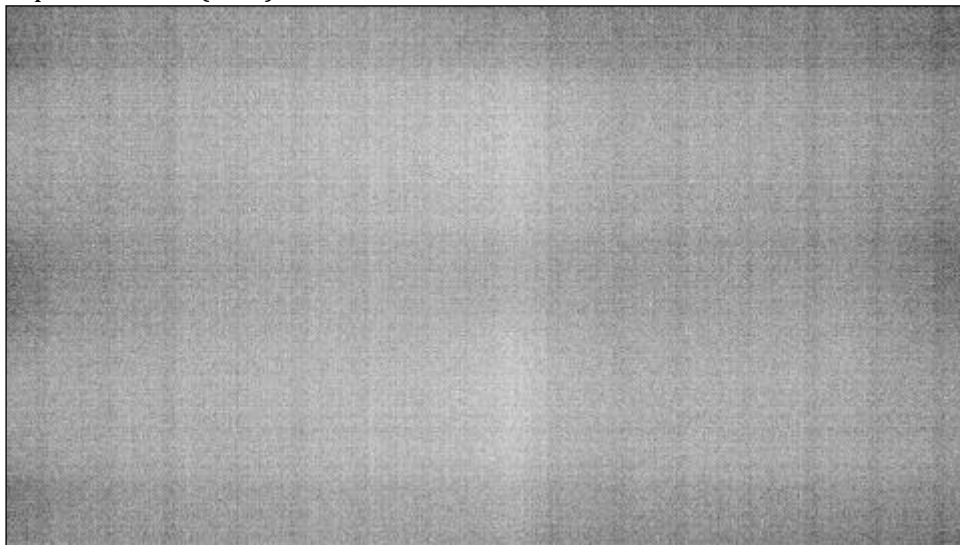
Exposure Time (Raw): 50 000 a menší



Obrázek 25 - výstup kamery při expozici 50 000, černý rám

**Výstup:** Černý obráz s blikajícími body o velikosti 1x1 pixel

Exposure Time (Raw): 80 000

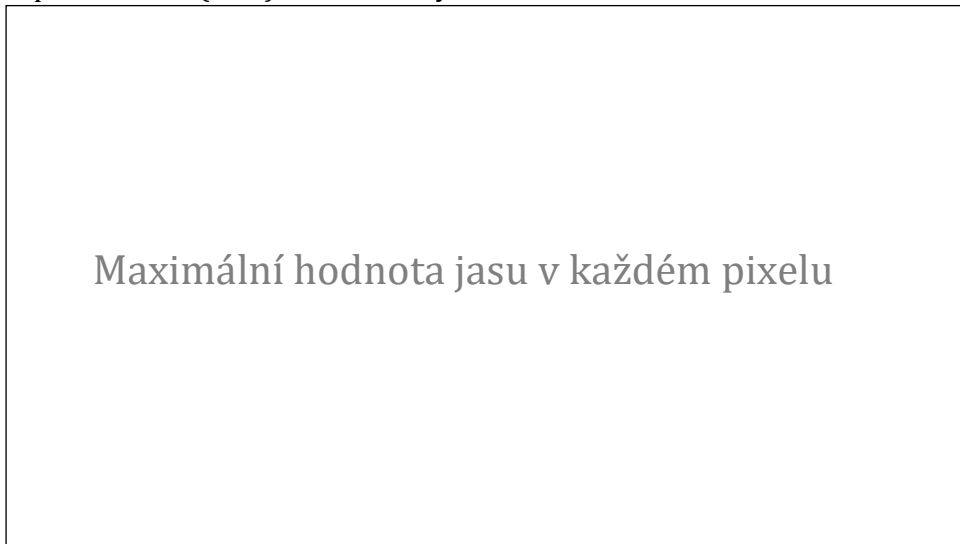


Obrázek 26- výstup kamery při expozici 80 000, černý rám

**Výstup:** pohybující se šum se znatelnou mřížkou přes celou plochu obrázku

Navyšování expozičního času z 60 000 do přibližně 90 000 (hodnota se pohybovala) pouze navyšovala jasový zisk obrazu (tzv. gain). V této části testování byla horizontální spodní část sledovaného pole (FoV neboli Field of View) a tedy polovina objektu zakryta netkanou buničinou. To bylo učiněno ke zjištění, zda se v obraze nachází signál. Horní a dolní horizontální polovina obrazu nejeví rozdíl.

Exposure Time (Raw): 100 000 a vyšší



Obrázek 27- výstup kamery při expozici 100 000, černý rám

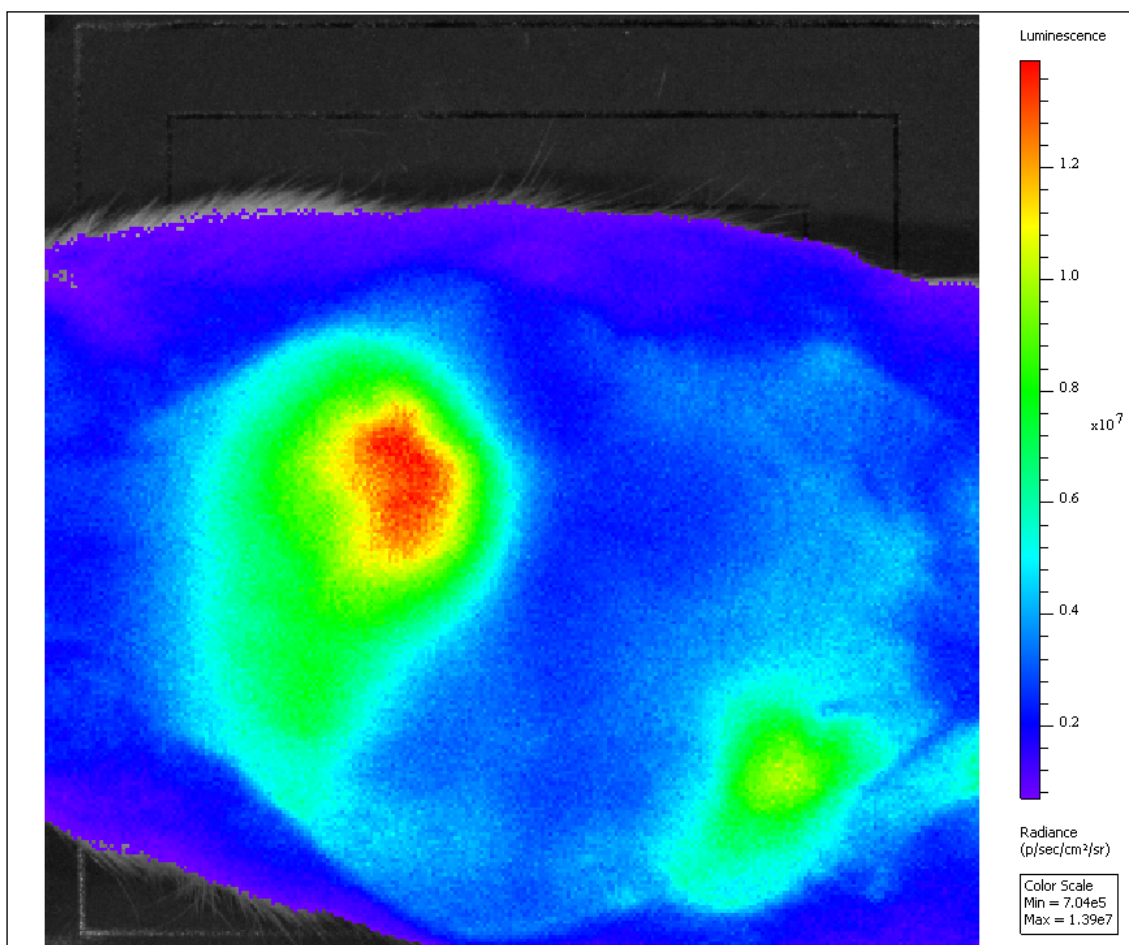
**Výstup:** Obrázek v celé jeho ploše saturovaný (maximální hodnoty jasu v každém pixelu), reprezentováno bílou barvou

Změna vzdálenosti kamera – subjekt nebo změna nastavení clony neovlivnila kvalitu obrázku. Při každé změně nastavení vzdálenosti nebo clony byl obraz zaostřen při konvenčním světle. Expoziční čas od 100 000 do 10 000 000 nebylo možné použít.



#### 8.1.1.4 Závěrečný stav:

IVIS Lumina XR, 10 s expozice, 27 minut po aplikaci injekce



Obrázek 28 - závěrečný stav, IVIS Lumina XR, 10 s expozice, černý rám

Závěrečný stav zobrazuje, že subjekt vyzařoval bioluminiscenční signál po ukončení testování kamery. V Příloha 14, Příloha 15 a Příloha 16 lze vidět fotografie umístění kamery v průběhu testování.

#### 8.1.2 Závěr testování I

Testování I prokázalo, že kamera BASLER acA2000 – 50gmNIR v této konfiguraci není schopna zachytit bioluminiscenční signál. Zarážející je však chování kamery při samotném měření, kdy se 90 % rozsahu nastavení expozičního času stalo nepoužitelné v důsledku saturace obrazu. Toto shledání bylo konzultováno s českým dodavatelem i německým výrobcem.

#### 8.2 Testování II

Pro další testování byla použita sestava z Testování I, která u dodavatele prošla změnou nastavení a v dále je označena jako Sestava 1 modifikovaná. Původně byly získané obrazy z této sestavy vyhodnoceny jako saturace čipu kamery tepelným šumem, který se však za konvenčního užití kamery nevyskytuje. Dodavatel omezil automatické nastavení *gainu* (zisku) elektrického zesilovače čipu kamery, aby tento jev odstranil. K tomu byla do testování přidána kamera BASLER acA2200 – 20gm, označena jako Sestava 2, která byla výrobcem BASLER AG označena jako nejcitlivější z jejich výroby. Sestava 3 označuje kameru

G2-3200 českého výrobce Moravské přístroje a.s., která byla vytypována na základě technických parametrů kamery užívané v přístroji IVIS Lumina XR. Tato kamera disponuje čipem CCD a je koncipována pro snímání scény s velmi nízkým optickým signálem.

Toto testování zahrnuje sledování subjektu ze stabilních pozic za účelem zjistit, jestli některá ze sestav je schopna zachytit bioluminiscenční signál. Opět je ke kontrole zdroje bioluminiscenčního signálu užit přístroj IVIS Lumina XR.

### **8.2.1 Popis měření**

**Datum:** 13. února 2017

**Lokace:** Instituce Klinické a Experimentální Medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4-Krč

**Okolní podmínky:** Laboratorní místnost bez oken s aktivní ventilací udržující teplotu místnosti pod 24°C, v místnosti se nachází optické zobrazovací zařízení s anesteziologickým přístrojem s otevřeným inhalačním okruhem (anestetický plyn je vydechován do prostoru), kamera byla umístěna do temného boxu, zdrojem světla pro manipulaci bylo konvenční osvětlení místnosti, které bylo v průběhu testování vypnuto a kamera byla ovládána mimo místnost

**Subjekt:** celosvítící laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) reagující na luciferin– samička  
**Agens:** 0,2 ml luciferin, koncentrace 6 mg / ml, intraperitoneální injekční aplikace 9:20

#### **8.2.1.1 Sestava 1 modifikovaná**

**Kamera:** BASLER acA2000 – 50gmNIR, ID: 106159 - 18, S/N: 21961203, GigE (UTP kabel)  
**Čip:** CMOSIS CMV2000 NIR - enhanced, **Rozlišení:** 2048 × 1088, **Velikost pixelu:** 5,5 × 5,5 μm, **Plocha snímače:** 2/3"

**Objektiv:** Computar 12 mm, M1214-MP2, f12mm, C-mount, 2/3", M30.5x0.5

**Napájecí zdroj kamery:** Netgear ProSAFE JGS524PE-100EUS, GigE switch with POE, S/N: 3KL66C5W00791

#### **8.2.1.2 Sestava 2**

**Kamera:** BASLER acA2440 - 20gm, ID: 107212 – 03 P, S/N: 22021768, GigE (UTP kabel)  
**Čip:** Sony IMX264, **Rozlišení:** 2448 x 2048, **Velikost pixelu:** 3,45 × 3,45 μm, **Plocha snímače:** 2/3"

**Objektiv:** VS25-25085/C, f25 mm, C-mount, S/N: Z15045318

**Napájecí zdroj kamery:** Netgear ProSAFE JGS524PE-100EUS, GigE switch with POE, S/N: 3KL66C5W00791

**Software:** pylon Viewer 64bit, verze 5.0.5.8999 64bit

**Připojený počítač:** HP ProBook 650 G2, Intel i5-6200U, RAM 8 GB, Win7 64 bit

### 8.2.1.3 Sestava 3

**Kamera:** G2-3200, Moravské přístroje (Moravia instrument), ID: 2787, S/N: G2FK3200-002787, USB 2.0

**Čip:** KAF-3200ME, **Rozlišení:** 2184 × 1472, **Velikost pixelu:** 6,8 × 6,8 μm, **Plocha snímače:** 14,9 × 10 mm

**Objektiv:** Canon EFS 18-55 mm, Ø 58 mm, ID: 3960508113

**Napájecí zdroj kamery:** Switching power adapter DC 12 V / 5 A max (P/N: 9NA0605349, S/N: H6271000045)

**Software:** SIPS CZ 64 bit (viz kapitola 5.5.1)

**Připojený počítač:** DELL Latitude E5450, Intel i7, RAM 8 GB, Windows 10 Pro 64bit

**Referenční porovnání:** IVIS Lumina XR

### 8.2.1.4 Kontrola teploty

Pro kontrolu povrchové teploty byl využit ruční pyrometr <sup>1)</sup>, ke kontrole teploty prostoru vestavěný teploměr ventilační soustavy instalovaný pod stropem laboratorní místnosti <sup>2)</sup>, který byl náhodně ověřen, že se shoduje s měřením pyrometru <sup>1)</sup> a u sestavy 3 je teplota sledována přímo ve vlastnostech kamery <sup>3)</sup>.

**Pyrometr:** ROTHENBERGER Industrial Infrarotthermomete, Art. 1500000804, Mod. DT-811, S/N: 11-397-2013-08

Tabulka 6 - záznam teplotního měření při Testování II

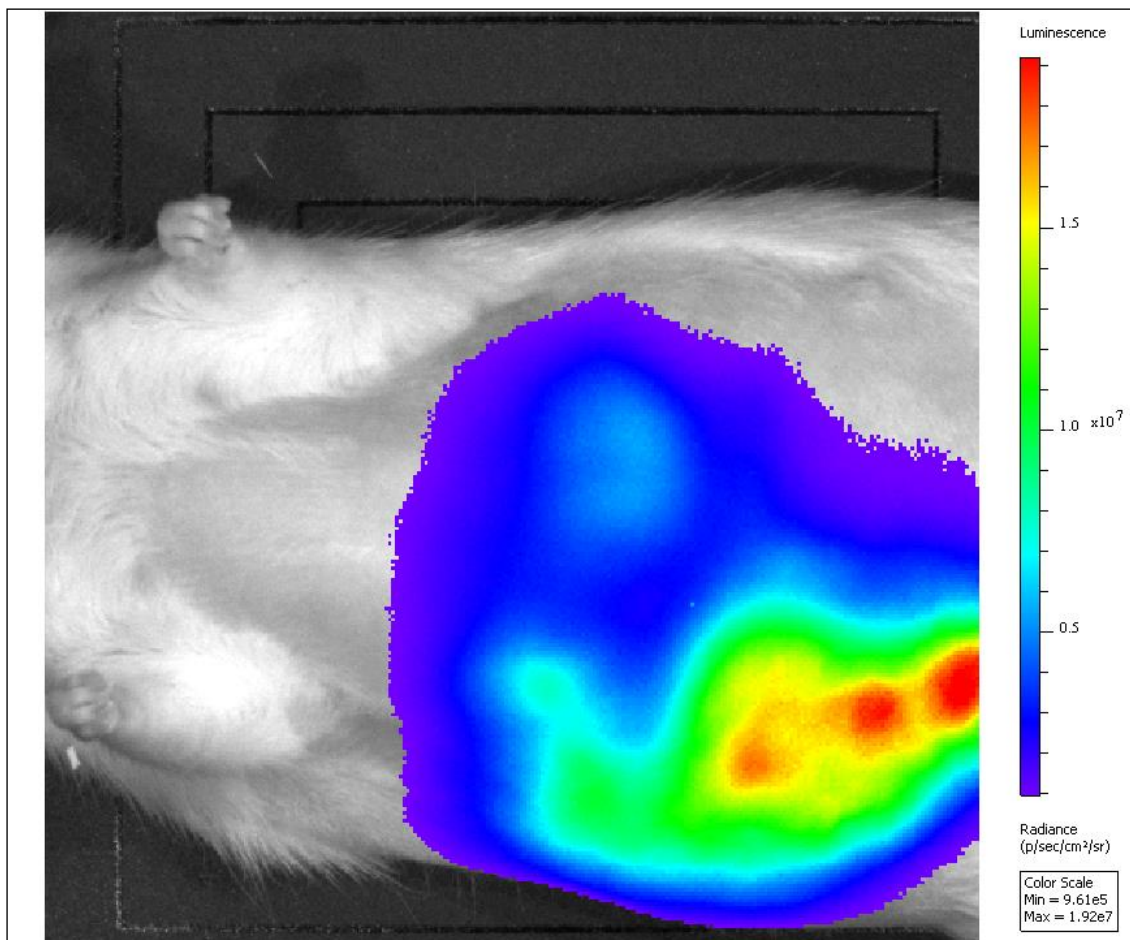
Místo měření	Začátek testování	Průběh testování	Konec testování
Místnosti (strop) <sup>1)</sup> <sup>2)</sup>	24 °C	22 °C	22 °C
Potkan (povrch) <sup>1)</sup>	32 °C	32 °C	32 °C
Sestava 1 povrch kamery <sup>1)</sup>	37 °C	-	-
Sestava 2 povrch kamery <sup>1)</sup>	28 °C	35 °C / 28 °C	28 °C
Sestava 3 teplota kamery <sup>3)</sup>	32 °C	35 °C	37,7 °C
Sestava 3 teplota čipu <sup>3)</sup>	- 27,1 °C	- 24 °C	- 19,6 °C

### 8.2.2 Testování II.a a II.b

Tato část testování se zaměřuje na sestavu 1 modifikovanou (kapitola 8.2.1.1) a sestavu 2 (kapitola 8.2.1.2).

#### 8.2.2.1 Úvodní ověření:

**IVIS Lumina XR, 60 s expozice, ihned po aplikaci injekce**



Obrázek 29 - IVIS Lumina XR, expozice 60s, černý rám

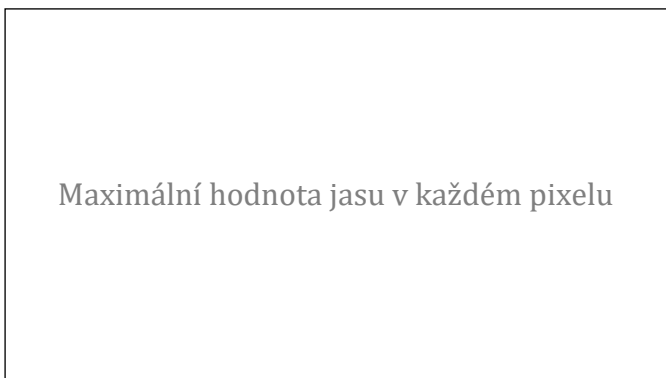
Ověřená přítomnost bioluminiscenčního signálu před začátkem testování.

#### Sestava techniky a zaostření

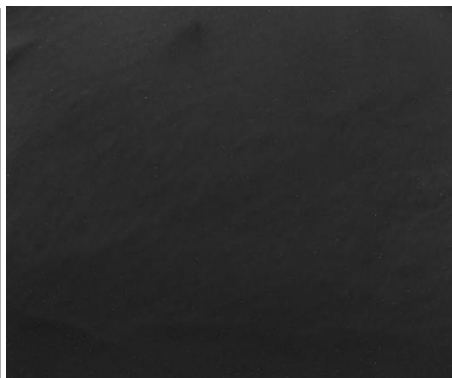
Sestava 1 a sestava 2 byly umístěny dovnitř temné komory, sestava 3 byla na začátku měření umístěna na trojnožce mimo komoru, jak je možné vidět na fotografiích viz Příloha 17. Všechny sestavy byly zapojeny, otestovány a zaostřeny (viz Příloha 18, Příloha 19, Příloha 20).

### 8.2.2.2 První snímání:

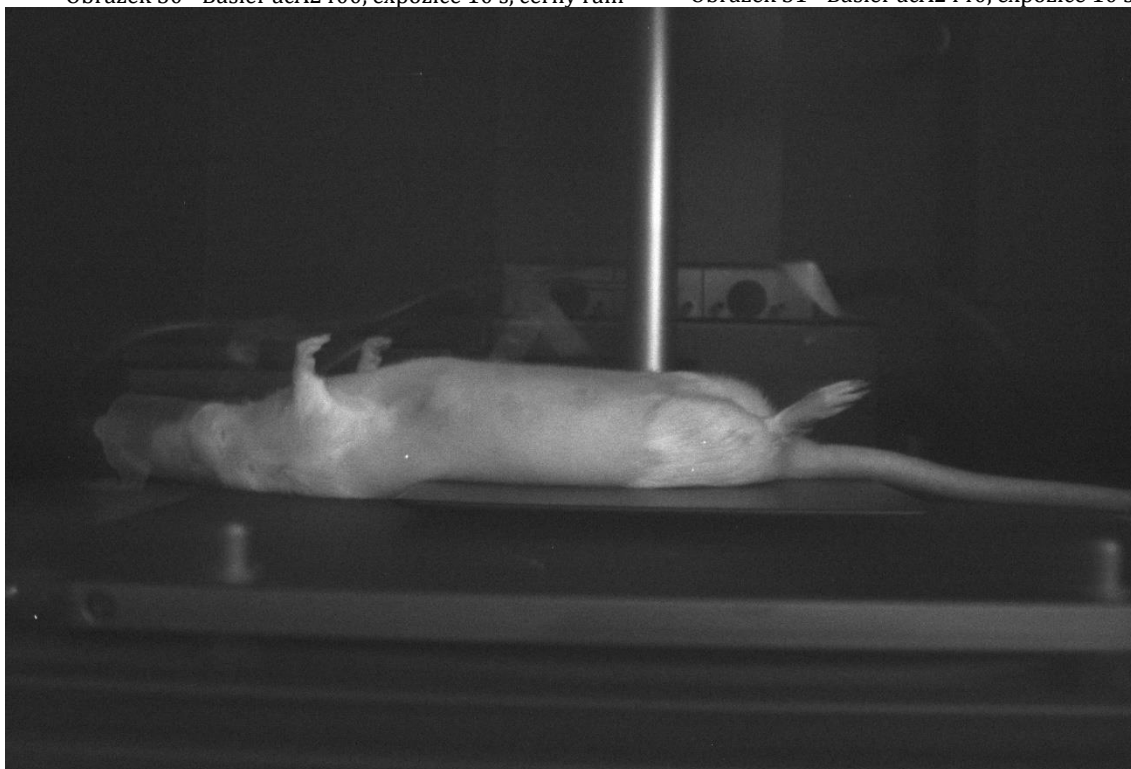
Basler acA2400, Basler acA2330, G2-3200 - expozice 10 s



Obrázek 30 - Basler acA2400, expozice 10 s, černý rám



Obrázek 31 - Basler acA2440, expozice 10 s



Obrázek 32 - G2-3200, expozice 10 s, otočeno o 180°

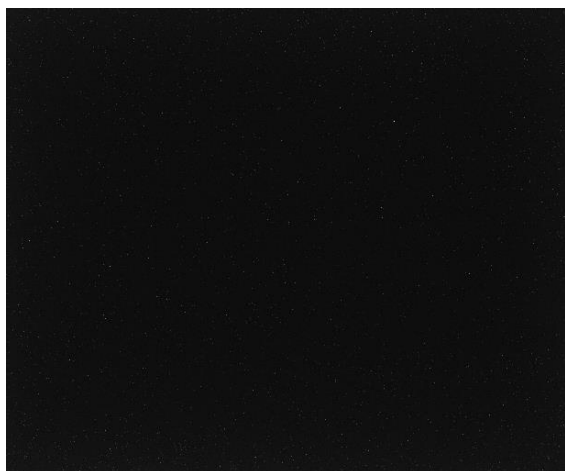
První snímání bylo zatíženo chybou, jelikož z důvodu umístění kamery G2-3200 vně blackboxu na trojnožce a ponechání otevřených dveří blackboxu v uzavřené místnosti s vypnutými světly, došlo k průniku denního světla pode dveřmi a výstupní obraz se jevil jako focený za denního světla. Pro další měření byla kamera G2-3200 umístěna přímo do blackboxu, aby bylo možné zavřít dvířka. Sestava 1 (kamera Basler acA2400) byla pro další testování vyřazena. Změnou nastavení parametrů kamery nedošlo k očekávanému vylepšení zisku obrazu z kamery oproti testování I.

### 8.2.2.3 Druhé snímání:

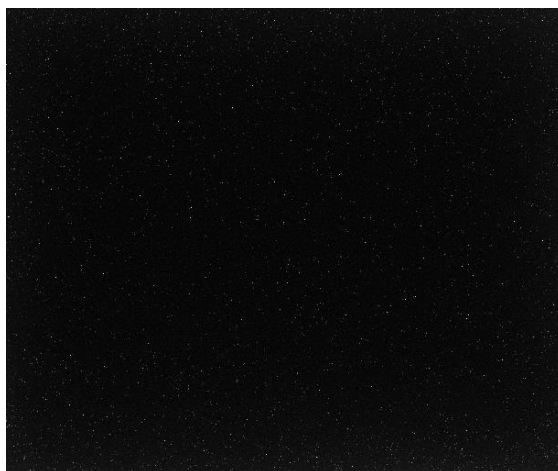
**BASLER acA2440, expozice 10 s**

Série testování se sestavou 2 (kamera Basler acA2440) při použití nejdelšího možného expozičního času 10s a s různým nastavením *gain* (zesílení) ukázala, že ani tato

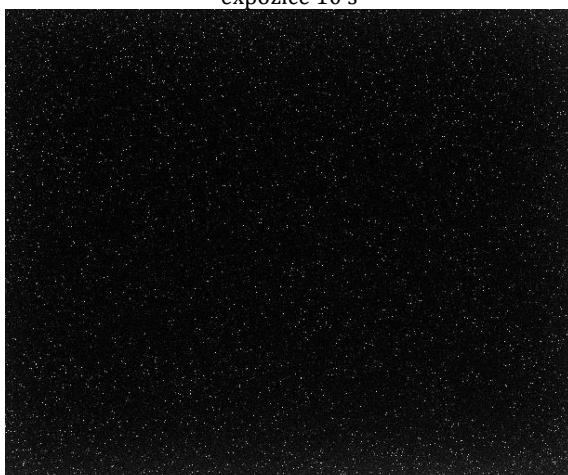
sestava není použitelná pro tuto aplikaci. Na zobrazených obrázcích je zřejmé, že nastavení vyššího *gainu* způsobovalo pouze zesílení bodového šumu z čipu kamery.



Obrázek 33 – Basler acA2440 s nastavení GAIN 0%,  
expozice 10 s



Obrázek 34 – Basler acA2440 s nastavení GAIN 70%,  
expozice 10 s



Obrázek 35 - Basler acA2440 s nastavení GAIN 100%,  
expozice 10 s

### 8.2.3 Testování II.c

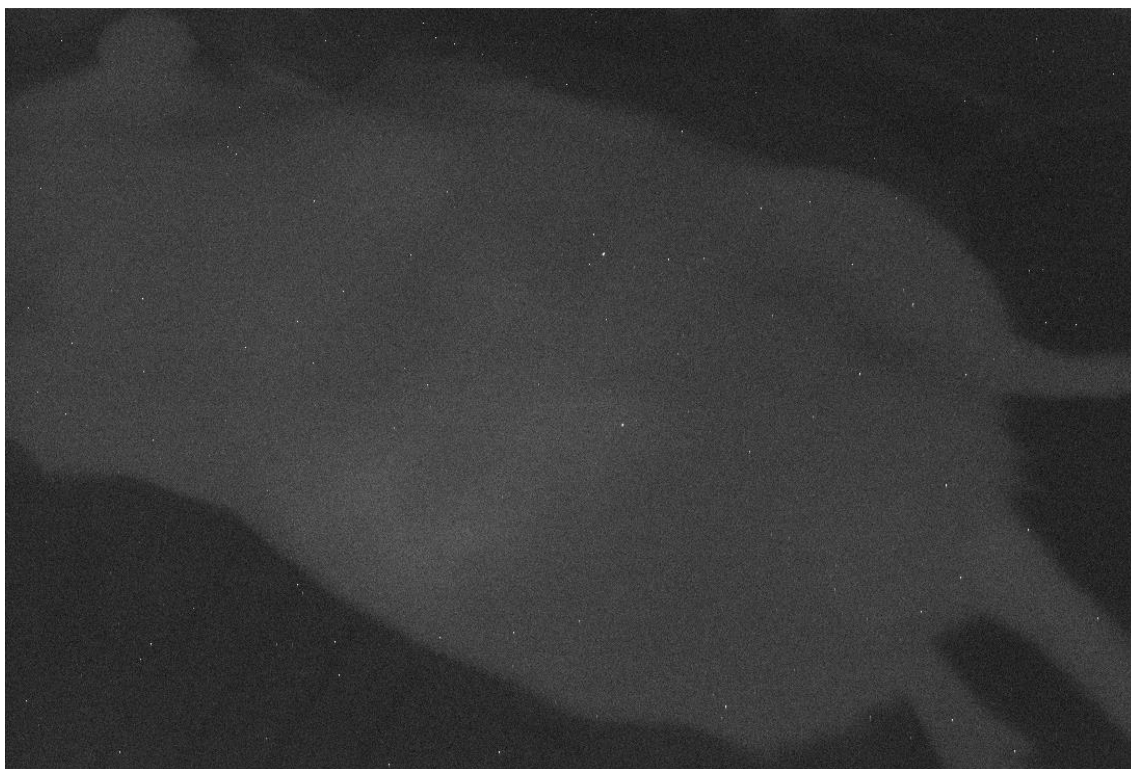
Dále se přistoupilo k testování sestavy 3 (8.2.1.3).

#### 8.2.3.1 Třetí snímání:

##### G2-3200, expozice 40 s

Pro snímání sestavou 3 byl použit malý tripod (viz Příloha 21), který se svými rozměry vešel dovnitř blackboxu a umožňoval zaostřit optickou soustavu na ohniskovou vzdálenost 18 mm.

Na obrázcích níže je vidět první skutečně detekovaný a zaznamenaný bioluminiscenční signál. Potkan byl celosvítící tudíž jsou jasné obrysové kontury ležícího potkana a nejvýraznější zdroj signálu je v místě vpichu luciferinu v dolní pravé části abdomen. Při využití dark korekce, kalibrace temným obrazem pořízeném při stejném expozičním čase, který je součástí akvizičního software dojde k odfiltrování podstatné části šumu a zdroj signálu je více zřetelný. Stejný obrázek byl poté obarven z monochromatické na barevnou škálu (lookup) *fire* pro zvýraznění rozložení bioluminiscenčního signálu.



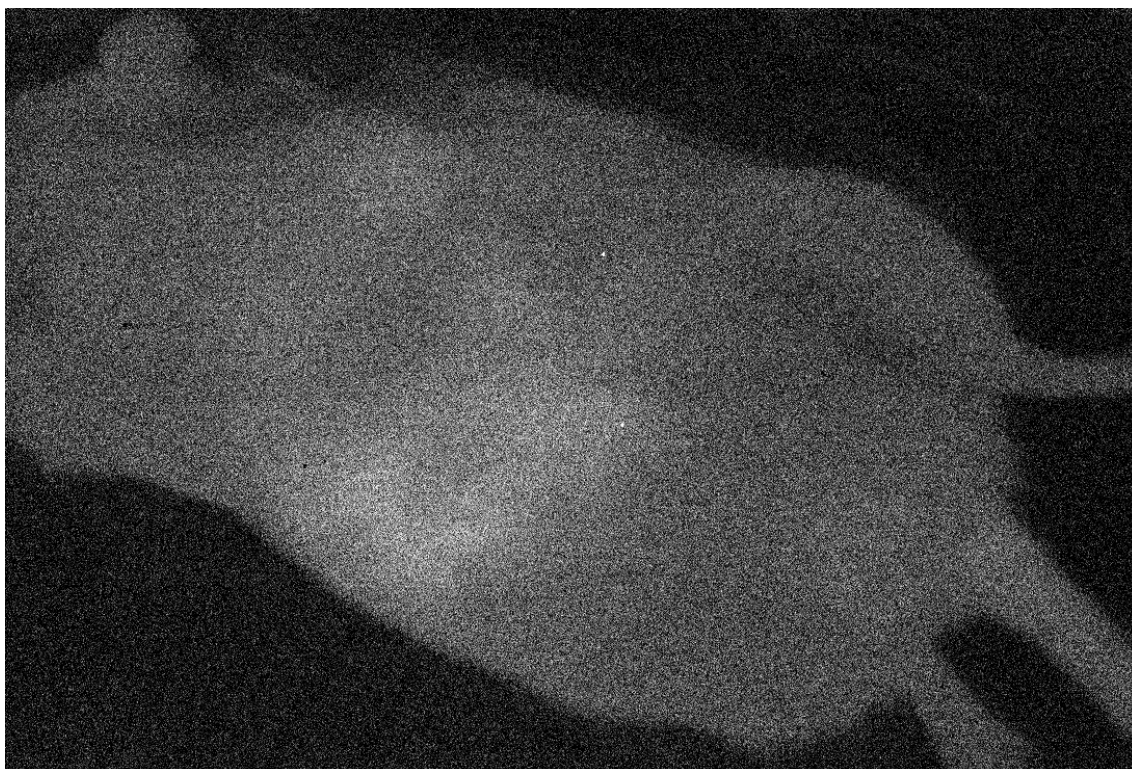
Obrázek 36 - G2-3200, expozice 40 s



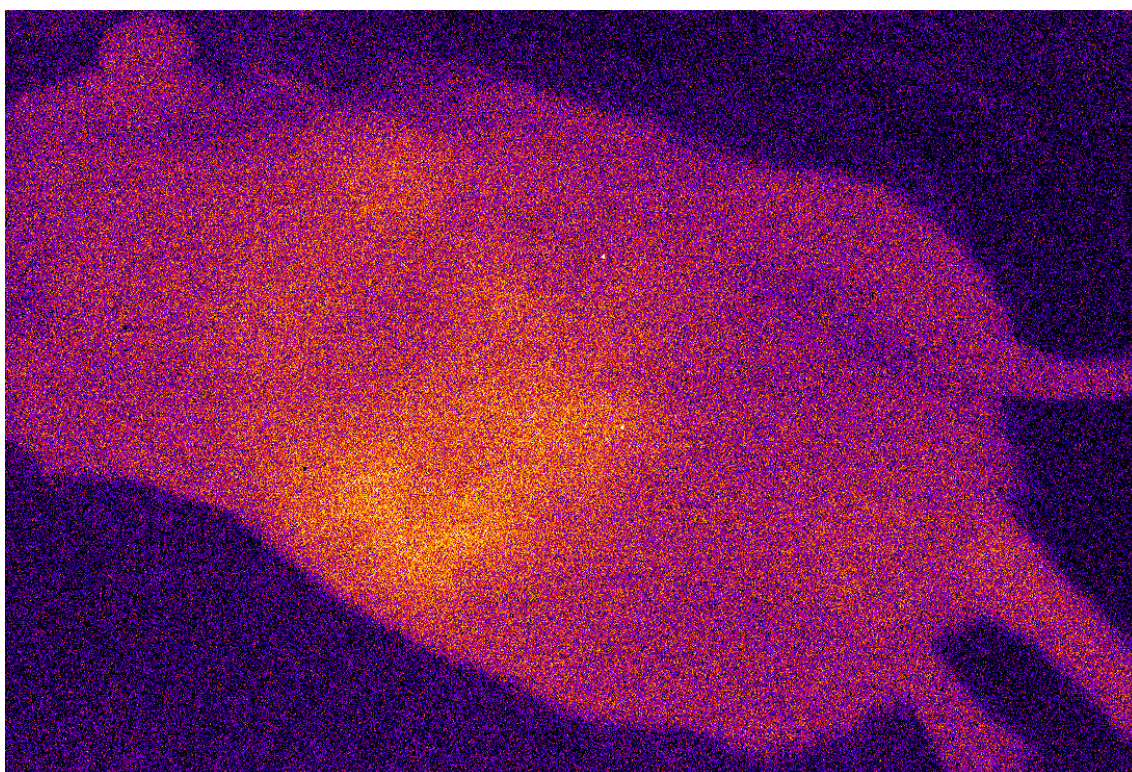
Obrázek 37 - G2-3200, expozice 40 s, bining XY 4x

Po dobu snímání byl nastavený binning XY 2x pro kamerové snímání (nikoliv software binning). Zvýšení binningu XY na 4x neukázalo nějaký výrazný nárůst bioluminiscenčního signálu, spíše jej více rozlišil od pozadí, ale hlavně se zvýšila intenzita bodového šumu.





Obrázek 38 - G2-3200, f17, expozice 40 s, korekce temným obrazem

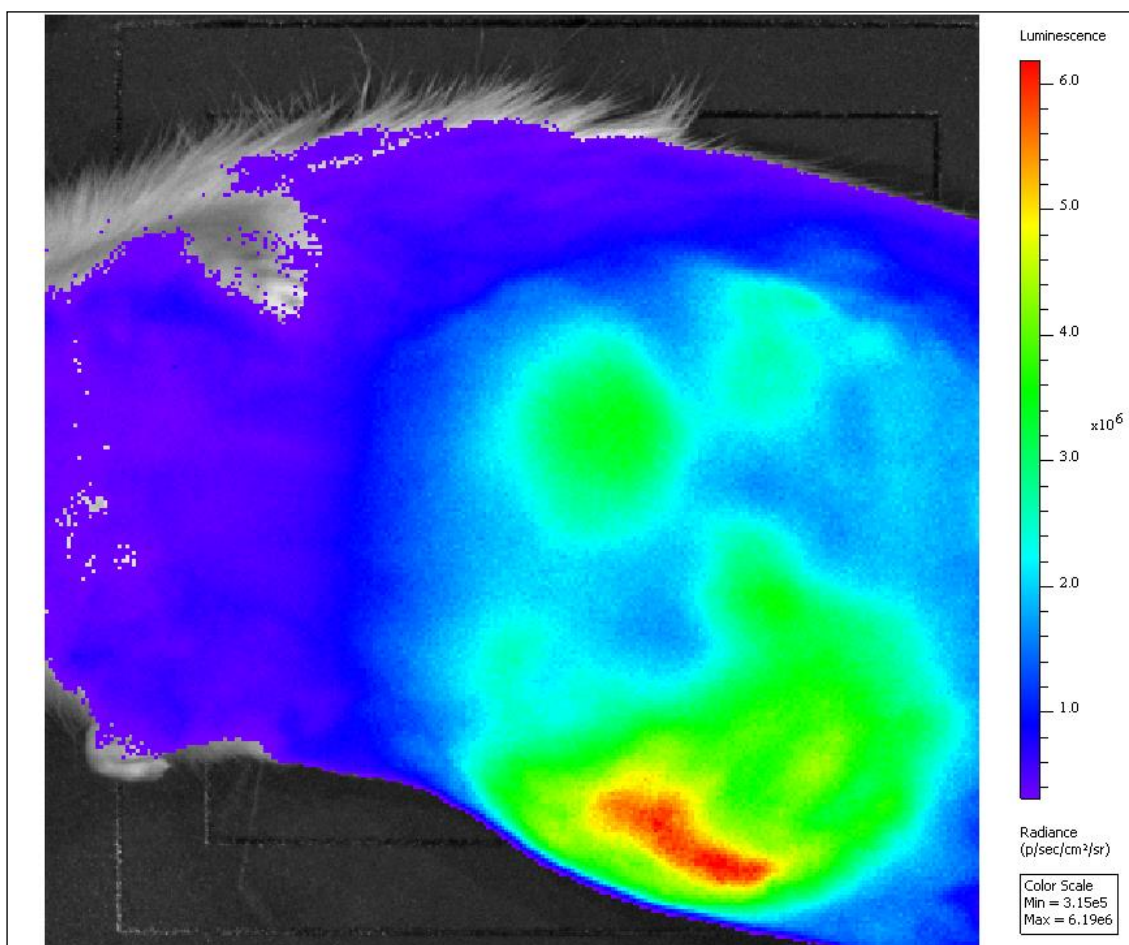


Obrázek 39 - G2-3200, expozice 40s, dark korekce, stupnice lookup fire



### 8.2.3.2 Závěrečné ověření:

IVIS Lumina XR, 60 s expozice, 1 hodina a 4 minuty po aplikaci injekce



Obrázek 40 - IVIS Lumina XR, expozice 60 s, černý rám

Přítomnost bioluminiscenčního signálu po ukončení testování byla ověřena.

### 8.2.4 Závěr testování II

Bylo úspěšně prokázáno, že kamera G2-3200 je jako jediná z vytypovaných schopna detekovat a zaznamenat bioluminiscenční signál.

## 8.3 Testování III

Pro závěrečné testování byl vytvořen speciální držák (viz kapitola 7.1), který umožňuje snímat subjekt pod různými úhly. Na základě úspěchu z testování II byly pro testování III přiřazeny dva subjekty za účelem získat co nejvíce dat pro aplikaci do připraveného rekonstrukčního algoritmu. V první fázi testování III byla ještě ověřena schopnost kamery detekovat bioluminiscenční signál, aby byla dodržena návaznost na testování II.

Subjektu jedna byl luciferin podán injekčně subcutálně do peritonea jak je to zvykem při standardním bioluminiscenčním měření. Druhém subjektu byl luciferin podán intramuskulárně do pravé (dexter) pánevní končetiny intramuskulárně (do svalů) ve snaze vytvořit intenzivní lokální (bodový) zdroj signálu, který by se pomaleji distribuoval do

zbytku subjektu. Tato změna měla za účel vytvořit bodový zdroj signálu, který by zůstal po dobu měření co nejdéle lokalizovaný a byl tak průkazný pro použití algoritmu rekonstrukce.

### **8.3.1 Popis měření**

**Datum:** 16. února 2017

**Lokace:** Instituce Klinické a Experimentální Medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4-Krč

**Okolní podmínky:** Laboratorní místnost bez oken s aktivní ventilací udržující teplotu místnosti pod 24°C, v místnosti se nachází optické zobrazovací zařízení s anesteziologickým přístrojem s otevřeným inhalačním okruhem (anestetický plyn je vydechován do prostoru), kamera byla umístěna do temného boxu, zdrojem světla pro manipulaci bylo konvenční osvětlení místnosti, které bylo v průběhu testování vypnuto a kamera byla ovládána mimo místnost

**Subjekt 1:** celosvítící laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) reagující na luciferin-samička

**Subjekt 2:** celosvítící laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) reagující na luciferin-samička

**Agens:** 0,2 ml luciferin, koncentrace 6 mg / ml

- Subjekt 1: intraperitoneální injekční aplikace 14:08
- Subjekt 2: intramuskulární injekční aplikace pánevní končetina dexter, 16:20

#### **8.3.1.1 Sestava**

**Kamera:** G2-3200, Moravské přístroje (Moravia instrument), ID: 2787, S/N: G2FK3200-002787, USB 2.0

**Čip:** KAF-3200ME, **Rozlišení:** 2184 × 1472, **Velikost pixelu:** 6,8 × 6,8 μm, **Plocha snímače:** 14,9 × 10 mm

**Objektiv:** Canon EFS 18-55 mm, Ø 58 mm, ID: 3960508113

**Napájecí zdroj kamery:** Switching power adapter DC 12 V / 5 A max (P/N: 9NA0605349, S/N: H6271000045)

**Software:** SIPS CZ 64 bit (viz kapitola 5.5.1)

**Připojený počítač:** DELL Latitude E5450, Intel i7, RAM 8 GB, Windows 10 Pro 64bit

**Referenční porovnání:** IVIS Lumina XR

#### **8.3.1.2 Kontrola teploty**

Pro kontrolu povrchové teploty byl využit ruční pyrometr <sup>1)</sup>, ke kontrole teploty prostoru vestavěný teploměr ventilační soustavy instalovaný pod stropem laboratorní místnosti <sup>2)</sup>, který byl náhodně ověřen, že se shoduje s měřením pyrometru <sup>1)</sup> a u sestavy 3 je teplota sledována přímo ve vlastnostech kamery <sup>3)</sup>.

**Pyrometr:** ROTHENBERGER Industrial Infrarotthermomete, Art. 1500000804, Mod. DT-811, S/N: 11-397-2013-08

Tabulka 7 - záznam teplotních měření při Testování III

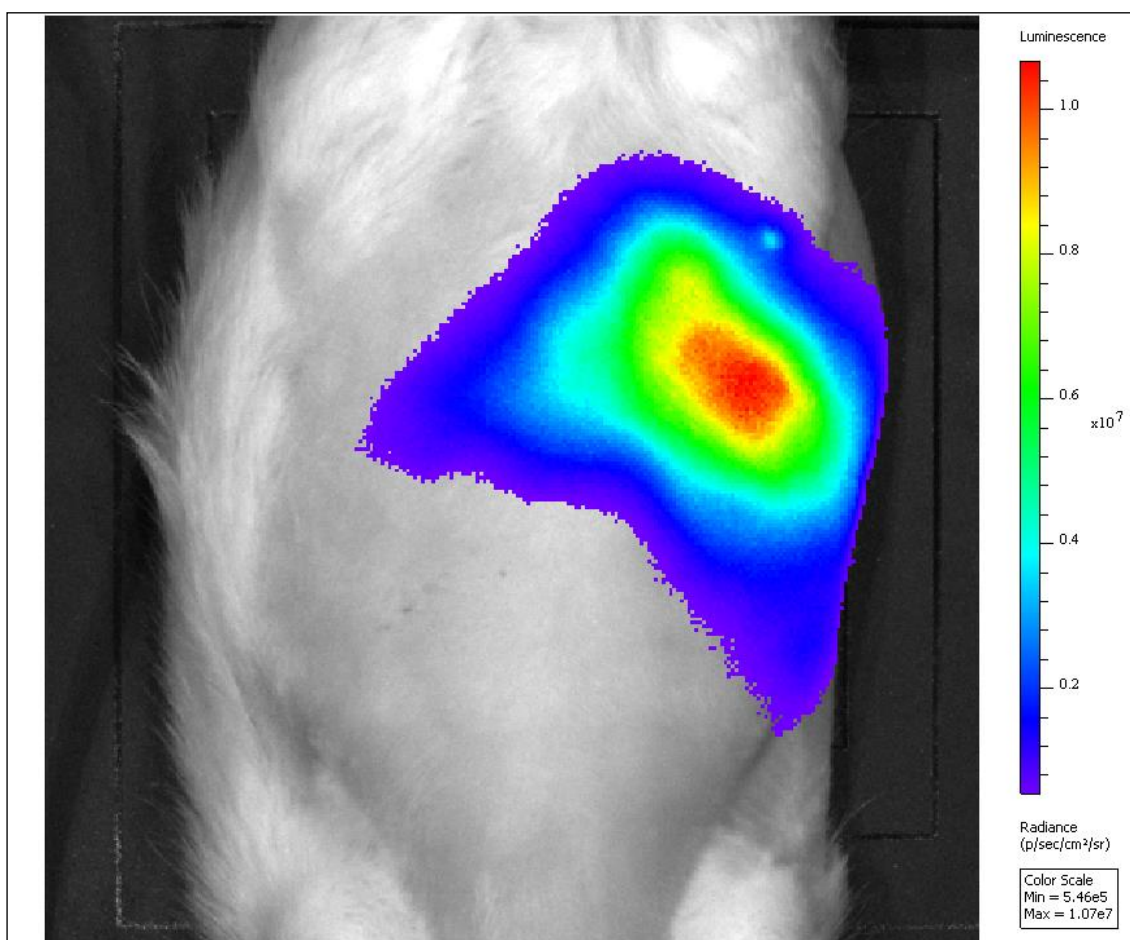
Místo měření	Subjekt 1			Subjekt 2		
	Začátek	Průběh	Konec	Začátek	Průběh	Konec
Místnosti (strop) <sup>1)</sup> <sup>2)</sup>	22,8 °C	22,7 °C	22,8 °C	23,1 °C	22,7 °C	22,9 °C
Potkan (povrch) <sup>1)</sup>	30,7 °C	31,5 °C	32 °C	32 °C	31,9 °C	32 °C
Teplota kamery <sup>3)</sup>	34,1 °C	45,5 °C	38 °C	27,6 °C	35,3 °C	39,8 °C
Teplota čipu <sup>3)</sup>	- 26,3 °C	- 16,3 °C	- 21,3 °C	- 30,8 °C	-22,9 °C	-16,7 °C

### 8.3.2 Testování III.a

#### Subjekt 1

##### 8.3.2.1 Úvodní ověření:

IVIS Lumina XR, 30 s expozice, ihned po aplikaci injekce

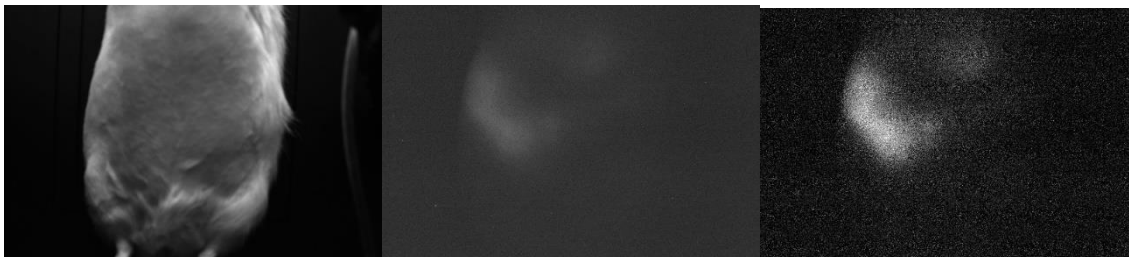


Obrázek 41 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám

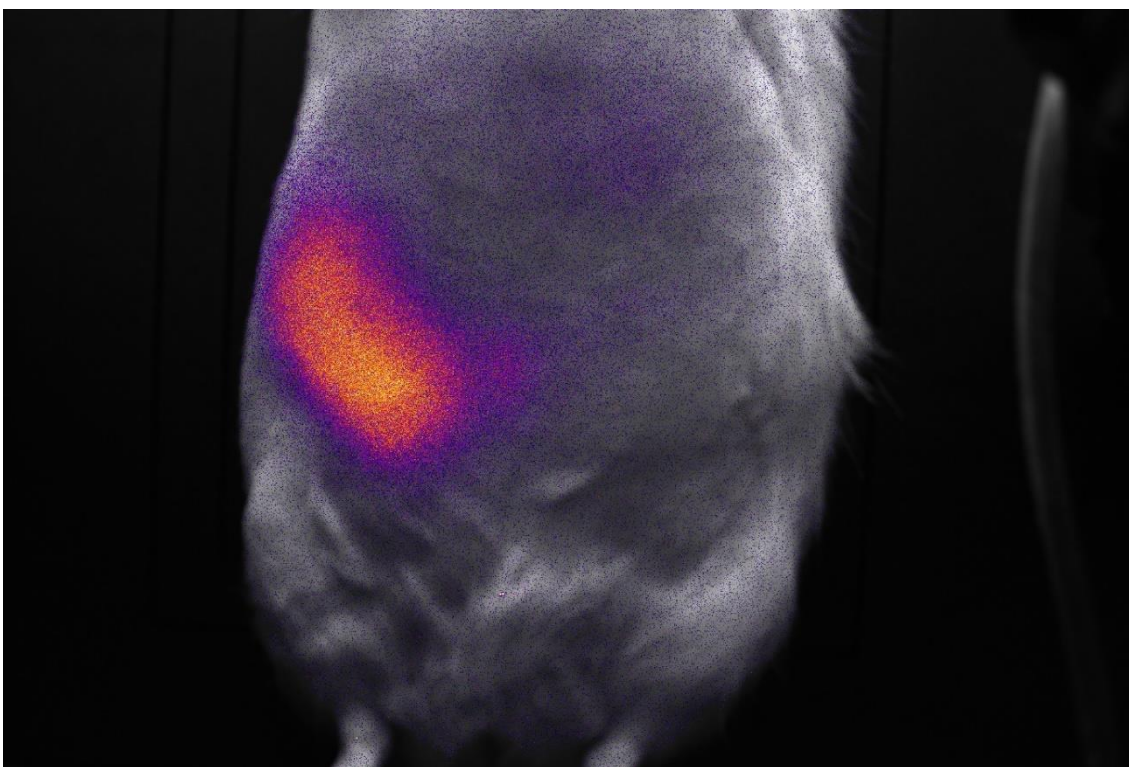
Ověřená přítomnosti bioluminiscenčního signálu u subjektu 1 před začátkem testování.

### 8.3.2.2 První snímání:

G2-3200, expozice 10 – 60 s, f17, tripod (stabilní pozice)



Obrázek 42 - G2-3200, expozice 1 s Obrázek 43 - G2-3200, expozice 60 s Obrázek 44 - G3-3200, expozice 60 s, dark korekce

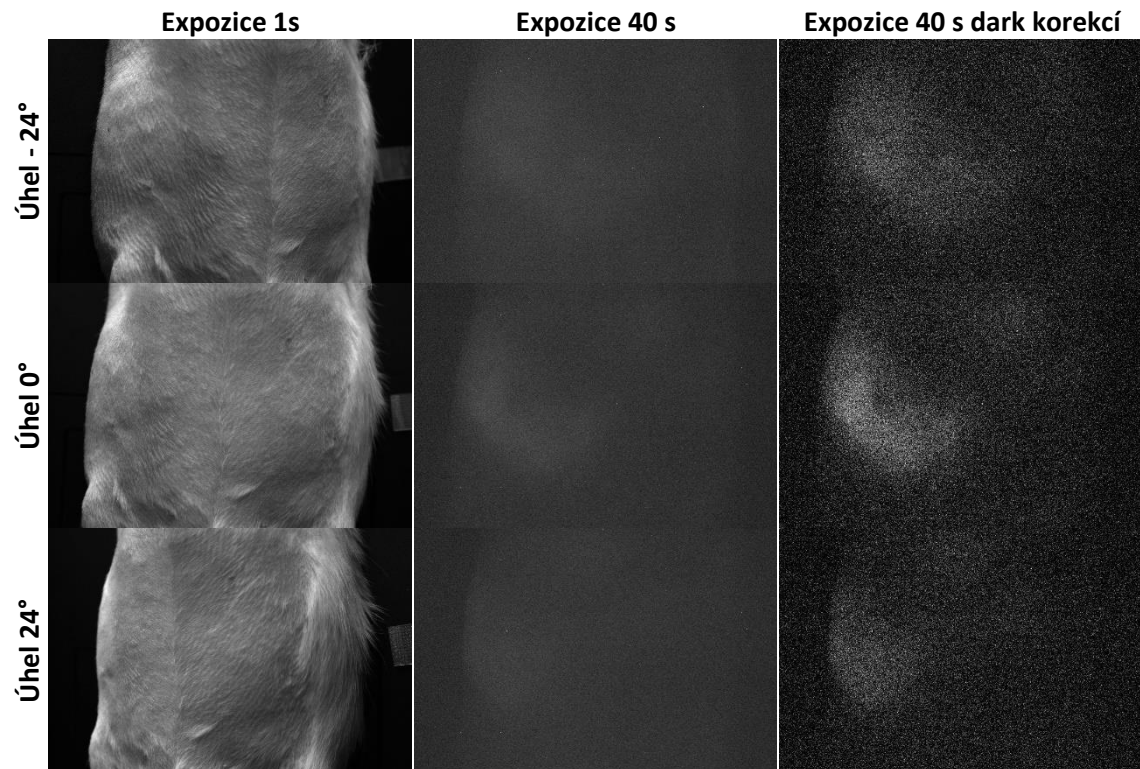


Obrázek 45 - kombinace obrazů G2-3200 expozice 1s + expozice 60s dark korekce, lookup fire

První snímání bylo určeno k ověření návaznosti na testování z 13. 2. 2017 za použití malého tripodu umístěného dovnitř blackboxu tak, aby šla zavřít dveře komory. Schopnost kamery G2-3200 detekovat a zaznamenávat bioluminiscenční signál byla ověřena. Na kombinovaném obrázku výše je vidět bioluminiscenční signál obarvený barevnou škálou *fire* na podkladu obrazu za viditelného světla pro koregistraci. Pozici kamery lze vidět na fotografii v Příloha 22.

### 8.3.2.3 Druhé snímání:

G2-3200, expozice 40 s, f24, úhly snímání -24°, 0°, 24°



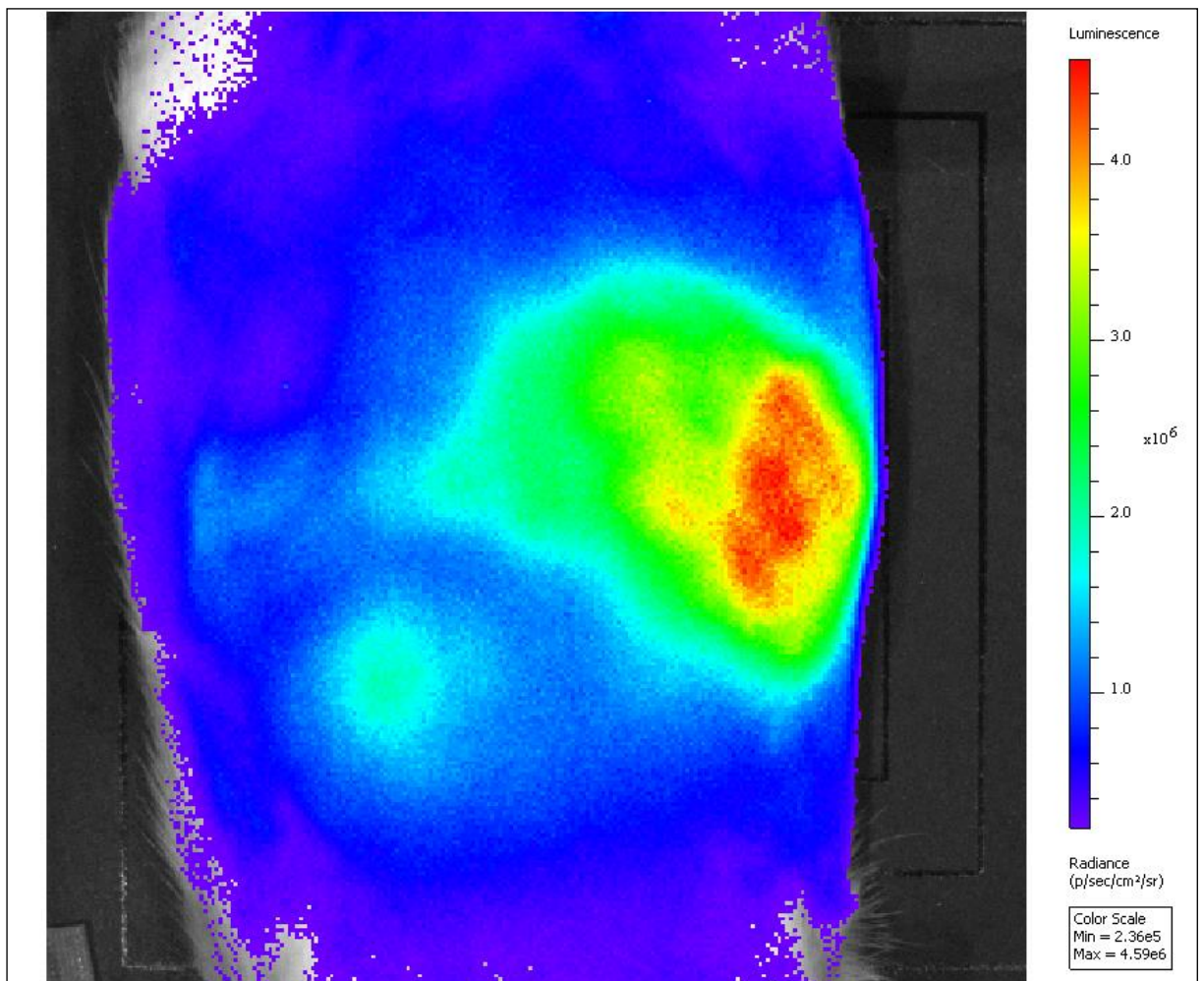
Obrázek 46 - záznam z kamery G2-3200 při testování III.a, obrázky po úpravě

Pro druhé snímání byl aplikován na míru vyrobený držák s vymezením snímacích úhlů, aby bylo možné získat data pro testování rekonstrukčního 3D algoritmu. Byly použity úhly 0°, -24°, 24°, 12° a -12°, ale pro poslední dvě polohy nebyl získán odpovídající signál, jelikož bylo už více jak 1 hodinu a 5 minut po injekci luciferinu a došlo k poklesu bioluminiscenčního signálu, tak že jej kamera již nedetekovala, ale závěrečné ověření jej ještě prokázalo (viz Příloha 23, Příloha 24).



#### 8.3.2.4 Závěrečné ověření:

IVIS Lumina XR, 60 s expozice, 1 hodina a 32 minut po aplikaci injekce



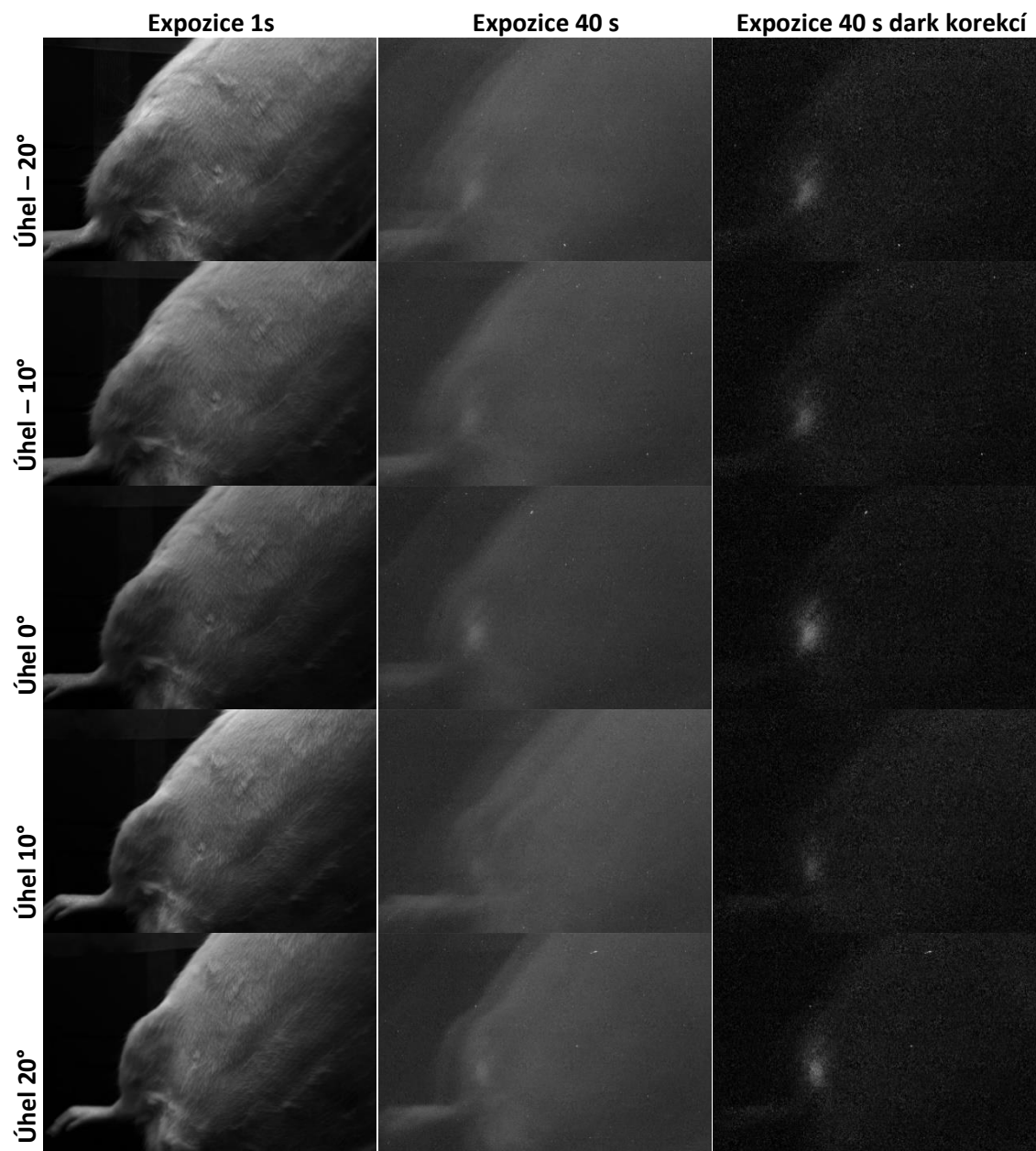
Obrázek 47 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám

Přítomnost bioluminiscenčního signálu u subjektu 1 po testování ověřena.

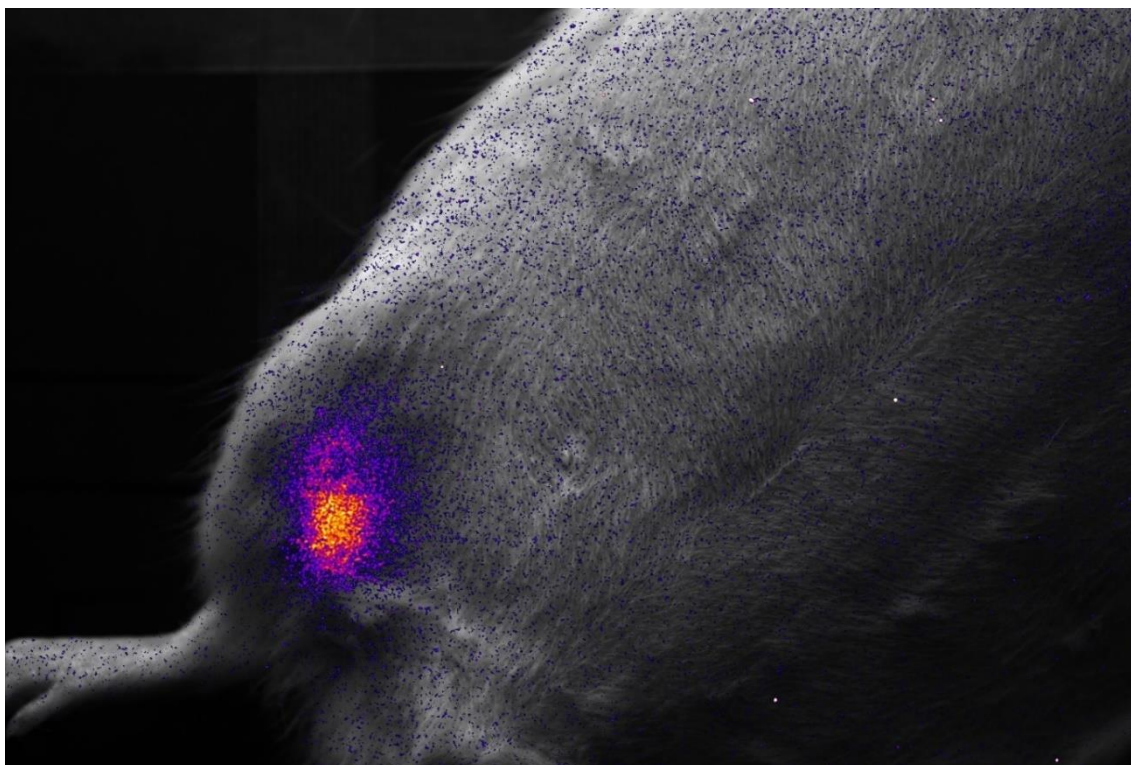
**8.3.3 Testování III.b**  
**Subjekt 2**

**8.3.3.1 Třetí snímání:**

**G2-3200, expozice 40 s, binning XY 2x, úhly snímání -20°, -10°, 0°, 10°, 20°, ihned po aplikaci injekce**



Obrázek 48 - záznam z kamery G2-3200 při testování III.b, obrázky po úpravě



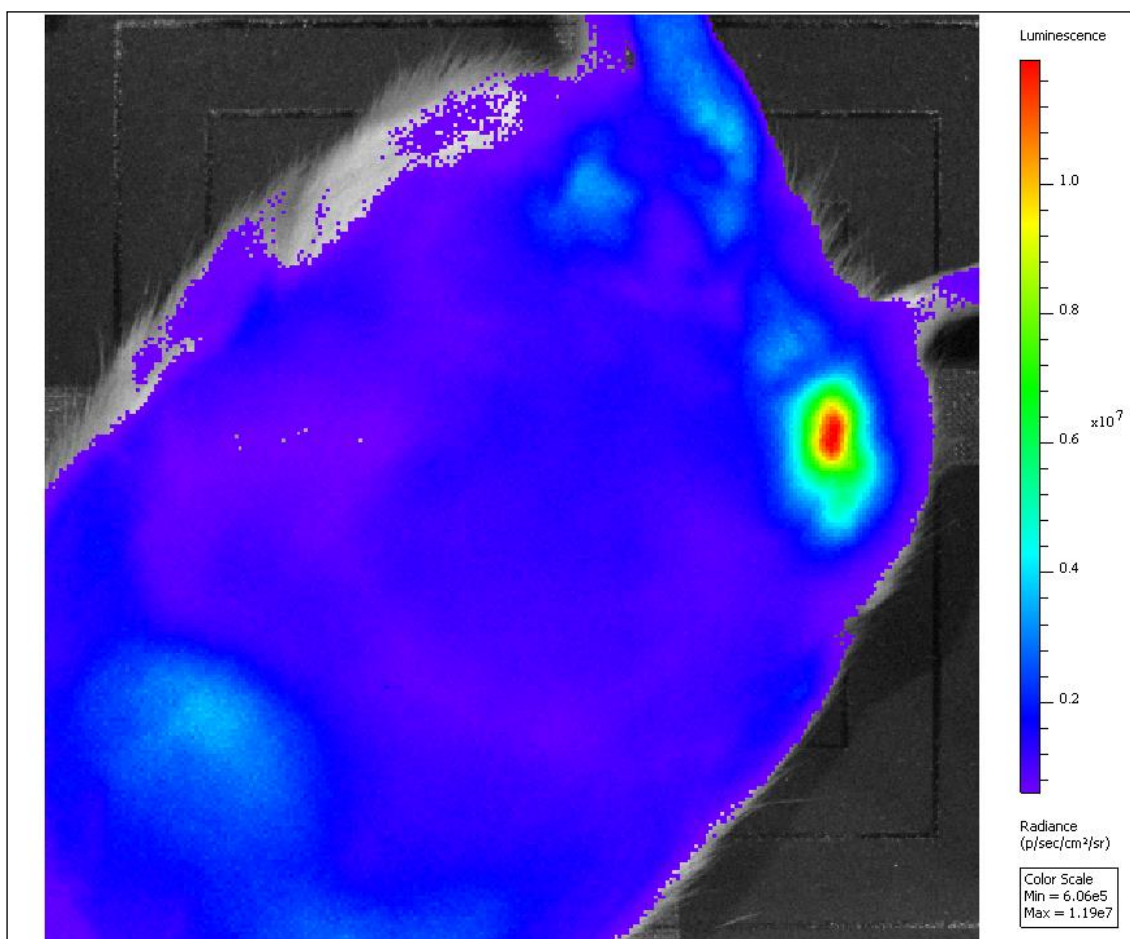
Obrázek 49 - kombinace obrazů G2-3200 pod úhlem 0° expozice 1s + expozice 40s dark korekce, lookup fire, průměrovací filtr

U subjektu 2 se z časových důvodů neprovádělo úvodní ověření. Injekce byla dána intra muskulárně, aby byl zdroj bodově lokalizovaný a nedocházelo k tak rychlému rozšíření do zbytku těla. I tato data byla naměřena za účelem otestování 3D rekonstrukčního algoritmu a to v rozsahu úhlů -20°, -10°, 0°, 10°, 20°. Při použití *dark* korekce se zobrazí bodový zdroj, který je pro ilustraci ukázán v kombinovaném obrázku výše, kde je podkladem obrázek za viditelného světla a přes něj vrstva bioluminiscenčních dat, která byla přefiltrována průměrovým filtrem obarvena barevnou škálou *fire*. Umístění kamery je k vidění na fotografii viz Příloha 25.



### 8.3.3.2 Závěrečné ověření:

IVIS Lumina XR, 30 s expozice, 48 minut po podání injekce



Obrázek 50 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám

Přítomnost bioluminiscenčního signálu u subjektu 2 byla ověřena po testování III.

### 8.3.4 Závěr testování III

Bylo nashromážděno dostatek dat pro testování rekonstrukčního algoritmu. Tato data lze rozdělit do dvou sérií, každá pro jeden subjekt. První série je nasnímána z třech úhlů projekce a druhá série z pěti různých úhlů.

## 8.4 Sumarizace

Počet testování i jejich délka byl limitován samotným principem této metody, jelikož jak už bylo řečeno pro vytvoření bioluminiscenčního signálu je zapotřebí živý organismus a jiným způsobem nebylo možné testování kamer provést. Délka měření kromě samotného biologického poklesu exprese luciferinu byla limitována maximální bezpečnou délkou anestezie jedince (subjektu). Při anestezii delší než 1,5 hodiny stoupá riziko úhynu jedince.

Tabulka 8 - finanční náročnost testování

<b>Položka</b>	<b>Cena</b>	<b>Užité</b>	<b>Výdaje</b>
IVIS Lumina XR (pořizovací cena)	5 000 000 Kč	7 měření	-
Potkan <i>Lewis</i> „celosvítící“	8 000 Kč / jedinec	2 jedinci	-
Luciferin inj. sol.	30 000 Kč / g	120 mg	3 600 Kč
Inhalační anestezie Isofluran	2 000 Kč / měsíc	4 anestezie	266 Kč
Kanyly	3 000 Kč / 50 ks	4 ks	240 Kč
Mzda laboranta IKEM	120-150 Kč / hod	16 hod., 3 osoby	5 760 Kč
Vyhřívaná podložka	1 000 Kč / ks	1 ks	-

V tabulce nahoře je k vidění přibližná finanční náročnost testování, která byla pokryta pracovištěm IKEM, avšak nelze ji označit za nulovou nebo zanedbatelnou. V průběhu testování nedošlo ke škodě na majetku (přístrojovém vybavení) ani k ublížení na zdraví nebo úhynu subjektu (jedince), což by případně způsobilo nežádoucí navýšení nákladů. A i tento důvod nepřímo limitoval počet měření.

## 9 Zpracování dat a aplikace algoritmu

Obrazová data získaná při experimentu (viz kapitola 8) byla upravena a připravena pro následnou aplikaci v připraveném rekonstrukčním algoritmu.

### 9.1 Úprava dat před použitím v algoritmu

Výstupní data z programu SIPS (viz kapitola 5.5.1) bylo zapotřebí modifikovat před použitím v algoritmu. Veškeré modifikace před vstupem do algoritmu probíhaly v programu ImageJ (viz kapitola 5.5.3). Vzhledem k obsahu nashromážděných dat – celkem 329 položek (souborů) bylo nutné nejprve provést setřídění dat, opravu chyb v názvech a přeměnu názvů pro funkční srovnání. Program SIPS umožňuje automatické ukládání nasnímaných obrazů s možností přidání vlastních poznámek, pořadového čísla a časové značky do názvu souboru. To však bohužel činí připojováním za hlavní název, což je pro operační systém rovnající soubory dle názvu matoucí.

K práci se soubory byl použit program Total Commander (viz kapitola 5.5.2), který kromě jiného disponuje funkcí „hromadného přejmenování“, které umožňuje velký objem souborů přejmenovat podle nastavené masky. Pomocí tohoto postupu byly názvy všech souborů přeměny tak, aby začínaly časovou značkou a pokračovaly určením typu obrazu, polohy a pořadového čísla. Následně byly z programu SIPS generovány vybraná nasnímaná data do PNG bez komprese v 16 bitovém rozlišení. Ostatní nasnímaná data, která byla chybná nebo pomocná (např. ostření) nebyla exportována.

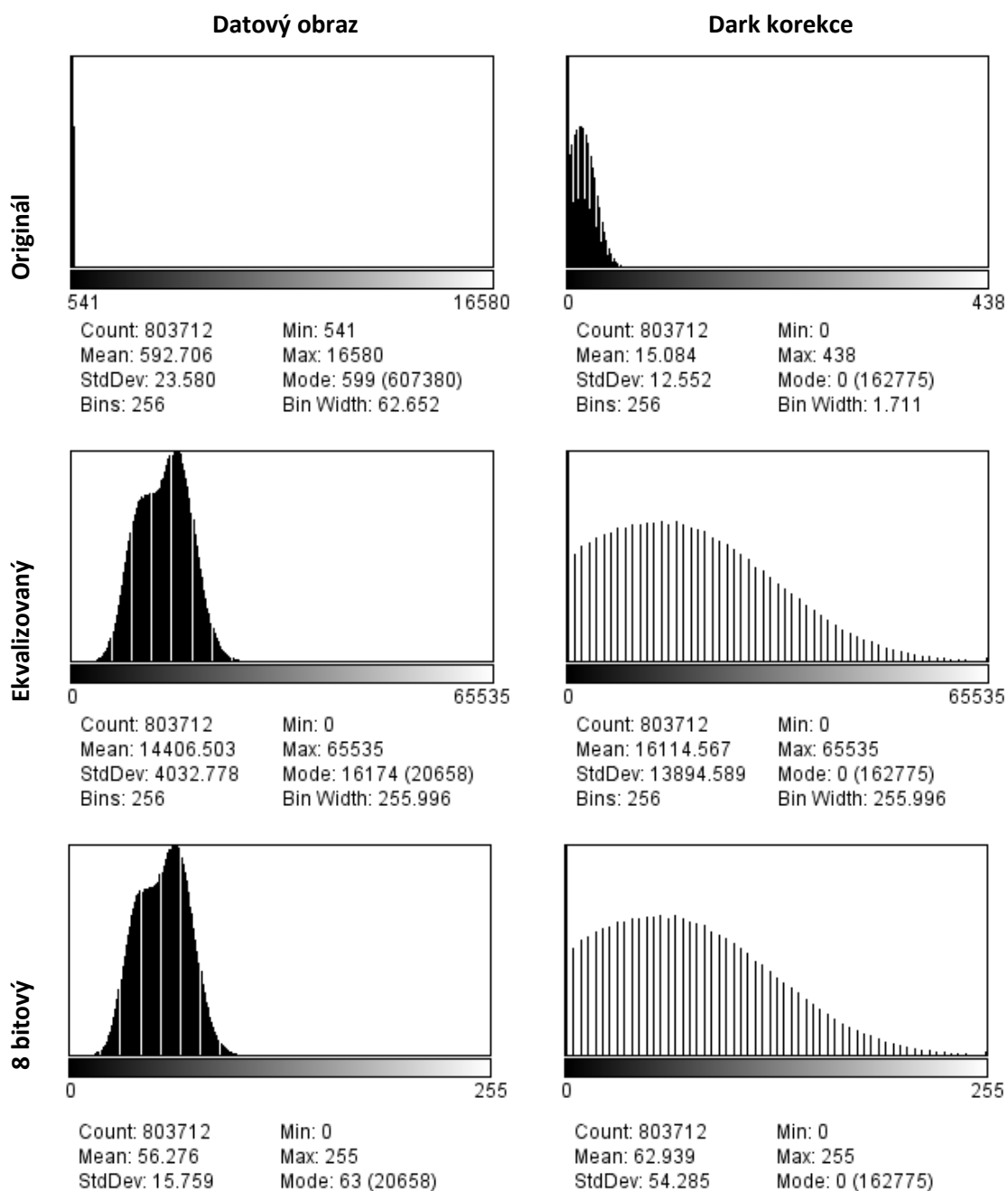
U projekcí byla kromě samotných dat a koregistračního obrazu za „denního“ světla i temný obraz (*dark*), který byl použit na *dark* korekci příslušných obrazových dat přímo v programu SIPS. *Dark* obraz musí odpovídat datovému obrazu pozicí snímání i délkou expozice. Díky této korekci je odfiltrováno signální pozadí a zvýrazní se samotný bioluminiscenční signál.

#### 9.1.1 Ekvalizace histogramu, ořez minimální a maximální hodnoty, lookup

Prvním krokem každé úpravy je otevření exportovaného souboru PNG a zobrazení histogramu. Matematický rozsah obrazu je pro datový obraz přibližně v rozsahu 541 – 16580 (jednotlivé obrázky se můžou lehce lišit) a pro datový obraz po *dark* korekci přibližně 0 – 438. Ten je následně modifikován manuálním ořezem minimální a maximální hodnoty dle vizuální kontroly. Zbylý rozsah je roztažen na celý 16bitový rozsah (0 – 65535) a vznikne ekvalizovaný histogram.

Následně je obrázek převeden do 8bitového rozsahu (0 – 255) a uložen ve formátu PNG. V případě dat snímaných v sérii (různé úhly v rámci jednoho měření) byly všechny projekce nahrány do *stacku*, aby úpravy rozsahu a převody byly shodné pro úhly snímání. *Stack* je následně po všech společných úpravách rozložen a jsou uloženy upravené obrazy jednotlivých projekcí.

Pro přehlednost je možné na data aplikovat *lookup table*, který data nijak nemodifikuje, pouze matematický rozsah zobrazí v barevné škále dle výběru. Lookup typu *fire* ukázal velmi pozitivní přínos pro zvýraznění zdroje dat. Existuje možnost takto zvýrazněný obrázek uložit jako barevný.



Obrázek 51 - histogramy upravovaných obrazů

### 9.1.2 Filtrace dat

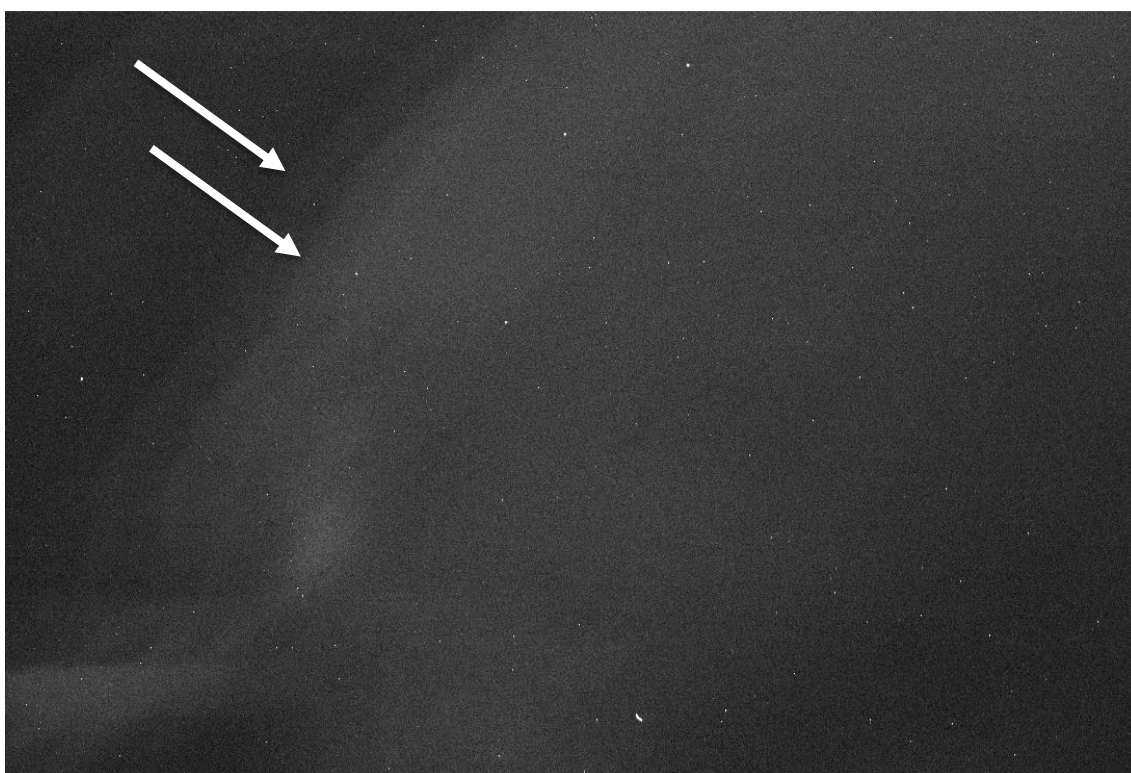
Získaná data jsou na první pohled zřetelně bodová, obzvláště nejvýraznější je to po *dark* korekci. V rámci zlepšení vstupních dat pro algoritmus, který je ze své podstaty koncipován na spojitá data získaná počítačovou tomografií, je možné data modifikovat matematickými filtry. Mezi vyzkoušené filtry se řadí mediánový filtr, průměrový filtr (*mean*) a Gaussův filtr.

Průměrový filtr rozprostře data i mezi volné (černé) pixely, avšak výsledek se jeví pouze jako rozmazaný. Lepšího výsledku je dosaženo pomocí mediánového filtru, který eliminuje saturované pixely a po mediánové filtraci zcela vymizí a data jsou spojena do plochy při zachování vlastní lokace signálu v obraze. Gaussův filtr vytváří nejkvalitnější

plošné spojení bodových dat, lepší než oba předchozí filtry, avšak bohužel neeliminuje saturované body. Použité filtry jsou teoreticky popsány v kapitole 2.3.

### 9.1.3 Residual Bulk Image

Při testování III.b (viz kapitola 8.3.3) se objevil na zaznamenaných datech artefakt zdvojené hrany sledovaného subjektu (viz Obrázek 52). Tento artefakt, původně pokládáný za odraz od testovacího držáku, byl následně vysvětlen jako *Residual Bulk Image*, který vzniká pouze u CCD čipů na základě jejich konstrukce (viz kapitola 3.1.1). Některé fotony, obzvláště ty s delší vlnovou délkou, proniknou skrz fotocitlivou vrstvu čipu až do substrátu, kde se uvolní ve formě elektronů a putují do tzv. nábojových pastí (*charge traps*), které vznikají při výrobě CCD čipu. Následně se tyto zachycené náboje mohou navrátit zpět do fotocitlivé vrstvy při čtení (i bez přístupu světla) a vniká artefakt falešných jasových stop. Jak bylo zjištěno už při zpracování obrazu, tento artefakt lze odstranit pomocí korekcí *dark* obrazu přímo v akvizičním softwaru. [39]



Obrázek 52 - záznam z testování III.b s artefaktem residual bulk image

### 9.1.4 Softwarový binning

Nasnímaná data bez binningu nastaveného na kameře mají pixelové rozlišení vlastního čipu, tedy 2184 x 1472. Některá data byla nabrána s kamerovým binningem a těch se tato podkapitola netýká. Avšak pro obrazy s nezmenšeným rozlišením se ukázalo, že jsou pro algoritmus nepoužitelná, jelikož vytvoření a výpočet rekonstrukční matice o rozměrech 2184 x 2184 x 1472 je zcela mimo výpočetní výkon počítače.

Pro tato data bylo potřeba využít softwarový binning (viz kapitola 2.3.5). Ten lze modifikovat a využít v různém rozsahu a nastavení, oproti kamerovému binningu, který je pevně daný vlastní kamerou. Originální data před ekvalizací (viz kapitola 9.1.1) byla zmenšena binningem 2x v obou směrech (X i Y) v nastavení sumačním. Takto softwarově

upravená data byla plně použitelná pro rekonstrukční algoritmus, bez rizika ztráty dat s výhodou jejich zesílení oproti temnému pozadí.

## 9.2 Rekonstrukční algoritmus

S prvními naměřenými reálnými daty bylo teprve možné směřovat vývoj algoritmu do finální fáze. Oproti testovacím variantám bylo nutné definovat přesně vstupní data, která byla před použitím modifikována a nahrát je odděleně. Dále po dobu testování s reálnou předlohou byla vstupní data do rekonstrukce shodná ze všech směrů. Tento vstup do algoritmu byl upraven, aby vstupní reálná data odpovídala jejich skutečné pozici.

Dále byl do této doby užívaném algoritmu upraven výstup celého algoritmu, který byl předělán na souborový výstup formátu TIFF, do kterého byly nahrány jednotlivé vypočtené projekce z rekonstrukce jako vrstvy *stacku*. V první variantě (zastoupené souborem prog12.m) proběhla rekonstrukce dle očekávání, avšak výstupem byl binární obraz (pouze černá a bílá), což byla zřejmá chyba, jelikož vstupní data byla v odstínech šedi 8 bitový obraz, který si algoritmus zpracoval stejně jako při testování s reálnou předlohou.

V rámci konzultace bylo zjištěno, že se chyba skrývá v samotném výstupu dat z rekonstrukce, jelikož matematický výstupní rozsah není shodný se vstupním, který je *double* s hodnoty stupně šedi od 0 do 1. Výstupem algoritmu je rozsah od -1 do 1, který při snaze o export do 8 bit rozsahu ať už v rámci samotného algoritmu nebo v exportu do souborového formátu TIFF došlo k oříznutí záporných hodnot, které byly nahrazeny nulou a hodnoty nenulové byly nahrazeny jedničkou.

```
135 %% Export dat
136
137 imwrite(uint8((mat2gray(slices(:,:,1)))*255), 'export_stack.tif')
138 for k = 2:size(slices,3)
139     imwrite(uint8((mat2gray(slices(:,:,k)))*255),
140            'export_stack.tif', 'writemode', 'append');
141 End
```

Zdrojový kód 3 – část kódu ze souboru prog12\_opraveny.m

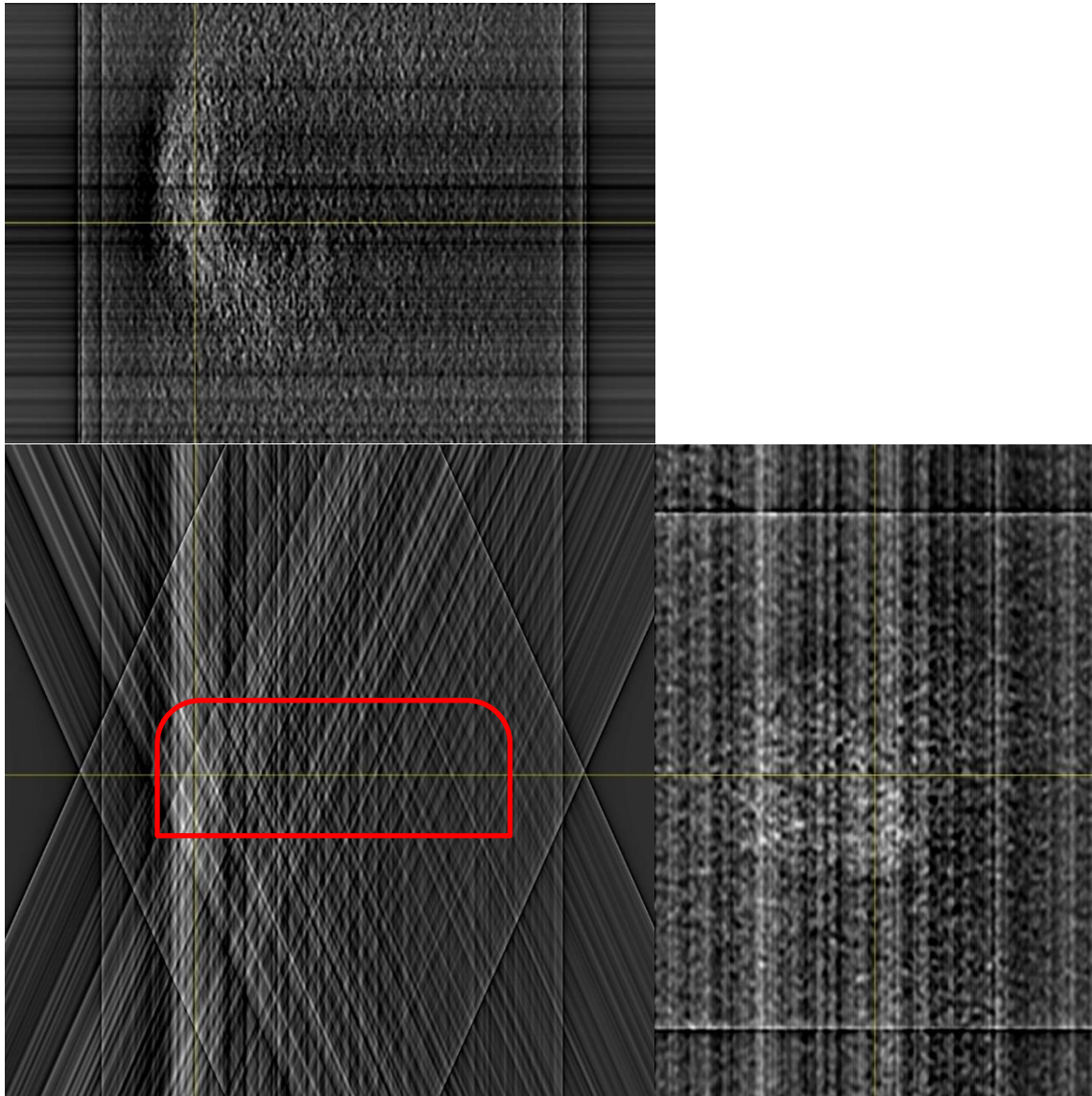
Tento nedostatek byl odstraněn (jak je vidět v Zdrojový kód 3) tak, že výstupní rozsah hodnot -1 až 1 byl vložen do funkce *mat2gray(A)*, který zkontroluje matici, minimální reálnou hodnotu vezme jako 0 (černá barva) a maximální hodnotu v matici jako 1 (bílou) a všechny ostatní hodnoty rozdělí spojitou lineární funkcí na stupně šedi. Poté byl nový výstupní rozsah 0 - 1 vynásoben konstantou 255 (odvozené od velikost 8bitového rozlišení 0-255) a na závěr je převeden na 8bitové rozlišení funkcí *uint8(array)*.

V poslední fázi vývoje byl algoritmu očištěn od vývojových mezikroků a zobrazení (*figure*), rozdělen do dvou variant pro rekonstrukci z 3 úhlů projekcí (reprezentován souborem prog13\_3proj.m) a 5 úhlů projekcí (soubor prog3\_5proj.m). Byla opravena úhlová pozice projekcí v algoritmu, které se v předchozích variantách počítaly od nuly s pevným úhlovým krokem posunu (rotace doleva), na skutečné pozice pevně zadané podle konstrukce testovacího držáku. Tedy oproti předposlední variantě není nutné výstupní matici TIFF postprocesingově rotovat o 24°, ale projekce se skládají už v rámci rekonstrukce z originálního postavení.

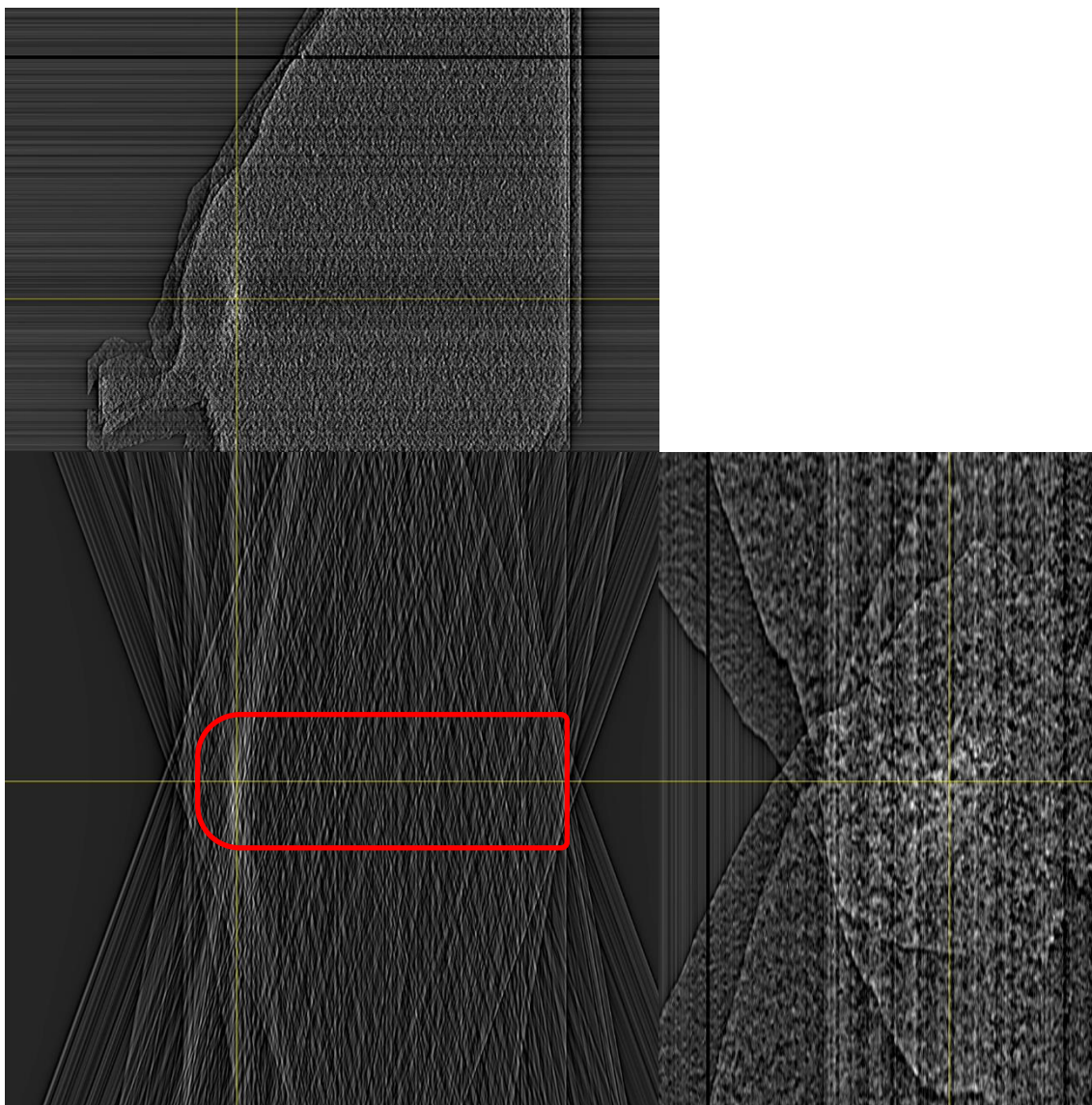


### 9.3 Projekce výstupu z algoritmu

Výstupem rekonstrukčního algoritmu je *stack* rekonstrukcí uložené ve formátu TIFF. Ten však lze prohlížet v programu Matlab pouze po jednotlivé vrstvě. Otevřením *stacku* TIFF v programu ImageJ umožňuje volné a rychlé listování v jednotlivých vrstvách. Taktéž je možné si *stack* zobrazit v ortogonální projekci, která zobrazí *stack* ze 3 stran: ze předu (XY) tak jak jsou řezy, ze shora (XZ) a boční pohled (YZ). Horní pohled (XZ) odpovídá zobrazovacímu úhlu 0°. Při posunu po vertikální ose je vidět vzájemný posun projekcí z horního pohledu. Zároveň je možné se v rámci jednotlivých projekcí pohybovat a sledovat svoji pozici pomocí žlutého navigačního kříže.



Obrázek 53 - tomografický řez 3 projekční rekonstrukce s ortogonálními projekcemi



Obrázek 54 - tomografický řez 5 projekční rekonstrukcí s ortogonálními projekcemi



## 10 Diskuze

Na rekonstruovaných datech je zřejmé zobrazení reálné pozice zdroje signálu. Tento výsledek zcela naplňuje požadavky nároků kladené na tuto diplomovou práci. Ačkoliv se může zdát kvalita rekonstrukce neuspokojivá a přesnost sporná, je přímo prokazatelné, že bioluminiscenční signál byl lokalizován přibližně ve svislé úrovni rekonstrukční plochy, je lokalizován vlevo od osy což odpovídá vždy reálné pozici, kdy byl v případě prvního subjektu podán do peritonea dexter a v druhém případě do pravé (opět dexter) pánevní končetiny intramuskulárně.

Lze konstatovat, že tato metoda je v tuto chvíli na stejné úrovni jako, když 16. 3. 1973 publikoval Paul C. Lauterbur první tomografickou rekonstrukci z magnetické rezonance (viz Obrázek 55). Podobnost s výstupem rekonstrukčního algoritmu je velmi příhodná, jelikož v obou případech se jedná o tomografický řez s tím rozdílem, že Lauterbur měl dva zdroje signálu. Tato publikace dala základ všem dnešním přístrojům magnetické rezonance užívaným v klinické praxi a v rámci České republiky bylo k datu 31.12.2015 zaregistrováno 88 přístrojů [ÚZIS 2015, Statistický výstup 12.1.7].



Obrázek 55 - první MRI rekonstrukce, zdroj: [37]

Tato metoda má zřejmé nedostatky už jak bylo popsáno při vývoji konstrukce a rekonstrukčního algoritmu a je zde velký prostor pro další vývoj, který se může zaměřit na zkvalitnění akvizice dat, jejich lepší filtraci a následného výpočtu rekonstrukce. Dále by bylo potřeba k vyrobenému samotnému přístroji, tak jak byl popsán v kapitole 7.3, vybudovat komplexní software, který by zkombinoval všechny funkce v jednom programu: tedy akvizici a úpravu dat, rekonstrukci a projekci (kterou nyní zastupovaly 3 různé programy). [37][38]

V rámci diplomové práce byly definovány konstrukční prvky ke stavbě přístroje, jejíž základním kamenem je kamera konstrukce CCD dostatečně citlivá pro detekci bioluminiscenčního signálu (viz kapitola 8.3). Ta musí být umístěna do světlotěsné komory vyrobené na míru podle vlastností celé optické soustavy (kamera + objektiv), tak aby se do ní vešel oblouk pro snímání s minimálním poloměrem pracovní vzdálenosti (WD), tak jak je popsáno v kapitole 7. Jak se ukázalo v průběhu zpracování diplomové práce, není k dispozici vhodný software pro rekonstrukci bioluminiscenčních dat v 3D prostoru. Z toho důvodu byl v programovacím prostředí Matlab vyvinut vlastní rekonstrukční algoritmu, jehož popis se nachází v kapitole 6 a 9.2.

## Závěr

V rámci této diplomové práce byly analyzovány možnosti konstrukce zařízení pro trojrozměrné zobrazení optického signálu aplikovatelného ve specifických podmínkách bioluminiscenčního měření. Byl zdokumentován vývoj vlastní konstrukce přístroje, který by takový způsob zobrazování umožňoval. Proto bylo nejprve nutné vytypovat a následně otestovat kamery schopné snímat optický bioluminiscenční signál. Tato problematika se ukázala jako nejsložitější a nejzásadnější pro celou diplomovou práci, protože každou z vytypovaných kamer bylo nutné otestovat na pracovišti IKEM na živých subjektech pro schopnost detekce bioluminiscenčního signálu. Možné kamery byly vytypovány na základě parametrů bioluminiscence a předpokládané citlivosti čipu, aby ji kamery mohly detekovat. Přestože žádná komerčně dostupná kamera není primárně určena k detekování bioluminiscence, podařilo se jednu kameru sestavit na základě průběžného testování.

Při absenci dostupného software pro rekonstrukci optického signálu v trojrozměrném prostoru byl vyvinut vlastní algoritmus v programovacím prostředí Matlab na principu Radonovy transformace. Ten byl v průběhu vývoje testován na umělých datech, poté na datech z reálné předlohy a ve výsledku na reálných datech naměřených kamerou a za pomoci zařízení vlastní konstrukce.

Komplexní řešení diplomové práce umožnilo koncipovat funkční experimentální přístroj schopný detekce a záznamu bioluminiscenčního signálu v trojrozměrném prostoru a jeho matematickou rekonstrukci do tomografických obrazů. Samotná konstrukce přístroje je v diplomové práci prezentována úspěšně aplikovaným testovacím držákem pro možnosti snímání pod různými úhly a 3D modely návrhů laboratorního přístroje vytvořených na základě získaných poznatků při zpracování problematiky. Přínosem diplomové práce je též vytvořený matematický algoritmus, potřebný k rekonstrukci dat v trojrozměrném prostoru a jehož funkčnost byla ověřena.

Na závěry této diplomové práce je možné navázat v dalším výzkumu, který by zpracované poznatky dále rozvinul. Na základě představených 3D modelů z Autodesk Inventor by bylo možné vyrobit experimentální zařízení, ke kterému pak bude s využitím vyvinutého algoritmu a získaných poznatků vytvořeno komplexní programové prostředí zahrnující všechny potřebné softwarové funkce (akvizice, rekonstrukce, projekce) do jednoho programu s grafickým rozhraním.

## Seznam užitých ilustrací

Obrázek 1 a obrázek 2 - ilustrace zpětné rekonstrukce, zdroj: [19] .....	21
Obrázek 3 - přehled frekvenční charakteristiky dolnoproputných filtrů, zdroj: [20] .....	22
Obrázek 4 - princip Fourierovy transformace, zdroj: [1] .....	23
Obrázek 5 - ilustrace korekce útlumu, zdroj: [20] .....	24
Obrázek 6 - schéma iterační metody .....	25
Obrázek 7 a obrázek 8 - algoritmus metody MLEM (nahore) a OSEM (dole), zdroj: [20] ..	25
Obrázek 9 - princip CCD, zdroj: [6] .....	29
Obrázek 10 - ilustrace principu stereoskopie, zdroj: [22] .....	31
Obrázek 11 - ilustrace laserové triangulace, zdroj: [22] .....	32
Obrázek 12 - princip Time of Flight, zdroj: [24] .....	33
Obrázek 13 - 3D kamera Basler ToF640-20gm 850nm, zdroj: [23] .....	33
Obrázek 14 - princip FMT 4000, zdroj: [32] .....	41
Obrázek 15 - výstup programu Autodesk 123D .....	42
Obrázek 16 - výstup programu Autodesk Memento Beta .....	43
Obrázek 17 - náhled generovaných obrázků P1, P2, P3 .....	47
Obrázek 18 - ilustrace fungování Radonova algoritmu na generovaných datech .....	48
Obrázek 19 - výstup rekonstrukcí na generovaných datech s různým počtem projekcí ....	50
Obrázek 20 - výstup rekonstrukcí z reálné předlohy s různým počtem projekcí .....	51
Obrázek 21 - rekonstruovaný tomografický řez, vrstva 250 .....	52
Obrázek 22 - návrh konstrukce testovacího držáku .....	54
Obrázek 23 - počáteční stav, IVIS Lumina XR, 60 s expozice, černý rám .....	60
Obrázek 24 - výstup kamery při expozici 10 000 000, černý rám .....	61
Obrázek 25 - výstup kamery při expozici 50 000, černý rám .....	61
Obrázek 26 - výstup kamery při expozici 80 000, černý rám .....	62
Obrázek 27 - výstup kamery při expozici 100 000, černý rám .....	62
Obrázek 28 - závěrečný stav, IVIS Lumina XR, 10 s expozice, černý rám .....	63
Obrázek 29 - IVIS Lumina XR, expozice 60s, černý rám .....	66
Obrázek 30 - Basler acA2400, expozice 10 s, černý rám .....	67
Obrázek 31 - Basler acA2440, expozice 10 s .....	67
Obrázek 32 - G2-3200, expozice 10 s, otočeno o 180° .....	67
Obrázek 33 - Basler acA2440 s nastavení GAIN 0%, expozice 10 s .....	68
Obrázek 34 - Basler acA2440 s nastavení GAIN 70%, expozice 10 s .....	68
Obrázek 35 - Basler acA2440 s nastavení GAIN 100%, expozice 10 s .....	68
Obrázek 36 - G2-3200, expozice 40 s .....	69
Obrázek 37 - G2-3200, expozice 40 s, bining XY 4x .....	69
Obrázek 38 - G2-3200, f17, expozice 40 s, korekce temným obrazem .....	70
Obrázek 39 - G2-3200, expozice 40s, dark korekce, stupnice lookup fire .....	70
Obrázek 40 - IVIS Lumina XR, expozice 60 s, černý rám .....	71
Obrázek 41 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám .....	73
Obrázek 42 - G2-3200, expozice 1 s .....	74
Obrázek 43 - G2-3200, expozice 60 s .....	74
Obrázek 44 - G3-3200, expozice 60 s, dark korekce .....	74
Obrázek 45 - kombinace obrazů G2-3200 expozice 1s + expozice 60s dark korekce, lookup fire .....	74
Obrázek 46 - záznam z kamery G2-3200 při testování III.a, obrázky po úpravě .....	75
Obrázek 47 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám .....	76

Obrázek 48 - záznam z kamery G2-3200 při testování III.b, obrázky po úpravě.....	77
Obrázek 49 - kombinace obrazů G2-3200 pod úhlem 0° expozice 1s + expozice 40s dark korekce, lookup fire, průměrovací filtr.....	78
Obrázek 50 - IVIS Lumina XR, expozice 30 s, černý rám.....	79
Obrázek 51 - histogramy upravovaných obrazů .....	82
Obrázek 52 - záznam z testování III.b s artefaktem residual bulk image.....	83
Obrázek 53 - tomografický řez 3 projekční rekonstrukce s ortogonálními projekcemi.....	85
Obrázek 54 - tomografický řez 5 projekční rekonstrukcí s ortogonálními projekcemi.....	86
Obrázek 55 - první MRI rekonstrukce, zdroj: [37].....	87

### **Seznam vložených tabulek**

Tabulka 1 - porovnání CCD a CMOS, zdroj: [2].....	30
Tabulka 2 - technické parametry přístroje IVIS Lumina XR, zdroj: [26][27].....	39
Tabulka 3 a 4 – finanční kalkulace variant s 5 kamerami.....	56
Tabulka 5 - finanční kalkulace varianty s elektrickým posunem .....	58
Tabulka 6 - záznam teplotního měření při Testování II .....	65
Tabulka 7 - záznam teplotních měření při Testování III.....	73
Tabulka 8 - finanční náročnost testování .....	80

## Seznam použité literatury

- [1] BENEŠ, Jiří, Daniel JIRÁK a František VÍTEK. Základy lékařské fyziky. 4. vydání. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015, 325 stran. ISBN 978-80-246-2645-1.
- [2] HOTAŘ, Vlastimil. Úvod do problematiky strojového vidění. Vyd. 1. Liberec: Technická univerzita, 2015, 132 s. ISBN 978-80-7494-156-6.
- [3] GONZALEZ, Rafael C. a Richard E. WOODS. Digital image processing. 3rd ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, c2008. ISBN 0-13-168728-x.
- [4] JAN, Jiří. Medical image processing, reconstruction, and restoration: concepts and methods. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2006. ISBN 9780824758493.
- [5] VLČEK, Vítězslav Vít a Karel SEGETH. Matematika dokonale ukrytá v počítačové tomografii. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie.: Jednota českých matematiků a fyziků. Praha, 2008, 1956-2008(53), 199-210. ISSN 0032-2423.
- [6] Princip CCD kamery. WikiSkripta: projekt sítě lékařských fakult MEFANET [online]. 2014 [vid. 2015-07-05]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Princip\\_CCD\\_kamery](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Princip_CCD_kamery)
- [7] KAČENKA M. et al. Fluorescent magnetic nanoparticles for cell labeling: Flux synthesis of manganite particles and novel functionalization of silica shell. *Journal Colloid Interface Sci.* 2015, Jun 1;447:97-106. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.01.071. Epub 2015 Feb 4. PubMed PMID: 25702866.
- [8] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, et al. Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan polymeric micelles. *Biomacromolecules.* 2014 Nov 10;15(11):4012-20. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1021/bm501065q. Epub 2014 Oct 13. PubMed PMID: 25268047.
- [9] BERKOVA Z. et al. Gadolinium- and manganite-based contrast agents with fluorescent probes for both magnetic resonance and fluorescence imaging of pancreatic islets: a comparative study. *ChemMedChem.* 2013 Apr;8(4):614-21. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1002/cmdc.201200439. Epub 2013 Jan 11. PubMed PMID: 23316021.
- [10] FILIPPOV S. K. et al. Glycogen as a biodegradable construction nanomaterial for in vivo use. *Macromol Biosci.* 2012 Dec;12(12):1731-8. [vid. 2015-05-06]. DOI: 10.1002/mabi.201200294. Epub 2012 Nov 21. PubMed PMID: 23169686.
- [11] NTZIACHRISTOS, Vasilis, Christoph BREMER a Ralph WEISSLEDER. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *European Radiology.* 2002, roč. 2003, č. 13, s. 195-208. [vid. 2015-04-01]. ISSN 0938-7994. DOI: 10.1007/s00330-002-1524-x.
- [12] SHCHERBAKOVA D. M. a V. V. VERKHUSHA. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature Methods.* 2013-6-16, č. 10, 8 vydání, s. 751-754. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.2521. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2521>
- [13] PATTERSON, Aileen P., Stephanie A. BOOTH a Reuben SABA. The Emerging Use of In Vivo Optical Imaging in the Study of Neurodegenerative Diseases. *BioMed Research International.* 2014, č. 2014, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 2314-6133. DOI: 10.1155/2014/401306. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/401306/>
- [14] KOLITZ-DOMB, Michal, et al. Engineering of near infrared fluorescent proteinoid-poly(L-lactic acid) particles for in vivo colon cancer detection. *Journal of Nanobiotechnology.* 2014, č. 12, vydání 1, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1477-3155.

- DOI: 10.1186/s12951-014-0030-z. Dostupné z:  
<http://www.jnanobiotechnology.com/content/12/1/30>
- [15] COHEN, Sarit a Shlomo MARGEL. Engineering of near IR fluorescent albumin nanoparticles for in vivo detection of coloncancer. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012, č. 10, vydání 1, s. 1-14. [vid. 2015-04-01]. ISSN 1477-3155. DOI: 10.1186/1477-3155-10-36. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/36>
- [16] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, et al. Selective In Vitro Anticancer Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Loaded in Hyaluronan Polymeric Micelles. *Biomacromolecules*. 2014-11-10, č. 15, vydání 11, s. 4012-4020. [vid. 2015-04-08]. ISSN 2014-11-10. DOI: 10.1021/bm501065q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm501065q>
- [17] Luminiscence. Jan Durspek's Website: Physics of Living Systems [online]. 2016 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <https://www.jandur.cz/optics/luminiscence/lu5.htm>
- [18] X3 TECHNOLOGY: DIRECT IMAGE SENSORS [online]. Foveon, 2010 [cit. 2016-11-02]. Dostupné z: <http://www.foveon.com/article.php?a=67>
- [19] Zpětná projekce. SPECT: jednofotonová emisní tomografie [online]. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2009 [cit. 2015-07-16]. Dostupné z: <http://www.pet-spect.fbmi.cvut.cz/spect/index.php/zpetna-projekce-s-filtraci.html>
- [20] Filtrovaná zpětná projekce. SPECT: jednofotonová emisní tomografie [online]. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2009 [cit. 2015-07-16]. Dostupné z: <http://www.pet-spect.fbmi.cvut.cz/spect/index.php/filtrovana-zpetna-projekce.html>
- [21] Iterativní rekonstrukce. SPECT: jednofotonová emisní tomografie [online]. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2009 [cit. 2015-07-16]. Dostupné z: <http://www.pet-spect.fbmi.cvut.cz/spect/index.php/iterativni-rekonstrukce.html>
- [22] Science Behind 3D Vision. Depth Biomechanics: Centre for Sports Engineering Research [online]. Sheffield: Sheffield Hallam University, 2015 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.depthbiomechanics.co.uk/?p=102>
- [23] Basler Time-of-Flight Camera: Cut System Costs with 3D Technology [online]. Ahrensburg: Basler, 2016 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.baslerweb.com/en/products/cameras/3d-cameras/time-of-flight-camera>
- [24] ToF 3D Range Camera [online]. Meerecompany, 2012 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: [http://www.meerecompany.com/en/product/tof\\_01.asp](http://www.meerecompany.com/en/product/tof_01.asp)
- [25] Fenomén hloubky ostrosti [online]. Praha: Ing. Roman Pihan, 2013 [cit. 2016-11-04]. Dostupné z: [http://www.fotoroman.cz/tech1/focus\\_dof.htm](http://www.fotoroman.cz/tech1/focus_dof.htm)
- [26] IVIS Lumina XR, Bioluminiscenční, Fluorescenční a RTG snímací zařízení, Návod k použití, Caliper Life Sciences, Inc., říjen 2009
- [27] IVIS Lumina XR Brochure, High Resolution Digital X-Ray Bioluminescence & Fluorescence Spectral Unmixing Living Image Software, Caliper Life Sciences, Inc., anglicky, Sep 2009
- [28] In Vivo Imaging Agents, Obtain more information from your target, PerkinElmer: For the Better Inc., anglicky, 2010
- [29] IVIS Spectrum In Vivo Imaging System. PerkinElmer: For the Better [online]. Waltham, 2016 [cit. 2016-11-02]. Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/product/ivis-instrument-spectrum-120v-andor-c-124262>

- [30] IVIS SpectrumBL High-Throughput In Vivo Optical Imaging System. PerkinElmer: For the Better [online]. Waltham, 2016 [cit. 2016-11-02]. Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/product/ivis-instrument-spectrum-bl-120v-cls137325>
- [31] IVIS SpectrumCT In Vivo Imaging System. PerkinElmer: For the Better [online]. Waltham, 2016 [cit. 2016-11-02]. Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/product/ivis-instrument-spectrum-ct-120v-128201>
- [32] FMT 4000 In Vivo Imaging System. PerkinElmer: For the Better [online]. Waltham, 2016 [cit. 2016-11-02]. Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/product/fmt-4-channel-fmt4000>
- [33] Radon: Radon transform. MathWorks: Documentation [online]. Natick, 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/radon.html>
- [34] Iradon: Inverse Radon transform. MathWorks: Documentation [online]. Natick, 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/iradon.html>
- [35] Mat2gray: Convert matrix to grayscale image. MathWorks: Documentation [online]. Natick, 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/mat2gray.html>
- [36] Uint8: Convert to 8-bit unsigned integer. MathWorks: Documentation [online]. Natick, 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/uint8.html>
- [37] Invention of MR Imaging: Who invented MR imaging? [online]. Winston-Salem: ELSTER, 2017 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://mri-q.com/who-invented-mri.html>
- [38] 12.1.7 Medicínské technologie: magnetická rezonance (MRI) a Výpočetní tomografie (CT). Regionální zpravodajství NZIS: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2016 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <http://reporting.uzis.cz/cr/index.php?pg=statisticke-vystupy--dostupnost-pece--indikatory-dostupnosti-pece--medicinske-technologie-magneticka-rezonance-mri-a-vypocetni-tomografie-ct>
- [39] Residual Bulk Image [online]. Zlín: Moravské přístroje, 2013 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.gxccd.com/art?id=418&cat=52&lang=405>

## Přílohy

### Přiložené DVD

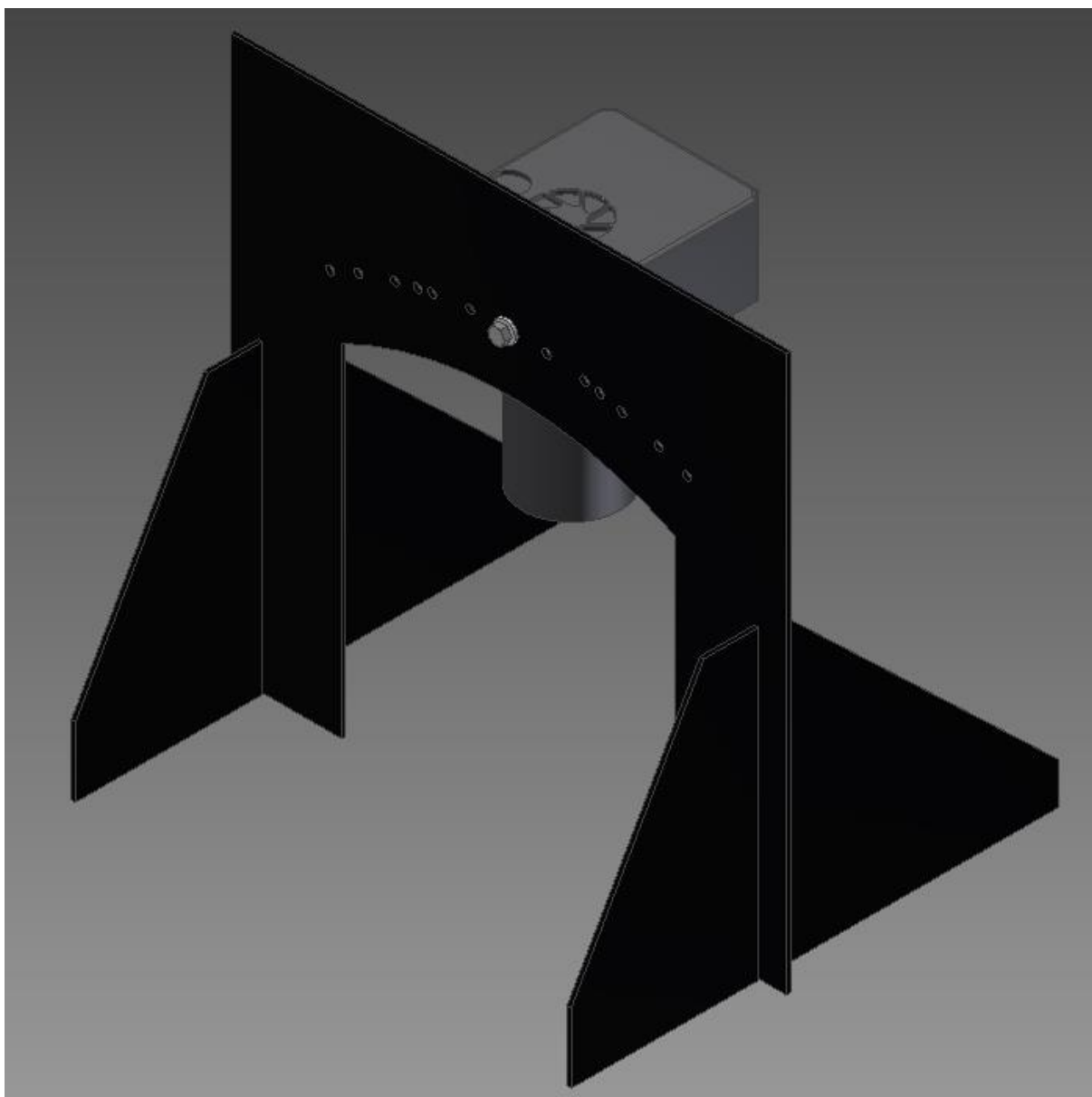
- \_diplomová\_práce\_2017\_Jakub\_Štoček.pdf
- Soubory Matlab (44 položek)
- Soubory aplikace Autodesk Inventor (134 položek)
- Naměřená originální data (474 položek)

### Seznam obrázkových příloh

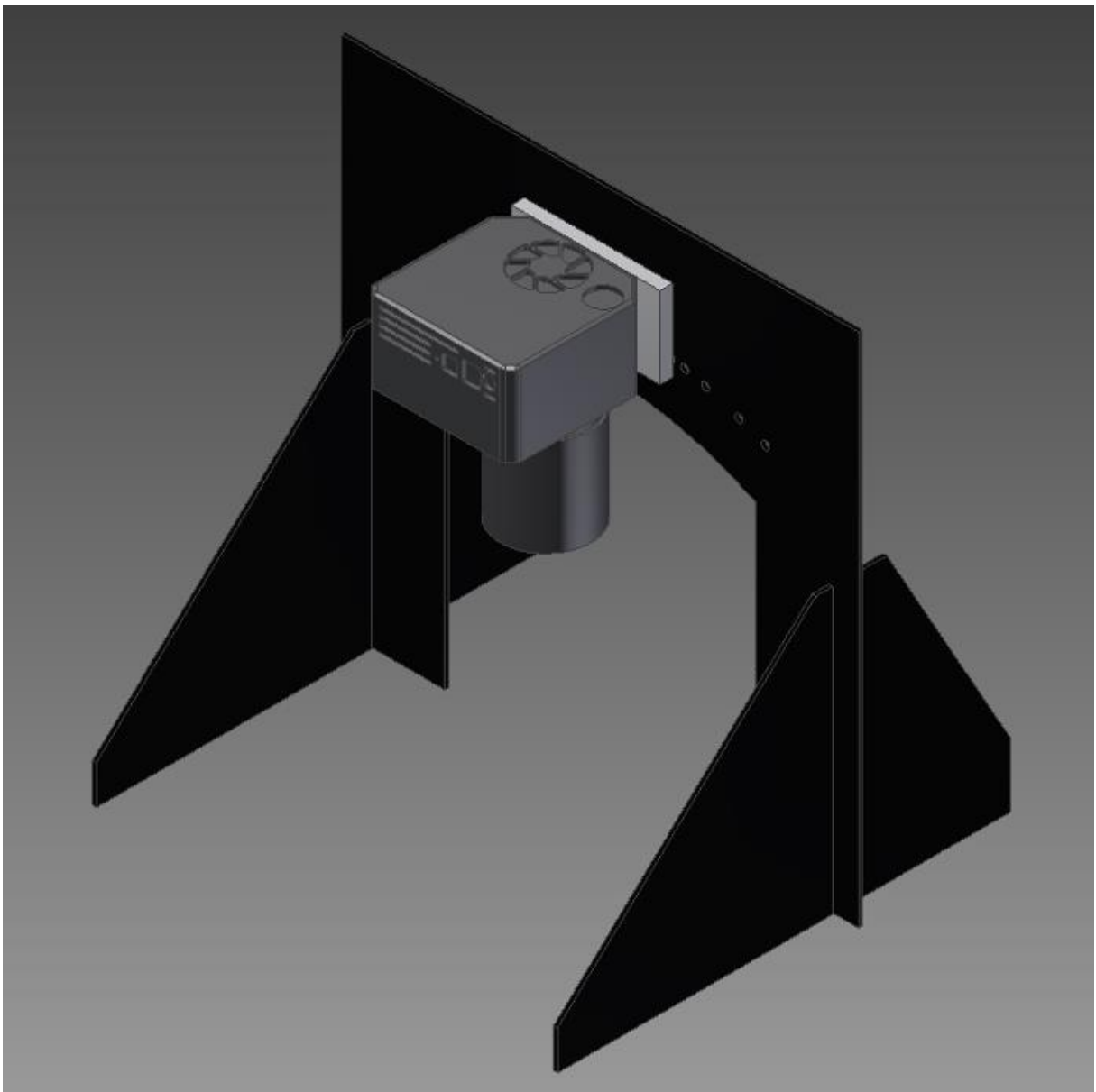
Příloha 1 - 3D model testovacího držáku, pohled pravý horní.....	95
Příloha 2 - 3D model testovacího držáku, pohled levý zadní.....	96
Příloha 3 - výkres testovacího držáku .....	97
Příloha 4 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled pravý horní.....	98
Příloha 5 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled zepředu.....	98
Příloha 6 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled shora.....	99
Příloha 7 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled detail.....	99
Příloha 8 - výkres varianty jedné kamery pod různými úhly.....	100
Příloha 9 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled pravý horní.....	101
Příloha 10 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled zepředu.....	101
Příloha 11 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled shora.....	102
Příloha 12 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled detail.....	102
Příloha 13 - výkres varianty s elektrickým posunem.....	103
Příloha 14 - IVIS Lumina XR se subjektem.....	104
Příloha 15 - IVIS Lumina XR použita jako černý box pro kameru.....	105
Příloha 16 - kamera s objektem.....	105
Příloha 17 - úvodní umístění kamer.....	106
Příloha 18 - Basler acA2400 před testem, expozice 1 ms.....	107
Příloha 19 - Basler acA2440 před testem, expozice 1 ms.....	107
Příloha 20 - G2-3200 před testem, expozice 0,1 s, otočen o 180°.....	108
Příloha 21 - nová pozice kamery G2-3200 pro další testování.....	109
Příloha 22 - fotografie upevnění kamery G2-3200 na tripodu uvnitř blackboxu.....	110
Příloha 23 - sestavený držák kamery G2-3200.....	111
Příloha 24 - držák s kamerou G2-3200 v pozici pro úhel 24° se subjektem 1.....	112
Příloha 25 - držák s kamerou G2-3200 v pozici pro úhel -20° se subjektem 2.....	113
Příloha 26 - Zápůjční protokol č. 20161222001, firma ATEsystem Jablonec, s.r.o.....	114
Příloha 27 - Zápůjčka č. ZAP-17002, firma Moravské přístroje, a.s.....	114



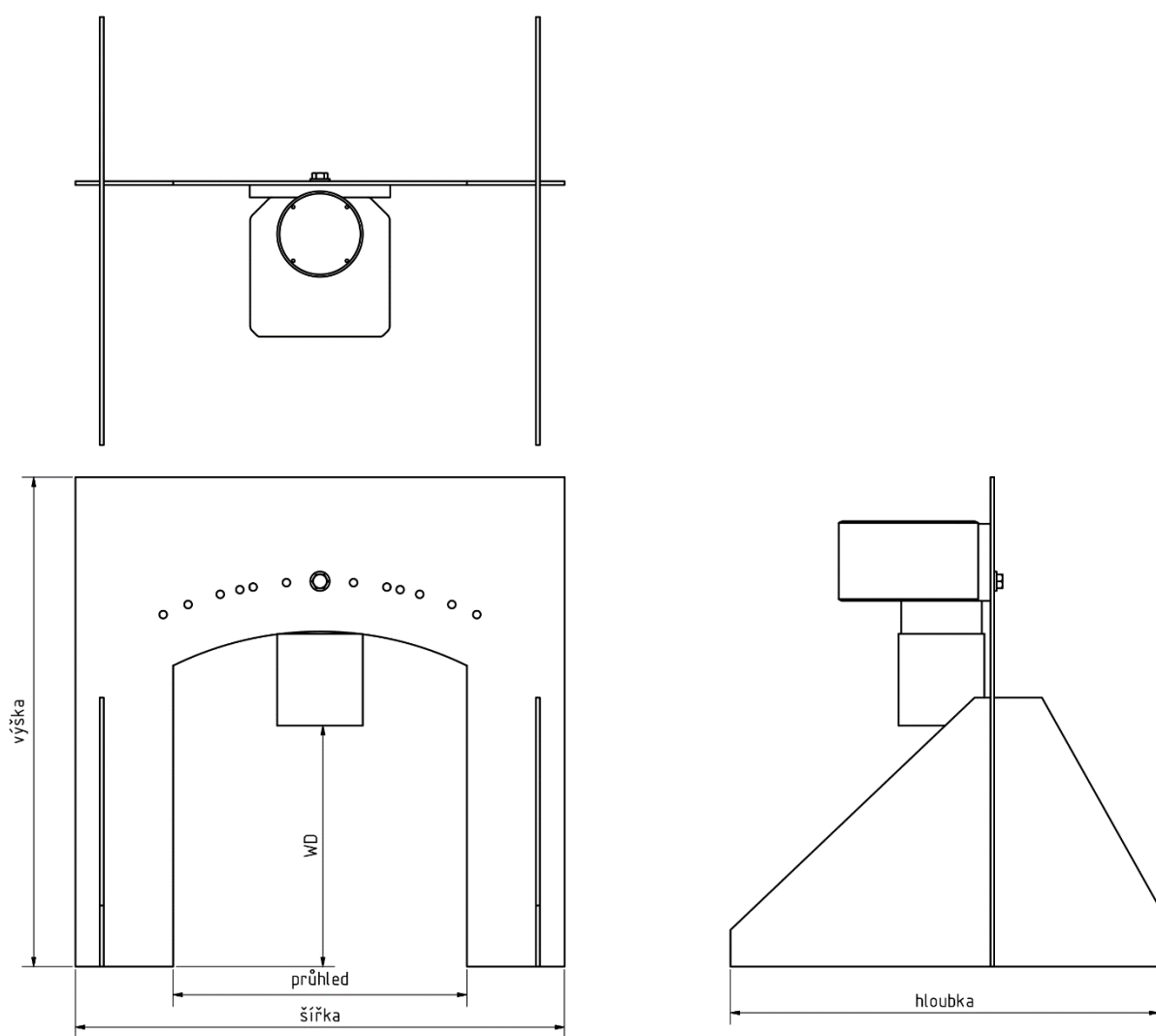
## Obrázkové přílohy



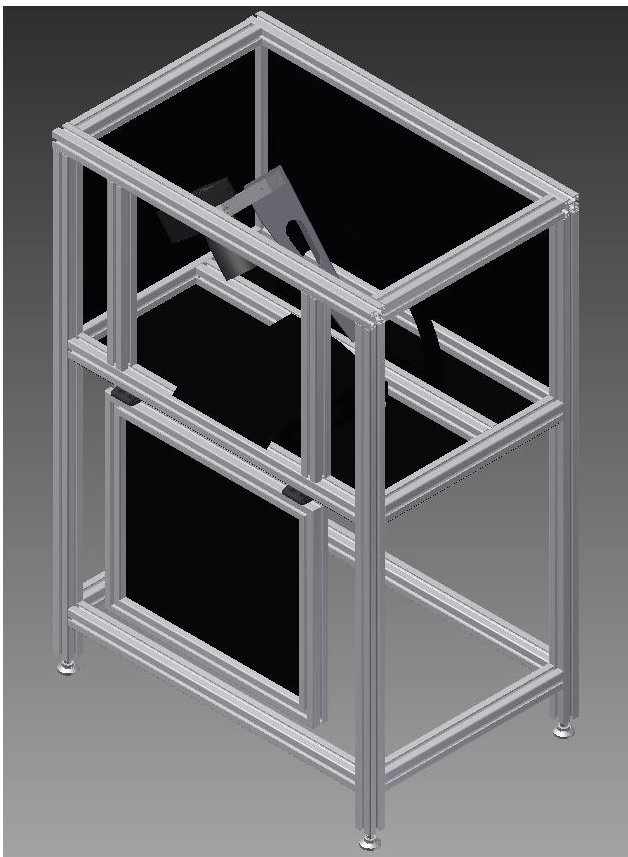
Příloha 1 - 3D model testovacího držáku, pohled pravý horní



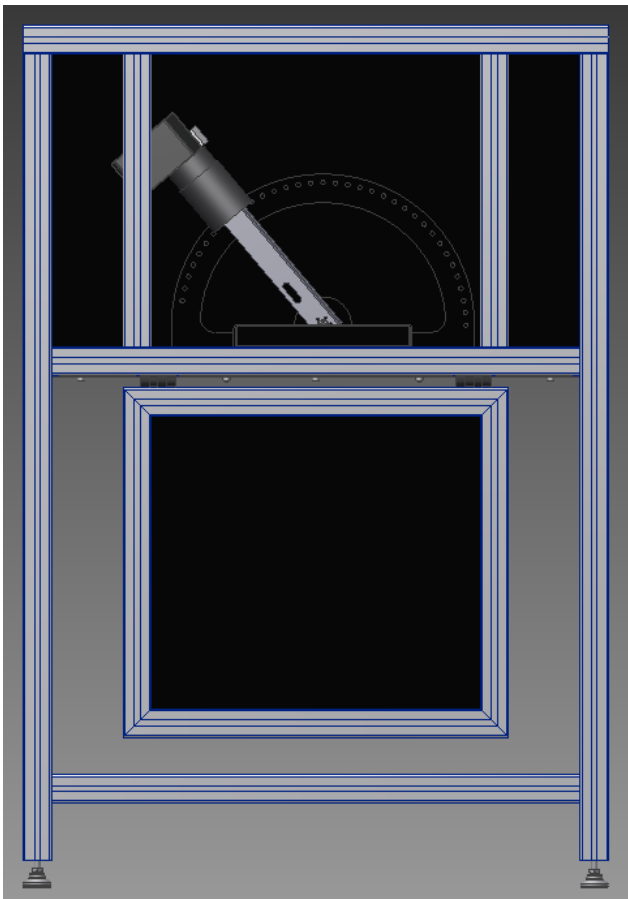
Příloha 2 - 3D model testovacího držáku, pohled levý zadní



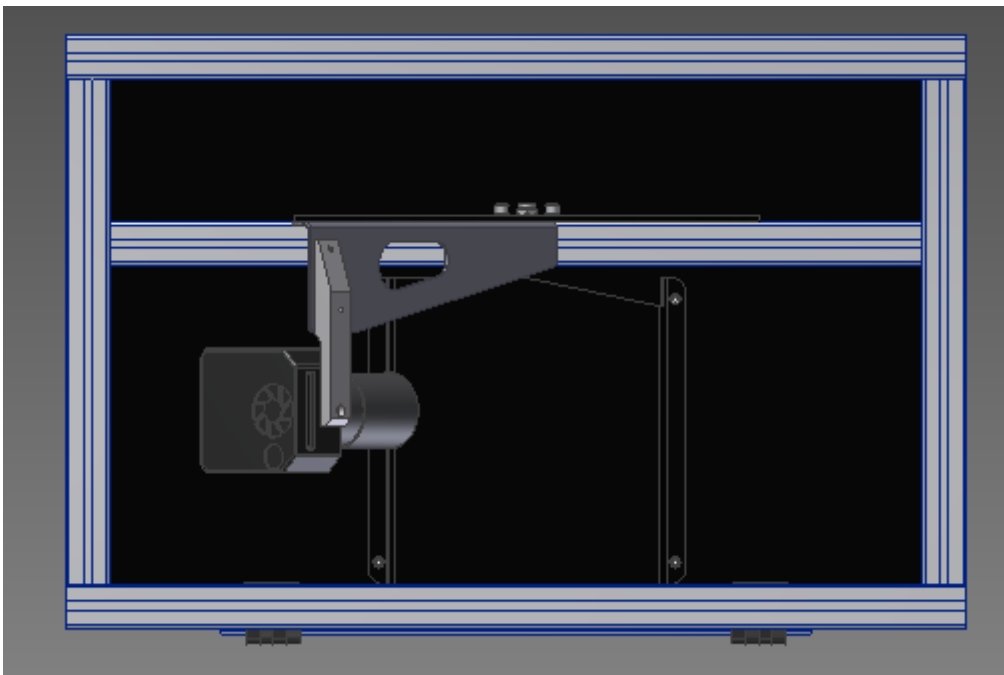
Příloha 3 - výkres testovacího držáku



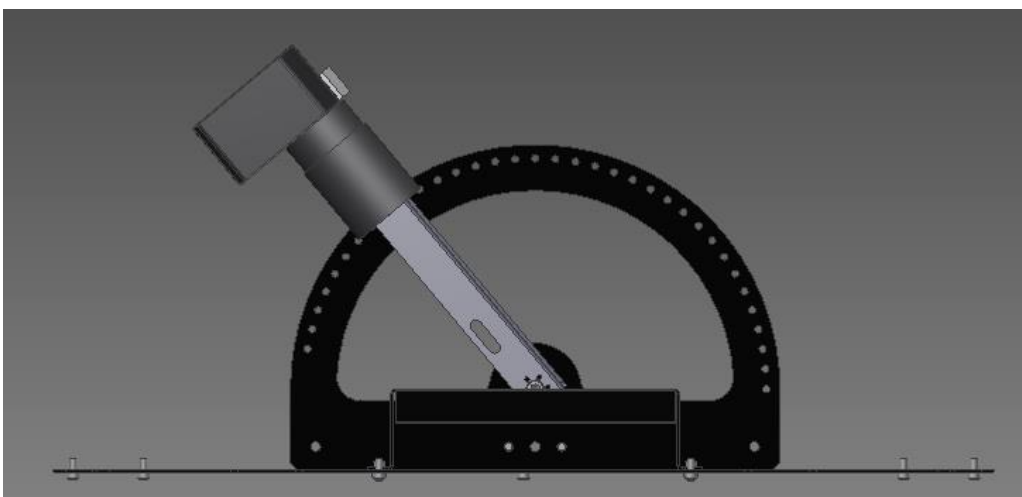
Příloha 4 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled pravý horní



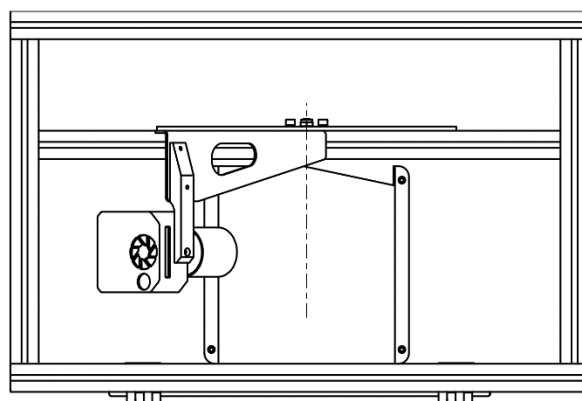
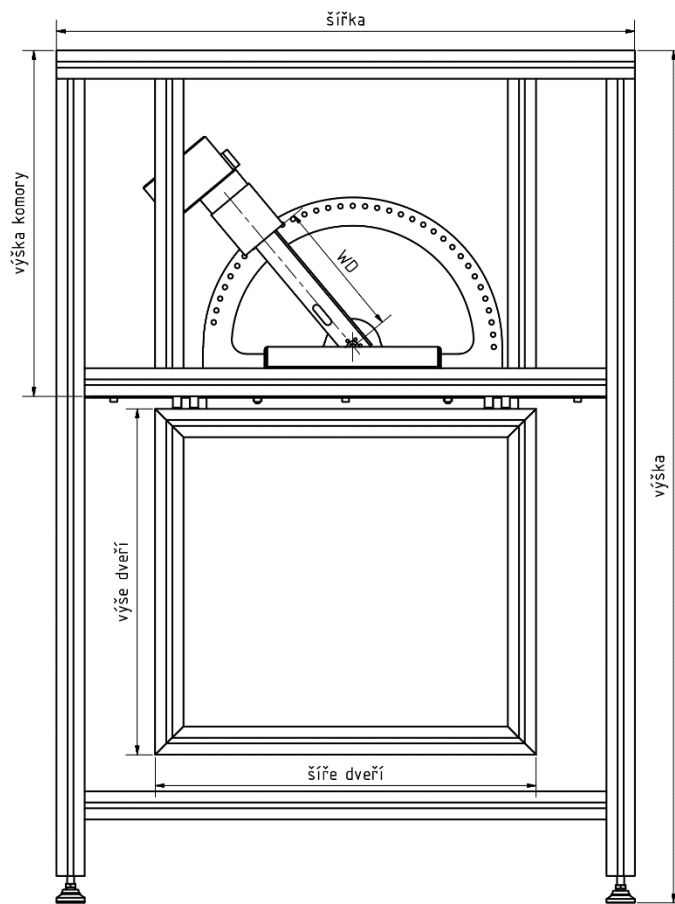
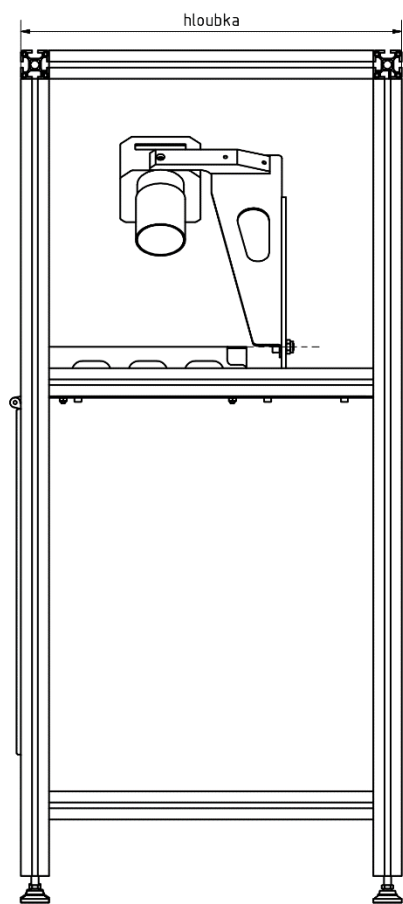
Příloha 5 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled zepředu



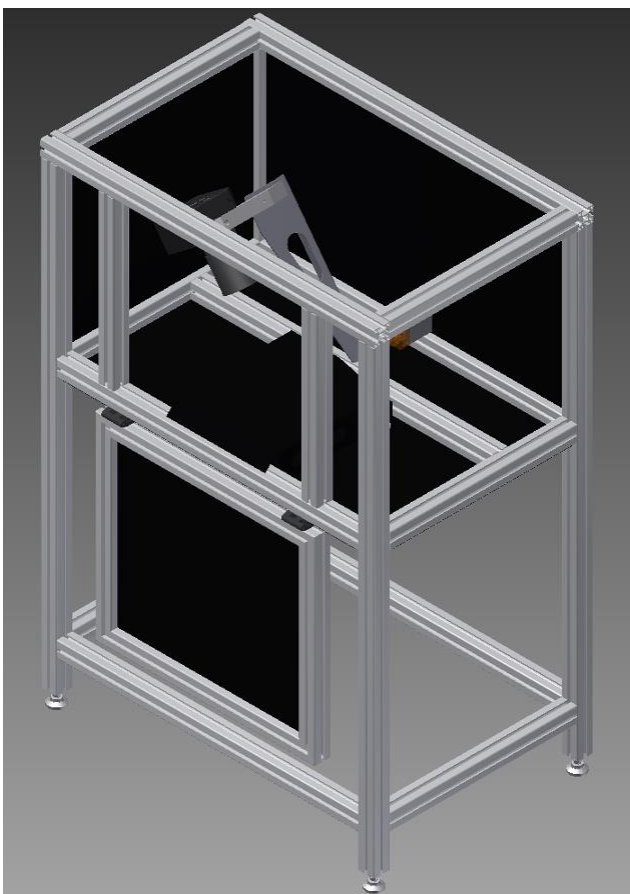
Příloha 6 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled shora



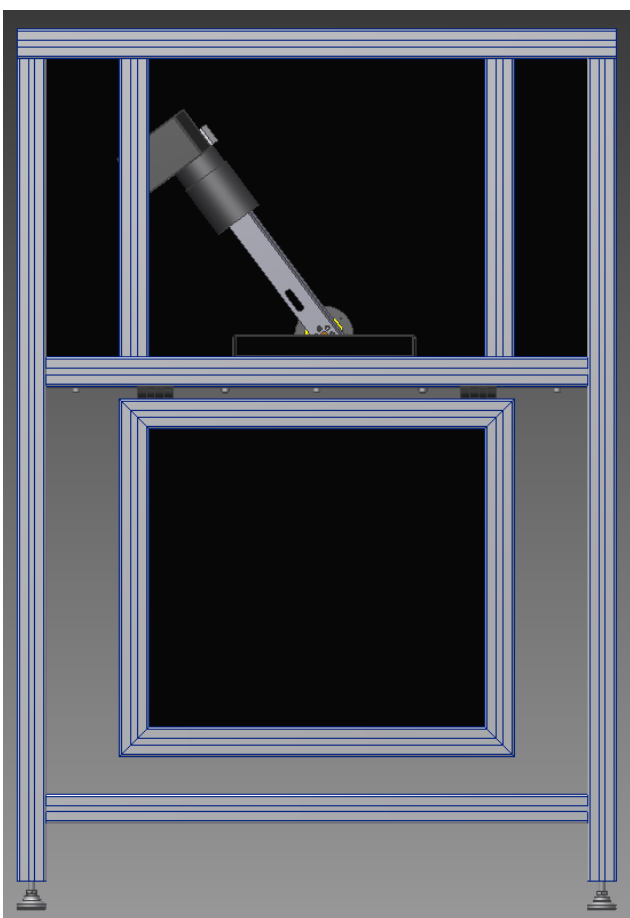
Příloha 7 - 3D model varianty s jednou kamerou, pohled detail



Příloha 8 - výkres varianty jedné komory pod různými úhly

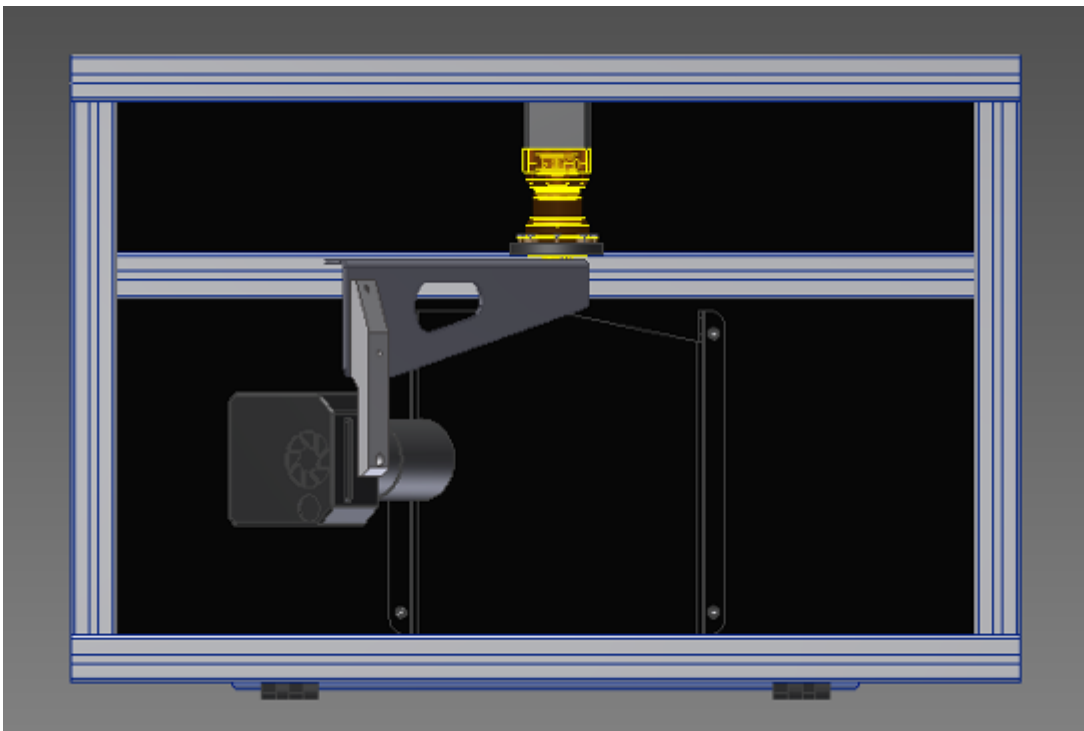


Příloha 9 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled pravý horní

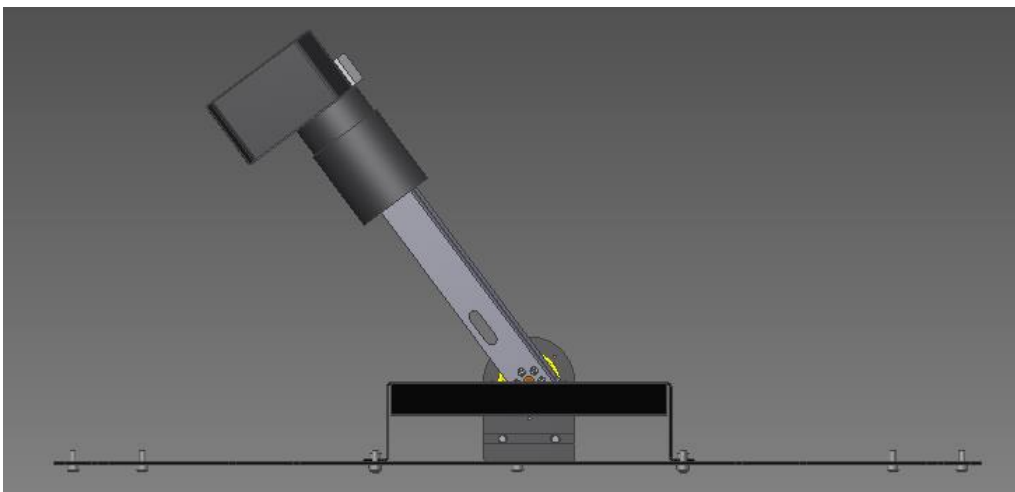


Příloha 10 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled zepředu

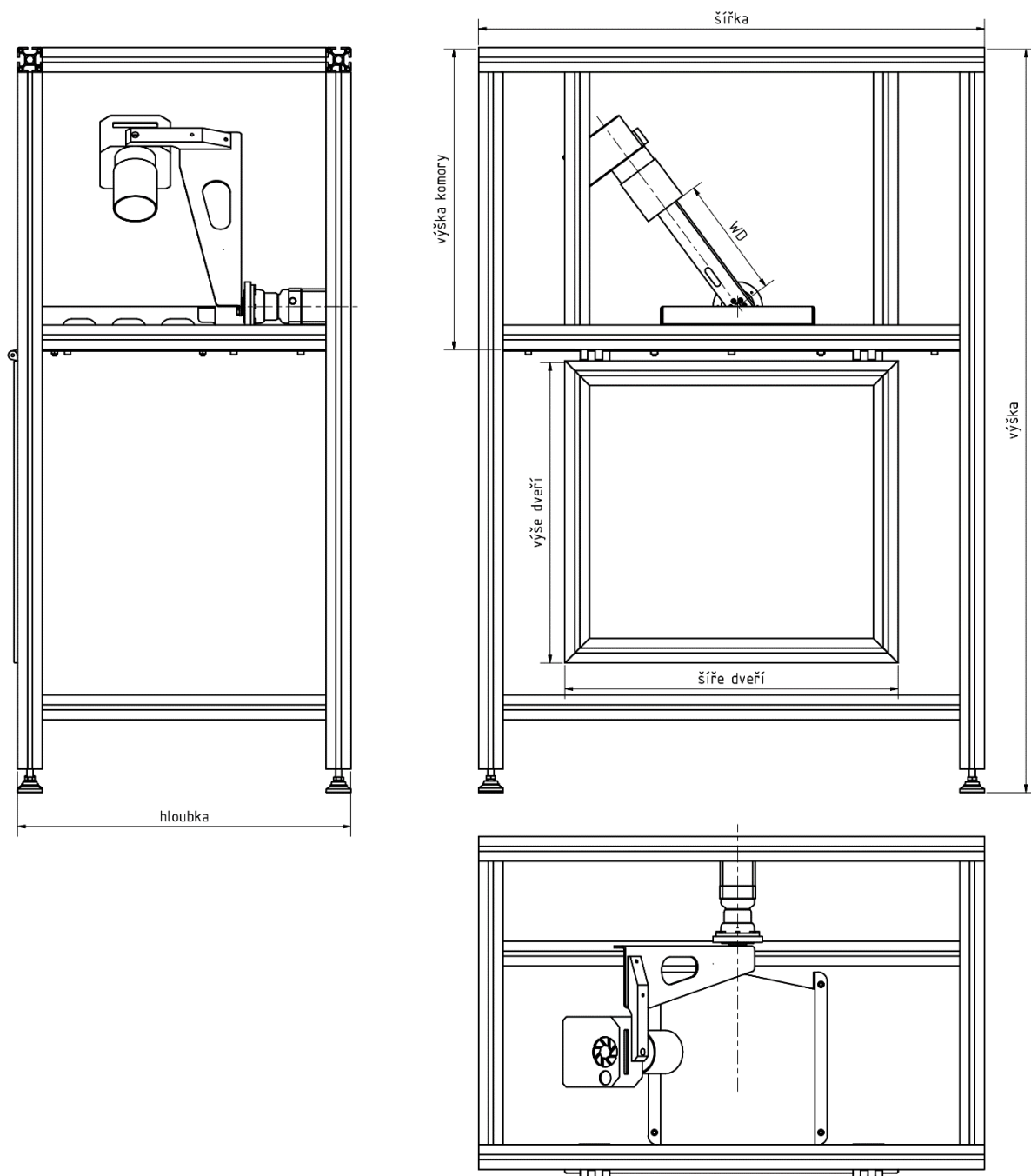




Příloha 11 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled shora



Příloha 12 - 3D model varianty s elektrickým posunem, pohled detail



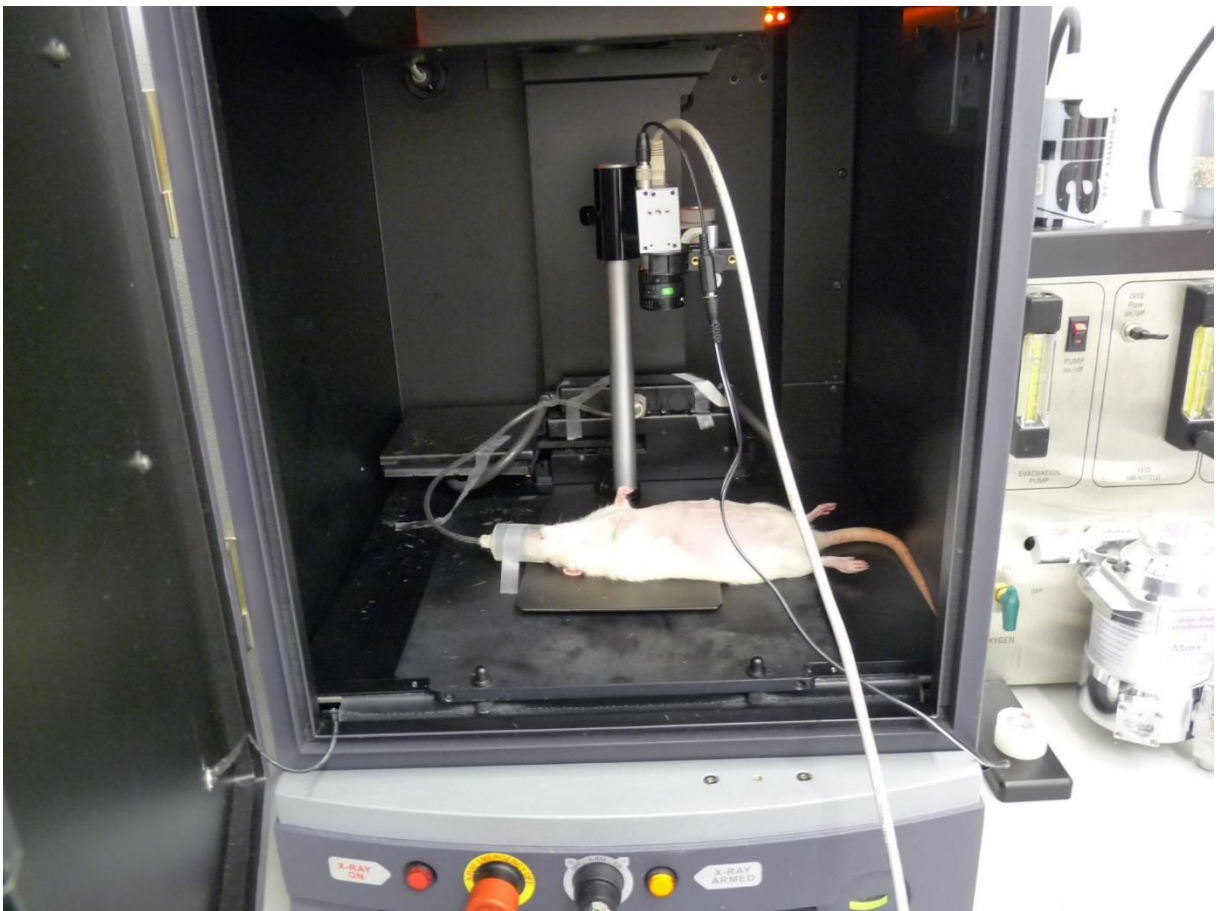
Příloha 13 - výkres varianty s elektrickým posunem



Příloha 14 - IVIS Lumina XR se subjektem

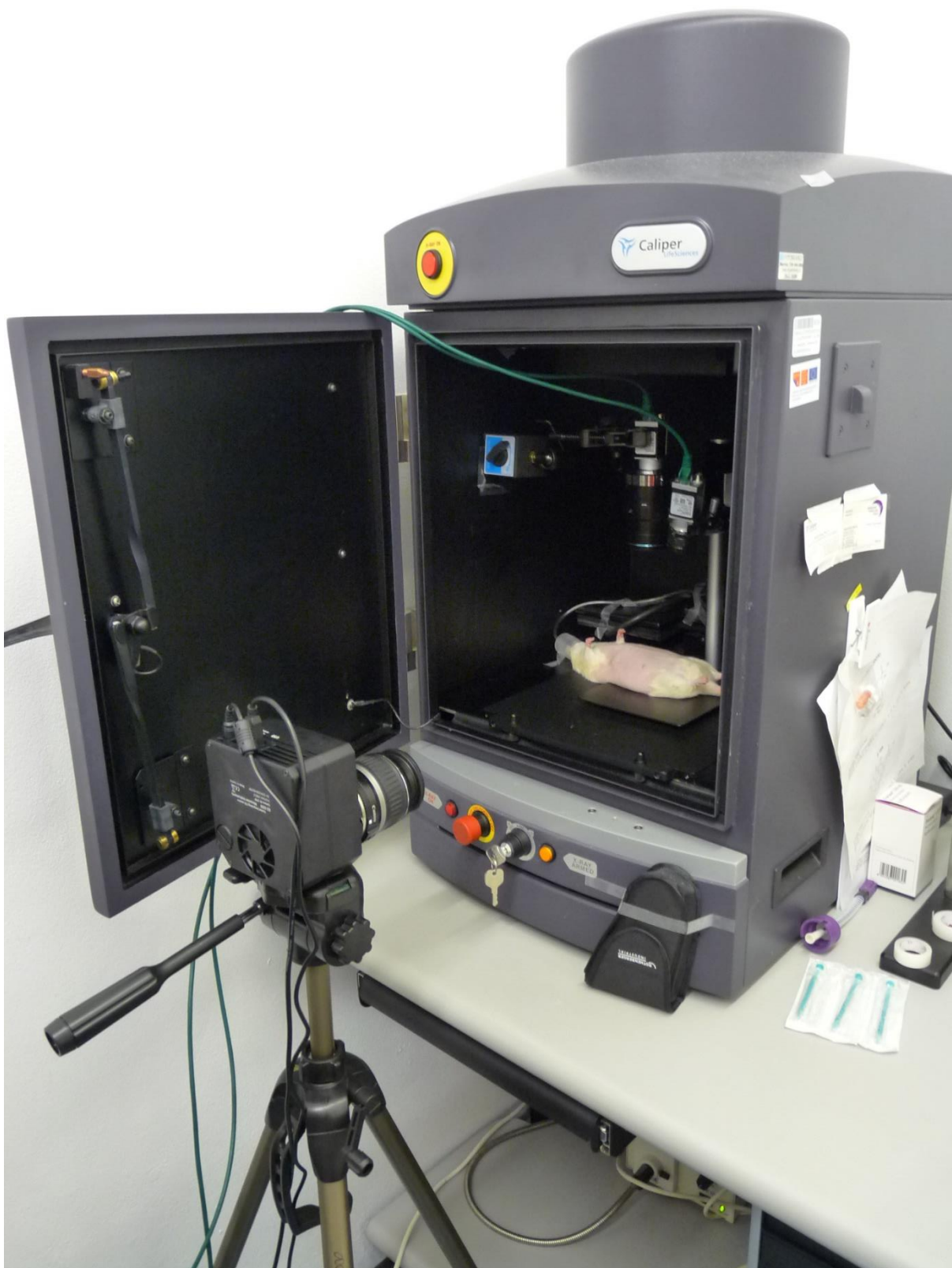


Příloha 15 - IVIS Lumina XR použita jako černý box pro kameru

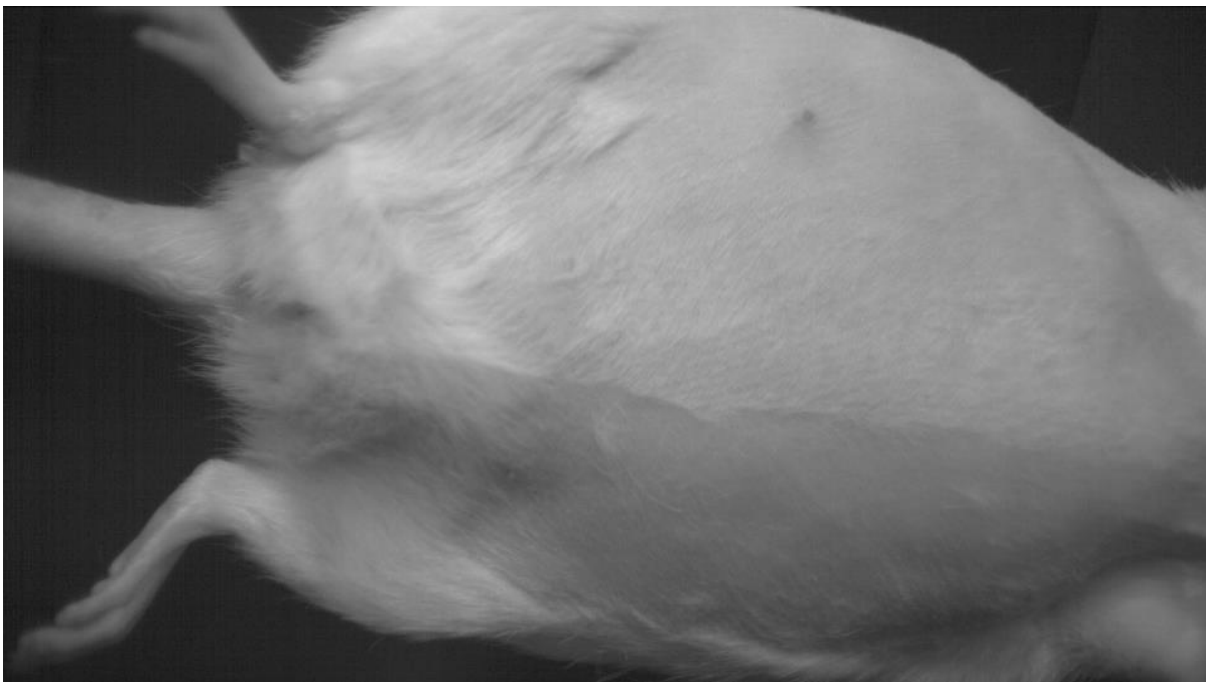


Příloha 16 - kamera s objektem





Příloha 17 - úvodní umístění kamer



Příloha 18 - Basler acA2400 před testem, expozice 1 ms



Příloha 19 - Basler acA2440 před testem, expozice 1 ms

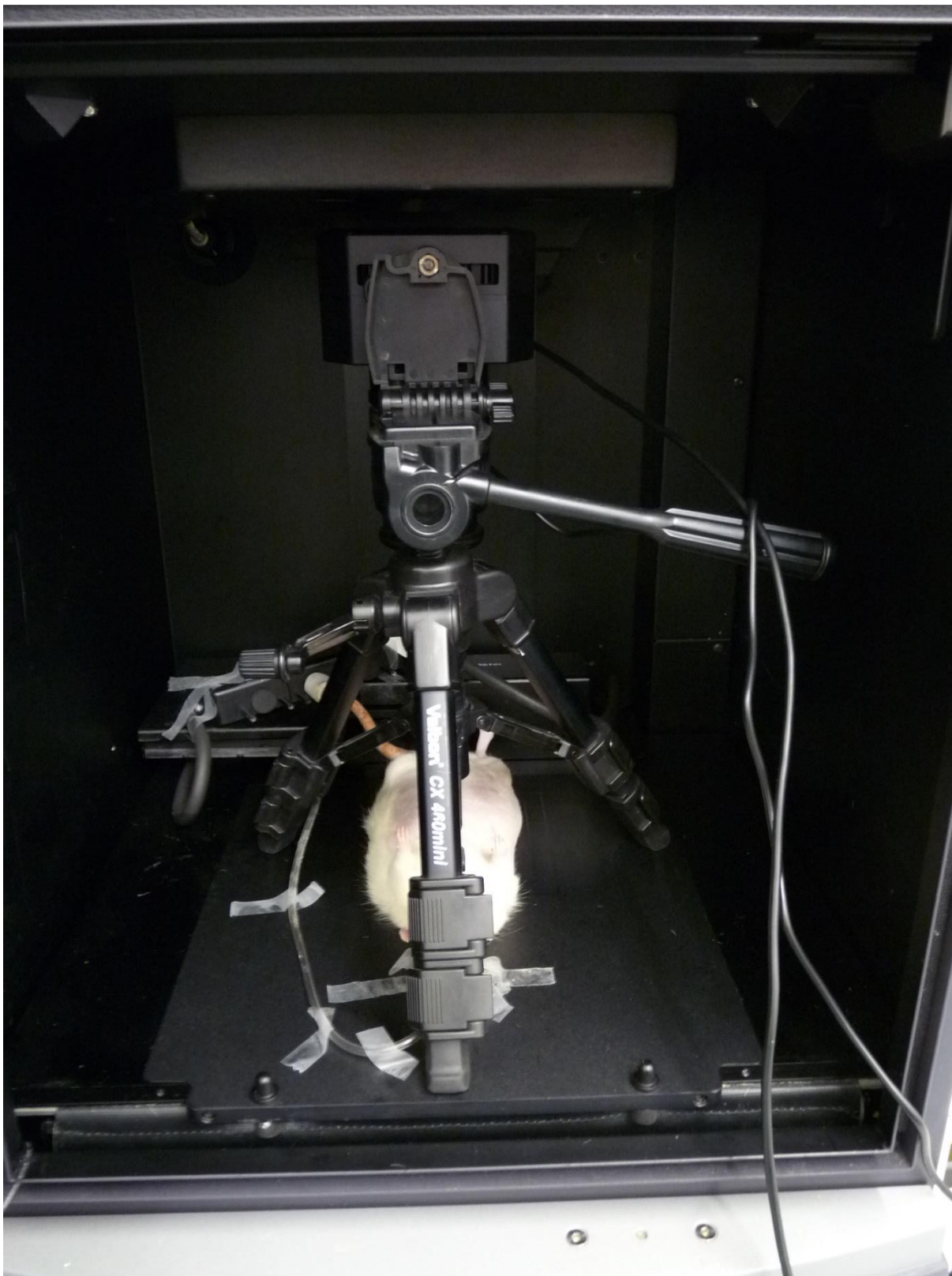


Příloha 20 - G2-3200 před testem, expozice 0,1 s, otočen o 180°





Příloha 21 - nová pozice kamery G2-3200 pro další testování

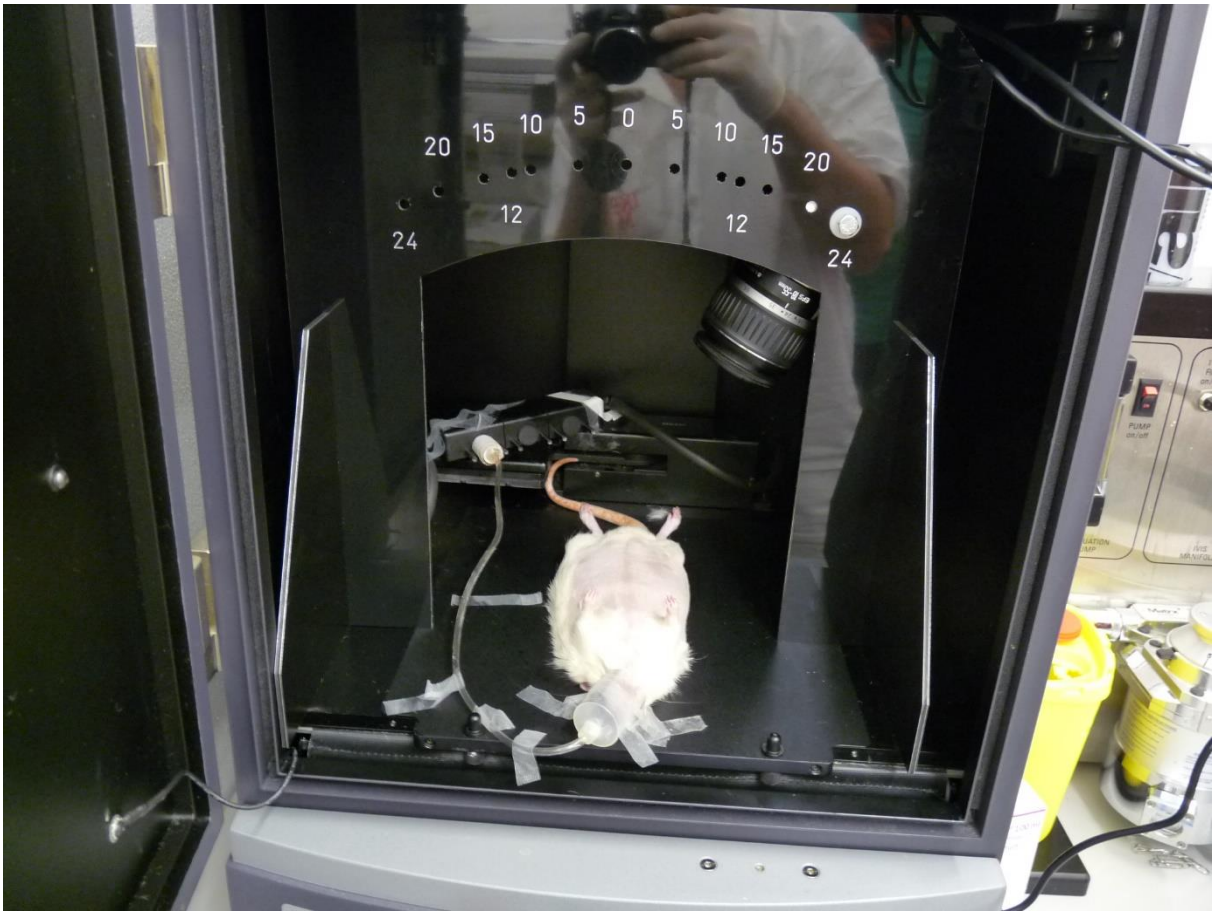


Příloha 22 - fotografie upevnění kamery G2-3200 na tripodu uvnitř blackboxu



Příloha 23 - sestavený držák kamery G2-3200





Příloha 24 - držák s kamerou G2-3200 v pozici pro úhel 24° se subjektem 1



Příloha 25 - držák s kamerou G2-3200 v pozici pro úhel  $-20^{\circ}$  se subjektem 2

## **Dokumenty**

Příloha 26 - Zápůjční protokol č. 20161222001, firma ATEsystem Jablonec, s.r.o

Příloha 27 - Zápůjčka č. ZAP-17002, firma Moravské přístroje, a.s.



<b>Předávající:</b> <b>ATEsystem Jablonec s.r.o.</b> Jiráskova 4898/9 466 01 Jablonec nad Nisou tel.: +420 723 142 262 e-mail: <a href="mailto:atesystem-jablonec@atesystem.cz">atesystem-jablonec@atesystem.cz</a>	<b>Přebírající:</b> Bc. Jakub Štoček Donská 945 463 11 Liberec 30  Tel: 722 012 013
--	--

<b>Kontaktní osoba:</b> Martin Rolf tel: +420 721 649 604 e-mail: <a href="mailto:martin.rolf@atesystem.cz">martin.rolf@atesystem.cz</a>	<b>Kontaktní osoba:</b>
---	-------------------------

<b>Identifikační číslo zakázky:</b>	<b>Datum zapůjčení: 22.12.2016</b>
	<b>Datum dohodnutého vrácení:</b>

**Poznámky:**

- 1) Přebírající nese od okamžiku převzetí zboží za toto zboží plnou hmotnou zodpovědnost.
- 2) V případě, že přebírající nevrátí zboží v dohodnutém termínu a nebude s předávajícím tuto skutečnost konzultovat, bude přebírajícímu fakturována zde uvedená cena zboží.

**Předmět zápujčky:**

**Předmět zápujčky**

**Přebírající potvrzuje převzetí následujícího zboží:**

Č.	Ident. kód	Název položky a počet kusů	Cena
1	VXBA00333	1 x acA2000-50gmNIR	0
2		1 x Zdroj a redukce k napájení kamery	0
3		1 x Objektiv Computar 12mm	0
4		1 x Stojánek Noga malá (ATEsystem s.r.o.)	0
5		1x Síťový kabel	
6			
7			
8			
9			
10			

<b>Předává:</b>  <b>Podpis:</b>  	<b>Přebírá:</b>  <b>Podpis:</b> 
---	---





**Moravské přístroje a.s.**

Masarykova 1148, Malenovice  
76302 Zlín

IČ : 13691295

DIČ : CZ13691295

Obchodní rejstřík vedený u Krajského  
obchodního soudu Brno - oddíl B, vložka 298

Tel.: +420 (042) 577 107 171

Fax: +420 (042) 577 107 171

Bankovní účet : 1466291/0300  
Československá obchodní banka, a.s.

## Zápůjčka č. ZAP-17002

**Datum vystavení:** 06.02.2017  
**Datum platnosti od:** 06.02.2017  
**Datum platnosti do:** 06.03.2017  
**Datum vyřízení:**

**Experientio s.r.o.**

1. máje 97/25  
46007 Liberec (nečleněné město)  
Česká republika

**Vyřizuje :** Ivana Sýkorová, ivana@mii.cz

IČ : 22802100 DIČ : CZ22802100

Zapůjčené zboží je plně funkční a bez závad.

Příjemce se zavazuje, že :

- zapůjčené zboží bude v termínu vráceno v nepoškozeném stavu,
- v případě poškození zboží uhradí odpovídající hodnotu, nebo v případě nevrácení zboží uhradí plnou hodnotu zboží

O prodloužení zápůjčky lze požádat písemně e-mailem na adrese ivana@mii.cz - vyřizuje Ivana Sýkorová. Předpokládaná doba zápůjčky maximálně do 30.4.2017.

Označení dodávky	Katalog	Počet MJ	Cena za MJ	Sazba	Základ	Celkem s DPH
Kamera CCD G2-3200 s čipem KAF-3200ME Monochromní CCD 2184x1472 bodů, adaptér, napájecí kabel a zdroj, USB kabel 5m Sériové číslo: G2KF3200-002787	G2-3200	1,00 ks	110 610,00	21%	110 610,00	133 838,10 Kč
Adaptér pro objektivy Canon EOS + dlouhý mezikroužek Pro kameru bez filtrového kola	TA-EOS-N	1,00 ks	2 670,00	21%	2 670,00	3 230,70 Kč

**Hodnota zápůjčky celkem (vč. DPH) : 137 068,80 Kč**

Ing. Petr Štoček  
jednatel/CEO

Převzal, a podmínkami zápůjčky souhlasí :

**EXPERIENTIO, s.r.o.**

1. máje 97/25  
460 07 Liberec 3  
IČ: 22802100, DIČ: CZ22802100

VRAĆENO BEZ KONTROLY; KOMPLETNÍ SEJHAVA

12.6.2017 IVANA SÝKOROVÁ

Sejhorová



**Moravské přístroje a.s.**  
Masarykova 1148  
763 02 ZLÍN-Malenovice  
DIČ: CZ13691295

www.mii.cz • info@mii.cz • 577107171

Vystavil: Ivana Sýkorová

<http://www.mii.cz>

Vytiskl(a): Ivana Sýkorová