

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

MATEMATICKÉ METODY PRO ZPRACOVÁNÍ OBRAZU V BIOLOGICKÝCH POZOROVÁNÍCH

MATHEMATICAL METHODS FOR IMAGE PROCESSING IN BIOLOGICAL OBSERVATIONS

ZKRÁCENÁ VERZE DIZERTAČNÍ PRÁCE
SHORT VERSION OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. TOMÁŠ ZIKMUND

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. RADIM CHMELÍK, Ph.D.

Abstrakt

Dizertační práce se zabývá zpracováním obrazu v digitální holografické mikroskopii a rentgenové počítačové tomografii. Těžiště práce spočívá v návrhu postupů pro zpracování dat v daných oblastech biologických experimentů.

Transmisní světelná holografická mikroskopie je použita zejména pro kvantitativní fázové zobrazení transparentních mikroskopických objektů, jako jsou živé buňky. Fázové obrazy jsou ovlivněny fázovými aberacemi, které ztěžují studium buněk. V této práci je prezentován nový algoritmus pro dynamické zpracování fázových obrazů živých buněk v časosběrné sérii. Algoritmus kompenzuje deformace fázového obrazu použitím metody vážených nejmenších čtverců. Navíc ve fázovém obrazu identifikuje a segmentuje individuální buňku. Tyto vlastnosti algoritmu jsou rozhodující pro kvantitativní fázové zobrazení buněk v reálném čase a řízení průběhu experimentu. Účinnost navrženého algoritmu je demonstrována na obrazech krysích nádorových buněk prostřednictvím mimoosového holografického mikroskopu.

Rentgenová počítačová tomografie s vysokým rozlišením je stále více používanou technikou pro studium mikroarchitektury kostí malých hlodavců. V této části práce je provedena analýza kortikální a trabekulární distální poloviny krysích stehenních kostí. Vyvinuli jsme metodu pro mapování pozice a rozměrů kortikálních povrchů od centrální podélné osy s jednostupňovým úhlovým rozlišením. Touto metodou jsou zkoumány tvarové odlišnosti krysích stehenních kostí mezi experimentálními skupinami. Orientace kostí je v tomografických řezech vyrovnána před mapováním pomocí navrženého postupu standardizace tomografických dat. Aktivita remodelačního procesu dlouhé kosti je také studována na systému kortikálních kanálků.

Summary

The dissertation deals with the image processing in digital holographic microscopy and X-ray computed tomography. The focus of the work lies in the proposal of data processing techniques to meet the needs of the biological experiments.

Transmitted light holographic microscopy is particularly used for quantitative phase imaging of transparent microscopic objects such as living cells. The phase images are affected by the phase aberrations that make the analysis particularly difficult. Here, we present a novel algorithm for dynamical processing of living cells phase images in a time-lapse sequence. The algorithm compensates for the deformation of a phase image using weighted least squares surface fitting. Moreover, it identifies and segments the individual cells in the phase image. This property of the algorithm is important for real-time cell quantitative phase imaging and instantaneous control of the course of the experiment. The efficiency of the propounded algorithm is demonstrated on images of rat fibrosarcoma cells using an off-axis holographic microscope.

High resolution X-ray computed tomography is increasingly used technique for the study of the small rodent bones micro-structure. In this part of the work, the trabecular and cortical bone morphology is assessed in the distal half of rat femur. We developed new method for mapping the cortical position and dimensions from a central longitudinal axis with one degree angular resolution. This method was used to examine differences between experimental groups. The bone position in tomographic slices is aligned before the mapping using the propound standardization procedure. The activity of remodelling process of the long bone is studied on the system of cortical canals.

Klíčová slova

digitální holografická mikroskopie, holografie v reálném čase, kvantitativní fázové zobrazení, sledování buňky, rentgenová počítačová mikrotomografie, 3D analýza mikrostruktury, tomografické zpracování obrazu, růst kosti, krysí stehenní kost

Keywords

digital holographic microscopy, real-time holography, quantitative phase imaging, cell tracking, X-ray micro computed tomography, 3D microstructure analysis, tomographic image processing, bone growth, rat femur

ZIKMUND, T. *Matematické metody pro zpracování obrazu v biologických pozorováních*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 23 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Obsah

1	Úvod	2
2	Digitální holografická mikroskopie	3
2.1	Fázové zobrazení	3
2.1.1	Experimentální stanovení vývoje deformace fáze	3
2.2	Cíle práce	4
2.3	Princip dynamického zpracování fázových obrazů	5
2.3.1	Stručný popis algoritmu	5
2.3.2	Zpracování prvního fázového obrazu	5
2.3.3	Dynamické zpracování dalších fázových obrazů	6
2.3.4	Experimentální výsledky	9
3	Rentgenová počítačová mikrotomografie	11
3.1	Vývoj kosti	11
3.2	Analýza CT dat končetin laboratorních krys	12
3.2.1	Označení vzorků	12
3.2.2	Standardní hodnocení kostní mikrostruktury	13
3.3	Cíle práce	14
3.4	Nový přístup ke studiu kosti na μ CT datech	14
3.4.1	Standardizace CT dat distální poloviny stehenní kosti	14
3.4.2	Automatické odstranění obrazu trabekulární kosti	14
3.4.3	Mapování kortexu: měření vzdáleností povrchu stěny kosti od centrální podélné osy	16
3.5	Výsledky	17
4	Závěr	20

1. Úvod

Dizertační práce je rozdělena do dvou částí kopírujících činnosti, kterými jsem se zabýval v průběhu doktorského studia. Cíle práce jsou uvedeny a v každé dílčí části zvlášť a jejich splnění diskutováno závěru. První část popisuje výsledky dosažené v digitální holografické mikroskopii a druhá část v rentgenové počítačové tomografii. V obou případech byla témata výzkumné práce zaměřena na zpracování obrazu biologických vzorků. V případě digitální holografické mikroskopie se konkrétně jedná o zpracování fázového obrazu buněk. Část s počítačovou tomografií je zaměřena na zpracování tomografických dat mikrostruktury kostí laboratorních krys.

V Centru inovativní mikroskopie na Fakultě strojního inženýrství Vysokého učení technického v Brně byl vyvinut nový unikátní koherencí řízený digitální holografický mikroskop. Nedílnou součástí tohoto systému je počítačové zpracování hologramu a následné zpracování obrazu navázané fáze. Tento mikroskop nachází uplatnění v biologii ke sledování živých buněk neinvazivním způsobem. Studium buněk je založeno na extrakci morfologických a fázových parametrů buňky. Avšak deformace fázového obrazu nedovoluje buňky analyzovat. Tato deformace může být důsledkem optických aberací komponent mikroskopu, ale i samotného předmětu pozorování. V dlouhodobých experimentech navíc dochází ke změně deformace vlivem nestability mikroskopu a podmínek měření. Ve většině vědeckých publikací, které se zabývají kompenzací deformace, je korekce fázového obrazu řešena matematicky v rámci zpracování obrazu po dokončení experimentu. Tyto metody nesplňují požadavky, které jsou kladeny na buněčné pozorování realizované na digitálním holografickém mikroskopu. Tyto skutečnosti byly impulzem pro vytvoření nového algoritmu, který by řešil kompenzaci deformace fázových obrazů automaticky a zároveň online v režimu časosběrného snímání. Do algoritmu byla také zakomponována automatická segmentace buněk, aby bylo možné řídit probíhající experiment na základě změn parametrů charakterizujících nitrobuněčnou aktivitu buňky.

Další část dizertační práce se zabývá zpracováním dat rentgenové počítačové tomografie, s kterou jsem se seznámil v rámci studijní stáže na Queen Mary University of London. Počítačová tomografie s vysokým rozlišením je stále více používanou technikou pro 3D studium mikroarchitektury kostí. Naším hlavním úkolem bylo provést rentgenovou počítačovou tomografii a následnou analýzu krysích kostí. Výsledky analýzy byly součástí projektu zkoumajícího vliv různých léčiv na růst kostí. Zkoumání těchto vlivů bylo zaměřeno na mikrostrukturu krysí stehenní kosti v oblasti distální metafýzy, která podstupuje nejdrastičtější remodelační změny. Základním principem remodelačního mechanismu dlouhé kosti je formování nebo resorpce povrchu kosti, kterým se udržuje proporcionální tvar dlouhé kosti. Velký potenciál pro měření remodelačních změn kortikální kosti vlivem podávaných léčiv byl shledán v použití nedestruktivně získaných tomografických dat. Proto byla vyvinuta nová metoda měření vzdáleností vnitřního a vnějšího povrchu kosti, na kterých by následně bylo možné pozorovat morfologické rozdíly napříč experimentálními skupinami. V rámci této metody byla zároveň vyřešena interpretace výsledků a standardizace kostí v tomografických datech. Dále jsme se v této práci zaměřili na hodnocení struktury cévních kanálků kortikální kosti. Pro tento účel byly vybrány segmenty kostí naměřeny s lepším voxelovým rozlišením než původní CT data kostí.

2. Digitální holografická mikroskopie

Transmisní digitální holografická mikroskopie je široce používaný nástroj pro studium a analýzu chování živých buněk v reálném čase prostřednictvím kvantitativního fázového zobrazení [1]. Předností této techniky je pozorování buněk bez toxického efektu na jejich život.

2.1. Fázové zobrazení

Kvantitativní fázové obrazy mohou být interpretovány jako distribuce suché hmoty buněk (proteiny, cukry, tuky). Pozorování a měření dynamiky suché hmoty umožňují přístup k rozhodujícím informacím pro výzkum nitrobuněčných procesů.

Fázové obrazy jsou reprezentací fázových rozdílů mezi dvěma svazky (tj. předmětovým a referenčním svazkem). Teoreticky by měly být fázové rozdíly rovny nule s výjimkou fázových rozdílů představujících pozorované objekty (buňky). V reálném systému je fázový obraz poškozen deformací fáze vznikající nepřesností optického systému, aberací optických elementů nebo průchodem světla skrze dvě separované optické cesty, které se mohou odlišovat například vlivem odchylky teploty či proudění vzduchu. Deformace fáze se v obraze projeví jako zakřivené pozadí, které znemožňuje korektní manipulaci s obrazem či sledování buňky. Kromě toho se deformace fáze mění během dlouhodobého experimentu, což je důsledkem dlouhodobé nestability dvousvazkového interferenčního mikroskopu. Za příčiny fluktuace pozadí lze také považovat kontaminaci média buněčnými procesy v komoře předmětové větve, změnu podmínek prostředí (teplota, vlhkost), rozladění justážních prvků mikroskopu vlivem otřesů. Pro kvantifikaci fázových rozdílů souvisejících s buňkou je nutné deformace pozadí eliminovat.

Studium chování buňky je založeno na extrakci dynamických dat buňky z časosběrné série fázových obrazů. Data mohou obsahovat těžiště buňky, buněčnou hmotu, fázové a morfometrické parametry. Ačkoliv tato data mohou být počítána v rámci zpracování obrazu po ukončení experimentu, je výhodnější počítat je v průběhu snímání. Díky tomu lze průběh experimentu ovlivňovat a řídit; např. úpravou snímací frekvence na základě pohybu nebo změny tvaru buňky, posouváním stolku nebo v případě buněk kultivovaných v průtokových komůrkách je možné měnit médium ve specifickém stádiu jejich života.

2.1.1. Experimentální stanovení vývoje deformace fáze

Cílem tohoto experimentu bylo stanovit změnu deformace fáze během dlouhodobého měření a ověřit možnou závislost na měřitelných veličinách jako jsou teplota a vlhkost vzduchu. Vývoj deformace je sledován na koeficientech polynomu 3. stupně (výraz 2.1), který je proložen hodnotami každého fázového obrazu.

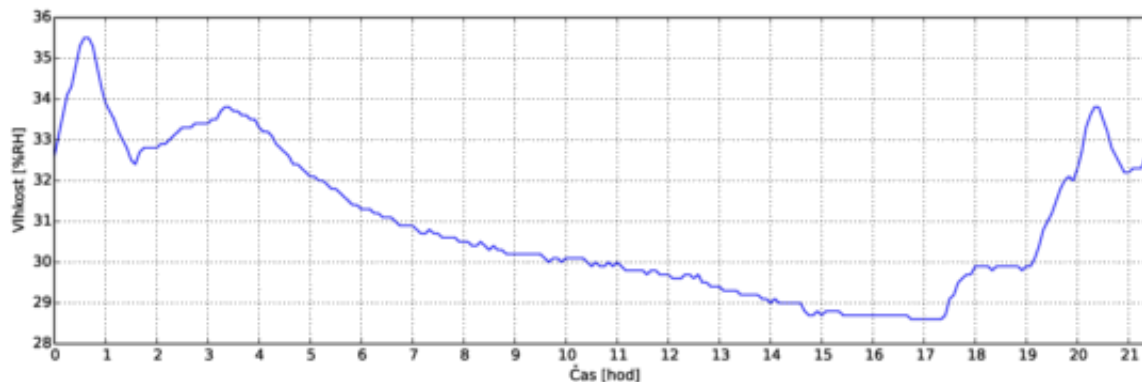
$$P_3(x, y) = a_{00} + a_{10}x + a_{01}y + a_{20}x^2 + a_{11}xy + a_{02}y^2 + a_{30}x^3 + a_{21}x^2y + a_{12}xy^2 + a_{03}y^3 \quad (2.1)$$

Měření bylo realizováno na mikroskopu CCHM [2] v místnosti klimatizované na pokojovou teplotu. Měření probíhalo od 13:55 do 11:25 následujícího dne (21,5 hodin). Snímky byly pořizovány po 5 min a současně v těchto intervalech byla měřena teplota a vlhkost vzduchu v okolí mikroskopu. Do referenční i předmětové větve byly vloženy komůrky s médiem, aby byly simulovány podmínky nejbližší skutečnému měření buněk.

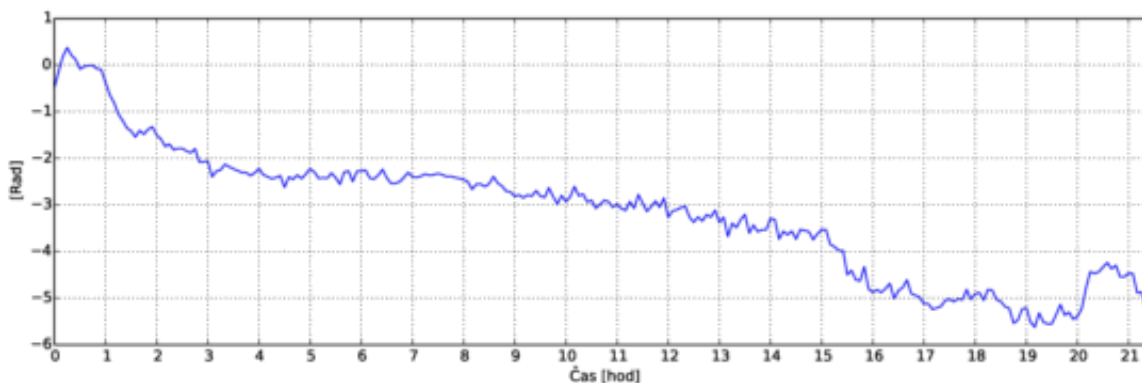
2.2. CÍLE PRÁCE

Hodnoty vybraných koeficientů polynomu byly vyneseny v časové závislosti do grafu. Grafy koeficientů ukazují, že během experimentu dochází k výrazné změně deformace fáze.

Vizuální kontrolou vývoje koeficientu a_{00} (Obr. 2.1) s vývojem vlhkosti (Obr.2.2) byl zjištěn podobný klesající trend, který má shodný nárůst hodnot v intervalech $[0, 1]$ hod a $[20, 21]$ hod. Pro určení závislosti mezi oběma veličinami byl použit Pearsonův koeficient korelace r_p . Koeficient korelace ukázal, že mezi vlhkostí a koeficientem a_{00} existuje pozitivní vztah.



Obrázek 2.1: Graf časové závislosti vlhkosti.



Obrázek 2.2: Graf časové závislosti absolutního členu polynomu a_{00} .

2.2. Cíle práce

Cílem práce je navrhnout nový algoritmus pro zpracování navázaných fázových obrazů. Algoritmus musí kompenzovat deformace ihned po získání obrazu, aby bylo možné s obrazy okamžitě manipulovat. Dále musí pracovat automaticky v režimu časového sekvenčního snímání. Kompenzační procedura musí odstranit kompletní deformace fáze a zároveň vzít v úvahu přítomnost buněk v obraze. Tato procedura by měla být nezávislá na volbě objektů mikroskopu a také by měla řešit možný posun fázových hodnot kvůli navazovacímu algoritmu. Kompenzační nástroj se musí adaptovat pro každý obraz série, kvůli vývoji deformace v obrazech fáze během dlouhodobého snímání. Po aplikaci kompenzační metody by algoritmus měl v obraze automaticky identifikovat a segmentovat buňku zvolenou

uživatelé na začátku experimentu. Tato vlastnost algoritmu umožní uživateli pozorovat změny buňky během experimentu a zasáhnout do experimentu.

2.3. Princip dynamického zpracování fázových obrazů

Navržený algoritmus je složen ze zpracování prvního fázového obrazu a zpracování následných fázových obrazů (dynamické zpracování). Zpracování prvního fázového obrazu vyžaduje asistenci lidského operátora a následující obrazy jsou zpracovávány automaticky. První fázový obraz tak může být označen jako referenční obraz, na kterém proběhne nastavení parametrů pro automatické zpracování. Tento obraz nemusí být zařazen do výsledné série fázových obrazů.

2.3.1. Stručný popis algoritmu

Procedura kompenzující deformace je založena na odečítání plochy, která popisuje tvar deformace fázového obrazu. Tato plocha je určena z hodnot nebuněčných oblastí. V prvním obraze jsou tyto oblasti specifikovány manuálně operátorem. V ostatních obrazech série jsou vymaskovány pomocí fuzzy prahování. Aby bylo možné proces prahování aplikovat, je nutné alespoň částečně eliminovat deformaci. Toto je provedeno odečtením plochy popisující deformace fáze v předchozím fázovém obraze. Procedura sledování buněk je založena na identifikaci jádra buňky s pomocí těžiště jádra v předchozím fázovém obraze. Jádra jsou jednoznačně separovatelná od pozadí a mají kompaktnější tvar oproti tělu buňky.

2.3.2. Zpracování prvního fázového obrazu

Prvním úkolem operátora je vyznačit v obraze nebuněčné oblasti pro kompenzaci deformace pozadí obrazu [3]. Hodnotami těchto oblastí je proložen polynom 3. stupně pomocí metody nejmenších čtverců. Kompenzační plocha P_0 (pole stejných rozměrů jako fázový obraz) je vygenerována z předpisu polynomiální funkce a následně odečtena od fázového obrazu Φ_0 . Kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 0}$ je dále použit k určení parametrů pro automatické zpracování.

Prvním parametrem je konstanta c , s pomocí které je počítán práh $t_{CELL\ n}$ pro každý fázový obraz. Tento práh je použit pro maskování nebuněčné oblasti (pozadí) obrazu. Pro tyto účely je použita fuzzy maska, kterou je klasifikováno, zda bod fázového obrazu patří do nebuněčné oblasti. Koncept fuzzy masky $F(x, y; t)$ je rozšíření binární masky.

$$F(x, y; t) = \begin{cases} 1 & \text{if } |\Delta\varphi(x, y)| < 0,9t \\ 0 & \text{if } |\Delta\varphi(x, y)| > 1,5t \\ -\frac{|\Delta\varphi(x, y)| - 1,5t}{0,6t} & \text{jinak,} \end{cases} \quad (2.2)$$

kde $\Delta\varphi(x, y) = \varphi(x, y) - \mu$ a $\varphi(x, y)$ je fázová hodnota v bodě (x, y) a μ je průměrná hodnota fáze z hodnot nebuněčné oblasti. Parametry 0,9 a 1,5 byly empiricky určeny na základě experimentů s buňkami.

Hodnota prahu je počítána právě pomocí zmíněné konstanty c výrazem

$$t_{CELL\ 0} = c\sigma, \quad (2.3)$$

2.3. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

kde σ je standardní odchylka fázových hodnot obrazu $\Phi_{comp\ 0}$ z oblastí vybraných operátorem. Konstantou c se hodnota prahu dostane nad úroveň šumu pozadí. Výraz 2.3 je použit také pro výpočet prahu $t_{CELL\ n}$ v následujících fázových obrazech.

Dalším neznámým parametrem je hodnota t_{NUCL} , která je použita k prahování kompenzovaného fázového obrazu. Výsledkem je binární maska určující oblasti jádra buněk v obraze.

Posledním úkolem operátora je výběr pozorované buňky. Výběr je proveden v masce jader $M_{NUCL\ 0}$, která byla vygenerována v předchozím kroku. Oblasti reprezentující jádra jsou před výběrem segmentovány využitím In-place algoritmu [4] a z obrazu jsou odstraněny malé oblasti, které nepředstavují jádra buněk. Z vybrané oblasti je vypočítáno těžiště cg_0 .

2.3.3. Dynamické zpracování dalších fázových obrazů

Zpracování všech následujících fázových obrazů pokračuje v automatickém režimu podle algoritmu, který je zobrazen na schématu (Obr. 2.3) pro n -tý navázaný fázový obraz ze série. Tento algoritmus je v této kapitole popsán pro zpracování druhého fázového obrazu Φ_1 . Pro zpracování tohoto obrazu jsou použity hodnoty $M_{BG\ 0}$, c , t_{NUCL} , cg_0 vygenerované v prvním fázovém obraze. Algoritmus zpracování druhého fázového obrazu koresponduje se schématem (Obr. 2.3) pro index $n = 1$.

I. Maskování nebuněčných oblastí

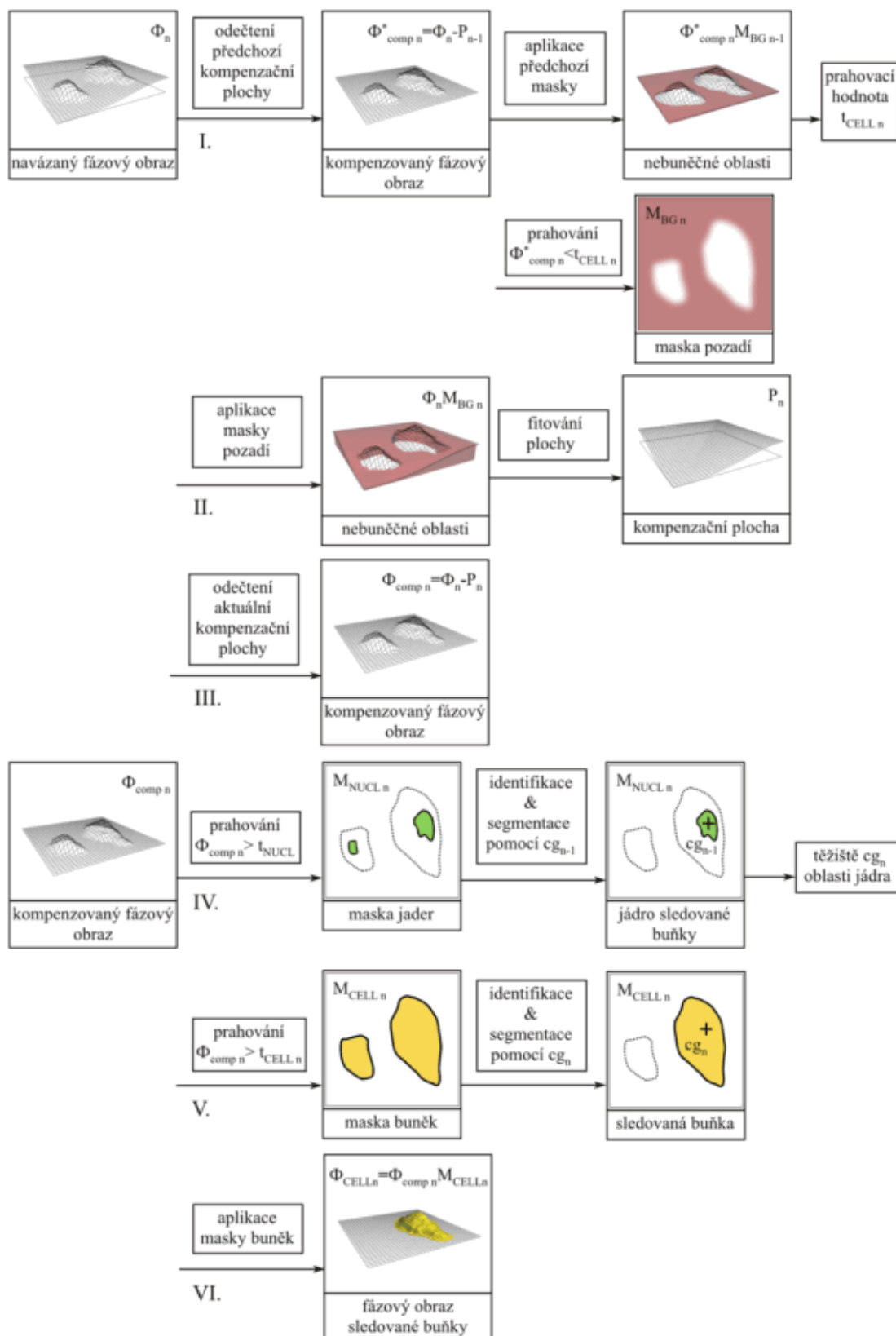
Nejdříve je pro eliminaci deformace pozadí použita kompenzační plocha vygenerovaná pro kompenzaci deformace předchozího obrazu. Kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 1}^*$ je vytvořen odečtením plochy P_0 od původního obrazu navázané fáze Φ_1 . Potom je počítána nová hodnota prahu $t_{CELL\ 1}$ ze všech bodů $\Phi_{comp\ 1}^*$, ve kterých je maska $M_{BG\ 0}$ rovna 1. Hodnota $t_{CELL\ 1}$ je použita pro fuzzy prahování kompenzovaného fázového obrazu $\Phi_{comp\ 1}^*$ podle výrazu (2.2). Výstupem prahování je nová maska $M_{BG\ 1}$, která specifikuje nebuněčné oblasti v obraze Φ_1 .

Důvodem k zavedení fuzzy masky bylo snížení citlivosti výsledku na výpočet prahu. Jak je zobrazeno na obrázku 2.4, krajní části buňky mohou být velmi tenké. Vzhledem k tomu, že pozadí není perfektně rovinné, a to ani po eliminaci deformace snižování prahu mezi buňkou a pozadím, vede prahování k nesprávné klasifikaci velké části pozadí jako buněčné oblasti. S pomocí fuzzy masky je možné použít bezpečnou hodnotu prahu a nastavit jen nižší fuzzy práh. Je-li část pozadí identifikována jako buňka, tímto způsobem dostanou odpovídající body nízkou hodnotu přiřazení k buňce, takže toto špatné chování nebude mít silný efekt na výpočet kompenzační plochy.

II. Výpočet kompenzační plochy

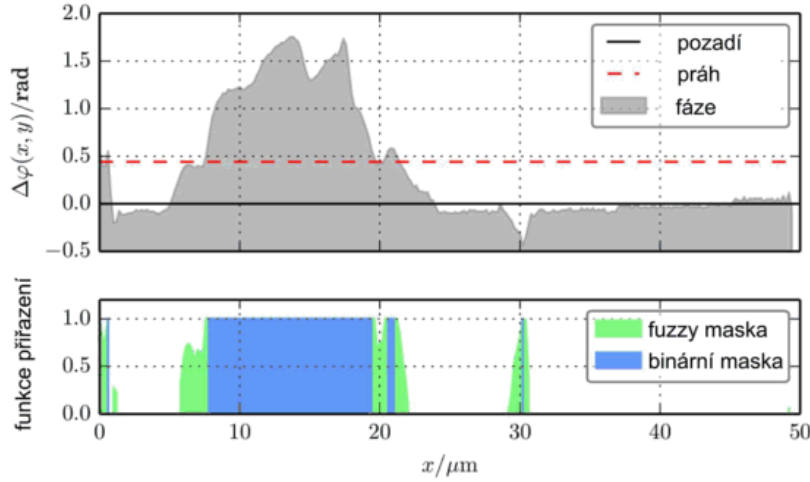
V navázaném fázovém obraze Φ_1 maska $M_{BG\ 1}$ určuje body, kterými je proložena polynomiální funkce dvou proměnných. Funkce je spočítána prostřednictvím metody vážených nejmenších čtverců, kde hodnoty fuzzy masky jsou použity jako váhové faktory. Hodnoty polynomiální funkce jsou zaznamenány do pole hodnot (kompenzační plocha P_1), které má stejné rozměry jako původní fázový obraz.

2. DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE



Obrázek 2.3: Schéma dynamického zpracování n -tého navázaného fázového obrazu. Index $n - 1$ značí obraz vytvořený pro zpracování předchozího fázového obrazu série. $\Phi_{comp\ n}$ značí fázový obraz kompenzovaný plochou popisující deformace předchozího obrazu.

2.3. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ



Obrázek 2.4: Profil buňky s odlišným maskováním znázorněn na experimentálních datech.

III. Kompenzace deformace

Kompenzační plocha P_1 je odečtena od fázového obrazu Φ_1 . Výsledkem rozdílu je kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 1}$. Za účelem zlepšení výsledku kompenzace je možné implementovat kroky I., II., III. na každý zpracovávaný obraz opakovaně. To znamená, že kompenzační procedura je aplikována znovu na kompenzovaný fázový obraz.

IV. Identifikace jader a výpočet

Maska jader $M_{NUCL\ 1}$ je vytvořena z fázového obrazu $\Phi_{comp\ 1}$ prahováním pomocí hodnoty t_{NUCL} . Oblasti jader jsou v masce následně segmentovány a nebuněčné oblasti jsou z masky odstraněny. V takto upravené masce je oblast jádra pozorované buňky identifikována pozicí bodu cg_0 . Z identifikované oblasti je následně spočítáno nové těžiště cg_1 . Počítáním těžiště v každém obrazu je pozice bodu jako identifikačního prvku, aktualizována vzhledem k pohybu nebo změnám tvaru buňky.

V. Generování masky pro pozorovanou buňku

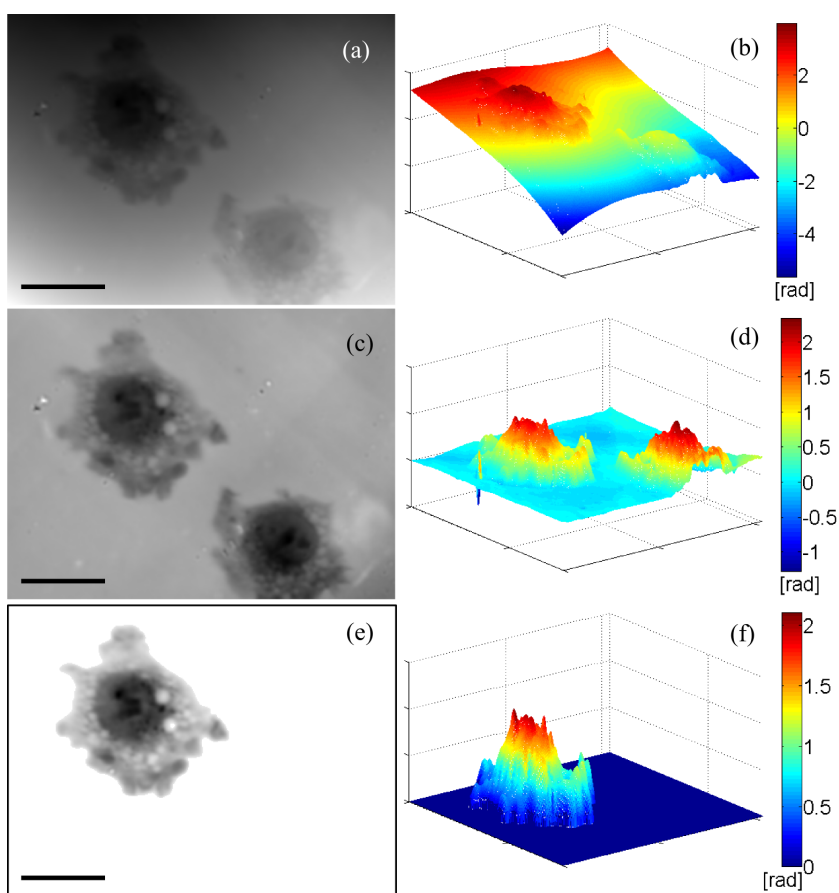
Maska buněk $M_{CELL\ 1}$ je vytvořena jako binární maska podle rovnice s použitím prahu $t_{CELL\ 1}$ na kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 1}$. Na masce je provedena segmentace stejným způsobem, jak bylo popsáno na konci kapitoly 2.3.2. Oblast obsahující bod cg_1 je oblast pozorované buňky a všechny hodnoty v masce jsou vynulovány s výjimkou vybrané oblasti.

VI. Extrakce fáze pozorované buňky

Maska buněk je aplikována na kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 1}$. Výsledkem je fázový obraz $\Phi_{CELL\ 1}$, jehož hodnoty jsou nulové, kromě hodnot pozorované buňky. Jakákoliv další matematická procedura aplikovaná na tento obraz je vztažena pouze na pozorovanou buňku. Lze tak velice snadno získat parametry charakterizující buňku.

2.3.4. Experimentální výsledky

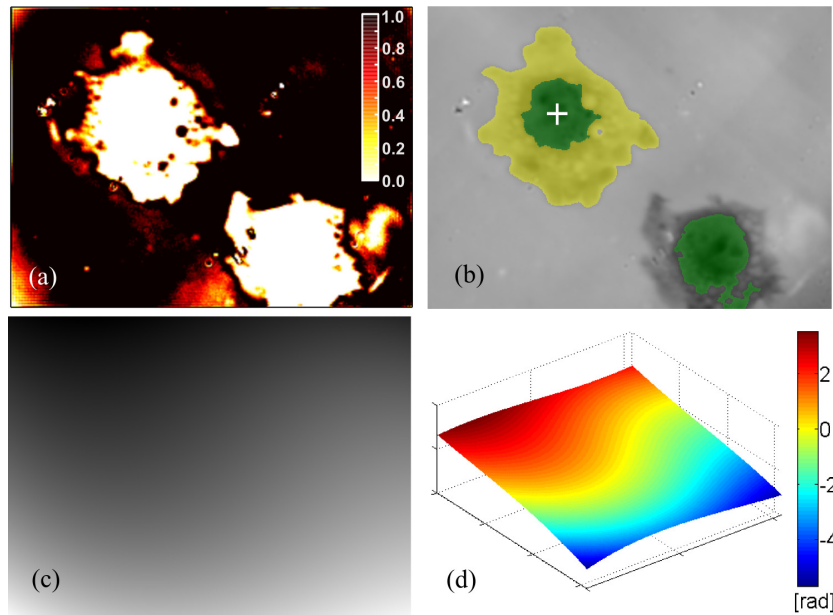
Pro experiment byly použity krysí rakovinné buňky, plným označením LW13K2 (nádorové embryonální fibroblasty). Měření bylo realizováno na CCHM mikroskopu [2]. Hologramy buněk byly nepřetržitě snímány po dobu 18 hodin s frekvencí 3 hologramy za minutu. Z hologramu byla provedena rekonstrukce fázového obrazu [5]. Na tento obraz byl aplikován navazovací algoritmus. Navázané fázové obrazy byly zpracovány podle navrženého dynamického algoritmu.



Obrázek 2.5: Zpracování fázového obrazu z 15. hodiny experimentu: (a) navázaný fázový obraz Φ_{2700} , (c) kompenzovaný fázový obraz $\Phi_{comp\ 2700}$ a (e) fázový obraz sledované buňky $\Phi_{CELL\ 2700}$. Měřítka v těchto obrazech představuje vzdálenost $20\ \mu\text{m}$. 3D vizualizace jednotlivých obrazů jsou zobrazeny v (b), (d), (f). Barevná škála ukazuje fázi v radiánech.

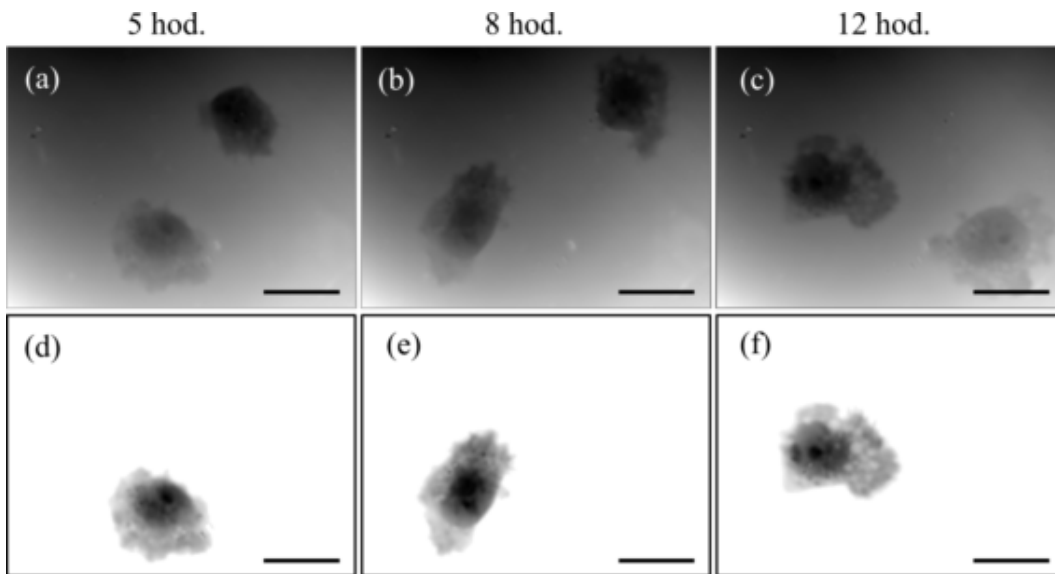
Průběh zpracování fázového obrazu dle navrženého dynamického algoritmu je ukázán na obraze z 15. hodiny experimentu (Obr. 2.5). Fuzzy maska pozadí (Obr. 2.6(a)) určující nebuněčné oblasti v původním fázovém obrazu je využita k fitování polynomiální funkce 3. řádu (Obr. 2.6(c)). Okrajům buňky a některým částem obrazu je přiřazena nižší příslušnost k nebuněčné oblasti a mají tak menší vliv na výpočet polynomiální funkce. Na obrázku 2.6(b) je zobrazena maska jader spolu a kompenzovaným obrazem pomocí transparentní hladiny. Bílý křížek v obraze značí pozici těžiště identifikujícího sledovanou buňku, která byla vybrána na začátku experimentu. Oblast identifikované buňky (žlutá oblast) je následně použita pro segmentaci fázových hodnot buňky. Výsledek segmentace buňky je zobrazen na obr. 2.5(e).

2.3. PRINCIP DYNAMICKÉHO ZPRACOVÁNÍ FÁZOVÝCH OBRAZŮ

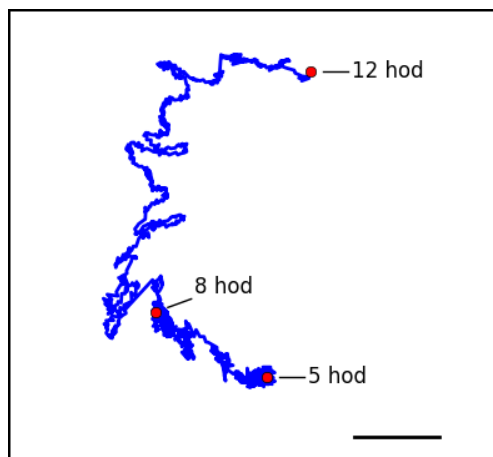


Obrázek 2.6: Vygenerovaná data použitá pro zpracování fázového obrazu Φ_{2700} (Obr. 2.5). (a) Fuzzy maska pozadí $M_{BG\ 2700}$, (b) kompenzovaný fázový obraz zobrazen spolu s maskou jader (zelené oblasti), maska buněk (žlutá oblast) a těžiště (bílý kříž), (c) kompenzační plocha P_{2700} a (d) 3D vizualizace kompenzační plochy.

Tři fázové obrazy byly vybrány z celé časosběrné série pro demonstraci funkčnosti automatického režimu algoritmu. V těchto obrazech se pozorovaná buňka (spodní buňka na obr. 2.7a) pohybuje a mění tvar.



Obrázek 2.7: (a-c) Navázané fázové obrazy v různých časech experimentu, (d-f) fázové obrazy sledované buňky, odpovídající obrazům (a-c), zpracované navrženým dynamickým algoritmem. Měřítko v obrazech představuje vzdálenost $20\ \mu\text{m}$.



Obrázek 2.8: Trajektorie těžiště plochy buňky získané záznamem jeho polohy ve 20-ti sekundových intervalech během 7 hodin. Zobrazené měřítko představuje $10\ \mu\text{m}$.

Na takto zpracovaných obrazech lze přímo hodnotit morfologii sledované buňky. Pohyb buňky v 7 hodinovém intervalu experimentu je zaznamenán na obrázku 2.8 pomocí trajektorie geometrického těžiště.

3. Rentgenová počítačová mikrotomografie

Počítačová tomografie s vysokým rozlišením je stále více používanou technikou pro 3D studium mikroarchitektury kostí a pro kvantifikaci objemového podílu kosti.

3.1. Vývoj kosti

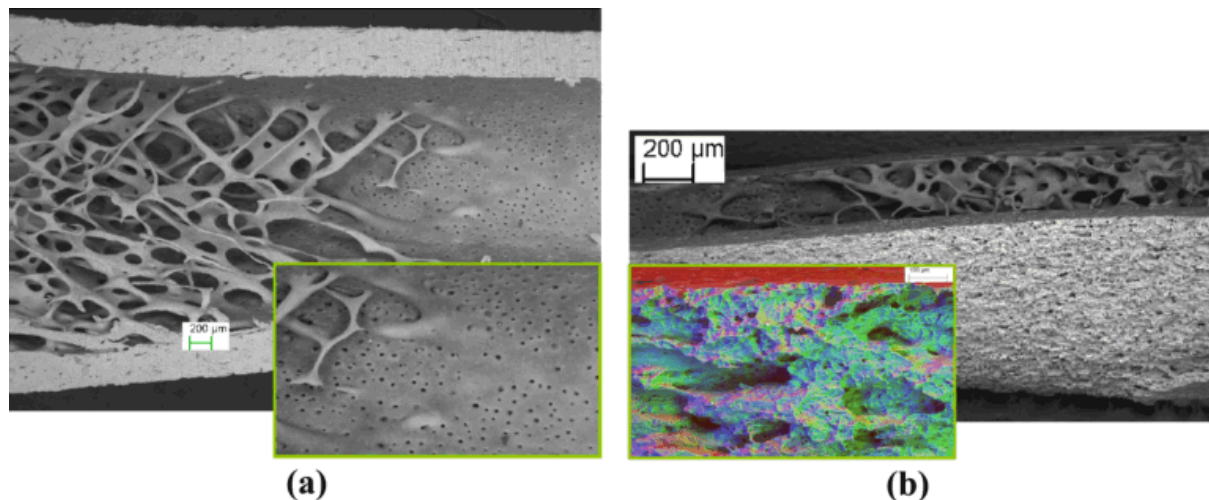
Nezbytnou součástí růstu kosti je remodelace. Tento proces představuje postupný mechanismus přestavby kosti, který udržuje konstantní tvar, proporce a poměr kosti během růstu. Jak kost roste do délky přirůstáním na jejích koncích, starší části kosti jsou přemísťovány do jiných relativních pozic. Přemístění těchto oblastí s sebou přináší odpovídající změny v její velikosti, tvaru a také posunu v ose v každé oblasti. Proces remodelace zahrnuje formování kosti na určitém povrchu doplněné o resorpční odstranění kosti na opačném povrchu. Metafýza dlouhé kosti má trychtýřovitý tvar, nebo-li “V” konfiguraci [7]. Kost v této oblasti musí být postupně redukována v průměru do té doby, než se následně přemístí do úzkého tvaru diafýzy. Růst v této oblasti je zařízen depozicí endostálního povrchu a resorpcí periostálního povrchu (Obr. 3.1).

K vyšetření remodelačního mechanismu jsou používány fluorescenční látky, které jsou začleněny přímo do oblasti, jež prochází kalcifikací (zvápenatěním). Hladiny začlenění jsou vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 3.2). Měřením vzdálenosti mezi hladinami je získána informace o růstu kosti během určitého časového intervalu.

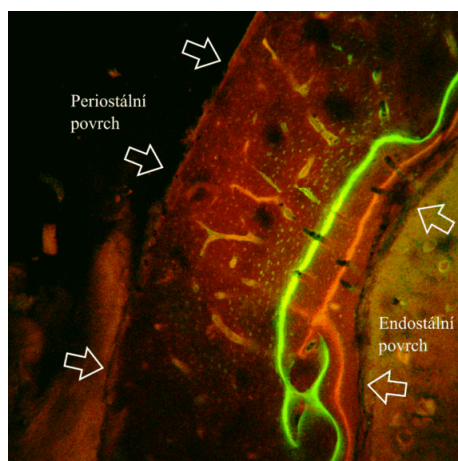
3.2. Analýza CT dat končetin laboratorních kryš

3.2.1. Označení vzorků

Předmětem pozorování byly samčí krysy Lewis vážící 209 ± 15 gramů. V první skupině (kontrolní skupina) byly krysy ponechány neléčené. Ostatním bylo od prvního dne perorálně aplikováno léčivo Vehicle nebo léčivo Prednisolon v dávkách 1, 3, 10, 30 nebo 100 mg/kg. Dále v textu bude experimentální skupina kostí léčených látkou Prednisolon značena jako Pred. V případě vyjádření koncentrace látky Prednisolon je využito symbolu "@".



Obrázek 3.1: Endostální (a) a periostální (b) povrch krysí stehenní kosti v oblasti metafýzy. Mediální polovina vzorku zbavená měkké tkáně vyluhováním je zobrazena pomocí elektronového mikroskopu ZEISS EVO MA10 (autor obrázků A. Boyde).



Obrázek 3.2: Příklad dvojitého značení v části příčného řezu metafýzy stehenní kosti. Hladina tetracyklinu (zeleně), kalceinu (červeně). Snímek je pořízen konfokálním mikroskopem Leica SP2.

3.2.2. Standardní hodnocení kostní mikrostruktury

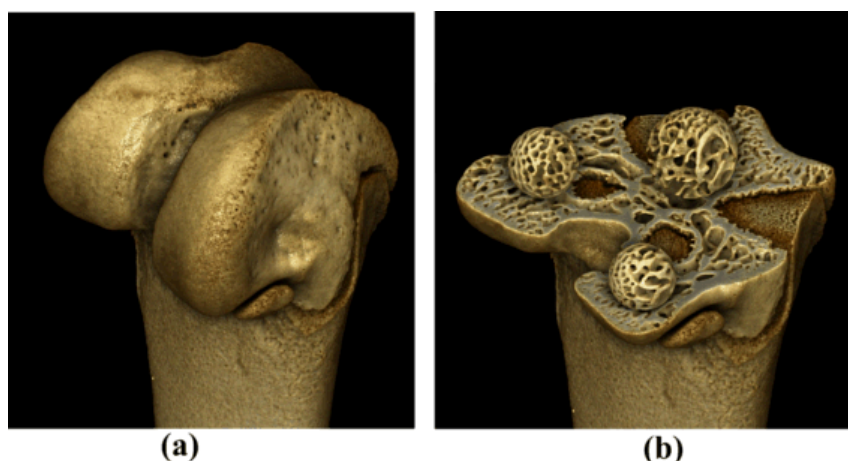
Pro vyhodnocení mikrostruktury stehenních kostí byla analyzována trabekulární a kortikální morfologie kosti použitím počítačové tomografie podle směrnic hodnocení kostní mikrostruktury u hlodavců [8].

Analýza kortikální kosti

Pro srovnání morfologie kortikální kosti experimentálních skupin byly vybrány tři tomografické řezy ve 20 %, 30 % a 40 % totální délky stehenní kosti od distálního konce. Hodnoty délek stehenních kostí byly získány z radiografických obrazů měřených pomocí přístroje Faxitron. Vybrané tomografické řezy byly analyzovány pomocí nástroje BoneJ (rozšíření softwaru ImageJ). Pro každou kost byla v těchto řezech vypočítána plocha průřezu kosti, průměrná hustota kosti, těžiště průřezu kosti, obvod vnějšího povrchu a maximální tloušťka, průměrná tloušťka a standardní odchylka tloušťky. Tyto parametry byly silně ovlivněny náklonem kosti v tomografických datech a míra resorpce periostálního povrchu ovlivnila hodnoty obvodu vnějšího povrchu.

Analýza trabekulární kosti

Základní morfometrickými ukazateli jsou hodnoty objemu kosti a totálního objemu analyzované oblasti. Poměr těchto dvou veličin se nazývá objemový podíl kosti. Tloušťka trabekul je počítána jako průměrná hodnota všech průměrů koulí vepsaných do trámčků kosti. Posledním získaným parametrem je konektivita, která byla vyvinuta pro charakterizaci redundance spojení trabekul.



Obrázek 3.3: Definice sférických oblastí v epifýze distální stehenní kosti: (a) 3D model distálního konce kosti, (b) vizualizace sférických oblastí pomocí virtuálního řezu epifýzy.

Trabekulární kost v epifýze distální stehenní kosti rozhodně podstupuje významné mechanické zatížení během pohybové funkce končetiny, ale tyto oblasti jsou v publikacích obecně přehlíženy. V tomto případě nelze aplikovat manuální kreslení polygonální oblasti kvůli komplikovanému tvaru epifýzy, která je navíc propletena částmi růstové ploténky. Proto byl navržen postup extrahování sférických oblastí (Obr. 3.3), které byly následně analyzovány.

3.3. Cíle práce

Základním principem růstu dlouhé kosti jsou remodelační mechanismy periostálního a endostálního povrchu kosti. Zda je povrch kosti formován nebo resorbován lze jednoduše rozlišit pomocí standardních zobrazovacích metod. Pro kvantifikaci přírůstku nové kosti se využívá fluorescenčních metod, které jsou založeny na měření vzdálenosti dvou fluorescenčních hladin, u nichž je znám časový odstup. Na základě rozdílů experimentálních skupin lze následně rozhodnout o vlivu podávaných látek na růst kosti. Nevýhodou tohoto přístupu je měření pouze ve vyřezaných tenkých sekcích, u kterých jsou velké nároky na mechanickou přípravu jejich povrchu. Fluorescenční hladiny lze také detekovat pouze v oblastech, kde se kost formuje nebo je v klidu. V oblastech kosti podléhajících resorpčnímu procesu jsou hladiny přirozeně odstraněny (Obr. 3.2).

K účelu posouzení rozdílného vývoje kostí vlivem aplikovaných léčiv lze s výhodou využít μ CT data kostí, ve kterých je zaznamenána kompletní nepoškozená kost. V tomografických řezech není sice možné kvantifikovat absolutní hodnoty přírůstků jako u fluorescenční metody, ale vhodným zpracováním dat lze zkoumat morfologické rozdíly mezi kostmi. Cílem práce je navrhnout algoritmus pro kvantifikaci vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kosti, který by umožnil studium rozdílů tvaru krysích stehenních kostí napříč experimentálními skupinami.

3.4. Nový přístup ke studiu kosti na μ CT datech

3.4.1. Standardizace CT dat distální poloviny stehenní kosti

Biologické vzorky je obecně náročné upnout do tomografické stanice tak, aby byla zajištěna jeho definovaná poloha a vzorek byl zároveň držen v lázni konzervační látky. Přestože byla používána standardní procedura upínání kostí končetin do držáku tomografické stanice, v tomografických datech byly nalezeny velké variace polohy kostí. Standardizace tomografických dat je tedy nezbytná ke srovnání výsledků následných analýz.

Princip standardizace je založen na transformaci 3D matice tomografických dat. Transformace je složena z tří elementárních rotačních matic. Dva úhly rotace jsou vypočítány z pozice osy kosti vůči ose z souřadného systému. Osa kosti je definovaná přímým tělem diafýzy stehenní kosti. A třetí úhel je specifikován pozicí distálních kondylů vůči hraně obrazu.

Realizace transformací:

- i. transformace obsahující dvě rotace $\mathbf{R}_z(\alpha)$ a $\mathbf{R}_y(\beta)$,
- ii. měření posledního úhlu γ v projekci všech řezů do roviny xy ,
- iii. transformace obsahující tři rotace $\mathbf{R}_z(\alpha)$, $\mathbf{R}_y(\beta)$ a $\mathbf{R}_z(\gamma)$,

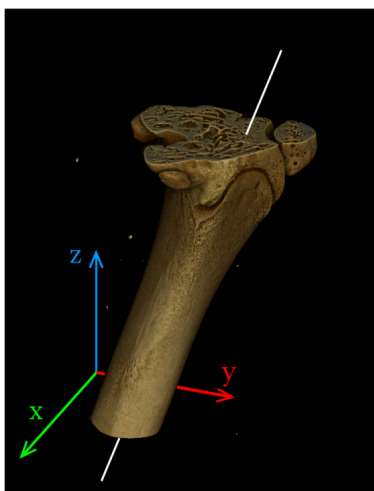
kde $\mathbf{R}_z(\gamma)$ a $\mathbf{R}_z(\alpha)$ rotace kolem osy z o úhel γ , resp. úhel α . $\mathbf{R}_y(\beta)$ rotace kolem osy y o úhel β . Pro převzorkování bodů v rámci transformace je použita trilineární interpolace.

3.4.2. Automatické odstranění obrazu trabekulární kosti

Ke studiu povrchu kortikální kosti je nutné se zbavit trámčitých elementů (trabekul) uvnitř kosti. K tomuto účelu byl ve spolupráci s Ing. L. Kvasnicou vyvinut automatický algoritmus popsáný následujícími 3 kroky:

I. Prahování

Každý 2D obraz je prahován k segmentaci kostního materiálu od pozadí. Prahováním vznikne binární obraz (obr. 3.5(a)). Pro všechny obrazy je použita konstantní prahovací hodnota.



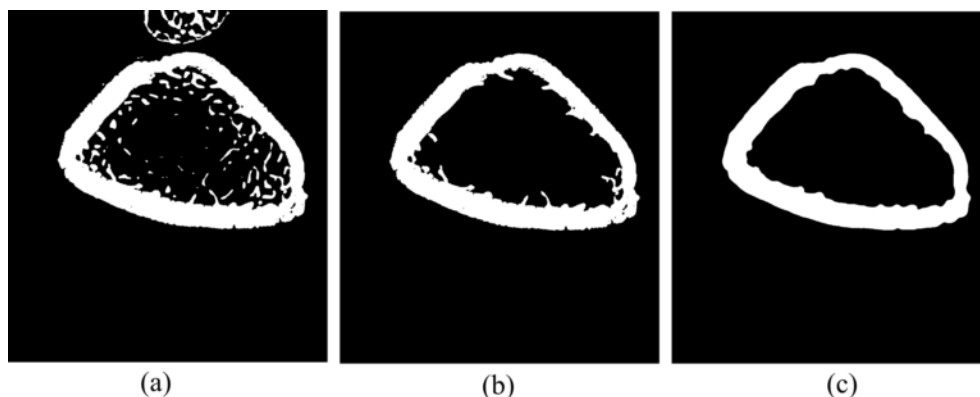
Obrázek 3.4: Objemový render CT dat stehenní krysí kosti vizualizovaný pomocí softwaru Drishti. Stehenní kost je virtuálně uříznuta v XY rovině originálního CT data setu. Diafýza kosti je dostatečně přímá, aby byla popsána přímkou (znázorněno bílou čarou).

II. Segmentace kortikální kosti

V binárním obraze jsou segmentovány spojitě oblasti. Pro každou oblast je vypočítán plošný obsah a je vybrána největší oblast. Kortikální kost má vždy největší plochu v příčných řezech diafýzy kosti. Tímto způsobem jsou z obrazu odstraněny všechny kostní části, které nejsou v příslušném řezu spojeny s kortikální kostí, například česka, úlomky kosti a některé trabekuly (obr. 3.5(b)).

III. Filtrování

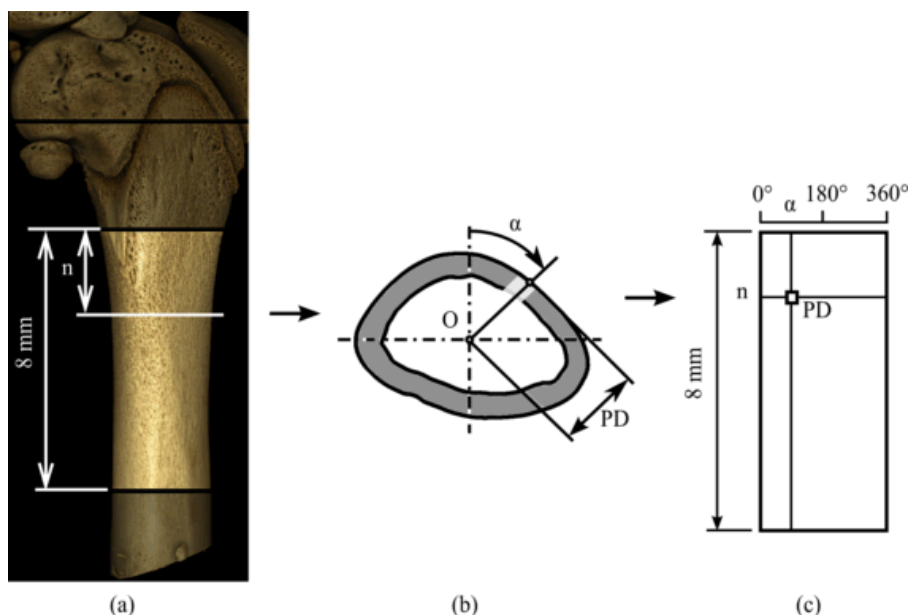
Na binární data je následně použit 3D medián filtr (obr. 3.5(c)), tzn. každý voxel ve filtrovaných datech obsahuje hodnotu mediánu binárních dat kulového okolí (jádra) o určitém průměru. Pro průměr jádra bylo použito experimentálně ověřených 40 voxelů.



Obrázek 3.5: Postupné zpracování pro odstranění trabekulární kosti ukazuje: (a) binární obraz řezu distální stehenní kosti vygenerované pomocí prahování, (b) segmentovanou kortikální kost jako největší spojitou oblast, (c) výsledek 3D mediánového filtrování.

3.4.3. Mapování kortexu: měření vzdáleností povrchu stěny kosti od centrální podélné osy

V návaznosti na předchozí zpracování byla vyvinuta metoda, která měří vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kosti od centrální osy. Hodnoty vzdáleností jsou uloženy do 2D obrázků nazvaných mapy.



Obrázek 3.6: Metoda mapování kortikální kosti. (a) Pozice n -tého příčného řezu, který je zpracován automatickou procedurou odstranění traberkulární kosti (b). Na tomto řezu je ilustrováno měření vzdálenosti (PD) od osy O k vnějšímu povrchu pod úhlem α , jehož hodnota je zaznamenána do mapy (c).

Po určení podélné osy kosti a standardizaci CT dat jsou v každém příčném řezu n analyzovaného objemu měřeny vzdálenosti vnitřního a vnějšího povrchu kortikální kosti od podélné osy s jednostupňovým úhlovým rozlišením (Obr. 3.6). Výsledky jsou ukládány do mapy, ve které je na vertikální ose značeno číslo řezu a na horizontální ose je úhel měření (0° až 360°).

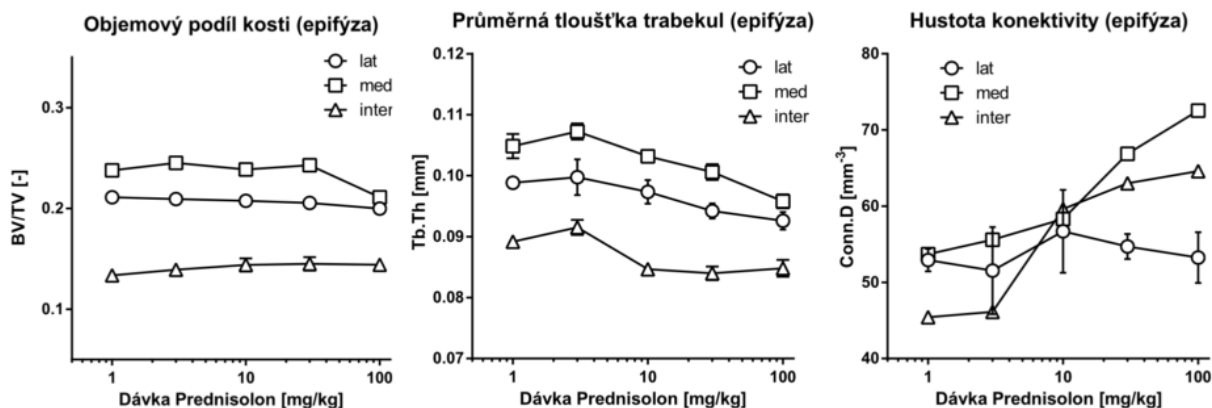
Z těchto dat mohou být vygenerovány tři základní typy map, a to jmenovitě mapa vzdáleností vnějšího povrchu, mapa vzdáleností vnitřního povrchu a mapa rozdílů těchto dvou, tj. tloušťka kůry kosti. Pro každý typ mapy byla navržena speciální barevná paleta. Rozdíly kostí jednotlivých zvířat nebo rozdíly kostí mezi experimentálními skupinami mohou být zkoumány použitím jednoduchých aritmetických operací těchto map. Hodnoty vnitřních nebo vnějších map jsou průměrovány mezi kostmi v rámci skupiny k vygenerování průměrné kosti reprezentující danou experimentální skupinu. Odečtením těchto map jsou získány odlišnosti mezi jednotlivými skupinami.

3.5. Výsledky

Morfologické analýzy v uživatelsky definovaných oblastech

Výsledky analýzy kortikální kosti a trabekulární kosti ukazují významný vliv obou podávaných léčiv na velikost a stavbu kosti. Léčivo Prednisolon (v dávce 100 mg/kg) má u všech počítaných morfologických parametrů silnější vliv než léčivo Vehicle. Z provedených analýz lze konstatovat, že všechna léčiva způsobují menší délku stehenní kosti, menší průřez kortikální kosti i její tloušťku oproti kostem z kontrolní skupiny. Tento jev je zřejmě kompenzován větší hustotou vnitřní struktury kosti, kterou lze pozorovat na objemovém podílu kosti a hustotě konektivity trabekulární kosti.

Poprvé byla provedena analýza epifýzy trabekulární kosti na oblastech specifikovaných kulovou sférou v mediálním, laterálním kondylu a mezi nimi (inter). Výsledky morfologických parametrů nepotvrdily významné změny v závislosti na dávce léčiva Prednisolon (Obr. 3.7) s výjimkou hustoty konektivity trabekulární struktury. Hustota konektivity má zvyšující se charakter v závislosti na větší dávce léčiva.



Obrázek 3.7: Vybrané morfologické parametry trabekulární kosti v oblasti epifýzy.

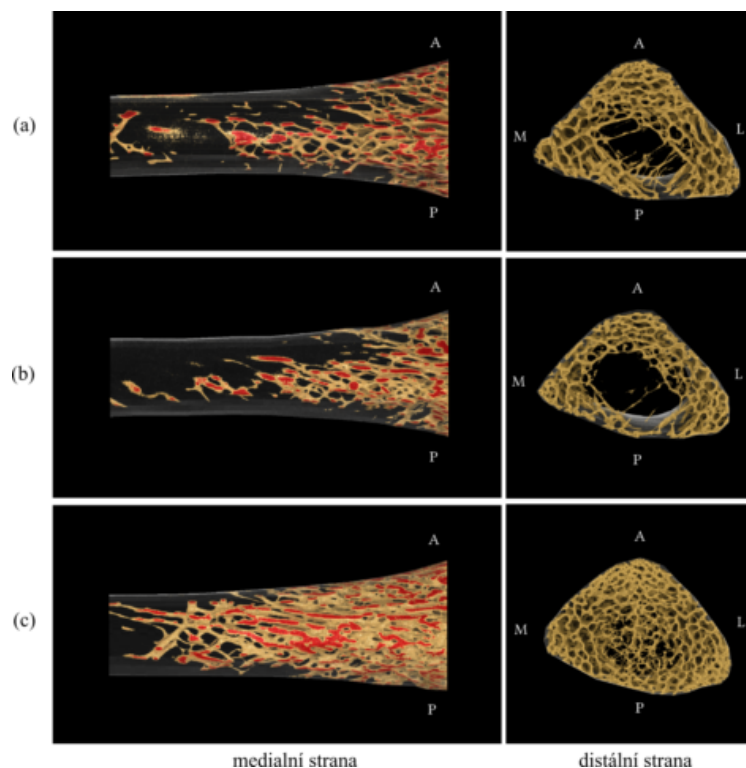
Vylepšené rendrování

Pomocí vygenerované masky kortikální kosti (sekce 3.4.2) byla vizualizována část stehenní kosti. Masky segmentuje vnitřní a vnější část kosti, což umožňuje jednu z nich odstranit nebo ji přiřadit různé transparentní vlastnosti. Odstraněním kortikální kosti s výjimkou transparentního endostálního povrchu je zobrazena trabekulární struktura kosti. Na obrázku 3.8 jsou touto metodou zpracovány analyzované segmenty kostí z každé experimentální skupiny.

Mapování povrchu

Mapy jsou formální reprezentací vzdálenosti povrchu kortikální kosti od osy přímé části distální kosti. Odečtením vnitřní mapy od vnější je vyprodukována mapa tloušťky kortikální kosti celého segmentu. Na obrázku 3.9 jsou zřejmé rozdíly tloušťek kosti z kontrolní skupiny a skupiny Pred@100. Zprůměrované mapy v rámci experimentálních skupin jsou odečteny pro zobrazení odlišností mezi skupinami (Obr. 3.10). Zaznamenané rozdíly ukazují podél celého analyzovaného segmentu kulatější tvar kosti ze skupiny Pred@100.

3.5. VÝSLEDKY



Obrázek 3.8: Vizualizace vnitřního prostoru analyzovaného segmentu stehenní kosti z mediálního a distálního pohledu (pomocí softwaru Drishti). Červenou barvou jsou zobrazeny oblasti připojení trabekul k endostálnímu povrchu kosti. K zobrazení rozdílů byly vybrány reprezentanti skupiny (a) kontrolní (b) Vehicle (c) Pred@100.

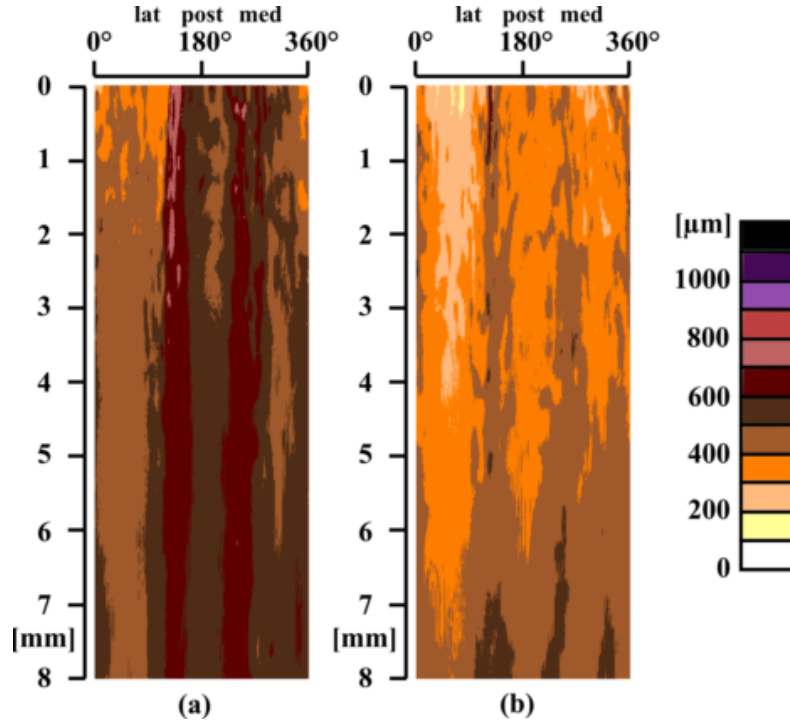
Výrazně červené tmavé pruhy v oblasti laterální a mediální jsou přesně těmi místy, které představují vrcholy trojúhelníkového profilu kontrolované skupiny.

Systémy kortikálních kanálků

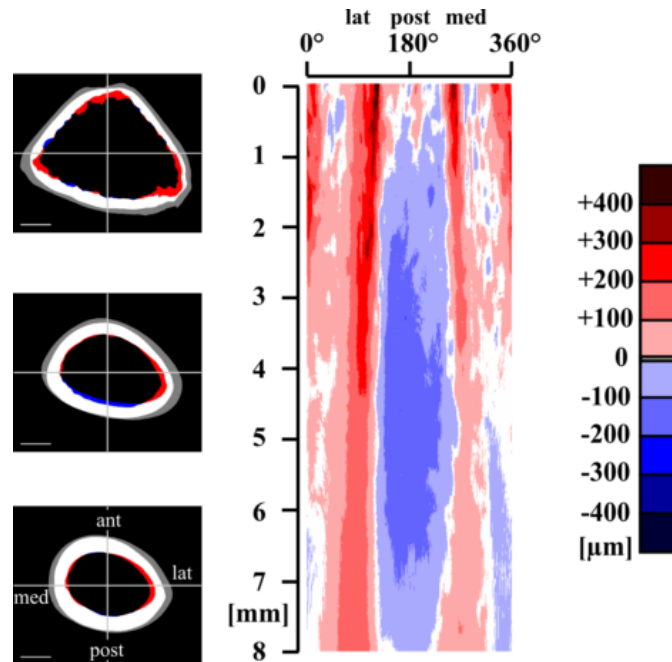
Na segment ze střední oblasti diafýzy byla aplikována analýza pórů v rámci softwaru VG Studio. Barevná vizualizace detekovaných objektů odhalila dva velké komplexy kanálků. Tyto systémy (vyznačené červeně) se u kontrolované kosti nachází v anteriorní a posteriorní oblasti (Obr. 3.12), naopak u kosti léčené Pred@100 v laterální a mediální oblasti. S ohledem na dosažené voxelové rozlišení lze ostatní kanálky zobrazené modře nebo zeleně označit za nespojené a odseparované od těchto dvou velkých sítí.

Aby bylo možné zhodnotit, zda jsou kanálky po obvodu kosti rozmístěny rovnoměrně, byla analýza pórů aplikována na oblasti ve čtyřech hlavních směrech kosti. V případě kontrolní kosti se větší koncentrace kanálků nachází na posteriorní a anteriorní oblasti 3.11(c), naopak u kosti léčené Prednisolon na laterální a mediální oblasti.

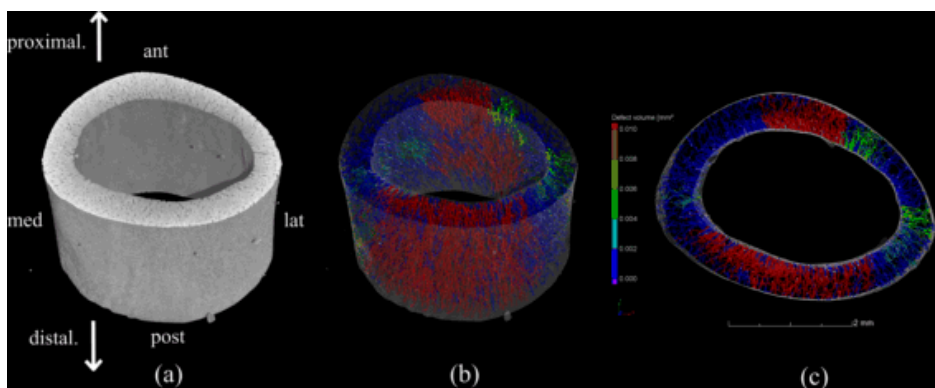
3. RENTGENOVÁ POČÍTAČOVÁ MIKROTOMOGRAFIE



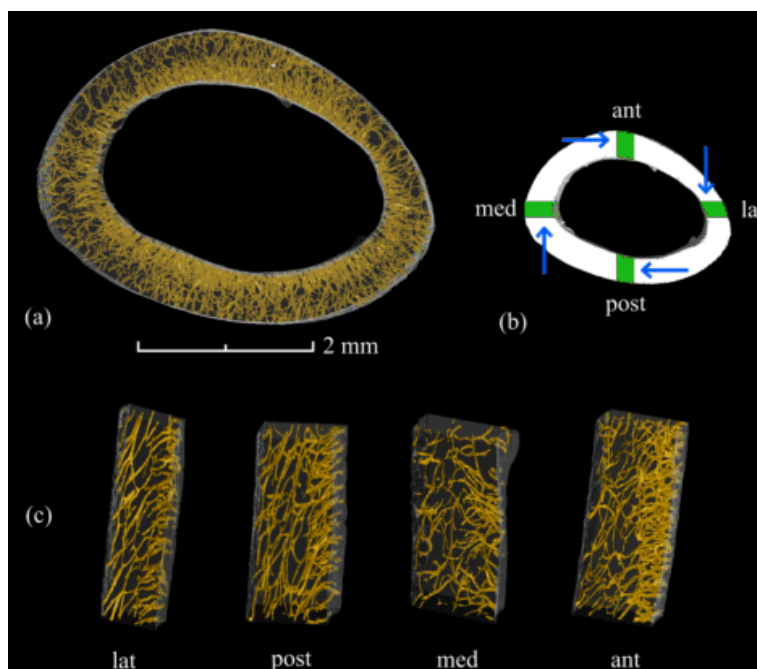
Obrázek 3.9: Mapa tloušťky kortikální kosti získané odečtením mapy vzdáleností endostálního a periostálního povrchu kosti: (a) z kontrolní skupiny, (b) ze skupiny Pred@100.



Obrázek 3.10: Mapa rozdílů vzdáleností endostálního povrchu mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou látkou Pred@100. Vlevo jsou uvedeny interpretace rozdílů na příčných řezech od shora 0 mm, 4 mm a 8 mm délky analyzovaného segmentu.



Obrázek 3.11: Vizualizace systémů kortikálních kanálků distální části levé stehenní kosti z kontrolní skupiny. (a) Objemové rendrování oblasti zkoumané analýzou pórů, (b) zobrazení detekovaných systémů barevně kódovaných podle objemové velikosti, (c) pohled z proximálního směru.



Obrázek 3.12: Hustota kortikálních kanálků v hlavních směrech levé stehenní kosti z kontrolní skupiny. (a) Proximální pohled na analyzovanou část stehenní kosti o výšce přibližně 1,4 mm, (b) vyznačení jednotlivých segmentů (zelené oblasti) a směrů (modré šipky), ze kterých byly segmenty zobrazeny, (c) axonometrický pohled na segmenty.

4. Závěr

V dizertační práci jsem se zabýval zpracováním, vizualizací a interpretací dat biologických experimentů v digitální holografické mikroskopii a rentgenové počítačové tomografii. Práce je rozdělena do dvou částí dle jednotlivých zobrazovacích technik. V obou oblastech je věnována jedna kapitola biologickému pozadí problematiky k osvětlení podstaty požadavků na zpracování dat. Na základě těchto požadavků byly pro každou oblast stanoveny cíle práce.

První část je zaměřena na zpracování kvantitativního fázového obrazu z digitálního holografického mikroskopu, který je vhodným nástrojem pro neinvazivní pozorování živých buněk. Návrh nového algoritmu pro zpracování fázových obrazů buněk splňuje všechny stanovené cíle. Algoritmus pracuje automaticky v režimu časosběrného snímání, je nezávislý na volbě objektivů mikroskopu, řeší možný fázový posun mezi sousedními snímky a automaticky segmentuje zvolenou buňku. Popsaný algoritmus je již implementován v softwaru koherencí řízeného holografického mikroskopu nové generace. Princip zpracování fázových obrazů byl publikován v časopise *Journal of Microscopy*. Metoda zpracování fázových obrazů může být použita pro různé typy buněk, nejen rakovinných. Budoucí vývoj algoritmu by se měl ubírat směrem k přesnějšímu určení hranice buňky, která hraje roli při optickém vážení buňky.

Druhá část práce je zaměřena na zpracování tomografických dat krysích kostí, konkrétně na analýzu mikrostruktury distální poloviny stehenních kosti za účelem výzkumu vlivu různých léčiv na růst kosti. Pro studium změn vnitřního a vnějšího povrchu kosti, na základě nichž lze pozorovat vliv podávaných léčiv, byla vyvinuta nová metoda měření vzdálenosti obou povrchů kortikální kosti k centrální ose kosti. Ta umožňuje kvantifikovat morfologické rozdíly mezi experimentálními skupinami. Získáním těchto výstupů byly splněny stanovené cíle práce. Měření vzdáleností předchází příprava tomografických dat kosti. Pro tento účel byl navržen postup standardizace orientace kosti v tomografických řezech a algoritmus pro automatické odstranění trabekulární kosti. Tento postup standardizace CT dat navrhujeme provádět pro všechna měření, ve kterých je cílem srovnat výsledky analýz mezi jednotlivými vzorky. Nad rámec stanovených cílů práce byla také studována síť kortikálních kanálků na vybraných segmentech. Dílčí výsledky práce byly publikovány na vědeckých konferencích Winter Meeting of the Anatomical Society (2011), Winter Meeting of the Anatomical Society (2012) a 17th International Inflammation Research Association Conference (2012). Další vývoj metody měření vzdálenosti kortikálních povrchů vidím v doplnění informací o hustotu kortikálních kanálků a jejich připojení k endostálnímu povrchu. Tyto výsledky by mohly přispět k objasnění remodelačních procesů dlouhé kosti.

Literatura

- [1] DUNN, G. A. and ZICHA, D.: Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1993, vol. 47, p. 91-106.
- [2] KOLMAN, P. and CHMELÍK, R.: Coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Express.*, 2010, vol. 18, p. 21990-22003. ISSN 1094-4087. DOI: 10.1364/OE.18.021990.
- [3] ZIKMUND, T., et al.: Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of SPIE 7746, 2010, p. 77460-1. ISBN 978-80-554-0238-3.
- [4] ASANO, T. and TANAKA, H.: In-place Algorithm for Connected Components Labeling. *Journal of Pattern Recognition Research*, 2010, vol. 5, p. 10-22.

LITERATURA

- [5] JANEČKOVÁ, H.: *Interferenční mikroskope biologických vzorků*. [Dizertační práce], Brno: VUT, FSI, 2006, 66 s.
- [6] BENEŠ, M. a MAROŠ, B.: Vyjádření přetvárného odporu a měrné přetvárné práce materiálu 13240 v závislosti na teplotě a logaritmickém stupni přetvoření. *Hutnické listy*, 1985, roč. 3, s. 191-196.
- [7] ENLOW, D. H.: *The human face: an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton*. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row, 1968.
- [8] BOUXSEIN, M. L., et al.: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, vol. 25, p. 1468-1486. ISSN: 0884-0431, DOI: 10.1002/jbmr.141.

Seznam vlastních publikací

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., LOVICAR, L., UHLÍŘOVÁ, H., CHMELÍK, R.: Dynamical Deformation Compensation of Phase in Digital Holographic Microscopy. In *Proceedings of SPIE*, 2010, p. 77460K-1. ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., BOYDE, A.: Correlation between 3D imaging methods in studying bone architecture: SEM, microCT and confocal LM. *Journal of Anatomy*, 2012, vol. 221, p. 86-86. ISSN: 0021-8782.

ZIKMUND, T., PETRILAK, M., NOVOTNÝ, J., LIŠKA, M., KAISER, J.: Kontrola rozměrů koncovky optického vlákna pomocí počítačové tomografie. *Jemná mechanika a optika*, 2013, roč. 2013, č. 6, s. 181-183. ISSN: 0447-6441.

ZIKMUND, T., PETRILAK, M., KAISER, J.: Rentgenová počítačová tomografie pro analýzu odlitků, defektoskopii a kontrolu rozměrů. In *Sborník recenzovaných příspěvků 2013 konference Zkoušení a jakost ve stavebnictví*, 2013, p. 429-438. ISBN: 978-80-214-4777-6.

HOBST, L., BÍLEK, P., ANTON, O., ZIKMUND, T.: Tomografické zjištění anomálního rozdělení drátků v kalibračních vzorcích drátkobetonu. In *20. Betonářské dny*, 2013. ISBN: 978-80-87158-34-0.

SEED, M., ZIKMUND, T., KVASNICA, L., BURNET, M., BOYDE, A., RAY, D.: Development of a robust rat model of glucocorticoid induced osteoporosis as assessed by microCT, SEM, and confocal LM. In *Inflammation research*. 17th International Inflammation Research Association Conference, 2012, 23 p. ISSN 1023-3830.

FRIML, J., PROCHÁZKOVÁ, K., MELNYK, G., ZIKMUND, T., KAISER, J.: Investigation of cheb relief intarsia and the study of the technological process of its production by micro computed tomography. *Journal of cultural heritage*, 2014, vol. 15: p. 1-5. ISSN: 1296-2074.

BÍLEK, P., HOBST, L., ZIKMUND, T.: Využití počítačové tomografie pro kontrolu homogenity drátkobetonu. In *Sborník příspěvků ExFoS - Expert Forensic Science*

XXIII. mezinárodní vědecká konference soudního inženýrství., 2014, p. 37-44. ISBN 978-80-214-4852-0.

BASSETT, J. H., BOYDE, A., ZIKMUND, T., EVANS, H., CROUVHER, P. I., ZHU, X., PARK, J. W., CHENG, S. Y., WILLIAMS, G. R.: Thyroid hormone receptor α mutation causes a severe and thyroxine-resistant skeletal dysplasia in female mice. *Endocrinology*, 2014, p. 1-15, 2014. ISSN: 1945-7170.

BOYDE, A., DAVIS, G. R., MILLS, D., ZIKMUND, T., COX, T. M., ADAMS, V. L., NIKER, A., WILSON, P. J., DILLON, J. P., RANGANATH, L. R., JEFFERY, N., JARVIS, J. C., GALLAGHER, J. A.: On fragmenting, densely mineralised a cellular protrusions into articular cartilage and their possible role in osteoarthritis. *J. Anat.*, 2014, p. 1-11. ISSN 0021-8782.

ZIKMUND, T., BRADA, M., ZATOČILOVÁ, A., PETRILAK, M., KAISER, J.: Kontrola rozměrů redukce objektivu a kamery pomocí rentgenové počítačové tomografie. *Jemná mechanika a optika*, 2014, roč. 59, č. 6-7, s. 186-189. ISSN: 0447-6441.

ZIKMUND, T., KVASNICA, L., TÝČ, M., KŘÍŽOVÁ, A., ČOLLÁKOVÁ, J., CHMELÍK, R.: Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*. 2014, 9 p. DOI: 10.1111/jmi.12165.

Revidovaný rukopis

MINÁRIKOVÁ, A., FICTUM, P., ZIKMUND, T., JEKL. V.: Periodontitis in a pet guinea pig (*Cavia porcellus*). *Journal of Small Animal Practice*. Druhá revize 9. srpna 2014.

SVOBODA, J., HLADILOVÁ, Š., HORÁČEK, I., KAISER, J., KRÁLÍK, M., NOVÁK, J., NOVÁK, M., POKORNÝ, P., SÁZELOVÁ, S., SMOLÍKOVÁ, L., ZIKMUND, T.: Dolní Věstonice IIa. Gravettian microstatigraphy, environment, and the origin of baked clay production in Moravia. *Quaternary International*. Revize 3. června 2014.