



AGH

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Praca inżynierska

Katarzyna Chmielewska

kierunek studiów: fizyka medyczna

Analiza mikrotomograficzna zwapnień w zastawkach aortalnych

Opiekun: dr hab. inż. Jacek Tarasiuk

Kraków, styczeń 2015 r.

Oświadczam, że świadomy (-a) odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę dyplomową wykonałem (-am) osobiście i samodzielnie i nie korzystałem (-am) z innych źródeł, niż wymienione w pracy.

.....

(czytelny podpis)

Chciałabym serdecznie podziękować **Panu Doktorowi Jackowi Tarasiukowi** za nieocenioną pomoc, cierpliwość oraz czas poświęcony na konsultacje dotyczące niniejszej pracy dyplomowej, bez których jej powstanie nie byłoby możliwe.

Składam również wyrazy podziękowania na ręce **prof. dr hab. n. med. Anetty Undas** oraz **lek. med. Piotra Mazura** za przygotowanie i udostępnienie materiału badawczego będącego przedmiotem analiz. Jestem niezmiernie wdzięczna za możliwość uczestnictwa w badaniach zastawek przeprowadzanych w Szpitalu Jana Pawła II w Krakowie

Merytoryczna ocena pracy przez Opiekuna:

Końcowa ocena pracy przez Opiekuna:

Data:

Podpis:

Skala ocen: 5.0-bardzo dobra, 4.5-plus dobra, 4.0-dobra, 3.5-plus dostateczna, 3.0-dostateczna, 2.0-niedostateczna

Merytoryczna ocena pracy przez Recenzenta:

Końcowa ocena pracy przez Recenzenta:

Data:

Podpis:

Skala ocen: 5.0-bardzo dobra, 4.5-plus dobra, 4.0-dobra, 3.5-plus dostateczna, 3.0-dostateczna, 2.0-niedostateczna

Spis treści

1	Wstęp	8
2	Cel pracy	10
3	Wprowadzenie teoretyczne	10
3.1	Serce.....	10
3.1.1	Położenie, kształt i wielkość serca	11
3.1.2	Budowa serca	11
3.1.3	Ściany serca	13
3.1.4	Tkanka mięśniowa serca	13
3.2	Zastawki	14
3.2.1	Zastawki żylne (przedsionkowo-komorowe)	15
3.2.2	Zastawki tętnicze (aortalna i pnia płucnego)	16
3.2.3	Problem zwapnienia zastawek aortalnych.....	17
3.3	Mikrotomografia komputerowa	18
3.3.1	Ogólna budowa i zasada działania nanotomografu	19
3.3.2	Prawo Lamberta-Beera	21
3.3.3	Oddziaływanie promieniowania X z materią	22
3.3.4	Skala Hounsfield' a.....	23
4	Metodyka	24
4.1	Materiał badawczy	24
4.2	Opis aparatury pomiarowej.....	24
4.2.1	Budowa urządzenia pomiarowego Nanotom® S.....	24
4.2.2	Parametry urządzenia i ich wpływ na jakość pomiaru	25
4.2.3	Geometria pomiarowa.....	26
4.3	Wykonanie pomiaru	27
4.4	(Fiji Is Just) ImageJ.....	29
4.5	BoneJ.....	30

5	Analiza jakościowa	31
5.1	Oszacowanie progu separującego złogi od tkanki miękkiej.....	31
5.2	Histogramy gęstości złogów wapniowych	34
5.3	Histogramy gęstości tkanki miękkiej zastawki aortalnej	37
5.4	Analiza statystyczna histogramów gęstości złogów	40
5.5	Analiza statystyczna histogramów gęstości tkanki miękkiej	43
6	Analiza ilościowa	45
6.1	Rozmieszczenie, zawartość procentowa, objętość i stopień pofałdowania złogów wapniowych.....	46
6.2	Średni rozmiar grudki	47
6.3	Analiza ilościowa najcięższej frakcji grudek	55
7	Podsumowanie	58
8	Dodatek A - zestawienie szczegółowych danych liczbowych	60
9	Dodatek B - fotografie badanych płatków zastawek aortalnych.....	67
9.1	I seria pomiarowa - TEST, Z12-Z20	67
9.2	II seria pomiarowa - Z21-Z33, Z36-Z40	69
10	Bibliografia.....	71
11	Spis ilustracji	73
12	Spis tabel.....	74
13	Spis wykresów.....	75

1 WSTĘP

Serce jest centralnym narządem układu krwionośnego. Nieustannie pompuje krew, zaopatrując wszystkie komórki w niezbędne do funkcjonowania tlen i składniki odżywcze. Czasami jednak transport ten jest znacznie utrudniony. Jedną z przyczyn stanowi zwapnienie zastawek aortalnych znajdujących się w lewym ujściu tętniczym, których rolą jest zapobieganie wstecznemu przepływowi krwi z aorty do lewej komory. W wyniku postępującego procesu odkładania się złogów wapniowych płatki półksiężycowate stają się coraz bardziej sztywne, czego efektem jest ich niedomykalność, bądź zwężenie lewego ujścia tętniczego. Schorzenie to stanowi najczęstszy problem zastawkowy na świecie i dotyka przeważnie starsze osoby. U ponad 2% z nich stopień zaawansowania zwapnienia zastawki jest tak duży, iż wymaga interwencji chirurgicznej. Jego ocena jest możliwa dzięki badaniom procesu mineralizacji tkanki oraz obecności widocznych grudek wapniowych. Można to zrobić przy pomocy tomografii komputerowej - niezwykle czulej i wysokorozdzielczej metodzie diagnostycznej dającej większe możliwości, niż klasyczny echokardiogram wykorzystywany powszechnie do badań mięśnia sercowego.

W celu dokładnego zbadania pojedynczych, wyciętych na skutek zmian chorobowych płatków aortalnych pod kątem obecności grudek wapniowych świadczących o stopniu zaawansowania schorzenia warto wykorzystać jedną z odmian klasycznej tomografii - mikrotomografię. Ta nieniszcząca metoda badawcza wykorzystująca promieniowanie rentgenowskie pozwala na niezwykle precyzyjne zobrazowanie struktury wewnętrznej badanych fragmentów zastawek aortalnych. Jest to możliwe, bowiem rozdzielczość, z jaką wykonuje się pomiary, sięga ułamków mikrometra.

Przypuszcza się, że sposób rozmieszczenia złogów wapniowych w tkance miękkiej płatka półksiężycowatego, ich liczebność oraz rozmiar mogą w różnym stopniu zaburzać prawidłowe funkcjonowanie całej zastawki, dlatego też analiza mikrotomograficzna tych wyciętych chirurgicznie fragmentów stała się przedmiotem niniejszej pracy inżynierskiej. Dzięki mikrotomografii można zbadać wymienione

wcześniej parametry, a następnie porównać z historią choroby pacjentów, od których zostały pobrane. Nie wchodzi to jednak w zakres badań prowadzonych w ramach pracy dyplomowej, lecz niewątpliwie wykonane obiektywnie analizy zostaną wykorzystane podczas badań klinicznych w szpitalu. Próbkę w postaci pojedynczych płatków zastawek aortalnych, wycięte i spreparowane przez członka grupy badawczej, lek. med. Piotra Mazura, umieszczone w 10% roztworze formaliny (w lodówce), udostępniono w ramach badań klinicznych koordynowanych przez prof. dr hab. n. med. Anettę Undas. Cel przeprowadzonego studium przedstawiono szerzej w rozdziale drugim.

W trzecim rozdziale pracy inżynierskiej opisano serce, zastawki oraz problem, jakim jest zwapnienie ich płatków półksiężycowatych. Przedstawiono także metodę badawczą stosowaną podczas pomiarów (mikrotomografię), podstawowe informacje dotyczące budowy oraz zasady działania nanotomografu Nanotom® S znajdującego się w Laboratorium Mikro i Nano Tomografii na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH, a także główne sposoby oddziaływania promieniowania X z materiałem zachodzące w trakcie wykonywania badań. Czwarty rozdział został poświęcony metodyce. Zawiera opis materiału badawczego, aparatury pomiarowej, jej wybranych parametrów oraz ich wpływu na jakość otrzymanego obrazu mikrotomograficznego. Krótko opisano także program *Fiji* służący do jego obróbki oraz wyciągania istotnych informacji na temat badanego obiektu. W piątej części pracy przedstawiono wyniki analizy ilościowej złogów wapniowych oraz tkanki miękkiej w postaci histogramów gęstości sporządzonych na podstawie poziomu szarości danych obszarów znajdujących się na projekcji. Szósty rozdział poświęcono z kolei ilościowej analizie konkretnych parametrów, jakimi są: objętość złogów, ich powierzchnia, stopień pofałdowania, średnia wielkość grudek oraz zawartość procentowa w całej zastawce. W siódmym rozdziale podsumowano wyniki przeprowadzonych badań oraz przedstawiono koncepcje dotyczące ich kontynuacji na WFİS.

2 CEL PRACY

Celem niniejszej pracy inżynierskiej jest przeprowadzenie analizy mikrotomograficznej wyciętych, zmienionych chorobowo zastawek aortalnych pochodzących od pacjentów ze Szpitala Jana Pawła II w Krakowie. W tym celu wykonano pomiary 34 pojedynczych płatków półksiężycowatych, wykorzystując aparaturę dostępną w Laboratorium Mikro i Nano Tomografii Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH. Jest nią nowoczesne urządzenie, Nanotom® S, które umożliwia wykonanie precyzyjnych pomiarów mikrotomograficznych z rozdzielczością sięgającą nawet ułamków mikrometra.

Podczas badań skupiono się przede wszystkim na analizie złogów wapniowych obecnych w tkance miękkiej zastawek. Brano pod uwagę takie parametry, jak rozmiar, kształt, stopień pofałdowania, objętość, rozmieszczenie oraz ich zawartość procentową w całym płątku. W zakres pracy nie wchodzi jednak porównanie otrzymanych wyników z badaniami klinicznymi. Brak jakichkolwiek informacji dotyczących stadium choroby pacjenta, od którego pobrano materiał biologiczny, wpłynął korzystnie na obiektywną ocenę rezultatów pracy badawczej.

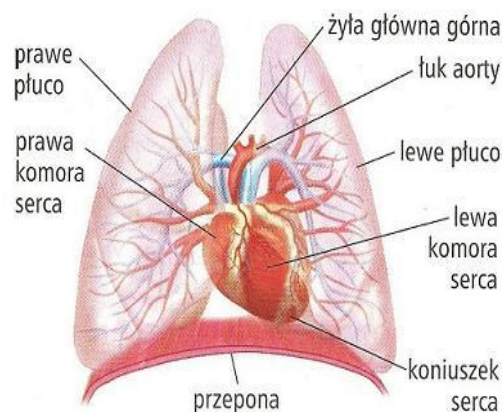
3 WPROWADZENIE TEORETYCZNE

3.1 Serce

Serce jest centralnym narządem układu krążenia pełniącym rolę pompy ssąco-tłoczącej. Podczas swojej nieustannej pracy pobiera krew z żył płucnych będących częścią małego krwioobiegu oraz obu żył głównych, górnej i dolnej, a następnie tłoczy ją do aorty, tętnic i pnia płucnego. Stamtąd przedostaje się ona siecią naczyń włosowatych do wszystkich komórek układu, niosąc tlen i składniki odżywcze. Mięsień ten może tłoczyć od 3 do 30 litrów krwi, w zależności od aktualnego zapotrzebowania organizmu. Jego wygląd, masa, a nawet położenie mogą być różne i wynikają ze zmienności osobniczej w obrębie jednego gatunku. Wpływają na nie takie czynniki, jak: wiek, waga, płeć, tryb życia, a także klimat.

3.1.1 Położenie, kształt i wielkość serca

Serce ma kształt lekko spłaszczonego od przodu stożka i jest położone w śródpiersiu przednim. Otacza je surowiczy worek osierdziowy oraz sieć naczyń wieńcowych dostarczająca mu składników odżywczych niezbędnych do prawidłowej pracy. Od przodu graniczy z chrząstkami żebrowymi oraz mostkiem, od tyłu z kręgosłupem, od dołu ogranicza je przepona, a po bokach znajdują się obie powierzchnie opłucnych. Leży asymetrycznie względem linii pośrodkowej, tylko $\frac{2}{3}$ całkowitej objętości znajduje się po lewej stronie klatki piersiowej. Jego wielkość jest stosunkowo nieduża, biorąc pod uwagę niezwykle ważną rolę, jaką odgrywa w organizmie. Potocznie mówiąc, ma rozmiar zaciśniętej pięści.



U przeciętnego dorosłego i zdrowego męż-

Rys. 3.1. Położenie serca w klatce piersiowej [17]

czyzny osiąga długość od 14 do 15 cm oraz szerokość 10-11 cm, przy wadze ok. 300 g i objętości sięgającej 270 cm³. U kobiet jest nieznacznie mniejsze, ponieważ waży ok. 220 g i zajmuje objętość 210 cm³. Jak już wcześniej wspomniano, wielkość tego organu jest uzależniona od indywidualnych cech danego osobnika.

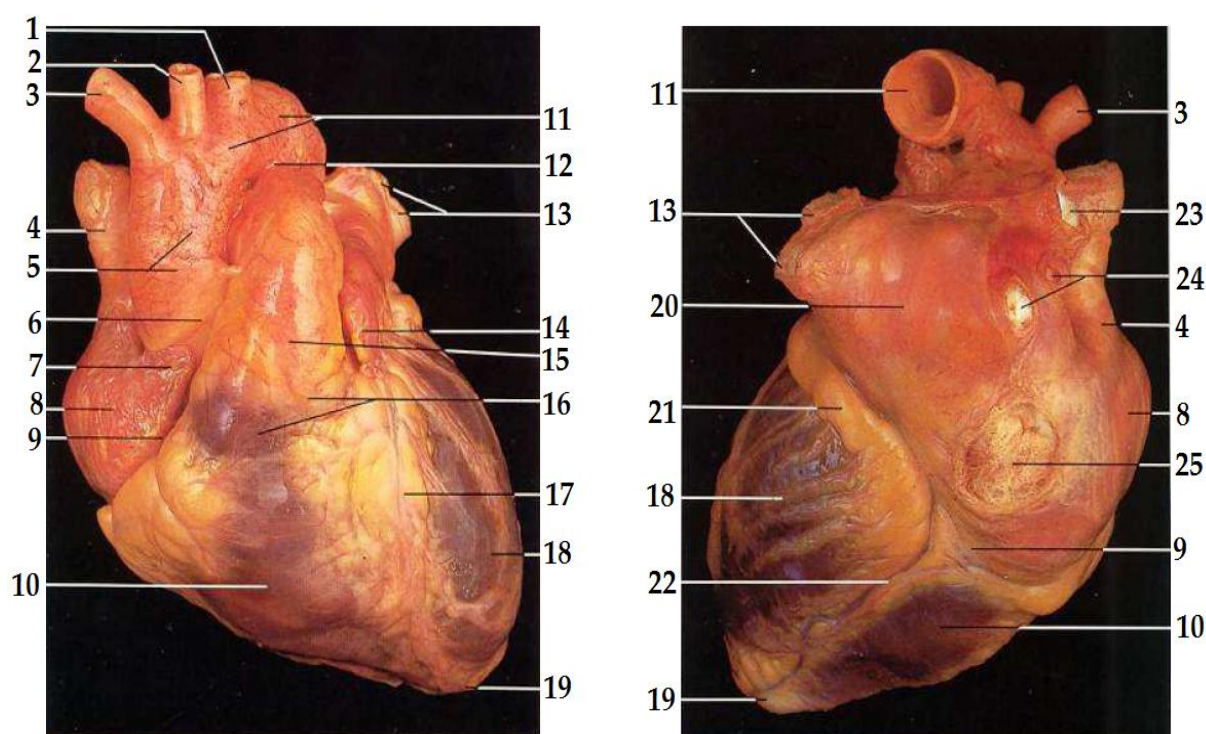
3.1.2 Budowa serca

Podłużna przegroda dzieli serce na 2 pracujące zgodnie części: prawą i lewą, tzn. serce prawe i lewe, które kurczą się jednocześnie, pompując za każdym razem tę samą ilość krwi. Serce prawe jest integralną częścią małego (płucnego) krwioobiegu. Znajduje się w nim ciemnoczerwona, odtleniona krew, natomiast jej jaśniejszą, bogatszą w tlen i składniki odżywcze wersję gromadzi i tłoczy serce lewe.

Obie połowy dzielą się na 2 kolejne: górną i cienkościnną, zwaną przedsionkiem oraz dolną, grubszą komorę. Wspomniane części łączą się ze sobą ujściem przedsionkowo-komorowym zaopatrzonym w łącznotkankowe wyrostki regulujące

prawidłowy przepływ krwi - zastawki, które znajdują się także w ujściach dużych tętnic (aorty i pnia płucnego, odpowiednio w komorze lewej i prawej).

Wewnętrzny podział na 2 komory i 2 przedsionki słabo uwidacznia się w wyglądzie zewnętrznym. Pomiedzy lewą a prawą komorą znajduje się bruzda międzykomorowa (przednia i tylna), natomiast przedsionki od komór oddziela bruzda wieńcowa. W budowie tego centralnego narządu układu krążenia wyróżnia się podstawę, wierzchołek oraz 3 powierzchnie boczne: mostkowo-żebrową, przeponową oraz płucną. Od zewnątrz otoczony jest siecią naczyń krwionośnych (naczyń wieńcowych) oraz tzw. koroną serca, w skład której wchodzi obie tętnice tłoczące krew do serca (aorta i pień płucny) oraz główne naczynia wyprowadzające krew (4 żyły płucne i 2 żyły główne: górna i dolna).



Rys. 3.2. Serce 30-letniej kobiety widziane od przodu (po lewej) oraz od tyłu (po prawej),

1 - tętnica podobojczykowa lewa, 2 - tętnica szyjna wspólna lewa, 3 - pień ramiennie-głowy, 4 - żyła główna dolna, 5 - aorta, 6 - opuszka aorty, 7 - uszko prawe, 8 - przedsionek prawy, 9 - bruzda wieńcowa, 10 - komora prawa, 11 - łuk aorty, 12 - więzadło tętnicze, 13 - żyły płucne lewe, 14 - uszko lewe, 15 - pień płucny, 16 - zatoka pnia płucnego, 17 - bruzda międzykomorowa przednia, 18 - komora lewa, 19 - koniuszek serca, 20 - przedsionek lewy, 21 - zatoka wieńcowa, 22 - bruzda międzykomorowa tylna, 23 - tętnica płucna prawa, 24 - żyły płucne prawe, 25 - żyła główna dolna [8]

3.1.3 Ściany serca

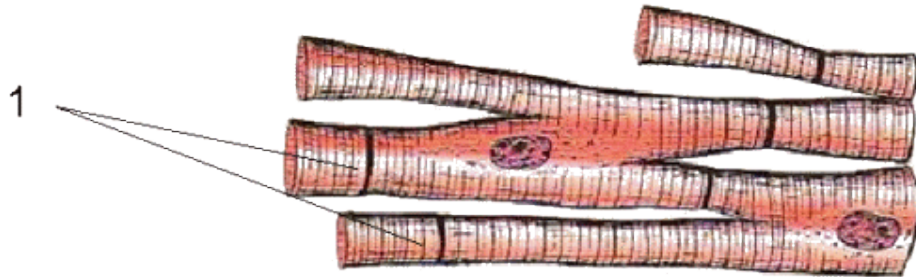
Ściany serca składają się z trzech warstw: wewnętrznego wsierdzia, zewnętrznego nasierdzia oraz znajdującego się pomiędzy nimi śródsierdzia. Obie powierzchnie graniczne są cienkie i zbudowane z jednowarstwowego nabłonka płaskiego spoczywającego na łącznotkankowym podłożu. W skład śródsierdzia wchodzi szkielet zbudowany z tkanki łącznej włóknistej (będący miejscem przyczepu mięśni oraz zastawek), mięśniówka (odpowiedzialna za nieustanny skurcz i rozkurcz mięśnia sercowego) oraz swoisty układ bodźcotwórczo-przewodzący serca, którego zadaniem jest, jak sama nazwa wskazuje, przewodzenie bodźców z jednego do drugiego końca narządu, umożliwiając tym samym ich komunikację.

Grubość ścian serca nie jest równomierna. Decyduje o niej zawartość tkanki mięśniowej w śródsierdziu. Oba przedsionki są stosunkowo cienkie i podobne do siebie. Różnice widać dopiero w obrębie komór. Lewa jest bardziej rozbudowana, co wiąże się z jej funkcją - tłoczeniem krwi bogatej w tlen i składniki odżywcze do całego ciała poprzez główną tętnicę, aortę. Zadaniem prawej komory jest wyłącznie dostarczenie krwi do sieci naczyń włosowatych płuc, stąd też ilość zawartej w niej tkanki mięśniowej jest mniejsza.

3.1.4 Tkanka mięśniowa serca

Wspomniana wcześniej mięśniówka składa się z charakterystycznej tkanki mięśniowej określanej mianem sercowej. Jej widlasto rozgałęzione włókna, zwane roboczymi, łączą się poprzez boczne odgałęzienia (anastomozy), tworząc syncytium. W pojedynczych komórkach (kardiomiocytach) znajduje się jedno lub dwa centralnie położone jądra, niewielka ilość organelli zgrupowanych w rejonach przybrzeżnych oraz dobrze rozbudowany aparat kurczliwy z licznymi kanalikami T. W swoim wnętrzu gromadzą spore ilości glikogenu, swoisty barwnik - lipofuscyne oraz kropelki tłuszczu. Kardiomiocyty wytwarzają między sobą połączenia znajdujące się na stykach z sąsiednimi komórkami, tzw. wstawki, a także między powierzchniami poprzecznymi - desmosomy, powięzi przylegania oraz neksusy, które dodatkowo zwiększają wytrzymałość całej tkanki. Pracują niezwykle dynamicznie, jak włókna

szkieletowe, lecz w odróżnieniu od nich kurczą się przestrzennie. Ich praca jest niezależna od woli, nie podlegają również zmęczeniu, co upodabnia je dodatkowo do tkanki mięśniowej gładkiej.

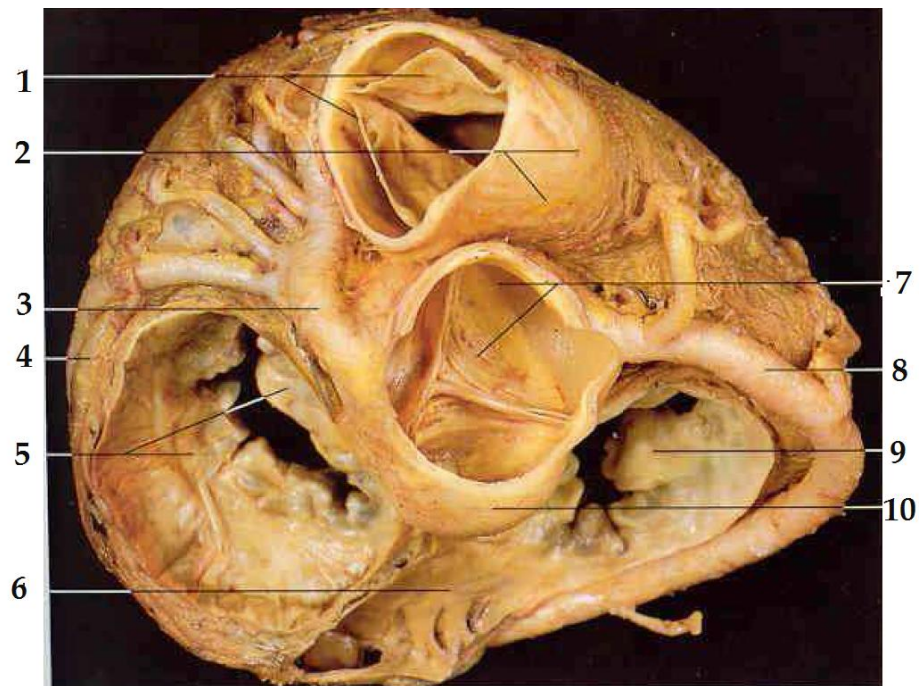


Rys. 3.3. Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana serca, 1-wstawki [18]

Oprócz włókien roboczych w ścianach mięśnia sercowego znajdują się komórki układu bodźcotwórczo-przewodzącego. Są niczym innym, jak zatrzymanymi na wczesnym etapie rozwoju komórkami roboczymi. Różnią się od nich jedynie słabo rozwiniętym systemem kurczliwym oraz brakiem kanalików T. Ich kardiomiocyty łączą się poprzez liczne nekususy i grupują w pęczki zlokalizowane głównie w obrębie węzła przedsionkowo-komorowego oraz zatokowo-predsionkowego. Są zdolne do spontanicznej depolaryzacji błony komórkowej, co razem z rozbudowaną siecią połączeń umożliwia sprawne przenoszenie impulsów o obrębie całego serca.

3.2 Zastawki

We wszystkich 4 ujściach znajdujących się w sercu: dwóch przedsionkowo-komorowych oraz dwóch tętniczych (pnia płucnego i aorty) są obecne łącznotkankowe twory regulujące prawidłowy przepływ krwi - zastawki. Ze względu na rodzaj przepływającej przez nie krwi dzielą się na 2 grupy: żyłne, obecne w obu ujściach przedsionkowo-komorowych i zapobiegające cofaniu się krwi z komór podczas skurczu do przedsionków oraz tętnicze, znajdujące się w ujściach wielkich tętnic do komór, pnia płucnego i aorty, hamujące jej zwrotny napływ podczas skurczu.

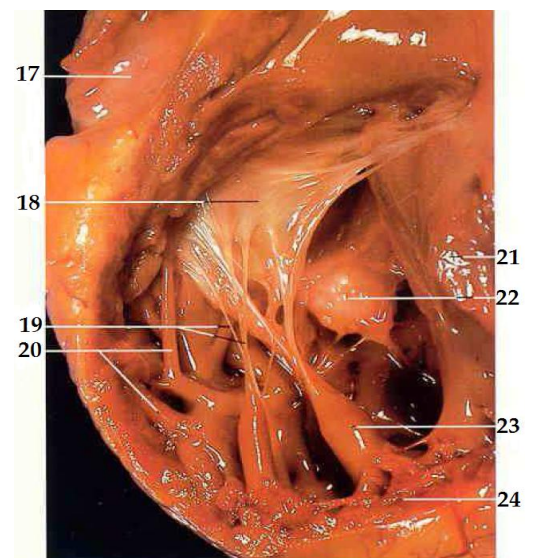


Rys. 3.4. Zastawki serca: 1 - zastawka pnia płucnego, 2 - zatoka pnia płucnego, 3 - tętnica wieńcowa lewa, 4 - żyła wielka serca, 5 - zastawka przedsionkowo-komorowa lewa, 6 - zatoka wieńcowa, 7 - zastawka aorty, 8 - tętnica wieńcowa prawa, 9 - zastawka przedsionkowo-komorowa prawa, 10 - opuszka aorty [8]

3.2.1 Zastawki żyłne (predsionkowo-komorowe)

- **Budowa**

Zastawki żyłne przyczepiają się do pierścieni włóknistych okalających oba wejścia przedsionkowo-komorowe. Składają się z płatków, z których każdy posiada 3 warstwy: dwie zewnętrzne (zbudowane z wsierdzia) oraz środkową, łącznotkankową blaszkę właściwą. Zwieszają się w kierunku komory, a do ich wolnego brzegu przytwierdzone są łącznotkankowe struny ścięgnowe. Ich rolą jest prawidłowe umocowanie i napinanie omawianych fragmentów zastawek pod wpływem ciśnienia powstającego na skutek przepływającej krwi.



Rys. 3.5 Zastawka trójdzielna: 17 - prawy przedsionek, 18 - płatek przedni, 19 - struny ścięgnowe, 20 - beleczki mięśniowe, 21 - przegroda międzykomorowa, 22 - płatek przegrodowy, 23 - mięsień brodawkowy przedni, 24 - mięsień sercowy komory prawej [8]

Prawa zastawka przedsionkowo-komorowa posiada 3 płatki - przedni, tylny oraz przegrodowy, stąd też często nazywana jest trójdzielną, natomiast lewa - tylko dwa: przedni i tylny. Określenia bywa mianem dwudzielnej, bądź mitralnej.

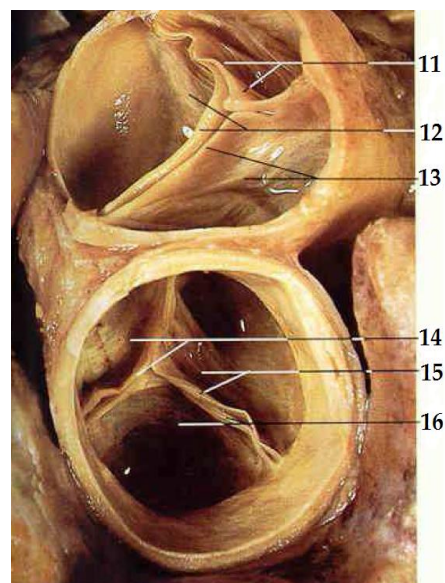
- **Funkcja**

Podczas rozkurczu serca krew z wypełnionych przedsionków rozchyla płatki obu zastawek i przedostaje się do pustych komór. W chwili skurczu skracają się beleczki mięśniowe budujące komory oraz napinają przyczepione do nich struny ścięgnowe. Efektem jest zamknięcie ujść przedsionkowo-komorowych i uniemożliwienie zwrotnego przepływu krwi do światła przedsionków. W prawidłowo ukształtowanym płatku wolny brzeg jest cienki i elastyczny, lecz w wyniku zmian chorobowych może ulec zgrubieniu. Prowadzi to do nieszczelności zapory lub też do zwężenia ujścia, w wyniku czego przepływ krwi jest utrudniony.

3.2.2 Zastawki tętnicze (aortalna i pnia płucnego)

- **Budowa**

Zastawki te zbudowane są z trójwarstwowych płatków półksiężycowatych o kształcie jaskółczych gniazd. Ich liczba waha się od 2 do 4, niekiedy nawet i do 5. Najczęściej jednak spotyka zastawki posiadające trzy płatki. Każdy z nich posiada dwie powierzchnie: wypukłą, zwróconą do komory oraz wklęsłą, po stronie tętnicy. Jednym brzegiem przytwierdzone są do pierścieni włóknistych otaczających ujścia aorty i pnia płucnego. Drugi brzeg, niemalże prosty i wolny, jest skierowany do światła naczynia oraz wzmocniony niewielką, położoną pośrodku cienkiego paska grudką - łąkotką.



Rys. 3.6. Zastawka pnia płucnego: 11 - płatek przedni, 12 - płatek lewy, 13 - płatek prawy; **zastawka aorty:** 14 - płatek lewy, 15 - płatek prawy, 16 - płatek tylny [8]

- **Funkcja**

Rolą zastawek tętniczych, podobnie jak przedsionkowo-komorowych, jest w skrócie zapobieganie wstecznemu przepływowi krwi z tętnic odprowadzających do serca. Podczas rozkurczu komór, gdy są one wypełniane krwią napływającą z przedsionków, płatki półksiężycowate wpuklają się w ich stronę, tworząc trójamienne gwiazdę zamykającą ujście tętnic odprowadzających. W chwili skurczu płatki rozstępują się i zbliżają do ścian aorty i pnia płucnego, otwierając drogę przepływu bogatej w tlen i składniki odżywcze krwi do całego organizmu.

3.2.3 Problem zwapnienia zastawek aortalnych

Schorzenia zastawek aortalnych spowodowane ich zwapnieniem są najczęstszym problemem zastawkowym na świecie, który dotyka przeważnie starsze osoby. U ponad 2% z nich można zaobserwować zwężenie lewego ujścia tętniczego wymagające interwencji chirurgicznej. Choroba ta powoduje zaburzenia przepływu krwi z lewej komory do aorty, a tym samym - do dużego krwioobiegu. Płatki są coraz bardziej sztywne, czego efektem jest ich niedomykalność lub zwężenia lewego ujścia tętniczego. O skutkach nie trzeba zatem wiele mówić. Serce nie pozostaje jednak bierne w tej sytuacji i stara się adaptować do podwyższonego ciśnienia wyrzutowego poprzez przerost lewej komory. Chwilowo poprawia to wydolność całego mięśnia, lecz czasami zwiększenie objętości komórek nie jest wystarczające i dochodzi do zmniejszenia frakcji wyrzutowej, w wyniku której może dojść do niedotlenienia.

Pierwsze widoczne makroskopowo zmiany w płatkach nie niosą ze sobą istotnych zmian w ich funkcjonowaniu. Obejmują stopniową mineralizację lub powstawanie skupisk o zwiększonej gęstości rozsianych w całej objętości zastawki aortalnej. Procesowi temu często towarzyszy obecność komórek kościotwórczych (osteoblastów) świadczących o jego aktywnym przebiegu. Ocena zaawansowania choroby jest możliwa dzięki badaniom procesu mineralizacji tkanki oraz obecności widocznych grudek wapniowych. W końcowym i najbardziej poważnym stadium złoży wystają ponad powierzchnię płatka, powodując jego znaczącą deformację. Grudkom wap-

niowym mogą także towarzyszyć powstałe w wyniku metaplastyki komórki kościopodobne oraz kościotwórcze (osteoblasty).

Zwapnienia zastawek często wiązane są z wiekiem pacjenta. Nie jest to przypadkowe sformułowanie, gdyż prawdopodobieństwo wystąpienia ciężkich objawów związanych z nieprawidłową pracą zastawek rośnie u osób starszych (powyżej 65. roku życia), lecz nie stanowi skutku deterministycznego samego procesu starzenia organizmu. Wpływ na odkładanie się wapnia w płatkach mają m.in. płeć, wzrost, palenie tytoniu, hipercholesterolemia (potwierdzona poprzez podwyższone stężenie LDL w zastawkach), przewlekła niewydolność nerek, nadciśnienie, stres oksydacyjny, czy cukrzyca typu II. Istnieje również teza, iż proces wapnienia ma podłoże genetyczne i występuje częściej w zastawce dwupłatkowej (mitralnej).

Bardzo często wynikiem gromadzenia się złogów jest chirurgiczne usunięcie płatków półksiężycowatych, gdyż leczenie farmakologiczne nie zwalnia progresji choroby. Zastąpienie zmienionej chorobowo zastawki przez protezę prowadzi do częściowego ustąpienia objawów oraz odzyskania funkcji przez lewą komorę, jednak gdy diagnoza nie nastąpi dostatecznie wcześnie może dojść do nieodwracalnego upośledzenia funkcji rozkurczowej mięśnia sercowego prowadzące do śmierci pacjenta. Niezwykle ważne jest zatem wczesne wykrycie niepokojących grudek wapniowych w tkance miękkiej zastawki. Można to zrobić przy pomocy tomografii komputerowej - niezwykle czulej i wysokorozdzielczej metodzie diagnostycznej dającej większe możliwości, niż klasyczny echokardiogram wykorzystywany powszechnie do badań serca.

3.3 Mikrotomografia komputerowa

Mikrotomografia komputerowa (μ CT, ang. *MicroComputed Tomography*) to wysokorozdzielcza, nieniszcząca metoda badawcza wykorzystująca promieniowanie rentgenowskie, pozwalająca na zobrazowanie struktury wewnętrznej badanych obiektów. Od klasycznej tomografii komputerowej, powszechnie stosowanej w medycynie, różni się rozdzielczością, sięgającą nawet ułamków mikrometra, co daje

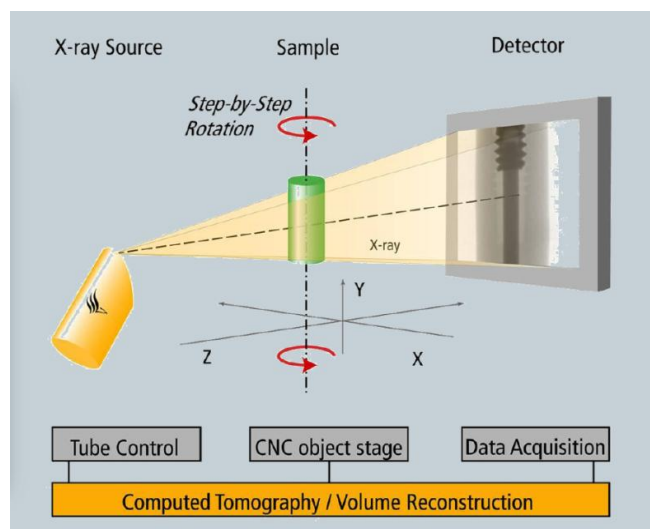
niezwykłą precyzję pomiaru i możliwość zobrazowania nawet bardzo małych struktur z zachowaniem nawet drobnych szczegółów dotyczących ich budowy.

Wraz z rozwojem technologii metoda ta staje się coraz bardziej popularna. Świadczy o tym ilość prac naukowych poświęconych tej dziedzinie, pojawiająca się od schyłku XX wieku. Rozwijająca się branża przemysłowa wymusza na producentach nieustanne podnoszenie jakości wytwarzanych sprzętów, w celu sprostanienia wymogom konsumenta. Istotne jest zatem, aby produkt wypuszczony na rynek był pozbawiony wad, przede wszystkim fabrycznych. W tym celu wykonuje się liczne testy kontroli jakości, do których coraz częściej wykorzystuje się mikro- lub nanotomografy (o rozdzielczości rzędu nanometrów). Dzięki nim możliwe jest zbadanie ciągłości użytych materiałów kompozytowych pod kątem mikropęknięć, rozwarstwienia struktury, obecności pęcherzyków powietrza, porów, itp.. Krótko mówiąc, mikrotomografia komputerowa staje się powszechnie wykorzystywaną metodą badawczą w szeroko pojętej dziedzinie defektoskopii, w skład której wchodzi także badania archeologiczne, geologiczne, analiza poprawności montażu układów scalonych, jak również badania materiałów biologicznych - kości, czy też zastawek, będących przedmiotem niniejszej pracy inżynierskiej. Metodę tę stosuje się również w medycynie, do analizy małych modeli zwierzęcych wykorzystywanych przy badaniu etiologii chorób dręczących ludzi oraz sposobu ich leczenia. Jest to możliwe, gdyż koszty produkcji i eksploatacji urządzeń pomiarowych (mikro- lub nanotomografów) są niższe, niż stosowanych dotąd mikroskopów elektronowych, a rozdzielczość pomiarów jest znacznie lepsza, niż w klasycznych tomografach medycznych, w których niemożliwe jest dokładne zbadanie małych obiektów, jakimi są narządy modeli zwierzęcych.

3.3.1 Ogólna budowa i zasada działania nanotomografu

Podobnie, jak klasyczny tomograf, urządzenie to składa się z lampy będącej źródłem promieniowania rentgenowskiego, ruchomej podstawki na próbkę, umożliwiającej ustawienie jej rotacji o zadany kąt oraz położenia względem lampy i detek-

tora, wpływającego na powiększenie. Ostatnim, lecz niemniej ważnym elementem składowym urządzenia jest dwuwymiarowa tablica detektorów, najczęściej scyntylacyjnych, których istotną składową stanowi kamera CCD przetwarzająca impulsy świetlne generowane przez scyntylator na sygnał elektryczny.



Rys. 3.7 Podstawowe elementy składowe i zasada działania nanotomografu [5]

W wyniku złożenia projekcji wykonanych pod różnym kątem, na skutek przechodzenia promieniowania X emitowanego ze źródła przez badaną próbkę, otrzymuje się serię obrazów przekrojowych (radiogramów). Następnie poddaje się je rekonstrukcji w celu otrzymania trójwymiarowego obrazu. Proces ten jest niezwykle skomplikowany i wymaga użycia zaawansowanych algorytmów matematycznych realizowanych za pomocą komputera. Problem stanowi fakt, że bezpośrednio mierzoną wielkością nie jest współczynnik absorpcji (μ), lecz natężenie promieniowania przechodzącego przez obiekt pod danym kątem. Obecnie powszechnie stosowaną metodą jest filtrowana projekcja wsteczna (ang. *FBP - Filtered Back Projection*). Polega ona na odpowiedniej filtracji każdej otrzymanej projekcji, a następnie zrzutowaniu otrzymanej maski na płaszczyznę obrazu pod odpowiednim kątem. Powoduje to zmniejszenie ilości błędów powstających w wyniku zmian gęstości w obrębie badanego obiektu. Łatwo zauważyć, że na jakość zrekonstruowanego w ten sposób obrazu wpływa liczba wykonanych podczas pomiaru zdjęć - im więcej, tym lepiej. Niestety, wiąże się to ze zwiększoną ekspozycją obiektu na promieniowanie oraz wy-

dłużeniem czasu wykonywania skanów, co niekiedy jest ogromną wadą. W wyniku całego procesu rekonstrukcyjnego otrzymuje się dokładną wizualizację struktury wewnętrznej badanego obiektu, bez naruszenia jego ciągłości. Umożliwia to wielokrotne analizowanie tej samej próbki, bądź wykorzystanie jej do innych testów.

3.3.2 Prawo Lamberta-Beera

Efektem zabiegów dokonywanych podczas procesu rekonstrukcji jest, jak już wcześniej wspomniano, utworzenie diagnostycznego obrazu tomograficznego. W skrócie polega to na pomiarze pochłaniania promieniowania przechodzącego przez obiekt pod różnym kątem w oparciu o prawo Lamberta-Beera stosowane dla materiałów heterogenicznych:

$$I = I_0 \cdot e^{-\sum \mu_i x_i}, \quad (3.1) [16]$$

gdzie:

I - natężenie promieniowania, które przeszło przez próbkę,

I_0 - natężenie padającej wiązki promieniowania ,

μ_i - liniowy współczynnik pochłaniania i-tej frakcji o określonej gęstości; $[\mu] = \frac{1}{m}$,

x_i - grubość i-tej frakcji o określonej gęstości pochłaniającej promieniowanie; $[x] = m$.

Przy analizie współczynnika absorpcji, czyli prawdopodobieństwa, z jakim dany obiekt pochłonie promieniowanie, warto mieć na uwadze jego silną zależność zarówno od gęstości materiału, jak i od energii padających fotonów. W urządzeniu pomiarowym, jakim jest nanotomograf, mamy do czynienia przeważnie z polichromatyczną wiązką promieniowania generowanego w lampie oraz obszarami o różnej gęstości obecnymi w badanej próbce. Należy również zaznaczyć, że wyznaczenie współczynnika absorpcji danego elementu objętości materiału badawczego nie jest łatwe i dokonuje się tego poprzez skomplikowane algorytmy rekonstrukcyjne oparte na pomiarze natężenia promieniowania przechodzącego przez obiekt pod danym kątem, rejestrowanego na matrycy detektora.

3.3.3 Oddziaływanie promieniowania X z materią

Dwa dominujące procesy fizyczne towarzyszące mikrotomografii to efekt Comptona oraz absorpcja fotoelektryczna. Pierwszy z nich polega na niekoherentnym rozproszeniu fotonów pod kątem ϕ na elektronach walencyjnych, które przyjmując część energii padającego promieniowania, uzyskują pewną energię kinetyczną (odrzutu). W wyniku drugiego procesu (absorpcji fotoelektrycznej) padający foton zostaje całkowicie pochłonięty, a jego energię przejmuje elektron znajdujący się na wewnętrznej powłoce atomowej. Jeśli jest ona wyższa od siły wiązania, zostaje wybita. Towarzyszy temu emisja wysokoenergetycznego promieniowania X. Całość procesu ilustruje równanie (3.2)

$$E_k = h\nu - E_w \quad , \quad (3.2)$$

gdzie:

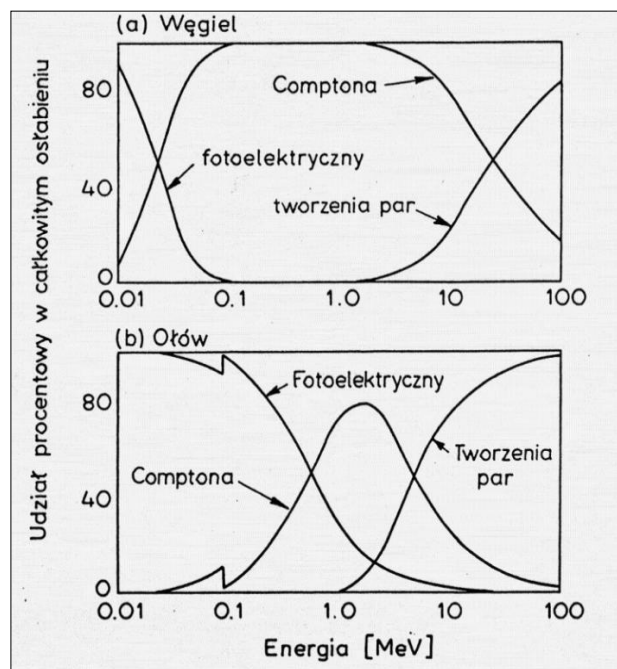
E_k - energia kinetyczna wybitego elektronu,

$h\nu$ - energia zaabsorbowanego fotonu,

E_w - energia wiązania elektronu na wewnętrznej powłoce atomowej.

Efekt Comptona oraz zjawisko fotoelektryczne silnie zależą od liczby atomowej badanego materiału oraz od energii padającego promieniowania. Dla niekoherentnego rozpraszania fotonów liniowy współczynnik pochłaniania jest proporcjonalny do Z , natomiast w przypadku absorpcji - do jej piątej potęgi (Z^5). Na rys. 3.8 widać, że pierwszy z efektów dominuje dla wyższych energii padających fotonów.

W przypadku lekkich pierwiastków,



Rys. 3.8. Względne prawdopodobieństwo zajścia różnych procesów oddziaływania promieniowania X z materią dla a) węgla b) ołowiu [9]

takich jak węgiel (znajdujących się m.in. w tkance miękkiej) jest to zakres od ok. 50 keV. W przypadku pierwiastków o dużej liczbie atomowej, dla tego samego zakresu napięcia zasilania maksymalnie do 180 kV dla urządzenia znajdującego się w LMiNT, wykorzystywanego w ramach badań wykonanych w ramach niniejszej pracy inżynierskiej), widać znaczącą rolę zjawiska fotoelektrycznego.

3.3.4 Skala Hounsfield' a

Objętość badanego obiektu jest podzielona na małe komórki, zwane *voxelami* (jednostkowymi elementami objętościowymi), którym w procesie rekonstrukcji obrazów przekrojowych przypisuje się wartość proporcjonalną do ich liniowego współczynnika pochłaniania omówionego w poprzednim podrozdziale. W tym celu wykorzystuje się wzór:

$$HU = 1000 \cdot \frac{\mu_{\text{obektu}} - \mu_{\text{wody}}}{\mu_{\text{wody}}}, \quad (3.3)$$

gdzie:

HU - wartość w jednostkach Hounsfield' a (ang. *HU - Hounsfield units*),

μ_{obektu} - wartość liniowego współczynnika pochłaniania w badanym obiekcie

μ_{wody} - wartość liniowego współczynnika pochłaniania w wodzie.

W objaśnieniu symboli zawartych w równaniu (3.3) pojawiło się pojęcie jednostek Hounsfield' a. Zostały wynalezione pod koniec XX wieku przez uczonego, od którego nazwiska wzięła się ich nazwa. Służą do opisu gęstości *voxeli* wyznaczonej podczas rekonstrukcji na podstawie natężenia pochłoniętego promieniowania X. Obraz tomograficzny powstaje poprzez przypisanie wartościom tych jednostek odpowiedniego poziomu szarości. Jest więc cyfrowy i monochromatyczny. Rozpiętość skali zależy od liczby bitów użytych do kodowania zrekonstruowanych informacji. Dla 8-bitowych obrazów, które stanowiły materiał analityczny w niniejszej pracy, wynosi od 0 HU (dla wody) do 255 HU, obejmując 2^8 wartości. Najniższe z nich odpowiadają najciemniejszym punktom na zdjęciach, które zarejestrowano po przejściu

promieniowania przez ośrodek o najmniejszej gęstości, jak np. tkanka miękka, czy powietrze lub woda.

4 METODYKA

4.1 Materiał badawczy

Materiałem badawczym w niniejszej pracy inżynierskiej są 34 pojedyncze płatki półksiężycowate zastawek aortalnych usunięte chirurgicznie pacjentom ze Szpitala Jana Pawła II w Krakowie znajdującym się w różnym stadium choroby, na skutek postępującego procesu wapnienia, czyli odkładania się grudek wapnia w obrębie tkanki miękkiej.

Udostępniono je w ramach badań klinicznych koordynowanych przez prof. dr hab. n. med. Anettę Undas. Zastawki zostały wycięte i spreparowane przez członka zespołu badawczego, lek. med. Piotra Mazura, a następnie umieszczone w 10% roztworze formaliny, w lodówce, aby zachować ich pierwotny kształt, zapobiec rozkładowi oraz wysuszeniu. Następnie przekazano je do analizy

w pracowni mikrotomograficznej WFiS AGH. Pozostałe płatki każdej z zastawek podlegały badaniom biochemicznym oraz histologicznym w Szpitalu Jana Pawła II w Krakowie.



Rys. 4.1 Pojedynczy płatek silnie zmienionej chorobowo zastawki aortalnej

4.2 Opis aparatury pomiarowej

4.2.1 Budowa urządzenia pomiarowego Nanotom® S

W celu przeprowadzenia niezbędnych pomiarów wykorzystano dostępny w Laboratorium Mikro i Nano Tomografii WFiS wysokorozdzielczy, nowoczesny nanotomograf rentgenowski Nanotom® S firmy General Electric (rys. 4.2). Urządzenie to posiada otwartą lampę rentgenowską o maksymalnym



Rys. 4.2. Nanotom ® S [12]

napięciu zasilania 180 kV z wymienną katodą oraz okienkiem, będącym anodą (targetem). W laboratorium znajdują się 2 typy targetu: jeden wykonany ze sztucznego diamentu napylonego wolframem oraz drugi, molibdenowy. Użycie obu tarcz jest zdeterminowane przez napięcie lampy stosowane przy danym pomiarze. Diamentową anodę wykorzystuje się w przypadku materiałów o wysokim współczynniku absorpcji, wymagających dużego natężenia prądu, które nierozdzielnie wiąże się ze znaczną różnicą potencjałów. Tarcza molibdenowa jest natomiast używana w przypadku materiałów biologicznych, jaki stanowią m.in. zastawki. Maksymalne napięcie, jakie można wtedy użyć, sięga ok. 60 kV. Katodę stanowi zwinięty, wolframowy drucik o średnicy ok. 200 μm i rozgrzewający się do temperatury 2200°C, dzięki czemu możliwe jest wybicie elektronów, które przyspieszane różnicą potencjałów wewnątrz lampy pędzą przez rurę zawierającą próżnię w kierunku anody. Uderzając w jej tarczę, przekazują swą energię kinetyczną elektronom związanym na wewnętrznych powłokach atomowych, prowadząc do uwolnienia wysokoenergetycznego promieniowania X.

4.2.2 Parametry urządzenia i ich wpływ na jakość pomiaru

W poniższej tabeli (tab. 4.1) zebrano niektóre parametry techniczne urządzenia.

Tab. 4.1. Wybrane parametry techniczne urządzenia pomiarowego Nanotom® S

Parametr	Wartość
Maksymalne napięcie na lampie	180 kV
Rozmiar ogniska	$\leq 800 \text{ nm}$
Maksymalne powiększenie 3D	1.5-100 razy
Minimalna odległość lampy od detektora	0.4 mm
Maksymalna rozdzielczość	$< 0.5 \mu\text{m}$
Wykrywalność szczegółów	$> 0.2 \mu\text{m}$
Maksymalna waga badanego obiektu	2 kg
Maksymalna wielkość badanego obiektu	15 cm x 12 cm

Wszystkie powyższe cechy wpływają na jakość otrzymanego w wyniku pomiarów obrazu. Wysokie napięcie panujące w lampie niesie ze sobą wysokie natężenie prądu, a rozdzielczość, czyli ilość pikseli zawierających informację o obrazie, ulega wtedy polepszeniu. Może osiągnąć nawet $0.5\ \mu\text{m}$, co w porównaniu z klasycznym tomografem, gdzie rząd wielkości to milimetry, daje znakomitą precyzję i poszerza wachlarz zastosowań. Podczas projektowania pomiaru trzeba jednak pamiętać o optymalizacji tych wielkości, aby poprzez zastosowanie zbyt dużych wartości nie przepalić targetu.

Duże znaczenie odgrywa również rozmiar ogniska lampy (ang. *FS - focal spot*). Gdy jest ono większe od rozmiaru piksela na detektorze, dochodzi do rozmycia krawędzi obiektu na obrazie. Jest to tzw. efekt półcienia. Można go zredukować poprzez odpowiednie dobranie rozmiaru ogniska, kierując się prostą zasadą - im mniejsze FS, tym lepiej.

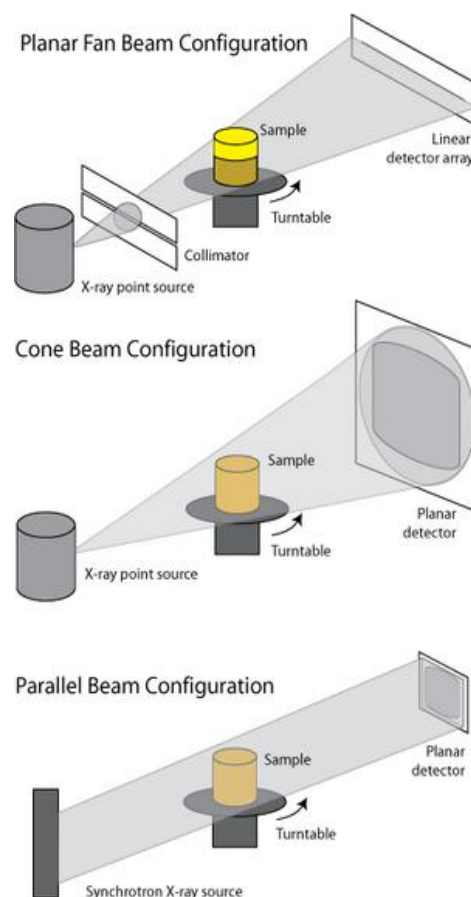
Ciekawym parametrem jest także wykrywalność szczegółów (ang. *detail detectability*). Określa rozmiary najmniejszej struktury, jaką można zarejestrować, lecz nie odtworzyć poprawnie. Oznacza to tyle, że istnieje możliwość przedstawienia na obrazie bardzo małych elementów, lecz bardzo szczegółowe informacje o ich detalach, np. drobnych odgałęzieniach, skomplikowanych zakrętach, są tracone.

4.2.3 Geometria pomiarowa

Istnieje kilka geometrii pomiarowych w mikro- i nanotomografach, dzięki którym można uzyskać informacje o strukturze wewnętrznej badanych próbek bez ingerencji w ich skład i budowę (rys. 4.3). W Nanotomie® S wykorzystywana jest najbardziej popularna, jak również najtańsza geometria pomiarowa - *cone beam*, więc to ona zostanie szerzej opisana. Wiązka promieniowania X jest emitowana ze źródła w postaci stożka, który może objąć całą próbkę. Skraca to znacznie czas akwizycji i zmniejsza szумы wpływające niekorzystnie na jakość otrzymywanych projekcji. Badany obiekt znajduje się na ruchomej, rotującej podstawie, dzięki czemu możliwe jest wykonanie wielu dwuwymiarowych zdjęć pod różnym kątem, od 0 do 360° . Dane na temat natężenia przechodzącego przez dany materiał promienio-

wania są zbierane na planarnym detektorze, następnie przesyłane do komputera, gdzie dokonywana jest ich rekonstrukcja oparta na skomplikowanych algorytmach matematycznych. W wyniku tych procesów otrzymuje się obraz tomograficzny możliwy do analizy, segmentacji, bądź trójwymiarowej wizualizacji obiektu, będący liniową mapą współczynnika pochłaniania.

Nanotom® S służy do nieniszczącej analizy wewnętrznej struktury badanych obiektów. Wykorzystywany jest w wielu dziedzinach nauki ze względu na swoją precyzję oraz zaawansowane moduły oprogramowania. Znalazł szerokie zastosowanie przy pomiarach układów elektronicznych, ograniczonych rozmiarowo i wagowo materiałów kompozytowych, minerałów, polimerów oraz wielu innych próbek, w tym biologicznych.



Rys. 4.3. Geometrie pomiarowe μ CT [15]

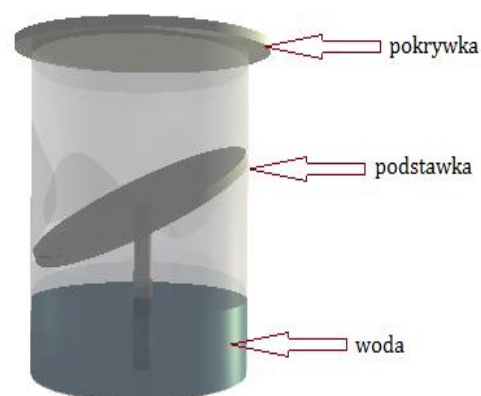
4.3 Wykonanie pomiaru

Pomiary wykonywano w 3 seriach pomiarowych, w różnym czasie, przy tych samych warunkach początkowych, aby zachować ich jednolitość. Po pierwszej, a drugą turą nastąpiła awaria sprzętu, która obniżyła maksymalne napięcie zasilania. Wpłynęło to także na jakość otrzymywanych obrazów, bowiem uległa ona widocznemu pogorszeniu.

Jak już wcześniej zaznaczono, wszystkie pomiary wykonano przy tych samych warunkach początkowych, ustawiając napięcie 60 kV oraz natężenie prądu 230 μ A. W każdym skanie mieściło się 1400 pojedynczych, trwających 0.5 s projekcji wykonanych pod różnym kątem w wyniku rotacji próbki o zadany kąt. Ostateczny obraz

powstawał w wyniku uśrednienia 4 zdjęć. W ten sposób można było nieznacznie zredukować błędy wynikające z niedoskonałości systemu poruszania próbką.

Podczas pomiaru bardzo ważne jest, aby badany obiekt pozostał nieruchomy. W przypadku materiału biologicznego, jakim są zastawki aortalne, okazało się to niemałym problemem. W trakcie skanowania płatki wysychały, zmieniając swoją objętość, co uwiadamiało się na późniejszych zdjęciach tomograficznych. Aby wyeliminować to istotne źródło artefaktów, specjalnie dla celów badań



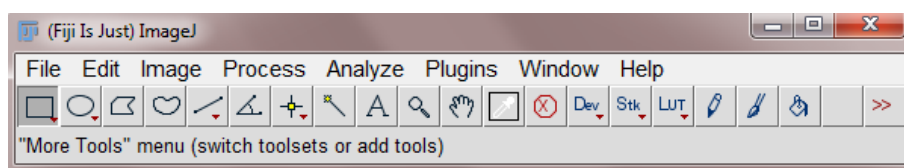
Rys. 4.4 Plastikowy, szczelnie zamykany pojemnik pomiarowy na zastawki

skonstruowano specjalny, plastikowy, szczelnie zamykany pojemnik z podstawką, na której umieszczano próbkę (rys. 4.4). W środku znajdowała się woda, dzięki której zastawka nie wysychała i nie zmieniała kształtów. Całość umieszczano w nanotomografie i wykonywano kolejne projekcje pod różnymi kątami, aby w efekcie otrzymać informację o trójwymiarowej strukturze wewnętrznej badanych płatków aortalnych.

Pomiary przeprowadzano w różnych rozdzielczościach, dobranych indywidualnie do poszczególnych zastawek tak, aby każda z nich mieściła się w całości w polu pomiarowym ($12\text{ }\mu\text{m}$, $12.474\text{ }\mu\text{m}$, $12.5\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ }\mu\text{m}$, $14\text{ }\mu\text{m}$ oraz $16\text{ }\mu\text{m}$). Uzyskane dane w postaci informacji cyfrowej zostały zapisane na 32-bitach pamięci i poddane wstępnej obróbce za pomocą oprogramowania znajdującego się w pracowni mikrotomografii. Dzięki programowi *VGStudio MAX 2.1* firmy Volume Graphics możliwe było przekonwertowanie ich do reprezentacji 8-bitowej oraz usunięcie nieistotnych pod kątem analizy fragmentów, tj. podstawki, pokrywki i ścianek naczynia pomiarowego. W efekcie uzyskano informacje dotyczące wyłącznie badanych fragmentów zastawek, które nie obciążały tak bardzo pamięci operacyjnej komputera, jak pierwotne obrazy. Na tym etapie zakończono wstępną obróbkę danych i rozpoczęto analizę jakościową oraz ilościową płatków przy pomocy programu *Fiji* oraz *Microsoft Office Excel 2007*.

4.4 (Fiji Is Just) ImageJ

Fiji jest aplikacją dostępną w domenie publicznej - dystrybucją znanego programu *ImageJ* wykorzystywanego do analizy obrazów, uzupełnioną o zestaw wtyczek (ang. *plug-ins*). Działa na każdym komputerze posiadającym *Java 1.5*. bądź starszą maszynę wirtualną, a pobrać można go bezpośrednio ze strony producenta: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Program ten posiada przejrzyste menu, w którym znajduje się wiele użytecznych narzędzi pozwalających na analizę, przetwarzanie, edycję, zapisywanie oraz drukowanie 8-, 16- oraz 32-bitowych obrazów w szerokiej bazie formatów, m.in. TIFF, GIFF, JPEG, BMP, DICOM, czy surowej wersji "raw". Został napisany w Javie, języku cieszącym się niezwykle popularnością, co czyni go jeszcze bardziej przystępnym dla użytkownika.



Rys. 4.5. Fiji

Przy pomocy tego programu można stworzyć histogramy gęstości, zmierzyć odległości i kąty między wybranymi obiektami, sterować kontrastem, wygładzić obraz, nałożyć filtr, czy też znaleźć krawędzie. Dzięki tej domenie można w łatwy sposób połączyć kilka zdjęć, dokonać ich segmentacji, bądź wizualizacji badanej struktury w 3D. Szeroką gamę możliwości poszerzają dodatkowo liczne wtyczki programowe (ang. *pluginy*), które można aktualizować i instalować wedle własnych potrzeb. Warto wspomnieć, że w *Fiji* dzieje się to automatycznie, więc nie trzeba tego robić za każdym razem ręcznie. W pracy inżynierskiej korzystano głównie z wtyczki *BoneJ* opisanej w następnym podrozdziale, dzięki której możliwe było policzenie objętości wybranej frakcji, jej powierzchni oraz średniej wielkości. Dokonano tego za pomocą odpowiednich opcji: *Volume Fraction*, *Isosurface* oraz *Thickness*.

4.5 BoneJ

Wtyczka *BoneJ* została stworzona z myślą o analizie materiału biologicznego, jakim są kości. Posiada zestaw narzędzi doskonale nadających się do badania beleczek będących podstawą konstrukcyjną istoty gąbczastej, użytecznych także w przypadku innych obiektów badawczych. Niektóre z opcji oferowanych przez tę wtyczkę wykorzystano podczas analizy obrazów tomograficznych płatków półksiężycowatych zastawki aortalnej. Są to: *Volume Fraction*, *Isosurface* oraz *Thickness*.

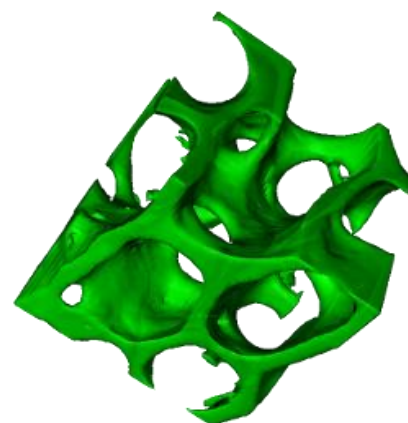
- ***Volume Fraction (BV/TV, ang. bone volume/total volume)***

Opcja ta umożliwia wyznaczenie objętości danej frakcji wyznaczonej poprzez obrany próg jasności. Wymaga obrazów binarnych, 8- lub 16-bitowych, z zaznaczonym ROI (ang. *Region Of Interest*) lub samej listy ROI.

Istnieją dwie metody wyznaczenia objętości: jedna (oparta na *voxelach*) oraz druga, bazująca na siatce dopasowanej do powierzchni. W pierwszej BV (ang. *bone volume*) stanowi ilość jednostkowych elementów objętości interesującego fragmentu obrazu, a TV (ang. *total volume*) to pozostałe *voxele* danej projekcji. Druga metoda dopasowuje do badanego obszaru siatkę, której powierzchnia ogranicza szukaną objętość. W wyniku zastosowania *Volume Fraction* otrzymuje się: BV, TV, BV/TV oraz (opcjonalnie) trójwymiarową projekcję powierzchni BV oraz TV w różnych kolorach.

- ***Isosurface***

Wtyczka *BoneJ* wśród wachlarza możliwości oferuje również narzędzie służące do obliczenia pola powierzchni zajmowanej przez badany obiekt na binarnym lub 8-bitowym obrazie. W oparciu o algorytm "wędrujących sześcianów" wynaleziony w 1987 r. oraz trójkątną siatkę dopasowaną do całego obszaru oblicza powierzchnię, jaką zajmuje dana struktura oraz sumę pól trójkątów, jakie się w niej znajdowały na pierwotnej siatce. *Isosurface* umożliwia własnoręczny

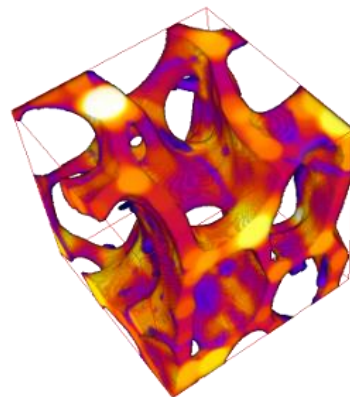


Rys. 4.6 Wizualizacja w 3D fragmentu powierzchni uzyskana dzięki zastosowaniu opcji *Isosurface* [12]

wybór parametrów: ilości operacji próbkowania, decydującej o stopniu wygładzenia siatki, progu izolującego interesujący obszar oraz wizualizacji w 3D.

- *Thickness*

Opcja *Thickness* umożliwia obliczenie średnicy badanego obiektu (Tb. Th), jego otoczenia (TB. Sp) wraz z odchyleniem standardowym. Jej działanie polega na losowaniu punktu w zadanej przestrzeni, a następnie dopasowywaniu okręgów o coraz większej średnicy, aż do momentu, gdy dotkną krawędzi badanego obszaru. Wymaga obrazów binarnych, których rozmiar wpływa na szybkości obliczeń dokonywanych podczas uruchomienia omawianej opcji.



Rys. 4.7 Efekt działania opcji *Thickness*; różne kolory oznaczają różne średnice danych fragmentów obiektu [12]

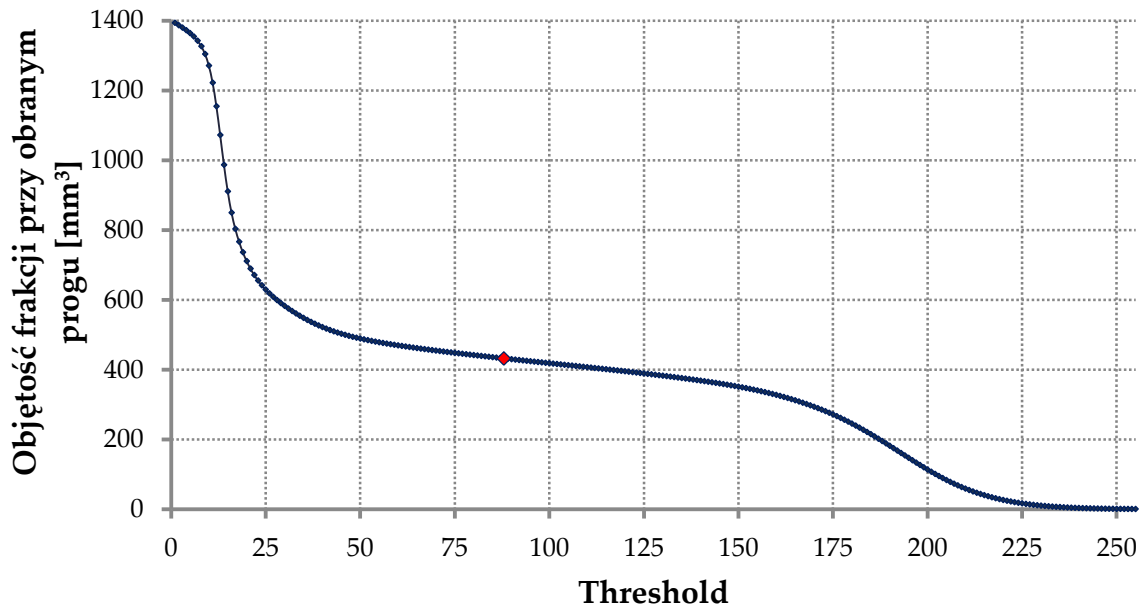
5 ANALIZA JAKOŚCIOWA

Po wykonaniu pomiarów mikrotomograficznych przystąpiono do analizy otrzymanych obrazów przekrojowych płatków półksiężycowatych. Jej przedmiotem są głównie złogi znajdujące się w badanych próbkach, w mniejszym stopniu tkanka miękka. W tym rozdziale pracy skupiono się na ich odseparowaniu z obrazu, zbadaniu rozmieszczenia w zastawkach oraz zróżnicowania pod względem gęstości.

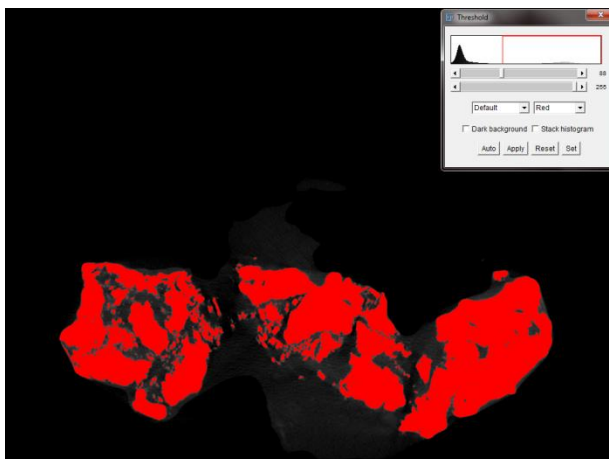
5.1 Oszacowanie progu separującego złogi od tkanki miękkiej

W pierwszej kolejności zajęto się oszacowaniem progu (ang. *Threshold*), tj. poziomu szarości, który pozwoliłby oddzielić tkankę miękką od zwapnień. Umożliwiło to późniejsze obliczenie procentowego udziału złogów w całym płatku, a także ocenę gęstości oraz stopnia pofałdowania grudki. Jak się okazało, każda zastawka wymagała indywidualnego potraktowania. Uniemożliwiło to zastosowanie ujednoliconego schematu postępowania, który usprawniłby proces analityczny. Dla każdej należało osobno dobrać odpowiedni, graniczny poziom szarości, bazując na krzywej progowania (wyk. 5.1). Sporządzono ją na podstawie wartości objętości liczonej dla

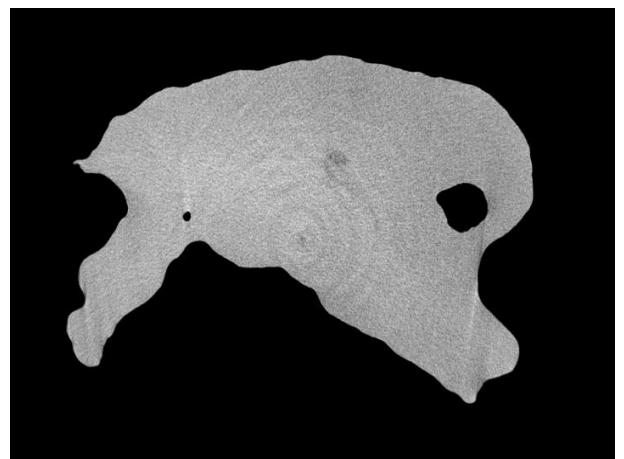
wartości *Threshold* znajdujących się w zakresie 1-255, czyli skali szarości dostępnej dla obrazu zapisanego na 8-bitach. Dokonano tego w programie *Fiji*, stosując opcję *Volume Fraction* dostępną we wtyczce *BoneJ*. Analizie poddano obrazy, na które wcześniej nałożono filtr medianowy *Median 3D*. Jego działanie polega na przypisaniu danemu elementowi objętości średniej arytmetycznej wartości sąsiadujących z nim *voxeli*. Powoduje to nieznaczną redukcję szumów oraz poprawę jakości obrazu.



Wyk. 5.1. Przykładowa krzywa progowania sporządzona dla zastawki Z16; kolorem czerwonym zaznaczono obrany próg binaryzacji

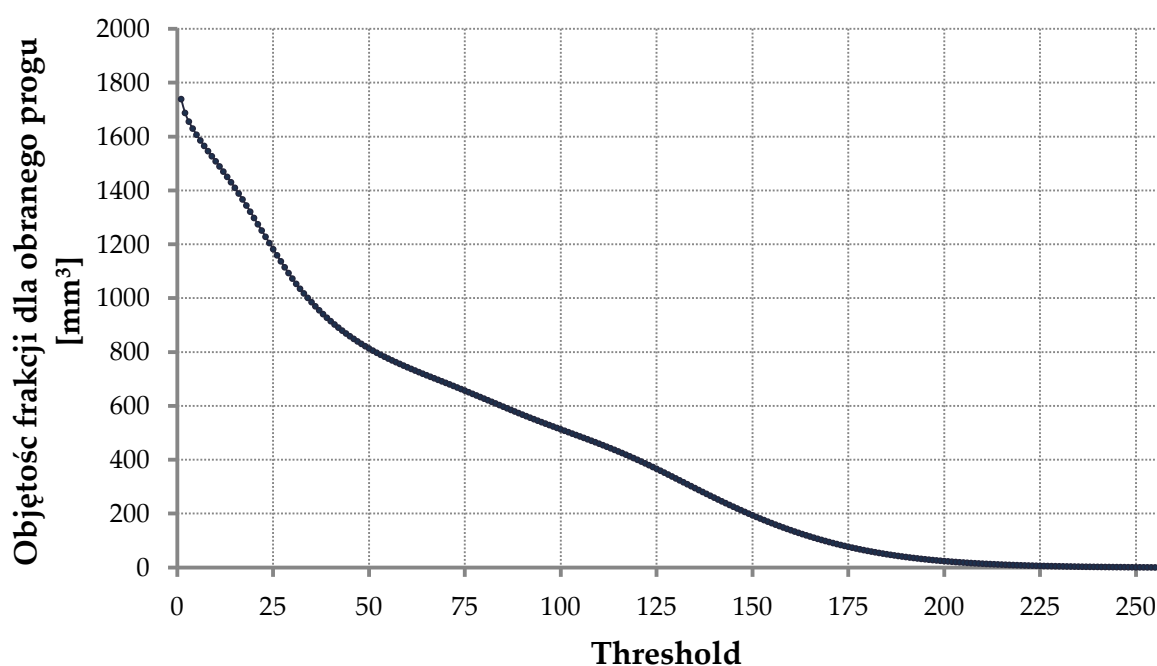


Rys. 5.2 Próg binaryzacji dla obrazu zastawki Z16 separujący złogi



Rys. 5.1. Wybrany przekrój przez zastawkę Z19 z widocznymi artefaktami kołowymi

Próg (rys. 5.1) został obrany na podstawie analizy projekcji oraz kształtu krzywej. W tym celu ponownie posłużono się programem *Fiji*, wybierając dostępną opcję służącą do binaryzacji obrazu: *Image* → *Adjust* → *Threshold*. Niestety, jednoznaczne określenie jego wartości nie było możliwe ze względu na obszar *plateau* w granicach ok. 25-175 (wyk. 5.1), dlatego bazowano głównie na wizualnej ocenie przekrojów. Metodyka pozostawała ta sama dla wszystkich zastawek, mimo to poszczególne krzywe różniły się od siebie. Niektóre posiadały dość wyraźne załamania, umożliwiające jednoznaczną ocenę szukanego poziomu szarości, jednak w większości stanowiło to kwestię sporną. Problem starano się rozwiązać na drodze wnikliwej analizy obrazów tomograficznych. Tam, gdzie krzywa progowania posiadała niemal płaski obszar *plateau* (wyk. 5.1) można było z dość dużym powodzeniem zaufać własnym obserwacjom, bowiem w szerokim zakresie szarości wartość objętości frakcji dla danego progu podlegała niewielkim zmianom. Trudniejsza okazała się ocena krzywych, których przebieg był bardziej złożony. Przykładem może być ta sporządzona dla zastawki Z42 (wyk. 5.2). Jak widać, już niewielka zmiana wartości progu powoduje znaczne różnice w objętości frakcji, co może zafałszować informacje.



Wyk. 5.2. Krzywa progowania sporządzona dla zastawki Z42

Zestawienie wszystkich wartości wybranych progów przedstawia tabela 5.1 umieszczona w dodatku A (zestawienie szczegółowych danych liczbowych). Na jej podstawie można łatwo wywnioskować, że płatek pochodzący z zastawki Z19 znacznie odbiega wartością obranego progu od reszty. Może to być spowodowane niską jakością analizowanego obrazu (posiadał znaczne szумы, m.in. w postaci artefaktów kołowych) (rys. 5.2).

5.2 Histogramy gęstości złogów wapniowych

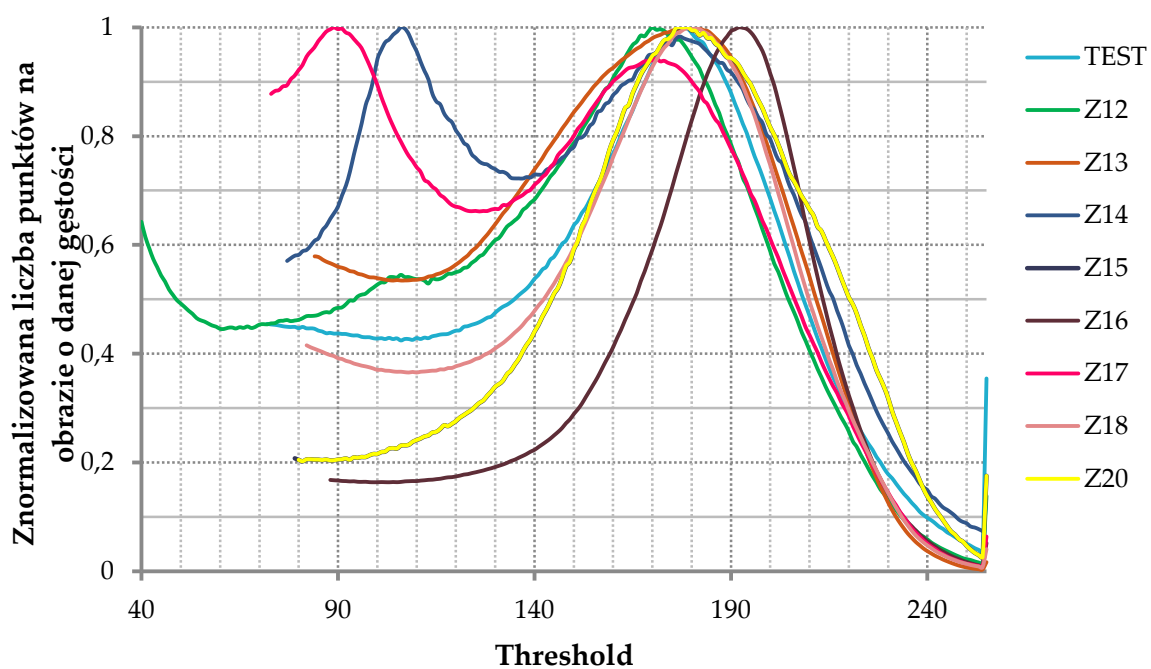
Po ustaleniu progu binaryzacji przystąpiono do oceny histogramów gęstości złogów, która wiąże się ze stopniem, w jakim dany materiał absorbuje promieniowanie rentgenowskie podczas pomiaru mikrotomograficznego.

Sporządzono je w programie *Microsoft Office Excel 2007* na podstawie liczby zliczeń punktów o danej gęstości (odpowiadających określonej szarości na obrazie), otrzymanych dzięki opcji *Analyze→Histogram*. Materiały charakteryzujące się większą gęstością lepiej absorbują promieniowanie, stąd na projekcji przyjmują jaśniejszy odcień.

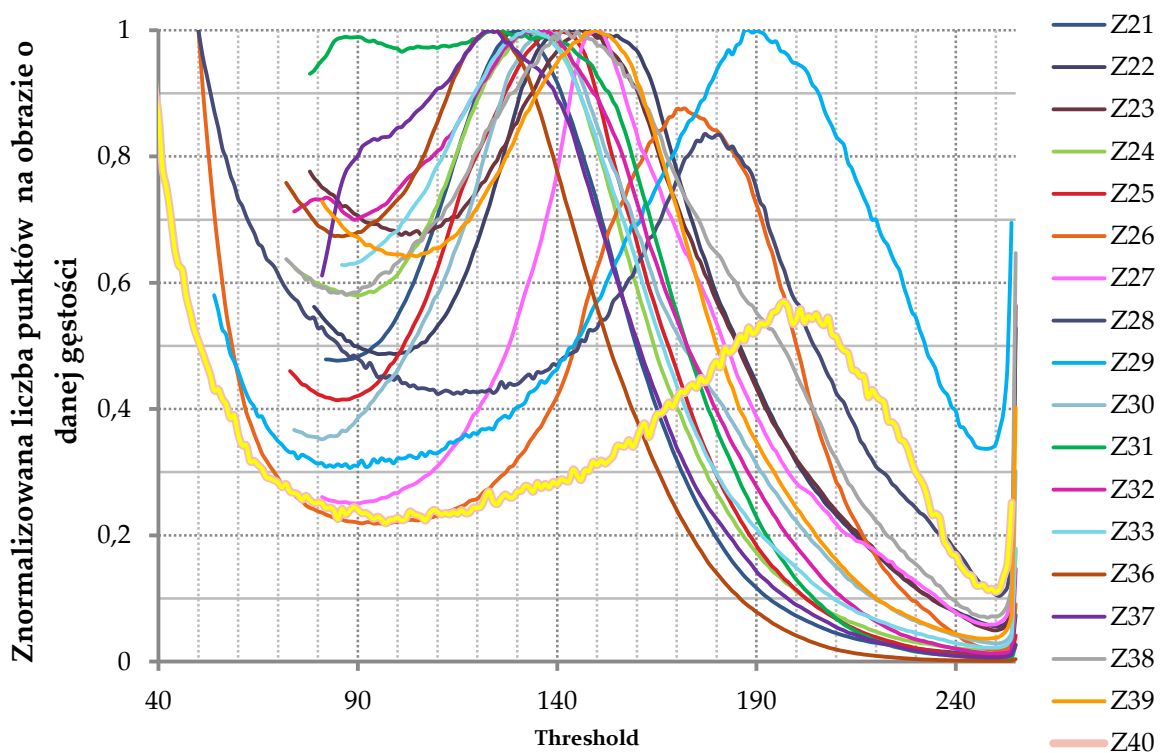
Otrzymane wartości znormalizowano względem największej z nich, aby umożliwić późniejsze porównywanie ze sobą poszczególnych zastawek. Na wykresach zbiorczych zebrano dane dla 3 serii pomiarowych:

- **I seria:** TEST, Z12 Z20,
- **II seria:** Z21-Z33, Z36-Z40
- **III seria:** Z41 - Z44, Z46 - Z47.

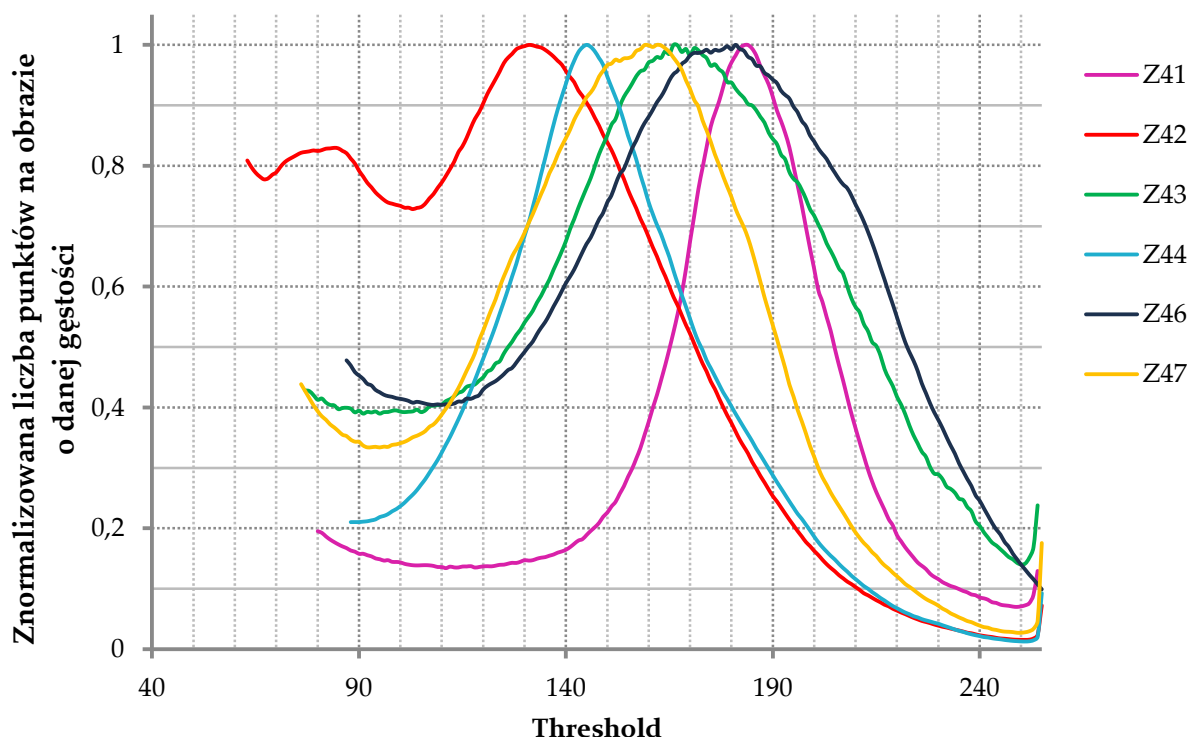
Na wykresach nie umieszczono krzywej odpowiadającej próbce Z19, ponieważ znacznie odbiegała od reszty wartością obranego progu (tab. 5.1, dodatek A). Stało się to podstawą do jej odrzucenia i nie uwzględniania w dalszym toku analiz jakościowych oraz ilościowych.



Wyk. 5.3. Wykres zbiorczy histogramów gęstości zlogów dla zestawów z I serii pomiarowej: TEST, Z12-Z20 (z pominięciem Z19)

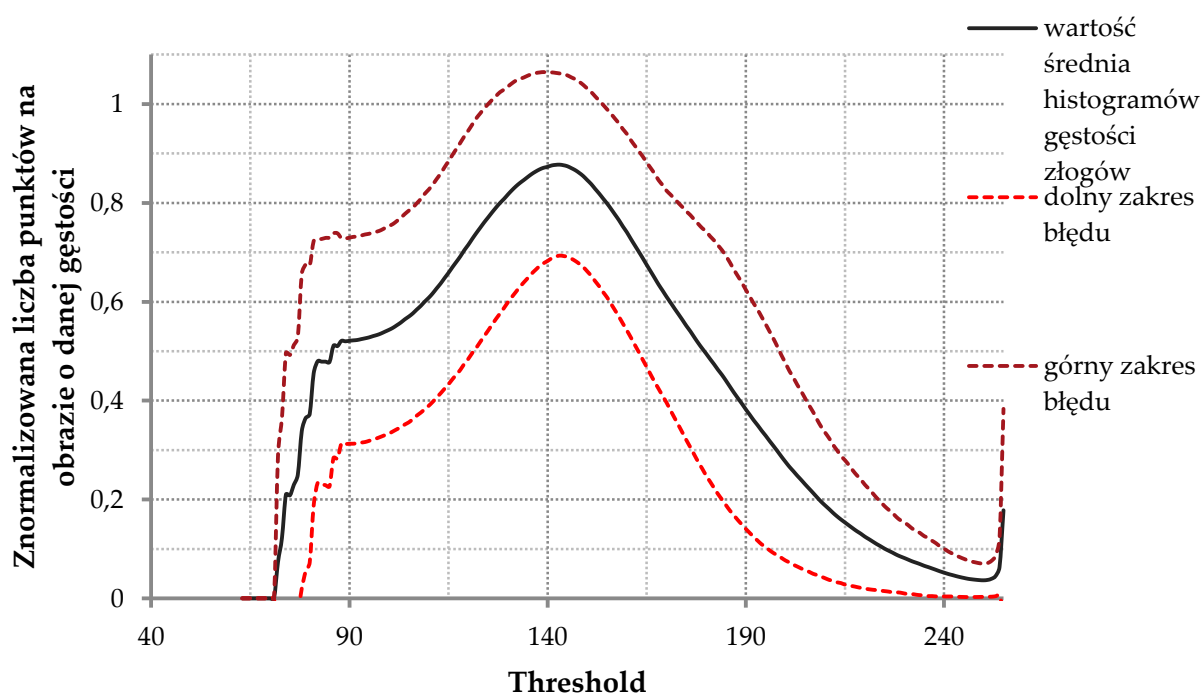


Wyk. 5.4 Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości zlogów dla zestawów z II serii pomiarowej: Z21-Z33, Z36-Z40



Wyk. 5.5. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości złogów dla zastawek z III serii pomiarowej: Z41-Z44, Z46-Z47

Analizując wykresy 5.3, 5.4 i 5.5 można dojść do wniosku, że krzywe mają podobny kształt (jeden, dość szeroki, dobrze rozróżnialny pik), tylko nieliczne odbiegają nieznacznie od schematu (Z14, Z17 - wyk. 5.3; Z26, Z28, Z29, Z40 - wyk. 5.4; Z42 - wyk. 5.5). Widoczna jest także różnica między położeniem maksimum piku dla poszczególnych grup. W pierwszej serii mieści się ono w zakresie 160-170, w drugiej oscyluje przeważnie w granicach 120-160, natomiast w trzeciej mieści się w przedziale 130-180. Jak już wcześniej wspomniano, taki rozrzut może być spowodowany pogorszeniem jakości obrazów na skutek awarii układu zasilającego nanotomograf mającej miejsce po pierwszej turze pomiarów. W celu uwzględnienia tego faktu sporządzono wykres zbiorczy prezentujący wypadkową wartość pochodzącą ze złożenia znormalizowanych histogramów gęstości, odrzucając całą I serię pomiarową oraz nieliczne egzemplarze z pozostałej puli próbek: Z26, Z28, Z29, Z40 (posiadające bardzo mało złogów w swojej objętości), Z42 i Z44 (o bardzo dużym stopniu zwapnienia) (wyk. 5.6). Obliczono również odchylenie standardowe tej wielkości i na jego podstawie zaznaczono obszar niepewności (przerwane linie).

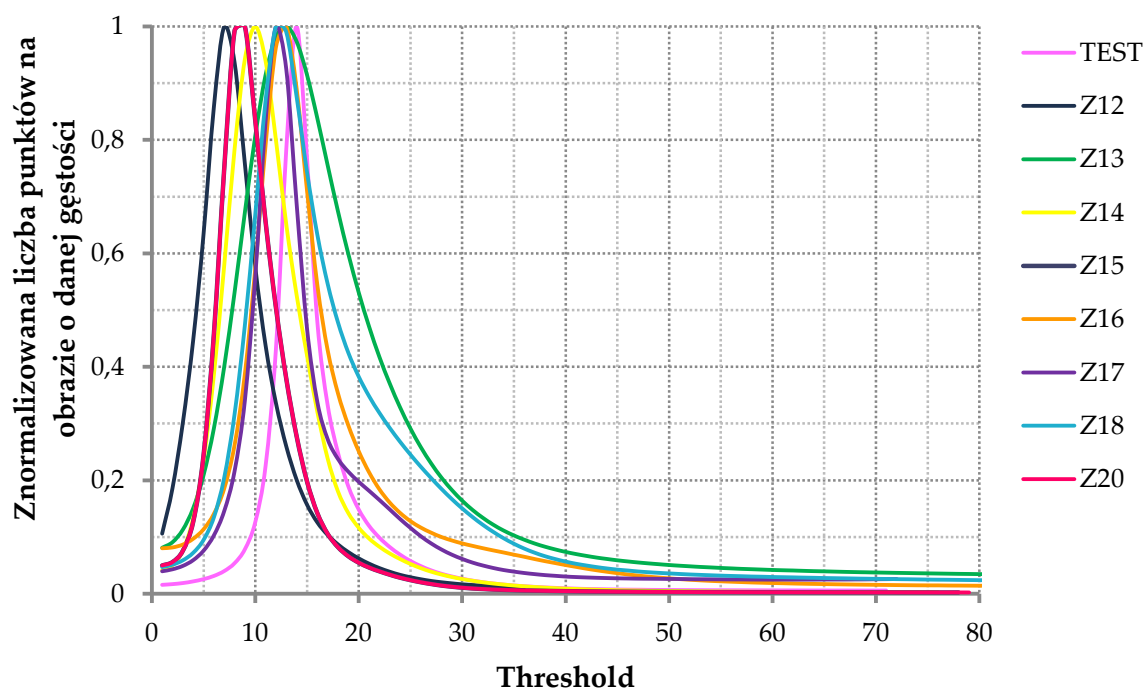


Wyk. 5.6. Wykres zbiorczy obrazujący średnią wartość gęstości złogów pochodzącą ze złożenia ich histogramów gęstości (po odrzuceniu I serii pomiarowej oraz kilku próbek z pozostałej puli) wraz z zaznaczonym obszarem niepewności wyznaczonym na podstawie odchylenia standardowego.

Na wykresie 5.6 wyraźnie widać jeden, główny pik, który wedle oczekiwań posiada maksimum w okolicy 140. Mimo dość dużego wahanía liczby punktów o określonej gęstości w obrębie zastawek zobrazowanym poprzez odchylenie standardowe można postawić hipotezę, iż obecne złogi są zbudowane z tego samego materiału. Jest on różnie wysycony, lecz pod względem składu pierwiastkowego pozostaje podobny.

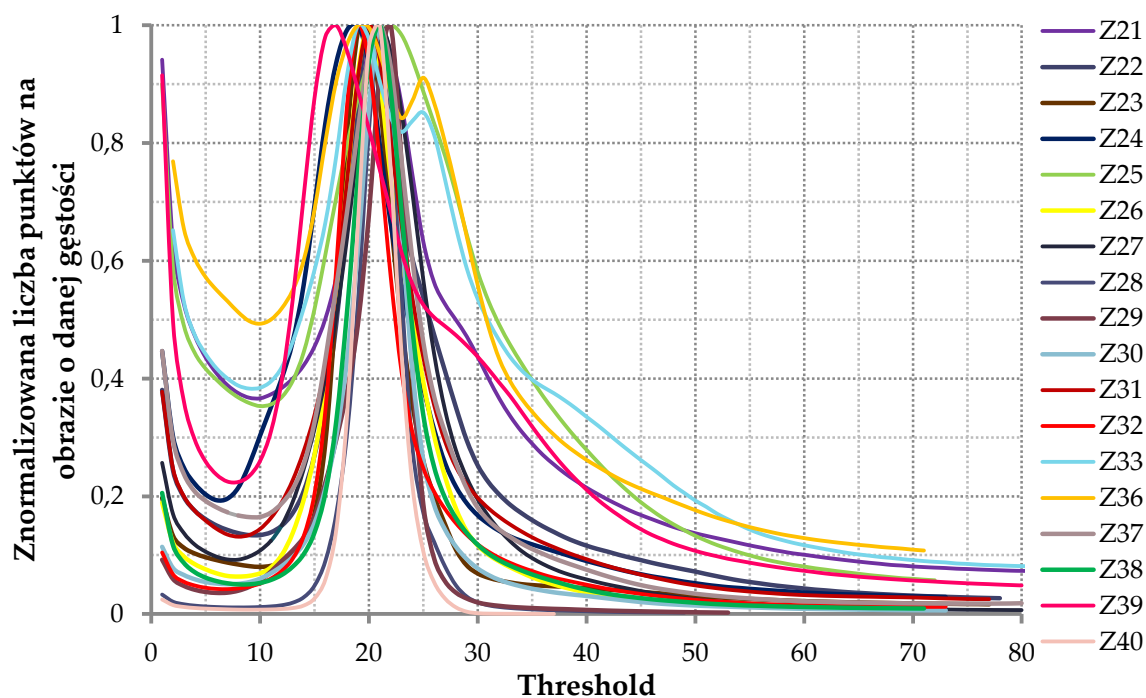
5.3 Histogramy gęstości tkanki miękkiej zastawki aortalnej

Kolejnym krokiem było wykonanie podobnych histogramów gęstości dla tkanki miękkiej. Miało to na celu zbadanie jej jednorodności w poszczególnych zastawkach oraz sprawdzenie, czy wpływ na nią ma stopień zwapnienia. Do sporządzenia wykresów wykorzystano obrane wcześniej dla złogów separujące poziomy szarości (progi binaryzacji) (tab. 5.1) oraz wartości zliczeń punktów o danej gęstości z obrazów mikrotomograficznych, uzyskane podczas analizy zwapnień. Zachowano także podział na serie pomiarowe: I, II i III.

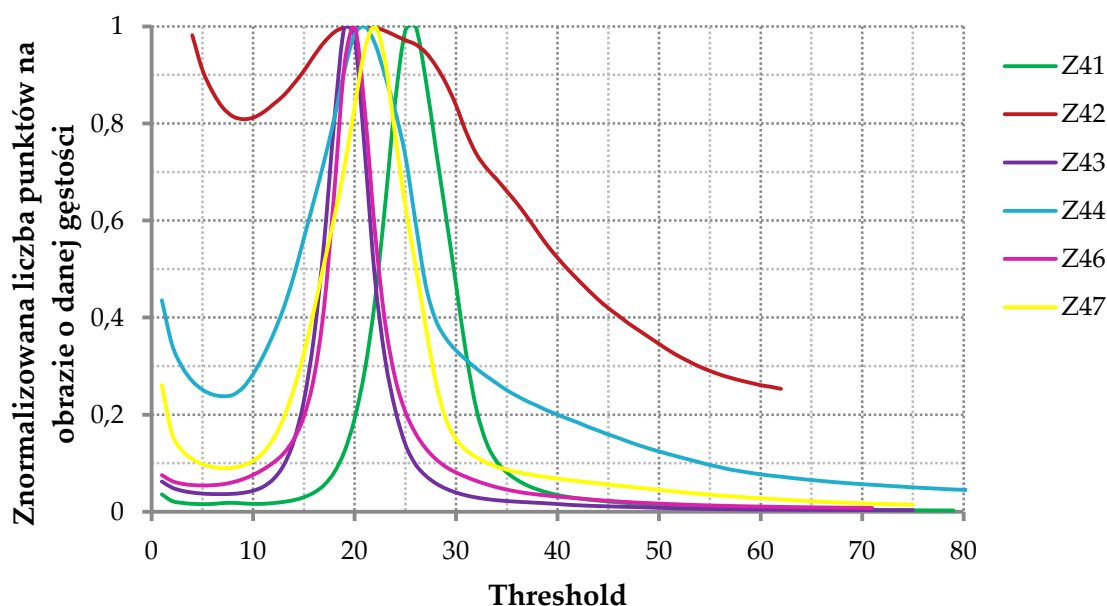


Wyk. 5.7. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z I serii: TEST, Z12-Z20 (z odrzuceniem Z19)

W obrębie I tury widać dużą jednorodność tkanki miękkiej w obrębie płatków półksiężycowatych. Krzywe posiadają wąskie piki, po jednym dla każdej zastawki, których maksimum oscyluje w tych samych granicach: 6-16.



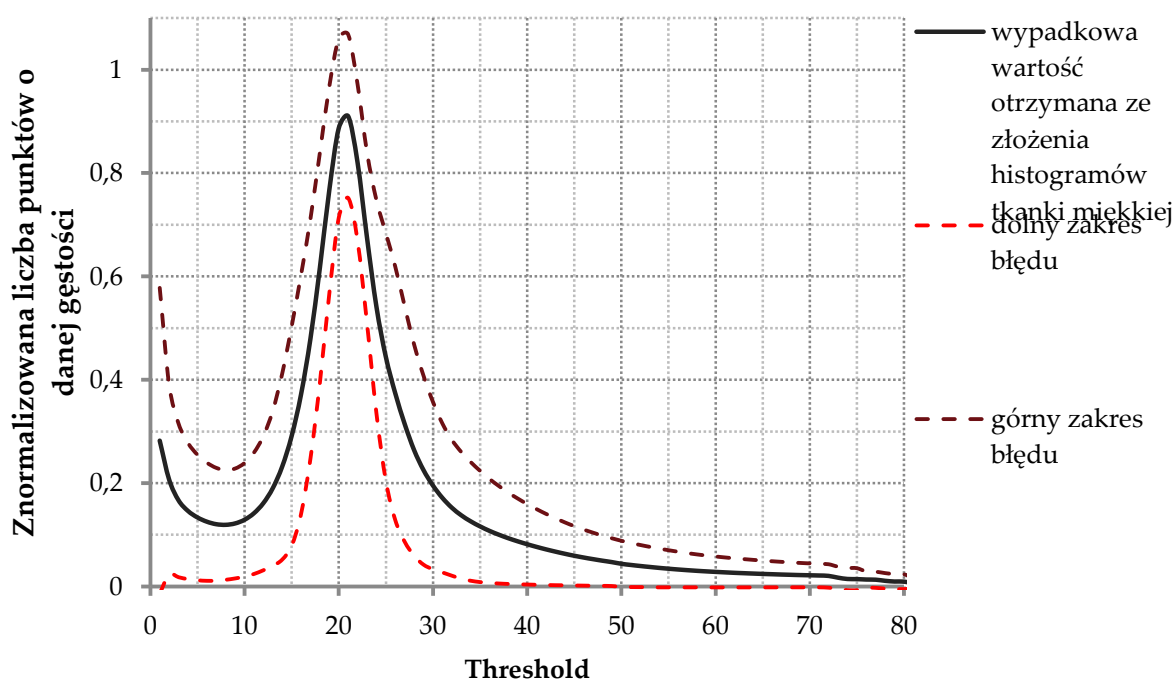
Wyk. 5.8 Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z II serii: Z21-Z33, Z36-Z40



Wyk. 5.9. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z III serii: Z41-Z44, Z46-Z47

Na podstawie obserwacji można stwierdzić, że krzywe dla tkanki miękkiej mają podobny kształt. Jedynie Z33, Z36 oraz Z39 posiadają 2 słabo rozróżnialne piki, co odróżnia je od pozostałych zastawek. Inaczej wygląda także histogram dla Z42. Próbką ta posiada bardzo duże i zróżnicowane złogi, co uwidacznia się w odmiennym kształcie krzywej. Na wykresach można również zauważyć zależność od serii, w jakiej został wykonany dany pomiar. Tę samą sytuację obserwowano w przypadku grudek wapniowych. Objawia się ona w położeniu maksimum pików - dla I tury leży w zakresie 6-16, natomiast dla pozostałych płatków półksiężycowatych oscyluje w granicach 16-26. Ponownie zmiany te argumentuje się gorszą jakością analizowanego obrazu dla późniejszych pomiarów. Warto zwrócić uwagę, że mimo niewielkich różnic w budowie morfologicznej i anatomicznej maksimum pozostaje w dużej mierze stałe, co świadczy o jednorodności składu materiału tkankowego. Zawartość procentowa złogów nie wpływa znacząco na ten fakt.

W celu porównania ze sobą znormalizowanych histogramów gęstości sporządzono wykres zbiorczy (wyk. 5.10) prezentujący wypadkową wartość liczby punktów o danej jasności na obrazie, po odrzuceniu I serii oraz kilku próbek wyróżniających się na tle pozostałych: Z33, Z36, Z39 i Z42. Wyznaczono również odchylenie standardowe, a na jego podstawie zaznaczono obszar błędu (przerywane linie).



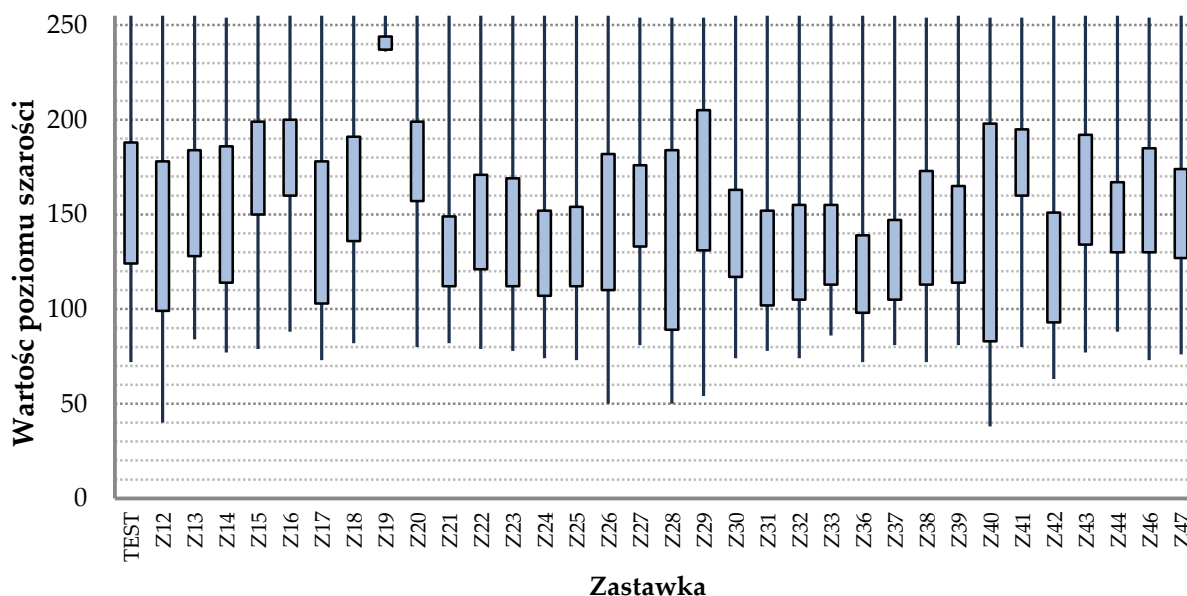
Wyk. 5.10. Wykres zbiorczy obrazujący średnią wartość gęstości tkanki miękkiej pochodzącą ze złożenia ich histogramów gęstości (po odrzuceniu I serii pomiarowej oraz kilku próbek z pozostałej puli) wraz z zaznaczonym obszarem niepewności (przerywane linie)

Tkanka miękka jest bardzo słabo zróżnicowana pod względem zawartości frakcji o różnych gęstościach. Świadczy o tym jeden, wąski pik z maksimum w granicy 20 obecny na krzywej sporządzonej dla pojedynczego płątka oraz niewielkie odchylenie standardowe warunkujące mały zakres błędu. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami.

5.4 Analiza statystyczna histogramów gęstości złożeń

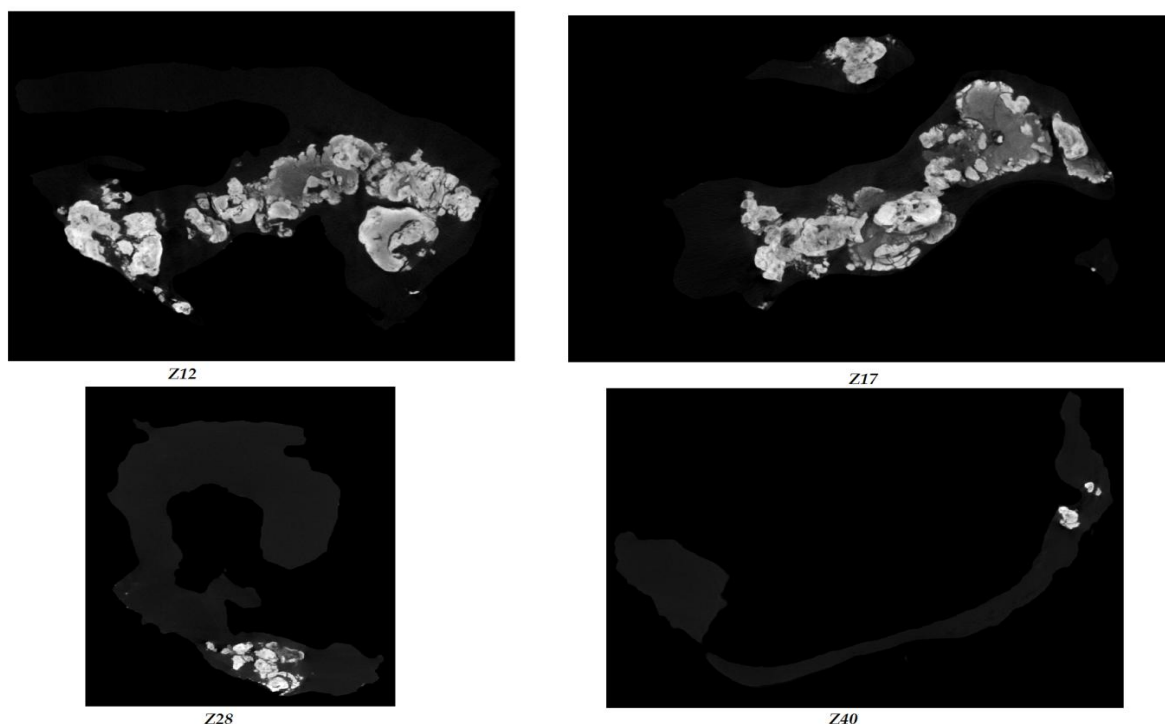
Po makroskopowej obserwacji krzywych przystąpiono do bardziej szczegółowych analiz statystycznych histogramów gęstości. W tym celu wykorzystano dolne i górne kwartyle (I i III), których zadanie polega na podziale obserwacji na 4 równe grupy wyznaczone na podstawie sumy liczby punktów o danej gęstości w obrębie jednej próbki. Przykładowo, wartość pierwszego kwartyla stanowi próg binaryzacji, poniżej którego suma liczby zliczeń danych punktów dla poszczególnych, niższych poziomów szarości stanowi 25% całości. Dzięki kwartyłom możliwa jest ocena zróżnicowania badanej cechy, opisywana poprzez tzw. rozstęp kwartylny.

Określono także wartość maksymalną oraz minimalną dla obranego wcześniej progu binaryzacji (tab. 5.1, dodatek A). Wszystkie uzyskane dane zebrano w tabeli 5.2 (dodatek A). Na jej podstawie sporządzono wykres pudełkowy (wyk. 5.11), dzięki któremu możliwa jest ocena rozpiętości gęstości w obrębie złogów wyrażona poprzez różne poziomy szarości



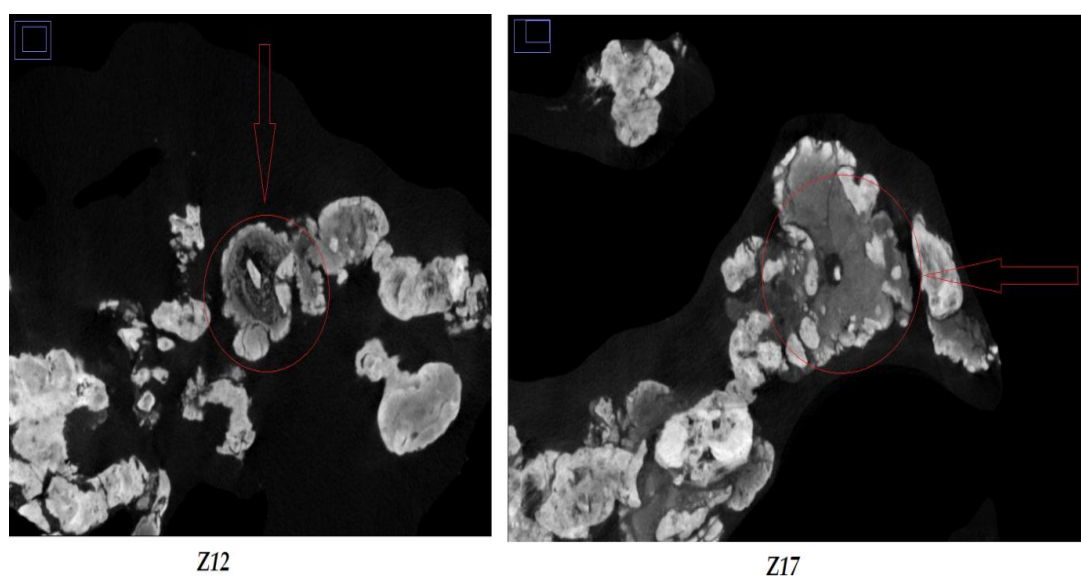
Wyk. 5.11 Analiza statystyczna histogramów gęstości złogów

Na podstawie wykresu 5.11 można stwierdzić, że większość pików cechuje się podobnym zakresem gęstości, mimo że ich dolna granica jest nieco różna. Widać tu przesunięcie w stronę wyższych wartości dla zastawek z serii I oraz III. Można dostrzec, że zastawka Z19 znacznie odbiega od reszty, co stanowi podstawę do jej odrzucenia i nie uwzględniania w dalszych pomiarach. Potwierdzają to także dane z tabel 5.1 oraz 5.2. Ciekawy jest również fakt, że niektóre piki są bardzo szerokie. Oznacza to znaczne zróżnicowanie w obrębie badanej cechy, jaką jest gęstość danego obszaru złogów (zobrazowana w postaci poziomów szarości na obrazie). Na podstawie rozpiętości kwartylnej, tj. różnicy między pierwszym (dolnym), a trzecim (górnym) kwartylem, wybrano 4 najszerokie piki i ponownie przyjrano się obrazom tomograficznym odpowiadających im zastawek: Z12, Z17, Z28 oraz Z40 (rys. 5.3).



Rys. 5.3. Wybrane przekroje przez płatki zastawek Z12, Z17, Z28 oraz Z40

Na powyższym rysunku można zauważyć podobieństwa między wybranymi płatkami zastawek aortalnych. Wszystkie cechuje dość skomplikowany kształt, a znajdujące się w nich złoże mają szeroki zakres gęstości widoczny w postaci różnych poziomów szarości. Z28 oraz Z40 posiadają nieliczne grudki skupione w jednej, skrajnej części próbki. W Z12 i Z17 są one rozmieszczone centralnie, zebrane w duże skupiska. Warto także przyrzeć się dokładniej ich bardzo zróżnicowanej, wewnętrznej strukturze (rys. 5.4).



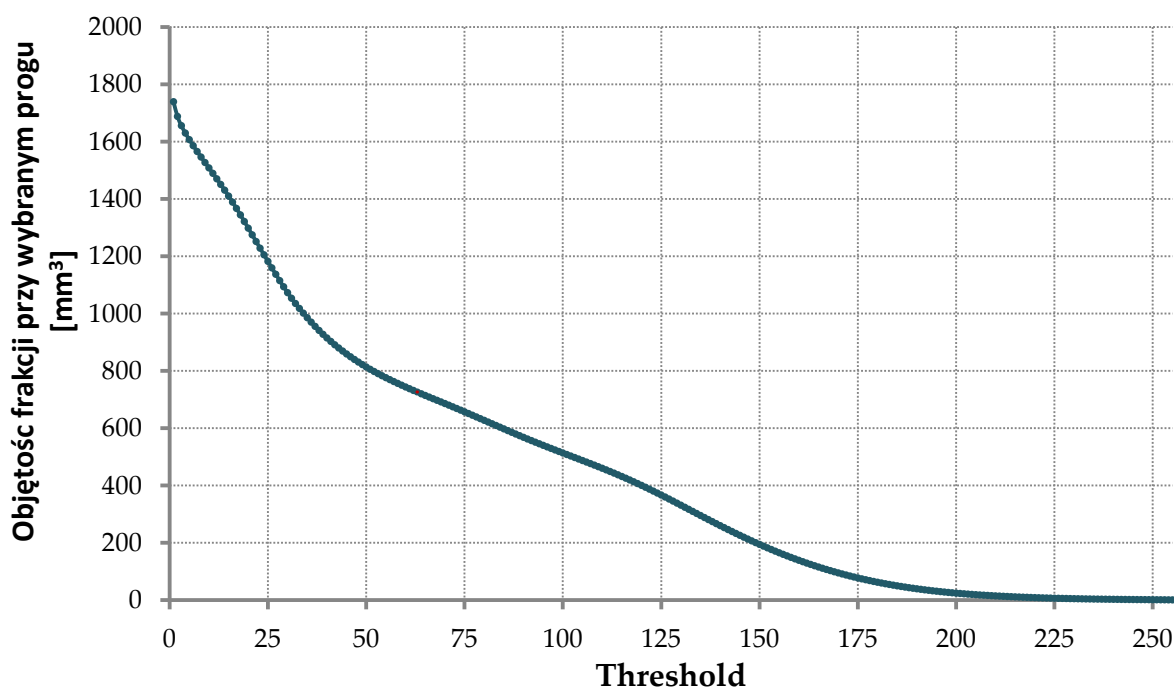
Rys. 5.4 Powiększone fragmenty zastawek Z12 oraz Z17 z interesującymi fragmentami zaznaczonymi kolorem czerwonym

- 1) Proces rozpoczyna się od tworzenia małych, gęstych złogów, które następnie łączą się w większe skupiska poprzez stopniowo wapniejącą tkankę miękką na skutek odkładania się soli w jej objętości.
- 2) Początkowo obszar tkanki wapnieje równomiernie. W miarę upływu czasu część soli migruje w obrębie jej objętości, grupując się w skupiska, stopniowo zwiększające swoją gęstość. Daje to efekt "wypłukania" tkanki miękkiej płata zastawki aortalnej z soli wapnia, widoczny na obrazie mikrotomograficznym w postaci ciemnych obszarów znajdujących się wokół jasnych grudek.

Po przeanalizowaniu złogów zajęto się tkanką miękką. Na podstawie danych zawartych w tabeli 5.3 (dodatek A) sporządzono wykres pudełkowy (wyk. 5.12).

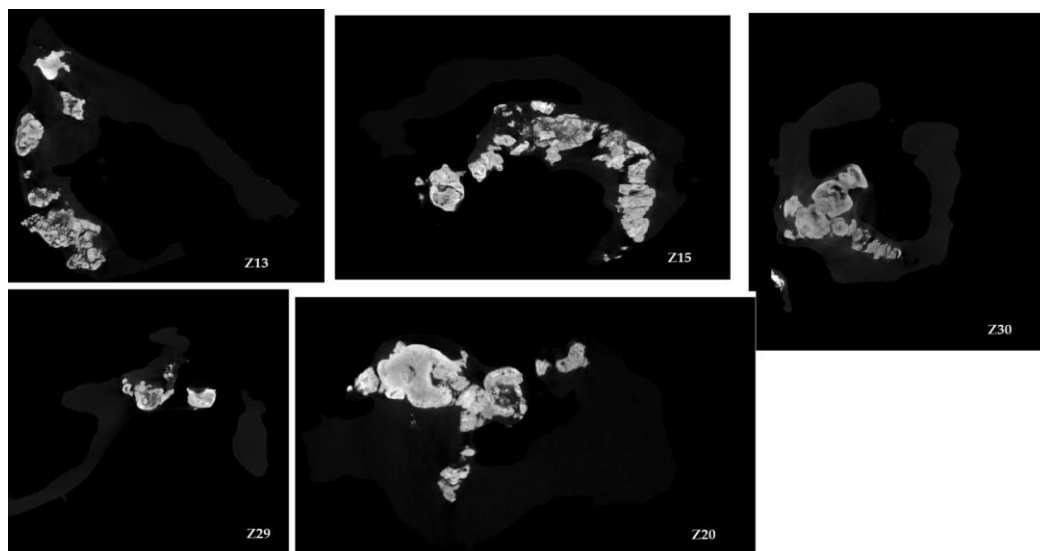


Na wykresie 5.12 można zauważyć dużą jednorodność badanej cechy tkanki miękkiej, tj. gęstości. Jej górny zakres sięga ok. 70-80. Wyjątkiem są próbki: Z12, Z26, Z28, Z29 oraz Z40. Dla nich konieczne było ustalenie progu binaryzacji na niższym poziomie, niż w pozostałych płatkach, co może być spowodowane bardziej stromym nachyleniem krzywych progowania. Widać tu również różnice w rozmieszczeniu pików oraz położeniu ich wartości maksymalnej. Dla zastawek z I serii znajdują się w zakresie 7-24, z maksimum w okolicy 12, natomiast dla II tury pomiarowej ulegają przesunięciu do obszaru jasności 13-37, osiągając maksymalną wartość oscylującą wokół 20. Podobnie jest w przypadku III serii. Wyjątek stanowi zastawka Z42, odbiegająca pod tym względem od reszty. Jej krzywa progowania miała nietypowy przebieg, bowiem opadała znacznie łagodniej od pozostałych, dając obszar *plateau* utrudniający jednoznaczne określenie progu separującego złoży (wyk. 5.13). Dodatkowo grudki znajdujące się w obrębie tkanki były bardzo zróżnicowane pod względem gęstości i osiągały dość duże rozmiary. Przypuszcza się, że mogło to nieznacznie wpłynąć na jej skład pierwiastkowy.



Wyk. 5.13. Krzywa progowania dla zastawki Z44

Podobnie, jak w przypadku zwapnień, przyjrzano się dokładniej kilku zastawkom wyróżniającym się na tle reszty. Jako kryterium wyboru ustalono najmniejszy rozstęp kwartylny odpowiadający najmniejszemu zróżnicowaniu gęstości w obrębie tkanki, zobrazowanej poprzez poziom szarości na obrazie, eliminując jednocześnie Z12, Z17, Z28 oraz Z40 analizowane wcześniej.



Rys. 5.5. Wybrane przekroje przez zastawki Z13, Z15, Z30, Z29 i Z20

Jak widać na rysunku, złogi znajdują się w stosunkowo dużych skupiskach. Posiadają liczne, małe grudki (Z13, Z15), jak również gęste i zajmujące dużą powierzchnię obszary zwapnienia. Łatwo je odróżnić od tkanki miękkiej, granica między nimi jest dość dobrze widoczna. Grudki są ponadto zróżnicowane pod względem gęstości. Ten fakt skłonił do ponownego przyjrzenia się wykresom 5.11 i 5.12. Na ich podstawie można dojść do ciekawego wniosku - szerokim pikom złogów towarzyszą zwykle wąskie piki dla tkanki miękkiej. Stwierdzenie to jest niesprzeczne z wysnutą wcześniej hipotezą.

6 ANALIZA ILOŚCIOWA

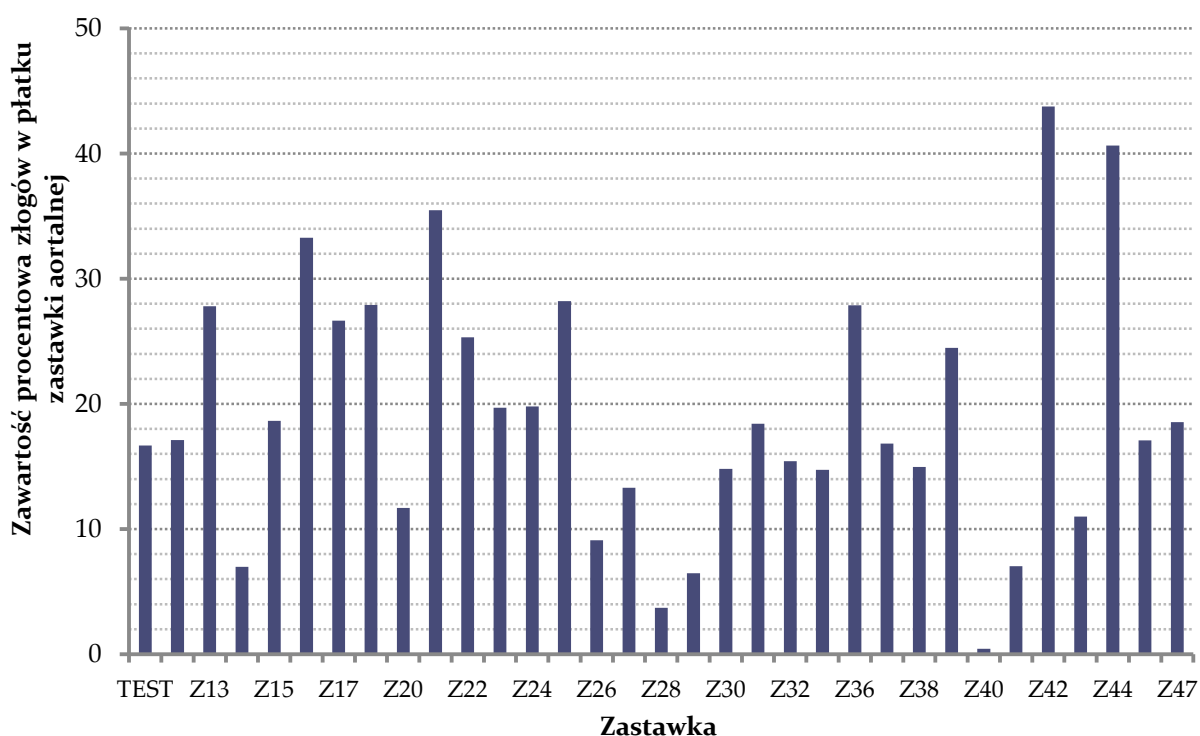
Po przeprowadzeniu jakościowej analizy opartej na ocenie wizualnej wartości progu oddzielającego tkankę miękką od złogów oraz ocenie kształtu krzywych histogramów, czas przejść do analizy ilościowej. W tej części skupiono się na wyznaczeniu zawartości procentowej złogów w zastawce, ich objętości, średniej wielkości

oraz stopnia pofałdowania. Zbadano także pod tym kątem najcięższą frakcję zwapnień. Niezbędne obliczenia wykonano w programie *Fiji*, dzięki wtyczce *BoneJ*. Wykorzystano w tym celu dostępne opcje: *Volume Fraction*, *Isosurface* oraz *Thickness*, które opisano w rozdziale poświęconym metodyce.

6.1 Rozmieszczenie, zawartość procentowa, objętość i stopień pofałdowania złogów wapniowych

Poziom jasności umożliwiający odseparowanie złogów od tkanki miękkiej ważył się w okolicach 70 dla niemal wszystkich zastawek, dlatego tę wartość przyjęto do dalszych obliczeń. Wartość progu binaryzacji, dla którego możliwe było wyizolowanie z obrazu mikrotomograficznego całej objętości zastawki trzeba było niestety dobierać ręcznie, indywidualnie dla każdej próbki. Otrzymane szczegółowe wyniki zebrano w tabeli 6.1 (dodatek A). Następnie przystąpiono do ich omówienia.

Badane płatki półksiężycowate mają różną wielkość, poczynając od 330 mm^3 do ponad 2400 mm^3 . Ich stopień pofałdowania jest jednak bardzo zbliżony, co świadczy o podobnym kształcie. Parametr ten osiąga większe wartości dla mniejszych zastawek. Mówiąc o zwapnieniach obecnych w całej objętości, sytuacja wygląda nieco inaczej. Zawartość procentowa grudek jest bardzo różna i potencjalnie niezależna od objętości próbki (wyk. 6.1). Próbowano zbadać, czy istnieje powiązanie między tymi dwoma wielkościami. W tym celu obliczono współczynnik korelacji Pearson'a (r), otrzymując wartość 0.54. Na tej podstawie można stwierdzić, że parametry wydają się skorelowane, lecz korelacja ta jest stosunkowo niska. Z obserwacji płynie prawdopodobny wniosek, że wraz ze wzrostem objętości płatka zwiększa się w nieznaczny sposób ilość grudek. Może to również sugerować, że pierwotne rozmiary zastawek mogły być podobne, lecz z uwagi na postępujący proces wapnienia odkładające się złogi spowodowały powiększenie płatków, w stopniu zależnym od progresji choroby. Kolejnym parametrem, jaki próbowano powiązać z wielkością płatka było jego pofałdowanie. Tutaj otrzymano współczynnik korelacji $r=-0.72$, co świadczy o istotnej antykorelacji tych cech.

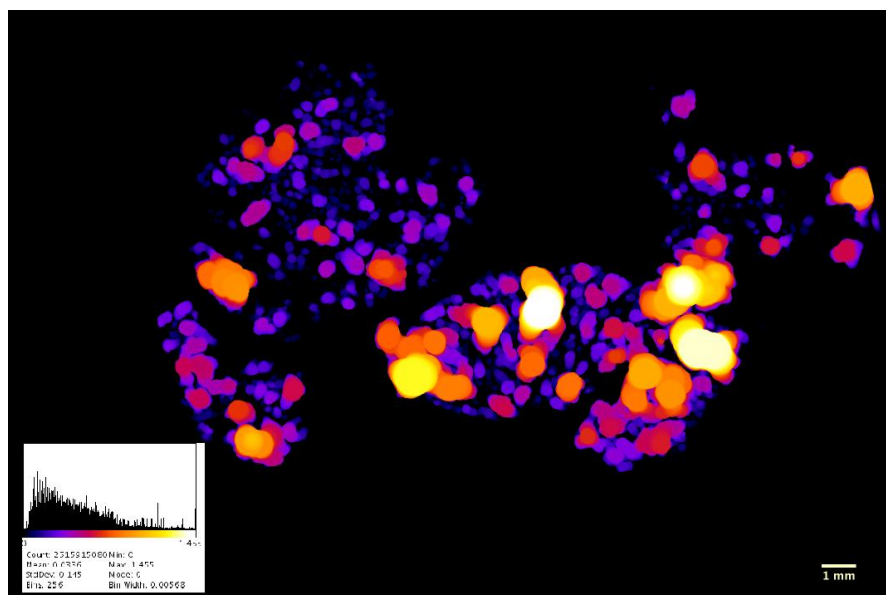


Wyk. 6.1. Zawartość procentowa złogów w płatku półksiężycowatym poszczególnych zastawek aortalnych

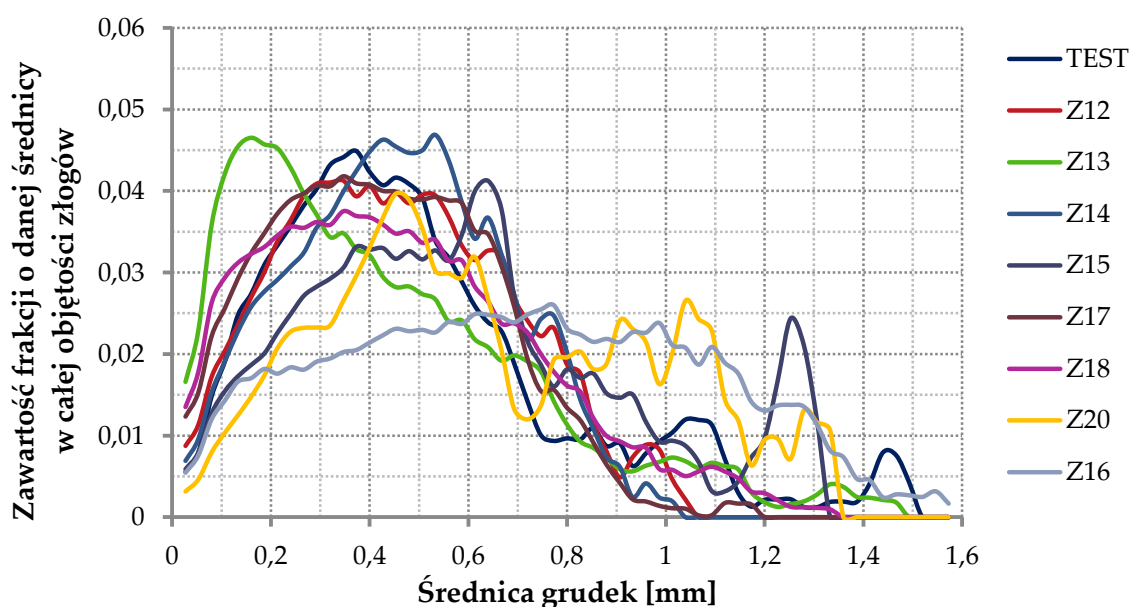
W większości zastawek złogi stanowiły ok 15-20%. Najmniej znajdowało się ich w próbkach: Z14, Z28, Z29 i Z40 - tam też cechowały się dość dużym stopniem pośladowania. Najbardziej bogata w zwapnienia okazała się próbka Z42, w której zawartość procentowa tej frakcji sięgała aż 43.76%.

6.2 Średni rozmiar grudki

Przedmiotem następnych analiz ilościowych stało się zróżnicowanie złogów pod względem rozmiaru. Postanowiono zbadać rozkład średniej wielkości grudek w próbkach. W tym celu ponownie wykorzystano wtyczkę *BoneJ* oraz znajdującą się w niej opcję *Thickness*. Uzyskane wyniki zilustrowano na wykresach sporządzonych oddzielnie dla I, II i III serii zastawek, aby zachować ich przejrzystość (wyk. 6.2, 6.3 i 6.4). Na rysunku 6.1 umieszczono także przykładowy, 32-bitowy obraz uzyskany po zastosowaniu opcji *Thickness*, ukazujący rozmieszczenie grudek o danej średnicy w objętości płatka zastawki aortalnej.



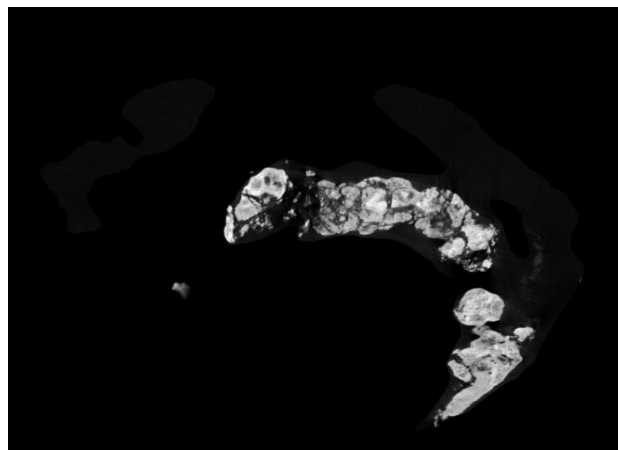
Rys. 6.1. Rezultat zastosowania wtyczki Thickness dla zastawki Z13; poszczególne kolory symbolizują daną średnicę grudki - jasnożółty największą, a ciemnofioletowy najmniejszą



Wyk. 6.2. Rozkład wielkości grudek dla zastawek z I serii pomiarowej

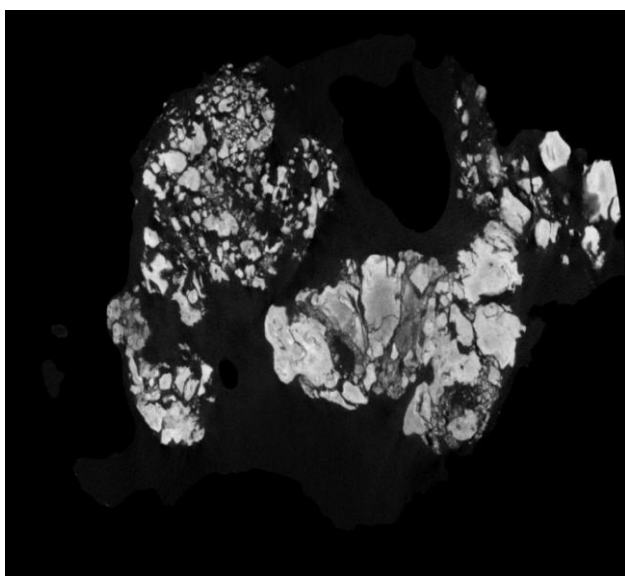
Na powyższym wykresie można zauważyć, że rozkład wielkości złogów w zastawkach z I serii pomiarowej jest bardzo podobny. Przeważają grudki o średnicy ok. 0.4-0.6 mm oraz mniejsze. Zgadza się to z danymi w tabeli 6.1. Maksymalny udział złogów o tej średnicy sięga ok. 4-5%. Rzadko obserwuje się skupiska o średnicy większej od 1 mm. Wyjątkiem są zastawki Z15 oraz Z20, gdzie ich zawartość osiąga ok. 2.5%. Na szczególną uwagę zasługuje pierwsza - jej krzywej posiada

aż 2 piki - jeden w okolicy 0.6-0.7 mm, a drugi dla 1.3 mm. Na tej podstawie można wnioskować o przewadze tych wielkości skupisk (rys. 6.2). Ciekawy rozkład mają również zastawki Z13 i Z16. W pierwszej przeważają złogi o średnicach rzędu 0.15 mm (4.5%), co widać na pierwszy rzut oka, patrząc na obraz tomograficzny (liczne, drobne, ja-

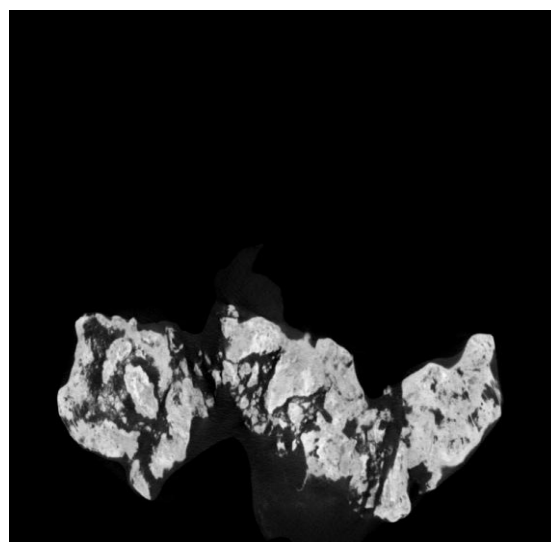


Rys. 6.2. Wybrany przekrój przez płatek zastawki Z15

sne obszary (rys. 6.3). Zastawka Z16 cechuje się natomiast dość równomiernym rozłożeniem grudek o różnej średnicy (rys. 6.4).

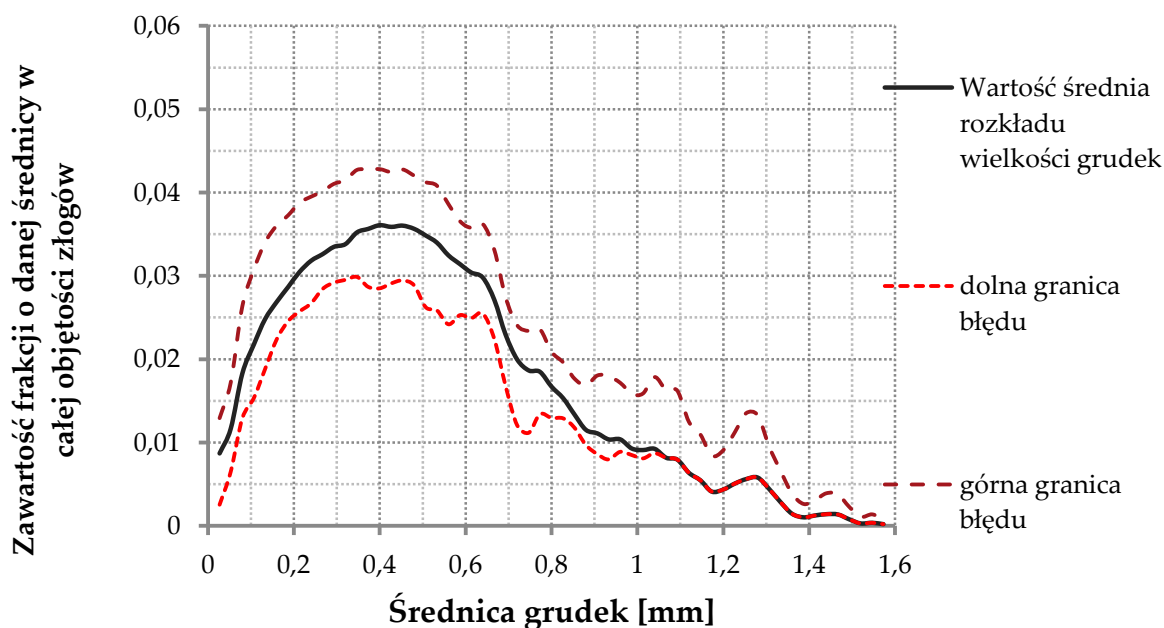


Rys. 6.3. Wybrany przekrój przez płatek zastawki Z13



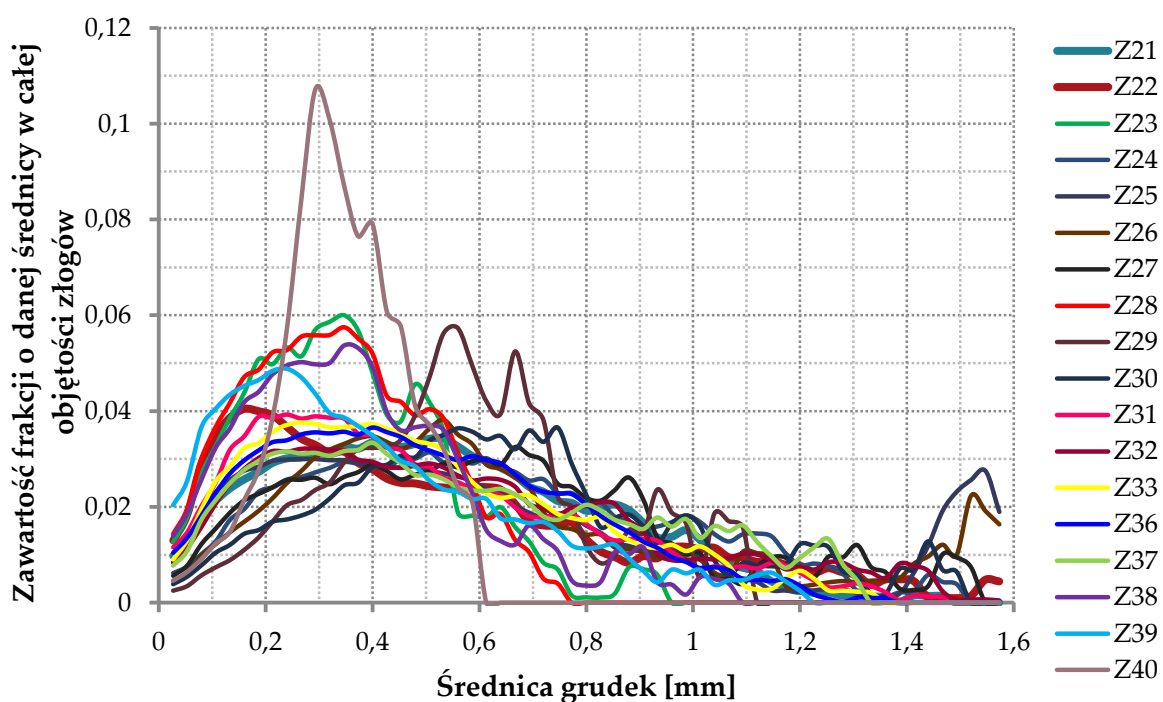
Rys. 6.4. Wybrany przekrój przez płatek zastawki Z16

W celu zwiększenia czytelności wykresu 6.2 wyznaczono średnią wartość wielkości grudki wraz z jej odchyleniem standardowym i na ich podstawie sporządzono krzywe (wyk. 6.3). Zaznaczono również obszar niepewności.

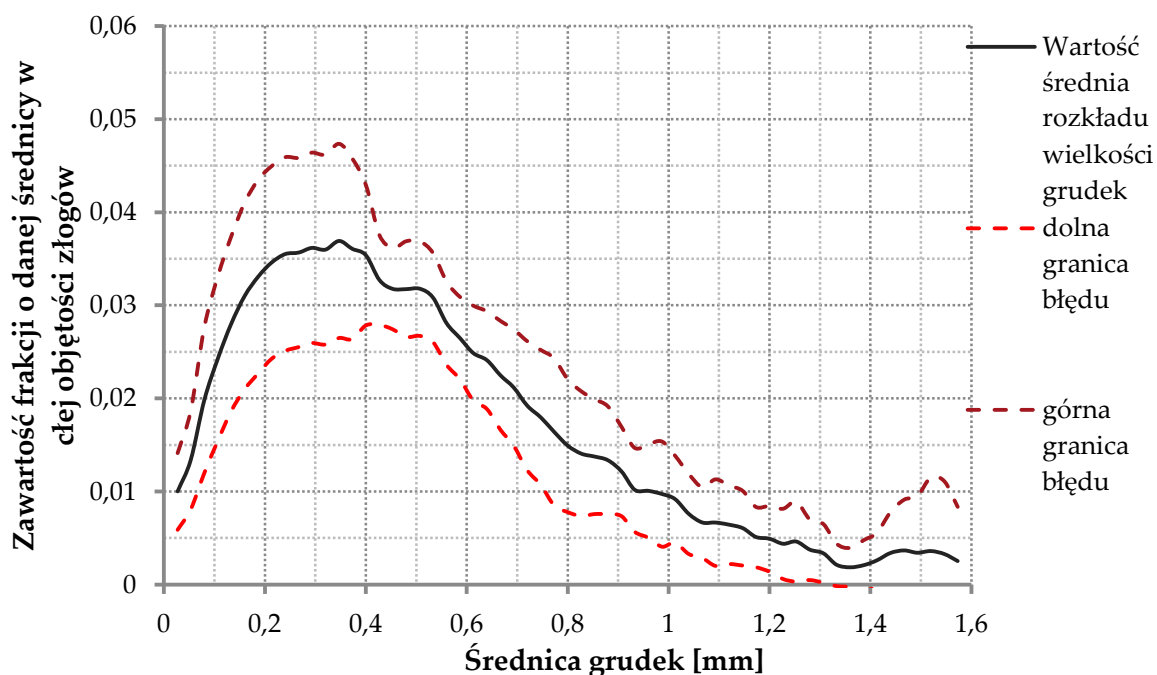


Wyk. 6.3. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla I serii pomiarowej

Powyższy wykres doskonale pokazuje, że najwięcej grudek w I serii pomiarowej ma rozmiar ok. 0.4 mm, a odsetek tych powyżej 1 mm jest niewielki. Wąski obszar niepewności dodatkowo potwierdza podobieństwo w rozkładzie wielkościowym złogów znajdujących się w próbkach mierzonych w pierwszej turze.

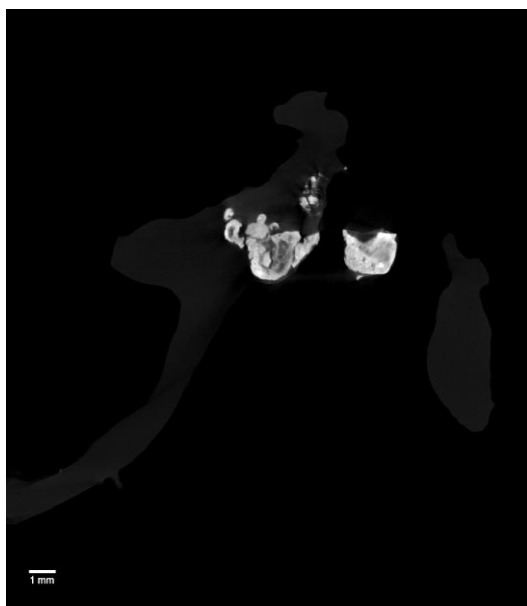


Wyk. 6.4. Wykres zbiorczy rozkładu wielkości grudek dla zastawek z II serii pomiarowej: Z21-Z33, Z36-Z40



Wyk. 6.5. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla II serii pomiarowej, po odrzuceniu krzywych wyraźnie odbiegających od reszty, tj. dla Z29 oraz Z40.

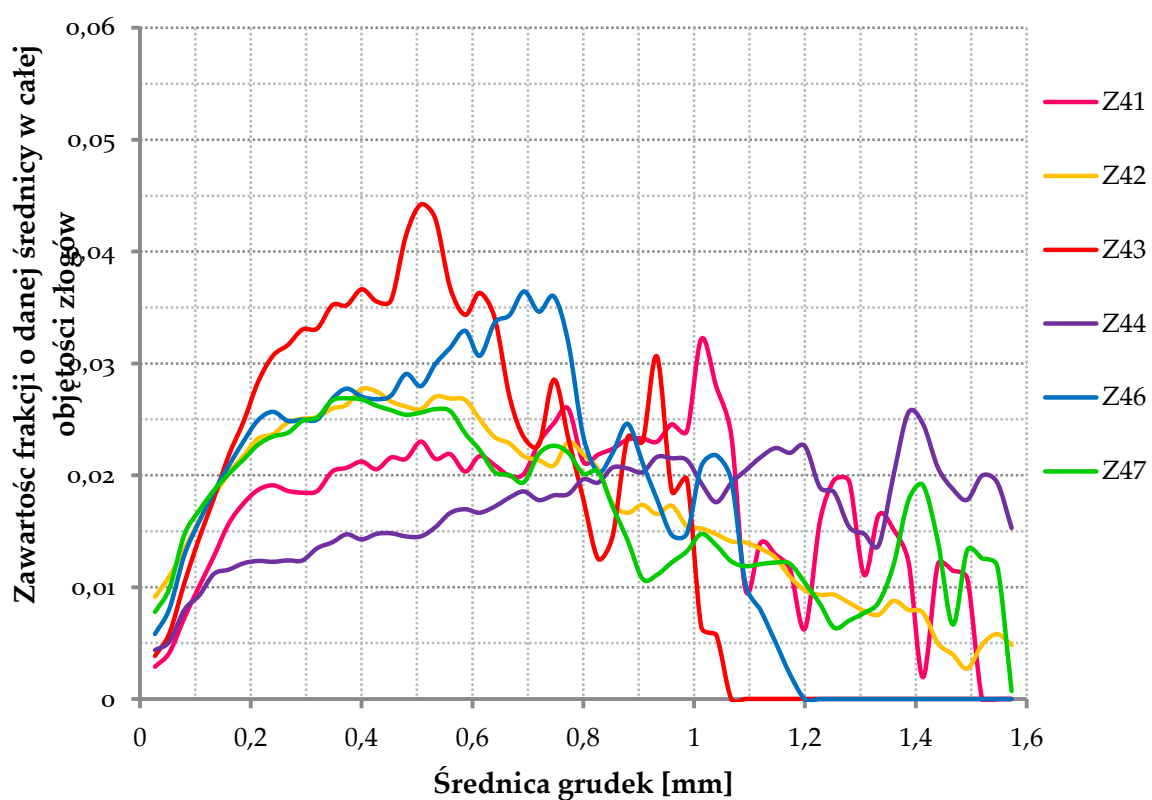
Na wykresie 6.4 można zauważyć pewną analogię do serii I - rozkład wielkości grudek ma bowiem bardzo podobny kształt. Dla większości zastawek przeważają skupiska o średnicy 0.3-0.6 mm, co potwierdzają dane z tabeli 6.1. Duży udział mają tu złogi małe, poniżej 0.4 mm, niewielki odsetek stanowią te o rozmiarze powyżej 1 mm (wyk. 6.5). Część badanych próbek wyróżnia się na tle reszty. Wyraźne odstępstwa widać w przypadku zastawki Z29 oraz Z40. Dla pierwszej z nich (rys. 6.5) przeważają grudki ok. 0.5 mm (5.6%), 0.68 mm (5.2%), 0.9 mm (2.2%) oraz 1.3 mm (2%). Próbką Z40 (rys. 6.6) wykazuje najwyraźniejsze odstępstwo. Zdecydowanie najwięcej złogów osiąga tu średnicę ok. 0.3 mm (aż 14%). Może być to spowodowane faktem, iż zwapnienia stanowiły w niej zaledwie 0.44% całej objętości. Najprawdopodobniej próbka ta pochodziła od pacjenta znajdującego się w początkowym stadium choroby, więc odkładające się sole wapniowe nie zdążyły utworzyć większych skupisk. Przypuszczenie jest jednak czysto hipotetyczne i zostanie zweryfikowane przez zespół badaczy ze Szpitala Jana Pawła II w Krakowie po odcodowaniu danych pacjentów, od których pobrano materiał badawczy.



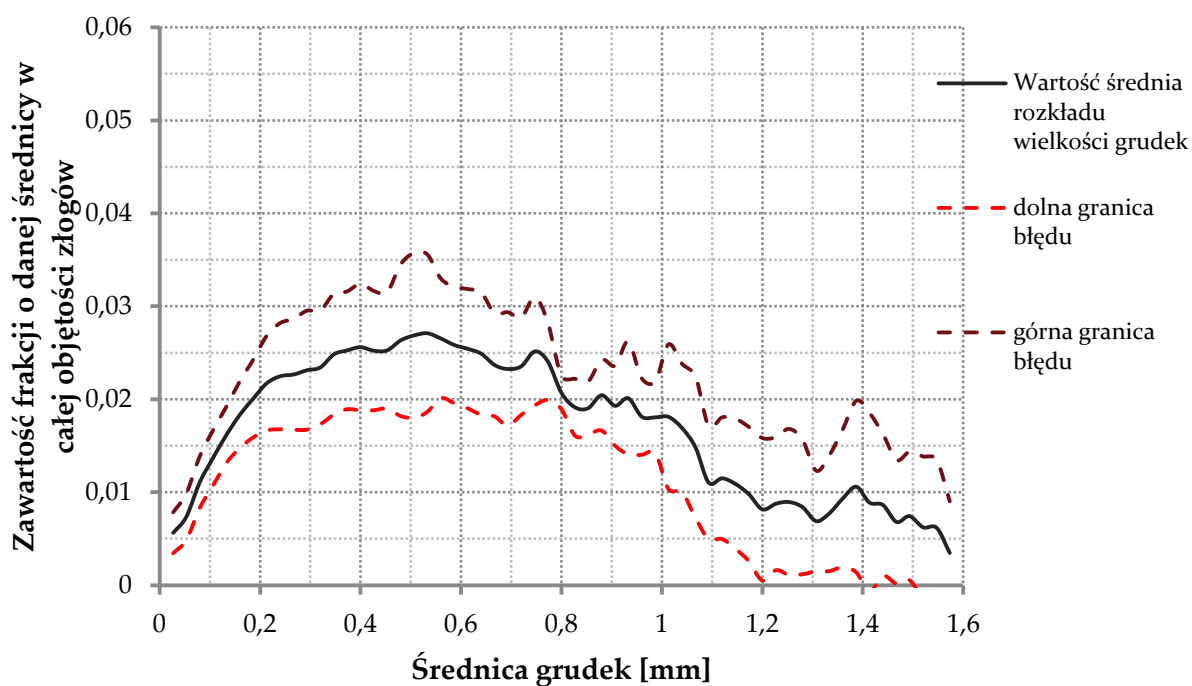
Rys. 6.5. Wybrany przekrój przez płatek Z29



Rys. 6.6. Wybrany przekrój przez płatek Z40

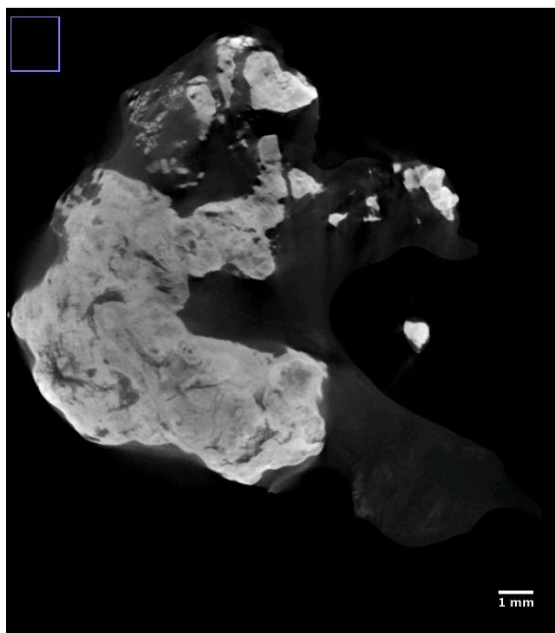


Wyk. 6.6. Wykres zbiorczy rozkładu wielkości grudek dla zastawek z III serii pomiarowej: Z41-Z44, Z46-Z47

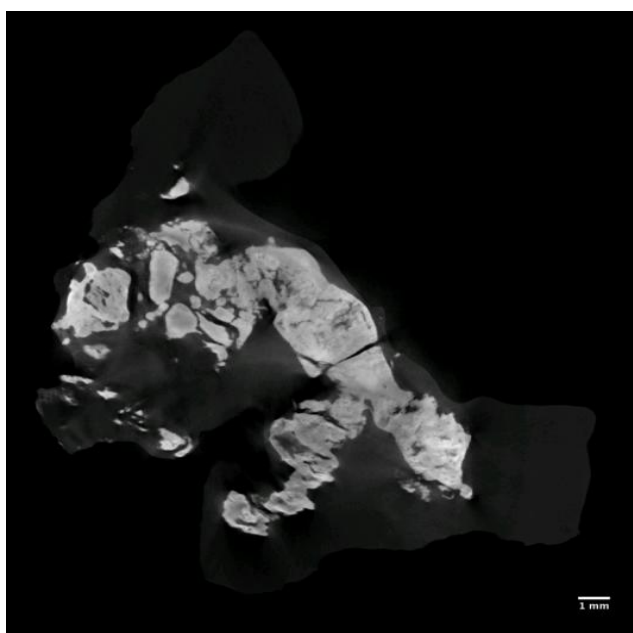


Wyk. 6.7. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla III serii pomiarowej: Z41-Z44, Z46-Z47

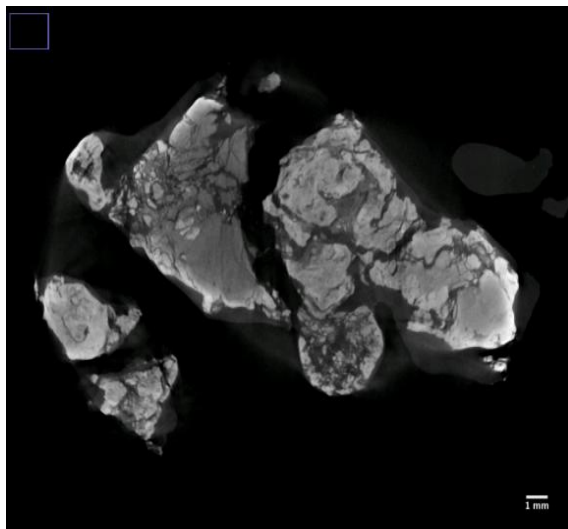
W przypadku III serii próbek widać większe zróżnicowanie rozmiaru złogów, niż w pozostałych. Dla Z44 (rys. 6.7) i Z47 (rys. 6.8) widać spory odsetek dużych skupisk, których rozmiar średnicy przekracza 1 mm. W zastawkach Z41, Z42 (rys. 6.9), Z43 oraz Z46 (rys. 6.10) przeważają małe grudki, poniżej 1 mm. Najwięcej jest tych o średnicy 0.4-0.8 mm. Widać to na obrazach mikrotomograficznych.



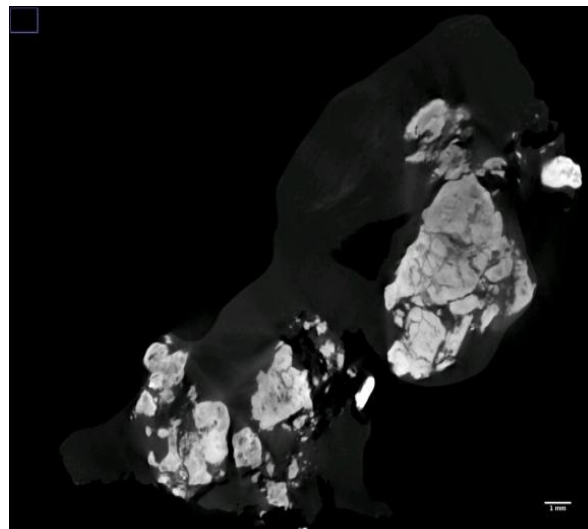
Rys. 6.7. Wybrany przekrój przez próbkę Z44



Rys. 6.8. Wybrany przekrój przez próbkę Z47



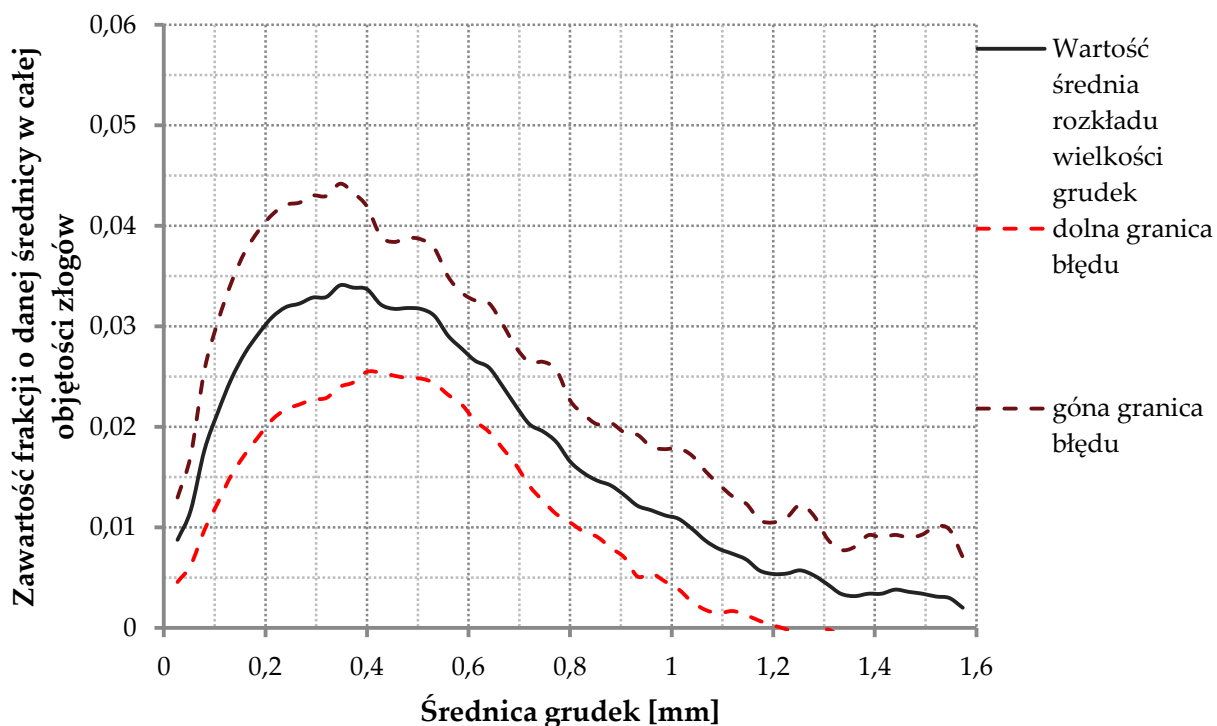
Rys. 6.9. Wybrany przekrój przez płatek Z42



Rys. 6.10. Wybrany przekrój przez płatek Z46

Po przeanalizowaniu rozkładu wielkości grudek zbadano ich stopień korelacji z objętością zastawki. Niska i dodatnia wartość współczynnika ($r=0.28$) mówi nam o słabym powiązaniu tych dwóch parametrów.

Na koniec przedstawiono wykres zbiorczy przedstawiający średni rozkład wielkościowy złożeń we wszystkich zastawkach wraz z odchyleniem standardowym wyznaczającym obszar błędów, mający na celu porównanie próbek pochodzących z 3 serii pomiarowych (wyk. 6.8).



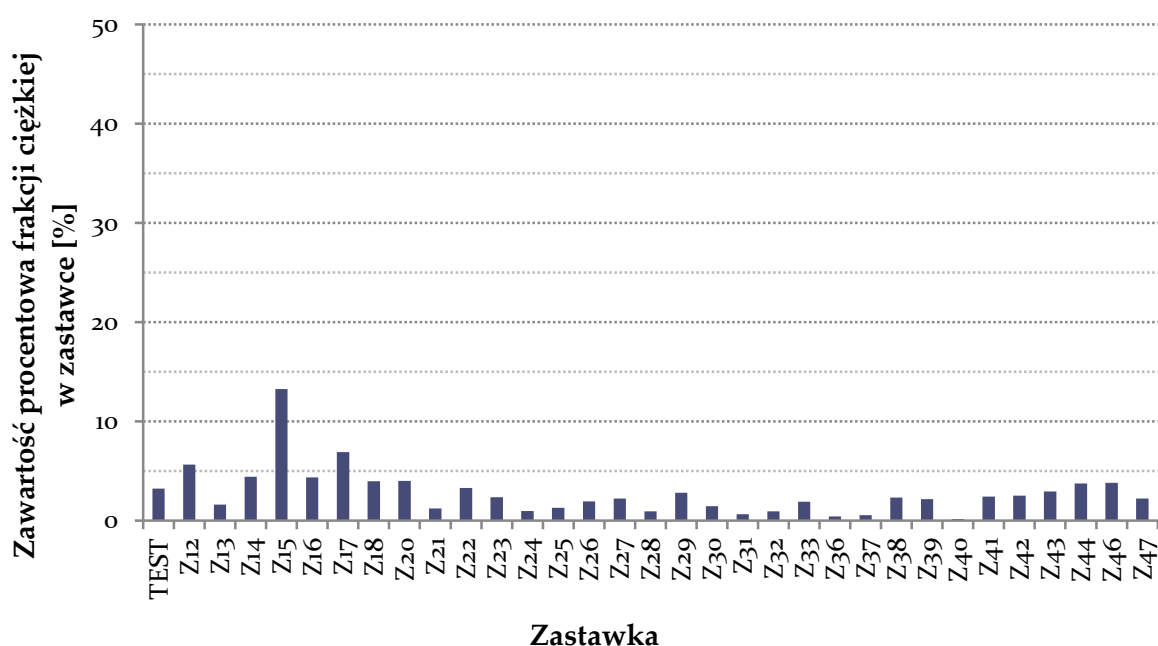
Wyk. 6.7. Wykres zbiorczy średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla wszystkich zastawek

Na wykresie 6.8 wyraźnie widać wielkie podobieństwo do poprzednich rozkładów wielkości dla poszczególnych serii pomiarowych, mimo sporego obszaru błędu. Jak można się było spodziewać, przeważają małe grudki, o średnicy poniżej 1 mm. Krzywa osiąga maksimum w okolicach 0.3-0.4 mm, podobnie jak dla pierwszej i drugiej tury pomiarowej.

6.3 Analiza ilościowa najcięższej frakcji grudek

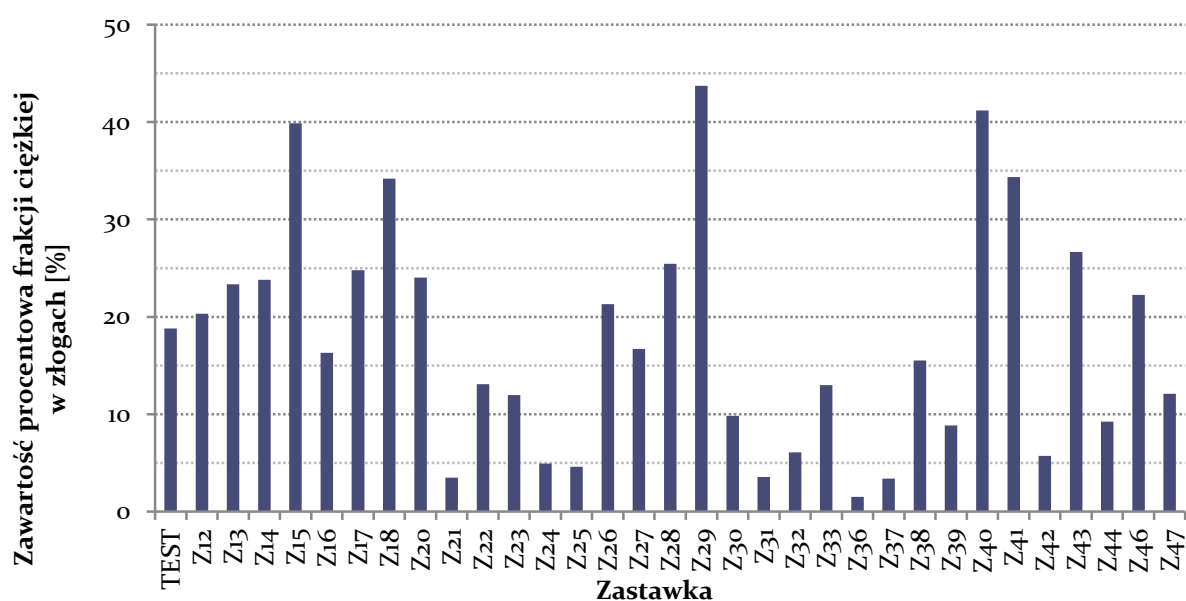
Ostatnim parametrem podlegającym badaniu była frakcja ciężka skupisk, czyli obszary o najsilniejszym stopniu zmineralizowania. Jako próg oddzielający ją od pozostałych złogów wybrano arbitralnie, na podstawie obserwacji obrazów mikrotomograficznych, wartość 190. Następnie obliczono jej objętość, powierzchnię, stopień pofałdowania, a także zawartość procentową w złogach oraz w całej zastawce. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 6.2 (dodatek A).

Frakcja ciężka niewielkiej objętości ma większy stopień pofałdowania, niż reszta złogów w zastawkach. Stanowią z reguły niewielki procent całego płatka oraz zwapnień. Widać to na wykresach 6.9 i 6.10.



Wyk. 6.8. Zawartość procentowa najcięższej frakcji złogów w całej objętości płatka

Analizując powyższy wykres można stwierdzić, że frakcja ciężka w większości przypadków stanowi poniżej 4% całkowitej objętości płątka. Oczywiście nie jest to reguła, zdarzają się bowiem zastawki, dla których wartość ta jest większa. W Z15 sięga ona niemal 13.6%. Najmniejszą zawartością procentową frakcji ciężkiej cechuje się zastawka Z40, co może być spowodowane małym odsetkiem złogów znajdującym się w tej próbce (zaledwie 0.44%). Jest to także zgodne z wcześniejszym przypuszczeniem, że zastawka ta pochodzi od pacjenta będącego na stosunkowo wczesnym etapie choroby.

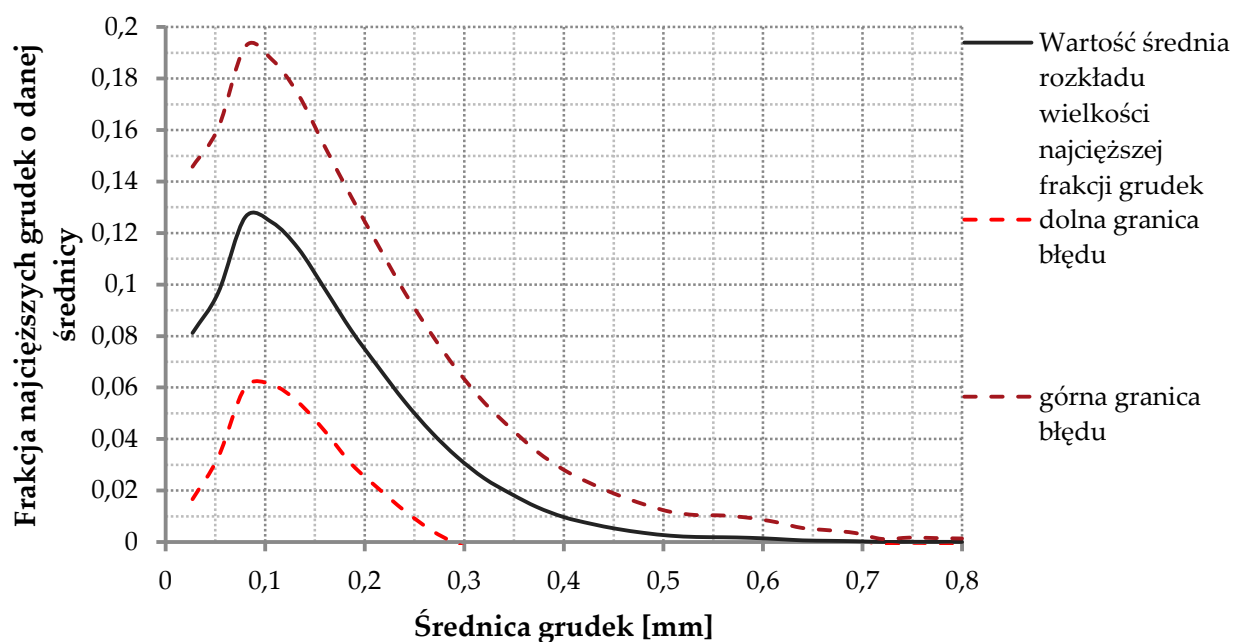


Wyk. 6.9. Zawartość procentowa najcięższej frakcji złogów w ich całkowitej objętości

Inaczej wygląda sprawa z obecnością tej frakcji w złogach. Tutaj zawartość procentowa osiąga wyższe wartości i jest bardziej zróżnicowana. Najwięcej "gęstych" grudek znajduje się tam, gdzie zwapnień jest stosunkowo mało, tj. w Z29 oraz Z40. Nie jest to jednak regułą, bowiem współczynnik korelacji między zawartością wapniowych skupisk, a zawartością ich najcięższej frakcji wynosi -0.50. Mówi o tym, że udział ciężkich grudek jest większy przy mniejszym stopniu zwapnienia płątka półksiężycowatego, lecz zależność ta nie jest silna. Zdaje się to również potwierdzać postawioną wcześniej hipotezę dotyczącą procesu wapnienia, mówiącą o początkowej obecności jednej lub kilku bardzo silnie zmineralizowanych grudek, wokół których

w późniejszym stadium powstają większe obszary złogów o dużym zróżnicowaniu pod względem gęstości.

Poniżej umieszczono wykres obrazujący wartość średnią rozkładu wielkości grudek odpowiadających najcięższej frakcji wraz z zaznaczonym obszarem błędu, wyznaczonym poprzez odchylenie standardowe (wyk. 6.11).



Wyk. 6.10. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości ziaren najcięższej frakcji obecnej w złogach

Na powyższym wykresie dokładnie widać, że rozkład wielkości ziaren o największej gęstości jest bardzo podobny dla wszystkich zastawek. Przeważają skupiska o średnicy ok 0.1 mm. Potwierdzają to dane z tabeli 6.2 (dodatek A). Może to także sugerować, że najmniejsze grudki, o największym stopniu zmineralizowania są zarodkami dla rozwijających się wraz z upływem czasu złogów.

Na koniec sprawdzono, czy wysnute wcześniej hipotezy dotyczące procesu wapnienia mogą być prawdziwe. W tym celu obliczono współczynnik korelacji między zawartością procentową ciężkiej frakcji, a rozpiętością kwartylną dla tkanki miękkiej. Zgodnie z oczekiwaniami otrzymano antykorelację na poziomie -0.53. Może to świadczyć o prawdziwości wysnutej tezy, bowiem liczne, bardzo gęste grudki zwykle towarzyszą dużej jednorodności gęstości w obrębie tkanki.

7 PODSUMOWANIE

W pracy inżynierskiej zbadano wielkość, kształt (wyrażony poprzez stopień pofałdowania), strukturę, rozmieszczenie oraz zawartość procentową złogów w całej objętości zastawki. Poddano również analizie ich najcięższą frakcję oraz oceniono średni rozmiar grudek.

Okazało się, że mimo różnic w stopniu zwapnienia badanych próbek niektóre parametry są bardzo podobne, np. sposób rozmieszczenia złogów. Wszystkie grudki gromadzą się w mniejsze lub większe skupiska, nie są rozsiane po całej objętości płątka. Ich gęstość, mimo różnego zakresu, wskazuje na ten sam materiał odkładający się w płatkach. Jest on różnie wysycony, lecz pod względem stopnia pochłaniania promieniowania rentgenowskiego - niemal identyczny. Sugeruje to, że skład pierwiastkowy pozostaje podobny. Stopień pofałdowania płatków również jest bardzo zbliżony. Osiąga nieznacznie większe wartości dla mniejszych zastawek. Istniejącą zależność potwierdza obliczony współczynnik korelacji Pearson'a (r) równy -0.72.

Istotną wielkością mówiącą o stopniu zwapnienia zastawki jest niewątpliwie zawartość procentowa złogów. Dla badanych próbek osiąga bardzo różną wartość, która nie zależy istotnie od ich objętości (współczynnik korelacji między tymi dwoma wielkościami wyniósł $r=0.54$). W większości zastawek zwapnienia stanowiły ok 15-20%. Rozmiar pojedynczej grudki waha się w okolicach 0.3-0.4 mm i nie zależy od wielkości płatka w jakim się znajduje. Frakcja ciężka złogów stanowi bardzo niewielki procent całej zastawki (poniżej 4%) i można zaobserwować, że dominuje w płatkach o najmniejszym stopniu zwapnienia.

Na podstawie obranych wcześniej progów separujących tkankę miękką od złogów sporządzono histogramy gęstości (przedstawione jako poziom szarości danej frakcji na obrazie). Po przeprowadzeniu wnikliwej analizy jakościowej i statystycznej kształtu otrzymanych krzywych, tj. szerokości oraz rozmieszczenia znajdujących się na nich pików, zaobserwowano ciekawe zależności. Mimo niewielkich różnic w budowie morfologicznej i anatomicznej zastawek maksimum pików dla tkanki miękkiej pozostaje w dużej mierze stałe w obrębie wszystkich próbek, co świadczy o jedno-

rodności jej składu. Istnieje jej pewne powiązanie ze stopniem zwapnienia, bowiem szerokie piki świadczące o dużym zróżnicowaniu poziomów szarości w ich obrębie (a tym samym i gęstości dla odpowiadających im obszarów próbki badawczej) towarzyszą wąskim pikom dla złogów.

Po bardziej wnikliwej obserwacji obrazów mikrotomograficznych badanych fragmentów zastawek wysnuto hipotezy dotyczące zachodzącego w nich procesu wapnienia. Według pierwszej proces może rozpoczynać się od tworzenia małych, gęstych złogów, które następnie łączą się w większe skupiska poprzez stopniowo wapniejącą tkankę miękką. Druga z nich mówi o tym, że początkowo obszar tkanki wapnieje równomiernie. W miarę upływu czasu część znajdujących się w niej soli grupuje się w skupiska, które stopniowo zwiększają swoją gęstość kosztem migracji z obszarów obecnych wokół. Daje to efekt "wyflukania" soli z tkanki, co widoczne jest na obrazie mikrotomograficznym w postaci ciemnych pól wokół jasnych grudek. W celu sprawdzenia poprawności wysnutych tez obliczono współczynnik korelacji między zawartością procentową ciężkiej frakcji, a rozpiętością kwartylną dla tkanki miękkiej. Zgodnie z oczekiwaniami otrzymano antykorelację na poziomie -0.53, co pozostaje w zgodzie z przedstawionymi przypuszczeniami (w szczególności drugim), bowiem bardzo gęste grudki zwykle towarzyszą dużej jednorodności gęstości w obrębie tkanki.

Przeprowadzone badania, mimo interesujących rezultatów, otwierają szeroki wachlarz możliwości dla dalszych analiz. Niewątpliwie ciekawe będzie porównanie ich z wynikami klinicznymi dla poszczególnych pacjentów, którym wycięto zastawki. Mogłoby to ostatecznie potwierdzić słuszność postawionych hipotez poprzez informacje o stopniu zaawansowania choroby. Kolejnym interesującym pomysłem jest dokładniejsze zbadanie struktury wewnętrznej pojedynczych grudek, wykonując pomiar fragmentu płatka w lepszej rozdzielczości. Prace takie już się rozpoczęły i będą kontynuowane w Laboratorium Mikro i Nano Tomografii WFiIS AGH. Już podczas wstępnych obserwacji obrazów widać, że złogi są nie tylko zróżnicowane pod względem wielkości, lecz również pod względem gęstości. W obrębie jednej

grudki znajdują się obszary obejmujące szeroki zakres poziomów szarości, co mówi zapewne o rozmieszczeniu soli wapniowych, a tym samym - o całym procesie mineralizacji. Możliwości dalszych analiz jest wiele, a ich realizacja może przynieść rezultaty, dzięki którym proces wapnienia zastawek upośledzający ich funkcję stanie się bardziej zrozumiały.

8 DODATEK A - ZESTAWIENIE SZCZEGÓŁOWYCH DANYCH LICZBOWYCH

Tab. 8.1. Zestawienie wartości obranych progów binaryzacji dla wszystkich zastawek

Zastawka	Obrany próg
TEST	72
Z12	40
Z13	84
Z14	77
Z15	79
Z16	88
Z17	73
Z18	82
Z19	236
Z20	80
Z21	82
Z22	79
Z23	78
Z24	74
Z25	73
Z26	50
Z27	81
Z28	50
Z29	54
Z30	74
Z31	78
Z32	74
Z33	86
Z36	72
Z37	81
Z38	72
Z39	81
Z40	38
Z41	80
Z42	63
Z43	77
Z44	88
Z46	73
Z47	76

Tab. 8.2. Parametry statystyczne wyznaczone dla złożeń na podstawie liczby punktów o danej gęstości dla poszczególnych wartości poziomów szarości.

Zastawka	Dolny kwartył	Maksymalna wartość prugu z histogramu	Minimalna wartość prugu z histogramu	Górny kwartył	Mediana	Maksimum piksu	Rozstęp kwartylny
TEST	124	255	72	188	164	177	64
Z12	99	255	40	178	147	170	79
Z13	128	255	84	184	160	180	56
Z14	114	254	77	186	154	106	72
Z15	150	255	79	199	176	179	49
Z16	160	255	88	200	184	192	40
Z17	103	255	73	178	145	89	75
Z18	136	255	82	191	169	180	55
Z19	237	255	236	244	240	237	7
Z20	157	255	80	199	176	177	42
Z21	112	255	82	149	130	130	37
Z22	121	255	79	171	147	144	50
Z23	112	255	78	169	142	146	57
Z24	107	255	74	152	130	135	45
Z25	112	255	73	154	134	139	42
Z26	110	255	50	182	158	50	72
Z27	133	254	81	176	153	150	43
Z28	89	254	50	184	147	50	95
Z29	131	254	54	205	176	188	74
Z30	117	255	74	163	139	138	46
Z31	102	255	78	152	127	125	50

Z32	105	255	74	155	131	134	50
Z33	113	255	86	155	134	132	42
Z36	98	255	72	139	119	124	42
Z37	105	255	81	147	126	123	42
Z38	113	254	72	173	143	142	60
Z39	114	255	81	165	141	149	51
Z40	83	254	38	198	155	38	115
Z41	160	254	80	195	180	184	35
Z42	93	255	63	151	125	131	58
Z43	134	255	77	192	165	166	58
Z44	130	255	88	167	147	145	37
Z46	130	254	73	185	159	167	55
Z47	127	255	76	174	152	162	47

Tab. 8.3. Parametry statystyczne wyznaczone dla tkanki miękkiej na podstawie liczby punktów o danej gęstości dla poszczególnych wartości poziomów szarości.

Zastawka	Dolny kwartył	Maksymalna wartość progu z histogramu	Minimalna wartość progu z histogramu	Górny kwartył	Mediana	Maksimum piku	Rozstęp kwartylny
TEST	13	71	1	17	14	14	4
Z12	8	39	1	13	10	10	5
Z13	11	83	1	24	16	13	13
Z14	8	76	1	14	11	10	6
Z15	7	78	1	12	9	9	5
Z16	11	87	1	21	14	13	10
Z17	11	72	1	20	13	12	9

Z18	11	81	1	24	15	12	13
Z20	7	79	1	12	9	9	5
Z21	13	81	1	34	22	21	21
Z22	17	78	1	29	22	20	12
Z23	17	77	1	24	20	20	7
Z24	14	73	1	24	18	19	10
Z25	15	72	1	32	22	22	17
Z26	17	49	1	23	20	20	6
Z27	17	80	1	25	2	21	8
Z28	19	49	1	22	21	21	3
Z29	18	53	1	22	20	22	4
Z30	18	73	1	23	20	21	5
Z31	16	77	1	27	20	20	11
Z32	17	73	1	24	20	19	7
Z33	16	85	2	37	24	19	21
Z36	14	71	2	32	22	19	18
Z37	16	80	1	25	20	21	9
Z38	18	71	1	24	21	21	6
Z39	15	80	1	32	21	17	17
Z40	19	37	1	23	20	21	4
Z41	23	79	1	28	26	26	5
Z42	14	62	4	36	24	20	22
Z43	18	76	2	22	20	20	4
Z44	17	87	2	34	23	22	17
Z46	18	72	2	24	20	21	6
Z47	17	75	1	26	22	22	9

Tab. 8.4. Wyniki otrzymane dla złogów podczas analizy ilościowej płatków półksiężycowatych

Zastawka	Próg izolujący całą zastawkę	Objętość zastawki [mm ³]	Powierzchnia zastawki [mm ²]	Stopień pofałdowania zastawki [mm ⁻¹]	Objętość złogów [mm ³]	Powierzchnia złogów [mm ²]	Zawartość złogów [%]	Stopień pofałdowania złogów [mm ⁻¹]	Średni rozmiar grudki [mm]	Odczytanie standardowe [mm]
TEST	4	1010.22	1260.63	1.25	168.32	842.02	16.66	5.00	0.52	0.31
Z12	4	556.65	807.43	1.45	95.30	509.00	17.12	5.34	0.47	0.23
Z13	5	1062,11	1175,59	1,11	295.19	2105.47	27.79	7.13	0.45	0.31
Z14	6	823.94	1288.78	1.56	57.60	261.06	6.99	4.53	0.60	0.32
Z15	4	491.07	843.16	1.72	91.58	477.17	18.65	5.21	0.47	0.21
Z16	5	1365.16	1582.70	1.16	454.21	1692.45	33.27	3.73	0.72	0.36
Z17	4	762.19	912.38	1.20	203.16	1112.05	26.65	5.47	0.44	0.22
Z18	3	1461.97	1449.27	0.99	407.97	2322.53	27.91	5.69	0.48	0.27
Z20	4	311.30	518.57	1.67	36.34	161.27	11.67	4.44	0.66	0.33
Z21	7	1259.11	1831.78	1.45	446.69	2009.85	35.48	4.50	0.54	0.29
Z22	8	707.41	1047.66	1.48	179.14	1142.37	25.32	6.38	0.54	0.37
Z23	7	418.56	698.11	1.67	82.48	555.00	19.70	6.73	0.35	0.19
Z24	4	1214.54	1648.29	1.36	240.44	1220.67	19.80	5.08	0.63	0.33
Z25	7	1028.23	1478.83	1.44	290.11	1729.66	28.21	5.96	0.52	0.31
Z26	5	580.08	980.40	1.69	52.88	247.02	9.12	4.67	0.76	0.50
Z27	6	606.63	875.06	1.44	80.68	410.96	13.30	5.09	0.64	0.35
Z28	4	407.10	627.32	1.54	15.11	127.72	3.71	8.45	0.35	0.17
Z29	5	243.27	507.06	2.08	15.73	74.73	6.47	4.75	0.59	0.24
Z30	4	618.18	901.39	1.46	91.50	345.32	14.80	3.77	0.67	0.33
Z31	8	2416.30	2330.7	0.96	445.14	2530.76	18.42	5.68	0.51	0.31

Z32	4	1726.88	1382.91	0.80	266.46	1298.15	15.43	4.87	0.60	0.37
Z33	8	591.33	924.85	1.56	87.07	1028.79	14.72	11.82	0.51	0.29
Z36	4	1490.41	1680.99	1.13	415.55	2169.83	27.88	5.22	0.51	0.28
Z37	5	1031.45	1341.95	1.30	173.77	858.62	16.83	4.94	0.58	0.33
Z38	4	334.31	642.39	1.92	49.50	332.80	14.96	6.66	0.40	0.22
Z39	6	642.48	939.64	1.46	157.27	1110.82	24.48	7.06	0.42	0.27
Z40	3	378.60	524.31	1.38	1.68	124.19	0.44	8.46	0.36	0.11
Z41	4	723.25	602.95	0.83	50.83	235.69	7.03	4.64	0.76	0.38
Z42	7	1568.04	1987.12	1.27	686.24	2575.32	43.76	3.75	0.71	0.42
Z43	8	356.71	569.35	1.60	39.22	226.45	10.99	5.77	0.54	0.25
Z44	8	1078.26	1171.27	1.09	438.31	1074.07	40,65	2.45	1.06	0.52
Z46	7	686.64	907.15	1.10	117.28	565.66	17.8	4.82	0.59	0.28
Z47	9	831.26	917.48	1.10	154.16	696.35	18.54	4.52	0.72	0.43

Tab. 8.5. Wyniki otrzymane dla najcięższej frakcji złogów podczas analizy ilościowej płatków półksiężycowatych zastawek aortalnych

Zastawka	Objętość frakcji ciężkiej [mm ³]	Powierzchnia frakcji ciężkiej [mm ²]	Stopień pofałdowania frakcji ciężkiej [mm ⁻¹]	Zawartość procentowa w zastawce [%]	Zawartość procentowa w złogach [%]	Średni rozmiar grudki [mm]	Odchylenie standardowe [mm]
TEST	40.45	525.70	13.00	4.00	24.03	0.20	0.13
Z12	17.93	265.02	14.78	3.22	18.82	0.16	0.09
Z13	60.00	776.30	12.94	5.65	20.33	0.19	0.12
Z14	13.44	191.64	14.26	1.63	23.34	0.18	0.10
Z15	21.80	343.80	15.77	4.44	23.81	0.15	0.09
Z16	181.14	2125.47	11.73	13.27	39.88	0.19	0.10

Z17	33.16	520.00	15.68	4.35	16.32	0.16	0.09
Z18	101.16	1452.66	14.36	6.92	24.80	0.16	0.10
Z20	12.43	148.56	11.96	3.99	34.19	0.07	0.04
Z21	15.54	248.01	15.96	1.23	3.48	0.19	0.10
Z22	23.43	326.66	13.94	3.31	13.08	0.15	0.08
Z23	9.87	148.13	15.00	2.36	11.97	0.16	0.09
Z24	11.82	161.48	13.66	0.97	4.92	0.20	0.11
Z25	13.38	220.09	16.45	1.30	4.61	0.14	0.07
Z26	11.26	161.42	14.33	1.94	21.30	0.19	0.11
Z27	13.48	167.89	12.46	2.22	16.71	0.24	0.17
Z28	3.85	60.71	15.78	0.94	25.46	0.16	0.08
Z29	6.88	86.82	12.62	2.83	43.74	0.20	0.11
Z30	8.99	130.13	14.48	1.45	9.82	0.17	0.09
Z31	15.82	208.49	13.18	0.65	3.55	0.17	0.09
Z32	16.21	215.11	13.28	0.94	6.08	0.19	0.10
Z33	11.29	177.05	15.68	1.91	12.97	0.17	0.09
Z36	6.24	97.64	15.66	0.42	1.50	0.13	0,06
Z37	5.87	99.79	17.00	0.57	3.38	0.14	0.07
Z38	7.76	109.55	14.12	2.32	15.52	0.16	0.09
Z39	13.93	205.39	14.75	2.17	8.86	0.16	0.09
Z40	0.69	11.47	16.60	0.18	41.20	0.16	0.06
Z41	17.45	207.09	11.86	2.41	34.34	0.76	0.38
Z42	39.36	524.63	13.33	2.51	5.73	0.71	0.42
Z43	10.46	145.08	13.87	2.93	26.68	0.54	0.25
Z44	40,43	503.87	12.46	3.75	9.22	1.06	0.52
Z46	26.10	334.69	12.82	3.80	22.26	0.59	0.28
Z47	18.63	268.07	14.39	2.24	12.08	0.72	0.43

9 DODATEK B - FOTOGRAFIE BADANYCH PŁATKÓW ZASTAWEK AORTALNYCH

W niniejszym dodatku umieszczono dostępne fotografie badanych płatków półksiężycowatych zastawek aortalnych z I i II serii pomiarowej. W podpisach załączono informację o rozdzielczości, w jakiej wykonywany był pomiar danej próbki.

9.1 I seria pomiarowa - TEST, Z12-Z20



Rys. 9.1. TEST, 13 μm



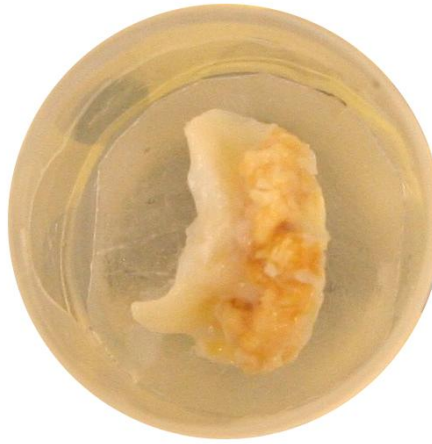
Rys. 9.2. Z12, 12 μm



Rys. 9.3. Z13, 12 μm



Rys. 9.4. Z15, 12 μm



Rys. 9.5. Z16, 12.6 μm



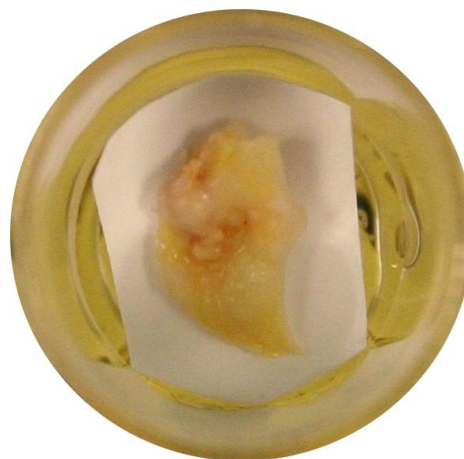
Rys. 9.6. Z17, 12 μm



Rys. 9.7. Z18, 12 μm



Rys. 9.8. Z19, 12.5 μm



Rys. 9.9. Z20, 12 μm

9.2 II seria pomiarowa - Z21-Z33, Z36-Z40



Rys. 9.10. Z21, 12 μm



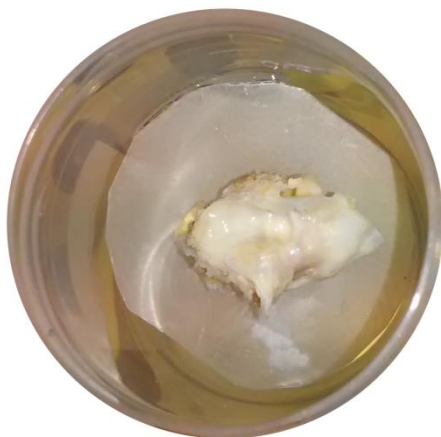
Rys. 9.11. Z22, 12 μm



Rys. 9.12. Z23, 12 μm



Rys. 9.13. Z24, 16 μm



Rys. 9.144. Z25, 12 μm



Rys. 9.55. Z26, 12 μm



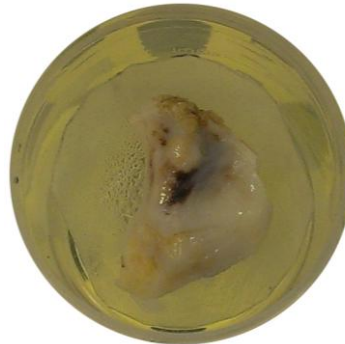
Rys. 9.66. Z27, 12 μ m



Rys. 9.177. Z28, 12 μ m



Rys. 9.18. Z29, 12 μ m



Rys. 9.19. Z32, 14 μ m



Rys. 9.20. Z36, 14 μ m



Rys. 9.21. Z37, 12 μ m



Rys. 9.22. Z39, 12 μ m

10 BIBLIOGRAFIA

- [1] S. R. Stock, *MicroComputed tomography methodology and applications*, CRC Press, USA, 2009.
- [2] A. Bochenek, M. Reicher, *Anatomia człowieka. Tom V. Układ wewnętrznydzielniczy. Układ naczyniowy*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, wydanie IV, 1960, s. 106-107, s. 121-204.
- [3] Z. Ignasiak, A. Janusz, A. Jarosińska, *Anatomia człowieka, część II*, Wydawnictwo AWF, Wrocław, 1999, s. 158-174.
- [4] T. Cichocki, J. A. Litwin, J. Mirecka, *Kompendium histologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, wydanie IV poprawione i uzupełnione, 2009, *Tkanka mięśniowa*, s.177-180.
- [5] J. Tarasiuk, *Wykład obieralny z Mikrotomografii*, Kraków, 2013.
- [6] N. M. Rajamannan, F. N. Evans, E. Aikawa, K. J. Grande-Allen, L. L. Demer, D. D. Heistad, et al., *Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Reviewand Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis*[online], *Circulation*, American Heart Association, 2011, 124, s. 1783-1791, [dostęp: 22.12.2014], dostępny w Internecie: <http://circ.ahajournals.org/content/124/16/1783>.
- [7] D. A. Towler, *Molecular and Cellular Aspects of Calcific Aortic Valve Disease* [online], *Circulation Research*, 2013, 113, s. 198 [abstract], [dostęp: 30.12.2014], dostępny w Internecie: <http://circres.ahajournals.org/content/113/2/198>.
- [8] C. Yokochi, J. W. Rohen, *Anatomia człowieka. Atlas fotograficzny anatomii systematycznej i topograficznej*, Oficyna Wydawnicza "Kaliopie", Warszawa, Wydanie I, 1995.
- [9] J. R. Greening, *Fundamentals of Radiation Dosimetry, Medical Physics Handbooks*15, Adam Hilger Ltd., Bristol, 1985
- [10] M. Heljak, J. Jaroszewski, W. Świążkowski, K. J. Kurzydłowski, *Mikrotomografia rentgenowska jako metoda obrazowania w inżynierii materiałowej* [online], *Badania nieniszczące*, 01/08/2009, [dostęp: 30.12.2014], dostępny w Internecie: <http://www.badania-nieniszczace.info/Badania-Nieniszczace-Nr-01-08-2009/Serwis-Badania-Nieniszczace-01-08-2009-art-nr2.html>.

- [11] T. Ferreira, W. Rasband, *ImageJ User Guide, IJ 1. 46r* [online], 2012, [dostęp: 20.03.2013], dostępny w Internecie: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>.

Strony internetowe:

- [12] <http://bonej.org>, [ostatnia aktualizacja: 14.07.2014].
- [13] <http://www.ge-mcs/en/radiography-x-ray/ct-computed-tomography/nanoton-s.html>, [dostęp: 23.12.2014].
- [14] <http://home.agh.edu.pl/~tarasiuk/MINT/>, [ostatnia aktualizacja: 2014].
- [15] <http://www.energoelektronika.pl>, [ostatnia aktualizacja: 17.08.2012].
- [16] http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/CT.html [ostatnia aktualizacja: 29.05.2012].
- [17] http://www.womkat.edu.pl/files/standaryzacja/grupa69/Motyl_Mateusz/S2.jpg, [dostęp: 29.12.2014].
- [18] http://x02.szkolnictwo.pl/rysunki_lekcje/2844/Clipboard06nowy.gif, [dostęp: 29.12.2014]

11 SPIS ILUSTRACJI

Rys. 3.1. Położenie serca w klatce piersiowej.....	11
Rys. 3.2. See 30-letniej kobiety.....	12
Rys. 3.3. Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana serca.....	14
Rys. 3.4. Zastawki serca.....	15
Rys. 3.5 Zastawka trójdzielna.....	15
Rys. 3.6. Zastawka pnia płucnego	16
Rys. 3.7 Podstawowe elementy składowe i zasada działania nanotomografu	20
Rys. 3.8. Względne prawdopodobieństwo zajścia różnych procesów oddziaływania promieniowania X z materią dla a) węgla b) ołowiu.....	22
Rys. 4.1 Pojedynczy płatek silnie zmienionej chorobowo zastawki aortalnej.....	24
Rys. 4.2. Nanotom ® S.....	24
Rys. 4.3. Geometrie pomiarowe μ CT	27
Rys. 4.4 Plastikowy, szczelnie zamykany pojemnik pomiarowy na zastawki.....	28
Rys. 4.5. Fiji	29
Rys. 4.6 Wizualizacja w 3D fragmentu powierzchni uzyskana dzięki zastosowaniu opcji <i>Isosurface</i>	30
Rys. 4.7 Efekt działania opcji <i>Thickness</i> ; różne kolory oznaczają różne średnice danych fragmentów obiektu.....	31
Rys. 5.1. Wybrany przekrój przez zastawkę Z19 z widocznymi artefaktami kołowymi	32
Rys. 5.2 Próg binaryzacji dla obrazu zastawki Z16 separujący złoże	32
Rys. 5.4 Powiększone fragmenty zastawek Z12 oraz Z17.....	42
Rys. 5.5. Wybrane przekroje przez zastawki Z13, Z15, Z30, Z29 i Z20	45
Rys. 6.1. Rezultat zastosowania wtyczki <i>Thickness</i> dla zastawki Z13.....	48
Rys. 6.2. Wybrany przekrój przez płatek zastawki Z15	49
Rys. 9.1. TEST, 12 μ m.....	67
Rys. 9.2. Z12, 12 μ m.....	67
Rys. 9.3. Z13, 12 μ m.....	67
Rys. 9.4. Z15, 12 μ m.....	67
Rys. 9.5. Z16, 12.6 μ m.....	68
Rys. 9.6. Z17, 12 μ m.....	68

Rys. 9.7. Z18, 12 μm	68
Rys. 9.8. Z19, 12,5 μm	68
Rys. 9.9. Z20, 12 μm	68
Rys. 9.10. Z21, 12 μm	69
Rys. 9.11. Z22, 12 μm	69
Rys. 9.12. Z23, 12 μm	69
Rys. 9.13. Z24, 16 μm	69
Rys. 9.14. Z25, 12 μm	69
Rys. 9.15. Z26, 12 μm	69
Rys. 9.16. Z27, 12 μm	70
Rys. 9.17. Z28, 12 μm	70
Rys. 9.18. Z29, 12 μm	70
Rys. 9.19. Z32, 14 μm	70
Rys. 9.20. Z36, 14 μm	70
Rys. 9.21. Z37, 12 μm	70
Rys. 9.22. Z39, 12 μm	70

12 SPIS TABEL

Tab. 4.1. Wybrane parametry techniczne urządzenia pomiarowego Nanotom® S.....	25
Tab. 5.1. Zestawienie wartości obranych progów dla wszystkich zastawek	60
Tab. 5.2. Parametry statystyczne wyznaczone dla złogów na podstawie liczby punktów o danej gęstości dla poszczególnych wartości poziomów szarości.	61
Tab. 5.3. Parametry statystyczne wyznaczone dla tkanki miękkiej na podstawie liczby punktów o danej gęstości dla poszczególnych wartości poziomów szarości.	62
Tab. 6.1. Wyniki otrzymane dla złogów podczas analizy ilościowej płatków półksiężycowatych.....	64
Tab. 6.2. Wyniki otrzymane dla najcięższej frakcji złogów podczas analizy ilościowej płatków półksiężycowatych zastawek aortalnych.....	65

13 SPIS WYKRESÓW

Wyk. 5.1. Przykładowa krzywa progowania sporządzona dla zastawki Z16	32
Wyk. 5.2. Krzywa progowania sporządzona dla zastawki Z42	33
Wyk. 5.3. Wykres zbiorczy histogramów gęstości złożeń dla zastawek z I serii pomiarowej: TEST, Z12-Z20 (z pominięciem Z19)	35
Wyk. 5.4 Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości złożeń dla zastawek z II serii pomiarowej: Z21-Z33, Z36-Z40	35
Wyk. 5.5. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości złożeń dla zastawek z III serii pomiarowej: Z41-Z44, Z46-Z47.....	36
Wyk. 5.6. Wykres zbiorczy obrazujący średnią wartość gęstości złożeń pochodzącą ze złożenia ich histogramów gęstości (po odrzuceniu I serii pomiarowej oraz kilku próbek z pozostałej puli) wraz z zaznaczonym obszarem niepewności wyznaczonym na podstawie odchylenia standardowego.....	37
Wyk. 5.7. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z I serii: TEST, Z12-Z20 (z odrzuceniem Z19).....	38
Wyk. 5.8 Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z II serii: Z21-Z33, Z36-Z40.....	38
Wyk. 5.9. Wykres zbiorczy znormalizowanych histogramów gęstości tkanki miękkiej dla zastawek z III serii: Z41-Z44, Z46-Z47	39
Wyk. 5.10. Wykres zbiorczy obrazujący średnią wartość gęstości tkanki miękkiej pochodzącą ze złożenia ich histogramów gęstości (po odrzuceniu I serii pomiarowej oraz kilku próbek z pozostałej puli) wraz z zaznaczonym obszarem niepewności (przerzywane linie)	40
Wyk. 5.11 Analiza statystyczna histogramów gęstości złożeń	41
Wyk. 5.12. Analiza statystyczna histogramów gęstości tkanki miękkiej.....	43
Wyk. 5.13. Krzywa progowania dla zastawki Z44.....	44
Wyk. 6.1. Zawartość procentowa złożeń w płatku półksiężycowatym poszczególnych zastawek aortalnych	47
Wyk. 6.2. Rozkład wielkości grudek dla zastawek z I serii pomiarowej.....	48
Wyk. 6.3. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla I serii pomiarowej.....	50
Wyk. 6.4. Wykres zbiorczy rozkładu wielkości grudek dla zastawek z II serii pomiarowej: Z21-Z33, Z36-Z40	50

Wyk. 6.5. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla II serii pomiarowej, po odrzuceniu krzywych wyraźnie odbiegających od reszty, tj. dla Z29 oraz Z40.....	51
Wyk. 6.6. Wykres zbiorczy rozkładu wielkości grudek dla zastawek z III serii pomiarowej: Z41-Z44, Z46-Z47	52
Wyk. 6.8. Wykres zbiorczy średniej wartości rozkładu wielkości grudek dla wszystkich zastawek	54
Wyk. 6.9. Zawartość procentowa najcięższej frakcji złogów w całej objętości płatka.....	55
Wyk. 6.10. Zawartość procentowa najcięższej frakcji złogów w ich całkowitej objętości	56
Wyk. 6.11. Wykres średniej wartości rozkładu wielkości ziaren najcięższej frakcji obecnej w złogach.....	57