



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

Zpracování obrazových dat biologických vzorků z mikro-CT

Biological specimens image data processing from micro-CT

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Hozman, Ph.D.

Branislav Gašpar

Kladno 2020/21



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Gašpar** Jméno: **Branislav** Osobní číslo: **474276**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Biomedicínský technik**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Zpracování obrazových dat biologických vzorků z mikro CT

Název bakalářské práce anglicky:

Biological specimens image data processing from micro CT

Pokyny pro vypracování:

Navrhněte a ověřte možnosti pro optimální nastavení převodní charakteristiky (transfer function) obrazu z hlediska jasů a kontrastu pro vybrané biologické vzorky z mikro CT (Skyscan 1275). Cílem optimalizace je získat takovou převodní charakteristiku obrazu, která bude vykazovat zdůraznění zejména měkkých tkání. Pro realizaci použijte jednak specializované SW (Dragonfly, Bruker analyzer, CTvox a případně další) pro zpracování obrazových výstupů z mikro-CT a jednak laboratorních experimentů s různým typem kontrastních látek.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Stock, S.R., MicroComputed Tomography. Methodology and Applications. , ed. 2, Boca Raton: CRC Press, 2019, 389 s., eBook, <https://doi.org/10.1201/9780429186745> , ISBN 9780429186745
[2] Dudak J, Zemlicka J, Karch J, Patzelt M, Mrzilikova J, Zach P, Hermanova Z, Kvacek J, Krejci F. , 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, Sci Rep. , ročník 6, 2016, Červenec, Article number: 30385

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. Ing. Jiří Hozman, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

MUDr. Bc. Jana Mrzilková, Ph.D. (3. LF UK)

Datum zadání bakalářské práce: **15.02.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**


doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student(ka) bere na vědomí, že je povinnen(a) vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

5.3.2021

Datum převzetí zadání



Podpis studenta(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Zpracování obrazových dat biologických vzorků z mikro CT“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské 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, 10. května 2021

.....

Branislav Gašpar

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval panu doc. Ing. Jiřímu Hozmanovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za jeho vstřícnost a čas strávený při konzultacích se mnou a také za jeho užitečné rady a připomínky, které se mnou v průběhu práce konzultoval. Chtěl bych také poděkovat paní MUDr. Bc. Janě Mrzílkové, Ph.D. za její skvělou spolupráci, konzultace a pomoc s preparací i skenováním biologických vzorků.

ABSTRAKT

Zpracování obrazových dat biologických vzorků z mikro-CT

Vizualizace měkkých tkání z obrazových dat pořízených technikou výpočetní tomografie je poměrně komplexní a složitá úloha, a to i za asistence dnešních moderních technologií. Cílem této práce bylo navrhnout a ověřit optimální převodní charakteristiku, která by podobnou vizualizaci umožňovala.

V práci bylo použito vybraných biologických vzorků kuřat, myši, krysy, králíka a jejich orgánů, které byly vypreparovány v roztocích ethanolu, formaldehydu, jodidu draselného rozpuštěného v roztoku ethanolu, další s kontrastní látkou Aurovist a Omnipaque a pár korozivních preparátů s pryskyřicí Mercocox. Vzorky byly naskenovány sestavou Bruker SkyScan 1275 a zpracovány pomocí softwaru CTvox a ORS Dragonfly. V rámci práce byl uskutečněn i experiment s fantomem cévního řečiště naskenovaným sestavou Phywe XR 4.0. K rekonstrukci projekcí z mikro-CT byl použit software NRecon a Measure CT.

Bylo navrženo 53 převodních charakteristik zdůrazňujících především měkké tkáně. V softwaru Dragonfly byla provedena 3D segmentace kapilár fantomu cévního řečiště, které byly později obarveny. Byly vyzkoušeny různé metody sekvenční filtrace, umožňující odšumění a doostření obrazových dat, včetně využití konvoluční neuronové sítě U-Net k vyhlazování obrazu v prostředí Dragonfly.

Kromě dosažení hlavního cíle práce vedlo řešení zadání i k pár jiným zajímavým výsledkům a novým nápadům, které by nás v oblasti vizualizace měkkých tkání výpočetní tomografií mohly do budoucna posunout dál.

Klíčová slova

Mikro-CT

Bruker CTvox

ORS Dragonfly

Měkké tkáně

3D segmentace a zpracování obrazových dat

ABSTRACT

Biological specimens image data processing from micro-CT

Visualization of soft tissue from computed tomography image data is a relatively complex and complicated task, even with the aid of today's modern technology. The aim of this thesis was to design and verify an optimal transfer function that would allow for such visualisation.

In the present thesis, biological samples of chicken, mice, a rat, a rabbit, and their organs were used and prepared in solution of ethanol, formaldehyde, potassium iodide dissolved in ethanol solution, some of them with Aurovist and Omnipaque contrast agent. A few corrosive preparations with Mercox resin were also used. Samples were scanned by a Bruker SkyScan 1275 mikro-CT and processed using CTvox and ORS Dragonfly software. An additional part of the thesis was an experiment with a phantom of the vascular bed, scanned by the Phywe XR 4.0 X-ray unit. To reconstruct the micro-CT projections, NRecon and Measure CT software was used.

53 transfer functions were designed, enhancing mostly soft tissue structures. Capillaries of the vascular bed-phantom were 3D-segmented and stained using ORS Dragonfly software. Various sequential filtering methods have also been tested, to reduce the noise and to sharpen the image data, including the use of the U-Net convolutional neural network to smooth the image in the Dragonfly environment.

In addition to achieving the main goal of the thesis, solving the problem also led to a few other interesting results as well as new ideas that could move us further in the field of soft tissue visualization by computed tomography, in the future.

Keywords

Micro-CT

Bruker CTvox

ORS Dragonfly

Soft Tissue

3D Segmentation and Image Data Processing

Obsah

Seznam zkratk	9
1 Úvod	10
2 Přehled současného stavu	11
2.1 Výpočetní tomografie.....	11
2.2 Mikro-CT	12
2.3 Kontrastní látky	12
2.3.1 Kontrastní látky pro vyšetření CT	13
2.3.2 Kontrastní látky pro vyšetření ultrazvukem	13
2.4 Software pro zobrazování a zpracování obrazových dat.....	13
2.4.1 DataViewer.....	14
2.4.2 CTAn/CTVol.....	14
2.4.3 CTvox.....	14
2.4.4 Dragonfly.....	14
2.4.5 3D Slicer.....	15
2.4.6 MeVisLab.....	15
2.4.7 ImageJ.....	15
3 Cíle práce	16
4 Metody	17
4.1 Charakteristika biologických vzorků	17
4.1.1 Vzorky z Ústavu anatomie 3. LF UK.....	17
4.1.2 Fantom – kuřecí maso a kapiláry.....	17
4.2 Skenovací sestavy	18
4.2.1 Sestava Bruker SkyScan 1275.....	18
4.2.2 Experimentální sestava Phywe XR 4.0	19
4.3 Nastavení parametrů sestav	21
4.4 Rekonstrukce řezů	22
4.4.1 NRecon	22
4.4.2 Measure CT	25
4.5 Zobrazování, 3D vykreslování a úprava dat.....	29
4.5.1 CTvox.....	30

4.5.2	Dragonfly.....	32
4.6	Návrh převodní charakteristiky	39
5	Výsledky.....	40
5.1	Rekonstrukce fantomu cévního řečiště a segmentace kapilár	40
5.2	Výstupy z programu CTvox.....	40
5.2.1	Ethanol.....	41
5.2.2	Aurovist	42
5.2.3	Omnipaque	47
5.2.4	Jodid draselný (KI) v 20% roztoku ethanolu.....	49
5.2.5	Mercocox (pryskyřice)	52
5.3	Vyhazení obrazu neuronovou sítí typu U-Net	54
5.4	Srovnání obarveného vzorku před a po sekvenční filtraci	56
5.5	Převodní charakteristiky (transfer functions).....	57
6	Diskuze.....	58
7	Závěr	61
	Seznam použité literatury	62
	Příloha A: Nastavení parametrů mikro-CT Bruker SkyScan 1275.....	65
	Příloha B: Seznam převodních charakteristik.....	71

Seznam zkratek

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CT	Výpočetní tomografie (Computed Tomography)
Mikro-CT	CT s vysokým rozlišením (Micro-computed Tomography)
μ CT	Mikro-CT
3. LF UK	3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
ROI	Region zájmu (Region of Interest)
k. l.	Kontrastní látka
AuNP	Zlaté nanočástice (Gold nanoparticles)
RTG	Rentgen, rentgenový
KI	Jodid draselný

1 Úvod

Zobrazování pomocí výpočetní tomografie nachází v praxi široké uplatnění, hlavně díky neinvazivnosti této metody, jejímu dobrému prostorovému rozlišení a relativně krátké době akvizice požadovaných snímků. Kromě klasických výpočetních tomografů, které jsou využívány především v oblasti zdravotnictví, jsou v praxi využívány i výpočetní tomografy s vysokým prostorovým rozlišením neboli mikro-CT (μ CT). Tyto systémy pracují na stejném základním principu jako klasický výpočetní tomograf (CT). Jejich výhoda však spočívá v schopnosti skenování vzorků s mnohem vyšším prostorovým ($<50 \mu\text{m}$) a kontrastním rozlišením.

Právě díky nedestruktivnosti této metody při vyhodnocování skenovaného objemu s vysokým rozlišením jsou přístroje mikro-CT hodně využívány jak ve výzkumu, tak v průmyslu. Vnitřní šum detektorů komerčních mikro-CT v řadě případů nepředstavuje problém (zejména v průmyslu), zobrazování delikátnějších struktur s nižším rozsahem CT čísel, a s tím souvisejícím nižším útlumovým kontrastem mezi jednotlivými strukturami, jakými jsou například měkké tkáně, je však tímto šumem značně ztíženo.

Bakalářská práce se ve spolupráci s Ústavem anatomie 3. LF UK primárně zabývá vizualizací zejména měkkých tkání, jakož i hledáním metodiky, kterou by bylo možné celkový proces segmentace optimalizovat a učinit snadnějším. S tím zároveň souvisí zkoumání a experimentace s novými postupy a kontrastními látkami, které by umožnily dosažení požadovaného kontrastu mezi jednotlivými měkkými tkáněmi, který je potřebný k jejich segmentaci.

Práce se kromě samotného systému mikro-CT zabývá i prací se softwarem pro zpracování výsledných obrazových dat ze získaných projekcí. Dále se řeší 3D vykreslování získaných dat, jejich další úprava, filtrace, a to i za pomoci neuronové sítě. Také je zde řešena i 3D segmentace dat.

Tato práce slouží především jako úvod do světa mikro-CT a také jako ukázka toho, že vizualizace měkkých tkání, a to i za pomoci moderní technologie dnešní doby, není až tak jednoduchá, jak by se mohlo zdát.

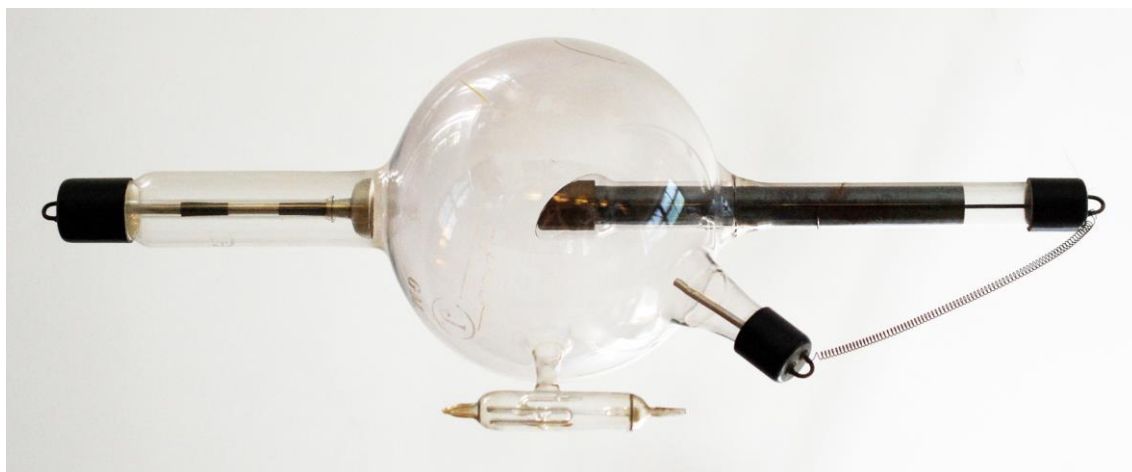
2 Přehled současného stavu

Přehled současného stavu tvoří čtyři kapitoly, které se postupně zabývají pozadím a problematikou CT a mikro-CT, řeší kontrastní látky používané při vyšetřeních CT a ultrazvukem, až po software, který je používán v oblasti zobrazování a zpracování obrazových dat z CT a mikro-CT.

2.1 Výpočetní tomografie

Výpočetní tomografie (angl. Computed Tomography, CT) je zobrazovací metoda, kde je užíváno jednotlivých projekcí, získaných prozářením zkoumaného objemu rentgenovým zářením z různých pozorovacích úhlů, k matematické rekonstrukci vnitřní struktury zkoumaného objektu. Poskytuje nám tedy jedinečnou alternativu k získávání informací o strukturách uvnitř zkoumaných předmětů bez potřeby fyzického zásahu do jejich integrity. Právě díky této skutečnosti našla tato modalita široké uplatnění především jako diagnostické zařízení v oblasti zdravotnictví.

Rentgenové záření, potřebné pro vyšetření pacienta na výpočetním tomografu, vzniká v rentgenové lampě (rentgence) interakcí elektronů uvolněných termoemisí z rozžhavené katody s anodou, která je k sobě urychluje vysokým napětím. Jen malé množství kinetické energie dopadených elektronů se přemění v rentgenové záření, většina z ní se přemění na teplo, které se rozptýlí na anodě rentgenky.



Obr. 2.1: Rentgenka první generace (Muzeum W. C. Röntgena ve Würzburgu) [1]

Během vyšetření na výpočetním tomografu prochází toto záření skrz tělo pacienta, ve kterém se jeho část utlumí a tím vznikne kontrast mezi zkoumanými strukturami. Záření dál dopadá na detektor, anebo se rozptýlí do prostoru okolo pacienta.

Tzv. útlumový kontrast mezi lineárními koeficienty útlumu jednotlivých částí skenovaného objemu (tzv. CT číslo) je proto důležitým faktorem při zobrazování výpočetní tomografií. Lineární koeficient útlumu pro daný materiál je závislý na vlnové délce (energii) rentgenového záření a je konstantou udávající frakci utlumených fotonů monoenergetického rentgenového záření dopadajícího na tento materiál, vztaženou na jednotku délky (cm^{-1}). U CT se jako vztažná relativní hodnota používá lineární koeficient útlumu vody, který je $0,19 \text{ cm}^{-1}$ a tudíž CT číslo vody je pak rovno 0.

Při zobrazování vlastností a charakteristik různých objektů pomocí CT hraje důležitou roli prostorové a kontrastní rozlišení. Zejména kontrast, jako relativní veličina, je pak závislý na složení okolních tkání. Co vše lze zobrazit pomocí CT, závisí od vztahu a kompromisu mezi kontrastní citlivostí a prostorovým rozlišením této modalit [2].

2.2 Mikro-CT

CT s vysokým rozlišením neboli mikro-CT je výpočetní tomograf, který je schopen rekonstruovat vzorky s vysokým prostorovým (alespoň 50–100 μm) a kontrastním rozlišením. Využívá útlumu rentgenového záření k snímání projekcí z různých úhlů a poskytuje informaci o vnitřní 3D struktuře zkoumaných orgánů nebo tkání [3, 4]. Pokud se jedná o základní princip fungování, tak je mikro-CT s konvenčním výpočetním tomografem totožné [5].

Ačkoli je už v dnešní době možné provádět mikro-CT skeny malých živočichů in vivo, ex vivo skeny dosahují oproti nim pořád lepšího prostorového rozlišení a tím poskytují i lepší informaci o jemných anatomických strukturách zkoumaných orgánů. Nejmodernější mikro-CT systémy dosahují dnes rozlišení jen několika pár mikrometrů, v případě některých laboratorních zařízení dokonce i pod jeden mikron [6].

I přes vysoké prostorové rozlišení, kterým mikro-CT disponuje, zůstává vizualizace měkkých tkání aktuálním a náročným úkolem i za značné podpory výpočetní techniky s mnoha algoritmy zpracování obrazových dat, a to zejména z důvodu velmi nízkého intrinsického útlumového kontrastu mezi zkoumanými strukturami [7].

2.3 Kontrastní látky

Kontrast u mikro-CT vzniká (stejně jako u konvenčního CT) díky útlumu rentgenových paprsků absorpcí nebo jejich rozptylem uvnitř zkoumaných objektů. Jsou to ale hlavně jenom vysoce mineralizované struktury (např. kosti, zuby), které díky obsahu minerálů fosforečnanu vápenatého poskytují na snímcích z mikro-CT dobrý kontrast [6].

K tomu, abychom od sebe odlišili i tkáně absorbující rentgenové záření na téměř stejné úrovni, potřebujeme častokrát vpravit do zkoumaného orgánu nebo tkáně kontrastní látku, která jejich schopnost absorbovat rentgenové záření buď zvýší (pozitivní k. l.) nebo sníží (negativní k. l.).

2.3.1 Kontrastní látky pro vyšetření CT

Kontrastní látky mají při vyšetřování pomocí CT dlouhou historii, ať už se jedná o vyšetření trávicí trubice nebo CT angiografii. Rozlišujeme kontrastní látky izodenzní, hypodenzní a hyperdenzní.

Izodenzní k. l. mají stejnou denzitu jako okolitá tkáň. Řadí se mezi ně např. voda nebo methylcelulóza a používají se při vyšetření trávicí trubice.

Hypodenzní k. l. jsou negativní k. l., tj. na CT snímcích se jeví tmavěji než okolitá tkáň. Patří sem např. oxid uhličitý a vzduch a používají při vyšetření žaludku a tlustého střeva.

Hyperdenzní k. l. jsou pozitivní k. l., ve srovnání s okolitou tkání se jeví světleji a používají se při vyšetření CT nejčastěji. Řadíme mezi ně ve vodě rozpustné k. l. jodové (Xenetix, Telebrix) a baryové (Micropaque).

Další kontrastní látky na bázi jodu jsou Omnipaque, Ultravist a Iomeron. K intravenózní digitální subtrakční angiografii se používá k. l. Optiray.

2.3.2 Kontrastní látky pro vyšetření ultrazvukem

Při vyšetření ultrazvukem se používají kontrastní látky, které obsahují mikrobublinky. Rozměry mikrobublinek v průměru nepřesahují velikost erytrocytů (1–10 μm), takže nehrozí riziko vzduchové embolie. Jedná se v podstatě o stabilní, nereaktivní plyn, který je obalen v lipoproteinovém obalu, který by teoreticky bylo možné použít jako negativní k. l. pro skenování malých živočichů na mikro-CT.

Tyto kontrastní látky mají tu výhodu, že kolují pouze v cévním řečišti a neprostupují do intersticia, tudíž by na snímcích z mikro-CT uměle nezvětšovaly objem cév.

V České republice je doposud dostupná pouze jedna takováto kontrastní látka s názvem SonoVue. Krom ní existují i další k. l. s mikrobublínkami, jako např. Definity a Optison, které se používají i v USA.

2.4 Software pro zobrazování a zpracování obrazových dat

K prohlížení řezů nebo prostorovému vykreslení naskenovaného objemu a následnému zkoumání v něm obsažených struktur existuje řada programů. Mezi nejjednodušší a nejzákladnější patří program DataViewer. O něco pokročilejší je softwarový balík CTAn/CTVol. Mezi pokročilé programy patří například CTvox, Dragonfly, 3D Slicer, MeVisLab nebo ImageJ. V této práci bude z následovných programů použit CTvox od společnosti Bruker, spolu se softwarem Dragonfly od společnosti Object Research Systems (ORS).

2.4.1 DataViewer

Dataviewer od společnosti Bruker je softwarový nástroj sloužící k prohlížení dat nebo kontrole jejich kvality po jejich rekonstrukci. Kromě toho je v něm možné měnit orientaci a velikost řezů, měřit hustotu a vzdálenost mezi jednotlivými pixely a též provádět registraci různých datasetů [8].

2.4.2 CTAn/CTVol

Softwarový balík CTAn/CTVol od společnosti Bruker se skládá z programu CTAn pro 2D vizualizaci a 2D/3D analýzu a programu CTVol sloužícího k realistické 3D vizualizaci. Funkce těchto dvou programů je doplňková. Zpracováním obrazových dat v CTAn, např. odstraněním šumových teček z řezů apod., se dataset připraví k binarizaci a následnému vytvoření povrchu 3D modelu, který je pak možné prohlížet v CTVol [19].

Program CTAn umožňuje také kvantitativní měření – denzitometrii (měření voxelového koeficient útlumu) a morfometrii (pomocí binarizovaného obrázku). Dále je v něm možné segmentovat data globálně, automatickým nastavením prahové hodnoty Otsuho metodou, nebo adaptivně výpočtem prahové hodnoty pro každý voxel zvlášť jako mediánu všech pixelů/voxelů ze zvoleného okolí [19].

2.4.3 CTvox

Program CTvox společnosti Bruker slouží k vykreslování objemů naskenovaných na mikro-CT a je kompatibilní se všemi sestavami SkyScan. Klíčová funkce tohoto programu spočívá v editoru převodní charakteristiky, který je rychlým a flexibilním nástrojem pro vytváření barevných 3D modelů a zvýrazňování jejich textur, které dále umožní odkrýt různé struktury skenovaného objemu. Vedle této funkce je v programu možné vykreslovat více objemů najednou a tyto různě posouvat, vystříhovat je, nebo z nich vyřezávat různé části [15].

2.4.4 Dragonfly

Dragonfly, vyvíjen společností Object Research Systems (ORS), je jedním z nejpokročilejších analyzačních programů, využívající pokročilých vizualizačních a nejmodernějších vykreslovacích technik, umožňující zkoumat detaily a vlastnosti 3D modelů ve vysokém rozlišení. Disponuje moduly pro 2D a 3D filtraci obrazu a prahování. Data je možné segmentovat automaticky nebo s asistencí uživatele a generovat z nich povrchové 3D modely k vizualizaci různých vlastností včetně povrchů, objemů, četnosti určitých znaků nebo tvarů, distribucí nebo orientací segmentů [20].

Kromě nespočetného množství analyzačních nástrojů, rychlé zobrazovací schopnosti a možnosti pracovat s velkými datasey, je díky integraci distribuce Anaconda Python v Dragonfly možné uživatelem implementovat skrze konzoli napsané skripty, kterými lze přistupovat k datovým objektům Dragonfly a vytvářet si vlastní zásuvné moduly za pomoci výkonných algoritmů pro zpracování obrazových dat, volně dostupných v ekosystému Python [20].

2.4.5 3D Slicer

3D Slicer je volně dostupný, open-source program, který byl vyvinut za účelem zpracování obrazových dat a jejich prostorové vizualizace. Je možné jej spustit na platformách Windows, Linux i MacOSX a je rozšiřitelný o zásuvné moduly obsahující množství algoritmů a aplikací určených především k analýze dat (registrace, segmentace) [21].

2.4.6 MeVisLab

Software MeVisLab od společnosti MeVis Medical Solutions AG ve spolupráci s výzkumným institutem Fraunhofer MEVIS představuje výkonný nástroj založen na modulární struktuře, která umožňuje uživateli rychlou integraci a testování nových algoritmů [22].

Jednotlivé moduly umožňují segmentaci, registraci obrazu, volumetrii a kvantitativní morfologickou a funkční analýzu se zaměřením na zobrazování v oblasti medicíny a s možností plánování i chirurgických zákroků. Kromě utilizace standardu OpenGL podporuje tento program také skriptování v jazyce Python a programování v jazyce C++ [22].

2.4.7 ImageJ

ImageJ byl vyvinut americkou institucí National Institutes of Health a je volně dostupný a šířitelný software pro zpracování obrazu, spustitelný na jakékoli platformě s podporou prostředí Java 1.4 a vyšší. Používán je hlavně k zpracování a analýze obrazu. Mezi jeho základní funkcionality patří měření vzdáleností a úhlů, vytváření histogramů, upravování kontrastu, zostřování nebo vyhlazování obrazu, detekce hran, mediánová filtrace a další [23]. Podporuje také prostorové prohlížení dat ve formě tzv. „stacks“. Toto rozšíření není však optimalizované pro plnohodnotnou práci s 3D daty.

Výhodou tohoto programu je množství online nástrojů a zásuvných modulů pro zpracování obrazu, které jsou vyvíjeny i online komunitou používající tento software. Pro účely online podpory je k dispozici také dedikované ImageJ fórum [24].

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je navržení a ověření optimálního nastavení převodní charakteristiky (transfer function) obrazu z hlediska kontrastu a jasu pro vybrané biologické vzorky z Ústavu anatomie 3. LF UK, naskenované systémem mikro-CT Bruker Skyscan 1275.

Cílem optimalizace je získat takovou převodní charakteristiku obrazu, která bude vykazovat zdůraznění zejména měkkých tkání, které jsou často zakryty jinými typy tkání. Vhodným nastavením uvedené přenosové charakteristiky můžeme dosáhnout eliminaci okolních tkání a zvýraznění požadované tkáně.

Optimalizovaná převodní charakteristika se uloží do souboru s příponou *.tf.

4 Metody

4.1 Charakteristika biologických vzorků

4.1.1 Vzorky z Ústavu anatomie 3. LF UK

K realizaci práce byla využita databáze snímků z mikro-CT od Ústavu anatomie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (3. LF UK).

Databáze pozůstávala z ex vivo kuřat ve skořápce i mimo skořápku a ve stáří 5 až 19 dnů. Kuřata mimo skořápku byly vypreparované v 50–100% ethanolovém roztoku, některé z nich navíc v roztoku formaldehydu. Pár vzorků kuřat obsahovalo vstříknuté zlaté nanočástice z kontrastní látky AuroVist. Před akvizicí byly vzorky po vyjmutí z roztoku ponechány na vzduchu a po odpaření roztoku naskenovány sestavou SkyScan 1275 od společnosti Bruker.

Další část databáze se skládala ze ex vivo preparátů myši, kterým byla před skenováním vstříknuta kontrastní látka Aurovist obsahující zlaté nanočástice (AuNP) o velikosti 15 nm.

50% roztoku kontrastní látky Omnipaque bylo pak využito intravenózně před skenováním samotných myších orgánů – jater, plic, sleziny a srdce.

Naskenovány byly i preparáty myších orgánů, které byly před skenováním naložené po dobu jednoho týdne v roztoku rozpuštěného jodidu draselného (KI) v 20% roztoku ethanolu. Jednalo se o myší játra, ledvinu, mozek, srdce a nohu.

V neposlední řadě se v databázi nacházely i korozivní preparáty, u kterých se do cévního systému napustila a nechala zatvrdnout pryskyřice (Mercox), zbytek tkáně byl pak macerací rozpuštěn v louhu a preparát byl naskenován. Pro účely bakalářské práce byly vybrány korozivní preparáty zaječích a krysích plic a srdce.

4.1.2 Fantom – kuřecí maso a kapiláry

Pro konkrétní realizaci idey zobrazení cév v měkké tkáni za pomoci kontrastu, který by byl vytvořen přítomností vzduchu v dutinách cévních řečišť, bylo použito kuřecí maso jako fantom, ve kterém byly umístěny válcovité trubičky/kapiláry o různých průměrech z různých materiálů. Jednalo se o 2 bužírky (silikon), o skleněnou kapiláru se zatavenými konci a o plastové brčko (polyethylen). Tento fantom byl pak naskenován experimentální sestavou Phywe XR 4.0.



Obr. 4.1: Vzorek kuřecího masa s kapilárami; materiály zleva: polyethylen, sklo, silikon, silikon [zdroj: autor]

4.2 Skenovací sestavy

Ke skenování výše uvedených vzorků bylo využito dvou mikro-CT systémů. Vzorky ex vivo kuřat byly naskenovány profesionálním mikro-CT systémem, nacházejícím se na Ústavu anatomie 3. LF UK, zatímco ke skenování fantomu cévního řečiště z kuřecího masa a kapilár bylo využito experimentální sestavy Phywe XR 4.0.

4.2.1 Sestava Bruker SkyScan 1275

Sestava SkyScan 1275 od americké společnosti Bruker byla speciálně navržena pro rychlé skenování s využitím pokroků technologie v oblasti zdrojů rentgenového záření a efektivních flat-panel detektorů. Energetický rozsah volitelného anodového napětí sestavy činí 20–100 kV o výkonu 10 W. Sestava obsahuje aktivní 3 megapixelový CMOS flat-panel detektor s maximálním možným rozlišením až 4 μm (při maximálním zvětšení) a je schopna pojmout vzorek o průměru 96 mm a výšce 120 mm.

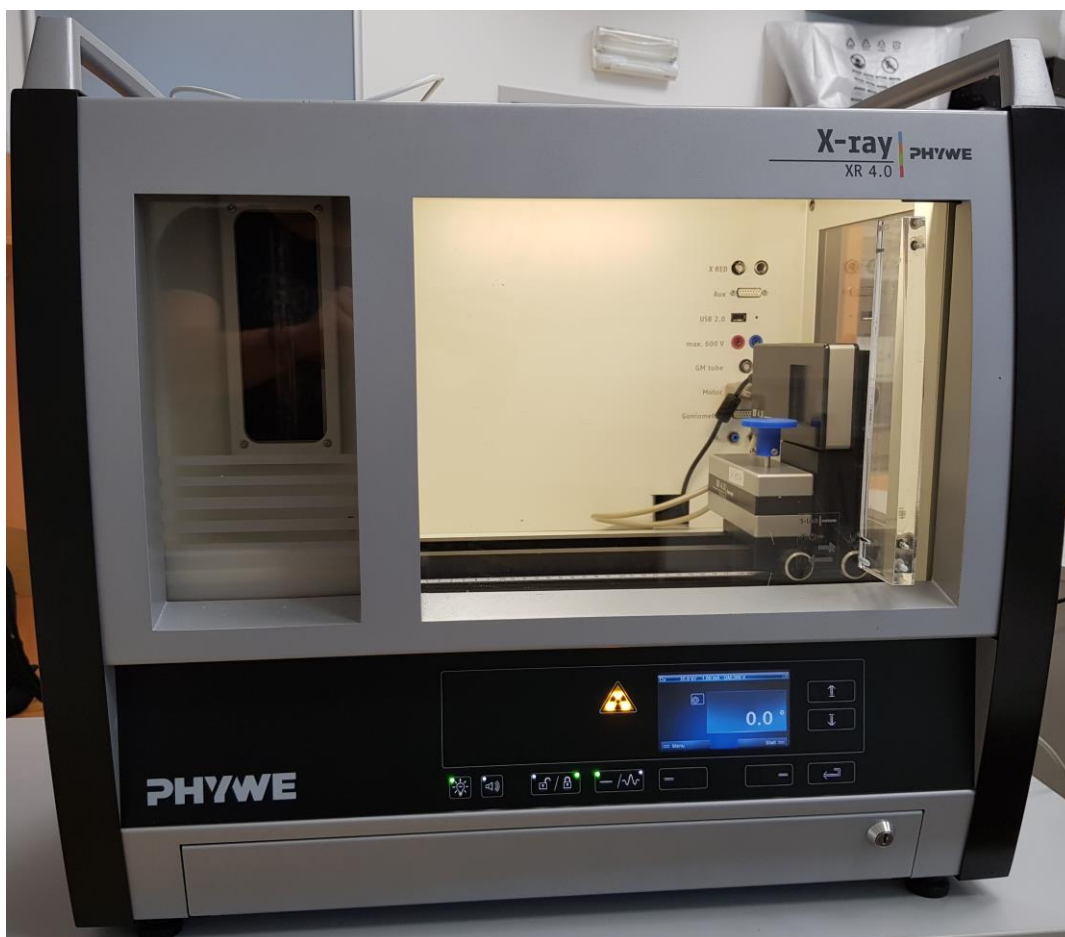


Obr. 4.2: Sestava Bruker SkyScan 1275 [9]

Ve srovnání s klasickým výpočetním tomografem probíhá akvizice snímků v soustavě SkyScan 1275 za postupného otáčení vzorku uvnitř skenovacího prostoru sestavy, zatím co zdroj rentgenového záření spolu s detektorem jsou stacionární. Při rekonstrukci řezů se pak pracuje s konkrétními řádky snímků nasnímaných postupně pod různými úhly.

4.2.2 Experimentální sestava Phywe XR 4.0

Experimentální sestava XR 4.0 od německé společnosti Phywe byla navržena pro výukové účely a k laboratorním experimentům s rentgenovým zářením. Její výhoda mimo jiné spočívá v poměrně snadné a rychlé vyměnitelnosti rentgenové lampy, a tudíž usnadňuje experimenty s různými materiály anody [10].



Obr. 4.3: Sestava Phywe XR 4.0 [zdroj: autor]

XR 4.0 je díky rozšiřujícímu setu podporujícímu funkci výpočetní tomografie možné použít i jako systém mikro-CT. Tento set se skládá z pevné měděné rentgenky prozařující vzorek nacházející se na otočném stolku poháněném krokovým motorkem s minimálním možným nastavitelným úhlem otočení stolku o $0,086^\circ$. Utlumené rentgenové záření pak dopadá na XRIS detektor (CMOS) s aktivní plochou o velikosti $5 \times 5 \text{ cm}^2$ a s maximálním možným rozlišením $48 \mu\text{m}$ [11]. Energetický rozsah volitelného anodového napětí sestavy činí 5–35 kV s nastavitelným emisním proudem v rozmezí 0–1 mA.

Před použitím XR 4.0 jako systému mikro-CT je potřeba pomocí konektoru Motor k sestavě připojit krokový motorek, který stolkem s umístěným vzorkem otáčí. Sestava se pak spolu s XRIS detektorem připojí přes dva USB kabely do počítače s nainstalovaným softwarovým balíkem Measure CT. K přímému propojení detektoru XRIS uvnitř skenovacího prostoru sestavy a počítače se využije dedikovaného přístupového kanálu, určeného pro tento účel.

4.3 Nastavení parametrů sestav

Nastavení parametrů sestavy SkyScan 1275 při skenování vybraných biologických vzorků na Ústavu anatomie 3. LF UK je uvedeno v tabulkách v Příloze A.

Nastavení parametrů sestavy XR 4.0 během skenování fantomu cév v podobě kapilár v kuřecím masu je uvedeno v následovní tabulce:

Tabulka 4.1: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě XR 4.0

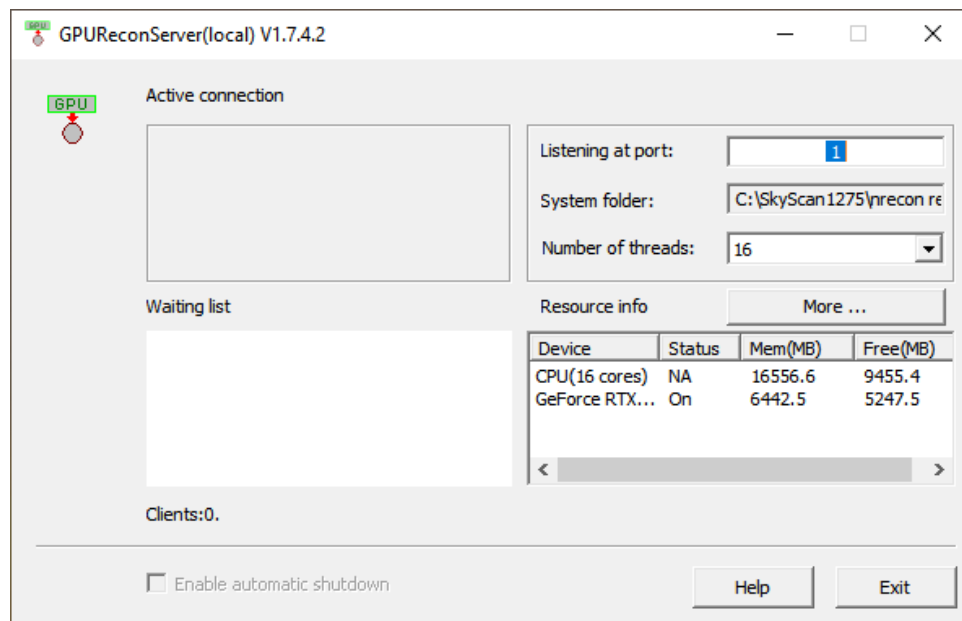
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	310
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	360
Anodové napětí (kV)	35
Emisní proud (mA)	1
Velikost pixelu projekce (μm)	96
Doba expozice (ms)	500
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	1,8
Binning	500x500

4.4 Rekonstrukce řezů

K rekonstrukci řezů z projekcí nasnímaných vzorků s využitím kuželovitého svazku rentgenového záření byl v případě vzorků kuřat z Ústavu anatomie 3. LF UK použit software NRecon od společnosti Bruker a v případě experimentu s kuřecím masem s kapilárami jako fantomu cév použit softwarový balík measure CT, který byl vyvinut společností Phywe.

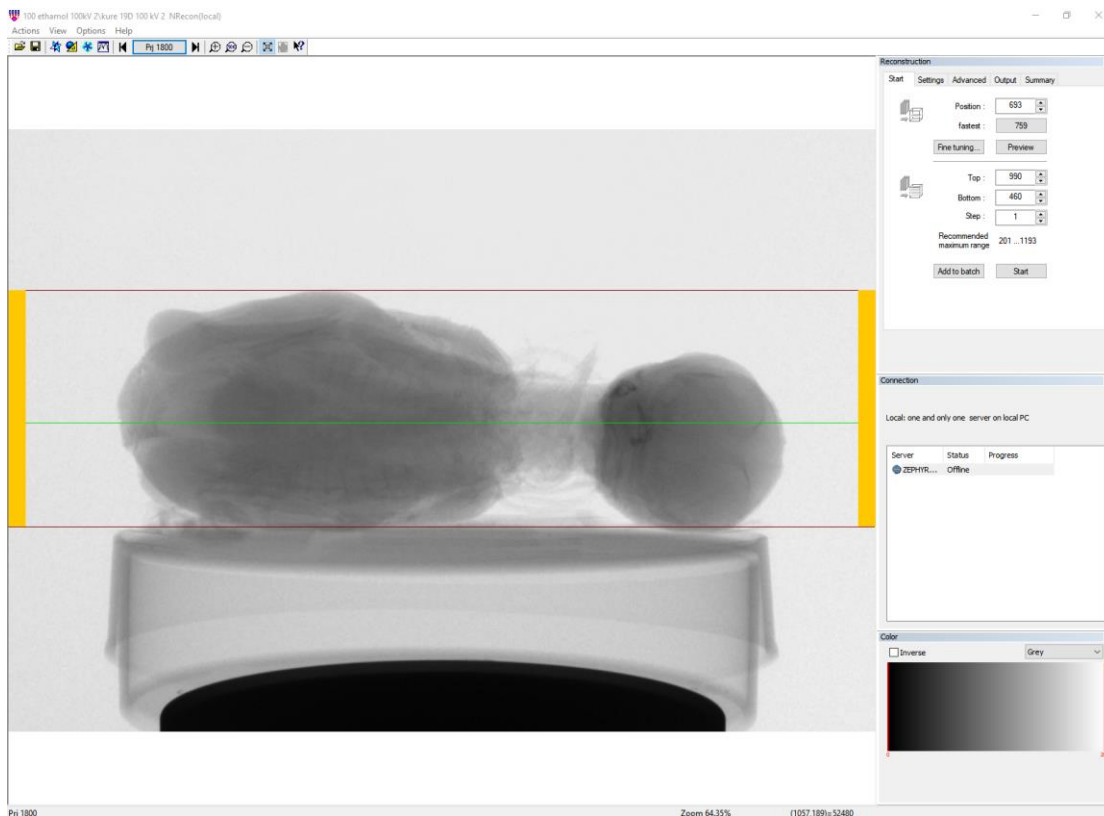
4.4.1 NRecon

K rekonstrukci řezů využívá NRecon implementovaného Feldkampova algoritmu v rekonstrukčním jádru aplikace, které lze spustit i lokálně na kterémkoli počítači, za předpokladu dostatečného výpočetního výkonu. Ke zrychlení rekonstrukce je doporučeno spouštění aplikačního jádra na vybraných grafických akcelerátorech a výpočetních kartách společnosti nVIDIA s podporou architektury CUDA.



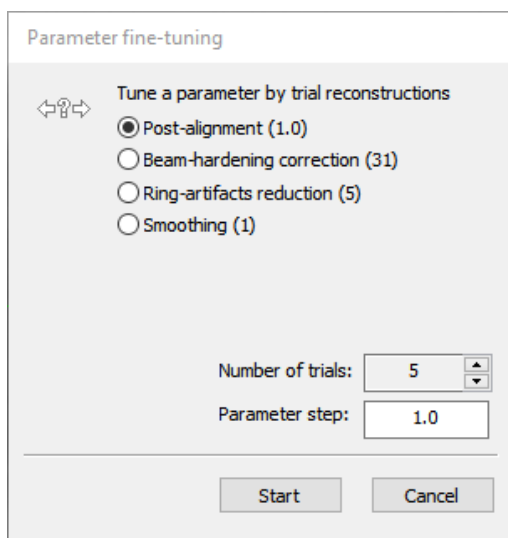
Obr. 4.4: Rekonstrukční jádro GPUReconServer programu NRecon [zdroj: autor]

Výhodou tohoto programu je automatické rozeznávání dat naskenovaných na sestavách SkyScan a automatické optimální přizpůsobení parametrů potřebných pro rekonstrukci těchto dat (vyhlazování, kompenzace vychýlení, redukce kruhových artefaktů, korekce utvrzování svazku, nastavení dynamického rozsahu atp.). V případě, že formát souborů a jejich názvy spolu s doprovodným log souborem odpovídají požadované konvenci popsané v manuálu programu [12], je možné rekonstruovat tímto softwarem i nenativní tomografická data z jiných sestav než SkyScan.



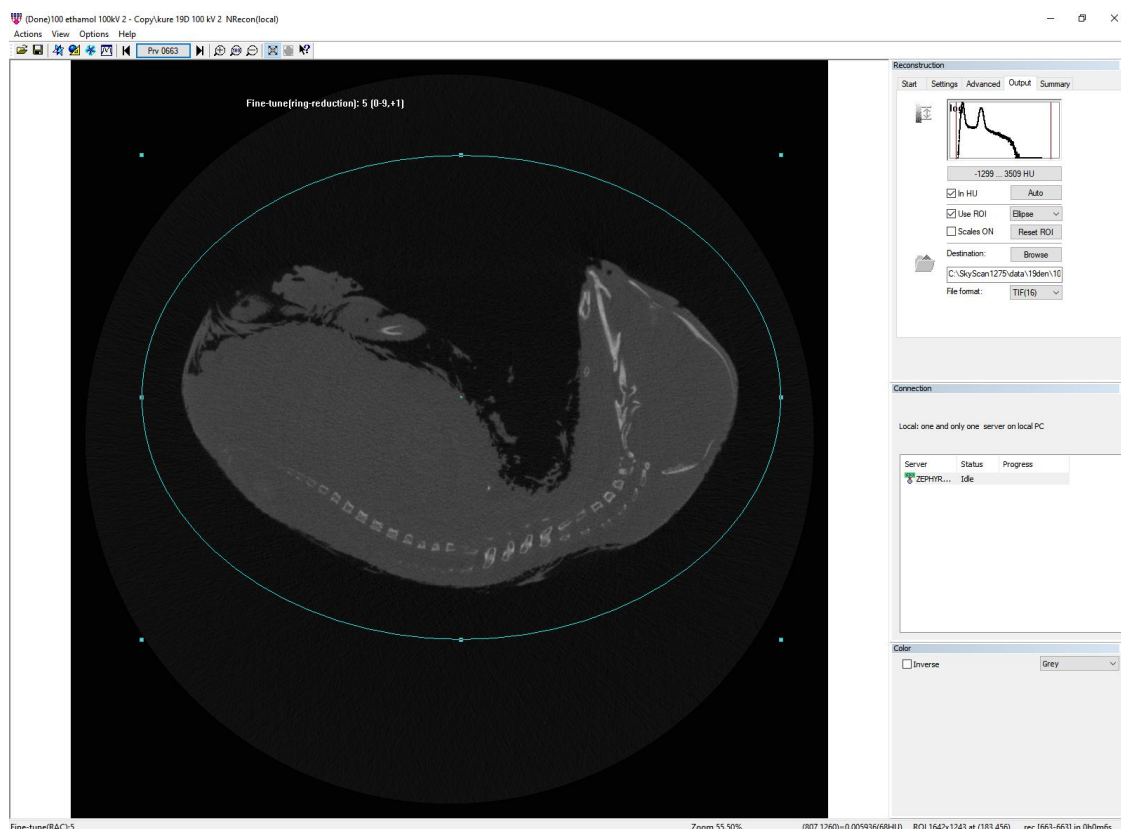
Obr. 4.5: Rozhraní rekonstrukčního programu NRecon [zdroj: autor]

Před samotným spuštěním zdlouhavějšího procesu rekonstrukce řezů z projekcí je užitečné si po nastavení rekonstrukčních parametrů v programu zobrazit náhled jednoho zrekonstruovaného řezu pro utvoření si obrazu o tom, zdali dané nastavení parametrů poskytne optimální výsledek. V této oblasti spočívá další výhoda tohoto programu, kterou je funkce tzv. jemného doladování.



Obr. 4.6: Funkce jemného doladování parametrů [zdroj: autor]

Jemné doladování uživateli umožňuje rychle najít a vybrat správné hodnoty parametrů, které budou poskytovat vizuálně lepší rekonstrukční výsledek z daného datasetu projekcí. Uživatel si v sekci nastavení navolí výchozí hodnotu parametru, který chce ladit, a pak si pomocí funkce jemného doladování zvolí počet a velikost kroků, kterými bude program následně tuto výchozí hodnotu upravovat. Po rekonstrukci vybraného náhledu řezu s použitím zvoleného rozsahu hodnot parametru pro doladování si je možné výsledek prohlížet posouváním běžce nastavujícího hodnotu daného parametru. NRecon pak zobrazuje náhled vybraného zrekonstruovaného řezu pro zvolenou hodnotu parametru v reálném čase.



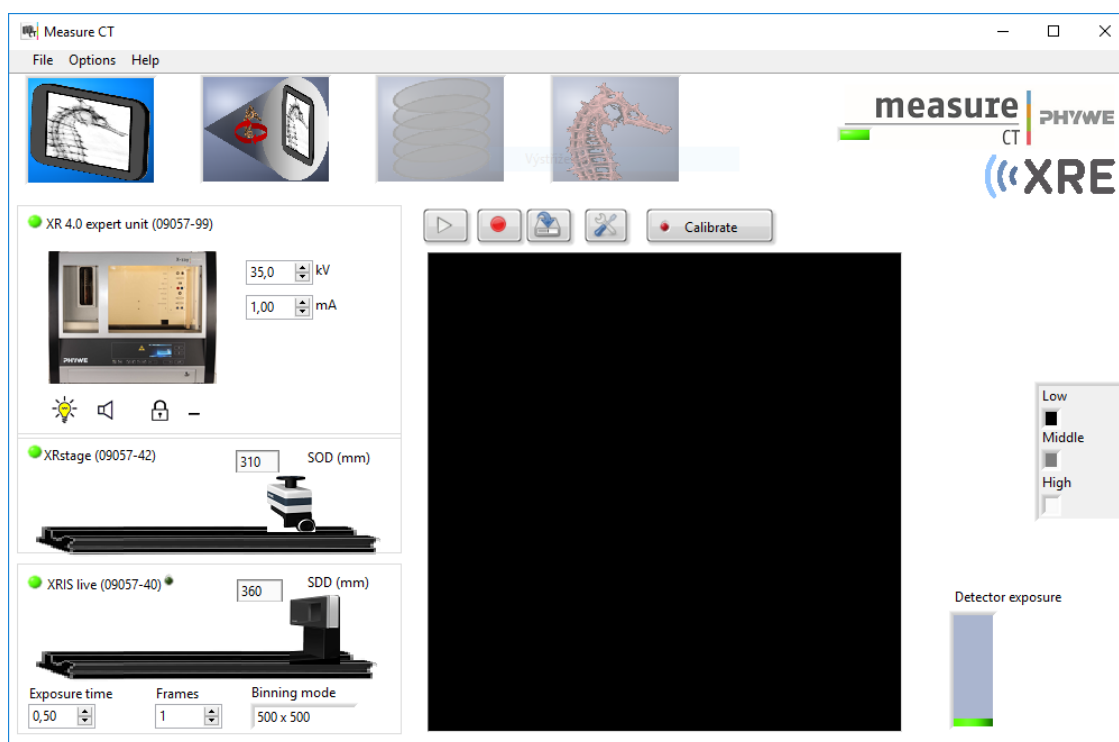
Obr. 4.7: Okno náhledu vybraného zrekonstruovaného řezu [zdroj: autor]

Po navolení optimálních parametrů pro rekonstrukci je možné v okně náhledu volit několik dalších nastavení týkajících se výstupu, jako jsou dynamický rozsah, region zájmu nebo formát výstupu. Dynamický rozsah výstupu lze upravovat jak v zobrazovaném histogramu, tak pomocí manuálního zadávání krajních hodnot – je též možné použít Hounsfieldovy jednotky (tzv. CT čísla) místo lineárních koeficientů útlumu. Zvolení a rekonstrukce pouze regionu zájmu pomůže grafické kartě s následovným vykreslováním 3D modelu ze zrekonstruovaných řezů šetřením její operační paměti.

Kromě dalších užitečných funkcionalit jako jsou možnost volby barevného schématu výstupu, podvzorkování výstupu, maskování defektních pixelů, profilovací funkce nebo zobrazení měřítek po stranách zrekonstruovaných řezů, disponuje rekonstrukční program NRecon mnoha dalšími funkcemi, které jsou popsány v manuálu programu [12].

4.4.2 Measure CT

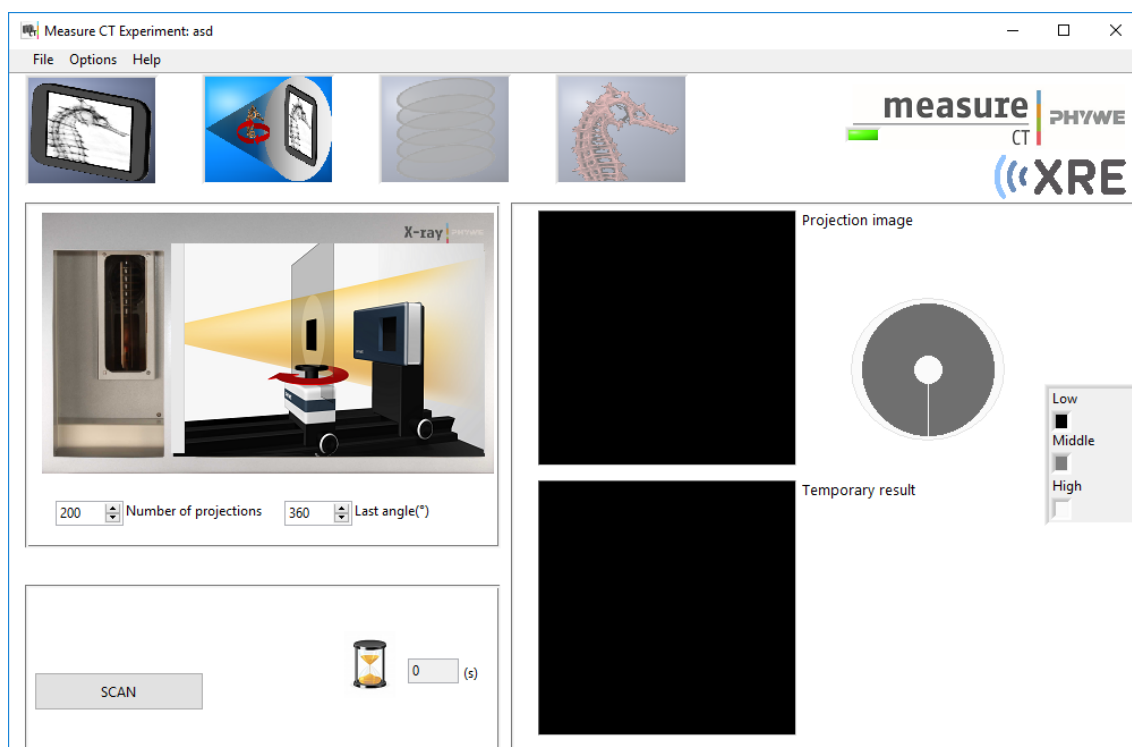
Softwarový balík Measure CT slouží k ovládání digitálního detektoru rentgenového záření XRIS včetně experimentální sestavy XR 4.0, pro kterou je tento detektor primárně určen. Kromě toho umožňuje následnou rekonstrukci naskenovaných projekcí a export zrekonstruovaných řezů v běžně používaných formátech pro pozdější analýzu obrazových dat v profesionálních vykreslovacích programech, jako např. Dragonfly. Measure CT disponuje 4 operačními módy: Live view and parameters, CT Scan, Reconstruction, 3D View. Mezi jednotlivými módy lze překlíkávat pomocí čtyř velkých tlačítek v záhlaví aplikačního okna.



Obr. 4.8: Rozhraní programu Measure CT – Live view and parameters [zdroj: autor]

Okno Live view and parameters umožňuje nastavování parametrů potřebných pro skenování (anodové napětí, emisní proud, vzdálenosti objekt-zdroj a kamera-zdroj, doba expozice, binning) a po uzavření a uzamčení skenovacího prostoru také náhled na vzorek v reálném čase.

Před samotným spuštěním CT skenu je pro optimalizaci výsledku potřeba vykonat kalibraci systému stlačením tlačítka Calibrate. Pro vykonání kalibrace je potřeba vyjmout vzorek ze skenovacího prostoru sestavy. Během náhledu lze také nastavit kontrast obrazu, který je však během CT skenu nastavován automaticky. Pro úspěšné prokliknutí do módu CT scan je potřeba po kalibraci systému do programu zadat znovu vzdálenosti objekt-zdroj a kamera-zdroj a kliknutím na File > New experiment vytvořit nový experiment a vyplnit požadované údaje.

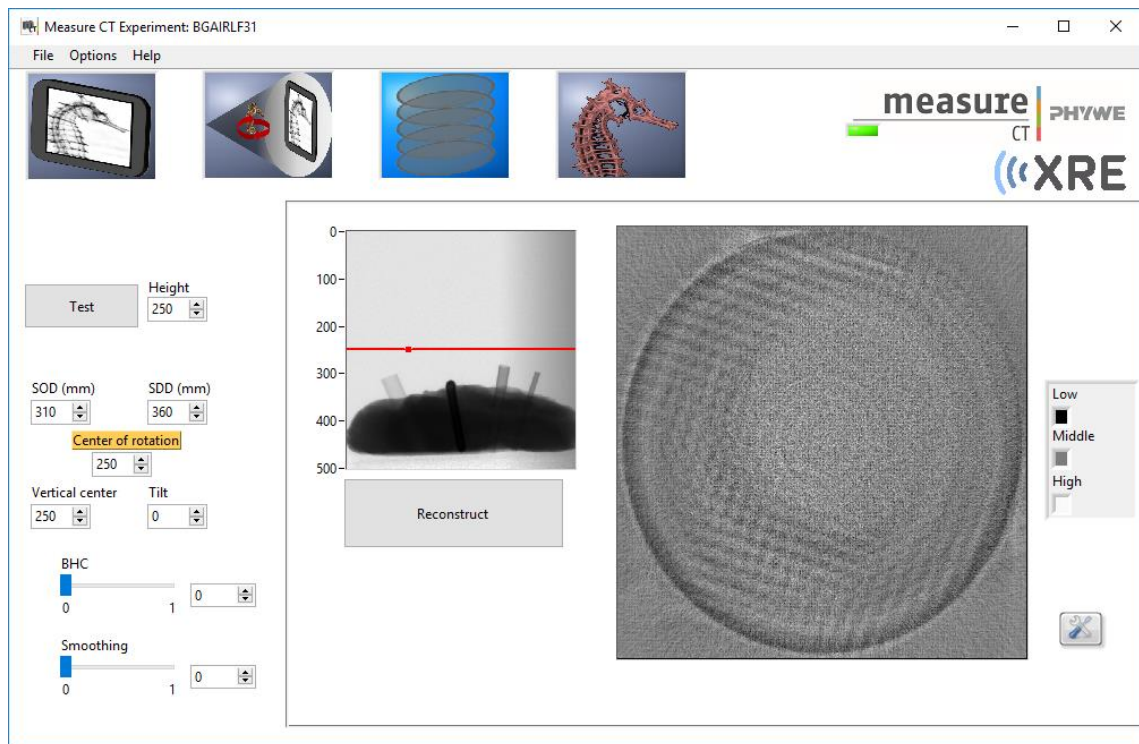


Obr. 4.9: Rozhraní programu Measure CT – CT scan [zdroj: autor]

Před spuštěním CT skenu je v okně CT scan potřeba nastavit dva parametry – počet projekcí a velikost posledního úhlu rotace. Z těchto dvou parametrů pak lze jednoduchým výpočtem zjistit velikost úhlu jedné rotace jako podíl posledního úhlu rotace a celkového počtu projekcí.

Po spuštění skenování se v dolním levém rohu okna zobrazí progres skenu spolu se zbývajícím časem do konce skenu. Na pravé straně okna je možné pozorovat aktuální snímanou projekci spolu s grafickým znázorněním velikosti stupně otočení stolku a přechodný výsledek rekonstrukce.

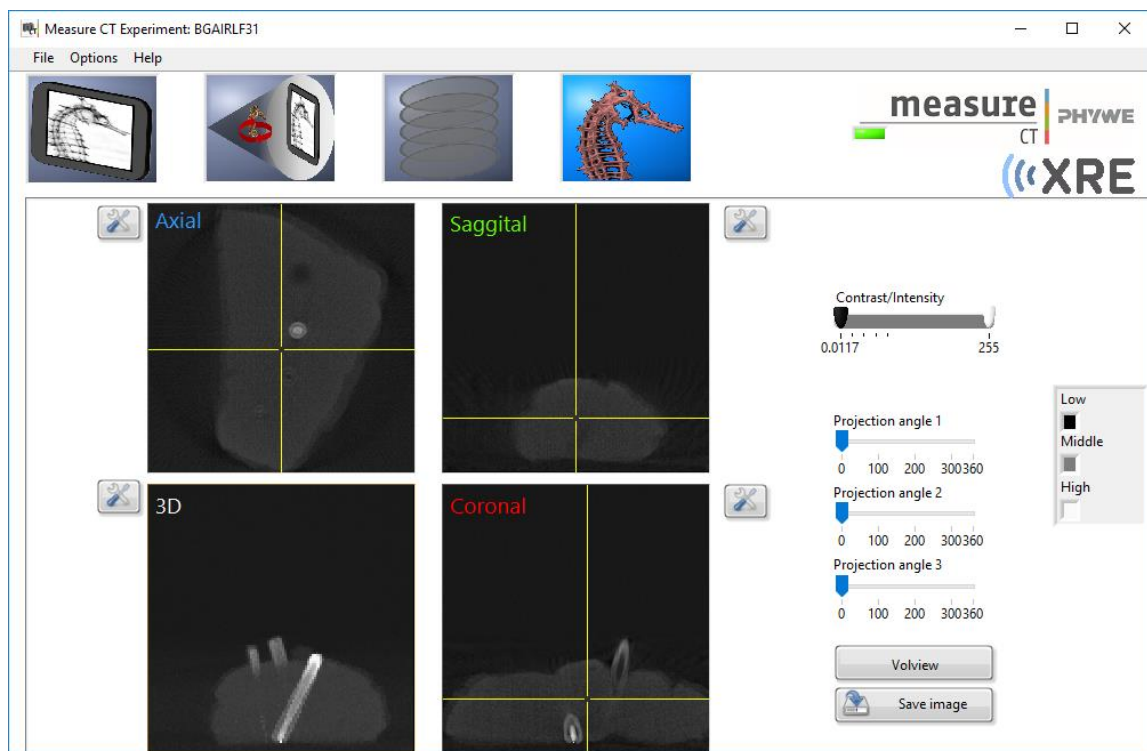
Po dokončení skenování se v pořadí třetí tlačítko Reconstruction rozsvítí modře. Pomocí něj pak lze přejít k rekonstrukci řezů z projekcí, anebo kliknutím na „simulate Scan“ znovu spustit skenování jako simulaci – všechny vypočtené „mezirekonstrukce“ se uloží, z kterých lze pak pomocí funkce Image viewer tvořit videa.



Obr. 4.10: Rozhraní programu Measure CT – Reconstruction [zdroj: autor]

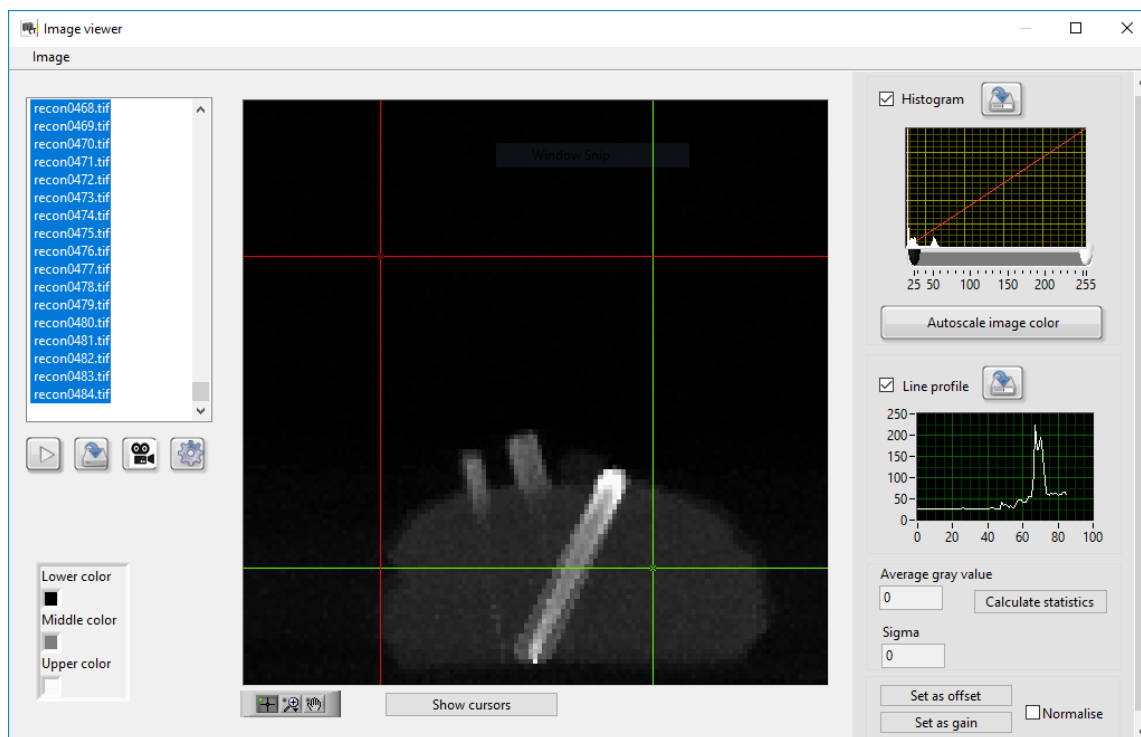
V předposledním okně Reconstruction lze ze získaných projekcí rekonstruovat řezy skenovaného objektu. Před spuštěním samotné rekonstrukce je však vhodné otestovat nastavení jednotlivých hodnot rekonstrukčních parametrů (střed rotace, náklon detektoru, korekce utvrzování svazku, vyhlazování) pro získání optimálního výsledku.

Nejdůležitějším pro rekonstrukci je parametr střed rotace, který je vztažen k fyzické ose, kolem které skenovaný objekt rotuje. Ideálně je hodnota středu rotace identická s prostředním sloupcem pixelů detektoru (250 pro binning 500x500 [13]), je však dobré vyzkoušet i vedlejší hodnoty pro dosažení ostřejších rekonstrukcí řezů.



Obr. 4.11: Rozhraní programu Measure CT – 3D View [zdroj: autor]

Okno 3D View umožňuje po rekonstrukci zjednodušeně prozkoumat 3D model vykreslen z jednotlivých řezů. Krom 3D náhledu, v kterém lze 3D model různě natáčet pomocí běžců na pravé straně okna, jsou k dispozici i náhledy ve třech rovinách – xy, yz, xz (axiální, sagitální, koronální) – pomocí kterých je možné změnou polohy žlutého křížku v jedné z nich zobrazovat různé řezy v odpovídajících směrech. Tyto řezy odpovídají poloze žlutých čar tvořících zmiňovaný křížek.



Obr. 4.12: Rozhraní programu Measure CT – Image viewer [zdroj: autor]

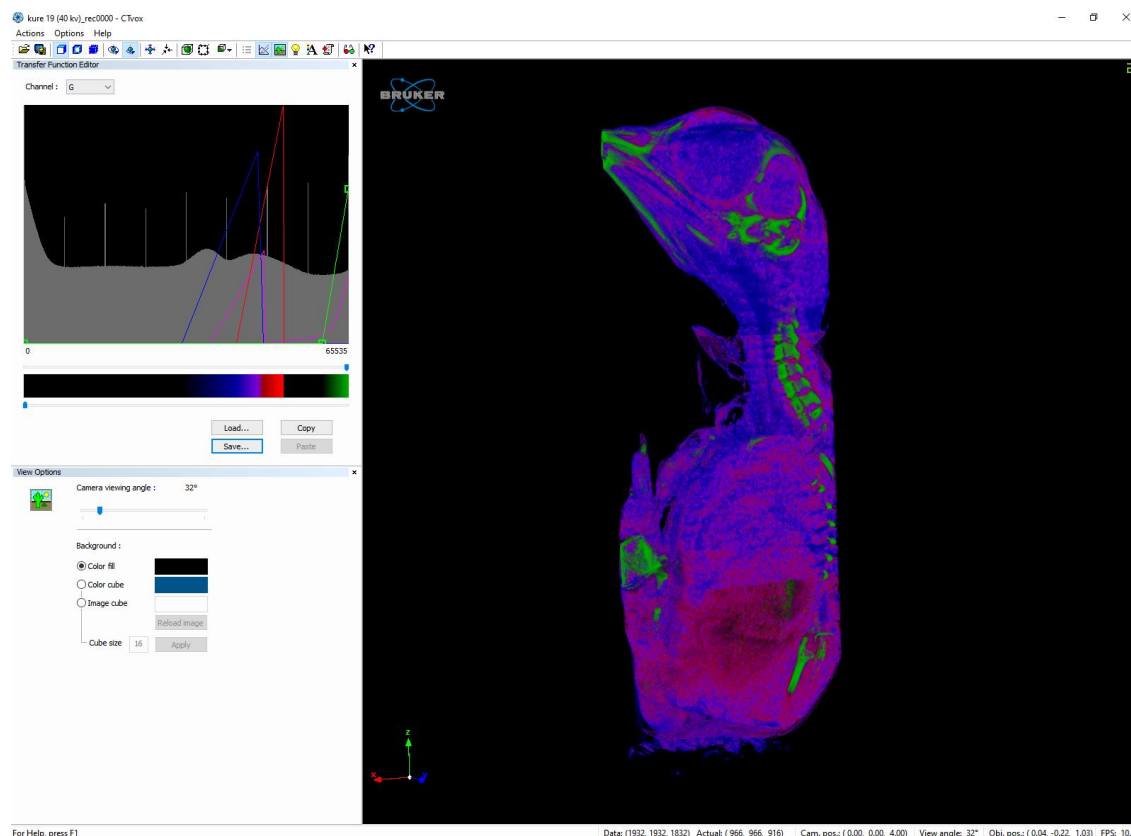
Funkce Image viewer slouží k základní úpravě a analýze načtených tomografických dat a jejich export. K úpravě dat slouží nástroj histogram, kterým lze upravovat jejich kontrast manuálně posouváním běžců pod histogramem, nebo automaticky tlačítkem Autoscale. K analýze dat je např. přítomna funkce čarového profilu, který zobrazuje hodnoty stupňů šedi podél čáry, kterou lze nakreslit nástrojem pravítka. Dalšími funkcemi jsou počítání průměrného stupně šedi ve vyznačeném regionu, změna barevného kódování, tvorba videa z obrazových dat a jeho export ve formátu AVI, a další.

4.5 Zobrazování, 3D vykreslování a úprava dat

K zobrazení a 3D vykreslení tomografických dat po jejich rekonstrukci ve výše uvedených rekonstrukčních programech byl použit software uveden v kapitole 2.4. Vzhledem k velmi dobré vybavenosti po analyzační i vykreslovací stránce a také značné versatilitě bude však v této kapitole popsán pouze software Dragonfly od společnosti Object Research Systems (ORS), který byl spolu s 3D vykreslovacím softwarem CTvox od společnosti Bruker použit k úpravě a analýze obrazových dat. Oba programy přímo souvisí se zadáním této práce.

4.5.1 CTvox

CTvox od společnosti Bruker je praktický nástroj k vykreslování 3D struktur z tomografických dat, podporující řadu souborových formátů pro obrazová data, včetně nejpoužívanějších TIF, BMP, RAW nebo standardu DICOM. Jeho ovládání je poměrně intuitivní a nenáročné. Program je dodáván v rámci softwarového balíku 3D.SUITE, který je dodáván spolu s každým systémem SkyScan a je určen k rekonstrukci, inspekci, vizualizaci a analýze vnitřní struktury skenovaného objektu [14].



Obr. 4.13: Rozhraní programu CTvox [zdroj: autor]

V levém horním rohu okna programu se nachází histogram útlumu spolu s editorem, pomocí kterého lze libovolně upravovat převodní charakteristiku – program může buď jednoduše pospojovat jednotlivé markery, anebo jich využít jako uzlů pro vytvoření tzv. spline křivky. Program pak v režimu prolnutí tzv. Volume rendering (lze nastavit v paneli nástrojů) podle převodní charakteristiky přiřadí každému voxelu odpovídající stupeň právě zvoleného parametru (tzv. emisní barvu [15]) v závislosti od útlumu daného voxelu.

Na výběr je celkem pět parametrů – opacita (neprůhlednost), červený (R) kanál, zelený (G) kanál, modrý (B) kanál a luminiscence (L). V případě spojení všech tří RGB kanálů jsou k dispozici pouze dva parametry – opacita a luminiscence – voxelům je pak přiřazována jejich neprůhlednost (opacita) a stupně šedi. V opačném případě jsou k dispozici čtyři parametry, a to opacita spolu se všemi třemi kanály RGB – kromě přiřazování neprůhlednosti lze tímto způsobem jednotlivé voxely i různě barvit, resp. barevně je segmentovat.

Kromě režimu prolnutí Volume rendering jsou k dispozici další dva režimy – Attenuation (česky: útlum) a Maximum Intensity Projection (MIP, česky: projekce maximální intenzity). Režim Attenuation slouží k digitální rekonstrukci rentgenového snímku podél směru aktuálního náhledu. V režimu MIP je z každého paprsku směřujícího kolmo k obrazovce zachován pouze nejjasnější voxel nacházející se podél tohoto paprsku. Režim MIP tedy automaticky zvýrazňuje struktury maximální intenzity.

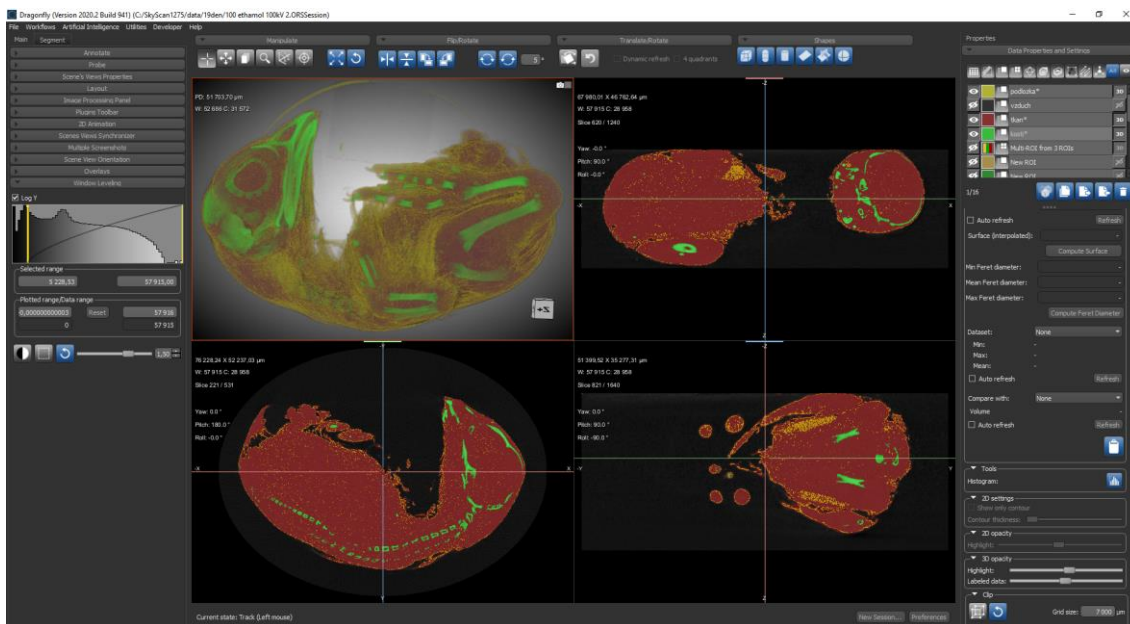
V levém dolním rohu okna jsou dále umístěny možnosti náhledu, kde je možné nastavit typ a barvu pozadí náhledového okna (na pravé straně) spolu s náhledovým úhlem kamery – ten se zdánlivě chová jako přiblížení, při rotaci scény však způsobuje změnu rychlosti pohybu (natáčení) kamery kolem objektu.

Při zobrazování jednotlivých struktur je velmi užitečná funkce vystřihování a vyřezávání, nacházející se v panelu nástrojů. Funkce vystřihování (angl. clipping) slouží k odstranění části objemu nacházejícího se mimo zvolený tvar; vyřezáváním zas odstraníme část objemu uvnitř zvoleného tvaru. K dispozici jsou tvary kvádr, koule, válec a tříboký hranol.

Další funkce programu CTvox (světelné efekty, anotace, zaznamenávání letu, stereo náhled, prohlížení vícero objemů, a další) jsou podrobněji popsány v manuálu [15].

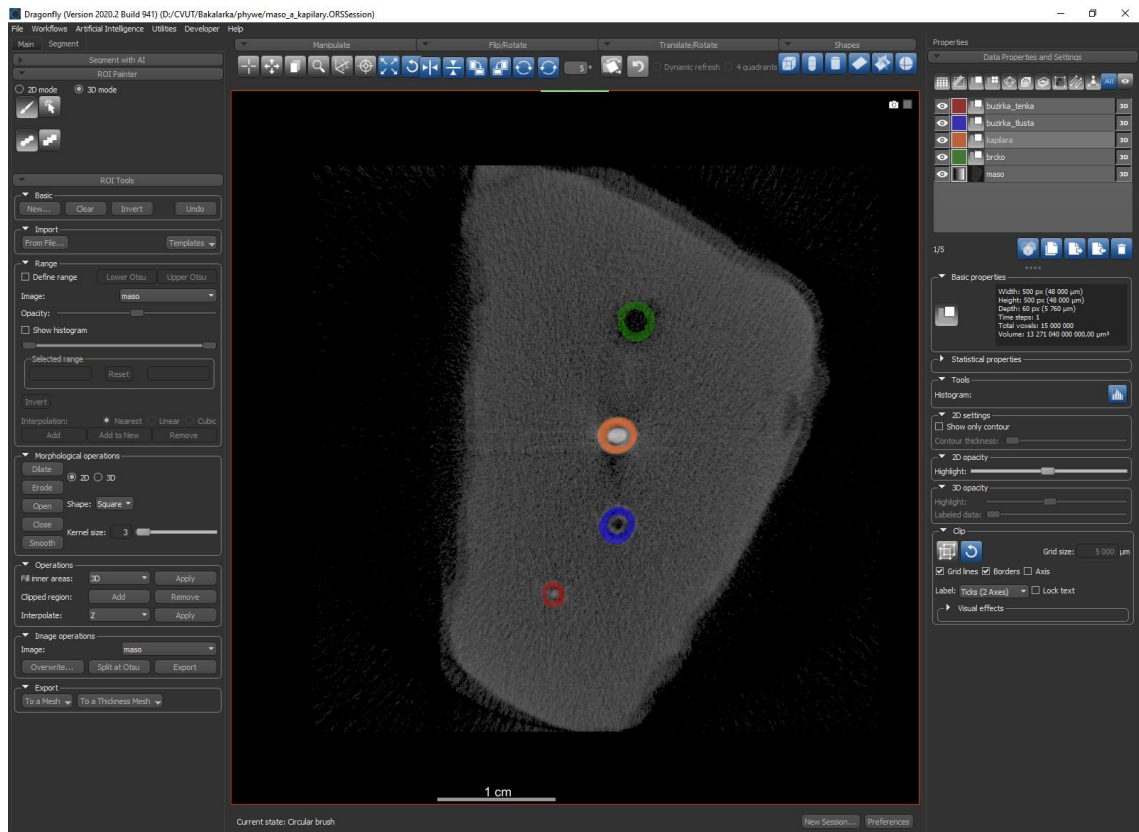
4.5.2 Dragonfly

Program Dragonfly od společnosti Object Research Systems (ORS) je nejnovějším ze softwarových balíčků sloužících k segmentaci tomografických dat. Pro nekomerční akademické použití je Dragonfly dostupný zdarma, je však potřeba nejdříve zažádat o udělení nekomerční licence, na kterou oprávnění společnost ORS posuzuje individuálně – po stažení a instalaci programu je potřeba pro získání licence vyplnit poměrně delší osmistranný online formulář.



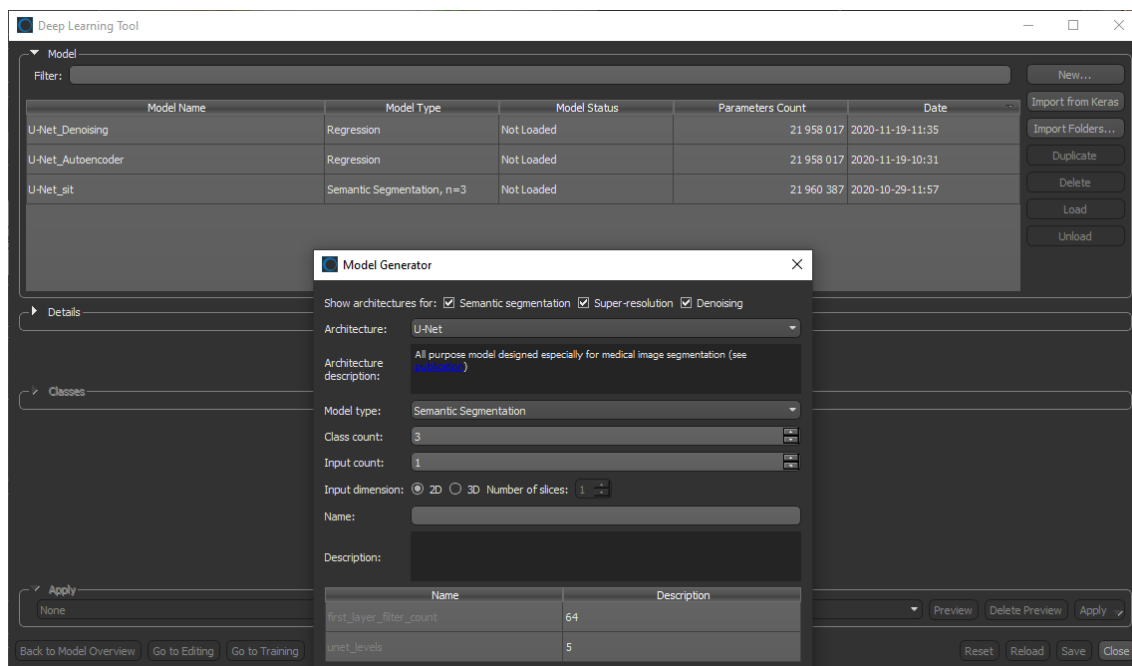
Obr. 4.14: Rozhraní programu Dragonfly [zdroj: autor]

Rozhraní je ve srovnání s ostatními softwary moderní, propracované a v mnoha směrech uživatelsky přizpůsobitelné. Ovládací panely po levé i pravé straně lze volně přesouvat jak mezi sebou, tak připnout na horní lištu, anebo je úplně odepnout, volně přesouvat a používat ve formě vyskakovacích oken. Práci s programem usnadňuje i množství klávesových zkratk, které lze libovolně konfigurovat. Rozložení náhledů (3D, XY, YZ, XZ) je též uživatelem přizpůsobitelné, každý z náhledů lze navíc prakticky dvojklikem otevřít na celou obrazovku.



Obr. 4.15: Segmentace kapilár v kuřecím masu [zdroj: autor]

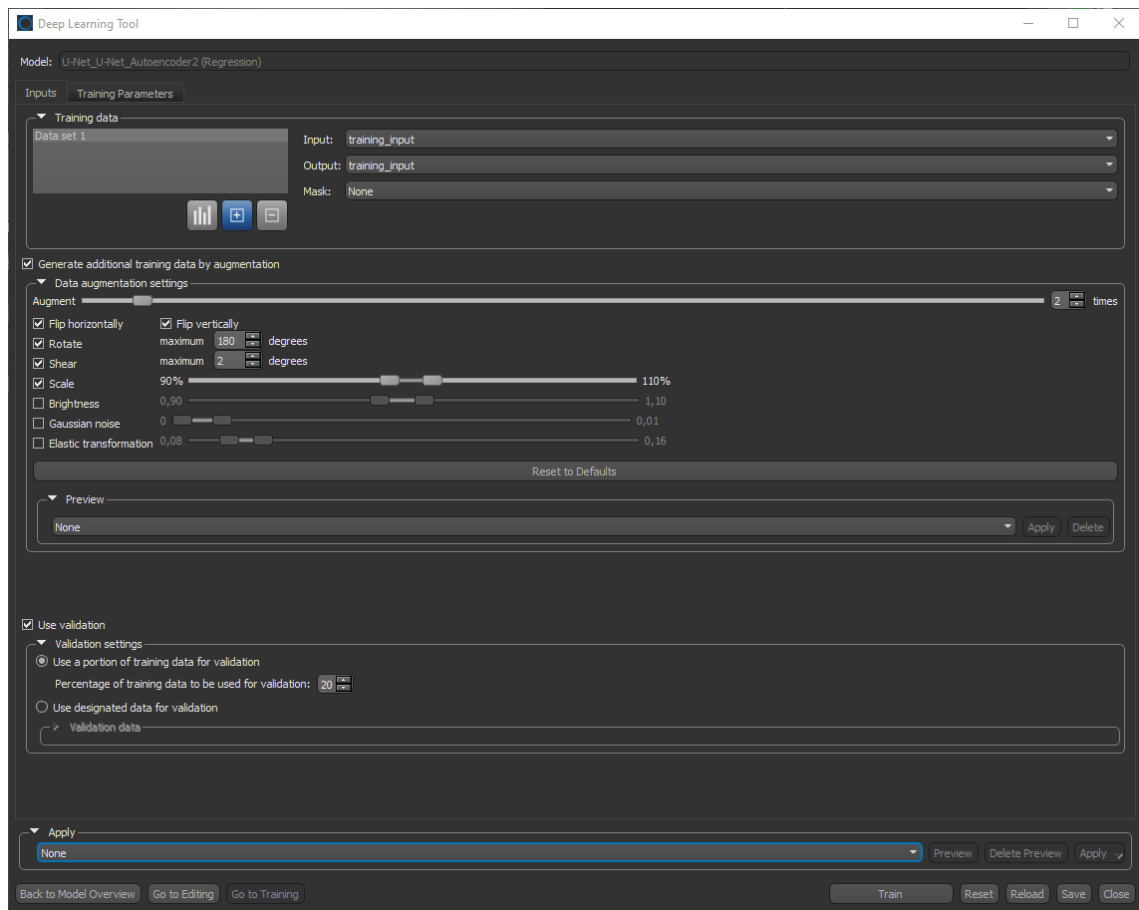
Program disponuje také širokou nabídkou nástrojů určených k segmentaci různých částí, mezi nejpoužívanější patří ROI Painter, který nabízí kromě klasického štětce i 3D štětec a panel ROI Tools, který umožňuje vytváření regionů zájmu (ROI, angl. Region of Interest) pomocí histogramu buď manuálně, posouváním hraničních hodnot útlumu, anebo automaticky, s využitím Otsuho prahovací metody.



Obr. 4.16: Deep Learning Tool [zdroj: autor]

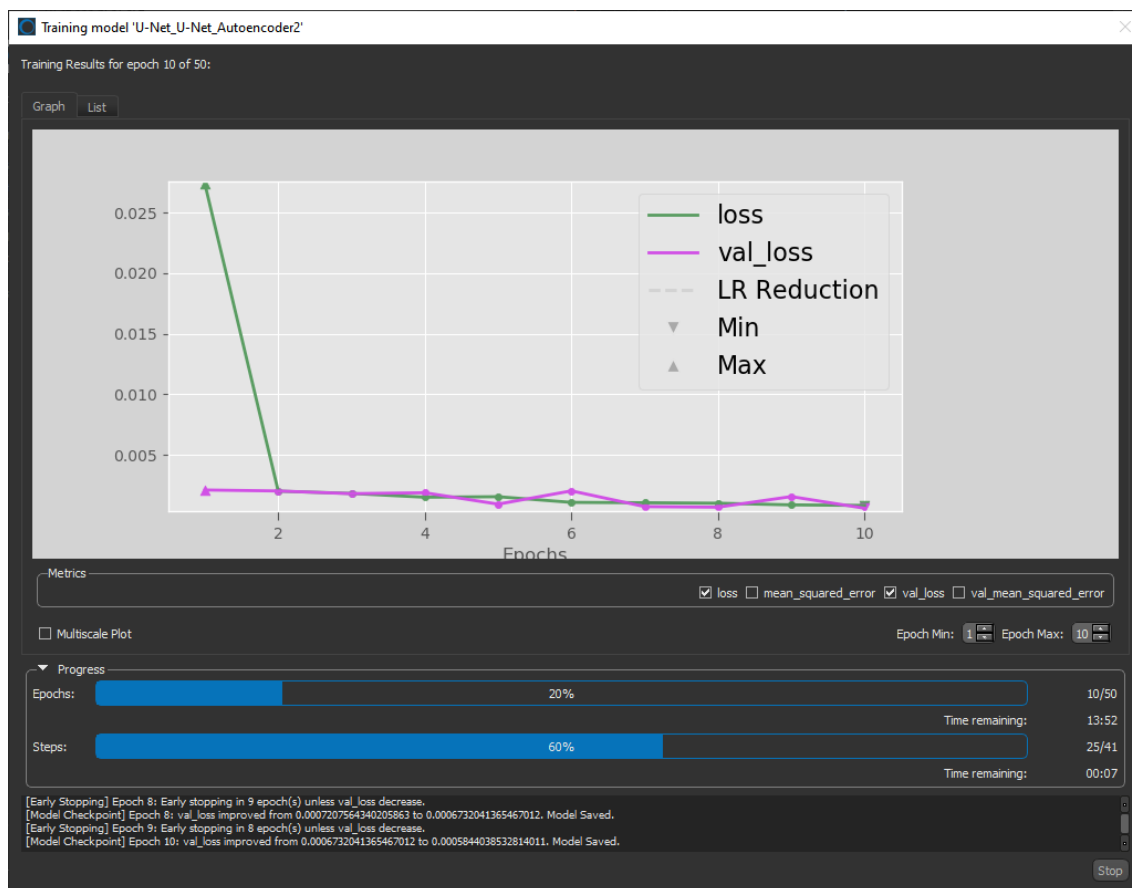
Největší výhodou multifunkčního softwaru Dragonfly oproti ostatním segmentačním programům je jeho nástroj pro hluboké učení (Deep Learning Tool) se zakomponovanými open-source knihovnamy TensorFlow (napsaná v jazyce Python, C++ a CUDA) a Keras (napsaná v jazyce Python), které byly vyvinuty společností Google za účelem strojového učení, především pro trénování hlubokých neuronových sítí. Tohoto nástroje lze využít jak k 3D segmentaci obrazových dat, tak k jejich odšumění a super rozlišení.

Jelikož cílem této práce je vysegmentovat v biologických vzorcích jednotlivé měkké tkáně, kterých relativně malý rozsah CT čísel (40–80) znamená jejich nízký kontrast, který zároveň snižuje intrinsický šum samotného detektoru sestavy SkyScan 1275, je na místě zvážit odšumění těchto obrazových dat.



Obr. 4.17: Trénování konvoluční neuronové sítě typu U-Net – vstupní parametry (trénovací vstupní data jsou totožná s daty na výstupu) [zdroj: autor]

Existuje vícero způsobů, jak lze tohoto nástroje využít k odšumění obrazu. Jedním z nich je využití architektury konvoluční neuronové sítě U-Net (vyvinuté na Univerzitě ve Freiburgu (Německo) za účelem segmentace biomedicínských dat [16]) na způsob neuronové sítě typu Denoising (odšumovací) Autoencoder. Princip spočívá v tom, že neuronové síti s architekturou U-Net se dají na vstup trénovací data shodná s daty, která se vloží na výstup.



Obr. 4.18: Trénování neuronové sítě s architekturou U-Net [zdroj: autor]

Idea odšumění obrazu neuronovou sítí typu U-Net spočívá v tom, že její struktura obsahuje parametry, které během učícího procesu rekonstrukce provádějí downsampling a následně upsampling dat. Neuronová síť se tímto způsobem sice naučí rekonstruovat identický výstup z totožných trénovacích dat na vstupu, avšak v rekonstrukci určitých typů šumu už dobrá není [17]. Tímto způsobem zpracování obrazových dat se v ideálním případě tomografická data vyhladí.

Jednou z nejjednodušších a nejzákladnějších cest ke zlepšení kvality obrazových dat je však odšumění obrazu klasickou filtrací. Filtrace obrazu dokáže častokrát výrazně zlepšit kvalitu výsledného obrazu a také zvýraznit detaily, které by jinak zůstali nepovšimnuté.

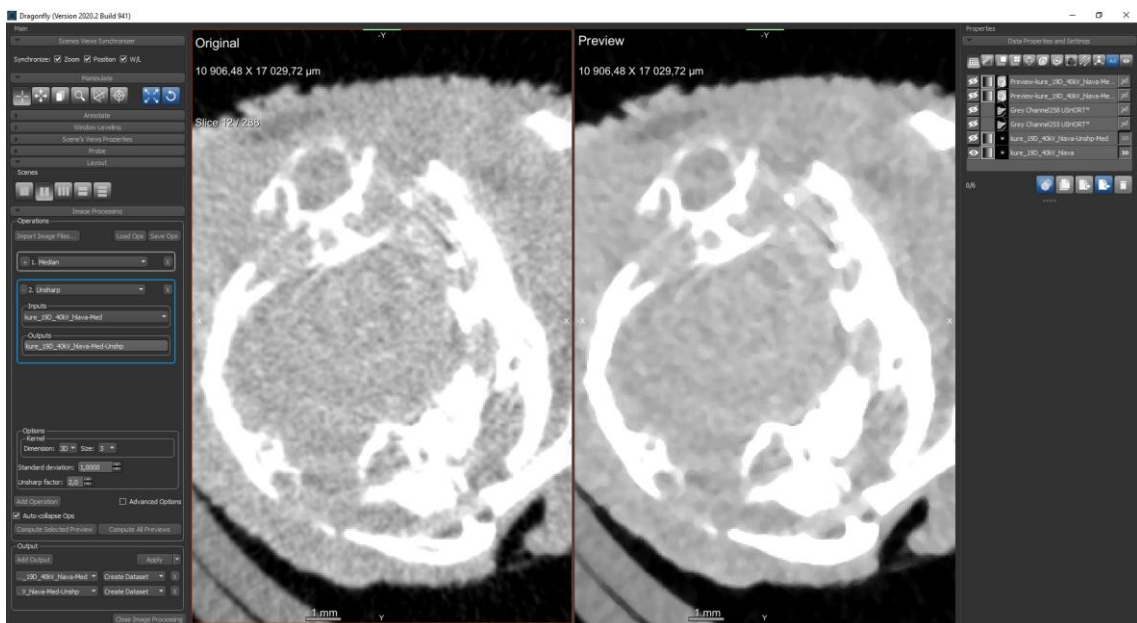
Nástroj filtrace obrazu, kterým Dragonfly disponuje, obsahuje značné množství zakomponovaných filtrů, s možností instalace dalších z jejich cloudové platformy Infinity Toolbox, kam mohou uživatelé nahrávat mimo vlastních filtrů i další užitečné zásuvné moduly, které si lze v prostředí Dragonfly skrze Python konzoli naprogramovat. Někdy je pro dosažení optimálního výsledku potřeba aplikovat dva a více filtrů za sebou, je však důležité zohlednit i pořadí filtrů – určitá pořadí filtrů optimální nejsou.



Obr. 4.19: Filtrace tomografických dat – vlevo: řez před úpravou; vpravo: řez po doostření a následném vyhlazení obrazu [zdroj: autor]

Na Obr. 4.19 je vidět výsledek použití sekvence filtru „Unsharpen Mask“ pro doostření obrazu a následně je použit mediánový filtr pro vyhlazení. Výsledkem je sice ostřejší obraz, avšak více zašuměný.

Kromě správné sekvence filtrů je důležité poznamenat, že kvalita výsledného obrazu je závislá jak na vstupním obrazu, tak na správném nastavení filtračních parametrů jako jsou velikost, tvar a dimenze (2D/3D) konvolučního jádra, počet iterací, apod.

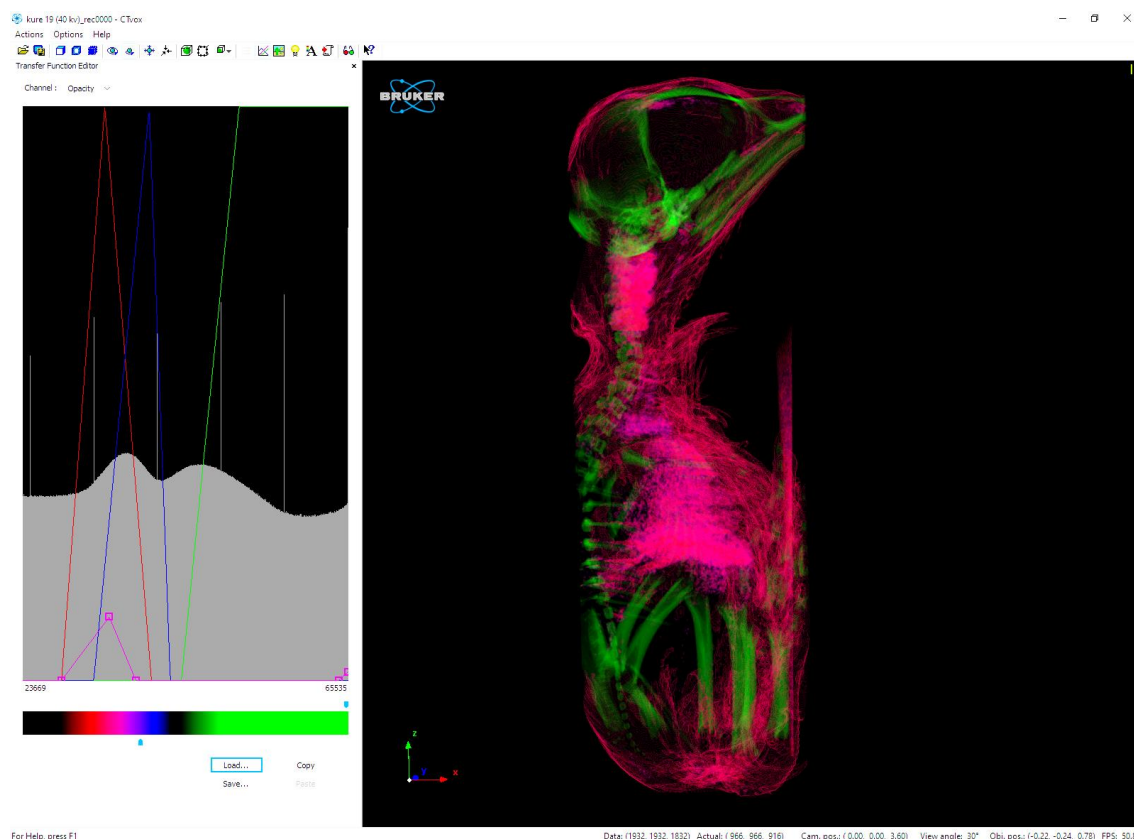


Obr. 4.20: Filtrace tomografických dat – vlevo: řez před úpravou; vpravo: řez po vyhlazení a následném doostření obrazu [zdroj: autor]

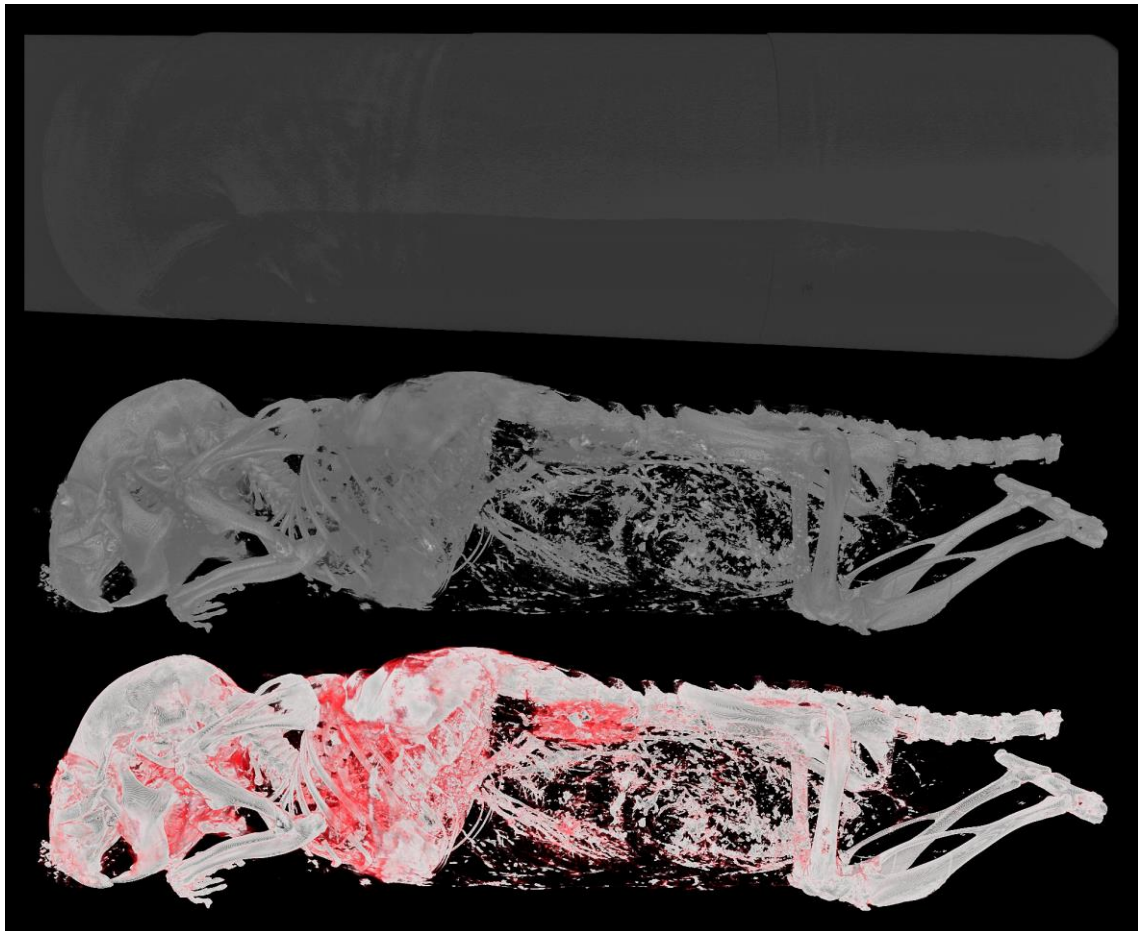
Na Obr. 4.20 byly použity stejné filtry se shodným nastavením filtračních parametrů jako na Obr. 4.19, byly však aplikovány v opačném pořadí. Výsledkem je obraz částečně zbaven šumu, na kterém jsou vidět o něco ostřejší struktury.

Další výhodou tohoto programu je v neposlední řadě i možnost exportovat výsledná data v různých formátech, ať už jako tomografické řezy (TIF, RAW, DICOM atd.) anebo v podobě 3D modelů (STL, OBJ, PLY a další).

Data z Obr. 4.20 byly po filtraci v softwaru Dragonfly dále barevně upraveny v programu CTvox.



Obr. 4.21: Obarvení vyfiltrovaných dat v programu CTvox [zdroj: autor]



Obr. 4.22: Filtrace zrekonstruovaných a 3D vykreslených tomografických dat s jejich následným obarvením [zdroj: autor]

4.6 Návrh převodní charakteristiky

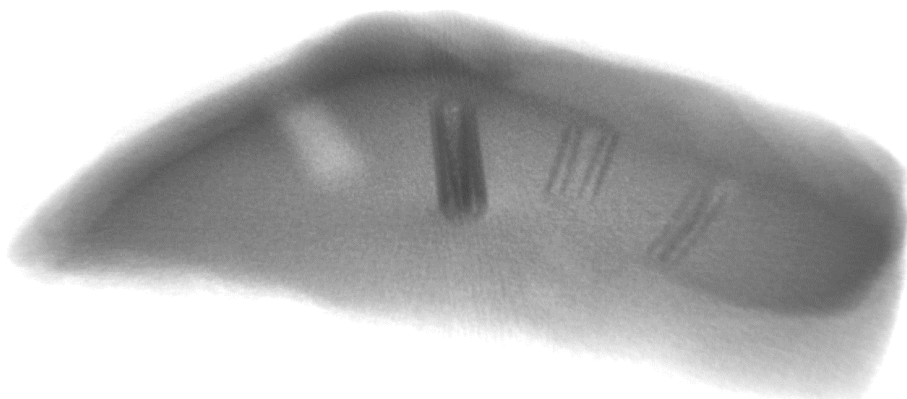
Ačkoliv je možné s převodními charakteristikami pracovat i v programu ORS Dragonfly, byl tento program využit pouze k filtraci a segmentaci dat a k exportu výstupů pro další práci se zpracovanými daty v jiných programech. Samotný návrh převodních charakteristik však z důvodu exportu souborů s příponou *.tf probíhal v prostředí CTvox. Podrobný popis práce s editorem převodních charakteristik programu CTvox je popsán v kapitole 4.5.1.

Jelikož program CTvox neumožňuje přepočítání naměřených a zakódovaných lineárních koeficientů útlumu jednotlivých voxelů na Hounsfieldovy jednotky (CT čísla) po rekonstrukci projekcí, nebylo možné řídit se při návrhu převodních charakteristik pomocí tzv. „okének na tkáň“ známými hodnotami CT čísel jednotlivých tkání. Bylo možné vycházet pouze ze znalosti vybraného rozsahu CT čísel pixelů projekcí (který chce uživatel zakódovat do obrázků zrekonstruovaných řezů), zvoleného v rekonstrukčním programu NRecon před spuštěním samotné rekonstrukce dat, a následném odhadu CT čísla z přiřazené celočíselné hodnoty voxelům (pixelům – v případě snímků jednotlivých řezů) s 16bitovou hloubkou (v případě formátu .tif).

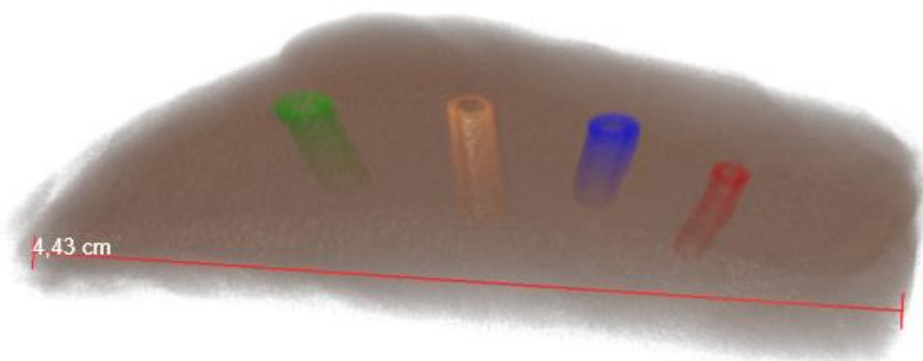
5 Výsledky

5.1 Rekonstrukce fantomu cévního řečiště a segmentace kapilár

V rámci laboratorního experimentu s výukovou sestavou Phywe XR 4.0 byl naskenován fantom cévního řečiště v podobě válcovitých trubiček/kapilár napíchaných ve vzorku kuřecího masa a poté byly jednotlivé útvary vysegmentovány za pomoci segmentačních nástrojů softwaru ORS Dragonfly.



Obr. 5.1: Zrekonstruovaný fantom cévního řečiště; materiály zleva: polyethylen, sklo, silikon, silikon [zdroj: autor]



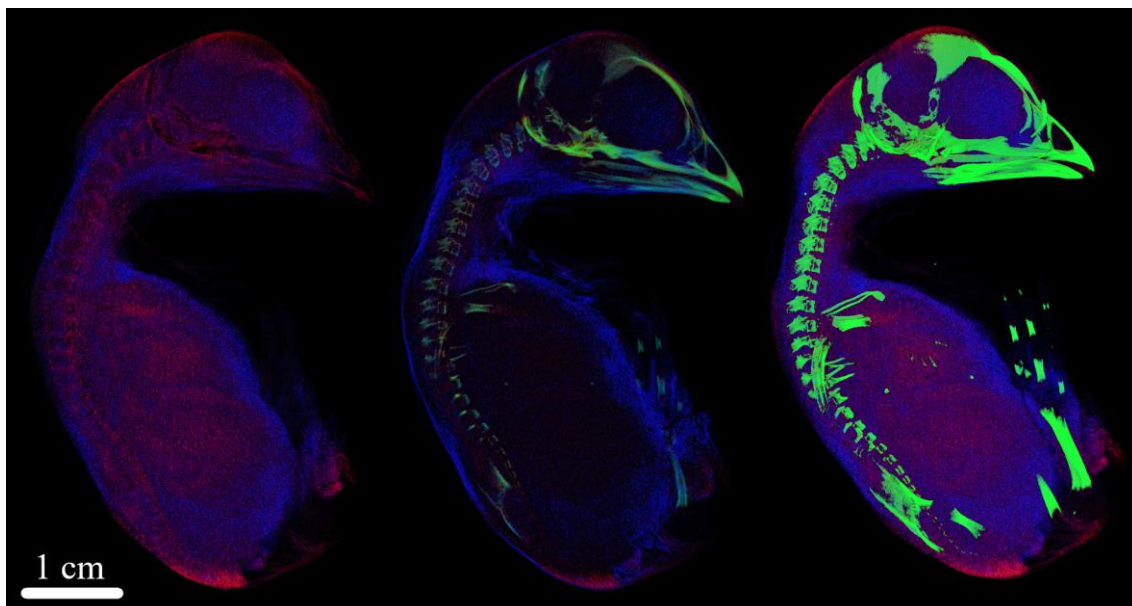
Obr. 5.2: Fantom cévního řečiště s vysegmentovanými kapilárami [zdroj: autor]

5.2 Výstupy z programu CTvox

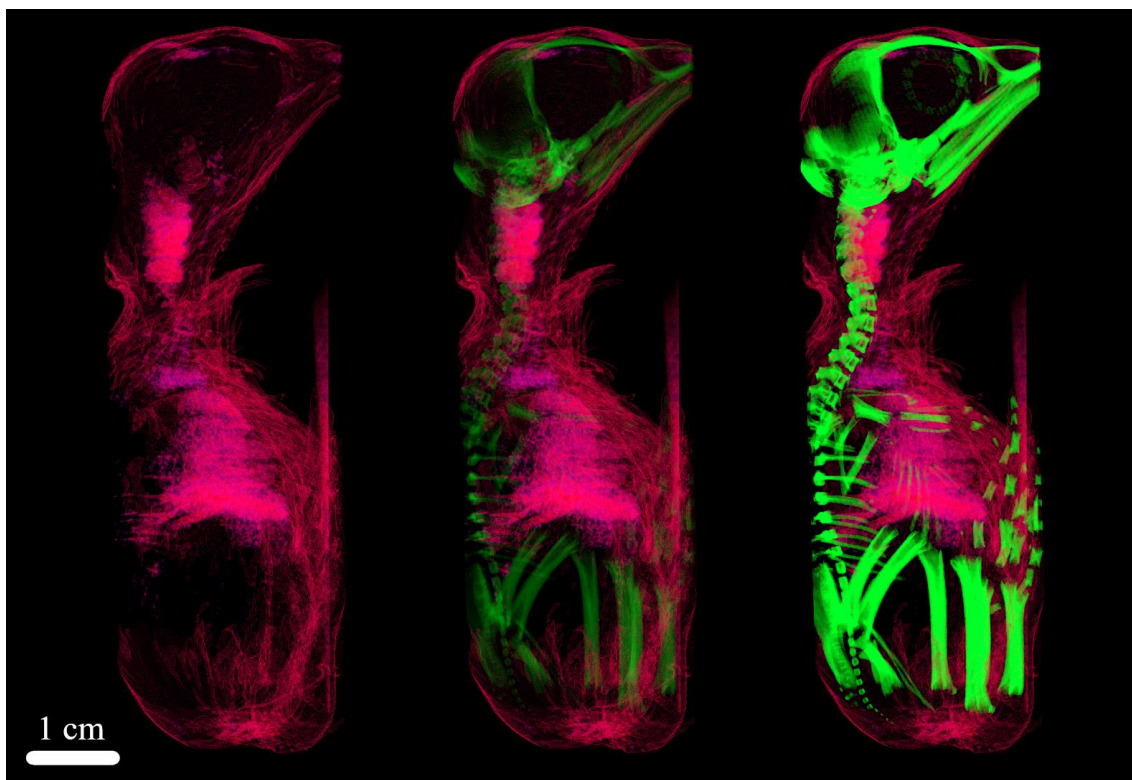
Po rekonstrukci dat programem NRecon, jsem v programu CTvox navrhl několik převodních charakteristik (transfer functions) zdůrazňujících různé struktury vybraných vzorků, zejména však měkkých tkání. Výstupy z programu CTvox jsou rozděleny do 5 podkapitol – podle použitého způsobu preparace vzorků, resp. použitého kontrastu.

5.2.1 Ethanol

U preparátů kuřat v roztocích ethanolu jsem navrhl převodní charakteristiky zvýrazňující jejich struktury s různou intenzitou zvýraznění kostí a následně nimi vzorky obarvil. Hlavu kuřete na Obr. 5.4 jsem pak vyfiltroval v programu ORS Dragonfly a na Obr. 5.25 a 5.26 ji porovnal s původními daty.



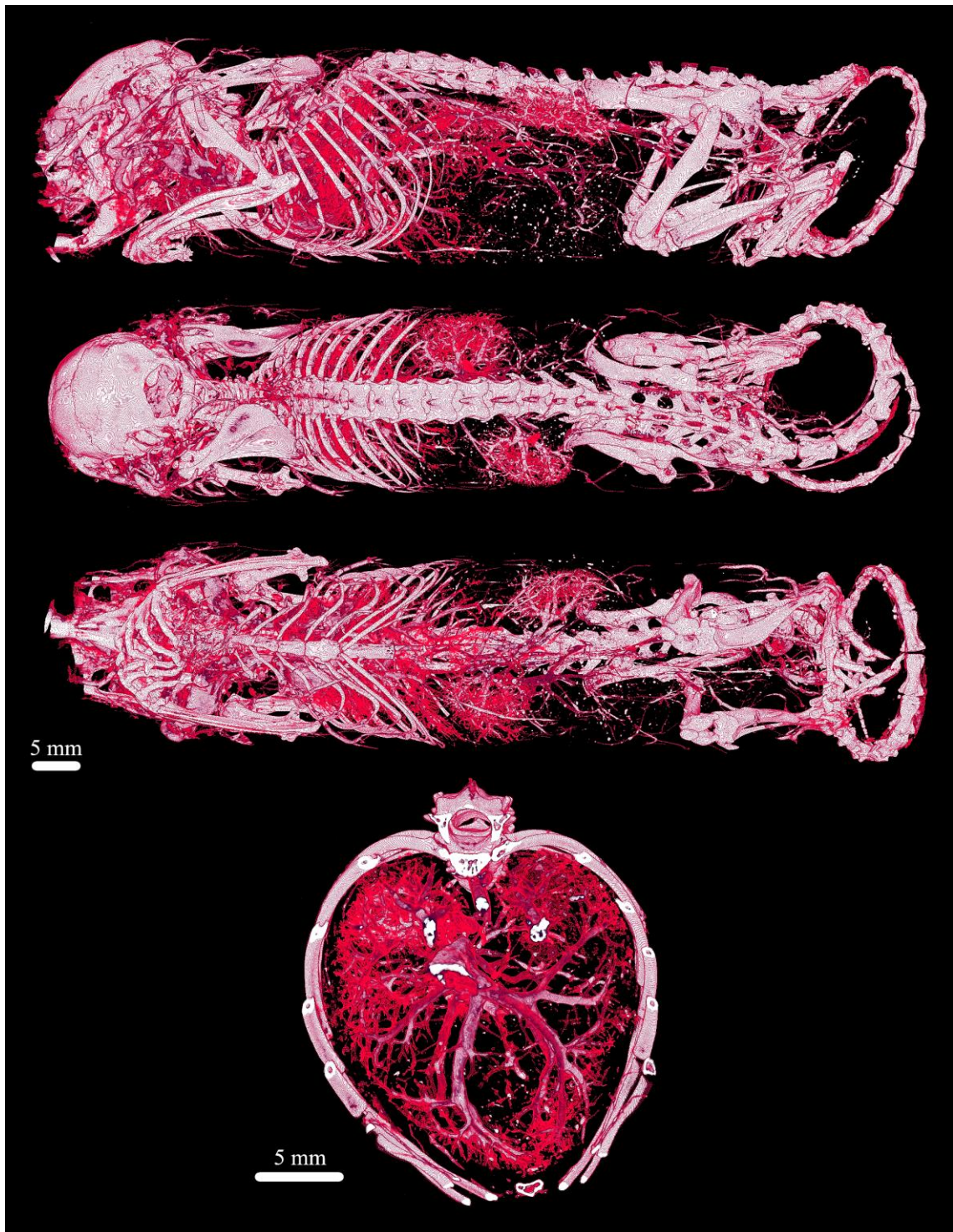
Obr. 5.3: Obarvené 19denní kuře (akvizice při anod. nap. 100 kV) [zdroj: autor]



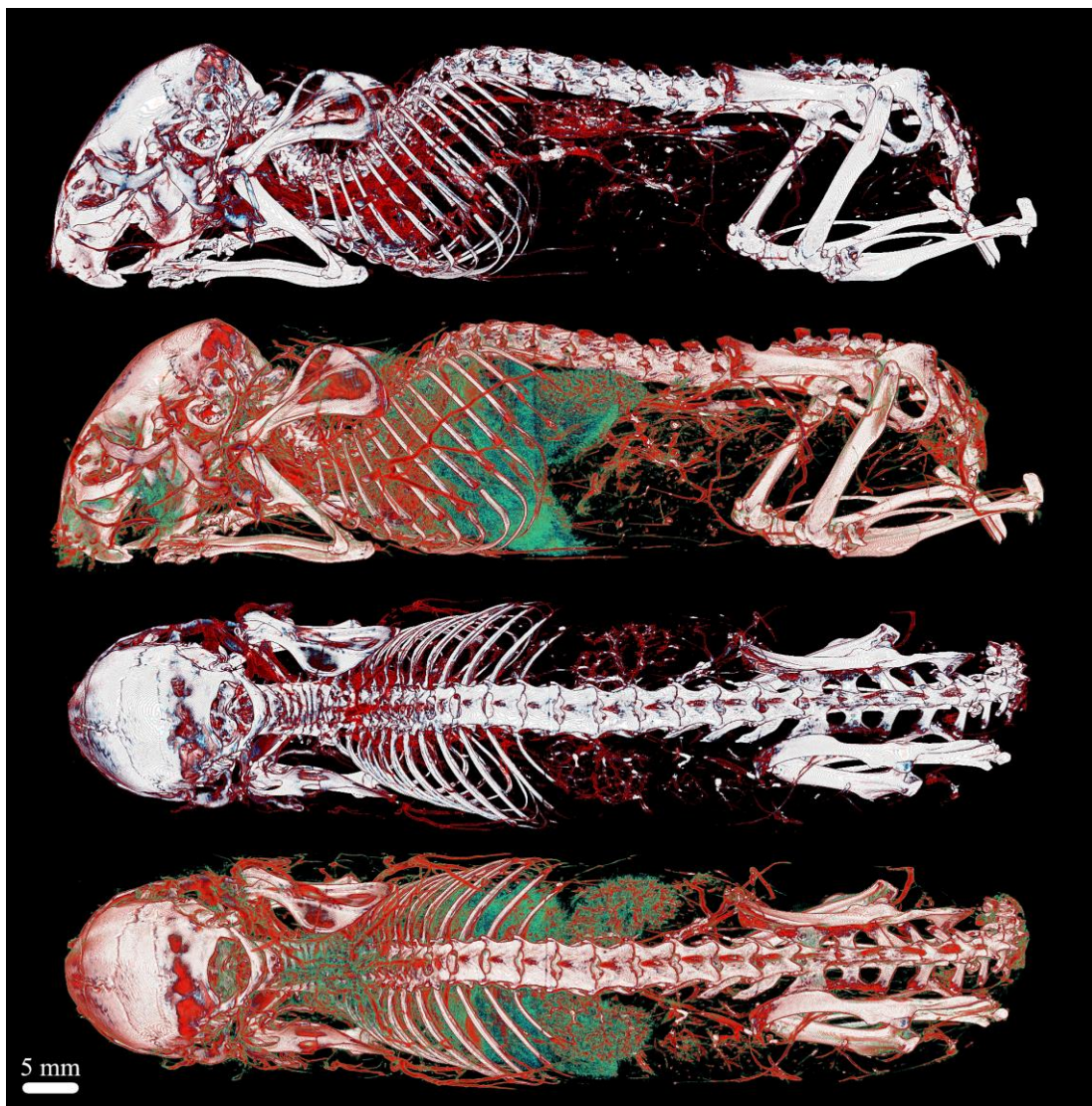
Obr. 5.4: Obarvené 19denní kuře (akvizice při anod. nap. 40 kV) [zdroj: autor]

5.2.2 Aurovist

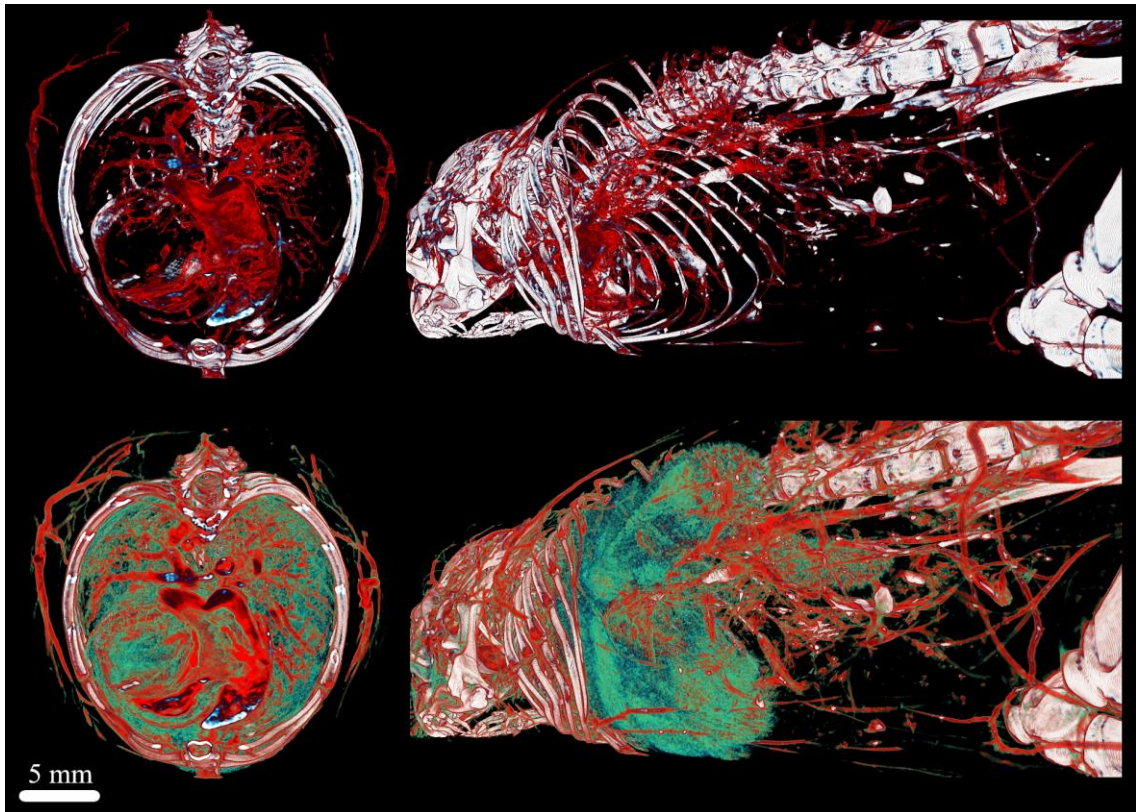
U ex vivo myši s kontrastní látkou se zlatými nanočásticemi (Aurovist) jsem navrhl převodní charakteristiky barevně zvýrazňující struktury měkkých tkání, zejména u cév a dýchacích cest.



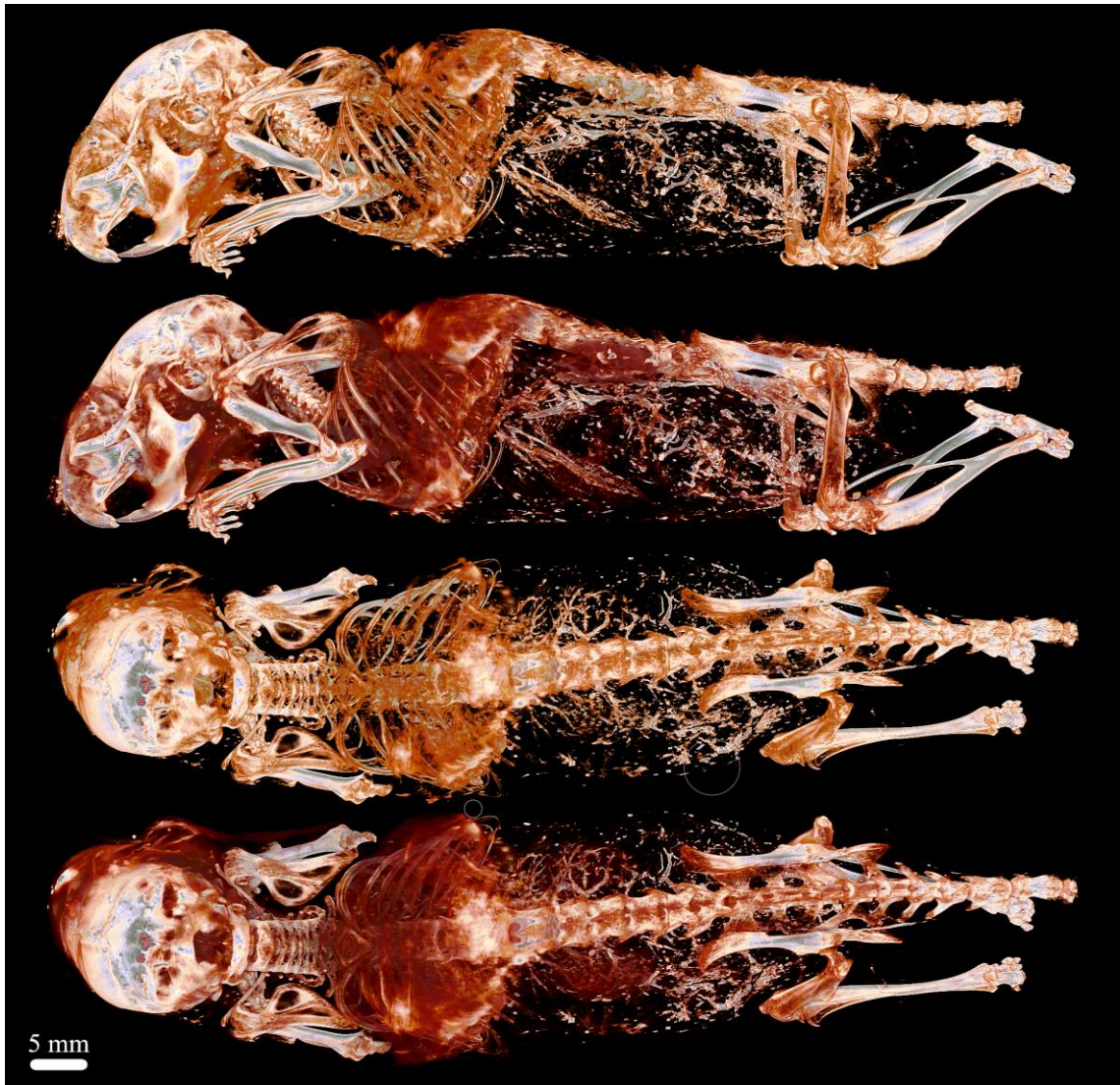
**Obr. 5.5: Segmentace a obarvení cévního řečiště – myš (k. l. Aurovist)
[zdroj: autor]**



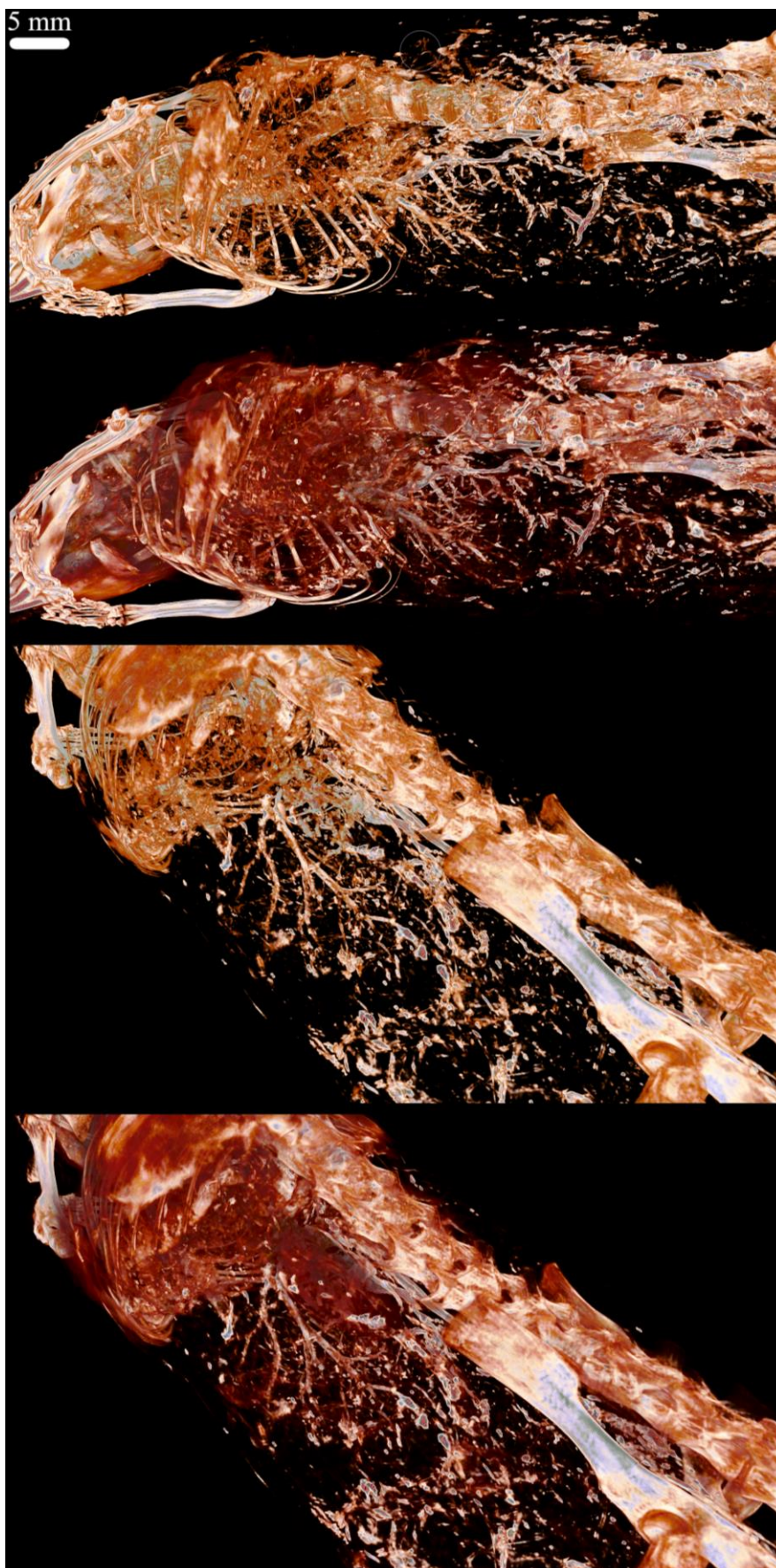
**Obr. 5.6: Segmentace a obarvení cévního řečiště a dýchacích cest – myš
(k. I. Aurovist) [zdroj: autor]**



Obr. 5.7: Segmentace a obarvení cévního řečiště a dýchacích cest – myš
(k. I. Aurovist) [zdroj: autor]



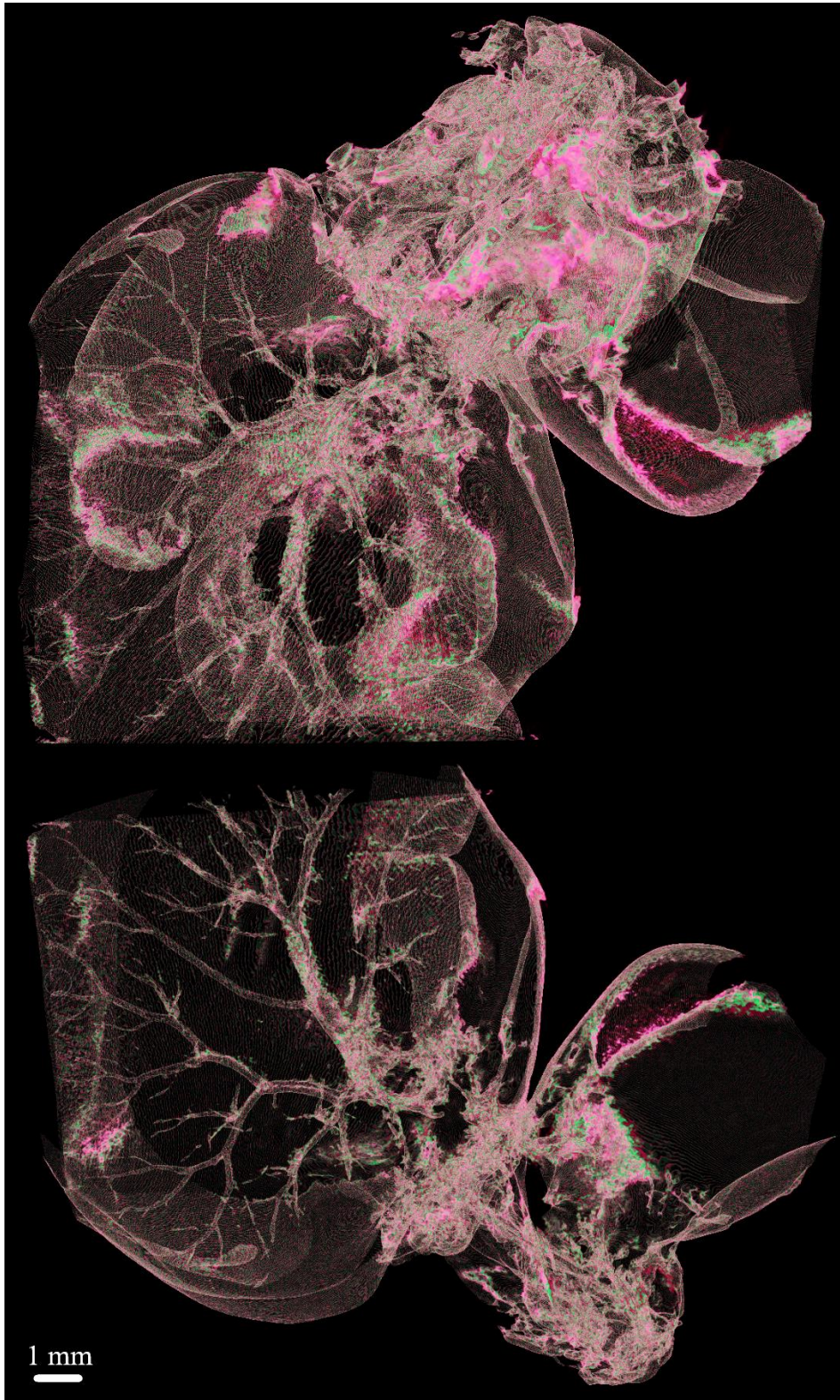
**Obr. 5.8: Segmentace a obarvení cévního řečiště a dýchacích cest – myš
(k. I. Aurovist) [zdroj: autor]**



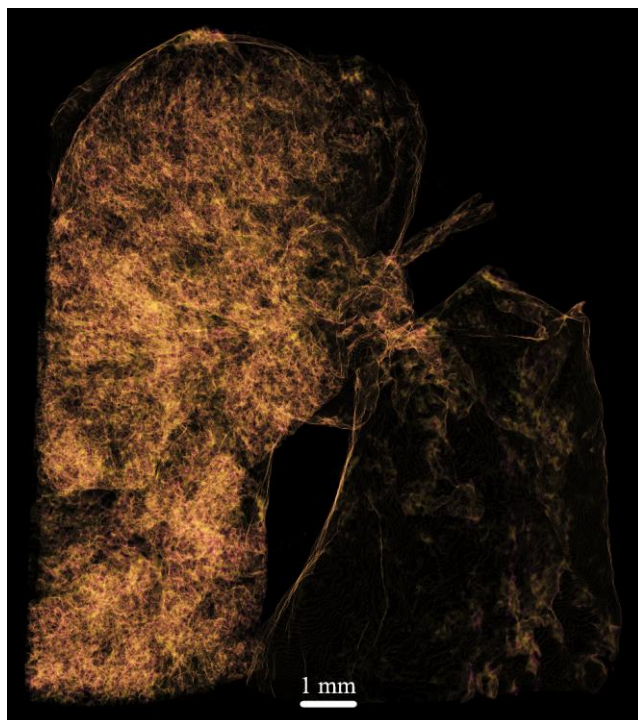
Obr. 5.9: Segmentace a obarvení cévního řečiště a dýchacích cest – myš
(k. I. Aurovist) [zdroj: autor]

5.2.3 Omnipaque

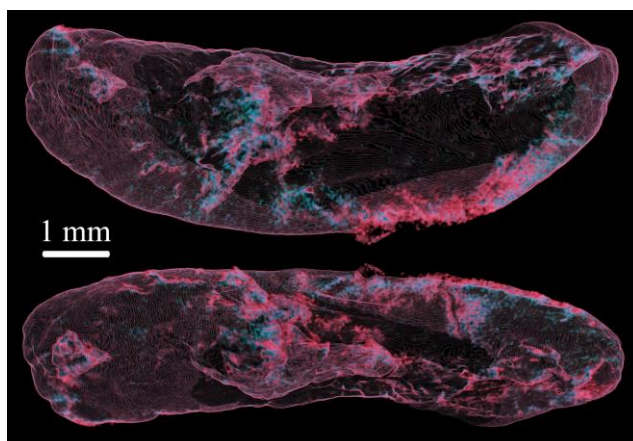
U myších orgánů, vypreparovaných kontrastní látkou Omnipaque, byly navrženy převodní charakteristiky zvýrazňující měkké tkáně těchto orgánů.



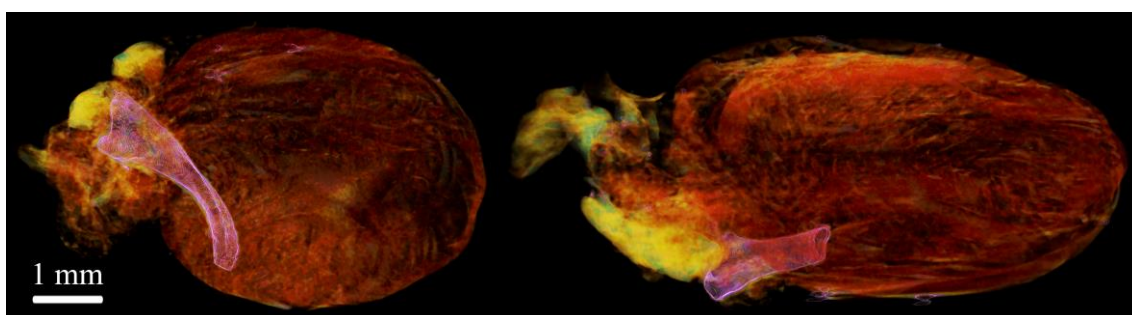
Obr. 5.10: Segmentace cévního řečiště – myší játra (k. l. Omnipaque)
[zdroj: autor]



**Obr. 5.11: Segmentace a obarvení měkké tkáně myších plic (k. l. Omnipaque)
[zdroj: autor]**



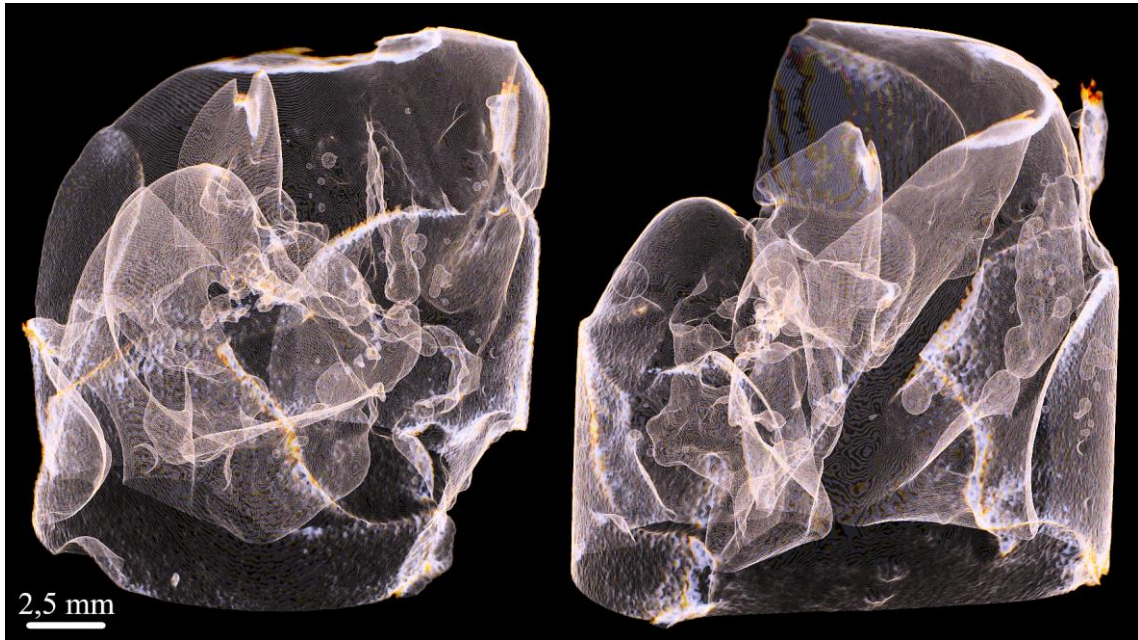
**Obr. 5.12: Segmentace a obarvení měkké tkáně myší sleziny (k. l. Omnipaque)
[zdroj: autor]**



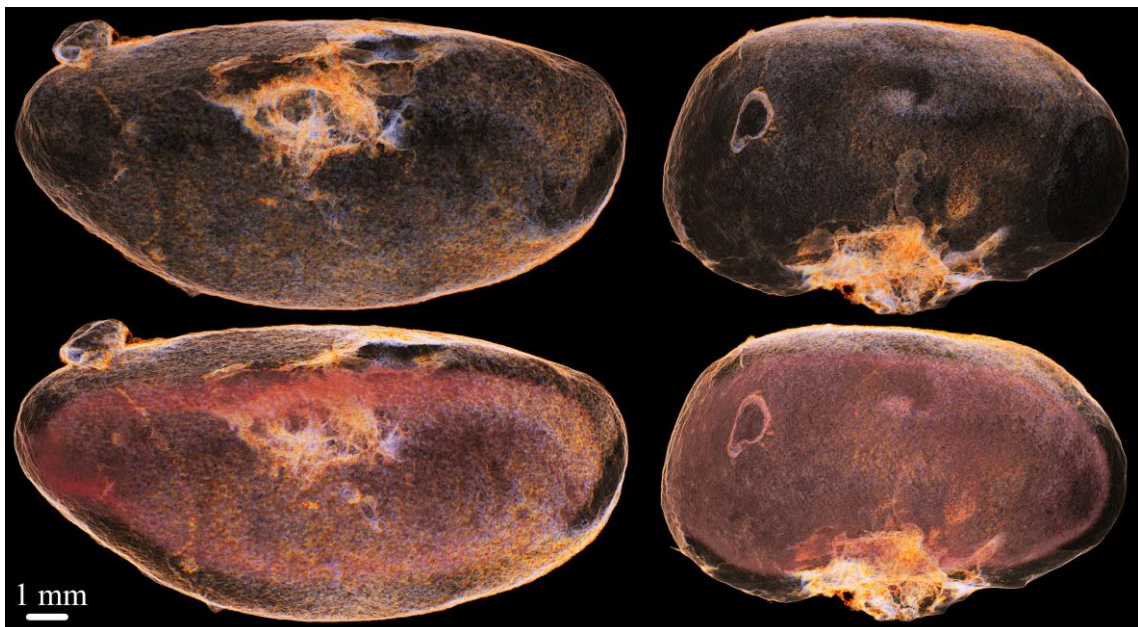
**Obr. 5.13: Segmentace a obarvení měkké tkáně myšího srdce (k. l. Omnipaque)
[zdroj: autor]**

5.2.4 Jodid draselný (KI) v 20% roztoku ethanolu

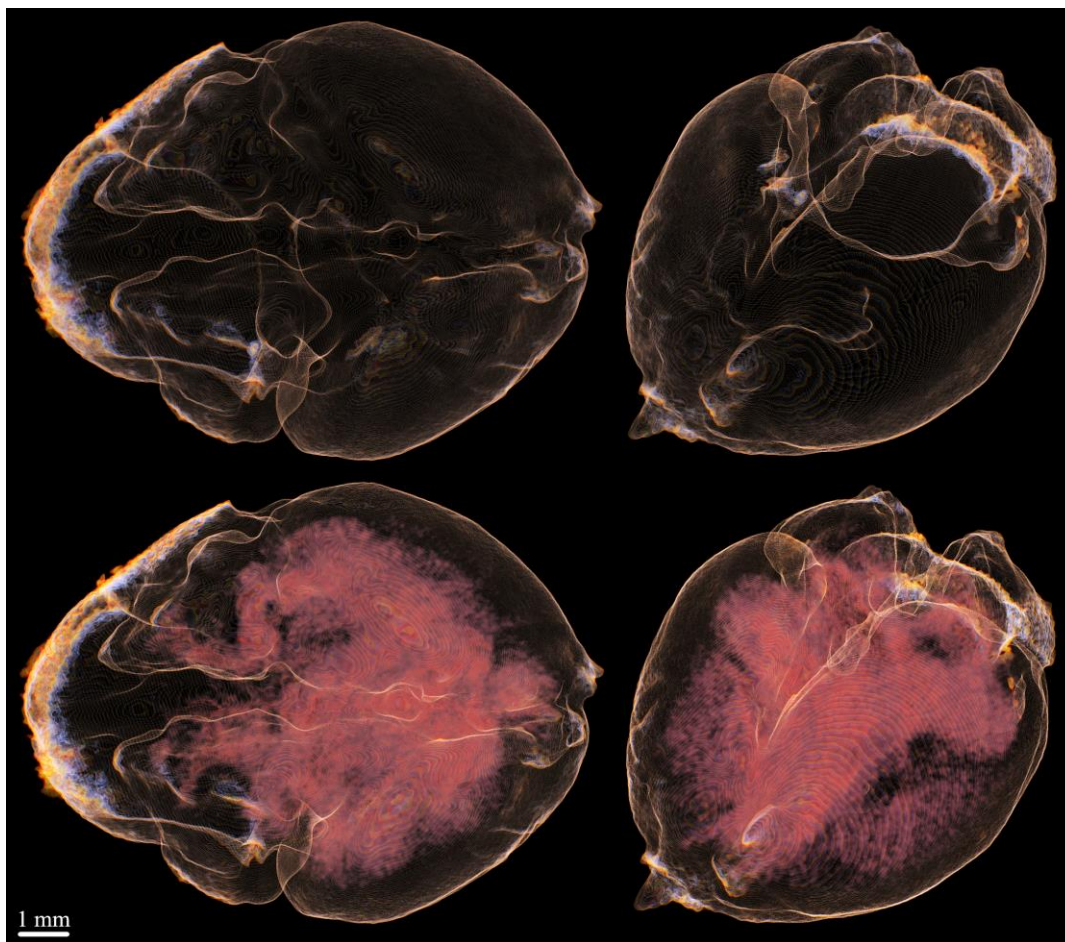
Pro zdůraznění měkkých tkání orgánů naložených v roztoku rozpuštěného jodidu draselného v 20% roztoku ethanolu byly navrženy a optimalizovány další převodní charakteristiky.



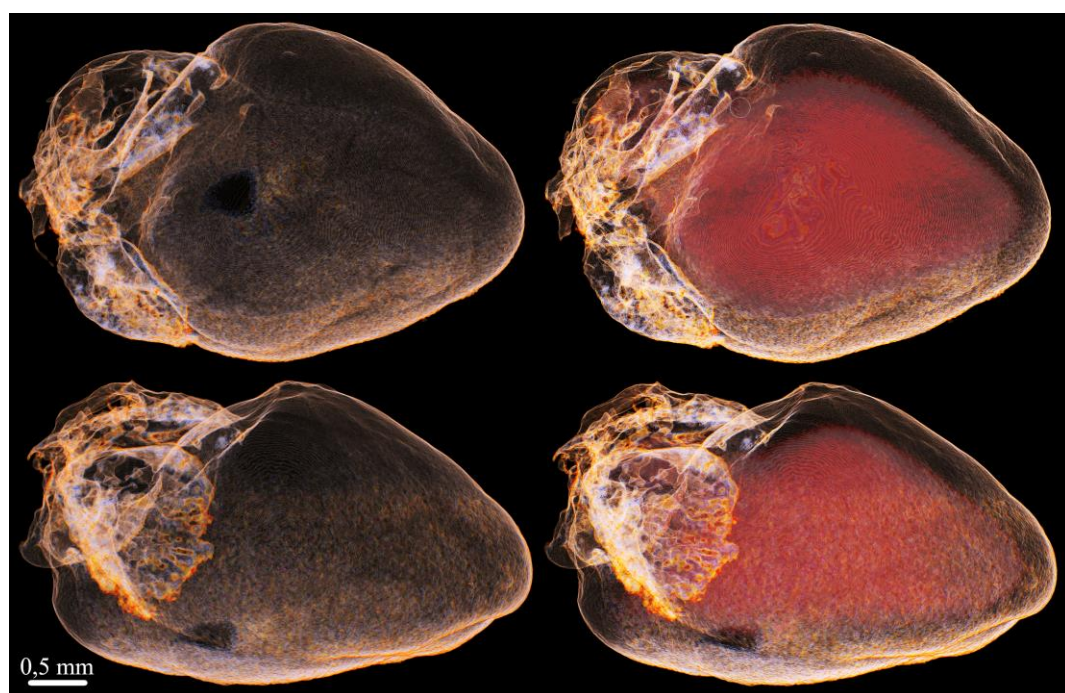
Obr. 5.14: Segmentace a obarvení měkké tkáně myších jater (k. l. KI + ethanol)
[zdroj: autor]



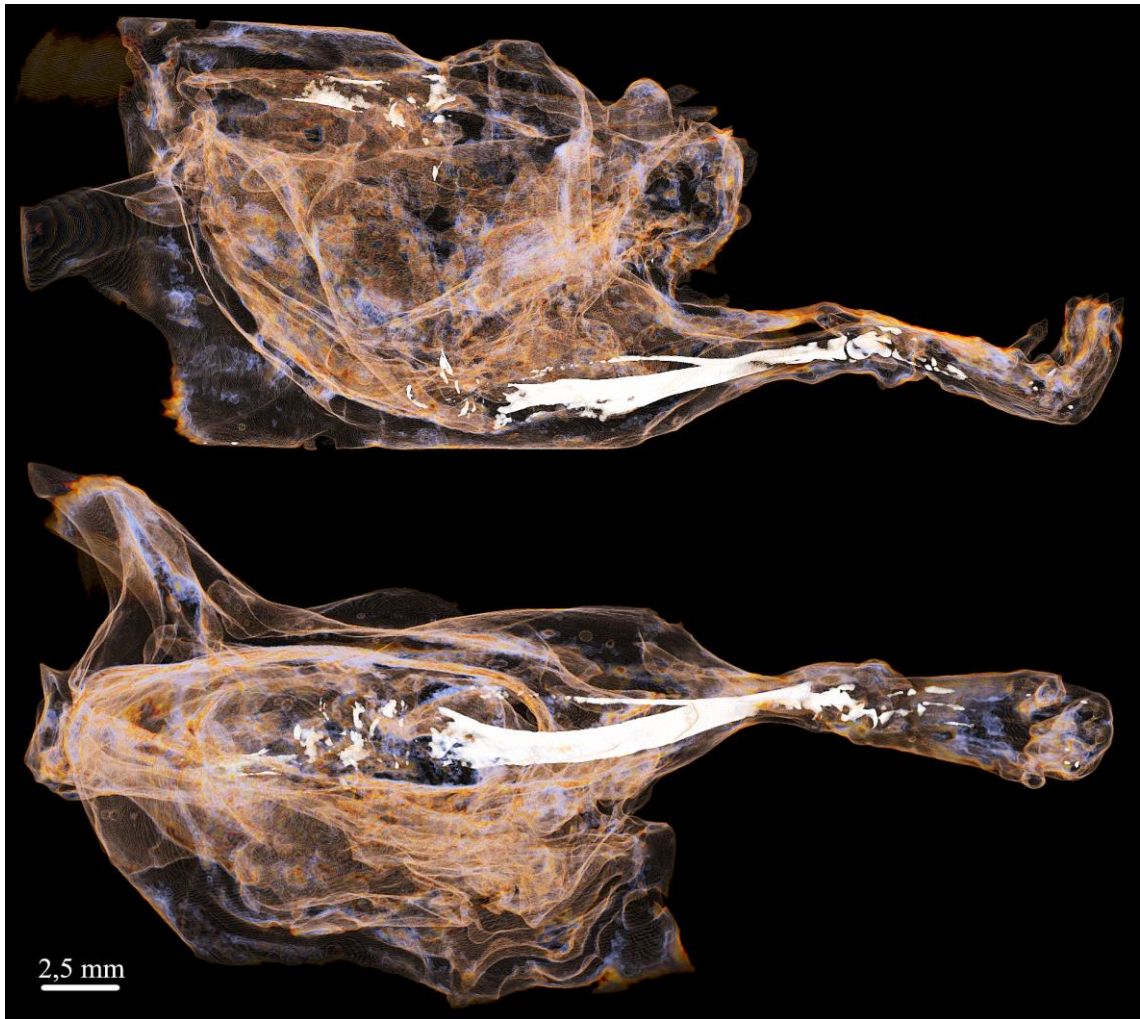
Obr. 5.15: Segmentace a obarvení měkké tkáně myší ledviny (k. l. KI + ethanol)
[zdroj: autor]



Obr. 5.16: Segmentace a obarvení měkké tkáně myšního mozku (k. l. KI + ethanol)
[zdroj: autor]



Obr. 5.17: Segmentace a obarvení měkké tkáně myšního srdce (k. l. KI + ethanol)
[zdroj: autor]



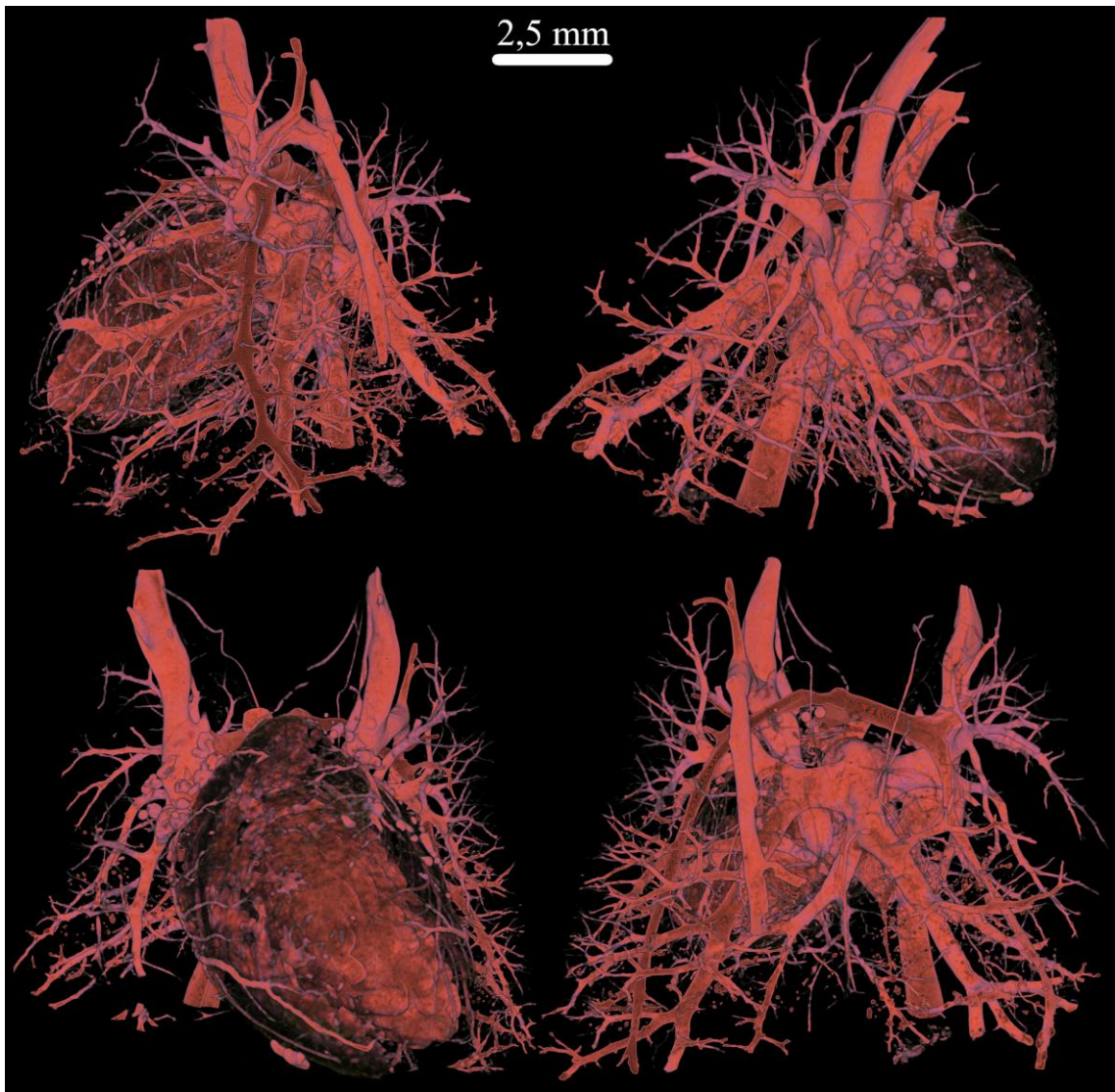
**Obr. 5.18: Segmentace a obarvení měkké a tvrdé tkáně myší nohy
(k. l. KI + ethanol) [zdroj: autor]**

5.2.5 Mercox (pryskyřice)

U korozivních preparátů byly navrženy převodní charakteristiky zdůrazňující pouze strukturu měkkých tkání (nikoli měkkou tkáň samotnou) pomocí kontrastu mezi pryskyřicí a vzduchem. Na obrázcích je vidět zaječí a krysí dýchací cesty, v případě krysy je vidět i srdce spolu s cévním řečištěm.



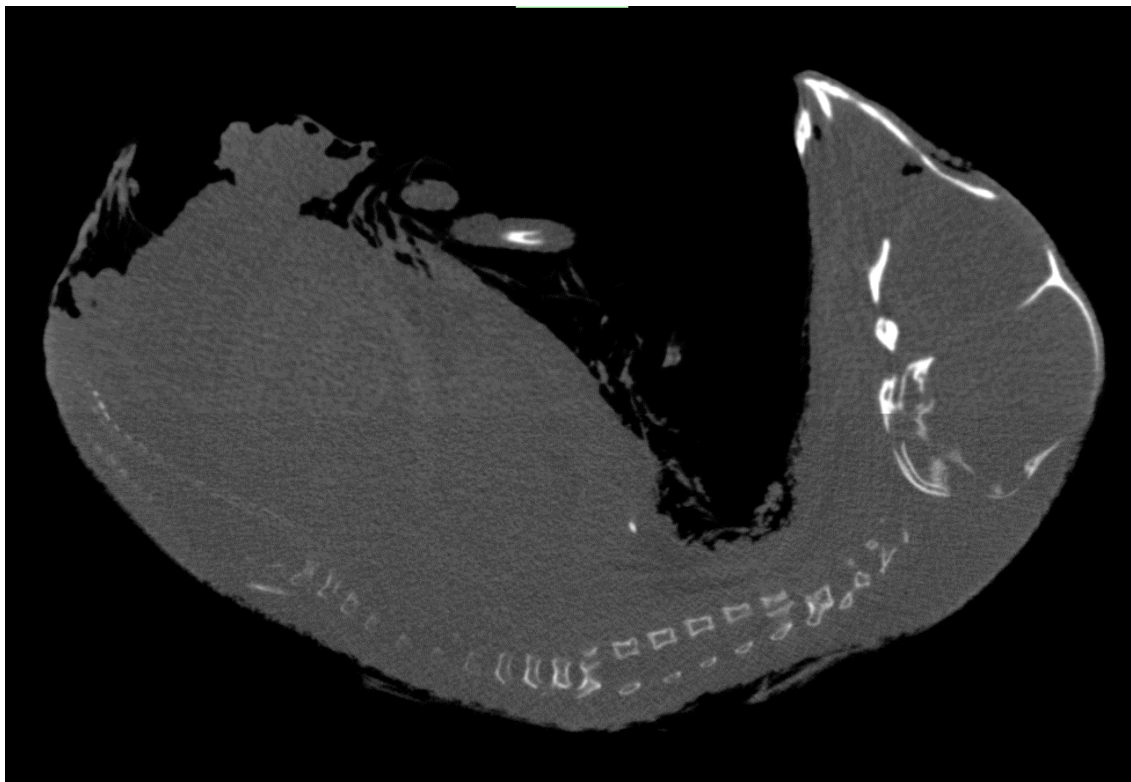
**Obr. 5.19: Segmentace a obarvení dýchacích cest zaječích plic (k. l. Mercox)
[zdroj: autor]**



Obr. 5.20: Segmentace a obarvení dýchacích cest myších plic a myšího srdce (k. I. Mercox) [zdroj: autor]

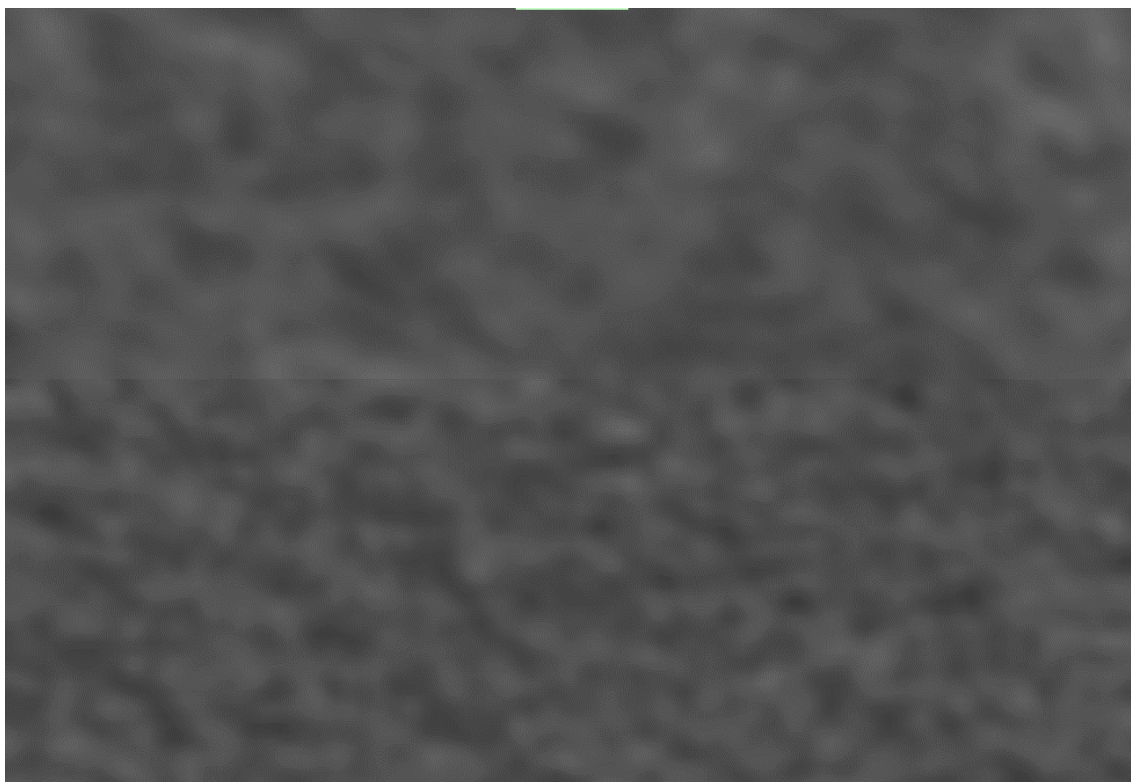
5.3 Vyhlazení obrazu neuronovou sítí typu U-Net

V snaze o odšumění dat z mikro-CT jsem použil jako filtr konvoluční neuronovou síť architektury U-Net a jako výstupní data jsem použil data trénovací. Neuronová síť tedy provedla kompresi a dekompresi dat, během které částečně nezrekonstruovala šum v obrazových datech a obraz vyhladila.

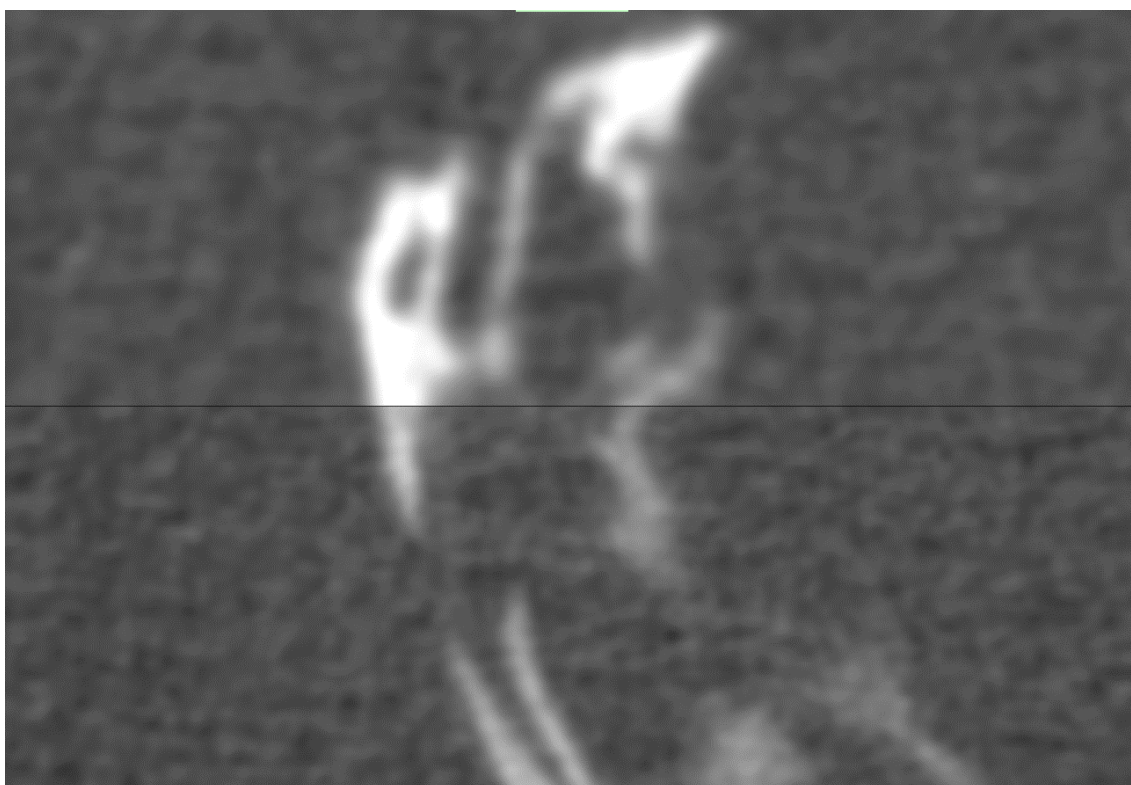


Obr. 5.21: Tomografický řez 19denním kuřetem (akviziční anodové napětí 100 kV); horní část řezu je po odfiltrování neuronovou sítí U-Net ve srovnání s původní spodní částí vyhlazena [zdroj: autor]

Jako ukázkou jsem z Obr. 5.5 ořezal část přechodu z nevyhlazené do vyhlazené části obrázku v místě trupu a hlavy kuřete. Tyto výřezy přechodů jsou na Obr. 5.6 a 5.7 na další straně.



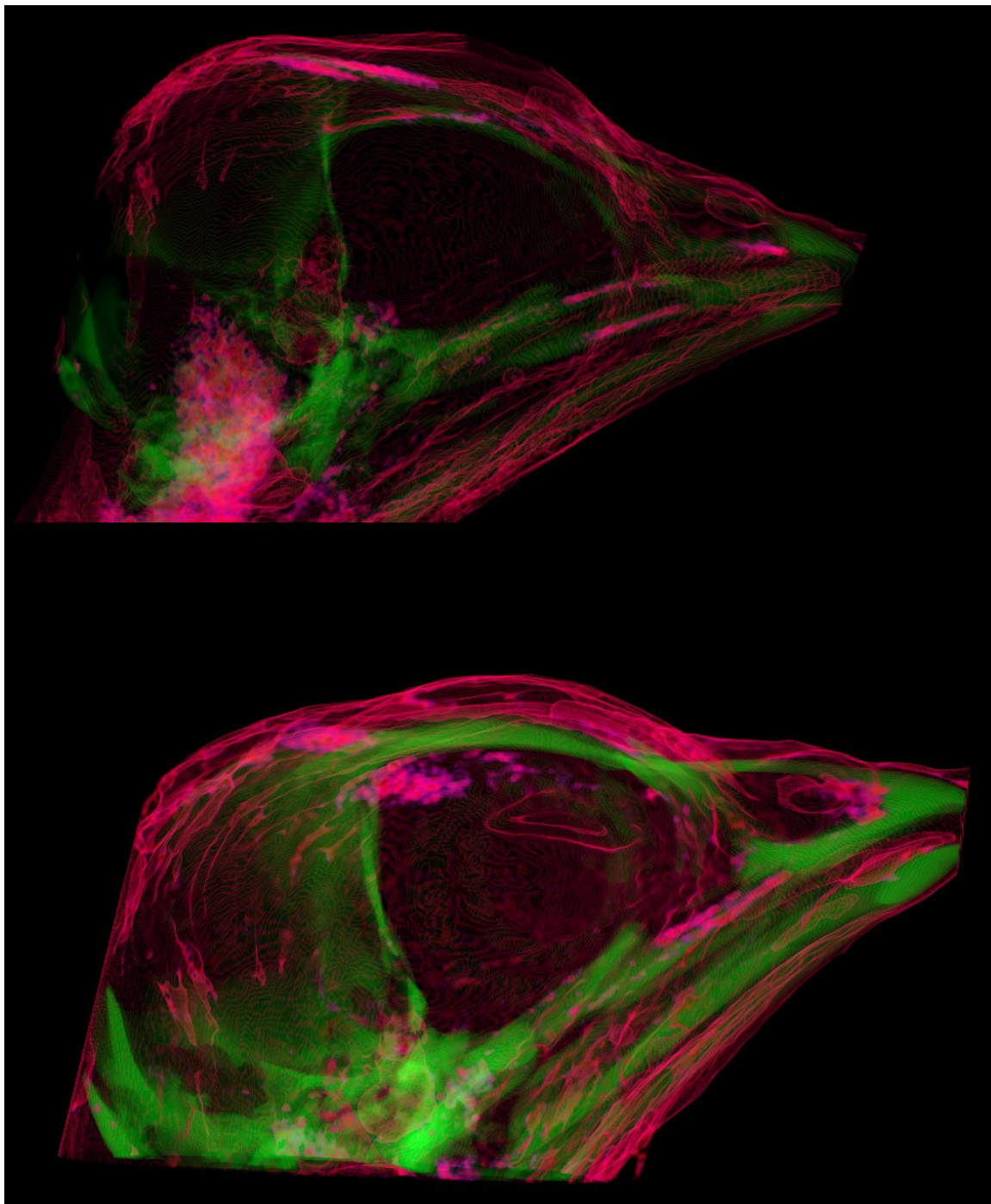
Obr. 5.22: Výřez přechodu z trupu kuřete z Obr. 5.5 – vyhlazená část neuronovou sítí U-Net je v horní části obrázku [zdroj: autor]



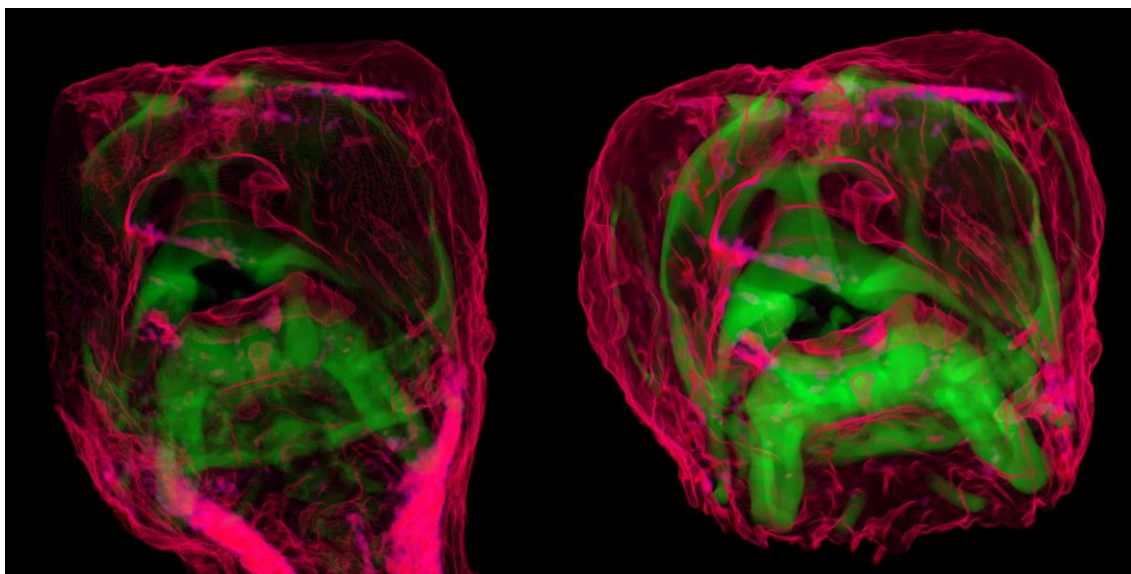
Obr. 5.23: Výřez přechodu na hlavě kuřete z Obr. 5.5 – vyhlazená část neuronovou sítí U-Net je v horní části obrázku [zdroj: autor]

5.4 Srovnání obarveného vzorku před a po sekvenční filtraci

Po částečném odfiltrování šumu a doostření obrazu v Dragonfly jsem data z Obr. 4.20 obarvil v programu CTvox stejnou převodní charakteristikou jako před filtrací a vyobrazil je jedno vedle druhého pro zjištění rozdílu v kvalitě obrazu.



Obr. 5.24: 19denní kuře (akviziciční anodové napětí 40 kV); nahoře je vzorek před filtrací, dole je stejný vzorek po sekvenční filtraci [zdroj: autor]



Obr. 5.25: 19denní kuře (akviziční anodové napětí 40 kV); nalevo je vzorek před filtrací, vpravo je stejný vzorek po sekvenční filtraci [zdroj: autor]

5.5 Převodní charakteristiky (transfer functions)

Pomocí editoru převodních charakteristik programu CTvox jsem navrhl 53 převodních charakteristik, z nichž jsem 42 ověřil a optimalizoval na zdůraznění měkkých tkání vybraných biologických vzorků. Seznam navržených převodních charakteristik je uveden v Příloze B.

6 Diskuze

Z důvodu neexistence jedné optimální a univerzální převodní charakteristiky bylo za pomoci softwaru CTvox navrženo spolu 53 převodních charakteristik, které byly optimalizovány s cílem zvýraznit zejména měkké tkáně. 42 z nich se podařilo i ověřit na vybraných biologických vzorkách, z kterých je většina vyobrazena v kapitole 5.2.

Použitím různých typů kontrastních látek se podařilo pomocí programů CTvox a ORS Dragonfly vysegmentovat a barevně zvýraznit některé měkké tkáně biologických vzorků poskytnutých Ústavem anatomie 3. LF UK (celkem 1,3 TB tomografických dat). Jednalo se o malé živočichy (kuřata, myši, krysa, zajíc) a jejich orgány a v neposlední řadě o fantom cévního řečiště (kapiláry uvnitř kuřecího masa). Byly použity kontrastní látky Aurovist, Omnipaque, Lugolův roztok a také korozivní preparace vzorků pomocí pryskyřice Mercocox.

Na obrázcích myších jater (Obr. 5.10) v kapitole 5.2.3 je zvýrazněno zejména cévní řečiště a u myších plic (Obr. 5.11) částečně dýchací cesty. V případě myšího srdce (Obr. 5.13) se podařilo vysegmentovat a barevně rozlišit tkáň srdečního svalu od zbytku cévy.

U myších jater (Obr. 5.14) v kapitole 5.2.4 je vidět zejména jejich vnější strukturu, u ledviny, mozku a srdce (Obr. 5.15, Obr. 5.16, Obr. 5.17) částečně i struktury vnitřní. Při vzorku myší nohy (Obr. 5.18) zdůrazňuje převodní charakteristika částečně měkké tkáně a částečně tvrdé tkáně (kost).

U korozivních preparátů v kapitole 5.2.5 jsou struktury měkkých tkání zobrazeny pomocí kontrastu vzniklého mezi pryskyřicí Mercocox a vzduchem. Jelikož CT čísla syntetické pryskyřice se pohybují kolem hodnoty 70 HU [18], je v tomto případě možné hovořit o ekvivalentu měkké tkáně (rozsah 40–80 HU).

Navzdory ohromnému množství dat naskenovaných kuřat (celkem 45 skenů kuřat spolu činících 525 GB dat) se bohužel nepodařilo z ani jednoho skenu kuřete vysegmentovat měkké tkáně ani jejich orgány. Diskutabilní je však výsledek prezentován v kapitole 5.4 (Obr. 5.25 a 5.26). Není totiž jisté, zda se po obarvení skenu hlavy kuřete starého 19 dní, naskenovaného anodovým napětím 40 kV, podařilo zvýraznit právě jazyk tohoto kuřete, anebo zdali je to jen chrupavčitá část jeho zobáku.

U vzorků ex vivo kuřat vypreparovaných v roztocích ethanolu a formaldehydu existoval předpoklad vzniku kontrastu na snímcích z mikro-CT skrze koagulaci bílkovin. Tento předpoklad se pravděpodobně potvrdil jen částečně – na Obr. 5.3 je vidět rozdílně zabarvený vnitřek kuřete modrou a červenou barvou, což odpovídá mírnému rozdílu CT čísel jinak dále nesegmentovatelné měkké tkáně. Roztok ethanolu navíc neměl u celých kuřat možnost proniknout do dutin zvířete a následně se z nich odpařit, což by způsobilo nahrazení roztoku vzduchem, který by dále způsobil lepší kontrast na snímcích z mikro-CT – analogicky k odpaření ethanolu z dutin zvířecích orgánů v něm vypreparovaných.

Během jediné akvizice a rekonstrukce tomografických dat ze sestavy Phywe XR 4.0 softwarem Measure CT se stalo, že program dva krát přestal pracovat, a pro jeho opětovné fungování bylo potřeba restartovat počítač. Z této zkušenosti lze usoudit, že ačkoli je program Measure CT po mnoha stránkách versatilní, rekonstrukční program NRecon od společnosti Bruker je mnohem spolehlivější, nakolik u něj během několik desítek náročných rekonstrukcí podobný problém nenastal. Problém u programu Measure CT by bylo pravděpodobně možné do budoucna vyřešit aktualizací na novější verzi programu.

Ve fantomu cévního řečiště, nasimulovaném vzorkem kuřecího masa, ve kterém byly napíchnuty válcovité trubičky, resp. kapiláry, se tyto kapiláry podařilo úspěšně vysegmentovat a barevně, i spolu s masem, vyznačit. Ke zvýraznění struktur fantomu bylo zamýšleno natrénování konvoluční neuronové sítě určené speciálně pro tento účel, avšak nakonec se kapiláry spolu s masem vyznačily manuálně pomocí segmentačních nástrojů obsažených v softwaru Dragonfly, jelikož se nepodařilo nalézt optimální nastavení parametrů k sémantické segmentaci pomocí neuronové sítě typu U-Net pro tak malou strukturu, jakou byly v tomto případě kapiláry.

Zajímavostí také je, že plastové brčko z polyethylenu má přibližně stejnou hodnotu CT čísla jako kuřecí maso a při jeho průchodu masem brčko nelze od masa rozeznat. Nejlépe ze všech materiálů bylo vidět skleněnou kapiláru, následovala bužírka ze silikonu o větším průměru a třetí byla bužírka s menším průměrem. Na rozdíl od polyethylenu byly tedy od kuřecího masa všechny ostatní materiály dobře rozeznatelné.

V kapitole 5.2.1 z výstupů vykreslovacího programu CTvox vyplývá, že použití nižšího anodového napětí je pro skenování měkkých tkání na mikro-CT optimálnější volbou. V případě segmentace kostí volba napětí nesehrála žádnou významnější roli.

Pro efektnější prezentaci výsledků v kapitole 5.2.1 jsem do práce záměrně zvolil zpracování primárně nejstarších kuřat vypreparovaných v ethanolu, a to hlavně z důvodu dostatečného anatomického vyvinutí kuřete až kolem 19. dne od oplodnění vejce, jelikož v tomto stáří se kuřata obvykle líhnou. Při zkoumání mladších kuřat nebylo mnoho struktur ještě dostatečně vyvinutých, a tedy ani viditelných.

K dispozici byly i kuřata vypreparovaná v roztoku formaldehydu, ten však při prohlížení a úpravě dat nijak výrazně nepomohl.

Čtyři vzorky kuřat obsahovaly také kontrastní látku Aurovist, sestávající ze zlatých nanočástic o velikosti 15 nm. Jednalo se konkrétně o dva skeny ve stáří 10 dní a další dva ve stáří 12 dní – bohužel, ani v tomto případě nešlo rozeznat žádné vnitřní (měkké) anatomické struktury. Mohlo to být zapříčiněno krátkým stářím kuřete, kterému se tyto struktury ještě nemusely pořádně vyvinout. Druhým vysvětlením by mohlo být vstříknutí příliš malého množství kontrastní látky Aurovist do vzorku.

Výsledek v kapitole 5.3 byl původně neplánovaný experiment s neuronovou sítí, který se nakonec ukázal jako funkční odšumovací filtr. Do budoucna by bylo zajímavé vyzkoušet i další techniky odšumování obrazu s využitím neuronových sítí, a to buď vložením méně zašuměných obrazů (např. pořízených s delší dobou expozice) na výstup sítě, anebo s pomocí uměle zašuměných dat natrénovat síť, která by pak uměla odšumovat další data.

Kromě výše uvedených použitých kontrastních látek se přišlo s nápadem vyzkoušet i nekonvenční přístup, který byl nastíněn už v kapitole 2.3.2 u kontrastních látek pro vyšetření ultrazvukem. Idea by spočívala právě ve využití poznatku, že srdce žáby pumpuje ještě zhruba 20 minut po její smrti. Kdyby se nám takové mrtvé žábě podařilo nějakým způsobem vpravit do oběhu zmiňovanou kontrastní látku s mikrobublínkami, dostali bychom do jejího oběhu plyn, který se v CT skenu chová jako negativní kontrastní látka, podobně jako vzduch. Tím bychom se dopracovali k požadovanému útlumovému kontrastu mezi cévami a jejich okolím, co by nás posunulo o krok blíž k našemu cíli – vizualizace měkkých tkání pomocí komerčních přístrojů mikro-CT.

7 Závěr

Zadání bakalářské práce se podařilo úspěšně splnit – spolu bylo navrženo 53 převodních charakteristik, z nichž 42 bylo ověřeno a optimalizováno na zdůraznění měkkých tkání vybraných biologických vzorků z mikro-CT (myši, krysa, zajíc) za použití vybraných kontrastních látek (Aurovist, Omnipaque, KI v roztoku ethanolu, Mercocox). Zbylých 11 převodních charakteristik se z důvodu absence kontrastu v měkkých tkáních ve vzorcích kuřat ověřit nepodařilo, tyto charakteristiky však zvýrazňují i jiné zajímavé struktury těchto vzorků.

Z celkových 53 převodních charakteristik, se podařilo navrhnout jednu převodní charakteristiku, kterou by bylo pravděpodobně možné zvýraznit jazyk 19denního kuřete, naskenovaného sestavou Bruker SkyScan 1275 při anodovém napětí 40 kV.

Nad rámec zadání bakalářské práce se při experimentu s fantomem cévního řečiště podařilo barevně vysegmentovat jednotlivé kapiláry, nacházející se v kuřecím masu.

Dále byla úspěšně natrénována konvoluční neuronová síť typu U-Net, která byla využita jako filtr k vyhlazování, resp. odšumění obrazových dat.

Jako poslední byla znázorněna a vysvětlena sekvenční filtrace v ORS Dragonfly na datech z kapitoly 5.2.1.

Seznam použité literatury

- [1] *Rentgenka* [online]. [cit. 2020-10-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Rtg_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD_-_mechanismus_vzniku#/media/File:X-ray_tube_3.jpg
- [2] STOCK, Stuart R. *Microcomputed tomography: Methodology and applications* [online]. Second edition. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press/Taylor and Francis, 2020, s. 1-18 [cit. 2020-10-18]. ISBN 9780429186745. Dostupné z: <https://lccn.loc.gov/2019046117>
- [3] VICKERTON, P., J. JARVIS a N. JEFFERY. *Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT* [online]. 2013, 223(2):185-93 [cit. 2020-10-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/joa.12068>
- [4] SILVA, JMDE, I. ZANETTE, PB NOEL, MB CARDOSO, MA KIMM a F. PFEIFFER. *Three-dimensional non-destructive soft-tissue visualization with X-ray staining micro-tomography* [online]. Sci Rep-UK, 2015, 5:Artn 14088 [cit. 2020-10-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/srep14088>
- [5] METSCHER, BD. *MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues* [online]. BMC Physiol, 2009, 9:11 [cit. 2020-10-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-11>
- [6] PATZELT, M., J. MRZILKOVA, J. DUDAK a et al. *Ethanol fixation method for heart and lung imaging in micro-CT* [online]. Jpn J Radiol 37, 2019, 500–510 [cit. 2020-11-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s11604-019-00830-6>
- [7] DUDÁK, Jan *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 [cit. 2020-11-02]. Dostupné z: doi:10.1038/srep30385
- [8] Exploring DataViewer. *Bruker* [online]. [cit. 2020-11-08]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/products/microtomography/academy/2016/exploring-dataviewer.html>
- [9] SkyScan 1275: 3D X-ray Microscopy for Everyone. *Bruker* [online]. [cit. 2020-11-08]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning/skyscan-1275/overview.html>
- [10] *PHYWE SYSTEME GMBH & CO. KG. XR 4.0 expert unit, X-ray unit, 35 kV: Germany: PHYWE Systeme GmbH & Co* [online]. [cit. 2020-11-09]. Dostupné z: <https://repository.curriculab.net/files/bedanl.pdf/09057.99/0905799e.pdf>

- [11] XR 4.0 X-ray Direct Digital Image Sensor (XRIS): Germany: PHYWE Systeme GmbH & Co. *PHYWE* [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <https://www.phywe.com/en/xr-4-0-x-ray-direct-digital-image-sensor-ii-xris-ii-mit-usb-kabel.html>
- [12] *NRecon User Manual* [online]. [cit. 2020-11-12]. Dostupné z: https://umanitoba.ca/faculties/health_sciences/medicine/units/cacs/sam/media/NReconUserManual.pdf
- [13] XR 4.0 Software measure CT Manual. *PHYWE* [online]. [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: <https://repository.curriculab.net/files/bedanl.pdf/14421.61/1442161e.pdf>
- [14] 3D.SUITE Software. *Bruker* [online]. [cit. 2020-11-15]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/products/microtomography/micro-ct-software/3dsuite.html>
- [15] CTvox Quick Start Guide. *Bruker* [online]. [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/3-Service/Support/Preclinical_Imaging/X-Ray-uCT_Software/CTvox_QuickStartGuide.pdf
- [16] RONNEBERGER, Olaf, Philipp FISCHER a Thomas BROX. *U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation* [online]. Computer Science Department and BIOS Centre for Biological Signalling Studies, University of Freiburg, Germany [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <http://lmb.informatik.uni-freiburg.de/>
- [17] BAGUER, Daniel Otero, Johannes LEUSCHNER a Maximilian SCHMIDT. *Computed Tomography Reconstruction Using Deep Image Prior and Learned Reconstruction Methods* [online]. Center for Industrial Mathematics (ZeTeM), University of Bremen, Bibliothekstraße 5, 28359 Bremen, Germany, 2020 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://arxiv.org/pdf/2003.04989.pdf>
- [18] ALSHIPLI, Marwan, Norlaili A. KABIR, Rokiah HASHIM, M.W. MARASHDEH a Abd Aziz TAJUDDIN. Measurement of attenuation coefficients and CT numbers of epoxy resin and epoxy-based *Rhizophora* spp particleboards in computed tomography energy range. *ScienceDirect* [online]. 2018, **2018**, 47 [cit. 2021-5-11]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.04.001>
- [19] *Skyscan CT-volume manual* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: https://umanitoba.ca/faculties/health_sciences/medicine/units/cacs/sam/media/CTVol_UserManual.pdf
- [20] *Key Features of Dragonfly* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://www.theobjects.com/dragonfly/features.html>

- [21] *3D Slicer image computing platform* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://www.slicer.org/>
- [22] *MeVisLab* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://www.mevislab.de/>
- [23] *ImageJ Features* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://imagej.nih.gov/ij/features.html>
- [24] *ImageJ Forum Welcome Page* [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://forum.image.sc/t/welcome-to-the-imagej-forum/8>

Příloha A: Nastavení parametrů mikro-CT Bruker SkyScan 1275

Nastavení skenovacích parametrů pro skenování biologických vzorků kuřat mimo skořápku sestavou SkyScan 1275 je uvedeno v následovných tabulkách. Záhloví tabulky pozůstává z čísla, za kterým následuje velké písmeno D, jedná se o stáří kuřete, které je uvedeno v dnech. Před tímto údajem se může vyskytovat buď další číslo, za kterým následuje velké písmeno E a v tom případě se jedná o koncentraci ethanolového roztoku, ve kterém bylo dané kuře vypreparováno, anebo písmeno F, které značí, že kuře bylo vypreparováno v roztoku formaldehydu. Ve čtyřech případech se před koncentrací ethanolového roztoku vyskytne velké písmeno A, jedná se o kontrastní látku Aurovist.

Tabulka A.1: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	50E5D	100E5D	F5D	50E6D	80E6D	100E6D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	40,97	40,97	40,97	40,97	40,97	40,97
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	50	50	50	50	50	50
Emisní proud (μ A)	200	200	200	200	200	200
Velikost pixelu projekce (μ m)	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6
Doba expozice (ms)	50	50	50	50	50	50
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.2: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	F6D	80E7D	100E7D	80E8D	80E9D	A80E10D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	40,97	48,39	48,39	57,22	71,47	92,67
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	50	50	50	65	70	100
Emisní proud (μ A)	200	200	200	153	142	100
Velikost pixelu projekce (μ m)	11,6	13,7	13,7	16,2	20,24	26,24
Doba expozice (ms)	50	50	50	36	36	35
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.3: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	A80E10D	80E10-11D	80E10-11D	50E11D	80E12D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	71,47	60,75	67,9	92,67	80,4
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	75	75	75	75	75
Emisní proud (μA)	133	133	133	133	133
Velikost pixelu projekce (μm)	20,24	17,2	19,23	26,24	22,77
Doba expozice (ms)	36	36	36	36	500
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.4: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	A80E12D	A80E12D	50E13D	50E14D	100E14D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	92,67	82,19	92,67	96,48	123,29
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	75	75	75	75	80
Emisní proud (μA)	133	133	133	133	125
Velikost pixelu projekce (μm)	26,24	23,27	26,24	27,32	34,91
Doba expozice (ms)	500	500	500	500	32
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.5: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	50E15D	50E15D	50E16D	100E18D	100E18D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	146,51	142,94	178,67	169,74	176,89
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	80	80	80	80	80
Emisní proud (μA)	125	125	125	125	125
Velikost pixelu projekce (μm)	41,48	40,47	50,59	48,06	50,08
Doba expozice (ms)	32	32	32	33	33
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.6: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	100E19D	100E19D	100E19D	100E19D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	173,31	132,22	92,67	141,15
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	287	286	286	286
Anodové napětí (kV)	40	80	100	100
Emisní proud (μ A)	250	125	100	100
Velikost pixelu projekce (μ m)	49,07	37,44	26,24	39,97
Doba expozice (ms)	35	35	35	35
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1

Nastavení skenovacích parametrů pro skenování biologických vzorků kuřat ve skořápce sestavou SkyScan 1275 je uvedeno v následovných tabulkách. Záhloví tabulky pozůstává z čísla, za kterým následuje velké písmeno D, jedná se o stáří kuřete, které je uvedeno v dnech.

Tabulka A.7: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	8D	9D	10D	11D	12D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	155,45	146,51	151,87	137,58	153,66
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	80	80	80	80	80
Emisní proud (μ A)	125	125	125	125	125
Velikost pixelu projekce (μ m)	44,01	41,48	43	38,95	43,51
Doba expozice (ms)	36	36	36	36	36
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.8: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	13D	14D	15D	15D	16D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	146,51	148,30	155,45	158,93	144,73
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	80	80	80	80	80
Emisní proud (μA)	125	125	125	125	125
Velikost pixelu projekce (μm)	41,48	41,99	44,01	45	40,98
Doba expozice (ms)	36	36	36	36	36
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.9: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	17D	18D	18D	19D
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	159,02	157,23	167,95	150,09
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	95	80	80	80
Emisní proud (μA)	105	125	125	125
Velikost pixelu projekce (μm)	45,03	44,52	47,55	42,50
Doba expozice (ms)	36	36	36	36
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1

Nastavení skenovacích parametrů pro skenování biologických vzorků myši s kontrastní látkou Aurovist (písmeno A), biologických vzorků zajíce a krysy s kontrastem pryskyřice Mercoc (písmeno M) a biologických vzorků myších orgánů s kontrastní látkou Omnipaque (písmeno O) a kontrastní látkou jodidu draselného (KI) rozpuštěného v 20% roztoku ethanolu (písmena KI) sestavou SkyScan 1275 je uvedeno v následovných tabulkách.

Tabulka A.10: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	A – myš	M – zajíc	M – krysa
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	92,67	148,30	62,54
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286
Anodové napětí (kV)	42	46	34
Emisní proud (μA)	238	217	227
Velikost pixelu projekce (μm)	26,24	41,99	17,71
Doba expozice (ms)	99	35	41
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1

Tabulka A.11: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	O – játra	O – plíce	O – slezina	O – srdce
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	58,96	33,95	28,59	33,95
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	40	54	54	40
Emisní proud (μA)	238	185	185	238
Velikost pixelu projekce (μm)	16,70	19,22	16,19	9,61
Doba expozice (ms)	35	50	50	35
Stupeň 1 rotace ($^{\circ}$)	0,2	0,4	0,4	0,2
Binning	1x1	2x2	2x2	1x1

Tabulka A.12: Hodnoty nastavených parametrů na sestavě SkyScan 1275

	KI – játra	KI – ledvina	KI – mozek	KI – srdce	KI – noha
Vzdálenost objekt-zdroj (mm)	107,21	32,16	117,93	39,31	178,67
Vzdálenost kamera-zdroj (mm)	286	286	286	286	286
Anodové napětí (kV)	80	80	80	80	80
Emisní proud (μA)	125	125	125	125	125
Velikost pixelu projekce (μm)	30,36	9,11	33,39	11,13	50,59
Doba expozice (ms)	35	35	35	35	35
Stupeň 1 rotace ($^\circ$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Binning	1x1	1x1	1x1	1x1	1x1

Příloha B: Seznam převodních charakteristik

Převodní charakteristiky byly rozříděny do složek podle jednotlivých kontrastních látek, pro které byly navrženy a optimalizovány.

- Aurovist
 - 2016_11_30_mys_aurovist_STACKfinal_1.tf
 - 2016_11_30_mys_aurovist_STACKfinal_2.tf
 - 20161010 MYS AUROVIST 2 - REKONSTRUKCE_1.tf
 - 20161010 MYS AUROVIST 2 - REKONSTRUKCE_2.tf
 - 20161010 mys aurovist vol3 STACK_final_1.tf
 - 20161010 mys aurovist vol3 STACK_final_2.tf
 - 20161010 mys aurovist vol3 STACK_final_3.tf
 - 20161123 PLESATA MYS_1.tf
 - 20161207 MYS REKONSTR_1.tf
 - 20161207 MYS REKONSTR_2.tf
 - aurovist mys 9032021_rec0000_1.tf
 - aurovist mys 9032021_rec0000_2.tf
 - aurovist mys 9032021_rec0000_3.tf
 - aurovist mys 9032021_rec0000_4.tf
 - Mys Aurovist_1.tf
 - Mys Aurovist_2.tf
 - Mys Aurovist_3.tf
- KI+ethanol
 - mys ki 20 ledvina_1.tf
 - mys ki 20 ledvina_2.tf
 - mys ki 20 ledvina_3.tf
 - mys ki 20 ledvina_4.tf
 - mys ki 20_jatra_1.tf
 - mys ki 20_jatra_2.tf
 - mys ki 20_jatra_3.tf
 - mys ki 20_mozek_1.tf
 - mys ki 20_noha_1.tf
 - mys ki 20_srdce_1.tf
 - mys ki 20_srdce_2.tf

- Kurata_Ethanol
 - kure 19 (40 kv)_bez_kosti.tf
 - kure 19 (40 kv)_jazyk.tf
 - kure 19 (40 kv)_kosti.tf
 - kure 19 (40 kv)_mozna.tf
 - kure 19 (40 kv)_pulnapul.tf
 - kure 19 (40 kv)_rec0000.tf
 - kure 19d 100 kv 2_bez_kosti.tf
 - kure 19d 100 kv 2_bez_kosti2.tf
 - kure 19d 100 kv 2_pulnapul.tf
 - kure 19d 100 kv 2_pulnapul2.tf
 - kure 19d 100 kv 2_s_kostma.tf
- Mercox
 - Rabbit Lungs L-0138_1.tf
 - Rabbit Lungs L-0138_2.tf
 - Rabbit Lungs L-0138_3.tf
 - Rat lungs+ heart3 1699_1.tf
- Omnipaque
 - Mys 3 OMNIPAQUE jatra 50_1.tf
 - Mys 3 OMNIPAQUE jatra 50_2.tf
 - Mys 3 OMNIPAQUE jatra 50_3.tf
 - Mys 3 OMNIPAQUE jatra 50_4.tf
 - Mys 3 OMNIPAQUE jatra 50_5.tf
 - mys 3 omnipaque plice 50_1.tf
 - mys 3 omnipaque slezina 50_1.tf
 - mys 3 omnipaque srdce 50_1.tf
- ostatní
 - salzburg ren_rec0000_1.tf
 - salzburg ren_rec0000_2.tf