



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Preklinické využití a kritické zhodnocení mikro-CT
z pohledu orální a maxilofaciální chirurgie**

Martin Bartoš

Praha 2019

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Autor: MUDr. et MDDr. Martin Bartoš

Školitel: prof. MUDr. et MUDr. René Foltán, Ph.D., FEBOMFS

Školitel konsultant: odb. as. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1.lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Praze

ABSTRAKT

Preklinická zobrazovací metoda mikro-CT (mikrotomografie) umožňuje vizualizovat a kvantifikovat strukturu zkoumaných vzorků, a to s rozlišením v řádu jednotek mikrometrů. Její užití, rozšíření a význam celosvětově narůstá. Kromě řady výhod (nedestruktivita, možnost přímé 3D analýzy, časová efektivita aj.) má mikro-CT i některé limitace (problematická validace výsledků, vliv obrazových modifikací aj.). Tato práce se zabývá využitím a kritickým zhodnocením mikro-CT v oblasti výzkumu a vývoje kovových i nekovových materiálů perspektivně využitelných v klinické praxi k podpoře kostního hojení. První část se věnuje vybraným limitacím mikro-CT. Porovnali jsme mikro-CT a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) při hodnocení velikosti pórů, což je zásadní strukturní parametr tkáňových nosičů. Práce uvádí problematičnost tohoto hodnocení a popisuje významně vyšší hodnoty dosažené pomocí SEM (přibližně trojnásobně), což umožňuje komparaci studií využívajících pouze jednu z metod. V rámci řešení otázky validace mikro-CT analýzy byl vyvinut software umožňující generování fantomových datasetů 3D objektů o definovaných strukturních parametrech, který testování analýzy umožňuje a jenž byl využit v našich projektech k optimalizaci zpracování dat. Dále jsme porovnávali hodnocení struktury kostní tkáň pomocí mikro-CT a dvou histologických metod (výbrusy a dekalCIFikované parafinové řezy). Mezi mikro-CT a histologickými metodami nebyly signifikantní rozdíly, což dokládá, že mikro-CT může v tomto případě zastoupit

konvenční postup, navíc s výhodou nedestruktivity, časové efektivity a možnosti vyhodnocení celého vzorku. V druhé části jsou shrnuty provedené studie zaměřené na charakterizaci tkáňových nosičů, zejména parametrů porozity, s cílem optimalizace jejich přípravy a lepší predikce chování po implantaci. Zaměřili jsme se též na změny struktury tkáňových nosičů v důsledku hydratace, ke které po implantaci dochází. Pozorovali jsme významné změny mechanických vlastností při nevýznamných změnách struktury vzorků. V rámci *in-vivo* experimentu byla hodnocena degradace kovového resorbovatelného osteosyntetického materiálu (hořčíková slitina WE43) stanovením změny objemu a povrchu implantátů v čase. Degradace akcelerovala po 12 týdnech hojení, objem se zmenšoval a povrch přechodně narůstal v důsledku fragmentace implantátu. Provedené studie potvrzují významný přínos zobrazovací metody mikro-CT s předpokladem jejího rozšíření a standardizace v řadě dalších výzkumných oblastí.

Klíčová slova: Mikro-CT, kostní regenerace, biomateriály, tkáňové nosiče, orální chirurgie, maxilofaciální chirurgie

ABSTRACT

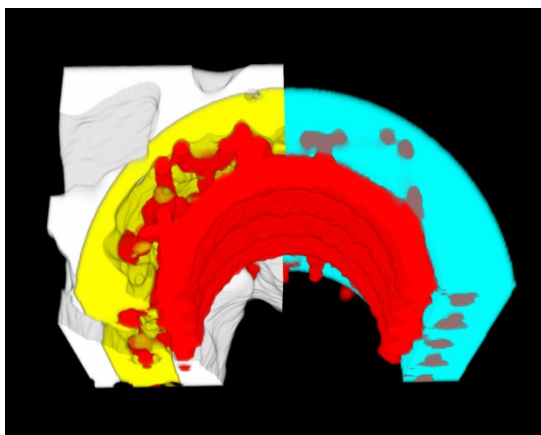
The preclinical imaging method micro-CT (microtomography) allows the visualization and quantification of the structure of samples at a resolution of micrometers. Its' importance is increasing globally. In addition to several advantages (non-destructive, the possibility of direct 3D analysis, time efficiency, etc.), micro-CT also has some significant limitations (problematic validation of results, image artifacts, significant influence of image modifications, etc.). This thesis focuses on the application of micro-CT in the field of research and development of metallic and non-metallic materials promoting bone healing with their possible clinical applications. The first part addresses the limitations of micro-CT through several studies. A comparison of pore sizes in biomaterials utilizing scanning electron microscopy (SEM) and micro-CT was performed, and the complications of pore size evaluation were presented. SEM image analysis leads to significantly higher values than micro-CT (approximately three times), which allows for comparison of the studies using only one of these methods. Validation of micro-CT 3D analysis results based on calibration phantoms with complex structure, to date, is not possible. We therefore developed software generating phantom datasets of 3D objects with well-defined structural parameters. This enabled testing of micro-CT analysis accuracy, along with quantification of bias introduced by many factors (e.g. image processing or image noise). Furthermore, we compared the evaluation of bone structure using micro-CT and two histological methods

(ground and decalcified paraffin sections). There were no significant differences between micro-CT and the histological methods, which proves that in this case micro-CT can replace the conventional approach with the advantages of no destruction of samples, time efficiency and whole specimen evaluation. The second part summarizes the studies carried out on the characterization of the structures of tissue engineering scaffolds, in particular their porosity, in order to optimize their fabrication and prediction of their behaviour. Tissue engineering scaffolds are usually evaluated in a dry state, so we focused on changes caused by hydration, as this always occurs after material implantation. Significant alterations of mechanical properties were observed with minimal structural changes. As part of the *in-vivo* experiment, the degradation of metal resorbable osteosynthetic material (WE43 magnesium alloy) was evaluated by determining the changes in volume and surface of the implants over time. Implant degradation accelerated after 12 weeks of healing with decrease of volume and temporary increase of surface - due to implant fragmentation. The studies carried out confirm a significant benefit of micro-CT imaging with the postulation of the future increase of its importance.

Keywords: Micro-CT, bone regeneration, biomaterial, tissue engineering scaffold, oral surgery, maxillofacial surgery

1 Úvod a cíle práce

Preklinická zobrazovací metoda mikro-CT umožňuje vizualizovat a kvantifikovat strukturu zkoumaných vzorků, a to s rozlišením v řádu jednotek mikrometrů. Mezi její hlavní přednosti patří nedestruktivita, rozsáhlé možnosti 2D i 3D zobrazení (obr. 1), přímá 3D analýza za nativních podmínek, vysoké rozlišení a časová efektivita (Landis E. N. a Keane D. T., 2010). Analýzou mikro-CT dat je možné hodnotit velmi široké spektrum strukturních parametrů (objem, povrch, počet objektů, tloušťka struktury, porozita, isotropie aj.), které jsou následně interpretovány (Schladitz K., 2011). Získaná data mohou být použita pro matematické modelace. Využití mikro-CT v posledním desetiletí celosvětově významně narůstá. Spektrum aplikací je velice široké a zahrnuje jak vědy technické, tak biologické (Stock S. R., 2009). V řadě oblastí se mikro-CT postupně stává standardní zobrazovací metodou (např. kostní biologie). Kromě mnoha předností však má tato metoda i své limitace, které mohou vést k chybným výsledkům. Jako příklad lze uvést značnou závislost na kvalitě obrazových dat, která je ovlivněna CT artefakty (např. kruhové artefakty), obrazovým šumem a modifikacemi obrazových dat, které jsou před dalším zpracováním většinou nezbytné. Významné je, že doposud přetrvává nejednoznačnost v metodologii užití mikro-CT, prezentaci dosažených výsledků, jejich interpretaci a zejména validaci (Bouxsein M.L. et al., 2010; Cengiz I. F. et al., 2018).



Obr. 1: Příklad mikro-CT vizualizace při hodnocení osseointegrace 3D tištěného titanového implantátu (vlastní data). Červená – titanový implantát; bílá – kostní tkáň; tyrkysová – oblast zájmu (vymezena okrajem preparované štoly a vnějším povrchem implantátu), ve které je

hodnocena novotvořená kost; žlutá – kostní tkáň uvnitř oblasti zájmu (novotvořená kostní tkáň).

Hlavním cílem předkládané dizertační práce je využití mikro-CT v oblasti vývoje a testování materiálů určených k podpoře kostního hojení (tkáňové nosiče a resorbovatelný osteosyntetický materiál), které jsou perspektivní z pohledu klinické aplikace v humánní medicíně. Mezi základní charakteristiky těchto biomateriálů je řazena 3D struktura, která má vliv na interakci s okolní tkání (prostup živin a odpadních látek, migrace buněk, vaskularizace aj.). Zásadním parametrem je v případě tkáňových nosičů porozita (Jones A.C. et al., 2009). Ta může být rozdělena podle komunikace s okolním prostředím na otevřenou a uzavřenou, a právě její stanovení je konvenčními postupy obtížně dosažitelné. Důkladná znalost 3D struktury zkoumaných vzorků umožňuje optimalizovat postupy přípravy (s cílem dosáhnout konkrétní struktury), hodnotit její změny v různých podmínkách a vyhodnocovat a lépe predikovat vliv struktury na reakci

s biologickým systémem. Ve studiích zaměřených na kostní tkáňové nosiče je standardně hodnocena velikost pórů daných materiálů (nejčastěji na základě měření snímků skenovací elektronové mikroskopie), ačkoliv dosud není konsensus ohledně použité metody hodnocení. Různé metody měření pravděpodobně povedou k dosažení odlišných hodnot, což komplikuje porovnávání jednotlivých studií a obecně zhoršuje jejich reprodukovatelnost.

Práce se dále zabývá kritickým zhodnocením možností a limitací mikrotomografie, a to včetně otázky validace výsledků. Mikro-CT výsledky 3D parametrů struktury vzorku většinou popisují vzorek o neznámé hodnotě těchto parametrů. V případě evaluace materiálu, jehož složení je poměrně jednoduché, lze konvenčními metodami tyto parametry zjistit a použít jako referenční. Pokud jsou však analyzovány komplexní struktury se složitou, často hierarchicky organizovanou strukturou s četnými kolidujícími částmi (např. kostní trámčina, porézní biomateriál), situace je výrazně komplikovanější. Většinou totiž není možné spolehlivě ověřit, jak přesné jsou mikro-CT výsledky a jaký je vliv zpracování dat a postupu analýzy. Řešením by bylo zhotovení kalibračních fantomů komplexní struktury na úrovni mikrometrů s přesně definovanými prostorovými parametry. Dosud však není k dispozici metoda, která by s dostatečnou spolehlivostí k tomuto účelu mohla být použita.

Dizertační práce je založena na souboru publikovaných prací, které jsou komentovány a diskutovány. Přehled tematických oblastí, kterým byla při doktorském studiu věnována hlavní pozornost, je uveden níže.

Řešení těchto cílů bylo zároveň spojeno se zaváděním a testováním zcela nové zobrazovací modality na pracovišti Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN. Dostupnost mikro-CT v České republice je prozatím poměrně nízká. Lze předpokládat, že význam mikro-CT bude trvale narůstat, a že se v krátkém časovém horizontu stane zcela běžnou zobrazovací metodou.

Hlavní a dílčí cíle práce:

I. Validace a kritické zhodnocení mikro-CT analýzy

- a) Porovnání hodnocení porozity tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a skenovací elektronové mikroskopie (SEM).
- b) Testování kalibrace mikro-CT analýzy za využití softwarově vygenerovaných datasetů 3D objektů se známými prostorovými parametry.
- c) Komparace výsledků mikro-CT a histologického hodnocení struktury kostní tkáně.

II. Mikro-CT evaluace biomateriálů s primárním zaměřením na kostní tkáňovou regeneraci

- a) Vyhodnocení 3D struktury vyvíjených tkáňových nosičů.
- b) Posouzení strukturních změn porézních kompozitních tkáňových nosičů na bázi kolagenu v průběhu jejich hydratace.
- c) Evaluace biodegradabilního osteosyntetického materiálu v *in-vivo* experimentu.

2 Metodika: využití mikro-CT

V této části je přehledně shrnuta mikro-CT metodika využívaná při řešení uvedených témat. Celý proces skenování a zpracování dat může mít zásadní vliv na dosažené výsledky. Kompletní metodika uvedených projektů je detailně popsána v publikovaných článcích.

Studovaný vzorek musí být před mikro-CT skenováním vhodně připraven, což závisí na jeho charakteru (např. biologický či materiálový). Zásadní je zajistit stabilní polohu vzorku ve skenovací komoře, kde mohou být umístěny jak volně na nosiči vzorků, tak ve zkumavkách. Pokud vzorek nemá dostatečný RTG kontrast, je možné využít kontrastních látek (např. fosfowolframové kyselina; Metscher B.D., 2009). V projektu byl využit mikro-CT přístroj SkyScan 1272 (Bruker micro-CT, Kontich, Belgie; obr. 2) a výrobcem dodaný software. S ohledem na typ vzorku, požadavky na zobrazení a následné analýzy byly nastaveny skenovací parametry (velikost pixelu, proud a napětí rentgenky, filtr, průměrování snímku, rotační krok a stupně rotace vzorku aj.; Cooper D. et al., 2007, Pyka G. et al, 2014). Skenováním je vytvořen dataset projekčních snímků (obr. 3 -A).



Obr. 2: Ex-vivo mikro-CT přístroj Bruker micro-CT SkyScans 1272 (převzato z Bruker micro-CT).

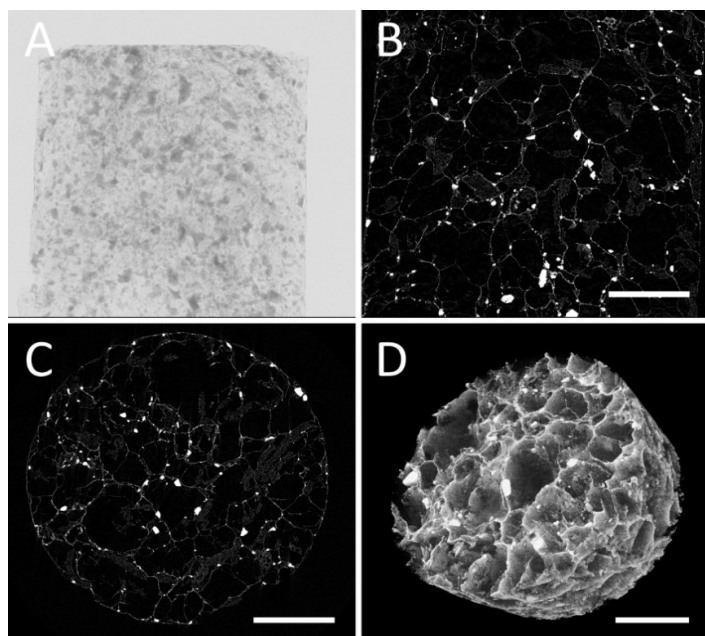
Pro rekonstrukci datasetu průřezových snímků (Obr. 3 – B,C) byl využit oficiální software výrobce NRecon a InstaRecon (Bruker micro-

CT, Kontich, Belgie). Základním krokem je definování převodu hodnoty atenuačního koeficientu, který náleží každé základní objemové jednotce (voxel), na hodnoty stupňů šedi. Takto získaná data většinou vyžadují modifikaci před dalším využitím (vizualizace či analýza struktury), například redukce obrazového šumu. Zcela kritická je volba oblasti zájmu (region of interest - ROI) v analyzovaném datasetu, která slouží jako výchozí objem, uvnitř kterého probíhá kvantifikace struktury. Před výpočty je nezbytné provedení binarizace obrazu (převedení obrazu ze stupňů šedi do černobílé), která je rovněž jedním z problematických bodů mikro-CT analýzy, protože má zásadní vliv na výsledky (Hara T. et al., 2002) a její stanovení je většinou subjektivní. Uvedené kroky byly aplikovány v řadě variant dle konkrétní situace. V řadě projektů byly dále využívány při obrazových analýzách binární operace (práce s paralelními datasety pomocí logických operátorů) či morfologické operace (např. funkce eroze, dilatace, otevírání či uzavírání struktury). K analýzám byl využit software výrobce CTAn (CT analyser; Bruker micro-CT, Kontich, Belgie). 2D i 3D zobrazení naskenovaných vzorků bylo dosaženo několika způsoby při využití oficiálního softwaru výrobce DataViewer a CTVox (Bruker micro-CT, Kontich, Belgie; obr. 3 – B,C,D).

Pro charakterizaci struktury byly využity různé 2D i 3D parametry, jejichž hodnoty byly dále interpretovány. V případě tkáňových nosičů byla hlavním parametrem porozita, která byla hodnocena ve stanovené standardizované oblasti zájmu. Byl kvantifikován objem matrice, objem pórů, analýza spojení prostorů porozity s okolním prostředím

a tedy rozlišení otevřené a uzavřené porozity a následně velikost pórů, která byla založena na 3D analýze algoritmem Sphere-fitting a dosažené distribuční křivce velikosti pórů v dané oblasti zájmu (Hildebrand T. a Rüegsegger P, 1997). Stejným způsobem byla hodnotitelná i tloušťka stěny matrice nosiče.

Obr. 3: Příklady mikro-CT zobrazení porézního kompozitního tkáňového nosiče (vlastní data, převzato z Bartoš et al., 2018): A) 2D projekční snímek; sada takových



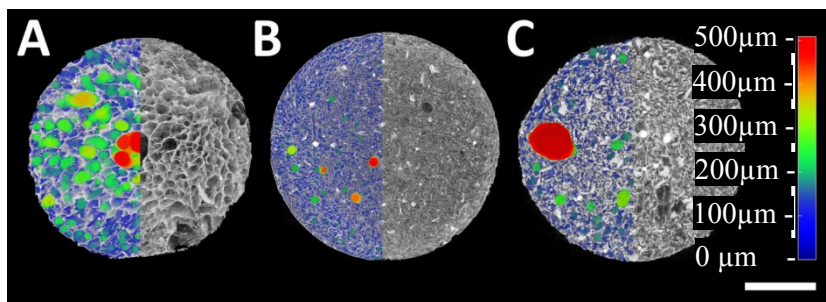
snímků s definovaným rotačním krokem je základem pro následnou rekonstrukci; B, C) rekonstruovaný 2D snímek ve 2 rovinách zobrazení: koronální (B) a transversální (C); 2D zobrazení umožňuje detailní hodnocení struktury a je základem pro následné 2D i 3D vizualizace a analýzy strukturních parametrů; D) 3D vizualizace vzorku. Na snímcích B, C, D jsou patrné póry, jejich rozměr a tvar, matrice nosiče (stěny) a denzní částice (hydroxyapatit). Měřítka (B, C, D) = 1 mm.

3 Výsledky a diskuse: prezentace hlavních výsledků

3.1 Validace a kritické zhodnocení mikro-CT analýzy

3.1.1 Porovnání hodnocení porozity tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a skenovací elektronové mikroskopie (SEM)

Porovnání různých postupů hodnocení velikosti pórů tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a SEM bylo reakcí na dosavadní absenci konsensu hodnocení porozity biomateriálů, a to navíc za situace, kdy jsou zcela běžně v publikacích studovány a doporučovány konkrétní hodnoty optimální velikosti pórů. Dle očekávání se hodnoty různých parametrů popisujících velikost pórů lišily. Hodnoty dosažené SEM analýzou byly přibližně trojnásobné ve srovnání s mikro-CT analýzou. Jako vysvětlení se nabízí možný selekční bias při SEM analýze (opomíjení malých pórů) a vliv obrazového šumu při mikro-CT analýze (vliv na Sphere-fitting algoritmus). Příklad vizualizace mikro-CT dat je na obr. 4. Na základě semikvantitativního hodnocení vybraných aspektů obou metod (např. destruktivita, dostupnost, časová efektivita, 3D hodnocení) vychází mikro-CT jako výhodnější metoda charakterizace. Je zde diskutována obtížnost hodnocení velikosti pórů a význam neznalosti reálné hodnoty. Uvedené poznatky umožňují porovnání studií užívajících pouze jednu z testovaných metod.



Obr. 4: Mikro-CT vizualizace 3 typů (A, B, C) porézních kompozitních tkáňových nosičů (vlastní data). Pravé části nosiče jsou ve stupních šedi a je zde dobře patrná struktura nosiče, velikost a tvar pórů. V levé části je kombinováno zobrazení matrice nosiče (stupně šedi) s porozitou, která je barevně kódována dle velikosti póru. Protože se jedná o průřez, může být zobrazení zdánlivě matoucí, např. pokud je v řezu zachycen velký pór pouze okrajově, pak bude barva odpovídat vyšší hodnotě než barva v daném řezu větších sousedních pórů – patrné na snímku B). Měřítka = 3 mm; vpravo barevně kódované měřítko.

3.1.2 Testování kalibrace mikro-CT analýzy za využití softwarově vygenerovaných datasetů 3D objektů se známými prostorovými parametry

Uvedený projekt se zabýval problematikou spolehlivosti výsledků mikro-CT analýzy, možností ověření výsledků, jejich ovlivnění obrazovými modifikacemi (např. redukce šumu, binarizace) a charakterem zkoumaného vzorku (např. isotropie). Tyto procesy vnášejí do analýzy obtížně kvantifikovatelné zkreslení (bias). V rámci projektu byl vyvinut volně dostupný program TeIGen, který umožňuje generovat virtuální mikro-CT datasety použitelné k testování 3D analýzy. Pomocí tohoto programu mohou mikro-CT uživatelé sami

provést analýzu datasetů s různým nastavením parametrů a tím studovat vlivy různých operací na výsledky a také hodnotit vzniklé nepřesnosti. Na základě analýz testovacích datasetů byly popisovány odchylky různých parametrů mikro-CT výsledků od zadaných hodnot o přibližně 5% u objemu a počtu objektů a o 15% u povrchu a délky objektů. Chyba významně narůstala při snižování rozlišení datasetu (nejvíce poté, co velikost voxelu přesáhla 1/10 průměru typického objektu v datasetu) a nárůstu obrazového šumu. V rámci hodnocení byly zjištěny kombinace rizikových faktorů (např. rozlišení, velikost objektů a obrazový šum), které vedou k významným nepřesnostem výsledků mikro-CT 3D analýzy.

3.1.3 Komparace výsledků mikro-CT a histologického hodnocení struktury kostní tkáně

Struktura kostní tkáně je běžně hodnocena pomocí histologických metod. Mikro-CT se stává významnou alternativou. V této studii bylo cílem porovnat výsledky dosažené pomocí dvou histologických metod (dekalifikované řezy a výbrusy) a mikro-CT při stanovení objemu kostní tkáně, objemu trabekulární kosti, objemu a tloušťky kortikální kosti. Rozdíly mezi zkoumanými metodami nebyly statisticky signifikantní. Obě histologické metody dobře korelovaly s hodnotami dosaženými pomocí mikro-CT. Toto podporuje využití mikro-CT při analýze těchto parametrů místo konvenčních postupů, jež jsou pracné a časově náročné. Zároveň bylo potvrzeno, že evaluace uvedených parametrů na základě 2-3 histologických řezů/výbrusů odpovídá

hodnotám, které jsou získány při analýze celého kostního vzorku pomocí mikro-CT. Je však nutné zdůraznit, že v případě nehomogenní struktury kostní tkáň (např. výzkum hojení kostních defektů) lze očekávat, že nepřesnosti způsobené limitací na několik málo řezů vzorkem mohou být významné. Mikro-CT umožňuje oproti histologii přímou analýzu mnoha dalších 3D parametrů (např. otevřená a uzavřená porozita). V této práci byla též popsána kostní struktura a její variabilita v oblasti velkého trochanteru prasete, jež může být užita jako reference ve studiích, které danou oblast použijí pro experimenty.

3.2 Mikro-CT evaluace biomateriálů se zaměřením na kostní tkáňovou regeneraci

3.2.1 Vyhodnocení 3D struktury vyvíjených tkáňových nosičů

Mikro-CT bylo v několika projektech užito k charakterizaci 3D struktury tkáňových nosičů. Hlavními hodnocenými parametry byla porozita (poměr otevřené a uzavřené porozity, velikost pórů a její distribuce), objem a homogenita struktury. Na základě těchto analýz proběhla selekce vzorků k dalšímu testování, což umožnilo optimalizaci procesu přípravy. Preferována byla homogenní struktura o vysoké otevřené porozitě (80-90%) s velikostí pórů o hodnotách 50-200 μm (mikro-CT analýza). Hodnocení struktury probíhalo jak na základě výsledků kvantifikace, tak pomocí připravených 2D a 3D vizualizací.

3.2.2 Posouzení strukturních změn porézních kompozitních tkáňových nosičů na bázi kolagenu v průběhu jejich hydratace

Tkáňové nosiče jsou běžně hodnoceny v suchém stavu. Po implantaci do organismu však dochází k jejich hydrataci, což jejich vlastnosti může měnit. Cílem této práce bylo využít mikro-CT ke studiu těchto změn. Pro účely projektu byla vytvořena metodika RTG kontrastování tkáňového nosiče (pomocí Lugolova roztoku) a mikro-CT skenování hydratovaných vzorků. Hydratace nevedla k významným změnám strukturních parametrů a permeability. Předpokládaný nárůst uzavřené porozity (v důsledku uzavírání komunikací mezi póry bobtnáním materiálu) nebyl pozorován. Mechanické vlastnosti byly hydratací významně ovlivněny u všech typů nosičů. V průběhu času dochází k uvolňování kontrastní látky do média, ve kterém je vzorek inkubován, což vede ke snížení RTG denzity scaffoldu a zároveň zvýšení RTG denzity pozadí. Hodnocení bylo proto omezeno na 24 hodin, protože v delších intervalech se kontrast nosiče snižoval a data tak byla hůře hodnotitelná.

3.2.3 Evaluace biodegradabilního osteosyntetického materiálu v *in-vivo* experimentu

V tomto projektu byla hodnocena degradace hořčíkových implantátů (slitina WE43) zavedených do králičích tibií. Vzorky kostní tkáně s implantáty byly po usmrcení experimentálních zvířat ve stanovených časových intervalech (4, 8, 12 a 16 týdnů) hodnoceny pomocí

histologie a mikro-CT. Kontrolní materiál byl titan. Mikro-CT 3D analýza hodnotila objem a povrch implantátů. Objemové změny u WE43 byly pozorovány až mezi posledními dvěma časovými intervaly, kdy došlo k redukci objemu o téměř 50 %. Titanové implantáty zůstaly beze změny. Povrch mírně narůstá u WE43 mezi 8 a 12 týdnem, avšak významný nárůst je pozorován až mezi 12 a 16 týdnem. V průběhu degradace tedy dochází ke snižování objemu a přechodnému nárůstu povrchu, který je důsledkem fragmentace materiálu. Hodnota BIC u WE43 byla nejvyšší po 8 týdnech. Reakce okolní tkáně byla uspokojivá a rozdíly mezi titanem a WE43 nebyly významné.

4 Závěry

- V rámci doktorského studia byla hodnocena řada aspektů aplikace mikrotomografie ve výzkumu biomateriálů (kovových i nekovových) vyvíjených pro účely kostní regenerace, a to včetně možnosti validace výsledků a komparace se standardními metodami hodnocení.
- Mikro-CT představuje významnou 3D zobrazovací metodu, která zároveň umožňuje kvantifikaci struktury zkoumaných vzorků. Využití mikro-CT v oblasti výzkumu biomateriálů vyvíjených pro účely kostní regenerace je velice široké a výhodné. Na základě provedených studií byl potvrzen významný přínos zobrazovací metody mikro-CT s předpokladem jejího dalšího rozšíření a standardizace v řadě výzkumných oblastí.
- Mikro-CT bylo úspěšně použito při hodnocení struktury tkáňových nosičů pro kostní regeneraci a tím umožnilo mj. optimalizovat proces přípravy a podpořit výběr vzorků k dalšímu testování. Zásadní pro hodnocení byly parametry porozity. Zaměřili jsme se též na změny struktury tkáňových nosičů v důsledku hydratace, což odpovídá reálné situaci nastávající po implantaci materiálu. Z výsledků vyplývá, že dochází k významným změnám mechanických vlastností při nevýznamných změnách struktury vzorků.

- Mikro-CT umožňuje 3D hodnocení porozity a přesné odlišení otevřených a uzavřených pórů. Při srovnání hodnocení velikosti pórů tkáňových nosičů se standardním hodnocením pomocí SEM byly mikro-CT hodnoty získané 3D analýzou přibližně trojnásobně nižší. Uvedené poznatky umožňují porovnání studií užívajících pouze jednu z testovaných metod.
- Při řešení otázky validace mikro-CT výsledků byl vyvinut software, který umožňuje generování fantomových datasetů 3D objektů pro testování mikro-CT analýzy. Pozorované rozdíly mezi zadanými parametry 3D objektů a výsledky mikro-CT analýzy dosahovaly přibližně 5% u objemových a 15% u povrchových parametrů. Chyba výrazně narůstala při nižším rozlišení datasetu a vyšší intenzitě obrazového šumu.
- Ve srovnávací studii hodnocení vybraných parametrů struktury kostní tkáně nebyly shledány signifikantní rozdíly mezi mikro-CT 3D analýzou a histologickými metodami (dekalifikované parafinové řezy a výbrusy). Mikro-CT v tomto případě může zastoupit konvenční postup s výhodou nedestruktivity, časové efektivity a vyhodnocení celého vzorku.
- Mikro-CT jsme použili k hodnocení *in-vivo* experimentu resorbovatelného osteosyntetického materiálu (hořčíková slitina WE43), při kterém byly stanoveny objemové a povrchové změny v průběhu degradace implantátů.

5 Použitá literatura

Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A.: Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. Volume 30, Issue 10, October 2012, Pages 546-554. Doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005

Bouxsein M.L., Boyd S.K., Christiansen B.A., Guldberg R.E., Jepsen K.J., Müller R.: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.

Cengiz I.F., Oliveira J.M., Reis R.L.: Micro-CT – a digital 3D microstructural voyage into scaffolds: a systematic review of the reported methods and results. *Biomater Res*. 2018; 22: 26. Published online 2018 Sep 26. doi: 10.1186/s40824-018-0136-8

Hara T., Tanck E., Homminga J., Huiskes R.: The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties. *Bone*. Volume 31, Issue 1, July 2002, Pages 107-109. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00782-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00782-2)

Hildebrand T., Rüegsegger P.: A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*. 1997, 185(1), 67-75. doi: 10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x

Ho S. T., Hutmacher D. W. (2006): A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27(8), 1362-1376. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.035

Jones A.C., Arns Ch.H., Hutmacher D.W., Milthorpe B.K., Sheppard A.P., Knackstedt M.A.: The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*. Volume 30, Issue 7, March 2009, Pages 1440-1451 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.056>

Metscher, B.D.: MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology* 2009,9:11. doi:10.1186/1472-6793-9-11

Pyka G., Kerckhofs G., Schrooten J., Wevers M.: The effect of spatial micro-CT image resolution and surface complexity on the morphological 3D analysis of open porous structures. *Materials Characterization*. 2014, 87:104-115

Stock, S.R.: *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*. CRC Press, 2009. ISBN 9781420058765.

6 Seznam publikací autora

A) Publikace (IF), které jsou podkladem dizertační práce

1) Bartoš M., Suchý T., Foltán R.: Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? BioMedical Engineering OnLine. 2018 Aug; 17(1):110. doi: 10.1186/s12938-018-0543-z

IF= 1.676

2) Jiřík M., Bartoš M., Tomášek P., Malečková A., Kural T., Horáková J., Lukáš D., Suchý T., Kochová P., Hubálek Kalbáčová M., Králíčková M., Tonar Z.: Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths and object counts in fibrous and porous materials using Xray microtomography. Microscopy Research and Technique. 2018 Jun; 81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011.

First two authors contributed equally to the manuscript

IF = 1.327

3) Kubíková T., Bartoš M., Juhás Š., Suchý T., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M., Tonar Z.: Comparison of ground sections, paraffin sections and micro-CT imaging of bone from the epiphysis of the porcine femur for quantitative histological evaluation . Annals of Anatomy. 2018 Nov; 220:85-96. doi: 10.1016/j.aanat.2018.07.004

IF= 1,852

4) Gregor A., Filová E., Novák M., Kronek J., Chlup H., Buzgo M., Blahnová V., Lukášová V., Bartoš M., Nečas A., Hošek J.: Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. Journal of Biological Engineering. 2017 Oct;11:31. doi: 10.1186/s13036-017-0074-3

IF=5.256

5) Suchý T., Šupová M., Bartoš M., Sedláček R., Piola M., Soncini M., Fiore G.B., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M.: Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states? Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2018 Feb; 29(3):20. doi: 10.1007/s10856-017-6024-2

IF = 2,448

6) Bartoš M., Suchý T., Tonar Z., Foltán R., Hubálek Kalbáčová M.: Micro-CT in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application. *Ceramics-silikáty*. 2018; 62(2),194 - 199. doi: 10.13168/cs.2018.0012

IF= 0,680

7) Sauerová P., Suchý T., Šupová M., Bartoš M., Klíma J., Juhásová J., Juhás Š., Kubíková T., Tonar Z., Sedláček R., Piola M., Fiore G.B., Soncini M., Hubálek Kalbáčová M.: Positive impact of dynamic seeding of mesenchymal stem cells on bone-like biodegradable scaffolds with increased content of calcium phosphate nanoparticles. *Mol Biol Rep*. 2019 Jun 10. doi: 10.1007/s11033-019-04903-7. [Epub ahead of print]

IF= 1.889

8) Levorová J., Dušková J., Drahoš M., Vrbová R., Vojtěch D., Kubásek J., Bartoš M., Dugová L., Ulmann D., Foltán R.: In vivo study on biodegradable magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws. *Journal of Biomaterials Applications*. 2018 Feb; 32(7):886-895. doi: 10.1177/0885328217743321

IF = 2,082

B) Publikace (IF) bez vztahu k tématu dizertace

1) Bohuslavová R., Čerychová R., Papoušek F., Olejníčková V., Bartoš M., Görlach A., Kolář F., Sedmera D., Semenza G.L., Pavlinková G.: HIF-1 α is required for development of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jun 13. pii: 201903510. doi: 10.1073/pnas.1903510116.

IF= 9.504

2) Kolesová H., Bartoš M., Hsieh W.C., Olejníčková V., Sedmera D. Novel approaches to study coronary vasculature development in mice. *Developmental Dynamics*. 2018 Aug; 247(8):1018-1027. doi: 10.1002/dvdy.24637

IF= 2,507

3) Horáková J., Mikeš P., Lukáš D., Šaman A., Jenčová V., Klápšřová A., Švarcová T., Ackermann M., Novotný V., Kaláb M., Lonský V., Bartoš M., Rampichová M., Litvinec A., Kubíková T., Tomášek P., Tonar Z.: Electrospun vascular grafts fabricated from poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) used as a bypass for the rabbit carotid artery.

Biomedical Materials. 2018 Sep; 13(6):065009.

doi: 10.1088/1748-605X/aade9d

IF= 2.897

4) Jágr M., Ergang P., Pataridis S., Kolrosová M., Bartoš M., Mikšík I.: Proteomic analysis of dentin-enamel junction and adjacent protein-containing enamel matrix layer of healthy human molar teeth. European Journal of Oral Sciences. 2018 Nov 22.

doi: 10.1111/eos.12594

IF= 1.655

5) Kulhavá L., Eckhardt A., Pataridis S., Bartoš M., Foltán R., Mikšík I.: Comparison of human saliva composition according to tooth decay and gender. Folia biologica (2018) 64, 195-203.

IF= 1.044

6) Lukáč P., Hartinger J., Mlček M., Popková M., Suchý T., Šupová M., Závora J., Adámková V., Benáková H., Slanař O., Bartoš M., Grus T.: Novel gentamicin-releasing wound dressing from freshwater-fish *Cyprinus carpio* collagen crosslinked with carbodiimide.

Journal of Bioactive and Compatible Polymers (2019) 34; 3: 246-262

<https://doi.org/10.1177/0883911519835143>

IF= 1.976