Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

Metody zlepšení kontrastu pro vizualizaci měkkých tkání v mikrotomografii

Diplomová práce

Autor práce: MUDr. Bc. Jindřiška Martínková

Obor studia: Zájmové chovy

Vedoucí práce: Ing. Miloslav Petrtýl, PhD.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Metody zlepšení kontrastu pro vizualizaci měkkých tkání v mikrotomografii" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.4.2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miloslavu Petrtýlovi, PhD. za ochotu, vstřícný a trpělivý přístup při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům, lékařskému a sesterskému týmu Kliniky pneumologie Fakultní nemocnice Bulovka za podmínky, které mi v těžké době pandemie Covid- 19 vytvořili, aby tato práce mohla vůbec vzniknout.

Metody zlepšení kontrastu pro vizualizaci měkkých tkání v mikrotomografii

Souhrn

Studium anatomie živočichů bylo zpočátku doménou světelné mikroskopie a tvorby histologických preparátů. Příprava těchto vzorků byla velmi časově náročná a vedla vždy k trvalé destrukci tkáně. V průběhu druhé poloviny 20. století se začala rozvíjet oblast neinvazivních zobrazovacích metod. Na podkladě rentgenového záření vznikla výpočetní tomografie. Ta byla zpočátku určena především pro oblast humánní medicíny. S postupem času začala být tato metoda hojně využívána i v biologii.

Mikrotomografie je metoda, která z výpočetní tomografie vychází, ale disponuje podstatně větším rozlišením až na úrovni mikrometrů. Technologie postavené na principu rentgenového záření dosahují výborných výsledků při vizualizaci mineralizovaných tkání obratlovců a chitinu u členovců. Ovšem měkké tkáně s nižší relativní hustotou absorbují rentgenové záření podstatně méně, a proto je jejich výsledné zobrazení výrazně horší. Pro zvýšení kontrastu a tím zlepšení vizualizace měkkých tkání se používají kontrastní látky s obsahem těžkých kovů. Nejčastěji se jedná o kontrastní činidla na bázi jódu (I2) a kyselinu fosfowolframovou (PTA).

V naší studii jsme se zaměřili na možnosti využití těchto barvících látek ke zlepšení zobrazení tkání u vodních živočichů. Vybrali jsme 8 preparátů ze sbírky Katedry zoologie a rybářství ČZU. Jednalo se o 5 rybovitých obratlovců, 2 zástupce korýšů a jeden druh měkkýše. Vzhledem k menším rozměrům exemplářů byly použity roztoky o nízkých koncentracích (1% a 0,3%). Preparáty byly barveny různě dlouhou dobu (6 h až 30 dnů). Zaměřili jsme se též na volbu vhodného způsobu fixace během skenování, aby nedocházelo k nežádoucím pohybům vzorků.

Následně jsme vyhodnocovali finální kvalitu skenů v závislosti na délce barvení, použité kontrastní látce a nastavení parametrů CT přístroje. Porovnávali jsme obě barvící metody (I2E a PTA). Prokázali jsme, že v případě jodové kontrastní látky dochází k dostatečné difuzi barviva do tkání již během několika hodin (v našem případě 6 h). PTA vzhledem ke své relativně větší molekule vyžaduje delší čas barvení, tzn. v rámci dnů a lépe až týdnů. Ze získaných dat jsme na závěr rekonstruovali trojrozměrné modely preparátů.

Klíčová slova: výpočetní tomografie, metody barvení, morfologie, 3D zobrazování

Contrast enhancement methods for soft tissue visualization in microtomography

Summary

The study of animal anatomy was initially the domain of the light microscopy and the formation of the histological preparates. The preparation of these samples was very time consuming and always led to a permanent tissue destruction. During the second half of the 20th century, the field of non-invasive imaging methods began to develop. Computed tomography was created on the basis of X-rays. It was initially intended primarily for the field of human medicine. Over time, this method began to be widely used in biology.

Microtomography is a method based on computed tomography, but it has a significantly higher resolution at the level of micrometers. Technologies based on the principle of X-rays achieve excellent results in the visualization of mineralized tissues in vertebrates and in the visualization of chitin in arthropods. However, soft tissues with a lower relative density absorb the X-rays significantly less, and therefore their resulting image is significantly worse. To increase the contrast and thus to improve the visualization of soft tissues, the contrast agents containing heavy metals are used. These are the most often used contrast agents based on iodine (I2) and phosphotungstic acid (PTA).

In our study, we focused on the possibilities of using these agents to improve tissue imaging in aquatic animals. We selected 8 specimens from the collection of the Department of Zoology and Fisheries. There were 5 fish vertebrates, 2 representatives of crustaceans and one species of mollusk. Due to the smaller dimensions of the specimens, solutions with low concentrations (1% and 0.3%) were used. The slides were stained for various lengths of time (6 h to 30 days). We also focused on choosing a suitable method of fixation during the scanning process to avoid any unwanted movements of the samples.

Subsequently, we evaluated the final quality of the scans depending on the length of staining, on the contrast of a medium used and on the settings of the CT instrument parameters. We compared both staining methods (I2E and PTA). We demonstrated that in the case of an iodine contrast agent, sufficient diffusion of the agent into the tissues occurs within a few hours (in our case 6 hours). Due to its relatively larger molecule, PTA requires longer staining time, counted in days or weeks. In the end we createded 3D specimen models from the data obtained.

Keywords: computed tomography, staining methods, morphology, 3D imaging

Obsah

1 Úvod ... 8

2 Vědecká hypotéza a cíle práce ... 9

3 Literární rešerše ... 10

3.1 Historie využití zobrazovacích metod v biologii ... 10

3.2 Magnetická rezonance ... 11

3.3 Další zobrazovací metody ... 12

3.4 Rentgenologické metody a jejich využití v biologii ... 13

3.4.1 Rentgenové záření ... 13

3.4.2 Výpočetní tomografie ... 14

3.4.3 MicroCT ... 15

3.4.4 DiceCT ... 16

3.4.5 Barvení pomocí kyseliny fosfowolframové ... 19

3.4.6 Srovnání magnetické rezonance a microCT ... 20

3.5 Postup při zpracování vzorků, parametry scanování ... 21

3.5.1 Příprava vzorku před scanováním ... 21

3.5.2 Parametry skenování ... 22

3.5.3 Smršťování tkání, vznik artefaktů ... 22

4 Metodika ... 23

4.1 Výběr exemplářů, způsob fixace ... 23

4.1.1 Příprava kontrastních činidel ... 24

4.1.2 Scanování, nastavení a parametry microCT ... 24

5 Výsledky ... 26

5.1 Preparáty barvené jódem ... 26

5.2 Preparáty barvené PTA ... 34

5.3 Srovnání I2 a PTA ... 38

6 Diskuze ... 41

7 Závěr ... 43

8 Literatura ... 44

1 Úvod

Studium anatomických struktur bylo zpočátku postaveno pouze na vytváření histologických preparátů a jejich následném studiu pod mikroskopem. Tento postup ovšem vede k trvalé destrukci tkání, které již nemohou být dále využity k jiným studijním účelům. Další nevýhodou je značná pracnost tohoto postupu. Během procesu dochází také ke vzniku nevratných artefaktů, které mohou způsobit významné zkreslení anatomických poměrů (Lesciotto et al. 2020). Histologické preparáty je možné hodnotit pouze ve dvojdimenzionálním rozlišení, chybí možnost rekonstrukce prostorových modelů tkání.

Z tohoto důvodu se pozornost vědecké obce zaměřila na vývoj modernějších zobrazovacích metod, které by umožnily podrobné studium anatomie na mikroskopické úrovni při zachování celistvosti preparátu a jeho tkání.

Rentgenové záření umožňuje zobrazení tvrdých mineralizovaných tkání, jako je kost, dentin, sklovina či silná chrupavka. Tyto tkáně absorbují nejvíce rentgenového záření na rozdíl od měkkých tkáňových struktur s nízkou hustotou, kde je absorbce záření minimální (Gignac & Kley 2018).

Výpočetní tomografie (CT) je metoda založená na rentgenovém záření využívající zobrazení anatomických struktur pomocí mnohočetných řezů tkáněmi z různých úhlů a jejich následnou digitální trojrozměrnou rekonstrukcí (du Plessis et al. 2017). Jedná se o jednu z nejstarších tomografických metod, která byla vytvořena prvotně pro účely humánní medicíny (Metscher 2009).

Mikrotomografie (microCT) je metoda postavená na principech výpočetní tomografie. Na rozdíl od humánních CT přístrojů zobrazuje objekty živé i neživé mnohdy o podstatně menších rozměrech, než je lidské tělo. Zatímco medicínské výpočetní tomografy dosahují maximálního rozlišení 70 µm, průmyslově vyráběná microCT disponují obecně rozlišením 5-150 µm. Mikrotomografy používané pro vědecké účely však dosahují až rozlišení 0,5 µm (nanoCT). Tyto přístroje s rozlišením na submikronové úrovni (nanoCT) jsou někdy označovány jako rentgenová mikroskopie, protože rozlišení je podobné optickým mikroskopům. U humánního CT se zdroj rentgenového záření a detektor pohybují kolem stacionárního objektu, zatímco u průmyslového CT jsou zdroj rentgenového záření a detektor fixovány v jedné pozici a rotuje skenovaný objekt (du Plessis et al. 2017).

Pro zlepšení vizualizace měkkých tkání se používají kontrastní látky, které obsahují některý z těžkých kovů. Tím se dosáhne zvýšení kontrastu těchto tkání a následně podstatně lepšího zobrazení (Silva de Se et al. 2015). Nejčastěji používaná kontrastní činidla jsou založena na bázi jódu, dále se používá kyselina fosfowolframová.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Využití konkrétní barvící techniky založené na účinku látek s obsahem jódu a wolframu umožňuje zvýšit kontrast a tím zlepšit vizualizaci měkkých tkání v mikrotomografii.

3 Literární rešerše

V posledních několika desítkách let došlo k významnému rozvoji zobrazovacích metod, které umožňují podrobně nahlédnout do anatomie sledovaných objektů, aniž by došlo k jejich destrukci. Mezi tyto metody patří výpočetní tomografie (X-ray computed tomography, CT), magnetická rezonance (magnetic resonance imaging, MRI), light sheet mikroskopie (light sheet fluorescence microscopy, LSFM), selective plane illumination microscopy (SPIM, mikroskopie využívající osvitu tenké vrstvy vzorku) a optical projection tomography (OPT). Díky tomuto pokroku je možné přesněji určit velikost jednotlivých tvrdých, ale především měkkých tkání, jejich vzájemný vztah a prostorou distribuci (Gignac & Kley 2018).

Tato práce se zaměřuje na možnosti využití microCT (CT s rozlišovací schopností v rámci mikrometrů) a diceCT (diffusible iodine-based contrast-enhanced computed tomography) při zobrazení měkkých tkání obratlovců, ale i některých bezobratlých živočichů.

3.1 Historie využití zobrazovacích metod v biologii

Na počátku morfologického výzkumu stála klasická světelná mikroskopie. K hodnocení tkání pod mikroskopem je nutné vytvořit histologické preparáty. Nejprve je nutné získat blok tkáně maximální velikosti 1 cm^3, ten se následně fixuje a zalévá nejčastěji do parafínu. Následně se bloček krájí na mikrotonu na tenké řezy (šíře 5-15 μm). Preparáty je možné dlouhodobě uchovávat. Ovšem tkáň je trvale poškozena a celý proces je značně pracný. Časově náročný proces přípravy a krájení vzorků představuje potenciál pro vznik artefaktů, které mohou překrýt nebo narušit tkáně a tkáňové struktury. Může dojít k roztržení, zlomení nebo naopak skládání tkáně (Lesciotto et al. 2020).

Zobrazovací metody naopak umožní podrobně zobrazit jednotlivé struktury a jejich složení se zachováním celistvosti tkáně (Gignac et al. 2016). Výsledkem je série přesných anatomických rekonstrukcí, ze kterých lze následně pomocí různých počítačových programů simulovat trojrozměrné rekonstrukce tkání. Preparát je tedy možné používat opakovaně a dlouhodobě uchovávat. Získané scany lze vkládat do různých databází, které jsou následně přístupné široké vědecké veřejnosti (Krings et al. 2017).

Výpočetní tomografie umožňuje pomocí rentgenového záření neinvazivně zobrazit vnitřní orgány a tkáně. Její počátky spadají do 60. a 70. let 20. století a jsou spojeny především s využitím v humánní medicíně. První prototyp byl představen 1. 10. 1971 v laboratořích EMI, jeho autorem byl G. N. Housfield (Kalender 2006). V 80. letech 20. století byla představena další mimořádně významná zobrazovací metoda, magnetická rezonance (Thornsten 2011).

Metody žalozené na rentgenovém záření jako prostý rentgenový snímek, výpočetní tomografie (CT) a mikrotomografie (microCT, μCT) detailně zobrazují tvrdé mineralizované tkáně jako kosti, dentin a sklovinu (Mizutani & Suzuki 2012). Magnetická rezonance umožňuje naopak podrobně zachytit měkké tkáně. SPIM (selective plane illumination microscopy) je metoda vhodná k mnohahodinové dokumentaci s vysokým rozlišením. Díky nízké fototoxicitě a vysoké rychlosti umožňuje například nepřetržité snímání vývoje embrya. OPT (optical projection tomography) je využívání k vizualizaci genové exprese (Gignac et al. 2016).

Mikroskopická výpočetní tomografie neboli mikrotomografie (μCT, microCT) byla vyvinuta na počátku 80. let minulého století. Je to trojrozměrná zobrazovací metoda využívající

rentgenové záření. Jedná se o identickou metodu, jako je klasická výpočetní tomografie. Rozdíl spočívá v rozlišovací schopnosti, která je u mikroCT podstatně větší až na úrovni menší než 1 milimetr. Dalším podstatným rozdílem je omezená velikost sledovaných objektů. Od roku 1982 došlo k obrovskému nárůstu využití microCT technik. V roce 2009 dosáhl počet vědeckých publikacích věnovaných této tématice téměř 1000. Existují 3 úrovně mikroskopické tomografie dle schopnosti prostorového rozlišení: mini-CT, micro-CT a nano-CT. Pro všechny tyto metody se však používá souhrnné označení microCT. Rozlišovací schopnost mini-CT se pohybuje v rozmezí $10^5 – 10^4$ μm, micro-CT 10^4-10^1 μm, nano-CT je schopné rozlišovat struktury menší než 1 μm (Ritman 2011). Mikrotomografie je metoda, kterou lze využít pro zobrazování neživých preparátů, ale též pro skenování objektů živých, tedy in vivo. Lze vytvářet longitudinální studie, kde studovaný objekt snímáme opakovaně v průběhu času (Broeckhoven et al. 2016).

3.2 Magnetická rezonance

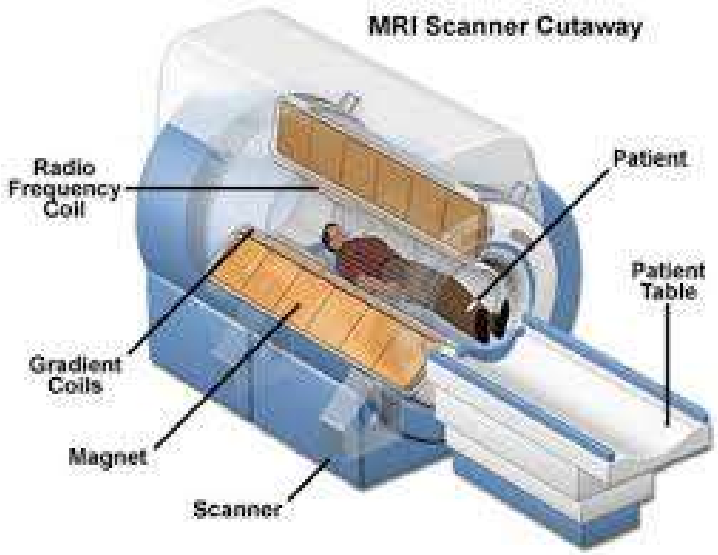
Princip nukleární magnetické rezonance byl poprvé experimentálně popsán v roce 1946. Oba autoři Bloch a Purcell získaly za tento vynález v roce 1952 Nobelovu cenu za fyziku. První přístroj pro klinické použití byl vyroben v roce 1980 v Nottingham a Aberdeen.

Atomové jádro se skládá z protonů a neutronů a vykazuje kladný elektrický náboj. Některá atomová jádra (s lichým protonovým číslem), jako je atom vodíku 1H, či jádro atomu fosforu 31P, mají vlastnost zvanou spin. Spin (moment hybnosti) si lze představit jako rotaci částice kolem vlastní osy. Jedná se o matematický model, samotné jádro se netočí v klasickém významu, ale jeho části vytvářejí lokální magnetické pole se severními a jižními póly a indukují tzv. magnetický moment (Grover et al. 2015).

Kromě rotace vykonává jádro ještě další pohyb, takzvanou precesi, což je pohyb spinu po plášti pomyslného kužele. Lze sis jej představit jako pohyb roztočené káči. Když umístíme sledovaný předmět do silného magnetického pole přístroje pro NMR, atomy vodíku se zorientují tak, aby jejich spin byl rovnoběžný se siločarami magnetického pole, a to ve dvou možných směrech - buď paralelně, nebo antiparalelně. Antiparalelně orientované atomy mají vyšší energii než ty paralelní. Všechny atomy přitom neustále vykonávají precesní pohyb, a to o stejné frekvenci (vykonají stejný počet otáček za určitý čas). Tato frekvence závisí na síle magnetického pole, kterému jsou atomy vystaveny a na druhu atomu, a lze ji vypočítat, nazývá se Larmorova frekvence (Rosina et al. 2013).

V této fázi totiž přístroj vyšle do sledovaného objektu elektromagnetický impulz o stejné frekvenci, jako má precesní pohyb atomů vodíku. Při interakci dvou vlnění o stejné frekvenci dochází k rezonanci – atomy vodíku absorbují energii, která jejich precesní pohyb o něco vychýlí. Zjednodušeně řečeno tím přibylo antiparalelně postavených atomů o vyšší energii na úkor těch paralelních. Navíc všechny atomy začnou vykonávat díky elektromagnetickému impulsu svůj precesní pohyb synchronně – začnou obíhat pomyslný kužel ze stejné strany, jejich spin je tedy v daný okamžik vychýlený na stejnou stranu a vznikne tak příčná magnetizace (kolmá na hlavní magnetické pole), kterou lze měřit. Když impuls přestane působit, atomy vodíku se začnou vracet do původního postavení a přitom energii, kterou prve absorbovaly, zase postupně emitují, mluví se o fázi relaxace. A v této fázi nastává měření. Měří

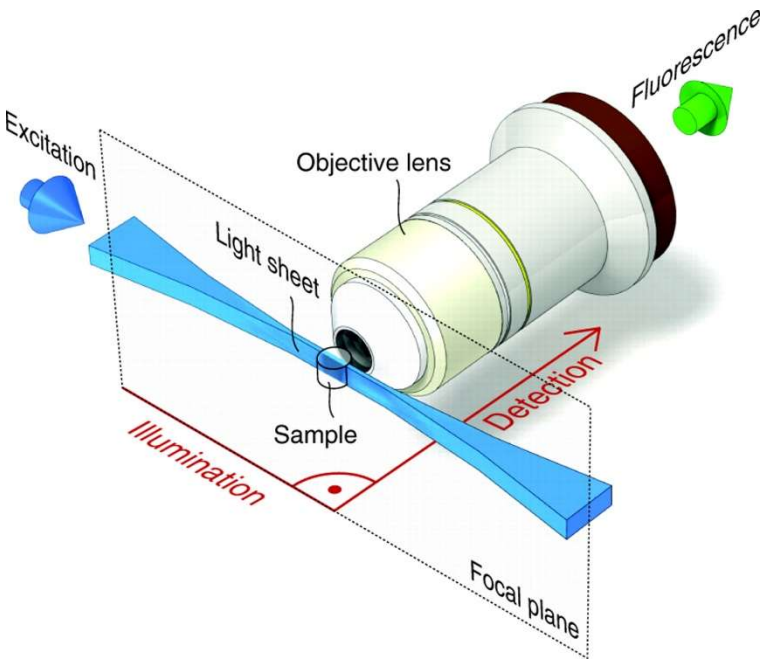
se jednak čas, za jak dlouho se nadbytečné antiparalelní atomy vrátí do paralelní polohy, což se projeví jako změny v podélné magnetizaci (T1 relaxační čas), a dál se měří změny v příčné magnetizaci, za jak dlouho se atomy opět desynchronizují v precesním pohybu (T2 relaxační čas). To závisí hlavně na složení okolní tkáně, jak v ní na sebe molekuly vzájemně působí. Někde se tak atomy začnou o něco opožďovat a někde zrychlovat. Kontrastně tak můžeme zobrazit tkáně obsahující hodně tuků od tkání složených hlavně z vody. Přiblížením cívky do blízkosti rotujícího magnetického momentu se v ní indukuje napětí, které je následně měřeno (Grover et al. 2015).



Obr. 1 Schéma přístroje pro magnetickou rezonanci (Tran 2012)

3.3 Další zobrazovací metody

Fluorescenční mikrokopie světlených listů (Light sheet fluorescence microscopy, LSFM) funguje jako nedestruktivní mikrotom a mikroskop, který využívá rovinu světla k optickému řezu a vizualizaci tkání na subcelulární úrovni. Tato metoda je vhodná k zobrazování hluboko uložených struktur v transparentních tkáních, protože tkáně jsou vystaveny pouze tenké rovině světla (Santi 2011).



Obr. 2 Schéma light sheet fluorescence microscopy (Huisken & Stainier 2009)

Mikroskopie využívající osvitu tenké vrstvy vzorku (selective plane illumination microscopy, SPIM) je jednou z metod mikroskopie světelných listů. Je založená na prosvětlování vzorku laserovým svazkem roztaženým pomocí cylindrické čočky. Laserový paprsek probíhá kolmo k umístění detektoru (Huisken & Stainier 2009).

Optická projekční tomografie (optical projection tomography, OPT) je optický ekvivalent retgenové výpočetní tomografie. Vzorky jsou ale místo rentgenovým zářením prosvěcovány viditelným světlem. Vložený preparát je otáčen postupně s malým úhlovým krokem v rozsahu 360° a pro každé natočení je získána projekce. Ze souboru obrazů projekcí je algoritmem filtrované zpětné projekce spočítána výsledná 3D reprezentace preparátu (Rieckher et al. 2011).

3.4 Rentgenologické metody a jejich využití v biologii

3.4.1 Rentgenové záření

Rentgenové paprsky (starším názvem paprsky X) jsou elektromagnetické ionizující záření s vlnovou délkou 10^{-8} – 10^{-12} m. Jedná se o proud fotonů, o energiích desítek až stovek KeV. Přirozenými zdroji rentgenového záření jsou hlavně hvězdy. Rentgenové paprsky vznikají všude tam, kde elektrony narážejí velkou rychlostí na překážku. Při nárazu elektronů se promění jejich kinetická energie z větší části na teplo a jen nepatrné množství v rentgenové záření. Čím větší je rychlost elektronů, tím jsou rentgenové paprsky pronikavější (Martykánová 2007).

Rentgenové paprsky objevil Wilhelm Conrad Röntgen dne 8. listopadu 1895 ve své laboratoři ve fyzikálním ústavu na Würzburské univerzitě v Bavorsku. V té době zkoumal katodové záření, což je proud elektronů urychlených elektrickým polem. Při jejich dopadu na anodu vzniká záření, které proniká i neprůhlednými předměty. Vypozoroval, že emulze fotografické desky zabalené do černého papíru a umístěné v blízkosti výbojové

trubice po vyvolání zčernala. Nestalo se tak, pokud na desku položil kovový předmět. Tímto způsobem Röntgen vytvořil první rentgenový snímek ruky. Za své objevy obdržel v roce 1901 Nobelovu cenu za fyziku (Glasser 1993).

3.4.2 Výpočetní tomografie

Termín tomografie byl poprvé použit ve 30. letech 20. století. Znamená zobrazování ve formě řezů sledovaným objektem kolmých k ose rotace. Konvenční tomogram je jeden řez pacientovým tělem či sledovaným předmětem, který je umístěn paralelně k filmu. Následnou rekonstrukcí jednotlivých řezů z různých směrů dochází k tvorbě 2D a následně i 3D obrazů (Seeram 2015).

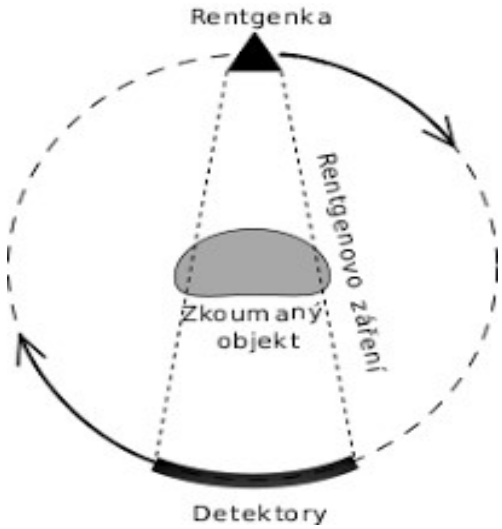
Rekonstrukční programy obvykle generují voxely (objemové pixely), které mají zcela identickou velikost, a rozměry voxelů se automaticky vypočítávají se stejnou přesností jako kalibrace zobrazovacího systému. Numerická hodnota vypočtená pro každý voxel je lineární koeficient útlumu rentgenového záření v odpovídajícím bodě objemu vzorku. Výsledný 3D scan je tedy jakási trojrozměrná matice hodnot jasu, která se rovná souboru vyrovnaných dvourozměrných digitálních obrazů. Takové datové sady se stávají stále užitečnějšími a všestrannějšími s rostoucí sofistikovaností a dostupností softwaru pro 3D prohlížení, manipulaci a analýzu (Metscher 2009).

Při klasickém CT vyšetření v humánní medicíně je pacient uložen na posuvném lůžku, které postupně projíždí vyšetřovacím kruhem CT přístroje (gantry). Na jedné straně gantry je umístěn šterbinovitý zdroj rentgenového záření, tzv. rentgenka. Na opačné straně stojanu se nachází sada detektorů (Kramme et al. 2011). U starších přístrojů jsou detektory umístěny přímo proti rentgence, jsou s ní pevně spojeny a společně s ní se pohybují. U modernějších tomografů jsou nepohyblivé detektory prstenčitě uspořádány kolem celého pacientova těla. Matematickým výpočtem je určena výše absorpce rentgenového záření, zobrazená v odstínech šedi (Navrátil & Rosina 2019). Objekt je zobrazován v transverzální rovině, která je kolmá na dlouhou osu těla.

Obr. 3: Výpočetní tomografie Fakultní nemocnice Motol

K určení rozsahu denzity (míry absorpce a rozptylu záření) v dané oblasti se používají Hounsfieldovy jednotky (HU). V praxi mohou nabývat Hounsfieldovy jednotky hodnot od −1000 (vzduch), do +1000 (kompaktní kost). Pro diagnostické užití a pro zobrazení

výsledného obrazu v odstínech šedi na monitoru je tedy k dispozici cca 2000 čísel. Denzita je spočítaná v jednotlivých bodech tkáně a její hodnota je kvantifikována tzv. Hounsfieldovou stupnicí na 4096 stupňů. Rozdíly v denzitě se zobrazují na stupnici šedi. Protože lidským okem nelze rozlišit celou škálu denzit, používají se podintervaly, tzv. okna (např. měkkotkáňové, kostní okno, plicní aj.).



Obr. 4 Princip výpočetní tomografie (Navrátil & Rosina 2019)

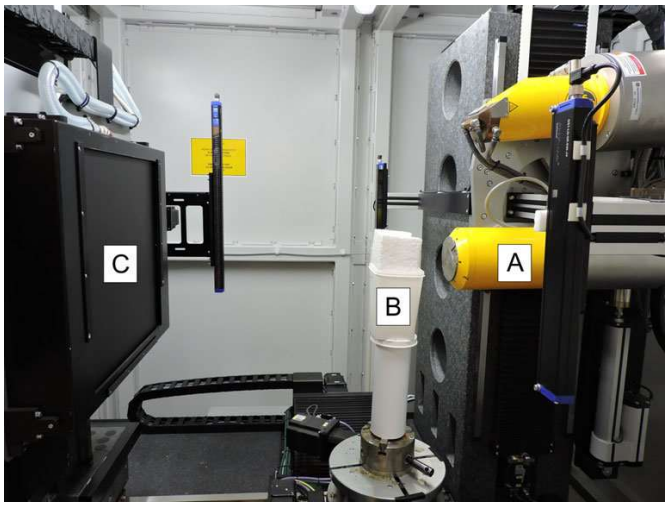
Existují 2 typy CT vyšetření: konveční (sekvenční, skokové) a helikální (spirální) CT (Peterová 2010). U konvečního CT je v určitý okamžik scanován pouze jeden řez. Rentgenka a detektory rotují o 360º nebo méně stupňů, zatímco posuvný stůl a pacient zůstávají ve stacionární pozici. Tato metoda je časově velmi náročná. Spirální CT naopak výrazně zkracuje dobu vyšetření. Během scanování se posuvný stůl s pacientem kontinuálně pohybuje vnitřkem gantry a rentgenka s detektory nepřetržitě rotují kolem pacienta. Pohyb rentgenových paprsků kolem pacienta tak probíhá po spirále. Výsledkem je zisk značného množství dat během krátkého časového úseku. Vyšetření ovšem znamená pro pacienta vyšší radiační zátěž než u konvenčního CT (Seeram 2015).

3.4.3 MicroCT

Mikrotomografie (microCT, μCT) je metoda vycházející z výpočetní tomografie (CT) či výpočetní axiální tomografie (CAT). Je postavena na stejných principech jako výpočetní tomografie široce využívaná v humánní medicíně (Metscher 2009, Singhal et al. 2013). Průmyslově vyráběné CT přístroje jsou určeny k zobrazování živých i neživých objektů mimo medicínské účely. Vzhledem k faktu, že tyto objekty dosahují mnohdy velmi malých rozměrů, bylo nutné docílit podstatně většího rozlišení až na úrovni mikrometrů (micro-CT) a dokonce i úrovni menší než 1 mikrometr (nano-CT). MicroCT se stává široce rozšířenou metodou v oblasti morfologického výzkumu (Zikmund et al. 2018).

CT pro průmyslové účely se liší od přístrojů určených k medicínskému použití ve 3 základních bodech. Medicínské CT má uvnitř přístroje kruhový otvor (gantry), kterým projíždí

posuvný stůl s pacientem, rentgenka a detektory rotují kolem pacienta. U průmyslových přístrojů je to opačně, zdroj rentgenového záření a detektory jsou pevně fixovány a pohybuje se naopak sledovaný vzorek. Toto uspořádání umožňuje dosáhnout vyššího rozlišení při zobrazování zejména malých objektů. Daším podstaným rozdílem je výrazně větší flexibilita v možnosti nastavení napětí a elektrického proudu u microCT určených pro průmyslové a vědecké využití v závislosti na materiálovém složení vzorku. MicroCT disponuje vyšším obrazovým rozlišením než medicínské CT, obvykle se pohybuje v rozmezí 5-150 μm. Výpočetní tomografy pro lékařské účely dosahují největšího rozlišení na úrovni 70 μm (du Plessis et al. 2017).

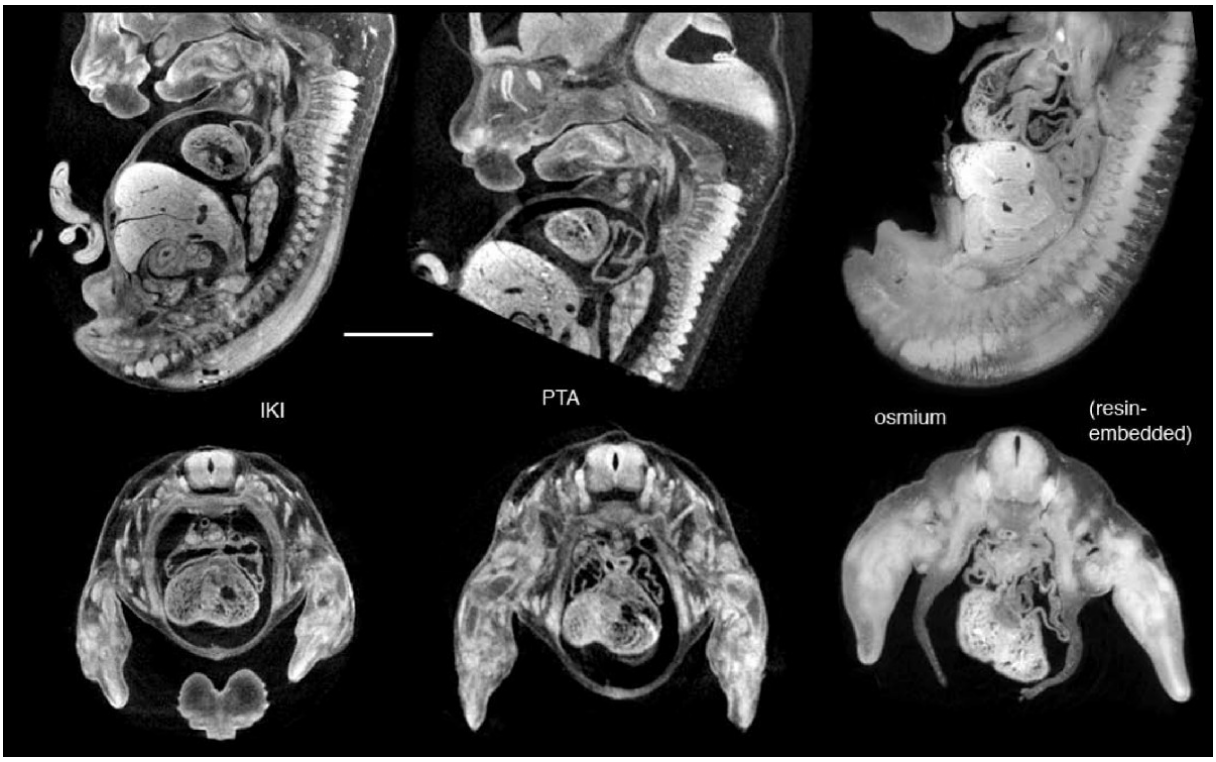


Obr. 5 Schéma uspořádání microCT (du Plessis et al. 2017): A-zdroj rentgenového záření; B-stojan, kde je umístěn scanovaný objekt; C-detektory hodnotící množství dopadajícího záření

Metody pro rekonstrukci 3D obrazů se dělí do dvou základních skupin: metody založené na rekonstrukci ze sériových řezů a scanování celého objemu studovaného vzorku (Metscher 2009).

3.4.4 DiceCT

Rentgenové technologie vykazují vynikající výsledky při vizualizaci mineralizovaných tkání obratlovců, jako je kost, dentin, sklovina, dále silná chrupavka a u členovců chitin. Tyto tkáně nejvíce absorbují rentgenové záření. Naopak měkké tkáně s relativně nízkou hustotou jako jsou játra, ledviny, centrální a periferní nervový systém absorbují záření podstatně méně a proto je výsledné zobrazení výrazně horší. Pro lepší zachycení měkkých tkání se používají kontrastní látky, které obsahují některý z těžkých kovů, například oxid osmičelý (OsO4), kyselina fosfomolybdenová (PMA), kyselina fosfowolframová (PTA) a jod (I2). Z tohoto důvodu byly zavedeny nové metody, jako je například diceCT (diffusible iodine-based contrast-enhanced computed tomography).



Obr. 6 Virtuální řez myším embryem. Srovnání barvících technik používaných pro mikrotomografii: Lugolův roztok (IKI, Iodine-Potassium Iodide), fosfowolframová kyselina (PTA, Phosphotungstic acid), osmium (Metscher 2009).

DiceCT využívá k lepšímu zobrazení měkkých tkání jodové kontrastní látky. Jod je méně toxický a současně i levnější variantou než například osmium. Rozpuštěný jód difunduje hluboko do tkáně, kde jsou přirozeně vázány tuky a sacharidy a tím zvyšuje jejich radiodenzitu (Gignac & Kley 2014). Stejně jako magnetická rezonance (NMR, MRI), diceCT patří mezi neinvazivní metody. Sledované vzorky zůstávají nepoškozeny narozdíl od histologického zpracování preparátů. U takto ošetřených preparátů lze dobře sledovat obsah lipidů v tkáních a tím rozlišit myelinizované struktury od nemyelinizovaných, což nabízí velký potenciál pro neuroanatomické studie. Například v mozku obratlovců dokážeme díky diceCT odlišit myelinizované dráhy od nemyelinizovaného kortexu, mozkových jader a ganglií. Lze také sledovat průběh jednotlivých nervů a vytvářet trojdimenzionální simulace. Elementární jod (I2) má dobré výsledky při zobrazování malých vzorků do velikosti 1 cm^3. Ovšem u větších objektů je nutné použít jiné kontrastní látky na bázi jódu s větší schopností penetrace do tkáně. Jako kontrastní činidlo se používá jód ve formě vodného jodidu draselného (aka, Lugolův roztok, I2KI) nebo alkoholický jód (I2E a I2M), kde je jako rozpouštědlo použit ethanol nebo methanol (Li et al. 2016; Gignac & Kley 2018).

Gignac et al. 2016 ve své práci porovnává studie 38 autorů, kteří studovali pomocí diceCT různé tkáně rozmanitých druhů živočichů. Jako kontrastní činidlo byly použity všechny výše uvedené formy jodových barviv (I2, I2KI, I2E, I2M). Délka barvení se výrazně lišila zejména s ohledem na velikost vzorků. U malých vzorků je difuzní dráha, kterou musí kontrastní činidilo urazit, aby proniklo do měkkých tkání, podstatně kratší.

Menší vzorky vyžadují nižší koncentrace I2KI, I2E a I2M, stejně jako kratší doby barvení. Kromě toho roztoky o vyšších koncentracích vytvářejí vyšší osmotický tlak, a proto jsou rychleji absorbovány měkkými tkáněmi (Vickerton et al. 2013). Malé vzorky, jako je většina bezobratlých a embrya obratlovců, lze barvit při nízkých koncentracích (tj. ≤ 1% hmotn./obj.). Vynikající úrovně kontrastu se dosahuje již při barvení trvajícím několik hodin (přes noc). U větších vzorků, jako jsou post-embryonální obratlovci, lze zvolit 2 přístupy: nízké koncentrace barvicího roztoku aplikované po dobu několika týdnů až měsíců, nebo vyšší koncentrace barvicího roztoku (až ~ 10% hmotn./obj.) po kratší dobu (tj. několik týdnů; Gignac & Kley, 2014).

Rychlejší difuze a penetrace jódu do tkání může způsobit přebarvení preparátu s následným nižším rozlišení jednotlivých tkáním. Dochází k rozmazání tkáňových rozhraní a výsledný obraz je podstatně méně přehledný než při použití PTA (Lesciotto et al. 2020).

Řada autorů uvádí, že jódová kontrastní činidla umožňují výrazně zlepšit kontrast v kosterní svalovině, pojivových, srdečních a cévních tkáních (Degenhardt et al. 2010; Jeffery et al. 2011). V případě mozku, chrupavky a více kolagenních struktur však jód dosahuje podstatně horších výsledků (Metscher 2009; Tsai & Holliday 2011; Tahara & Larsson 2013; Lautenschlager et al. 2014; Descamps et al. 2014; Disney et al. 2017; Krings et al. 2017). Kromě toho, že nejsou v případě jodových kontrastních látek zobrazeny všechny tkáně stejně kvalitně, je pravděpodobně nejvýznamnější limitací použití jodu jako činidla zvyšujícího kontrast pro microCT potenciál pro silné smrštění tkáně (Vickerton et al. 2013).

Tab. 1 Příklady barvících protokolů na bázi jódu u různých autorů

Autor	Druh	Stáří	Tkáň	Barvící roztok + koncentrace % w/v	Délka barvení
Baverstock et al. 2013	Myš	Dospělý jedinec	Hlava	3,75% I2KI	1 týden
Hopkins et al. 2015	Potkan	Dospělý jedinec	Sedací nerv	6% I2KI	48 h
Metscher 2009	Mihule	Juvenilní jedinec	Přední část těla	1% I2E	Přes noc
Fernández et al. 2014	Žížala temná	Neuvedeno	Celé tělo	10% I2KI	4 + 10 dnů
Metscher 2009	Veslonos americký	Novorozený jedinec	Hlava	1% I2M	Přes noc
Dougherty et al. 2015	Ploštička přehlížená	Dospělý jedinec	Celé tělo	1% I2E	4 dny
Pauwels et al. 2013	Prase domácí	Dospělý jedinec	Svalová a tuková tkáň	43% KI	24 h

3.4.5 Barvení pomocí kyseliny fosfowolframové

Kyselina fosfowolframová (PTA, phosphotungstic acid), je roztok obsahující ionty wolframu, o nichž je známo, že se vážou na fibrin a kolagen. PTA se v poslední době používá pro vysoce kontrastní zobrazování hmyzu a embryonálních tkání myší a kuřat v histologických rozlišeních za použití komerčních μCT systémů (Dullin et al. 2017). Ve srovnání s jódem je PTA relativně velká molekula a její prostup tkáněmi je výrazně pomalejší proti jodovým kontrastním látkám. PTA proto vyžaduje delší barvící protokoly, aby bylo možné plně proniknout do hlubších tkáňových struktur a dosáhnout tak požadované kvality zobrazení (Dunmore-Buyze et al. 2014, Lesciotto et al. 2020).

Přestože bylo publikováno značné množství prací věnujících se zobrazování tkání za využití PTA, nebyla dosud jasně stanovena doporučená délka barvení, neexistuje tedy žádný univerzální protokol, který byl nabízel jednoznačný postup. Doba barvení a postup se u různých autorů liší. V návaznosti na Metscherovy publikované protokoly o barvení (Metscher 2009, 2011) byla PTA použita k vizualizaci struktur měkkých tkání na mikroCT obrazech různých druhů a typů tkání, s využitím mnoha různých protokolů (Lesciotto et al. 2020).

Řada autorů dospěla na základě svých výzkumů ke stejnému závěru, že délka barvení není rozhodujícím faktorem, pokud dojde k dostatečné difuzi PTA do tkání (Nierenberger et al. 2015). Bylo však zveřejněno několik podrobností, které by naznačovaly dobu potřebnou k dostatečnému proniknutí do tkání různých druhů a věkových skupin. Metscher (2011) ve své práci prokázal, že ani koncentrace barvicího roztoku PTA, ani koncentrace alkoholu nebyly kritickou složkou protokolu. Srovnání doporučené koncentrace Metschera 0,3% PTA v 70% ethanolu se zvýšenou koncentrací 0,6% PTA v 70% ethanolu nevedlo k signifikantnímu rozdílu ve vizualizaci tkání. Stejně tak doba barvení pouze přes noc a po dobu 10 dnů v 0,3% roztoku PTA nevykazovala rozdíly ve finálním zobrazení (Krings et al. 2017).

Tab. 2 Srovnání postupů barvení při použití PTA u různých autorů

Autor	Druh	Stáří	Tkáň	Barvící roztok	Délka barvení
Descamps et al. 2014	Myší embryo	Stáří 14,5 dne	Celé tělo	2,5% PTA v demineralizovaném vodném roztoku	24 h
Balint et al. 2016	Prase	Neuvedeno	Vazy a šlachy	10% hm./obj. PTA ve vodě	Do 5 dnů
Dullin et al. 2017	Myš	Dospělý	Srdce	0,7% PTA in 70% ethanol	6 dnů
Buytaert et al. 2014	Králík	12 týdnů	Kosti, svaly, nervy, tuk	0,3% PTA ve vodě	Neuvedeno
Krings et al. 2017	Pulec	Neuvedeno	Celé tělo	0,3% PTA v 70% ethanolu	Přes noc
Smith et al. 2016	Čmelák	4 dny	Hlava	0,5% PTA v 70% ethanolu	1-9 dnů
Tesařová et al. 2016	Myší embryo	Stáří 15,5 dne	Celé tělo	0,7% PTA v 90% methanolu	6 dnů

Přestože uvedené barvící protokoly v mikrotomografii mají nespočetné výhody, lze i tyto postupy do jisté míry považovat za destruktivní. Například se obecně předpokládá, že barvení kyselinou fosfowolframovou (PTA) není zcela reverzibilní, a dokonce ani barvení na bázi jódu nelze úplně odstranit. Na základě těchto faktů musí být pečlivě zváženo použití těchto barvících metod u důležitých vzorků, kde je jakékoli poškození nežádoucí. Dalším diskutovaným bodem jsou účinky barvících protokolů i skenování na integritu genetické informace preparátů a jejich další využití v rámci genetických analýz. Přestože se zdá, že samotná mikrotomografie neohrožuje strukturu DNA buněk, zůstává nadále znepokojujícím faktem jasně prokázaná souvislost mezi rentgenovým zářením a poškozením DNA (Sumner-Rooney et al. 2019).

3.4.6 Srovnání magnetické rezonance a microCT

Magnetická rezonance je v současné době preferovanou metodou při studiu měkkých tkání a je zlatým standardem v neuroekologii ryb. Umožňuje vyšetřovat i větší vzorky, což je výhodné zejména tam, kde z důvodu velikosti studovaného objektu nelze použít mikrotomografii. Běžně používaná kontrastní činidla při vyšetření nukleární magnetickou rezonancí narozdíl od diceCT nezpůsobují nežádoucí smrštění tkáně a tudíž nedochází ke vzniku artefaktů.

Na druhou stranu ovšem relativní nedostupnost, vysoké náklady a časová náročnost MRI mohou být omezujícím faktorem zejména v případě studií prováděných na velkém počtu

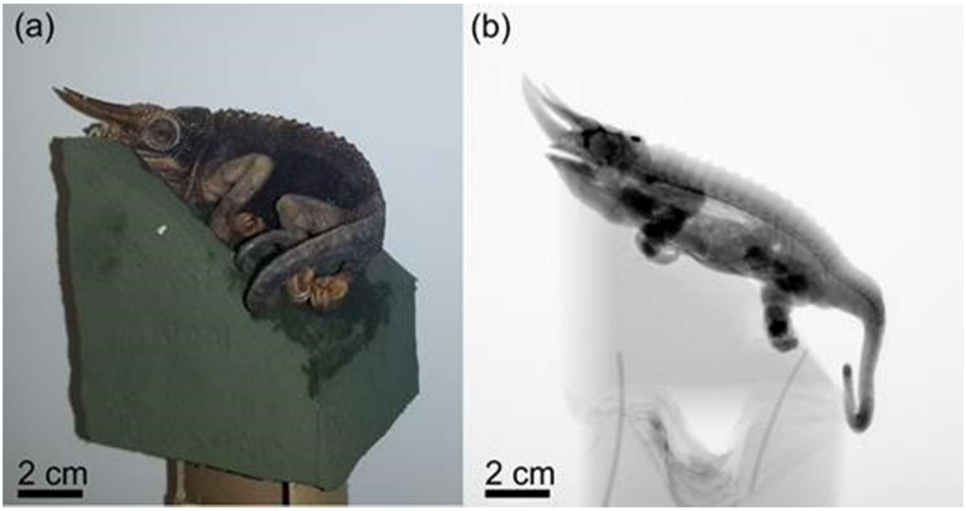
vzorků, či na preparátech o malé velikosti, kde je vyžadováno větší rozlišení zobrazovaných anatomických struktur. Proto je diceCT vhodnou alternativou při studii měkkotkáňových struktur u celé škály živočichů, které jsou pro scanování magnetickou rezonancí nevhodné. Umožňuje podrobné zobrazení nervového systému, jednotlivých částí mozku a jejich prostorového uspořádání (Camilieri-Asch et al. 2020).

3.5 Postup při zpracování vzorků, parametry scanování

3.5.1 Příprava vzorku před scanováním

Mikrotomografie nevyžaduje žádnou nebo jen minimální přípravu vzorku před vlastním scanováním. Objekt během scanování rotuje a je snímán z různých úhlů. Ze získaných projekcí se posléze hodnotí absorbce retgenového záření v jednotlivých bodech sledovaného objemu (Metscher 2009). Z důvodu minimalizace vzniku artefaktů je nezbytně nutné studovaný objekt pevně fixovat v jedné pozici a zabránit tak nežádoucím pohybům. Doporučuje se používat různé fixační nádoby dle tvaru a velikosti vzorku vyrobené z materiálů o nízné denzitě (např. trubice z lepenky, plastové láhve, skleněné tyče). Vzorek s fixační nádobou musí být oddělen od vysoce denzního rotačního systému CT přístroje.

Je vhodné umístit vzorek do držáku pod mírným úhlem, aby se zabránilo paralelnímu postavení s rentgenovými paprsky. V takovém případě totiž rentgenové paprsky nepronikají řádně sledovaným objektem a dochází ke vzniku nežádoucích artefaktů a nepřesností v rozlišení. Výsledný obraz může být rozmazaný a tudíž nevhodný k analýze jednotlivých struktur a jejich prostorového uspořádání.



Obr. 7 Fixace chameleona ve floristické pěně s cílem minimalizace pohybů preparátu během skenování (du Plessis et al. 2017).

Postupné vysychání vzorku během poměrně dlouhé doby scanování může také způsobit vznik artefaktů. Tomu lze zabránit předchozí dehydratací vzorku (nedoporučuje se u malých a křehkých objektů), či umístěním sledovaného objektu do kusu látky navlhčeného vodou, ethanolem, formalinem nebo isopropanolem (du Plessis et al. 2017).

3.5.2 Parametry skenování

Napětí rentgenového záření velmi silně závisí na typu a materiálovém složení vzorku. Optimálního rozlišení se obvykle dosahuje nižšími hodnotami napětí. Pro biologické preparáty se používá napětí v rozmezí 30 až 100 kV, pro menší nerosty a lehké kovy 60 až 150 kV a pro těžké kovy a velké nerosty 160 až 240 kV. Malé vzorky obecně vyžadují nízké napětí (du Plessis et al. 2017).

Jak již bylo řečeno, objekt během skenování rotuje. Doba skenování je odvislá od počtu projekcí, ze kterých je exemplář snímán. Na každou projekci se vytváří více snímků, aby se jejich zprůměrováním snížil šum a následně zlepšila kvalita obrazu.

3.5.3 Smršťování tkání, vznik artefaktů

Smrštění tkáně je způsobeno hlavně nízkým pH PTA v roztoku a vysokou osmolalitou jodových kontrastních látek. Smršťování vzorků je kritickým bodem, který je třeba eliminovat nebo přinejmenším minimalizovat, protože významně mění morfologii a integritu tkáně, což znemožňuje správnou strukturální analýzu a následné modelování. Získaná data jsou zkreslená a nepřesná. Navíc smršťování poškozuje vzorky, a proto nemohou být následně použity v jiných biologických studiích (de Bournonville et al. 2019).

4 Metodika

4.1 Výběr exemplářů, způsob fixace

V této práci jsme se zaměřili na možnosti zobrazování tkání několik zástupců obratlovců (rybovití obratlovci), bezobratlých (korýši, měkkýši) pomocí mikrotomografie při použití jodové kotrastní látky (I2) a kyseliny fosfowolframové (PTA). Vybrali jsme 8 preparátů ze sbírky Katedry zoologie a rybářství České zemědělské univerzity. Jednalo se o exempláře velikosti cca 1 – 10 cm. Z rybovitých obratlovců byli použiti tito zástupci: *Gobio gobio*, *Carnegiella sp.*, *Proterorhinus sp.*, *Cobitis laoensis, Salmo trutta*. Z korýšů byli do studie zařazeni 2 druhy raků: *Pacifastacus leniusculus* a *Orconectes limosus*. Měkkýši byli zastoupeni jedním druhem *Sepiola sp*.

Preparáty byly dlouhodobě uchovávané ve 4-8% formaldehydu. Exempláře bylo třeba převést do 70% roztoku ethanolu. Kvůli nežádoucímu smrštění tkáně tento krok není možné udělat přímo, proto vzorky procházely ethanolovou ředící řadou. Formaldehyd byl promyt, exempláře jsme umístili do vody, poté do 20% ethanolu, 40% ethanolu a nakonec do 70% ethanolu. Celý proces trval několik týdnů, jednotlivé fáze představovaly zdržení asi 1-4 týdnů, záleželo na velikosti vzorku.

Obr. 8 Příprava a barvení preparátů

4.1.1 Příprava kontrastních činidel

Pro obě metody zlepšení kontrastu (I2 i PTA) byl použit 1% roztok v 70% ethanolu. Současně jsme však také zkoušeli koncetrace nižší, 0,3% PTA v 70% ethanolu, 0,3% I2 v 96% ethanolu. Řada autorů ve svých pracích používala různé koncentrace barvívích roztoků a jak již bylo zmíněno výše, není stanoven jednoznačný doporučený postup. Porovnávali jsme též vliv doby barvení preparátu na výslednou kvalitu zobrazení scanovaných objektů. Délka barvení se pohybovala v rozmezí 1,5 h až do 25 dnů.

Chemikálie pro přípravu kontrastních činidel dodala společnost Penta chemicals s. r.o. Po navážení materiálu pro dané roztoky proběhlo míchání na laboratorní míchačce do celkového rozpuštění barviva. Vzorky byly následně umístěny do dostatečně velké plastové nádoby a zality připraveným barvícím roztokem. Poté byly uchovávány za optimálních podmínek po požadovanou dobu barvení.

Obr. 9 *Gobio gobio* - barvení vzorku 1% roztokem I2

4.1.2 Scanování, nastavení a parametry microCT

Po obarvení jsme vzorky přesunuli do zkumavek dle velikosti jednotlivých preparátů. Vzorky byly zality v čistém ethanolu o stejné koncentraci jako vlastní barvivo (tedy 70% a 90% ethanol), aby nedocházelo k vysychání tkání a smrštění preparátů. Důležitým bodem přípravy se stala volba vhodného fixačního materiálu, do kterého byly jednotlivé preparáty uchyceny, aby při manipulaci a následném scanování nedocházelo k nežádoucím pohybům vzorku v nádobě. Po několika pokusech byla nakonec zvolena floristická aranžovací hmota.

Pro scanování byl použit přístroj XT H 225 Nikon, který vlastní Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Každý exemplář byl snímán v 720 projekcích, na každou projekci byly provedeny 4 snímky. Pouze preparát *Salmo trutta* byl v každé projekci snímán 16x. Tyto snímky byly následně zprůměrovány, aby se

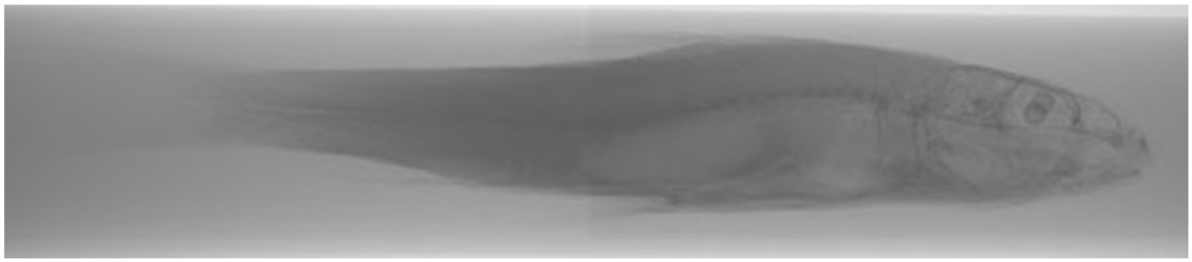
odstranily nežádoucí artefakty. Nastavení energie paprsku se pohybovalo v rozmezí 60 - 85 kV, intenzita proudu 92 - 175 µA a síla v rozmezí 7,9 – 11,7 W.

Obr. 10 Mikrotomograf XT H 225 Nikon

Pro následnou analýzu získaných dat a rekonstrukci trojrozměrných projekcí a modelů byl použit komerčně dostupný softwarový program Avizo.

5 Výsledky

5.1 Preparáty barvené jódem



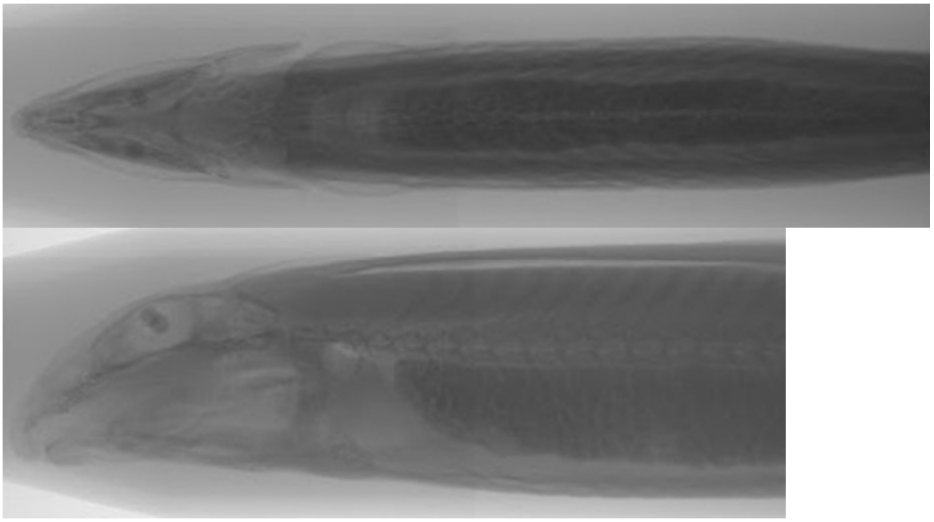
Obr. 11 *Gobio gobio* – náhledový sken, barvení 1% I2 2 dny, nastavení CT: 73 kV, 130 µA, 9,5 W

Na obrázku číslo 12 je v několika projekcích zachycen *Orconectes limosus* barvený v 1% I2E po dobu 5 dnů. Na posledním skenu vpravo dole je jeho trojrozměrný model z laterálního pohledu. Velmi podrobně je na jednotlivých řezech zobrazena svalovina a žaberní oblouky. Dále můžeme pozorovat například trávicí trubici a mozkový ganglion.

Obr. 12 *Orconectes limosus* - barvení 1% I2E po dobu 5 dnů, nahoře vlevo frontální řez, vpravo transverzální řez, dole vlevo sagitální řez, vpravo dole trojrozměrný model z laterálního pohledu

Na dalším obrázku č. 13 jsou náhledové skeny *Cobitis laoensis* barveném 25 dnů v jódu při nastavení parametrů paprsku 67 kV, 173 µA, 11,6 W. Následující obrázek pak zobrazuje

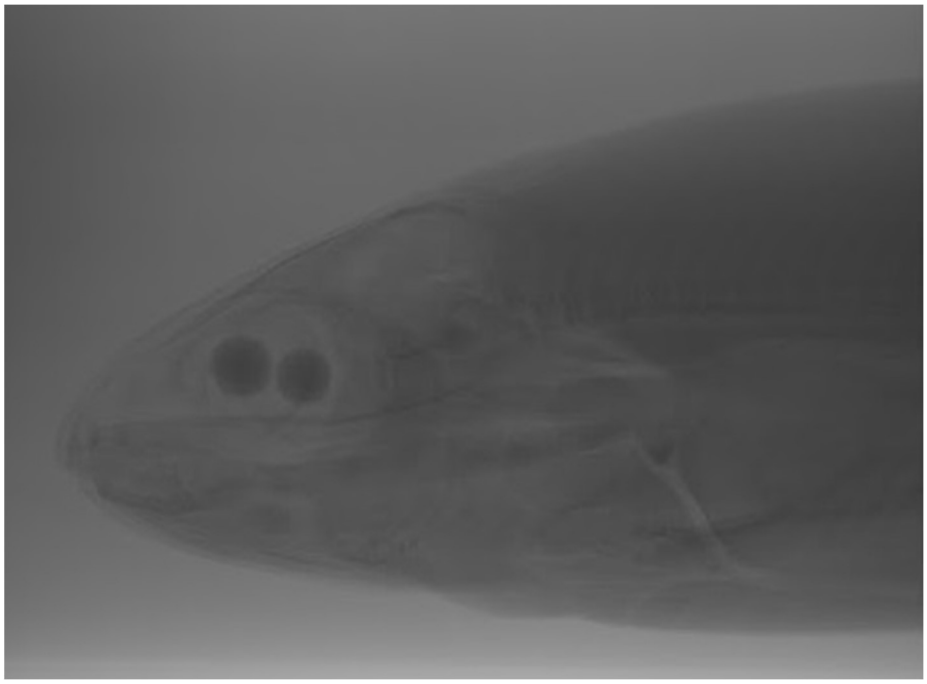
finální skeny v několika projekcích, včetně trojrozměrného modelu exempláře. Na jednotlivých řezech lze identifikovat mozek, trávicí soustavu, srdce, žaberní systém, skelet, svalovinu a také například Weberův orgán.



Obr. 13 *Cobitis laoensis* - náhledové skeny, barveno 25 dnů I2E, parametry CT: 67 kV, 173 µA, 11,6 W

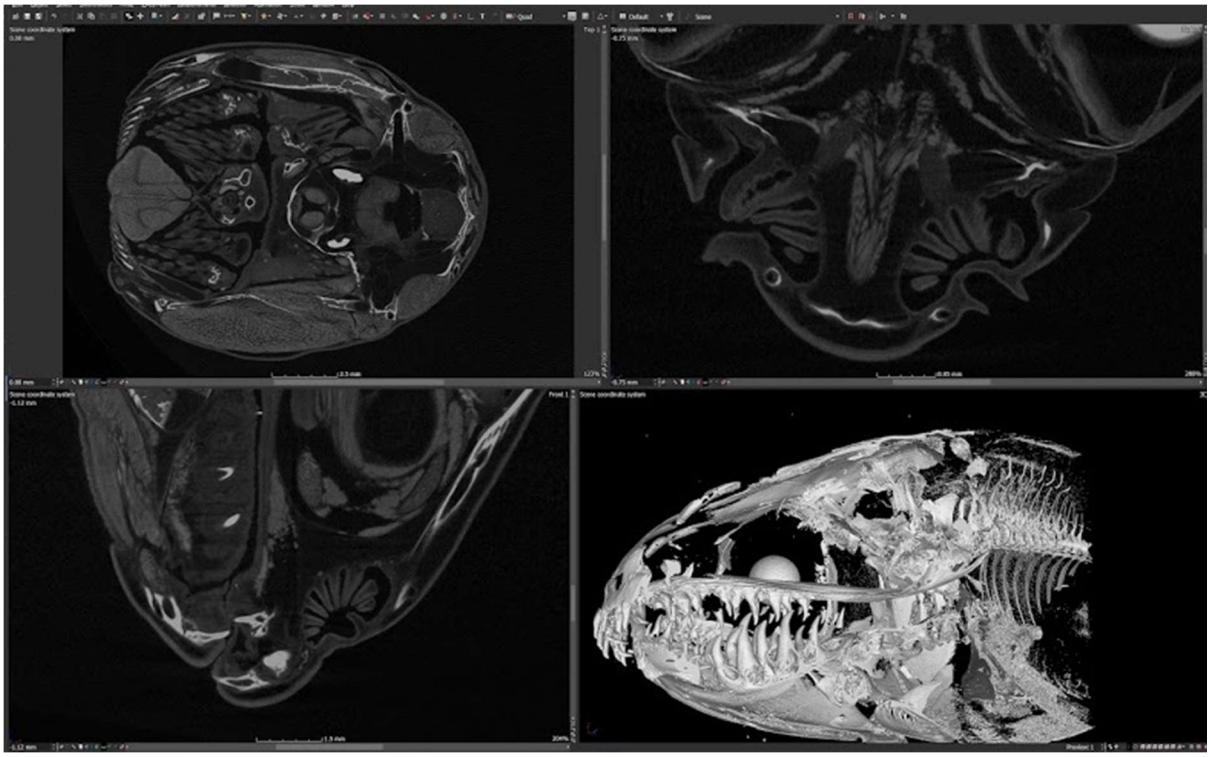
Obr. 14 *Cobitis laoensis* - transverzální, sagitální a frontální projekce, na posledním snímku trojrozměrný model, barvení 25 dnů I2E, parametry CT: 67 kV, 173 µA, 11,6 W, lze rozlišit nervovou soustavu, mozek, trávicí trubici, srdce, žábry, Weberův orgán a další struktury.

Preparát *Salmo trutta* jsme barvili nejdéle ze všech exemplářů, t.j. po dobu 30 dnů v 1% I2E. Náhledový sken hlavy je zobrazen na obr. 15. Na následujících obrázcích 16 a 17 jsou zachyceny finální skeny preparátu v několika projekcích. K dispozici jsou též trojrozměrné modely zobrazující anatomické struktury hlavy. Tyto simulace byly vytvořeny v programu Avizo. Během skenování bylo provedeno 16 snímků na každou projekci. Napětí rentgenového paprsku bylo nastaveno na 60 kV, proud 151 μA a síla 9,1 W.



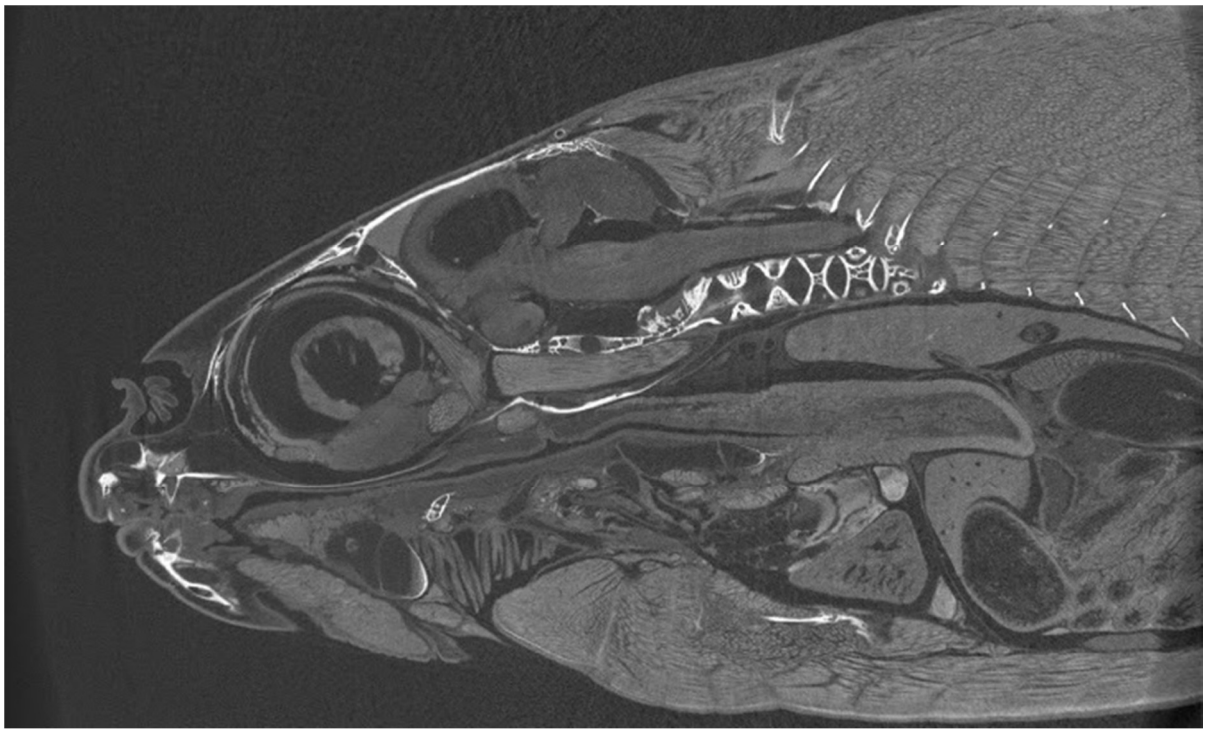
Obr. 15 *Salmo trutta* - náhledový sken, barvení I2E po dobu 30 dnů

Obr. 16 *Salmo trutta* - barvení I2E po dobu 30 dnů, 16 snímků na projekci



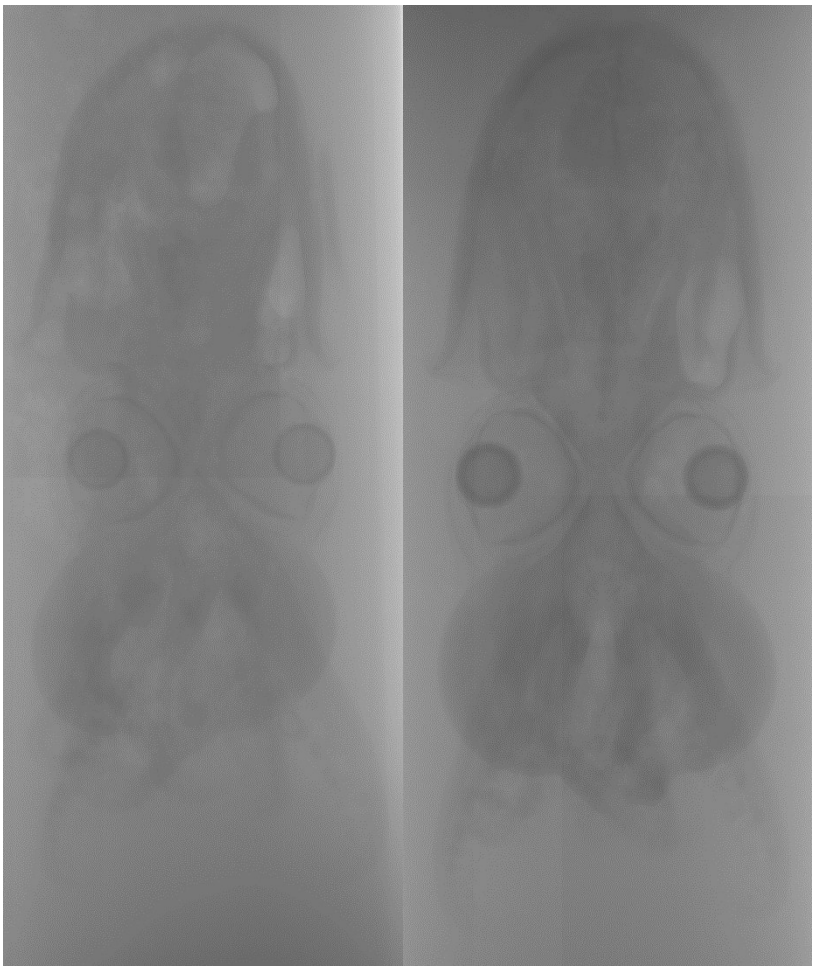
Obr. 17 *Salmo trutta* - barvení I2E po dobu 30 dnů, 16 snímků na projekci

Na obrázku č. 18 je detail hlavy *Salmo trutta* v sagitální projekci. Jedná se o identický preparát jako na předešlých obrázcích 15, 16 a 17. Preparát byl barven 30 dnů v jódu, na každou projekci bylo provedeno 16 snímků. Na uvedeném skenu jsou detailně zobrazeny struktury oka, mozku, míchy, trávicí trubice včetně jater. Dále jsou patrné žábry, srdce, plynový měchýř a gonády. Jsou jasně patrná rozhraní mezi jednotlivými orgánovými soustavami, nedochází ke splývání tkání vlivem difuze jodového činidla.



Obr. 18 *Salmo trutta* - detail hlavy, barvení I2E po dobu 30 dnů, 16 snímků na projekci

Jediný zástupce měkkýšů, *Sepiola sp.*, byl barven v 1% I2E po dobu 6 h a následně 18 h. Náhledové skeny obou preparátů jsou ke srovnání zobrazeny na obrázku č. 19. Vlevo je náhledový snímek získaný po 6 h barvení, vpravo po 18 hodinách. Snímek vpravo je celkově sytější, jednotlivé tkáňové struktury jsou vykresleny detailněji. To svědčí pro lepší difuzi barviva do tkání, která vyžaduje zřejmě delší časovou přípravu než 6 hodin pro dosažení kvalitní vizualizace všech měkkotkáňových struktur. Definitivní skenování proto bylo prováděno až po 18 hodinách barvení. Ukázka výsledných finálních skenů v různých projekcích je na obrázku č. 20. Opět je připojen i trojrozměrný model vytvořený v programu Avizo.

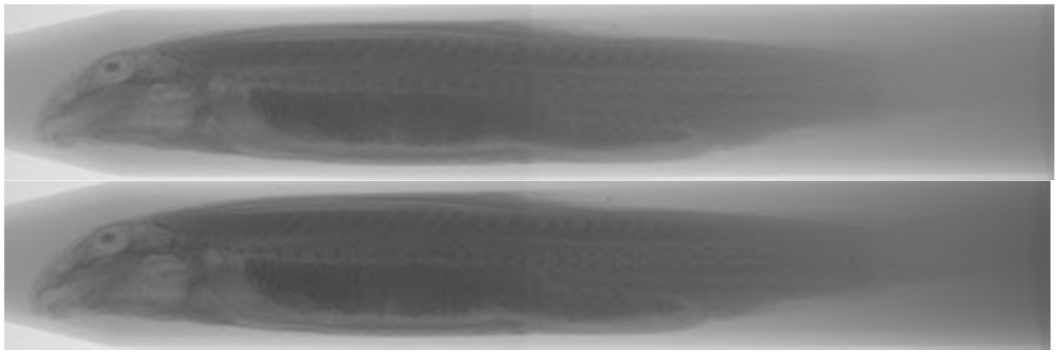


Obr. 19 *Sepiola* - náhledové skeny, barvení I2E, vlevo po dobu 6 h, vpravo 18 h

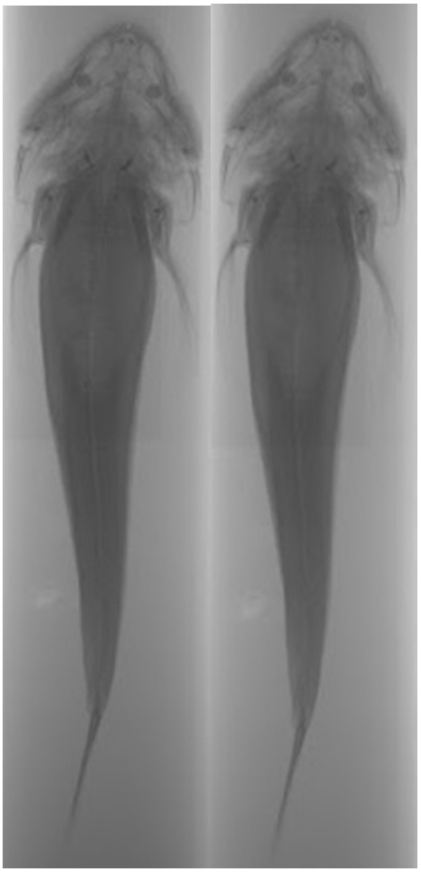
V případě trojrozměrného modelu *Sepioly sp.* si lze povšimnout určitých artefaktů v podobě mnohočetných šedých bodů, které jsou umístěny v proximální části snímku a táhnou se podél těla měkkýše. Jedná se o drobné rentgenkontrastní částice, které kontaminovaly preparát umístěný v nádobce v ethanolovém roztoku.

Obr. 20 *Sepiola* - barvení I2E po dobu 18 h, 8 snímků na projekci, na posledním snímku vpravo dole jsou přítomny mnohočetné šedé body jako artefakty způsobené kontaminací preparátu

Dále jsme se zaměřili také na vliv parametrů skenování na výslednou kvalitu snímků. Stejné preparáty jsme skenovali při odlišném napětí, síle a proudu rentgenového paprsku. Ke srovnání uvádíme 2 příklady na obrázku č. 21 a 22. Na každém obrázku jsou vždy 2 náhledové skeny stejného vzorku ovšem snímané při jiném nastavení skeneru. V obou případech není patrný významný rozdíl mezi jednotlivými skeny. Snímky jsou ovšem velmi tmavé, přesycené barvivem a tím je snížena schopnost odlišit jednotlivé tkáňové struktury.



Obr. 21 *Cobitis laoensis* - náhledové skeny
Nahoře: barvení I2 po dobu 25 dnů, nastavení CT: 75 kV, 94 µA, 7,1 W
Dole: barvení I2 po dobu 25 dnů, nastavení CT: 62 kV, 146 µA, 9,1 W



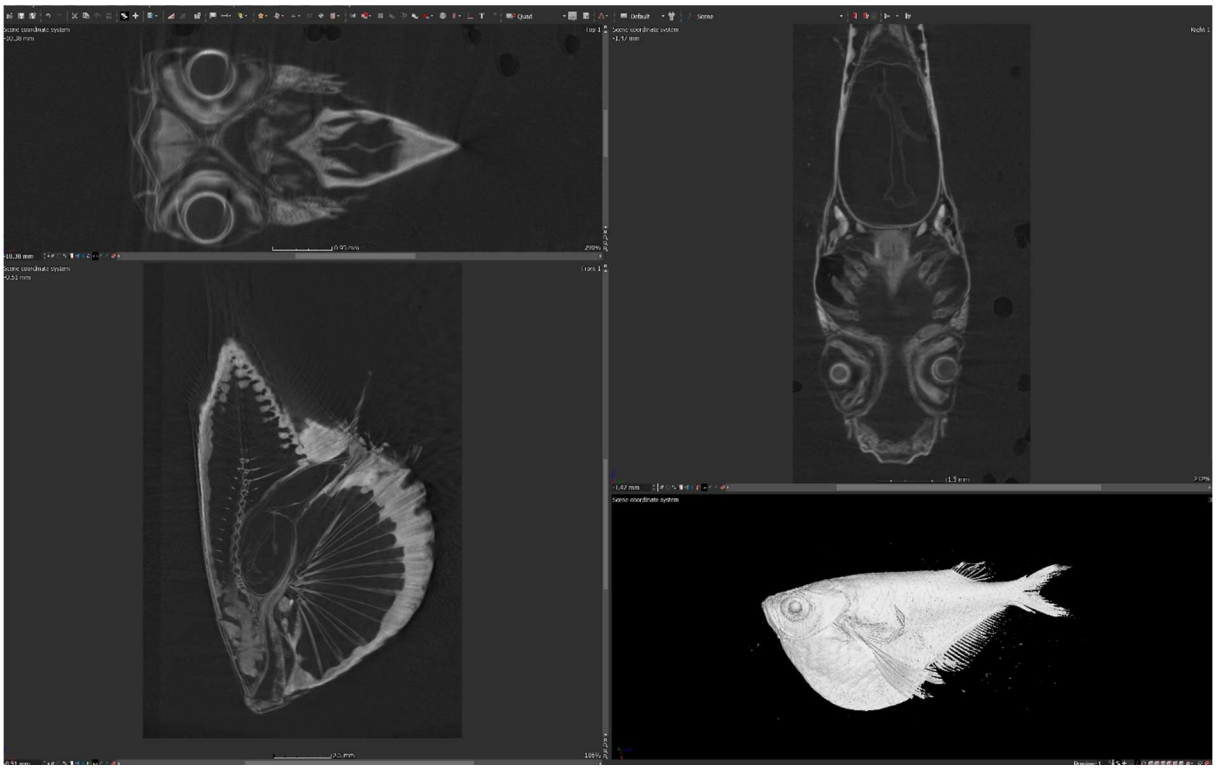
Obr. 22 *Proterorhinus* - náhledové skeny
Vlevo: barvení I2 po dobu 25 dnů, nastavení CT: 62 kV, 146 µA, 9,1 W
Vpravo: barvení I2 po dobu 25 dnů, nastavení CT: 67 kV, 173 µA, 11,6 W

5.2 Preparáty barvené PTA

Obrázek č. 23 zachycuje raka druhu *Pacifastacus leunisculus* ve frontální, transverzální a sagitální projekci. Na posledním snímku je opět vytvořen trojrozměrný model exempláře. Preparát byl barven po dobu 5 dnů v PTA. Již na první pohled je patrné, že měkké tkáně nejsou prakticky vůbec zobrazeny. Nelze diferencovat jednotlivé orgánové soustavy, svalovina je jen hrubě naznačena, žaberní systém není patrný vůbec.

Obr. 23 *Pacifastacus leunisculus* - barvení 0,3% PTA po dobu 5 dnů, opět frontální, transverzální a sagitální projekce, vpravo dole trojrozměrný model

Exemplář *Carnegiella sp.* jsme barvili v 0,3% PTA po dobu 24 h (obr. 24). Výsledné skeny jsou neostré až rozmazané. Příčinou tohoto jevu zřejmě byl nechtěný pohyb vzorku během skenování při nedostatečné fixaci preparátu. V tomto případě jsou dobře zobrazeny především tvrdé tkáně, vizualizace měkkých tkání je minimální. Z toho vyplývá, že PTA vyžaduje k dosažení lepšího kontrastu delší dobu barvení.

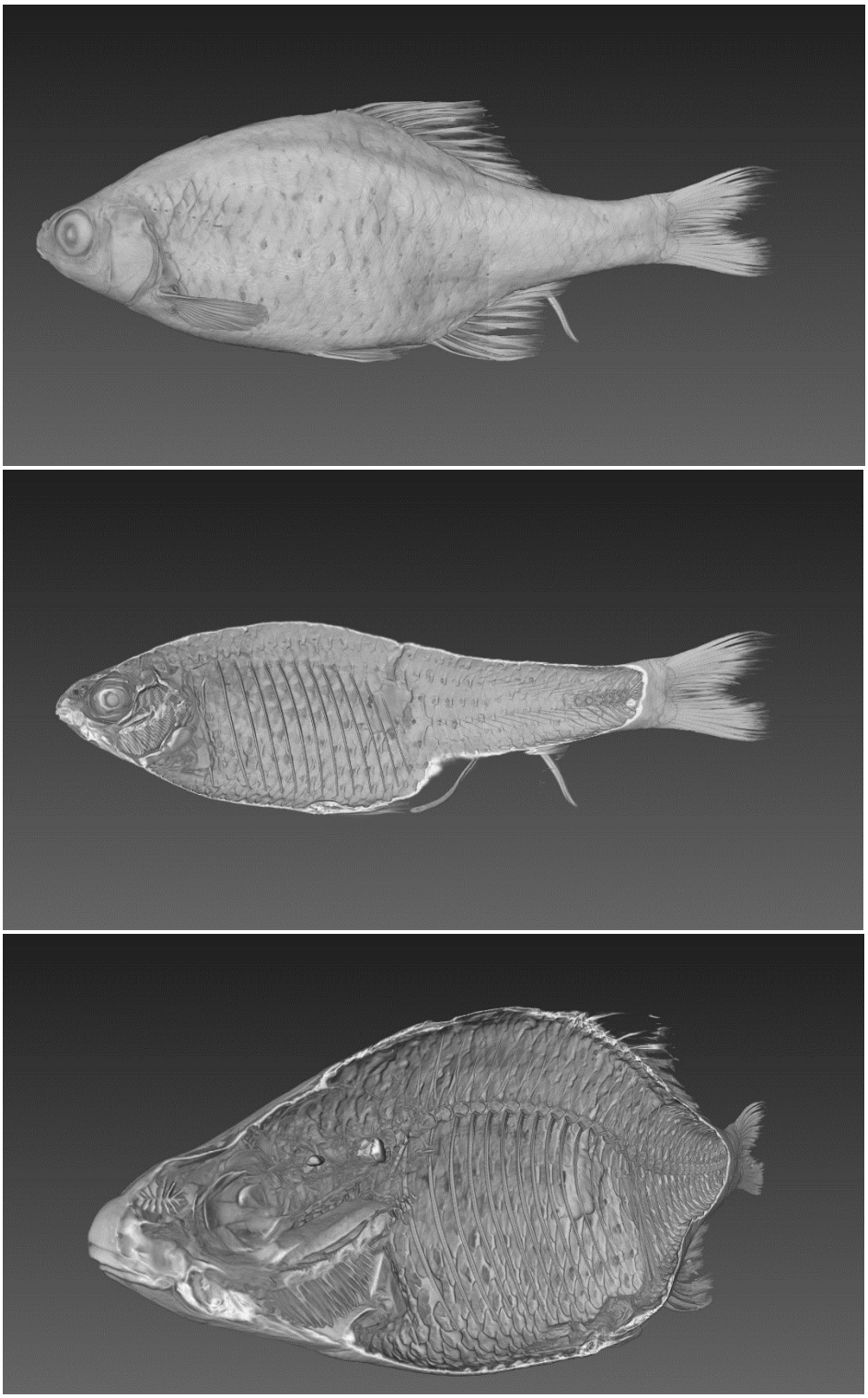


Obr. 24 *Carnegiella* - barveno v PTA po dobu 24 h

Preparát *Rhodeus sp.* byl také barven v 0,3% PTA, tentokrát po dobu 28 h (obr. 25). Vizualizace měkkotkáňových struktur je lepší než v případě *Carnegiella sp*. Ovšem i zde by mohl být výsledný efekt kvalitnější. Dobře jsou zachyceny tvrdé kostěné struktury, dále také žaberní systém, ale vnitřní orgány jsou pouze naznačeny.

Obr. 25 *Rhodeus sp.* - barveno PTA po dobu 28 h, 16 snímků na projekci

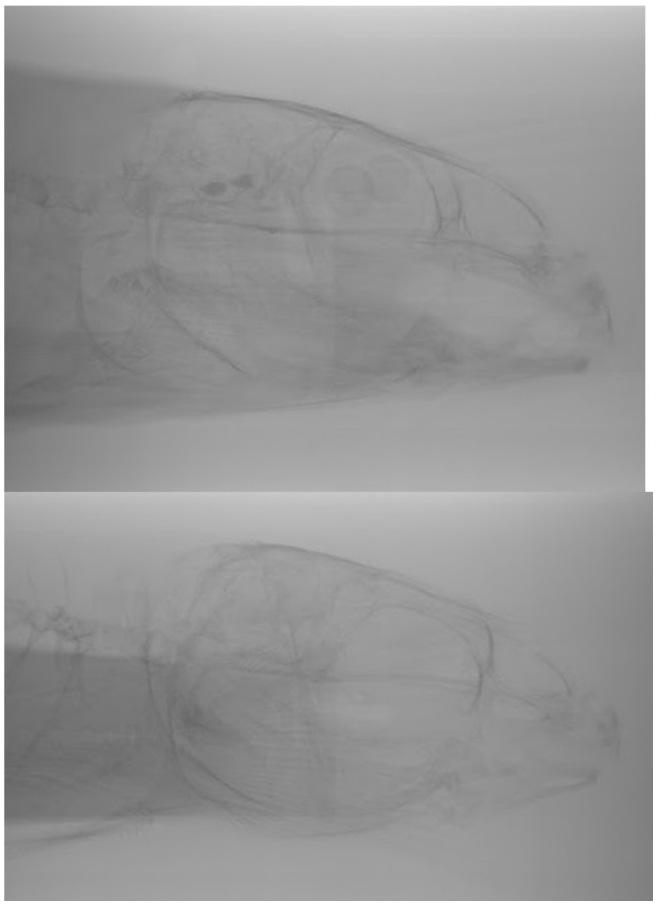
Na posledním snímku č. 26 jsou zobrazeny 3 trojrozměrné simulace *Rhodeus sp.* zhotovené v programu Avizo dle zadaných dat. Na každou projekci bylo během skenování zhotoveno 16 snímků.



Obr. 26 *Rhodeus sp.* - barveno PTA po dobu 28 h, 16 snímků na projekci, trojrozměrné řezy vytvořené v programu Avizo

5.3 Srovnání I2 a PTA

Pokud srovnáme náhled zobrazení hlavy *Gobio gobio* barvené 13 h v 1% I2 a 1% PTA (obr. 27a a 27b), je patrné již na této úrovni rychlejší pronikání jodového barviva do preparátu, protože u tohoto scanu lze identifikovat i měkké tkáňové struktury jako oční bulby a některé nervové struktury. Naopak CT náhledový sken stejného exempláře barveného 13 h v 1% PTA zobrazuje především kostěné struktury.

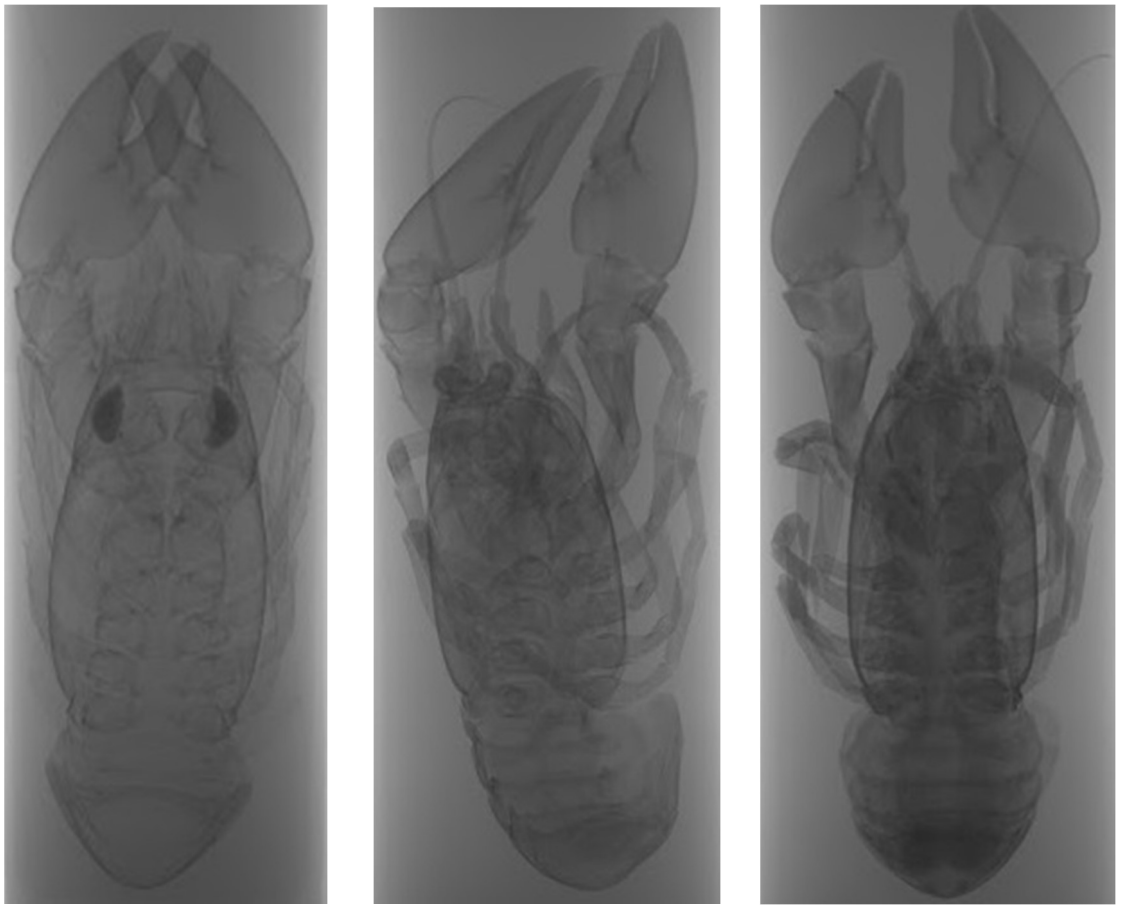


Obr. 27 a) *Gobio gobio* - hlava, barvení 1% I2 13 h, nastavení CT: 85 kV, 92 µA, 7,8 W
b) *Gobio gobio* - hlava, barvení 1% PTA 13 h, nastavení CT: 85 kV, 92 µA, 7,8 W

Ještě výraznější je srovnání náhledu celého těla *Gobio gobio* při použití obou barviv 0,3% PTA a 1% I2 po dobu 13 h (obr. 28). V případě jodové kontrastní látky je studovaný preparát podstatně sytější, měkké tkáně jsou mnohem více nasyceny kontrastním činidlem než u obdobného preparátu při použití PTA. PTA vyžaduje delší čas barvení, aby došlo k dostatečné difuzi barviva do tkání.

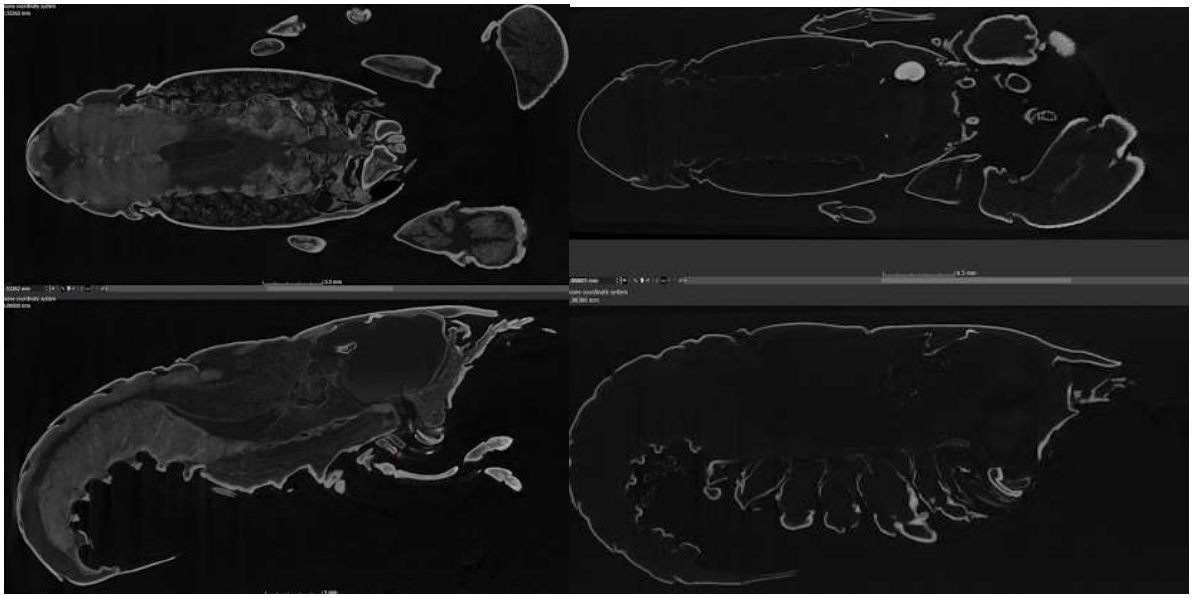
Obr. 28 *Gobio gobio* - srovnání barvení v 0,3% PTA (nahoře) s 1% I2 (dole) po dobu 13 h, nastavení CT: 85 kV, 92 µA, 7,8 W

Další srovnání obou barvících technik nabízí obrázek č. 29, který zachycuje náhledové snímky 2 druhů raků- vlevo *Pacifastacus leunisculus* barvený PTA po dobu 2 dnů a uprostřed *Orconectes limosus* barvený v I2E též po dobu 2 dnů. Zcela vpravo je zachycen náhledový sken *Orconectes limosus* barvený v jódu po dobu 5 dnů. Je patrná rozdílná sytost a probarvení tkání. Směrem doprava postupně stoupá sytost a vyšší míra kontrastu.



Obr. 29 a) *Pacifastacus leunisculus* - barvení 0,3% PTA po dobu 2 dnů
b) *Orconectes limosus* - barvení 1% I2E po dobu 2 dnů
c) *Orconectes limosus* - barvení 1% I2E po dobu 5 dnů

Na obrázku č. 30 jsou pro srovnání ještě jednou zobrazeny ve stejných projekcích skeny příbuzných druhů *Orconectes limosus* a *Pacifastacus leunisculus*, které byly barveny shodně po dobu 5 dnů, v případě *Orconectes limosus* v 1% I2E, v případě *Pacifastacus leunisculus* v 0,3% PTA. Srovnání jednoznačně vychází lépe pro metodu barvení I2E. V případě jodové kontrastní látky se zdá doba barvení 5 dnů jako dostačující. Naopak u PTA po 5 dnech nedošlo k dostatečné difuzi barviva do tkání, zobrazují se proto pouze tvrdé struktury jako vnější exoskelet.



Obr. 30 V levé polovině obrázku *Orconectes limosus* barvený 5 dnů v I2E, vpravo *Pacifastacus leunisculus* barvený 5 dnů v PTA

6 Diskuze

Na základě dostupné odborné literatury jsme ke zvýšení kontrastu zvolili 2 výše uvedené barvící metody (1% I2 v 70% roztoku ethanolu, 0,3% PTA v 70% a 96% roztoku ethanolu). Přestože bylo publikováno značné množství prací věnujících se zobrazování tkání za využití jódu i PTA, nebyla dosud jasně stanovena doporučená délka barvení, neexistuje tedy žádný univerzální protokol. Délka barvení a postup se u různých autorů liší.

Metscher 2009 ve své práci uvádí, že délka barvení není kritický faktor, pokud má kontrastní látka dostatek času proniknout do tkání. Anorganický jód v alkoholickém nebo vodném roztoku rychle difunduje do fixovaných tkání a byl schopen obarvit většinu vzorků za několik hodin nebo méně, ačkoli obarvení se obvykle provádělo přes noc. V naší práci jsme barvili 1% I2E několik preparátů. Délka barvení se pohybovala od 6 h do 30 dnů.

Nejkratší dobu byla barvena *Sepiola sp.*, totiž 6 h a 18 h. Exemplář *Gobio gobio* byl v jodovém roztoku naložen po dobu 13 h a 2 dnů, *Orconectes limosus* po dobu 2 a 5 dnů, *Cobitis laoensis* a *Proterorhinus sp.* shodně 25 dnů, preparát *Salmo trutta* byl barven nejdéle tzn. 30 dnů. Následně jsme porovnávali výsledný efekt délky barvení na kvalitu zobrazení měkkých tkání. Dospěli jsme k závěru, že skutečně stačilo několik hodin barvení, aby došlo k dostatečné difuzi barviva do tkání (v našem případě se jednalo o 6 h). Tento závěr byl ve shodě i s mnoha dalšími autory (Gignac & Kley 2014, Gignac 2016).

PTA je ovšem ve srovnání s jódem větší molekula a její prostup tkáněmi je výrazně pomalejší, proto vyžaduje delší barvící protokoly, aby bylo možné plně proniknout do hlubších tkáňových struktur a dosáhnout tak požadované kvality zobrazení (Dunmore-Buyze et al. 2014, Lesciotto et al. 2020). V našem případě jsme barvili exemplář *Gobio gobio* v PTA po dobu 13 h, *Carnegiella sp.* byla barvena 28 h, *Rhodeus sp.* 28 h, *Pacifastacus leunisculus* 2 a 5 dnů.

Provedli jsme srovnání obou technik na preparátu *Gobio gobio*, který jsme barvili po dobu 13 h oběma metodami (I2E i PTA). Výsledné skeny jsme porovnali a zjistili, že finální výsledek je zcela odlišný (obr. 30, 31). Zatímco 13 h v případě jodové kontrastní látky zcela stačilo k dostatečné difuzi barviva do tkání, v případě PTA kontrastní činidlo do měkkých tkání prakticky vůbec neproniklo. I tento nález se tedy shodoval s údaji, které jsou uváděny v pracích uvedených autorů.

Dále jsme se pokusili prokázat, jaká je nejkratší nezbytná doba barvení v případě protokolu založeném na 0,3% PTA, aby se stačily všechny tkáně dostatečně nasytit barvivem. Porovnávali jsme proto finální skeny výše uvedených preparátů barvených v PTA. V případě *Carnegiella sp.*, která byla barvena po dobu 24 h, se zobrazil především kostěný aparát a paprsčitý systém ploutví. Z měkkých tkání lze dobře diferencovat mozek a míchu. Ostatní orgánové struktury jsou pouze naznačeny. Preparát *Rhodeus sp.* byl v barvivu uložen po dobu 28 h. V tomto případě je velmi detailně zobrazen žaberní aparát a obecně struktury hlavy, vnitřní tělesné orgány se zobrazují méně sytě. Výsledek je ovšem celkově výtěžnější než v případě *Carnegiella sp*.

Pacifastacus leunisculus byl barven 2 a 5 dnů. Srovnávali jsme finální skeny barvené v PTA s příbuzným druhem *Orconectes limosus*, který byl barven stejně dlouho ovšem v I2E (obr. 33). Výsledek byl velmi odlišný. Preparát barvený jódem dosahoval vysoké kvality, lze

identifikovat všechny vnitřní orgánové soustavy. U PTA se prakticky zobrazila jen vnější schránka a další tvrdé struktury.

Přesnou délku barvení nezbytně nutnou k dosažení kvalitní vizualizace měkkých tkání u PTA se nám nepodařilo stanovit. Na základě našich výsledků bychom doporučili barvící protokoly založené na PTA v délce nejméně několika dnů, lépe několika týdnů.

Du Plessis et al. 2017 doporučuje ve své práci používat pro biologické vzorky napětí v rozmezí 30 - 100 kV. Gignac et al. 2016 ve své práci porovnává studie 38 autorů, kteří studovali pomocí diceCT tkáně rozmanitých živočišných druhů různé velikosti. Hodnota proudu v těchto pracích oscilovala od 43 do 500 µA. V našem případě se energie paprsku pohybovala v rozmezí 60 - 85 kV, intenzita proudu 92 - 175 µA a síla v rozmezí 7,9 - 11,7 W.

Porovnávali jsme vliv odlišného nastavení rentgenového paprsku na výslednou kvalitu zobrazení u preparátu *Cobitis laoensis*, který byl barven 25 dnů jodovým kontrastním činidlem. Signifikantní rozdíl ovšem nebyl prokázán (obr. 21). Obdobný pokus jsme provedli v případě exempláře *Proterorhinus sp*., který byl též barven po dobu 25 dnů jódem. V prvním případě jsme použili nastavení CT: 62 kV, 146 µA, 9,1 W, v druhém případě 67 kV, 173 µA, 11,6 W. Výsledné skeny byly prakticky identické kvality.

Vzorky, které byly použity v naší práci, dosahovaly poměrně malých rozměrů cca do 10 cm velikosti (vyjma *Salmo trutta*), volili jsme proto nízké koncentrace kontrastních látek. Vyšší koncentrace barvicího roztoku a delší doba barvení jsou možnosti pro zlepšení kontrastu tkáně, ale často vedou ke zvýšenému smršťování tkáně a jejich potenciální deformaci (Degenhardt et al. 2010; Descamps et al. 2014; Gignac & Kley 2014). Dullin et al. 2017 uvádějí, že vyšší rychlost difúze a penetrace jódu mohou snížit ostrost obrazu tím, že způsobí rozmazání mezi tkáňovými rozhraními. Naopak pozvolný průnik PTA díky své větší molekulové velikosti může přispět ke zlepšení kontrastu na rozhraních mezi tkáněmi.

V naší studii jsme nepozorovali zhoršenou kvalitu obrazu v případě použití delších barvících protokolů založených na jódu ani PTA. Delší doba barvení byla naopak nezbytná pro dosažení dostatečné difuze PTA do tkání. Nezaznamenali jsme ani významné nežádoucí smrštění tkání či jiné deformity. Příčinou tohoto jevu bylo zřejmě použití ethanolového roztoku o stejné koncentraci, ve kterém byly exempláře umístěny během skenování. Tento faktor zabránil vysychání tkání.

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na možnosti využití barvících technik založených na účinku látek s obsahem jódu a wolframu na zvýšení kontrastu a tím zlepšení vizualizace měkkých tkání v mikrotomografii. Na několika preparátech ze sbírky Katedry zoologie a rybářství České zemědělské univerzity v Praze ze skupiny rybovitých obratlovců, korýšů a měkkýšů byly použity 2 barvící metody (1% I2 v ethanolovém roztoku, 1% a 0,3% PTA v ethanolovém roztoku). Porovnávali jsme obě metody, sledovali efekt délky barvení na výslednou kvalitu skenů, zjišťovali jsme též vliv parametrů skenování na kvalitu zobrazení finálních skenů. Na závěr jsme v programu Avizo sestavovali trojrozměrné modely preparátů.

Prokázali jsme, že kontrastní látky založené na bázi jódu, pronikají do měkkých tkání výrazně rychleji než kyselina fosfowolframová. K dostatečné difuzi barviva v našem případě stačilo 6 hodin. Pokud byla délka barvení prodloužena, lehce se zvýšila výsledná sytost tkání. Tkáně se ale v určitý moment barvivem saturovaly a další prodloužení barvení nemělo významný efekt. Nepozorovali jsme ani významné smrštění tkáně během delších barvících protokolů a následném skenování. Příčinou bylo zřejmě použití alkoholového roztoku o stejné koncentraci jako vlastní barvivo, ve kterém byly vzorky umístěny během skenování. Nedocházelo tak k nežádoucímu vysychání tkání.

Kyselina fosfowolframová má větší molekulu a vyžaduje proto delší barvící protokoly. Proniká pomaleji do tkání a je nutné barvit vzorky minimálně několik dnů, lépe týdnů. S delší dobou barvení stoupala výsledná kvalita skenů.

Dále jsme sledovali vliv nastavení parametrů skenování na výslednou kvalitu obrazu. Hodnoty napětí, proudu a výkonu jsme upravovali dle prací autorů uvedených výše. Signifikantní rozdíl ve výsledném zobrazení jsme ovšem nepozorovali.

Použití kontrastních látek na bázi jódu a wolframu ke zlepšení vizualizace není ve vědeckém světě nic nového, zejména anatomie hlodavců a myších embryií byla tímto způsobem dokonale prostudována. V oblasti zoologie vodních živočichů ale tolik studií dosud provedeno nebylo. Naše práce měla za cíl rozšířit použití mikrotomografie a barvících metod ke zvýšení kontrastu a vizualizace především v rámci studentské akademické obce.

8 Literatura

Balint R, Lowe T, Shearer T. 2016. Optimal contrast agent staining of ligaments and tendons for x-ray computed tomography. PLoS ONE 11 (e0153552) DOI: 10.1371/journal.pone.0153552.

Baverstock H, Jeffery NS, Cobb SN. 2013. The morphology of the mouse masticatory musculature. J Anat **223**:46–60.

Broeckhoven C, Du Plessis A, Le Roux SG, Hui C. 2016. Beauty is more than skin deep: a non-invasive protocol for in vivo anatomical study using micro-CT. Methods in Ecology and Evaluation **8**:358-369.

Buytaert J, Goyens J, De Greef D, Aerts P, Dirchx J. 2014. Volume shrinkage of bone, brain, and muscle tissue in sample preparation from microCT and LSFM. Microsc Microanal **20**:1208–1217.

Camilieri-Asch V, Shaw JA, Mehnert A, Yopak KE, Partridge JC, Collin SP. 2020. DiceCT: a valuable technique for study the nervous system of fishes. ENEURO 20. DOI:10.1523/ENEURO.0076-20.2020.

De Bournonville S, Vangrunderbeeck S, Kerckhofs G. 2019. Contrast-Enhanced MicroCT for Virtual 3D Anatomical Pathology of Biological Tissues: A Literature Review. Contrast Media & Molecular Imaging (e8617406) DOI: 10.1155/2019/8617406.

Degenhardt K, Wright AC, Horng D, Padmanabhan A, Epstein JA. 2010. Rapid 3D phenotyping of cardiovascular development in mouse embryos by micro-CT with iodine staining. Circulation: Cardiovascular Imaging **3**:314–322.

Descamps E, Sochacka A, De Kegel B, Van Loo D, Van Hoorebeke L, & Adriaens D. 2014. Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning. Belgian Journal of Zoology **144**:20-40.

Disney CM, Madi K, Bodey AJ, Lee PD, Hoyland JA, Sherratt MJ. 2017. Visualising the 3D microstructure of stained and native intervertebral discs using X-ray microtomography. Scientific Report 7 (e16279) DOI: 10.1038/s41598-017-16354-w.

Dougherty LR, Rahman IA, Burdfield-Steel ER, et al. 2015. Experimental reduction of intromittent organ length reduces male reproductive success in a bug. Proc Royal Sociaty B 282 (e20150724) DOI: 10.1098/rspb.2015.0724.

Dullin C, Ufartes R, Larsson E, Martin S, Lazzarini M, Tromba G, Missbach-Guentner J, Pinkert-Leetsch D, Katschinski DM, Alves F. 2017. µCT of ex-vivo stained mouse hearts and

embryos enables a precise match between 3D virtual histology, classical histology and immunochemistry. PLoS ONE 12 (e0170597) DOI: 10.1371/journal.pone.0170597.

Dunmore-Buyze PJ, Tate E, Xiang F, Detombe SA, Nong Z, Pickering G, Drangova M. 2014. Three-dimensional imaging of the mouse heart and vasculature using micro-CT and whole-body perfusion of iodine or phosphotungstic acid: vascular tissue visualization with perfusion technique. Contrast Media & Molecular Imaging **9**:383-390.

Du Plessis A, Broeckhoven C, Guelpa A, le Roux SG. 2017. Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. Gigascience **6**:1-11.

Fernández R, Kvist S, Lenihan J, et al. 2014. Sine systemate chaos? A versatile tool for earthworm taxonomy: non-destructive imaging of freshly fixed and museum specimens using micro-computed tomography. PLoS ONE 9 (e96617) DOI: 10.1371/journal.pone.0096617.

Gignac PM, Kley NJ. 2014. Iodine-enhanced micro-CT imaging: methodological refinements for the study of the soft-tissue anatomy of post-embryonic vertebrates. Journal of Experimental Zoology **322**:166-176.

Gignac PM, Kley NJ, Clarke JA, Colbert MW, Morhardt AC, Cerio D, Cost IN, Cox PG, Daza JD, Early CM, Echols MS, Henkelman RM, Herdina AN, Holliday CM, Li Z, Mahlow K, Merchant S, Müller J, Orsbon CP, Paluh DJ, Thies ML, Tsai HP, Witmer LM. 2016. Diffusible iodine-based contrast-enhanced computed tomography (diceCT): an emerging tool for rapid, high-resolution, 3-D imaging of metazoan soft tissues. Journal of Anatomy **228**: 889-909.

Gignac PM, Kley NJ. 2018. The Utility of DiceCT Imaging for High-Throughput Comparative Neuroanatomical Studies. Brain Behavior and Evolution **91**:180-190.

Glasser O. 1993. Wilhelm Conrad Röntgen and the Early History of the Roentgen Rays. Norman Publishing, San Francisco.

Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. 2015. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. Journal of Clinical and Experimental Hepatology **5**:246-255.

Hopkins TM, Heilman AM, Liggett JA, et al. 2015. Combining micro-computed tomography with histology to analyze biomedical implants for peripheral nerve repair. Journal of Neuroscience Methods **255**:122-130.

Huisken J, Stainier DYR. 2009. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. Development **12**:1963-1975.

Jeffery NS, Stephenson RS, Gallagher JA, Jarvis JC, Cox PG. 2011. Micro-computed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. Journal Biomechanics **44**:189-192.

Kalender WA. 2006. X-ray computed tomography. Physics in Medicine and Biology **51**:29-43.

Kramme R, Hoffmann KP, Pozos RS. 2011. Springer Handbook of Medical Technology. Springer, Heidelberg.

Krings M, Müller H, Heneka M, Rödder D. 2017. Modern morphological methods for tadpole studies: a comparison of micro-CT, and clearing and staining protocols modified for frog larvae. Biotechnic & Histochemistry **92**:595-605.

Lautenschlager S, Bright JA, Rayfield EJ. 2014. Digital dissection - using contrast-enhanced computed tomography scanning to elucidate hard- and soft-tissue anatomy in the Common Buzzard Buteo buteo. Journal of Anatomy **224**:412-431.

Lesciotto KM, Motch Perrine SM, Kawasaki M, Stecko T, Ryan TM, Kawasaki K, Ritschmeier JT. 2020. Phosphotungstic acid enhanced microCT: optimized protocols for embryonic and early postnatal mice. Developmental Dynamics **249**: 573–585.

Li Z, Ketcham RA, Yan F, Maisano JA, Clarke JA. 2016. Comparison and Evaluation of the Effectiveness of Two Approaches of Diffusible Iodine-Based Contrast-Enhanced Computed Tomography (diceCT) for Avian Cephalic Material. Journal of Experimental Zoology Part B **326**: 352-362.

Martykánová E. 2007. Rtg záření, jeho vlastnosti a využití [MSc. Thesis]. Masarykova univerzita, Brno.

Metscher BD. 2009. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. BMC Physiology 9 (e19545439) DOI: 10.1186/1472-6793-9-11.

Metscher BD. 2011. X-Ray Microtomographic Imaging of Intact Vertebrate Embryos. Cold Spring Harb Protocols 12 (e067033) DOI: 10.1101/pdb.prot067033.

Mizutani R, Suzuki Y. 2012. X-ray microtomography in biology. Micron **43**:104-115.

Navrátil L, Rosina J. 2019. Medicínská biofyzika. Grada, Praha.

Nierenberger M, Rémond Y, Ahzi S, Choquet P. 2015. Assessing the three-dimensional collagen network in soft tissues using contrast agents and high resolution micro-CT: application to porcine iliac veins. Comptes Rendus Biologies **338**:425-433.

Pauwels E, Van Loo D, Cornillie P, Brabant L, Van Hoorebeke L. 2013. An exploratory study of contrast agents for soft tissue visualization by means of high resolution X-ray computed tomography imaging: contrast agents for soft tissue visualization with microCT. Journal of Microscopy **250**:21-31.

Peterová V. 2010. CT- základy vyšetření, indikace, kontraindikace, možnosti, praktické zkušenosti. Medicína pro praxi **7**:90-94.

Rieckher M, Birk UJ, Meyer H, Ripoll J, Tavernarakis N. 2011. Microscopic Optical Projection Tomography In Vivo. PLoS ONE 6 (e18963) DOI: 10.1371/journal.pone.0018963.

Ritman EL. 2011. Current Status of Developments and Applications of Micro-CT. Annual Review of Biomedical Engineering **13**:531-552.

Rosina J, Vránová J, Kolářová H, Stanek J. 2013. Biofyzika: Pro zdravotnické a biomedicínské obory. Grada, Praha.

Santi PA. 2011. Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review. Journal of Histochemistry and Cytochemistry **59**:129-138.

Seeram E. 2015. Computed Tomography - E-Book: Physical Principles, Clinica Applications, and Quality Control. Elsevier Health Sciences.

Silva de Se JM, Zanette I, Noël PB, Cardoso MB, Kimm MA, Pfeiffer F. 2015. Three-dimensional non-destructive soft-tissue visualization with X-ray staining micro-tomography. Scientific Reports 5 (e14088).

Singhal A, Grande JC, Zhou Y. 2013. Micro/Nano-CT for Visualization of Internal Structures. Microscopy Today **21**:16-22.

Smith DB, Bernhardt G, Raine NE, Abel RL, Sykes D, Ahmed F, Pedroso I, Gill RJ. 2016. Exploring miniature insect brains using micro-CT scanning techniques. Scientific Report 6 (e21768) DOI: 10.1038/srep21768.

Sumner-Rooney L, Kenny NJ, Ahmed F, Williams ST. 2019. The utility of micro-computed tomography for the nondestructive study of eye microstructure in snails. Scientific Reports 9 (e15411) DOI: 10.1038/s41598-019-51909-z.

Tahara R, Larsson HCE. 2013. Quantitative analysis of microscopic X-ray computed tomography imaging: Japanese quail embryonic soft tissues with iodine staining. Journal of Anatomy **223**:297–310.

Tesařová M, Zikmund T, Kaucká M, Adameyko I, Jaros J, Palousek D, Skaroupka D, Kaiser J. 2016. Use of micro computed-tomography and 3D printing for reverse engineering of mouse

embryo nasal capsule. Journal of Instrumentation 11 (eC03006) DOI: 10.1088/1748-0221/11/03/C03006.

Tran MP. 2012. 3D image analysis with variational methods and wavelets-Applications to medical image processing [PhD Thesis]. University of Orléans. Orléans.

Tsai HP, Holliday CM. 2011. Ontogeny of the alligator cartilago transiliens and its significance for sauropsid jaw muscle evolution. PLoS ONE 6 (e24935) DOI: 10.1371/journal.pone.0024935.

Vickerton P, Jarvis J, Jeffery N. 2013. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. Journal of Anatomy **223**: 185-193.

Zikmund T, Novotná M, Kavková M, Tesařová M, Kaucka M, Szarowska B, Adameyko I, Hruba E, Buchtova M, Drazanova E, Starcuk Z, Kaiser J. 2018. High-contrast differentiation resolution 3D imaging of rodent brain by X-ray computed microtomography. Journal of instrumentation 13 (C02039) DOI: 10.1088/1748-0221/13/02/C020.