



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

# RENTGENOVÁ POČÍTAČOVÁ TOMOGRAFIE EMBRYA MYŠI

X-RAY COMPUTED TOMOGRAPHY OF MOUSE EMBRYO

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARIE ŠEJNOHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. RADIM KOLÁŘ, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
**Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

**Studentka:** Bc. Marie Šejnohová

**ID:** 137261

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2014/2015

## NÁZEV TÉMATU:

### Rentgenová počítačová tomografie embrya myši

#### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s anatomíí dodaných biologických vzorků a zaměřte se na jejich přípravu vzorků pro rentgenovou počítačovou tomografii. 2) Dále prostudujte a popište dostupné mikroCT systémy. 3) Realizujte tomografická měření vzorků různého embryonálního stádia myši. 4) Vyhodnoťte kvalitu získaných CT dat z různých systémů s ohledem na následnou segmentaci chrupavčité části embrya. 5) Navrhněte postup segmentace oblasti chrupavky s cílem vytvořit 3D model chrupavky. Tento úkol realizujte na CT datech pro jeden zvolený CT systém. 6) Výsledný 3D model porovnejte s manuálně segmentovaným modelem a dosažené výsledky diskutujte.

#### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HSIEH, J. Computed tomography : principles, design, artifacts, and recent advances, Wiley, 2009.

[2] GONZALEZ, R. a R. WOODS. Digital image processing, Prentice Hall, 2008.

**Termín zadání:** 9.2.2015

**Termín odevzdání:** 22.5.2015

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

**Konzultanti diplomové práce:** Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D.

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

#### UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **ABSTRAKT**

Jedním z cílů diplomové práce je porovnání možností dostupných mikro-CT. Teoretická část se zabývá možnostmi barvení měkkých tkání a embryí z důvodu zvýšení kontrastu mikro-CT snímků u těchto tkání. Dále se zde popisují zdroje záření a detektory dostupných mikro-CT systémů. V praxi bylo realizováno barvení embrya ve spolupráci s Ústavem embryologie a histologie v Brně. Následně proběhlo skenování na stanici v Brně na FSI, v Praze na ČVUT a synchrotronu Elettra v Itálii. V práci jsou popsána měření embrya myši pomocí výše uvedených zařízení a výsledky porovnány. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na mikro-CT v Brně, kde se využívá rentgenová trubice a flat panel detektor. Tyto snímky se použily pro segmentaci chrupavčité tkáně čichového ústrojí pomocí metody 3D region growing. Z výsledných dat byly vytvořeny 3D modely za účelem porovnání s manuálně segmentovaným modelem. Poloautomatickou segmentací se dosahuje méně přesných výsledků, ale z hlediska časové náročnosti je tato metoda vhodnější.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mikro-CT, barvení, embryo, 3D narůstání oblastí, adaptivní prahování, analýza obrazů

## **ABSTRACT**

The aim of this semestral thesis is to compare the possibilities of available micro-CT systems. Theoretic part of this thesis there deals with possibilities of staining soft tissues and embryos because of enhancement the contrast of micro-CT images. Here follows a description of sources X-ray and detectors of available micro-CT systems. In practice there was realized the staining of embryo in cooperation with Department of histology and embryology in Brno. Then followed a measuring on FSI in Brno, ČVUT in Prague and synchrotron Elettra in Italy. In semestral thesis are described of the thesis there are compared the micro-CT systems and results of measuring embryos by means of presented systems and results are compared. The best results were obtained on micro-CT in Brno, where X-ray tube and flat panel detector were used. This images were used for a segmentation of cartilage olfactory system by means of 3D region growing. From results they were created 3D models for comparison with a manually segmented model. A less accurate results were obtain with the semi-automatic segmentation but this method isn't too time-consuming.

## **KEYWORDS**

mikro-CT, staining, embryo, 3D region growing, adaptive thresholding, image analysis

ŠEJNOHOVÁ, M. Rentgenová počítačová tomografie embrya myši.

Brno: FEKT VUT v Brně, Ústav Biomedicínského inženýrství, 2015. 83 s.

Vedoucí práce doc. Ing. Radim Kolář, konzultant Ing. Tomáš Zikmund.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Rentgenová počítačová tomografie embrya myši jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení §11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. Díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

podpis autora.....

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Ph.D Radimu Kolářovi a konzultantovi práce Ing. Tomášovi Zikmundovi za odborné vedení, trpělivost, konzultace a jejich cenné rady. Také bych chtěla poděkovat Ing. Tomášovi Zikmundovi za pomoc při skenování v Brně a v Itálii na synchrotronu. Dále chci poděkovat M. Kaucké za dodání laboratorních embryí myši a J. Jarošovi a D. Střítecké za spolupráci při barvení. Poděkování patří i pracovníkům z Ústavu technické a experimentální fyziky ČVUT v Praze, kteří se podíleli na realizaci měření nebo rekonstrukci dat, jmenovitě J. Žemličkovi, J. Dudákovi, F. Krejčímu a C. Granjovi.

Brno .....

podpis.....

# Obsah

Úvod.....	9
1 Barvení měkkých tkání .....	10
1.1 Metody barvení měkkých tkání .....	10
1.2 Barvení embryí pomocí PTA.....	11
2 Mikro tomografie .....	12
2.1 Zdroje záření.....	13
2.1.1 Mikroohniskové rentgenové zdroje .....	13
2.1.2 Synchrotronové záření .....	14
2.2 Detektory záření .....	18
2.2.1 Flat panel.....	19
2.2.2 CCD detektor .....	21
2.2.3 detektory rodiny Medipix .....	22
3 Cíle práce.....	24
3.1 Příprava vzorků.....	25
3.2 Mikro-CT laboratoř v Brně.....	28
3.3 Mikro-CT na ČVUT v Praze .....	29
3.3.1 Měření embryí.....	29
3.4 Synchrotron Elettra-Stanice Syrmep .....	32
3.4.1 Pracovní stanice SYRMEP .....	32
4 Porovnání kvality získaných dat z jednotlivých mikro-CT systémů.....	34
5 Segmentace obrazu.....	39
5.1 Předzpracování obrazu pro segmentaci .....	39
5.1.1 Transformace kontrastu.....	40
5.1.2 Potlačení šumu .....	44
5.1.3 Ostření obrazu .....	47
5.1.4 Cannyho detektor hran .....	50
5.2 Používané metody segmentace CT snímků .....	51
6 Narůstání oblastí: semínková metoda .....	52

6.1 Implementace metody ve 3D .....	53
6.1.1 Adaptivní prahování .....	56
6.1.2 Nevhodnost rekurzivního algoritmu na větší objem dat .....	58
7 Morfologické operace .....	59
7.1 Morfologie binárních obrazů .....	59
7.2 Morfologie šedotónových obrazů .....	62
8 Hodnocení výsledků segmentace .....	63
8.1 Porovnání výsledků pro vzorek dat .....	63
8.1.1 Porovnání na základě předzpracování .....	63
8.1.2 Porovnání na základě adaptivního prahování .....	69
8.1.3 Porovnání na základě morfologických operací .....	72
8.2 Rozšíření algoritmu na větší objem dat .....	74
9 Vytvoření a hodnocení 3D modelů .....	76
10 Závěr .....	79
Seznam literatury .....	81
Seznam symbolů, veličin a zkratk .....	83

## Seznam obrázků

Obr. 1: Zrekonstruované a graficky upravené embryo E14.....	9
Obr. 1. 1: Kontrasty embrya získaných pomocí různých barviv [2].....	11
Obr. 2. 1: Mikro-CT systém.....	12
Obr. 2. 2: a) Reflexní terč, b) Transmisní terč [8].....	14
Obr. 2. 3: Jednotlivé části synchrotronu.....	16
Obr. 2. 4: Ohybový magnet.....	17
Obr. 2. 5: Undulátor.....	17
Obr. 2. 6: Ukázka beamlajnu synchrotronu.....	18
Obr. 2. 7: a) Lineární detektor, b) Plošný detektor.....	19
Obr. 2. 8: Flat panel a) s nepřímou konverzí, b) s přímou konverzí [14].....	20
Obr. 2. 9: CCD detektor [13].....	21
Obr. 2. 10: a) přemísťování elektronů z jednoho pixelu na druhý.....	21
Obr. 2. 11: Princip detektoru Medipix [11].....	22
Obr. 2. 12: Metoda „Bump bonding“ [11].....	23
Obr. 2. 13: Detektor Timepix [11].....	24
Obr. 3. 1: Model čichového systému vytvořený v Avizu.....	25
Obr. 3. 2: Zrekonstruované embryo E14 (zobrazeno ve VG Studiu).....	26
Obr. 3. 3: Zrekonstruované embryo E16.....	26
Obr. 3. 4: Zrekonstruované embryo P1.....	27
Obr. 3. 5: a) Nenabarvené E14 v plastové trubičce zalité agaróza gelem.....	27
Obr. 3. 6: Sagitální řez naskenovaného čtrnáctidenního embrya E14.....	28
Obr. 3. 7: Radiografické snímky embrya ve formě tzv. dlaždic.....	30
Obr. 3. 8: Korigovaná data jednotlivých subakvizic E14.....	31
Obr. 3. 9: Zrekonstruovaná data nabarveného embrya E14.....	31
Obr. 3. 10: E145 a E155 po uskutečnění měření na synchrotronu (zleva).....	33
Obr. 3. 11: Sagitální řez E14 po rekonstrukci a korekcích dat ze synchrotronu.....	33
Obr. 3. 12: Transverzální řez E14 po rekonstrukci a korekcích dat ze synchrotronu.....	33
Obr. 4. 1: a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya.....	34
Obr. 4. 2: a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya.....	35
Obr. 4. 3: a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya.....	36
Obr. 4. 4: Detail chrupavky čichového systému z obr. 4. 1b.....	37
Obr. 4. 5: Detail chrupavky čichového systému z obr. 4. 2b.....	37
Obr. 4. 6: Detail chrupavky čichového systému z obr. 4. 3b.....	38
Obr. 5. 1: Předzpracování pomocí operátorů: (a) bodový, (b) lokální, (c) globální.....	40



Obr. 5. 2: Transformační funkce pro negativ.....	40
Obr. 5. 3: Transformace na negativ: (a) originál, (b) negativ.....	41
Obr. 5. 4: Transformace snímku: (a) ekvalizace, (b) lineární transformace.....	42
Obr. 5. 5 Exponenciální transformace s použitím základu: (a) $b=15$ , (b) $b=0,01$ .....	43
Obr. 5. 6: Gama korekce s hodnotou parametru: (a) $\gamma=0,7$ ; (b) $\gamma=2,5$ .....	44
Obr. 5. 7: Odstranění Gaussovského šumu: (a) pomocí masky (5. 8).....	46
Obr. 5. 8: Odstranění impulzního šumu mediánovým filtrem: (a) velikost masky 3x3, (b) velikost masky 5x5.....	47
Obr. 5. 9: Ostření odečtením rozostřeného obrazu: (a) rozostřený obraz, (b) detaily originálu, (c) zostřený obraz, (d) přičtení zostřeného obrazu k originálu.....	48
Obr. 5. 10: Ostření pomocí lokálních operátorů: (a) využití masky (5. 11) , (b) využití masky (5.12).....	49
Obr. 5. 11: Ostření ve frekvenční oblasti: (a) potlačení nízkých frekvencí originálu.....	50
Obr. 5. 12: Použití Cannyho detektoru: (a) binární obraz s hranami, (b) výsledný obraz po sečtení binárního obrazu a váhovaného originálu.....	51
Obr. 6. 1: Narůstání oblastí s využitím: (a) statického kritéria, (b) dynamického kritéria.....	53
Obr. 6. 2 Vývojový diagram hlavního programu.....	54
Obr. 6. 3 Vývojový diagram podprogramu: Region growing.....	55
Obr. 6. 4: Výsledky segmentace s počítáním prahu v okolí seedu o velikosti: (a) 7x7 pixelů, (b) 11x11 pixelů, (c) 17x17 pixelů, (d) 39x39 pixelů.....	57
Obr. 6. 5: Schématické znázornění okrajových částí obrazu (šedá barva) a přizpůsobení.....	58
Obr. 7. 2: Morfologická operace binární eroze: (a) binární obraz vysegmentované chrupavky před úpravou, (b) výsledný erodovaný obraz.....	60
Obr. 7. 3: Morfologická operace binární dilatace: (a) binární obraz vysegmentované chrupavky před úpravou, (b) výsledný dilatovaný obraz.....	61
Obr. 7. 4: Morfologické operace: (a) otevření, (b) uzavření.....	62
Obr.8. 1: výsledek segmentace bez předzpracování.....	63
Obr.8. 2: Výsledek segmentace s použitím mediánového filtru: (a) velikost masky 3x3, (b) velikost masky 5x5.....	64
Obr.8. 3: Výsledek segmentace s použitím průměrovací masky: (a) velikosti 3x3, (b) velikosti 5x5, (c) velikosti 5x5 , (d) velikosti 3x3 a následně mediánový filtr 3x3.....	65
Obr.8. 4: Výsledek segmentace s použitím exponenciální transformace o základu: (a) $b=2$ , (b) $b=4$ , (c) $b=6$ .....	66
Obr.8. 5: Výsledek segmentace s použitím gama korekce: (a) $\gamma=0,5$ ; (b) $\gamma=0,6$ ; (c) $\gamma=1,5$ ; (d) $\gamma=2,5$ . 67	67
Obr.8. 6: Výsledek segmentace s použitím: (a) ekvalizace, (b) ekvalizace a následně mediánové filtrace s velikostí masky 3x3.....	68
Obr.8. 7: Využití Cannyho detektoru hran: (a) předzpracovaný snímek, (b) segmentace bez Cannyho detektoru, (c) segmentace s Cannyho detektorem.....	69

Obr.8. 8: Vliv tolerance na adaptivní prahování (horní mez=0,0065): (a) dolní mez=0,004, (b) dolní mez=0,0065, (c) dolní mez=0,007.....	70
Obr.8. 9: Vliv tolerance na adaptivní prahování (dolní mez=0,0065): (a) horní mez=0,004, (b) horní mez=0,0065, (c) horní mez=0,009.....	71
Obr.8. 10: Převedení původní masky na binární (hodnoty 2 změněny na 1): (a) původní maska, (b) binární maska, (c) aplikace uzavření použita na binární masku, (d) následná aplikace dilatace.....	73
Obr.8. 11: Převedení původní masky na binární (hodnoty 1 a 2 změněny na 1): (a) binární maska, (b) aplikace uzavření na binární masku, (c) následné vynásobení s originálním snímkem.....	74
Obr.8. 12: Testování 3D region growing na: (a) 50 snímků, (b) 100 snímků, (c) 150 snímků, (d), 200 snímků, (e) 250 snímků, (f) 300 snímků.....	75
Obr. 9. 1: Zobrazení výsledných 3D modelů mutovaného embrya: (a) manuálně segmentovaný referenční model, (b) segmentace po 10 snímcích, (c) segmentace po 20 snímcích, (d) segmentace po 30 snímcích, (e) segmentace po 40 snímcích, (f) segmentace po 50 snímcích.....	77
Obr. 9. 2: Zobrazení výsledných 3D modelů čtrnáctidenního embrya: (a) manuálně segmentovaný referenční model, (b) segmentace po 10 snímcích, (c) segmentace po 20 snímcích, (d) segmentace po 30 snímcích, (e) segmentace po 40 snímcích, (f) segmentace po 50 snímcích.....	78

# Úvod

Práce se zabývá porovnáním možností dostupných mikro-CT systémů a realizací skenování měkkých tkání s využitím těchto zobrazovacích zařízení. Měkké tkáně přirozeně nelze zobrazit pomocí absorpce rentgenového záření. Ke zvýšení kontrastu se uvádí několik barvicích metod. Pro mikro-CT zobrazení měkkých tkání se dosud nejvíce využívá anorganický jód a kyselina fosfowolframová (PTA).

Pro měření byla k dispozici embrya laboratorních myší různých vývojových stádií. Účelem měření těchto biologických vzorků bylo pozdější zkoumání vývoje struktur chrupavčité tkáně. Embrya se barvila pomocí PTA, protože tato kyselina patří mezi osvědčené všestranné a silné kontrastní barvivo. Po nabarvení byla jednotlivá embrya umístěna v plastových trubičkách a zalita agarozovým gelem z důvodu fixace vzorku při skenování.

Tomografické měření se uskutečnilo v mikro-CT laboratoři na Fakultě strojního inženýrství v Brně, v Praze na Ústavu technické a experimentální fyziky ČVUT a na synchrotronu Elettra v Itálii. V Praze i v Brně se využívá jako zdroj rentgenového záření rentgenová trubice. Na synchrotronu je zdrojem synchrotronové záření, které produkuje rentgenové paprsky ve směru tečny pohybujících se elektronů. Jako detektory byly pro měření použity flat panel v Brně, CCD detektor v Itálii na synchrotronu a speciální detektor rodiny Medipix v Praze na ČVUT. Na Obr. 1 se nachází ukázka již zrekonstruovaného a graficky upraveného čtrnáctidenního embrya (E14), které bylo skenováno na mikro-CT stanici v Brně.

Následující kapitoly se nejdříve věnují metodám barvení měkkých tkání pro mikro-CT a teoretickým popisem zdrojů a detektorů využitých při skenování. Dále je popsána realizace měření na jednotlivých mikro-CT systémech společně s prezentovanými výsledky. Nejlepší výsledek je vybrán pro segmentaci pomocí metody 3D region growing, z výsledných dat vytvořeny 3D modely a porovnány s referenčním manuálně segmentovaným modelem.



**Obr. 1:** Zrekonstruované a graficky upravené embryo E14.

# 1 Barvení měkkých tkání

Srovnávací, funkční a vývojové studie tvaru zvířat vyžadují přesnou vizualizaci trojrozměrných struktur. Pro nedestruktivní objemové zobrazování měkkých tkání existuje několik široce aplikovatelných metod. Rentgenová mikrotomografie má potenciál produkovat 3D snímky malých biologických vzorků, ale její všeobecné užití pro nemineralizované tkáně je limitováno nízkým kontrastem měkkých tkání. Pro mikro-CT zobrazení zvířecích měkkých tkání je uváděno několik barvicích metod. Všechny jsou založeny na principu, jak dostat do tkání těžké kovy, které pomáhají zvýšit absorpční vlastnosti tkání v rentgenografii. Dosud nejvíce široce využívaná kontrastní barviva jsou anorganický jód a PTA (phosphotungstic acid).

## 1.1 Metody barvení měkkých tkání

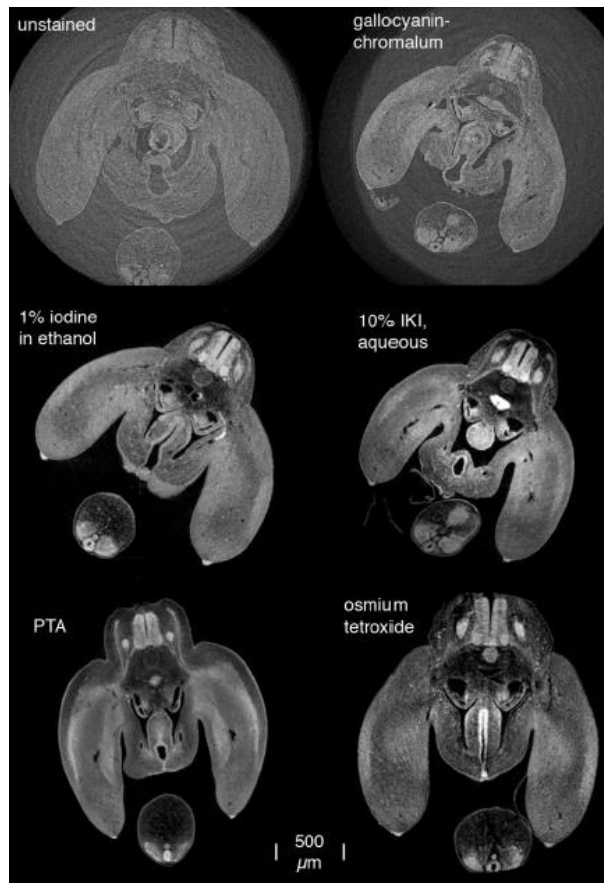
Anorganický jód v alkoholovém či vodném roztoku se dokáže rychle rozptýlit do fixovaných tkání a je možné barvit větší množství vzorků v několika hodinách nebo i méně. Je osvědčený jako všestranné a silné kontrastní barvivo.

PTA je podstatně větší molekula a použitý roztok potřebuje inkubaci přes noc, aby pronikla vzorky 2-3 mm tenké a delší dobu pro větší vzorky. PTA je známý tím, že se těžce váže k různým proteinům jako fibrin nebo kolagen a k pojivovým tkáním. Lze také použít barvení pomocí PMA (phosphomolybdic acid), které se používá podobně jako PTA a i výsledky vycházejí přibližně stejně.

Osmium tetroxid (osmium tetroxide) je běžně používané barvivo pro mikro-CT zobrazování měkkých tkání. Váže buněčné membrány a další struktury bohaté na tuky, mezi něž patří i nervy. Toto barvivo je nicméně velmi toxické, drahé na likvidaci a v alkoholu nebarví příliš kvalitně. Stejně jako PTA proniká tkáněmi pomalu, ale PTA je daleko méně toxické, více jednoduché pro používání a více efektivně barví vzorky uložené v alkoholu. Barviva založená na anorganickém jódu a kyselině fosfowolframové jsou mnohem méně toxické než osmium a produkují vysoký kontrast rentgenových snímků různých měkkých tkání ve srovnání s osmiem.

Gallocyanin chromalum jako histologické barvivo pro buněčná jádra poskytuje kontrast pro rentgenové záření tkáním podle jejich přirozených buněčných hustot. Celkově poskytuje jasnější kontrast mezi objektem a pozadím než nenabarvené tkáně, ale tento rozdíl není dostatečný.

Kontrasty měkkých tkání embryí získané několika barvivy lze vidět na Obr. 1. 1. S použitím běžně využívaného doporučeného materiálu alkoholu, ve kterém byly všechny vzorky skenovány, byla získána srovnatelná data absorpce pro různě obarvené tkáně. [1] [2]



**Obr. 1. 1:** Kontrasty embrya získaných pomocí různých barviv [2].

## 1.2 Barvení embryí pomocí PTA

K barvení myších embryí pro mikro-CT byla využita PTA neboli kyselina fosfowolframová. Chemický vzorec PTA je  $H_3PW_{12}O_{40}$ . Wolfram s vysokým atomovým číslem 74 patří mezi přechodné kovy, a tak uděluje při navázání na biologické tkáně velký kontrast. PTA se váže na fibrin a kolagen, proteiny, které jsou všudypřítomné v pojivových tkáních všech částí zvířecích orgánů.

Embrya myši je třeba skladovat v pufrovaném formalínu (pufrovaný formalín sodný), které předchází barvení pomocí PTA a mikro-CT zobrazování. Umístění embryí v EPTA (roztok PTA v ethanolu) přímo z pufrovaného formalínu může mít za následek popraskání některých tkání kvůli rychlé dehydrataci. Proto prvním krokem musí být vždy postupná dehydratace v ethanolu. Po této dehydrataci lze jednotlivá myší embrya ponořit do připraveného roztoku EPTA v malých utěsněných plastických lahvičkách a ponechat tak v barvivu několik dní. [2]

## 2 Mikro tomografie

Počítačová tomografie může být využívána k zachycení vnitřní struktury prostorových objektů pro účely metrologie. Využití technologie rentgenového záření ve smyslu 2D radiografických snímků už je dlouho zavedenou součástí lékařské diagnostiky. Nositelé Nobelovy ceny Allan McLeod Cormac a Newbold Hounsfield učinili významný přínos v rozvoji 3D tomografického zpracování pro lékařské využití. Na začátku roku 1990, začala být rentgenová tomografie více užívána také pro zkoumání technických předmětů. Pracovní díly byly kontrolovány pro jejich póry, inkluze a chybějící funkce. Poprvé bylo možné prohlédnout si vnitřní strukturu pomocí nedestruktivní metody. Časem byly pro tyto nové aplikace vyvinuty speciální přístroje. Dosažená přesnost, v rozsahu několika stovek milimetrů, byla stále velmi nízká. První rentgenový přístroj dostatečné přesnosti pro průmyslové aplikace byl prezentován na veřejnost roku 2005. Přesnost je v rozmezí několika mikronů pro standardní aplikace až po mikrony pro přesné měření. Na Obr. 2. 1 lze vidět mikro-CT přístroj.

Užití rentgenové tomografie je zásadně odlišné od medicínského CT. Za účelem získání radiografických snímků z různých směrů, se u lékařského CT otáčí zdroj záření a detektor kolem nepohyblivého pacienta. Pro průmyslovou tomografii je však tato jednotka stacionární a objekt je otáčen v dráze paprsku. U průmyslových aplikací není problémem expozice záření, takže mohou být použity větší radiační intenzity než v medicínské oblasti. [6] [8]



**Obr. 2. 1:** Mikro-CT systém.

## 2.1 Zdroje záření

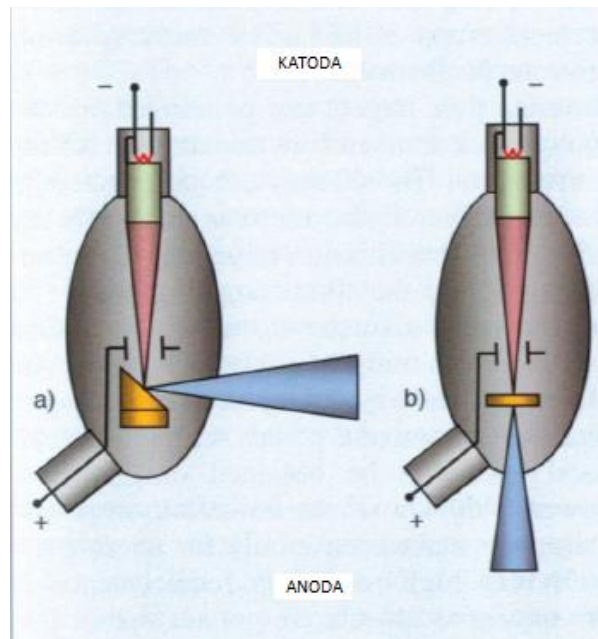
V praxi může rentgenové záření vznikat buď dopadem urychleného elektronu na terč, nebo změnou dráhy relativistického elektronu u synchrotronu.

### 2.1.1 Mikroohniskové rentgenové zdroje

Rentgenové trubice fungují na základním principu elektronových paprsků. Volné elektrony jsou generovány žhavenou wolframovou katodou v oblasti vakua, urychleny elektrickým polem generovaným napětím v rozmezí 10-100 keV. V rentgenové trubici tyto elektrony naráží na kovový povrch terče (anody). Rozsah frekvencí generovaného polychromatického rentgenového záření závisí na napětí mezi katodou a anodou trubice a na materiálu terče. Záření z rentgenové trubice může být považováno za proud fotonů různé frekvence.

Mikroohniskové zdroje fungují na stejném principu jak klasické trubice, ale jsou konstrukčně odlišné. Svazek tepelných elektronů je tvarován magnetickými čočkami a fokusován na terč o průměru v řádu 1  $\mu\text{m}$ . Velikost této stopy lze ovlivňovat napětím na čočkách. V praxi, je maximální napětí podle typu trubice mezi 90 kV a 450 kV. Pokud jsou měřeny části, které obsahují kov, je vyžadováno napětí vyšší. Mikroohniskové zdroje mají oproti klasickým trubicím velkou prostorovou koherenci. Rentgenové záření zde generuje pouze plocha, na kterou dopadají elektrony.

Terče rentgenových trubic jsou v zásadě děleny na reflexní a transmisní, viz Obr. 2. 2. V reflexním terči jsou rentgenové paprsky terčem odražené, což poskytuje větší rozptyl tepla. Je zde proto povolena vyšší energie a měření v důsledku toho může probíhat kratší dobu. Minimální ohnisková velikost bodu, která může být dosažena reflexním terčem, je několik mikronů. Taková velikost je pro běžné měření dostačující, protože rozlišení menší než 5  $\mu\text{m}$  bývá vyžadováno zřídka. U transmisních terčů dochází k jejich prosvícení rentgenovými paprsky, jejichž rozptyl je tak užší než u reflexních terčů. Rentgenové trubice s transmisními terči mají výhodu, že produkují menší paprsky v průměru (ohniskové body), a tak je dosaženo vyššího rozlišení. U reflexních terčů závisí jejich ohniskový bod na nastavení energie. Malý ohniskový bod tak může být získán pouze s nižší silou záření. [3] [7] [8]



**Obr. 2. 2:** (a) Reflexní terč, (b) Transmisní terč [8].

Rentgenové trubice jsou k dispozici jak v otevřené tak uzavřené podobě. V uzavřené trubici se vakuum vytvoří pouze jednou a je potom udržováno dlouhou dobu v hermeticky těsnící vakuové komoře. Užití uzavřené trubice má význam pro napětí vyšší než okolo 150 kV. V tomto případě, může být trubice využita pro měření několik let bez údržby. Pokud jednou životnost výrobku uplynula, kompletní trubice musí být vyměněna. Rentgenové trubice s ohniskovým bodem rozsahu mikrometrů, u které je používáno napětí nad 150 kV, se řadí obvykle k otevřeným systémům. Povrch elektrod takových trubic je tak velký, že vyžadují pravidelnou údržbu. Pro otevřenou trubici, je vakuum tvořeno oddělenou vakuovou pumpou během činnosti. Lze tak otevřít rentgenovou trubici za účelem obnovení vakua pomocí vakuové pumpy. Vzhledem k ceně údržby otevřených systémů a ceny náhrady pro uzavřený systém, cena pro spravování obou typů trubic je podobná.

Konstrukce rentgenové trubice je velmi komplexní. Kromě elektrod a terče, které už byly zmíněny, má také velké množství součástí pro zaostřování paprsků, elektrodového topení a dalších funkcí. Skrz vyžadovanou přesnost měření, hraje přední roli teplota při užití rentgenových trubic v souřadnicových měřicích zařízeních. Protože rentgenové trubice mají obecně nízký stupeň účinnosti, je zde poměrně velká ztráta energie. Ta je odstraněna z měřicího zařízení vhodným tekutým chladicím systémem. [3] [5] [8]

### 2.1.2 Synchrotronové záření

Synchrotronní záření je elektromagnetické záření nabitých částic o energiích několika GeV. Částice, např. elektrony, se pohybují v akumulačním prstenci a jsou urychleny



magnetickým polem. Toto pole je jednotné v celé oblasti trajektorie ohybových magnetů. Prostorově osciluje v tzv. víglerech a undulátorech. Produkované rentgenové záření se pohybuje ve směru tečny na zakřivenou trajektorii elektronů v akumulacním prstenci. Okolo prstence jsou umístěny beamlajny. [3]

### **2.1.2.1 Vlastnosti synchrotronového záření**

Synchrotronové záření vzniká při pohybu relativistické nabitě částice po zakřivené dráze. Záření těžších částic např. protonů je zanedbatelné ve srovnání se zářením elektronů, protože ztráta energie částice vyzářením za jeden oběh je nepřímo úměrná čtvrté mocnině její hmoty. U nerelativistického elektronu je vyzařováno prakticky do všech směrů monochromatické záření s frekvencí oběhu. Elektromagnetický vzruch, který se šíří kolem relativistického elektronu, tvoří kužel s osou tečny k oběžné dráze (orbitu). Tento kužel má vrchol v místě, kde se vyskytuje elektron a otevírá se ve směru jeho pohybu. Čím více se rychlost elektronu blíží rychlosti světla, tím je kužel ostřejší. Obíhající elektrony v akumulacním prstenci tvoří shluky, takže se synchrotronové záření jeví jako pulsující. Elektrony při oběhu oscilují kolem ideální kruhové dráhy. Synchrotronové záření, které se šíří z akumulacního prstence, je celkem stabilní. Vlivem srážek elektronů s atomy plynu se však počet elektronů v orbitu postupně zmenšuje. Ve spektru synchrotronového záření se objevuje kromě základní frekvence ještě velké množství vyšších harmonických. Se vzrůstající energií elektronu  $E$  se spektrum záření rozšiřuje směrem ke kratším vlnovým délkám.

Jako jedna z charakteristik spektra synchrotronového záření se uvádí charakteristická nebo také kritická vlnová délka se vzorcem:

$$\lambda_c [\text{nm}] = 0,559 (R[\text{m}] / E^3[\text{GeV}]) \quad (2.1)$$

Této kritické vlnové délce odpovídá kritická energie:

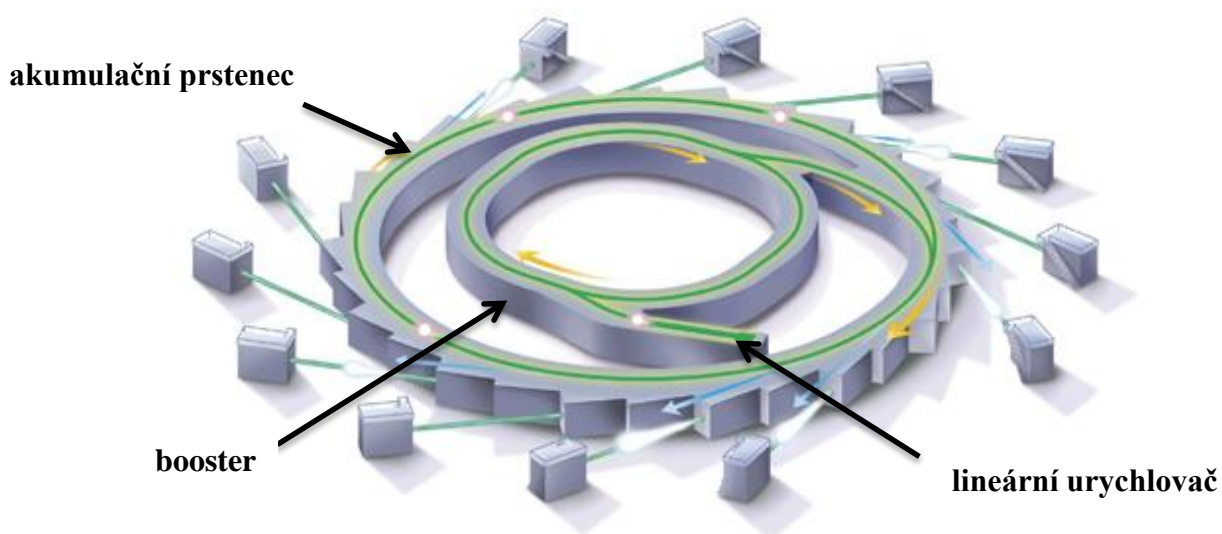
$$\varepsilon_c [\text{eV}] = 1240 / \lambda_c [\text{nm}] \quad (2.2)$$

Celkový vyzářený výkon nad touto energií odpovídá celkovému vyzářenému výkonu pod ní.

Mezi vlastnosti synchrotronového záření třetí generace patří vysoká prostorová koherence svazku, vysoká energie (6 GeV) elektronů produkujících záření a vysoká intenzita. Svazek je vyslán do malého úhlu, velikost elektronového paprsku v průřezu je menší než <100 um a pokrývá velkou část elektromagnetického spektra. Paprsek je tedy velmi intenzitní, homogenní, paralelní a po průchodu monochromátorem, monochromatický. V laboratorní tomografii se využívá relativně slabý, polychromatický a divergentní. [3] [4]

### 2.1.2.2 Části synchrotronu

Synchrotron se skládá ze tří hlavních částí: lineárního urychlovače, boosteru a akumulčního prstence (tzv. storage ring), viz Obr. 2. 3. Elektronů emitovaných elektronovým urychlovačem jsou nejdříve urychleny v lineárním urychlovači na energii v řádech stovek MeV a potom přeneseny do kruhového urychlovače (boosteru), kde dosahují energie o stupni 6 bilionů eV (6 GeV) a přibližují se tak rychlosti světla. Tyto vysokoenergetické elektrony jsou potom vneseny do velkého akumulčního prstence, kde obíhají ve vakuovém prostředí o konstantní energii po poměrně dlouhou dobu (hodin). Dodává se jim jen tolik energie, kolik se jí vyzáří. Tyto elektrony prochází skrz různé typy magnetů, kde je vyzářováno synchrotronové záření. [19] [21]

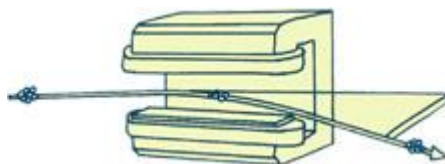


**Obr. 2. 3:** Jednotlivé části synchrotronu.

Akumulční prstenc obsahuje vysoké vakuu, řádově  $133 \cdot 10^{-10}$  Pa. Skládá se z části zakřivené a části přímé. V zakřivených dochází při průchodu částic ohybovými magnety k emisi synchrotronového záření. V přímých jsou částice urychlovány a jsou zde umístěny speciální magnety ke korekci dráhy elektronů.

#### 1. Ohybové magnety

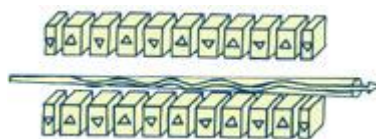
Hlavní funkcí ohybových magnetů je ohýbat elektrony do jejich oběžné dráhy. Jakmile jsou elektrony odkloněny z jejich rovné dráhy, emitují synchrotronové záření tangenciálně na rovinu elektronových paprsků. Synchrotronové záření z ohybových magnetů pokrývá široké a spojité spektrum, od vlnových délek řádu mikronů po těžké rentgenové záření. Ukázka ohybového magnetu je vidět na Obr. 2. 4.



**Obr. 2. 4:** Ohybový magnet.

## 2. *Víglery a undulátory*

Tyto magnety se nachází v přímé sekci akumulárního prstence. Oba typy magnetů jsou tvořeny dvěma řadami permanentních magnetů, kde se vedle sebe střídá severní a jižní pól. Je tak vytvořeno periodicky se měnící magnetické pole a elektrony zde oscilují. Ve vígleru elektron vytváří oscilace buď v rovině orbity, nebo rovině na něj kolmé. V undulátoru (interferenčním vígleru) se elektron periodicky vychyluje s větším množstvím period v rovině nebo po šroubovici. V undulátorech a víglerech dochází také k vyzařování synchrotronového záření, které je více intenzivní než paprsky záření z undulátoru. Mezera mezi řadami magnetů může být změněna za účelem změny vlnové délky záření. Undulátor lze vidět na Obr. 2. 5.



**Obr. 2. 5:** Undulátor.

## 3. *Monochromátory*

Pro některé experimenty se používá tzv. bílé záření, které obsahuje všechny vlnové délky. Častěji se však pomocí monochromátoru vybírá pouze určitá část spektra. Pro nižší energie slouží k monochromatizaci např. optické mřížky nebo filtry. U vyšších energií se používá monochromátor založený na difrakci záření na speciálně upravených monokrystalech.

Velké zdroje synchrotronového záření dosahují energií několika GeV a proudu až několika set mA. Synchrotron může generovat rentgenové záření s vyššími energiemi než je produkované z rentgenových trubic. Po obvodu synchrotronu může být až několik desítek výstupů tzv. beamlajnů, kde se odebírá synchrotronové záření pro určité experimenty, viz Obr. 2. 6. V současné době se synchrotron používá pouze k vědeckým aplikacím kvůli jeho vysoké ceně. Vysokofrekvenční synchrotronové záření může být použito pro prosvícení a tomografii velmi velkých kovových objektů. Pro naše měření byl využit synchrotron Elettra v Itálii. [19] [21]



**Obr. 2. 6:** Ukázka beamlajnu synchrotronu.

## 2.2 Detektory záření

Pro rentgenové záření jsou k dispozici detektory lineární a plošné viz Obr. 2. 7. Lineární detektory zachycují paprsky ve tvaru vějíře tzv. fan beam tomografie a pro plošné detektory se využívá RTG záření tvaru kužele, cone beam tomografie. Z geometrického hlediska jsou lineární senzory ideální. Synchronizovaný pohyb zdroje záření a lineárního senzoru může zajistit, že průřez roviny skrz objekt zůstane vždy svislý na rotační osu. Nevýhodou této tomografie je, že každý řez rovinou potřebuje být zachycen individuálně v každé rotační pozici. Měření je tak mnohem více časově náročné. Výhodou je řádově nižší cena detektoru. Lineární detektory se využívají například v letištních bezpečnostních rentgenech pro kontrolu zavazadel, v celotělové kostní denzitometrii, ale jsou známé i systémy pro skiografii.

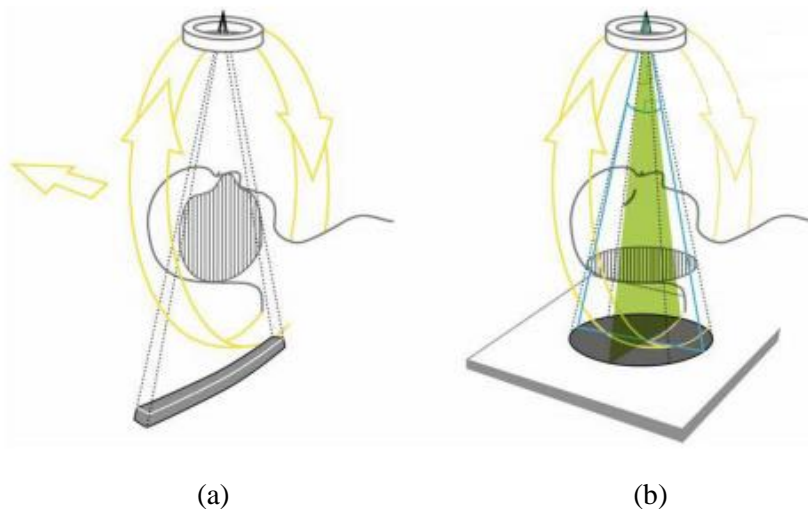
Více využívány jsou plošné detektory, které zachytávají několik rovin měřeného objektu naráz podle počtu řádků senzoru. Mezi nevýhody patří, že řezy rovin objektu kromě centrálního nejsou svislé na rotační osu. Proto dochází k chybám měření během matematické rekonstrukce objemových dat, které musí být korigovány.

Průmyslová rentgenová tomografie běžně využívá plošné detektory se scintilátorem. Scintilátor převádí rentgenové paprsky, které dopadly na senzor mikro-CT, na světlo. Vysokoenergetické fotony rentgenového záření excitují částice scintilačního materiálu při průchodu scintilátorem. Tyto částice potom emitují světlo viditelného frekvenčního spektra. Je tak možné využít křemík založený na takovýchto fotosenzitivních částicích k záznamu snímku.

Jednotlivé pixely plošných senzorů nejsou stejně citlivé. Tyto rozdíly jsou v praxi automaticky eliminovány kalibrací senzoru světlym a tmavým osvětlením a aplikováním korekce pomocí softwaru. Typické plošné senzory obsahují okolo 1000 x 1000 nebo 2000 x 2000 pixelů. Rozměry pixelů mají mezi 50 a 400  $\mu\text{m}$ . Velikost senzoru určuje největší možný

objekt, který může být změřený při malém zvětšení bez užití rastrové tomografie. Pro stejný úhel vyžaduje větší plošný větší měřící zařízení než menší sensor. Větší sensor má proto význam pouze v případě, když je vyžadována velká plocha měření. Se stejným počtem pixelů poskytuje menší sensor využívající menší zavedený prostor stejné rozlišení jako větší sensor s větším zavedeným prostorem. Rozlišení se může zvětšit využitím senzoru s více pixely nebo rastrovou tomografií.

Pro měření embryí myši byl použit speciální detektor v Praze, flat panel využívající mikro-CT v Brně a v Itálii CCD detektor. [3] [5] [8]



Obr. 2. 7: (a) Lineární detektor, (b) Plošný detektor

### 2.2.1 Flat panel

Flat panely neboli tzv. ploché detekční panely patří mezi polovodičové detektory a poskytují signály pro přímý digitální RTG obraz. Skládá se z velkého počtu elementů- pixelů a jsou sestaveny do obrazové matice o rozměrech okolo 2000 x 2000 těchto pixelů. Flat panely mohou využívat buď přímou, nebo nepřímou konverzi rentgenového záření viz Obr. 2. 8a, b.

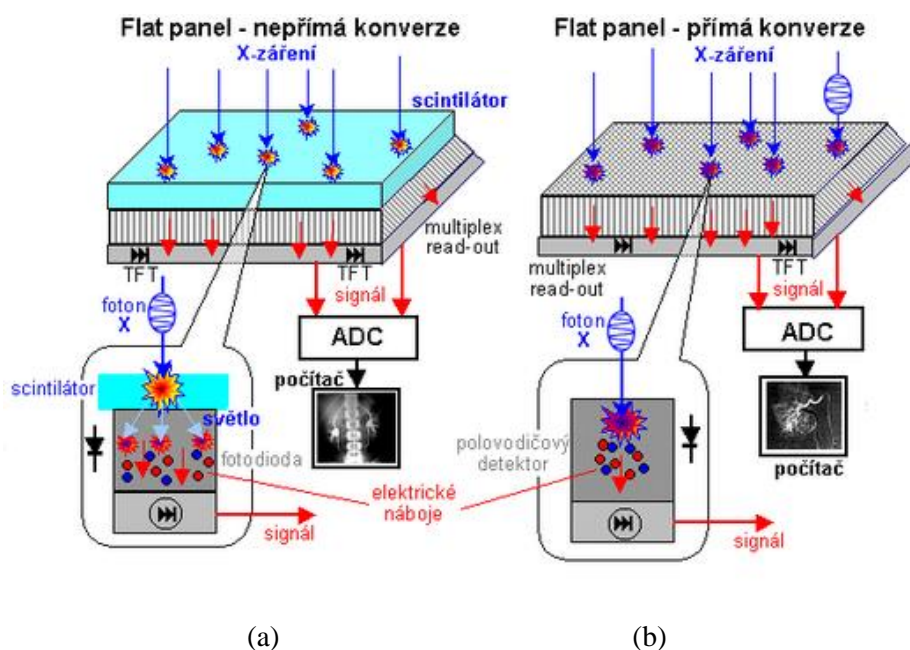
Systémy s nepřímou konverzí jsou založené na amorfním křemíku (a-Si) a využívají převedení rentgenového záření na viditelné pomocí scintilační vrstvy. Fotony X-záření nejprve dopadají na tuto scintilační vrstvu (nejvíce se používá CsI), kde vznikají záblesky viditelného světla. Detekce viditelného světla následně probíhá pomocí matice polovodičových fotodiod (většinou z a-Si), kde se vnitřním fotoefektem uvolňuje elektrický náboj a světlo je převedeno na elektrický signál.

Flat panely s přímou konverzí, které jsou založeny na amorfním selenu (a-Se), pracují bez pomocného scintilátoru. Fotony X-záření dopadají rovnou do polovodičových detektorů, kde se interakcí uvolňují elektrické náboje a jsou tedy přímo převáděny na elektrický signál. Tyto typy flat panelů se zatím používají méně často než systémy s nepřímou konverzí, avšak

v budoucnosti se nejspíš uplatní více. Konstruují se také v menších rozměrech (řádu centimetrů) s velmi velkou hustotou miniaturních obrazových pixelů, tedy i vysokým rozlišením.

U obou typů flat panelů je elektrický signál snímán speciální maticí tranzistorů, implantovaných technologií integrovaných obvodů v tenké vrstvě na skleněném nosiči. Vzhledem k tomu, že detektor obsahuje několik milionů pixelů, pro redukci počtu přívodů k fototranzistorům se používá jejich uspořádání do matice, které je buzeno po sloupcích s čtením pomocí přenosu náboje (CCD) v řádcích. Snímání, tzv. read-out poskytuje tak souřadnicové impulsy o poloze místa detekce fotonu X-záření. Následně jsou tyto souřadnicové impulsy převedeny analogově digitálním konvertorem (ADC) do digitální formy do odpovídajících míst obrazové matice.

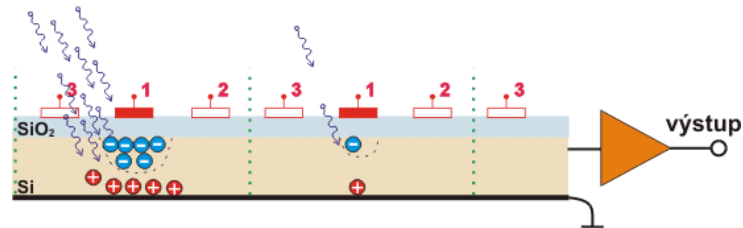
Nevýhodou zobrazovačů integrujících náboj analogově je skutečnost, že integrují kromě užitečného signálu i šum a hlavně tzv. temný proud. Temný proud je způsoben tzv. prosakováním (leakage) náboje uloženého v paměťovém kondenzátoru. Temný proud omezuje maximální poměr signálu k šumu, jakého lze s těmito zobrazovači dosáhnout. [23]



**Obr. 2. 8:** Flat panel: (a) s nepřímou konverzí, (b) s přímou konverzí [23].

## 2.2.2 CCD detektor

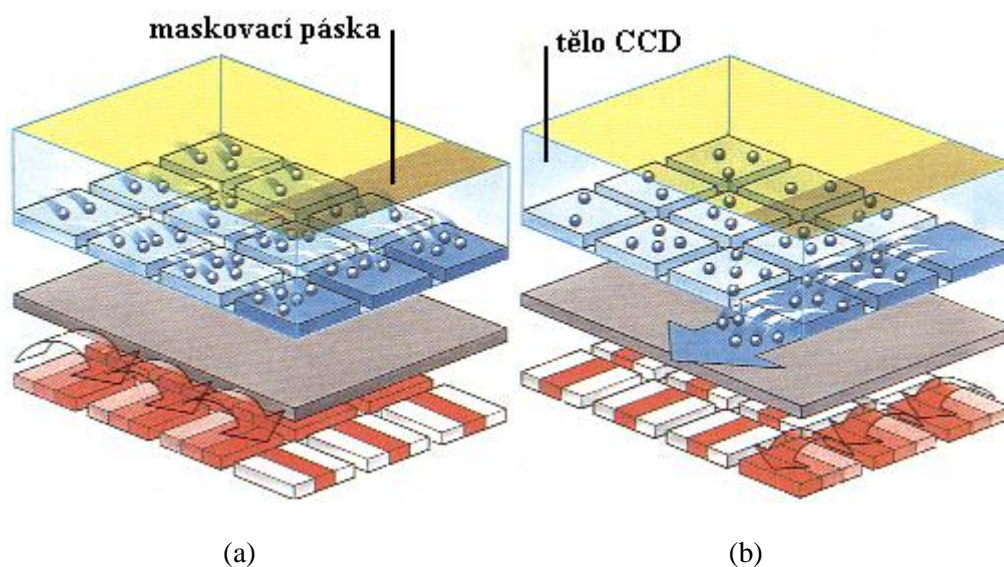
CCD detektor (charge-coupled device) je čip, který na základě fotoefektu přeměňuje energii dopadajícího světla na energii elektrického signálu. Základ tvoří destička z čistého křemíku uloženého nad kovovou elektrodou. Na spodní straně je křemíkový polovodič uzemněn, na druhé kryt vrstvou oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ), která se chová jako izolant viz Obr. 2. 9.



Obr. 2. 9: CCD detektor [22].

Nejdříve dopadají fotony na atomy křemíku. Na základě fotoefektu je uvolněn některý valenční elektron z vazby křemíku a vzniká pár elektron-díra. Takto uvolněné elektrony zachycuje kladně nabitá elektroda nacházející se pod každým pixelem a oddělená od křemíku izolační vrstvou. Počet uvolněných elektronů je přímo úměrný intenzitě dopadajícího světla. V dalším kroku probíhá čtení obrazu pixel po pixelu. Kladný náboj se postupně posouvá podél elektrod v každém sloupci pixelů a elektrony se přemísťují z jednoho pixelu na druhý viz Obr. 2. 10a. Všechny zachycené elektrony na čidlovém mikroprocesoru jsou takto přeneseny k terminálu, kde vytváří kontinuální signál viz Obr. 2. 10b. Vrcholy signálu odpovídají nejjasnějším pixelům, tzn. místům, ze kterých se uvolnilo nejvíce elektronů.

CCD detektor patří mezi moderní zařízení, které má široké uplatnění v digitálních fotoaparátech, videokamerách nebo webkamerách. [22]

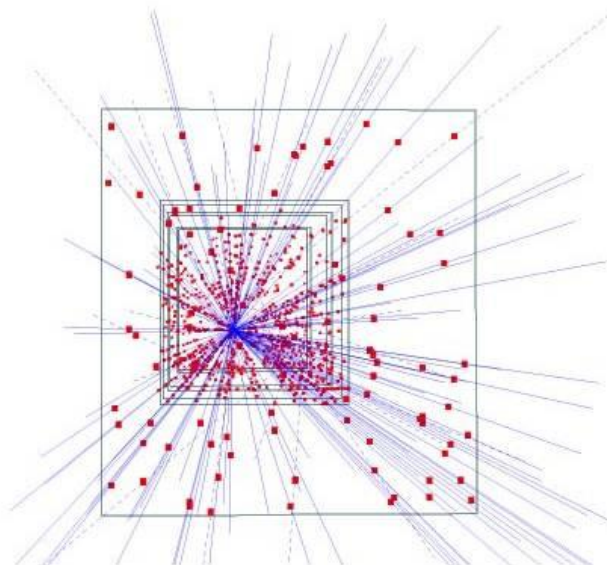


Obr. 2. 10: (a) přemísťování elektronů z jednoho pixelu na druhý  
(b) přenesení elektronů k terminálu [22].

### 2.2.3 detektory rodiny Medipix

Detektory typu Medipix patří mezi hybridní polovodičové křemíkové detektory. Vývoj těchto detektorů se započal v devadesátých letech dvacátého století v rámci Medipix-Collaboration ve výzkumném centru CERN ve Švýcarsku. Na vývoji spolupracovalo celkem 16 univerzit a výzkumné týmy po celé Evropě. Medipix1 se začal používat k výzkumným účelům v roce 1997, další, vylepšený typ Medipix 2 v roce 2001. Následovala vylepšení ve formě detektoru Timepix a v roce 2006 začal vývoj Medipixu 3, který stále pokračuje.

Detektory při přeměně rentgenového záření na elektrický signál využívají přímé konverze. Jedná se o digitální zařízení, které oproti jiným detektorům jako např. CCD počítají jednotlivé fotony RTG záření. Obr. 2. 11 ukazuje potenciál těchto detektorů. Je na něm zobrazeno 153 vysokoenergetických částicových drah letících skrz teleskop obsahující půl milionu pixelů. Tento experiment označený jako WA97 z roku 1995 sloužil za účelem osvojení hybridní pixelové technologie. Každý červený bod značí pixel zasažený dráhou fotonu. Nejsou zde obsaženy žádné falešné zásahy, takže obraz, vzniklý za 1 mikrosekundu, neobsahuje šum. [20]

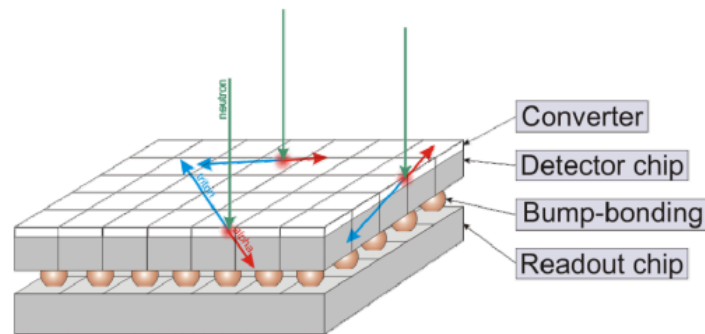


**Obr. 2. 11:** Princip detektoru Medipix [20].

Detektor se skládá z polovodičového senzoru citlivého na záření a z čipu integrovaného obvodu obsahujícího v každém pixelu čtecí elektroniku. Ke čtecí elektronice patří zesilovač, amplitudový diskriminátor a digitální čítač. Čip čtecí elektroniky a sensorový čip jsou vyráběny odděleně metodou „bump bonding“ Obr. 2. 12. Každá z těchto dvou částí detektoru obsahuje maticové pole bodových elektrod spojených mechanicky a elektricky



pomocí malých sférických vazeb. Vazby jsou obvykle vyhotoveny z pájky nebo india v průměru okolo 20  $\mu\text{m}$ . Díky možnostem volby materiálu je tento postup vhodný pro více aplikací podle potřebné detekční účinnosti. GaAs nebo CdTe může být použito místo křemíku, který má nízkou absorpční účinnost pro rentgenové záření s energiemi vyššími než přibližně 20 keV.



Obrázek č. 10: Pixelový detektor v hybridním uspořádání. Senzor pro detekci záření (křemík) je spojen s vyčítací elektronikou typu CMOS pomocí technologie „Bump-bonding“ [13].

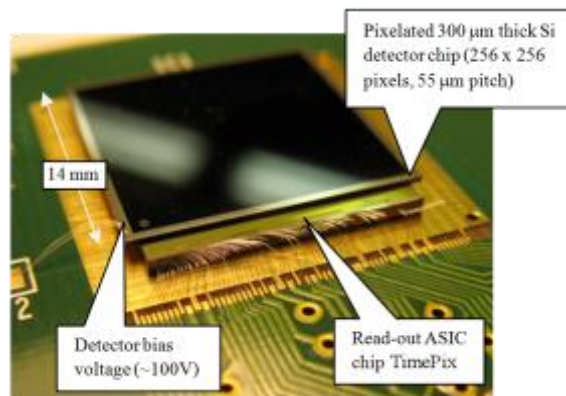
**Obr. 2. 12:** Metoda „Bump bonding“ [20].

Detektory typu Medipix se v různých variantách používají zatím jen pro výzkumné účely. Do této rodiny detektorů patří Medipix1, Medipix2, Timepix a Medipix3.

### 2.2.3.1 Timepix

Detektor Timepix patří k novějším členům rodiny Medipix a má lepší vlastnosti než jeho předchůdci. Skládá se z čipu senzoru připojeného technikou „bump-bonding“ k čipu čtecí elektroniky. Čip senzoru obvykle tvoří křemík, méně často GaAs nebo CdTe. Senzor má na zadní straně umístěnou jednu společnou elektrodu a na přední straně matici čtvercových elektrod, která obsahuje 256 x 256 čtvercových pixelů s roztečí 55  $\mu\text{m}$ . Každý pixel je zde připojen ke své vlastní elektronice. Detektor umožňuje nastavení každého pixelu do jednoho ze tří režimů. První režim Medipix tzv. čítač registruje počet částic způsobující v detektoru ionizaci větší než je práh nastavený diskriminátorem. Zde pracuje detektor stejně jako Medipix2. Druhý režim Timepix neboli časovač zaznamenává časový interval mezi detekcí částice a příchodem vnějšího spouštěcího signálu. Poslední režim TOT (Time over treshold) dovoluje přímé měření energie detekovaných částic v každém pixelu.

Pixelové detektory typu Timepix umožňují zobrazování drah částic s rozlišením až na submikronové úrovni a s vysokou spolehlivostí. Díky rychlému snímání obrazů dovolují sledovat i poměrně rychlé děje s frekvencí až 100 Hz. Detektor Timepix lze vidět na Obr. 2. 13. [20]



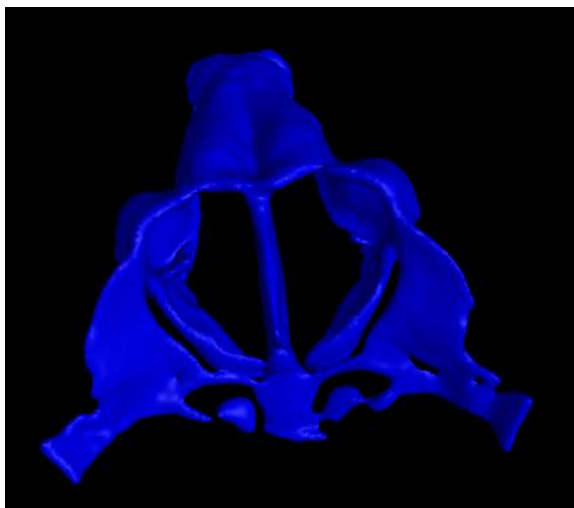
**Obr. 2. 13:** Detektor Timepix [20].

### 3 Cíle práce

Pro mikro-CT laboratoř v Brně byla dodána laboratorní embrya myši celkem 8 vývojových stádií od čtrnáctidenního (E14) až po postnatální embryo (P). Embrya pro laboratoř poskytla Karolínská instituce ve Stockholmu, Ústav fyziologie a farmakologie. Předmětem výzkumu je zkoumání vývoje struktur chrupavčité tkáně. Mezi chrupavčité tkáně patří např. čichový systém nebo vnitřní ucho. Z důvodu komplikovanosti struktury chrupavky bylo potřeba měřením dosáhnout co největšího rozlišení a vysokého kontrastu.

Pro 3D vizualizaci takových struktur se využívá rentgenová počítačová mikrotomografie. Jedním z cílů diplomové práce je realizovat tomografická měření embrya na 3 různých tomografických stanicích a následně porovnat výhody a nevýhody jednotlivých mikro-CT systémů vzhledem k požadavkům pro zobrazení chrupavčité tkáně embrya myši a stanovit nejvhodnější CT systém. Pro tomografické měření je nutné vzorky barvit látkou, která zajistí kontrast měkkých tkání v rentgenových snímcích. Měření proběhlo na mikro-CT FSI v Brně, ČVUT v Praze a synchrotronu Elettra v Itálii. Pro srovnání bylo použito embryo E14.

Za účelem zkoumání vývoje chrupavky je třeba strukturu chrupavky segmentovat a vizualizovat ve 3D modelu. V softwaru Avizo byla provedena segmentace chrupavky čichového systému, viz Obr. 3. 1. Program ovšem umožňuje automatickou segmentaci. Vlivem nedokonalého barvení, tomografických artefaktů a především morfologie chrupavčité struktury byla segmentace provedena manuálně. Tento manuální zásah je časově velmi náročný, a proto je dalším cílem navrhnout metodu pro automatickou segmentaci, popřípadě algoritmus, který CT data předzpracuje a usnadní následnou manuální segmentaci. Manuálně segmentovaný model vytvořený v Avizu bude sloužit jako reference pro výsledky testovaných segmentačních technik.



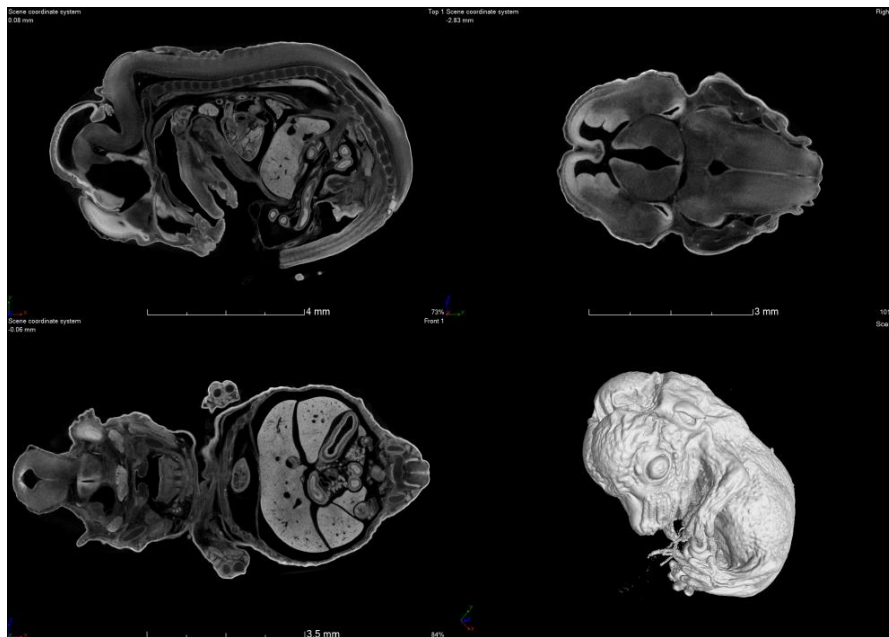
**Obr. 3. 1:** Model čichového systému vytvořený v Avizu.

### 3.1 Příprava vzorků

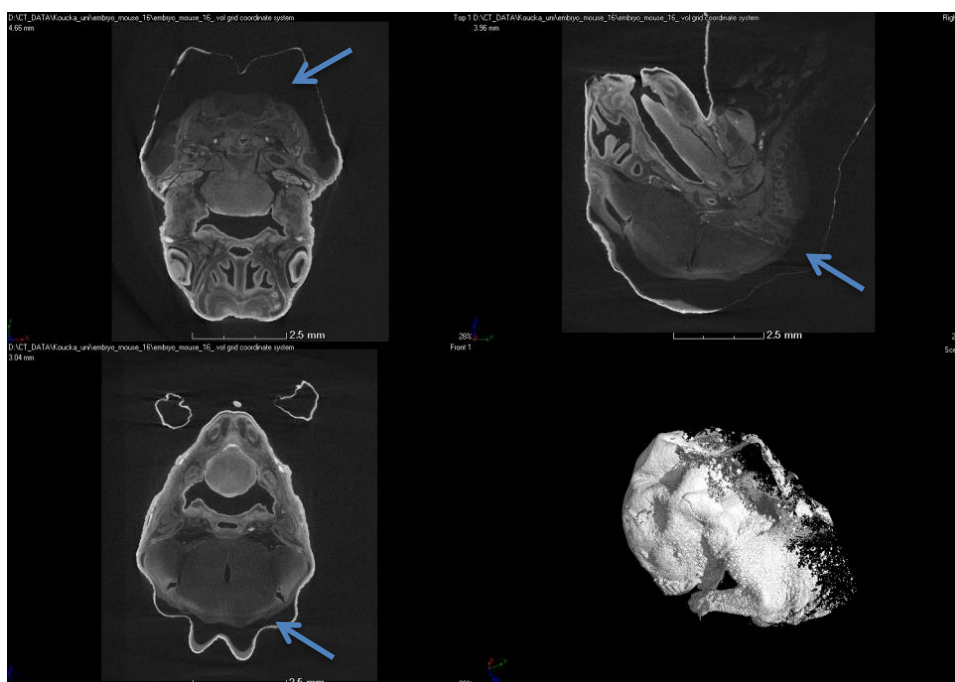
Ve spolupráci s Ústavem embryologie a histologie MUNI v Brně se barvila embrya myši celkem 8 vývojových stádií.

V první fázi se barvila a skenovala embrya E14, E16 a P. Pro fixaci vzorku a optimalizaci barvení byla embrya ponořena na 4 hodiny do roztoku 4% PFA (kyselina peroxymravenčí) a následně fixována v PBS, což je fosfátový pufr obsahující chlorid sodný. V další fázi byly dodány embrya stádií E145, E155, E165, E175 a E185. Fixace se prováděla nejdříve ve 4% PFA a oproti předchozímu měření následovala dehydratace ethanolovou řadou v 35-50-70% EtOH po dvou dnech a v 70% alkoholu byly poslány do Brna, kde proběhlo měření pomocí PTA. Pouze embryo E145 nebylo fixováno PFA, jen ethanolovou řadou. Na Ústavu embryologie a histologie se realizovalo barvení pomocí PTA viz. kap. 1.2 Barvení embryí pomocí PTA

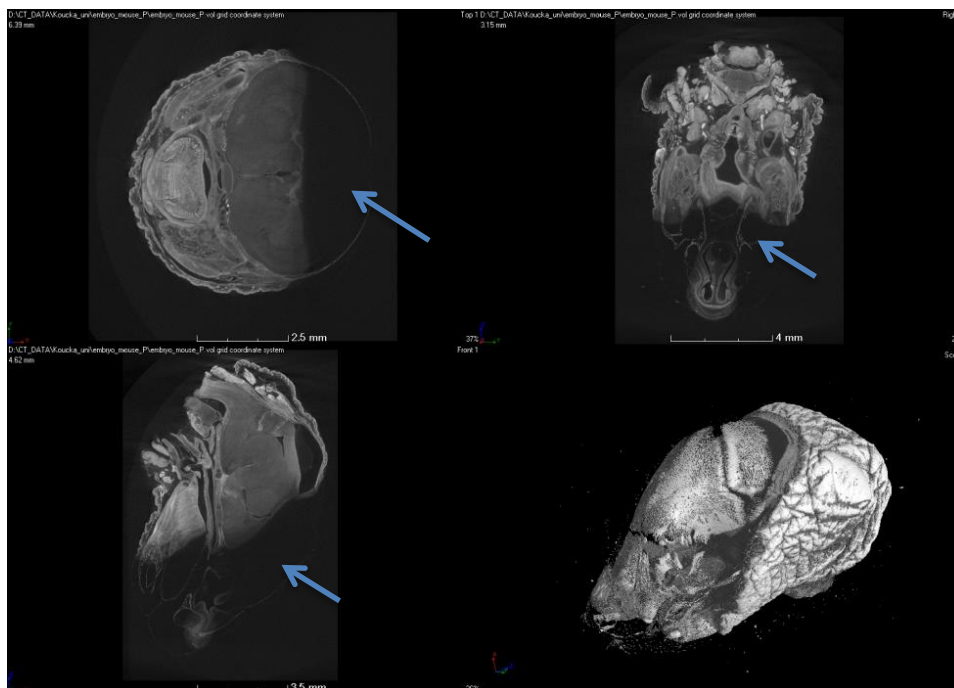
Na Obr. 3. 2, Obr. 3. 3 a Obr. 3. 4 se nachází již zrekonstruovaná data po skenování na mikro-CT v Brně. Snímky jsou zobrazeny pomocí softwaru VG Studio. Na jednotlivých obrázcích lze vidět, že pouze u E14 jsou všechny struktury úspěšně nabarvené. U vzorku E16 a P1 jsou nabarveny hlavně vnitřní měkké tkáně, které se dostaly do kontaktu s kyselinou fosfowolframovou (na obrázcích jsou tyto oblasti označeny modrou šipkou). Důvodů špatného nabarvení může být více: krátká doba barvení, nebo že při fixaci ethanolem a PFA nebyly po celou dobu všechny části embrya dostatečně ponořené uvnitř. Při dehydrataci ethanolem může docházet ke smrštění vzorků. Některá embrya se smrštila více než ostatní. Příčinou mohla být vysoká koncentrace alkoholu nebo fixace ve formalínu. Obvykle dochází k většímu smrštění u tkání s vyšším obsahem vody.



**Obr. 3. 2:** Zrekonstruované embryo E14 (zobrazeno ve VG Studiu).



**Obr. 3. 3:** Zrekonstruované embryo E16 (na nenabarvené oblasti ukazuje modrá šipka).



**Obr. 3. 4:** Zrekonstruované embryo P1  
(na nenabarvené oblasti ukazuje modrá šipka).

Po procesu barvení byly vzorky umístěny do plastové trubičky co nejmenšího průměru pro dosažení co největšího rozlišení. Plastová trubička méně rozptyluje a absorbuje záření oproti skleněné. Skleněná byla použita pro měření na mikro-CT v Praze. Z výše zmíněných důvodů se s největší pravděpodobností dosáhlo méně kvalitních výsledků, než se předpokládalo. Pro následnou mechanickou stabilizaci vzorku v přístroji při skenování byl použit 0,5 % agarosa gel, který má nízkou absorpci rentgenového záření. Při skenování se vzorek umístil co nejbližší k trubici za účelem získání maximálního zvětšení. Na Obr. 3. 5a se nachází nenabarvené embryo E14 v plastové trubičce zalité agarosa gelem a na Obr. 3. 5b je toto embryo nabarvené a umístěné ve skleněné trubičce.



(a)



(b)

**Obr. 3. 5:** (a) Nenabarvené E14 v plastové trubičce zalité agarosa gelem  
(b) Nabarvené E14 ve skleněné trubičce zalité agarosa gelem.

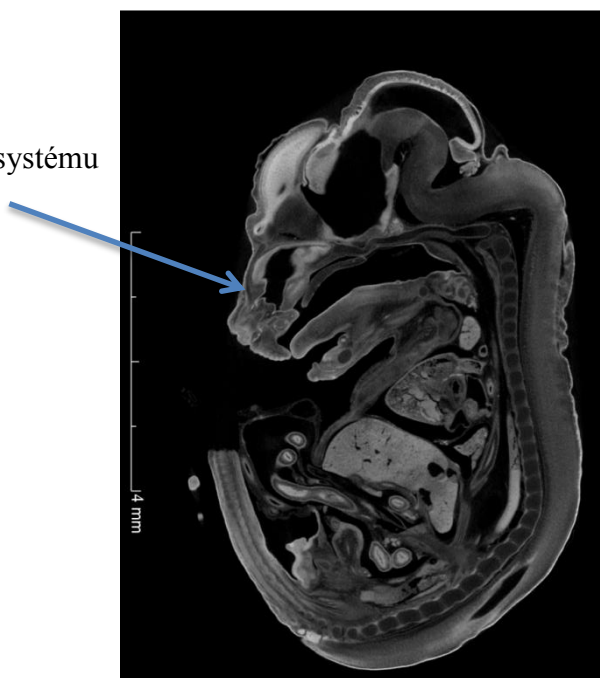
## 3.2 Mikro-CT laboratoř v Brně

V rámci vědeckého centra CEITEC vznikla v září 2012 na Ústavu strojního inženýrství, FSI v Brně, laboratoř rentgenové mikrotomografie GE v|tome|x L 240. Výzkumná skupina této laboratoře se zaměřuje na vývoj a aplikace metod počítačové tomografie a na vizualizaci vnitřní 3D struktury různých vzorků s vysokým prostorovým rozlišením.

Pro měření lze využít mikrofokusační nebo nanofokusační rentgenovou trubici. Nanofokusační může dosáhnout maximálního napětí 180 kV a výkonu 15 W. Mikrofokusační má maximální napětí 240kV a výkon 320 kW. Přístroj umožňuje měřit jednotlivé vzorky od desetin mm až po stovky mm v průměru. Vzorky mohou mít maximální velikost 500 x 800 mm a hmotnost 50 kg. Typické rozlišení bývá přibližně 1/1000 průměru vzorku – dosahuje až 1 μm pro 1 mm vzorek. Dosažitelné voxelové rozlišení je do 2 μm pro 240kV mikrofokusační trubici a kolem 1 μm pro 180 kV nanofokusační RTG trubici. Rozlišení a maximální velikost vzorku jsou limitovány mírou absorpce rentgenového záření. Detektor typu flat panel má aktivní oblast 2048 x 2048 pixelů o velikosti 410 x 410 mm s dynamickým rozsahem 10 000 : 1. [9]

V mikro-CT laboratoři se skenovala všechna embrya myši, která byla barvena pomocí PTA. K měření byla využita nanofokusační rentgenová trubice. Nastavené napětí trubice se pro jednotlivá embrya pohybovalo mezi 60 a 65 kV a elektrický proud v rozmezí 170 a 230 μA. Expoziční čas byl v intervalu 750 a 1000 ms. Získané voxelové rozlišení dosáhlo 4 až 6,5 μm v závislosti na velikosti daného embrya. Tomografická rekonstrukce byla realizována pomocí softwaru GE phoenix datos|x 2.0.

chrupavka čichového systému



**Obr. 3. 6:** Sagitální řez naskenovaného čtrnáctidenního embrya E14.

Na Obr. 3. 6 se nachází řez naskenovaného čtrnáctidenního embrya E14 po rekonstrukci dat. Jsou zde kvalitně zachycené detaily jednotlivých struktur a snímek neobsahuje velké množství šumu. Chrupavku lze na obrázku rozlišit. Nedochází u ní k obarvení pomocí PTA, takže se jeví se na snímku šedočerně.

### 3.3 Mikro-CT na ČVUT v Praze

Ústav technické a experimentální fyziky (ÚTEF) na ČVUT v Praze se již dlouhou dobu podílí na výzkumu detektorů rodiny Medipix. V rámci spolupráce se zabývají převážně vývojem detektoru Timepix a měřením různých vzorků s využitím tohoto detektoru. Vhodnost detektoru nachází uplatnění v různých aplikacích, jako jsou rentgenové tomografie, hadronové terapie nebo po úpravě na neuronově citlivé detektory také pro neutronovou tomografii.

Na ÚTEF se nachází mikro-CT, pomocí něhož lze skenovat různé biologické vzorky. Při zobrazování těchto vzorků se zaznamenává rozložení intenzity záření pro určení kvantitativního rozložení hmoty ve vzorku. Nové typy detektorů Medipix jsou schopny kromě intenzity zachytit také energetické spektrum detekovaného záření a lze tak získat i kvalitativní informaci o materiálovém složení vzorku. Detektor je chlazen na 10 nebo 0 °C. Napětí na rentgence lze nastavit v rozmezí 20-29 kV a proud v rozsahu 0-250  $\mu$ A. Expoziční doba snímku trvá 1-100 s. Práh se volí řádově v keV. [20]

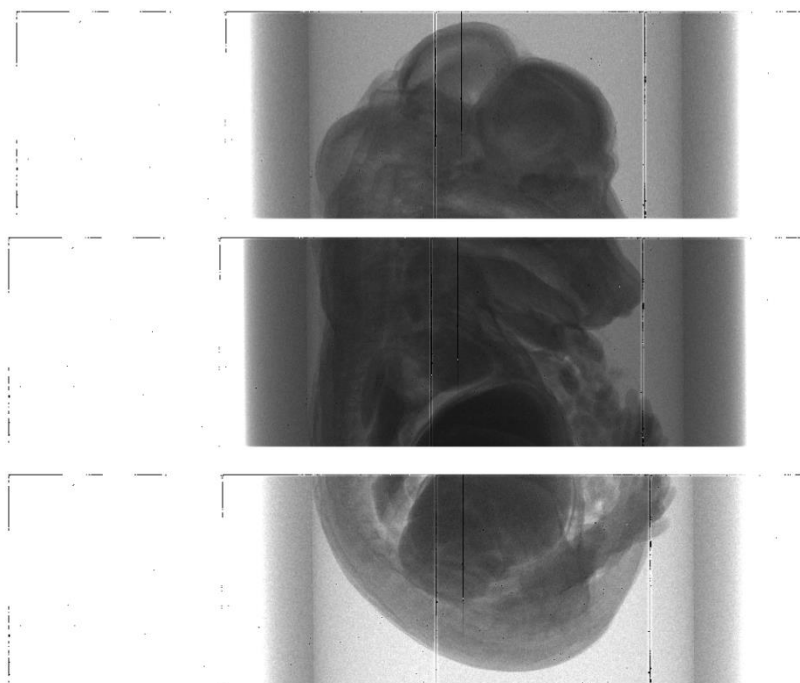
#### 3.3.1 Měření embryí

Pomocí detektorů rodiny Medipix lze zobrazovat i měkké tkáně bez použití barvicích technik. Z tohoto důvodu se na mikro-CT v Praze realizovalo měření dvou stejně starých embryí E14, jednoho nabarveného pomocí PTA a druhého nenabarveného.

Pro měření byla použita rentgenka umožňující jak režim nano- tak mikro-. Dosažitelný výkon pro mikrofokální trubici je 160 kV a výkon na terči 10W. Maximální velikost vzorku závisí na typu detektoru. Může být použit velkoplošný detektor s plochou až 14,3 x 14,2 cm. Kompaktnější vzorek s vysoce absorbujícími kovy prosvítit nelze.

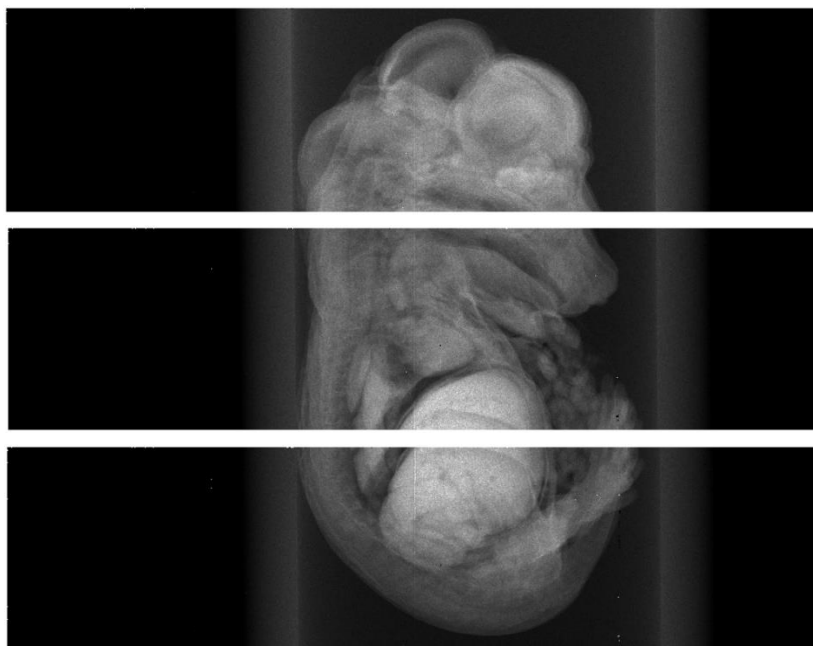
Vzorky byly umístěny ve skleněné trubičce o průměru 8 mm a zalité v agarosa gelu. Každý pixel detektoru je svou vlastní analogovou elektronikou připojen k vlastnímu AD převodníku. Před použitím detektoru musí být proto provedena kalibrace pomocí hliníkových filtrů. Filtry jsou měřeny proto, aby byla experimentálně určena křivka udávající vztah mezi měřenou intenzitou a tloušťkou vybraného materiálu. Jedná se tedy o útlumový zákon přímo měřený pro spektrum rentgenky a podmínky experimentu. Lze tak ve výsledném snímku převést každý pixel podle jeho individuální křivky z měřené intenzity na ekvivalentní tloušťku materiálu. Výhodou převedení je linearita hodnot pro tloušťku materiálu oproti intenzitě. Následně lze tak automaticky odlišnou odezvu pixelů a identifikovat vadné pixely. Pro BH korekci je zpracována interpolace vadných pixelů, které byly identifikovány.

Po kalibraci bylo realizováno skenování embryí. Pro měření se využilo mikrofokusní nastavení trubice. Použité napětí trubice se rovnalo 90 kV a proud terče 22  $\mu$ A. Měřený objekt se nacházel 70 mm od zdroje objektu a vzdálenost zdroje, detektoru byla 300 mm. Pro velké vzorky nebo velká zvětšení se používá měření s více detektory uspořádanými v řadě. Měření jednoho embrya probíhalo pomocí čtyř takto uspořádaných detektorů typu Timepix. Ke zobrazení celého embrya bylo nutné provést měření třikrát po dílčích částech. Na Obr. 3. 7 jsou ukázány radiografické snímky ve formě tzv. dlaždic, získané ze skenování nabarveného embrya. Jedná se o zobrazovací mód, kdy jsou snímky vzorku tvořeny z více subakvizic. Pixely na detektoru, které mají slabší citlivost, se korigují pomocí flat field korekce. Mezi jednotlivými detektory se však nachází neúčinná místa, která se na snímku zobrazují jako černé linie. Tyto artefakty nelze odstranit pomocí flat field korekce, ale je třeba pixely nahradit interpolací ze sousedních pixelů. Na Obr. 3. 8 lze vidět jednotlivé subakvizice po zmíněných korekcích. První i druhá subakvizice vznikla ze 720 projekcí s úhlem otočení 0,5° a akvizičním časem 10 s. Pro časovou náročnost měření je třetí subakvizice tvořena pouze ze 360 projekcí s úhlem otočení 1° a akvizičním časem 10 s. Měření se uskutečnilo i pro nenabarvené embryo, avšak na snímcích se nezobrazilo. Tato skutečnost byla s největší pravděpodobností způsobena tím, že má agarosa gel stejnou absorpci záření jako tkáň nenabarveného embrya. Proto by muselo být realizováno měření buď s jinou fixací nebo jen nabarveného embrya.



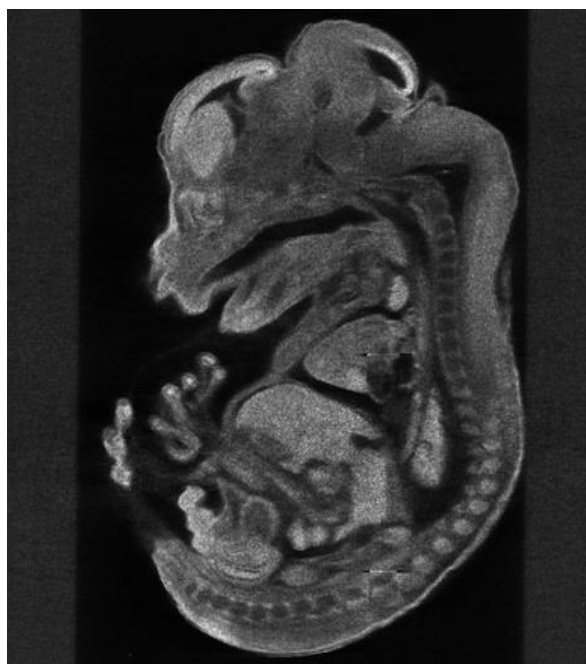
**Obr. 3. 7:** Radiografické snímky embrya ve formě tzv. dlaždic.





**Obr. 3. 8:** Korigovaná data jednotlivých subakvizic E14.

Zrekonstruovaná data embrya lze vidět na Obr. 3. 9. Bylo dosaženo rozlišení 20  $\mu\text{m}$ . Nižší kvalita dat je s největší pravděpodobností způsobena vysokou absorpcí a rozptylem záření skleněnou trubičkou, ve které bylo embryo umístěné. Dalším důvodem může být nedostatečně kvalitní počítačové předzpracování dat před rekonstrukcí. Obraz je zašuměný bez větších detailů jednotlivých struktur. Chrupavku zde nejde rozlišit. Lepších výsledků by šlo dosáhnout použitím plastovou trubičkou nebo jinou fixací vzorku.



**Obr. 3. 9:** Zrekonstruovaná data nabarveného embrya E14.

## 3.4 Synchrotron Elettra-Stanice Syrmep

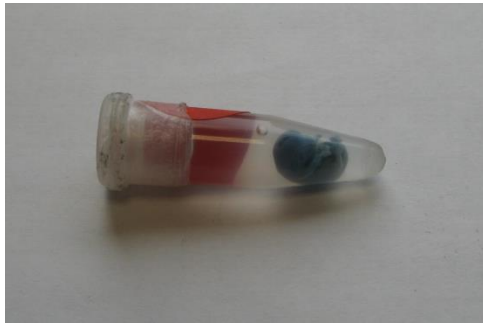
Elettra je laboratoř synchrotronového záření v Itálii otevřená za účelem výzkumů v různých základních a aplikovaných oborech. Hlavním přínosem výzkumného centra jsou dva zdroje záření, elektronový akumulární prstenec Elettra a laser založený na volných elektronech tzv. free-electron laser (FEL) FERMI. Elettra patří mezi synchrotrony 3. Generace a je využívána od října 1993. Poskytuje fotony o energiích v řádů několika desítek keV. Nachází se zde více než 30 experimentálních stanic na 27 pracovních stanic. Měření embrya myši proběhlo na pracovní stanici SYRMEP. [19]

### 3.4.1 Pracovní stanice SYRMEP

SYRMEP neboli Synchrotronové záření pro medicínskou fyziku (SYnchrotron Radiation for MEDical Physics) představuje jednu z pracovních stanic Elettry. Byla navržena v synchrotronu Trieste pro výzkum v medicínské diagnostické radiologii s částečným zájmem o mamografii. Kromě toho, že v SYRMEPu mohou být prováděny medicínské diagnostické experimenty, také je zde měřen velký počet vzorků pomocí mikrotomografie z odvětví materiálového výzkumu, geologie, biomedicínského zobrazování atd.

Pracovní stanice se nachází ve vzdálenosti okolo 20 m od zdroje fotonů a je upraven pro rentgenové záření vzorků in vitro. Zdrojem záření je ohybový magnet. Pracovní stanice může pracovat jak pomocí monochromatického, tak i „bílého“ světla. Využívání monochromatických a laminárních paprsků umožňuje vylepšení kvality snímků a redukci absorbované dávky. Ve stanici SYRMEP se používá digitální CCD detektor, který poskytuje vysokokontrastní rozlišení a velmi široký dynamický rozsah.

Mikro-CT laboratoř v Brně spolupracuje se synchrotronem Elettra na vývoji pokročilých technik počítačové tomografie. V říjnu bylo testováno měření embrya myši pro srovnání kvality dat. Měření se realizovalo na více embryích. Skenovala se pouze hlava embrya, protože svazek paprsků ze synchrotronu je paralelní a úzký. Pro zobrazení celé hlavy se skenování muselo realizovat ve dvou blocích. Měření jednoho embrya trvalo 4 hodiny. Bylo dosaženo voxelového rozlišení 2  $\mu\text{m}$ . Na Obr. 3. 10 lze vidět embrya E145 a E155 po uskutečnění měření na synchrotronu. U těchto i ostatních zde měřených embryí došlo ke zmodrání, které bylo pravděpodobně způsobeno vlivem silné intenzity synchrotronového záření. [19]



(a)



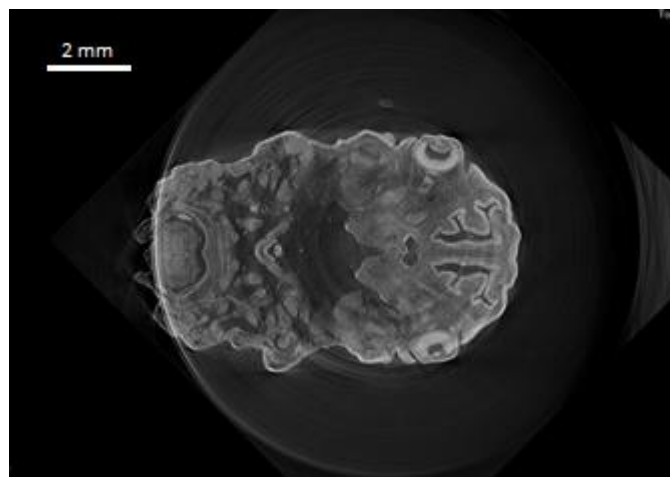
(b)

**Obr. 3. 10:** Embrya po uskutečnění měření na synchrotronu: (a) E145, (b) E155.

Obr. 3. 11 a Obr. 3. 12 ukazuje výsledné snímky dat ze synchrotronu po korekcích na artefakty měření. Na transverzálním řezu jsou vidět ring artefakty, které se nevyskytují na žádných rekonstruovaných datech ostatních mikro-CT systémů. Ring artefakty vznikají v centru osy otáčení. Díky vysokému rozlišení 2 $\mu$ m lze vidět velké detaily. Viditelnost jednotlivých struktur však omezuje nízký kontrast snímků.



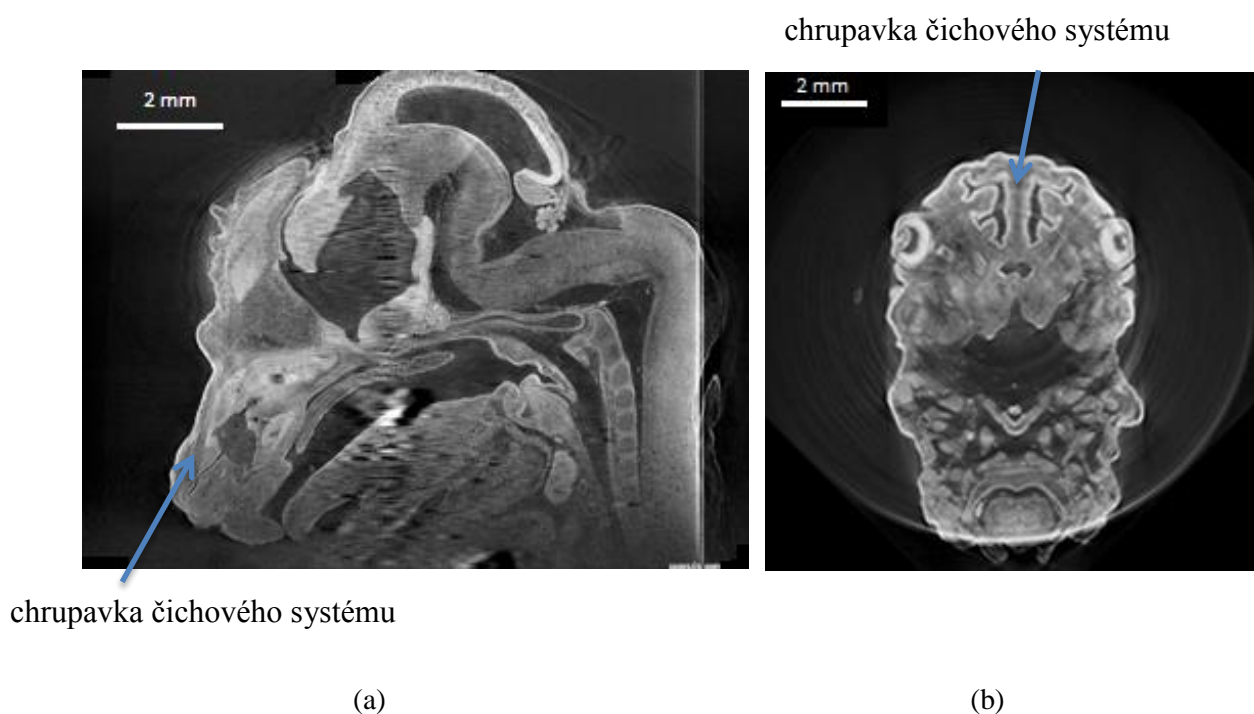
**Obr. 3. 11:** Sagitální řez E14 po rekonstrukci a korekcích dat ze synchrotronu.



**Obr. 3. 12:** Transverzální řez E14 po rekonstrukci a korekcích dat ze synchrotronu.

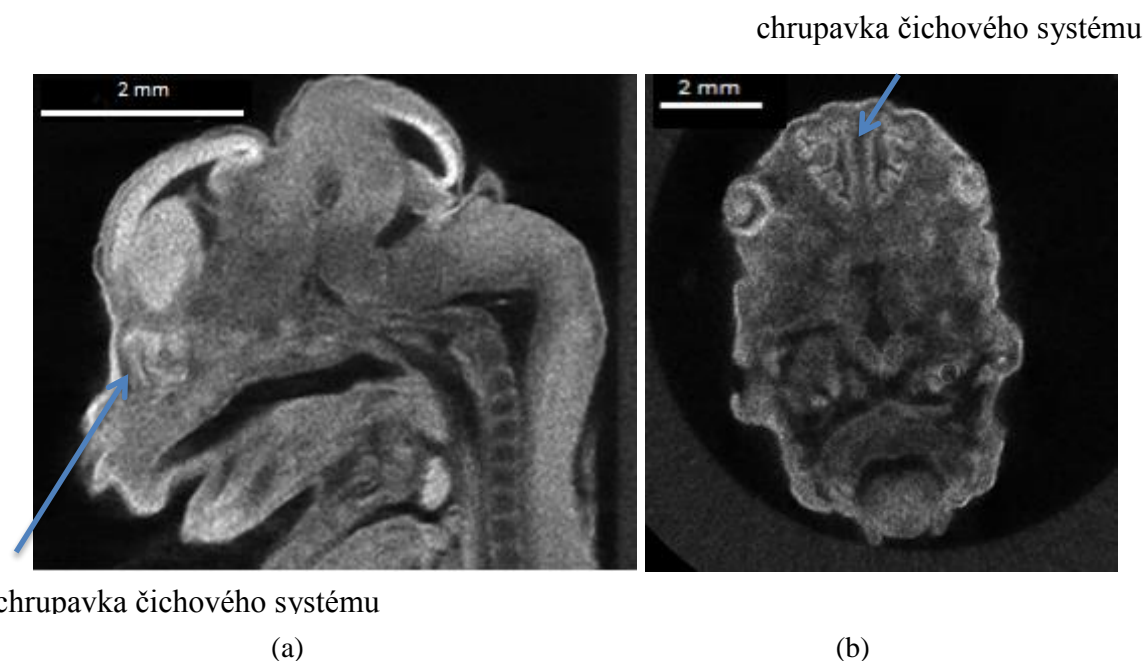
## 4 Porovnání kvality získaných dat z jednotlivých mikro-CT systémů

Na synchrotronu Elettra se skenovala pouze hlava embrya, protože svazek paprsků je paralelní a úzký. Embryo bylo umístěno v plastové trubičce, aby nedocházelo k tak velké absorpci a rozptylu záření jako u skleněné trubičky. Měření se muselo realizovat ve dvou blocích, protože tvarové vlastnosti svazku dovozovaly zachytit pouze část hlavy. Měření hlavy jednoho embrya trvalo 4 hodiny. U všech embryí došlo ke zmodrání, které bylo pravděpodobně způsobeno vlivem silné intenzity synchrotronového záření. Další nevýhodou synchrotronu je, že se jedná o zařízení málo dostupné a měření zde je velmi drahé. Ze synchrotronu byla získána data s vysokým rozlišením 2  $\mu\text{m}$ . Na transverzálním řezu Obr. 4. 1b se nachází embryo E14 po rekonstrukci dat a po korekci kruhových artefaktů, které jsou i přesto viditelné. Histogramy uvedených obrázků v této kapitole byly ekvalizovány pro zvýšení kontrastu obrázku. Na příčném řezu jsou vidět kruhové artefakty, které se nevyskytují na žádných rekonstruovaných datech ostatních mikro-CT systémů. Ring artefakty vznikají v kvůli různé citlivosti jednotlivých pixelů. Díky vysokému rozlišení lze vidět velké detaily. Nízký kontrast snímků však omezuje viditelnost jednotlivých struktur. Chrupavčitou tkáň lze rozlišit méně než z měření CT laboratoři Brno, ale je více viditelná oproti snímku získaného z laboratoře ČVUT viz Obr. 4. 1 (a) a Obr. 4. 1(b).



**Obr. 4. 1:** (a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya  
(b) Chrupavka v transverzálním řezu (data ze synchrotronu).

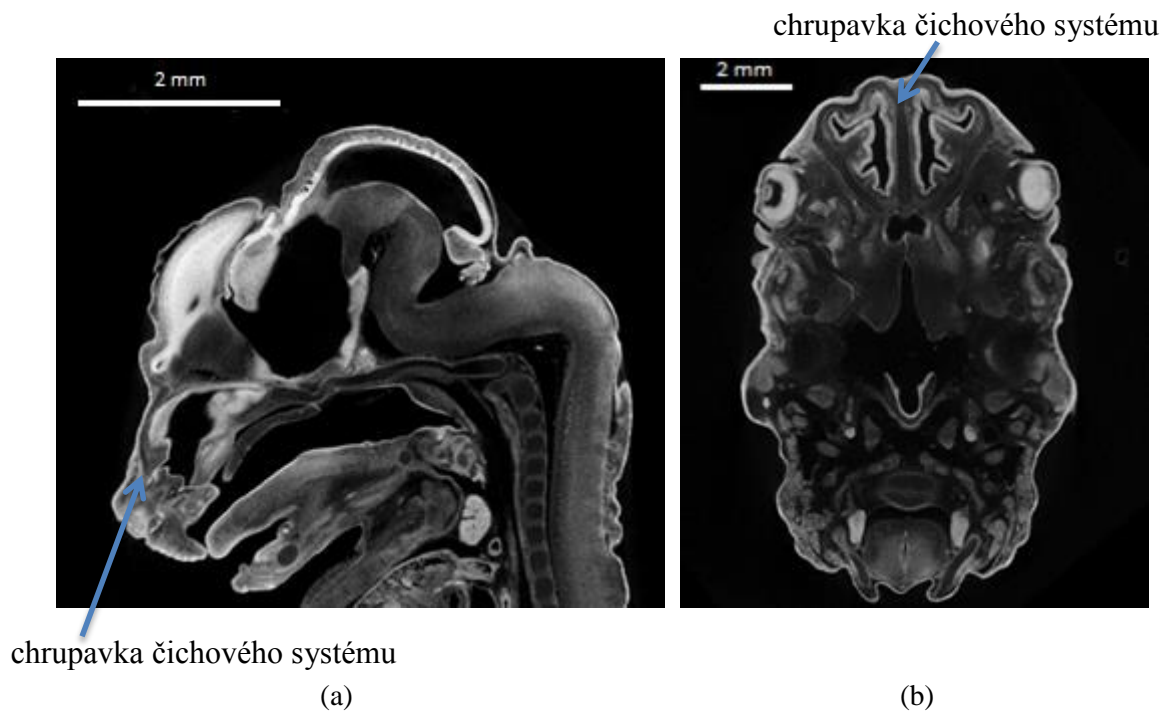
Na mikro-CT systému v Praze byl realizováno skenování celého embrya E14 na rozdíl od synchrotronu. Měření probíhalo pomocí čtyř detektorů Timepix uspořádaných v řadě. Pro zobrazení celého embrya bylo nutné provést měření ve třech blocích. Rozbíhavé rentgenové záření z trubice oproti synchrotronovému záření umožňuje zachycení větší části embrya. Detektor Timepix se skládá z 256 x 256 čtvercových pixelů s velikostí jednoho pixelu 55 x 55  $\mu\text{m}$ . Měření bylo časově náročné, protože ještě před samotným použitím detektoru musela být provedena kalibrace všech pixelů. Každý pixel je totiž připojen ke své vlastní elektronice. Výsledná data po rekonstrukci a korekcích lze vidět na Obr. 4. 2 (a) a Obr. 4. 2 (b). Data obsahují hodně šumu a voxelové rozlišení má velikost pouze 20  $\mu\text{m}$ . V řezech nejsou dostatečně rozlišitelné detaily. Oproti výsledným snímkům ze synchrotronu se na výsledných snímcích nenachází kruhové artefakty. Nižší kvalita dat je s největší pravděpodobností způsobená vysokou absorpcí a rozptylem záření skleněnou trubičkou, ve které bylo embryo umístěné. Dalším důvodem může být nedostatečně kvalitní počítačové předzpracování dat před rekonstrukcí. U zobrazené chrupavky nelze dostatečně rozlišit hrany. Ke zlepšení kvality dat by byla potřebná filtrace dat, při které by však došlo ke ztrátě detailů. Dostupnost mikro-CT systému se speciálním detektorem Timepix je mnohem lepší než u synchrotronu, ale vzhledem k ceně detektoru (cca desítky miliónů korun) ho lze v české republice najít právě v laboratoři ČVUT.



**Obr. 4. 2:** (a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya  
 (b) Chrupavka v transverzálním řezu (data z mikro-CT v Praze).

V Brně na mikro-CT stanici proběhlo měření embrya pomocí flat panelu a rentgenové trubice. Vzhledem k velikosti flat panelu (2048 x 2048 pixelů s rozměrem jednoho pixelu 200 x 200  $\mu\text{m}$ ) a rozbíhavému svazku rentgenového záření proběhlo skenování celého embrya

najednou. Měření trvalo přibližně jen 2 hodiny a oproti měření v Praze se systém nemusel před experimentem kalibrovat. Na výsledných zrekonstruovaných datech jsou kvalitně zachycené detaily jednotlivých struktur a snímek téměř neobsahuje šum ani kruhové artefakty viz následující obrázky. Rozlišení pro embryo E14 dosáhlo hodnoty 5  $\mu\text{m}$  a chrupavčitou tkáň lze dobře rozlišit. Mikro-CT v Brně je také ze všech použitých systémů nejvíce dostupné pro měření vzorků.



**Obr. 4. 3:** a) Chrupavka v sagitálním řezu hlavy embrya  
b) Chrupavka v transverzálním řezu (data z mikro-CT v Brně).

Na následujících obrázcích Obr. 4. 4, Obr. 4. 5 a Obr. 4. 6 lze vidět detail chrupavčité tkáně čichového systému z dostupných mikro-CT systémů. Nejlépe je chrupavka viditelná na zrekonstruovaných datech v Brně. Ze synchrotronu byla získána data největšího rozlišení, takže chrupavku jde také vidět. Přes nízký kontrast a kruhové artefakty nedosahují data tak vysoké kvality jako z měření v Brně. Chrupavka čichového systému z dat z Prahy je celkově viditelná nejméně, protože data obsahují velké množství šumu.

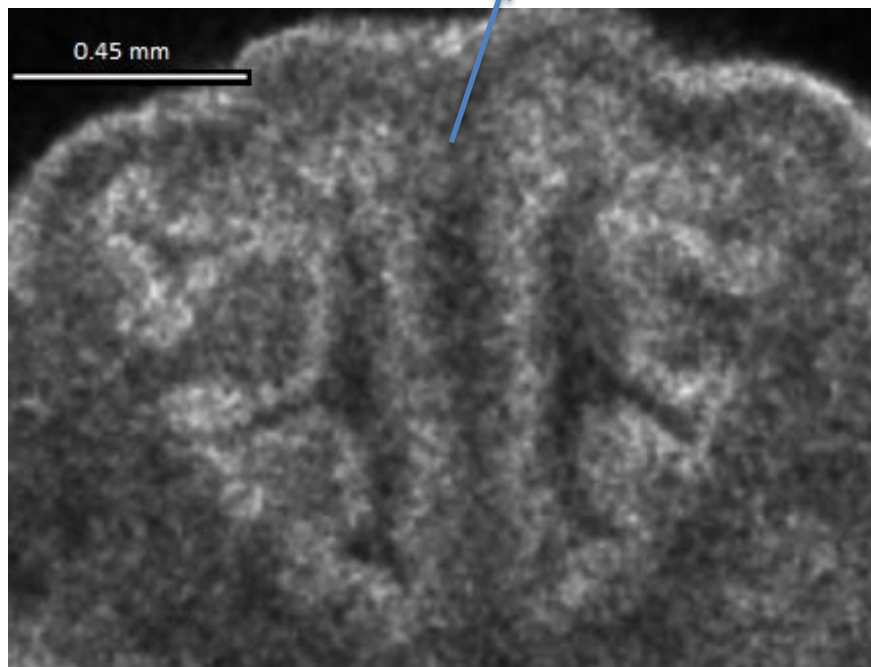
Z hlediska kvality výsledných zrekonstruovaných dat, dostupnosti systému i rychlosti měření byla pro následnou segmentaci chrupavky vybrána data z mikro-CT stanice v Brně.

chrupavka čichového systému



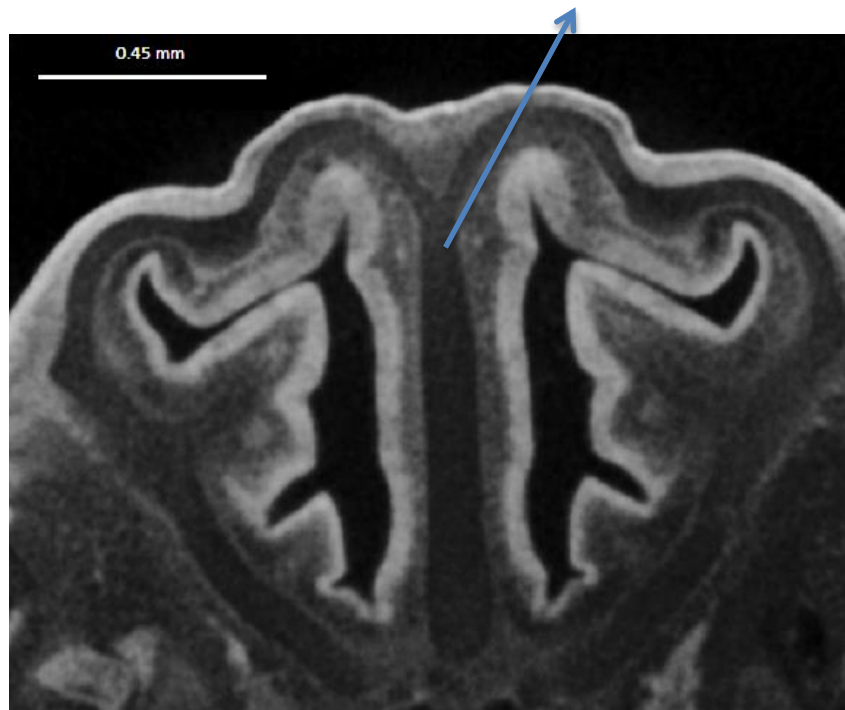
**Obr. 4. 4:** Detail chrupavky čichového systému z Obr. 4. 1b  
(data ze synchrotronu).

chrupavka čichového systému



**Obr. 4. 5:** Detail chrupavky čichového systému z Obr. 4. 2b  
(data z mikro-CT v Praze).

chrupavka čichového systému



**Obr. 4. 6:** Detail chrupavky čichového systému z  
(b)

**Obr. 4. 3b**  
(data z mikro-CT v Brně).

Další část práce se věnuje teoretickému rozboru předzpracování mikro-CT snímků pro segmentaci, používanými metodami segmentace a morfologickými operacemi. Mikro-CT snímky jsou následně vhodně předzpracovány a pro segmentaci chrupavčité tkáně se aplikuje metoda 3D region growing s využitím adaptivního prahování. Výsledná data jsou upravena pomocí morfologických operací a v programu Avizo vytvořen 3D model za účelem vizualizace chrupavky a porovnání s manuálně segmentovaným modelem.



## 5 Segmentace obrazu

Segmentace je proces rozdělení obrazu na nepřekrývající se oblasti, které odpovídají konkrétním objektům v obraze. Jedná se o jeden z nejdůležitějších kroků analýzy obrazu. Ve výsledném obraze jsou vyznačeny konkrétní hledané oblasti. Značí se buď celý obsah objektu, nebo lze vyznačit pouze jeho hranici. V medicínských datech se segmentace používá pro automatické rozpoznávání typů tkání, pro vizualizaci nebo 3D modelování tkání či kostí. Segmentační algoritmy lze rozdělit na regionově nebo hranově orientované segmentace a segmentace na základě homogenity oblastí. K regionově orientovaným patří metoda dělení a slučování oblastí nebo narůstání oblastí. Mezi hranově orientované se řadí např. Houghova transformace. Prahování spadá mezi metody, které segmentují objekty podle homogenity oblastí. [10][28]

Z mikro-CT laboratoře v Brně byly k dispozici mikro-CT snímky embrya myši více vývojových stádií. S ohledem ke kvalitě dat se pro testování segmentační metody zvolilo mutované 15,5 denní embryo, jehož zrekonstruované snímky mají nejvyšší kontrast a obsahují menší množství šumu. Chrupavčitá tkáň čtrnáctidenního embrya je segmentovaná podle výchozího nastavení algoritmu jen s menšími úpravami některých parametrů algoritmu. Ke zpracování snímků se využívá programové prostředí Matlab.

Pro úspěšnost segmentace je důležitá i kvalita vstupních dat. Výsledky získané pomocí segmentační metody Region growing ovlivňuje zásadním způsobem šum a rozdíl jasových hodnot mezi objektem a pozadím. Jelikož snímky mutovaného i čtrnáctidenního embrya šum obsahují a v určitých místech má segmentovaná chrupavčitá tkáň téměř stejné hodnoty jako její okolí, práce se zabývá podrobnějším rozbohem předzpracování dat.

### 5.1 Předzpracování obrazu pro segmentaci

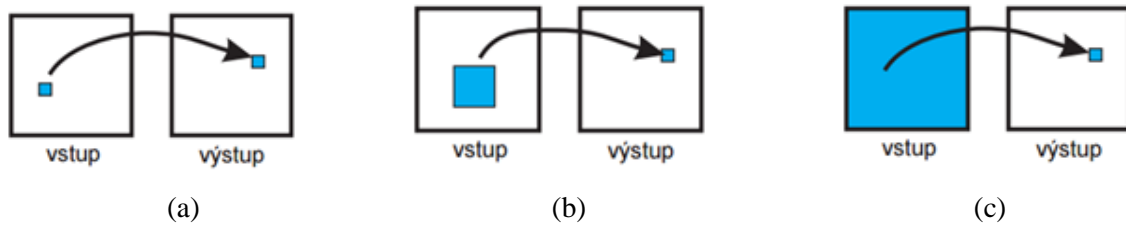
Předzpracování obrazu znamená práci s obrazem bez předchozí znalosti o jeho obsahu pro následnou segmentaci. K základním postupům patří vylepšení kontrastu, potlačení nežádoucího šumu nebo zvýraznění hran objektů. Špatná kvalita vstupních dat může podstatně zhoršit výsledek segmentace. U většiny operací, které se provádí u předzpracování, však dochází ke ztrátě určité informace. Odstranění šumu způsobuje rozmazání tenkých hran. Naopak při ostření obrazu, tedy zvýraznění vyšších frekvencí, se zvyšuje obrazový šum, který je také vysokofrekvenční. Pro předzpracování je proto potřeba zvolit určitý kompromis. [10]

Předzpracování se provádí pomocí tzv. operátorů, které umožňují zobrazení  $P$  vstupního obrazu  $f(x,y)$  na výstupní obraz  $g(x,y)$  podle následující rovnice.

$$g(x,y) = P(f(x,y)) \quad [11] \quad (5.1)$$

Operátory lze rozdělit na základě některých vlastností. Podle množství bodů vstupního obrazu, které ovlivňují jeden bod obrazu výstupního, se dělí na bodové, lokální nebo globální

viz Obr. 5. 1. Bodové mají vliv pouze na odpovídající bod vstupního a výstupního obrazu, u lokálních je výstupní pixel vypočten navíc pomocí nejbližšího okolí odpovídajícího pixelu. Při výpočtu pixelu s využitím globálního operátoru, je každý pixel výstupního obrazu ovlivněn všemi pixely vstupního. K bodovým operátorům patří např. transformace kontrastu nebo pseudobarvení. Lokální operátory umožňují potlačit aditivní Gaussovský šum nebo obraz zostřit. Mezi globální patří Vlnková transformace a Fourierova transformace.[24]



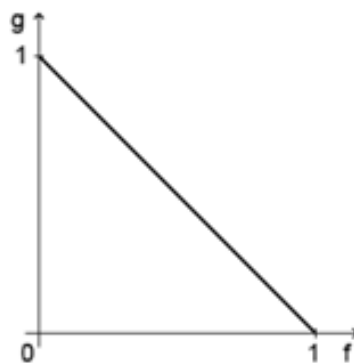
**Obr. 5. 1:** Předzpracování pomocí operátorů: (a) bodový, (b) lokální, (c) globální. [24]

### 5.1.1 Transformace kontrastu

Transformace kontrastu znamená převod stupňů šedi vstupního obrazu  $f_{i,k}$  na stupně šedi obrazu výstupního  $g_{i,k}$  podle funkce  $N$ , viz následující rovnice.

$$g_{i,k} = N(f_{i,k}) \quad (5.2)$$

Tuto transformační funkci lze vyjádřit pomocí funkčního předpisu nebo tabulky LUT, kde jsou uvedeny konkrétní hodnoty, na které mají být stupně šedi vstupního obrazu převedeny. Mezi nejběžnější transformace kontrastu patří ekvalizace histogramu, lineární transformace pro využití celé škály stupňů šedi, transformace na negativ, exponenciální transformace a Gama korekce. [] Tyto transformace jsou vyjádřeny pomocí tzv. transformačních funkcí, které vyjadřují závislost stupňů šedi výstupního obrazu na stupních šedi obrazu vstupního. Na Obr. 5. 2 lze vidět ukázkou transformační funkce pro negativ. [11]

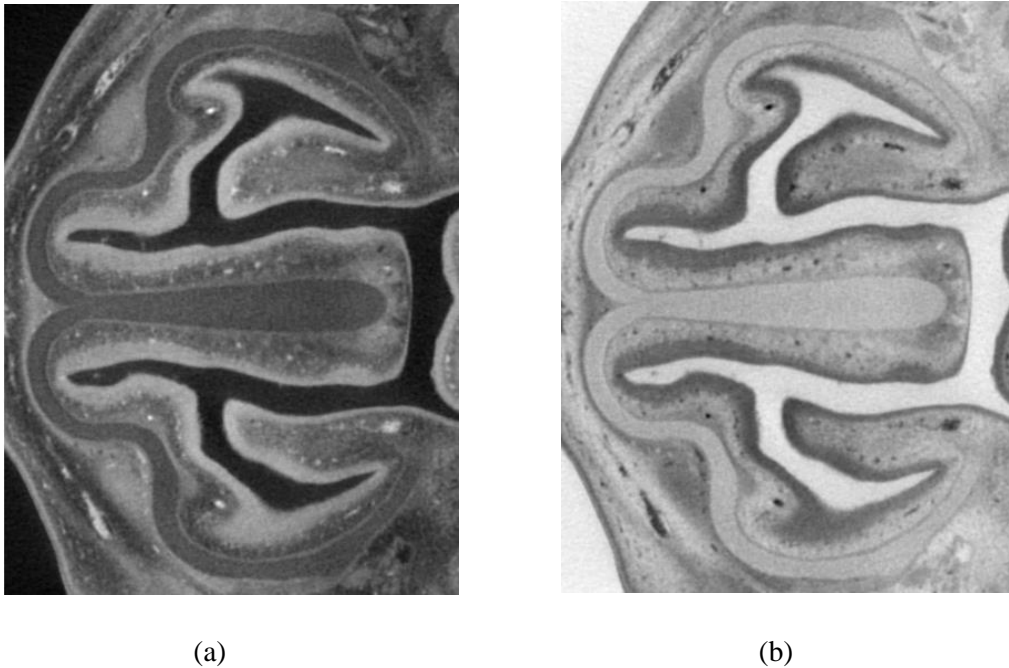


**Obr. 5. 2:** Transformační funkce pro negativ.

## Negativ

Negativ představuje převrácení tmavých stupňů šedi na světlé a naopak. Používá se zejména pro snazší čitelnost některých struktur obrazu na základě subjektivního vnímání jasu. Je charakterizován následující rovnicí a jeho transformační funkce má tvar lineárně klesající funkce. [10][11]

$$g_{i,k} = 1 - f_{i,k} \quad (5.3)$$



**Obr. 5. 3:** Transformace na negativ: (a) originál, (b) negativ.

Na Obr. 5. 3 se nachází originální snímek a snímek transformovaný na negativ. Podle subjektivního vnímání se jeví jako kontrastnější snímek ležící vlevo, protože obsahuje více černé barvy a leží na světlém pozadí. Negativ neovlivňuje šum ani celkový kontrast, tedy není třeba této úpravy pro následnou segmentaci.

## Ekvalizace histogramu a lineární transformace

Ekvalizace histogramu znamená vytvoření obrazu o přibližně rovnoměrném rozložení jasu v histogramu. Následující rovnice ukazuje princip této transformace.

$$h_l^g = \sum_{k=k_1}^{k_1+\Delta k_1} h_k^f, \quad (5.4)$$

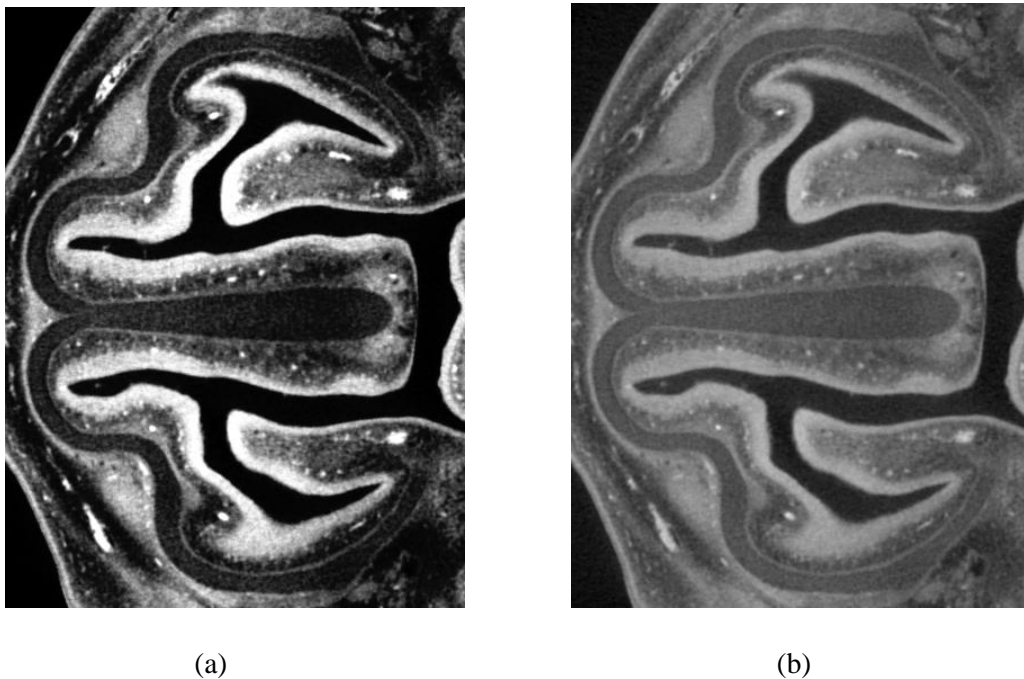
kde  $h_l^g$  představuje jednotlivé třídy  $l$  histogramu  $h$  výstupního obrazu  $g(x,y)$ . Tyto třídy se vypočítají postupným součtem několika sousedních tříd histogramu vstupního obrazu

$h_k^f$ . Aktuální suma nesmí být větší než vypočítaná hodnota  $mn/q$ , kde  $m \times n$  určuje rozměry vstupního obrazu  $f(x,y)$  a  $q$  stupně šedi. Transformační křivka je ve tvaru schodovité neklesající funkce. V obrazu s celkově vysokým kontrastem ekvalizace umožňuje zvýraznit špatně rozpoznatelné detaily s nižším kontrastem. [11]

Cílem lineární transformace kontrastu je využít celou škálu stupňů šedi, aby byl histogram obrazu v intervalu  $\langle 0,1 \rangle$ . Oproti ekvalizaci nemusí být stupně šedi rovnoměrně zastoupeny. Výpočet lineární transformace znázorňuje následující rovnice.

$$g_{i,k} = \frac{f_{i,k} - \min(f)}{\max(f) - \min(f)} \quad (5.5)$$

Výše uvedený vzorec zajišťuje posun minimální hodnoty na nulu, maximální hodnoty na jedničku a lineárního rozmístění ostatních hodnot do tohoto intervalu. Na Obr. 5. 4 lze vidět snímek upravený pomocí ekvalizace a lineární transformace. [24][25][26]



**Obr. 5. 4:** Transformace snímku: (a) ekvalizace, (b) lineární transformace.

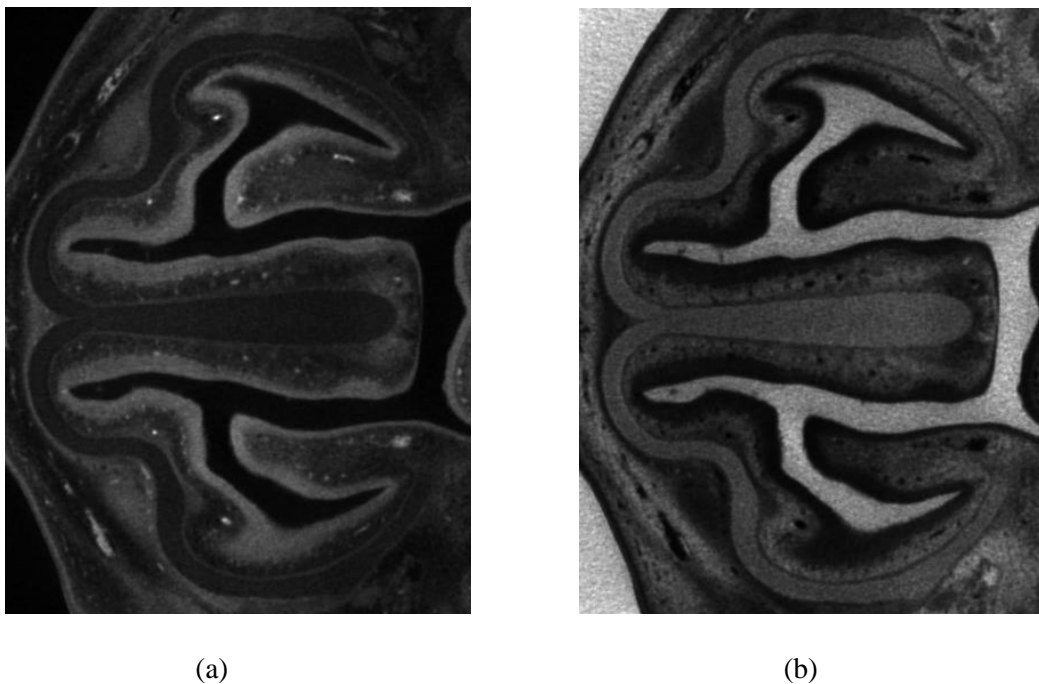
U lineární transformace nedošlo ve srovnání s originálním snímkem k viditelné změně. Ekvalizace zvýšila kontrast snímku i rozdíl hodnot intenzit mezi chrupavkou a jejím okolím.

## Exponenciální transformace a gama korekce

Mezi nelineární transformace patří exponenciální transformace a gama korekce. Exponenciální transformace je vyjádřena následující rovnicí.

$$g_{i,k} = b^{f_{i,k}}. \quad (5.6)$$

Výsledek metody je závislý na použitém základu  $b$ . Při použití základu v rozmezí  $\langle 0,1 \rangle$  má transformační křivka tvar konvexní a klesající. S hodnotou koeficientu blíží se jedničce vypadá výsledný obraz stále více jako negativ, směrem k nule jsou jasové hodnoty oproti negativu tmavší. Více se však přibližují negativu než originálu. Čím více se hodnota základu blíží k nule, tím více je exponenciální. Při zvyšování tohoto exponentu nad hodnotu jedna, je výsledný snímek ve srovnání s originálem tmavší a transformační křivka má konvexní a rostoucí tvar. Pokud se použije základ vyšší než jedna, musí se výsledný obraz opět normalizovat do intervalu  $\langle 0,1 \rangle$ . Na Obr. 5. 5 lze vidět výsledné snímky s použitím různého základu. [10][11][24]



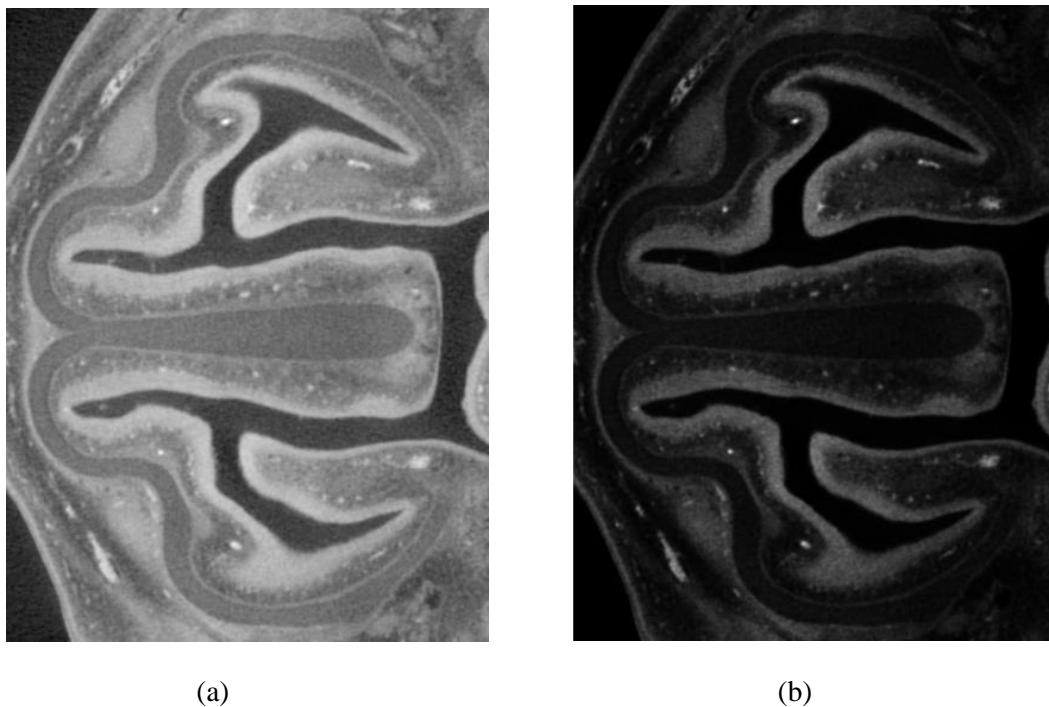
**Obr. 5. 5** Exponenciální transformace s použitím základu: (a)  $b=15$ , (b)  $b=0,01$ .

Metodu Gama korekce lze popsat následující rovnicí.

$$g_{i,k} = f_{i,k}^{\gamma} \quad (5.7)$$

Parametr  $\gamma$  obvykle nabývá hodnot v rozmezí  $\langle 0,6; 2,5 \rangle$ . Při zvyšování parametru nad hodnotu jedna se transformační funkce stává konvexní nelineární a výsledný snímek je tmavší. Naopak s hodnotou  $\gamma$  nižší než jedna je funkce čím dál více konkávní nelineární a

výsledný obraz světlejší než originál. Na obr. se nachází výsledky gama korekce s použitím parametru 0,7 a 2,5. Po aplikaci této metody není potřebná normalizace obrazu.



**Obr. 5. 6:** Gama korekce s hodnotou parametru: (a)  $\gamma = 0,7$ ; (b)  $\gamma = 2,5$ .

### 5.1.2 Potlačení šumu

Šum se v praxi vyskytuje v každém obraze. Pro výběr metody k jeho odstranění je třeba znát charakteristiku konkrétního šumu. Obrazový šum lze dělit podle propojení s obrazem, dále podle amplitudy, prostorového rozložení šumu nebo spektrálního obsahu. Propojení s obrazem znamená, zda se v obraze nachází šum aditivní nebo multiplikativní. Na základě spektrálního obsahu se rozlišuje šum úzkopásmový nebo širokopásmový. V digitálním obraze se nejvíce vyskytuje Gaussovský šum a impulsní šum typu „sůl a pepř“.

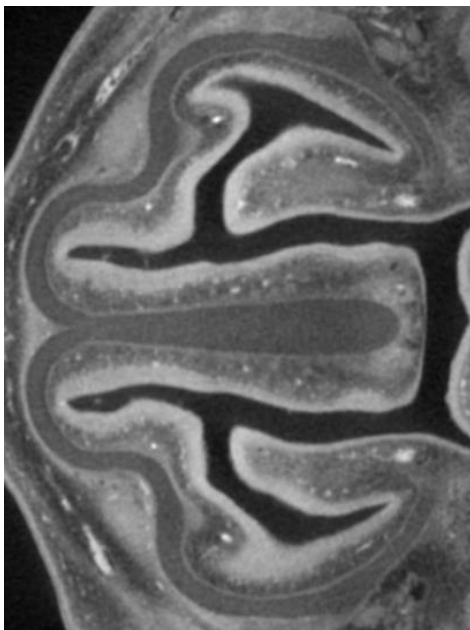
Gaussovský šum postihuje celý obraz. Ke každému pixelu v obraze je přiřčena hodnota z normálního rozložení, tedy se jedná o aditivní šum s nulovou střední hodnotou. Intenzity dosahují hodnot podstatně nižších než maximální intenzity obrazu. Jedná se o širokopásmový šum, kde jsou všechny frekvence stejně postiženy. Potlačení takového šumu je založeno na *průměrování* série obrazů stejné scény, struktury opakující se v obraze nebo skupiny sousedních pixelů v obraze. Dochází tak ke snížení rozptylu Gaussovského šumu, kde nulová střední hodnota má tendenci se vykompenzovat. Používají se konvoluční průměrovací masky, které jsou tvořeny maticí prvků. Na každé pozici vstupního obrazu se vypočítává konvoluce konkrétního pixelu s maskou. Jako průměrovací masky mají buď všechny prvky stejně velké, nebo se mění jejich centrální prvek. Masky pro redukci Gaussovského šumu o různé velikosti a výsledné snímky při použití těchto masek lze vidět

v následujících 3 rovnicích a na Obr. 5. 7a, b, c. První dvě masky se nachází v normalizovaném tvaru, tzn. jsou vyděleny počtem prvků, který obsahují a nedochází tak k prudké změně jasových hodnot obrazu. [10][11]

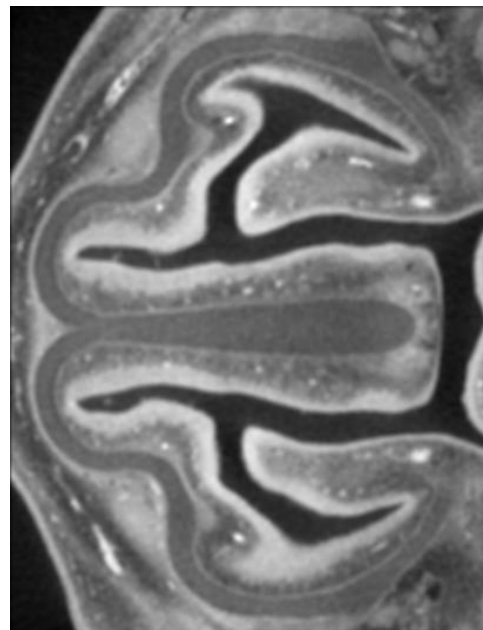
$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} / 9 \quad (5.8)$$

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} / 25 \quad (5.9)$$

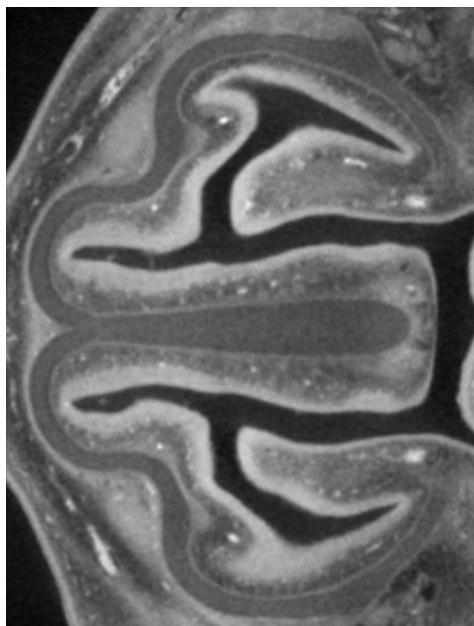
$$\begin{bmatrix} \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} \\ \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} \\ \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.5} & \overline{0.02} & \overline{0.02} \\ \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} \\ \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} & \overline{0.02} \end{bmatrix} \quad (5.10)$$



(a)



(b)



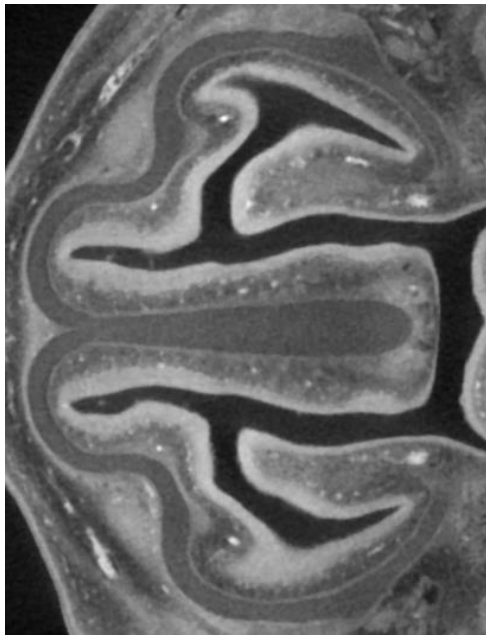
(c)

**Obr. 5. 7:** Odstranění Gaussovského šumu: (a) pomocí masky (5.8),  
(b) pomocí masky (5.9), (c) pomocí masky (5.10).

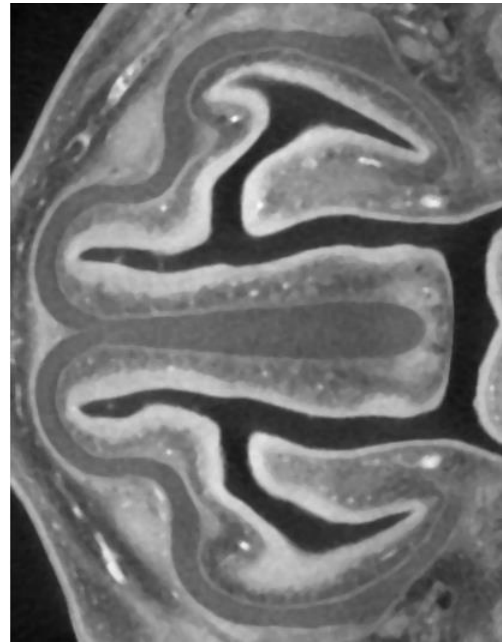
Při zachování stejných hodnot všech prvků průměrovací matice platí pravidlo, že se zvyšujícím se počtem prvků této matice dochází k většímu vyhlazení šumu a rozostření hran. Druhá a třetí použitá maska má stejnou velikost, ale velikost centrálního prvku matice třetí je větší oproti ostatním prvkům stejné matice. Lze vidět, že vyšší centrální prvek snižuje míru průměrování.

Impulzní šum postihuje izolované pixely nebo skupiny pixelů. Jeho intenzity mají vysoké hodnoty na rozdíl od intenzit původního obrazu, tedy se zobrazují jako černé nebo bílé body. Odstranění impulzního šumu lze dosáhnout nalezením postiženého pixelu a nahradit z okolních pixelů, které pravděpodobně šum neobsahují tzv. „*detekce-náhrada*“. Jako další metoda se používá mediánový filtr založený na třídění hodnot jasů skupin pixelů v obrazu. K výpočtu pixelu výstupního obrazu se používá lokální okolí konkrétního pixelu. Do výstupního obrazu se na pozici centrálního prvku vkládá medián ze setříděných pixelů. Šum se pro vysoké hodnoty intenzit nachází na okrajích setříděných prvků. Odstranění impulzního šumu pomocí mediánového filtru lze vidět na Obr. 5. 8a, b. Čím větší je použitá maska, tím dochází k většímu vyhlazení, ale i rozostření dat. [10][11]





(a)



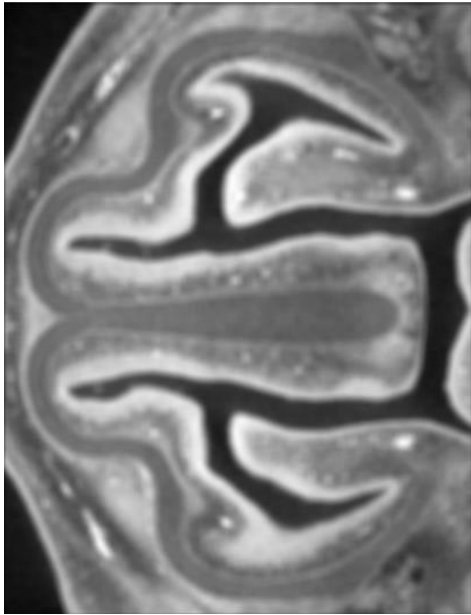
(b)

**Obr. 5. 8:** Odstranění impulzního šumu mediánovým filtrem: (a) velikost masky 3x3, (b) velikost masky 5x5.

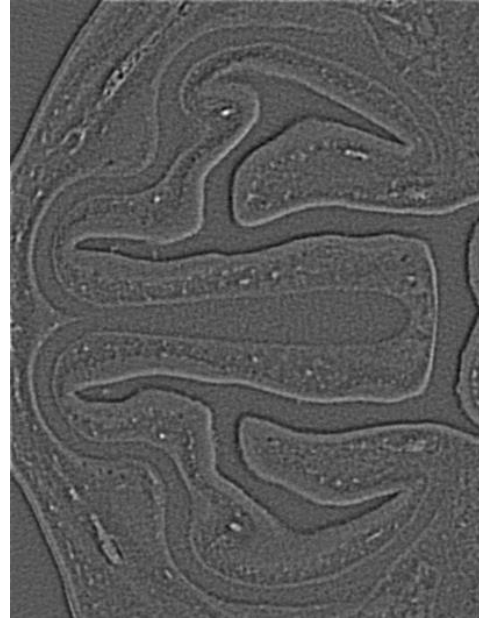
### 5.1.3 Ostření obrazu

Zostření obrazu znamená zdůraznění vysokých prostorových frekvencí pomocí tzv. diferenčních operátorů. Hranu představuje dostatečně vysoká změna jasu v obrazu. S rychlejší změnou této hodnoty je hrana zřetelnější a lépe detekovatelná. Využívá se ostření odečtením rozostřeného obrazu, pomocí lokálních operátorů nebo úpravou spektra, kde se zvýší zastoupení vysokofrekvenčních složek. [10]

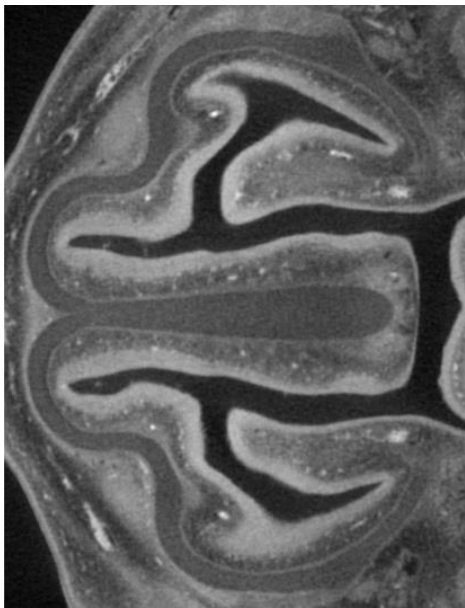
První metoda využívá odečtení rozostřeného obrazu od originálu při získání obrazu se zvýrazněnými hranami. Byla použita normalizovaná průměrovací maska velikosti 8x8 se stejnou velikostí všech prvků. Přičtením takto upraveného obrazu k originálu lze dostat zostřený obraz. Touto metodou ovšem dochází ke zvětšení podílu šumu výsledného obrazu ve srovnání originálem. Podíl obraz/šum se zvyšuje úměrně s velikostí rozostření použitého obrazu. Výsledné snímky jednotlivých kroků lze vidět na Obr. 5. 9a, b, c, d.



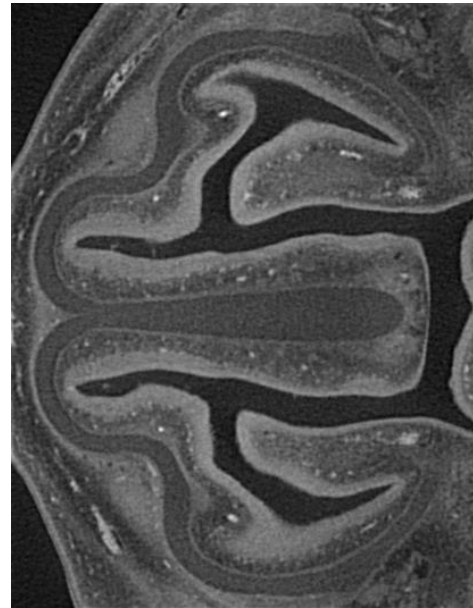
(a)



(b)



(c)



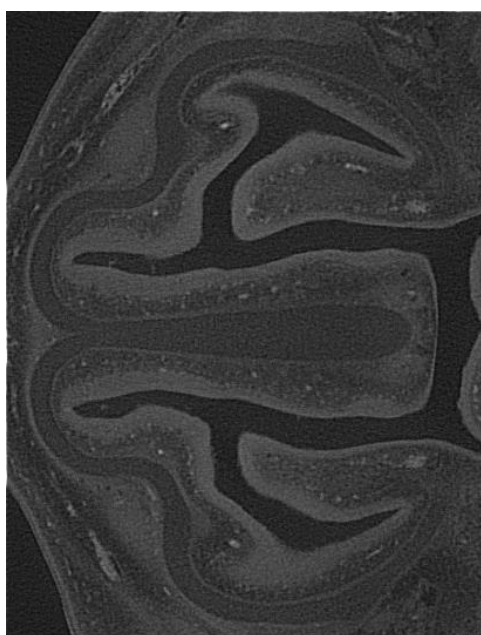
(d)

**Obr. 5. 9:** Ostření odečtením rozostřeného obrazu: (a) rozostřený obraz, (b) detaily originálu, (c) zostřený obraz, (d) přičtení zostřeného obrazu k originálu.

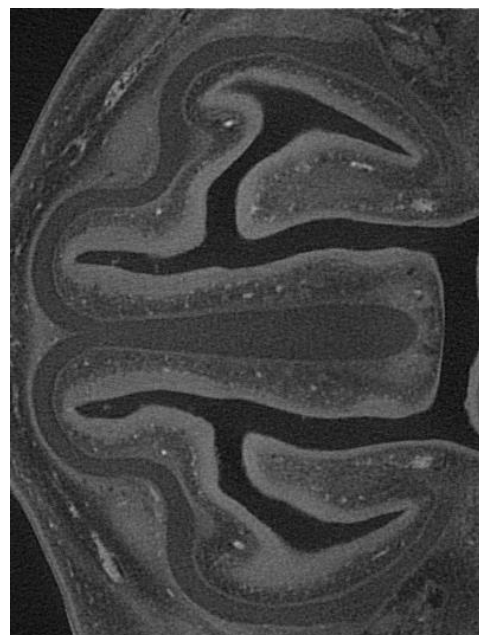
Za účelem ostření pomocí lokálních operátorů se využívají konvoluční ostřicí masky. Příklad masek a výsledné snímky za použití těchto masek ukazují následující dvě rovnice a Obr. 5. 10:a, b. Také touto metodou dochází ke zhoršení podílu obraz/šum. [11]

$$\begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 9 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \quad (5. 11)$$

$$\frac{1}{2} \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 10 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \quad (5. 12)$$



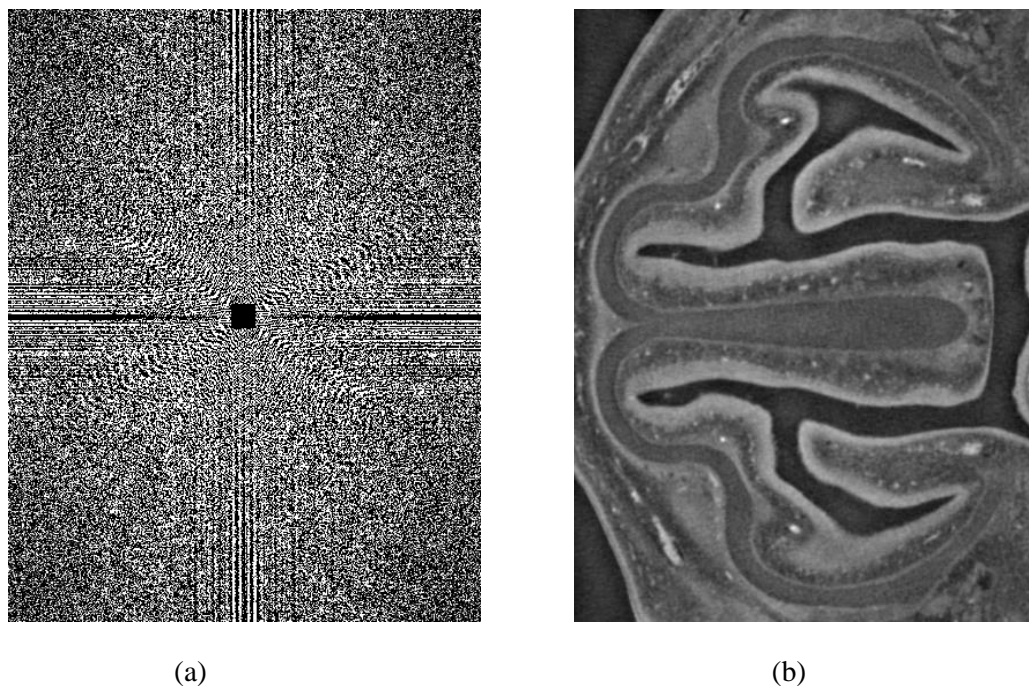
(a)



(b)

**Obr. 5. 10:** Ostření pomocí lokálních operátorů: (a) využití masky (5.11), (b) využití masky(5.12).

K ostření obrazu lze použít Fourierovu transformaci pro převod do frekvenční oblasti. Hrany představují vysoké frekvence v obrazu, takže potlačením koeficientů odpovídajících nízkým frekvencím se po zpětném převodu do originální oblasti získá obraz detailů. Sečtením originálu s detaily vznikne zostřený obraz. Na Obr. 5. 11a se nachází originální obraz převedený do frekvenční oblasti s potlačenými nízkými frekvencemi a Obr. 5. 11b ukazuje výsledný obraz po převodu do originální oblasti.



**Obr. 5. 11:** Ostření ve frekvenční oblasti: (a) potlačení nízkých frekvencí originálu po převodu do frekvenční oblasti, (b) výsledný snímek po převodu do originální oblasti.

#### 5.1.4 Cannyho detektor hran

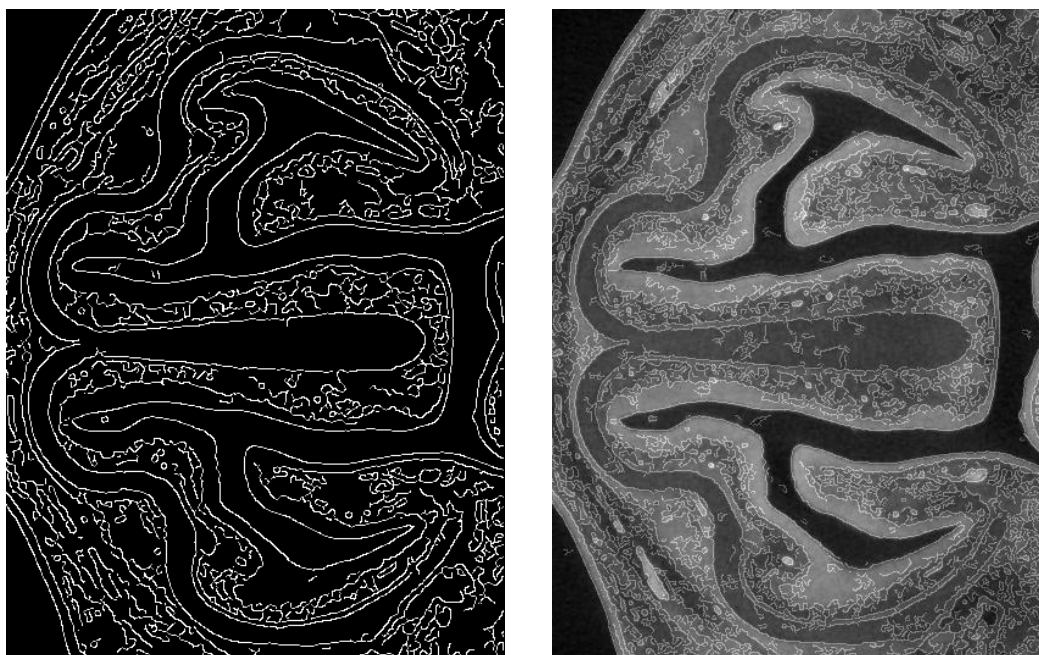
Detektory hran transformují šedotónový obraz na obraz binární. Hrany představují místa obrazu, kde se rychle mění jas a ve výsledném binárním obrazu jsou reprezentovány bílými pixely. Obvykle se využívá prvních a druhých derivací, u digitálních obrazů aproximovaných jako první a druhé difference. U první derivace odpovídá hrana lokálnímu extrému a u druhé se jedná o průchod nulou.

Cannyho detektor patří mezi pokročilejší detektory hran, který je méně citlivý na šum. Oproti jiným přístupům se jedná o posloupnost více kroků: filtruje se šum pomocí Gaussianu, detekují hrany ve všech směrech, vypočítá gradientní obraz, atd. []

S ohledem na použití předzpracovaných obrazů pro metodu region growing, samotný binární obraz obsahující hrany není vhodný. Sečtením binárního obrazu a váhovaného originálu však vznikne opět šedotónový obraz, který má zvýrazněné hrany a je tak vhodný pro segmentační metodu, viz následující rovnice a Obr. 5. 12a, b. Váha se originálnímu obrazu přidává, aby vynikly jeho hrany. [11]

$$g_{i,k} = w f_{i,k} + b, \quad (5.13)$$

kde  $w$  reprezentuje váhu originálního obrazu,  $f_{i,k}$  označuje originální a  $b$  binární obraz.



(a)

(b)

**Obr. 5. 12:** Použití Cannyho detektoru: (a) binární obraz s hranami, (b) výsledný obraz po sečtení binárního obrazu a váhovaného originálu.

## 5.2 Používané metody segmentace CT snímků

Segmentace CT snímků představuje první krok při tvorbě 3D modelu jednotlivých struktur. Podle míry zásahu uživatele ji lze rozdělit na manuální, poloautomatickou nebo automatickou. Manuální segmentace je celá realizována uživatelem. Algoritmy při ní mohou pomáhat, ale samy segmentaci neprovádí. Poloautomatická segmentace je více nebo méně uskutečněná automaticky a uživatel při ní může nastavovat parametry segmentace. U automatické segmentace algoritmus pracuje sám bez zásahu uživatele. Nevýhodou manuální segmentace je velká časová náročnost, a proto bývá snaha o její automatizaci. Pro automatickou segmentaci je třeba navrhnout vhodný algoritmus, který zařadí jednotlivé body snímku do konkrétní třídy. Existuje 2D segmentace, kdy algoritmus pracuje postupně na jednotlivých snímcích nebo 3D segmentace využívající celý 3D prostor. 3D segmentace bývá pomalejší, ale lze u ní dosáhnout větší přesnosti.

O automatické segmentaci měkkých tkání CT snímků je publikováno hodně vědeckých prací, ale segmentaci chrupavčité tkáně se dosud mnoho vědců nezabývalo. Často bývají segmentovány játra a plíce, méně mozek, ledviny nebo srdce [12][13][14][15][16]. V článku [17] se popisuje metoda segmentace chrupavčité tkáně kyčle větvením svazku (pruning). CT snímky bývají obvykle segmentovány pomocí metody rozvodí, aktivních kontur, narůstání oblastí- semínkové metody nebo dělení a slučování oblastí. Někdy se objekt segmentuje také využitím fuzzy klasifikace, vlnkové transformace a Houghovy transformace.

Pro segmentaci chrupavčité tkáně čichového ústrojí se jevila jako vhodná semínková metoda narůstání oblastí.

## 6 Narůstání oblastí: semínková metoda

Jako vhodná segmentační metoda se jevila pro segmentaci chrupavčité tkáně metoda narůstání oblastí neboli tzv. region growing. Narůstání oblastí patří k regionově orientovaným segmentačním přístupům, do kterých spadá také metoda dělení a slučování oblastí. Tyto přístupy rozdělují obraz do oblastí na základě jejich homogenity.

Princip metody spočívá v seskupování pixelů do narůstající oblasti podle definovaného kritéria homogenity. Při segmentaci je zvolen iniciační bod  $p_s$ , tzv. semínko, ze kterého začíná oblast narůstat. Tento pixel je vybrán buď na základě předchozí analýzy obrazu, nebo může být zadán interaktivně uživatelem. Následně se kontrolují sousední pixely a podle kritéria homogenity je rozhodnuto, zda budou k narůstající oblasti přidány. Kritéria se rozdělují na statická nebo dynamická. Vzorec pro statické kritérium vyjadřuje následující rovnice.

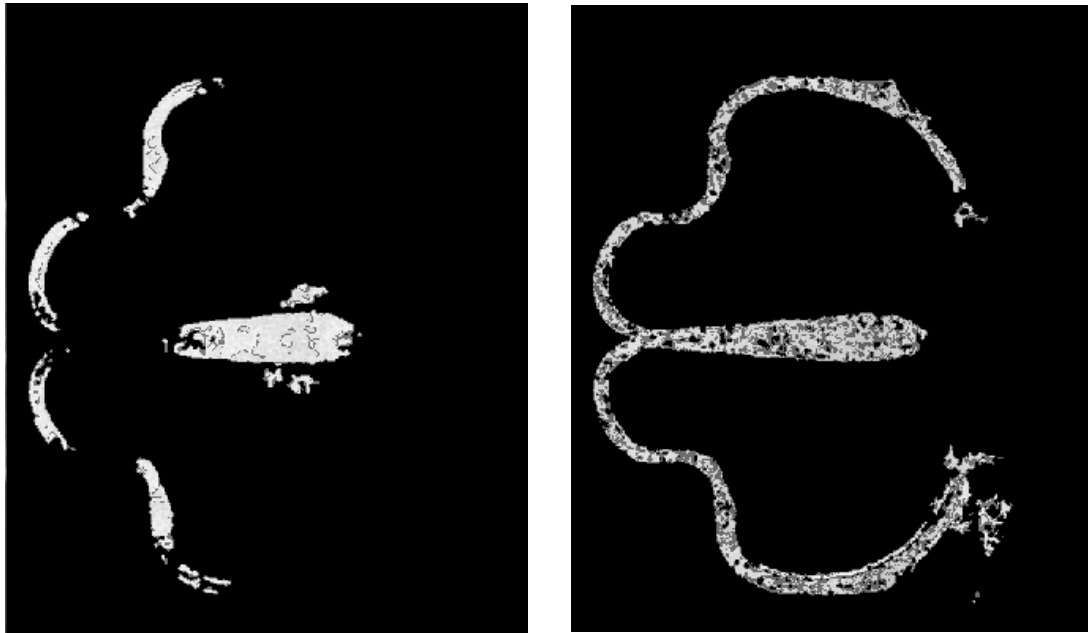
$$|p_s - p_j| \leq T, \quad (6.1)$$

$p_s$  představuje jas semínka,  $p_j$  je jas aktuálně testovaného pixelu a  $T$  odpovídá nastavenému prahu. U statického kritéria se tedy porovnává parametr semínka s parametrem testovaného pixelu. Pokud sousední pixel vyhovuje podmínce, stává se součástí narůstající vysegmentované oblasti a tvoří v dalším cyklu nový iniciační bod. Možností dynamického kritéria je více. Lze porovnávat parametry testovaného pixelu a aktuální střední hodnoty pixelů zařazených do vysegmentované oblasti  $p_a$  nebo naposledy přidaného pixelu  $p_i$ , viz následující dvě rovnice.

$$|p_i - p_j| \leq T \quad (6.2)$$

$$|p_i - \overline{p_a}| \leq T \quad (6.3)$$

Dynamické kritérium umožňuje postupnou změnu vstupních parametrů, takže lze segmentovat i oblasti méně homogenní. Na Obr. 6. 1a lze vidět výsledný snímek s použitím statického kritéria a na Obr. 6. 1b použití dynamického kritéria. [10][11][28]



(a)

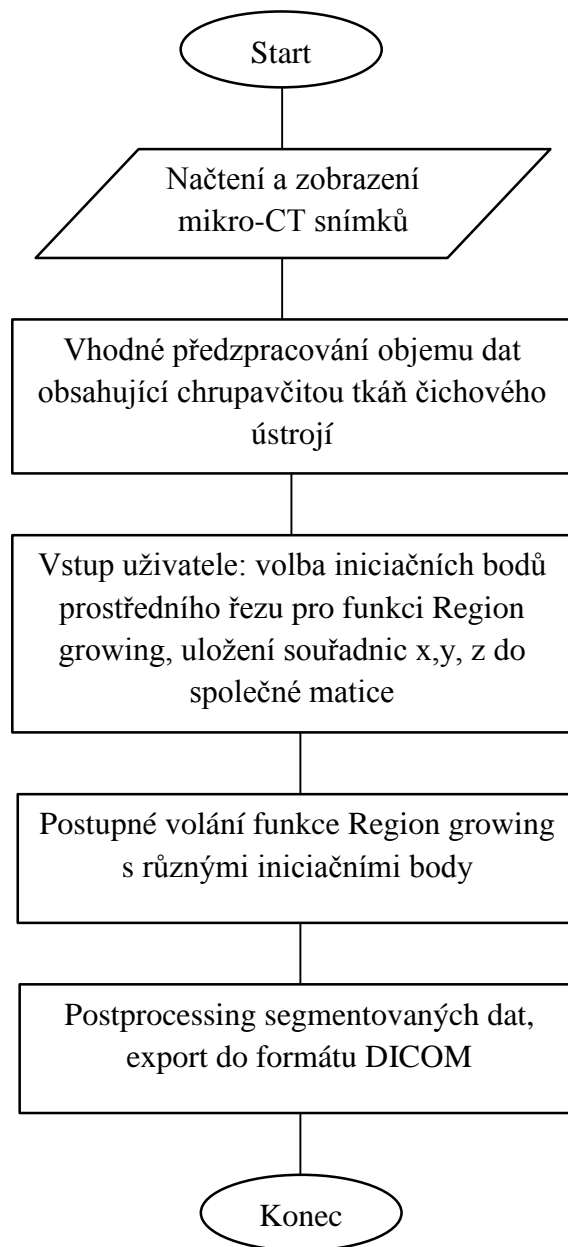
(b)

**Obr. 6. 1:** Narůstání oblastí s využitím: (a) statického kritéria, (b) dynamického kritéria.

## 6.1 Implementace metody ve 3D

Metoda region growing byla implementována do 3D s využitím adaptivního prahování neboli tzv. dynamického kritéria. Algoritmus byl vytvořen v programovém prostředí Matlab. Chrupavka čichového ústrojí obou testovaných embryí obsahuje přibližně 400 snímků. Pro nastavení vhodných parametrů je používán pouze vzorek objemu dat mutovaného embrya. Na Obr. 6. 2 a Obr. 6. 3 jsou vidět vývojové diagramy pro hlavní program a podprogram, které graficky znázorňují důležité kroky použitého algoritmu.

V prvním kroku hlavního programu dochází vždy k načtení jednoho konkrétního mikro-CT snímku obsahujícího chrupavku čichového ústrojí. Z něho se pro další úpravy vybere pouze samotná oblast chrupavčité tkáně. Výřez je následně vhodným algoritmem předzpracován a uložen do předpřipraveného prostoru. Takto se postupně zpracují i ostatní snímky. V dalším kroku se zobrazí prostřední z předzpracovaných snímků a uživatel si volí určitý počet iniciačních bodů, které představují vstupní semínka tzv. seedy pro nárůst segmentované oblasti. Souřadnice  $x$ ,  $y$  a  $z$  vybraných bodů se uloží do společné matice a pro každý z nich je postupně volán podprogram s funkcí region growing. Tato funkce se tedy opakuje vícekrát podle počtu volených bodů. Výsledný vysegmentovaný obraz je v konečné fázi upraven zvolenými morfologickými operacemi viz kapitola 7 Morfologické operace

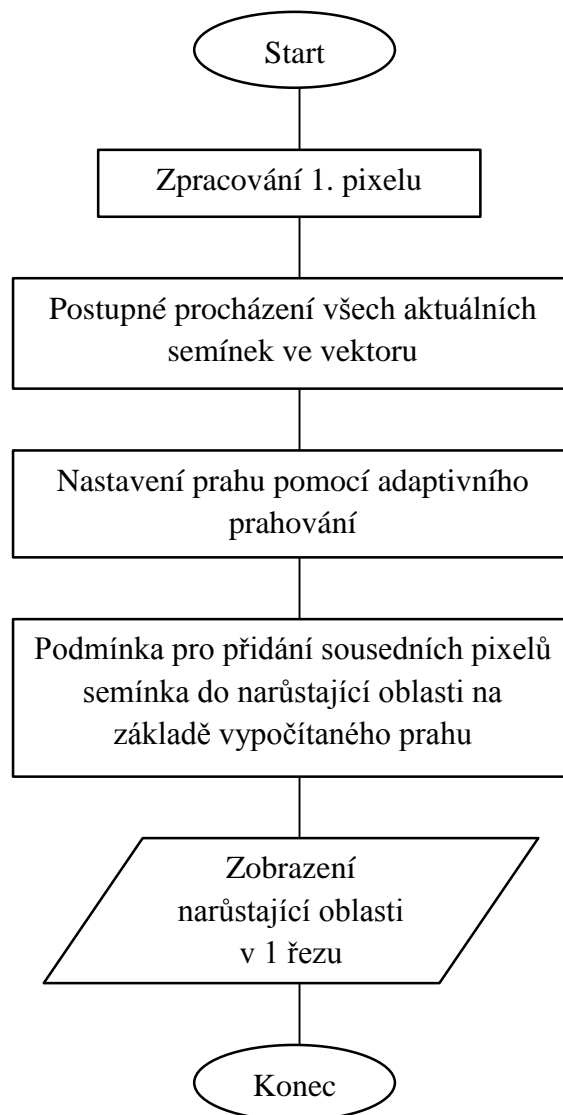


**Obr. 6. 2** Vývojový diagram hlavního programu

Pro funkci region growing je předpřipravená 3D maska, která má stejnou velikost jako objem předzpracovaných dat a ukládá se do ní vysegmentovaná chrupavčitá tkáň. Zpočátku obsahuje nulové hodnoty. Pouze všechny okrajové části jsou nastaveny na hodnotu jedna, aby nedošlo k jejich testování. Funkce zpracovává rozdílným způsobem iniciační bod ve srovnání s ostatními body. Automaticky, bez použití prahování, jsou k prvnímu zpracovávanému pixelu přidány čtyři okolní body a nastaveny jako další výchozí semínka. Zabrání se tak případnému okamžitému ukončení segmentace v důsledku nehomogenit v obrazu. Těmto seedům je následně na základě adaptivního prahování vypočítán práh a podle jeho hodnoty se rozhoduje o přidání dalšího bodu do vysegmentované oblasti. Vždy se celkem kontrolují 3



řezy pro jedno konkrétní semínko, ze stejného řezu čtyři okolní body a ze sousedních řezů bod se stejnými souřadnicemi x,y jako semínko. Kontrolují se jen body, které ještě nebyly testovány a jsou v masce označeny hodnotou nula. Adaptivnímu prahování se věnuje samostatná kapitola Adaptivní prahování. Při splnění podmínky prahování se konkrétní bod uloží do 3D masky s hodnotou 2, která značí nastavení bodu jako dalšího výchozího semínka. Přidané body se ukládají do vektoru a v dalším cyklu programu se prochází všechny tyto nová semínka. Pokud není splněna podmínka prahování, bod se do masky uloží s hodnotou jasu jedna, aby nedošlo opět k jeho kontrole. Okrajové části 3D masky jsou nastaveny na hodnotu 1 jako testované body, protože na krajích nelze kontrolovat čtyřokolí jednotlivých pixelů. Funkce region growing je ukončena, pokud se ve vektoru nenachází žádná další semínka. Narůstání segmentované oblasti lze sledovat na snímku, ze kterého byl zvolen iniciační bod pro segmentaci.



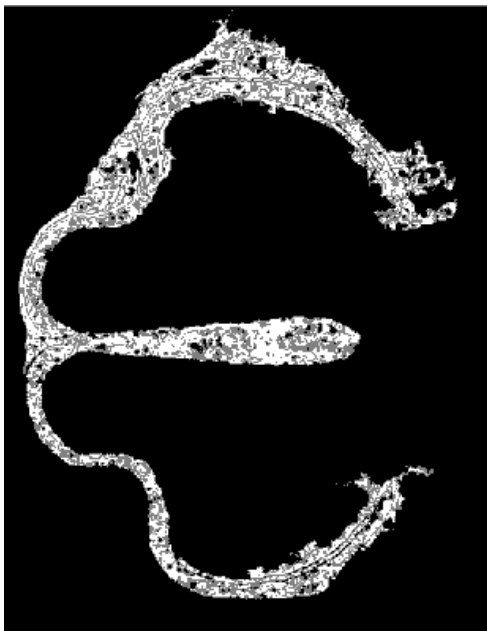
**Obr. 6.3** Vývojový diagram podprogramu: Region growing

### 6.1.1 Adaptivní prahování

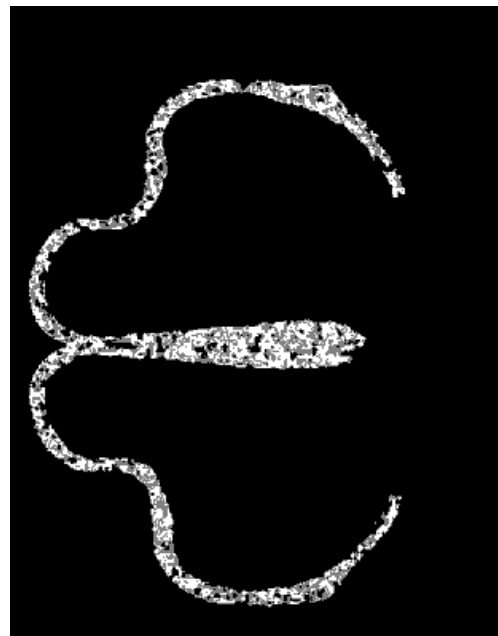
Prah se určuje pro každé semínko. V okolí konkrétního semínka se naleznou pozice bodů, které aktuálně patří do vysegmentované oblasti a z předzpracovaného obrazu se zjistí intenzita bodů odpovídajících souřadnic. Okolí je vymezeno čtvercovou nebo obdélníkovou oblastí o určité velikosti a v závislosti na volbě velikosti se mění výsledky segmentace. Semínko se vždy nachází přesně uprostřed oblasti. Na základě zjištěných intenzit bodů v okolí se podle následující rovnice vypočítá prah.

$$p = \mu \mp \sigma, [18] \quad (6.4)$$

kde  $p$  představuje prah,  $\mu$  střední hodnotu a  $\sigma$  směrodatnou odchylku. Střední hodnota je definována jako součet všech hodnot konkrétní proměnné dělený počtem těchto hodnot a směrodatná odchylka určuje, jako moc jsou hodnoty rozptýleny či odchýleny od jejich průměru. U nastavení prahu pro vysoké intenzity je směrodatná odchylka přičtena a pro nízké intenzity odečtena. Tomuto prahu je navíc pro nízké i vysoké intenzity přidána tolerance přibližně 1% z důvodu lokálních nehomogenit v obrazu. Na Obr. 6. 4a,b,c,d se nachází výsledky segmentace s počítáním prahu v okolí semínka o velikosti 7x7, 11x11, 17x17 a 39x39 pixelů. Volbou menšího okolí pro počítání prahu dochází k nastavení méně přísného prahu, takže je vysegmentovaná nejen chrupavčitá tkáň, ale i okolí. S počítáním prahu z většího okolí je vypočítán přísnější prah a vysegmentovaná pouze část chrupavky. Ideální je volba okolí pro počítání prahu velikosti 11x11.



(a)



(b)

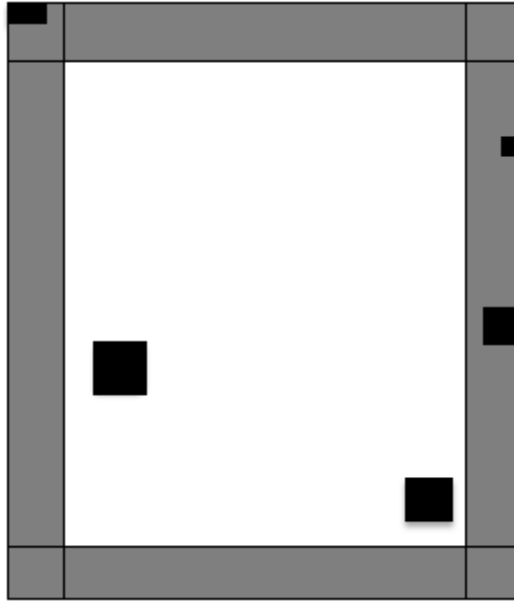


(c)

(d)

**Obr. 6. 4:** Výsledky segmentace s počítáním prahu v okolí seedu o velikosti: (a) 7x7 pixelů, (b) 11x11 pixelů, (c) 17x17 pixelů, (d) 39x39 pixelů.

V praxi je třeba zohlednit fakt, že v okrajích obrazu nemůže být počítán práh ze stejné velikosti okolí semínka jako uvnitř obrazu. Proto se v algoritmu nachází 8 podmínek pro všechny okrajové části obrazu, viz Obr. 6. 5. Pokud leží semínko v některém okraji, vypočítá se jeho vzdálenost od konkrétního okraje, popř. od obou při pozici semínka v rohu. Na základě vzdálenosti od okraje se mu přizpůsobí velikost okolí, ze kterého je počítán práh. Uprostřed obrazu a v okrajích kromě rohů se tedy jedná o čtvercové okolí. V rozích se může počítat práh z čtvercového i obdélníkového okolí podle pozice seedu. Okrajovým hodnotám prahu je přiřazována menší váha, proto je pro ně nastavena nižší tolerance prahování. Pokud by se okraje nepřizpůsobily, v některých situacích by nemuselo dojít k ukončení programu, protože by mohla zůstat ve vektoru semínka.



**Obr. 6. 5:** Schématické znázornění okrajových částí obrazu (šedá barva) a přizpůsobení velikosti okolí podle pozic seedu (čtverce, obdélníky s černou výplní).

### 6.1.2 Nevhodnost rekurzivního algoritmu na větší objem dat

Pro metodu region growing byl testován rekurzivní algoritmus, který pracuje na principu opakovaného volání funkce. Při zpracování většího objemu dat však docházelo kvůli složitosti algoritmu k přetížení Matlabu a jeho ukončení. Proto je tento typ algoritmu vhodný především ve 2D. Pro 3D metodu byl použit cyklus while, pomocí kterého se opakuje určitá část kódu, dokud není splněna daná podmínka. Jedná se o iterační algoritmus.

# 7 Morfologické operace

Matematická morfologie pracuje s obrazem jako s množinou. Základ tvoří tzv. strukturní element (maska), pomocí kterého se zpracovává zkoumaný obraz. Tyto operace mohou zjednodušit tvar objektu v obrazu, zvětšit nebo zeštíhlit struktury, zjistit počet objektů atd. Původně se využívaly pouze u binárních obrazů, dnes se uplatňují i při práci s obrazy šedotónovými. [27]

## 7.1 Morfologie binárních obrazů

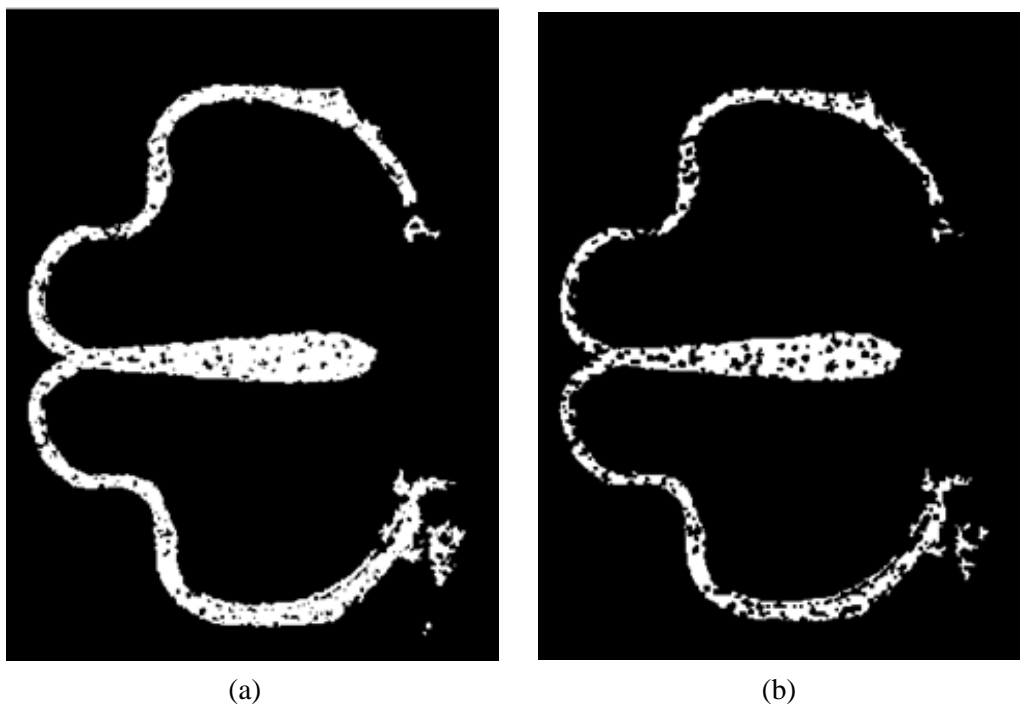
U binárních obrazů bílá barva představuje objekt a černá pozadí. Mezi základní morfologické operace patří *eroze* a *dilatace*.

### Eroze

Při binární erozi se využívá Minkowského rozdíl, tedy průnik posunutých množin. Jednotlivé posunuté obrazy lze vytvořit pomocí vektoru  $b$  obsahujícího vektory posunu mezi centrálním prvkem a všemi aktivními prvky strukturního elementu. Jedna verze vstupního obrazu tedy vznikne posunutím originálního obrazu na pozici strukturního elementu opačným směrem než příslušný prvek vektoru  $b$ . Průnikem souboru takto získaných obrazů vznikne výsledný obraz. Definici binární eroze vyjadřuje následující rovnice.

$$Y = X \ominus B = \bigcap_{b \in B} X_{-b} \quad (7.1)$$

kde  $X$  představuje vstupní a  $Y$  výstupní obraz. V praxi platí, že pokud se pod všemi aktivními prvky strukturního elementu vyskytuje hodnota 1, na pozici referenčního prvku strukturního elementu se ve výsledném obrazu zapíše 1. Binární eroze se používá ke zjednodušení objektu, viz Obr. 7. 1a, b. [11][27][28]



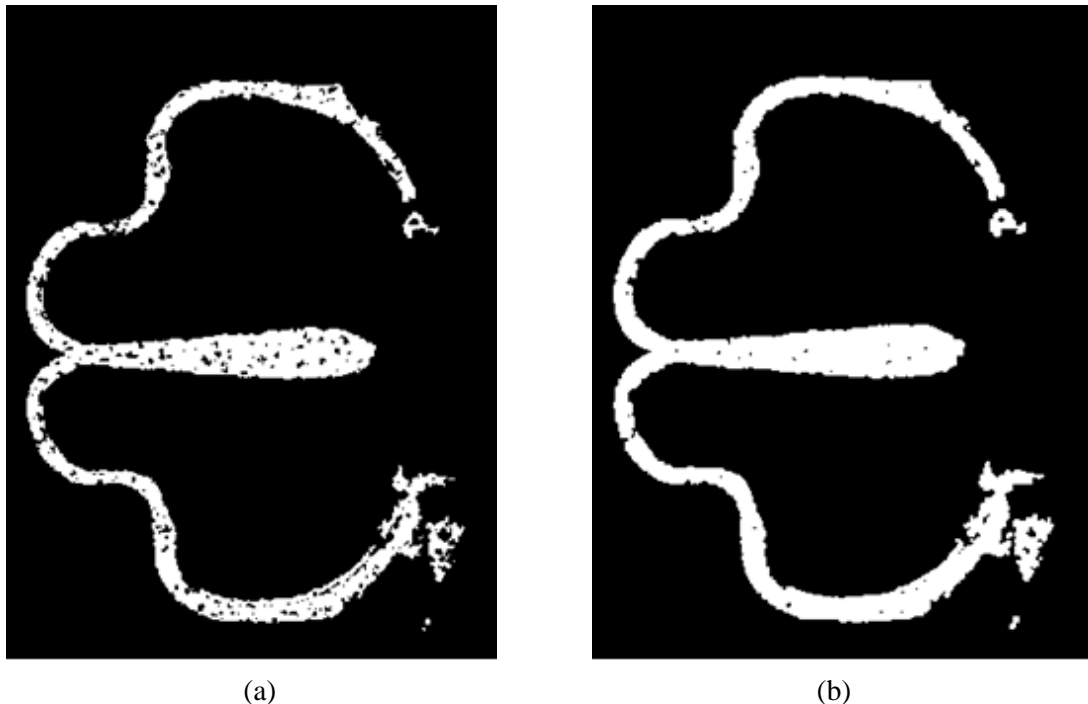
**Obr. 7. 1:** Morfologická operace binární eroze: (a) binární obraz vysegmentované chrupavky před úpravou, (b) výsledný erodovaný obraz.

### Dilatace

Binární dilatace představuje duální morfologickou transformaci k erozi. Využívá se zde Minkowského součet, tzn. sjednocení souboru posunutých obrazů podle vektoru  $b$  podle následující rovnice.

$$Y = X \oplus B = \cup_{b \in B} X_{-b} \quad (7.2)$$

Pokud se tedy alespoň pod jedním aktivním prvkem strukturního elementu vyskytuje 1, na pozici referenčního prvku strukturního elementu se zapíše do výsledného obrazu 1. Binární dilatace se využívá ke zvětšení objektu v obrazu nebo k vyplnění menších děr objektu, viz Obr. 7. 2a, b. [11][27][28]



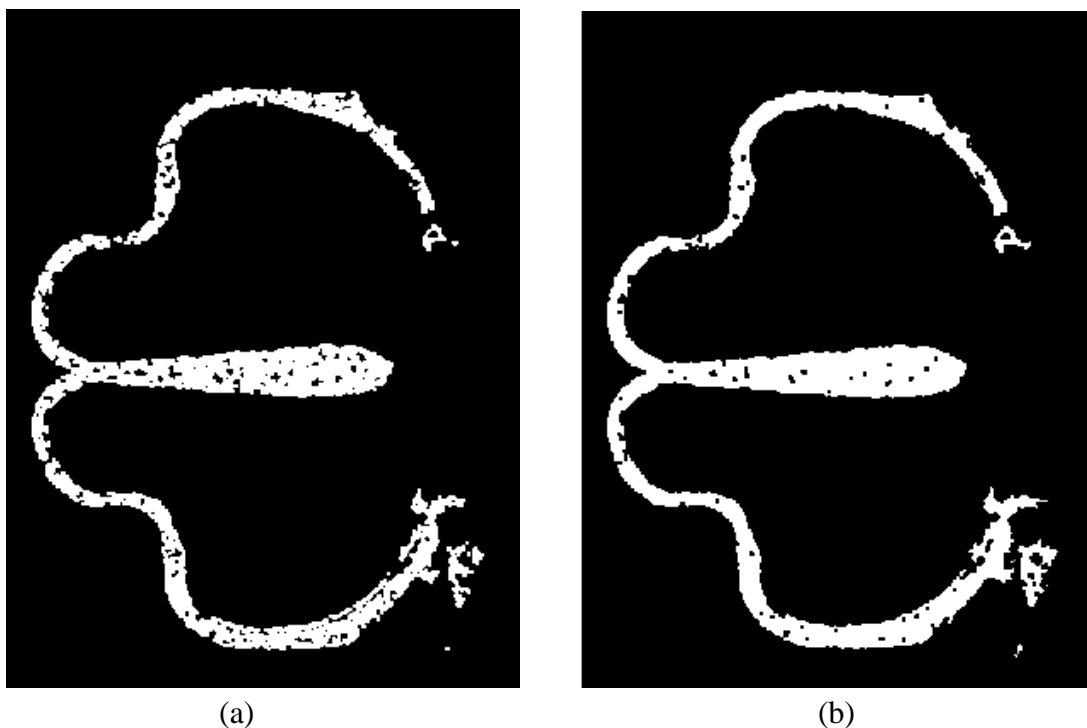
**Obr. 7. 2:** Morfologická operace binární dilatace: (a) binární obraz vysegmentované chrupavky před úpravou, (b) výsledný dilatovaný obraz.

### Otevření a uzavření

Operace otevření znamená aplikaci eroze a následné dilatace,  $(X \ominus B) \oplus B$ . Naopak uzavření tvoří posloupnost dilatace a následné eroze,  $(X \oplus B) \ominus B$ . Výhodou je, že tyto operace na rozdíl od eroze nebo dilatace nemění v průměru velikosti objektů. Dochází zde pouze k filtraci malých objektů. Vždy záleží na pořadí operace, přičemž zásadní vliv na vyhlazení objektů má operace první. Druhá slouží pouze k přibližné restauraci velkých objektů.

Otevření odděluje objekty spojené úzkou linií a odstraňuje objekty menší, než strukturální element. V praxi lze použít pouze jednu operaci pro erozi a následnou dilataci. Pokud jsou pod všemi aktivními prvky strukturálního elementu jedničky, do výstupního obrazu se vloží hodnota 1 pod všechny prvky strukturálního elementu viz Obr. 7. 3a.

Uzavření naopak spojuje objekty ležící blízko u sebe a vyplňuje malé díry. Dilataci a následnou erozi lze také vyjádřit pouze jednou matematickou operací. Pokud jsou pod všemi prvky strukturálního elementu nuly, jsou všechny tyto prvky ve výsledném obrazu nastaveny na hodnotu 0. U všech ostatních případů se pod tyto prvky zapíše hodnota 1 viz Obr. 7. 3b. [11][27][28]



**Obr. 7. 3:** Morfologické operace: (a) otevření, (b) uzavření.

### **Top hats a Bottom-hats transformace**

Transformace Top-hats znamená odečtení obrazu získaného operací otevření od původního obrazu a Bottom-hats naopak obrazu získaného operací uzavření od původního obrazu.[11]

## **7.2 Morfologie šedotónových obrazů**

Morfologické operace lze zobecnit i pro šedotónové obrazy, kde je původní šedotónový obraz převeden na soubor binárních obrazů. Průnikem dvou šedotónových obrazů vzniká obraz, jehož pixely jsou vypočteny operací minimum z odpovídajících pixelů vstupních obrazů. Ke sjednocení dochází pomocí operace maximum. V praxi dilatace šedotónových obrazů rozšiřuje světlé části obrazu a eroze je zmenšuje. Více informací lze nalézt v [29].



## 8 Hodnocení výsledků segmentace

V rámci této kapitoly jsou zobrazeny a hodnoceny výsledky pro vzorek objemu dat a následně je metoda 3D region growing rozšířena i na celou chrupavčitou tkáň. Pro nastavení vhodných parametrů je použito mutované embryo. Chrupavčitá tkáň čtrnáctidenního embrya je segmentovaná podle výchozího nastavení algoritmu jen s menšími úpravami některých parametrů.

### 8.1 Porovnání výsledků pro vzorek dat

K testování metody bylo použito mutované 15,5 denní embryo, protože jednotlivé mikro-CT snímky obsahují méně šumu než 14 denní embryo a jsou více kontrastní. Pro vhodné nastavení parametrů stačil menší počet snímků. Všechny výsledky, které jsou zobrazeny v této podkapitole, představují prostřední řez z testovaného objemu 50 snímků.

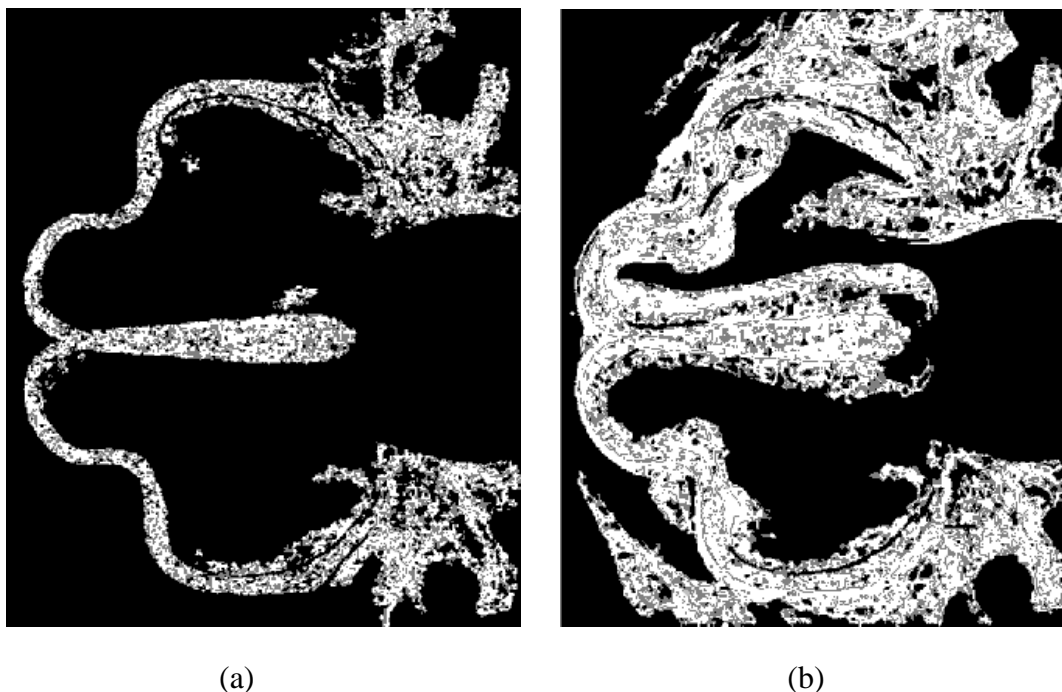
#### 8.1.1 Porovnání na základě předzpracování

Na následujícím obrázku Obr.8. 1 se nachází vysegmentovaná chrupavka originálního snímku bez jakéhokoli předzpracování. Lze vidět, neobsahuje celou chrupavku, protože originální snímek je zašuměný.



**Obr.8. 1:** výsledek segmentace bez předzpracování originálního snímku

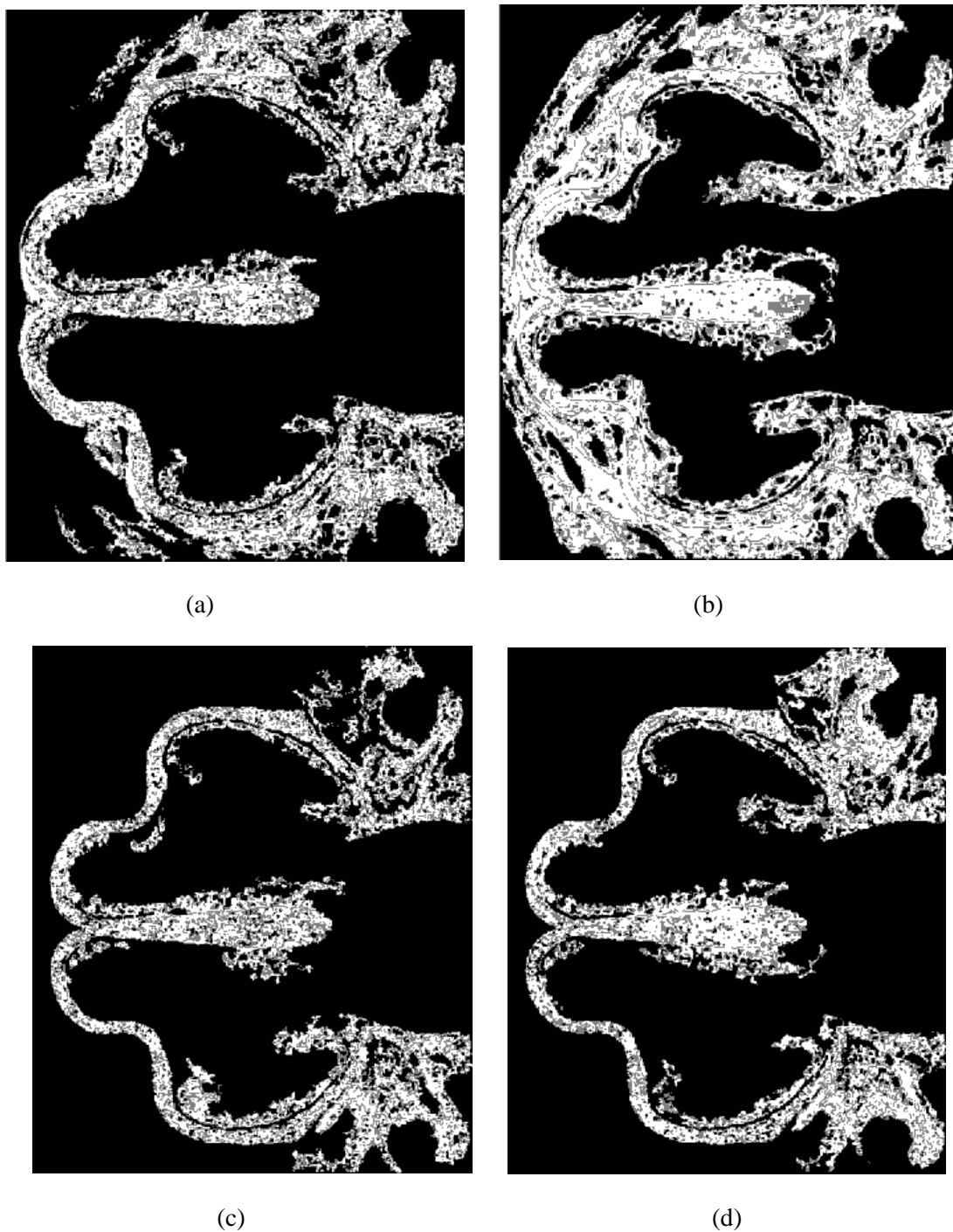
Při použití mediánového filtru však dochází k segmentaci nejen chrupavky, ale i jiných struktur z důvodu rozostření hran. Přesněji vychází segmentace pomocí mediánového filtru o velikosti masky 3x3, protože dochází k menšímu rozostření viz Obr.8. 2a,b a kapitola 5.1.2 Potlačení šumu



**Obr.8. 2:** Výsledek segmentace s použitím mediánového filtru: (a) velikost masky 3x3, (b) velikost masky 5x5.

Na Obr.8. 3a,b lze vidět výsledky průměrování pomocí konvolučních masek. Lépe dopadla segmentace využitím normalizované masky velikosti 3x3 se všemi prvky stejnými z rovnice (5.8) nebo masky 5x5 s prostředním prvkem vyšším viz rovnice (5.10) Použitím mediánového filtru velikosti 3x3 a následně průměrovací masky z rovnice (5. 8) se přesnost segmentace o stupeň zhorší, protože dochází k většímu rozostření hran.

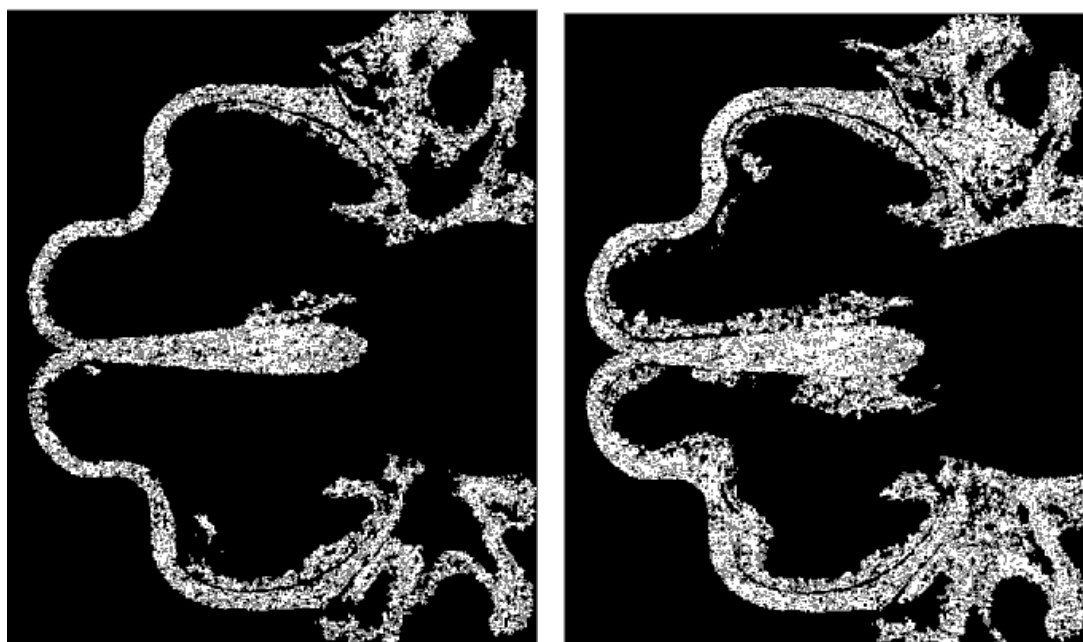
Podle výsledků lze usoudit, že samotná filtrace šumu pro segmentaci nestačí. Je třeba použít i jiné metody, např. úpravu kontrastu nebo zvýraznění hran.



**Obr.8. 3:** Výsledek segmentace s použitím průměrovací masky: (a) velikosti 3x3 podle rovnice (5.8), (b) velikosti 5x5 podle rovnice (5.9), (c) velikosti 5x5 podle rovnice (5.10), (d) velikosti 3x3 a následně mediánový filtr 3x3.

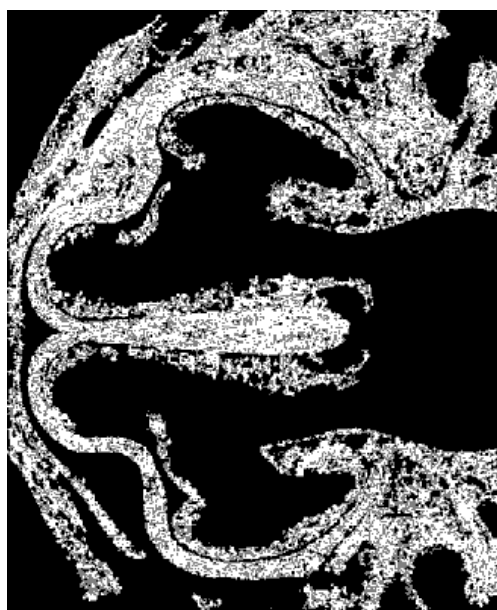
Kapitola 5.1.1 Transformace kontrastu se mimo jiné zabývá úpravou kontrastu pomocí exponenciální transformace a gama korekce. U použití exponenciální transformace se základem vyšším než jedna se rozsah jasových hodnot posouvá směrem k nižším hodnotám. Výsledný snímek působí tmavěji a celkově dochází ke snížení kontrastu v obrazu. Lepší

kontrast se posouvá směrem k vyšším intenzitám. Chrupavčitá tkáň a její okolí neobsahuje jasové hodnoty tak vysoké, takže dochází spíše ke snížení kontrastu, což je patrné z výsledků segmentace na Obr.8. 4.



(a)

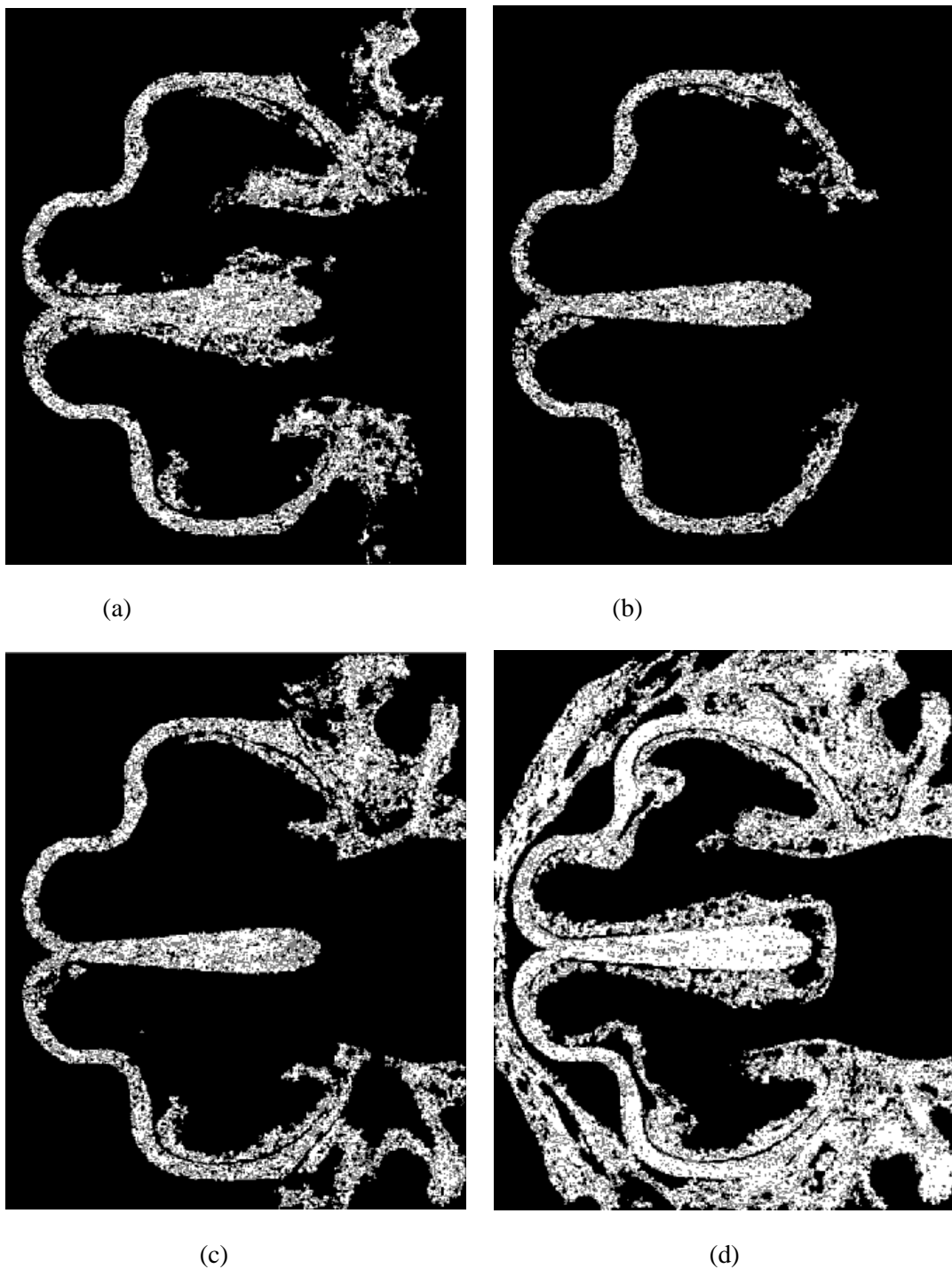
(b)



(c)

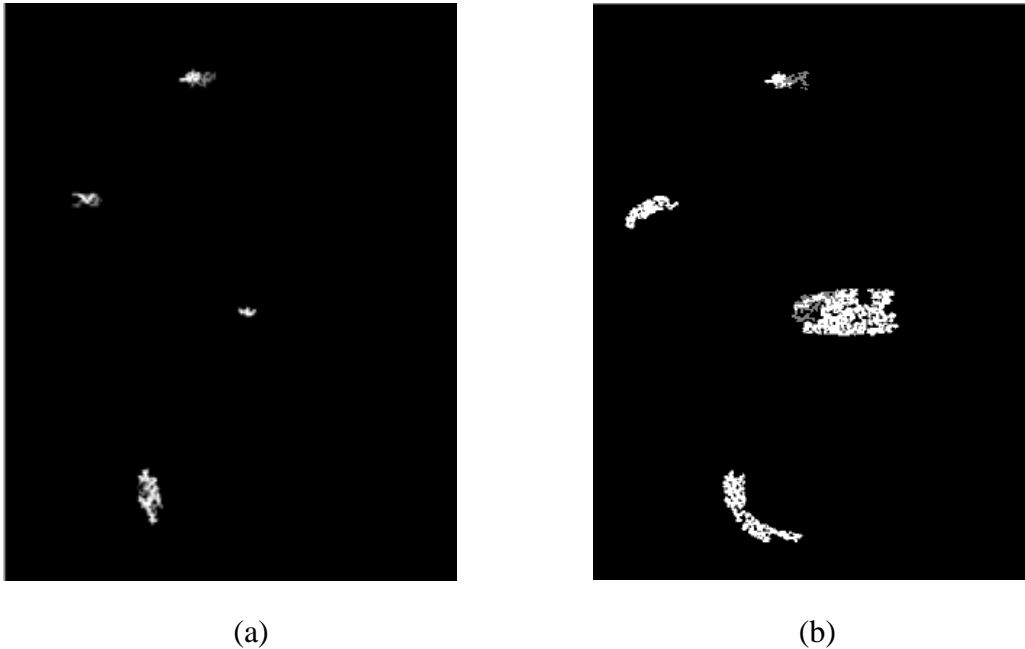
**Obr.8. 4:** Výsledek segmentace s použitím exponenciální transformace o základu: (a)  $b=2$ , (b)  $b=4$ , (c)  $b=6$ .

U gama korekce dochází s koeficientem  $\gamma$  vyšším než jedna ke zvýšení kontrastu v oblasti vysokých intenzit. Pokud je tento koeficient nižší než jedna, kontrast se zvýší v oblasti nízkých intenzit. U chrupavčité tkáně a jeho okolí dochází v obou případech ke snížení kontrastu. Výsledná segmentace se tedy s koeficientem vyšším než 1 postupně zhoršuje a s jeho hodnotou nižší než jedna se směrem k nule je segmentace také méně přesná viz Obr.8. 5a,b,c,d.



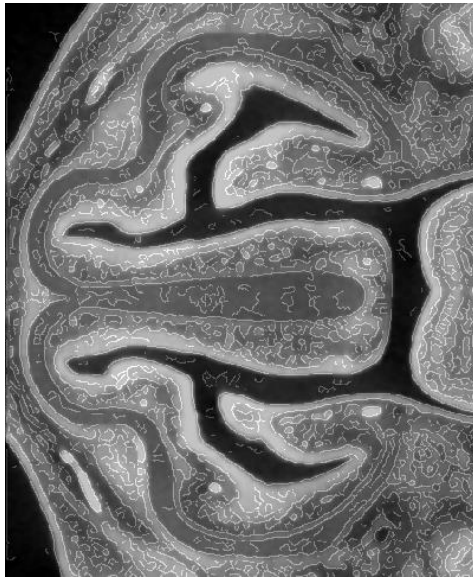
**Obr.8. 5:** Výsledek segmentace s použitím gama korekce: (a)  $\gamma=0,5$ ; (b)  $\gamma=0,6$ ; (c)  $\gamma=1,5$ ; (d)  $\gamma=2,5$ .

Použitím ekvalizace došlo k velkému zašumění, takže se nevysegmentovala téměř žádná oblast chrupavky. Filtrací se výsledek zlepšil, ale celkově se ekvalizace ukázala jako nevhodná metoda pro region growing viz Obr.8. 6. Srovnatelně vyšla segmentace za použití metod ostření obrazu, tedy pomocí lokálních masek, odečtením rozostřeného obrazu a potlačením nízkých frekvencí ve frekvenčním spektru.

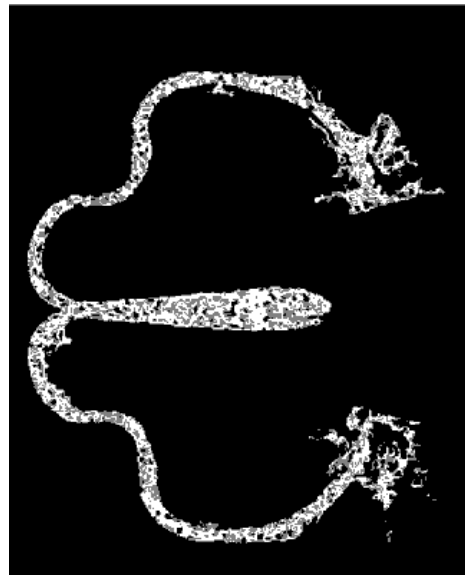


**Obr.8. 6:** Výsledek segmentace s použitím: (a) ekvalizace, (b) ekvalizace a následné mediánové filtrace s velikostí masky 3x3.

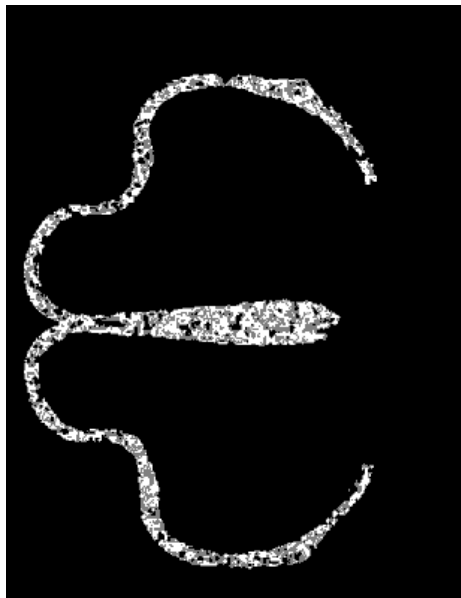
Nejlepší výsledky segmentace na základě předzpracování obrazů se získaly využitím Cannyho detektoru hran viz kapitola 5.1.4 Cannyho detektor hran. Nejdříve byly snímky rozostřené pomocí normalizované konvoluční masky velikosti 5x5 se všemi prvky stejnými a mediánovým filtrem 5x5 za účelem většího vyhlazení obrazu. Kontrast byl zvýšen pro vyšší i nižší intenzity využitím příkazu `imadjust`. Takto upravené snímky byly s určitou váhou postupně přičteny k odpovídajícím binárním obrazům s hranami, které vznikly pomocí Cannyho detektoru hran viz Obr.8. 7a. Na Obr.8. 7 a,b lze vidět rozdíl mezi použitím výše uvedeného předzpracování a stejného předzpracování jen bez použití Cannyho detektoru.



(a)



(b)



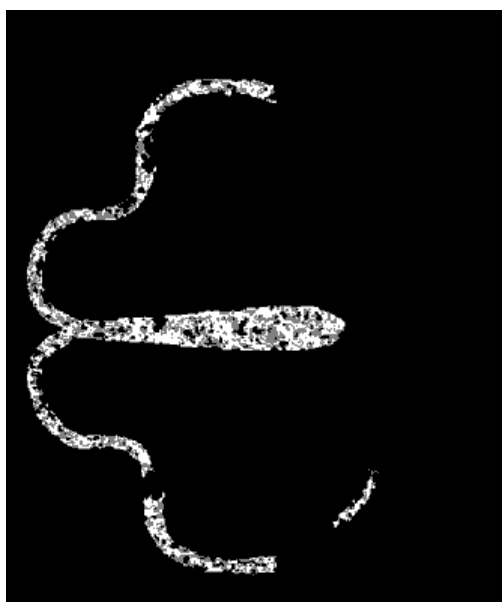
(c)

**Obr.8. 7:** Využití Cannyho detektoru hran: (a) předzpracovaný snímek, (b) segmentace bez Cannyho detektoru, (c) segmentace s Cannyho detektorem.

### 8.1.2 Porovnání na základě adaptivního prahování

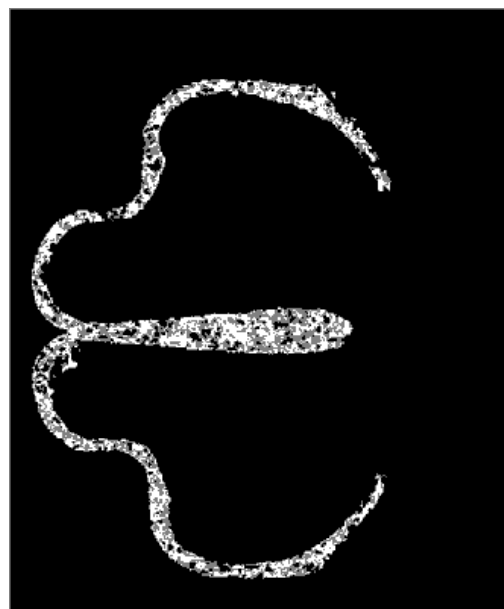
Z kapitoly Adaptivní prahování vyplývá, že ideální okolí pro počítání adaptivního prahu je velikost  $11 \times 11$ . K samotnému vypočítanému adaptivnímu prahu je vždy připočtena tolerance přibližně 1%. Bez této tolerance by byl vždy práh moc přísný a došlo by k segmentaci jen několika bodů chrupavky. K nižším intenzitám je tolerance odečtena a dále v textu označena jako dolní mez a naopak u vyšších intenzit je přičtena a označena jako horní

mez. Velký vliv tolerance je patrný z obrObr.8. 8 a Obr.8. 9. Pro snímky předzpracované pomocí Cannyho detektoru a úprav popsanych výše vychází dolní práh v průměru 0,42 a horní 0,41. Při změně tolerance pro horní i dolní mez jen o několik tisícín dochází k velkému ovlivnění výsledku segmentace. Pro segmentaci chrupavčité tkáně byla zvolena horní i dolní mez 0,0065.



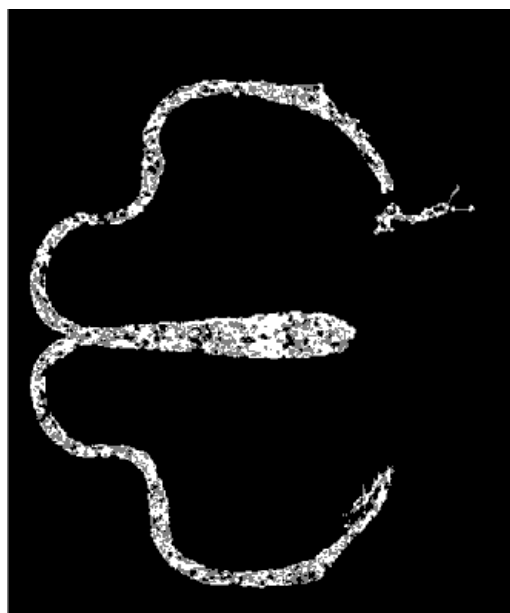
(a)

d\_mez 0,004



(b)

d\_mez 0,0065



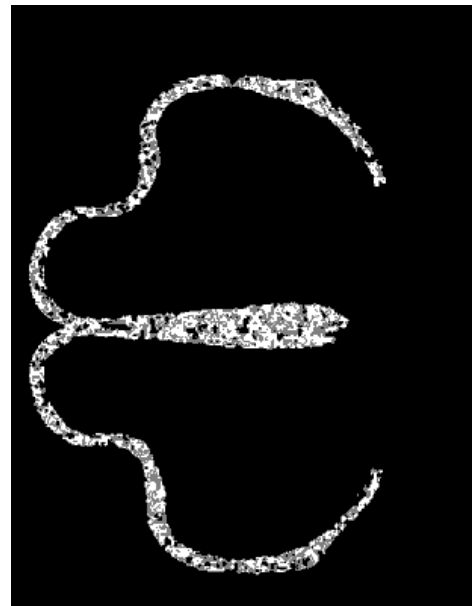
(c)

**Obr.8. 8:** Vliv tolerance na adaptivní prahování (horní mez=0,0065): (a) dolní mez=0,004, (b) dolní mez=0,0065, (c) dolní mez=0,007.

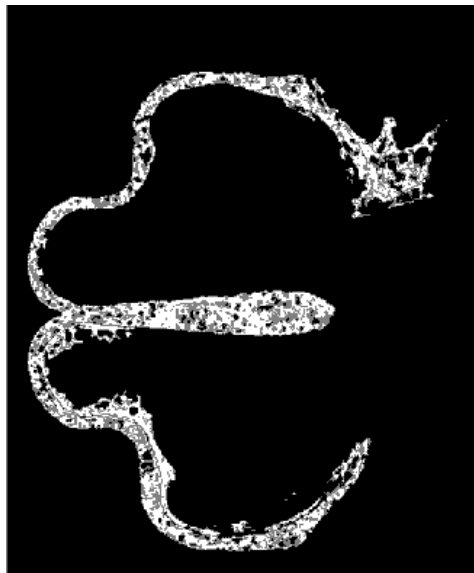




(a)



(b)



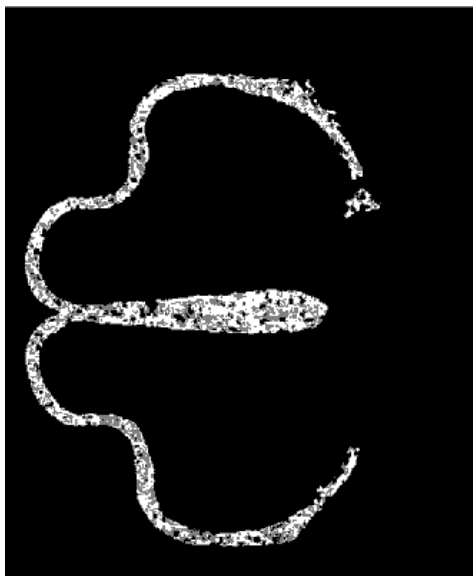
(c)

**Obr.8. 9:** Vliv tolerance na adaptivní prahování (dolní mez=0,0065): (a) horní mez=0,004, (b) horní mez=0,0065, (c) horní mez=0,009.

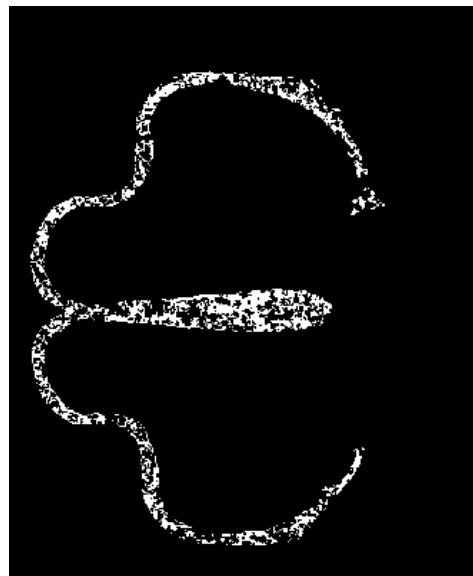
### 8.1.3 Porovnání na základě morfologických operací

Z morfologických operací se jeví jako nejvhodnější použití metody uzavření, protože nemění velikosti objektu viz kapitola 7 Morfologické operace. Tato operace zároveň odstraní malé díry v objektu. Obr.8. 10a představuje masku, kde hodnoty 0 označují pozadí, 1 testované body, nezařazené do vysegmentované oblasti a 2 vysegmentovanou oblast chrupavčité tkáně. Na Obr.8. 10b se nachází binární obraz vytvořený z této masky, v němž původní hodnoty 0 a 1 představují nulu a hodnota 2 jedničku. Výsledný obraz po operaci uzavření ukazuje Obr.8. 10c. Protože obsahuje velké množství děr, byla na něj aplikována dilatace viz Obr.8. 10d.

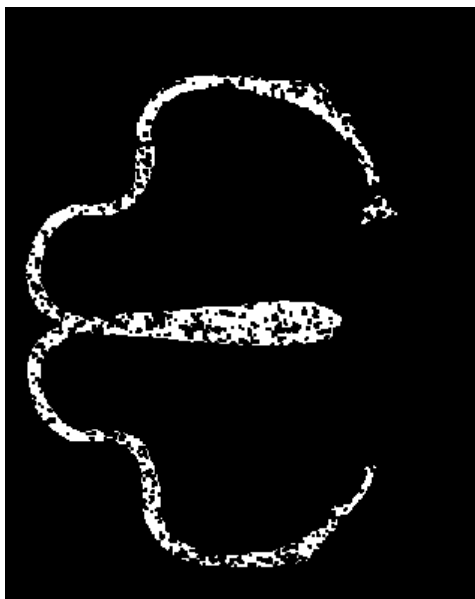
Nejlepší výsledek však vyšel po převedení masky na binární, kde 1 představuje původní hodnota 1 a 2 viz Obr.8. 11a. Došlo tak ke zmenšení větších děr na menší a odstranění menších děr a zvětšení chrupavky z každé strany o jeden pixel. Pro následné odstranění zmenšených děr byla použita operace uzavření. Výsledek této operace ukazuje Obr.8. 11b. Za účelem zachování průhlednosti chrupavky se tento výsledek vynásobil s originálním snímkem viz Obr.8. 11c.



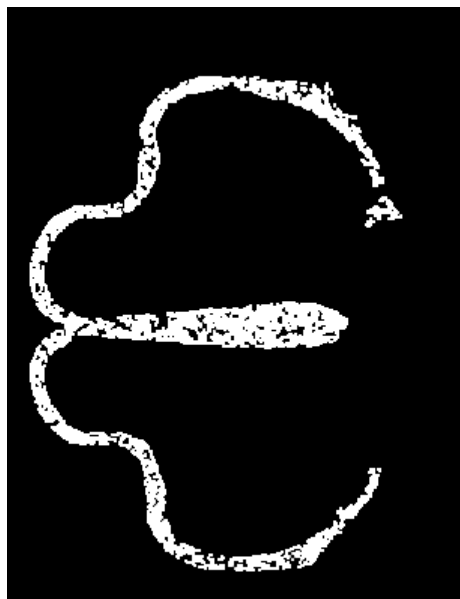
(a)



(b)

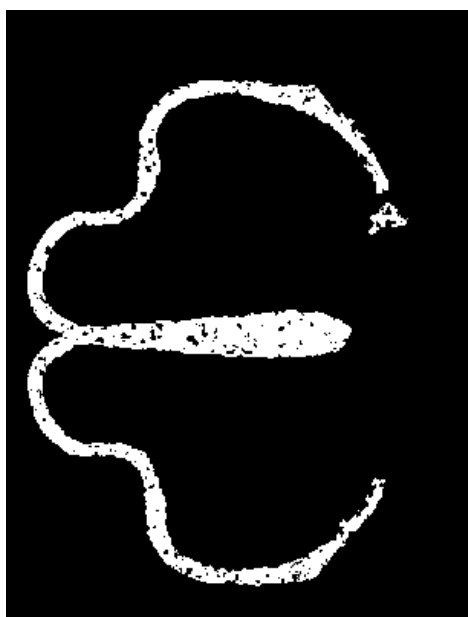


(c)



(d)

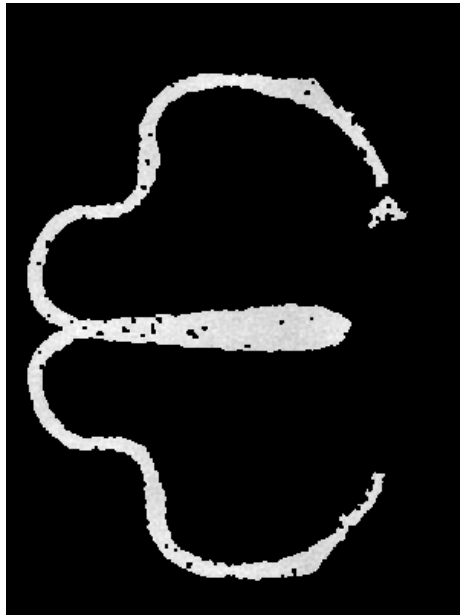
**Obr.8. 10:** Převodní původní masky na binární (hodnoty 2 změněny na 1): (a) původní maska, (b) binární maska, (c) aplikace uzavření použita na binární masku, (d) následná aplikace dilatace.



(a)



(b)

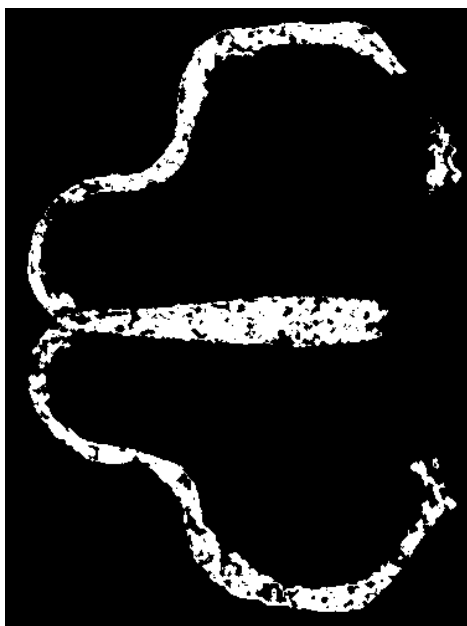


(c)

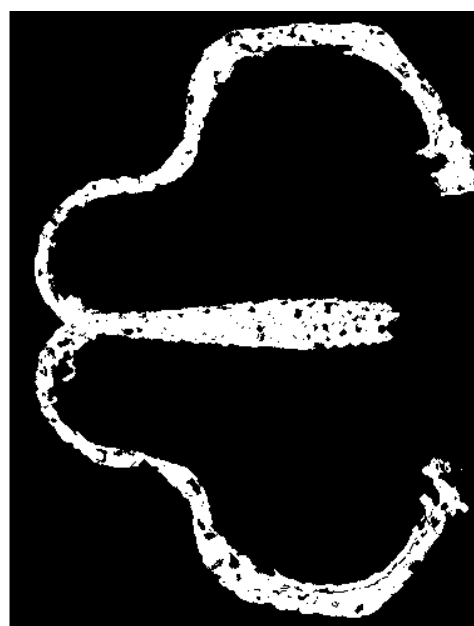
**Obr.8. 11:** Převedení původní masky na binární (hodnoty 1 a 2 změněny na 1): (a) binární maska, (b) aplikace uzavření na binární masku, (c) následné vynásobení s originálním snímkem.

## 8.2 Rozšíření algoritmu na větší objem dat

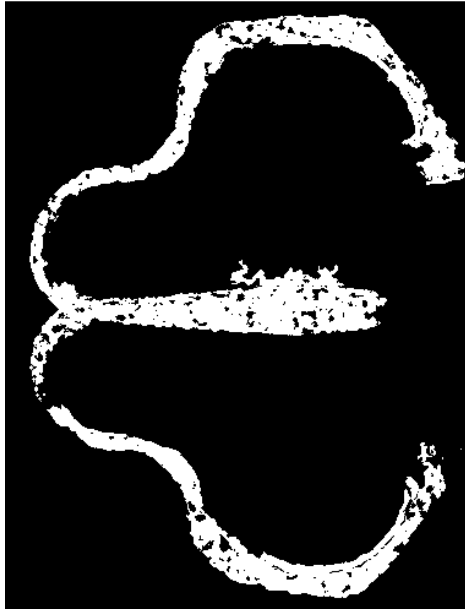
Při použití 3D region growing na větší objem dat dochází přímou úměrou k rozšiřování chyb do okolí. Algoritmus byl postupně testován na 50, 100, 150, 200, 250 a 300 snímcích. Srovnání jednoho vybraného řezu takto testované metody lze vidět na Obr.8. 12. Nejlépe dopadla segmentace 50 snímků, i když některé výsledné snímky neobsahují celou chrupavku. Segmentací 250 a 300 snímků nelze chrupavčitou tkáň téměř rozlišit.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

**Obr.8. 12:** Testování 3D region growing na: (a) 50 snímků, (b) 100 snímků, (c) 150 snímků, (d), 200 snímků, (e) 250 snímků, (f) 300 snímků.

Za účelem zabránění akumulace chyb do okolí byl vytvořen způsob zpracování všech potřebných snímků po částech. 3D metodou se vždy segmentuje určitý počet snímků, mezivýsledek se uloží do většího předpřipraveného prostoru a v dalším kroku se zpracovává stejný počet snímků. Takto jsou postupně segmentovány a uloženy všechny potřebné snímky. Uživateli se v každém cyklu načte prostřední ze zpracovávaných snímků a zvolí si iniciační body pro metodu region growing. Je třeba zajistit, aby nezůstaly mezi jednotlivými výsledky

bílé krajní řezy a byly segmentovány všechny snímky. Z tohoto důvodu se v každém kroku zpracovávají i 2 poslední snímky, které byly použity v kroku předchozím.

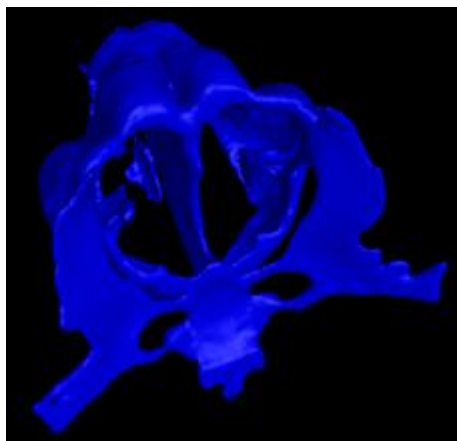
Výše popsany způsob 3D metody byl aplikován pro segmentaci snímků po 10, 20, 30, 40 a 50. Výsledky jsou zobrazeny jako 3D modely pomocí programu ImageJ a hodnocena přesnost segmentace, viz následující kapitola.

## 9 Vytvoření a hodnocení 3D modelů

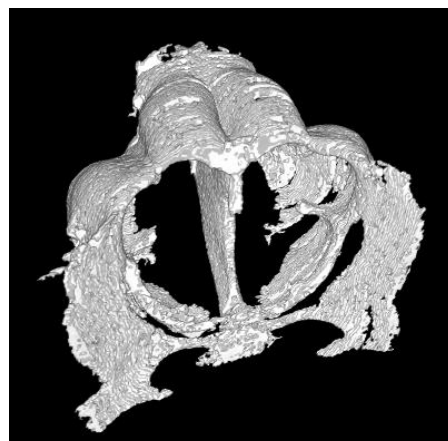
K vytvoření 3D modelu lze použít speciální softwary např. VG Studio, Avizo nebo Image J. Jednotlivé modely manuálně segmentované chrupavky čichového ústrojí byly vytvořeny v Avizu a poloautomaticky segmentované chrupavky v programu ImageJ. Na následujících obrázcích se nacházejí ukázky těchto modelů přibližně stejného úhlu natočení. Zobrazení modelů i pro jiné úhly lze najít v obrazové příloze diplomové práce.

Na Obr. 9. 1 se nachází výsledné modely mutovaného 15,5 denního embrya. Manuálně segmentovaný model je podle očekávání nejpřesnější, ale segmentace trvala cca. 20 pracovních hodin. Poloautomatická segmentace jednoho modelu zabrala přibližně 2 hodiny a stačí, aby uživatel vždy zadal daný počet iniciačních bodů, ze kterých se začne pomocí metody region growing segmentovat určité množství snímků embrya. Přesnost výsledných modelů ovlivňuje, po kolika snímcích byla chrupavka segmentována. Čím méně snímků se segmentovalo najednou, tím vyšel výsledek přesněji. Kvalita segmentace je také ovlivněna nastaveným počtem iniciačních bodů pro volbu pozice těchto bodů v řezu. Obvykle stačí 5 až 7 bodů u mutovaného embrya, ale při segmentaci po 10 snímcích je vhodné nastavení více bodů. Na Obr. 9. 1a se chrupavka zpracovávala po 10 snímcích a uživatel si volil 12 iniciačních bodů. Lze vidět, že některé části chrupavky nebyly vysegmentovány, ale nachází se zde méně okolních chybových oblastí. Výsledek také ovlivňuje, jak daleko od sebe byly tyto iniciační body voleny, takže stejnou metodou se mohou modely chrupavky nepatrně lišit. Zpracování po 10 snímcích je také časově náročnější, takže se jeví jako nejvíce přijatelná segmentace po 20 snímcích.

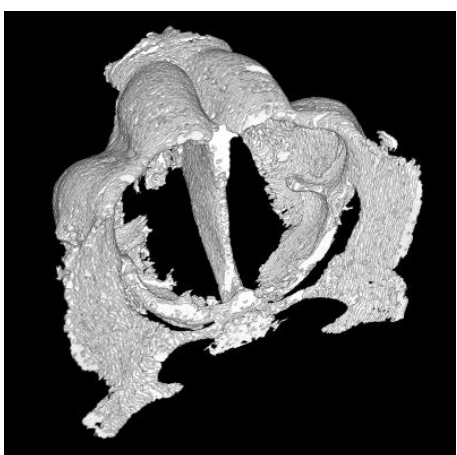
Pro segmentaci čtrnáctidenního embrya je třeba volit větší počet iniciačních bodů, protože chrupavka je užší. Zobrazení jednotlivých modelů představuje Obr. 9. 2. U výsledného modelu, který se zpracovával po 10 snímcích se, podobně jako u mutovaného embrya, některé oblasti chrupavky nevysegmentovaly. Z tohoto důvodu i kvůli větší časové náročnosti, je vhodnější zpracování po 20 nebo 30 snímcích.



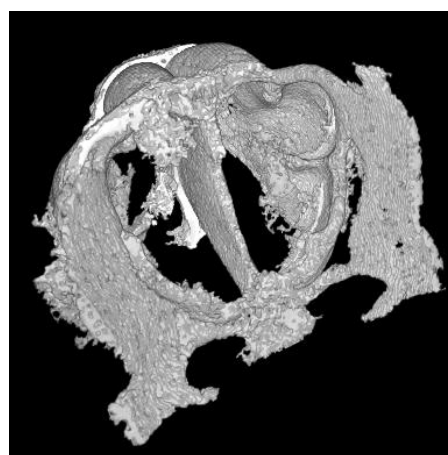
(a)



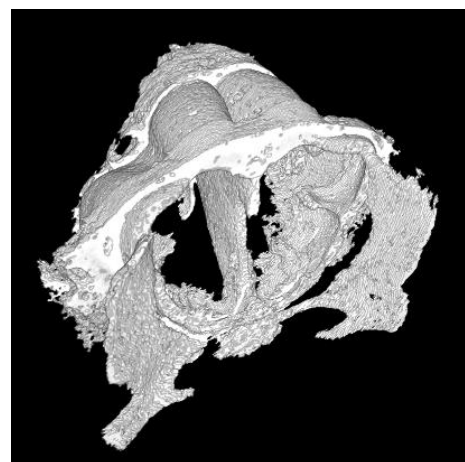
(b)



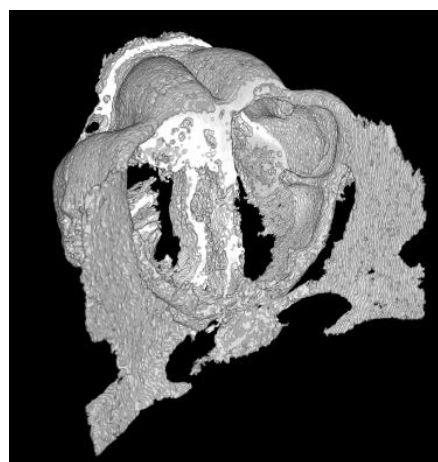
(c)



(d)

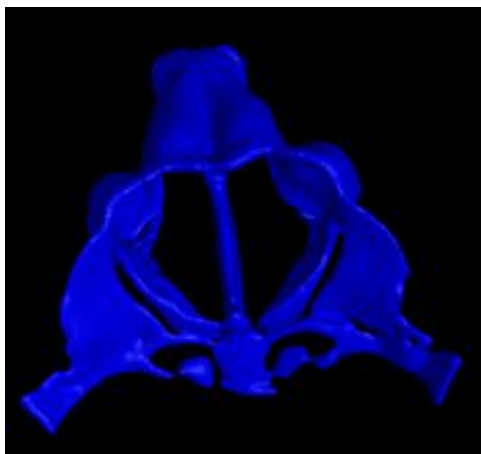


(e)

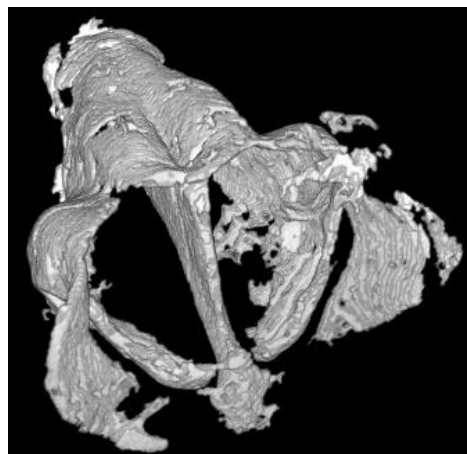


(f)

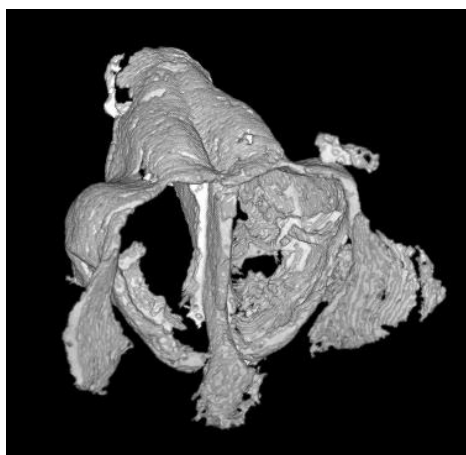
**Obr. 9. 1:** Zobrazení výsledných 3D modelů mutovaného embrya: (a) manuálně segmentovaný referenční model, (b) segmentace po 10 snímcích, (c) segmentace po 20 snímcích, (d) segmentace po 30 snímcích, (e) segmentace po 40 snímcích, (f) segmentace po 50 snímcích.



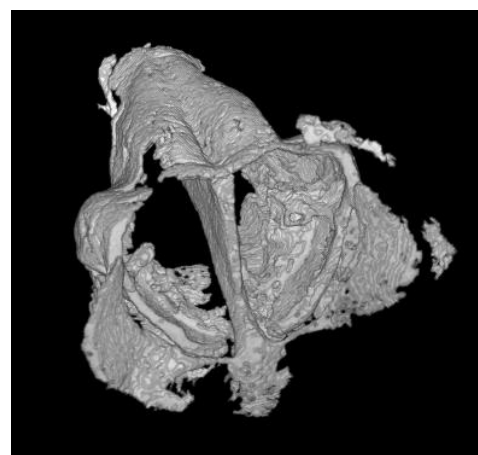
(a)



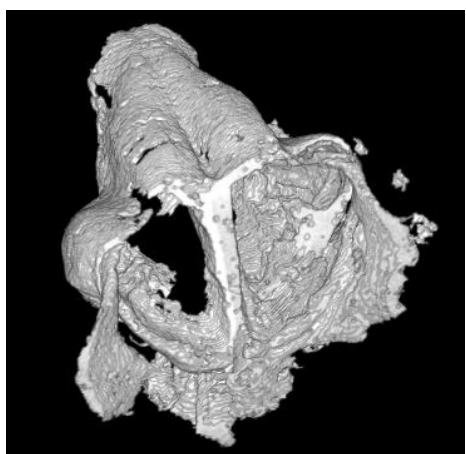
(b)



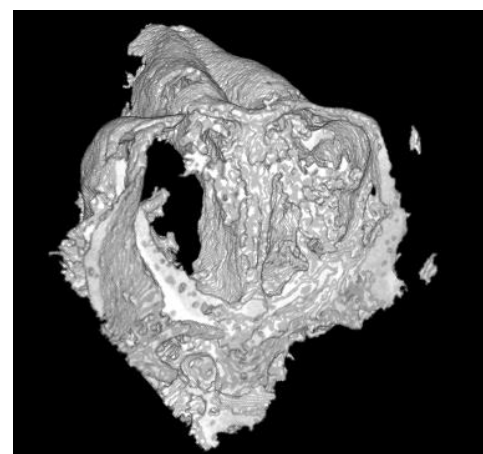
(c)



(d)



(e)



(f)

**Obr. 9. 2:** Zobrazení výsledných 3D modelů čtrnáctidenního embrya: (a) manuálně segmentovaný referenční model, (b) segmentace po 10 snímcích, (c) segmentace po 20 snímcích, (d) segmentace po 30 snímcích, (e) segmentace po 40 snímcích, (f) segmentace po 50 snímcích.



## 10 Závěr

Jedním z cílů diplomové práce byla realizace tomografických měření laboratorního embrya myši na dostupných mikro-CT stanicích a následně porovnání výhod a nevýhod jednotlivých systémů vzhledem k požadavkům pro zobrazení chrupavčité tkáně embrya. Pro mikro-CT laboratoř v Brně byla dodána laboratorní embrya myši více vývojových stádií. Za účelem srovnání mikro-CT systému bylo použito čtrnáctidenní embryo E14.

Barvení embrya pomocí PTA se uskutečnilo ve spolupráci s Ústavem embryologie a histologie MUNI v Brně. Embryo E16 a postnatální embryo P1 nebyla dostatečně kvalitně nabarvena. Došlo k obarvení hlavně vnitřních měkkých tkání, které se dostaly do kontaktu s kyselinou fosfowolframovou. Důvodem špatného nabarvení mohla být buď krátká doba barvení nebo nedostatečné ponoření embrya v ethanolu nebo PFA. Také u některých vzorků došlo ke smrštění pravděpodobně kvůli použití vysoké koncentrace etanolu. Po nabarvení embryí pomocí PTA byly vzorky umístěny do plastové trubičky co nejmenšího průměru pro dosažení co největšího rozlišení. Plastová trubička ve srovnání se skleněnou méně rozptyluje a absorbuje záření. Skleněná trubička byla použita při měření na mikro-CT v Praze. Právě z důvodu vyššího rozptylu a absorpce se s největší pravděpodobností dosáhlo méně kvalitních výsledků, než se předpokládalo. Pro mechanickou stabilizaci vzorku v přístroji při skenování byl použit 0,5 % agaróza gel, který má nízkou absorpci rentgenového záření. Při skenování se vzorek umístil co nejbližší k trubici za účelem získání co největšího zvětšení.

Skenování embrya E14 proběhlo v laboratoři mikro-CT Brno, ČVUT v Praze a na synchrotronu Elettra v Itálii. Na synchrotronu Elettra se skenovala pouze hlava embrya, protože svazek paprsků je paralelní a úzký. Měření se muselo realizovat ve dvou blocích, protože vlastnosti paprsku dovozovaly zachytit pouze část hlavy. V Praze bylo pro měření embrya použito 4 detektorů spojených do jedné řady. Ke zobrazení celého embrya bylo však nutné provést měření ve třech blocích. V Brně proběhlo skenování celého embrya najednou a měření bylo také nejméně časově náročné. Na synchrotronu se dosáhlo rozlišení 2  $\mu\text{m}$ , což je nejvíce ze všech použitých systémů. Výsledná data však po rekonstrukci a korekcích na artefakty obsahují nízký kontrast a kruhové artefakty. Na snímcích z měření v Brně a v Praze se kruhové artefakty nevyskytují, ale data z Prahy obsahují velké množství šumu. V Brně bylo dosaženo rozlišení 5  $\mu\text{m}$  pro embryo E14 a jednotlivé struktury včetně chrupavčité tkáně lze dobře rozlišit. Nejméně dostupné a nejdražší bylo měření na synchrotronu.

Z hlediska kvality výsledných zrekonstruovaných dat, dostupnosti systému i rychlosti měření byla pro následnou segmentaci chrupavky v rámci diplomové práce vybrána data z mikro-CT stanice v Brně. Hlavním cílem v rámci diplomové práce bylo navrhnout metodu pro automatickou segmentaci chrupavky, popřípadě algoritmus, který CT data předzpracuje a usnadní následnou manuální segmentaci. Jako reference sloužil manuálně vytvořený 3D

model pomocí softwaru Avizo. Pro segmentaci chrupavčité tkáně čichového ústrojí se jevila jako vhodná metoda 3D region growing s využitím adaptivního prahování. Za účelem přesné segmentace je důležité předzpracování vstupních dat. Práce se předzpracování věnuje podrobněji, protože segmentovaná chrupavčitá tkáň má v některých místech téměř stejné hodnoty jako její okolí. Nejlepší výsledky segmentace na základě předzpracování obrazů se získaly využitím Cannyho detektoru hran. Binární obrazy obsahující hrany byly přičteny k rozostřeným snímkům s vylepšeným kontrastem. Těmto rozostřeným šedotónovým snímkům byla nastavena jen určitá váha, aby vynikly hrany v obrazu. Pro nastavení vhodných parametrů byl použit vzorek objemu dat mutovaného embrya a segmentace chrupavky čtrnáctidenního embrya byla realizována s pozměněním jen některých parametrů.

Adaptivní práh podle rovnice (6.4) se počítal z určitého okolí semínka s přidanou tolerancí přibližně 1 %. Zvolením malého okolí se vypočítal tolerantnější práh a z velkého okolí byl naopak přísný. Nejvhodnější se ukázala velikost okolí 11x11 pixelů. Z morfologických operací byla na vysegmentované snímky použita metoda uzavření, protože se s ní nemění velikost objektu a dochází k odstranění menších děr uvnitř objektu. Před aplikací této operace byly převedeny jasové hodnoty v masce na binární. Pro zmenšení větších děr byly na hodnotu jedna nastaveny i body, které nesplnily podmínku prahování, ale byly kontrolované. Došlo tak ke zvětšení chrupavčité tkáně z každé strany o jeden pixel. Následně se na binární masku aplikovala metoda uzavření. Za účelem zachování průhlednosti chrupavky se výsledné snímky vynásobily s originálními daty.

Použitím metody 3D region growing na větší objem dat dochází přímou úměrou k akumulaci chyb do okolí. Za účelem zabránění rozšíření chyb byl algoritmus upraven pro zpracování potřebného množství snímků po částech. Mezivýsledky se ukládají do předem připraveného prostoru. Uživatel si vždy volí iniciační body na prostředním ze zpracovávaných snímků. Tento způsob metody byl aplikován pro segmentaci snímků po 10, 20, 30, 40 a 50 a z výsledných vysegmentovaných dat vytvořeny 3D modely v programu ImageJ. Na Obr. 9. 1 se nachází výsledné modely mutovaného 15,5 denního embrya a na Obr. 9. 2 modely čtrnáctidenního embrya. Čím méně snímků bylo najednou segmentováno, tím vyšel výsledek přesněji. Přesnost však také ovlivňuje volba iniciačních bodů. Srovnáním s manuálně segmentovaným modelem lze vidět, že poloautomatickou segmentací vznikly méně přesné, ale použitelné výsledky. Manuální segmentace chrupavky čichového ústrojí jednoho embrya zabrala přibližně 20 hodin a poloautomatická segmentace jen cca. 2 hodiny. Další vylepšení segmentace by mohlo být realizováno interpolací mezi některými snímky, protože zpracováním po částech na sebe jednotlivé mezivýsledky přesně nenasazují.

# Seznam literatury

Knihy a odborné články:

- [1] METSCHER, B.D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues, University of Vienna, June 2009.
- [2] METSCHER, B.D. MicroCT Developmental Biology: A Versatile Tool for High-Contrast 3D Imaging at Histological Resolutions, December 2008.
- [3] STUART, R. S. MicroComputed Tomography: Methodology and Applications, Boca Raton, 2009.
- [4] HRDÝ, J. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie: Synchrotronové záření, Jednota českých matematiků a fyziků, 1983.
- [5] HSIEH, J. Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts and Recent Advances, Bellingham, Washington USA, 2nd ed., 2009.
- [6] GRANGEAT, P. (Editor) Tomography, Wiley-ISTE, July 2009.
- [7] BARUCHEL, J., BUFFIERE, J.Y., MAIRE, E., MERLE, P., PEIX, G. X-ray Tomography in Material Science, ISBN 2-7462-01 15-1, Paris, 2000.
- [8] MESSTECHNIK, W. X-Ray Tomography in Industrial Metrology, ISBN 978-3-86236-045-1, 2nd ed., 2012.
- [9] ZIKMUND, T., PETRILAK, M., KAISER, J. Rentgenová počítačová tomografie pro analýzu odlitek, defektoskopii a kontrolu rozměrů, FAST VUT Brno, říjen 2013.
- [10] JAN, J. Medical Image Processing, Reconstruction and Restoration: Concepts and Methods, CRC, Press, 2005. ISBN 0-8247-5849-8.
- [11] WALEK, P., LAMOŠ, M., JAN, J. Analýza biomedicínských obrazů, ISBN 978-80-214-4792-9, 2013.
- [12] MUHLENBRUCH, M., DAS, C., HOHL, J., WILDBERGER, E., RINCK, D., FLOHR, T. G. Global left ventricular function in cardiac CT. Evaluation of an automated 3D region-growing segmentation algorithm, European Radiology, vol. 16, pp. 1117-1123, 2005.
- [13] JIMIN, L., SU, H., NOWINSKI, W. L. Automatic Segmentation of the Human Brain Ventricles from MR Images by Knowledge-Based Region Growing and Trimming, Neuroinformatics, vol. 7, pp. 131-146, 2009.
- [14] AL-NAAMI, B., BASHIR, A., AMASHA, H., AL-NABULSI, J. Statistical Approach for Brain Cancer Classification Using a Region Growing Threshold, Journal of Medical Systems, vol. 35, pp. 463-471, 2011.
- [15] RITTER, F., BOSKAMP, T., HOMEYER, A., LAUE, H., Medical Image Analysis, Browse Journals & Magazines, vol. 2, pp. 60 - 70, 2011.

- [16] SHAOHUI, H., BOLIANG, W., XIAOLI, H., XIAOPING, M. A Novel Post-Process Approach for Fast Marching Method in Liver CT Slices Automatic Segmentation, vol. 1, pp. 573-577, 2009.
- [17] BANIASADIPOUR, A., ZOROOFI, R. A., SATO, Y., NISHII, T. A Fully Automated Method for Segmentation and Thickness Map Estimation of Femoral and Acetabular Cartilages in 3D CT Images of the Hip, pp. 92-97, 2007.
- [18] JIAN, W., FENG, Y., JIAN-LIN, M., XIAO-PING, S. The Segmentation and Visualization of Human Organs Based on Adaptive Region Growing Method, pp. 439-443, 2008.

Internetové zdroje:

- [19] Elettra and FERMI lightsources, dostupné z: <<http://www.elettra.trieste.it/>>.
- [20] Ústav technické a experimentální fyziky, ČVUT v Praze. Dostupné z: <<http://www.utef.cvut.cz/cz/index.php?&Ns=103&id=1000002>>.
- [21] ESRF, The European Synchrotron. Dostupné z: <<http://www.esrf.eu/cms/live/live/en/sites/www/home/about/synchrotron-science/synchrotron-light.html>> .
- [22] Encyklopedie Fyziky. Dostupné z: <<http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/748-ccd-zakladni-princip>>.
- [23] AstroNuklFyzika: Aplikace ionizujícího záření- jaderné a radiační metody, dostupné z: <<http://astronuklfyzika.cz/JadRadMetody.htm>>.
- [24] Jasové a geometrické transformace. Václav HLAVÁČ. Dostupné z: <[https://cw.fel.cvut.cz/wiki/\\_media/courses/a4m33dzo/18brightgeomtxcz.pdf](https://cw.fel.cvut.cz/wiki/_media/courses/a4m33dzo/18brightgeomtxcz.pdf)>.
- [25] Histogram a ekvalizace. Odbor termomechaniky a techniky prostředí, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: <<http://ottp.fme.vutbr.cz/~pavelek/optika/1508.htm>>.
- [26] Ekvalizace histogramu. Martin BARVA. Dostupné z: <[http://cmp.felk.cvut.cz/~perdom1/vyuka/dzo/cv2/cv2\\_histeq/cv2\\_histeq.html](http://cmp.felk.cvut.cz/~perdom1/vyuka/dzo/cv2/cv2_histeq/cv2_histeq.html)>.
- [27] Morfologické operace. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: <[http://midas.uamt.feec.vutbr.cz/ZVS/Exercise10/content\\_cz.php](http://midas.uamt.feec.vutbr.cz/ZVS/Exercise10/content_cz.php)>.
- [28] Získávání a analýza obrazové informace. Biofyzikální ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno. Dostupné z: <[https://www.med.muni.cz/biofyz/Image/prezentace\\_4.pdf](https://www.med.muni.cz/biofyz/Image/prezentace_4.pdf)>.
- [29] Šedotónová matematická morfologie. Václav HLAVÁČ. Dostupné z: <<http://cmp.felk.cvut.cz/~hlavac/TeachPresCz/11DigZprObr/71-06MatMorfolGrayCz.pdf>>.

# Seznam symbolů, veličin a zkratek

PTA	kyselina fosfowolframová
SYRMEP	Synchrotronové záření pro medicínskou fyziku (beamline)
PFA	kyselina peroxomravenčí
EPTA	roztok ethanolu v PTA
ÚTEF	Ústav technické a experimentální fyziky
MUNI	Masarykova univerzita
FSI	Fakulta strojního inženýrství
ČVUT	České vysoké učení technické
CERN	Evropská organizace pro jaderný výzkum
E14 (E16)	čtrnáctidenní (šestnáctidenní) embryo
P1	postnatální embryo