



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Diss. ETH No. 21042

High-throughput, synchrotron based tomographic microscopy tools for the quantitative characterization of complex structures : A bone and foam study

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Science

presented by

Kevin Mader

MSc in Photonics, Boston University

BSc in Electrical Engineering, Boston University

born 5th April, 1986

citizen of the United States of America

March 1, 2013

Examiner: Prof. Dr. Marco Stampanoni

Co-examiner: Prof. Dr. Ralph Müller

Co-examiner: Prof. Dr. Jean-Philippe Thiran

Co-examiner: Prof. Dr. Christophe Raufaste

Summary

At first glance, the two principal matters of study in this thesis, bone and foam, are disparate substances. While one is a simple mixture of liquid and gas, the other is a complex, hierarchical, living, reacting biological tissue. Even the communities that study them are radically different, with one consisting of physicists and material scientists and the other consisting of doctors and biomedical engineers. Surprisingly, bone and foams share many characteristics and both belong to the general class of cellular materials. The principal commonality of these structures is the connection between structure and mechanical properties. For both bone and liquid foams, the properties of the raw materials (calcium carbonate and collagen for bone and water and air for foam) are well understood and characterized. Were bone and foam limited to the properties of their raw materials, they would lose a great deal of their functionality. The diversity that comes from the ability to mix materials to achieve specific properties allows bones to be strong without being heavy, stiff without being fragile, and tough while being sensitive. In foams, this same diversity means that shaving foam remains solid and deformable on your face and flows when pushed with a razor. These materials are thus extremely versatile and capable of performing a number of different tasks better than any of their constituent components. In particular, for both materials, although some of their behavior can be quantified with existing metrics such as bone densitometry and liquid fraction respectively, crucial elements remain unexplained by these analyses. The essence of this thesis is to use and develop quantitative 3D tomographic microscopy techniques to understand the complex interplay between microstructure and macro-scale properties for these two cellular materials.

Specifically for the bone, we wish to understand more about bone strength and fracture risk by carefully examining the microstructure of the cortical bone and connecting the structure to hereditary factors. Since this microstructure has not been studied extensively, much is still not known about which genes or even chromosomes might be responsible for regulating the struc-

ture. In order to identify the regions that are relevant for these structures, a linkage must be conducted looking at a variety of different bones with a variety of different genetic backgrounds. For this sort of analysis to have statistical significance a very large number of bones (> 1000) must be examined.

For the foam experiments, we wish to understand the fundamental behavior at the microstructural scale of bubbles and water. As foams flow, they rearrange quickly and begin to change shape. In order to see and track the movement of individual bubbles, images need to be taken and processed at a very fast rate so that bubbles can be identified and located inside an image. Since many of the foam we measure have well over 10,000 bubbles, a time-lapse experiment with only 20 seconds of data can involve analyzing and following well over 400,000 bubbles.

Between genetic studies and foam flow experiments, the need for automation in every aspect of the thesis is clear. We present a realization of this automation and the science that can be done with in this thesis. Every step of the methodology has been automated from the sample loading, alignment, and measurements (sec. 2) to the segmentation (sec. 3) to the post processing steps (sec. 4 & 5).

We discuss the issues related to automated sample management in chapter 2. Specifically, we show the robot-based sample exchange system that we developed at the TOMCAT beamline and how up to 60 different samples can be changed without user-intervention. We also show how a simple script can be used to automatically align and locate regions of interest in a murine femur bone sample. Finally, we show the micron-level stability of the system after hours of unattended measurement.

The next step, how the imaging data can be segmented into structural information, is discussed in chapter 3. We present the framework (sec. 3.1) we developed for analyzing the image data and how this scales to cluster computing environments. We then show how this framework can be used to automatically analyze the cellular aspects of microstructural bone (sec. 3.3). Finally, we present a new method developed during the thesis, for identifying and labeling bubbles in a liquid foam using the Plateau border structure (sec. 3.4).

In chapter 4, the task of making useful quantitative analyses from the structural data is addressed. We begin the chapter with illustrative examples of how our tools can be used to answer several genetic types of scientific questions. We then proceed to describe the tools we developed for the thesis and how they were applied to different systems.

We make the connection between the segmented and quantified images to function in chapter 5. In other words, we address the original scientific questions about foam and bone structure that were asked. In the foam system,

we show how the shape information can be used to track bubbles in a variety of different experiments and how useful information can be extracted about plastic and viscous behavior in the foam (sec. 5.1). The bone studies show how the relationship between shape, spatial position, and local strains can be quantified and how that can be applied to real bone samples to possibly estimate the sensitivity of mechanosensation for different lacunae. The final analysis is the linkage analysis connecting the microstructural phenotypes to genetic background and identifying which regions of the genome are likely to contain a gene responsible for regulating a given phenotype.

The final chapter, 6, is a summary of the major results of this thesis and an outlook for the future of research in the 3D imaging and tomography field. Specifically, we discuss the transition the imaging field is going through right now and what we expect for the next 10-20 years.

Résumé

Au premier abord, les deux principaux sujets d'étude de cette thèse, l'os et la mousse, sont deux objets très différents. Alors que l'un est un tissu biologique réactif complexe, hiérarchique et vivant, l'autre est un mélange simple de liquide et de gaz. De même, les communautés scientifiques qui les étudient sont radicalement différentes, avec d'une part des physiciens et chercheurs en sciences des matériaux, et d'autre part des médecins et ingénieurs biomédicaux. Cependant, les os et les mousses partagent étonnamment plusieurs propriétés : ils appartiennent tous deux à la classe générale des matériaux cellulaires, et leur principale propriété commune est le lien entre leur structure et propriétés mécaniques. Aussi bien pour les os que pour les mousses liquides, les propriétés de leurs composants propres (carbonate de calcium et collagène pour l'os, eau et air pour la mousse) sont bien comprises et caractérisées. Cependant, si les os et les mousses étaient limités aux simples propriétés de leurs constituants, ils perdraient une grande partie de leur fonctionnalité. En effet, leur structure cellulaire leur confère des propriétés spécifiques : les os ont la propriété d'être solide sans être lourd, rigide sans être fragile, et résistant sans être sensible. Les mousses liquides comme par exemple une mousse à raser ont le pouvoir d'être ferme et déformable sur le visage, et de s'écouler comme un fluide sous l'action d'une lame de rasoir. Ces matériaux sont en conséquence très polyvalents et capables de remplir des tâches de façon bien plus adaptée que leurs simples constituants. Cependant, pour ces deux matériaux en particulier, alors que certaines caractéristiques telles que la densité osseuse pour l'un et la fraction liquide pour l'autre sont bien quantifiées, certains éléments fondamentaux restent encore incompris malgré de nombreuses études. Ainsi, l'objectif de cette thèse est d'employer et de développer des techniques quantitatives de microscopie tomographique en 3D afin de comprendre le rapport complexe entre structure à l'échelle microscopique et propriétés notamment mécanique à l'échelle macroscopique de ces deux matériaux cellulaires.

Pour les matériaux osseux, nous nous penchons en particulier sur la robustesse des os et le risque de fracture par une étude minutieuse de la mi-

crostructure de l'os cortical et de sa relation avec des facteurs héréditaires. Peu est connu sur cette microstructure jusqu'à présent peu explorée, les gènes et chromosomes responsables de la régulation de la structure restent à être déterminés. Afin d'identifier les régions pertinentes à ces structures, une étude doit être menée reliant différentes variétés d'os avec une variété de provenances génétiques. Afin d'obtenir des valeurs statistiques représentatives, un très grand échantillon d'os (>1000) doit être examiné.

Concernant les mousses liquides, nous voulons comprendre leur comportement mécanique et rhéologique, caractérisés par des réarrangements et des variations de forme des bulles qui les constituent. Afin de pouvoir suivre de tels mouvements à l'échelle microscopique des bulles lors de l'écoulement simple d'une mousse, un dispositif d'enregistrement d'images à haute fréquence et haute résolution doit être mis en place. Comme une mousse peut contenir plus de 10 000 bulles, une telle expérience implique de pouvoir analyser simultanément plus de 400 000 bulles.

Entre étude génétique et expérience d'écoulement de mousses, le besoin d'automatisation dans tous ses aspects ressort clairement de cette thèse. Nous présentons ici une réalisation de cette automatisation, et les conclusions scientifiques que nous en tirons. Chaque étape de la méthodologie a été automatisée, du chargement de l'échantillon, son alignement et ses mesures (Ch. 2), à la segmentation (Ch. 3) et au traitement des données (Ch. 4 et 5).

Au Chapitre 2, nous abordons les questions soulevées par le traitement automatique des échantillons. En particulier, nous présentons le système robot d'échange d'échantillons développé sur la ligne TOMCAT, où jusqu'à 60 échantillons peuvent être échangés sans intervention humaine. Nous présentons également comment une fonction simple peut être employée pour aligner automatiquement et identifier des régions d'intérêt dans un échantillon d'os fémoral de souris. En fin de chapitre, nous présentons la stabilité à l'échelle du micron obtenue après plusieurs heures de mesure sans surveillance.

Au Chapitre 3, nous discutons comment les données d'imagerie peuvent être découpées en information structurale. Nous présentons le cadre (Partie 3.1) que nous avons développé pour analyser les données d'imagerie, et comment ce cadre s'adapte à l'environnement informatique en grappe («cluster computing»). Nous montrons ensuite comment ce cadre peut être appliqué pour analyser automatiquement l'aspect cellulaire du tissu microstructural osseux (Partie 3.3). Enfin, nous présentons une nouvelle méthode développée au cours de ce travail de thèse pour identifier et marquer des bulles dans une mousse liquide à partir de l'analyse de la structure du liquide contenu dans une mousse : les bords de Plateau et les vertex (jonctions des bords de Plateau).

Au Chapitre 4, nous nous attaquons au problème de l'analyse quantitative des données structurales. En premier lieu, nous illustrons comment nos outils de travail peuvent être employés pour répondre à plusieurs questions

soulevées par la génétique. Nous procédons ensuite à la description de ces outils développés dans le cadre de ce travail de thèse, ainsi qu'à leurs applications à différents systèmes d'étude.

Au Chapitre 5, nous établissons le rapport fonctionnel entre les images fragmentées et les images quantifiées. En d'autres termes nous nous adressons aux questions scientifiques initiales posées sur la structure des mousses et des os. Dans les systèmes de mousse, nous démontrons que l'information sur la forme peut être utilisée pour suivre des bulles dans une variété d'expériences différentes, retirant ainsi des informations pertinentes sur le comportement plastique.

Le dernier Chapitre, le Chapitre 6, est un résumé des résultats centraux de ce travail de thèse et les perspectives d'études dans le domaine de l'imagerie 3D et de la tomographie. En particulier, nous discutons la transition que le domaine de l'imagerie est en train de connaître et quels sont les changements à attendre dans les 10 à 20 prochaines années.