

Mikrotomografia komputerowa na Uniwersytecie Jagiellońskim

Bartosz Leszczyński
Zakład fizyki Medycznej, Instytut Fizyki UJ

Metody tomograficzne

Obecnie metody tomograficzne takie jak tomografia komputerowa (CT), tomografia rezonansu magnetycznego (MRI) czy pozytronowa tomografia emisyjna (PET) stanowią podstawę diagnostyki obrazowej wielu chorób i urazów. Metody te zostały opracowane i udoskonalone do optymalnego obrazowania pacjentów, osiągając przestrzenne zdolności rozdzielcze 0.24 mm w przypadku CT [1] czy 0.1 mm w przypadku badań *ex-vivo* 7T MRI [2]. Tomografy kliniczne mają zapewnić maksymalną rozdzielczość w możliwie krótkim czasie, z zachowaniem bezpieczeństwa pacjenta, w szczególności ograniczenia dawki promieniowania w CT i PET. Urządzenia te posiadają swoje odpowiedniki przeznaczone do badań przedklinicznych *ex-vivo* i *in-vivo* na małych zwierzętach laboratoryjnych. Dzięki obrazowaniu znacząco mniejszej objętości (zwykle kilka lub kilkadziesiąt centymetrów sześciennych) i znacznie łagodniejszych restrykcjach co do dawki promieniowania X w CT, czy wartości indukcji pola magnetycznego w MRI, możliwe jest osiągnięcie dużo wyższych zdolności rozdzielczych na poziomie mikrometrów. W ten sposób definiuje się mikrotomografy.

Mikrotomografia komputerowa

Mikrotomografia komputerowa (micro-CT) to niedestrukcyjna metoda obrazowania niewielkich próbek z przestrzenną zdolnością rozdzielczą rzędu mikrometra. Wszystkie rodzaje tomografii komputerowej wymagają do działania źródła promieniowania rentgenowskiego. Istnieją wprawdzie laboratoria mikrotomograficzne działające przy synchrotronach i korzystające ze wszystkich zalet promieniowania synchrotronowego, takich jak monochromatyczność i wysoka intensywność promieniowania. Jednakże ze względu na ograniczoną dostępność synchrotronów znakomita większość klinicznych tomografów komputerowych i mikrotomografów komputerowych wykorzystuje lampy rentgenowskie. Drugim elementem potrzebnym do budowy tomografu komputerowego jest detektor promieniowania X. Wykorzystuje się tu matryce CCD lub CMOS połączone ze scyntylatorem przekształcającym promieniowanie X na widzialne. W tomografach klinicznych używa się nawet 320-warstwowych detektorów [3] – oznacza to, że możliwe jest zarejestrowanie danych do uzyskania 320 obrazów warstw badanego pacjenta. W mikrotomografii stosuje się wysokorozdzielcze kamery pozwalające na uzyskanie obrazu w rozdzielczości nawet 16 megapikseli w pro-

porcji 4:3, co odpowiada 4920×3264 pikseli. Można powiedzieć, że w terminologii tomografii klinicznej detektor taki ma 3264 rzędy.

Pomiędzy lampą rentgenowską a detektorem umieszcza się badaną próbkę (lub pacjenta). W trakcie pomiaru próbka obraca się wokół własnej osi z niewielkim krokiem rzędu ułamka stopnia. Dla każdego kroku rejestrowane jest zdjęcie rentgenowskie, w tomografii komputerowej zwane projekcją. W tomografii klinicznej, ze względu na komfort pacjenta, to układ lampa-detektor obraca się, a pacjent spoczywa na stole pomiędzy nimi. Promieniowanie rentgenowskie jest osłabiane przez materię budującą próbkę. Osłabienie to zależy od liniowego współczynnika osłabienia proporcjonalnego do liczby atomowej Z materiału, a tym samym od gęstości oraz grubości materiału. Detektor rejestruje obraz osłabienia wiązki promieniowania zachodzącego w próbce.

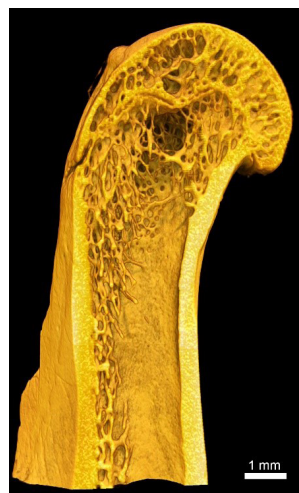
Tomografia komputerowa jest pośrednią metodą obrazowania. Zarejestrowane projekcje wykorzystuje się w procesie rekonstrukcji obrazu, która pozwala na obliczenie na ich podstawie trójwymiarowego rozkładu liniowego współczynnika osłabienia promieniowania rentgenowskiego wewnątrz próbki. Rozkład ten normalizuje się i przedstawia w formie obrazów przekrojów poprzecznych badanej próbki. Zwykle są to obrazy przedstawione w 256 odcieniach szarości. Dla lepszego uwidocznienia analizowanych struktur stosuje się wirtualnie nakładaną skalę barwną dostosowywaną na potrzeby danej próbki.

Zastosowania mikrotomografii komputerowej

Tkanki wysokozmineralizowane

Pierwotnie mikrotomografia komputerowa wykorzystywana była do badania próbek wysokozmineralizowanych, takich jak kości i zęby. W strukturze kości najbardziej interesującym w mikrotomografii obszarem jest obszar kości beleczkowej (rys. 1), która dzięki możliwości remodelingu zmienia swoje własności pod wpływem m. in. procesów chorobowych, np. osteoporozy, stosowania leków czy procesów starzenia [4]. Mikrotomografy komputerowe mogą współpracować z przystawką do pomiarów wytrzymałości próbki na ściskanie i rozciąganie. Wykonanie mikrotomografii komputerowej pod zadaniem obciążenia umożliwia mikroskopową analizę zmian geometrii badanego materiału.

Tkanki zmineralizowane doskonale nadają się do obrazowania mikrotomograficznego ze względu na



Rys. 1. Wizualizacja 3D głowy kości udowej szczura. Widoczna jest struktura kości beleczkowej

wysoką zawartość hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), którego gęstość jest trzykrotnie wyższa niż otaczających kości tkanek miękkich.

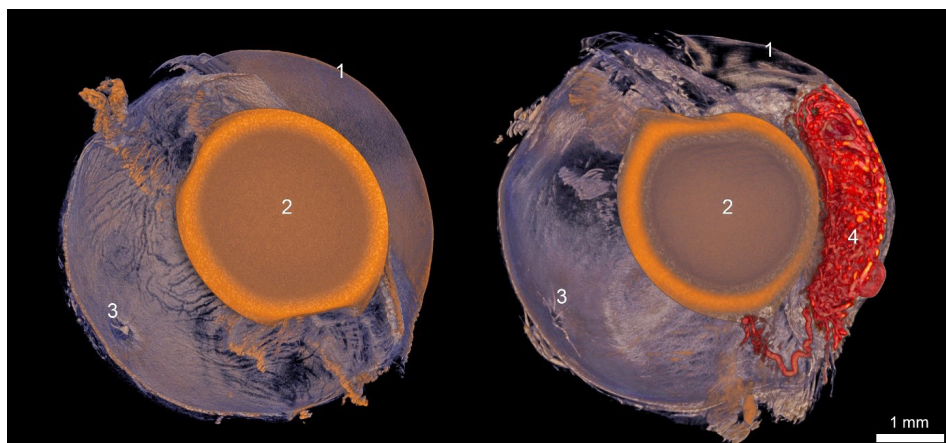
Tkanki miękkie

Różnice w osłabieniu promieniowania rentgenowskiego pomiędzy tkankami miękkimi są bardzo subtelne (maksymalnie 5%), co czyni je praktycznie nierozróżnialnymi na obrazie tomograficznym. W klinicznej tomografii komputerowej stosuje się środki kontrastowe, czyli substancje mające znacząco różnić się współczynnikiem osłabienia promieniowania względem otoczenia. Najczęściej są to substancje podawane dożylnie w celu uwidocznienia naczyń krwionośnych lub doustnie w celu zobrazowania układu pokarmowego. Stosowanie tego typu środków kontrastowych jest również możliwe w mikrotomografii *in-vivo* małych zwierząt laboratoryjnych, w odróżnieniu od mikrotomografii *ex-vivo*, gdzie najczęściej dysponujemy próbką w postaci pojedynczego narządu lub jego fragmentu, np. biopsji tkanki nowotworowej.

W praktyce mikrotomograficznej *ex-vivo* stosuje się barwienie (ang. *staining*) środkami kontrastującymi bazującymi na procesach dyfuzyjnych. Metoda ta wywodzi się z mikroskopii, jednakże w przypadku mikrotomografii próbkę zanurza się w roztworze środka kontrastującego na czas od kilku godzin do kilku tygodni w zależności od specyfiki próbki. Najczęściej stosowanymi środkami kontrastującymi są związki jodu, np. płyn Lugola (I_3K), czterotlenek osmu (OsO_4) czy kwas fosforowolframowy (PTA). Barwienie typu *staining* jest bierne i działa globalnie na całą próbkę. Pozwala to na wizualizację wielu tkanek i struktur w analizowanym materiale. Drugi rodzaj kontrastowania w mikrotomografii komputerowej wykorzystuje perfuzję, czyli nastrzyknięcie naczyń krwionośnych zwierzęcia laboratoryjnego środkiem kontrastowym. W odróżnieniu od dożylnego podania kontrastu, perfuzja nie jest zabiegiem przyżyciowym, środek kontrastowy nie jest metabolizowany, a pozostaje w naczyniach danego narządu lub całego zwierzęcia. Do kontrastowania perfuzyjnego wykorzystuje się m. in. komercyjnie dostępne środki, jak np. $\mu\text{Angiofil}$ [5], a także tusz. Perfuzja jest procesem aktywnym i lokalnym, co oznacza, że nastrzykuje się tylko naczynia krwionośne. Pozostałe tkanki nie są kontrastowane.

Stosowanie *stainingu* pozwala na zwizualizowanie jednego z najbardziej złożonych anatomicznie narządów, czyli gałki ocznej. Badania zostały przeprowadzone na modelu świńskim ze względu na wysoką zbieżność wymiarów i struktury anatomicznej z okiem ludzkim. Barwienie czterotlenkiem osmu i płynem Lugola pozwoliło na uwidocznienie rogówki, komory przedniej oka, soczewki, ciała rzęskowego, siatkówki, naczyniówki, twardówki, nerwu wzrokowego i wielu innych struktur istotnych w diagnostyce klinicznej [6]. Optymalizacja przygotowania, utrwalania, barwienia oraz analizy prawidłowych gałek ocznych pozwoliła na rozszerzenie badań o patologiczne zmiany w obrębie narządu wzroku. Zastosowano chemiczny model czerniaka gałki ocznej (ang. Bomirski Hamster Melanoma BHM). Komórki ludzkiego czerniaka skóry były wszczepiane

do komory przedniej gałki ocznej chomika syryjskiego, w której następował ich dalszy wzrost. Mikrotomografia w połączeniu z odpowiednim barwieniem pozwoliła na ocenę rozwoju unaczynienia i obszarów martwiczych guza, co pokazano na rys. 2 [7].

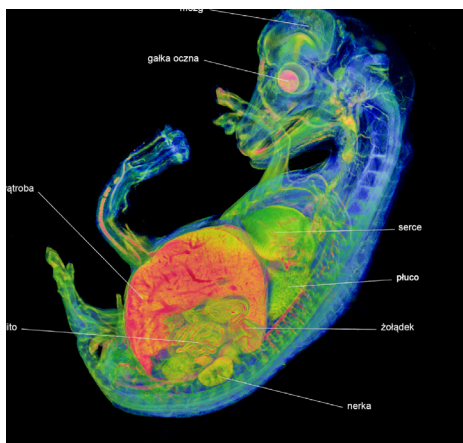


Rys. 2. Wizualizacja 3D gałek ocznych: prawidłowej (po lewej stronie) i z czerniakiem BHM (po prawej stronie). Próbki barwiono płynem Lugola 96 godzin. Numerami zaznaczono przykładowe części anatomiczne: rogówka (1), soczewka (2), nerw wzrokowy (3), naczynia krwionośne nowotworu (4)

Staining jest niezwykle uniwersalną metodą, ponieważ pozwala na kontrastowanie zarówno małych, jak i dużych wielonarządowych próbek. Jest to szczególnie dobrze widoczne na obrazie mikrotomograficznym całych embrionów np. embrionu owcy na rys. 3. Dzięki temu uzyskujemy możliwość analizy nie tylko guzów pierwotnych, ale również przerzutów w innych narządach. Wadą tej metody jest czas potrzebny na barwienie dużych próbek – może on wynieść nawet kilka tygodni.

Metoda kontrastowania perfuzyjnego jest znacznie szybsza. Czas wymagany na barwienie związany jest tylko z czasem wstrzyknięcia środka kontrastującego i utrwalenia próbki. Jako wynik uzyskujemy bardzo szczegółowy model sieci naczyń krwionośnych, łącznie z kapilarami średnicy kilku mikrometrów. Wysoka zdolność rozdzielcza obrazowania naczyń stanowi przewagę perfuzji nad stainingiem używanym do obrazowania naczyń.

Rys. 3. Wizualizacja 3D embrionu owcy wykonana na podstawie pomiaru mikrotomograficznego z barwieniem płynem Lugola przez 4 tygodnie



Podsumowanie

Metoda mikrotomografii komputerowej daje ogromne możliwości badań przedklinicznych, może posłużyć do analizy morfologii zmian chorobowych czy wpływu zaaplikowanej terapii. Optymalne kontrastowanie rozszerza spektrum zastosowań na tkanki miękkie, dzięki temu mikrotomografia komputerowa staje się realną alternatywą dla badań histopatologicznych. Uzyskuje ona ogromną przewagę dzięki niedestrukcyjności oraz możliwości analizy trójwymiarowej próbki jako całości.

Referencje

- [1] [siemens.com/somatom-force](https://www.siemens.com/somatom-force).
- [2] Edlow, B.L., Mareyam, A., Horn, A. et al. 7 Tesla MRI of the ex vivo human brain at 100 micron resolution. *Sci Data* 6, 244 (2019).
- [3] global.medical.canon/products/computed-tomography/aquilion-one-family.
- [4] Leszczyński B., Skrzat J., Kozerska M. et al. Three dimensional visualisation and morphometry of bone samples studied in microcomputed tomography (micro-CT). *Folia Morphol.* 73(4), 422 (2014).
- [5] [micro-angio.ch](https://www.micro-angio.ch).
- [6] Leszczyński B., Sojka-Leszczyńska P., Wojtysiak D. et al. Visualization of porcine eye anatomy by X-ray microtomography. *Exp Eye Res.* 167, 51 (2018).
- [7] Leszczyński B., Śniegocka M., Wróbel A. et al. Visualization and Quantitative 3D Analysis of Intraocular Melanoma and Its Vascularization in a Hamster Eye. *Int J Mol Sci.* 19(2), E332 (2018).