ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra přírodovědných oborů

Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze

4D embryogenesis study using X-Ray micro-CT

Diplomová práce

Studijní program:	Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor:	Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce:	Bc. Kristýna Merglová
Vedoucí diplomové práce:	Ing. Jan Žemlička, Ph.D.

Kladno 2019

ČVUT
ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení:	**Merglová**	Jméno:	**Kristýna**	Osobní číslo:	**434008**
Fakulta:	**Fakulta biomedicínského inženýrství**				
Garantující katedra:	**Katedra přírodovědných oborů**				
Studijní program:	**Biomedicínská a klinická technika**				
Studijní obor:	**Přístroje a metody pro biomedicínu**				

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze

Název diplomové práce anglicky:

4D embryogenesis study using X-Ray micro-CT

Pokyny pro vypracování:

1. Porovnání vzorků myší (P stage) s různými variantami kontrastních látek a stabilizačních metod na zobrazovacím systému ÚTEF 2. Výběr optimálního protokolu pro přípravu vzorků, a jeho charakterizace 3. Výběr vhodných parametrů tomografických měření kontrastovaných vzorků vzhledem ke geometrii snímání, počtu projekcí, akvizičnímu času atd. 4. Vizualizace různých vývojových stádií myši (E,P stage) na základě optimálního protokolu 5. Vyhodnocení výsledků (interpretace, 3-D vizualizace)

Seznam doporučené literatury:

[1] J. T. Bushberg et al, The Essential Physics of Medical Imaging, ed. Second Edition, Williams & Wilkins, 2002, ISBN 978-0-683-30118-7
[2] J. Jakůbek, Semiconductor Pixel detectors and their applications in life sciences, Journal of Instrumentation, ročník 4, číslo 3, 2009
[3] Medipix Collaboration, Medipix Collaboration, 2015, http://medipix.web.cern.ch/
[4] J. Dudak et al, X-ray micro-CT scanner for small animal imaging based on Timepix detector technology, NIM A, ročník 773, číslo -, 2015, 81-86 s.
[5] J. Dudak et al, High-contrast X-ray micro-radiography and micro-CT of ex-vivo soft tissue murine organs utilizing ethanol fixation and large area photon-counting detector, Scientific Reports, ročník 6, číslo -, 2016, 30385 s.

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Jan Žemlička, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **19.02.2019**
Platnost zadání diplomové práce: **18.09.2020**

doc. Ing. Lenka Lhotská, CSc.	prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis vedoucí(ho) katedry	podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 16. 5. 2019 …..……..……...

Bc. Kristýna Merglová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Janu Žemličkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracovávání diplomové práce věnoval. Poděkování patří také Ing. Janu Dudákovi za ochotu při realizaci experimentálních měření, za poskytnutí potřebných informací při zpracovávání získaných dat a cenné rady. Dále bych také ráda poděkovala RNDr. Janě Bulantové, Ph.D. za poskytnutí vzorků embryí laboratorní myši a MUDr. Janě Mrzílkové, Ph.D. za diskuzi a rady k anatomické části mé diplomové práce.

Práce byla podpořena z projektu Evropských strukturálních a investičních fondů OP VVV - Inženýrské aplikace fyziky mikrosvěta (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000766).

ABSTRAKT

V posledních letech rentgenová mikro–tomografie nalézá uplatnění v mnoha dříve nemyslitelných vědeckých oblastech. Díky rozvoji nano–fokus zdrojů je možné v radiografických laboratořích získávat 3D data s prostorovým rozlišením menším než 1 µm a nové digitální detektory umožňují zobrazování struktur tvořených materiály s velmi podobnou absorpcí rentgenového záření. V této práci se zaměřuji na možnosti zobrazování měkkých tkání myších embryí, kdy je možné měřením různých vývojových stádií sledovat embryonální vývoj. Pro referenční stádium P1 byly vyzkoušeny různé způsoby stabilizace, kontrastování a mechanické fixace, což vedlo ke stanovení vhodného protokolu pro měření tohoto typu vzorků. Na základě stanoveného protokolu byla dále zkoumána stádia E14 a E18. Výsledky tomografických měření vzorků stabilizovaných v etanolové řadě, kontrastované Lugolovým roztokem a mechanicky fixované agarózovým gelem umožňují identifikaci jednotlivých orgánů a zachycují jejich růst ve sledovaném časovém období.

Klíčová slova

Rentgenové záření; tomografie; radiografie; mikro-CT; hybridní polovodičové detektory; jodové kontrastní látky; embryogeneze.

ABSTRACT

In recent years, X-ray micro–tomography has found its application in many previously unthinkable scientific fields. Thanks to the development of nano–focus sources, 3D data with a spatial resolution of less than 1 μm can be obtained in radiographic laboratories and new digital detectors allow the displaying of structures made of materials with very similar X-ray absorption. In this work, I focus on the possibilities of displaying soft tissues of mouse embryos, where it is possible to monitor embryonic development by measuring various developmental stages. Various ways of stabilization, contrast, and mechanical fixation methods have been tried for a reference stage P1, which consequently led to the establishment of an appropriate protocol for measuring this type of sample. Based on the established protocol, stages E14 and E18 were further examined. The results of tomographic measurements of samples stabilized in ethanol series, contrasted with Lugol's solution and mechanically fixed by agarose gel, enable identification of individual organs and capture their growth in the monitored time period.

Keywords

X-ray; tomography; radiography; micro-CT; hybrid semiconductor detectors; iodinated contrast solutions; embryogenesis.

Obsah

Seznam symbolů a zkratek **9**

Seznam obrázků **10**

Seznam tabulek **15**

1 Úvod **16**

2 Teoretický základ **18**

2.1 Historie objevení RTG záření 18

2.2 RTG záření 19

2.2.1 Vznik RTG záření 19

2.2.2 Interakce RTG záření 21

2.3 Základní části RTG přístroje 23

2.3.1 Rentgenka 23

2.3.2 Detektory RTG záření 25

2.4 Vznik RTG obrazu 28

2.5 Kvalita RTG obrazu 28

2.5.1 Prostorové rozlišení 28

2.5.2 Kontrast 29

2.5.3 Šum 30

2.6 Výpočetní tomografie 31

3 Současný stav **32**

3.1 Metody pro sledování embryonálního vývoje 32

3.1.1 Episkopická mikroskopie s vysokým rozlišením (HREM) 32

3.1.2 Optická projekční tomografie (OPT) 34

3.1.3 Mikro-magnetická rezonance (mikro-MR) 34

3.1.4 Radiografické metody 36

3.2 Rentgenová mikrotomografie 37

3.3 Kontrastní látky 38

3.3.1 Oxid osmičelý 39

3.3.2 Jodové kontrastní látky 39

3.3.3 Kyselina fosfowolframová (PTA) 40

3.3.4 Kontrastní látky tvořené nanočásticemi 43

4 Cíle práce 44
5 Metody 45
5.1 Vzorky 45
5.2 Stabilizace, kontrastování a fixace vzorků 47
5.3 Mikro-CT 48
5.4 Průběh měření 49
5.5 Zpracování naměřených dat 52
6 Výsledky 57
6.1 Referenční P1 stádium laboratorní myši s různými variantami přípravy 57
6.1.1 Měření 1 (M1) 57
6.1.2 Měření 2 (M2) 59
6.1.3 Měření 3 (M3) 60
6.1.4 Měření 4 (M4) 61
6.1.5 Měření 5 (M5) 62
6.1.6 Měření 6 (M6) 64
6.1.7 Měření 7 (M7) 66
6.2 Vybraný protokol pro přípravu vzorků a jeho charakterizace 68
6.2.1 Vybraný protokol pro přípravu P1 stádia laboratorní myši 68
6.2.2 Vybraný protokol pro přípravu E18 a E14 stádia laboratorní myši 69
6.3 Vizualizace různých vývojových stádií laboratorní myši (E, P) 70
6.3.1 Vizualizace E14 stádia laboratorní myši 71
6.3.2 Vizualizace E18 stádia laboratorní myši 74
6.3.3 Vizualizace P1 stádia laboratorní myši 78
7 Diskuse 85
8 Závěr 89
Seznam použité literatury 91
Příloha A: Tabulka přípravy vzorků 96
Příloha B: Tabulka parametrů měření 97

Seznam symbolů a zkratek

Zkratka/Symbol	Význam
Mikro-CT	Mikro-tomografie
RTG	Rentgenové
Z	Protonové číslo
3D	Trojrozměrný
E	Embryonální stádium
P	Postnatální stádium
CT	Výpočetní tomografie (z angl. Computed Tomography)
ÚTEF	Ústav technické a experimentální fyziky
ČVUT	České vysokého učení technické
CCD	Z angl. charge-coupled device
CMOS	Z angl. complementary metal-oxide-semiconductor
Si	Křemík
GaAs	Arsenid gallitý
CdTe	Tellurid kademnatý
CERN	Evropská organizace pro jaderný výzkum (z franc. Conseil Européen pour la recherche nucléaire)
PSF	Odezva na bodový impulz (z angl. Point Spread Function)
SNR	Poměr signálu k šumu (z angl. signal-to-noise ratio)
2D	Dvojrozměrný
HREM	Episkopická mikroskopie s vysokým rozlišením (z angl. high-resolution episcopic microscopy)
OPT	Optická projekční tomografie
Mikro-MR	Mikro-magnetická rezonance
MR	Magnetická rezonance
PTA	Kyselina fosfowolframová (z angl. phosphotungstic acid)
PMA	Kyselina fosfomolybdenová (z angl. Phosphomolybdic acid)
I2E	1% jod ve 100% etanolu
I2M	1% jod ve 100% metanolu
IKI	Roztok elementárního jodu a jodidu draselného v etanolu
EPTA	Roztok kyseliny fosfowolframové v etanolu
SDD	Vzdálenost od zdroje k detektoru (z angl. source-detector distance)
SOD	Vzdálenost od zdroje k objektu (z angl. source-object distance)
μ	Mikro
EPS	Efektivní velikost pixelu

Seznam obrázků

Obr. 2.1: Wilhelm Conrad Röntgen a snímek ruky Röntgenovy manželky publikovaný 16. ledna 1896 v The New York Times. 19

Obr. 2.2: Spektrum brzdného a charakteristického RTG záření pro wolframovou anodu rentgenky. Na ose x energie fotonů v keV, na ose y relativní počet fotonů. 20

Obr. 2.3: Schéma fotoelektrického jevu. Dochází ke střetnutí fotonu RTG záření s obalovým elektronem. Foton předává veškerou energii elektronu a zaniká. Elektron vylétává z atomu a na volné místo přeskakuje elektron z vyšší hladiny. 22

Obr. 2.4: Schéma Comptonova rozptylu. Dochází ke střetnutí fotonu RTG záření s elektronem. Foton předá část své energie elektronu, který je poté vyražen. Foton se dále pohybuje ve změněném směru s nižší energií. 23

Obr. 2.5: Schéma nano–fokus rentgenky s transmisní anodou. Extrémně malá velikost ohniska zajištěná soustavou elektromagnetických čoček společně s geometrií kuželového svazku umožňuje prostorové rozlišení menší než 1 μm. 25

Obr. 2.6: Schéma hybridního pixelového detektoru, který se skládá z polovodičového senzoru propojeného technologií bump-bondingu s elektronickým vyčítacím čipem. ..27

Obr. 2.7: Velkoplošný pixelový detektor WidePIX$_{4\times5}$ registrující jednotlivé fotony s rozlišením 1280 × 1024 pixelů složený z 20 bezhranných čipů Timepix s rozlišením 256 × 256 pixelů. 27

Obr. 2.8: Schéma vzniku polostínu. Prostorové rozlišení je omezeno velikostí ohniska rentgenky. Vlevo: zdroj záření s větším ohniskem způsobí vznik polostínu. Vpravo: zdroj záření s bodovým ohniskem bez rozmazání obrazu. 29

Obr. 3.1: Myší embryo zobrazené pomocí HREM. Tloušťka řezu v transverzální rovině 3 μm. Vlevo: výsledný soubor dat obsahující 2 574 transverzálních obrazů byl použit pro získání sagitálních a koronárních řezů. Vpravo: 3D rekonstrukce datového souboru. Měřítko 2 mm. 33

Obr. 3.2: Autofluorescenční snímek myšího embrya získaný s OPT systémem s prostorovým rozlišením 6,7 μm. Měřítko 2 mm. 34

Obr. 3.3: T1 vážený obraz nekontrastovaného embrya myši získaný pomocí mikro-MR. Měřítko 2 mm. 35

Obr. 3.4: Embryo laboratorní myši stabilizované 4% paraformaldehydem (přes noc), kontrastované 0,1% roztokem jodu – 2:1, jodid draselný:elementární jod ve vodě – (přes noc) a mechanicky fixované agarózovým gelem zobrazené pomocí mikro-CT systému. Rozlišení 11 μm. Měřítko 2 mm. 37

Obr. 3.5: Dvě varianty skenovací geometrie. (a) Rotující vzorek umístěný mezi statickou rentgenkou a detektorem. (b) Rotující systém rentgenka–detektor kolem statického vzorku. 38

Obr. 3.6: Embryo laboratorní myši. Vlevo: stabilizované 4% paraformaldehydem a kontrastované pomocí roztoku 1% elementárního jodu a 2% jodidu draselného ve vodě. Uprostřed: stabilizované 4% paraformaldehydem a kontrastované kyselinou fosfowolframovou (PTA). Vpravo: stabilizované roztokem 4% formaldehydu a 1% glutaraldehydu ve fosfátovém pufru, kontrastované 1–2% roztokem oxidu osmičelého ve fosfátovém pufru a mechanicky fixované pryskyřicí. 42

Obr. 3.7: Embryo myši stabilizované alkoholovou řadou pomocí etanolu (30%–50%–70%), v každém roztoku několik hodin, a kontrastované pomocí roztoku kyseliny fosfowolframové v etanolu (EPTA) po dobu čtyř dní. 42

Obr. 3.8: Laboratorní myš, které byla intravenózně aplikována kontrastní látka obsahující nanočástice na bázi kovů alkalických zemin. A a B získané 4 h po aplikaci kontrastní látky ukazují intrasplenické (*) a intrahepatické (LMet) nádory. B, C a D ukazují zesílený kontrast břišních a mediastinálních lymfatických uzlin (LN) a nadledvinek (Adrenal glands = AdrG). C získán 4 h a D 22 dní po aplikaci kontrastní látky. 43

Obr. 5.1: Přehled vývoje laboratorní myši. Jednotlivé fáze jsou uvedeny nad časovou osou, zásadní události a procesy jsou uvedeny pod časovou osou. 46

Obr. 5.2: Referenční P1 stádium laboratorní myši stabilizované alkoholovou řadou a kontrastované pomocí IKI.....46

Obr. 5.3: Čtyři vzorky P1 stádia laboratorní myši stabilizované vzestupnou alkoholovou řadou, kontrastované pomocí IKI či Lugolova roztoku, mechanicky fixované potravinářskou želatinou, umístěné v plastových zkumavkách a speciálním držákem upevněné k rotačnímu stolku. Měřeno pomocí mikro-CT systému vybudovaného v ÚTEF ČVUT v Praze.....48

Obr. 5.4: Mikro-CT systém skládající se z detektoru (WidePIX$_{4\times5}$), rentgenky typu nano–fokus (FeinFocus FXE–160.51), polohovacího systému s rotačním stolkem (Newport URS75BPP) a revolveru se sadou hliníkových filtrů. 49

Obr. 5.5: Rozhraní softwaru Pixet s projekcí laboratorní myši umístěné v etanolu se zobrazenými surovými daty bez obrazových korekcí. 51

Obr. 5.6: Beam–hardening korekce. Vlevo: nekorigovaná data, vpravo: data po beam–hardening korekci.....52

Obr. 5.7: Načtené naměřené projekce beam–hardening filtrů (Mask 1–8) s nastavenými tloušťkami (Thickness) v mikrometrech a délkou akvizičního času (Time) v sekundách.....53

Obr. 5.8: Okno aplikace v programu MATLAB, které se otevírá po spuštění skriptu GUI vytvořeného v ÚTEF ČVUT v Praze a sloužícího ke zlepšení kvality výsledného obrazu. 54

Obr. 5.9: Program NRecon sloužící k rekonstrukci naměřených dat. 55

Obr. 5.10: Vizualizace 3D objemu vzorku a transverzálních, koronárních a sagitálních řezů v programu Dragonfly. 56

Obr. 6.1: M1: CT rekonstrukce nativního vzorku P1 stádia laboratorní myši bez stabilizace alkoholovou řadou a bez kontrastování. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují dobře viditelné kostní struktury. Dále je možné částečně rozeznat plicní tkáň vyplněnou vzduchem a stíny v oblasti břišní dutiny. EPS = 22 μm. 58

Obr. 6.2: M2: CT rekonstrukce vzorku ponořeného do 50% roztoku etanolu a poté přesunutého do 75% roztoku etanolu. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami. Rozpoznatelné jsou také struktury vyplněné vzduchem (plíce, střeva a paranasální dutiny). EPS = 20 μm. 60

Obr. 6.3: M3: CT rekonstrukce P1 stádia laboratorní myši kontrastované pomocí 5% IKI. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami. Rozpoznatelná je také tuková tkáň a stíny v oblasti břišní dutiny. EPS = 20 μm. 61

Obr. 6.4: M4: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (50 % – 75 % – 96 % roztok etanolu) a kontrastovaného 5% IKI. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami a tukovou tkání. I přes přítomnost rekonstrukčních pohybových artefaktů je možné rozpoznat některé vnitřní orgány. EPS = 20 μm. 62

Obr. 6.5: M5: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (50% – 75% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného 5% IKI a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů. Kontrastní látka IKI v průběhu měření bohužel difundovala z tkání do okolního prostředí, v důsledku čehož byl snížen kontrast vzorku. EPS = 20 μm. 63

Obr. 6.6: M6: CT rekonstrukce vzorků stabilizovaných alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaných 10%, 20% a 40% IKI a mechanicky fixovaných potravinářskou želatinou. I přes zvyšování koncentrace IKI nebylo dosaženo požadovaného kontrastu měkkých tkání. EPS = 33,26 μm. 65

Obr. 6.7: M6: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného 20% IKI a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů díky mechanické fixaci potravinářskou želatinou. M6 bylo uskutečněno ihned po zalití vzorku do potravinářské želatiny, čímž bylo

omezeno difundování kontrastní látky z měkkých tkání do okolního prostředí. EPS = 33,26 μm. 65

Obr. 6.8: M6: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného Lugolovým roztokem a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů a výborný kontrast měkkých tkání. EPS = 33,26 μm. 66

Obr. 6.9: M7: CT rekonstrukce vzorků stabilizovaných alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaných Lugolovým roztokem a mechanicky fixovaných potravinářskou želatinou. Před samotnou mechanickou fixací proces: opláchnutí v 96 % roztoku etanolu – oschnutí – postříkání bezbarvým lakem – zaschnutí – opláchnutí destilovanou vodou. Sagitální řezy: zleva 2, 4, 6, 8 a 11 dní kontrastované vzorky. EPS = 36,67 μm. 68

Obr. 6.10: Zrekonstruovaný virtuální 3D model E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 71

Obr. 6.11: Sagitální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 72

Obr. 6.12: Sagitální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 72

Obr. 6.13: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 73

Obr. 6.14: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 73

Obr. 6.15: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm. 74

Obr. 6.16: Zrekonstruovaný virtuální 3D model E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 75

Obr. 6.17: Sagitální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 75

Obr. 6.18: Sagitální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 76

Obr. 6.19: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 77

Obr. 6.20: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 77

Obr. 6.21: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm. 78

Obr. 6.22: Zrekonstruovaný virtuální 3D model P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 79

Obr. 6.23: Zrekonstruovaný virtuální 3D model kosterní soustavy P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 79

Obr. 6.24: Sagitální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 80

Obr. 6.25: Sagitální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 81

Obr. 6.26: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 82

Obr. 6.27: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 82

Obr. 6.28: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 83

Obr. 6.29: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm. 83

Seznam tabulek

Tabulka 6.1: Vybraný protokol pro přípravu vzorku P1 stádia laboratorní myši 69

Tabulka 6.2: Vybraný protokol pro přípravu vzorku E18 a E14 stádia laboratorní myši 70

1 Úvod

Mikroradiografie a mikro-tomografie (mikro-CT) jsou zobrazovací modality založené na zeslabení rentgenového (RTG) záření pozorovaným vzorkem. RTG paprsky jsou obvykle generovány pomocí RTG trubice a zaznamenávány na detektoru. Díky neustálému technologickému pokroku v oblasti zdrojů a detektorů RTG záření lze v dnešní době pomocí RTG zobrazovacích technik dosahovat rozlišení téměř srovnatelného s optickými metodami. Velkou výhodou těchto postupů je na rozdíl od standardního mikroskopického a histologického zpracování nedestruktivita obou metod. Jednotlivé vzorky tak mohou být použity k dalšímu výzkumu. [1]

Metody založené na využití RTG záření se jak v medicíně, tak ve výzkumu využívají k zobrazování kostí a měkkých tkání. [2] K vizualizaci jemných struktur měkkých tkání je však většinou nezbytné použití kontrastních látek. Kontrastní látky jsou takové látky, které dokáží selektivně změnit efektivní protonové číslo (Z) měkkých tkání, čímž dojde ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření. [3]

Trojrozměrná (3D) vizualizace morfologie embrya je důležitá jak pro úplné pochopení funkce orgánů a tkání, tak pro porozumění způsobu jejich vývoje. Důležitá může být také zejména v kombinaci s prostorovou analýzou genové exprese, kdy může poskytnout výjimečný pohled na embryonální vývoj a pochopení mechanismů, které jsou základem abnormálního vývoje nebo vrozených chorob. Ukázalo se, že hlavní výzvou pro 3D vizualizaci je najít zobrazovací metodu, která je vhodná jak pro tvorbu digitálních objemových dat s odpovídajícím rozlišením, tak pro zobrazení široké škály biologických vzorků, včetně těch, které jsou velké a opticky neprůhledné. [4]

Cílem mé diplomové práce s názvem Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze je na vzorcích laboratorních myší dokázat, že metodu RTG mikro-CT lze využít pro monitorování embryonálního vývoje savců. K dosažení takového cíle je nutné vytvořit vhodný protokol pro přípravu různých stádií laboratorní myši, tedy experimentálním měřením optimalizovat proces stabilizace, kontrastování a mechanické fixace tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího kontrastu u měkkých tkání. Dále je nutné naměřená data embryonálních (E) a postnatálních (P) vzorků vyhodnocovat a konzultovat s anatomy, aby bylo možné určit, zda je mikro-CT systém vhodný nástroj pro takovýto výzkum.

Samotná práce je rozdělena na část teoretickou, současný stav, metody a výsledky. Teoretická část poskytuje základní, zejména fyzikální informace o radiografii a tomografii počínaje objevením RTG záření, jeho vznikem a interakcemi. Další část je věnována základním částem RTG přístroje, tedy RTG trubici a detektoru. Poté je čtenář seznámen se samotným vznikem RTG obrazu a základními parametry pro jeho hodnocení. V závěru teoretické části je stručně popsána výpočetní tomografie (CT) jakožto radiografická modalita.

Kapitola současný stav je zaměřena na používané metody pro sledování embryonálního vývoje, na RTG mikro-CT a na dostupné mikroradiografické kontrastní látky. Část práce nazvaná jako Metody seznamuje čtenáře s přípravou vzorků, s používaným mikro-CT systémem, průběhem měření a následným zpracováním naměřených dat. Na závěr jsou uvedeny výsledky jednotlivých experimentálních měření vedoucích k vhodnému protokolu, tento protokol i vizualizace a interpretace různých embryonálních stádií laboratorní myši.

2 Teoretický základ

V následujících podkapitolách mé diplomové práce bude uvedena historie objevení RTG záření, následně bude popsáno samotné RTG záření, jeho vznik a interakce a v další části budou rozebrány hlavní komponenty RTG přístroje, tedy rentgenka a detektory. V závěru teoretické části práce bude popsán vznik RTG obrazu a základní parametry pro hodnocení jeho kvality.

2.1 Historie objevení RTG záření

Podle historických pramenů bylo RTG záření objeveno 8. listopadu 1895, kdy německý fyzik Wilhelm Conrad Röntgen (Obr. 2.1) (1845-1923), tehdy působící na Würzburské univerzitě, ve své laboratoři experimentoval s katodovými paprsky. V temné místnosti do papírové krabice uzavřel katodovou trubici a nechal dopadat proud elektronů urychlených elektrickým polem na luminiscenční stínítko pokryté platinokyanidem barya. Zjistil, že dochází ke světélkování pokaždé, když v trubici dojde k výboji, a to i v případě, kdy ji zakryl černým papírem či když mezi ni a stínítko vložil tlustou knihu. Stín na stínítku se objevil, až když mezi katodovou trubici a stínítko umístil předmět z kovu. [5-7]

Röntgen zjistil, že dopadají-li elektrony s velkou kinetickou energií na kovovou anodu, vzniká neviditelné záření, které označil jako „paprsky X“. Po tomto objevu uskutečnil jeden ze svých nejdůležitějších pokusů, kdy v černém papíře zabalenou fotografickou desku umístil před katodovou trubici. Vyvolaná deska celá zčernala. Když ale do svazku záření umístil kovový předmět, na desce se po vyvolání objevila světlá část odpovídající tvaru předmětu. Tento objev, za který v roce 1901 získal jako vůbec první Nobelovu cenu za fyziku, ho vedl k vytvoření historicky prvního RTG snímku ilustrující budoucí využití. Jednalo se o snímek ruky Röntgenovy manželky (Obr. 2.1), jenž byl publikovaný 16. ledna 1896 v The New York Times. [5-7]

Obr. 2.1: Wilhelm Conrad Röntgen a snímek ruky Röntgenovy manželky publikovaný 16. ledna 1896 v The New York Times. [7]

2.2 RTG záření

RTG záření je typ elektromagnetického záření s velmi krátkými vlnovými délkami v rozsahu $8 \cdot 10^{-18}$ až 10^{-12} m, podle čehož tedy spadá do oblasti záření ionizujícího. Pod pojmem ionizující si můžeme představit každé záření, které je schopné pomocí energie ionizovat atomy a molekuly látky. V tomto případě se tak děje nepřímo, tedy ve dvou krocích, kdy nejdříve fotony interakcí s látkou vytvoří sekundárně nabité částice, u RTG záření elektrony, a ty poté v kroku druhém látku ionizují. [5, 8, 9]

2.2.1 Vznik RTG záření

Vznik RTG záření může probíhat v podstatě třemi způsoby: brzděním elektronu v látce, změnou dráhy relativistického elektronu jako synchrotronové záření či jako vybuzené fluorescenční záření. V mé práci se však podrobněji věnuji pouze prvnímu z uvedených způsobů, kdy tento typ vzniku RTG záření se dále dělí na brzdné a charakteristické. [5]

Brzdné záření

Anody rentgenek se vyrábějí z materiálů s vysokou elektronovou hustotou, typicky z wolframu. Pokud se primární elektrony z katody urychlené elektrostatickým polem

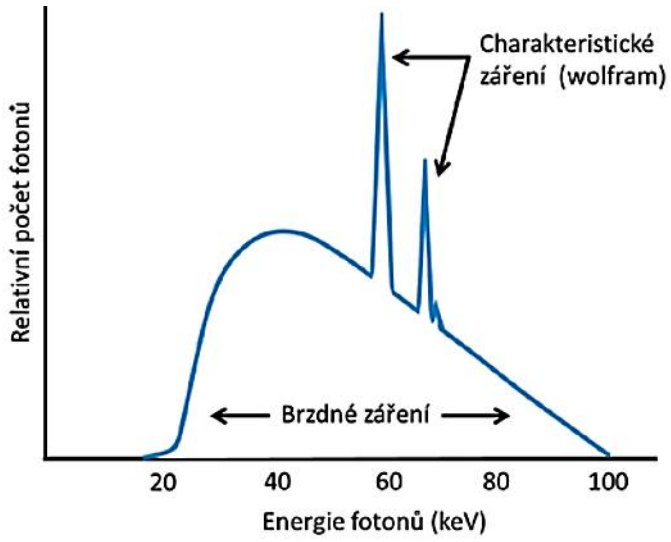
dostávají do blízkosti obalových elektronů, dochází v důsledku silného působení odpudivých sil a zabrzděním urychlených elektronů ke ztrátě jejich kinetické energie. Asi 1 % z energie je přeměněno na energii fotonů RTG záření a 99 % na energii tepelnou. Tento typ RTG záření má spojité energetické spektrum (Obr. 2.2), tedy obsahuje RTG fotony s energiemi od jednotek keV až po hodnotu odpovídající kinetické energii primárních elektronů.[5, 10, 11]

Charakteristické záření

V elektronových obalech terčových atomů může z různých příčin docházet k vyražení elektronů z vnitřních slupek, nejčastěji K či L. Tato situace nastává například, když se elektron s energií vyšší než je vazebná energie elektronů atomů anody letící z katody srazí s jedním z terčových elektronů. Neobsazené místo je zaplněné přechodem elektronu z některé z vyšší na nižší energetickou hladinu. Rozdíl vazebné energie vyzářený v podobě fotonů charakteristického záření např. mezi slupkou K a L je dán rovnicí:

$$E_v = E_K - E_L\,, \tag{2.1}$$

kde E_K je vazebná energie elektronu na slupce K a E_L na slupce L. Energetické spektrum tohoto typu RTG záření je čárové (Obr. 2.2) s energiemi od jednotek po desítky keV. Platí, že čím vyšší je protonové číslo materiálu anody, tím vyšší jsou vyzářené energie. [5, 11, 12]



Obr. 2.2: Spektrum brzdného a charakteristického RTG záření pro wolframovou anodu rentgenky. Na ose x energie fotonů v keV, na ose y relativní počet fotonů. [13]

2.2.2 Interakce RTG záření

Fotony RTG záření při průchodu hmotným prostředím ztrácejí svoji energii zejména třemi procesy, a to fotoelektrickým jevem, Comptonovým rozptylem a tvorbou elektron-pozitronových párů. Vzhledem k používané energii RTG záření při RTG zobrazování se však uplatňují pouze první dva zmiňované případy. Tvorba elektron-pozitronových párů nastává až při energiích primárních fotonů vyšších jak 1,022 MeV. [5, 7]

Fotoelektrický jev

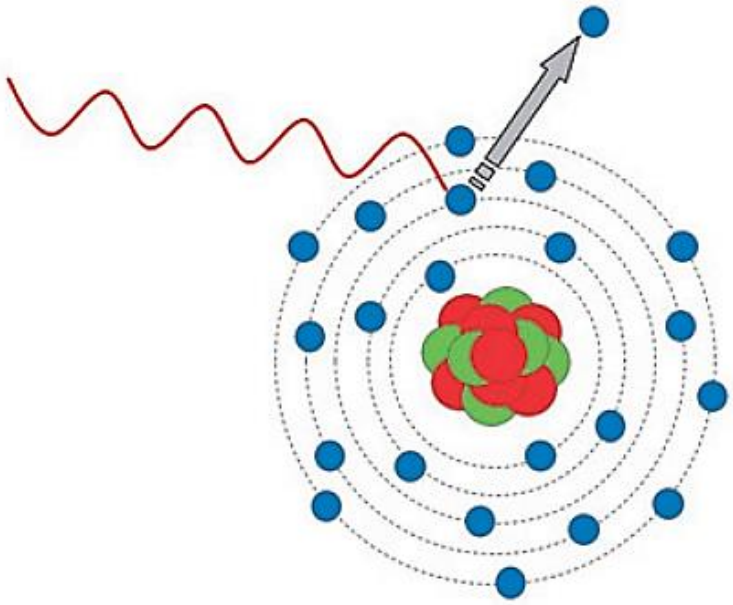
Fotoelektrický jev neboli fotoefekt (Obr. 2.3) je absorpční proces. Dochází při něm ke střetnutí fotonu RTG záření s elektronem vázaným na vnitřní slupce elektronového obalu. Letící foton při srážce předá veškerou svou energii elektronu a zanikne. Tato energie je využita na vyražení elektronu z elektronového obalu a na kinetickou energii fotoelektronu, která je dána rovnicí:

$$E = E_f - E_v \,, \tag{2.2}$$

kde E_f je energie fotonu RTG záření a E_v je vazebná energie elektronu na příslušné slupce (K, L, M, …). Fotoelektron se poté pohybuje mezi atomy, které do jeho zabrzdění ionizuje. [5, 8, 14]

Po vyražení elektronu na uvolněné místo v elektronovém obalu přeskakuje elektron z vyšší hladiny za současného vyzáření fotonů charakteristického záření. V některých případech však může také docházet k předání rozdílu energií některému elektronu z vyšších sfér elektronového obalu, který je emitován jako Augerův elektron. [5, 8, 14]

K fotoefektu nejčastěji dochází při nízkých energiích RTG záření a v absorbérech s vyšším protonovým číslem. Účinný průřez fotoefektu je nejvyšší, když je energie RTG záření jen o trochu vyšší než vazebná energie elektronu na příslušné slupce. V radiografii je tento proces potřebný, jelikož způsobuje absorpci v objektu zapříčiňující kontrast v obraze. [5, 8, 15]



Obr. 2.3: Schéma fotoelektrického jevu. Dochází ke střetnutí fotonu RTG záření s obalovým elektronem. Foton předává veškerou energii elektronu a zaniká. Elektron vylétává z atomu a na volné místo přeskakuje elektron z vyšší hladiny. [8]

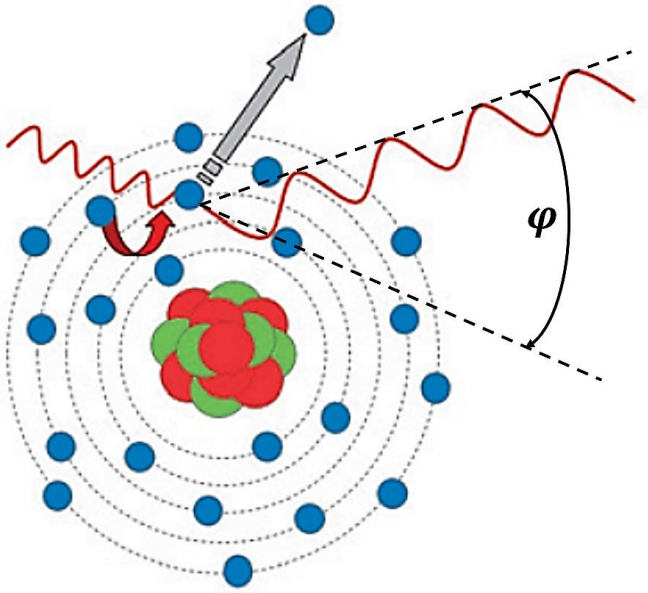
Comptonův rozptyl

Comptonův rozptyl (Obr. 2.4) je proces, při kterém dochází k interakci fotonu RTG záření a volného nebo slabě vázaného elektronu. Foton předá část své energie některému z těchto elektronů, a to pružným rozptylem. Energie elektronu je dána rozdílem energií primárního a rozptýleného fotonu. Takovýto elektron je poté vyražen pod úhlem v intervalu 0°–90°. Sám foton se pohybuje ve změněném směru s nižší energií danou vztahem:

$$E'_\gamma = \frac{E_\gamma}{1 + \frac{E_\gamma}{m_e \cdot c^2 \cdot (1 - cos\varphi)}}, \tag{2.3}$$

kde E'_γ je energie rozptýleného fotonu pod úhlem φ, E_γ je energie primárního fotonu a $m_e \cdot c^2$ je klidová energie elektronu odpovídající 511 keV. Pokles této energie je závislý na úhlu rozptylu φ, kdy největší je pro zpětný rozptyl, tedy 180°. [5, 8, 14]

Ke Comptonově rozptylu nejčastěji dochází u RTG záření středních a vyšších energií v rozmezí 0,5–5 MeV. Na rozdíl od fotoefektu není nijak podstatně závislý na protonovém čísle absorbéru a opakovaně probíhá až do doby, dokud foton neopustí látku či neztratí tolik energie, aby došlo k jeho absorpci fotoefektem. [5, 6, 8]



Obr. 2.4: Schéma Comptonova rozptylu. Dochází ke střetnutí fotonu RTG záření s elektronem. Foton předá část své energie elektronu, který je poté vyražen. Foton se dále pohybuje ve změněném směru s nižší energií. Upraveno z: [8]

Rayleighův rozptyl

Kromě těchto tří nejčastějších interakcí existuje také Rayleighův rozptyl, což je koherentní rozptyl na obalových elektronech, při kterém dochází pouze ke změně směru fotonového záření. [5]

Jak změna směru fotonu při této interakci, tak změna směru při Comptonově rozptylu zhoršují kvalitu RTG obrazu. Fotony interagující těmito procesy již nenesou v radiografickém obraze užitečné informace o zkoumaném objektu, ale pouze přispívají k signálu pozadí. [15]

2.3 Základní části RTG přístroje

Mezi základní části RTG přístroje typicky patří rentgenka jako zdroj RTG záření, detektor zaznamenávající intenzitu tohoto záření a zařízení sloužící k umístění zkoumaného objektu.

2.3.1 Rentgenka

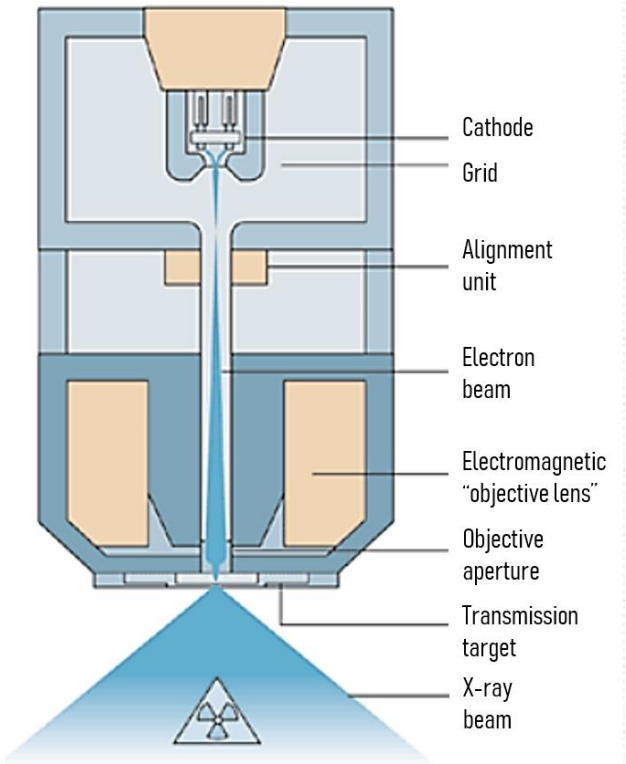
Rentgenka (neboli RTG trubice) jakožto nejjednodušší urychlovač nabitých částic je vysoce vakuovaná elektronka. Její vnitřní část je tvořena dvěma elektrodami,

a to zápornou katodou a kladnou anodou. Katoda, vyrobená většinou z wolframu, je žhavena vlastním elektrickým obvodem na teplotu více jak 2000 °C. Žhavením jsou uvolňovány elektrony a dochází tedy k termoemisi elektronů, jejichž množství je ovlivněno právě teplotou. Mezi katodou a anodou je připojeno vysoké napětí, zvané anodové, které je přibližně 20–150 kV. Toto napětí tvořící silné elektrické pole urychluje elektrony vylétávající z katody. [5, 7, 16]

Druhá elektroda rentgenky, anoda, je též vyrobena většinou z wolframu, jenž má vysokou hustotu elektronů a způsobuje tak prudké zabrzdění urychlených elektronů. Při jejich dopadu na anodu se však velká část kinetické energie přeměňuje na energii tepelnou a jen přibližně 1 % se mění na energii RTG záření ať už brzdného, či charakteristického. Jelikož při dopadu elektronů dochází k zahřívání anody, je nutné její chlazení cirkulujícím olejem, případně se současně využívá rotující anody, která zajistí rovnoměrnější rozložení tepla. Ještě lepší chlazení však zajišťuje rentgenka typu Straton, u které je anoda v přímém kontaktu s olejem. U vysokovýkonných rentgenek se využívá chlazení např. olejem či vodou. [5, 7, 16]

Anoda v rentgence je umístěná tak, že s centrálním paprskem RTG záření svírá určitý úhel, což zajišťuje ideální poměr mezi velikostí optického ohniska a intenzitou RTG záření. Místo ve tvaru obdélníku, kam dopadají urychlené elektrony, označujeme jako termické ohnisko a místo, jež je projekcí termického ohniska do směru centrálního paprsku jako ohnisko optické. Pro dostatečnou ostrost obrazu požadujeme co nejmenší velikost optického ohniska, které je obecně třikrát menší než termické. [5, 16]

V mé diplomové práci byla v experimentech používána speciální nano–fokus rentgenka s transmisní anodou zobrazená na Obr. 2.5. Její obrovskou výhodou je malý rozměr optického ohniska, který společně s velikostí pixelu detektoru omezuje dosažitelné prostorové rozlišení výsledného obrazu. Teoreticky by mělo mít toto ohnisko průměr blízký nule, avšak v praxi má velikost v řádu stovek nanometrů. Malé ohnisko je zajištěno speciální soustavou elektromagnetických objektivových čoček umístěných mezi katodou a anodou. RTG paprsky s nano–fokusací však poskytují podstatně nižší fotonový tok z důvodu nemožného efektivního chlazení tenké anody. K získání dostatečné statistiky v obraze je tedy nutné prodloužit akviziční čas na jednu projekci, což si můžeme dovolit kvůli kombinaci tohoto typu rentgenky s bezšumovým detektorem, u kterého je možné nastavení detekčního prahu nad úroveň šumu elektronického. [17-19]



Obr. 2.5: Schéma nano–fokus rentgenky s transmisní anodou. Extrémně malá velikost ohniska zajištěná soustavou elektromagnetických čoček společně s geometrií kuželového svazku umožňuje prostorové rozlišení menší než 1 μm. Upraveno z: [17]

2.3.2 Detektory RTG záření

Detektor RTG záření umístěný za vzorkem zaznamenávající modifikované vlastnosti RTG paprsků je důležitou součástí radiografického procesu. Společně s kvalitou RTG paprsků určuje množství informací zobrazených ve zkoumaném vzorku. [7, 20]

Filmové detektory

Jak již bylo zmíněno výše, historicky první RTG snímek zhotovil Röntgen. Jako zobrazovací médium použil RTG citlivou filmovou emulzi, která dala základ analogovým detektorům používaným dodnes. I přes mnoho výhod jako je vysoké prostorové rozlišení, nízký šum a cenová dostupnost se kvůli svým nevýhodám jako je chemické zpracování, omezený dynamický rozsah, nelineární odezva a absence on–line digitálního výstupu staly nevhodnými pro moderní diagnostické systémy. [20, 21]

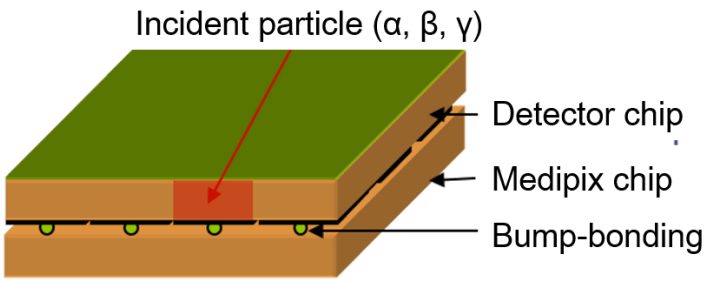
Digitální detektory: integrující náboj a detektory s hybridními pixely

V dnešní době byla tedy většina těchto detektorů nahrazena elektronickými zobrazovacími detektory s digitálním výstupem. V této oblasti existují dva přístupy:

detektory integrující náboj a pixelové detektory registrující jednotlivé fotony. První zmíněný přístup zahrnuje detektory, které v pixelech shromažďují a integrují náboj vytvářený ionizujícím zářením. Jsou to např. detektory CCD (charge-coupled device), CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) a flat panely. Výhodou těchto zobrazovacích zařízení je vysoké prostorové rozlišení. Naopak nevýhodami je šum, temný proud, omezený dynamický rozsah a integrace náboje bez energetického rozlišení fotonů. Obecně jsou tyto detektory vhodné pro aplikace s vysokou intenzitou ionizujícího záření, jelikož pokud je intenzita příliš nízká, je pro statické potlačení šumu vyžadována dlouhá doba expozice. [20, 22]

Druhý uvedený přístup pracuje na skutečnosti, že množství náboje generovaného ionizujícím zářením v citlivém objemu je zpracováváno přímo v jednotlivých pixelech. Tato zařízení mají mnoho výhod jako dobré prostorové rozlišení, neomezený dynamický rozsah, energetickou diskriminaci, vysokou vyčítací rychlost, nulový šum a temný proud. Oproti detektorům integrujícím náboj poskytují lepší výsledky v případech, kdy je nižší maximální počet impulzů (přibližně 10^6 impulzů/pixel/s), který je přesto dostatečný pro většinu radiografických aplikací. Samozřejmě ale mají tyto senzory také své nevýhody. Dnes se jedná již pouze o nenulovou mrtvou dobu a vyšší pořizovací cenu. Před pár lety však byla hlavní nevýhodou hybridních pixelových zařízení relativně malá citlivá plocha o velikosti několika centimetrů čtverečných, což zabraňovalo jejich možnému širokému využití. Tato skutečnost byla často řešena metodou skládání, tedy umístěním několika detektorových jednotek vedle sebe. Docházelo však ke vzniku mezer o velikosti až několik milimetrů, které byly necitlivé na záření. [20, 23]

Hybridní pixelový detektor je vlastně složen z matice jednoduchých polovodičových detektorů, v tomto případě pixelů, přičemž každý pixel této matice je připojen k vlastnímu elektronickému řetězci zajišťujícímu zpracování většiny signálu. Z technologického hlediska lze hybridní pixelový detektor vytvořit jako monolitické, nebo hybridní elektronické zařízení. Monolitická varianta je tvořena čipem, kde je na povrchu vytvořena elektronika a část jeho objemu slouží zároveň jako senzor. Hybridní pixelový detektor zobrazený na Obr. 2.6 se skládá ze dvou částí, elektronického vyčítacího čipu a polovodičového senzoru. Obě tyto části jsou obvykle vzájemně propojeny technologií bump-bondingu. Důležitou výhodou hybridního uspořádání je možnost kombinovat vyčítací čip se senzory různých materiálů (Si, GaAs, CdTe atd.), zatímco monolitická zařízení jsou omezena pouze na křemík. [20, 21]



Obr. 2.6: Schéma hybridního pixelového detektoru, který se skládá z polovodičového senzoru propojeného technologií bump-bondingu s elektronickým vyčítacím čipem. Upraveno z: [20]

Výzkumem pixelových detektorů se v Evropské organizaci pro jaderný výzkum (CERN) zabývá Medipix kolaborace, která postupně vyvinula několik typů detektorů rodiny Medipix, a to Medipix 1, Medipix 2, Timepix, Medipix 3 a Medipix 4. Jelikož je pro většinu aplikací nutná kontinuální detekční plocha, byl dále také vyvinut velkoplošný pixelový detektor WidePIX eliminující až milimetrové mezery vznikající při metodě skládání. Mezi takovéto unikátní senzory patří detektory složené z matice Timepix čipů 10 × 10 nebo 4 × 5. [23, 24]

V mé diplomové práci při experimentálních měřeních využívám k detekování RTG záření velkoplošný pixelový detektor WidePIX$_{4x5}$ (Obr. 2.7) registrující jednotlivé fotony s rozlišením 1280 × 1024 pixelů. Detektor je složen z 20 samostatných bezhranných čipů Timepix s rozlišením 256 × 256 pixelů. V tomto případě je u každého takového čipu použit jako polovodičový senzor křemík o tloušťce 500 µm. Jednotlivé pixely o velikosti 55 µm mají integrovaný předzesilovač následovaný dvojicí komparátorů a digitálním čítačem, což zajišťuje získání snímků s velmi vysokým kontrastem a širokým prakticky neomezeným dynamickým rozsahem. [18, 20, 25]

Obr. 2.7: Velkoplošný pixelový detektor WidePIX$_{4×5}$ registrující jednotlivé fotony s rozlišením 1280 × 1024 pixelů složený z 20 bezhranných čipů Timepix s rozlišením 256 × 256 pixelů. [23]

2.4 Vznik RTG obrazu

Vznik RTG obrazu je založen na pronikání fotonů RTG záření vycházejících z rentgenky a na jejich odlišné absorpci jednotlivými strukturami zkoumaného objektu. Část RTG fotonů je v důsledku výše popsaných interakcí, fotoelektrického jevu a Comptonova rozptylu eliminována v závislosti na tloušťce a materiálovém složení objektu, zbylá část prochází skrz objekt a je detekována dnes nejčastěji pomocí elektronických detektorů. Výsledný RTG obraz je poté založen na rozdílu mezi fotony absorbovanými fotoefektem a fotony prošlými na detektor bez interakce. Interakce fotonů Comptonovým rozptylem pouze přispívá ke zhoršení kontrastu obrazu. V důsledku těchto procesů dochází k poklesu intenzity záření, který lze vyjádřit vztahem:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot d}, \tag{2.4}$$

kde I je intenzita prošlého RTG záření, I_0 je počáteční intenzita RTG záření, d je tloušťka absorbujícího materiálu a μ je lineární součinitel zeslabení. *„Lineární součinitel zeslabení je tím vyšší, čím vyšší je hustota a protonové číslo dané látky a tím nižší, čím vyšší je energie záření.“ [8] (str. 120)* [6-8, 15]

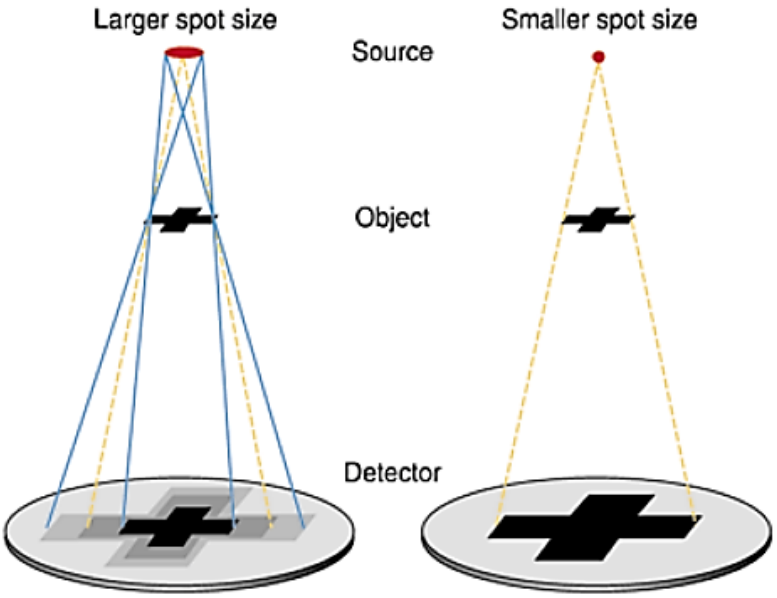
2.5 Kvalita RTG obrazu

Při mé práci zabývající se RTG mikroradiografií a mikrotomografií je významná kvalita výsledného obrazu, aby bylo možné detailně popsat jednotlivé struktury pozorovaných vzorků. K získání takto kvalitního obrazu jsou důležité především parametry jako prostorové rozlišení, kontrast a šum popsané níže.

2.5.1 Prostorové rozlišení

„Prostorové rozlišení je definováno jako nejmenší vzdálenost dvou bodových objektů, při níž se tyto ještě zobrazí jako dvě oddělené struktury.“ [7] (str. 26) Struktury tedy nelze rozlišit, pokud je jejich vzdálenost menší než prostorové rozlišení, zobrazí se poté jako tentýž objekt. Prostorové rozlišení může být popsáno pomocí odezvy na bodový impulz (PSF, z anglického Point Spread Function), která udává rozsah rozmazání bodu v obraze. [7, 14, 15]

Typicky však ovlivňuje prostorové rozlišení velikost ohniska rentgenky. Čím je jeho velikost větší, tím je prostorové rozlišení horší. Pokud je tedy velikost ohniska nenulová, vzniká geometrická neostrost, která se v obraze projeví jako polostín (Obr. 2.8). Prostorové rozlišení dále také závisí na velikosti a plošné hustotě jednotlivých pixelů detektoru. Čím je velikost pixelu menší, tím je prostorové rozlišení lepší a naopak. [7, 15]



Obr. 2.8: Schéma vzniku polostínu. Prostorové rozlišení je omezeno velikostí ohniska rentgenky. Vlevo: zdroj záření s větším ohniskem způsobí vznik polostínu. Vpravo: zdroj záření s bodovým ohniskem bez rozmazání obrazu. [26]

2.5.2 Kontrast

„Kontrast lze definovat jako rozdíl mezi denzitami jednotlivých struktur, který umožňuje jejich rozlišení.“ [27] (str. 44) Základní kontrast je kontrast objektu. V signálu vzniká před dopadem na detektor různými mechanismy přibližně homogenního záření s vyšetřovaným objektem. Mezi tyto mechanismy přispívající ke vzniku kontrastu řadíme tři procesy. Prvním takovým je přímočarý průchod RTG záření zkoumaným objektem na detektor. Druhým je absorbování kvant energie fotonů v důsledku fotoelektrického jevu. A posledním je rozptýlení části záření Comptonovým či Rayleighovým rozptylem. V důsledku rozptýleného záření vznikajícího v objektu však dochází ke snížení kontrastu, jelikož fotony neletí přímo ze zdroje záření na detektor a nelze tak určit, odkud pocházejí. [14, 28]

Kontrast objektu může být taktéž ovlivněn vnitřními a vnějšími faktory. Vnitřní faktory souvisejí se skutečnými anatomickými strukturami, naproti tomu vnější faktory jsou takové, které slouží k optimalizaci protokolu tak, aby byl zvýšen příslušný kontrast objektu. Takovýmto vnějším faktorem je v radiografii např. použití kontrastní látky a změna energie na rentgence. Kromě těchto faktorů má na kontrast vliv také množství šumu. [7, 14, 27]

2.5.3 Šum

Náhodnou veličinou negativně ovlivňující kvalitu RTG obrazu je šum. Šum, který je v RTG obraze přítomen vždy, může mít různé zdroje svého původu. Podle toho, odkud pochází, se poté jedná o šum elektronický, strukturální a kvantový. V další části této kapitoly je však detailněji probrán pouze šum kvantový, ovlivňující obraz získaný pomocí mikroradiografie s pixelovými detektory registrujícími jednotlivé fotony, u kterých je, jak již bylo zmíněno, možné nastavit energetický práh detekce, což potlačuje šum elektronický. Šum strukturální je taktéž potlačen, a to pomocí flat-field korekce. Po správné ekvalizaci pixelové matice tedy detektory pracují v režimu kvantového počítání bez temného proudu, v jehož důsledku by jinak při prodloužení akvizičního času docházelo právě ke zvýšení šumu v obraze. [14, 15, 18]

Kvantový šum je v popsaném případě definován jako:

$$\sigma = \sqrt{N}, \tag{2.5}$$

kde σ je kvantový šum a N je počet detekovaných fotonů v jednom pixelu detektoru, souvisí se statistickým charakterem generace a interakce fotonů. Absolutní velikost šumu je tím vyšší, čím větší je počet absorbovaných fotonů. Ve skutečnosti je však důležitý poměr signálu k šumu. [14, 15]

Veličina poměr signálu k šumu označovaná jako SNR (tj. signal-to-noise ratio) je definována:

$$SNR = \frac{N}{\sqrt{N}}, \tag{2.6}$$

kde N je stejně jako v rovnici (2.5) počet detekovaných fotonů v jednom pixelu. Pokud se zvýší počet detekovaných fotonů N, zvýší se sice i hodnota šumu, ale obraz bude

kvalitnější, jelikož i poměr signálu k šumu bude vyšší. K této veličině se váže tzv. Roseovo kritérium, které charakterizuje vztah mezi signálem objektu a signálem pozadí. Říká nám, že pokud je SNR ≥ 5, je objekt v obraze zaručeně viditelný. [15, 29]

2.6 Výpočetní tomografie

Výpočetní tomografie (CT, z anglického Computed Tomography) byla vyvinuta na přelomu šedesátých a sedmdesátých let 20. století dvěma vědci, Godfrey Newbold Hounsfieldem a Allanem McLeod Cormackem. V roce 1979 jim za tento objev byla udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství. [7, 13]

CT jakožto radiografická vyšetřovací metoda poskytuje 3D zobrazení denzity tkání v organismu. Na rozdíl od klasického RTG zobrazení, které je planární, odstraňuje superpozici tkání a orgánů uložených v různých hloubkách a má daleko vyšší kontrast. Princip spočívá ve využití vlastností RTG záření, především jeho různé absorpce v tkáních s odlišným složením. Intenzitu prošlého RTG záření detekovanou detektorem a převedenou na elektrický signál je možné zapsat ve tvaru:

$$I = I_0 e^{-(\mu_1 \Delta_x + \mu_2 \Delta_x + \mu_3 \Delta_x + \cdots)}, \tag{2.7}$$

kde I_0 je počáteční intenzita svazku RTG záření, Δ_x je délka průsečíku paprsku a voxelu a μ je lineární součinitel zeslabení. [7, 19, 28]

K vytvoření tomografického obrazu je uskutečněno z různých úhlů mnoho projekcí, a to buď v axiálním, nebo spirálním módu. Axiální (též sekvenční) mód je založen na postupném nabírání jednotlivých projekcí vzorku fixovaného v jedné rovině. Oproti tomu při spirálním (též helikálním) módu dochází, jak už název napovídá, ke spirálovému náběru dat při posuvu a rotaci vzorku. Následně jsou z jednotlivých projekcí vytvořeny sinogramy, což jsou dvourozměrné (2D) profily zeslabení v závislosti na úhlu projekce. Na základě takovýchto sinogramů je poté pomocí matematických algoritmů, jako je častěji filtrovaná zpětná projekce či iterativní rekonstrukce, zrekonstruována sada CT řezů požadované oblasti. [7, 15]

3 Současný stav

V této části mé diplomové práce budou rozebrány jednotlivé metody pro sledování embryonálního vývoje. Následně bude podrobněji popsána metoda mikro-CT, jež je určena pro sledování embryonálního vývoje a kterou v mé diplomové práci používám k experimentálním měřením. Na závěr této části práce budou uvedeny dostupné kontrastní látky využívané ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření v měkkých tkáních embryonálních vzorků laboratorní myši.

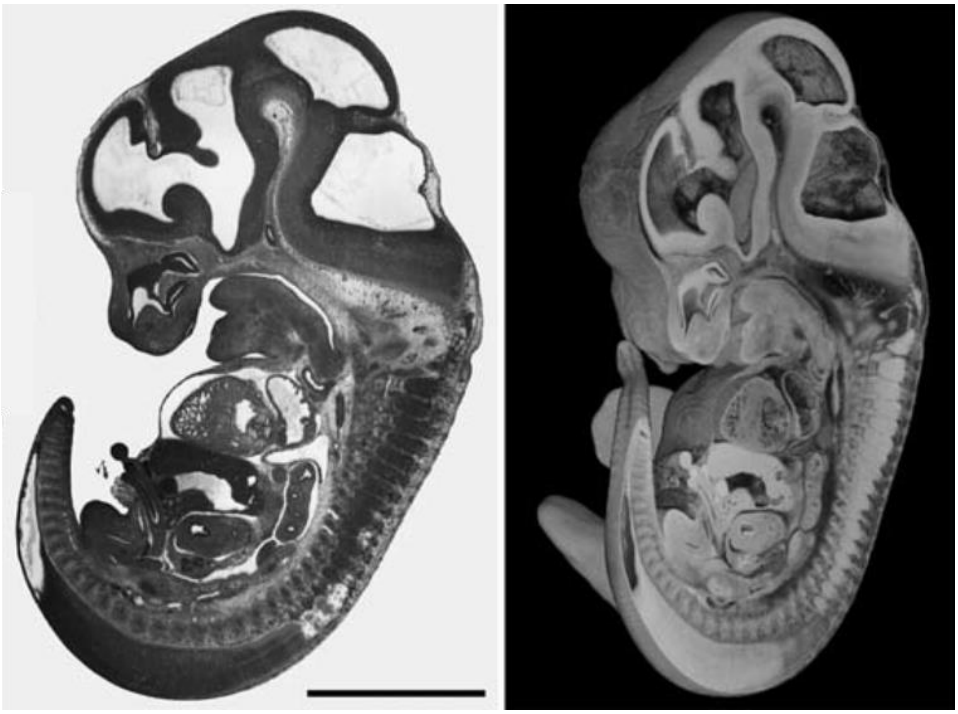
3.1 Metody pro sledování embryonálního vývoje

Metody pro 3D vizualizaci zvířecích vzorků se rozdělují do dvou kategorií: ty, které jsou založeny na rekonstrukci ze série snímků, a ty založené na celoobjemovém zobrazování. [30] První skupina metod je založena na klasické histologické technice, která je však časově náročná, komplikovaná a destruktivní. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu je to, že vzorek musí být rozřezán do série 2D řezů. Typicky je vzorek před řezáním a následným barvením stabilizován a zalit do pryskyřice. Každý takto připravený řez připevněný na podložním sklíčku je poté mikroskopicky pozorován, obrazy jsou digitalizovány a uloženy. Z těchto obrazů je následně zpětně zrekonstruován 3D objekt. [1, 31] Prostorové rozlišení získaného souboru dat je však vysoce anizotropní, protože tloušťka řezů je mnohem větší než prostorové rozlišení v rámci jediného řezu. [1] Tento proces je také velmi náchylný k různým artefaktům a je velmi obtížný pro pozdní stádia vzorků z důvodu rostoucího počtu zpracovávaných řezů. [31] Celoobjemové zobrazovací metody jako episkopická mikroskopie s vysokým rozlišením (HREM), optická projekční tomografie (OPT), mikro-magnetická rezonance (mikro-MR) a radiografické metody vhodné ke sledování embryonálního vývoje jsou podrobněji popsány v následujících podkapitolách. [30]

3.1.1 Episkopická mikroskopie s vysokým rozlišením (HREM)

HREM (z anglického high-resolution episcopic microscopy) je technika používaná k zisku objemových dat a vytváření 3D obrazů histologicky připravených vzorků. Zobrazovaná data se obecně podobají digitalizovaným verzím histologických snímků a vykazují pozoruhodné detaily (Obr. 3.1). Hranice buněk a tkání jsou jasně definovány

a při vhodném zvětšení je také možné pozorovat buněčná jádra. Tato technika je založena na reverzním způsobu vizualizace, kde je stabilizační médium vysoce fluorescenční za použití barviva, kterým je nejčastěji eosin. Vizualizace tkáně je poté výsledkem potlačení tohoto signálu všude, kde je na povrchu bloku přítomna tkáň. Jelikož neprůhlednost vzorku nemá žádný vliv na kvalitu obrazu, je možné zobrazovat široké spektrum různých velikostí vzorku. [4] HREM má tedy mnoho společného s konvenční histologií, ale s využitím odlišného skenovacího přístupu lze dosáhnout izotropního prostorového rozlišení 0,25 μm. Pro většinu aplikací se však ukázalo postačující rozlišení 0,5 μm. [1, 32] Namísto zobrazování jednotlivých řezů vzorků jsou tedy vytvářeny obrazy plochy celého bloku před odstraněním následujícího řezu o tloušťce 2–3 μm. [32] Tímto způsobem je zachováno zarovnání obrazu a výsledný obrazový soubor je jednoduše převeden na digitální 3D soubor objemových dat pro vizualizaci pomocí vhodných softwarových nástrojů. Tyto řezy mohou být poté zachovány a použity pro standardní histologickou analýzu. Významnou nevýhodou této metody je však její destruktivnost, jelikož dochází ke zničení celého vzorku, a časová náročnost přípravy vzorků. [4]



Obr. 3.1: Myší embryo zobrazené pomocí HREM. Tloušťka řezu v transverzální rovině 3 μm. Vlevo: výsledný soubor dat obsahující 2 574 transverzálních obrazů byl použit pro získání sagitálních a koronárních řezů. Vpravo: 3D rekonstrukce datového souboru. Měřítko 2 mm. Upraveno z: [4]

3.1.2 Optická projekční tomografie (OPT)

OPT je zobrazovací metoda, která snímá zpětně rozptýlenou fluorescenci z průhledného vzorku, který se otáčí kolem centrální osy. Snímky jsou rekonstruovány do 3D objemu a rozptyl světla je opticky dostatečně minimalizován. Vzorky o tloušťce přibližně do 15 mm lze získat s relativně vysokým prostorovým rozlišením 5–15 μm. Myší embrya mohou být zobrazena s použitím buď autofluorescence, nebo specifických fluorescenčních značek s poměrně rychlou akvizicí. Značnou nevýhodou této metody je však snížení prostorového rozlišení u větších vzorků. [33, 34] Podstatnou překážkou v popularizaci OPT byl také nedostatek komerčně dostupných systémů, na základě čehož byl vybudován relativně levný systém, který dokáže získat kompletní 3D datový soubor za 10 min při izotropním rozlišení 6,7 μm (Obr. 3.2). [35]

Obr. 3.2: Autofluorescenční snímek myšího embrya získaný s OPT systémem s prostorovým rozlišením 6,7 μm. Měřítko 2 mm. Upraveno z: [35]

3.1.3 Mikro-magnetická rezonance (mikro-MR)

Mikro-MR je zobrazovací metoda, která dokáže výborně rozlišit měkké tkáně, a to i v opticky neprůhledných vzorcích, jelikož zobrazení závisí na relaxačních vlastnostech excitovaných vodíkových jader ve vodě a lipidech. [36] Během experimentu

jsou výsledná 3D data (Obr. 3.3) nabírána přímo z neporušeného vzorku s izotropním prostorovým rozlišením, což umožňuje použití stejného vzorku k jiným výzkumným postupům. Při této metodě je výzvou získat dostatečné prostorové rozlišení s dostatečným kontrastem pro identifikaci anatomických znaků v embryu. V praxi je prostorové rozlišení omezeno nízkou intenzitou signálu magnetické rezonance (MR). S použitím silného magnetického pole, elektroniky optimalizované pro malé vzorky a řady zobrazovacích protokolů již bylo dosaženo téměř buněčného rozlišení. U vzorků embryí bylo dle jejich velikosti typicky dosahováno prostorového rozlišení 20–80 μm. Velkou výhodou mikro-MR je absence speciální přípravy vzorků v podobě kontrastování. Veškerý kontrast v obraze je způsoben fyzikálními vlastnostmi tkání, které modulují MR signál. Ten samý vzorek je však možné také zobrazit po aplikování kontrastní látky, která by měla kontrast v obraze ještě zvýšit. Je tedy možné získat dvě různé 3D vizualizace téhož vzorku. [31] Naopak nevýhodou této metody jsou poměrně vysoké náklady na zobrazovací zařízení. [30]

Obr. 3.3: T1 vážený obraz nekontrastovaného embrya myši získaný pomocí mikro-MR. Měřítko 2 mm. Upraveno z: [37]

3.1.4 Radiografické metody

Díky rychlému vývoji technologií v oblasti RTG zobrazování lze získat informace o vnitřních strukturách vzorků s vysokým prostorovým rozlišením i pomocí radiografických metod, u embryonálních vzorků typicky pomocí RTG mikro-CT. Prostorové rozlišení RTG mikro-CT systémů se pohybuje v případě zdrojů synchrotronového záření v desítkách nanometrů a v případě laboratorních přístrojů v rámci mikrometrů. U biologických vzorků je také velkou výhodou této metody nedestruktivnost, vzorek zůstává neporušený, což umožňuje jeho opětovné snímání i za jiných podmínek, a není tedy ani vyloučena následná histologická analýza. Touto modalitou je produkován virtuální 3D model pozorovaného vzorku (Obr. 3.4) s izotropním prostorovým rozlišením. Velkou výhodou je tedy vykreslení jakéhokoliv řezu napříč celým zrekonstruovaným objemem. [1] Na rozdíl od HREM a OPT lze laboratorní mikro-CT systémy zakoupit u několika výrobců. [33]

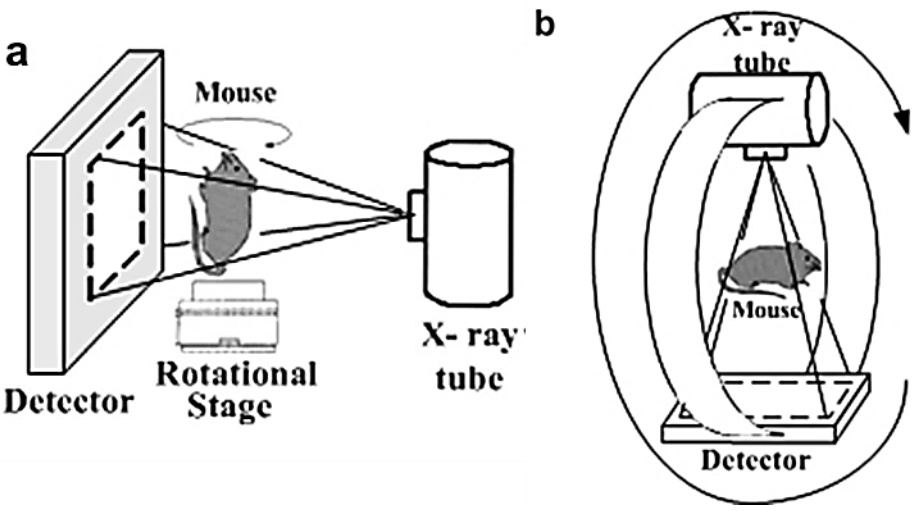
Navzdory poskytovanému vysokému prostorovému rozlišení zůstává náročným úkolem vizualizace měkkých tkání vzhledem k velmi nízkému kontrastu mezi zkoumanými strukturami. V důsledku této skutečnosti je pro zobrazování měkkých tkání RTG paprsky obvykle nutné použití kontrastní látky. Postupy kontrastování jsou však často poměrně komplikované a musí být pečlivě testovány pro každý nový typ vzorku, většinou jsou časově náročné (až několik dní) a nevratné, což zabraňuje použití vzorku pro jiné výzkumné metody. [1]

Jelikož v mé diplomové práci k experimentálním měřením používám mikro-CT systém, je tato metoda detailněji popsána v následující kapitole 3.2.

Obr. 3.4: Embryo laboratorní myši stabilizované 4% paraformaldehydem (přes noc), kontrastované 0,1% roztokem jodu – 2:1, jodid draselný:elementární jod ve vodě – (přes noc) a mechanicky fixované agarózovým gelem zobrazené pomocí mikro-CT systému. Rozlišení 11 μm. Měřítko 2 mm. Upraveno z: [33]

3.2 Rentgenová mikrotomografie

Mikro-CT fungující na stejném principu jako CT je, jak již bylo uvedeno v podkapitole 3.1.4, radiografická zobrazovací metoda vytvářející 3D obraz. Mikro-CT, skládající se z rentgenky, detektoru a polohovacího systému k umístění pozorovaného objektu, může mít dvě varianty skenovací geometrie (Obr. 3.5). První variantou je systém rentgenka–detektor rotující kolem zkoumaného vzorku podobně jako v klinické praxi. Toto uspořádání však obecně zabírá více místa a jeho mechanika je komplikovanější než v případě druhé skenovací geometrie. Právě tato druhá skenovací geometrie, kdy rotuje sám vzorek kolem své vlastní osy a systém rentgenka–detektor zůstává v klidu, se používá při zobrazování malých objektů spíše. Při této metodě skenování musí být vzorek dobře upevněn, aby nedocházelo k jeho posuvům, které by mohly způsobovat pohybové artefakty v zrekonstruovaném CT obrazu. [38, 39]



Obr. 3.5: Dvě varianty skenovací geometrie. (a) Rotující vzorek umístěný mezi statickou rentgenkou a detektorem. (b) Rotující systém rentgenka–detektor kolem statického vzorku. [38]

Odlišností mikro-CT oproti klinickému CT je také rentgenka, která má obvykle mnohem menší ohnisko, respektive místo, kde RTG paprsky interagují s anodou, což snižuje rozmazání a tím výrazně zlepšuje maximální prostorové rozlišení nezbytné pro zobrazování malých objektů. Odlišné bývají ale také detektory. Využívají se buď pixelové, nebo flat panely s ostrou prostorovou odezvou, u kterých je na úkor nižší účinnosti detekce volen tenký scintilátor zajišťující vyšší prostorové rozlišení. [39]

V posledních letech experimentální vývoj prokázal užitečnost laboratorních mikro-CT systémů pro zkoumání objektů ze širokého spektra vědeckých oblastí. Díky tomu je dnes již možné zakoupit komerční verze mikro-CT renomovaných výrobců (Bruker, Yxlon…) s vysokým prostorovým rozlišením (až 1–3 μm). Tyto systémy vynikající zejména svou jednoduchostí obsluhy je tak možné již nalézt nejen ve specializovaných typicky fyzikálních laboratořích. [33] Mikro-CT systém používaný v mé diplomové práci je podrobněji popsán v kapitole 5.3.

3.3 Kontrastní látky

RTG mikroradiografie a mikro-CT jsou běžně používané metody pro zobrazování kostní tkáně zvířecích vzorků v experimentech, avšak zobrazování měkkých tkání je značně omezeno nízkým RTG kontrastem. Veškerý kontrast u měkkých tkání je způsoben rozdíly v jejich hustotě a složení. Ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření se využívají kontrastní látky s vysokým Z, dnes již rutinně používané v klinické radiografii.

Jelikož jednotlivé typy kontrastních látek používaných u zvířecích vzorků mají různou afinitu k určitému typu tkáně, je v biomedicínských aplikacích nutné podrobit každý nový typ vzorku testování s různými stabilizačními a kontrastními činidly, aby bylo dosaženo požadovaných výsledků. U většiny biologických experimentů se tedy před procesem kontrastování provádí stabilizace např. ethanolem, paraformaldehydem nebo glutaraldehydem zabraňující rozkladu tkání zastavením biologických procesů. Právě takto připravené vzorky stabilizované pomocí alkoholu vykazují o něco vyšší kontrast než vzorky nestabilizované, a to pravděpodobně kvůli dehydratačnímu účinku alkoholu na proteiny způsobující kondenzaci. [30, 40, 41]

Existuje velké množství experimentálně testovaných kontrastních látek (oxid osmičelý, jodové kontrastní látky, kyselina fosfowolframová /PTA/, kyselina fosfomolybdenová /PMA/ či kontrastní látky tvořené nanočásticemi) s odlišnou selektivitou k jednotlivým tkáním, nejběžnější z nich budou podrobněji popsány v následujících podkapitolách. [30, 39, 40]

3.3.1 Oxid osmičelý

Hojně používanou kontrastní látkou pro zobrazování měkkých tkání a embryí byl v dřívějších dobách oxid osmičelý, respektive 1–2% roztok oxidu osmičelého ve fosfátovém pufru. Tato látka se váže na buněčné membrány a jiné struktury bohaté na lipidy včetně nervů. Jeho penetrace je však velmi pomalá a není vhodné ho kombinovat se stabilizací vzorků alkoholem. Ke stabilizaci je vhodnější použít roztok 4% formaldehydu a 1% glutaraldehydu ve fosfátovém pufru využívající rychlejší pronikání formaldehydu a výborný stabilizační účinek glutaraldehydu. I přes dosahovaný uspokojivý kontrast (Obr. 3.6) se dnes již kvůli jeho toxicitě, těkavosti a nákladům na koupi a likvidaci nevyužívá. [30, 40]

3.3.2 Jodové kontrastní látky

Jedněmi z nejvíce používaných kontrastních látek v RTG mikroradiografii a mikro-CT jsou jodové kontrastní látky. Jejich velkou výhodou je nejen jednoduchost přípravy a použití. Anorganický jod v alkoholovém nebo vodném roztoku rychle proniká do stabilizovaných tkání a je schopen barvit většinu malých vzorků během několika hodin. Výhodou je také rozdílná selektivita k jednotlivým tkáním způsobující vynikající kontrast. Jod se obecně hromadí ve svalových vláknech přednostně před okolními

pojivovými tkáněmi. Jedním z vysvětlení pro jeho zadržení je to, že se sloučenina zachytí v komplexní struktuře glykogenu nalezené ve svalových buňkách. U embryí vykazují tyto kontrastní látky zvýšený záchyt v nervové tkáni, epitelu, ektodermu a mezenchymu. [30, 40, 41]

Nevýhodou jodových kontrastních látek je hypertonická povaha jodu podporující dehydrataci tkání. Tato dehydratace způsobuje určitou deformaci, zejména u tkání s vyšším obsahem vody jako je např. mozek. Na základě velikosti vzorku je tedy nutné zajistit vhodnou koncentraci jodu a dobu kontrastování tak, aby byl zajištěn požadovaný kontrast a aby se minimalizovalo smrštění a deformace tkání. Navzdory optimalizaci se zdá určitý stupeň smrštění tkání nevyhnutelný. Také se ukázalo, že kontrast se po určité době kontrastování vzorků již nezlepšuje, naopak může docházet k ukládání jodu v okrajových částech, které jsou dobře přístupné (u embryí typicky v končetinách). [3, 37, 41]

Existuje několik variant kontrastních látek s jodem jakožto kontrastním činidlem (Z = 53). První takovou je roztok elementárního jodu a jodidu draselného ve vodě označovaný jako Lugolův roztok. U myších embryí je dobrého kontrastu dosahováno v kombinaci s 4% paraformaldehydem (Obr. 3.6). Další variantou je 1% jod ve 100% etanolu (I2E) či metanolu (I2M), kdy tkáně byly stabilizovány alkoholem. Možné je také využít roztok elementárního jodu a jodidu draselného v etanolu (tzv. jodovou tinkturu či IKI). [3, 30, 40]

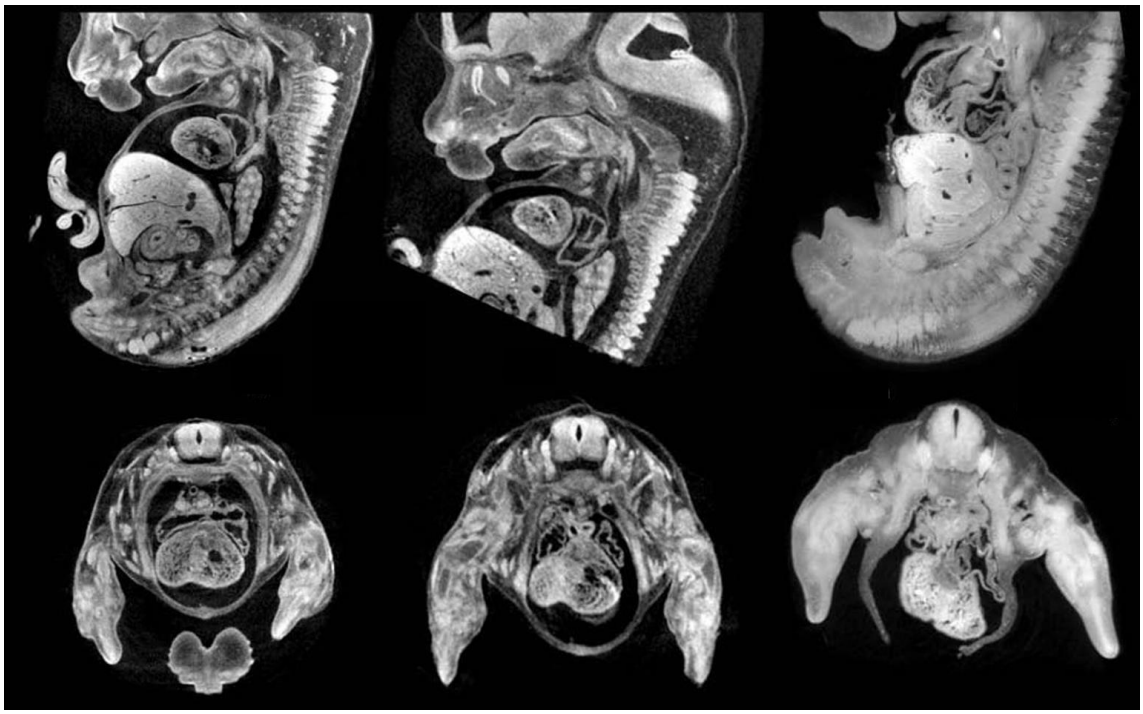
Experimentálně byla také testována varianta, při které nebyla laboratorní myš do kontrastní látky ponořena, ale kontrastní látka Iohexol naředěná 1:1 vodou byla aplikována injekčně do ocasní žíly myši či přímo do srdce nebo gastrointestinální sondou do trávicího traktu. Iohexol je neiontová kontrastní látka běžně využívaná při RTG a CT vyšetřeních v medicínské praxi. Ke zviditelnění dýchacího systému byla do plic a bronchiálního stromu aplikována suspenze síranu barnatého. Tato metoda by však vzhledem ke křehkosti embryonálních vzorků byla velmi těžko reprodukovatelná. [42, 43]

3.3.3 Kyselina fosfowolframová (PTA)

Vodný roztok PTA (z anglického názvu phosphotungstic acid) s koncentrací 1 % patří vedle výše uvedených jodových kontrastních látek mezi dosud nejvíce používané.

Chemický vzorec PTA je $H_3PW_{12}O_{40}$. Kontrastním činidlem je zde wolfram s vysokým Z = 74. Sloučenina se silně váže ke svalům a k různým proteinům, jako je např. kolagen a fibrin tvořící pojivové tkáně. U embryí vykazuje PTA stejně jako jod zvýšený záchyt v nervové tkáni, epitelu, ektodermu a mezenchymu. Dobře rozeznatelné jsou také orgány jako játra, plíce a srdce. Jelikož se jedná o větší molekulu, pomaleji proniká do tkání, ale pokud má tato kontrastní látka dostatek času, poskytuje vynikající kontrast. U vzorků o tloušťce 2–3 mm je nutné kontrastování přibližně 12 h, u větších vzorků je čas ještě delší. Na rozdíl od oxidu osmičelého je PTA mnohem méně toxická a je možné ji využít i u preparátů stabilizovaných pomocí alkoholu. U myších embryí bylo dosahováno dobrého kontrastu při stabilizaci paraformaldehydem (Obr. 3.6), který je však pro člověka karcinogenní. [30, 40, 41, 44]

Obdobnou formou této kontrastní látky je roztok PTA v etanolu označovaný jako EPTA. U kontrastní látky EPTA je důležitá dehydratace alkoholovou řadou, aby nedocházelo k praskání tkání. Vzorek je postupně přemisťován z 30% do 50% a 70% etanolu, přičemž v každém roztoku je ponořen několik hodin. Po provedené dehydrataci je možné embryo laboratorní myši přemístit do kontrastního činidla. Kontrastování probíhá podle velikosti vzorku po dobu jednoho až čtyř dnů (Obr. 3.7). [44]

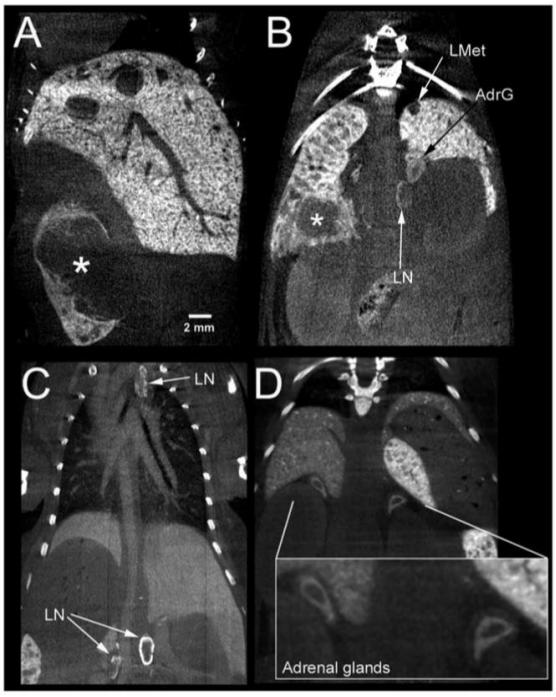


Obr. 3.6: Embryo laboratorní myši. Vlevo: stabilizované 4% paraformaldehydem a kontrastované pomocí roztoku 1% elementárního jodu a 2% jodidu draselného ve vodě. Uprostřed: stabilizované 4% paraformaldehydem a kontrastované kyselinou fosfowolframovou (PTA). Vpravo: stabilizované roztokem 4% formaldehydu a 1% glutaraldehydu ve fosfátovém pufru, kontrastované 1–2% roztokem oxidu osmičelého ve fosfátovém pufru a mechanicky fixované pryskyřicí. Upraveno z: [30]

Obr. 3.7: Embryo myši stabilizované alkoholovou řadou pomocí etanolu (30%–50%–70%), v každém roztoku několik hodin, a kontrastované pomocí roztoku kyseliny fosfowolframové v etanolu (EPTA) po dobu čtyř dní. [44]

3.3.4 Kontrastní látky tvořené nanočásticemi

Ke zvýšení kontrastu měkkých tkání se také využívají kontrastní látky tvořené nanočásticemi. Pro mikro-CT zobrazení bylo použito velké množství různých druhů nanočástic – nejčastěji kovů jako zlata, stříbra, barya, bismutu, tantalu, gadolinia, ytterbia a thoria, ale i jiných prvků jako jodu. Tyto kontrastní látky se však aplikují intravenózně do ocasní žíly myši. Použití u embryonálních vzorků by tedy bylo velmi obtížné. U dospělých jedinců byla také testována kontrastní látka obsahující nanočástice na bázi kovů alkalických zemin vázajících se především na buňky retikuloendotelového systému. Dojde tak k zobrazení jater a jejich metastáz, sleziny, břišních a mediastinálních lymfatických uzlin, ale i nadledvinek a cévních struktur (Obr. 3.8). Velkou výhodou je opětovné skenování pomocí mikro-CT systému bez aplikování další dávky kontrastní látky vzhledem k až šestiměsíčnímu eliminačnímu času. V posledních letech se experimenty zaměřují především na použití nanočástic zlata k zobrazení cévních struktur, srdce, oblasti břicha a nádorů, a to zejména kvůli vysokému Z = 79, extrémní inertnosti a snadné modifikaci pomocí povrchově vázaných molekul, které zajištují biokompatibilitu. [39, 45]



Obr. 3.8: Laboratorní myš, které byla intravenózně aplikována kontrastní látka obsahující nanočástice na bázi kovů alkalických zemin. A a B získané 4 h po aplikaci kontrastní látky ukazují intrasplenické (*) a intrahepatické (LMet) nádory. B, C a D ukazují zesílený kontrast břišních a mediastinálních lymfatických uzlin (LN) a nadledvinek (Adrenal glands = AdrG). C získán 4 h a D 22 dní po aplikaci kontrastní látky. [45]

4 Cíle práce

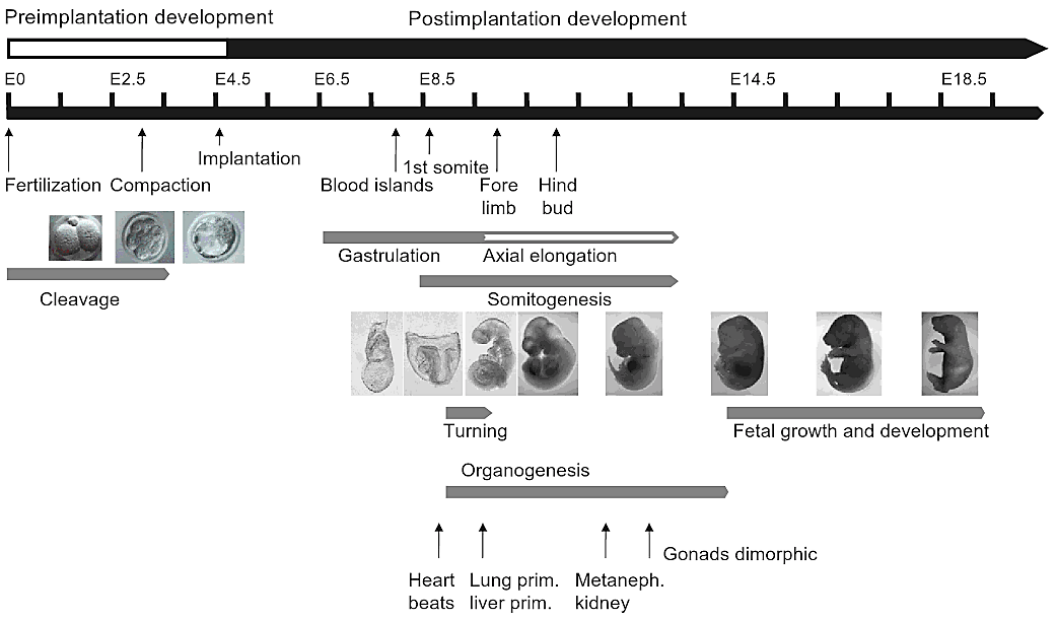
Cílem mé diplomové práce je pomocí mikro-CT systému vybudovaného v Ústavu technické a experimentální fyziky (ÚTEF) Českého vysokého učení technického (ČVUT) v Praze experimentálním měřením vzorků laboratorní myši s různými variantami přípravy a vyhodnocováním naměřených dat prokázat, že metodu RTG mikro-CT lze využít pro monitorování embryonálního vývoje savců. K dosažení tohoto cíle je nutné stanovit vhodný protokol k přípravě těchto vzorků tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího kontrastu u měkkých tkání za využití přípravných procesů stabilizace, kontrastování a také mechanické fixace. Na základě stanoveného protokolu je poté také nutné zhotovit radiografická a tomografická měření P i E stádií laboratorní myši, interpretovat výsledky a uskutečnit 3D vizualizace.

5 Metody

Praktickou část mé diplomové práce jsem prováděla v ÚTEF ČVUT v Praze. Poté, co jsem se seznámila se zobrazovacím systémem a rekonstrukčními postupy naměřených dat, jsem provedla mikroradiografická a mikro-CT měření jednotlivých vzorků, jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole 6. Vzorky připravené dle postupů popsaných v následujících částech práce byly poskytnuty ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou RNDr. Janou Bulantovou, Ph.D. a s 3. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy MUDr. Janou Mrzílkovou, Ph.D. Se zvířaty bylo nakládáno v souladu s pokyny definovanými Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v rozhodnutích č. 246/1992 a č. 419/2012. Laboratorní myši BALB/c byly pro účely této studie usmrceny předávkováním etherem.

5.1 Vzorky

Vzhledem k vysoké homologii mezi lidským a myším genomem se k monitorování embryonálního vývoje savců běžně využívají laboratorní myši. Ve výzkumných experimentech jsou používána embryonální stádia laboratorních myší s označením E (přibližně prvních 19 dní) a postnatální stádia s označením P. Standardní časový úsek pro embryogenetickou studii u myší je od embryonální fáze E8,5 po postnatální fázi P3 (Obr. 5.1). Popis vývoje jednotlivých orgánových soustav lze nalézt např. v [46, 47].



Obr. 5.1: Přehled vývoje laboratorní myši. Jednotlivé fáze jsou uvedeny nad časovou osou, zásadní události a procesy jsou uvedeny pod časovou osou. [46]

Nejlépe dostupné P1 stádium laboratorní myši (Obr. 5.2) jsem v mém experimentu využívala jako referenční vzorek. Jednotlivé vzorky byly stabilizovány, kontrastovány a mechanicky fixovány různým způsobem, aby byl nalezen vhodný protokol vedoucí k dosažení co nejlepšího kontrastu u měkkých tkání. S použitím vybraného protokolu jsem k sestavení série různých vývojových stádií následně použila stádium E14, E18 a P1. Podrobný popis přípravy všech vzorků je uveden v následujících částech práce.

Obr. 5.2: Referenční P1 stádium laboratorní myši stabilizované alkoholovou řadou a kontrastované pomocí IKI.

5.2 Stabilizace, kontrastování a fixace vzorků

Příprava jednotlivých stádií laboratorních myší zahrnovala několik procesů předcházejících samotnému měření. U každého vzorku byly postupně voleny různé způsoby: stabilizace, kontrastování či mechanická fixace vedoucí k vhodnému protokolu. Jelikož RTG laboratoř pod ÚTEF ČVUT v Praze, ve které byly prováděny experimenty, je v principu fyzikální pracoviště, byly vybírány co nejjednodušší postupy přípravy vzorků s využitím netoxických látek.

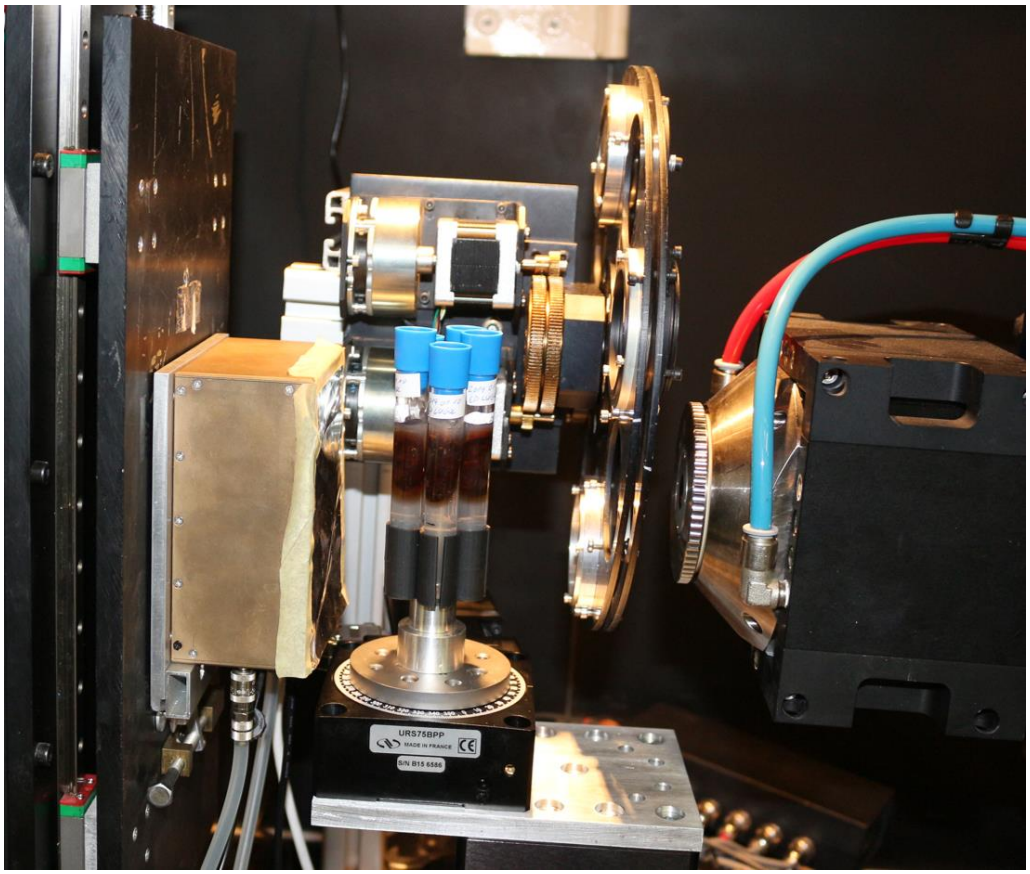
Ke stabilizaci vzorků různých stádií laboratorní myši byla použita vzestupná alkoholová řada skládající se z 50%, 75% a 96%, nebo 25%, 50% a 96%, či 30%, 50%, 70% a 96% roztoku etanolu. V každém činidle byly vzorky ponořeny dvanáct hodin, jeden či dva dny, výjimečně až devatenáct dní.

Ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření v měkkých tkáních bylo provedeno kontrastování. Jako kontrastní látky byly zvolené látky s jodem jakožto kontrastním činidlem. První část experimentů byla prováděna s roztokem elementárního jodu a jodidu draselného v etanolu (IKI) v různých koncentracích (5%, 10%, 20% a 40%). V druhé části byl použit Lugolův roztok, tedy roztok elementárního jodu a jodidu draselného ve vodě. Doby ponoření vzorku v kontrastní látce se pohybovaly od 2 do 11 dní.

Poslední částí přípravy vzorků byla u některých experimentů mechanická fixace, zabraňující vzniku pohybových artefaktů. Jednotlivá stádia laboratorní myši byla před měřením zalita do potravinářské želatiny (Obr. 5.3). Po ustanovení vybraného protokolu byl k mechanické fixaci stádií laboratorní myši E14, E18 a P1 použit agarózový gel, jakožto naprosto čisté médium bez příměsí.

Později byl mezi krok kontrastování a mechanické fixace zařazen další krok, kdy vzorky byly po vyjmutí z kontrastní látky opláchnuty v 96% etanolu, po oschnutí postříkány bezbarvým lakem a po jeho zaschnutí před zalitím do potravinářské želatiny či agarózového gelu omyty v destilované vodě. Opláchnutí 96% etanolem sloužilo k odstranění přebytečné kontrastní látky z povrchu vzorku, postříkání bezbarvým lakem zabraňovalo difundování kontrastní látky ze vzorku do okolního prostředí a omytí v destilované vodě napomáhalo přilnutí potravinářské želatiny či agarózového gelu.

Detailně popsané přípravy jednotlivých vzorků jsou uvedeny u každého měření v kapitole 6 Výsledky a shrnuje je také Příloha A: Tabulka přípravy vzorků.



Obr. 5.3: Čtyři vzorky P1 stádia laboratorní myši stabilizované vzestupnou alkoholovou řadou, kontrastované pomocí IKI či Lugolova roztoku, mechanicky fixované potravinářskou želatinou, umístěné v plastových zkumavkách a speciálním držákem upevněné k rotačnímu stolku. Měřeno pomocí mikro-CT systému vybudovaného v ÚTEF ČVUT v Praze.

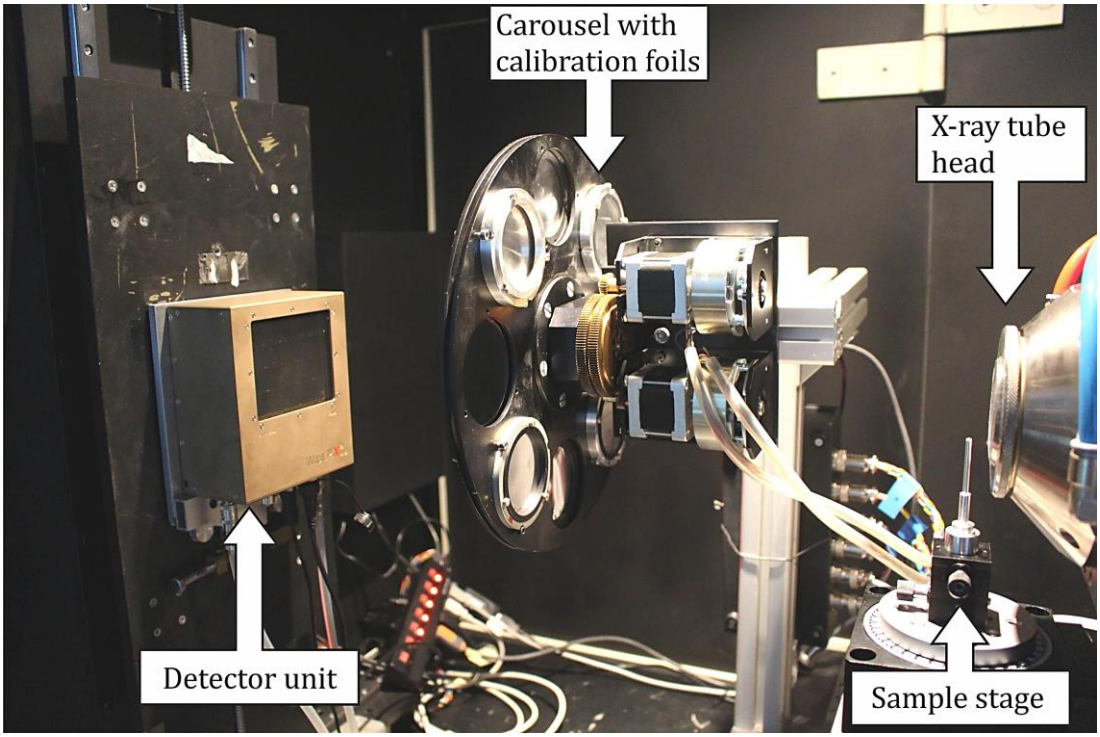
5.3 Mikro-CT

K monitorování embryonálního vývoje laboratorních myší využívám mikro-CT systém vybudovaný v ÚTEF ČVUT v Praze (Obr. 5.4). Celý systém umístěný v boxu zajišťujícím stínění se skládá z detektoru, rentgenky, polohovacího systému a revolveru filtrů. K jednotlivým měřením byla využita rentgenka typu nano–fokus (FeinFocus FXE–160.51) s wolframovým terčem a velkoplošný pixelový detektor WidePIX$_{4x5}$ registrující jednotlivé fotony. Další součástí je polohovací systém vybavený přesnými krokovými motory s rotačním stolkem (Newport URS75BPP), který slouží k umístění zkoumaného vzorku a k jeho otáčení o s daným úhlovým krokem a polohování ve směru os x (doprava a doleva), y (dopředu a dozadu) a z (nahoru a dolů). [18, 20]

Důležitou součástí použitého mikro-CT je také revolver skládající se ze dvou disků, přičemž každý disk obsahuje hliníkové filtry různých tlouštěk (0, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 600, 1 000, 2 000, 4 000, 6 000, 10 000 μm). Sada filtrů slouží k nabrání dat

potřebných pro provedení berm–hardening korekce, a tedy ke zlepšení kvality obrazu. [48]

Části měřícího systému (detektor, polohovací systém a revolver s filtry) jsou řízeny prostřednictvím počítače pomocí softwaru Pixet vytvořeného v ÚTEF ČVUT v Praze. Software Pixet slouží k nastavování parametrů detektoru, řízení akvizic a řízení krokových motorů v polohovacím systému. Jednotlivé funkce poskytované tímto softwarem jsou volány pomocí skriptů v programovacím jazyku Python. [49]



Obr. 5.4: Mikro-CT systém skládající se z detektoru (WidePIX$_{4\times5}$), rentgenky typu nano–fokus (FeinFocus FXE–160.51), polohovacího systému s rotačním stolkem (Newport URS75BPP) a revolveru se sadou hliníkových filtrů. [18]

5.4 Průběh měření

Před samotným měřením vzorků je kvůli následné rekonstrukci naměřených dat nutné nastavit parametry zobrazovacího systému (kolmost detektoru a osu systému rentgenka–polohovací systém–detektor). Pro nastavení kolmosti detektoru se používá kovový hrot upevněný k rotačnímu stolku. Posuvem hrotu na pravou či levou stranu detektoru nebo otočením hrotu o 180° zjistíme, zda detektor není nakloněn. Pokud by tomu tak bylo, byl by hrot na jedné straně detektoru zobrazen níže a na druhé výše. Správné nastavení do roviny doladíme šroubem u detektoru. Druhým parametrem, který

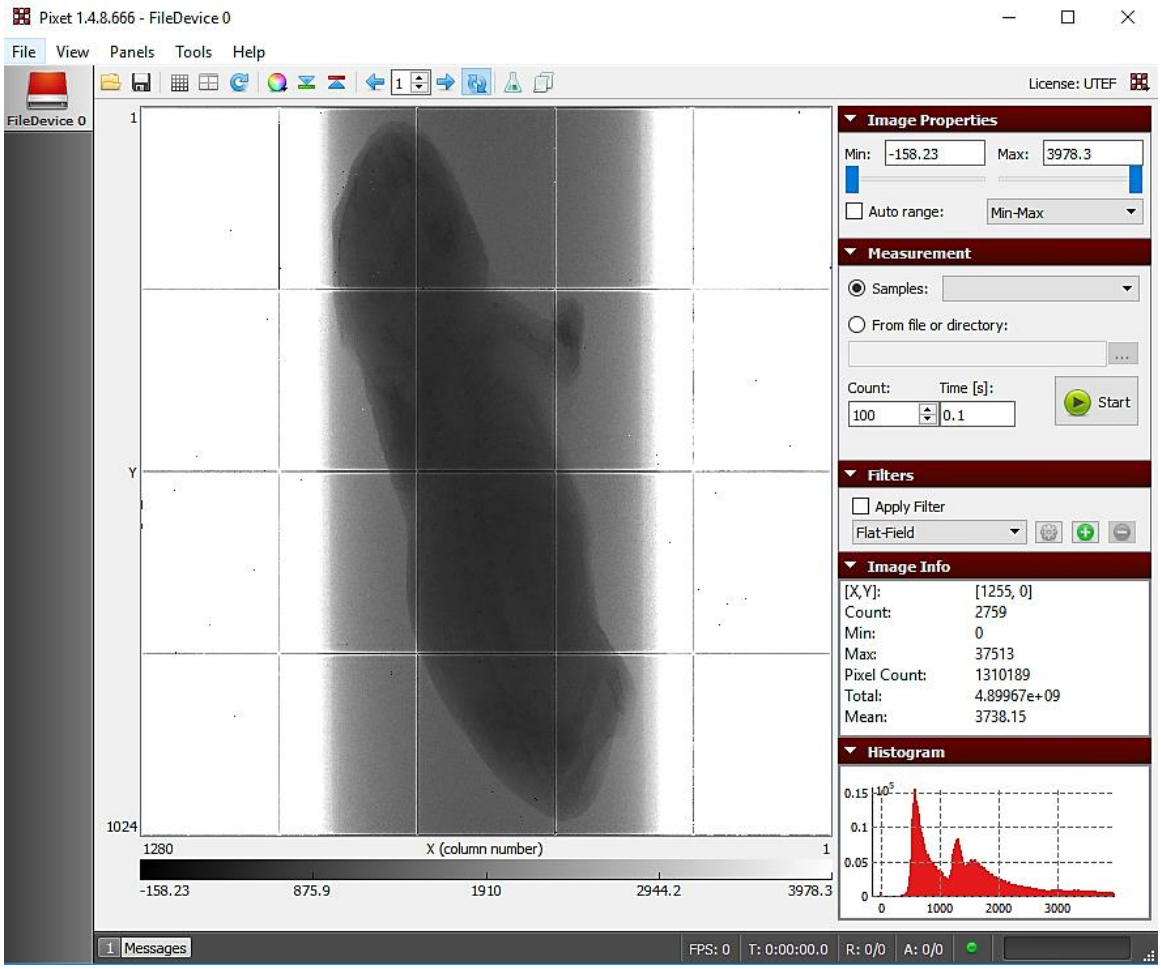
je nutné nastavit před začátkem měření, je osa systému rentgenka–polohovací systém–detektor, vše musí být v jedné rovině. K samotnému nastavení se používá kovová kulička upevněná taktéž k rotačnímu stolku. Nastavení osy systému lze určit pomocí polohy osy kuželu vyzařovaného rentgenkou, a to z poloh těžiště kuličky její projekcí ve dvou odlišných vzdálenostech od detektoru. Tato osa je umisťována do středu detektoru, neboť se jedná o základní předpoklad využívaný rekonstrukčními algoritmy. V případě umístění osy svazku na jiné místo detektoru je nutné tuto pozici znát a použít ji jako jeden z parametrů rekonstrukce.

Po základním nastavení detekčního systému je nutné nabrání filtrů pro beam–hardening korekci, pomocí kterých je naměřena odezva jednotlivých pixelů detektoru na RTG záření procházejícího danými tloušťkami. Tloušťky hliníkových filtrů se volí tak, aby byl celý rozsah útlumu ve vzorku rovnoměrně pokrytý. [50, 51] Jejich naměření se provádí pomocí příslušného skriptu v programovacím jazyce Python, ve kterém si nastavíme údaje jako akviziční čas, pozici a tloušťku požadovaných filtrů a složku, kam se mají jednotlivé projekce ukládat. Před naměřením beam–hardening filtrů je také nutné zjistit, zda se oba disky vzájemně překrývají a nezasahují do zobrazovacího pole detektoru.

Dalším krokem je již samotné měření připravených vzorků. Příslušný vzorek umístíme na rotační stolek a nejdříve nastavíme geometrii tak, abychom dosáhli co možná nejlepší kvality naměřených dat. Je zapotřebí upravit vzdálenost od zdroje k detektoru (tzv. SDD z anglického source–detector distance) a vzdálenost od zdroje k objektu (tzv. SOD z anglického source–object distance). V poslední řadě je také nutné zkontrolovat, zda zobrazovaný vzorek nevybíhá ze zorného pole detektoru otáčením kolem jeho vlastní osy. Samotný náběr jednotlivých projekcí pod určenými úhly je uskutečněn taktéž pomocí skriptu v programovacím jazyce Python. V daném skriptu nastavíme akviziční čas jednotlivých projekcí, úhlový krok, rozsah rotace a složku, kam se budou naměřené projekce ukládat. Akviziční čas volíme podle požadované kvality výsledných dat a intenzity RTG záření dopadajícího na detektor, která klesá s rostoucím SSD a je ovlivněna velikostí snímaného vzorku. Po spuštění upraveného skriptu začne polohovací systém otáčet vzorkem kolem jeho osy o zvolený úhlový krok a nabírat data. Po skončení celého měření je nabrána druhá kontrolní sada filtrů pro beam–hardening korekci, a to se stejnými kritérii jako v prvním případě.

Dle typu měřeného vzorku byly voleny parametry typicky v následujícím rozmezí tak, aby bylo dosaženo požadované kvality obrazu. SDD byla nastavena na 115–300 mm a SOD na 26–130 mm. Tloušťky naměřených hliníkových filtrů v revolveru pro beam–hardening korekci se pohybovaly v rozmezí 2–10 mm. Na rentgence bylo klasicky nastaveno napětí 50–100 kVp a proud 15–400 uA. Hodnota úhlového kroku rotačního stolku se vzorkem byla 0,4–0,92°. Při nabírání dat ve spirálním módu bylo většinou naskenováno okolo 3 000 projekcí a při nabírání dat v axiálním módu bylo při rotaci o 360° naskenováno 900 projekcí a při rotaci pouze o 180° poté 450 projekcí. Každá projekce byla nabírána po dobu 0,13–7,5 s. Příslušné parametry, při kterých byla nabrána data jednotlivých měření, jsou uvedeny v Příloha B: Tabulka parametrů měření.

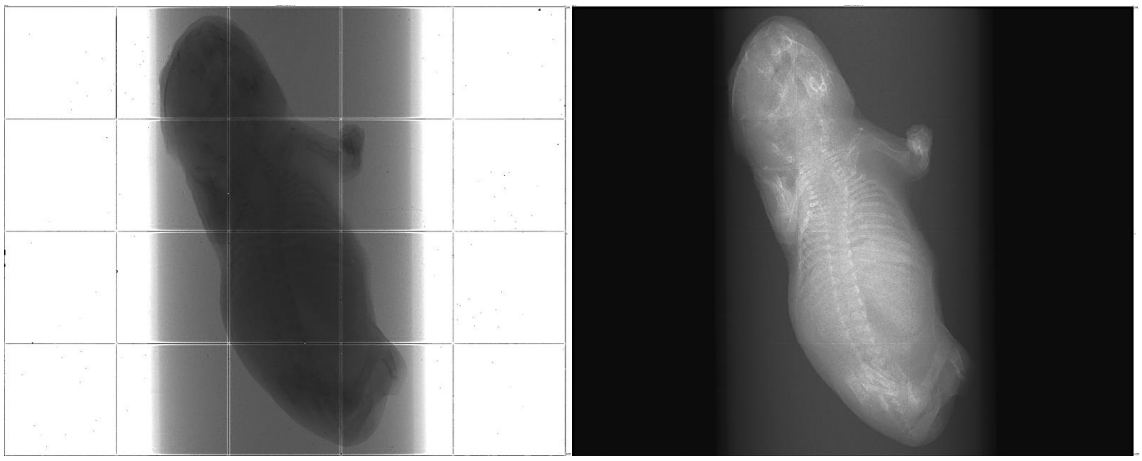
Jak již bylo zmíněno, vlastní získávání jednotlivých projekcí vzorků i filtrů je uskutečněno pomocí příslušného skriptu v programovacím jazyce Python. Tyto skripty jsou součástí softwaru Pixet (Obr. 5.5), pomocí kterého je řízen celý experiment.



Obr. 5.5: Rozhraní softwaru Pixet s projekcí laboratorní myši umístěné v etanolu se zobrazenými surovými daty bez obrazových korekcí.

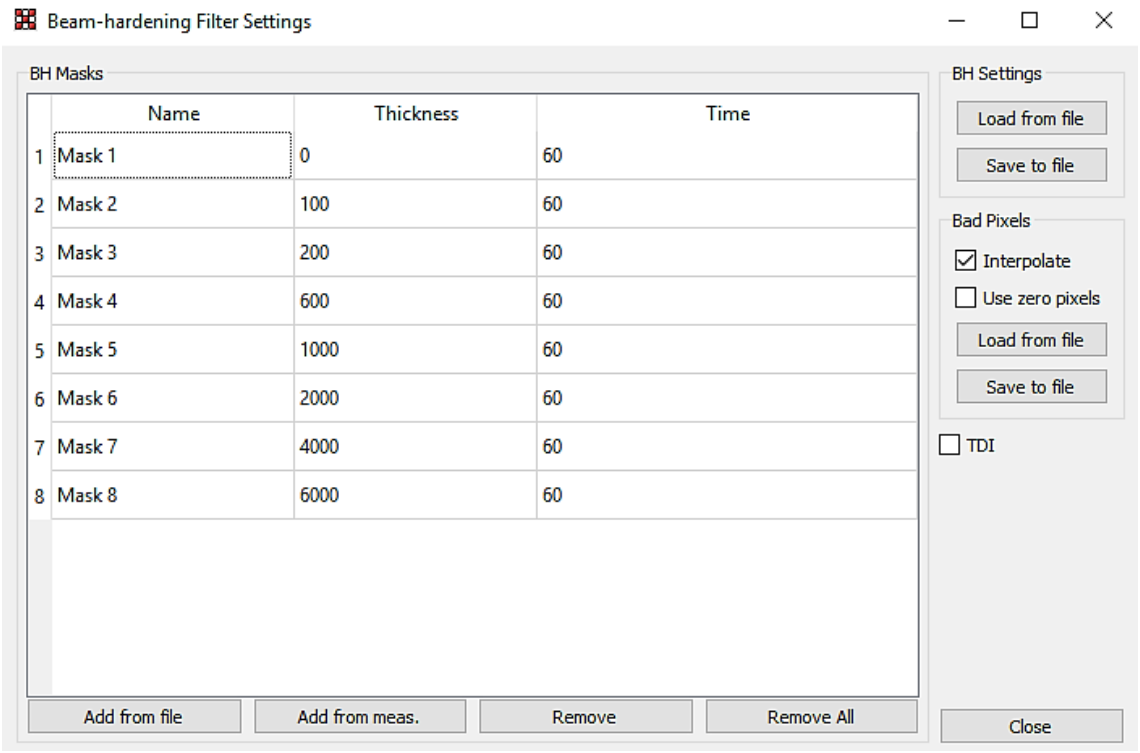
5.5 Zpracování naměřených dat

Po naměření sady projekcí vzorku a korekčních filtrů je na data aplikována beam–hardening korekce (Obr. 5.6), zohledňující odlišnou detekční účinnost jednotlivých pixelů detektoru a jejich nelineární energetickou odezvu. [51] Tato korekce je odvozená od efektu nazývaného jako tvrdnutí svazku (beam–hardening). Efekt tvrdnutí svazku spočívá v tom, že útlum intenzity RTG záření v objektu je závislý na energii paprsků a vlastnostech objektu. U polychromatického záření je tedy každá energie obsažená ve svazku záření zeslabována různým koeficientem útlumu. Obecně jsou fotony s vyšší energií méně absorbovány objektem než fotony s energií nižší. Pokud objekt nezpůsobuje homogenní útlum intenzity záření, tedy jeho tloušťka a materiál nejsou všude stejné, je za silnějšími částmi spektrum tzv. tvrdší než za tenčími. [20, 50] Výsledkem samotné korekce je poté převod intenzity prošlého záření (exponenciální závislost na tloušťce vzorku dle útlumového zákona) na ekvivalentní tloušťku kalibračního materiálu (lineární závislost). S výhodou lze tohoto využít pro zjednodušení výpočtů v algoritmech mikro-CT. Vzhledem k tomu, že se tento postup provádí pro každý pixel, je současně korigována jak jejich účinnost (což je ekvivalent k běžně používané flat–field korekci) tak beam–hardening efekt. [50, 51]



Obr. 5.6: Beam–hardening korekce. Vlevo: nekorigovaná data, vpravo: data po beam–hardening korekci.

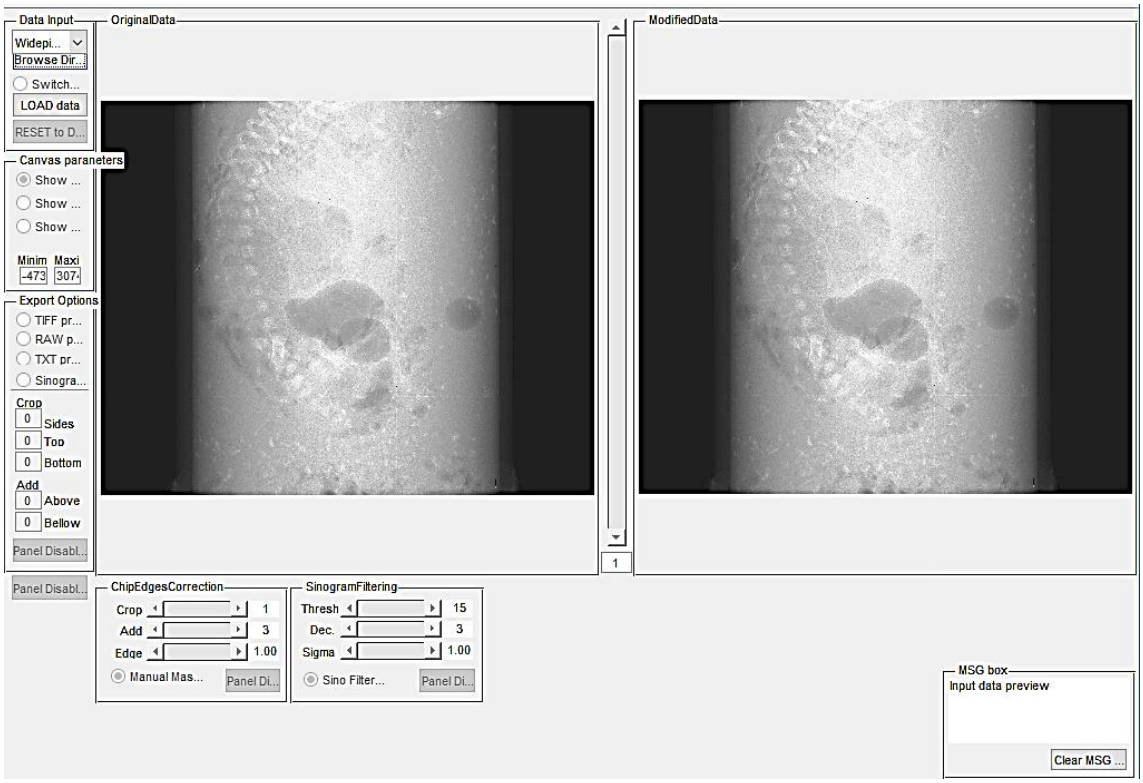
Tato korekce je prováděna opět pomocí skriptu v programovacím jazyce Python, jenž je součástí softwaru Pixet. Před spuštěním skriptu je do softwaru nutné načíst naměřené projekce beam–hardening filtrů a definovat jejich tloušťky (Obr. 5.7).



Obr. 5.7: Načtené naměřené projekce beam–hardening filtrů (Mask 1–8) s nastavenými tloušťkami (Thickness) v mikrometrech a délkou akvizičního času (Time) v sekundách.

Data po beam–hardening korekci je potřeba převést z textového formátu .txt (text) do formátu obrazového (např. .tiff – Tagged Image File Format, .png – Portable Network Graphics) a provést několik korekcí pro lepší kvalitu výstupního obrazu. Oba procesy jsou prováděny pomocí skriptu GUI vytvořeného v ÚTEF ČVTU v Praze v programu MATLAB (matrix laboratory) (Obr. 5.8). Příslušný skript umožňuje úpravu dvou sad parametrů. První takovou sadou je “ChipEdgesCorrection”. Jelikož pixely na hranách čipů mají menší časovou stabilitu, mohou vznikat artefakty, které jsou odstraněny pomocí první funkce “Crop Edge” sloužící k odstranění právě těchto pixelů a k jejich nahrazení interpolací. Při tomto procesu bohužel dochází k rozmazání v interpolovaných oblastech. Jelikož jsou pixely na hranách větší, dochází ke vzniku geometrických deformací obrazu v důsledku posunu částí objektu. To je korigováno dalším parametrem “Add Pixels”, který vkládá a interpoluje pixely mezi pixely na hranách čipu. Poslední volbou je “Edge Coeficient” snižující či zvyšující jas hran vynásobením daných hodnot vzhledem k okolí. V této sekci je také možné zlepšit kvalitu obrazu pomocí funkce “Manual Mask” interpolující vysvícené a vadné pixely definované ručně uloženou maticí o velikosti detektoru (1280 × 1024) s hodnotami pouze 1 (identita) a 0 (maska). Druhou sadou parametrů je “SinogramFiltering” sloužící k odstranění kruhových artefaktů v CT obraze.

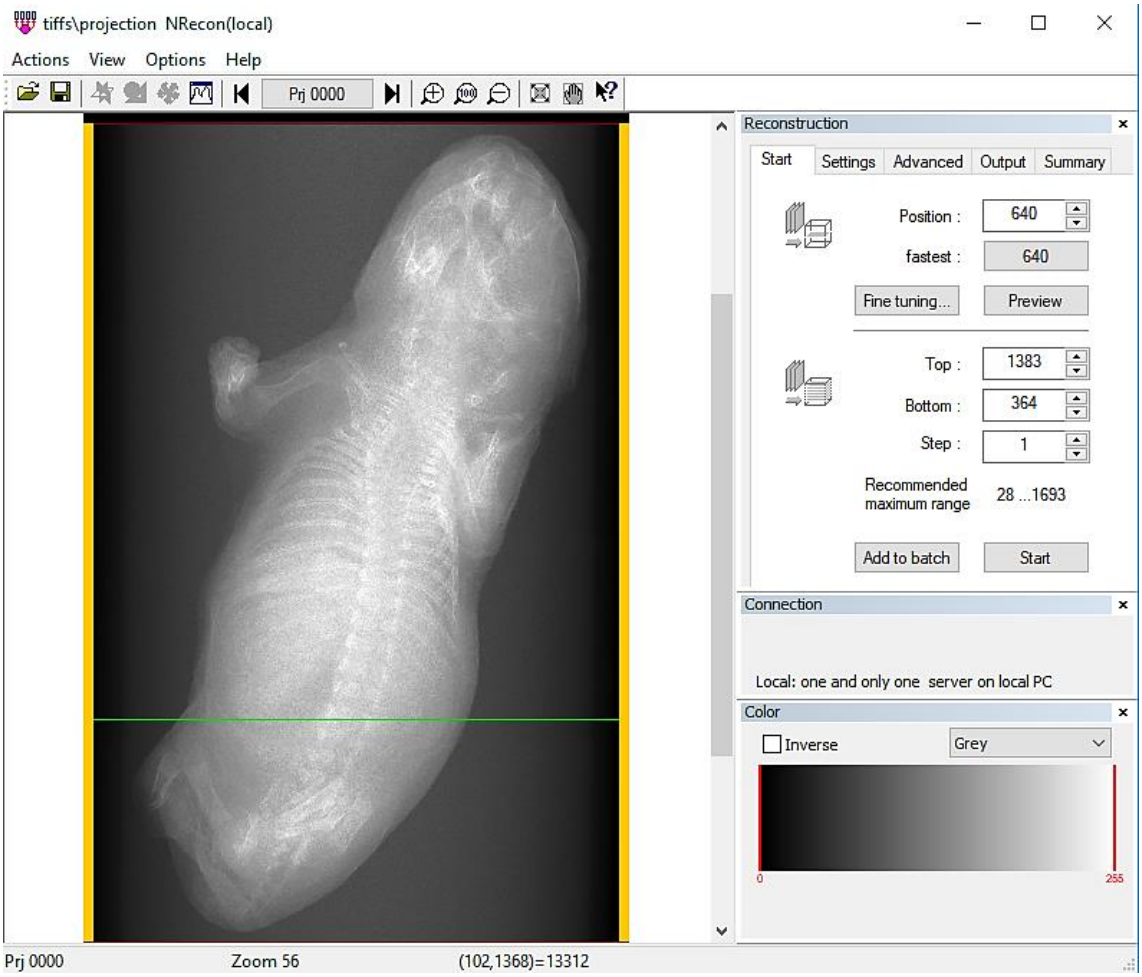
První parametr “Threshold” detekuje nefunkční pixely prošlé předchozí geometrickou korekcí a interpoluje celé sloupce v sinogramu, pokud hodnota překročí nastavený práh. Dalšími funkcemi jsou “DecimationFactor” a “Sigma”, které spolu úzce souvisí. Zabývají se na rozdíl od předchozího parametru funkčními pixely. První zmíněný definuje šířku pruhů a snaží se ho odstranit zvýšením či snížením jasu pixelů vzhledem k okolí, druhý řeší stejným způsobem délku pruhů.



Obr. 5.8: Okno aplikace v programu MATLAB, které se otevírá po spuštění skriptu GUI vytvořeného v ÚTEF ČVUT v Praze a sloužícího ke zlepšení kvality výsledného obrazu.

Rekonstrukce sady dat nabíraných v axiálním módu již v obrazovém formátu je prováděna v programu NRecon (Obr. 5.9). [52] Tento program nám umožňuje zlepšení kvality výsledné rekonstrukce hned několika způsoby. Prvním takovým způsobem je “post–alignment“ kompenzující případné odchylky osy rotace vzorku od středu detektoru. Další možností je “ring–artifacts reduction“ redukující kruhové artefakty vzniklé např. v důsledku vadného pixelu detektoru a poslední používanou funkcí v mé diplomové práci je “smoothing“, který snižuje šum, ale může způsobit rozmazání jemných struktur. Po nastavení uvedených parametrů je provedena vlastní rekonstrukce,

tedy dochází k tvorbě 3D modelu ze sady naměřených projekcí a zpracovaná data jsou exportována v požadovaném obrazovém formátu do příslušné složky.



Obr. 5.9: Program NRecon sloužící k rekonstrukci naměřených dat.

V případě spirálního náběru je výhodnější pro rekonstrukci CT sady dat využít program VG studio Max [53] umožňující zlepšení kvality výsledné rekonstrukce pomocí vhodněji navrženého algoritmu rekonstrukce. Většina parametrů pro předzpracování dat je totožných s programem NRecon.

Již posledním krokem celého zpracování naměřených dat je vizualizace transverzálních, koronárních a sagitálních řezů, kterou lze provést např. v programu DataViewer [54], Dragonfly (Obr. 5.10) [55] či CTVox [56], a vizualizace 3D objemu vzorku, kterou lze provést současně s vizualizací jednotlivých řezů pomocí programu Dragonfly (Obr. 5.10) nebo CTVox.

Obr. 5.10: Vizualizace 3D objemu vzorku a transverzálních, koronárních a sagitálních řezů v programu Dragonfly.

6 Výsledky

V této kapitole mé diplomové práce budou nejdříve popsány jednotlivé experimenty s referenčním P1 stádiem laboratorní myši vedoucí k ustanovení vhodného protokolu pro přípravu vzorků. Na základě provedených experimentů bude následně charakterizován vybraný protokol pro přípravu vzorků jak stádia P1, tak stádií E18 a E14, který lze však využít u všech stádií používaných ke zkoumání embryonálního vývoje. Na závěr této části práce budou uvedeny vizualizace laboratorní myši stádií E14, E18 a P1. Interpretace dosažených výsledků byla uskutečněna ve spolupráci s anatomy z 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

6.1 Referenční P1 stádium laboratorní myši s různými variantami přípravy

Následující podkapitoly popisují provedené experimenty s referenčním vzorkem P1 stádia laboratorní myši s různými variantami přípravy, které vedly k ustanovení vhodného protokolu charakterizovaného v kapitole 6.2.

Dle předpokladů jsou u všech naměřených P1 stádií na výsledných zrekonstruovaných řezech velmi dobře zobrazené kosti laboratorní myši, jelikož absorbují RTG záření ve vyšší míře než okolní měkké tkáně. Kromě kostní tkáně je také možné u všech těchto vzorků dobře rozpoznat místa, ve kterých se nachází vzduch, tedy části horních a dolních cest dýchacích, zejména pak větvení průdušek v plicní tkáni a paranasální dutiny, a vzduchové bubliny typicky v gastrointestinálním traktu. Vzduch jakožto negativní kontrastní látka však není ve většině případů postačující alespoň ke správnému určení tvaru jím vyplněných orgánů a struktur. Zobrazení zvenku přístupných dutin je navíc závislé na jejich zaplnění tekutinami, jelikož je k přípravě vzorků používána jak imerzní stabilizace, tak kontrastování a mechanická fixace.

6.1.1 Měření 1 (M1)

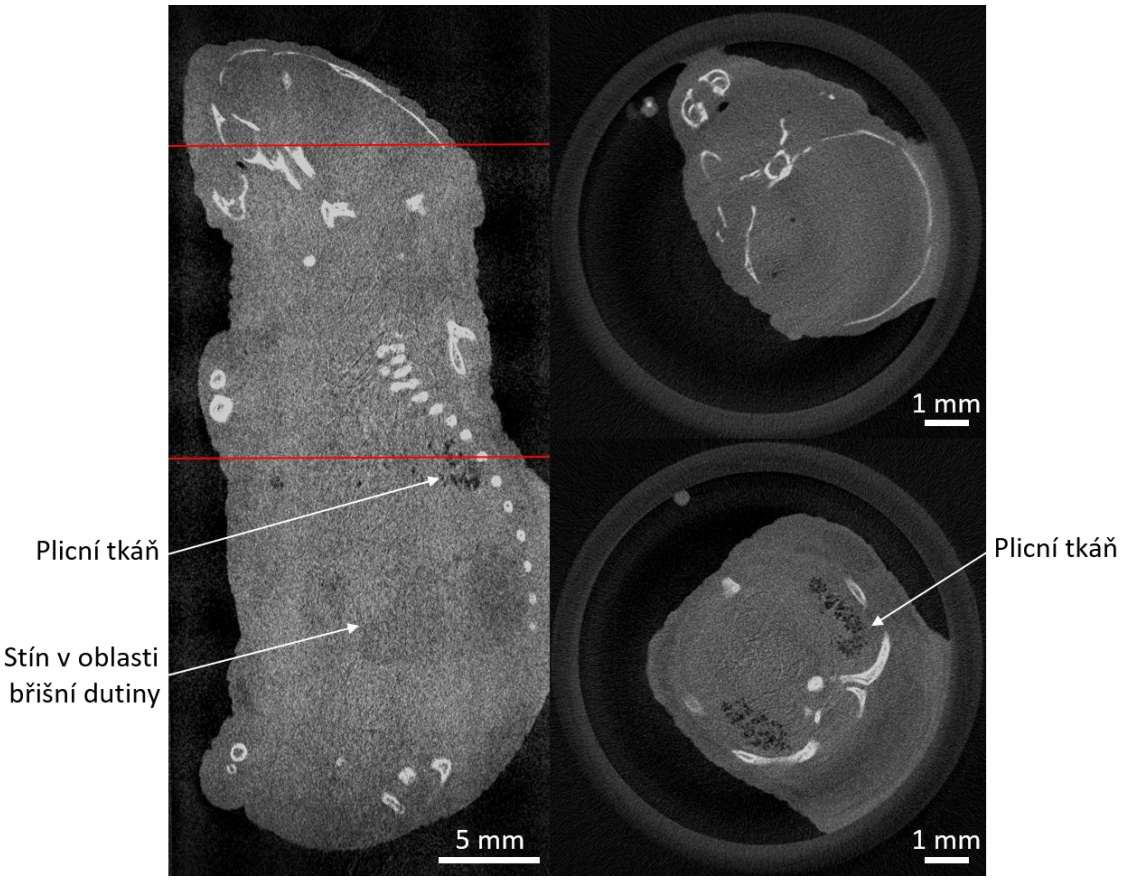
Jako první krok v mé diplomové práci bylo provedeno měření tzv. nativního vzorku P1 stádia laboratorní myši, což je vzorek měřený bez jakékoliv přípravy, tedy stabilizace

a kontrastování. Samotné měření probíhalo po umístění nativního vzorku do připravené plastové zkumavky, vzorek byl tudíž obklopen vzduchem.

Výsledky M1

U nativního vzorku je kromě kostí a plicní tkáně možné pozorovat stíny v oblasti břišní dutiny, které naznačují přítomnost orgánů v anatomicky předpokládaných umístěních. Toto zobrazení však není jednoznačné a dostačující pro určení alespoň tvaru jednotlivých vnitřních orgánů (Obr. 6.1).

Při nabírání projekcí docházelo vlivem vzduchu k vysychání vzorku, což způsobovalo jeho pohyb při měření. V některých řezech tak bylo možné pozorovat nechtěné pohybové artefakty (rozmazání struktur).



Obr. 6.1: M1: CT rekonstrukce nativního vzorku P1 stádia laboratorní myši bez stabilizace alkoholovou řadou a bez kontrastování. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují dobře viditelné kostní struktury. Dále je možné částečně rozeznat plicní tkáň vyplněnou vzduchem a stíny v oblasti břišní dutiny. EPS = 22 μm.

6.1.2 Měření 2 (M2)

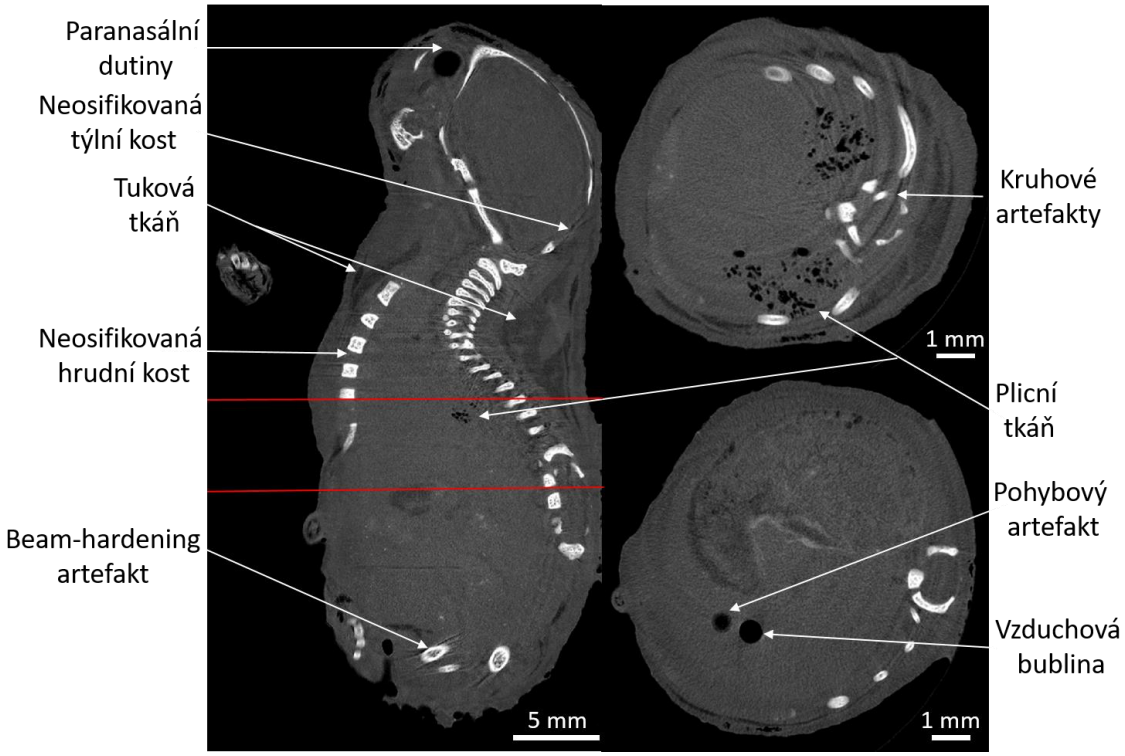
Jelikož při M1 nebylo možné rozeznat měkké tkáně bylo provedeno M2 referenčního stádia P1 laboratorní myši po stabilizaci vzestupnou alkoholovou řadou. Vzorek byl nejdříve ponořen do 50% roztoku etanolu na dobu 48 h a poté byl přemístěn do roztoku 75% etanolu na dobu 48 h. Samotné měření probíhalo po umístění zkoumaného vzorku do plastové zkumavky, vzorek byl tedy opět obklopen vzduchem.

Výsledky M2

Výsledné řezy M2 demonstrují, že kosti, které vznikají v pozdějších fázích embryonálního vývoje chondrogenní nebo desmogenní osifikací, jsou u P1 stádia stále odděleny chrupavkami či vazivem. Tato skutečnost je dobře viditelná u hrudní kosti a lebky. U lebky je také vidět, že nedošlo k úplnému vytvoření týlní kosti (Obr. 6.2).

U tohoto vzorku pouze stabilizovaného alkoholovou řadou je kromě kostní tkáně a míst vyplněných vzduchem, jako jsou paranasální dutiny a větvení průdušek v plicní tkáni, možné pozorovat vzduch v podobě bublin v oblasti břišní dutiny. Tato skutečnost nasvědčuje faktu, že v těchto místech by se mohla nacházet střeva či žaludek. Tvar přítomných bublin však není dostačující pro správné určení tvarů těchto dutých orgánů. Kromě toho může být také pozorována tuková tkáň (tmavší oblasti). I když zobrazený vzorek při M2 vykazuje o něco vyšší kontrast než vzorek z M1, ostatní vnitřní orgány tvořené měkkými tkáněmi s jistotou stále popsat nelze.

Při nabírání projekcí docházelo stejně jako u M1 k vysychání vzorku a i při aplikované korekci na posun vznikaly u zrekonstruovaných CT dat pohybové artefakty.



Obr. 6.2: M2: CT rekonstrukce vzorku ponořeného do 50% roztoku etanolu a poté přesunutého do 75% roztoku etanolu. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami. Rozpoznatelné jsou také struktury vyplněné vzduchem (plíce, střeva a paranasální dutiny). EPS = 20 μm.

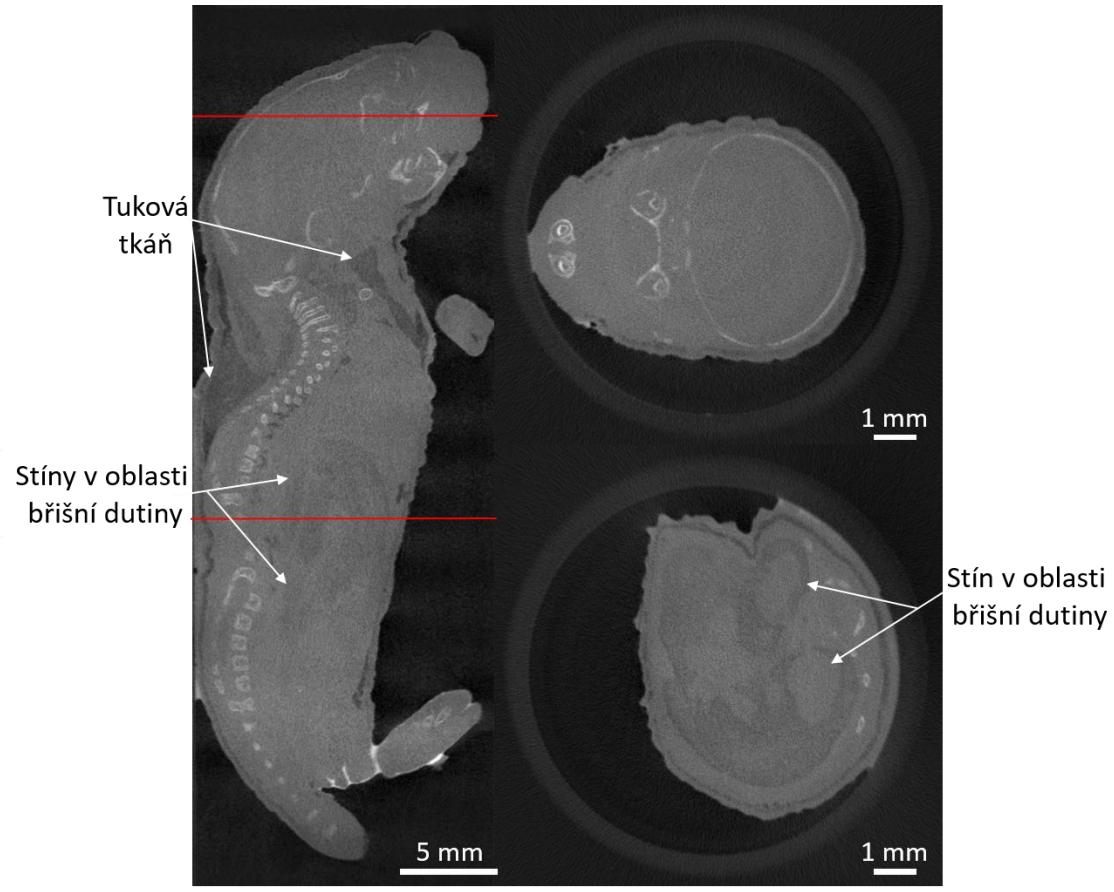
6.1.3 Měření 3 (M3)

Vzhledem k nedostatečnému kontrastu při M1 a M2 bylo provedeno M3, před kterým byl referenční vzorek P1 stádia laboratorní myši kontrastován pomocí 5% IKI po dobu 7 dní. Vzorek byl opět umístěn do plastové zkumavky jako v předchozím M1 a M2.

Výsledky M3

Výsledné řezy rekonstrukce ukázaly kromě opět dobře viditelných kostních struktur tukovou tkáň jako u M2. Při tomto měření však došlo ještě k jejímu zviditelnění způsobenému přednostním vychytáváním kontrastní látky IKI v okolní svalové tkáni. Kromě toho lze v oblasti břišní dutiny pozorovat stíny ukazující na přítomnost vnitřních orgánů (žaludek, játra, ledviny a další). I přesto však jednotlivé orgány ani jejich tvar a strukturu s jistotou popsat nelze (Obr. 6.3).

Jako u M1 a M2 docházelo taktéž k vysychání vzorku, což způsobovalo nechtěné pohybové artefakty v některých zrekonstruovaných CT řezech.



Obr. 6.3: M3: CT rekonstrukce P1 stádia laboratorní myši kontrastované pomocí 5% IKI. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami. Rozpoznatelná je také tuková tkáň a stíny v oblasti břišní dutiny. EPS = 20 μm.

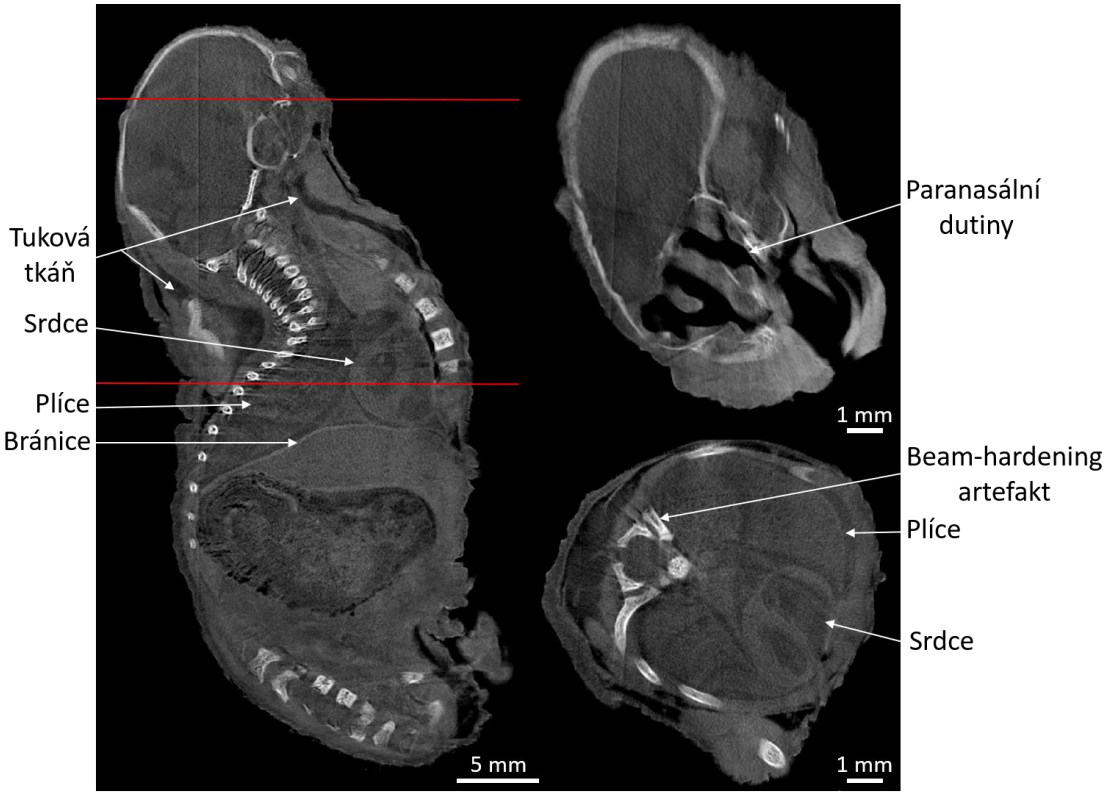
6.1.4 Měření 4 (M4)

Na základě předchozích měření, kde nebylo možné rozeznat většinu vnitřních orgánů laboratorní myši, bylo provedeno M4. Příprava vzorku stádia P1 laboratorní myši byla zčásti totožná s M2, avšak po stabilizování 50% (48 h) a 75% (48 h) roztokem etanolu byl vzorek přemístěn do 96% roztoku etanolu na dobu 72 h. Po stabilizaci alkoholovou řadou bylo P1 stádium 72 h kontrastováno pomocí 5% IKI. Vzorek byl poté před měřením opět vložen do plastové zkumavky.

Výsledky M4

Stejně jako u předchozích měření jsou velmi dobře zobrazené kosti a struktury vyplněné vzduchem. S pomocí IKI jakožto kontrastní látky, která se akumuluje v měkkých tkáních, došlo ke zviditelnění některých vnitřních orgánů. Poměrně dobře je již rozpoznatelné srdce, játra, plíce a bránice, a to i přes pohybové artefakty vznikající

při snímání v důsledku opětovného vysychání vzorku. Kromě toho může být opět pozorována tuková tkáň (Obr. 6.4).



Obr. 6.4: M4: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (50 % – 75 % – 96 % roztok etanolu) a kontrastovaného 5% IKI. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy s dobře viditelnými kostními strukturami a tukovou tkání. I přes přítomnost rekonstrukčních pohybových artefaktů je možné rozpoznat některé vnitřní orgány. EPS = 20 μm.

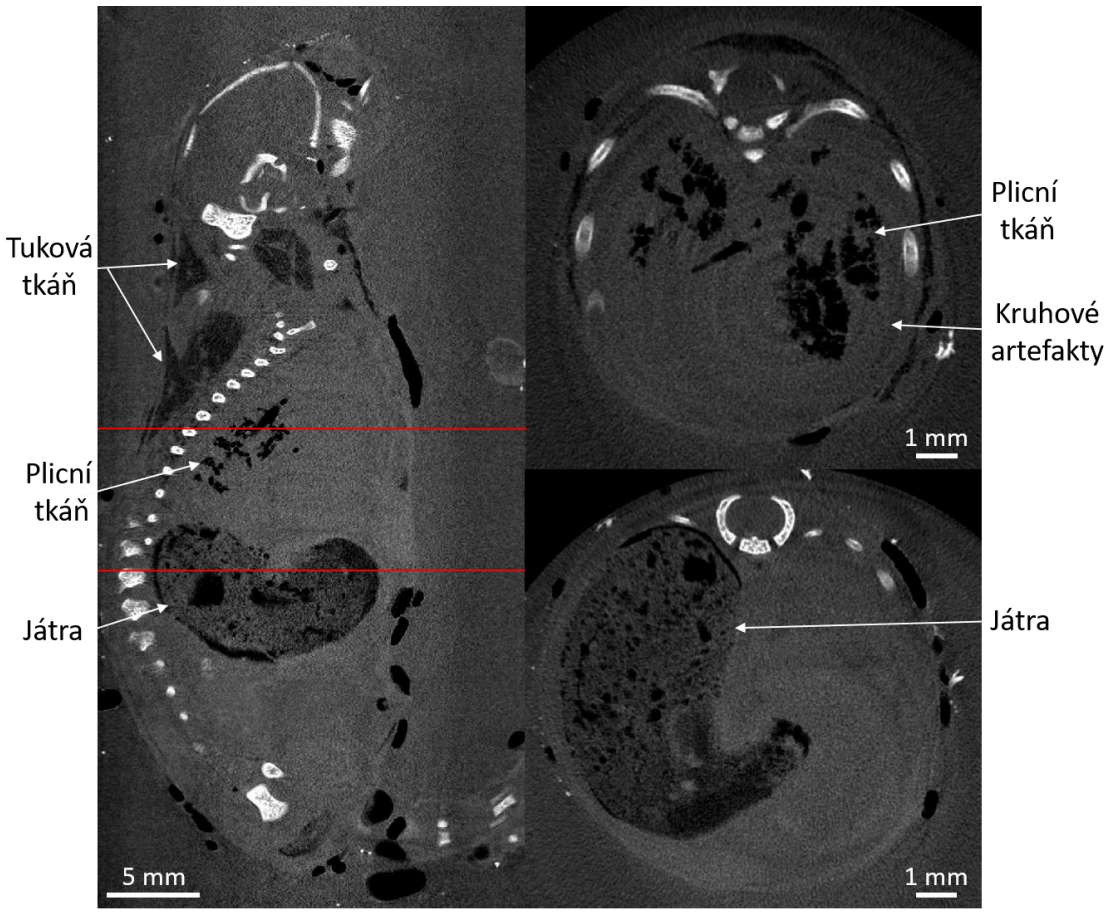
6.1.5 Měření 5 (M5)

Při předchozích měřeních M1 až M4 docházelo vlivem vzduchu k vysychání vzorku během experimentu, což způsobovalo pohybové artefakty v zrekonstruovaných CT obrazech. V důsledku této skutečnosti bylo uskutečněno M5, před kterým bylo referenční P1 stádium laboratorní myši postupně stabilizováno 50% (24 h), 75% (24 h) a 96% (72 h) roztokem etanolu a následně kontrastováno pomocí 5% IKI po dobu 72 h. Tato příprava vzorku byla tedy provedena shodně s předchozím M4. Na rozdíl od M1 až M4, kdy vzorek nebyl nijak mechanicky fixován a do plastové zkumavky byl pouze vložen, bylo referenční stádium u tohoto měření mechanicky fixováno pomocí potravinářské želatiny.

Výsledky M5

Díky mechanické fixaci pomocí potravinářské želatiny byl vzorek P1 stádia během celého měření stabilní a rekonstrukční pohybové artefakty vznikající v důsledku vysychání vzorku byly téměř eliminovány. V průběhu experimentu však docházelo bohužel k difundování kontrastní látky IKI z tkání do potravinářské želatiny, přičemž byl snížen výsledný kontrast vzorku (Obr. 6.5).

Jelikož zobrazení kostní tkáně a oblastí vyplněných vzduchem není závislé na přítomnosti kontrastní látky, je možné tyto struktury i přes přítomnou difuzi rozpoznat jako v předchozích měřeních. Možné je také pozorovat tukovou tkáň a játra.



Obr. 6.5: M5: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (50% – 75% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného 5% IKI a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů. Kontrastní látka IKI v průběhu měření bohužel difundovala z tkání do okolního prostředí, v důsledku čehož byl snížen kontrast vzorku. EPS = 20 μm.

6.1.6 Měření 6 (M6)

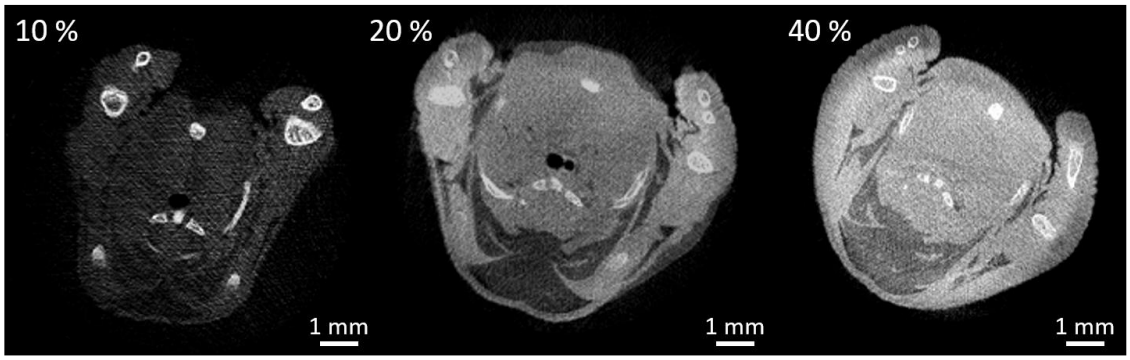
Při M1 až M5 nebylo dosahováno požadované kvality výsledných obrazů, zejména uspokojivého kontrastu měkkých tkání. Bylo proto uskutečněno M6, při kterém byly najednou měřeny čtyři různě kontrastované vzorky. Stabilizace referenčních stádií P1 laboratorní myši byla provedena opět vzestupnou alkoholovou řadou, přičemž všechny vzorky byly nejdříve ponořeny do 25% roztoku etanolu, poté byly přemístěny do 50% roztoku etanolu a nakonec do 96% roztoku etanolu na dobu vždy 24 h. Tři ze čtyř vzorků byly dále kontrastovány pomocí IKI o koncentracích 10 %, 20 % a 40 % a poslední vzorek byl kontrastován pomocí Lugolova roztoku. Kontrastování všech vzorků probíhalo po dobu 72 h. K mechanické fixaci byla opět jako při M5 použita potravinářská želatina. Jelikož však při M5 docházelo k difundování kontrastní látky IKI z tkání do okolního prostředí, M6 probíhalo ihned po mechanické fixaci potravinářskou želatinou.

Výsledky M6

Díky měření provedenému ihned po mechanické fixaci pomocí potravinářské želatiny bylo eliminováno difundování kontrastní látky IKI a Lugolova roztoku z měkkých tkání do okolního prostředí. Jelikož bylo měřeno více vzorků najednou, muselo být sníženo prostorové rozlišení (EPS = 33,26 μm).

IKI

I když byla zajištěna dostatečná mechanická fixace a i když bylo omezeno difundování kontrastní látky, nebylo při kontrastování pomocí IKI dosaženo požadovaného kontrastu měkkých tkání, a to i přesto, že byla zvyšována jeho koncentrace z 10 % až na 40 % (Obr. 6.6).



Obr. 6.6: M6: CT rekonstrukce vzorků stabilizovaných alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaných 10%, 20% a 40% IKI a mechanicky fixovaných potravinářskou želatinou. I přes zvyšování koncentrace IKI nebylo dosaženo požadovaného kontrastu měkkých tkání. EPS = 33,26 μm.

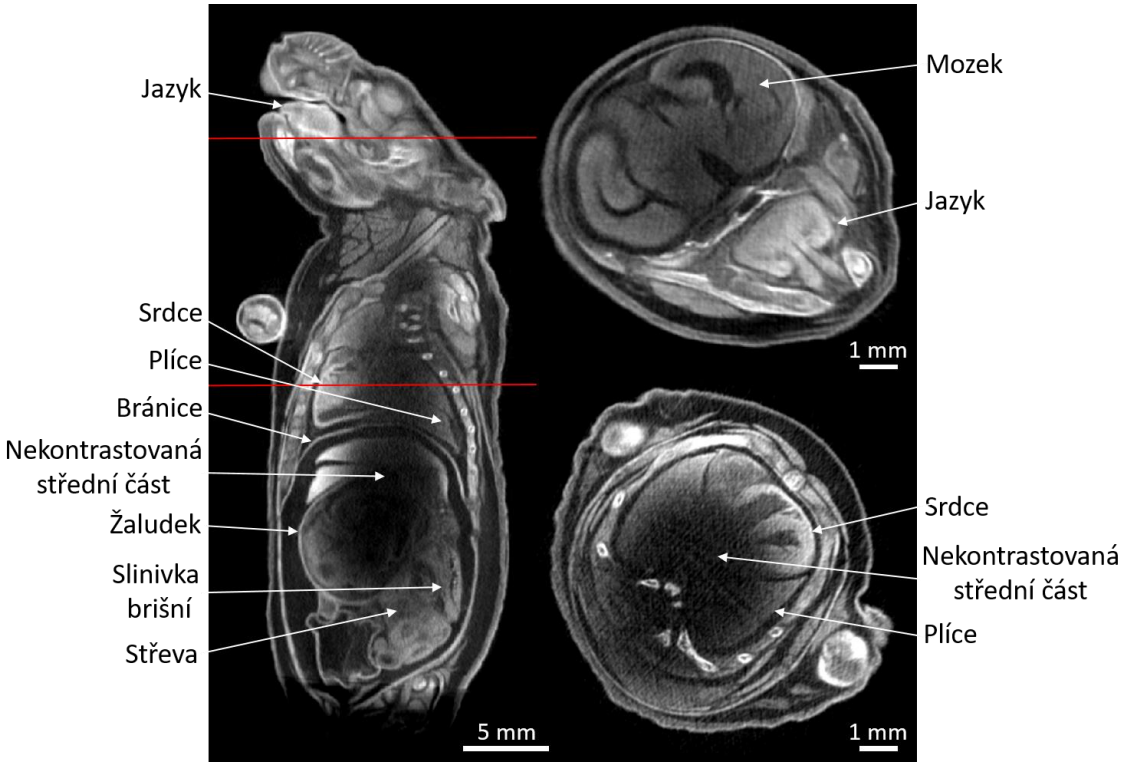
Stejně jako ve většině předchozích měření bylo možné s jistotou rozpoznat u všech třech vzorků pouze kostní tkáň, struktury vyplněné vzduchem a tukovou tkáň (Obr. 6.7).

Obr. 6.7: M6: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného 20% IKI a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů díky mechanické fixaci potravinářskou želatinou. M6 bylo uskutečněno ihned po zalití vzorku do potravinářské želatiny, čímž bylo omezeno difundování kontrastní látky z měkkých tkání do okolního prostředí. EPS = 33,26 μm.

Lugolův roztok

Při kontrastování vzorku laboratorní myši pomocí Lugolova roztoku bylo docíleno výborného kontrastu měkkých tkání (Obr. 6.8), došlo ke zviditelnění struktur z příčně pruhované, hladké i srdeční svaloviny. Kromě orgánů zobrazených v předchozím M4 (srdce, játra, plíce, bránice) je již také možné rozeznat další struktury (mozek, jazyk, žaludek, střeva, slinivku břišní a další).

Během 72 h bohužel nedošlo k difundování kontrastní látky do střední části referenčního vzorku, a tudíž zůstala tato místa nekontrastovaná.



Obr. 6.8: M6: CT rekonstrukce vzorku stabilizovaného alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaného Lugolovým roztokem a mechanicky fixovaného potravinářskou želatinou. Sagitální (vlevo) a transverzální (vpravo) řezy vykazují minimální počet pohybových artefaktů a výborný kontrast měkkých tkání. EPS = 33,26 μm.

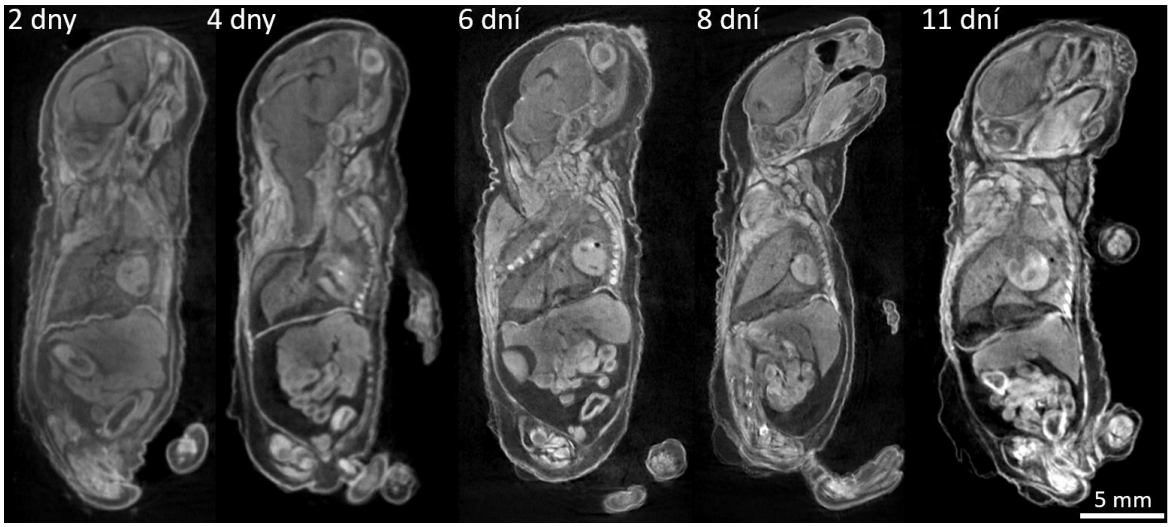
6.1.7 Měření 7 (M7)

Jelikož při předchozím M6 nedošlo k prokontrastování střední části, bylo uskutečněno M7, při kterém bylo zobrazeno pět vzorků s různou dobou kontrastování (Obr. 6.9), aby bylo možné určit čas potřebný k difundování kontrastní látky do celého objemu vzorku.

Stabilizace vzorků byla provedena alkoholovou řadou pomocí etanolu. Všechny vzorky byly nejdříve ponořeny do 25% roztoku etanolu na 24 h, poté byly přesunuty do 50% roztoku etanolu také na 24 h a nakonec do 96% roztoku etanolu, kde byla jednotlivá P1 stádia laboratorní myši ponechána od 10 do 19 dní. Vzorky byly dále kontrastovány pomocí Lugolova roztoku po dobu 2, 4, 6, 8 a 11 dnů. Po kontrastování byly vzorky vyjmuty a opláchnuty v 96% etanolu (odstranění přebytečné kontrastní látky z povrchu vzorku), následovalo oschnutí, po kterém byly vzorky postříkány bezbarvým lakem (zamezení difuze kontrastní látky ze vzorku do okolního prostředí) a po jeho zaschnutí byly opláchnuty v destilované vodě (zajištění přilnavosti potravinářské želatiny) a mechanicky fixovány pomocí potravinářské želatiny. Samotné měření bylo provedeno taktéž jako při M6 ihned po mechanickém zafixování P1 stádií laboratorní myši.

Výsledky M7

Při M7 bylo cílem určit optimální dobu kontrastování vzorků pomocí Lugolova roztoku, jelikož u M6 nedošlo k úplnému prodifundování kontrastní látky do celého objemu vzorku. Na základě naměřených mikro-CT dat bylo zjištěno, že od 6 dní se již kontrast tkání nezlepšoval. Jako optimální doba kontrastování byla tedy u P1 stádia laboratorní myši stanovena doba 6 dní. Jelikož bylo měřeno opět více vzorků najednou, muselo být sníženo prostorové rozlišení (EPS = 36,67 μm).



Obr. 6.9: M7: CT rekonstrukce vzorků stabilizovaných alkoholovou řadou (25% – 50% – 96% roztok etanolu), kontrastovaných Lugolovým roztokem a mechanicky fixovaných potravinářskou želatinou. Před samotnou mechanickou fixací proces: opláchnutí v 96 % roztoku etanolu – oschnutí – postříkání bezbarvým lakem – zaschnutí – opláchnutí destilovanou vodou. Sagitální řezy: zleva 2, 4, 6, 8 a 11 dní kontrastované vzorky. EPS = 36,67 μm.

6.2 Vybraný protokol pro přípravu vzorků a jeho charakterizace

Na základě výše popsaných experimentů M1 až M7 charakterizuje následující podkapitola vybraný protokol přípravy vzorků laboratorní myši stádií P i E vedoucí k výbornému kontrastu u měkkých tkání.

6.2.1 Vybraný protokol pro přípravu P1 stádia laboratorní myši

Následující podkapitola definuje vybraný protokol přípravy vzorku P1 stádia laboratorní myši, který byl v mé diplomové práci používán jako vzorek referenční.

Prvním krokem přípravy vzorku před měřením je proces stabilizace pomocí vzestupné alkoholové řady skládající se ze tří kroků. Nejdříve je třeba vzorek na 24 h umístit do 25% roztoku etanolu, na dalších 24 h do 50% roztoku etanolu a nakonec do 96% etanolu na nejméně 24 h. Druhým krokem přípravy vzorku je kontrastování za použití Lugolova roztoku. U P1 stádia laboratorní myši se osvědčila doba ponoření 6 dní k úplnému proniknutí kontrastní látky do celého objemu vzorku. Třetí krok (nazvaný jako mezikrok) se skládá z opláchnutí vzorku 96% etanolem, z následného oschnutí vzorku a jeho postříkání bezbarvým lakem. Po zaschnutí laku je dále vzorek před posledním krokem třeba namočit v destilované vodě. Posledním krokem přípravy

vzorku je mechanická fixace pomocí agarózového gelu, přičemž bylo experimentálně prokázáno, že měření je nutné provést ihned po tomto kroku, aby nedocházelo ke snižování kontrastu periférií vzorku difuzí Lugolova roztoku do okolního prostředí.

Tabulka 6.1: Vybraný protokol pro přípravu vzorku P1 stádia laboratorní myši

Krok přípravy vzorku	
Stabilizace	25% roztok etanolu (24 h) + 50% roztok etanolu (24 h) + 96% etanol (24 h a více)
Kontrastování	Lugolův roztok (6 dní)
Mezikrok	96% etanol – oschnutí + bezbarvý lak – oschnutí + dH_2O
Mechanická fixace	Agarózový gel
Měření	Ihned po mechanické fixaci

6.2.2 Vybraný protokol pro přípravu E18 a E14 stádia laboratorní myši

Následující podkapitola definuje vybraný protokol přípravy vzorků E18 a E14 stádií laboratorní myši.

Příprava těchto vzorků se skládá ze stejných kroků jako příprava referenčního P1 stádia laboratorní myši, která byla charakterizována v předešlé kapitole, pouze s tím rozdílem, že byl optimalizován proces stabilizace a jednotlivé doby procesů přípravy. Prvním rozdílem je stabilizace vzorků, při které byla použita širší vzestupná alkoholová řada. Vzorky stádií E18 a E14 je nutné v tomto případě nejdříve ponořit na 12 h do 30% roztoku etanolu, poté na 12 h do 50% roztoku etanolu, dále na 12 h do 70% roztoku etanolu a nakonec do 96% etanolu na 12 a více h. Druhým rozdílem je doba kontrastování Lugolovým roztokem. U těchto menších vzorků je optimální doba kontrastování 2 dny.

Tabulka 6.2: Vybraný protokol pro přípravu vzorku E18 a E14 stádia laboratorní myši

Krok přípravy vzorku	
Stabilizace	30% roztok etanolu (12 h) + 50% roztok etanolu (12 h) + 70% roztok etanolu (12 h) + 96% etanol (12 h a více)
Kontrastování	Lugolův roztok (2 dny)
Mezikrok	96% etanol – oschnutí + bezbarvý lak – oschnutí + dH_2O
Mechanická fixace	Agarózový gel
Měření	Ihned po mechanické fixaci

6.3 Vizualizace různých vývojových stádií laboratorní myši (E, P)

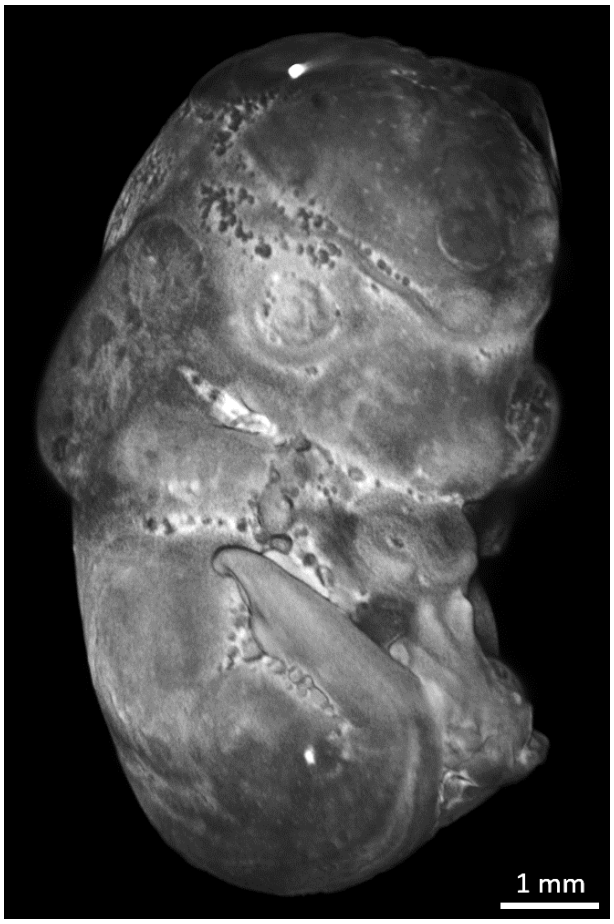
Po zpracování naměřených dat je, jak již bylo uvedeno v příslušné kapitole, posledním krokem vizualizace. Jelikož mikro-CT je radiografická metoda, při které jsou z nasnímaných projekcí zrekonstruovány transverzální řezy, pomocí kterých je vytvořen 3D obraz, lze vizualizovat virtuální 3D model příslušného vzorku. Velkou výhodou je poté vykreslení jakéhokoliv řezu napříč celým zrekonstruovaným objemem. Typicky se však jedná o řezy sagitální a koronární, ve kterých je v kombinaci s řezy transverzálními možné vidět veškeré detaily. Obecně jsou RTG modality založené na zeslabení RTG záření pozorovaným vzorkem a kontrast v rekonstruovaných datech je způsoben rozdíly v hustotě. Na tomto základě je poté možné vizualizovat struktury o vybrané hustotě např. kosterní systém.

Poněvadž cílem mé diplomové práce bylo nejen výsledky vizualizovat, ale také interpretovat, obrázky v následujících podkapitolách obsahují základní anatomické popisky orgánů a struktur uskutečněné opět ve spolupráci s anatomy z 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Následující podkapitoly tedy ukazují dosažené výsledky u jednotlivých stádií a demonstrují, že metodu mikro-CT lze využít ke studiu embryonálního vývoje laboratorní myši, a tím i k výzkumu vývojových vad např. při aplikaci farmak v době embryonálního vývoje a k testování teratogenity přípravku.

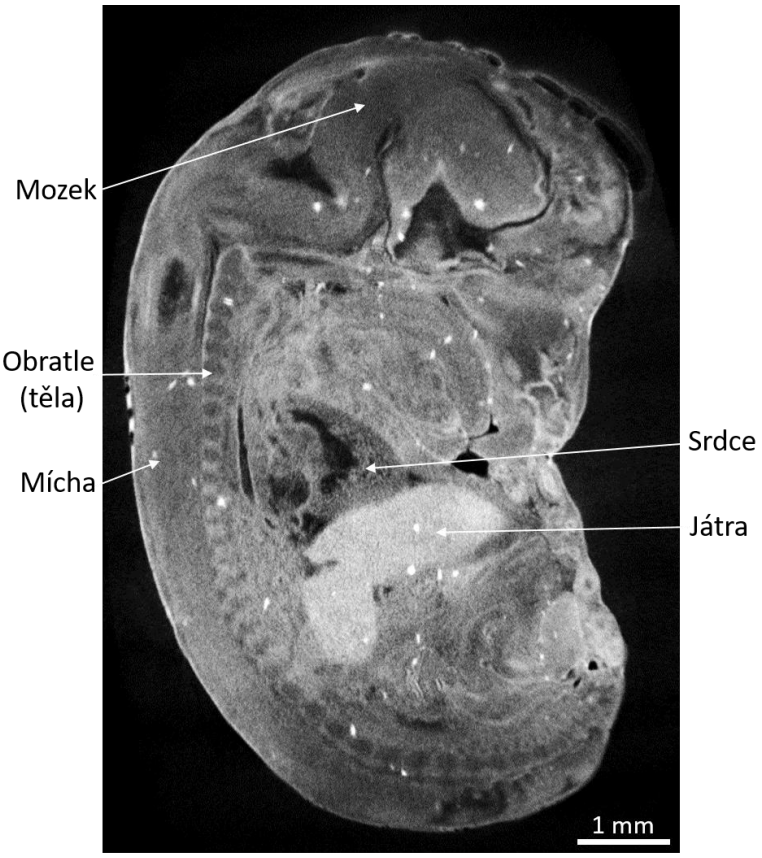
6.3.1 Vizualizace E14 stádia laboratorní myši

Na základě vybraného protokolu charakterizovaného v kapitole 6.2.2 bylo připraveno stádium laboratorní myši E14 a následně bylo uskutečněno měření 10 (M10), při kterém byly nastaveny parametry tak, aby bylo možné rozeznat detaily jednotlivých orgánových soustav.

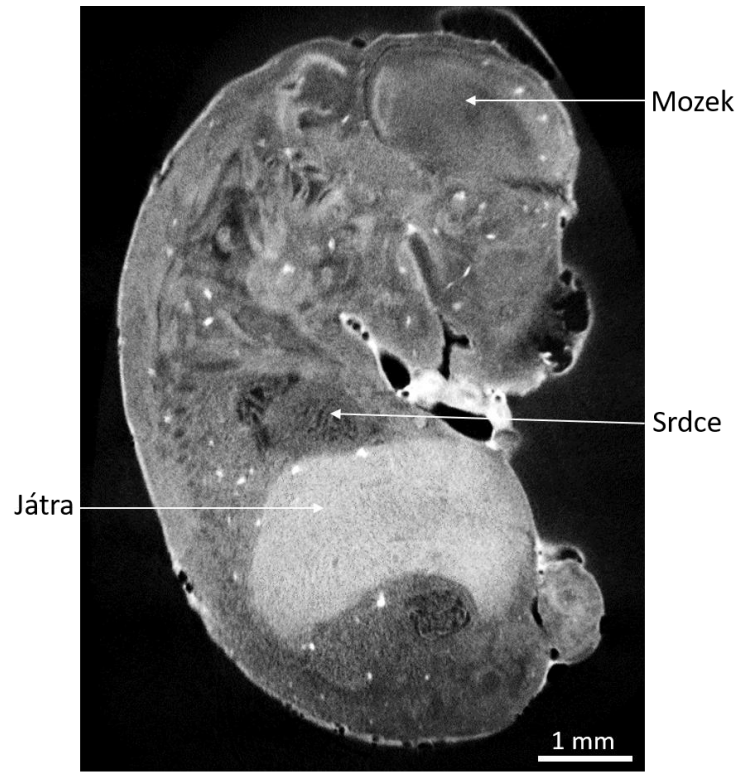
Následující podkapitola tedy vizualizuje E14 stádium laboratorní myši. Ukazuje jak zrekonstruovaný 3D model (Obr. 6.10), tak příslušné sagitální (Obr. 6.11, Obr. 6.12) a transverzální řezy (Obr. 6.13, Obr. 6.14, Obr. 6.15).



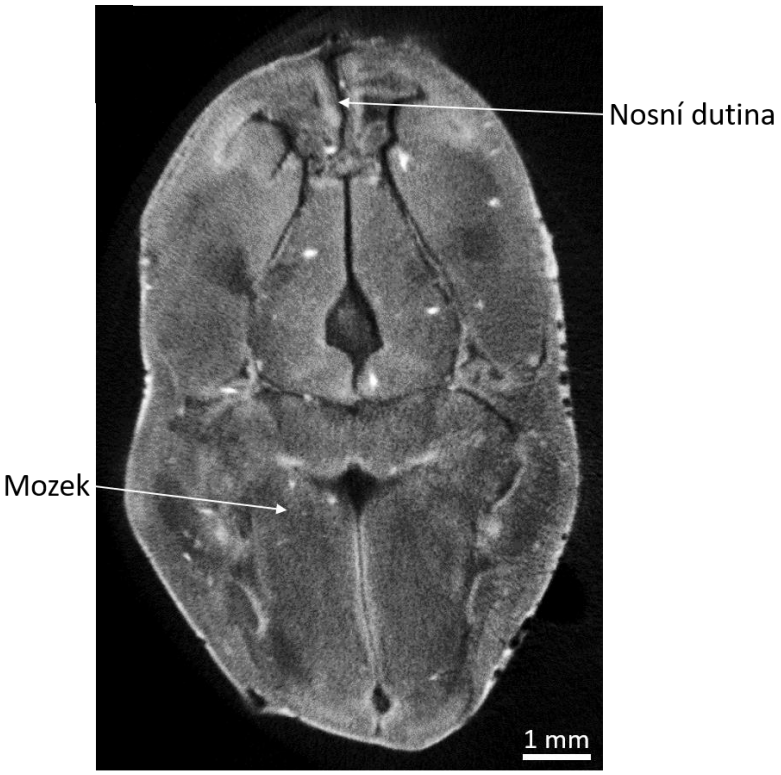
Obr. 6.10: Zrekonstruovaný virtuální 3D model E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.



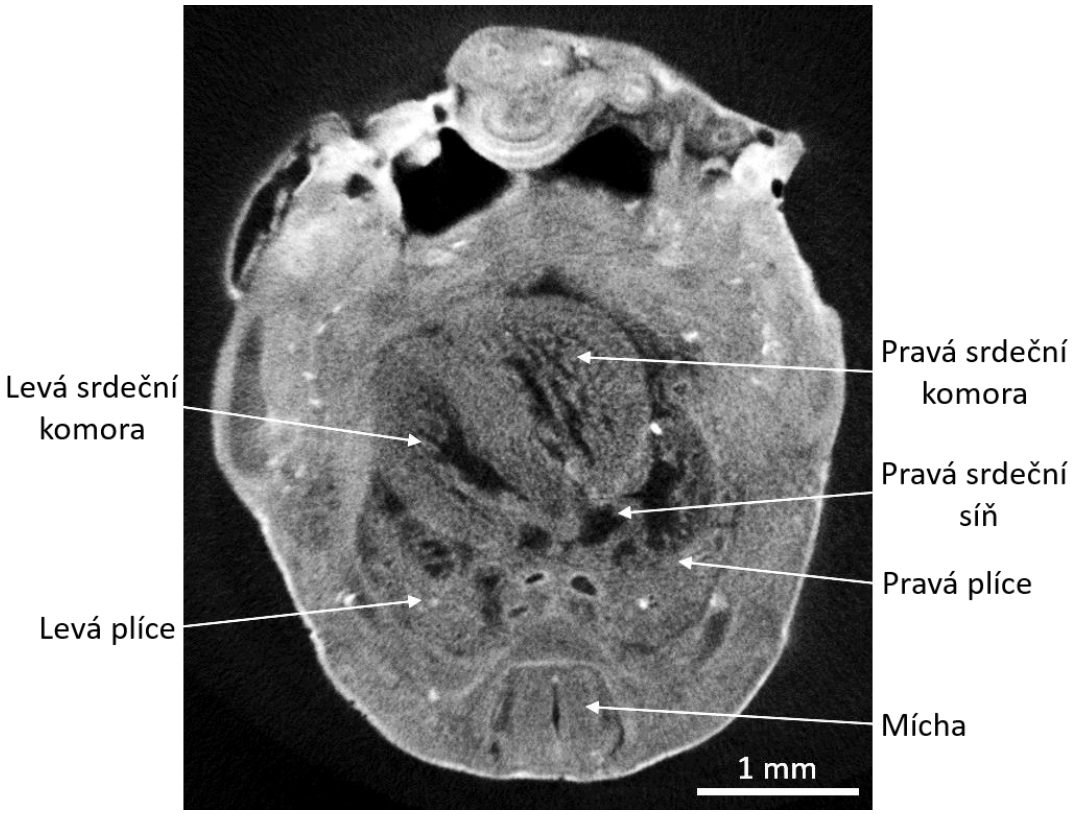
Obr. 6.11: Sagitální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.



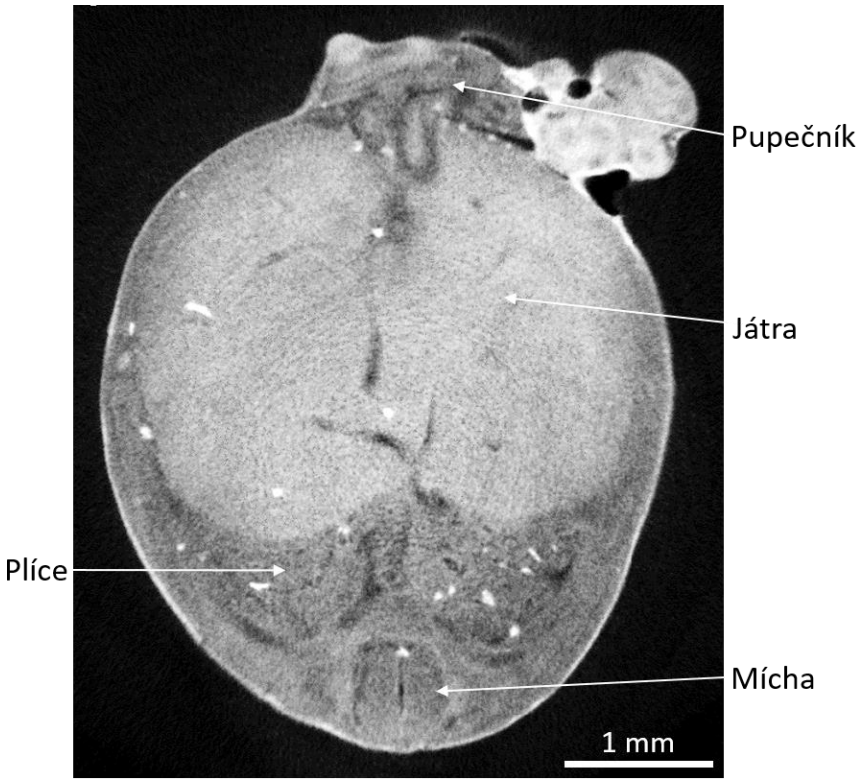
Obr. 6.12: Sagitální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.



Obr. 6.13: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.



Obr. 6.14: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.



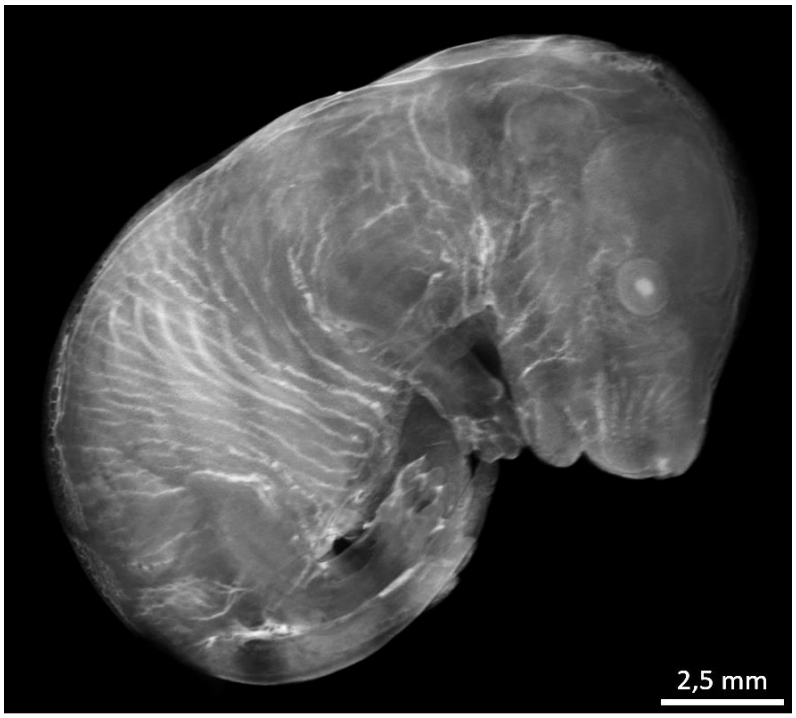
Obr. 6.15: Transverzální řez E14 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 8,8 μm.

Výsledné vizualizace E14 stádia laboratorní myši ukazují obrovská játra zabírající většinu břišní dutiny a utlačující střevní kličky. Můžeme si taktéž všimnout poměrně velkého srdce a naopak malých plic.

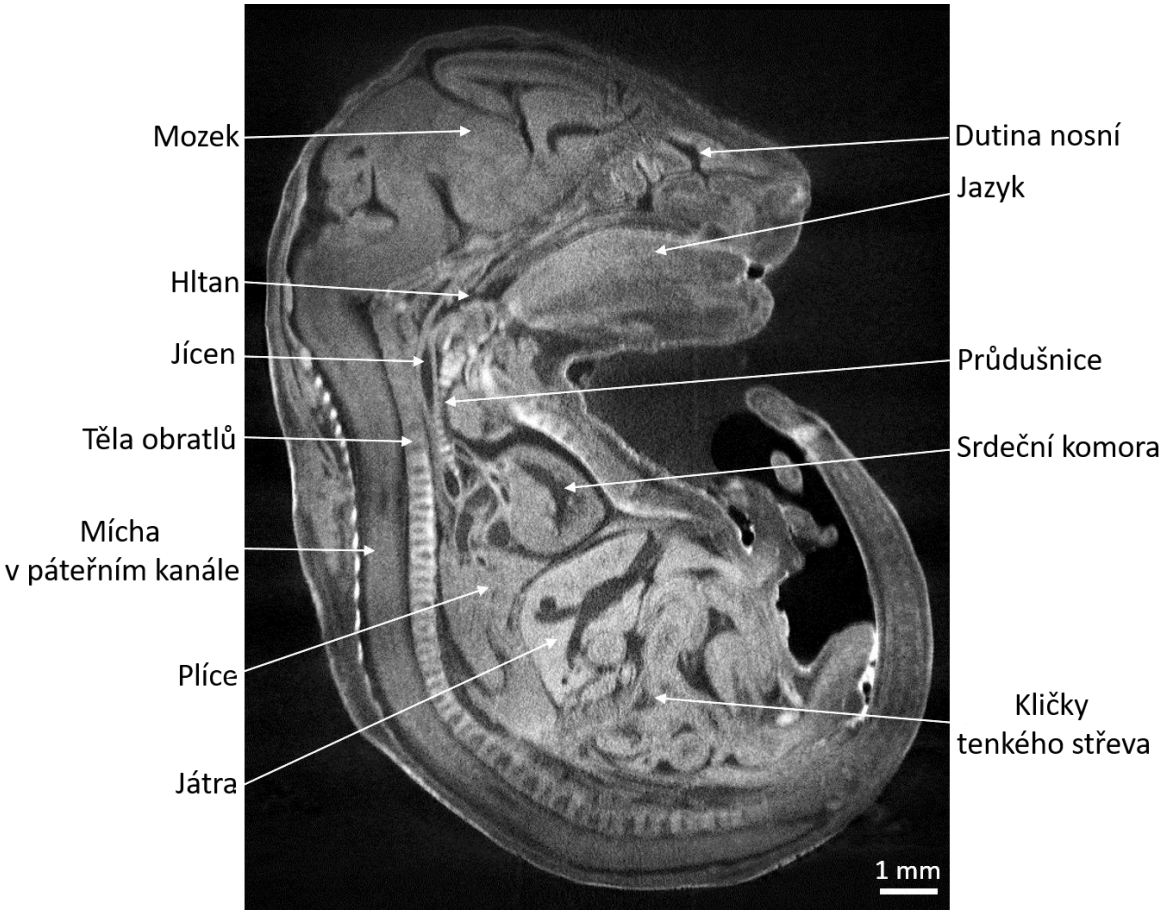
6.3.2 Vizualizace E18 stádia laboratorní myši

E18 stádium laboratorní myši bylo připraveno na základě vybraného protokolu charakterizovaného v kapitole 6.2.2. Následně bylo s tímto vzorkem uskutečněno měření 10 (M10), při kterém byly nastaveny parametry tak, aby bylo možné rozeznat detaily jednotlivých orgánových soustav.

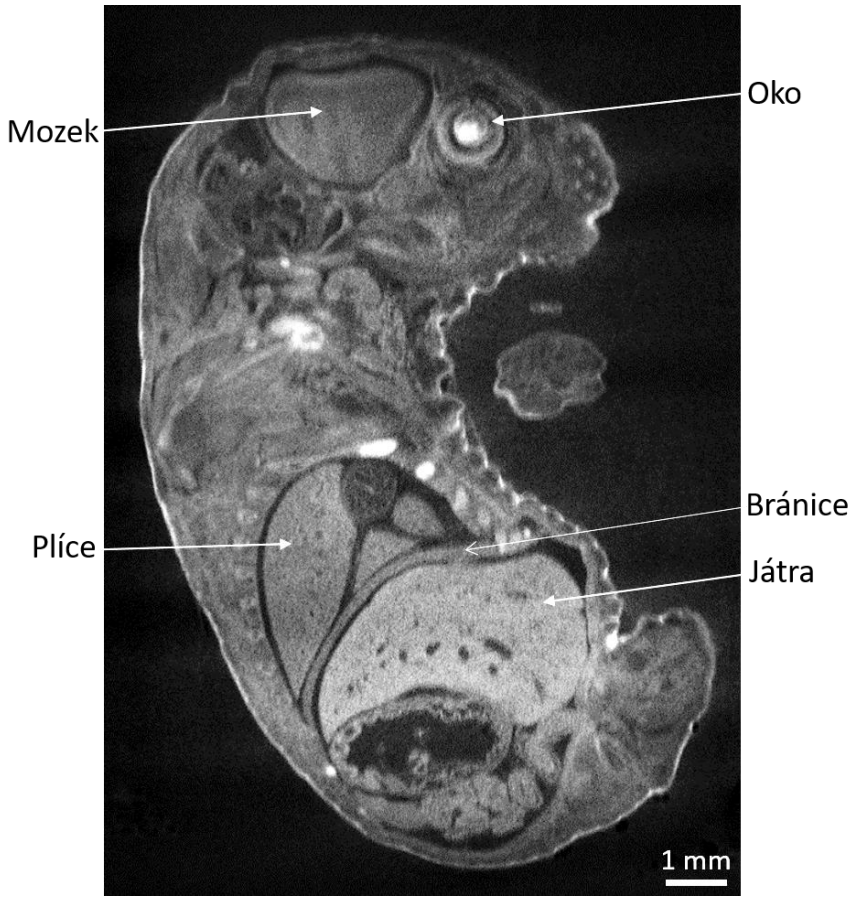
Následující podkapitola tedy vizualizuje E18 stádium laboratorní myši. Představuje zrekonstruovaný 3D model (Obr. 6.16) i příslušné sagitální (Obr. 6.17, Obr. 6.18) a transverzální řezy (Obr. 6.19, Obr. 6.20, Obr. 6.21).



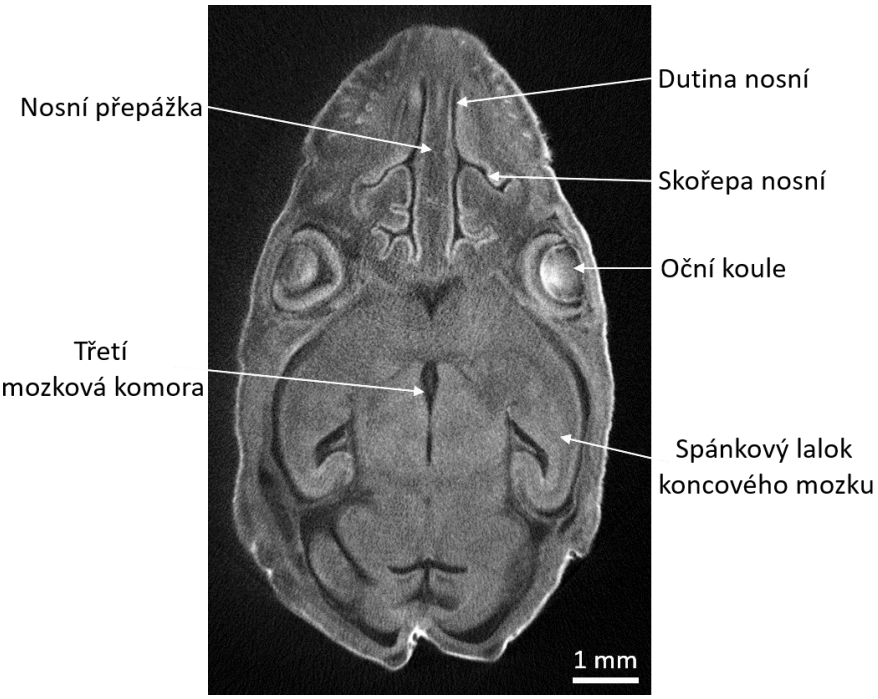
Obr. 6.16: Zrekonstruovaný virtuální 3D model E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.



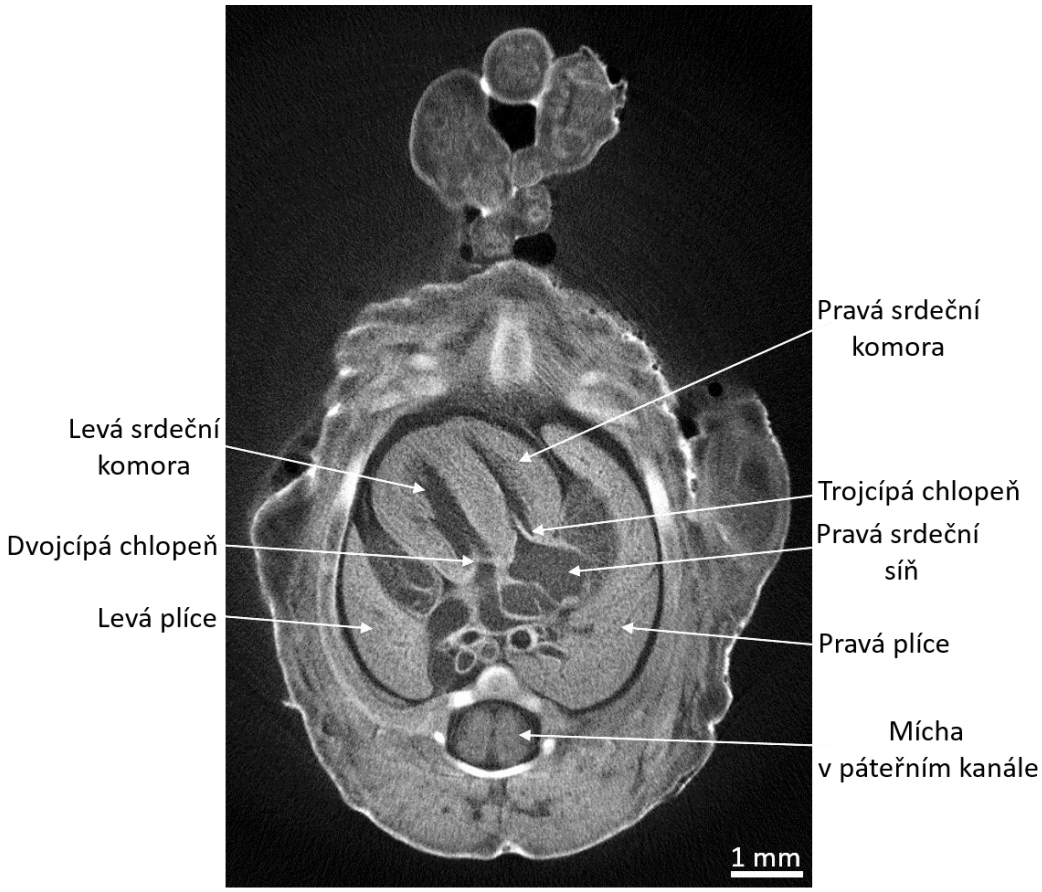
Obr. 6.17: Sagitální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.



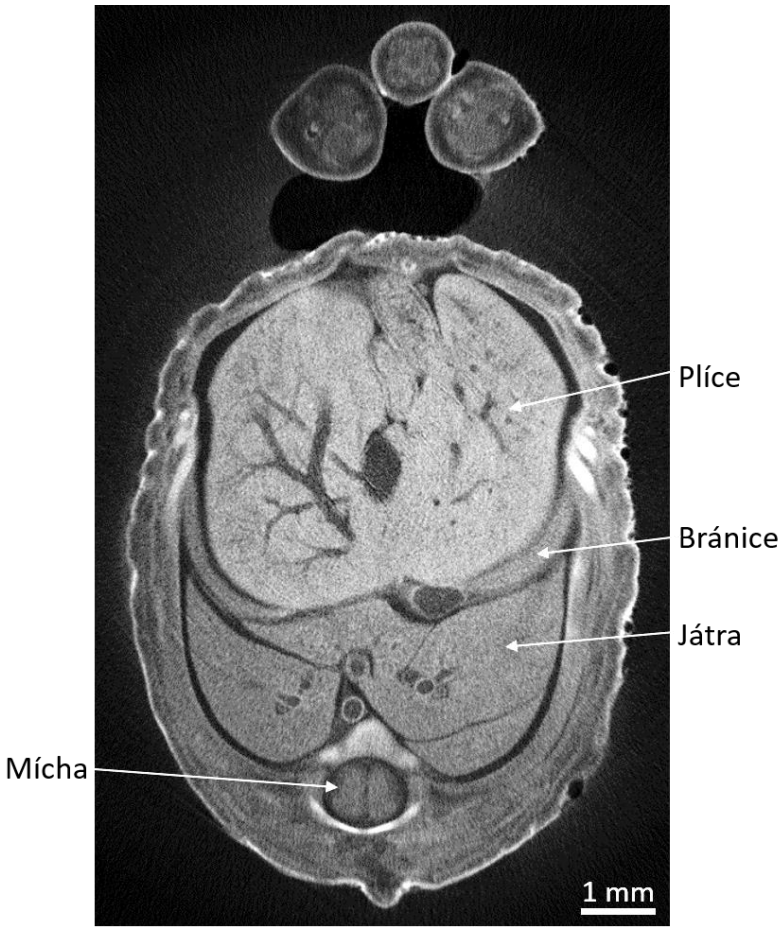
Obr. 6.18: Sagitální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.



Obr. 6.19: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.



Obr. 6.20: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.



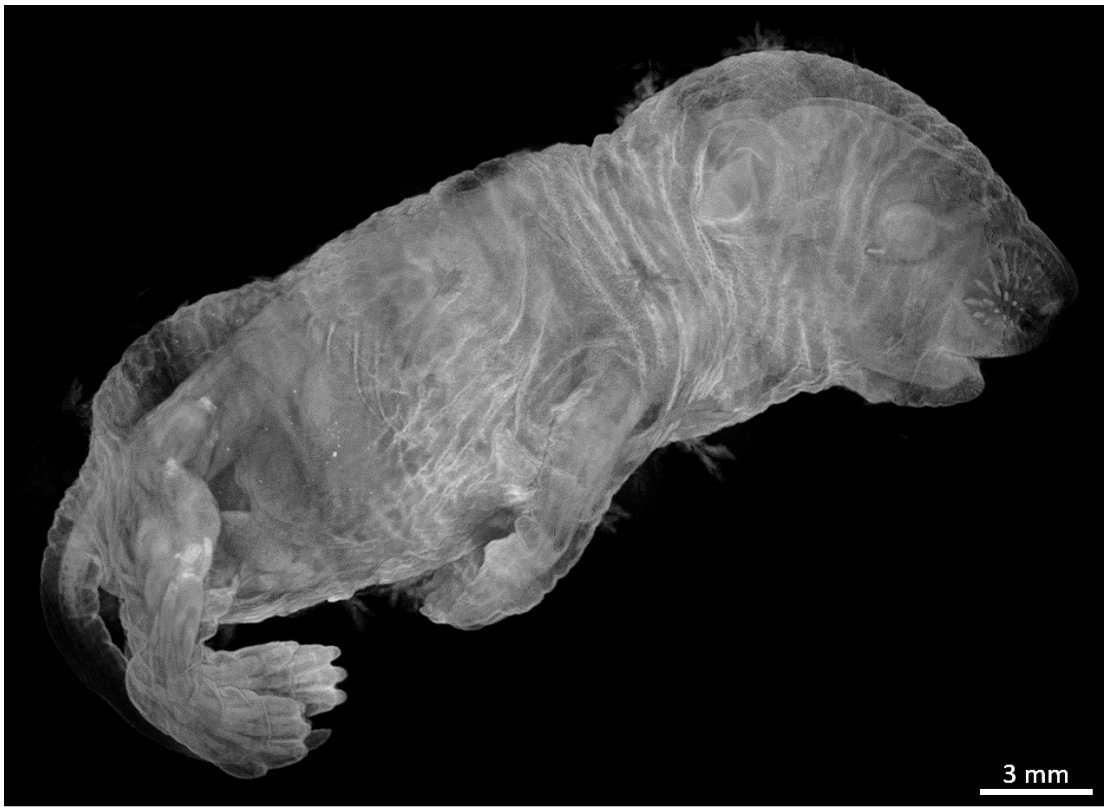
Obr. 6.21: Transverzální řez E18 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,1 μm.

Výsledné vizualizace E18 stádia laboratorní myši ukazují, že většina orgánových soustav je již založená, pouze dochází k jejich dalšímu vývoji.

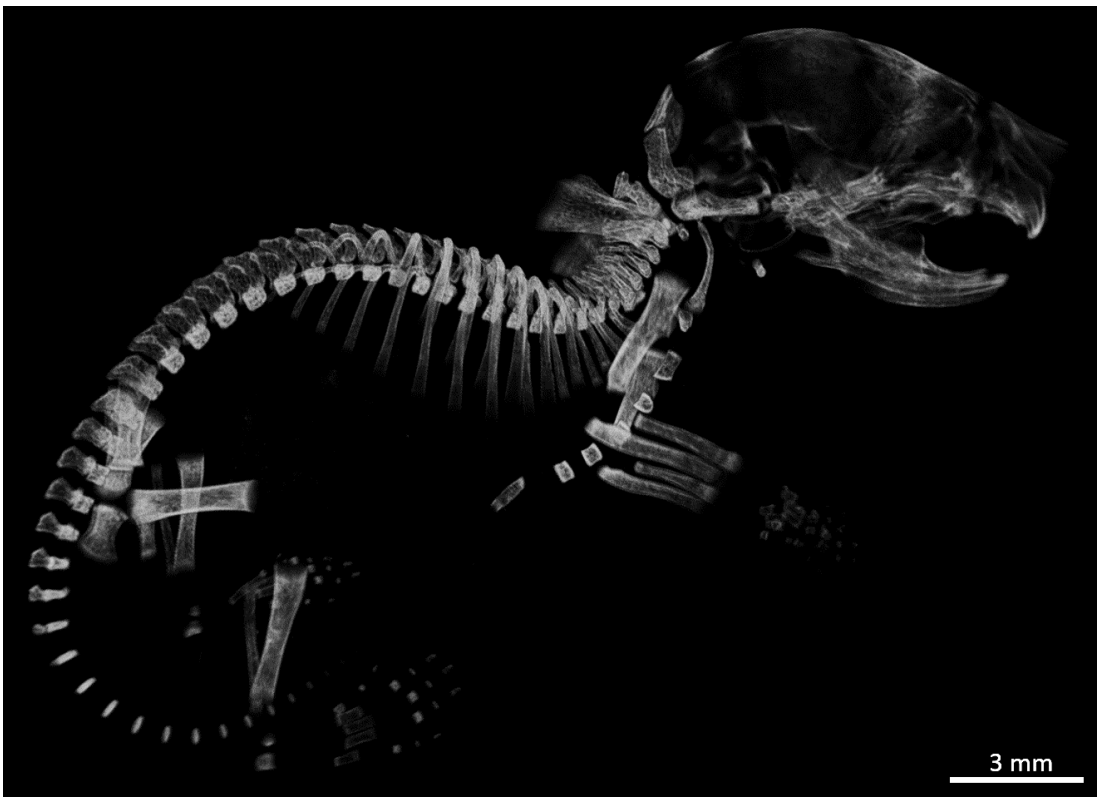
6.3.3 Vizualizace P1 stádia laboratorní myši

Na základě vybraného protokolu charakterizovaného v kapitole 6.2.1 bylo připraveno P1 stádium laboratorní myši a následně bylo uskutečněno měření 8 (M8). Při tomto měření byly nastaveny parametry tak, aby bylo možné rozeznat detaily jednotlivých orgánových soustav.

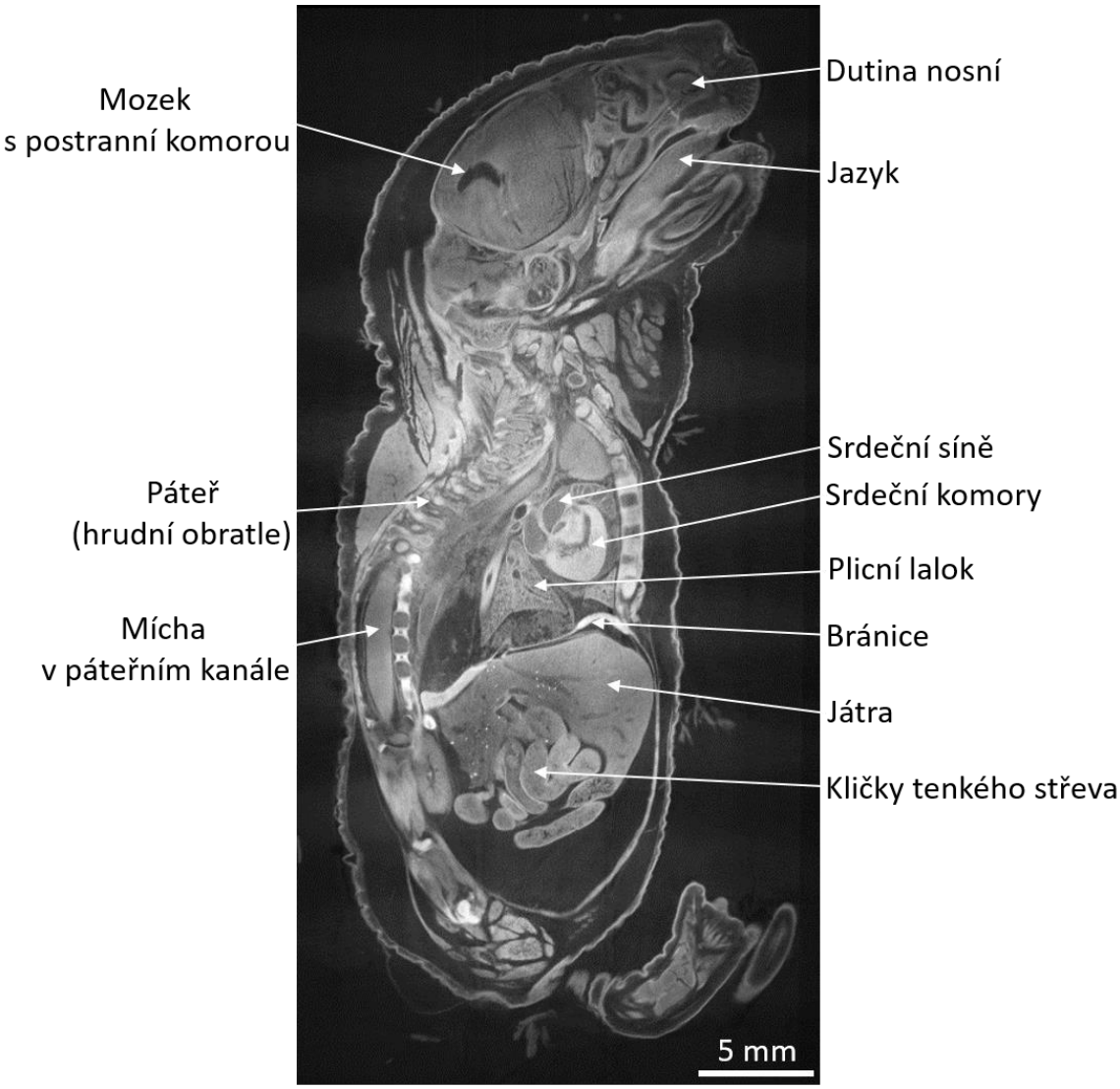
Následující podkapitola tedy vizualizuje P1 stádium laboratorní myši. Ukazuje jak zrekonstruovaný 3D model (Obr. 6.22), tak příslušné sagitální (Obr. 6.24, Obr. 6.25) a transverzální řezy (Obr. 6.26, Obr. 6.27, Obr. 6.28, Obr. 6.29) a také 3D model kosterní soustavy (Obr. 6.23).



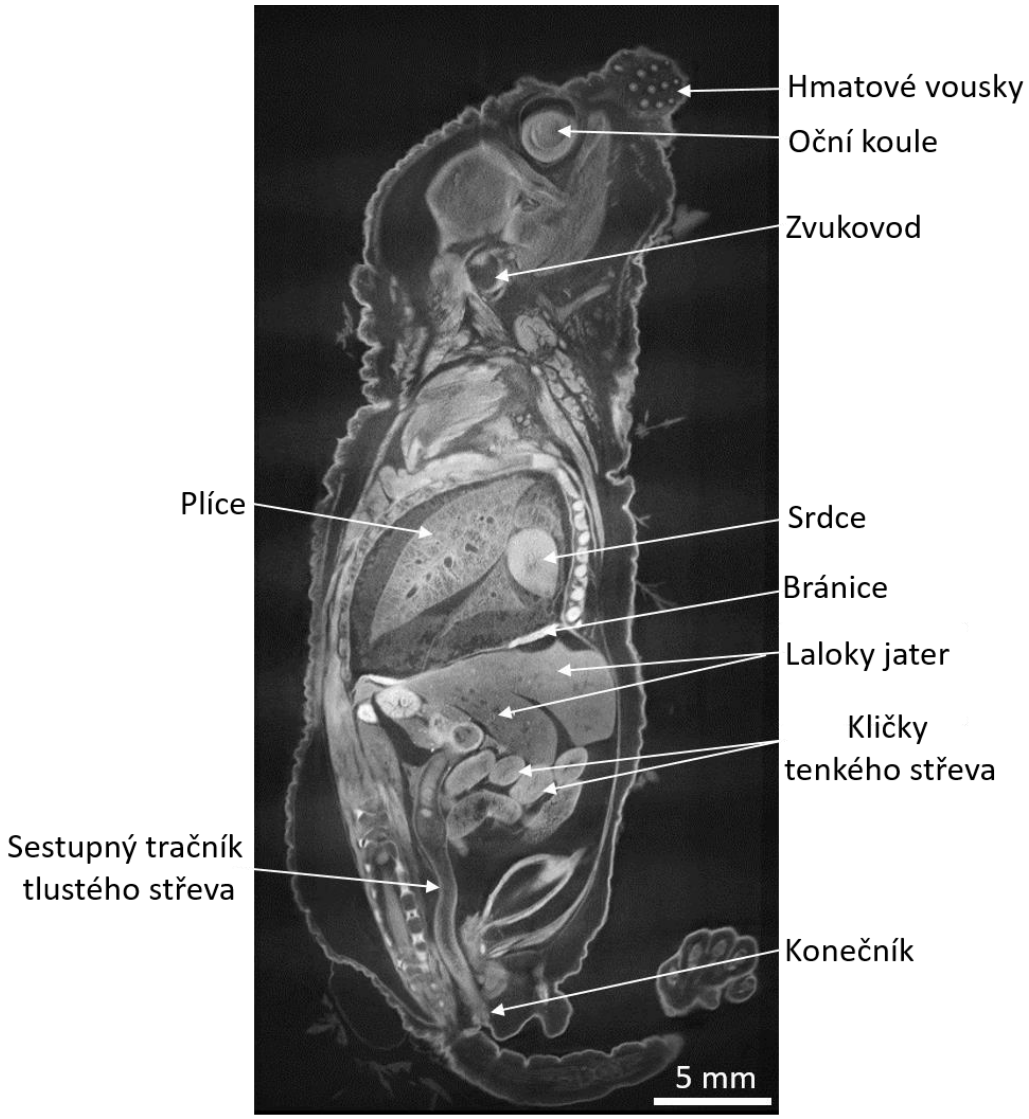
Obr. 6.22: Zrekonstruovaný virtuální 3D model P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



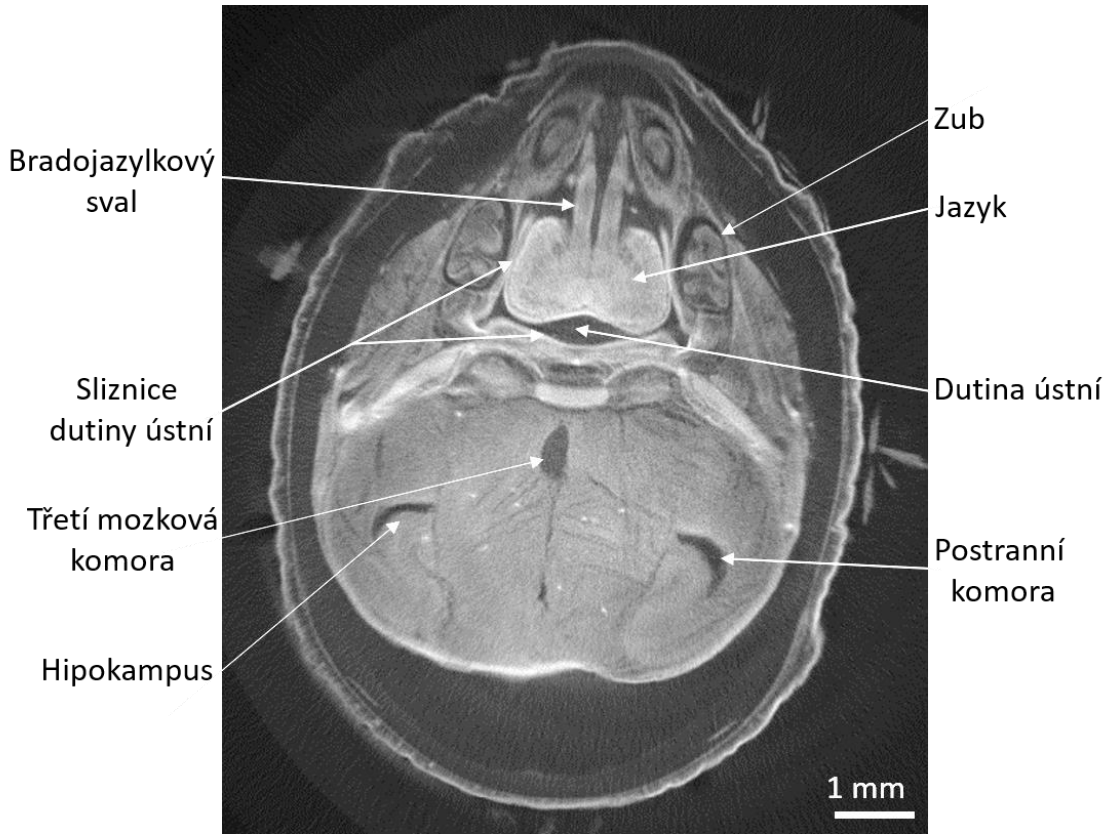
Obr. 6.23: Zrekonstruovaný virtuální 3D model kosterní soustavy P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



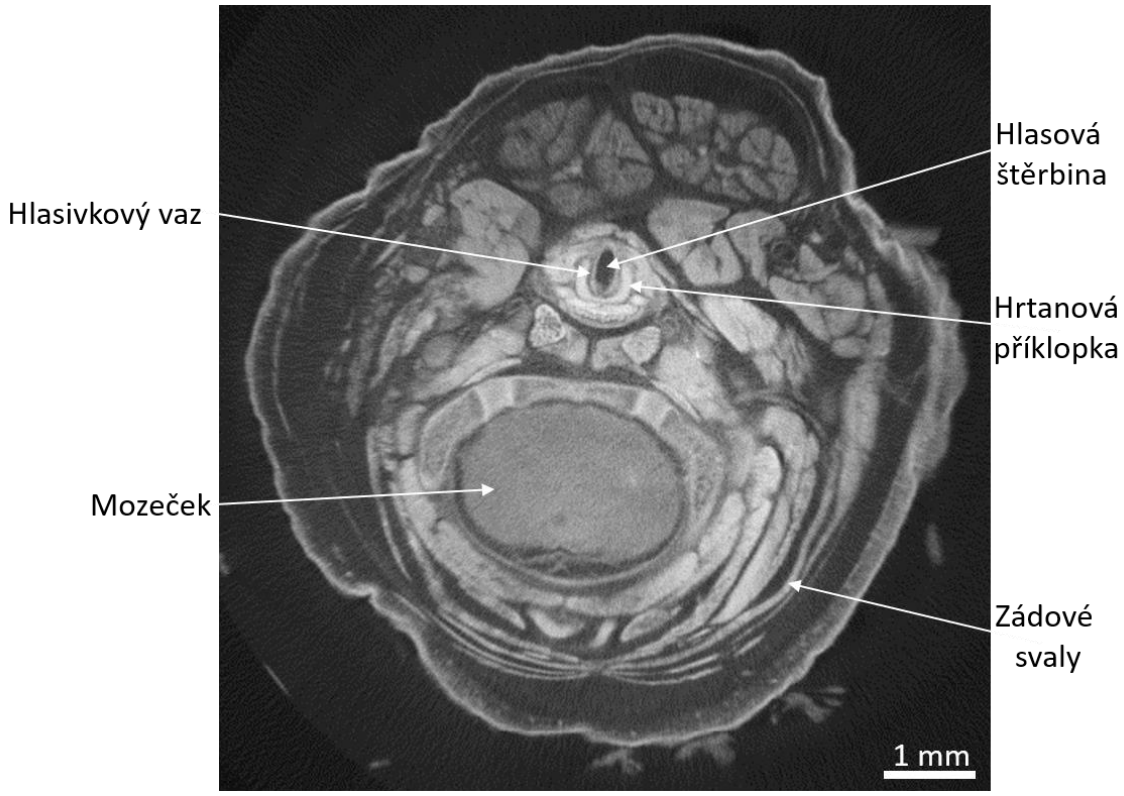
Obr. 6.24: Sagitální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



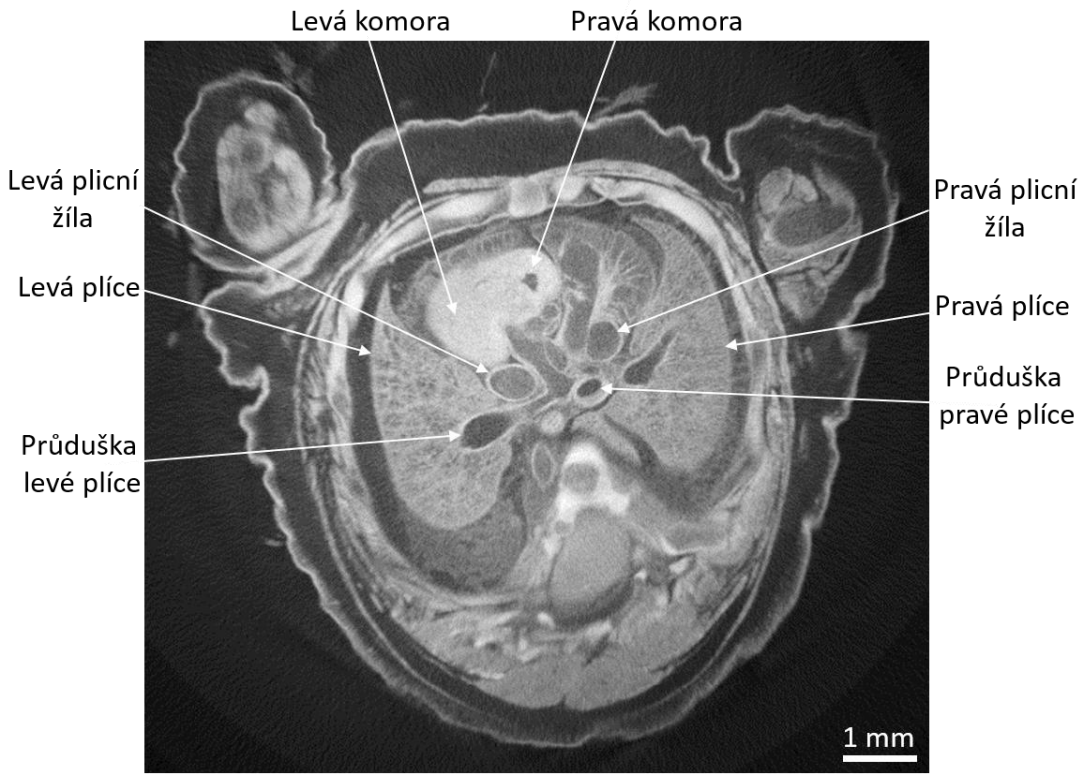
Obr. 6.25: Sagitální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



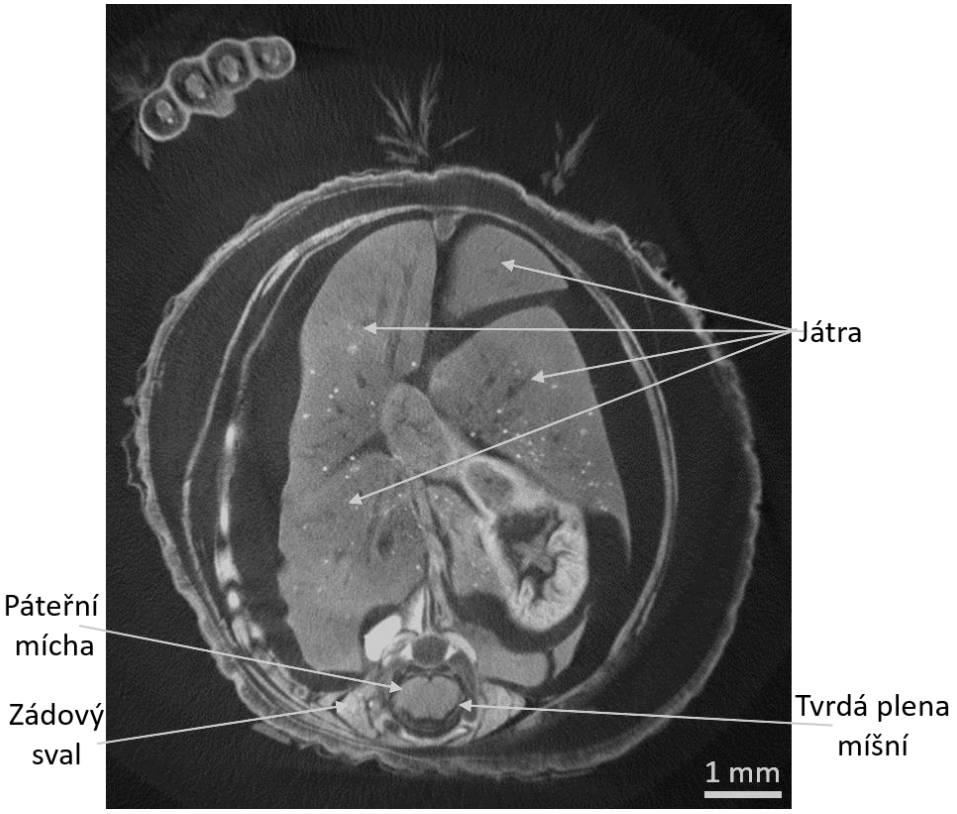
Obr. 6.26: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



Obr. 6.27: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



Obr. 6.28: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.



Obr. 6.29: Transverzální řez P1 stádia laboratorní myši připraveného dle vybraného protokolu. EPS = 12,43 μm.

Výsledné vizualizace naměřených dat P1 stádia laboratorní myši dokazují ukončený vývoj většiny orgánových soustav. Díky vybranému protokolu je možné rozeznat všechny významné orgány, ale i takové struktury jako jsou např. jednotlivé svalové skupiny, fascie svalů, míšní kořeny a obaly, hlasivky a vrstvu buněk tvořící sliznice.

7 Diskuse

V mé diplomové práci s názvem Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze bylo hlavním cílem prokázat, že metodu RTG mikro-CT lze využít pro monitorování embryonálního vývoje savců na laboratorních myších. K dosažení tohoto cíle bylo nutné vytvořit vhodný protokol pro přípravu vzorků, a to prováděním experimentálních měření různě připravovaných vzorků a vyhodnocováním naměřených dat. Získané výsledky zkoumaných embryonálních a postnatálních stádií byly následně konzultovány s anatomy pro ověření, zda se jedná či nejedná o užitečný nástroj.

Vzhledem k tomu, že RTG laboratoř pod ÚTEF ČVUT v Praze, ve které byly prováděny experimenty, je v principu fyzikální pracoviště, byly pro přípravu vzorků, tedy stabilizaci, kontrastování a mechanickou fixaci voleny co nejjednodušší postupy s využitím netoxických látek. K optimalizování těchto přípravných procesů a ke zvolení vhodného protokolu bylo jako referenční stádium využíváno P1 stádium laboratorní myši, jelikož dostupnost embryonálních vzorků je značně horší.

Jak je známo, RTG metody jsou běžně používané metody pro zobrazování kostní tkáně v humánní medicíně i u zvířecích vzorků v experimentech, avšak zobrazování měkkých tkání je značně omezeno nízkým RTG kontrastem, jelikož veškerý kontrast je způsoben malými rozdíly v hustotě a složení. [40] Tento fakt byl v mé diplomové práci demonstrován pomocí M1, kde CT rekonstrukce nativního vzorku (bez stabilizace i kontrastování) odhaluje pouze kostní tkáň a struktury vyplněné vzduchem. Měkké tkáně od sebe u takto skenovaného vzorku rozeznat nelze.

Jako další byl experimentálně zobrazen vzorek stabilizovaný vzestupnou alkoholovou řadou, v tomto případě 50% a následně 75% roztokem etanolu. Při M2 bylo dosaženo o něco vyššího kontrastu než při M1, a to pravděpodobně kvůli dehydratačnímu účinku alkoholu na proteiny způsobující kondenzaci, jak uvádí dostupný zdroj. [40] Nicméně ani v tomto případě není však možné rozeznat měkké tkáně.

Ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření je tedy při zobrazování měkkých tkání embryonálních a postnatálních stádií laboratorní myši nutné využití kontrastní látky s vysokým Z. [41] Dalším experimentem bylo tedy M3, při kterém byla použita kontrastní látka IKI s jodem jakožto kontrastním činidlem. I když díky afinitě jodu ke svalové tkáni došlo k jejímu zviditelnění, rozpoznání jednotlivých měkkých tkání opět možné nebylo.

CT rekonstrukce ukázaly pouze tukovou tkáň a stíny v oblasti břišní dutiny naznačující přítomnost vnitřních orgánů.

V dalším experimentu byl zkombinován proces stabilizace vzestupnou alkoholovou řadou, v tomto případě 50%, 75% a 96% roztokem etanolu, a proces kontrastování IKI. Výsledná CT rekonstrukce M4 ukazuje poměrně dobré výsledky, již je možné rozeznat některé vnitřní orgány (srdce, játra, plíce a bránici). Ostatní vnitřní orgány však stále vizualizovat nelze.

Jelikož ve všech předchozích experimentech docházelo během měření vlivem vzduchu k vysychání vzorku umístěného ve zkumavce a zkoumaný vzorek se během měření také lehce pohyboval, vznikaly v zrekonstruovaných CT obrazech pohybové artefakty. Tato skutečnost byla eliminována v M5 mechanickou fixací za použití potravinářské želatiny. Bohužel však docházelo k difundování kontrastní látky z tkání do okolního prostředí, čemuž bylo v následných experimentech zabráněno okamžitým měřením po zalití vzorku do potravinářské želatiny.

Při dalším experimentu byla zvolena postupnější etanolová řada (25 % – 50 % – 75 %) s koncentrovanější kontrastní látkou IKI. Bylo však zjištěno, že ani při zvyšování koncentrace z 10 % na 40 % nedojde k požadovanému zobrazení měkkých tkání. Při M6 byl také k experimentu jako kontrastní látka použit Lugolův roztok (opět s jodem jako kontrastním činidlem). Jeho kombinace se stabilizací etanolem vykazovala výborný kontrast u měkkých tkání a výborné zobrazení vnitřních orgánů. Důvodem naprosto rozdílných výsledků by mohlo být použití odlišného rozpouštědla pro totožné kontrastní činidlo. IKI (rozpouštědlo etanol) na rozdíl od Lugolova roztoku (rozpouštědlo voda) tedy proniká do tkání obtížněji vůči stabilizaci etanolem.

Posledním experimentem k ustanovení optimálního protokolu bylo M7, při kterém bylo cílem stanovit dobu potřebnou k proniknutí Lugolova roztoku do celého objemu vzorku, jelikož při M7 ani po 72 h nedošlo k úplnému prokontrastování střední části a zde uložené orgány tak nebylo možné rozeznat. Za dostačující byla u P1 stádia laboratorní myši stanovena doba 6 dní.

Těmito postupnými experimenty byly optimalizovány procesy přípravy vzorků a na jejich základě byl charakterizován vhodný protokol pro přípravu embryonálních i postnatálních stádií laboratorní myši využitý k dosažení hlavního cíle mé diplomové práce, tedy k prokázání, že mikro-CT systém lze využít pro monitorování embryonálního

vývoje savců na laboratorních myších. Celý proces, skládající se ze čtyř kroků (stabilizace, kontrastování, mezikroku a mechanické fixace), tak zajistil dostatečně vysoký kontrast měkkých tkání.

Ke stabilizaci referenčního vzorku P1 stádia laboratorní myši tak byla použita vzestupná alkoholová řada skládající se z 25%, 50% a 96% etanolu. V každém roztoku byly vzorky ponořeny 24 h a v 96% etanolu 24 h a více. Jednalo se tedy o imerzní chemickou stabilizaci využitou k postupné dehydrataci laboratorních myší, která chrání tkáně před popraskáním. Etanol, běžně využívaný ke stabilizaci biologických preparátů např. v histologii, zabraňuje rozkladu tkání zastavením biologických procesů. Obecnou snahou procesu stabilizace je uchovat buňky a tkáně tak, aby nedošlo k přílišným změnám jejich struktury. Důvodem zvolení etanolu v tomto kroku přípravy vzorků byla také jeho netoxicita oproti používanému paraformaldehydu. Paraformaldehyd, běžně využívaný při konvenční histologii, nebyl použit také z důvodu potlačení denzitních rozdílů mezi jednotlivými tkáněmi, které jsou důležité pro zobrazování pomocí RTG systémů.

Druhým krokem při přípravě vzorků bylo kontrastování ke zvýšení diferenciálního útlumu RTG záření v měkkých tkáních, jelikož pouhá stabilizace neposkytovala požadovaný kontrast. Jako kontrastní látka byl experimentálně zvolen Lugolův roztok. Tato kontrastní látka byla vybrána nejen kvůli jejímu snadnému imerznímu použití, ale také kvůli její netoxicitě oproti konkurenční PTA a oxidu osmičelému. Velkou výhodou je taktéž její rychlé difundování zejména do svalových tkání a vysoký přenášený kontrast. Oproti testovanému IKI bylo pomocí Lugolova roztoku dosaženo v kombinaci s etanolem výborného kontrastu u měkkých tkání. Za optimální se u vzorků P1 stádií ukázala doba 6 dní.

Třetím krokem byl tzv. mezikrok skládající se z několika procesů. První proces opláchnutí vzorku 96% etanolem slouží k odstranění přebytečné kontrastní látky z povrchu vzorku. Po oschnutí vzorku následoval proces druhý, postříkání bezbarvým lakem, omezující difundování kontrastní látky do okolního prostředí. Po zaschnutí bezbarvého laku byl proveden proces poslední, a to namočení vzorku do destilované vody pomáhající přilnutí agarózového gelu při zalévání stádia v kroku čtvrtém.

Čtvrtým a zároveň posledním krokem přípravy vzorků před měřením byla mechanická fixace agarózovým gelem, která zajistila dostatečnou stabilitu vzorku. Tento krok byl zařazen na základě vznikajících pohybových artefaktů při rekonstrukci

naměřených CT dat v důsledku vysychání vzorků vlivem vzduchu a pohybů při měření. Namísto potravinářské želatiny využívané k ustanovení vhodného protokolu byl ke kroku mechanické fixace jednotlivých vývojových stádií zvolen agarózový gel jako naprosto čisté médium bez příměsí.

Optimální protokol byl také charakterizován pro přípravu vzorků stádií E. Oproti protokolu charakterizovanému pro stádium P1 musel být optimalizován proces stabilizace a jednotlivé doby procesů přípravy. Vzorky stádií E18 a E14 byly nejdříve ponořeny ve 30% roztoku etanolu 12 h, poté v 50% roztoku etanolu 12 h, dále v 70% roztoku etanolu 12 h a nakonec v 96% etanolu 12 a více h. Tato širší vzestupná řada a kratší doby stabilizace byly zvoleny, aby se zabránilo deformaci tkání takto malých vzorků. Optimalizována byla vzhledem k malé velikosti vzorků také doba kontrastování, a to na dostačující 2 dny.

K prokázání, že metodu mikro-CT lze použít k monitorování embryonálního vývoje savců na laboratorních myších bylo také nutné uskutečnit měření různých vývojových stádií. V mé diplomové práci byla k tomuto kroku použita stádia E14, E18 a P1. Standardní časový úsek používaný ke studiu embryonálního vývoje u laboratorních myší je přibližně od stádia E8,5 po P3. [46] Jelikož vývoj laboratorní myši je poměrně velmi rychlý, ke zkoumání samotného embryonálního vývoje by bylo nutné doplnit chybějící fáze. Tato skutečnost tak dává příležitost odborným pracovníkům a dalším studentům pokračovat v naznačeném výzkumu detailněji.

Získané výsledky zkoumaných stádií laboratorní myši byly konzultovány s anatomy a přírodovědci pro ověření, zda mikro-CT je či není užitečný nástroj. Všichni se jednotně shodli, že mikro-CT systém je velmi užitečný nástroj pro monitorování embryonálního vývoje savců na laboratorních myších, a že bylo na anatomické úrovni dosaženo obdivuhodných výsledků. U všech zobrazených stádií byly viditelné i detailní struktury. Zejména pak u stádia P1 došlo k vizualizaci i struktur jako je např. páteřní mícha, míšní obaly, jednotlivé svalové skupiny, hlasivky, hrtanová příklopka, zrakový nerv a sliznice dutiny ústní.

8 Závěr

V diplomové práci s názvem Rentgenové mikro-CT jako nástroj pro 4D monitorování embryogeneze bylo cílem na vzorcích laboratorních myší dokázat, že metodu RTG mikro-CT lze využít pro monitorování embryonálního vývoje savců. Nejdříve bylo nutné charakterizovat vhodný protokol pro přípravu vzorků laboratorních myší tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího kontrastu u měkkých tkání. Na systému mikro-CT vybudovaného v ÚTEF ČVUT v Praze byla tedy uskutečněna experimentální měření P1 stádia s různými variantami přípravy a naměřená data byla následně vyhodnocována, aby bylo možné určit, zda bylo dosaženo lepších výsledků než v předešlém měření.

K přípravě vzorků bylo snahou volit co nejjednodušší postupy a netoxické látky pro snadnou reprodukovatelnost na radiografických pracovištích. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že nejúčinnější příprava vzorků se bude skládat z procesu stabilizace za použití vzestupné etanolové řady sloužící k postupné dehydrataci tkání laboratorních myší, následného kontrastování Lugolovým roztokem s jodem jakožto kontrastním činidlem zvyšujícím diferenciální útlum měkkých tkání, tzv. mezikroku zejména omezujícího difundování kontrastní látky z tkání a z mechanické fixace pomocí agarózového gelu zabraňující nadměrnému vysychání a pohybům vzorku při měření. Experimentálně bylo také zjištěno, že měření je nutné provést ihned po posledním kroku, aby nedocházelo ke snižování kontrastu periférií vzorku opět difuzí kontrastní látky do okolního prostředí.

K dosažení stanoveného cíle bylo také nutné na základě vybraného protokolu zhotovit tomografická měření různých embryonálních a postnatálních stádií laboratorní myši. Byla vizualizována stádia E14, E18 a P1, čímž bylo prokázáno, že metodu RTG mikro-CT lze využít pro 3D zobrazování s vysokým prostorovým rozlišením a výsledky implementovat pro studium embryonálního vývoje laboratorních myší. Mikro-CT má oproti konkurenčním metodám nespočet výhod, i když není ještě možné nahradit celulární a subcelulární rozlišení získávané histologickou analýzou. Mikro-CT oproti OPT dovoluje zkoumání i neprůhledných vzorků, oproti HREM je jednoduché a rychlé z hlediska přípravy vzorků a oproti mikro-MR je komerčně dostupné.

Pomocí mikro-CT systému a vybraného protokolu byly podle morfologického hodnocení získány překvapivě detailní výsledky na anatomické úrovni. Tato skutečnost by tak mohla být využita k rozšíření histologicko–embryologické studie. Histologie opírající se o dvourozměrné histologické řezy by díky této metodě dostala i prostorovou složku. Navíc by metoda mikro-CT mohla být v tomto směru také využita na prostorové zaměření jednotlivých řezů pro následnou histologickou analýzu vzorků. Výsledné vizualizace jednotlivých stádií s doplněnými mezifázemi by bylo v dalším výzkumu možné použít i pro zkoumání vrozených vývojových vad, které vznikají na základě abnormálního ontogenetického vývoje či vad získaných. Na jednotlivých stádiích by tak bylo možné zkoumat např. možné teratogenní účinky nových farmak i jiných chemických látek.

Seznam použité literatury

[1] DUDAK, Jan, Jan ZEMLICKA, Jakub KARCH, et al. High-contrast X-ray micro-radiography and micro-CT of ex-vivo soft tissue murine organs utilizing ethanol fixation and large area photon-counting detector. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6(1) [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1038/srep30385. ISSN 2045-2322. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/srep30385

[2] CHEN, Hongyu, Melissa M. ROGALSKI a Jeffrey N. ANKER. Advances in functional X-ray imaging techniques and contrast agents. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2012, 14(39) [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1039/c2cp41858d. ISSN 1463-9076. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cp41858d

[3] WONG, M. D., A. E. DORR, J. R. WALLS, J. P. LERCH a R. M. HENKELMAN. A novel 3D mouse embryo atlas based on micro-CT. *Development* [online]. 2012, 139(17), 3248-3256 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1242/dev.082016. ISSN 0950-1991. Dostupné z: http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.082016

[4] MOHUN, T. J. a W. J. WENINGER. Episcopic Three-Dimensional Imaging of Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2012, 2012(6), pdb.top069567-pdb.top069567 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1101/pdb.top069567. ISSN 1559-6095. Dostupné z: http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.top069567

[5] PODZIMEK, František. *Radiologická fyzika: fyzika ionizujícího záření.* V Praze: České vysoké učení technické, 2013. ISBN 978-80-01-05319-5.

[6] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1152-4.

[7] SEIDL, Zdeněk. *Radiologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-4108-6.

[8] ULLMANN, Vojtěch. *Jaderná a radiační fyzika.* Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Fakulta zdravotnických studií, 2009. ISBN 978-80-7368-669-7.

[9] ROSINA, Jozef. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.

[10] ROSINA, Jozef, Hana KOLÁŘOVÁ a Jiří STANEK. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů.* Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1383-7.

[11] MORNSTEIN, Vojtěch, Ivo HRAZDIRA a Aleš BOUREK. *Lékařská fyzika a informatika: (se zaměřením na zubní lékařství).* Brno: Neptun, 2007. ISBN 978-80-86850-02-3.

[12] BENEŠ, Jiří, Jaroslava KYMPLOVÁ a František VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi.* Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.

[13] FERDA, Jiří, Hynek MÍRKA, Jan BAXA a Alexander MALÁN. *Základy zobrazovacích metod.* Praha: Galén, [2015]. ISBN 978-80-7492-164-3.

[14] BUSHBERG, Jerrold T. *The essential physics of medical imaging*. Third edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

[15] SÚKUPOVÁ, Lucie. *Radiační ochrana při rentgenových výkonech - to nejdůležitější pro praxi.* Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0709-4.

[16] VOMÁČKA, Jaroslav, Josef NEKULA a Jiří KOZÁK. *Zobrazovací metody pro radiologické asistenty.* V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3126-0.

[17] KERRIDGE, Brian. Sharpen x-ray images. In: *EDN: NETWORK* [online]. c2019, June 01, 2002 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.edn.com/design/test-and-measurement/4385159/Sharpen-x-ray-images

[18] DUDAK, J., J. KARCH, K. HOLCOVA a J. ZEMLICKA. X-ray imaging with sub-micron resolution using large-area photon counting detectors Timepix. *Journal of Instrumentation* [online]. 2017, 12(12), C12024-C12024 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1088/1748-0221/12/12/C12024. ISSN 1748-0221. Dostupné z:

http://stacks.iop.org/1748-0221/12/i=12/a=C12024?key=crossref.4db6b6159f1991ab10a2dcd146ef4318
[19] ULLMANN, Vojtěch. Aplikace ionizujícího záření: jaderné a radiační metody. *Astro Nukl Fyzika: jaderná fyzika - astrofyzika - kosmologie - filosofie* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: http://astronuklfyzika.cz/JadRadMetody.htm#2
[20] JAKUBEK, Jan. Data processing and image reconstruction methods for pixel detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* [online]. 2007, 576(1), 223-234 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/j.nima.2007.01.157. ISSN 01689002. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900207002380
[21] JAKŮBEK, J. Semiconductor Pixel detectors and their applications in life sciences. *Journal of Instrumentation* [online]. 2009, 4(03), P03013-P03013 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1088/1748-0221/4/03/P03013. ISSN 1748-0221. Dostupné z: http://stacks.iop.org/1748-0221/4/i=03/a=P03013?key=crossref.32400348b8a6962987996c0a9ad4bd82
[22] DUDAK, Jan, Jan ZEMLICKA, Frantisek KREJCI, Stepan POLANSKY, Jan JAKUBEK, Jana MRZILKOVA, Matej PATZELT a Jan TRNKA. X-ray micro-CT scanner for small animal imaging based on Timepix detector technology. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* [online]. 2015, 773, 81-86 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.nima.2014.10.076. ISSN 01689002. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900214012443
[23] JAKUBEK, J, M JAKUBEK, M PLATKEVIC, P SOUKUP, D TURECEK, V SYKORA a D VAVRIK. Large area pixel detector WIDEPIX with full area sensitivity composed of 100 Timepix assemblies with edgeless sensors. *Journal of Instrumentation* [online]. 2014, 9(04), C04018-C04018 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1088/1748-0221/9/04/C04018. ISSN 1748-0221. Dostupné z: http://stacks.iop.org/1748-0221/9/i=04/a=C04018?key=crossref.f2a69104b0c9c9fd3f36b520dc22c6a2
[24] Medipix: collaboration. CERN: Accelerating science [online]. c2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: http://medipix.web.cern.ch
[25] JAKŮBEK, Jan. *Zobrazování malých objektů v jiném světle: Umění vidět neviditelné.* Vesmír: Časopis pro šíření vědy přírodní, země- a národopisné [online]. 2008, 87(7), 436-438 [cit. 2019-04-07]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2008/cislo-7/zobrazovani-malych-objektu-jinem-svetle.html
[26] MATHISZIK, Boris. Closing the gap between AXI and semi-automated systems. In: *Embedded: Cracking the code to systems development* [online]. c2019, August 01, 2005 [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: https://www.embedded.com/print/4382009
[27] FERDA, Jiří, Hynek MÍRKA a Jan BAXA. *Multidetektorová výpočetní tomografie: technika vyšetření.* Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-608-3.
[28] BENEŠ, Jiří, Pravoslav STRÁNSKÝ a František VÍTEK. *Základy lékařské biofyziky*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1009-4.
[29] SMITH, Steven W. Special Imaging Techniques: Signal-to-Noise Ratio. *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing* [online]. Hard Cover, 1997 [cit. 2019-03-18]. ISBN 0-9660176-3-3. Dostupné z: http://www.dspguide.com
[30] METSCHER, Brian D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology* [online]. 2009, 9(1) [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1186/1472-6793-9-11. ISSN 1472-6793. Dostupné z: http://bmcphysiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6793-9-11
[31] DHENAIN, Marc, Seth W. RUFFINS a Russell E. JACOBS. Three-Dimensional Digital Mouse Atlas Using High-Resolution MRI. *Developmental Biology* [online]. 2001, 232(2), 458-470 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1006/dbio.2001.0189.

ISSN 00121606. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160601901897

[32] WENINGER, Wolfgang J., Stefan H. GEYER, Timothy J. MOHUN, et al. High-resolution episcopic microscopy: a rapid technique for high detailed 3D analysis of gene activity in the context of tissue architecture and morphology. *Anatomy and Embryology* [online]. 2006, 211(3), 213-221 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1007/s00429-005-0073-x. ISSN 0340-2061. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00429-005-0073-x

[33] HSU, Chih-Wei, Leeyean WONG, Tara L. RASMUSSEN, et al. Three-dimensional microCT imaging of mouse development from early post-implantation to early postnatal stages. *Developmental Biology* [online]. 2016, 419(2), 229-236 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.09.011. ISSN 00121606. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160616303992

[34] SHARPE, J. Optical Projection Tomography as a Tool for 3D Microscopy and Gene Expression Studies. *Science* [online]. 296(5567), 541-545 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1126/science.1068206. ISSN 00368075. Dostupné z: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1068206

[35] WONG, Michael D., Jun DAZAI, Johnathon R. WALLS, Nicholas W. GALE, R. Mark HENKELMAN a James P. BRODY. Design and Implementation of a Custom Built Optical Projection Tomography System. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(9) [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1371/journal.pone.0073491. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073491

[36] RUFFINS, Seth W., Melanie MARTIN, Lindsey KEOUGH, Salina TRUONG, Scott E. FRASER, Russell E. JACOBS a Rusty LANSFORD. Digital Three-Dimensional Atlas of Quail Development Using High-Resolution MRI. *The Scientific World JOURNAL* [online]. 2007, 7, 592-604 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1100/tsw.2007.125. ISSN 1537-744X. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/tswj/2007/259090/abs/

[37] WONG, Michael D., Shoshana SPRING, R. Mark HENKELMAN a Ryuichi MORISHITA. Structural Stabilization of Tissue for Embryo Phenotyping Using Micro-CT with Iodine Staining. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(12) [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0084321. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084321

[38] LI, Hao, Hui ZHANG, Zhiwei TANG a Guangshu HU. Micro-computed tomography for small animal imaging: Technological details. *Progress in Natural Science* [online]. 2008, 18(5), 513-521 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.01.002. ISSN 10020071. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108000658

[39] ASHTON, Jeffrey R., Jennifer L. WEST a Cristian T. BADEA. In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2015, 6 [cit. 2019-01-12]. DOI: 10.3389/fphar.2015.00256. ISSN 1663-9812. Dostupné z: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00256/abstract

[40] METSCHER, Brian D. MicroCT for developmental biology: A versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. Developmental Dynamics [online]. 2009, 238(3), 632-640 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1002/dvdy.21857. ISSN 10588388. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.21857

[41] JEFFERY, Nathan S., Robert S. STEPHENSON, James A. GALLAGHER, Jonathan C. JARVIS a Philip G. COX. Micro-computed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. *Journal of Biomechanics* [online]. 2011, 44(1), 189-192 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.08.027. ISSN 00219290. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929010004719

[42] FIRSCHING, Markus, Anthony P. BUTLER, Nicola SCOTT, Nigel G. ANDERSON, Thilo MICHEL a Gisela ANTON. Contrast agent recognition in small animal CT using the Medipix2 detector. *Nuclear Instruments and Methods*

in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment [online]. 2009, 607(1), 179-182 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1016/j.nima.2009.03.141. ISSN 01689002. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900209006378

[43] ANDERSON, N. G., A. P. BUTLER, N. J. A. SCOTT, et al. Spectroscopic (multi-energy) CT distinguishes iodine and barium contrast material in MICE. *European Radiology* [online]. 2010, 20(9), 2126-2134 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1007/s00330-010-1768-9. ISSN 0938-7994. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00330-010-1768-9

[44] Ex vivo staining of embryos (mouse) with phosphotungstic acid for soft tissue contrast in micro-CT imaging: Application note. In: *Micro Photonics Inc.: Instrumental to your success* [online]. 2019 [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: https://www.microphotonics.com/assets/base/doc/embryostainingwithPTAforexvivomicro-ctimaging.pdf

[45] BOLL, Hanne, Stefanie NITTKA, Fabian DOYON, et al. Micro-CT Based Experimental Liver Imaging Using a Nanoparticulate Contrast Agent: A Longitudinal Study in Mice. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(9) [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0025692. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025692

[46] HEDRICH, Hans J. *The laboratory mouse*. Second edition. Amsterdam: AP, Elsevier, 2012. ISBN 9780123820082.

[47] HILL, M.A. Mouse Timeline Detailed. In: *Embryology* [online]. c2019, 6 May 2019 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Timeline_Detailed

[48] Products. *Institute of Experimental and Applied Physics: Czech Technical University in Prague* [online]. 6/20/2017 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: http://www.utef.cvut.cz/products

[49] TURECEK, D, T HOLY, J JAKUBEK, S POSPISIL a Z VYKYDAL. Pixelman: a multi-platform data acquisition and processing software package for Medipix2, Timepix and Medipix3 detectors. *Journal of Instrumentation* [online]. 2011, 6(01), C01046-C01046 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1088/1748-0221/6/01/C01046. ISSN 1748-0221. Dostupné z: http://stacks.iop.org/1748-0221/6/i=01/a=C01046?key=crossref.9cbc0e538eeedde66597c91b417135cd

[50] JAKUBEK, Jan, Tomas HOLY, Martin JAKUBEK, Daniel VAVRIK a Zdenek VYKYDAL. Experimental system for high resolution X-ray transmission radiography. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* [online]. 2006, 563(1), 278-281 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.nima.2006.01.033. ISSN 01689002. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900206001033

[51] VAVRIK, Daniel a Jan JAKUBEK. Radiogram enhancement and linearization using the beam hardening correction method. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* [online]. 2009, 607(1), 212-214 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/j.nima.2009.03.156. ISSN 01689002. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900209006469

[52] NRecon. In: *Bruker microCT* [online]. c2018 [cit. 2018-11-09]. Dostupné z: http://www.bruker-microct.com/products/nrecon.html

[53] VGSTUDIO MAX: High-End lndustrial CT Software. In: *VOLUME GRAPHICS: Enabling Better Products* [online]. c2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: https://www.volumegraphics.com/en/products/vgstudio-max.html

[54] Exploring DataViewer. In: *BRUKER* [online]. c2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: https://www.bruker.com/products/microtomography/academy/2016/exploring-dataviewer.html

[55] DRAGONFLY. In: *OBJECT RESEARCH SYSTEMS* [online]. c2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: http://www.theobjects.com/dragonfly/index.html

[56] CTVox. In: *Bruker microCT* [online]. c2018 [cit. 2018-11-09]. Dostupné z: http://www.bruker-microct.com/products/ctvox.html

Příloha A: Tabulka přípravy vzorků

Číslo měření	Stabilizace	Kontrastování	Mezikrok	Mechanická fixace
M1 (P1)	X	X	X	X
M2 (P1)	50% roztok etanolu (48 h) + 75% roztok etanolu (48 h)	X	X	X
M3 (P1)	X	5% IKI (5 dní)	X	X
M4 (P1)	50% roztok etanolu (48 h) + 75% roztok etanolu (48 h) + 96% etanol (72 h)	5% IKI (72 h)	X	X
M5 (P1)	50% roztok etanolu (48 h) + 75% roztok etanolu (48 h) + 96% etanol (72 h)	5% IKI (72 h)	X	Potravinářská želatina
M6 (P1)	25% roztok etanolu (24 h) + 50% roztok etanolu (24 h) + 96% etanol (24 h)	10% IKI, 20% IKI, 40% IKI, Lugolův roztok (72 h)	X	Potravinářská želatina
M7 (P1)	25% roztok etanolu (24 h) + 50% roztok etanolu (24 h) + 96% etanol (10, 13, 15, 17, 19 dní)	Lugolův roztok (2, 4, 6, 8, 11 dní)	Omytí 96% etanolem-oschnutí-postříkání bezbarvým lakem-zaschnutí-omytí v destilované vodě	Potravinářská želatina
M8 (P1)	25 % roztok etanolu (24 h) + 50% roztok etanolu (24 h) + 96% etanol (15 dní)	Lugolův roztok (6 dní)	Totožné s M7	Agarózový gel
M9 (E18)	30 % roztok etanolu (12 h) + 50% roztok etanolu (12 h) + 70% roztok etanolu + 96% etanol (10 dní)	Lugolův roztok (2 dny)	Totožné s M7	Agarózový gel
M10(E14)	30% roztok etanolu (12 h) + 50% roztok etanolu (12 h) + 70% roztok etanolu + 96% etanol (10 dní)	Lugolův roztok (2 dny)	Totožné s M7	Agarózový gel

Příloha B: Tabulka parametrů měření

Číslo měření	SDD [mm]	SOD [mm]	Zvětšení	EPS [µm]	Napětí [kVp]	Proud [µA]	Tloušťka filtrů do [mm]	Náběr dat	Úhlový krok [°]	Počet projekcí	Akviziční čas [s]
M1 (P1)	250	100	2,5	22	50	400	4	Spirální	0,65	2 492	0,15
M2 (P1)	300	110	2,7	20	60	20	2	Axiální	0,4	900	5
M3 (P1)	250	91	2,7	20	70	300	10	Spirální	0,65	3 876	0,13
M4 (P1)	300	110	2,7	20	100	15	4	Axiální	0,4	450	7,5
M5 (P1)	300	110	2,7	20	100	15	4	Axiální	0,4	450	7,5
M6 (P1)	215	130	1,65	33,26	60	67	10	Axiální	0,4	900	0,5
M7 (P1)	150	100	1,5	36,67	70	55	6	Axiální	0,4	900	0,7
M8 (P1)	115	26	4,42	12,43	70	55	6	Spirální	0,92	3 522	0,5
M9 (E18)	250	55	4,5	12,1	70	125	4	Spirální	0,65	2 953	0,25
M10 (E14)	300	48	6,3	8,8	70	125	4	Spirální	0,65	2 353	0,35