

# Mikroradiografie biologických objektů pixelovými detektory

**Metoda zobrazování pomocí rentgenového záření, která poskytuje nástroj ke studiu vnitřních struktur i živých biologických vzorků a materiálů, je známa již řadu let. Techniky zobrazování rentgenovým zářením však za poslední období prodělaly velký vývoj (Živa 2007, 6: 285–288). Dobře známé filmové zobrazovací systémy jsou postupně nahrazovány novými digitálními technologiemi. V dnešní době jsou to zejména systémy založené na rentgenech s mikroohniskem a digitálních pixelových detektorech. Dřívější kartotéky plné obálek s rentgenovými filmy nahradily velkokapacitní pevné disky a disková pole s digitálními obrazovými daty.**

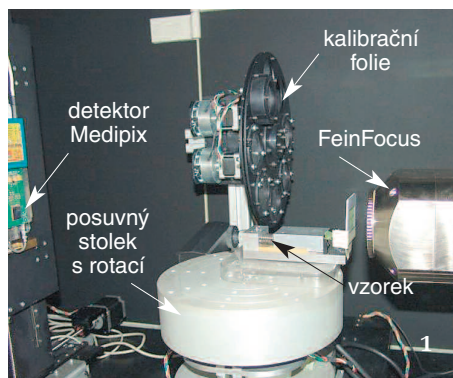
Rentgenová transmisní radiografie je založena na útlumu rentgenového záření při průchodu látkou (obr. 2). Část záření pohlcuje zobrazovaný materiál a tak vzniká latentní radiografický obraz, který je zachycen vhodným zobrazovacím detektorem. Obrázek pořízený detektorem se nazývá radiografický snímek.

## Digitální pixelové detektory Flat panel a Medipix2

Flat panel (používaný od r. 1995) je obrazový detektor rentgenového záření. Skládá se ze dvou částí – z luminoforu a diodového pole s elektronikou. Luminofor převádí rentgenové záření na světlo, kte-

ré je detekováno diodovým polem a převedeno na elektrický signál. Těmto detektorům je společný způsob akumulace obrázků. Signál zachycený každým obrazovým pixelem je integrován v analogové paměti (kapacitě). Analogová paměť je však časově nestabilní a doba integrace (expozice) je proto omezená.

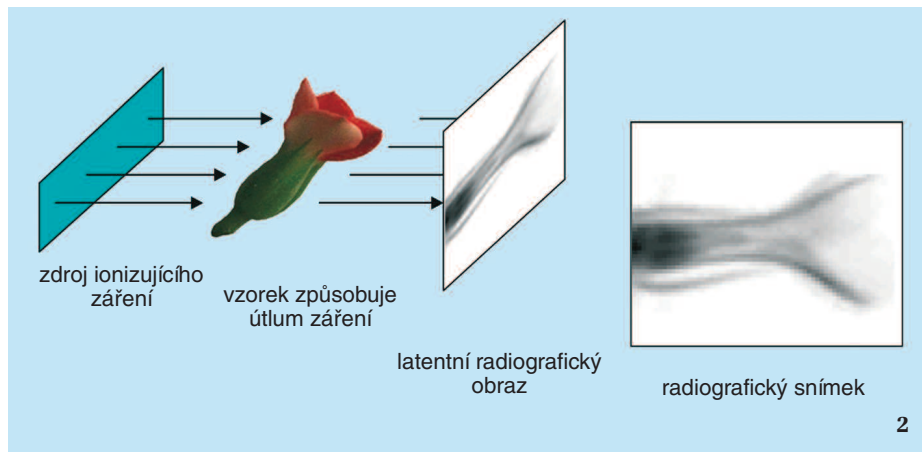
Zcela odlišného způsobu integrace se využívá v pixelových polovodičových detektorech, jako jsou detektory Medipix. Signál získaný detekcí rentgenového záření je v každém pixelu digitalizován okamžitě a integrace obrázku probíhá v digitální paměti, která je bezetrátová. Doba expozice u těchto detektorů není omeze-



**1** Experimentální uspořádání měřicí aparatury s rentgenem FeinFocus, pixelovým detektorem Medipix2, přesným polohovacím systémem a držákem pro biologické vzorky. Toto sestavení umožňuje až 50x zvětšení při velikosti ohniska 1  $\mu\text{m}$

**2** Útlum rentgenového záření při průchodu vzorkem

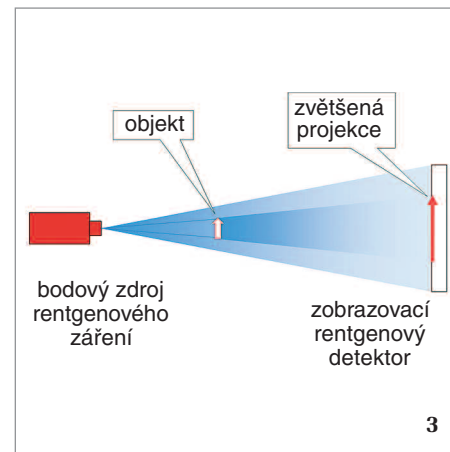
**3** Uspořádání aparatury s bodovým zdrojem záření umožňuje využít rozbitosti svazku k vytvoření zvětšeného obrázku zkoumaného objektu na ploše detektoru. Orig. J. Dammera a F. Weydy

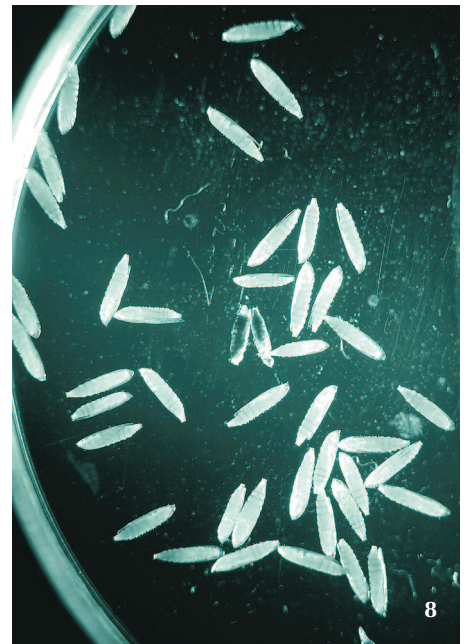
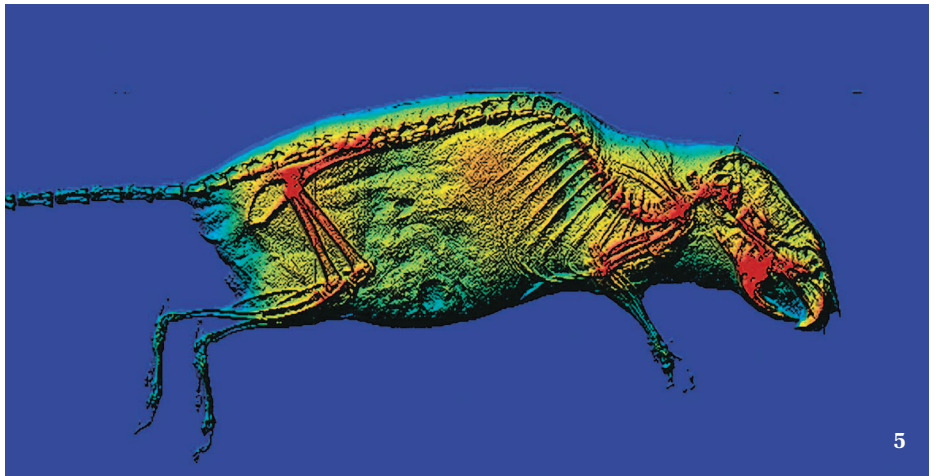
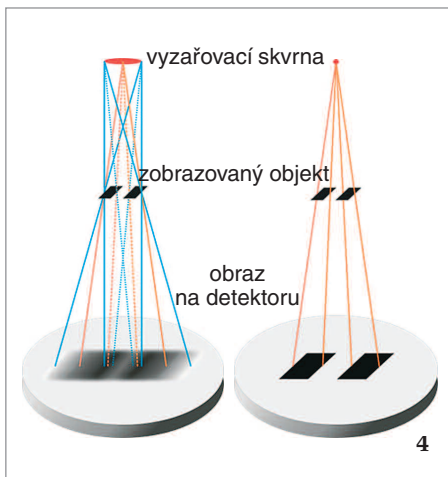


na, což umožňuje dosáhnout libovolně vysokého odstupu signálu od šumu, a tím získat vysokou kvalitu snímků. (Detektor Medipix byl vyvinut v letech 1995–2001 v rámci Medipix-Collaboration ve výzkumném ústavu CERN ve Švýcarsku ve spolupráci se 17 univerzitami a výzkumnými týmy. Na tomto projektu se již dlouhou dobu úspěšně podílí Ústav technické a experimentální fyziky ČVUT v Praze; více na <http://portal.lf1.cuni.cz/autor-158-jiri-dammer>.)

## Měřicí aparatura pro rentgenovou mikroradiografii

Rentgenová mikroradiografie využívá geometrického zvětšení obrazu objektu, které je umožněno použitím bodového zdroje rentgenového záření (obr. 3). (Jako zdroj rentgenového záření lze použít i urychlovač částic Synchrotron. Velkou výhodou je, že záření je monochromatické a lze volit jeho energii. Tento urychlovač se používá k materiálovému a biologickému výzkumu ve speciálních laboratořích; <http://www.synchrotron.cz>; <http://www.esrf.eu>.) Bodovým zdrojem je v případě mikroradiografické aparatury ÚTEF rentgenka Hamamatsu s wolframovou anodou, rozměrem vyzařovacího bodu o velikosti 5  $\mu\text{m}$ , pracovním napětím 5–90 kV a proudem 10–240  $\mu\text{A}$ , nebo rentgenka FeinFocus s wolframovou, mēděnou či molybdenovou anodou (anody lze podle potřeby měnit, volba závisí na typu zobrazovaného materiálu), která má velikost ohniska menší než 1  $\mu\text{m}$ , pracovní napětí 10–140 kV a proud 10–1 000  $\mu\text{A}$ . Většího rozlišení lze dosáhnout u rentgenu FeinFocus, a to kvůli malému rozměru vyzařovacího bodu (obr. 4). Jako zobrazovač používáme detektor Medipix2, jehož detekční práh lze nastavit od 5 kV výše (Jakůbek a kol. 2008). Celý systém pro rentgenovou mikroradiografii je popsán na obr. 1. (Jsou dostupné i komerční systémy pro mikroradiografii, kde se jako zobrazovací jednotky nejčastěji používají Flat panely. Např. Skyscan vyrábí a vyvíjí zařízení pro trojrozměrné zobrazování. Přístroje jsou schopny nedestruktivně zobrazovat i živé organismy; <http://www.skyscan.be>.) Doba expozice jednoho snímku je od 100 ms až po sekundy podle typu objektu, pracovní vzdálenosti, parametrů svazku a nastavení detektoru. Kvalitu radiografických snímků výrazně ovlivňuje tzv. tvrdnutí spektra svazku. To je způsobeno tím, že všechny energie ve zkoumaném vzorku nejsou





utlumeny stejně. Nižší energie rentgenového záření jsou absorbovány více, vyšší méně. Abychom mohli naměřená data správně korigovat, kalibrujeme každý pixel detektoru na různé úrovně tvrdnutí spektra svazku pomocí absorpčních fólií z hliníku či plastu (Jakůbek 2007).

#### Zobrazování biologických objektů

Na konkrétních příkladech bychom chtěli ukázat výzkum biologických vzorků, které touto technikou zpracováváme.

Metodu rentgenové transmisní radiografie používáme rutinně pro studium jednotlivých stadií klíněnky jírovčové (*Cameraria ohridella*). V rámci projektu MŠMT se zabýváme určitými aspekty biologie tohoto druhu a jeho parazitoidů. Pro tento účel potřebujeme dlouhodobě sledovat skrytý vývoj klíněnek v listech spolehlivou nedestruktivní technikou, která zajistí nepoškození biologických objektů a jejich vizualizaci i v méně průhledném prostředí, jakým jsou třeba listové miny starších larev vyplněné zčásti trusem. Doposud jsme měli k dispozici infračervenou digitální fotografii (Weyda 2007), která je dost efektivní jak pro studium vývojových stadií klíněnky žijících skrytě v listech (obr. 6, 7), tak pro determinaci parazitovaných kukel klíněnek (obr. 8). V případě parazitovaných kukel klíněnek vyjmutých z listu je infračervená fotogra-

fie rychlou a poměrně spolehlivou metodou (obr. 10) a mortalita larev i kukel je při této metodě minimální. Situaci si můžeme ověřit i na vzorcích připravených pro rastrovací elektronový mikroskop (obr. 11). Tato technika, která nám poskytuje jasný a ostrý obraz, je však destruktivní – vzhledem ke specifické přípravě objektů pro elektronovou mikroskopii nemůžeme takto připravený objekt už nikdy vrátit nepoškozený zpět do experimentu.

Rentgenová mikroradiografie doplňuje infračervenou fotografii, ale co se týče vizualizace, jde ještě dál. Dává jasné a kontrastní obrazy i tam, kde jiné techniky selhávají. Tak např. diapauzní kukly zapředené uvnitř listu specifickým zámožkem, které si snovací stadia larvy klíněnky vytvoří před zakuklením, mají takové optické vlastnosti, že infračervená fotografie zde dává velmi chabé výsledky. Rentgenová mikroradiografie zobrazuje tuto situaci velmi dobře. Stejně tak dává výborné výsledky v případě parazitovaných kukel s výskytem larev nebo kukel parazitoidů (obr. 1 a 2 na 3. str. obálky). Velkou předností rentgenové mikroradiografie je, že nám umožňuje studovat nejen statické situace, ale pomocí videozáznamu s nízkou frekvencí snímání (2 fps) zaznamenává i dynamické procesy jako např. pohyb larvy klíněnky v mině (obr. 9). Můžeme tak studovat chování larev klí-

4 Objekty zobrazené pomocí rentgenky s větším ohniskem jsou obtížněji rozpoznatelné než při použití rentgenky s menší vyzařovací skvrnou (vpravo). Je-li vyzařovací skvrna větší, je rentgenové záření emitováno z větší plochy, na zobrazovaném objektu dochází ke vzniku stínů a obraz na detektoru bude více rozmazán. Čím menší je vyzařovací skvrna, tím menší je i tento nežádoucí efekt. Prostorová rozlišovací schopnost měřicí aparatury je limitována velikostí vyzařovací skvrny (ohniska). Orig. J. Dammer a F. Weyda

5 Laboratorní myš – mikroradiografický snímek pořízený obrazovým detektorem typu Flat panel, zpracovaný vybraným procesem obrazové analýzy v programu ACC Image Structure and Object Analyzer v.6.1.

6 List jírovce s minou vytvořenou larvou klíněnky jírovčové (*Cameraria ohridella*) prosvícený lampou s viditelným světlem

7 Stejný list prosvícený infračervenou lampou, fotografováno v infračerveném modu s IR filtrem 850 nm

8 Petriho miska s kuklami klíněnky jírovčové – prosvětleno a fotografováno v infračerveném světle. Dvě kukly ve středu obrázku obsahují kukly parazitoidů

něnky ve výkrojcích listu v delších časových intervalech (Dammer a kol. 2008) a také např. chování parazitoidů uvnitř kukel klíněnky. Obr. 3 na 3. str. obálky ukazuje sekvenci snímků (pokrývá interval dvě sekundy) dokumentující netypické opouštění kukly klíněnky vylíhlým dospělcem parazitoida (pravděpodobně rod *Pnigalio*) stylem pozadu.

Rentgenovou mikroradiografii lze využít ke studiu různých skupin členovců (u termitů ji použili Hanus a kol. 2007), i obratlovců (obr. 5). Zvláštní kapitolou je aplikace rentgenového záření na fosilie. Prohlédli jsme celou řadu hmyzích fosilií v jantaru (baltský jantar i mnohem mladší kopál) a ačkoli výsledný obraz není ideální (poměrně nízký kontrast), dokáže zobrazit mnohé těžko dostupné struktury schované v zákrytu nebo uvnitř těla.

Během rentgenování různých biologických vzorků jsme získali řadu praktických zkušeností. Jednou z nich je, že záleží na obsahu vody ve studovaném objektu, protože voda ve vzorku tlumí rentgenové záření více než ve vzorcích vysušených. (Bio-

logický vzorek, který bude obsahovat dvě oddělené struktury – např. vodu a vzduch – bude na radiografickém snímku zobrazen následovně: část obsahující jenom vodu bude zobrazena bíle – největší útlum záření, část obsahující vzduch černě – nejmenší útlum, a části obsahující vodu i vzduch v šedých úrovních – rozdílný útlum záření.) Na radiografickém snímku rozeznáme více detailů, bude-li obsahovat více struktur, které mají odlišné absorpční vlastnosti rentgenového záření. Obecně platí, že čím vyšší je atomové číslo prvku ve vzorku, tím je rentgenové záření absorbováno více. Ve skutečnosti ale kvalita výsledného obrazu závisí na mnoha faktorech.

Jistým handicapem zobrazování rentgenovou mikroradiografií s čipem Medipix2 je jeho stále ještě poměrně malá detekční plocha. Může se stát, že dosáhneme mikroskopického rozlišení, ale velikost tohoto čipu nám neumožní ho plně využít. Existují však možnosti, jak tuto situaci elegantně zlepšit. Jednou z nich je využití panoramatické fotografie (v biologii skládání obrazů) v případě statických vzorků

(obr. na 1. str. obálky). Využití výpočetní techniky na „postprocessing“ je ostatně nedílnou součástí práce s mikrorentgenovým obrazem. Výhodnými postupy jsou lokální ekvalizace, adaptivní filtry, dekonvoluce, Fourierova transformace a další postupy obrazové analýzy. Velmi se nám osvědčil program ACC Image Structure and Object Analyser v.6.1. Samostatnou kapitolou jsou techniky 3D zobrazování. Postupy obrazové analýzy nám třeba zvýrazní málo postřehnutelné detaily v obraze. Jako příklad uvedeme zvýraznění struktury očního aparátu zlatohlávka *Eudicella smithi* (obr. 12).

Zvláštní kapitolou je také výpočetní mikrotomografie, která se stala důležitým objevem na poli rentgenového zobrazování. Principem této metody je, že se pod mnoha úhly pořídí jednotlivé projekce vzorku a z nich se pomocí vhodného algoritmu vytvoří trojrozměrný model zkoumaného objektu (obr. 4 na 3. str. obálky). Počítačová mikrotomografie neagresivním způsobem zobrazuje vnitřní strukturu zkoumaných objektů a umožňuje ukázat i jednotlivé řezy v rovinách x, y, z podle vlastního výběru (obr. 5 na 3. str. obálky).

### Závěr

Výzkum provedený na jednotlivých biologických objektech ukázal, že kromě běžně používaných technik vhodných k zobrazení malých organismů lze ke studiu vnitřní struktury vzorků použít rentgenové záření a pixelové detektory Medipix2. Mezi hlavní výhody této metody patří neomezený dynamický rozsah, a tedy i kontrast a vysoké prostorové rozlišení. To je limitováno pouze velikostí ohniska rentgenky. Tato technika zobrazení poskytuje téměř okamžitou informaci o vnitřní struktuře vzorku. Můžeme provádět studium v reálném čase, které umožňuje přežití biologických objektů.

Výzkum byl podpořen grantem 1P04LA211 (ČERN) a grantem základního výzkumu Centrum Projekt LC06041, výzkumným programem 6840770040 a 2B06005 (MŠMT).

**9** Předností rentgenové mikroradiografie je, že umožňuje studovat nejen statické situace, ale i dynamické procesy pomocí videozáznamu s nízkou frekvencí snímaných obrazů. Videosekvence pohybu larvy klíněnky jírovčové uvnitř miny listu. Zaznamenáno mikroradiografickou aparaturou s rentgenem FeinFocus s wolframovou anodou a detektorem Medipix2. Frekvence záznamu dva obrázky za sekundu

**10** Parazitované kukly klíněnky v infračerveném světle – jedna kukla parazitoida opouští kuklu klíněnky

**11** Kukla parazitoida (nahore) izolovaná z kukly klíněnky (dole) v rastrovacím elektronovém mikroskopu (pravděpodobně rod *Pnigalio*)

**12** Složené oko zlatohlávka *Eudicella smithi*. Vlevo obraz získaný pomocí rentgenové mikroradiografie detektorem Medipix2. Vpravo obraz zpracovaný vybraným procesem obrazové analýzy (Statistical Image Enhancement) odhalující mozaikovou strukturu složeného oka. Všechny snímky J. Dammera a F. Weydy

