

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV TELEKOMUNIKACÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF TELECOMMUNICATIONS

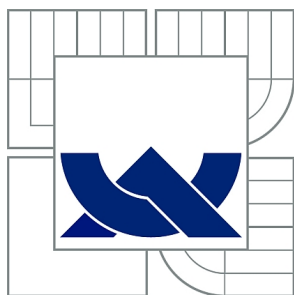
MAGNETICKO-RESONANČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ TKÁŇOVÝCH KULTUR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

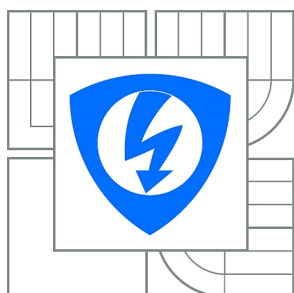
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JÁN CHOVANEC

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV TELEKOMUNIKACÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF TELECOMMUNICATIONS

MAGNETICKO-RESONANČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ TKÁŇOVÝCH KULTUR

MR IMAGING OF SOMATIC EMBRYOS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

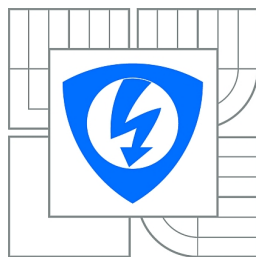
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JÁN CHOVANEC

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. KAREL BARTUŠEK, DrSc.

BRNO 2011



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav telekomunikací

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Teleinformatika

Student: Ján Chovanec

ID: 106488

Ročník: 3

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Magneticko-resonanční zobrazování tkáňových kultur

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Cílem práce je zpracovat metodiku měření tkáňových kultur a provést experimentální měření. Navrhněte metodiku měření tkáňových kultur metodou magneticko rezonančního zobrazování s využitím kontrastů : spinová hustota a relaxačními časy T2. Proveďte měření a vyhodnocení naměřených dat.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] H.J.Berg, T.E.J. Behrens, Diffusion MRI, Elsevier, 2009, ISBN: 978-0-12-374709-9
- [2] Vlaardingerbroek M.T., den Boer J.A., Magnetic Resonance Imaging.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 2.6.2011

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Bartušek, DrSc.

prof. Ing. Kamil Vrba, CSc.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo meranie tkáňových kultur smrku metodami MR zobrazovania. Bola premeraná sada vzorkov, u ktorých bol vyhodnotený obsah zhľuku v jednotlivých rezoch. K získaniu obrazu bola využitá magnetická rezonancia, konkrétne zobrazovacia sekvencia spinálneho echa. Metoda spinového echa je založená na dvoch po sebe idúcich impulzoch 90° a 180° . Vybraná metóda z teoretickej časti práce je následne použitá k zmeraniu a spracovaniu tkáňových kultur. Záver práce je venovaný spracovaniu dát v programe Marevisi a Matlab.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nukleárna magnetická rezonancia, tkáňová kultúra, spin-echo metóda, tranzverzálna magnetizácia, longitudinálna magnetizácia, RF pulz,

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is measuring of tissue cultures of spruce MR imaging methods. Was measured set of samples, where was found contain of cluster in each cuts. To obtain the image, the magnetic resonance was used, specifically spin echo sequence. Method called spin echo is based on two pulses 90° and 180° . Selected method from the beginning of the work is then used to measure the diffusion and processing of cultures. In last part the work is devoted to data processing in Matlab and Marevisi.

KEYWORDS

Nuclear magnetic resonance, tissue culture, spin-echo method, transverse magnetization, longitudinal magnetization, RF pulse,

CHOVANEK, Ján *Magneticko-rezonanční zobrazování tkáňových kultur*: bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav telekomunikací, 2011. 47 s. Vedoucí práce byl prof. Ing. Karel Bartušek, DrSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Magneticko-resonanční zobrazování tkáňových kultur“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

Brno

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Prof. Ing. Karlu Bartuškovi, DrSc. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

OBSAH

Úvod	11
1 Súčasný stav	12
2 Magnetická rezonancia	13
2.1 Princíp MR	14
2.2 Prístroje MR	14
2.3 Fyzikálne fakty MR	15
2.3.1 Protóny a spin	15
2.3.2 Protóny a magnetické pole	15
2.3.3 Precesia	16
2.3.4 Rezonancia	17
2.4 Relaxačné mechanizmy	17
2.4.1 Spin-mriežková (longitudinálna) relaxácia	18
2.4.2 Spin-spinová (tranzverzálna) relaxácia	19
2.5 Základné pulzové sekvencie	20
2.5.1 Typy RF pulzov	20
2.5.2 Gradient-echo sekvencia	21
2.5.3 Spin-echo sekvencia	22
3 Metodika MRI merania tkáňových kultúr	25
3.1 Tkáňová kultúra	29
3.2 Zobrazovacie techniky NMR	31
3.2.1 Priestorové kódovanie rezonujúcich jadier	31
3.2.2 Rekonštrukcia obrazu	33
4 Meranie tkáňových kultur	35
4.1 Spracovanie obrazu tkáňových kultur	36
4.2 Výpočet integrálu danej kultury	37
4.3 Vyhodnotenie tkáňových kultur	39
5 Záver	40
Literatura	41
Seznam symbolů, veličin a zkratek	42
Seznam příloh	43

A	Intenzity všetkých vzorkov	44
B	Porovnanie hodnot z UPT a MZLU	45
C	Pomer výsledkov merania MUZL/UPT	46
D	Tabuľka hodnôd intenzity zhlukov	47

SEZNAM OBRÁZKŮ

2.1	Magnetická rezonancia	13
2.2	Usporiadanie magnetického poľa	16
2.3	Rozdiel medzi rotáciou a precesiou[6]	17
2.4	Relaxačná krivka T_1 [9]	18
2.5	Relaxácia T_2 [9]	19
2.6	Relaxačná krivka T_2 [9]	19
2.7	Porovnanie PD, T_1 a T_2 relaxace [7]	20
2.8	Gradient-echo sekvencia [7]	21
2.9	GE pulzná sekvencia pre zobrazovanie [8]	22
2.10	Spin-echo sekvencia [7]	23
2.11	Vzťah T_1 a T_2 krivky a TR a TE času v SE sekvencií. [6]	24
2.12	SE pulzná sekvencia pre zobrazovanie [8]	24
3.1	Spin-echo sekvencia [9]	25
3.2	Vplyv Cd-EDTA iónov na obsah vody v ranných somatických embry- ách smreku klonu 2/32 naočkovaná iónmi kadmia.	26
3.3	Meranie ranných somatických embryí smreku metódami MRI	28
3.4	Priebeh difúzneho koeficientu ranných somatických embryí smreku	29
3.5	Tkáňová kultúra v Petriho myske	30
3.6	NMR obrazy váhované spinovou hustotou a) 3mm priečny rez eufor- biou (30x30mm, 256x256 bodov), b) citrónom (60x60mm, 256x256 bodov) [12]	32
3.7	K-rovina	34
3.8	Obraz po FT rekonštrukcii	34
4.1	Obraz tkáňových kultur zriadených MR tomografom	35
4.2	Parametre Fourierovej transformácie	36
4.3	Vľavo celkový obraz z MR tomografu, vpravo výrez konkrétneho zhluku.	37
4.4	príklad výpočtu integrála z tkáňovej kultury.	38

SEZNAM TABULEK

3.1	Parametre pri meraní	26
3.2	Výsledné hodnoty T_2 a D ESEs pri kontrole	27
3.3	Výsledné hodnoty T_2 a D ESEs kontaminovaných 50Bp a 50Zn . . .	27
3.4	Spin-spinový relaxačný čas T_2 pre rôzne molekulárne štruktúry cedru	29

ÚVOD

Magnetická rezonancia sa v poslednej dobe najviac spojuje s medicínskou technikou, vďaka svojmu veľkému uplatneniu v tomto obore. Oproti iným tomografickým technikám, u zobrazovacej techniky pomocou MR zatiaľ neboli preukázané negatívne účinky na ľudské telo. Vďaka technológii MRI je možné vytvoriť viac snímok s rozličnými parametrami, ktoré sú kľúčové pre výslednú moduláciu prijímaného signálu. Navyše možno aj tieto parametre kombinovať a vďaka svojej podstate dokážu teda vystihnúť nielen fyzikálne, ale aj chemické vlastnosti snímanej scény. Vďaka dobrému kontrastu obrazu je možné tento systém využiť aj pre meranie metrických veličín s menšími chybami. Spôsob zobrazovania MR je výhodná a vďaka tomu, že zobrazovanie jednotlivých častí meraných vzoriek sa uskutočňuje bez fyzického narušenia celku a je možnosť ďalšej práce so vzorkami. Cieľom tohto bakalárskeho projektu je spracovať metodiku merania tkáňových kultúr a vykonať experimentálne meranie. V tomto projekte je zahrnutý princíp magnetickej rezonancie, popis základných pulzových sekvencií a relaxačných mechanizmov. Ďalej sú v projekte uvedené rôzne príklady meraní tkáňových kultúr, princíp zobrazovacích technik NMR a postup vlastného merania tkáňových kultúr so spracovaním nameraných hodnôt.

1 SÚČASNÝ STAV

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) spektroskopia je neútočný zobrazovací nástroj používaný veľa k štúdiu molekúl. NMR spektroskopia využíva interakciu oscilačného rádiovfrekvenčného elektromagnetického poľa so zbierkou jadier ponorených do silného vonkajšieho pola na štúdium molekúl. Kým NMR sa často používa v Lekárstve, taktiež sa používa i v biologickom, biochemickom a chemickom výskume. V rastlinnej biológii je NMR využívaná k štúdiu vody a minerálnych látok prepravujúcich sa v rámci rastliny, stanovenie metabolizmu rastlín, vyšetrovanie bunkových procesov a pre skúmanie rastu a vývoju rastlín. NMR možno použiť aj ako sledovanie vodných zmien v skorých somatických embryách smreku. Somatické embryá smreku (ESEs) predstavujú unikátny modelový systém, ktorý môže byť použitý na štúdium rôznych typov životného prostredia vrátane kovových iónov za dobre kontrolovaných podmienok. Rastliny sú neustále vystavené abiotickými a biotickými namáhaniami v ich prostredí. Ich rast a vývoj je úzko spojený so schopnosťou rastlín reagovať a prispôbovať sa vonkajšiemu namáhaniu. Rastliny reagujú na patogén útoku a na výrazne zmeny vonkajších síl v expresii génov, čo má za následok syntézu špecifických peptidov a bielkovín ako sú glutatión a fytochelatínu. Glutatión je považovaný za základnú zložku všetkých živých buniek. To zohráva dôležitú úlohu pri detoxikácii toxických ťažkých kovov a upratovania reaktívnych foriem kyslíka. Rastliny si vyvinuli ochranné mechanizmy, ktoré im umožňujú kontrolovať hladiny kovov a toxických látok zo životného prostredia v ich systéme. Na vyšetrenie účinkov kadmia na ESEs sa používa 6 koncentrácií kadmia (50, 100, 150, 250, 500 a 1000 μM), ktoré sú vybrané v porovnaní s neliečenými ESEs. Prírodná koncentrácia kadmia vo vode je nižšia ako stanovené miery, avšak jeho iónový obsah v pôde môže byť väčší ako 1000ppm. ESEs sú vysoko odolné proti prítomnosti ťažkých kovov, preto široká škála koncentrácie kadmia vrátane 1000 μM boli využívané na štúdium morfológických zmien počas krátkej doby. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že embryonálne bunky klastrov sa pokúšali vylučovať kadmium, presnejšie znížiť koncentráciu kadmia v rámci klastrov. Tento jav možno považovať za jeden z mechanizmov detoxikácie rastlín ako sa vyrovnáť a prežiť proti nepriaznivým podmienkam v prítomnosti kontaminácie s ťažkými kovmi. Najčastejšie používané metódy pre odhad rastu bunkových kultúr sú založené na počítaní a vážení buniek alebo tkanív. Nevýhody týchto metód je zničenie a kontaminácia kultúr v priebehu analýzy. Na základe toho analýza obrazu pomocou NMR môže ponúknuť viac ohľadupľnejší nástroj pre štúdium bunkového rastu bez akéhokoľvek poškodenia alebo znečistenia biologického materiálu.[1][2]

2 MAGNETICKÁ REZONANCIA

Magnetická rezonancia (MR) objavená v poslednom desaťročí, je fyzikálny jav, ktorého význam v poslednom čase stúpol vďaka jeho rozšíreniu do viacerých odvetví života. V medicíne tento fyzikálny princíp využívajú prístroje pre zobrazovanie chorobných zmien v ľudskom tele, vďaka čomu sa dostala do podvedomia širokej verejnosti. V súčasnosti poznáme viac druhov magnetickej rezonancie (elektrónová paramagnetická, elektrická, feromagnetická, jadrová magnetická rezonancia a iné). MR sa využíva vo fyzikálnom, chemickom, a biologickom výskume.[3]



Obr. 2.1: Magnetická rezonancia

Zobrazovanie magneticou rezonanciou je diagnostická metóda ktorá sa v zdravotníctve používa od roku 1980 na vytváranie dvojrozmerných a trojrozmerných obrazov orgánov, alebo štruktúr vo vnútri ľudského tela. Táto metóda je jedinečná a stále viac populárna vďaka vysokej kvalite obrazov zriadených bez použitia radiačného žiarenia (ktoré sa používa v RTG a CT). Kvalita zobrazovania sa každým rokom neustále zlepšuje vďaka technologickým objavom a inováciám, čím sa spresňuje a zrýchľuje diagnostika pacientovho problému. Podľa odborníkov možno s určitosťou nazývať magneticú rezonanciu vrcholnou metódou rádiodiagnostiky.[4]

2.1 Princíp MR

Jav magnetická rezonancia vychádza z interakcie jadier atómov majúcich magnetický moment s vonkajším magnetickým polom. Jadrá mnohých atómov s jadrovým spinom sa chovajú ako magnetické dipóly a môžu byť buď vo vysokoenergetickom stave (orientované proti vonkajšiemu magnetickému poľu) alebo v nízkoenergetickom stave (orientované v smere vonkajšieho magnetického poľa). Medzi týmito dvoma stavmi je prechod doprevádzaný pohlcovaním alebo vyžarovaním energie v rádiový frekvenčnom pásme. Frekvencia energie emitovanej excitovanými jadrami je priamo úmerná intenzite vonkajšieho magnetického poľa. Presný vzťah medzi rezonančnou frekvenciou a vonkajším magnetickým polom je závislý na type rezonujúceho jadra (pochádzajúceho od rôznych chemických prvkov), čím je možné v MRI detekovať nezávislé rôzne atomové jadrá. Ďalej je rezonančná frekvencia modulovaná malými "tíniacimi" efekty elektrónov obiehajúcich okolo jadier (elektrón je nositeľom elektrického náboja a pretože sa pohybuje, vytvára okolo seba magnetické pole, ktoré moduluje vonkajšie magnetické pole). Tieto malé rozdiely (rádovo ppm) rezonančnej frekvencie protónov v rôznych molekulách sa využívajú pre MR spektroskopiu. Pri konvenčných aplikáciách MRI a fMRI sú tieto rozdiely ignorované.[5]

2.2 Prístroje MR

Najdôležitejšou časťou prístroja na zobrazovanie pomocou magnetickej rezonancie je samotný zdroj vonkajšieho poľa - magnet. Sila tohto poľa sa udáva v jednotkách Tesla (T) a pohybuje sa v rozmedzí 0,2 až 3T. Pole musí byť homogénne. Podľa spôsobu akým sa magnetické pole vytvára, sa prístroje delia do troch základných skupín:

prístroje s permanentným magnetom – magnetické pole vytvára trvalo magnetický materiál. Na vytvorenie poľa nie je potrebná žiadna ďalšia energia. Nevýhodami sú nízke hodnoty poľa - len do 0,3 T, citlivosť na zmeny teploty a veľká hmotnosť (až 100 ton).

prístroje s elektromagnetom – magnetické pole sa vytvára elektrickým prúdom, pretekajúcim vinutou cievkou. Sú magnetické len v prípade, že nimi prechádza elektrický prúd. Tieto prístroje majú veľkú spotrebu energie a potrebujú masívne chladenie. Sú schopné dosiahnuť väčšiu silu poľa ako permanentné magnety. V súčasnosti sa už používajú len málo.

prístroje so supravodivým magnetom – v súčasnosti najrýchlejšie sa rozširujúci typ. Magnetické pole je vytvárané vo vodiči, ktorý je ochladený na teplotu

-269°C, a ktorý tak získava supravodivé vlastnosti. Výsledkom je strata jeho elektrického odporu, čo má za následok, že raz doň "vpustený" elektrický prúd v ňom konštantne prebieha a vytvára magnetické pole bez potreby dodávania ďalšej energie. Na udržanie supravodivosti je však nutné dopĺňať tekuté hélium alebo dusík (staršie typy). Hlavnou výhodou tohoto typu je možnosť dosiahnuť vysokú silu a homogenitu magnetického poľa. Nevýhodou sú znovu pomerne dosť vysoké prevádzkové náklady.[6]

Prístroje možno taktiež rozdeliť podľa sily magnetického poľa:

- 0,15 - 0,5T – prístroje so slabým poľom
- 0,50 - 1,0T – prístroje so stredným poľom
- 1,00 - 3,0T – prístroje s vysokým poľom
- nad 3,0T – experimentálne prístroje

2.3 Fyzikálne fakty MR

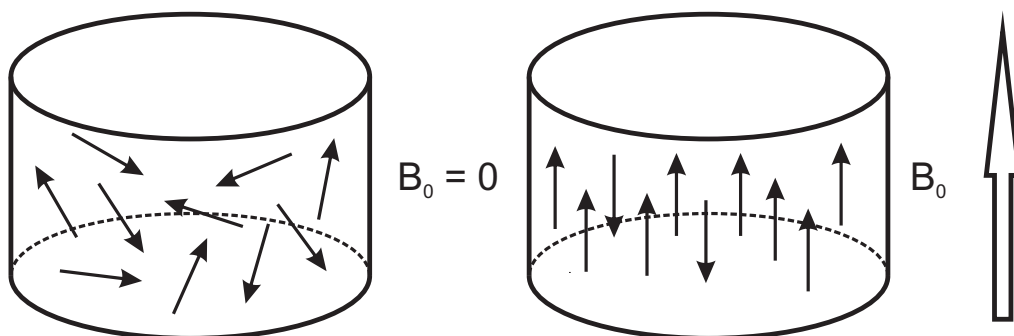
2.3.1 Protóny a spin

Atóm sa skladá z jadra a obalu. Elektróny ktoré majú záporný elektrický náboj tvoria obal atómu. Jadro sa skladá z neutrónov a najmä pre MR dôležité protóny. Neutróny su elektricky neaktívne, zatiaľ čo protóny majú kladný elektrický náboj. Protóny v jadre neustále rotujú okolo svojej osi - táto ich vlastnosť sa nazýva jadrový spin. Rovnako rotuje aj ich kladný elektrický náboj. Pohybujúci sa elektrický náboj je vlastne elektrický prúd indukujúci vo svojom okolí magnetické pole. Každý protón vytvára vo svojom okolí veľmi slabé magnetické pole. Severný pól tohto magnetického poľa sa v prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa natočí k južnému pólu vonkajšieho magnetu. Na zmenu polaritu je nutné dodať energiu z vonkajšieho prostredia. Potrebné vlnové dĺžky týchto energií spradajú do oblasti rádiových vln. Aby došlo k pohlteniu rádiového impulzu musí mať tento impulz špecifickú energiu. Z toho vyplýva, že iba určité žiarenie pri určitom magnetickom poli rezonuje s určitým jadrom a teda je absorbované.[6]

2.3.2 Protóny a magnetické pole

Mimo magnetického poľa sú protóny rozmiestnené chaoticky. Po umiestnení do silného vonkajšieho magnetického poľa sa v ňom usporiadajú podobne ako strelky kompasu: smer ich vlastného magnetického poľa sa stane rovnobežným so smerom pôsobenia poľa vonkajšieho. Keďže protóny patria medzi elementárne častice a platia pre nich zákony kvantovej mechaniky, chovajú sa v skutočnosti inak, ako strelka

kompasu, ktorá vo vonkajšom magnetickom poli ukazuje vždy jedným smerom. Lokálne magnetické pole protónu môže smerovať paralelne alebo antiparalelne so smerom vonkajšieho magnetického poľa. Paralelné usporiadanie je pre protóny menej energeticky náročné, a preto je väčšie množstvo usporiadané práve týmto smerom. Rozdiel medzi počtom protónov usporiadaných paralelne a antiparalelne je ale napriek tomu veľmi malý a závisí od sily vonkajšieho magnetického poľa.[6]



Obr. 2.2: Usporiadanie magnetického poľa

2.3.3 Precesia

Protóny vo vonkajšom magnetickom poli okrem toho, že rotujú okolo svojej osi a sú usporiadané paralelne alebo antiparalelne so smerom vonkajšieho magnetického poľa, vykonávajú ďalší pohyb, ktorý sa volá precesia. Je to krúživý pohyb voľnej osi otáčajúceho sa telesa. Rýchlosť pohybu ktorý protóny vykonávajú sa označuje ako frekvencia precesie. Hodnota vyjadruje počet otáčok protónu za jednu sekundu. Matematicky ju možno vyjadriť z Larmorovej rovnice:

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (2.1)$$

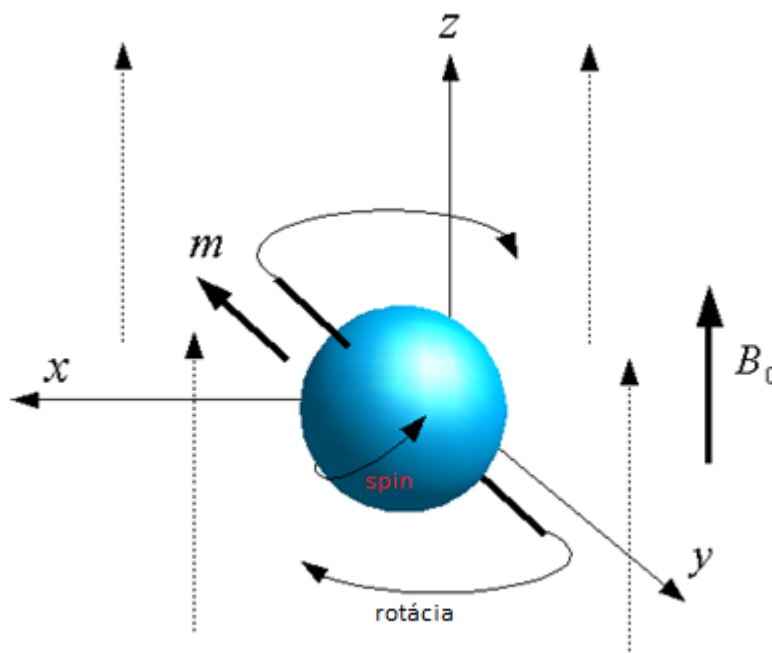
[6]

Pre frekvenciu precesného pohybu (Larmorovu frekvenciu) v Hz potom dostaneme :

$$f_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (2.2)$$

[6]

Z rovnice vyplýva, že frekvencia precesie je priamo úmerná indukčii (sile) vonkajšieho magnetického poľa.[6]



Obr. 2.3: Rozdiel medzi rotáciou a precesiou[6]

2.3.4 Rezonancia

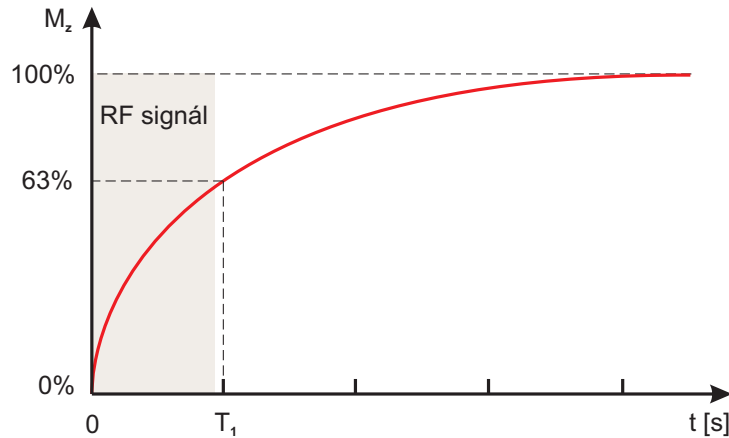
Aby mohlo dôjsť k prenosu energie, musia mať rádiovfrekvenčné pulzy (RF) frekvenciu totožnú s frekvenciou precesie protónov (musia byť v rezonancii), ktorú udáva Larmorova rovnica. Po vyslaní pulzu niektoré protóny, usporiadané paralelne (v stave s nižšou energetickou náročnosťou) získajú potrebnú energiu a zmenia svoje usporiadanie na opačné antiparalelné. Výsledkom je zníženie, vyrovnanie, alebo až zmena pomeru medzi počtom paralelne a antiparalelne usporiadaných protónov a zníženie, vymiznutie, alebo až obrátenie smeru longitudiálnej magnetizácie.[6]

2.4 Relaxačné mechanizmy

Po vybudení protónov do vyššieho stavu nastáva proces, kedy sa protóny vracia do rovnovážneho stavu. Zahŕnuje to dva procesy, ktoré prebiehajú súčasne ale s rôznou rýchlosťou. Jedná sa o spin-mriežkovú a spin-spinovú relaxáciu.

2.4.1 Spin-mriežková (longitudinálna) relaxácia

Po ukončení prísunu energie z vonkajšieho prostredia rádiofrekvenčným pulzom sa protóny zbavia nadbytočnej energie a vracajú sa do paralelného postavenia, ktorý je energeticky menej náročný. Pri tomto procese dochádza k výmene tepelnej energie čo ma za následok postupný vzrast longitudinálnej relaxácie v čase, viz obr. 2.4 Časová konštanta T_1 , ktorá označuje za aký dlhý čas určité tkanivo nadobudne 63% svojej maximálnej longitudinálnej relaxácie.[6]



Obr. 2.4: Relaxačná krivka T_1 [9]

$$M_z = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) , \quad (2.3)$$

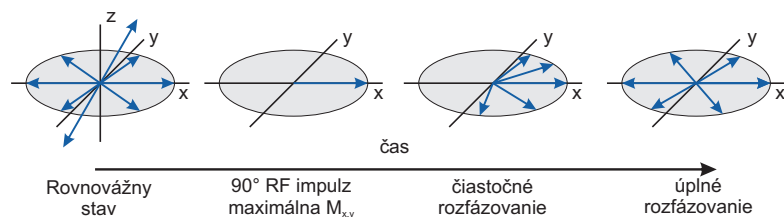
$$(M_0 - M_z) = M_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_1}} . \quad (2.4)$$

[9]

Časová konštanta alebo tiež relaxačný čas T_1 je 2-12 krát dlhší ako relaxačný čas T_2 . T_1 má v biologických tkanivách rozsah 200-2000ms,. Hodnota T_1 závisí na zložení a štruktúre tkaniva. Výmena energie prebieha vtedy keď sa precesná frekvencia protónov blíži k frekvencii okolia -teda sú v rezonancií. Napríklad ak je v okolí protónov čistá voda so svojimi malými a rýchlo sa pohybujúcimi molekulami je odovzdávanie energie ťažké a pomalé, preto má voda dlhý relaxačný čas T_1 . Ak je „mriežka“ tvorená molekulami strednej veľkosti (väčšina tkanív ľudského tela), energia je predávaná rýchlejšie. Relaxačný čas T_1 ďalej závisí od sily vonkajšieho magnetického poľa, čím je vyššia tým je T_1 dlhší. V silnejšom magnetickom poli je precesná frekvencia vyššia viz. Larmorova rovnica, predávanie energie okoliu je ťažšie.[6]

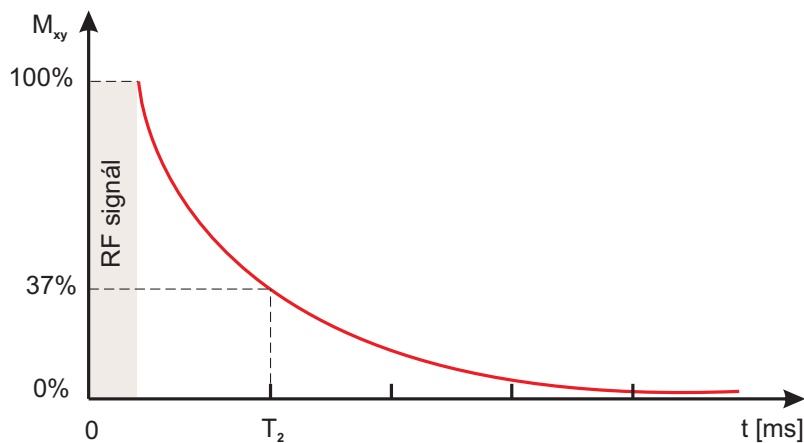
2.4.2 Spin-spinová (tranzverzálna) relaxácia

Po ukončení pôsobenia rádiovfrekvenčného pulzu sa protóny, ktoré dovtedy rotovali precesnou frekvenciou spoločne vo fáze sa začnú rozfázovávať. Výsledkom je pokles tranzverzálnej relaxácie v čase. Rýchlosť relaxačného času T_2 je ovplyvnená vnútornými a vonkajšími nehomogenitami magnetických polí. Jav rozfázovania je znázornený na obr. 2.5.



Obr. 2.5: Relaxácia T_2 [9]

Tak isto ako v prípade longitudinálnej relaxácii možno jej zmeny znázorniť v čase, viz obr. 2.6. Časová konštanta T_2 predstavuje dobu potrebnú k návratu na 37% pôvodnej maximálnej hodnoty. Relaxačný čas T_2 je 2 až 12 krát kratší ako T_1 . T_2 má v biologických tkanivách rozsah 30-150ms. [6]



Obr. 2.6: Relaxačná krivka T_2 [9]

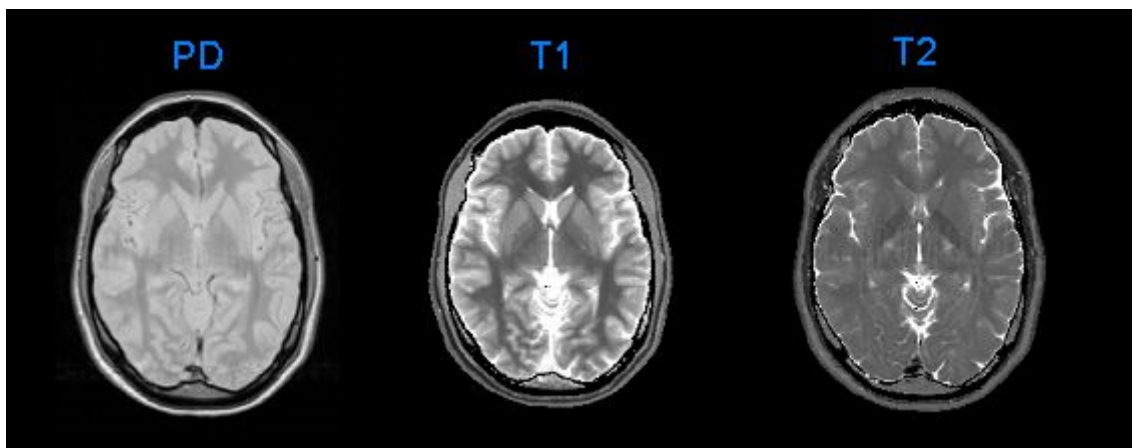
$$M_{xy}(t) = M_0 \cdot \exp - \frac{t}{T_2} . \quad (2.5)$$

[9]

2.5 Základné pulzové sekvencie

Hlavným cieľom MR zobrazovania je vytvoriť snímok s kontrastom medzi jednotlivými typmi tkaniva. Jas v obrázku ovplyvňuje mnoho faktorov. Medzi tri základné patrí:

- T_1 relaxacia
- T_2 relaxacia, resp. T_2^* relaxacia
- PD protonova hustota



Obr. 2.7: Porovnanie PD, T_1 a T_2 relaxace [7]

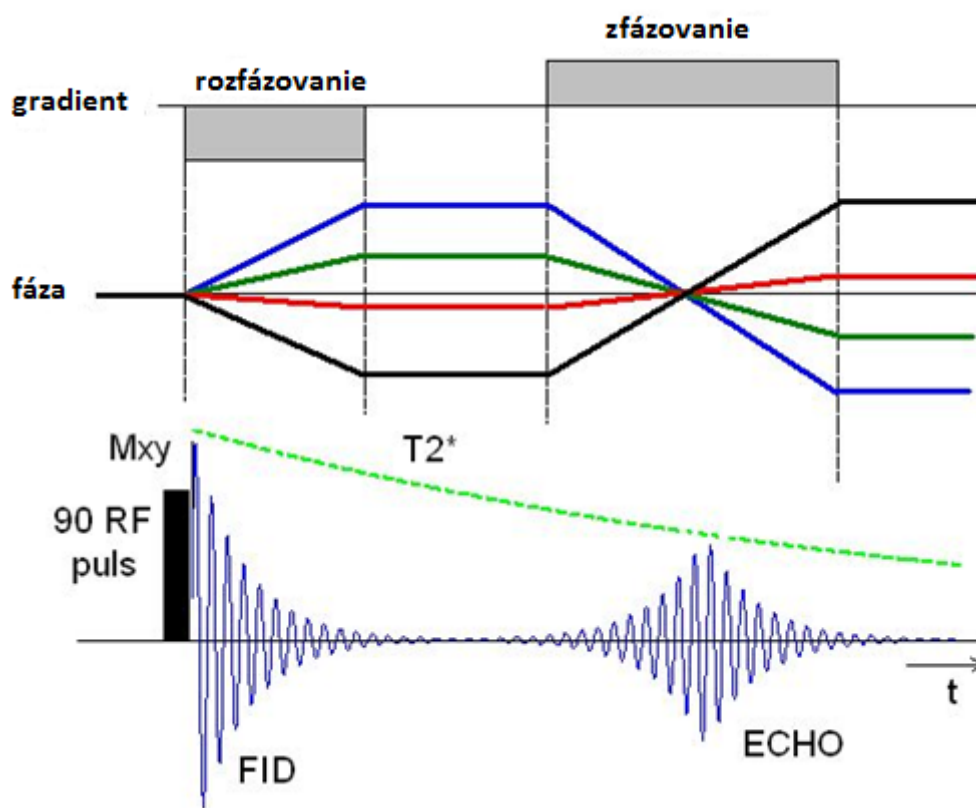
Kontrasty snímok vychádzajú z variability relaxačných časov rôznych tkanív a realizujú sa zmenou parametrov pulznej sekvencie. Energia použitá na RF excitačný pulz vyjadruje sklopenie vektora tkáňovej magnetizácie. Čím viac energie vyžarujeme do tkaniny, tým viac času je potrebné pre plnú relaxáciu. Parameter TR udáva dobu po ktorej opakovane aplikujeme jednotlivé excitačné pulzy. S kratším časom TR je i menej času k T relaxácii. Parameter TE je čas medzi excitačným pulzom a detekciou rezonančného signálu. Pri dlhšom čase TE budú jadrá s kratším časom T_2 menej prispievať k meraniu signálu.[7]

2.5.1 Typy RF pulzov

Existujú rôzne typy RF pulzov. Jedným zo základných je tzv. 90° pulz. Tento pulz dodá protónom toľko energie, že longitudinálnu relaxáciu úplne vynuluje. V tkanive bude rovnaký počet paralelne i antiparalelne usporiadaných protónov. Zároveň tento typ RF pulzu preklopí longitudinálnu relaxáciu o 90° a vytvorí z nej tranzverzálnu. Další 180° RF pulz dodá také množstvo energie, že otočí pomer paralelne a antiparalelne usporiadaných protónov a preklopí vektor longitudinálnej relaxácie o 180° . [6]

2.5.2 Gradient-echo sekvencia

Táto sekvencia začína 90° RF pulzom, ktorá ma za následok sklopenie vektoru magnetizácie do roviny xy. Na rozdiel od SE techniky používa gradient magnetického poľa namiesto ďalšieho pulzu. Výsledkom je riadené zvýšenie jeho nehomogenity a rýchlejší zánik tranzverzálnej relaxácie - kratší čas T_2 . To spôsobí rozfázovanie jednotlivých spinov. Po tomto nasleduje gradient s opačným znamienkom, ktorý jednotlivé spiny znovu sfázuje a tým vyvolá echo. Na rozdiel od SE techniky je pokles amplitudy echo signálu oproti amplitude FID signálu závislý na relaxačnom čase T_2^* a obrázok bude T_2^* váhovaný. [6][7]



Obr. 2.8: Gradient-echo sekvencia [7]

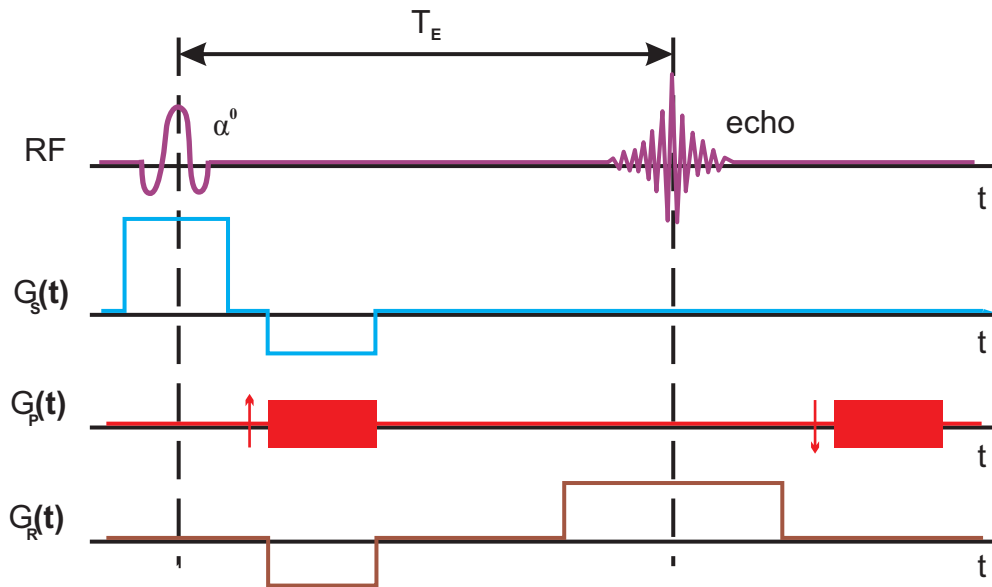
Pre excitaci sa používajú menšie uhly ($10-30^\circ$ RF pulzu), nespotrebuje sa celé longitudinálna relaxácia a zostane jej dosť aj pre nasledujúce série pulzov, a to i v prípade veľmi krátkeho pulzu. Čím ma tento pulz vyšší uhol, tým je výsledný obraz viac T_1 vážený. Jedná sa o rýchlu zobrazovaciu techniku, ktorá slúži ako základ pre zobrazovacie techniky používané v súčasnosti.[6]

Vyhody GE sekvencie:

- rýchle zobrazovanie
- malý uhol preklapania, vyžaduje menej energie
- Kompatibilný s 3D akvizíciou

Nevyhody GE sekvencie:

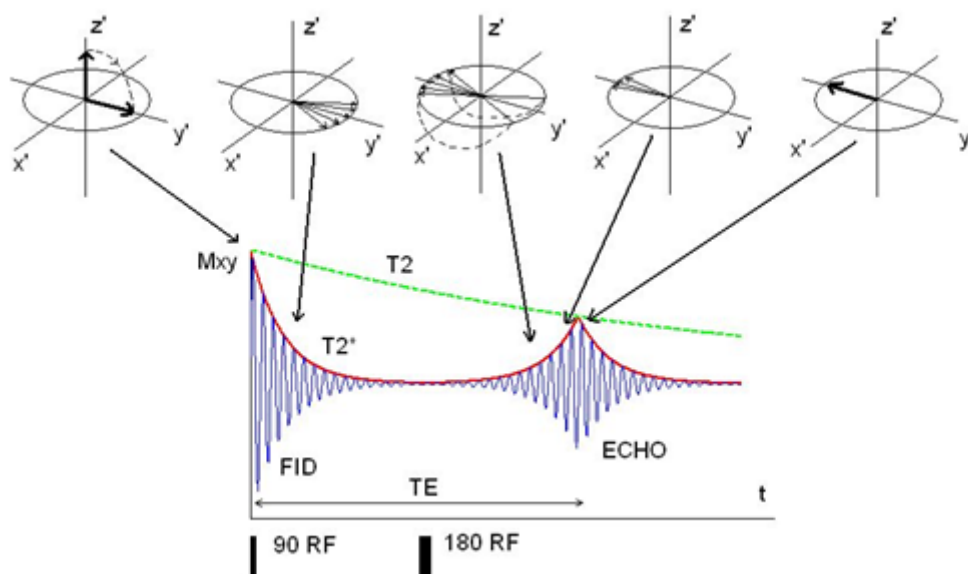
- Ťažko vytvoriť kvalitný T_2 vahovaný obraz
- Nehomogenita magnetického poľa B_0 spôsobuje stratu:
 - väčšej citlivosti
 - chemického rozfázovania [8]



Obr. 2.9: GE pulzná sekvencia pre zobrazovanie [8]

2.5.3 Spin-echo sekvencia

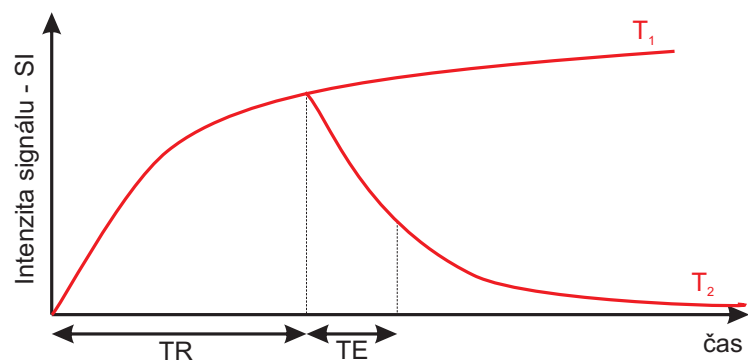
Sekvencia zložená z 90° a následného jedného alebo viacerých 180° RF pulzov. Patrí k základným pulzovým sekvenciám, využívaným v zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Po 90° RF impulzu je vektor magnetizácie preklopený do roviny xy a začína sa prejavovať T_2 relaxácia, t.j. dochádza k rozfázovaniu. Nasledujúcim 180° RF impulzom sa jednotlivé spiny preklopiť v rovine xy o 180° , opäť sa sfázujú a v prijímacej cievke je detekovaný echo signál, ktorého amplitúda je závislá na T_2 relaxácii. Intenzitu signálu T_2 potom určuje dĺžka času TE. [7]



Obr. 2.10: Spin-echo sekvencia [7]

Pomocou SE sekvencie sa dajú získať nielen T_2 ale i T_1 a PD vážené obrázky. Získanie príslušného váženého obrázku získame úpravou dĺžky časov TR a TE:

- *Dlhé TR a krátke TE:* pri dlhom čase TR (2-3s) rozdiely v T_1 výsledný obraz nebudú ovplyvňovať. Ak je zároveň zvolený i krátky čas TE, zmeny T_2 jednotlivých tkanív sa za tak krátky čas nebudu schopné dostatočne prejaviť a výsledny rozdiel nebudú ovplyvňovať ani rozdiely T_2 . Výsledkom je obraz, ktorého kontrast je ovplyvnený hlavne rozdielom v protónovej hustote tzv. PD vážený obraz.
- *Dlhé TR a dlhé TE :* pri dlhom čase TR (2 až 3 s) rozdiely v T_1 výsledný obraz nebudú ovplyvňovať. Ak je zároveň zvolený dlhý čas TE, majú rozdiely v T_2 dostatok času sa prejaviť. Výsledkom je tzv. T_2 vážený obraz.
- *Krátke TR a krátke TE:* pri krátkom čase TR (300 - 800 ms) neobnovia všetky tkanivá svoju longitudinálnu magnetizáciu na maximum - v okamihu ďalšieho 90° RF pulzu teda budú vyjadrené rozdiely v T_1 . Následne krátke TR zabráni výraznejšiemu prejavu rozdielov v T_2 . Výsledkom je tzv. T_1 vážený obraz.
- *Krátke TR a dlhé TE:* takéto nastavenie je možné, ale neúčelné. Krátke alebo veľmi krátke TR poskytne len malú longitudinálnu magnetizáciu. Následné dlhé TE spôsobí, že výsledný, už i tak slabý signál zanikne v šume pozadia. Výsledkom je diagnosticky nepoužiteľný obraz. [6]



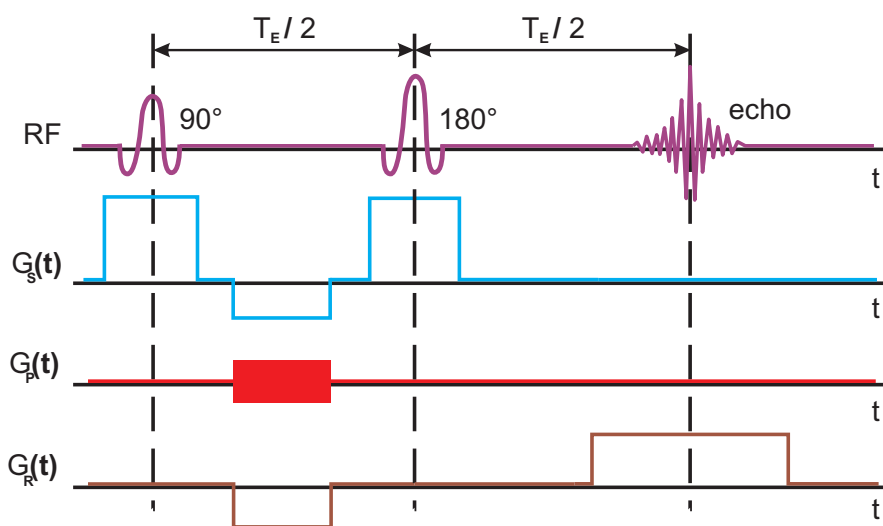
Obr. 2.11: Vzťah T_1 a T_2 krivky a TR a TE času v SE sekvencií. [6]

Vyhody SE sekvencie:

- Veľký SNR
- Vysoké priestorové rozlíšenie
- Čistý kontrastný mechanizmus:
 - krátke TR a krátke TE: T_1 - váhovany
 - dlhé TR a dlhé TE: T_2 - váhovany
 - dlhé TR a krátke TE: PD- váhovany

Nevyhody SE sekvencie:

- vyššia SAR ako u metódy SE, spôsobená 90° a 180° RF pulzmi
- Nekompatibilný s 3D akvizíciou, kvôli dlhému času TR
- Oneskorenie návratu magnetizácie do rovnovážneho stavu [8]

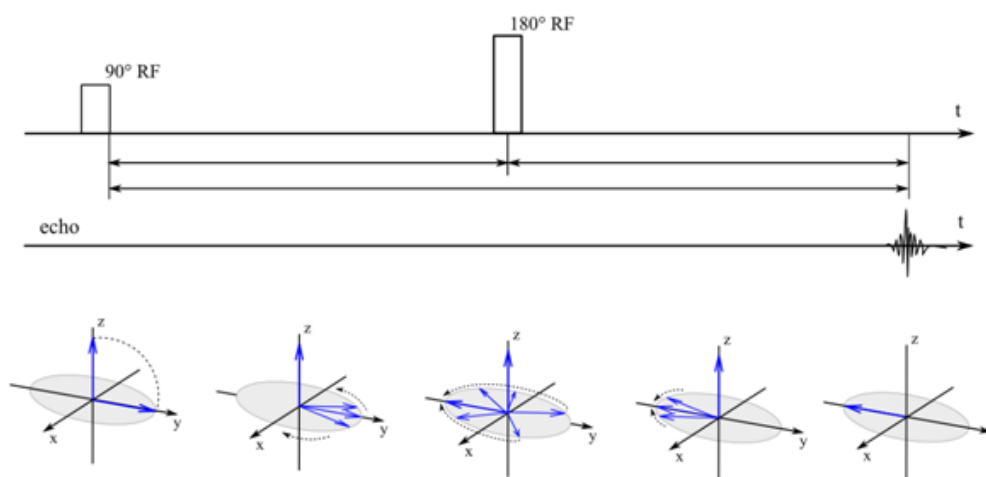


Obr. 2.12: SE pulzná sekvencia pre zobrazovanie [8]

3 METODIKA MRI MERANIA TKÁŇOVÝCH KULTÚR

Techniku MRI je možné použiť pri stanovení množstva vody v biologických tkanivách alebo pri sledovaní rastu tkáňových kultúr. Pri meraní tkáňovej kultúry sa vzorka umiestni do pracovného priestoru tomografu, zvolí sa vhodný smer roviny rezu a meria sa MR obraz v tejto rovine. Obraz je váhovaný spinovou hustotou a je možné z neho stanoviť relatívny počet protónových jadier v zvolenom reze a tým stanoviť množstvo vody a jej rozloženia vo vzorku. Pre tento účel je vhodná technika spin-echo, pretože eliminuje vplyv nehomogenity základného magnetického poľa a obrazy majú lepší pomer signál - šum. S týmto pomerom tiež súvisí zvolená šírka rezu a veľkosť meraného obrazu. S menšou hrúbkou rezu sa znižuje počet jadier vytvárajúcich signál a pomer signál- šum klesá. Minimálna hrúbka rezu je pre zobrazenie tkáňových kultúr výhodná. Optimálna hrúbka rezu sa udáva na 2mm. Pre zvýšenie pomeru signál- šum je možné meranie niekoľko krát opakovať a výsledky priemerovať. Meranie sa však časovo značne predlžuje. Pri väčšej veľkosti obrazu bude citlivosť tomografického systému menšia. Veľkosť obrazu sa volí s ohľadom na veľkosť zhluku tkáňových kultúr a na veľkosť pracovnej sondy. [10][12]

MR zobrazovacie systémy používajú radu budiacich sekvencií, ktoré sú tvorené jednotlivými impulzmi. Spin-echo metóda je daná kombináciou 90° a 180° impulzmi. Touto metódou je možné zobrazovať štruktúry podľa relaxačných časov T_1 a T_2 , ale i podľa protónovej hustoty. Tato metóda patri medzi najpoužívanéjšie sekvenčné metódy. [9] Princíp popisuje obr. 3.1



Obr. 3.1: Spin-echo sekvencia [9]

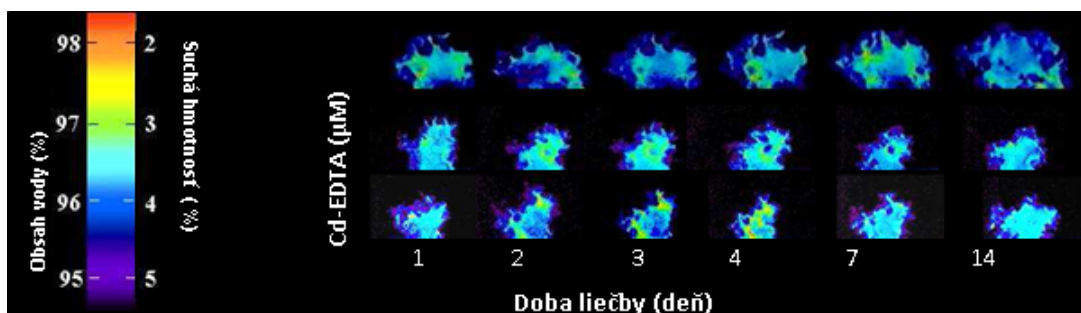
Po aplikovaný 90° RF impulzu v smere osy x, dôjde k zmene pozdĺžnej magnetizácie na priečnu. Týmto preklopením vektoru magnetizácie M do roviny xy a vplyvom T_2 relaxácie dochádza k strate fázovej koherencie (rozfázovanie jadier). Po uplynutí času $TE/2$ je tento krát aplikovaný 180° RF impulz opäť v smere osy x, vďaka čomu dôjde k opätovnému zfázovaniu. Vektor echa M_{xy} bude mať opačný smer vzhľadom k počiatočnému smeru vybudenia. V čase $TE/2$ dôjde k vzniku echo signálu. Pri metóde spin-echo sa neuplatňuje váhovanie T_2^* , preto táto metóda nie je závislá na homogenite B_0 , čo je jej veľká výhoda.[9]

Ako Príklad sú uvedené výsledky vyšetrovania obsahu vody v rastúcich tkáňových kultúrach ranných somatických embryí metódami MRI. Merané vzorky ranných somatických embryí smreku boli kultivované v plastových Petriho miskách (o priemere 50mm). Dáta boli spracované v programe MAREVISI. MRI obrazy boli získané pomocou klasickej spin-echo sekvencie s nasledujúcimi parametrami:

Tab. 3.1: Parametre pri meraní

čas spinového echa	$T_E = 13,5ms$
doba opakovania	$T_R = 3,8s$
rozmer matice	256x256 pixelov
rozmer matice	30x30 mm
rozlíšenie	0,117mm/ pixel
hrúbka vrstvy	2mm
počet priemerovaní	NS = 5

Experimenty boli vykonané na MR tomografickom systéme s horizontálnym magnetom s pracovným priestorom $r = 120mm$, pracujúcim s mag. poľom 4,7 T.



Obr. 3.2: Vplyv Cd-EDTA iónov na obsah vody v ranných somatických embryách smreku klonu 2/32 naočkovaná iónmi kadmia.

Meranie umožnilo určením obsahu vody v tkáňovej kultúre pomocou nukleárnej magnetickej rezonancii potvrdiť hypotézu o zvýšenie obsahu vody v tkáňovej kultúre pri kontaminácii kadmia. Farebná stupnica ukazuje odhadovaný obsah vody a vysušený váhový obsah v ranných somatických embryách (obr. 3.2). Obsah vody v ESE sa zväčšuje s koncentráciou kadmiových iónov v kultivačnom médiu po 14 dňoch pozorovania. Zvýšenie je dobre pozorované v priebehu prvých troch dňoch. MRI obrazy váhované spinovou hustotou určujú relatívny počet jadier vo vybranom mieste. Pre stanovenie celkového počtu protónových jadier pri raste tkáňovej kultúry je možné stanoviť integrál intenzity vo vybranej oblasti v závislosti na čase. Týmto spôsobom je možné lepšie vyhodnotiť nárast objemu jadier v čase. MRI obrazy váhované relaxačným časom T_2 a difúznym koeficientom D môžu priniesť nové informácie.

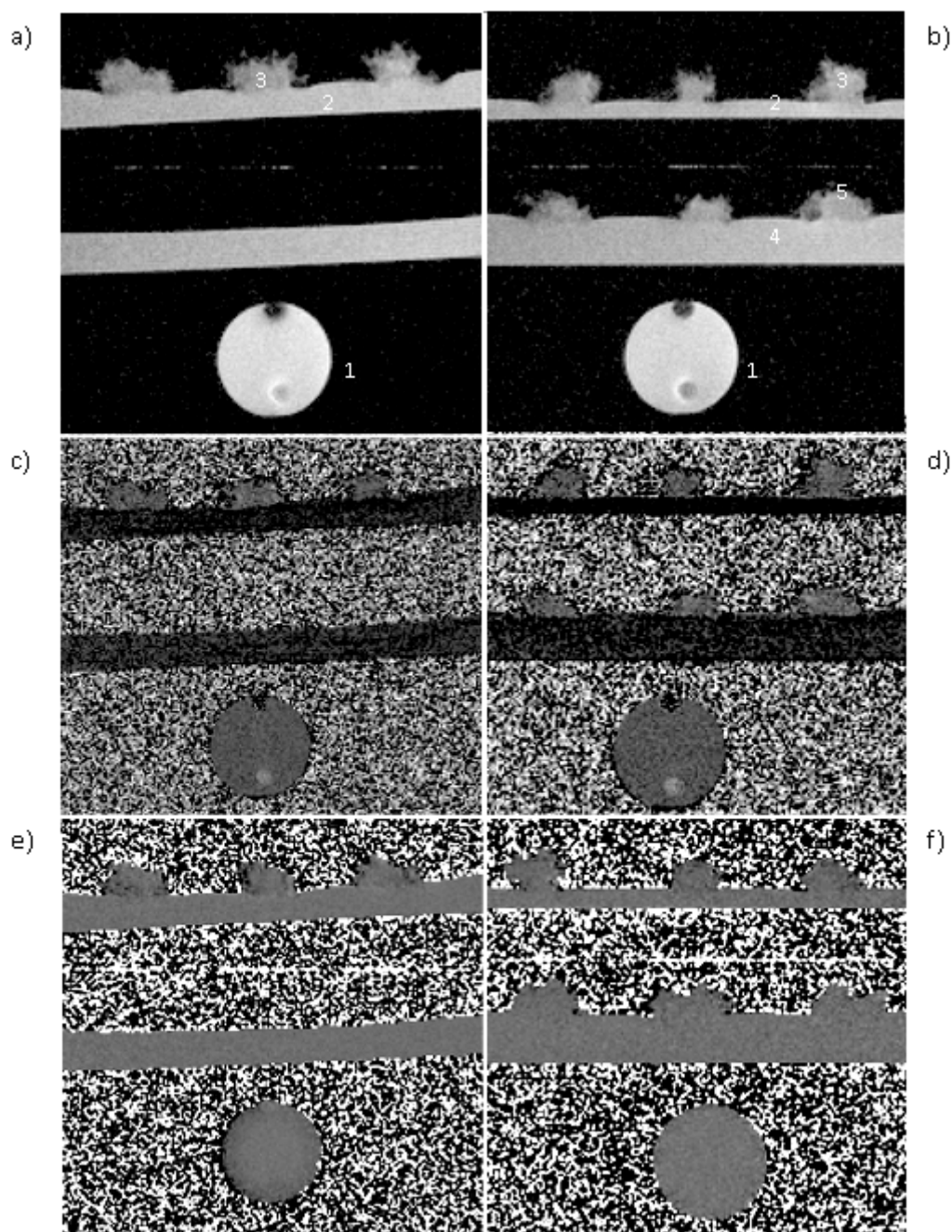
Ďalší príklad popisuje štúdium ranných somatických embryí smreku kontaminovaných Pb alebo Zn. Výsledky 8 dní po začiatku kultivácie sú porovnávané s kontrolou. Na obr. 3.3 je uvedené meranie ranných smrekových embryí metódou MRI. Obrazy sú váhované: a_j , b_j spinovou hustotou c_j , d_j relaxačným časom T_2 , e_j , f_j difúznym koeficientom D . V pozícii 1 je deionizovaná voda, v pozíciách 2 a 4 je kultivačné médium, v pozícii 3 je kontaminácia 50Pb a v pozícii 5 je kontaminácia 50Zn. Hodnoty T_2 a D pre kontrolu i pre kontaminované embryá sú uvedené v tab. 3.2 a tab. 3.3

Tab. 3.2: Výsledné hodnoty T_2 a D ESEs pri kontrole

Pozícia v obraze	Relaxácia T_2 [ms]	Difúzia $D[m^2/s]$
1 (voda)	88,4	$2,40e^{-9}$
2 (kultivačné médium)	40,4	$2,34e^{-9}$
3 (kontrola)	120	$2,09e^{-9}$

Tab. 3.3: Výsledné hodnoty T_2 a D ESEs kontaminovaných 50Bp a 50Zn

Umiestnenie v obraze	Relaxácia T_2 [ms]	Difúzia $D[m^2/s]$
1 (voda)	89,6	$2,40e^{-9}$
2 (kultivační médium)	46,9	$2,34e^{-9}$
3 (kontaminace 50Pb)	127,4	$2,09e^{-9}$
4 (kultivační médium)	30,2	$2,27e^{-9}$
5 (kontaminace 50Zn)	95,4	$2,08e^{-9}$



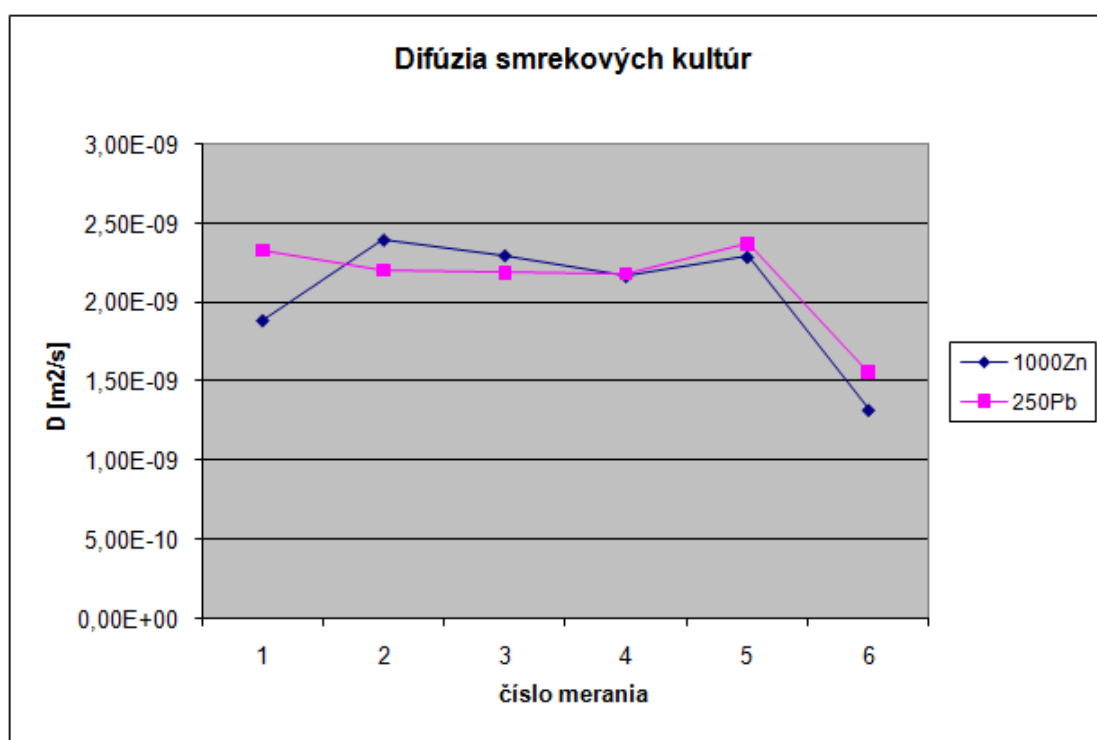
Obr. 3.3: Meranie ranných somatických embryí smreku metódami MRI

Veľkosti spin-spinového relaxačného času pre rôzne molekulárne štruktúry v cedru sú uvedené v tab. 3.4 . Z tabuľky je zrejmé, že pevne viazané molekuly vody alebo protóny majú relaxačný čas veľmi krátky, na rozdiel od voľne viazanej vody v jarnom dreve cedru. Relaxačné časy môžu byť tiež výrazne skrátené prímiesami paramagnetických látok alebo látok s výrazne odlišnou magnetickou susceptibilitou v porovnaní s vodou.

Tab. 3.4: Spin-spinový relaxačný čas T_2 pre rôzne molekulárne štruktúry cedru

Zdroj protónov	Relaxácia T_2	Molekulárna štruktúra
celulóza a lignín	20 μ s	polyméry bunkových stien
viazaná voda	4 ms	voda v bunkových stenách
nitrobunečná voda malých rozmerov	30ms	voda v letnom dreve
nitrobunečná voda veľkých rozmerov	100ms	voda v jarnom dreve

Na obr. 3.4 Je priebeh zmeny difúzneho koeficientu ranných somatických embryí smreku kontaminovaných 50Pb a 50Zn v závislosti na čase rastu. Jednotlivá merania prebiehala každý tretí deň. Z toho priebehu je zrejmé, že difúzia sa výrazne nemení.

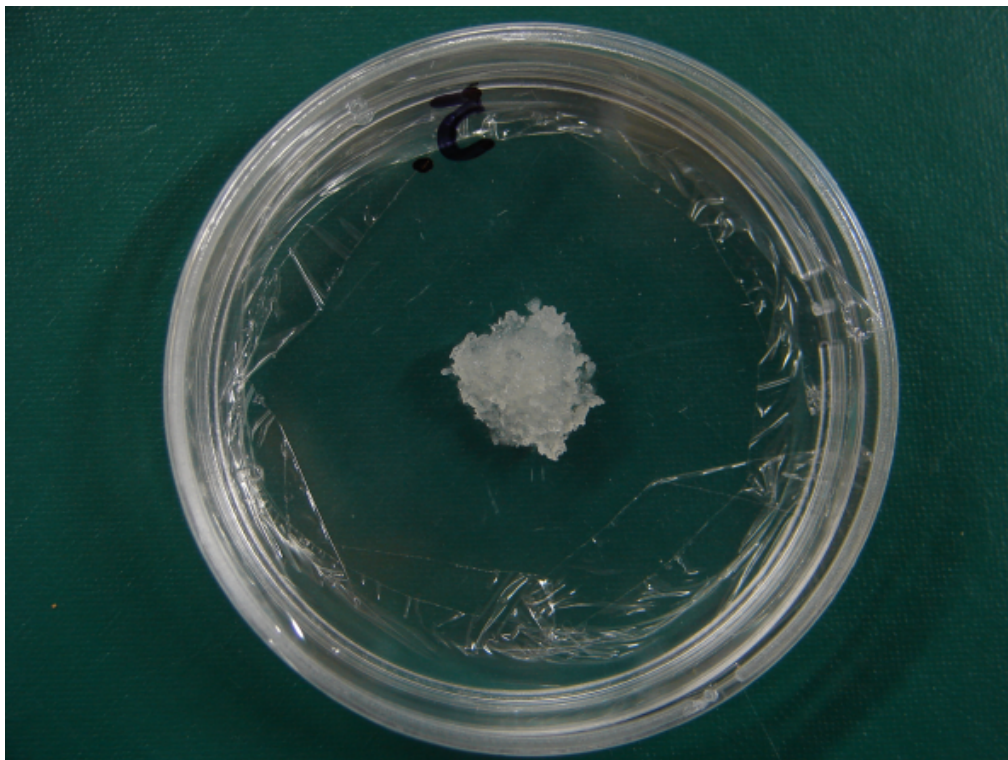


Obr. 3.4: Priebeh difúzneho koeficientu ranných somatických embryí smreku

3.1 Tkáňová kultúra

Prvé úspešné pokusy o založení bunečnej kultúry, v ktorej by sa bunky množili a prežívali dlhšiu dobu nastali v štyridsiatich rokoch 20. Storočia. Techniky tkáňových kultúr sa postupne zdokonaľovali a výsledky začínali byť stále spoľahlivejšie. Od

osemdesiatich rokoch sa tkáňové kultúry stáli bežným nástrojom nielen pre výskum, ale začali sa používať i v priemyselnej výrobe protilátok a chemikálii. Úplne nenahraditeľné sú tieto metódy pre molekulárnu biológiu a vývoj nových liekov.[11]



Obr. 3.5: Tkáňová kultúra v Petriho myske

Pojem tkáňovej kultúry znamená aseptickú kultiváciu izolovaných častí rastlín za umelých podmienok. Každá živá rastlinná bunka obsahuje genetickú výbavu celej rastliny. Práca s tkáňovými kultúrami sa v niektorých ohľadoch líši od ostatných technik používaných v biochémii. V prvom rade je nutné, aby všetky používané pomôcky a chemikálie boli sterilné a aby neobsahovali niektoré toxické látky, ktoré sa inak v stopových množstvách bežne kontaminujú. Principiálne má práca s každou bunkovou líniou niekoľko fáz:

- izolácia bunečného kmeňa
- udržiavanie bunečnej línie a jej expanzia
- využitie namnožených buniek v pokuse [11]

Väčšina bunečných línií má obmedzenú životnosť, tzn. podlieha starnutiu a po určitej dobe sa bunky prestanú deliť. Len niektoré tkanivové kultúry sú nesmrteľné, spravidla ide o bunky získané z nádorov. V tom prípade sa hovorí o kontinuálnych

bunkových líniiach. Aj v nich si bunky zvyčajne zachovávajú schopnosť regulácie bunkového delenia. Ak ju stratí a delí sa nekontrolovane, hovoríme o transformovanej bunečnej línii. [11]

Bunky sa pestujú v kultivačných nádobách (fľašiach, petriho miskách apod.), ktoré obsahujú špeciálne kultivačné média. Tie obsahujú potrebné ióny, pufre, zdroje energie, aminokyseliny, vitamíny, rastové faktory a ďalšie pomocné látky. Pre optimálny rast treba tkanivové kultúry pestovať v sterilnom prostredí so stálou teplotou okolo 37°C a zvlhčenou atmosférou so zvýšeným obsahom oxidu uhličitého. [11]

3.2 Zobrazovacie techniky NMR

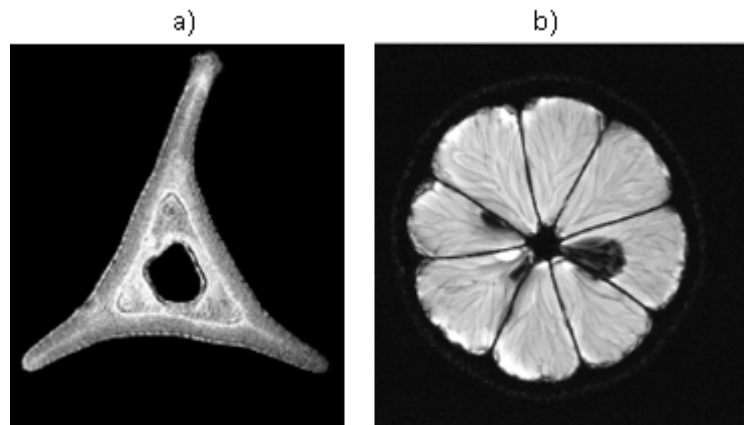
Princíp nukleárnej magnetickej rezonancie je veľmi často využívaný pre tomografické zobrazovanie v medicíne, biológii a v iných technických oboroch. Pretože v NMR možno stanoviť relatívny počet jadier zvoleného atómu rezonujúceho na jednom kmotočte, je pre NMR zobrazovanie potrebné zabezpečiť transformáciu polohy jadra na rezonančný kmotočet jadra. Táto transformácia sa vo väčšine prípadov prevádza pomocou gradientných magnetických polí. V súlade so vzťahom Larmorovej rovnice ak snímame signál od jadra za prítomnosti gradientného poľa , je možné stanoviť polohu jadra podľa jeho kmotočtu. Pri aplikácii gradientných polí vo všetkých troch smeroch získame obraz s kontrastom zodpovedajúcim spinovej hustote v každom pixeli obrazu. Intenzita obrazu je teda úmerná počtu jadier v meranej vzorke. Bežné obrazy majú 256x256 obrazových bodov a pre objekt 60x60mm je veľkosť obrazového bodu 0,234mm. Pri zmenšovaní veľkosti obrazového bodu klesá pomer signál-šum v obraze. [12]

Podľa typu NMR prístroja je možné dosiahnuť rozlíšenie až 0,05mm. Pre dosiahnutie väčšieho pomeru signál-šum je možné použiť časové priemerovanie NMR signálu alebo použitím digitálnej filtrácie obrazu. [12]

3.2.1 Priestorové kódovanie rezonujúcich jadier

Priestorové kódovanie vo vnútri excitovanej tomoroviny je u MR vykonávané pomocou dvojice ďalších prídavných gradientných magnetických polí G_x a G_y , ktoré sú superponované na základné pole B_0 v odpovedajúcich smeroch , teda ortogonálne na smer G_z . Nezávislé budenie odpovedajúcich cievok pre generáciu gradientných polí umožňuje vytvoriť lineárnu zmenu magnetického poľa v ľubovoľnom smere v súlade s rovnicou:

$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2 + G_z^2} . \quad (3.1)$$



Obr. 3.6: NMR obrazy váhované spinovou hustotou a) 3mm priečny rez euforbiou (30x30mm, 256x256 bodov), b) citrónom (60x60mm, 256x256 bodov) [12]

[10]

Pri začiatku merania je dôležité vybrať vo vzorke meranú rovinu, za pomoci lineárneho gradientu G_z . Hoci pomocou gradientu G_z zvolíme rovinu, ktorú chceme neskôr zobrazíť, nie je bez ďalších špecifikácií možné určiť od ktorého protónu signál prichádza. Preto sa používa kódovanie pozície precesujúcich protónov v danej rovine pomocou gradientov G_x , G_y [10].

Frekvenčné kódovanie

Frekvenčné kódovanie sa vykonáva v osi x použitím gradientu magnetického poľa G_x pri snímaní echo signálu. V závislosti na ose x preceďujú jednotlivé spiny pri pôsobení gradientu s mierne odlišnými frekvenciami. Echo signál je tvorený súčtom harmonických signálov o rôznych frekvenciách. [10]

Fázové kódovanie

Fázové kódovanie sa vykonáva v smere osi y . Ide o proces, kedy sa pomocou ďalšieho gradientu G_y budú protóny na miest s vyššou hodnotou G_y precesovať rýchlejšie, ako protóny s nižšou veľkosťou G_y . Ako náhle dôjde k vypnutiu gradientu G_y , budú opäť všetky protóny precesovať na rovnakej Larmorovej frekvencii, ale vďaka prefázovaniu budú protóny precesovať už s inou fázou. [10]

Zber obrazových dát

Ako prvý krok dôjde k vybudeniu protónu RF impulzom. Následne je sňatý signál FID, ktorého spektrum je tvorené úzkym pásom s frekvenciou ω_0 . Na Larmorových

frekvenciách rezonujú protónová jadrá. Kmitočet týchto frekvencií rastie v závislosti na pozícii protónov v smere gradientov G_x , G_y . Spektrum signálu obsahuje informáciu jak o pozícii tak aj o počte rezonujúcich jadier v danom stĺpci. [10]

3.2.2 Rekonštrukcia obrazu

Najpoužívanejšou metódou je Fourierova 2D rekonštrukčná metóda. Využíva sa 2D Fourierova transformácia. Najskôr sa vykoná rozfázovanie jadier a následne rozkódovanie frekvencie. Výsledkom je jeden pohľad, ktorá sa rovná jednému riadku v K-rovine, čiže K-priestoru. Nasleduje zmena fázového dekódovania o konštantný krok pri stálej frekvencii.

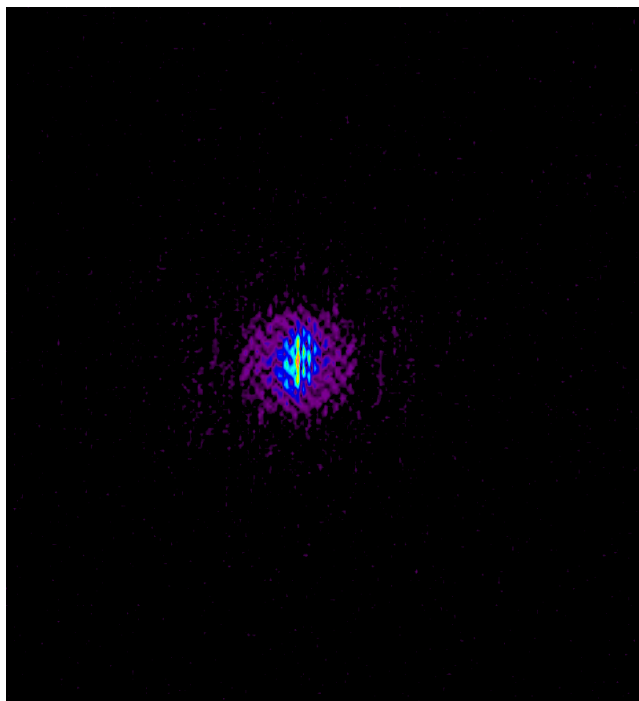
K-priestor

K-priestor využívaný od roku 1983, je matica kde sa dočasne ukladajú získané digitalizované NMR signáli. K-priestor teda dočasne uchováva nezpracované dáta pred rekonštrukciou výsledného obrazu. V matici sú vodorovne ukladané jednotlivé FID signály obsahujúce frekvenčné kódovanie a v stĺpcoch informácie o fázovom kódovaní. Pretože technika spinového echa neposkytuje informáciu o priestorovom rozložení signálu, ktorý potrebujeme k rekonštrukcii obrazu, je potrebné rozlíšiť čiastkové signály prichádzajúce zo všetkých meraných bodov. Tieto trojrozmerné body sú objemovými jednotkami, ktoré označujeme v analógií s dvojrozmerným pixlom voxel. Tieto voxely sú kódované po aplikácii excitačného pulzu pri náraste signálu do fázy a kmitočtu. Subsignály od čiastkových voxelov sú skladané do výsledného obrazu pomocou 2D Fourierovej transformácie. Fourierova transformácia je matematická technika, ktorá prevádza signály z časovej do frekvenčnej oblasti.

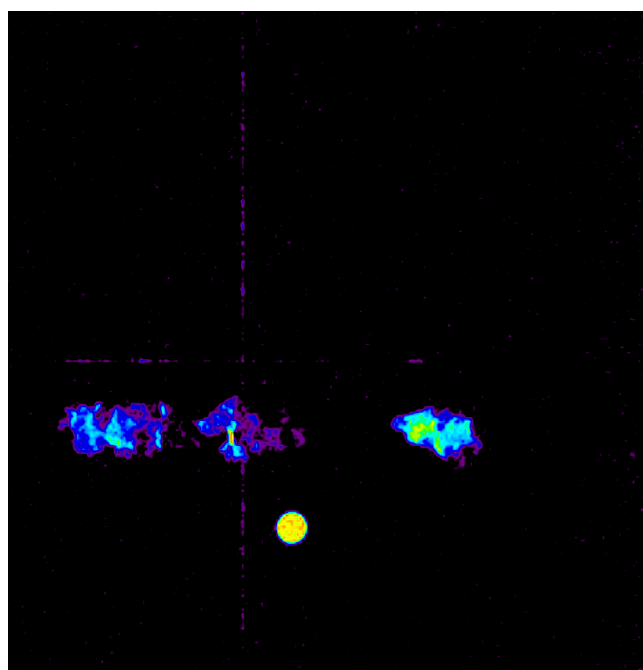
$$\rho(\omega) = F\{M_{x,y}(t)\} = \int_0^\infty M_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} \cdot e^{-i\omega_0 t} \cdot e^{-i\omega t} dt \quad . \quad (3.2)$$

[12]

kde je množstvo jadier vytvárajúcich NMR signál. Nazývame ju spinová hustota.



Obr. 3.7: K-rovina



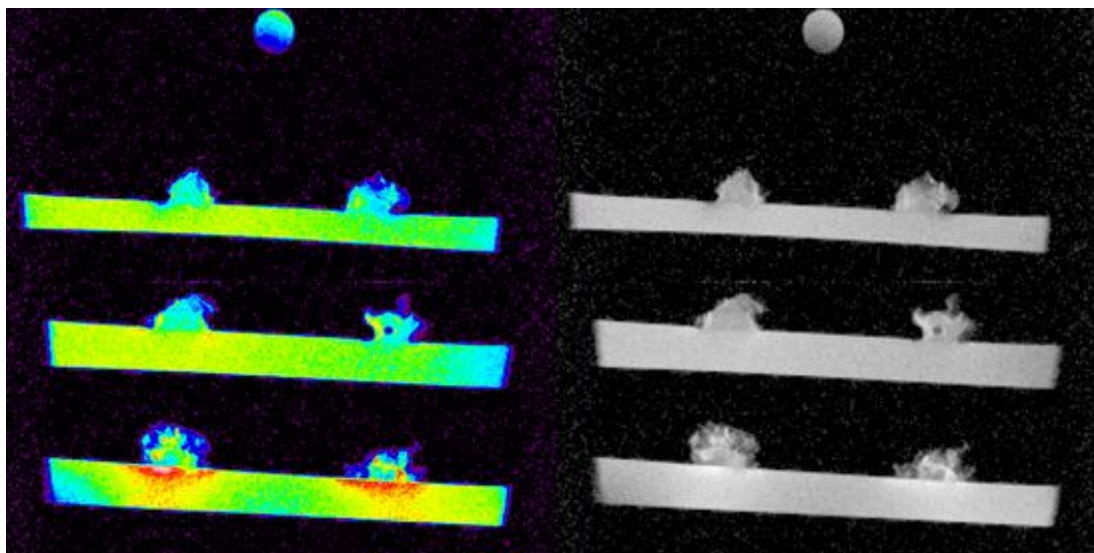
Obr. 3.8: Obraz po FT rekonstrukcii

4 MERANIE TKÁŇOVÝCH KULTUR

Pre meranie bola použitá spin-echo (SE) technika ktorá na rozdiel do gradient-echo (GE) techniky eliminuje vplyv nehomogenity základného magnetického poľa a obrazy majú lepší pomer signál-šum. S týmto pomerom súvisí zvolená šírka rezu a veľkosť meraného obrazu. S menšou šírkou rezu sa znižuje počet jadier ,ktoré vytvárajú MR signál a signál-šum klesá.[10]

Meranie bolo realizované v Ústave prístrojovej techniky Akadémie vied Českej republiky na MR tomografickom systéme s horizontálnym magnetom a s pracovným priestorom o priemere 120mm, pracujúcim s magnetickým polom 4,7T (tj. 200MHz pre jadra vodíka). Aktivne tienené gradientné cievky vytvárajú maximálnu veľkosť gradientného pola 180mT/m. Meraná dáta boli spracované v programe MAREVISI a MATLAB.

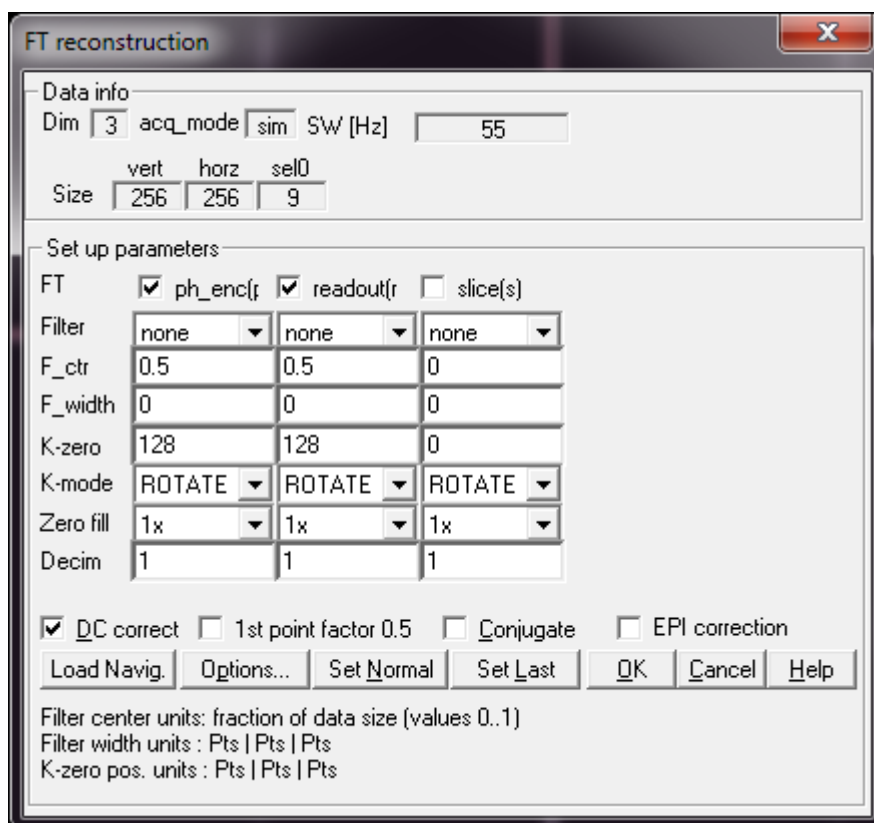
Merané vzorky ESEs smrku boli pripravené na Mendelovej Univerzite v Brne. MR obrazy boli získané pomocou klasickej SE sekvencie s nasledovnými parametrami: čas spinového echa $T_e = 16ms$, doba opakovania $T_R = 1000ms$. Rozmer matice bol daný na 256x256 pixelov, s rozlíšením $0,234mm/pixel$, $VOI = 55mm$ a počet priemerovaní $NS = 4$. Šírka rezu bola zvolená na $2mm$. Do tomografu boli vložené 3 Petriho misky o priemere $50mm$ viz obr. 4.1. Každá miska obsahovala 4 zhluky.



Obr. 4.1: Obraz tkáňových kultur zriadených MR tomografom

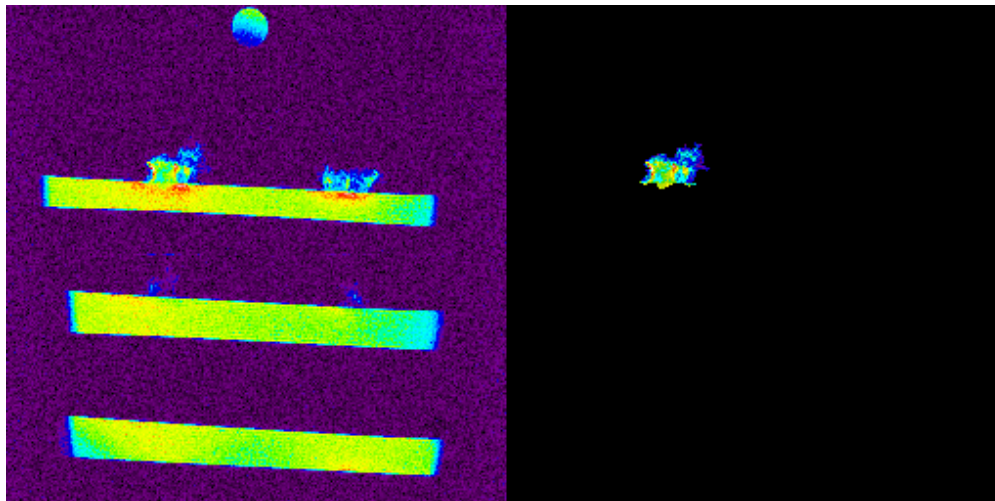
4.1 Spracovanie obrazu tkáňových kultur

Výsledné obrazy z merania, ktoré su vo forme k-priestoru , boli vložené do programu Marevisi, kde pomocou Fourierovej transformácie dojde k rekonštrukcii obrazu. Parametre Fourierovej transformácie su na obr. 4.2 .



Obr. 4.2: Parametre Fourierovej transformácie

Aby sme určili presný integrál konkrétneho zhluku tak tento zhluk musel byť vyňatý z okolitého prostredia. Práve pri tomto oreze mohla nastať menšia nepresnosť, keďže rozdiel medzi zhlukom a kultivačným médiom bol veľmi ťažko rozpoznateľný. Výsledný obraz bol vložený do programu Matlab kde bol vypočítaný integrál určitého zhluku pri určitom reze.



Obr. 4.3: Vľavo celkový obraz z MR tomografu, vpravo výrez konkrétného zhluku.

4.2 Výpočet integrálu dané kultury

Integrál obrazu môžeme stanoviť dvoma spôsobmi. Súčtom intenzít orezaného obrazu podelený počtom pixelov MR obrazu získame prvý spôsob.

$$I_i = \frac{X_{max} \cdot Y_{max}}{M \cdot N} \cdot \sum_1^M \cdot \sum_1^N \cdot S_i . \quad (4.1)$$

[10]

Druhý spôsob výpočtu integrálu je využitie vlastnosti Fourierovej transformácie, vzťahu MR obrazu a interferenčného obrazu, ktorým je subor zmeraných komplexných signálu.

$$S_i(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \rho_i(x, y) \cdot e^{-2\pi(k_x x + k_y y)} dx dy . \quad (4.2)$$

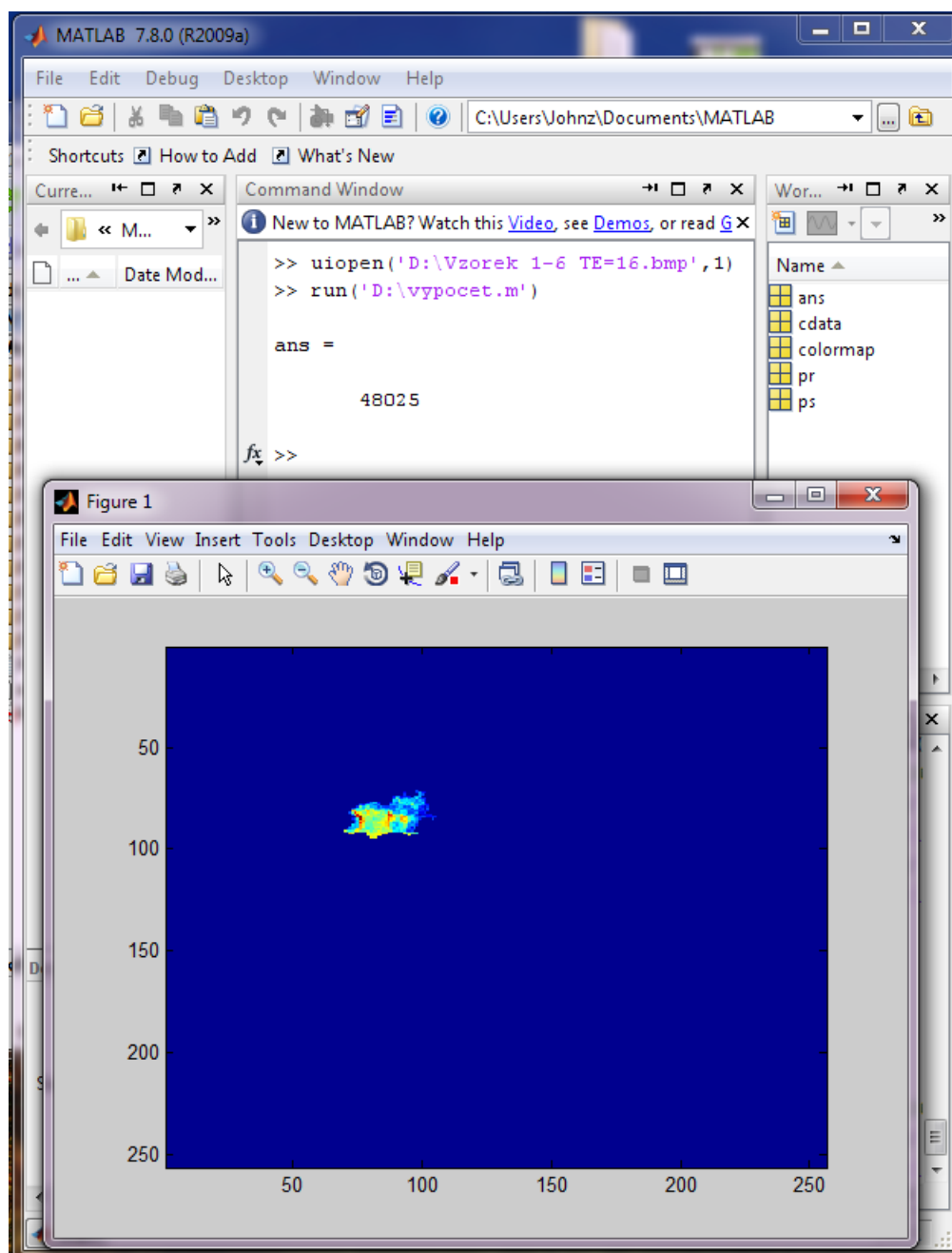
[10]

k_x, k_y sú súradnice v meranom interferenčnom obraze nazývané (spatial frequency) priestorová frekvencia, $\rho_i(x, y)$ je rozloženie spinovej hustoty v MR obraze. Počet protónových jadier v meranom vzorku je úmerný integrálu I_i , ktorý je rovný intenzite interferenčného obrazu v nulovom bode tj. pre $k_x = k_y = 0$.

$$S_i(0, 0) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \rho(x, y) dx dy = I_i . \quad (4.3)$$

[10]

Výsledky obidvoch spôsobov výpočtu sú zhodné a ich vzájomná chyba je menšia než 1%. Pre meranie len jedného zhluku tkáňových kultur je výhodnejší druhý spôsob. Závislosť intenzity obrazu zhluku je priamoúmerne relatívnemu počtu protónov v zhluku.[10]



Obr. 4.4: príklad výpočtu integrálu z tkáňovej kultury.

Obráz orezaného zhluku zriadeného v programe Marevisi s veľkosťou 256x256 pixelov sme vložili do programu Matlab príkazom `uinopen ('cesta k obrázku\názov obrázku.bmp', 1)`. Po prevedení tohto príkazu sa v Matlabe otvorí okno s parametrami obrázka. Po stlačení tlačidla *finish* sa okno zavrie a hodnoty z obrázka sa uložia do matice o veľkosti 256x256. Príkazom `run (cesta k súboru\vypocet.m')` sa spustí vopred pripravený program ktorý vypočíta integrál daného zhluku. Výsledkom je vypočítaná hodnota daného zhluku a zároveň sa nám zobrazí okno zhluku ktorý bol spracovávaný. S týmto obrázkom sa v prípade potreby môže pracovať ďalej.

Zdrojový kód programu na výpočet obsahu zhluku je znázornený nižšie:

```
[ps,pr] = size(cdata);
cdata;
imagesc(cdata)
sum(sum(cdata(25:250,10:250)))
```

4.3 Vyhodnotenie tkáňových kultur

Takýmto spôsobom sa postupne spracovali všetky zhluky vo všetkých rezoch. Celkový počet zhlukov bol 40. Hodnoty všetkých rezov zhluku sa sčítali dokopy a výsledkom bol celkový integrál intenzity konkrétnej tkáňovej kultúry. V prílohe A je znázornený výsledný graf intenzít všetkých vzorkov tkáňovej kultúry. Tieto hodnoty boli následne porovnané s hodnotami ktoré získali na Mendelejovej univerzite v Brne metódou vysušovania. Výsledný graf v ktorom sú porovnané obe metódy môžete vidieť v prílohe B. Nakoniec som spravil pomer výsledkov obidvoch meraní k prvému vzorku a vypočítal aritmetický priemer $mean = 1,0337$ a smerodajnú odchýlku $s.d. = 0,1695$. Pomer týchto dvoch meraní je znázornený v prílohe C. Na záver prikladám v prílohe D tabuľku hodnôt získaných z meraní tkáňových kultúr.

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskeho projektu bolo spracovať metodiku merania tkáňových kultúr a vykonať experimentálne meranie. Práca je členená do štyroch kapitol. V prvej kapitole sú zhrnuté články ktoré popisujú možnosť využitia magnetickej rezonancie v rastlinnej biológii pri stanovení metabolizmu , vyšetrovanie bunkových procesov a skúmanie rastu a vývoju rastlín. Druhá kapitola popisuje princíp magnetickej rezonancie, jej fyzikálne fakty, popis procesov relaxačných mechanizmov a základné pulzové sekvencie. V tretej kapitole je popísaná metodika merania a zobrazovania tkáňových kultúr prostredníctvom MRI, názorné príklady vyšetrovania obsahu vody v rastúcich tkáňových kultúrach a štúdium ranných somatických embryí smreku kontaminovaných olovom a zinkom. V štvrtej kapitole je popísaný postup vlastného merania tkáňovej kultury, ktoré prebehlo na Ústave prístrojovej techniky v Brne. Získané obrazy som spracovával v programe Marevisi, ktorý umožňuje spracovanie a analýzu rôznych typov viacrozmerných dát získaných MR zobrazovaním . V ňom som výrezom oddelil zhluky tkáňových kultur od okolitého prostredia aby som následne mohol v programe Matlab získať z týchto obrazov celkovú intenzitu určitej tkáňovej kultury. Keďže rozdiel medzi tkáňovou kultúrou a kultivačným médiom bol veľmi ťažko rozpoznateľný mohla práve pri tomto výreze vzniknúť chybovosť ktorá sa prejavuje v konečnom výsledku. Tieto hodnoty som porovnal s hodnotami ktoré získali na Mendelovej univerzite metódou vysušovania. Z výsledkov je zrejmé že metóda merania tkáňových kultúr magneticou rezonanciou spoľahlivá a výhodná, keďže pri meraní sa vzorky nezničia na rozdiel od metódy vysušovania pri ktorej už ďalšia práca zo vzorkami nie je možná. Výsledné grafy a získane hodnoty sú umiestnené v prílohách.

LITERATURA

- [1] Supalkova V., Petrek J., Baloun J., Vojtech A., Bartusek K., Trnkova L., Beklova M., Diopan V., Havel L., Kizek R. *Multi-instrumental Investigation of Affecting of Early Somatic Embryos of Spruce by Cadmium(II) and Lead(II) Ions*. Sensors, 2007. 17 s.
- [2] Huska D., Zitka O., Krystofova O., Adam V., Babula P., Zehnalek J., Bartusek K., Beklova M., Havel L., Kizek R., *Effects of cadmium(II) ions on early somatic embryos of Norway spruce studied by using electrochemical techniques and nuclear magnetic resonance*. Int. J. Electrochem. Sci., 2010. 15 s.
- [3] *Magnetická rezonancia* [online]. 2010, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <http://physedu.science.upjs.sk/nmr/mag_rezonancia.pdf>.
- [4] *Čo je to Magnetická rezonancia?* [online]. 2010, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <<http://www.magnetickarezonancia.sk/hlavna-stranka/co-je-to-magneticka-rezonancia/>>.
- [5] *Fyzikální princip NMR* [online]. 2004, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=13>.
- [6] *Zobrazovanie magnetickou rezonanciou* [online]. 2010, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <<http://www.info24web.info/kraj-sk-show-MRI>>.
- [7] *Základné pulzné sekvencie* [online]. 2010, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=14>.
- [8] *Sekvenčné diagramy* [online]. 2005, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <http://bitc.bme.emory.edu/seq_dia.html>.
- [9] Draisich, A. *Tomografické zobrazovacie systémy*. Brno: Skriptum VUT FEKT UBMI, 2004. 208 s.
- [10] Bartušek K., Gescheidtová E., Kizek R., Dokoupil Z., *Zpracování dat při studiu růstu raných smrkových embryí zobrazovacími MR technikami..* elektrorevue, 2008. 4s.
- [11] *Základné techniky práce s tkáňovými kultúrami. Ústav lékařské biochemie 1.lékařské fakulty UK* [online]. 2010, [cit. 6. 11. 2010]. Dostupné z URL: <<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>.
- [12] Bartušek K. *Technika nukleárnej magnetickej rezonancie* Brno, 2010. 8 s.

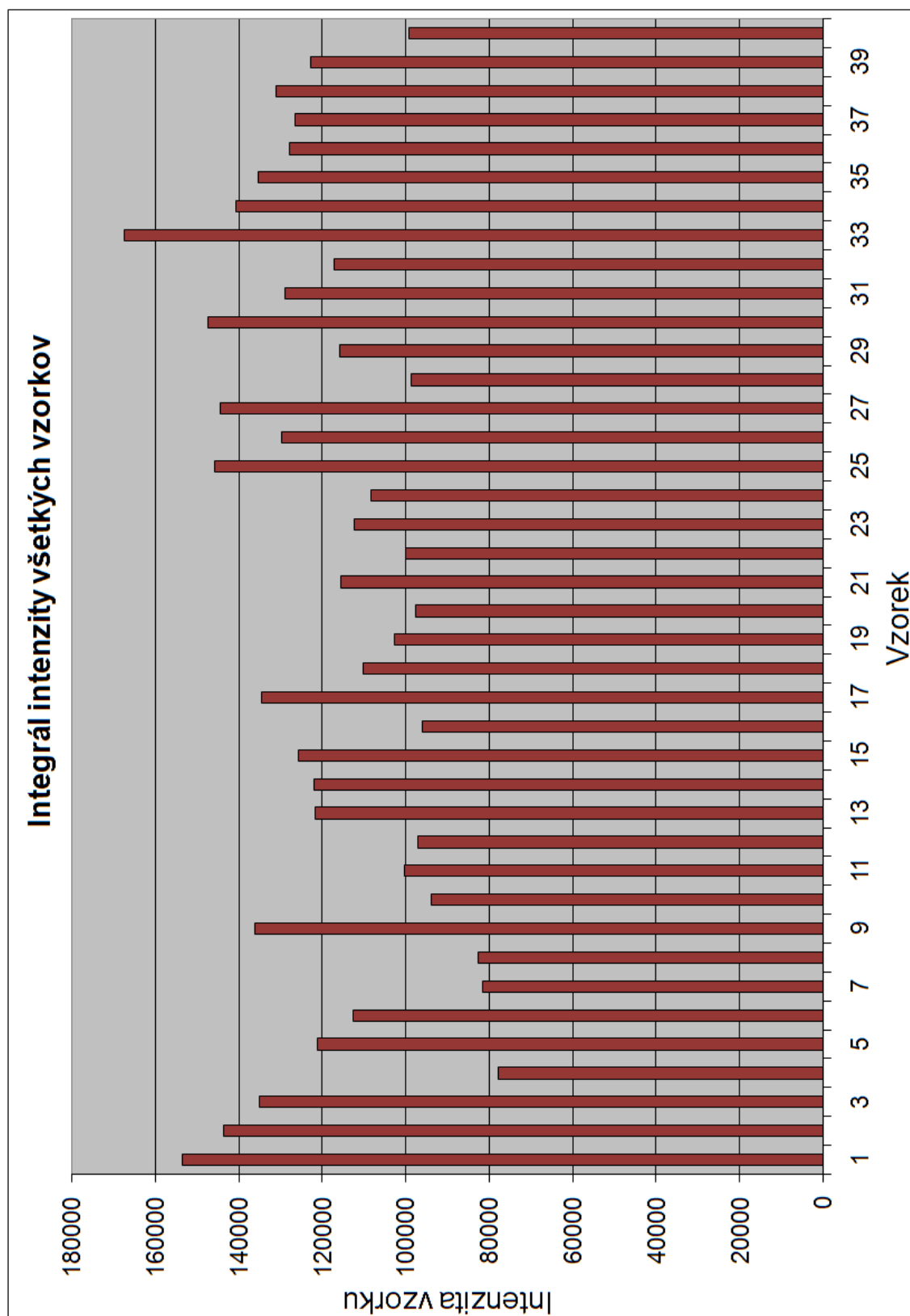
SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

DSP	číslíkové zpracování signálu – Digital Signal Processing
f_0	Larmorová frekvencia
ω_0	uhlová frekvencia precesie
γ	gyromagnetická konštanta
B_0	hodnota vonkajšieho magnetického
$M_{x,y,z}$	vektor magnetizácie
FID	free induction decay
D	difúzny koeficient
ESEs	skoré somatické embryá – Early somatic embryos
GE	gradientné echo – gradient echo
MR	magnetická rezonancia – magnetic resonance
MRI	zobrazovanie magnetickou rezonanciou – magnetic resonance imaging
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
SAR	špecifická miera absorpcie – specific absorption rate
PD	protónová hustota – proton density
RF	rádiofrekvenčný signál
SE	spinové echo – SE spin echo
TE	echo čas
TR	time to repetition
T_1	spin lattice relaxation time
T_2	spin spin relaxation time
I_i	integrál obrazu
$X_{\max}$	maximálne rozmery obrazu v ose x
$Y_{\max}$	maximálne rozmery obrazu v ose y

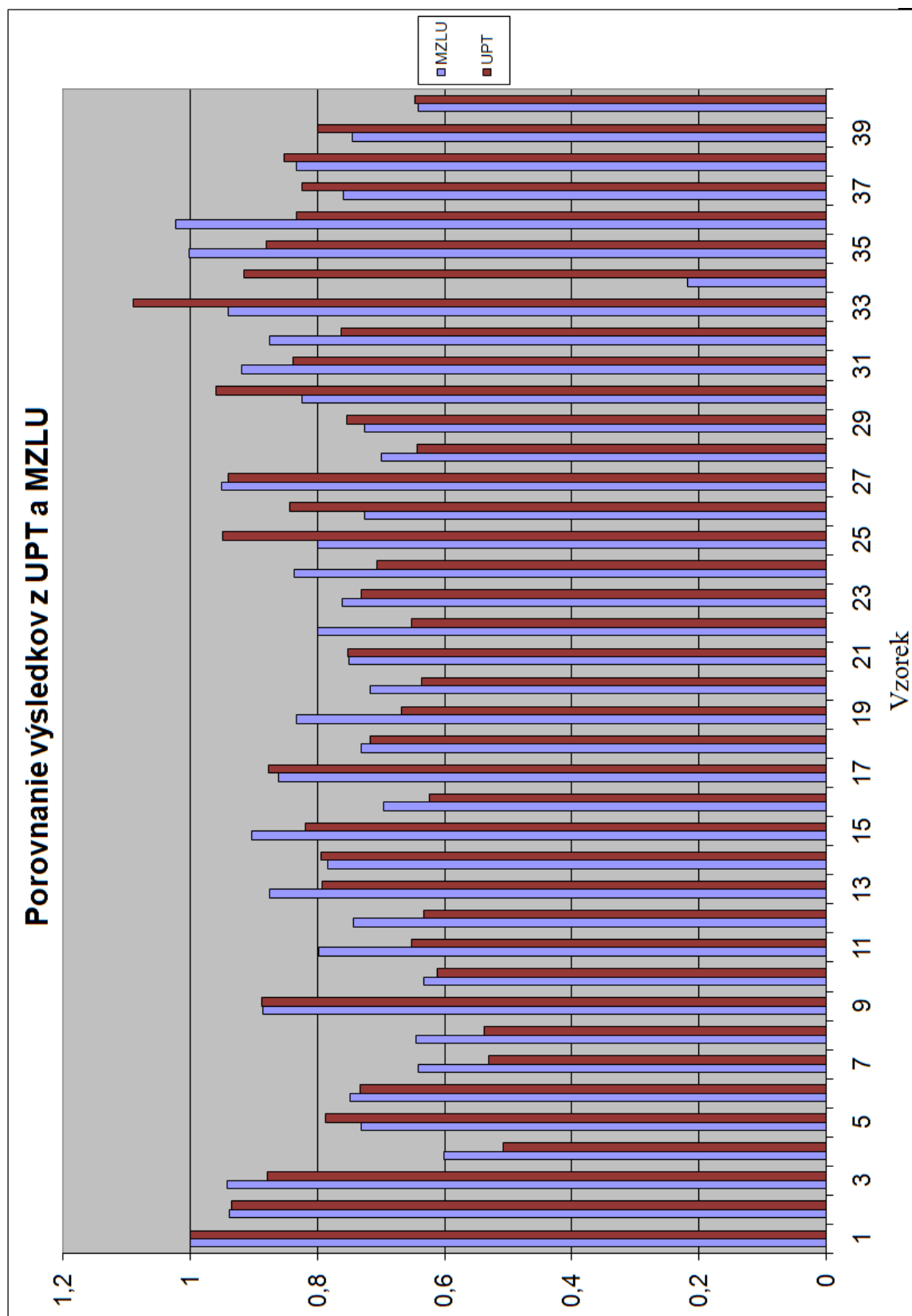
SEZNAM PŘÍLOH

A	Intenzity všetkých vzorkov	44
B	Porovnanie hodnot z UPT a MZLU	45
C	Pomer výsledkov merania MUZL/UPT	46
D	Tabuľka hodnôd intenzity zhlukov	47

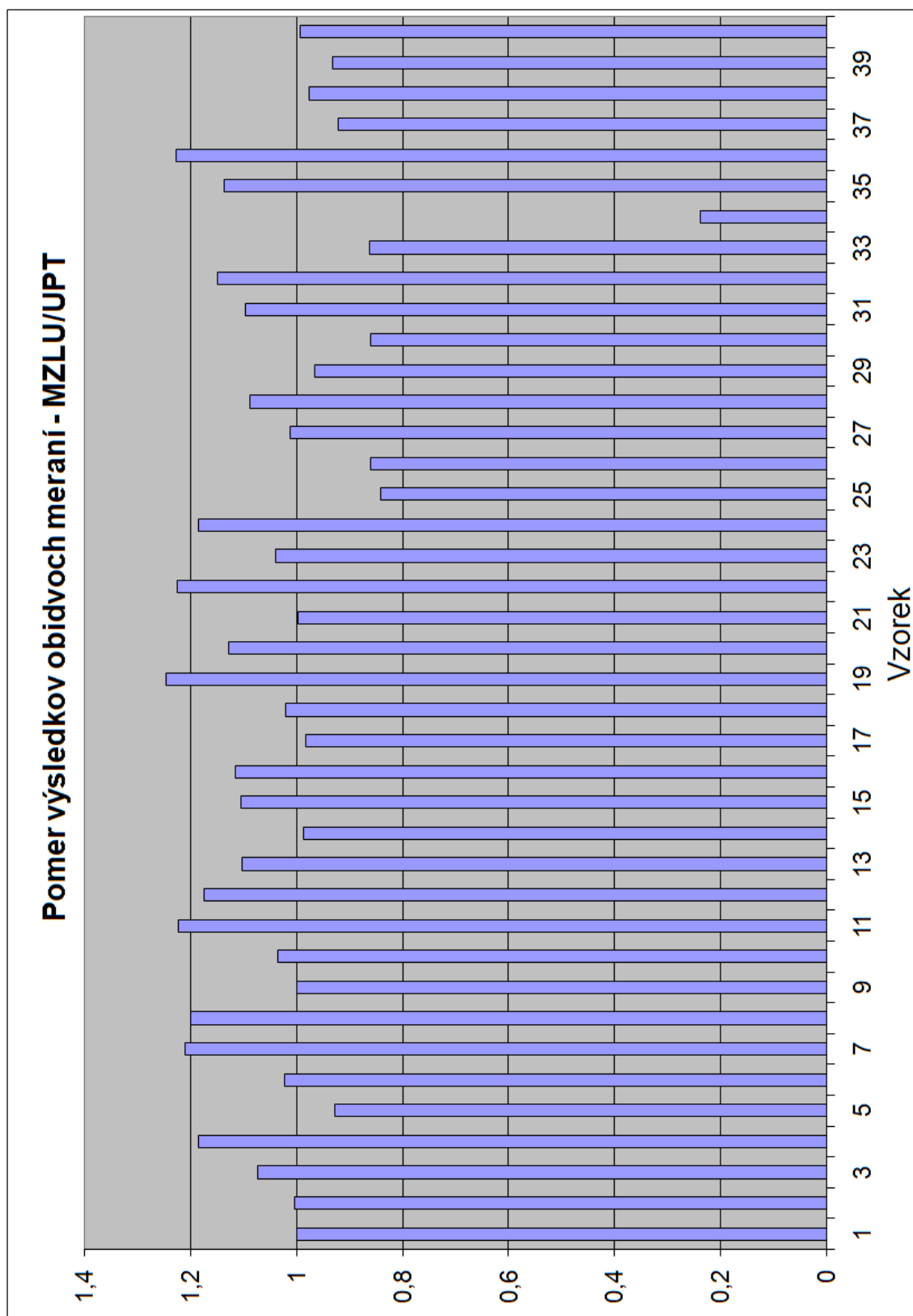
A INTENZITY VŠETKÝCH VZORKOV



B POROVNANIE HODNOT Z UPT A MZLU



C POMER VÝSLEDKOV MERANIA MUZL/UPT



D TABUĽKA HODNÔD INTENZITY ZHLUKOV

Rez→	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Celkový obsah
Zhluk ↓										
1	0	1458	19596	33872	51714	43148	3858	0	0	153646
2	0	0	13306	46485	57703	26235	0	0	0	143729
3	0	1958	21323	23870	53747	34052	0	0	0	134950
4	0	0	12293	19102	27716	18829	0	0	0	77939
5	0	0	40091	44966	32767	3229	0	0	0	121053
6	707	16700	25088	44062	23500	3165	0	0	0	112514
7	0	1546	20946	23243	33034	2697	0	0	0	81467
8	0	0	28450	23956	28318	1846	0	0	0	82571
9	3066	36697	44625	49729	5162	0	0	0	0	136213
10	0	15833	40981	35534	1538	0	0	0	0	93886
11	0	0	10269	28195	54176	7613	0	0	0	100253
12	0	0	1345	9669	43860	40229	2101	0	0	97204
13	0	12172	35042	47498	27026	0	0	0	0	121739
14	0	10335	54858	51955	4911	0	0	0	0	122059
15	0	8640	35749	22508	37674	21127	0	0	0	125699
16	0	5539	36136	31583	22636	0	0	0	0	95893
17	6682	59243	55564	19806	0	0	0	0	0	134614
18	4089	58008	36715	15388	0	0	0	0	0	110111
19	0	9112	47355	36175	10069	0	0	0	0	102711
20	0	24269	41845	19781	11846	0	0	0	0	97741
21	22781	48979	52902	13748	0	0	0	0	0	115628
22	33153	61857	36307	1994	0	0	0	0	0	100158
23	0	7261	48617	29805	26649	0	0	0	0	112332
24	0	8619	28047	38632	33150	0	0	0	0	108448
25	0	0	23287	55441	51557	15450	0	0	0	145734
26	0	0	14400	38888	53522	22819	0	0	0	129629
27	0	0	7325	40500	61599	35054	0	0	0	144478
28	0	0	11862	34565	44649	7593	0	0	0	98669
29	0	0	0	17914	47880	41543	8364	0	0	115702
30	0	0	0	28171	58780	45204	15285	0	0	147440
31	0	12014	33083	45424	35093	3204	0	0	0	128818
32	0	16336	34134	45080	21658	0	0	0	0	117208
33	0	0	1669	26682	61458	48049	29605	0	0	167463
34	0	0	0	12589	54402	42969	30629	0	0	140588
35	6939	58229	35983	41004	0	0	0	0	0	135216
36	7096	50264	32140	45476	0	0	0	0	0	127881
37	0	11540	39916	48116	26954	0	0	0	0	126526
38	0	5888	45915	49862	21802	7460	0	0	0	130927
39	0	0	14881	27087	56042	24879	0	0	0	122889
40	0	0	0	16336	50390	30953	1530	0	0	99209
Rez→	1	2	3	4	5	6	7	8	9	