

Metoder for bildesegmentering av karkanaler og kartlegging av dens struktur for individer med ulik alder

Caroline Enevoldsen

Master i fysikk og matematikk

Innlevert: juni 2018

Hovedveileder: Dag Werner Breiby, IFY

Medveileder: Fredrik Kristoffer Mürer, IFY

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for fysikk

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for fysikk ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim.

Professor Dag Werner Breiby har vært min veileder. Jeg setter stor pris på den gode veiledningen og støtten jeg har fått gjennom hele prosjektet. Takk for oppløftende ord og kreative løsninger når jeg har stått fast. Videre vil jeg takke min medveileder, Ph.d.-stipendiat Fredrik Kristoffer Mürer, som alltid har stilt opp når jeg har trent hjelp. Jeg vil også rette en stor takk til Kristin Olstad for at jeg fikk låne CT-bildene og for all kunnskapen hun har delt om osteochondrose. Videre vil jeg takke Ole Tore Buset for god opplæring på VGStudio Max, Basab Chattopadhyay for gode innspill under veiledningsmøtene og resten av røntgengruppa for inspirerende møter gjennom semesteret. Til slutt vil jeg rette en stor takk til forloveden min, Christian N. Sundby, som har holdt ut med en følelsesmessig berg-og dalbane og for at han er den fantastiske personen som han er!

NTNU, Trondheim 11. juni 2018
Caroline Enevoldsen

Sammendrag

Osteochondrose (OC) er en skjelettsykdom som oppstår i ledd under utvikling hos barn og unge dyr. Den er definert som en fokal forstyrrelse i den endokondrale ossifikasjonen, en prosess for dannelsen av bein og longitudinal vekst. Sykdommen er forårsaket av en svikt i blodkarene som går inne i karkanalene i vekstbrusken, som kan føre til dannelsen av sprekker og løse bruskbiter i leddet. Dette er en tilstand kjent som osteochondritis dissecans (OCD), som kan gi store leddplager for den berørte.

Karkanalene svikter mest sannsynlig i det de blir inkorporert inn mot ossifikasjons-senteret. Imidlertid er det uvisst hvorfor blodtilførselen svikter. Målet med oppgaven var å finne metoder for å analysere strukturen til karkanaler i vekstbrusken fra knokler avbildet med røntgen-mikro-computertomografi (mikro-CT). Knoklene talus og tibia fra åtte varmblodstravere mellom 0 og 7 uker ble undersøkt og det ble funnet en metode for å segmentere bein og karkanaler fra omkringliggende vekstbrusk. Segmenteringen samsvarte med observasjoner av mikro-CT-bildene justert med terskling ("thresholding"), men feilet i å segmentere karkanaler med lite tverrsnitt og karkanaler orientert med vinkelrett på beinoverflaten. Videre ble det funnet metoder for å kvantifisere karkanalens diameter og andelen karkanaler i vekstbrusken. Imidlertid viser resultatet fra den kvantitative analysen at metoden har en viss usikkerhet.

Abstract

Osteochondrosis (OC) is a joint disorder that occurs in both children and young animals. It is defined as a focal disturbance in the endochondral ossification, which is the process of bone formation and longitudinal growth of bone. The disease is caused by vascular failure in the cartilage canals located in the growth cartilage, which can lead to the formation of cracks in the articular cartilage and potentially loose cartilage fragments within the joints. This condition is known as osteochondrosis dissecans (OCD), which may cause major pain in the affected joint.

It is still not known why some of the cartilage canals fail, but failure most likely occurs as the blood vessels become incorporated into the ossification center. The aim of this work has been to obtain a method for analyzing the structure of cartilage canals in the growth cartilage from bones examined with x-ray computed tomography (micro-CT). Talus and tibia from eight Standardbred foals between 0 and 7 weeks old were examined. With the obtained segmentation method we were able to separate the cartilage canals and the bone from the surrounding growth cartilage. The results from the segmentation are in accordance with observations from the micro-CT data, but the method fails to segment cartilage canals with small cross-sections and cartilage canals oriented perpendicular to the bone. Furthermore, methods for quantifying the diameter of the cartilage canals were established as well as the ratio of cartilage canals to growth cartilage. The results from the quantitative analysis do however include some uncertainty.

Innhold

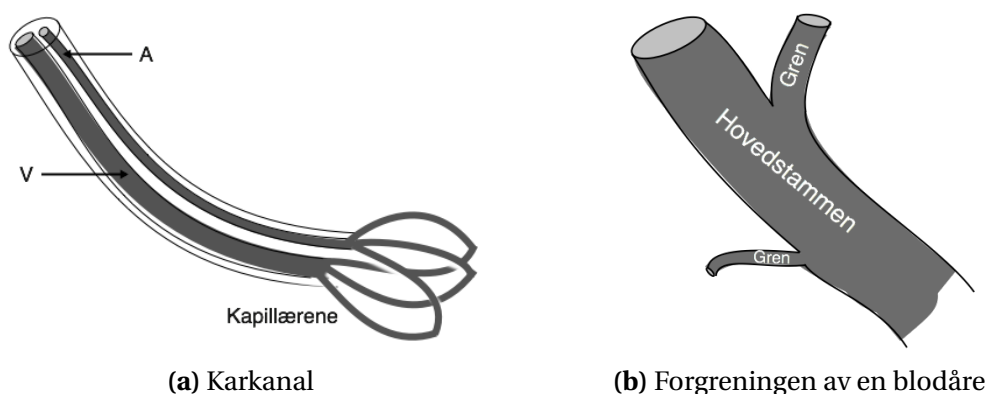
1 Innledning	3
2 Teori	7
2.1 Avbildning med mikro-computertomografi	7
2.1.1 Røntgenstråling	8
2.1.2 Røntgendektoren	14
2.2 Dannelsen av bruske og bein i pattedyr	17
2.2.1 Utviklingen av ett skjelett	18
2.3 Bildebehandling	22
2.4 Bildesegmentering	23
3 Metode	27
3.1 Preparering av knokkelprøver	27
3.2 Prosedyre for mikro-CT-målinger	28
3.3 Metode for bilde-segmentering av talus og tibia	29
3.4 Metode for analyse av karkanaler i vekstbrusk	30
4 Resultater	33
4.1 Segmenteringen av karkanaler og bein	33
4.2 Kvantitativ analyse av karkanalene i vekstbrusken	38
5 Diskusjon	43
5.1 Segmenteringen av knokkelprøvene	43
5.2 Evaluering av den kvantitative analysen	48
6 Konklusjon	53
Referanser	54

Kapittel 1

Innledning

De fleste vev i kroppen er avhengig av oksygen for å kunne fungere. Lungene tilfører oksygen til de røde blodcellene som transporterer oksygenet videre gjennom blodåre-systemet til de fleste vev og celler i kroppen. Dersom blodtilførselen svikter kan det oppstå et infarkt, som betyr at deler av vevet dør, betegnet som nekrose [1].

Vekstbrusk er en type vev som kan bli påvirket dersom blodtilførselen stanser. Denne brushtypen er kun tilstede hos barn og unge dyr, før den gradvis blir omdannet til bein i løpet av oppveksten. Manglende blodforsyning til vekstbrusken kan føre til at sykdommen *osteochondrose* (OC) oppstår. Blodforsyningen til vekstbrusken føres i såkalte *karkanaler* (se Figur 1.1a), og dersom denne blodtilførselen svikter kan deler av vekstbrusken bli nekrotisk og dermed ikke bli omdannet til bein [1]. Som en ytterste konsekvens kan leddbrusken som er lokalisert utenfor vekstbrusken, sprekke opp og løse bruskbiter kan bli inkorporert i leddet. Denne tilstanden er kjent som *osteochondritis dissecans* (OCD) og kan fremkalle store leddplager hos den berørte [2, 1].



Figur 1.1: Illustrasjon av en karkanal og blodårene som føres via denne. **(a)** Karkanalene fører blodårer med oksygenrikt blod fra hjerte, via arteriene (A) og tilbake via venene (V). De mikroskopiske kapillærene forbinder arteriene og venene. **(b)** En blodåre består ofte av en tykk hovedstammen som forgrenes ut i tynnere grener.

Hvorfor blodtilførselen i enkelte av karkanalene svikter er foreløpig et ubesvart spørsmål. Studier viser at konfigurasjonen til karkanalene i vekstbrusken er relatert til modningen av dyret [3]. Karkanalene går fra å være overlegne parallelle til å bli vinkelrette i forhold til beinfronten i løpet av forbeningsprosessen. I tillegg minker vaskulariteten og det blir mindre blod i omløp i vekstbrusken fordi det blir færre karkanaler, de blir kortere og har færre grener ut fra hovedstammen (se Figur 1.1b) [4]. Studier har også vist at karkanalene ofte svikter i det de blir inkorporert fra vekstbrusken og inn mot beinet, og at det gjerne er de parallelle karkanalene som svikter [5].

Histologi¹ er betraktet som den konvensjonelle metoden for å studere lesjoner med OC på grunn av den høye oppløsningen [4]. Røntgen-mikro-computer-tomografi (mikro-CT) har tidligere også blitt benyttet, og studier viser at metoden er i stand til å detektere de samme lesjonene som histologiske metoder, men med en lavere oppløsning. Med mikro-CT er det relativt enkelt å tilføre farge i prøvene som gir materialspesifikk kontrast i en ellers transparent prøve, i tillegg kan OC-lesjoner studeres i tre dimensjoner (3D) i motsetning til histologi som er forbeholdt analyse av bildesnitt i to dimensjoner (2D) [4].

Den indre 3D-strukturen til leddet kan kvantifiseres gjennom bildesegmentering og påfølgende analyse. Bildesegmentering er en metode for å dele et digitalt bilde inn i meningsfulle regioner basert på likheter i bildet [7]. Ved segmentering separeres interessante regioner og objekter i et bilde som senere kan beskrives kvantitativt eller bli benyttet for å stille en diagnose [8]. Det har tidligere ikke blitt foretatt en kvantitativ analyse av OC-lesjoner avbildet med mikro-CT. Tidligere segmentering har kun vært basert på tersking ("thresholding") for å separere vekstbrusken fra karkanalene og beinet, og studien har kun vært basert på kvalitative observasjoner av blodkar [4].

I denne masteroppgaven vil leddene tibia (skinnebeinet) og talus (ankelbeinet) hos åtte hester med ulik alder, bli undersøkt ved å anvende mikro-CT. Hestene er mellom 0 og 7 uker gamle, hvor aldersforskjellen mellom hver av individene er en uke. Dette gir en unik mulighet til å studere trender i karkanalene i forbeningsprosessen og kan være med på å øke forståelsen av patologien til OC. Målet med oppgaven er å bestemme om kvantitativ CT kan benyttes for å bestemme trender i karkanalene nær ossifikasjonsfronten for individer av ulik alder. CT-bildene vil først bli segmentert i VGStudio MAX v.3.1 og deretter analysert kvantitativt i Matlab R2018a.

¹anatomisk studie av vev i mikroskop [6]

Oppgavens struktur

Det første kapitlet i denne masteroppgaven tar for seg grunnleggende teori som er relevant for å forstå oppgaven. Kapitlet forklarer hvordan et 3D-bilde blir til ved å bruke mikro-CT og hvordan regioner i bildet kan separeres ved bildesegmentering. Her kan man også lese om hvordan brusk blir til bein hos barn og unge dyr, og komplikasjoner rundt denne prosessen, da relatert til OC. Kapittel 3 beskriver fremgangsmåten for hvordan knoklene ble klargjort før avbildningen og hvordan mikro-CT-målingen ble gjennomført. Datasettet som ble benyttet ble opprinnelig brukt i forbindelse med en annen studie om OC fra 2008 [4]. Det som står skrevet om prøveprepareringen og fremgangsmåten for mikro-CT-målingen er gjengitt fra den opprinnelige studien. Fremgangsmåten for bildesegmenteringen og den kvantitative analysen står også beskrevet i dette kapitlet. Resultatet er presentert i Kapittel 4, som videre blir diskutert i Kapittel 5. I Kapittel 6 blir det gitt en konklusjon.

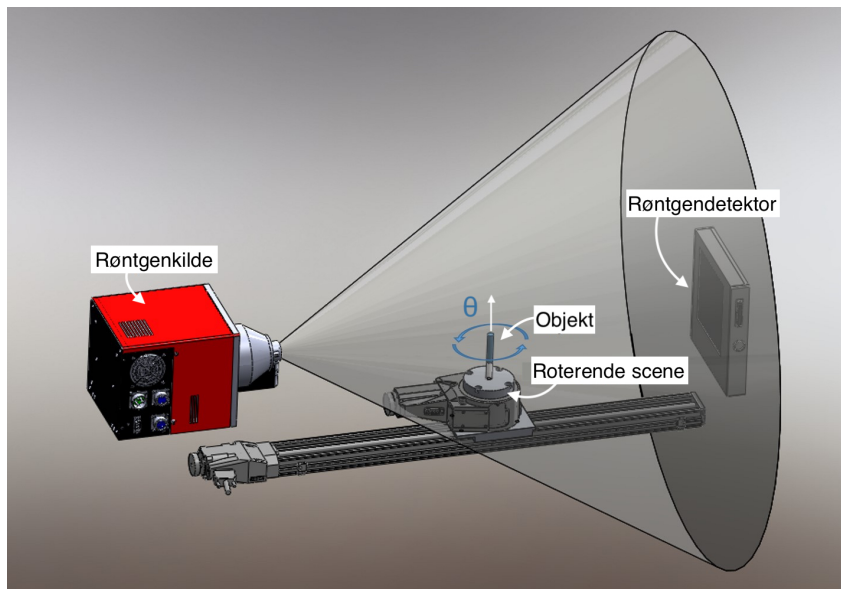
Kapittel 2

Teori

2.1 Avbildning med mikro-computertomografi

Mikro-computertomografi (mikro-CT) er en høyoppløselig avbildningsteknikk hvor det ved snittbilder dannes et 3D-bilde av en liten prøve, som ofte mindre enn $500\ \mu\text{m}$ tykk [9, 10]. Ordet *tomografi* kommer fra det greske ordet *tomos* som betyr snitt og *graphia* som betyr beskrivelse [11]. CT beskriver en ikke-destruktiv metode for å avbilde den innvendige, 3D-strukturen til en prøve ved å benytte stråling, som for eksempel røntgenstråling, og er en ettertraktet avbildningsteknikk innenfor blant annet biomedisin, materialforskning, matvitenskap og geofag. I medisin er metoden mye anvendt for å avbilde bein, men også andre typer vev, slik som brusk, leddbånd og blodårer, kan avbildes, men da er det nødvendig å tilføre et kontrastmiddel i vevet [12].

En røntgen-mikro-CT-skanner består av en røntgenkilde og en detektor plassert midt imot hverandre, med en prøve i mellom. Kort forklart foregår en røntgen-CT-undersøkelse ved at en røntgenkilde emitterer en strøm av fotoner gjennom en prøve og videre mot en detektor som måler antall fotoner gjennom prøven [13]. Figur 2.1 illustrerer et vanlig mikro-CT-oppsett.

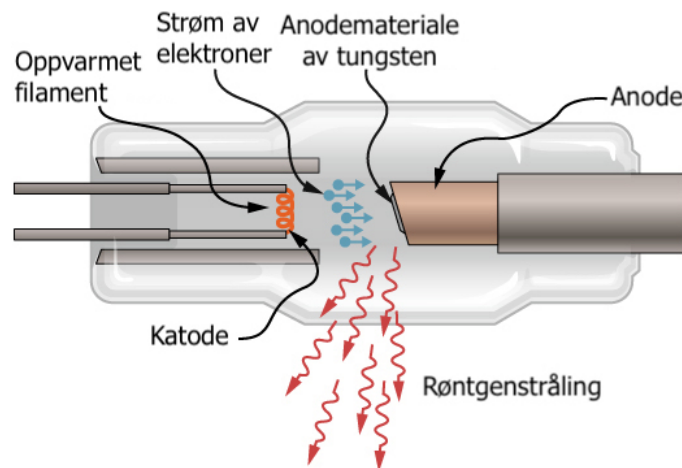


Figur 2.1: Skissert oppsett av en røntgen-mikro-CT-skanner. En røntgenkilde, plassert på venstre side, sender ut en strøm av fotoner som transmitterer objektet og tilslutt blir registrert av en 2D-røntgendetektor som beregner andelen fotoner som blir absorbert av prøven. Under avbildningen blir prøven kontinuerlig rotert over en vinkel θ som enten går over 360° eller 180° , samtidig som røntgenkilden og detektoren blir holdt i en stabil posisjon (Kilde: Novadep, 2016 [14]).

2.1.1 Røntgenstråling

Røntgenstråling er elektromagnetisk stråling med en bølgelengde på 0.01 nm - 100 nm som oppstår i det elektroner med høy hastighet akselererer mot en anode også blir bremsed ned. Elektronene frigjør energi i form av røntgenstråling [15, 16]. For å produsere røntgenstråling benyttes det ofte et røntgenrør, slik som vist i Figur 2.2. Den består av en katode og en anode som er plassert ovenfor hverandre i et lufttomt glasskabinett. Mellom elektrodene er det en spenningsforskjell som gjør at elektronene naturlig akselererer fra den negativt ladde katoden og til den positivt ladde anoden [17, 12].

Katoden er elektronkilden til røntgenrøret. Elektroner blir emittert fra katoden når filamentet når en såpass høy temperatur (~ 2400 K) at bindingsenergien i katodematerialet blir brutt. Dette er kjent som *termionisk effekt* [15]. I det elektroner kolliderer med anoden vil omtrent 99% av energien gå over til varme og kun 1% vil gå over til å produsere røntgenstråling. Elektromagnetisk stråling oppstår som en konsekvens av to prosesser; (1) ved transmisjon av elektroner mellom de innerste skallene i atomet (se Figur 2.3a) og (2) ved oppbremsing av ladde partikler på grunn av det elektromagnetiske feltet nær atomkjernen (se Figur 2.3b) [11].

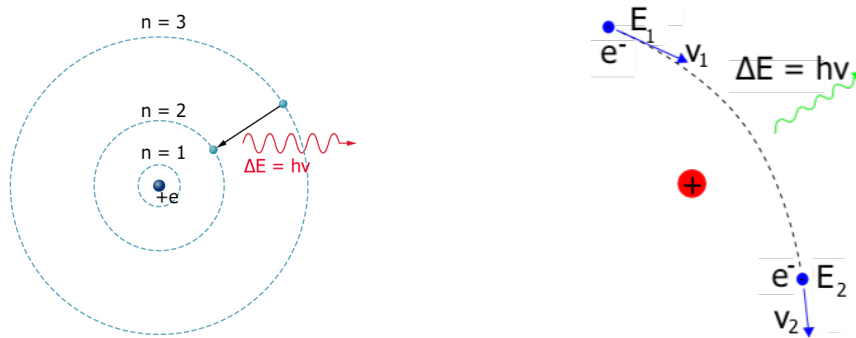


Figur 2.2: Skisse av et røntgenrør. Røntgenstråling blir emittert fra anodematerialet, her av tungsten, i det elektroner med høy hastighet akselerer fra katoden og mot anoden. Elektronene emitterer fra katoden i det bindingsenergien i katodematerialet blir brutt (Kilde: Physics LibreTexts [18]).

Når et elektron med tilstrekkelig stor kinetisk energi treffer anodematerialet, vil den slå fritt et elektron fra det innerste elektronskallet, altså K-skallet [11]. K-skallet blir fullt dersom ett elektron deeksiterer fra et høyere energinivå, slik som i Figur 2.3a. På grunn av energiforskjellen mellom elektronskallene blir det emittert et foton med en energi lik

$$h\nu = E_f - E_i, \quad (2.1)$$

hvor E_f er energinivået til det innerste elektronskallet, E_i er energinivået til elektronet som deeksiterer, h er Plancks konstant og ν er frekvensen til strålingen som blir emittert. Energiforskjellen, som ligger mellom 0.052 keV og 129.544 keV gir opphav til den såkalte *karakteristiske røntgenstrålingen* [11]. Den karakteristiske røntgenstrålingen kan ses som to tydelige toppunkter i røntgenspekteret i Figur 2.3c, og betegnes som anodematerialets fingeravtrykk fordi energiforskjellen mellom elektronskallene i et bestemt atom er unikt [15]. Elektronene som ikke har tilstrekkelig kinetisk energi kan bli bremset opp i anoden. Elektronene som passerer atomkjernen nære nok vil bli påvirket av det elektriske feltet fra atomkjernen, slik som i Figur 2.3b. Elektronenes retning avbøyes og dessuten vil hele eller deler av den kinetiske energi gå tapt. Andelen tapt energi blir emittert som røntgenstråling og kan ha en verdi opp mot 20 MeV. Denne typen stråling er kjent som *bremsstråling* eller *bremsestråling*, som er opphavet til det kontinuerlige spekteret i Figur 2.3c [15].

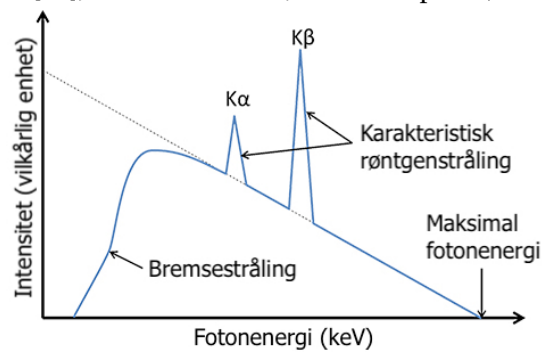


(a) Karakteristisk røntgenstråling

(Kilde: Physics LibreTexts [19])

(b) Bremsstråling

(Kilde: Wikipedia, 2007 [20])



(c) Røntgenspekter (Kilde: Radiology Café [21])

Figur 2.3: Generering av røntgenstråler. (a) Et elektron deeksiterer fra atomskall $n = 3$ til $n = 2$, og energiforskjellen ΔE fører til at det blir emittert karakteristisk røntgenstråling. (b) Et elektron blir bremsert ned på grunn av det elektriske feltet nær atomkjernen, og andelen tapt energi blir emittert som bremsstråling. (c) Røntgenspekteret består av to deler, et linjespekter og et kontinuerlig spekter som er forårsaket av henholdsvis karakteristisk røntgenstråling og bremsstråling. Notasjonene K_α og K_β viser til transmisjonen av et elektron fra L- ($n = 2$) og M-skallet ($n = 3$) til K-skallet ($n = 1$) [15].

Propagering av røntgenstråling gjennom et materiale

Prøven som er plassert mellom røntgenrøret og detektoren, blir eksponert for røntgenstråling fra ulike projeksjonsvinkler θ (se Figur 2.4a). Projeksjonsvinkelen definerer fra hvilke retninger som prøven blir utsatt for røntgenstråling og er typisk definert mellom 0° og 180° [12, 22, 11]. De resterende 180° rundt objektet er kun speiling av de første 180° fordi fotonene blir absorbert i like stor grad uavhengig av om de sendes fremover eller bakover langs en akse gjennom prøven [23]. Til tross for dette, opererer en rekke moderne CT-oppsett med en projeksjonsvinkel på 360° , blant annet for å motvirke aliasing i det rekonstruerte bildet [15, 24].

Røntgenstrålingens evne til å propagere gjennom et materiale, avhenger av fotonenergien og absorpsjonsevnen til materialet. Absorpsjonsevnen er bestemt ut i fra

tettheten til materialet og dens kjemiske sammensetningen. Dette forklarer hvorfor bein, som blant annet består av kalsium ($Z=20$) og fosfor ($Z=15$), absorberer mer stråling enn bløtt vev som blant annet inneholder oksygen ($Z=8$), nitrogen ($Z=7$), karbon ($Z=6$) og hydrogen ($Z=1$) [25]. Desto mer stråling som blir absorbert, jo mer fremtredende blir vevet på CT-bildet. For å øke kontrasten i en bestemt type vev, for eksempel blodårer, kan pasienten injiseres med et kontrastmiddel med et høyt innhold av for eksempel jod eller barium, som er grunnstoff med høye atomnumre [26].

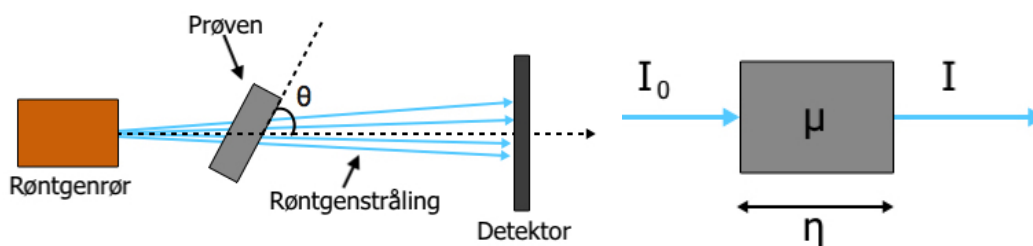
Når en stråle med fotoner transmitterer et materiale, vil strålingsintensiteten, som er proporsjonale med antall fotoner, avta eksponentielt som funksjon av materialets absorpsjonsevne og lengde. Dette er definert i *Lambert-Beers lov*, som sier at

$$I(\eta) = I_0 e^{-\mu\eta}, \quad (2.2)$$

hvor I_0 og I er strålingsintensiteten henholdsvis før og etter transmisjonen, μ er den lineære attenuasjonskoeffisienten til materialet og η er den tilbakelagte distansen i materialet. Alle parameterne er illustrert i Figur 2.4b. μ beskriver andelen fotoner som blir absorbert per enhet lengde inn i et spesifikt materiale. Koeffisienten er definert ved:

$$\mu = \frac{\rho N_A}{A} \cdot \sigma_{tot} = n \cdot \sigma_{tot}, \quad (2.3)$$

hvor ρ og A er henholdsvis tettheten og atommassen til materialet, N_A er Avogadros konstant og σ_{tot} er det totale spredningstverrsnittet. Spredningstverrsnittet beskriver forholdet mellom spredningen og innkommende fluks av fotoner.



(a) Mikro-CT-oppsett, sett ovenfra og ned

(b) Fotoner gjennom en prøve

Figur 2.4: Absorpsjon av røntgenstråler på vei gjennom en prøve. (a) I løpet av en CT-måling roteres prøven kontinuerlig over enten 180° eller 360° . Fra hvilken vinkel som prøven utsettes for røntgenstråling er gitt ved projeksjonsvinkelen θ . (b) Røntgenstråle med intensitet I_0 transmitterer gjennom en prøve med attenuasjonskoeffisienten μ og en tykkelse η , og ender opp med en intensitet I på den andre siden av prøven. Detektoren måler differansen mellom I_0 og I for å finne andelen fotoner som blir absorbert av prøven.

Vekselvirkning av fotoner med materie

Når en strøm av fotoner interagerer med et materiale vil noen av fotonene transmitterer gjennom materialet, noen vil skifte stråleretning på grunn av endring i energi som følger av spredning inne i materialet, og noen fotoner vil bli absorbert av materialet. Når fotonenergien er større enn bindingsenergien til atomet i prøven, vil hele eller deler av fotonenergien blir transformert gjennom enten fotoelektrisk effekt, Rayleigh-spredning, Compton-effekten eller pardannelse. Hvilken som er den dominerende spredningsmekanismen, avhenger av fotonenergien. Når denne øker, vil spredningsmekanismen skifte fra fotoelektriske effekt til Rayleigh-effekten til Compton-effekten til pardannelse [27, 28]. I mikro-CT forekommer ikke fotoelektrisk effekt da fotonenergien ikke er høy nok, derfor vil kun de andre spredningsmekanismene bli omtalt.

Fotoelektrisk effekt oppstår når energien til et foton overføres til et bundet elektron i prøven, slik at elektronet blir frigjort (se Figur 2.5a). Den regjerer for lave energier, i hovedsak mindre enn 100 keV [27, 28]. Rayleigh-spredning oppstår når et foton interagerer med et bundet elektron uten at atomet blir ionisert (se Figur 2.5b). Til tross for at retningen til den spredte strålen blir forandret, er energien til de innsendte og spredte fotonene den samme [15]. Compton-effekten er uelastisk spredning som oppstår når fotoner kolliderer med svakt bundet valenselektron slik at deler av fotonenergien og momentet blir overført til elektronet (se Figur 2.5c). Den resterende transmisjonen av fotonet gjennom materialet vil dermed være mindre energirik og ha en annen retning enn den opprinnelige innkommende røntgenstrålen. Betingelsen for Compton-spredning er at fotonenergien må være lik eller større enn elektronets hvileenergi, altså $h\nu \leq m_e c^2$ [28, 15].

Sannsynligheten for hvilken prosess som skjer er bestemt av spredningstverrsnittene:

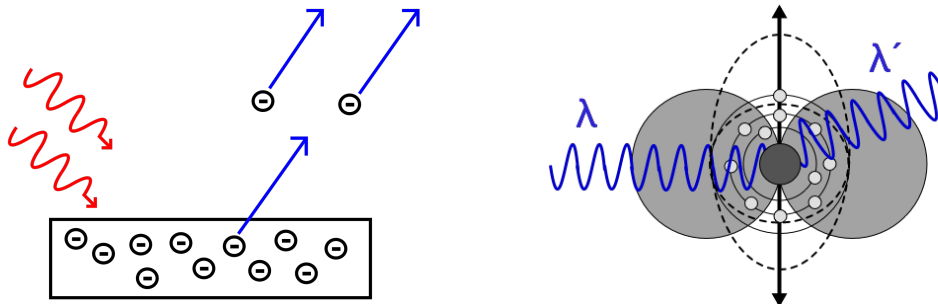
$$\sigma_{PE} \sim \rho \frac{Z^4}{E_\nu^{3/5}} \quad (2.4)$$

$$\sigma_R \sim \rho \frac{Z^2}{E_\nu^2} \quad (2.5)$$

$$\sigma_C \sim \rho \frac{Z}{E_\nu} \quad (2.6)$$

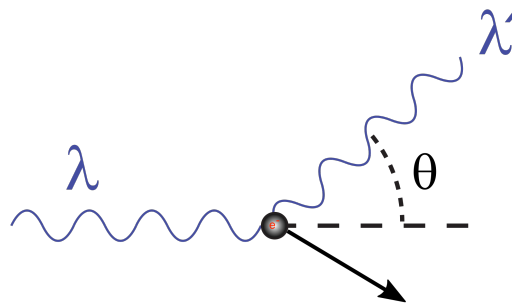
hvor ρ og Z er henholdsvis tettheten og atomnummeret til det transmitterte materialet, og E_ν er fotonenergien [29]. Disse tre interaksjonsprosessene viser at den totale spredningen av røntgenstråling i et materiale avhenger av både bølgelengden til det innsendte fotonet og atomsammensetningen til det transmitterte materialet. Generelt vil fotoner med lav energi blir lettere absorbert i et materiale enn fotoner med høy energi. Som følger av dette vil en polykromatisk røntgenstråle med tiden skifte over til

å bestå av mye hardere røntgenstråler slik at strålingsintensiteten ikke avtar i henhold til Lambert-Beers lov, gitt i ligning (2.2). Gjennomsnittsenergien til røntgenstrålen øker etter at fotoner med lav energi har blitt absorbert i et materiale med høy tetthet. Dette er kjent som "beam hardening" og gir opphav til artefakter i det rekonstruerte CT-bildet. Fotonene med tilstrekkelig lav energi kan fjernes ved å plassere et metallfilter mellom røntgenstrålen og materialet som skal undersøkes. Metallfilteret absorberer fotonene med lav energi slik at gjennomsnittsenergien til røntgenstrålen gjennom materialet øker og sannsynligheten for "beam hardening" blir redusert [15, 30].



(a) Fotoelektrisk effekt (Kilde: Wikipedia, 2007 [31])

(b) Rayleigh-spredning



(c) Compton-effekten (Kilde: Wikipedia, 2006 [32])

Figur 2.5: De vanligste spredningsprosessene mellom et foton og et materiale. (a) Fotoner blir absorbert av et materiale og det blir frigjort elektroner. (b) Et foton kolliderer med et bundet atom uten at atomet blir ionisert. Retningen til den spredte strålen er endret, men bølglengden er den samme. (c) Et foton som kolliderer med et svakt bundet valenselektron. Bølglengden til det spredte fotonet avtar.

2.1.2 Røntgendektoren

Den 2D-røntgendektoren registrerer antall fotoner som blir transmittert gjennom en prøve. For hver projeksjonsvinkel blir det konstruert et 2D-projeksjonsbilde som beskriver andelen fotoner som er absorbert av prøven, som tilsvarer $I_0 - I$. Summen av alle projeksjonene for et gitt snitt gjennom prøven blir samlet i et *sinogram*, slik som vist i Figur 2.6b [12, 22]. Den horisontale linjen i sinogrammet tilsvarer andelen fotoner som er absorbert av et snitt i prøven ved en gitt projeksjonsvinkel θ . Jo høyere intensiteten er, desto flere fotoner blir absorbert av prøven.

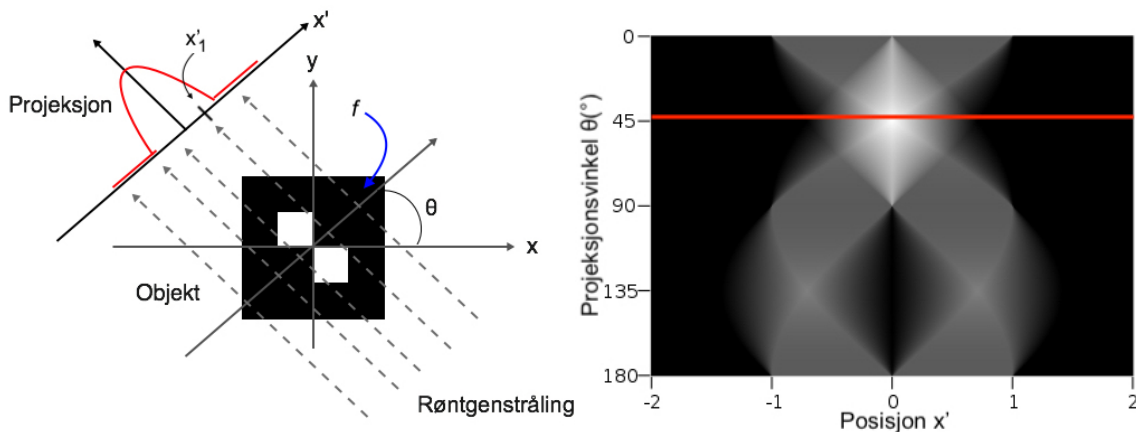
Intensiteten I til røntgenstrålen er, som tidligere nevnt, definert ved Lambert-Beers lov og ligning (2.2). I 2D er Lambert-Beers lov definert som:

$$I(x') = I_0 \exp\left(-\int_0^s \mu(x, y) ds'\right), \quad (2.7)$$

hvor I_0 og I er intensiteten til røntgenstrålen før og etter at den har tilbakelagt en distanse s gjennom en prøve. $\mu(x, y)$ er den lineære attenuasjonskoeffisienten til prøven som funksjon av posisjonene x og y [11]. La én røntgenstråle, slik som gitt i Figur 2.6, være definert ved linjen

$$x \cos \theta + y \sin \theta = x'.$$

x' er aksens som er vinkelrett i forhold til de innsendte røntgenstrålene [34]. Andelen



(a) Projeksjonen av et snittbilde

(b) Et sinogram (Kilde: Wikipedia, 2016 [33])

Figur 2.6: Summen av alle projeksjonene blir samlet i et sinogram. (a) Radontransformen gjør om en funksjon f fra (x, y) -domenet til en funksjon f i (ω, θ) domenet. Røntgenstråler sendes gjennom snittbildet med en bestemt projeksjonsvinkel θ og andelen absorberte fotoner er gitt som en projeksjon. (b) Radontransformasjonen av objektet i (a). En projeksjon av ett snitt i prøven tilsvarer en linje i sinogrammet, slik som den røde linjen markerer.

røntgenstråler som transmitterer prøven for en gitt projeksjonsvinkel, blir betegnet som en *projeksjon*, p_θ . Projeksjonen i et punkt, x'_1 , er definert ved linjeintegralet

$$p_\theta(x') = \int_s \mu(x, y) ds'. \quad (2.8)$$

Videre, ved å innføre deltafunksjonen i ligning (2.8) får man at

$$p_\theta(x') = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) \cdot \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - x') ds, \quad (2.9)$$

som er *Radontransformasjonen*, tilsvarende sinogrammet, til en 2D-prøve [34].

Rekonstruksjon av projeksjonene

Det finnes flere rekonstruksjonsalgoritmer, hvorav *filtrert tilbakeprojeksjon* er mest anvendt innen CT og mikro-CT [13]. For å rekonstruere en projeksjon må først den 2D-Fouriertransformen til projeksjonene i ligning (2.9) beregnes. Den er lik

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) \exp(-2i\pi(ux + vy)) dx dy, \quad (2.10)$$

hvor u og v er de romlige frekvensene i x - og y -retning i Fourier-domenet (se Figur 2.7a). I polarkoordinater er de romlige frekvensene definert ved

$$\begin{aligned} u &= \omega \cos \theta \\ v &= \omega \sin \theta, \end{aligned}$$

hvor ω er frekvensen og θ er projeksjonsvinkelen. Ved å omformulere ligning (2.10) får man at

$$F(\omega, \theta) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) \exp(-2i\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)) dx dy. \quad (2.11)$$

Dersom v settes lik 0 i ligning (2.10), kan uttrykket skrives som

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) dy \right] \exp(-2i\pi ux) dx. \quad (2.12)$$

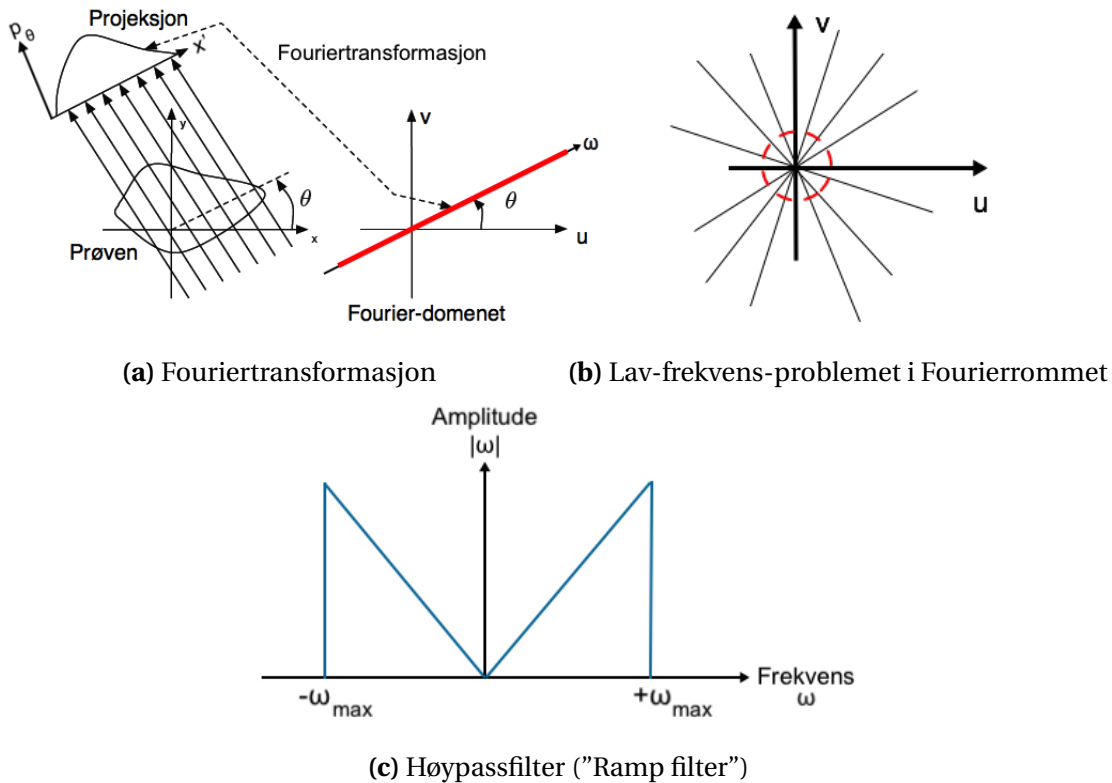
Sammenligner man uttrykket inne i hakeparentesen ser man at dette er identisk med ligning (2.8), noe som må bety at

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta=0}(x) \exp(-2i\pi ux) dx. \quad (2.13)$$

Høyre siden av ligningen representerer 1D-Fouriertransformen til projeksjonen $p_{\theta=0}(x)$. Dette er på engelsk kjent som "*Central slice theorem*". Teoremet konstaterer at sum-

men av $[p_{\theta_i}(t)]_{i=1:N}$, over N projeksjoner, utgjør 2D-Fouriertransformasjonen av den lineære attenuasjonskoeffisienten $\mu(x, y)$. Det endelige CT-bildet blir så rekonstruert ved invers Fouriertransformasjon over av alle projeksjonene [34].

Det oppstår et vektingsproblem i frekvensdomenet som betyr at Fourierrommet har et overtall av lave frekvenser. Dette er illustrert i Figur 2.7b. Konsekvensen er at det endelige rekonstruerte bildet blir uskarpt. For å unngå opphopningen av lave frekvenser i Fourier-domenet blir Fouriertransformasjonen til projeksjonene multiplisert med et høypassfilter, som for eksempel et "Ramp filter" med amplitude $|\omega| = \sqrt{u^2 + v^2}$ (se Figur 2.7c). Et "Ramp filter" fjerner de lave frekvensene ved å sette frekvensene i midten av Fourier-domenet lik null. Etter at den Fouriertransformerte projeksjonen har blitt multiplisert med filteret, kan projeksjonene bli transformert tilbake ved invers Fouriertransformasjon som tidligere [35].



Figur 2.7: Lav-frekvens-problemet som oppstår ved Fouriertransformasjonen. (a) En projeksjon $p_{\theta}(x')$ i det reelle rommet (x, y) tilsvarer Fouriertransformasjonen $F(\omega, \theta)$ i Fourierrommet (u, v) . (b) Hver av disse Fouriertransformerte projeksjonslinjene går via sentrum av (u, v) , slik at tettheten i sentrum av Fourier-domenet øker. Som følger blir det et overtall av lave frekvenser nær origo, markert i rødt. (c) Overtallet av de lave frekvensene i Fourierrommet kan korrigeres for ved å sette inn et høypassfilter. Høypassfilteret fjerner de lave frekvensene ved å sette den midtre delen av Fourier-domenet lik null.

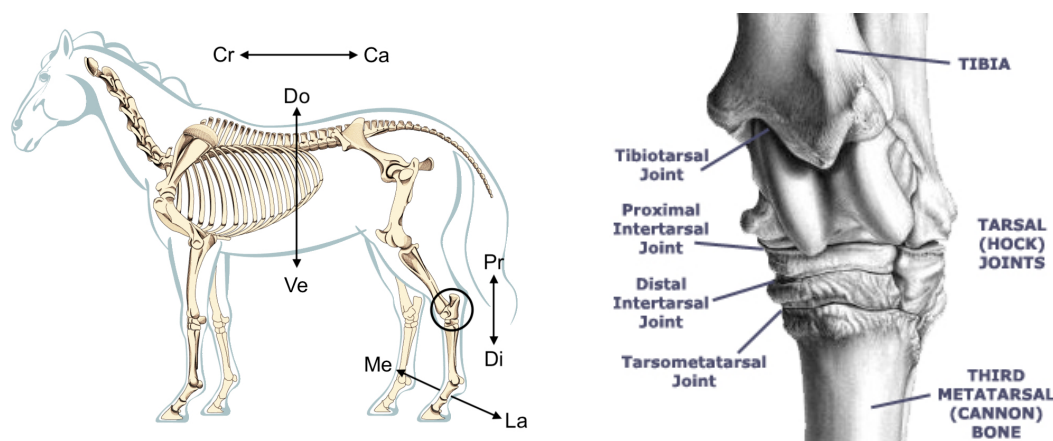
2.2 Dannelsen av brusk og bein i pattedyr

Et ledd er en bevegelig forbindelse mellom to eller flere knokler i skjelettet [36]. Knokkelender er dekket med leddbrusk, et støttevev som bidrar til en myk og friksjonsfri bevegelse i leddene [37]. Brusk utgjør en sentral rolle i pattedyrenes skjelett og er en viktig komponent som bidrar til struktur av blant annet ørene, nesene og ribbein, samt andre kroppsdeler [37]. Samtidig fungerer brusken som mellomstadiet før dannelsen av en rekke knokler i skjelettet.

Brusk er et fast vev, som kjennetegnes ved å være deformerbart og elastisk, i motsetning til bein [37]. Den inneholder kun en celletype kalt *kondrocytt*. Kondrocyttene utfører syntese og nedbrytning av den *ekstracellulære matriks-strukturen* (ECM). Den ligger mellom cellene i vevet og bestemmer vevets egenskaper og funksjon. De viktigste komponentene i ECM er proteinene kollagen og proteoglykan, som bidrar til at brusken tåler strekk og trykk. Brusken er som regel uten blodtilførsel og får næring fra omkringliggende vev [2, 38]. Det finnes tre ulike typer brusk, hyalin brusk, fiberbrusk og elastisk brusk, men i denne sammenhengen vil kun hyalin brusk bli betraktet.

Haseleddet til en hest

Haseleddet (*tarsus*), illustrert i Figur 2.8, er ett av de mest belastede leddene hos en hest [41]. Tarsus tilsvarer menneskets ankel og består av totalt seks knokler som blir



(a) Skjelettet til en hest (Kilde: New Breed Racing, 2015 [39])

(b) Nærbilde av haseleddet til en hest (Kilde: The Atlanta Equine Clinic [40])

Figur 2.8: Haseleddet til en hest. (a) Den svarte sirkelen markerer hasen på det venstre bakbeinet til en hest. Pilene indikerer de anatomiske retningene hvor La er lateral (vekk fra medialplanet), Me er medial (nært medialplanet), Pr er proksimal (nære kroppens senter), Di er distal (fjernt fra kroppens senter), Cr er kranial (mot hodeskalle), Ca er kaudal (mot halen), Do er dorsal (mot ryggen) og Ve er ventral (mot buken). (b) Detaljbilde av haseleddet til en hest.

holdt på plass av en rekke ligamenter og sener. Haseleddet er et hengselledd, som betyr at bevegelsen skjer rundt en akse. Mesteparten av bevegelsen foregår i forbindelsen mellom skinnebeinet (*tibia*) og hasen (se Figur 2.8).

2.2.1 Utviklingen av ett skjelett

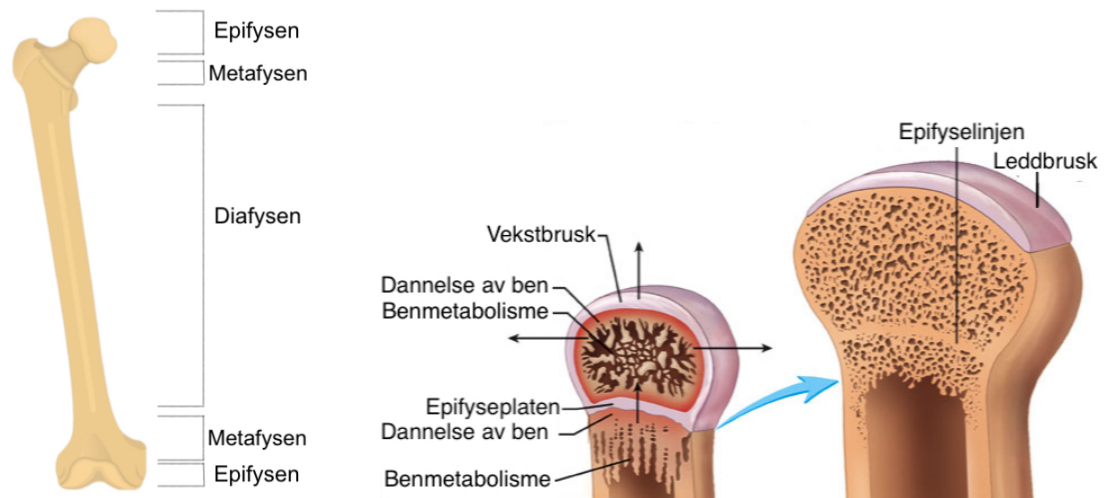
Bein er en form for erstatningsvev [38]. Hele eller store deler av skjelettet hos pattedyr er utformet fra en bruskmolell som gradvis blir fjernet og erstattet med beinvev gjennom fosterutviklingen og helt frem til dyret når voksenalderen. Denne spesielle formen for brusk, kjent som *vekstbrusk*, er kun tilstede tidlig i utviklingsfasen til skjelettet. I tillegg er vekstbrusken vaskulær, i motsetning til for eksempel leddbrusken [1].

Utgangspunktet for skjelettet starter noen uker inn i fosterutviklingen [38]. Da differensierer mesenkymale stamceller til kondrocytter som utgjør den såkalte bruskmolellen til skjelettet [42]. Kort tid etter dannes det en bruskhinne (*perichondrium*) som omslutter vekstbrusken og tilfører den blant annet næring.

Inne i vekstbrusken finnes det *karkanaler* som fører blodårer, og mesenkymale stamceller fra bruskhinnen [2]. Funksjonen til karkanalene er ikke fullstendig forstått, men blir ansett som viktig for å gi næring til vekstbrusken og fjerne avfallsprodukter [1]. I tillegg til dette kan de mesenkymale stamcellene i karkanalene differensiere til kondrocytter og osteoblaster, som henholdsvis bidrar til dannelsen av brusk og bein [37, 2]. Nydannelsen av brusk, såkalt *apposisjonell vekst*, oppstår når stamceller differensierer til osteoblaster og kondrocytter [37]. Dette kan oppstå i bruskhinnen, i karkanalene og på epifyseplaten (bestemt senere), og fører til at knoklene ekspanderer, både i lengde og tykkelse.

Endokondral ossifikasjon

Endokondral ossifikasjon beskriver forbeningen av bruskmolellen. Prosessen foregår inne i vekstbrusken hvor den gradvis blir fjernet og kontinuerlig erstattet med beinvev [1]. For å beskrive ossifikasjonen benyttes en rørknokkel som eksempel (se Figur 2.9). De to knokkelendene kalles epifysene og skaftet kalles diafysen. Under fosterutviklingen øker produksjonen av ECM og brusken i senter av diafysen, og senere epifysen, blir forkalket slik at kondrocyttene i senter av regionene dør. Blodårer utenfor beinet invaderer regionene som oppstår og fyller tomrommet. Cellene får osteogene egenskaper og kan senere bli omdannet til osteoblaster, som er beindannende celler. Regionene omtales som det *primære- og sekundære ossifikasjonssenteret*, og oppstår henholdsvis etter to- eller tre måneder inn i fosterutviklingen, og fra fødselen av. Det primære- og sekundære ossifikasjonssenteret er ansvarlig for vekst og utforming av henholdsvis diafysen og epifysen [38, 45].



(a) Rørknokkel (Kilde: Get Body Smart, 2017 [43])

(b) Apposisjonell vekst av en rørknokkel (Kilde: The McGraw-Hill Companies[44])

Figur 2.9: Utviklingen av en rørknokkel. (a) Epifysen, diafysen og metafysen definert på en rørknokkel. (b) Øverste delen av en rørknokkel fra et ungt og et voksent dyr. Epifysen er omsluttet av vekstbrusk som utvides i alle retninger, illustrert med svarte piler. Vekstbrusken erstattes med bein på epifyseplaten mot diafysen og utover fra epifysen. Når individet når voksen alder vil hele brusken, foruten om leddbrusken, være erstattet med bein.

Når skjelettet til dyret er ferdig forbenet, vil det kun være brusk igjen på leddflaten, altså leddbrusk, og i sonen mellom epifysen og diafysen, som er den såkalte *epifyseplaten* eller *vekstplaten* (se Figur 2.9b) [38]. Brusk blir dannet på epifysesiden av vekstplaten, samtidig som forbeningen tar plass på motsatt side, mot diafysen.

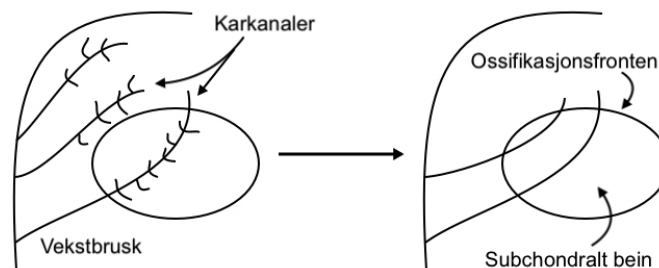
Etterhvert som brusken blir erstattet med beinvev, vil karkanalene i vekstbrusken bli inkorporert i beinet og bidra til økt vaskularisering av beinet. Karkanalene kan også naturlig trekke seg tilbake fra distal retning når brusken blir tilstrekkelig tynn slik at den ikke lenger har behov for dens tilstedeværelse [37]. Tilbakedannelsen skjer via *chondrifisering*, hvor karkanalene mest sannsynlig gjennomgår fysiologisk celledød (*apoptose*) slik at de blir kortere. I tillegg blir karkanalene omgitt av ossifikasjonsfronten og inkorporert i det sekundære ossifikasjonssenteret. Etter hvert som dyret blir eldre vil vekstbrusken bli tynnere og antall karkanaler blir redusert, fordi vekstbrusken klarer seg uten karkanaler når den er under en viss vekstrate. I det individet har nådd voksen alder vil alle karkanalene være borte og vekstbrusken vil være fullstendig erstattet med bein. Det gjenstår da kun et tynt lag med leddbrusk, slik som vist i Figur 2.9b [1].

Osteochondrose

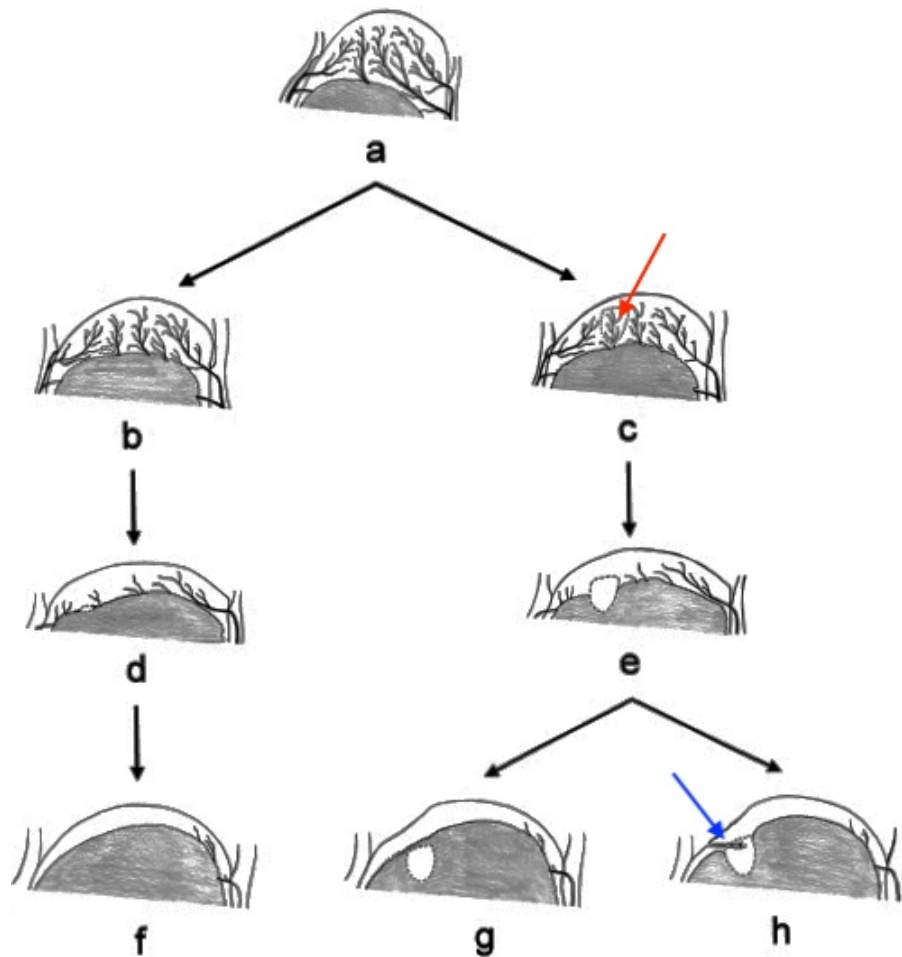
Osteochondrose (OC) er en vanlig skjelettsykdom som kan oppstå hos barn og en rekke unge dyr. Den er definert som en fokal forstyrrelse i den endokondrale forbeningsprosessen [1, 5]. Sykdommen er særlig utbredt blant griser og hester med en prevalens på henholdsvis 70-100% [46, 47, 48, 49] og 50% [50]. OC har derfor fått stor oppmerksomhet i veterinærmedisinen [1, 37, 5]. Ved OC er det påvist en feil ved blodtilførselen i karkanalene til vekstbrusken, slik at den ikke blir omdannet til beinvev og med det bortfaller fra normal forbening [5, 51]. Som en konsekvens vil nekrotiske områder fra vekstbrusken bli innlemmet som bløtt vev inne i det nyetablerte beinet. Med tiden som individet utvikler seg vil belastningen på leddene øke, slik at det i visse tilfeller kan føre til at leddbrusken sprekker opp. Denne tilstanden er kjent som *osteochondritis dissecans* (OCD) [1]. Dette er betegnet som det siste stadiet av OC og kjennetegnes ved at løse bruskbiter blir inkorporert i eller utenfor leddbrusken, noe som kan være svært smertefullt for dyret.

De etologiske faktorene er omdiskutert, hvor blant annet arv, rask vekst, anatomisk oppbygning, traumer og feilernæring har blitt sett på som potensielle årsaker til OC [37, 2]. Forskning viser imidlertid at arv og anatomisk oppbygning er den viktigste bidragsyteren til å forårsake sykdommen, og at blodårene som ryker, gjerne er de som blir inkorporert i beinfronten [1, 5]. Verdt å merke er at denne informasjonen bygger på veterinærmedisin, da det er store uenigheter mellom leger og veterinærer med tanke på sykdomsutviklingen av OC til OCD [37].

For hester forsvinner karkanalene i femur etter omtrent syv måneder, men selve beinet fortsetter å vokse i noen år til [52]. Hester regnes som ferdig utviklet når de er rundt 5 år gamle [53]. Når dyret er ungt ligger karkanalene ofte parallelt med ossifikasjonsfronten, slik som illustrasjonen til venstre i Figur 2.10 viser. Etter at mange av karkanalene har blitt inkorporert i ossifikasjonsfronten vil det kun være korte stumper igjen og disse vil være orientert vinkelrett ut fra det subchondrale beinet, slik som figuren til høyre i Figur 2.10 illustrerer. Studier viser at inkorporasjon av parallelle karkanaler kan føre til at blodtilførselen til vekstbrusken svikter [54].



Figur 2.10: Karkanalene i vekstbrusken går fra å være overlegne parallelle til å bli vinkelrette i forhold til ossifikasjonsfronten i løpet av forbeningsprosessen. Samtidig blir vekstbrusken mindre vaskulær fordi det blir færre karkanaler og færre grener ut fra hovedstammen.



Figur 2.11: Sykdomsutviklingen fra OC til OCD. **(a)** Når individet er i ung alder blir vekstbrusken forsynt med næring fra et stort nettverk av karkanaler. **(b)-(f)** Normal endokondral ossifikasjon. Karkanalene trekkes tilbake og vekstbrusken blir kontinuerlig erstattet med bein. Når individet er ferdig utviklet vil det kun gjenstå et tynt lag med leddbrusk. **(c)** Feil i blodtilførselen i karkanalene fører til nekrose i vekstbrusken. Området er markert med en rød pil. **(c)** Det nekrotiske området i vekstbrusken fører til en forsinkelse i utviklingen av ossifikasjonsfronten. **(g)** Det nekrotiske området blir uproblematisk inkorporert i det subchondrale beinet og pasienten er betraktet som frisk. **(h)** Utviklingen av OCD hvor det nekrotiske området fører til at leddbrusken sprekker opp, markert med en blå pil (Kilde: S. Ekman & C. S. Carlson, 1998 [49]).

2.3 Bildebehandling

Representasjonen av et digitalt bilde

Et monokromt bilde består typisk av 256 intensitetsverdier, hvorav verdien 0 representerer fargen svart og verdien 255 representerer fargen hvit [55]. La i og j være to heltall hvor $1 \leq i \leq m$ og $1 \leq j \leq n$. Videre la $f(i, j)$ betegne en heltallsfunksjon slik at $0 \leq f(i, j) \leq W$, hvor W betegner intensitetsverdien i bildet. Det digitale bildet er representert ved matrisen

$$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} f(1,1) & f(1,2) & \dots & f(1,n) \\ f(2,1) & f(2,2) & \dots & f(2,n) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ f(m,1) & f(m,2) & \dots & f(m,n) \end{bmatrix}, \quad (2.14)$$

hvor (i, j) definerer en posisjon i \mathbf{F} , kjent som en piksel. I 3D brukes betegnelsen voksel, men for enkelhetens skyld benyttes videre betegnelsen piksel også i 3D.

Forbehandling og justering av kontraster

Et utvidelsesfilter ekspanderer et bilde A i henhold til et strukturelement B . Operasjonen er gitt ved funksjonen

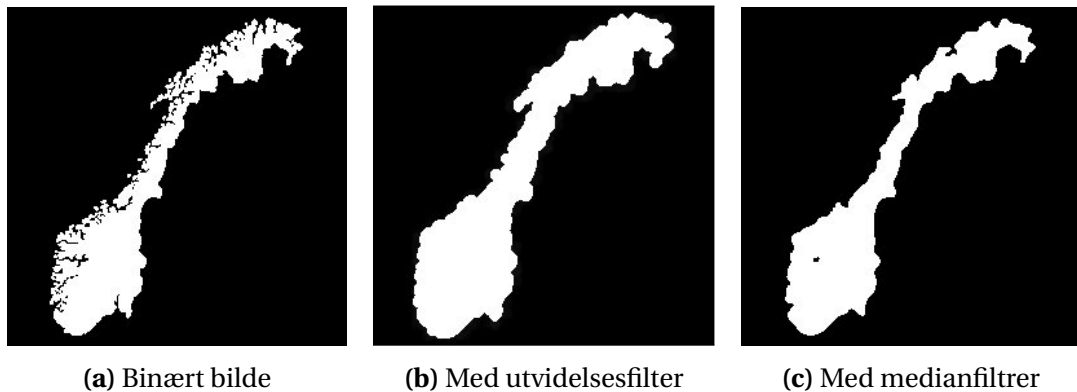
$$A * B = \bigcup_{a \in B} B_a, \quad (2.15)$$

hvor $B_a = \{c \in Z^2 \mid c = (b+a)\}$, b er en posisjon i strukturelementet B og a er en posisjon i bildet A . Prinsippet om hvordan et utvidelsesfilter fungerer er illustrert i Figur 2.12b [55].

Et medianfilter brukes gjerne for å fjerne støy og bevare grensene i bildet. Filteret ser på en piksel og betrakter nabopikslene rundt, og erstatter denne pikselen med medianverdien av nabopikslene. Se Figur 2.12c for eksempel. For å avgjøre om en piksel er en del av omgivelsene eller ikke, benyttes funksjonen

$$y[m, n] = \text{median}\{x(i, j), i, j \in w\}, \quad (2.16)$$

hvor w representerer nabopikslene rundt en gitt lokasjon $[m, n]$ i bildet. Slik at $y[m, n]$ er den mediane gråverdien og $x(i, j)$ er den opprinnelige gråverdien [56].



Figur 2.12: Forbehandling av rådata for å øke kontraster og fjerne støy. (a) Eksempel på et binært bilde. (b) Effekten av å legge et utvidelsesfilter på figuren i (a). Et utvidelsesfilter ekspanderer et bilde i henhold til et strukturelement. Dette kan brukes for å forsterke fargene i et bilde. (c) Effekten av å legge et medianfilter på figuren i (a). Et medianfilter ser på en piksel og erstatter denne med medianverdien av nabopikslene rundt.

2.4 Bildesegmentering

Bildesegmentering er en metode for å dele et digitalt bilde inn ulike, meningsfulle regioner. Hver region er homogen, som vil si at området er enhetlig representert og kan bli karakterisert med hensyn på for eksempel lysstyrke, farge, tekstur eller form [7]. Disse regionene kan korrespondere til spesifikke objekter i et bilde som er definert med en gruppe av piksler med lignende essensielle egenskaper [57].

Hvis hele området inne i et bilde er gitt som Ω , betyr det å segmentere et bilde, å bestemme settene $S_k \subset \Omega$. Tilsammen må segmenteringen oppfylle kravet om at

$$\Omega = \bigcup_{k=1}^K S_k, \quad (2.17)$$

hvor $S_k \cap S_j = \emptyset$ for $k \neq j$. Segmentene er disjunkte og overlapper dermed ikke med hverandre. K definerer antall klasser og brukes for å skille visse områder i et bilde fra hverandre [8]. For eksempel kan Figur 2.12a segmenteres inn i to klasser, forgrunn og bakgrunn, som er definert ut i fra intensiteten til pikslene.

Terskling

Terskling ("thresholding") er en enkel, men effektiv metode for å segmentere et bilde [58]. Generelt går metoden ut på å klassifisere en gruppe med piksler over en viss intensitetsverdi, t , mens resten blir klassifisert i en annen gruppe. Pikslene i et bilde segmentert med terskeling er definert som

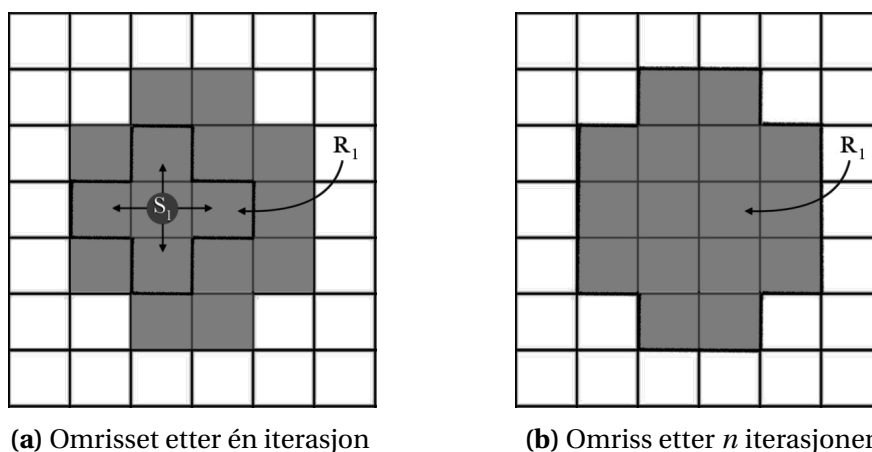
$$f_1(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{hvis } f(x, y) > t \\ 0 & \text{hvis } f(x, y) \leq t, \end{cases} \quad (2.18)$$

hvor 1 og 0 representerer henholdsvis fargene hvitt og svart. $f(x, y)$ er intensiteten i det opprinnelige bildet [59].

Forplantningsbasert segmentering

Med en forplantningsbasert segmenteringsmetode beregnes omrisset rundt et objekt i bildet med hensyn på intensiteten til pikslene, $f(i, j)$. En mye brukt metode er å segmentere alle pikslene som er forbundet til ett eller flere *frøpunkter* i bildet [60]. Kort forklart betrakter segmenteringsmetoden om nabopikselen til et gitt frøpunkt har en pikselintensitet innenfor et gitt toleranseområde. Hvis dette er tilfelle vil denne pikselen også bli klassifisert som et frøpunkt. Algoritmen fortsetter helt til nabopikslene ikke lenger oppfyller kravet til frøpunktet.

Gitt et sett med n frøpunkter definert som S_1, S_2, \dots, S_q . Disse frøpikslene blir videre erstattet med homogene områder, R_1, R_2, \dots, R_q som involverer flere og flere piksler for



Figur 2.13: Eksempel på forplantningsbasert segmentering. **(a)** Gitt en frøpiksel S_1 . Dersom nabopikslene og frøpunktet har lik intensitet, eller er innenfor en toleranseverdi, vil frøpunktet ekspandere til et homogent område R_1 . Dette området vokser dersom de neste nabopikslene har lik intensitet som det nye frøpunktet. **(b)** Etter n iterasjoner har området R_1 ekspandert til å bestå av hele det lysegrå området.

hver iterasjon. Pikslene i samme region er markert med samme symbol og piksler i ulike regioner er markert med forskjellige symboler, slik som Figur 2.13 indikerer.

De pikslene som foreløpig ikke hører til en region, R_q , men grenser til det etter m iterasjoner er gitt som:

$$T = \left\{ (x, y) \notin \bigcup_{i=1}^q S_i \mid N(x, y) \cap \bigcup_{i=1}^q S_i \neq \emptyset \right\}, \quad (2.19)$$

hvor $N(x, y)$ definerer regionen med nabopiksler til én piksel (x, y) , altså det området R_1 marker i Figur 2.13a [61].

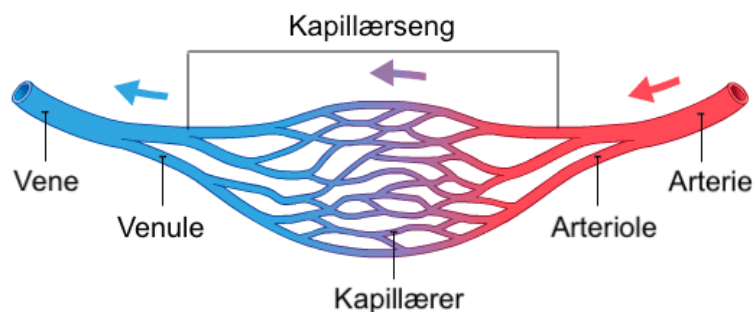
Kapittel 3

Metode

3.1 Preparering av knokkelprøver

Åtte føll av rasen varmblodstraver ble undersøkt. Føllene hadde forskjellig alder fra nyfødt (12 timer gammel) til 7 uker, og var alle barn av foreldre med OCD i distal ende av tibia (skinnebeinet). Prøveprepareringen ble gjennomført av K. Olstad *et al.* i forbindelse med deres studie om OCD i føll og om avbildning av OC-lesjoner ved å benytte mikro-CT [4, 62]. Føllene ble injisert med bariumsulfat (Sol-O-Pake®, E-Z-EM, Westbury, NY, USA) inn i blodårene i karkanalene like etter avlaving. Dette var for å øke intensiteten til karkanalene på CT-bildene. Bariumsulfatpartiklene hadde en median partikkelstørrelse på $0.7\ \mu\text{m}$ - $0.8\ \mu\text{m}$, noe som førte til at bariumet ble stanset i kapillærsengene (Se Figur 3.1) og kun arteriene ble utsatt for kontrastinjeksjon.

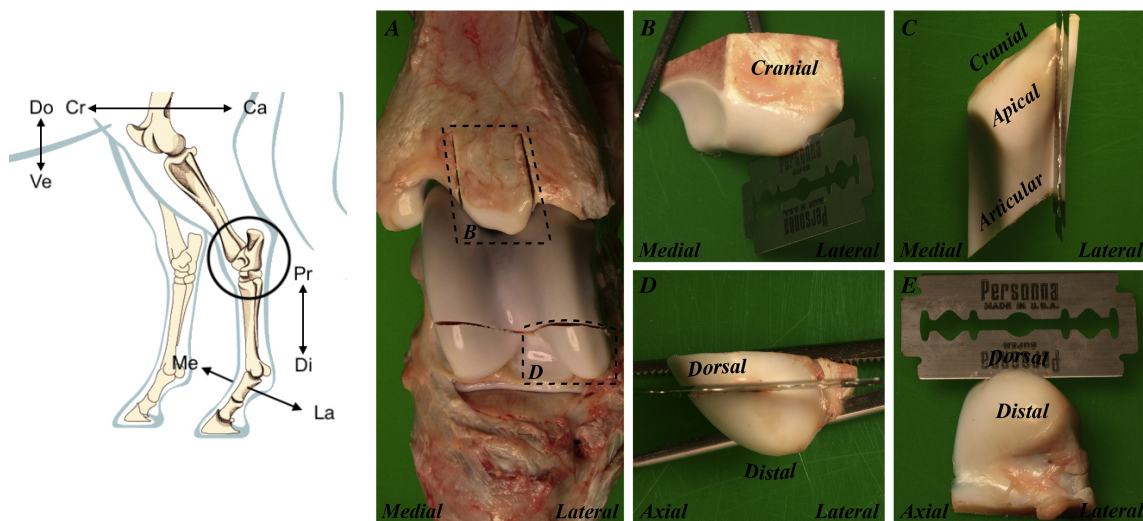
Talus-crural-leddet ble separert fra hestens venstre bakbein, unntatt for føllet som var 3 uker gammelt hvor da høyre bakbein ble benyttet. Etter at alt av bløtt vev var fjernet ble knoklene lagt i 4% formaldehydløsning i 48 timer. Tibia og talus ble manuelt skjært ut fra beinet. Bildet av de to knoklene er vist i Figur 3.2b. Lokasjonen på tibia og talus er nærmere beskrevet i Kapittel 2.2 og i Figur 2.8.



Figur 3.1: Skjematisk fremstilling av en blodåre. Blodet føres fra hjertet via arteriene, ut til kapillærene og tilbake til hjertet via venene (Kilde: The TeachMeSeries Ltd, 2017 [63]).

3.2 Prosedyre for mikro-CT-målinger

Mikro-CT-målingene ble utført av K. Olstad *et al* [4, 62]. Undersøkelsen ble gjort med en spesialbygd nano-CT-skanner bestående av kommersielt, tilgjengelige komponenter [4]. Skanneren bestod av en nano-fokusert røntgenkilde (Hamamatsu L10711-01) og en mikro-fokusert røntgenkilde (Hamamatsu L9181). Foran røntgenrøret var det to digitale detektorer, en flatpanel-detektor (Varian Paxscan 2520) og et CCD-kamera (Photonic Science VHR). Prøvene hadde høy tetthet og var relativt store (2 cm³), derfor ble den mikro-fokuserte røntgenkilden benyttet i kombinasjon med Varian Paxscan detektoren. Tungsten ble benyttet som anodemateriale. Prøven ble plassert på en roterende scene med luftbæring (Aerotech ABRT-150) og sentrert med piezo posisjonering (P1 Miniature XY Piezo-Stage M-662.470). Mikro-CT-målingen ble gjennomført med en akselerasjonsspenning på 80 kV. Det ble utført 800 projeksjoner samtidig som prøven ble rotert 360°. Eksponeringstiden per bilde var tre sekunder. Alle knoklene ble dekket med parafinvoks for å forhindre uttørking i løpet av avbildningen. Prosjeksjonene ble rekonstruert ved hjelp av programvaren Octopus v. 8.1. Det rekonstruerte bildet



(a) Talus-crural-leddet (Kilde: New Breed Racing, 2015 [39]) (b) Den eksaminerte leddprøven (Kilde: K. Olstad *et al.*, 2008 [4])

Figur 3.2: Knoklene ble hentet fra bakbeinet på åtte unge føll. (a) Bakbeinet til en hest hvor talus-crural-leddet er markert. Pilene indikerer de anatomiske retningene, La: lateral (vekk fra medialplanet), Me: medial (nært medialplanet), Pr: proksimal (nære kroppens senter), Di: distal (fjernt fra kroppens senter), Cr: kranial (mot hodeskalle), Ca: kaudal (mot halen), Do: dorsal (mot ryggen) og Ve: ventral (mot buken). (b) En av de eksaminerte prøvene sett fra dorsal retning. A: Tarsus-leddet i et føll, gitt fra dorsal retning. De stiplede linjene markert med B og D indikerer de to knoklene som ble undersøkt. B: Distal tibia, kranial retning. Prøven målte omtrent 2 cm i alle retninger. C: Distal tibia, distal retning. D: Talus, dorsal retning. Prøven målte omtrent 1 cm i proksimal distal retning og 2 cm i de øvrige retningene. E: Talus, distal retning.

hadde en vokselstørrelse mellom 26 μm og 34 μm , og en tonedybde på 16-bit.

3.3 Metode for bildesegmentering av talus og tibia

Bildebehandlingen og segmenteringen ble utført i VGStudio MAX v.3.1, som er en programvare for visualisering og analyse av CT-data [60]. Det ble benyttet et medianfilter på hele bildet for å skape en jevnere pikselintensitet og definere en tydeligere overgang mellom beinet og vekstbrusken. Videre ble det benyttet et utvidelsesfilter for å øke tverrsnittet til karkanalene og gjøre det enklere å detektere karkanalene i vekstbrusken.

Mikro-CT-bildene ble segmentert i to omganger, først ble beinet segmentert og deretter ble karkanalene i vekstbrusken segmentert. Det ble benyttet en forplantningsbasert-segmentering av typen statisk ("static") og fleksibel ("adaptive") for henholdsvis beinet og karkanalene. Ved en statisk segmentering inkluderes vokslar hvis de er forbundet til nabovokslene og hvis intensiteten ikke avviker fra frøpunktet (se Kapittel 2.4) med mer enn en gitt toleranseverdi. Med en fleksibel segmentering inkluderes kun de vokslene som er forbundet med nabovokslene og hvis intensiteten ikke avviker fra den gjennomsnittlige intensiteten på det voksende området med mer enn den gitt toleranseverdien [60]. Ved segmenteringen av beinet ble frøpunktet plantet i beinet. Ved segmenteringen av karkanalene ble frøpunktet plantet i vekstbrusken. Sistnevnte ga omriss av hele bildet utenom karkanalene. Ved å invertere markeringen og fjerne overlappende områder med beinet ble karkanalene i vekstbrusken segmentert. Toleranseverdien ble manuelt satt til 800 intensitetsverdier ved segmentering av beinet og til 400 intensitetsverdier ved segmentering av karkanalene.

Markeringene ble finjustert med et avgrensingsverktøy ("refinement") som justerte omrisset i henhold til en lokal intensitetsgradient med en gitt grenseverdi. Denne grensen ble manuelt satt til 40 intensitetsverdier for begge de segmenterte områdene. For å forhindre en ujevn overgang mellom beinet og vekstbrusken, forårsaket av beinets mange ulike intensiteter, ble markeringen rundt beinet gjort glattere med et utjevningverktøy ("smoothing"). Øvrige markeringer som ble ukorrekt definert ble manuelt fjernet. Karkanalene som inneholdt færre enn 250 vokslar ble også fjernet.

3.4 Metode for analyse av karkanaler i vekstbrusk

Karkanalene i vekstbrusken ble analysert i Matlab R2018a. Først ble 2D-snittbilder av de segmenterte karkanalene eksportert fra VGStudio Max til Fiji. I Fiji ble de 2D-bildene satt sammen til et 3D-bilde med funksjonen "3D Viewer". Overflaten av 3D-figuren ble lagret som en stl-figur, eksportert til Matlab og videre transformert til en 3D-binær-matrise. Hver av vokslene ble karakterisert ved tallene 1 og 0 som impliserte om vokselen tilhørte en karkanal eller ikke. Til dette ble funksjonen "VOXELISE" fra Matlabs filutveksling benyttet [64]. Karkanalene ble deretter transformert til senterlinjer med funksjonen "Skeleton3D" hentet fra Matlabs filutveksling [65].

Alle segmenter som inneholdt mindre enn 30 vokslar ble fjernet ved hjelp av funksjonen "Skel2Graph3D" fra Matlabs filutveksling [66]. "Skel2Graph3D" beskriver 3D-senterlinjer ved hjelp av såkalte noder og linker. En node er et lite segment langs en senterlinje og en link forbinder to noder. Funksjonen identifiserer både endepunkter og forgreningspunkter, i tillegg til en liste med koordinater som identifiserer hver node. Brukeren kunne manuelt sette en grense på minimum lengde på en gren for å filtrere ut støy og korte segmenter. Denne grensen ble satt til 30 vokslar. Nodene og linkene ble transformert tilbake til senterlinjer med funksjonen "Graph2Skel3D" [67].

Beregning av prosentandelen karkanaler i vekstbrusken

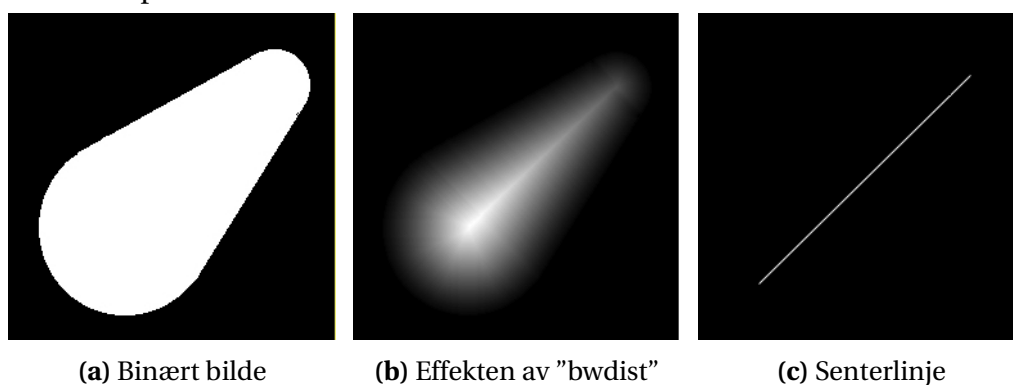
Prosentandelen karkanaler tilsvarende forholdet mellom karkanalenes volum og det totale volumet til vekstbrusken. Volumet til karkanalene ble beregnet med funksjonen "regionprops3" med parameteren 'Volume' som teller antall vokslar i bildet [68].

Volumet til vekstbrusken ble hentet fra VGStudio Max ved å betrakte det totale volumet minus volumet til beinet. Parafinvoksen som omsluttet alle knoklene hadde en tilnærmet lik attenuasjonskoeffisient som vekstbrusken, noe som gjorde det vanskelig å skille materialene fra hverandre på CT-bildene. Det ble vider antatt at parafinvoksen var uniformt fordelt rundt knoklene og at den hadde en tilnærmet tykkelse på 1 mm. Denne tykkelsen var basert på avstanden fra avkuttet ledd og til luft, ettersom det her ikke var brusktilstede.

Beregning av karkanalenes diameter

Diameteren til karkanalene ble beregnet i tre trinn. Først ble funksjonen "bwdist" benyttet for å beregne den korteste avstanden fra en hvit piksel til den nærmeste svarte pikselen [69]. Effekten av "bwdist" er vist i Figur 3.3b. Et slikt monokromt bilde inneholder 256 intensiteter (se Kapittel 2.3), hvorav 0 representerer svart og 255 representerer hvitt. Desto lavere intensiteten i Figur 3.3b er, desto kortere er avstanden til svart. Intensiteten blir på en måte oversatt til en distanse i bildet.

Videre ble karkanalene transformert til senterlinjer med funksjonen "Skeleton3D", slik som gitt i Figur 3.3c. Bildet blir binært og inneholder to intensiteter, svart og hvitt, representert med tallene 0 og 1. Ved å multiplisere senterlinjen med "bwdist" blir alle pikslene lik null unntatt de i senter som representerer radiusen. Diameter finner man da ved å multiplisere radiusen med to.



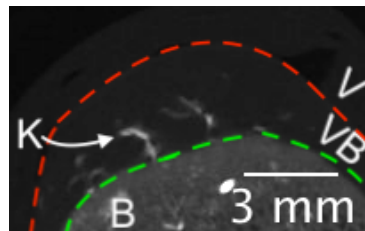
Figur 3.3: Prosedyre for å beregne diameteren til en figur. (a) Et binært bilde. Pikslene er enten svarte eller hvite som tilsvarer intensitetene 0 og 1. (b) Effekten av "bwdist" på bildet i (a). Bildet blir monokromt, og avstanden fra en hvit piksel til en svart piksel er visualisert ved hjelp av intensiteter i bildet. Desto høyere intensitet, desto lengre er avstanden til en svart piksel. (c) Senterlinjen av det binære bildet i (a). Bildet er igjen binært, og ved å multiplisere dette bildet med (b), finner man radiusen til figuren i (a).

Kapittel 4

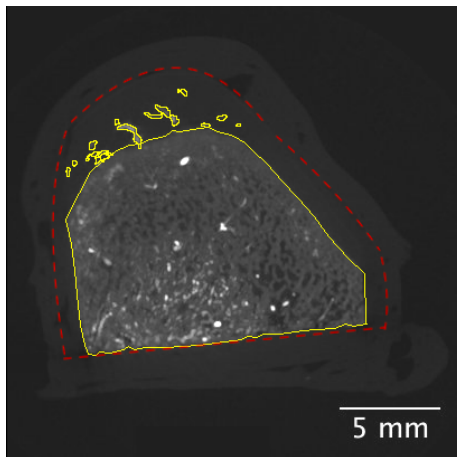
Resultater

4.1 Segmenteringen av karkanaler og bein

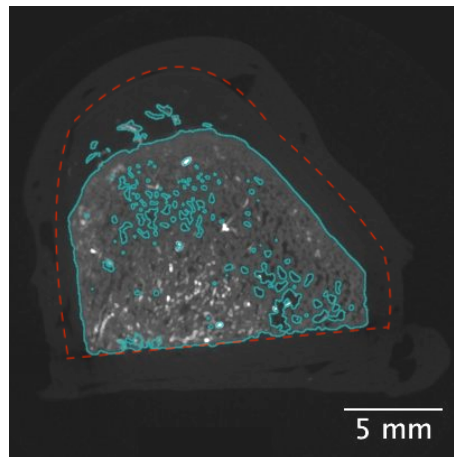
Sammenligningen av manuell og forplantningsbasert segmentering, gitt i Figur 4.1, viser at den anvendte metoden beskrevet i Kapittel 3.3, er i stand til å segmentere beinet og de fleste karkanalene fra den omkringliggende vekstbrusken. Figur 4.1c viser imidlertid at karkanaler i vekstbrusken med lav intensitet ikke blir segmentert. Resultatet fra segmenteringen av talus og tibia er gitt i Figur 4.2. Prøvene fra individer med lik alder er hentet fra det samme føllet. Vekstbrusken som omslutter beinet har blitt segmentert med terskling ("thresholding") og fjernet fra 3D-bildene i Figur 4.2. Beinet og de bariumfylte blodårene i karkanalene i vekstbrusken, har blitt segmentert med en forplantningsbasert-segenteringsmetode. Karkanalene inne i beinet er fjernet og det samme er karkanalene i vekstbrusken som inneholder færre enn 30 vokslar.



(a) Detaljbilde

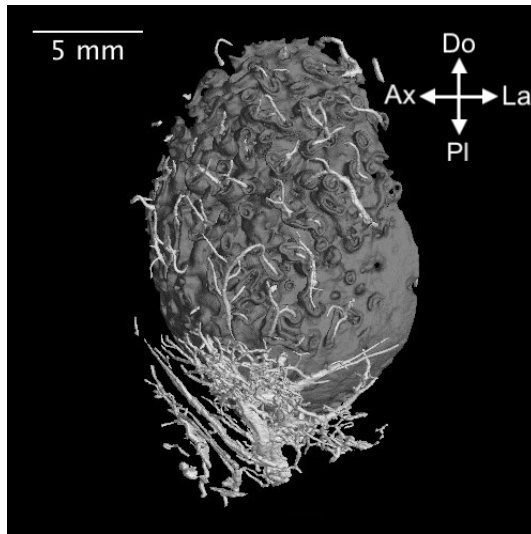


(b) Manuell segmentering

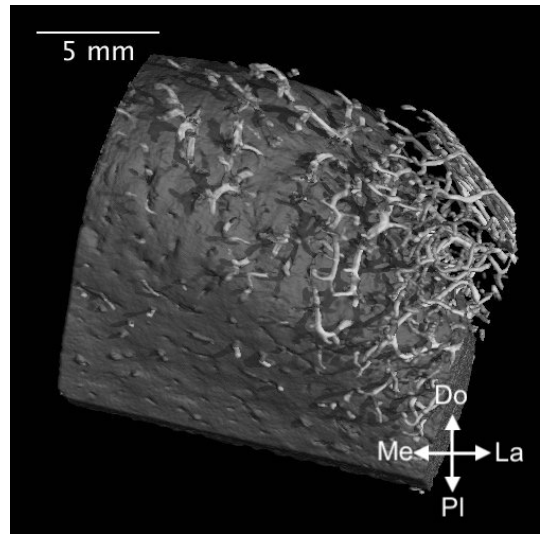


(c) Forplantningsbasert segmentering

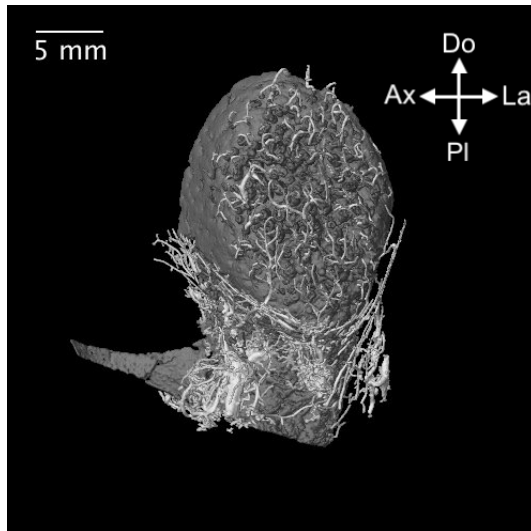
Figur 4.1: Snittbilde av segmenteringen utført på tibia, sett fra distal retning. (a) Nærbilde av karkanalene i vekstbrusken som ble forsøkt segmentert. Innenfor den grønne linjen er beinet (B), mellom den røde- og grønne linjen er det vekstbrusk (VB) og utenfor den røde linjen er det voks (V). Karkanalene (K) i vekstbrusken vises som hvite områder. (b) Manuell segmentering av beinet og karkanalene fra omkringliggende vekstbrusk. (c) Forplantningsbasert segmentering av beinet og karkanalene. Markeringene inne i beinet ble i ettertid fjernet og kan ignoreres.



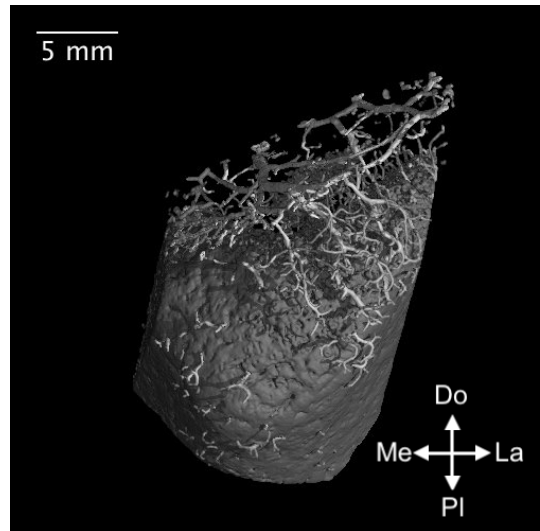
(a) Talus 0 uker, distal retning



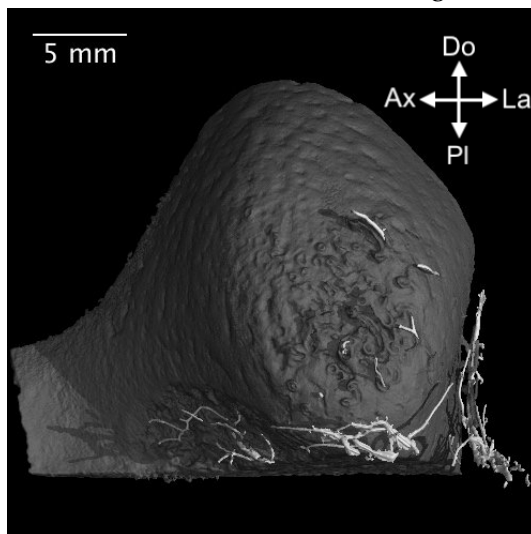
(b) Tibia 0 uker, distal retning



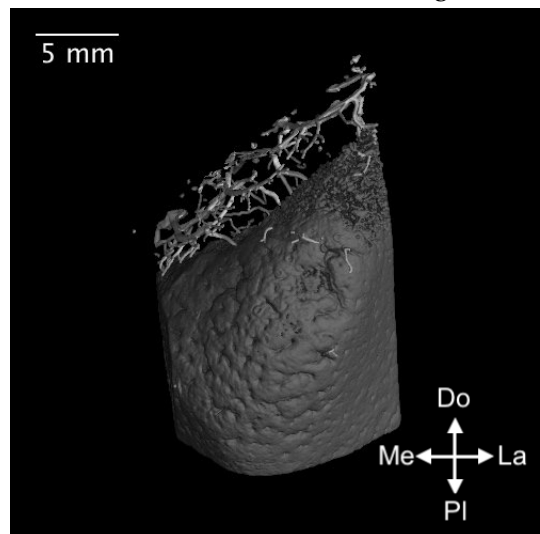
(c) Talus 1 uke, distal retning



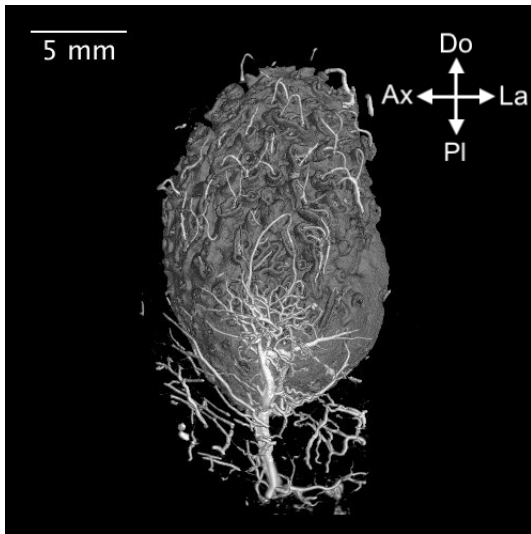
(d) Tibia 1 uke, distal retning



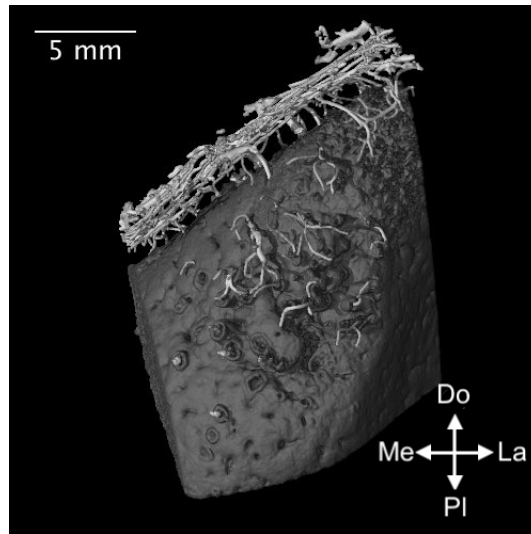
(e) Talus 2 uker, distal retning



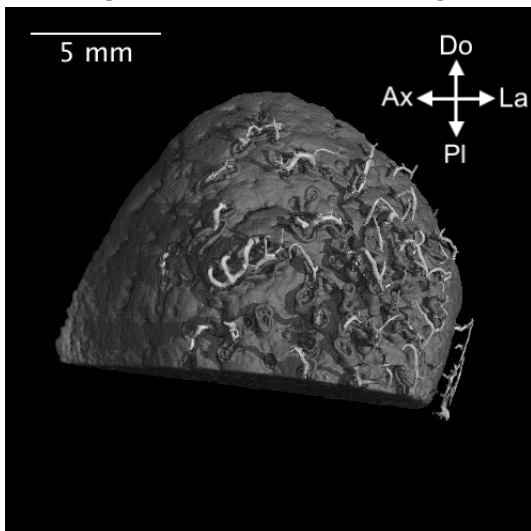
(f) Tibia 2 uker, distal retning



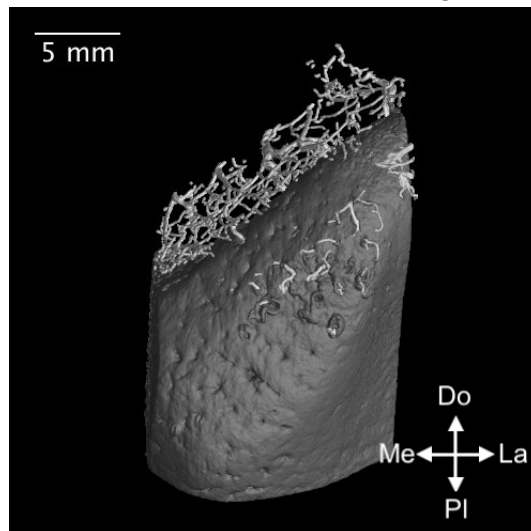
(g) Talus 3 uker, distal retning



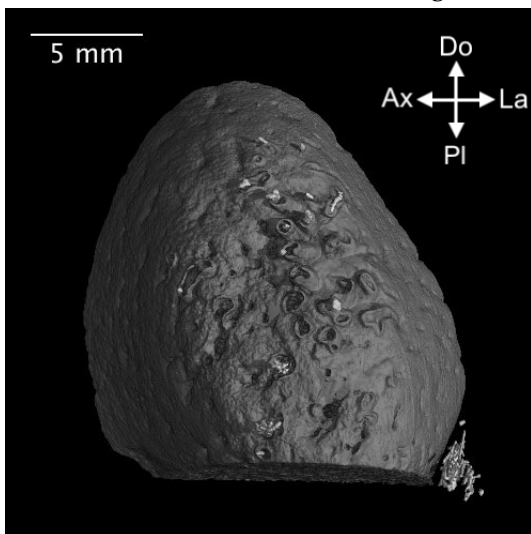
(h) Tibia 3 uker, distal retning



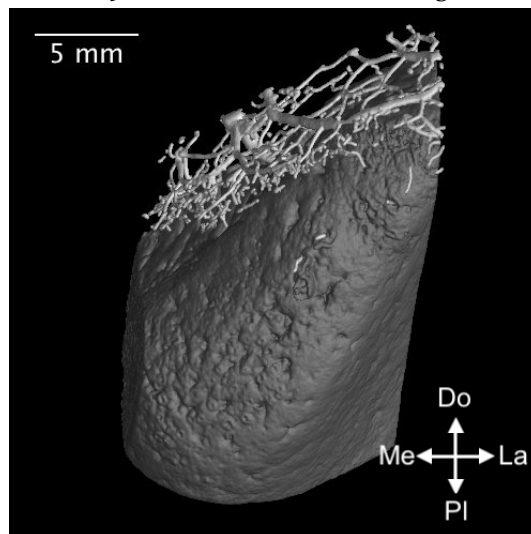
(i) Talus 4 uker, distal retning



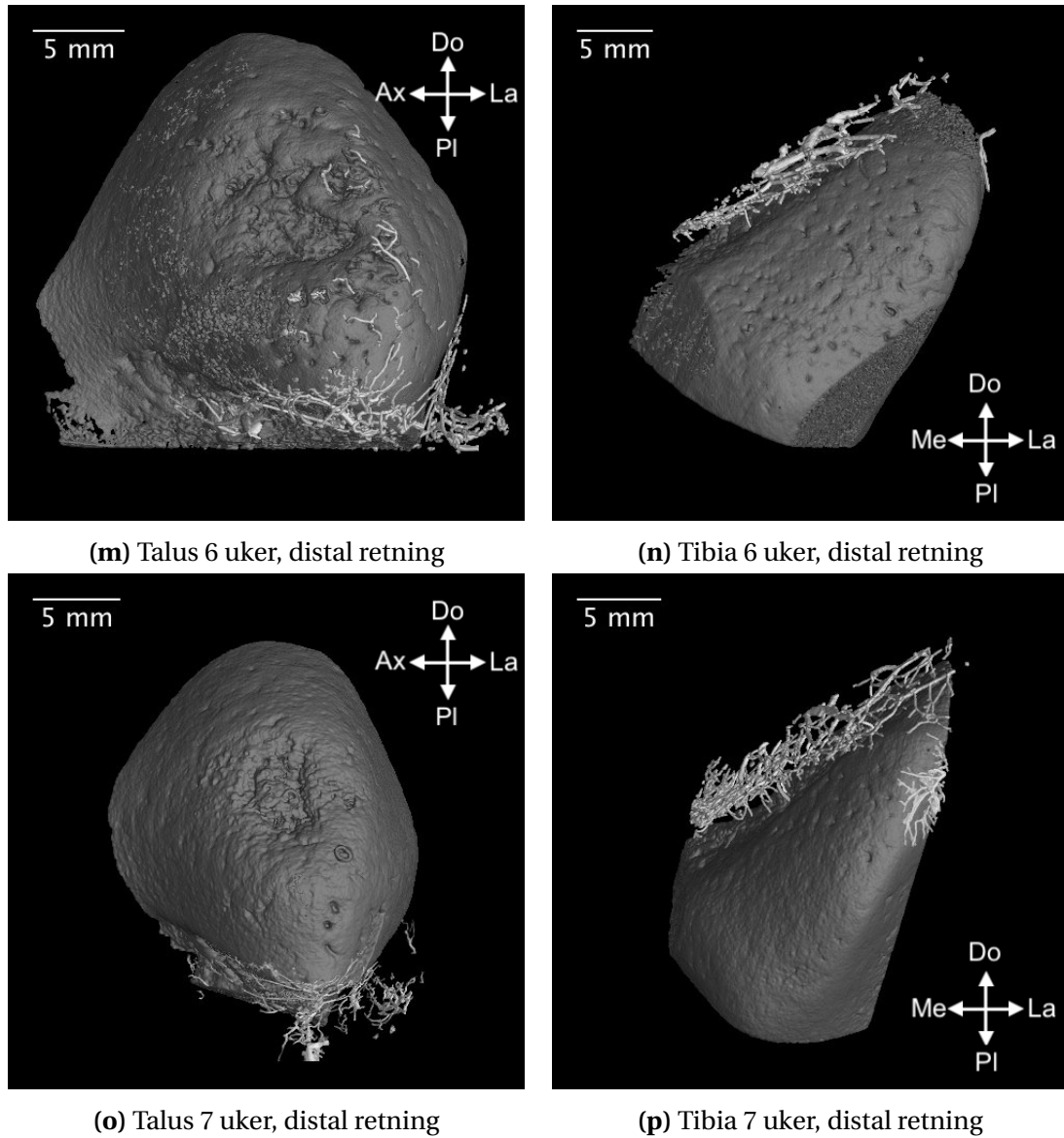
(j) Tibia 4 uker, distal retning



(k) Talus 5 uker, distal retning



(l) Tibia 5 uker, distal retning



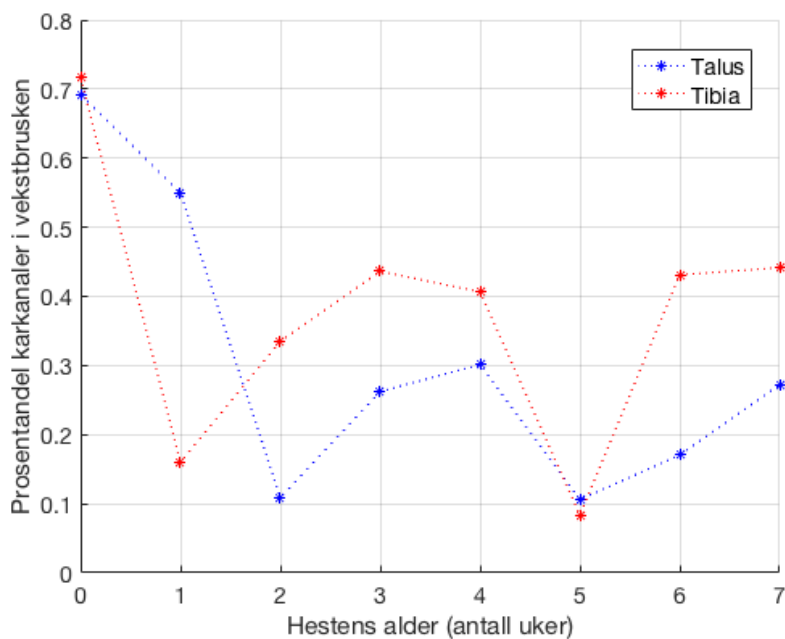
Figur 4.2: 3D-mikro-CT avbildning av knokler hentet fra talus-crural-leddet i åtte føll. Vekst-brusken er blitt segmentert bort og 3D-modellen viser karkanalene i hvitt og beinet i grått. Prøvene fra individer med lik alder er hentet fra det samme føllet. De anatomiske retningene, Do: dorsal, Pl: plantar, La: lateral, Ax: aksial og Me: medial, er definert i figurene.

4.2 Kvantitativ analyse av karkanalene i vekstbrusken

Prosentandelen karkanaler i vekstbrusken

Den foreslåtte metoden for å beregne karkanalenes volum gir svar i samsvar med det kjente volumet på fantomet av en karkanal gitt i Figur 4.4a. Fantomet ble laget ved hjelp av en binær 3D-array i Matlab.

Prosentandelen karkanaler i vekstbrusken i talus og tibia, viser til forholdet mellom volumet til karkanalene lokalisert i vekstbrusken og vekstbruskens volum. Resultatet er gitt i Figur 4.3. Bariumsulfatpartiklene fylte arteriesiden av sirkulasjonssystemet, ble stanset i kapillærsengene og nådde aldri venene, slik at andelen karkanaler i vekstbrusken er større enn hva som kommer frem i denne studien [4]. I henhold til Figur 4.3 reduseres antallet karkanaler i vekstbrusken ettersom føllenes alder øker. Imidlertid er det store variasjoner mellom føllene og prosentandelen er tilsynelatende minst ved 2- og 5 uker i talus og ved 2- og 5 uker i tibia.



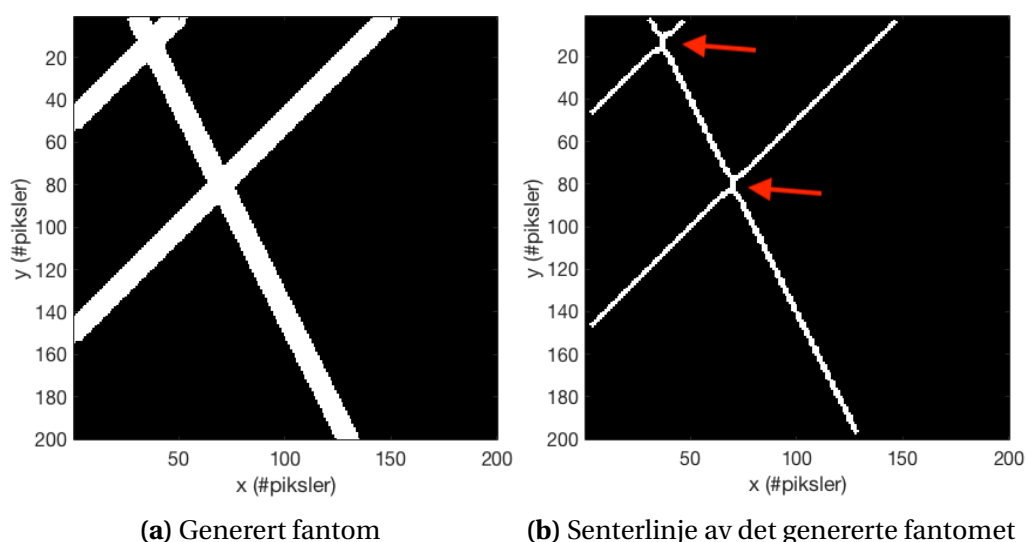
Figur 4.3: Forholdet mellom volumet til karkanalene lokalisert i vekstbrusken i forhold til volumet til vekstbrusken. Til tross for at føllenes alder øker, viser figuren store individuelle variasjoner mellom individene.

Diameteren til karkanalene i vekstbrusken

Den foreslåtte metoden for å beregne diameteren til karkanalene ble kontrollert opp i mot et fantom av en karkanal med kjent diameter (se Figur 4.4). Til tross for at fantomet hadde en jevn tykkelse, var den beregnede diameteren varierende. Sammenligning av fantomets diameter og den beregnede diameter er gitt i tabell 4.1. Den beregnede diameteren varierte mellom 0.06 mm og 0.65 mm, som tilsvarer en tykkelse på mellom 2 piksler og 19 piksler i henhold til vokselstørrelsen på CT-bildene. Prosentfeilen på den beregnede diameteren er stor når diameteren er liten, og avtar raskt når diameteren til fantomet øker. Observasjoner tyder på at senterlinjen er i stand til å gjengi fantomets fasong, men avviker fra midtpunktet i punktet der to kanaler krysser hverandre (se Figur 4.4b).

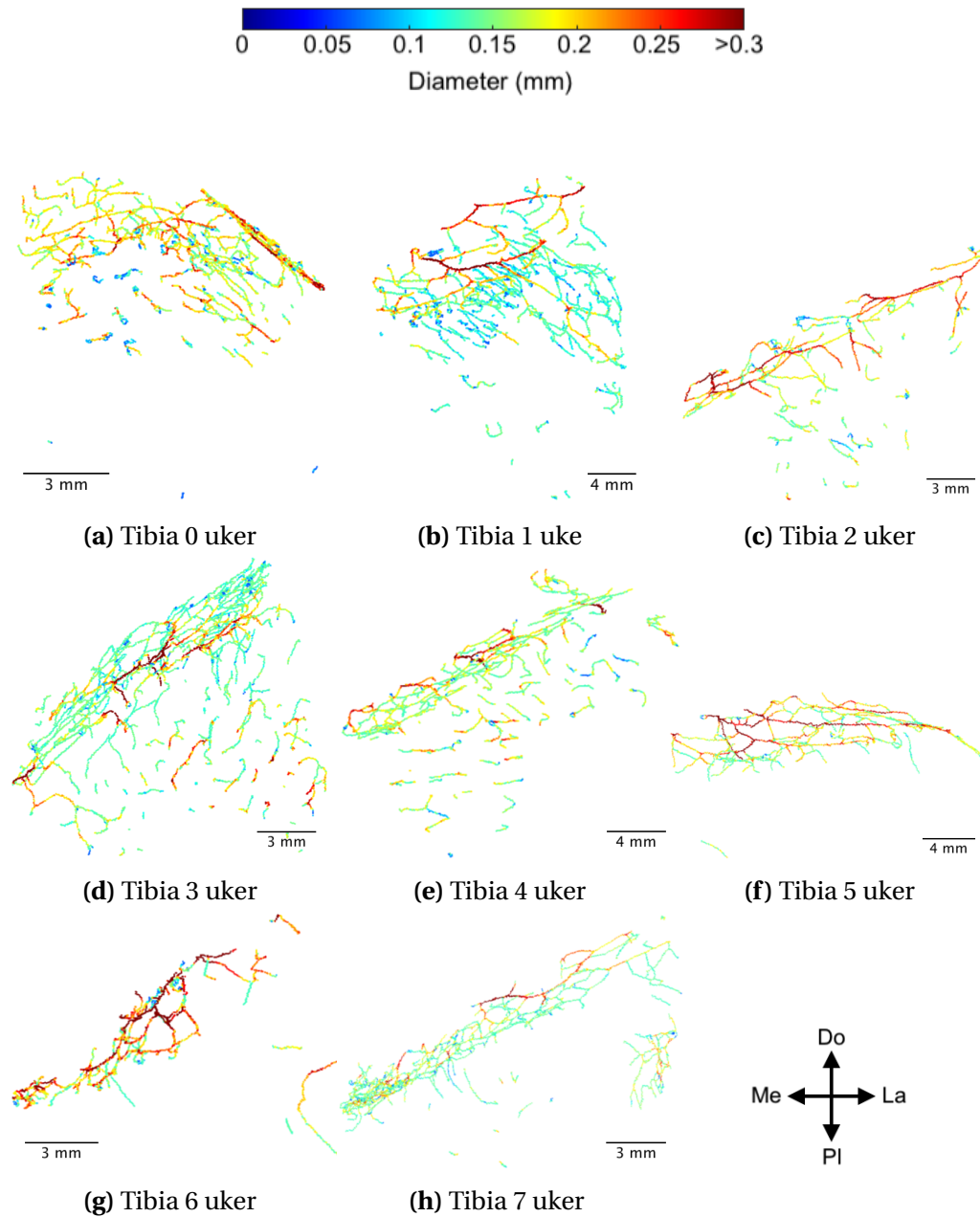
Tabell 4.1: Sammenligning av diameteren til fantomet i forhold til den beregnede gjennomsnittsdiameteren. Prosentfeilen er gitt ved differansen mellom beregnet verdi og faktisk verdi, delt på beregnet verdi, multiplisert med 100.

Fantomets diameter piksler	Beregnet diameter piksler	Prosentfeil %
19.40	19.45	0.26
15.52	15.76	1.51
9.79	9.91	1.30
3.87	4.22	9.09
2.08	2.61	25.50

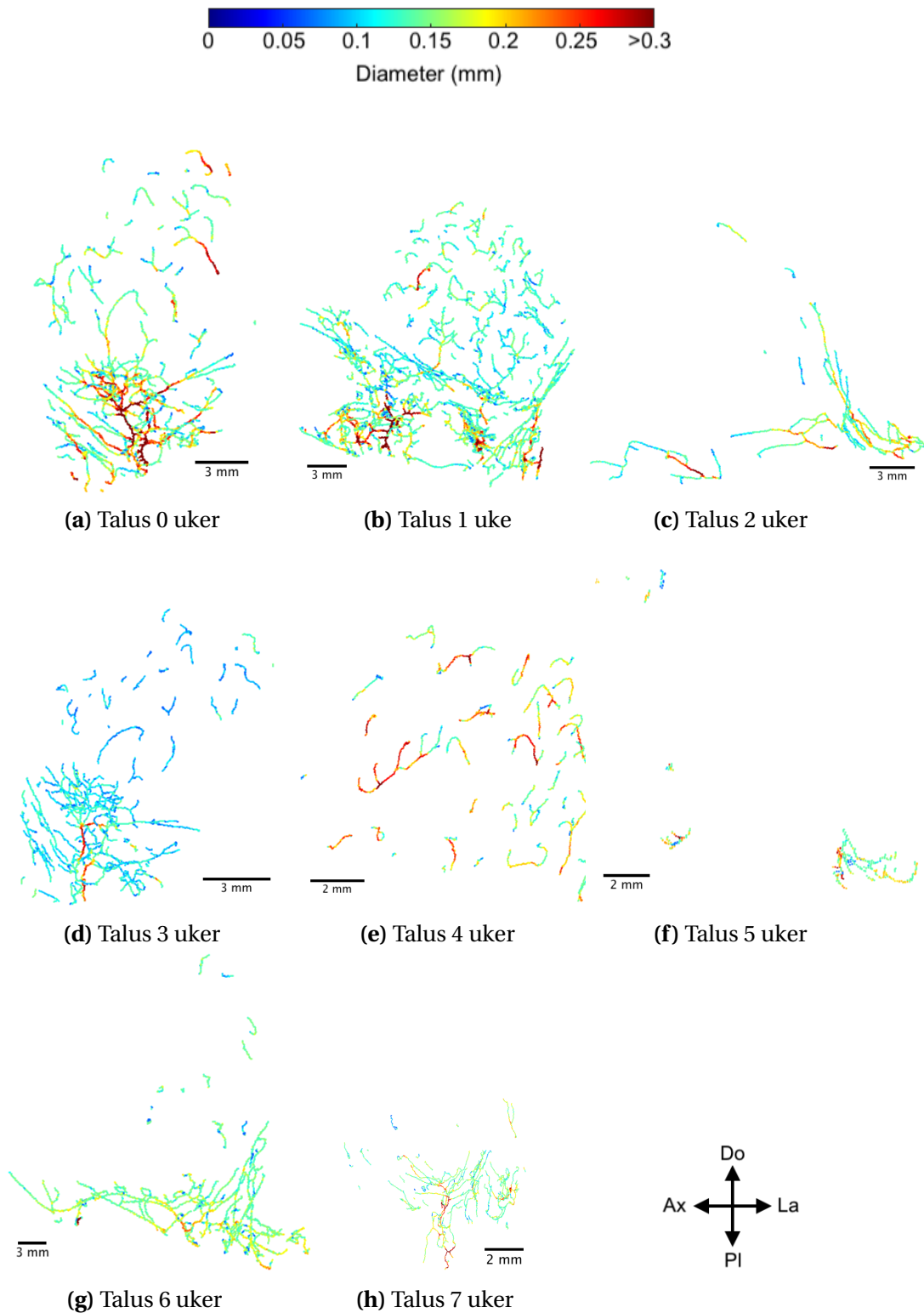


Figur 4.4: Fantom med kjente data for å kontrollere foreslått metode for kvantitativ analyse. (a) Et generert fantom laget i Matlab. (b) Senterlinje av (a). De røde pilene markerer områder hvor senterlinjen tilsynelatende avviker fra fantomets fasong.

Den beregnede diameteren til karkanalene i vekstbrusken er presentert i Figur 4.5 og Figur 4.6. Observasjoner tyder på at det blir færre karkanaler med diameter mindre enn $100\ \mu\text{m}$ ettersom føllenes alder øker. Som følger av dette er usikkerheten i den beregnede diameteren antatt størst blant de yngste individene med tanke på resultatet i Tabell 4.1. Den minste diameteren som ble målt var mellom $53.20\ \mu\text{m}$ og $65.40\ \mu\text{m}$. De tykkeste karkanalene i vekstbrusken er lokalisert mot dorsal retning i tibia og mot plantar retning i talus, det vil si lengst vekk fra leddet (se Figur 3.2). Observasjoner av de tykkeste karkanalene i Figur 4.2 tyder på at denne lokasjonen stemmer.



Figur 4.5: 3D-fremstilling av karkanaler i vekstbrusken, fargekodet etter tykkelse. Alle karkanalene er vist med lik tykkelse, hvor fargen representerer tykkelsen. De anatomiske retningene, Do: dorsal, La: lateral, Pl: plantar og Me: medial, er gitt i figuren.



Figur 4.6: 3D-fremstilling av karkanaler i vekstbrusken, fargekodet etter tykkelse. Alle karkanalene er vist med lik tykkelse, hvor fargen representerer tykkelsen. De anatomiske retningene, Do: dorsal, La: lateral, Pl: plantar og Me: medial, er gitt i figuren.

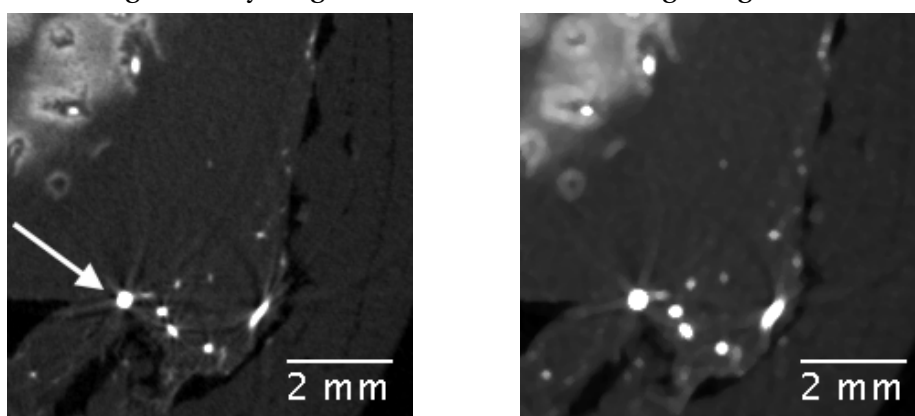
Kapittel 5

Diskusjon

5.1 Segmenteringen av knokkelprøvene

Den forslåtte segmenteringsmetoden ble vurdert etter hvorvidt den klarte å skille bein, karkanaler og vekstbrusk ved å betrakte den 3D-mikro-CT avbildning justert med terskling. Metoden var rask, krevde minimalt med manuelle justeringer og var i stand til å separere beinet og karkanelene fra omkringliggende vekstbrusk.

Injiseringen av bariumsulfat i karkanalene førte til mørke og lyse strekartefakter i CT-bildene rundt karkanalenes tverrsnitt i vekstbrusken (se Figur 5.1a). Disse lyse strekartefaktene ga et unøyaktig omriss av karkanalenes egentlige tverrsnitt.



(a) Eksempel på strekartefakter

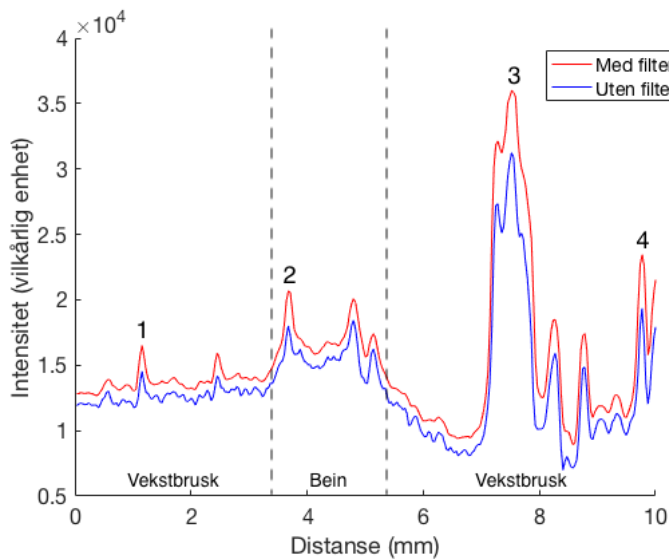
(b) Effekten av utvidelses- og medianfilter

Figur 5.1: Effekten av et utvidelses- og medianfilter på strekartefakter i CT-bildet. (a) Snittbilde av en liten del av talus fra 0 uker gammelt føll, sett fra distal retning. Strekartefakter oppstod i vekstbrusken rundt karkanaler med stort tverrsnitt, slik som pilen markerer. (b) Strekartefaktene rundt karkanalene i vekstbrusken ble mindre iøynefallende ved å legge på et utvidelses- og medianfilter på snittbildene. Utvidelsesfilteret økte også tverrsnittet til karkanalene og de tynneste karkanalene ble mer fremtredende.

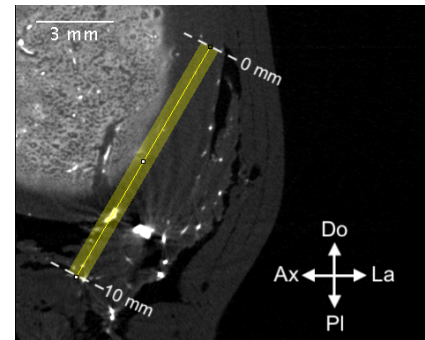
Strekartefaktene oppstod fordi bariumsulfat har en mye høyere attenuasjonskoeff-

fisient enn bløtt vev og det oppstod "beam hardening" rundt området hvor røntgenstrålen transmitterte karkanalene [26]. Fotoner med lav energi ble absorbert når attenuasjonskoeffisienten var høy og som følger økte den gjennomsnittlige fotonenergien. Etter at fotonene hadde transmittert en karkanal, økte den gjennomsnittlige fotonenergien, og fotonene ble i liten grad absorbert av vekstbrusken. Detektoren registrerte at det var få fotoner som ble absorbert av vevet rundt karkanalene, og vekstbrusken i dette området fikk derfor en lavere tetthet, altså en mørkere farge på CT-bildene. De lyse linjene ut fra karkanalene oppstod på grunn av Compton-effekten som endret fotonenes retning og energi (se Kapittel 2.1.1). Fotonene ble detektert i et annet detektorelement enn det som var på linje med den opprinnelige fotonretningen. Dette førte til at spredte fotoner ble detektert i et detektorelement som kanskje kun ville ha registrert et fåtall fotoner [30]. Medianfilteret gjorde strekartefaktene mindre synlige, men fremdeles var enkelte av linjene synlig, spesielt de lyse. Dersom knoklene hadde blitt avbildet med en høyere akselerasjonsspenning kunne effekten av "beam hardening" blitt redusert, imidlertid kunne kontrasten mellom vevene ha blitt dårligere. Eventuelt kunne man ha plassert et metallfilter foran røntgenkilden [30].

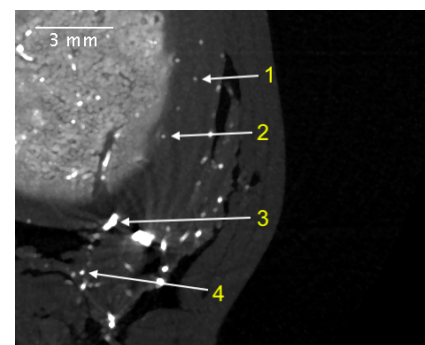
Karkanalene hadde varierende intensitet på mikro-CT-bildene, dette ser man tydelig i Figur 5.2a. Ettersom det oppstod stjerneformede strekartefakter rundt karkanalene var det utfordrende å fjerne disse og samtidig bevare karkanalene med lav intensitet. Figur 5.2a viser at utvidelses- og medianfilteret økte intensiteten til karkanalene og reduserte de små variasjonen mellom de lokale toppunktene. Utvidelses- og medianfilteret økte både karkanalenes tverrsnitt og intensitet, og karkanalene ble mer fremtredende i vekstbrusken. I tillegg økte kontrasten mellom beinet og vekstbrusken slik at det ble enklere å segmentere beinet.



(a) Intensitetsgraf



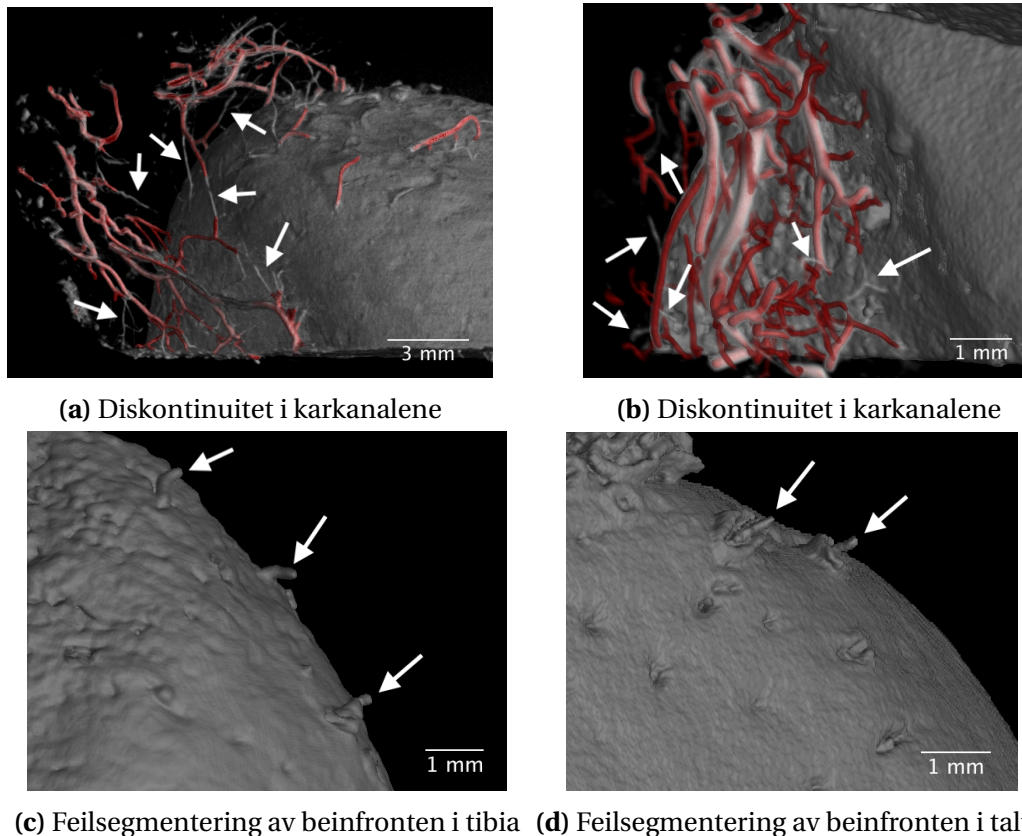
(b) En linje over ett snittbilde av talus



(c) Fire markerte karkanaler i vekstbrusken

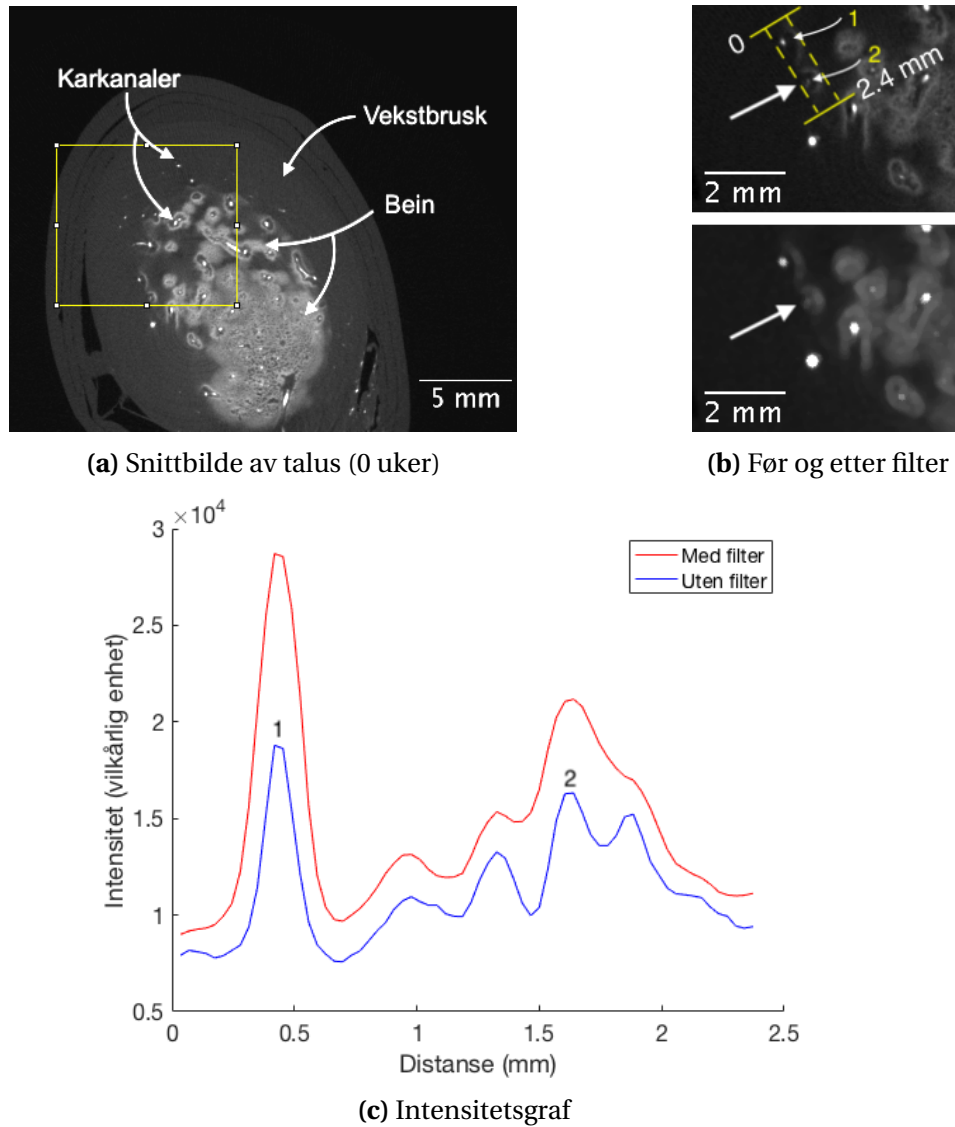
Figur 5.2: Intensitetsfordelingen langs en linje i ett snittbilde av talus. (a) Intensitet som funksjon av distanse langs med linjen gitt i (b). Intensiteten tilsvarer gråverdien i bildet. Fire lokale toppunkter er markert med tallene 1-4. De to stiplede linjene i intensitetsplottet markerer hvor den gule linjen passerte beinet. (b) Området av interesse. Den gule linjen strekker seg over et snittbilde av talus. (c) Fire karkanaler av interesse. Karkanalene som er markert har intensitet lik de fire lokale toppunktene i (a).

Enkelte karkanaler var diskontinuerlige etter segmenteringen, som Figur 5.3 illustrerer. Med fraværende karkanalsegmenter økte antallet karkanaler i vekstbrusken og karkanalene ble i gjennomsnitt kortere, slik at den kvantitative analysen ble upresis. Diskontinuiteten oppstod sannsynligvis når intensiteten i karkanalene var lav og når tverrsnittet var lite. Viskositeten til blodet i karkanalene påvirker kontrastmiddelets adferd i sirkulasjonssystemet og kan gi en ujevn intensitetsfordeling i arteriene [70]. Tynne karkanaler med lite kontrast ble ignorert ved segmenteringen fordi intensitetsdifferansen i forhold til vekstbrusken var liten da det ble benyttet et medianfilter (se Figur 5.4c).



Figur 5.3: Feilsegmentering av karkanaler i vekstbrusken. **(a)-(b)** Eksempel på diskontinuerlige karkanaler på grunn av feil i segmenteringen. Karkanalene markert i rødt er segmentert med metoden beskrevet i Kapittel 3.3, resten av bildet er segmentert med terskling for å fjerne vekstbrusken. De hvite pilene markerer områder hvor karkanalene ikke ble segmentert. **(c)-(d)** Eksempel på feilsegmentering av beinet. Karkanaler som kom ut gjennom beinet ble ofte segmentert som en del av beinet.

Beinfronten ble av og til feilsegmentert ved at karkanalene ut fra overflaten av beinet ble segmentert som en del av beinet (se Figur 5.3c og 5.3d). Feilsegmenteringen rammet knoklene fra eldre føll, fra omtrent 4-ukers-alderen, fordi karkanalene ofte da er orientert vinkelrett ut fra beinfronten. Feilsegmenteringen skyldes mest sannsynlig utvidelses- og medianfilteret. Figur 5.4c viser hvordan intensiteten til en karkanal merket 2, med lav intensitet, får tilnærmet samme intensitet som beinet på grunn av filteret og det lokale toppunktet blir jevnet ut. Dette betyr at karkanaler med lav intensitet, nære beinet, slik som i Figur 5.4b, ble segmentert som en del av beinet. Dette er lite hendig med tanke på kvantitativ analyse da det ofte er disse karkanalene som svikter og forårsaker OC [5]. Områdene som var feil segmentert ble manuelt fjernet og den foreslåtte segmenteringsmetoden fungerer dermed ikke helt optimalt.



Figur 5.4: Karkanaler som ender opp som en del av beinet under segmenteringen. **(a)** Snittbilde av talus hentet fra et nyfødt føll. Den gule firkanten markerer utsnittet i **(b)**. **(b)** Detaljbilde av snittbildet av talus fra et nyfødt føll. Det øverste bildet er uten filter og det nederste er med filter. Den tykke pilen markerer en karkanal som forsvinner som en konsekvens av filteret. Den gule stiplede firkanten markerer området intensitetsprofilen er plottet over. Tallene 1 og 2 peker på to karkanaler i det aktuelle området. **(c)** Intensiteten plottet som funksjon av distanse innenfor det markerte området i **(b)**. Tallene 1 og 2 markerer to lokale toppunkt som er de samme som i det øverste bildet i **(b)**.

5.2 Evaluering av den kvantitative analysen

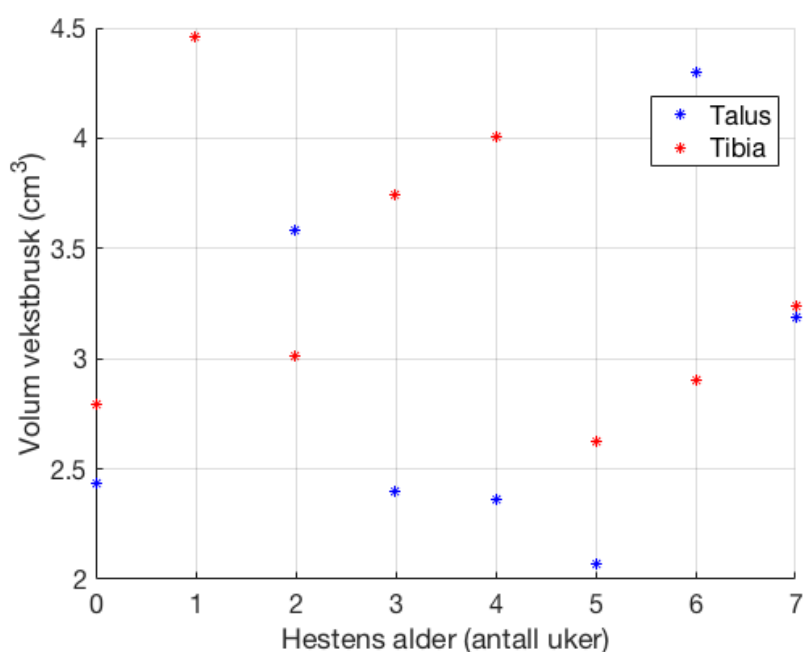
Knokkelprøvene ble hentet fra åtte ulike føll og det var derfor forventet at det ville forekomme biologiske forskjeller mellom individene. De store variasjonen kan biologisk forklares ved at føllene befant seg på ulike modningsstadier, som påvirkes av individuelle variasjoner mellom dyrene, når på året de var født og gestasjonslengden [4]. De kvantitative resultatene viste store individuelle variasjoner mellom de ulike føllene og det var dermed vanskelig å evaluere karkanalenes morfologi som funksjon av føllenes alder.

Metoden for å beregne karkanalenes volum stemte, men allikevel var estimatet på karkanalens- og vekstbruskens volum upresis da disse var basert på resultatet på segmenteringen. I tillegg var det kun blodkarene i karkanalene som ble fylt med bariumsulfat og det er derfor en usikkerhet i hvor store karkanalene er. Det er ikke utelukket at prosentandelen karkanaler i vekstbrusken kan være galt estimert. Som tidligere diskutert var det registrert enkelte feilsegmenteringer, slik som diskontinuerlige karkanaler, som kan ha medført at volumet til karkanalene ble mindre enn virkeligheten. I tillegg ble knokkelprøvene kuttet manuelt og ser derfor forskjellig ut (se Figur 4.2). Det er observert store forskjeller i blant annet talus fra det 3- og 4 uker gamle føllet og i tibia fra det 0- og 1 uker gamle føllet, hvor omtrent halvparten av knokkelen i talus og tibia, mot plantar retning, er fjernet fra det henholdsvis 4- og 0 uker gamle føllet. Variasjonen i kuttingen kan ha gitt feil indikasjon på prosentandelen karkanaler i vekstbrusken og hvordan denne ble utviklet over tid. Sannsynligvis var variasjonen størst i talus fordi visualiseringen av diameteren i Figur 4.6 viser at de fleste og største karkanalene var lokalisert i plantar retning, som kan være en av årsakene til at prosentandelen karkanaler i talus varierte. I henhold til K. Olstad *et al.* [4], som opprinnelig benyttet prøvene, ble talus og tibia kuttet slik at knokkelen skulle omfatte hele predileksjonsstedet da de mikroskopiske OC-lesjonen ikke var kjent. Den kvantitative analysen tok ikke høyde for at prøvematerialet er kuttet forskjellig, noe som sannsynligvis påvirket resultatet av prosentandelen i Figur 4.3.

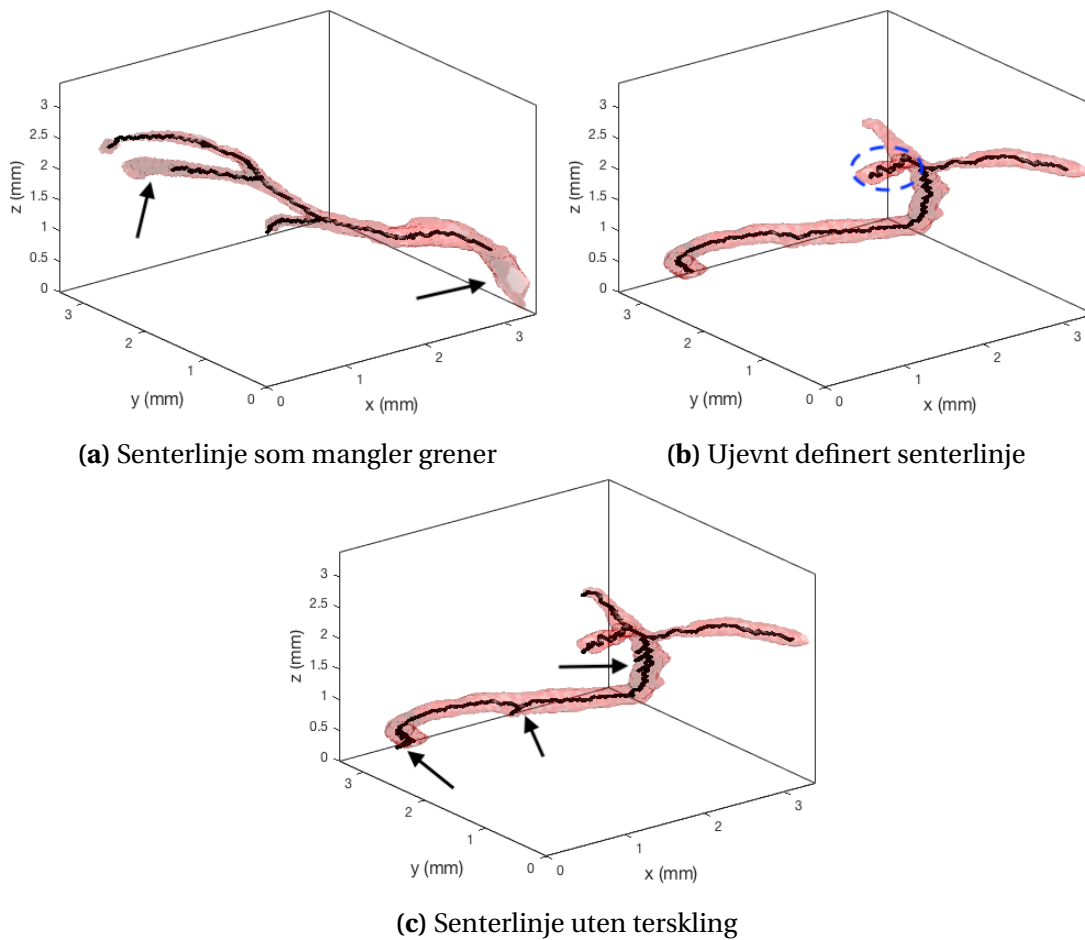
Observasjoner av karkanalene lokalisert i knokkene fra et 0- og 7 uker gammelt føll (se Figur 4.2a og 4.2o, og Figur 4.2b og 4.2p) tyder på at antall karkanaler i vekstbrusken ble redusert. I løpet av 7 uker ble karkanalene i distal retning tilbakedannet og det ble kun lokalisert enkelte karkanaler i plantar og dorsal retning, i henholdsvis talus og tibia (se Figur 4.2o og Figur 4.2p). Imidlertid var det observert store variasjoner mellom individene, spesielt i talus, slik som i overgangen fra det 1- og 2 uker gamle føllet (se Figur 4.2c og 4.2e) og mellom det 4- og 5 uker gamle føllet (se Figur 4.2i og 4.2k). Disse avvikene ser man tydelig i Figur 4.3 ved de to lokale bunnpunktene ved 2- og 5 uker.

Det var imidlertid vanskelig å observere store forskjeller i antall karkanaler i tibia da man kun betraktet det gjengitte 3D-volumet i Figur 4.2. Prosentandelen karkana-

ler i tibia var veldig lav hos det 1 uker gamle føllet. Til tross for at det tilsynelatende var lokalisert en del karkanaler i vekstbrusken (se Figur 4.2d og Figur 4.5b), var det estimerte volumet til vekstbrusken i dette området veldig stort (se Figur 5.5), og det var mest sannsynlig derfor prosentandelen karkanaler i vekstbrusken var såpass lav i dette området. Det estimerte volumet til vekstbrusken var på det minste ved 5 uker, og bunnpunktet i Figur 4.3 skyldes mest sannsynlig at det var få karkanaler til stedet. De fleste karkanalene mot distal retning var tilbakedannet ved 5 uker, slik som Figur 4.5f viser. Det var en ansamling med karkanaler mot dorsal retning, men disse hadde tilsynelatende en mye mindre diameter enn karkanalene ved 6 uker, noe som sannsynligvis kan forklare bunnpunktet i Figur 4.3.



Figur 5.5: Estimert av vekstbruskens volum. Ved 1 uke er vekstbruskens volum tilnærmet den samme i både talus og tibia og punktene ligger dermed opp på hverandre i figuren, slik at kun en av dem er synlig.



Figur 5.6: Karkanal og tilhørende senterlinje. (a) Senterlinjen bevarer karkanalens opprinnelige form, men mangler i endepunktene som er markert med piler. (b) Karkanalen og senterlinjen har tilnærmet den samme formen, men senterlinjen er noe ujevn, særlig ved den ene grenen som er markert med en blå ellipse. (c) Senterlinje uten terskling med markerte artefakter.

Metoden for å beregne karkanalenes diameter hadde en noe svak presisjon, særlig da kanaltykkelsen var liten. Den foreslåtte metoden for å beregne diameteren, betraktet avstanden fra senterlinjen og ut til kanten av karkanalene, multiplisert med to. Senterlinjen var som sagt i stand til å gjengi fantometes fasong, unntatt i skjæringspunktet mellom to grener, som sannsynligvis var årsaken til at den beregnede diameteren til fantomet varierte.

Observasjon av Figur 5.6 tyder på at senterlinjen var i stand til å bevare karkanalens fasong, men at linjen var noe ujevn, slik som senterlinjen markert med blått i Figur 5.6b. Metodens evne til gjenkjenne karkanalens struktur gikk betraktelig ned da karkanalene var uregelmessig definert. Karkanalenes overflate burde ha blitt jevnet ut for å redusere støy langs senterlinjen slik at den beregnede diameteren hadde blitt

mer nøyaktig. Årsaken til at enkelte av senterlinjene manglet ved karkanalens grener og endepunkter, slik som i Figur 5.6a, var mest sannsynlig på grunn av terskling. Hensikten var å fjerne korte senterlinjer for å filtrere ut artefakter, og i henhold til Figur 5.6b og 5.6c fungerte metoden bra. Imidlertid ble av og til en liten del av endestykkene på karkanalene fjernet, som mest sannsynlig tyder på at endestykket ble tolket som en gren og fjernet på grunn av terskling.

Kapittel 6

Konklusjon

Målet med oppgaven var å bestemme om kvantitativ CT kunne bli benyttet for å bestemme trender i karkanalene nær ossifikasjonsfronten for individer med ulik alder. Den 3D-mikro-CT avbildningen og den kvantitative analysen viste store biologiske forskjeller mellom føllene. Det ble derfor ikke bestemt en klar trend på karkanalene nær ossifikasjonsfronten som funksjon av individenes alder.

Gjennom prosjektet ble det funnet en metode for å segmentere bein og karkanaler fra omkringliggende vekstbrusk i 16 knokler avbildet med mikro-CT. Bariumsulfat ble gitt intravenøst i blodet slik at blodårene inne i karkanalene fikk kontrast i CT-bildene. Barium fylte arteriesiden og ble stanset i kapillærene, derfor er det en usikkerhet i andelen karkanaler som er synlig i mikro-CT. Resultatet fra segmenteringen var i samsvar med observasjoner av de 3D-CT-bildene når de ble justert med terskling, men feilet av og til ved segmenteringen av karkanaler med lite tverrsnitt og lav intensitet. Utvidelsesfilteret som ble brukt for å øke synligheten til de minste karkanalene, kan ha gjort omrisset til karkanalene unøyaktig. Dessuten var det kun bariumsulfat i blodårene inne i karkanalene, slik at det er en usikkerhet i karkanalenes posisjon og tykkelse. Videre ble det funnet en metode for å klassifisere diameteren til et nettverk av karkanaler, likevel krever metoden ytterligere forbedringer da prosentfeilen var nokså stor, særlig da diameteren var liten. De eksperimentelle resultatene tyder på en stor usikkerhet i metoden for å beregne diameteren, spesielt på grunn av artefakter i senterlinjen.

At det ble funnet en metode for å segmentere knokkelprøver gir et solid grunnlag for videre studie av lesjoner med OC. Bedre kontrastmiddel, med mindre partikkelstørrelse, kan gi et mer detaljert bildet av karkanaler med lite tverrsnitt. Istedenfor å betraktet knoklene uke for uke, kunne det ha vært interessant å studert knoklens modningsstadium som sannsynligvis hadde gitt en bedre indikasjon på trender i karkanalene.

Referanser

- [1] B. Ytrehus, C. S. Carlson, and S. Ekman, "Etiology and pathogenesis of osteochondrosis," *Veterinary Pathology*, vol. 44, no. 4, pp. 429–448, 2007.
- [2] I. R. Hellings, *Differences between cartilage canals with relevance for osteochondrosis in horses*. PhD thesis, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), 2017.
- [3] K. Olstad, B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson, and N. I. Dolvik, "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis," *Equine Veterinary Journal*, vol. 40, no. 1, pp. 30–39, 2008.
- [4] K. Olstad, V. Cnudde, B. Masschaele, R. Thomassen, and N. I. Dolvik, "Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals," *Bone*, vol. 43, no. 3, p. 574–583, 2008.
- [5] K. Olstad, S. Ekman, and C. S. Carlson, "An update on the pathogenesis of osteochondrosis," *Veterinary Pathology*, vol. 52, no. 5, pp. 785–802, 2015.
- [6] "Histologi." <https://no.wikipedia.org/wiki/Histologi>. [Online; lest 20-mai-2018].
- [7] H. Cheng, X. H. Jiang, Y. Sun, and J. Wang, "Color image segmentation: advances and prospects," *Pattern Recognition*, vol. 34, no. 12, pp. 2259 – 2281, 2001.
- [8] D. L. Pham, C. Xu, and J. L. Prince, "Current methods in medical image segmentation," *Annual Review of Biomedical Engineering*, no. 2, pp. 315–337, 2000.
- [9] P. Parlanti, V. Cappello, F. Brun, G. Tromba, R. Rigolio, I. Tonazzini, M. Cecchini, V. Piazza, and M. Gemmi, "Size and specimen-dependent strategy for x-ray micro-ct and tem correlative analysis of nervous system samples," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 2858, pp. 1–12, 2017.

- [10] D. Sarment, "Technology and principles of cone beam computed tomography," in *Cone Beam Computed Tomography: Oral and Maxillofacial Diagnosis and Applications*, ch. 1, Wiley, 2013.
- [11] R. Cierniak, *X-Ray Computed Tomography in Biomedical Engineering*. Springer London, 2011.
- [12] A. du Plessis, C. Broeckhoven, A. Guelpa, and S. G. le, "Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples," *GigaScience*, vol. 6, no. 6, p. 1–11, 2017.
- [13] C. T. Badea, M. Drangova, D. W. Holdsworth, and G. A. Johnson, "In vivo small-animal imaging using micro-ct and digital subtraction angiography," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 53, no. 19, pp. 319–350, 2008.
- [14] "Radiography & micro-ct." <http://www.novadep.com/radiography-micro-ct/>. [Bilde; lastet ned 10-juni-2018].
- [15] T. M. Buzug, *Introduction to Computed Tomography: From Photon Statistics to Modern Cone-beam CT*. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [16] "X-ray." <https://academic.elsevier.com/levels/collegiate/article/X-ray/77656>. [Online; lest 18-april-2018].
- [17] V. I. Mikla and V. V. Mikla, *Medical Imaging Technology*. Elsevier Science, 2013.
- [18] "Atomic spectra and x-rays." https://cnx.org/resources/5508d7b84c93fd722d6c440e2f3b8cddc8e2a451/CNX_UPhysics_41_05_XrayTube.jpg. [Bilde; lastet ned 18-april-2018].
- [19] "Atomic spectra and x-rays." https://cnx.org/resources/7d048373d83bc110b3f3921a365b3fe0ed02c767/CNX_UPhysics_41_05_AtomicRad.jpg. [Bilde; lastet ned 18-april-2018].
- [20] "Bremsstrahlung." <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1e/Bremsstrahlung.svg/220px-Bremsstrahlung.svg.png>. [Bilde; lastet ned 18-april-2018].
- [21] "Production of x-rays." <https://www.radiologycafe.com/images/physics/xray-characteristicradiation.png>. [Online; lest 14-mai-2018].

- [22] C. W. Sensen and B. Hallgrímsson, "Micro-computed tomography," in *Advanced Imaging in Biology and Medicine: Technology, Software Environments, Applications*, ch. 1, Springer, 2009.
- [23] M. Hammer, "Ct physics: Ct reconstruction and helical ct." <http://xrayphysics.com/ctsim.html>. [Online; lest 19-april-2018].
- [24] P. L. Riviere and X. Pan, "Sampling and aliasing consequences of quarter-detector offset use in helical ct," *Nuclear Science Symposium Conference Record*, vol. 3, 2002.
- [25] "Røntgenstråler." <https://snl.no/r%C3%B8ntgenstr%C3%A5ler>. [Online; lest 18-april-2018].
- [26] H. Lusic and M. W. Grinstaff, "X-ray computed tomography contrast agents," *Chemical Reviews*, vol. 113, no. 3, pp. 1641–1666, 2012.
- [27] S. Braibant, G. Giacomelli, and M. Spurio, *Particles and Fundamental Interactions*. Springer, 2012.
- [28] "Radiation." <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/radiation/109464>. [Online; lest 17-april-2018].
- [29] R. Salzer, "X-ray imaging," in *Biomedical Imaging*, ch. 3, Wiley, 2012.
- [30] F. E. Boas and D. Fleischmann, "Ct artifacts: Causes and reduction techniques," *Imaging in Medicine*, vol. 4, no. 2, pp. 229–240, 2012.
- [31] "Photoelectric effect." https://en.wikipedia.org/wiki/Photoelectric_effect#/media/File:Photoelectric_effect.svg, 2007. [Bilde; lastet ned 18-mai-2018].
- [32] "Compton scattering." https://en.wikipedia.org/wiki/Compton_scattering#/media/File:Compton-scattering.svg, 2006. [Bilde; lastet ned 18-mai-2018].
- [33] "Radon transform." https://en.wikipedia.org/wiki/Radon_transform#/media/File:Sinogram_-_Two_Square_Indicator_Phantom.svg, 2016. [Bilde; lastet ned 21-mai-2018].
- [34] A. C. Kak and M. Slaney, "Algorithms for reconstruction with nondiffracting sources," in *Principles of Computerized Tomographic Imaging*, ch. 3, Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001.

- [35] G. L. Zeng, “3d image reconstruction,” in *Medical Image Reconstruction - A Conceptual Tutorial*, ch. 5, Springer, 2010.
- [36] P. Holck, “Ledd.” <https://sml.sn1.no/ledd>, 2017. [Online; lest 22-februar-2018].
- [37] A. Finnøy, *Elucidating the pathogenesis of osteochondrosis using nonlinear optical microscopy*. PhD thesis, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), 2017.
- [38] “Bone formation and development.” <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>, 2016. [Online; lest 28-februar-2018].
- [39] “Basics of the equine skeleton – bone structure.” <http://www.newbreedracings.com.au/wp-content/uploads/2015/05/skeletonNatalija.gif>, 2015. [Bilde; lastet ned 14-mars-2018].
- [40] “Hock fusion.” http://www.atlantaequine.com/pages/client_lib_hockfusion.html. [Bilde; lastet ned 14-mars-2018].
- [41] P. Gillespie, “The equine hock joint.” <https://vetpro.co.nz/the-hock/>. [Online; lest 14-mars-2018].
- [42] R. Rivas and F. Shapiro, “Structural stages in the development of the long bones and epiphyses,” *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 84, no. 1, p. 85–100, 2002.
- [43] “Femur bone – anterior markings.” <https://www.getbodysmart.com/lower-limb-bones/femur-bone-anterior-markings>. [Bilde; lastet ned 16-mars-2018].
- [44] “Skeletal tissue.” <http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/APFallLect8.html>. [Bilde; lastet ned 16-mars-2015].
- [45] E. Mackie, Y. Ahmed, L. Tatarczuch, K.-S. Chen, and M. Mirams, “Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40, no. 1, pp. 46–62, 2008.

- [46] F. Tóth, J. L. Torrison, L. Harper, D. Bussieres, M. E. Wilson, T. D. Crenshaw, and C. S. Carlson, "Osteochondrosis prevalence and severity at 12 and 24 weeks of age in commercial pigs with and without organic-complexed trace mineral supplementation," *Journal of Animal Science*, vol. 94, no. 9, pp. 3817–3825, 2016.
- [47] T. Aasmundstad, J. Kongsro, M. Wetten, N. I. Dolvik, and O. Vangen, "Osteochondrosis in pigs diagnosed with computed tomography: heritabilities and genetic correlations to weight gain in specific age intervals," *Animal*, vol. 7, no. 10, pp. 1576–1582, 2013.
- [48] P. E. Etterlin, D. A. Morrison, J. Österberg, B. Ytrehus, E. Heldmer, and S. Ekman, "Osteochondrosis, but not lameness, is more frequent among free-range pigs than confined herd-mates," *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 57, no. 63, 2015.
- [49] B. Ytrehus, E. Grindflek, J. Teige, E. Stubbsjøen, T. Grøndalen, C. S. Carlson, and S. Ekman, "The effect of parentage on the prevalence, severity and location of lesions of osteochondrosis in swine," *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 51, no. 4, p. 188–195, 2004.
- [50] S. Lykkjen, K. H. Roed, and N. I. Dolvik, "Osteochondrosis and osteochondral fragments in standardbred trotters: prevalence and relationships," *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, no. 3, p. 332–338, 2012.
- [51] B. Ytrehus, "Osteokondrose – etiologi og patogenese," *Tidsskriftet Den Norske Legeforening*, no. 3, pp. 298–299, 2005.
- [52] C. S. Carlson, L. D. Cullins, and D. J. Meuten, "Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: Evidence for a defect in cartilage canal blood supply," *Veterinary Pathology*, vol. 32, no. 6, pp. 641–647, 1995.
- [53] "Horse." <https://en.wikipedia.org/wiki/Horse>. [Online; lest 17-april-2018].
- [54] K. Olstad, B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson, and N. I. Dolvik, "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis," *Equine Veterinary Journal*, vol. 40, no. 1, pp. 30–39, 2008.
- [55] B. G. Batchelor, "Basic machine vision techniques," in *Machine Vision Handbook* (B. G. Batchelor and P. F. Whelan, eds.), ch. 14, pp. 565–623, Springer, 2012.
- [56] R. Wang, "Median filter." http://fourier.eng.hmc.edu/e161/lectures/smooth_sharpen/node2.html, 2014. [Online; lest 21-Mars-2018].

- [57] J. F. S. Gomes, F. R. Leta, P. B. Costa, and F. de O. Baldner, "Important parameters for image color analysis: An overview," in *Visual Computing* (F. R. Leta, ed.), ch. 4, pp. 81–96, Springer, 2014.
- [58] N. R. Pal and S. K. Pal, "A review on image segmentation techniques," *Pattern Recognition*, vol. 26, no. 9, pp. 1277–1294, 1993.
- [59] W. P. dos Santos, A. L. I. de Oliveira, and C. A. B. de Mello, "Image thresholding," in *Digital Document Analysis and Processing* (C. A. B. de Mello, ed.), ch. 5, pp. 71–97, 2013.
- [60] MIT, *VGStudio MAX 2.2 Reference Manual*.
- [61] J. Fan, G. Zeng, M. Body, and M.-S. Hacid, "Seeded region growing: an extensive and comparative study," *Pattern recognition letters*, vol. 26, no. 8, pp. 1139–1156, 2005.
- [62] K. Olstad, B. Ytrehus, S. Ekman, C. Carlson, and N. Dolvik, "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis," *Equine veterinary journal*, vol. 40, no. 1, pp. 30–39, 2008.
- [63] D. Rogers and S. Lowe, "Ultrastructure of blood vessels." <http://teachmeanatomy.info/the-basics/ultrastructure/blood-vessels/>, 2017. [Bilde; lastet ned 3-juni-2018].
- [64] A. H. Aitkenhead, "Mesh voxelisation." <https://se.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27390-mesh-voxelisation>, 2013. [Online; lest 10-mai-2018].
- [65] P. Kollmannsberger, "Skeleton3d." <https://se.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/43400-skeleton3d>, 2013. [Online; lest 08-mai-2018].
- [66] P. Kollmannsberger, "Skel2graph 3d." <https://se.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/43527-skel2graph-3d>, 2014. [Online; lest 08-mai-2018].
- [67] P. Kollmannsberger, "Skel2graph3d-matlab." <https://github.com/phi-max/skel2graph3d-matlab/blob/master/Graph2Skel3D.m>, 2013. [Online; lest 19-mai-2018].
- [68] "Regionprops3." <https://se.mathworks.com/help/images/ref/regionprops3.html>. [Online; lest 19-mai-2018].

- [69] “bwdist.” <https://se.mathworks.com/help/images/ref/bwdist.html>.
[Online; lest 18-mai-2018].
- [70] L. Zagorchev, P. Oses, Z. W. Zhuang, K. Moodie, M. J. Mulligan-Kehoe, M. Simons, and T. Couffinhal, “Micro computed tomography for vascular exploration,” *Journal of Angiogenesis Research*, vol. 2, no. 7, 2010.