

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

MARCIN RAŚ, DARIUSZ IWAN

Muzeum i Instytut Zoologii PAN Wilcza 64, 00-679 Warszawa E-mail: marcinras1@gmail.com darek@miiz.waw.pl

# WYKORZYSTANIE MIKROTOMOGRAFII RENTGENOWSKIEJ, NIEINWAZYJNEJ TECHNIKI PRZESTRZENNEGO OBRAZOWANIA, W BADANIACH OWADÓW

# WSTĘP

Podstawa rentgenowskiej tomografii komputerowej jest technika prześwietleń znana już od 1895 r. Na poczatku lat 90. XIX w. pojedyncze zdjęcia rentgenowskie organizmów wykonał Nikola Tesla (1856-1943). Jednak to Wilhelm Konrad Röntgen (1845-1923) jako pierwszy przeprowadził pełne eksperymenty, a następnie opublikował swoje obserwacje na temat zastosowania promieni X. W przypadku naświetlanych materiałów, w tym tkanek zwierząt i ludzi, zachodzi zjawisko absorpcji przechodzącego promieniowania. Poszczególne tkanki organizmów mają zróżnicowane współczynniki absorpcji związane z różną gęstością substancji budującej daną strukturę. Różnica ta pozwala na uzyskanie skontrastowanych obrazów narządów wewnętrznych. Około 1896 r. Iwan Romanowicz Tarchanow--Tarchniszwili (1846-1908), rosyjski fizjolog narodowości gruzińskiej, wykonał pierwsze prześwietlenia zwierząt, w tym owadów, zwracając, tak jak Tesla, uwagę na wpływ promieniowania X na organizmy żywe (TSAGARELI 2012).

Techniki rentgenograficzne stopniowo rozwijały się i doskonaliły, doprowadzając do powstania wyodrębnionej dziedziny mikroskopii, do której zalicza się rentgenowską tomografię komputerową (TADEUSIEWICZ i ŚMIETAŃSKI 2011). Promieniowanie rentgenowskie, czy też promieniowanie X, to fale elektromagnetyczne o długości od 0,01 do 10 nm. Promieniowanie to dzielimy na miękkie i twarde. Pierwsze obejmuje fotony o energii poniżej 5 keV (kiloelektronowoltów), a w drugim przypadku energia pojedynczego fotonu oscyluje w granicy 5–125 keV. Do rentgenografii wykorzystuje się promieniowanie twarde, dzięki któremu można obrazować obiekty o małych rozmiarach, nawet pozycję atomów w kryształach. Właściwość ta została wykorzystana m. in. w pracach nad strukturą DNA. Jednak pewnym problemem jest brak możliwości wykorzystania soczewek do skupienia promieniowania X, ponieważ dla większości substancji ma ono indeks refrakcji zbliżony do 1, czyli słabo załamuje się przy przejściu z jednego ośrodka do drugiego.

Powszechnie używana nazwa "tomografia komputerowa" jest niedokładna i nie wskazuje z jaką techniką w rzeczywistości mamy do czynienia, gdyż tomografia niekoniecznie musi być wykonywana przy zastosowaniu rentgenografii. Dodatkowo określenie "komputerowa" zostało skrótowo wykorzystane jako tłumaczenie angielskiego słowa "computed", które oznacza obliczanie, pewien proces matematyczny. Dokładna nazwa prezentowanej techniki badawczej w języku angielskim brzmi "X-ray computed tomography (CT)". Rozbicie tej nazwy na poszczególne człony precyzyjnie określa z jaką techniką obrazowania mamy do czynienia: X-ray - wykorzystywane jest promieniowanie rentgenowskie; tomografia – obrazowanie badanego obiektu poprzez przedstawienie jego kolejnych sekcji poprzecznych; computed (obliczeniowa) - do uzyskania przekrojów wykorzystywane są różne procedury matematyczne, które na podstawie obrazów dwuwymiarowych (2D) definiują poprzeczne przekroje badanego obiektu (tomogramy), składające się na obraz trójwymiarowy (3D).

**Słowa kluczowe:** bezinwazyjna technika badawcza, morfologia, owady, rentgenowska tomografia komputerowa, zbiory entomologiczne

W języku polskim funkcjonuje zwrot "tomografia rentgenowska", który jest adekwatną nazwą dla tej techniki. Niniejsze opracowanie dotyczy badań małych obiektów, bo takimi z reguły są owady, stąd mówimy tutaj o tomografach operujących w skali mikro, które mogą obrazować detale o wielkości kilku lub kilkunastu mikrometrów. Dlatego dla techniki badania owadów za pomocą tomografii rentgenowskiej używamy słowa mikrotomografia, aby określić dokładność z jaką uzyskujemy wyniki. Należy pamiętać o zagrożeniach związanych z promieniowaniem rentgenowskim jako promieniowaniem jonizującym. Fotony promieniowania X są w stanie rozbijać wiązania atomowe i w dużych dawkach mogą prowadzić do choroby popromiennej.

# RENTGENOWSKA TOMOGRAFIA KOMPUTEROWA

#### APARATURA BADAWCZA

Po raz pierwszy w medycynie technikę rentgenowskiej tomografii komputerowej wykorzystano 1 listopada 1971 r. w szpitalu Atkinson Morley w Londynie. Zespół Godfreya Hounsfielda przeprowadził badanie głowy pacjenta w poszukiwaniu guza mózgu (patrz HIGGINS 2021). Uzyskiwane tą techniką obrazy są dokładniejsze, mają większą rozdzielczość, niż takie samo obrazowanie uzyskane przy pomocy rezonansu magnetycznego lub ultrasonografii.

Zastosowanie rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej do badań owadów stało się bardziej powszechne dopiero na początku XXI w. W tym czasie ukazało się szereg publikacji prezentujących pierwsze wyniki badań przeprowadzonych tą techniką (BEUTEL i KOMAREK 2004, BEUTEL I POHL 2006, WEIDE i BETZ 2009, BERRY i IBBOTSON 2010, SOCHA i współaut. 2010, SORIANO i współaut. 2010, POLILOV 2011).

Aparaty służące do badań rentgenograficznych wymagają odpowiedniego źródła promieniowania. Obecnie uzyskuje się promieniowanie X wykorzystując dwa typy źródeł (LIN i współaut. 2019):

 <u>lampę elektronową</u>, gdzie strumień elektronów emitowany przez lampę uderza w cel zazwyczaj wykonany z wolframu lub innego materiału o dużej gęstości, który w efekcie emituje fotony w zakresie promieni X;

– synchrotron, czyli akcelerator cząsteczek rozpędzający elektrony, prowadzone po okręgu, o dużej energii za pomocą silnego pola magnetycznego, co powoduje emitowanie promieniowania X. W najnowszych generacjach synchrotronów wykorzystuje się dodatkowe urządzenia, które wzmacniają zakrzywienie toru ruchu elektronów, przez co wytwarzane promieniowanie ma wyższą jasność, są to najjaśniejsze źródła spolaryzowanego promieniowania X mającego wąski zakres długości fal, jest ono dodatkowo skolimowane, czyli tworzy go wiązka równoległych fal, co pozwala na zastosowania kontrastu fazowego wymagającego promieniowania o wysokiej jakości i koherencji przestrzennej.

Aparatura badawcza rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej jest coraz bardziej udoskonalana i miniaturyzowana. Obecnie najmniejsze tomografy, czy też mikrotomografy komputerowe, mieszczą się na dużym biurku i zasilane są poprzez standardowe gniazdka sieci elektrycznej 230V. Ponadto urządzenia te są relatywnie proste w użyciu i tanie w utrzymaniu. Na rynku dostępnych jest wiele modeli, dzięki czemu można wybrać odpowiedni sprzęt w zależności od stosowanych procedur i rodzaju obiektów badawczych. Jedną z najważniejszych charakterystyk mikrotomografu jest wielkość komory limitującej maksymalny rozmiar badanego obiektu. Równie ważna jest moc lampy, szczególnie kiedy chcemy badać obiekty gęste, takie jak skamieniałości. Rozdzielczość kamery, a raczej jej matrycy, determinuje w dużej mierze rozdzielczość uzyskanego obrazu, którą podaje się w jednostce długości na piksel; w przypadku mikrotomografii rentgenowskiej jest to zazwyczaj m/piksel. Jest to jednak wartość teoretyczna, ponieważ w rzeczywiści detekcja ulega zaburzeniom, co zmniejsza końcową wartość uzyskanej rozdzielczości. Obiekt, który ma grubość jednego piksela i znajduje się na granicy dwóch pikseli uzyskanego obrazu, zostanie rozmyty i może zostać utracony w trakcie rekonstrukcji. Stąd w badaniach z wykorzystaniem synchrotronu, przy teoretycznej rozdzielczości 0,5 m/piksel, w praktyce uzyskuje się obraz obiektów o rozmiarach powyżej 1 m.

Do rekonstrukcji uzyskanych skanów i analizy badanych obiektów niezbędny jest sprzęt komputerowy, który zapewni odpowiednią moc obliczeniową (PÉREZ i współaut. 2020). Badania mikrotomografii rentgenowskiej skutkują zazwyczaj powstawaniem dużych zestawów danych liczonych w dziesiątkach, bądź setkach gigabajtów. Na początku stosowania mikrotomografu autorzy niniejszej publikacji wykorzystywali stacje robocze PC, które do rekonstrukcji skanu pojedynczego owada składającego się z kilku subskanów potrzebowały nawet kilkadziesiąt godzin. Obecnie proces ten, przeprowadzany w oparciu o średniej klasy stację roboczą, trwa najwyżej kilkadziesiąt minut.

Problem zapewnienia odpowiedniej mocy obliczeniowej komputerów dotyczy również możliwości zastosowania wymagających procesów analitycznych wykorzystujących zestawy danych o dużych objętościach. Analiza złożonych układów może przekroczyć możliwości standardowych komputerów, stąd wykorzystywane są stacje robocze posiadające setki giga-

bajtów RAM i potężne karty graficzne, pozwalające na wizualizację modeli złożonych z milionów punktów: pikseli w przypadku obrazowania 2D, wokseli dla 3D. Rezultaty badań, a więc zestawy danych wyjściowych i wyniki, w tym modele i zdjęcia, z racji ich dużych rozmiarów, wymagają stosunkowo obszernej przestrzeni pamięci dyskowej. Zestaw danych, który powstaje tylko podczas procesu skanowania pojedynczego obiektu, zazwyczaj zajmuje 40-80 Gb pamięci. Bez odpowiedniej infrastruktury informatycznej, przechowującej i zabezpieczającej dane przed ich utratą, prowadzenie badań z wykorzystaniem mikrotomografu rentgenowskiego jest bardzo uciążliwe lub praktycznie niemożliwe. Preferowanym rozwiązaniem są serwery tworzące automatycznie kopie zapasowe i umożliwiające szybki dostęp do danych. Możliwe jest również zastosowanie w mniejszej skali rozwiązań opartych na dyskach sieciowych. Pomimo mniejszej pojemności dają one możliwość zabezpieczenia danych w wypadku awarii dysku twardego.

### PROCES OBRAZOWANIA

Pozycjonowanie. Umieszczenie próbki w komorze skanowania wymaga odpowiedniego pozycjonowania w osiach X, Y, Z, z uwzględnieniem ruchu obrotowego skanowanego obiektu wokół osi pionowej. Stabilne umieszczenie próbki wyklucza ewentualne przemieszczenia, które odbiją się negatywnie na uzyskanych wynikach powodując rozmazany, nieostry obraz skanu. Ważnym elementem jest wybór materiałów, z których są wykonane pojemniki i elementy stabilizujące owada podczas skanowania. Najlepiej sprawdzają się tworzywa sztuczne o niskiej gęstości, np. polipropylen, a także polistyren (styropian). Włókna naturalne, np. bawełna, świetnie stabilizują skanowany obiekt, jednak sa dosyć trudne do usunięcia z modelu uzyskanego w procesie rekonstrukcji. Im mniej jest elementów przylegających do powierzchni owada, tym proces analityczny jest łatwiejszy i pozwala na uniknięcie artefaktów w uzyskanych obrazach.

<u>Skanowanie</u>. Dobór odpowiednich parametrów lampy, takich jak napięcie i natężenie, determinuje energię fotonów umożliwiającą im pełną penetrację badanego obiektu. Ustawienie zbyt wysokich wartości tych parametrów, wykorzystywanych do skanowania materiałów biologicznych, skutkuje słabym kontrastem lub wręcz brakiem informacji, którą jest różnica gęstości sąsiadujących obszarów badanego materiału. W takim przypadku niektóre elementy skanowanego obiektu są niewidoczne, ponieważ nie stanowią przeszkody dla promieni o większych energiach.

Kolejnym kluczowym parametrem jest czas naświetlania określający długość ekspozycji

obiektu na promieniowanie X podczas wykonywania pojedynczego rentgenogramu. Przy obiektach gęstych czasy naświetlania muszą być dłuższe, aby odpowiednia liczba fotonów o wysokiej energii została wykryta przez detektor.

Zastosowanie filtrów umożliwia dokonanie selekcji fotonów w zależności od ich energii. Są to zazwyczaj cienkie, kilku milimetrowej grubości, blaszki wykonane z różnych metali, np. miedzi lub aluminium, blokujące część widma promieniowania rentgenowskiego. Wykorzystuje się je przy badaniu gęstych obiektów, gdzie preferowane są fotony o dużych energiach, stąd zastosowany filtr usuwa fotony o niskiej energii.

Procesem, który znacznie poprawia jakość obrazu, jest uśrednienie wartości dla danego piksela na podstawie kilku rentgenogramów. Jednak zastosowanie tej procedury podnosi koszt i wydłuża czas badania. Uzyskanie obrazu o dużej rozdzielczości, w przypadku całego owada, możliwe jest dzięki połączeniu w procesie rekonstrukcji kilku skanów obrazujących poszczególne jego części. Skutkiem ubocznym, zniekształcającym obraz, mogą być niewielkie przesunięcia poszczególnych subskanów względem siebie.

Kąt obrotu próbki umocowanej do sceny w komorze skanowania determinuje liczbę wykonanych rentgenogramów. Z reguły wartość ta ustalana jest automatycznie, jednak przy wymagających badaniach warto się zastanowić czy nie zmniejszyć kąt obrotu o jaki próbka będzie przemieszczana po wykonaniu kolejnych prześwietleń. Obiekty skanuje się zazwyczaj przy zakresie obrotu 180°, czyli podczas całego procesu skanowania obróci się on o 180°. Jednak, jeżeli badany materiał ma bardzo zróżnicowaną gęstość, np. owad z ziarnami piasku w układzie pokarmowym (Ryc. 1), warto roz-



Ryc. 1. Przekrój modelu chrząszcza *Gonopus tibialis* w płaszczyźnie podłużnej; okaz spreparowany z wykorzystaniem suszarki w punkcie krytycznym; najjaśniejsze punkty (w czerwonym obramowaniu) to ziarna piasku znajdujące się w jelicie tylnym.

ważyć skanowanie w zakresie 360°. Oczywiście, wiąże się to z wydłużeniem czasu skanowania.

Warto zaznaczyć, że przed wykonaniem badań niezbędne jest dokonanie kalibracji urządzenia. Prawidłowe ustawienie kamery względem sceny i *vice versa* pozwala uniknąć nieosiowego (mimośrodowego) obrotu obiektu podczas skanowania. Kalibracja dotyczy również matrycy kamery dla uniknięcia niejednorodności tła, a także skorygowania niedoskonałości, które mogą występować na scyntylatorze i przy źródle promieniowania. W ten sposób tworzy się matrycę danych korekty obrazu wykorzystywaną w celu uzyskania jednorodnego natężenie promieniowania na całej powierzchni detektora kamery.

<u>Rekonstrukcja</u>. Proces ten polega na obliczeniu wartości jasności dla poszczególnych wokseli w przestrzeni 3D w oparciu o serię zdjęć rentgenowskich. Stosuje się do tego różne algorytmy, np. projekcji wstecznej (ang. back projection) (WILLEMINK i NOEL 2019). Wraz z roz-

wojem procesorów etap ten trwa obecnie nie godziny czy dni, ale minuty. Przed samą rekonstrukcją definiuje się szereg parametrów i procedur, takich jak uśrednienie pikseli (rozmycie), wykorzystanie algorytmów usuwających artefakty związane ze wzmocnieniem wiązki i powstawaniem pierścieni, a także koryguje się minimalne przesunięcia obrazu, zazwyczaj do granicy 10 pikseli. Ponadto definiuje się oryginalny zakres jasności, z jakiego będzie pozyskiwana skala szarości dla obrazowania z wykorzystaniem ostatecznych plików. Dzięki temu można uzyskać dobrą jakość kontrastu pomiędzy poszczególnymi realnymi gęstościami obszarów badanego obiektu reprezentowanymi przez poszczególne odcienie szarości.

Poszczególne etapy procesu badawczego owadów z wykorzystaniem rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej zostały przedstawione jako diagram (Ryc. 2).



Ryc. 2. Diagram obrazujący proces przygotowania, skanowania oraz analizy uzyskanych wyników przy wykorzystaniu techniki mikrotomografii rentgenowskiej.

### ANALIZA DANYCH

Zazwyczaj producenci mikrotomografów rentgenowskich dostarczają oprogramowanie wraz z zakupionym urządzeniem i są to najczęściej ich oryginalne rozwiązania. Możliwe jest również przetwarzanie uzyskanych danych (plików graficznych, np. w formacie .jpg, .bmp, .tif, bądź wykorzystywanych w medycynie plików typu DICOM) przy pomocy specjalistycznych programów dostępnych po zakupieniu licencji, np. komercyjne Amira lub Dragonfly, bądź jako wersje bezpłatne, np. Fiji Image®. Obecnie dostępny jest szeroki wachlarz programów zapewniających uzyskanie i zapisanie podstawowych parametrów, takich jak pomiar liniowy, powierzchnia, objętość lub liczba obiektów.

Ważnym elementem analiz jest możliwość generowania nowych zestawów danych, w tym modeli 3D (Ryc. 3), opartych na siatkach wielokątów. Proces ten pociąga za sobą konieczność stosowania specjalistycznego oprogramowania, które służy do wizualizacji czy też dokonywania pomiarów, np. Blender, Maya, Meshlab i inne. Tak uzyskane zestawy informacji mogą stanowić podstawę kolejnych etapów analiz kształtu obiektów o skomplikowanej budowie, będących podstawą morfometrii geometrycznej w środowisku trójwymiarowym, np. za pomocą programu R z pakietu geomorph.

Większość programów daje możliwość automatycznego (zaprogramowanego) zbierania pomiarów, np. średnicy lub dystansu od powierzchni. Tak utworzona mapa wartości wykonanych pomiarów pozwala na uzyskanie modelu



Ryc. 4. Wizualizacja wyników analizy średnicy układu tchawkowego chrząszcza *Tenebrio molitor;* poszczególne kolory obrazują średnicę tchawek.

3D badanego obiektu z różnymi grubościami przedstawionymi za pomocą skali barw (Ryc. 4). Można również prezentować powyższe wyniki w postaci standardowych tabel lub wykresów. Skanowanie całego obiektu pozwala na wykonanie wirtualnego sekcjonowania owada i wydzielenie poszczególnych narządów, z jednoczesną analizą takich parametrów, jak wymiary liniowe, pole powierzchni i objętość. Wydzielenie modeli poszczególnych układów umożliwia zdefiniowanie ich relacji przestrzennych (Ryc. 5, 6). Ciekawym wykorzystaniem modeli 3D jest możliwość wykonania obliczeń, które na podstawie rozkładu punktów tworzących model danego narządu, określają jego rozkład w przestrzeni i jednocześnie lokalizują



Ryc. 3. Trójwymiarowy model chrząszcza *Gonopus tibialis*, uzyskany z wykorzystaniem mikrotomografu rentgenowskiego.



Ryc. 5. Pustynny chrząszcz *Gonopus tibialis*; wyodrębniony model układu pokarmowego (kolor zielony) oraz model układu tchawkowego, gdzie na czerwono zaznaczone są tchawki związane z układem pokarmowym.



Ryc. 6. Pokrywy chrząszcza *Gonopus tibialis* z widocznymi kanałami, w których krąży hemolimfa (kolor zielony) oraz tchawkami (kolor żółty).

położenie w obrębie ciała. Zastosowanie funkcji gaussowskiego modelu mieszanego pozwala na wygenerowanie diagramu przedstawiającego rozkład gęstości obiektu w przestrzeni (Ryc. 7). Tak więc kolejnym pomiarem, jaki możemy uzyskać dzięki zastosowaniu tomografii rentgenowskiej, jest określenie gęstości poszczególnych elementów badanego obiektu. Przy zasto-



Ryc. 7. Analiza koncentracji układu tchawkowego chrząszcza *Tenebrio molitor* przedstawiona za pomocą modelu prawdopodobieństwa (gaussowski model mieszany); poszczególne kolory obrazują "gęstość" układu tchawkowego w obrębie ciała (czerwony – najniższą, niebieski – najwyższą).

sowaniu fantomu o znanej gęstości możliwe jest przełożenie skali szarości uzyskanych obrazów na realne wartości gęstości. Taki zestaw danych pozwala na identyfikację rodzajów tkanek i ich wytworów, np. odróżnienie ciał tłuszczowych od komórek jajowych i jaj.

Dane uzyskane z mikrotomografu rentgenowskiego pozwalają na obrazowanie całych organizmów, ich struktur budowy zewnętrznej i wewnętrznej, z pominięciem deformacji i uszkodzeń wynikających z zastosowania określonej techniki preparacyjnej (Ryc. 8, 9). W tym sensie mikrotomografia rentgenowska jest bezinwazyjną techniką badawczą, umożliwiającą dokonanie obserwacji naturalnych korelacji pomiędzy poszczególnymi narządami ciała (Ryc. 5). Modele uzyskane w procesie skanowania mogą posłużyć do przeprowadzenia symulacji komputerowych różnych procesów zachodzących w obrębie ciała, np. przepływu płynów ustrojowych, funkcjonowania mięśni (Ryc. 10), czy mechaniki ruchu. Dotychczas były to zazwyczaj badania prowadzone na zwierzętach kręgowych, jednak coraz częściej spotyka się prace naukowe, których obiektami są owady (WALKER i współaut. 2014).



Ryc. 8. Układ oddechowy chrząszcza *Tenebrio molitor*, przetchlinki zaznaczone są na czerwono, tchawki kolorem niebieskim.



Ryc. 9. Przekroje podłużne (A, C) oraz poprzeczne (B, D) modelu chrząszcza *Gonopus tibialis* obrazujące zmiany objętości przestrzeni pod pokrywami (subely-tral cavity) w zależności od stanu fizjologicznego (pobieranie wody przez chrząszcza).



Ryc. 10. Przekrój przez tułów wirtualnego modelu chrząszcza *Tenebrio molitor*, mięśnie zaznaczone są kolorem czerwonym.

# BADANIA OWADÓW Z WYKORZYSTANIEM MCT

### APARATURA POMOCNICZA, METODY PREPAROWANIA

Przygotowanie materiałów biologicznych do skanowania obejmuje kilka etapów, w zależności od tego czy chcemy badać owady przyżyciowo i jakie narządy/układy są obiektem badań. Istotne jest jakim materiałem dysponujemy. Zeskanowanie świeżo pozyskanych owadów pozwala na badanie układu oddechowego, który nie jest widoczny w przypadku materiałów przechowywanych na sucho lub w alkoholu. Do badań owady usypiane sa w standardowy sposób, np. poprzez wykorzystanie octanu etylu lub wystawienie na działanie niskiej temperatury (np. -20°C) przez kilkadziesiąt minut; zalecany czas to powyżej 30 min. Materiały przechowywane "na sucho" (np. w gablotach) lub "na mokro" (np. w alkoholu) bardzo dobrze nadają się do badania struktur szkieletu zewnętrznego i wewnętrznego. Owady pochodzące ze "starych kolekcji" często mają dobrze zachowany układ mięśniowy. Tak jak w przypadku materiałów wykorzystywanych do badań molekularnych, ważny jest również sposób ich pozyskania, uśpienia i warunki przechowywania. Minimalne wykorzystywanie środków chemicznych, brak pleśni, unikanie warunków sprzyjających rozwojowi procesów gnilnych, w sposób oczywisty podnosi jakość, a tym samym wartość materiałów muzealnych wykorzystywanych do badań, szczególnie z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych.

Przeprowadzenie specjalistycznego przygotowania owadów do skanowania ma zazwyczaj na celu zwiększenie kontrastu pomiędzy sąsiadującymi tkankami lub wyodrębnienie badanych struktur. Jedną z najlepszych metod utrwalania i zwiększania kontrastu tkanek, nie powodującego destrukcji owada, jest pozbycie się wody. Uzyskuje się preparat trwały, który może być wykorzystywany jako materiał

badawczy, analizowany również innymi technikami. Jest to jednak proces czasochłonny, wymaga odpowiedniego wyposażenia i doświadczenia. Najczęściej stosuje się dwie metody suszenia owadów poprzedzone odwodnieniem próbki poprzez przeprowadzenie jej przez szereg alkoholowy z roztworami o rosnącym stężeniu etanolu aż do 96%, a następnie zastąpienie go acetonem lub ksylenem. W pierwszym przypadku wykorzystywana jest suszarka w punkcie krytycznym, tzw. CPD (ang. critical point drying), w drugim związki chemiczne utrwalające tkanki. Dobrym przykładem zastosowania metody CPD są badania jelita przedniego u pluskwiaków z rodzajów Philaenus i Graphocephala (RANIERI i współaut. 2020). Struktura, która może utrudnić proces suszenia jest egzoszkielet, szczególnie jeżeli jest gruby i intensywnie rozbudowany, powodujący uszczelnienie dostępu do wnętrza ciała badanego owada. W takich przypadkach należy sekcjonować poszczególne jego elementy, np. przez usunięcie pokrywy u chrząszczy. Pewnym uproszczeniem procesu suszenia, w pełni zastępującym metodę CPD, jest wykorzystanie związku chemicznego Bis(trimethylsilyl)amine (HMDS), w którym obiekt zanurza się na okres od 12-24 godzin, w zależności od objętości i średnicy owada oraz szczelności jego egzoszkieletu. Dużym utrudnieniem stosowania tej techniki jest wysoka toksyczność związku HMDS, stąd wszelkie czynności należy przeprowadzać z wykorzystaniem dygestorium. Podobne zasady ostrożności w preparatyce próbek przygotowywanych do skanowania dotyczą stosowania innych związków chemicznych, np. środków utrwalających, takich jak aldehyd mrówkowy, aldehyd glutarowy, czterotlenek osmu, a także kontrastujących (jod, kwas fosforowolframowy i inne). Kolejną metodą kontrastowania tkanek jest barwienie przeprowadzane za pomocą kwasu fosforowolframowego (PTA), jodu rozpuszczonego w roztworze wodnym jodku potasu (IKI) lub w etanolu/metanolu, a także czterotlenek osmu. Przykładem barwienia z wykorzystaniem BaSO<sub>4</sub> jest badanie układu pokarmowego u dorosłych postaci muchówki Drosophila melanogaster (MATSUYAMA i współaut. 2015).

Procedury barwienia mogą różnić się w zależności od przynależności do danego taksonu, stadiów rozwojowych lub stanu fizjologicznego owada. Zdarza się, że technika dająca pozytywne rezultaty przy preparatyce dorosłych stadiów, nie sprawdza się w przypadku postaci larwalnych, tak jest np. u Holometabola. Stąd istnieje konieczność przeprowadzenia badań wstępnych, mających na celu ustalenie wystandaryzowanych procedur uwzględniających specyficzne właściwości materiałów biologicznych.

Skanowanie owadów in vivo można przeprowadzić w oparciu o standardową aparaturę mikrotomografii rentgenowskiej (mCT). W takim przypadku stosuje się anestetyk, który chwilowo uśpi/unieruchomi owada. Można wykorzystać CO<sub>2</sub>, a po wykonaniu skanu, przywrócić normalne stężenie gazów powodujące wybudzenie badanego owada (POINAPEN i współaut. 2017). Innym sposobem jest bardzo szybkie skanowanie, podczas którego ewentualne poruszenie się owada nie spowoduje zakłócenia procesu badawczego, co możliwe jest przy wykorzystaniu synchrotronu. Kombinowana technika z wykorzystaniem krótkich skanów przyżyciowych i standardowych preparatów posłużyła do analiz ruchomości krętarza u wołka zbożowego, chrząszcza z rodziny Curculionidae (Dos Santos Rolo i współaut. 2014).

### PRZEGLĄD WYNIKÓW DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ

Dotychczasowe badania z wykorzystaniem mCT najczęściej dotyczyły problemów budowy owadów, a także fizjologii, mechaniki ruchu, biologii. Stosunkowo rzadko publikowane są wyniki dotyczące ogólnej budowy ciała owada, tak jak w przypadku pszczoły miodnej (GRECO i współaut. 2017), bądź kornika Hypothenemus hampei (Alba-Alejandre i współaut. 2019), gdzie w odrębnej pracy zilustrowano również jego układ oddechowy (Alba-Telcedor i współaut. 2019). Zastosowanie mikrotomografii rentgenowskiej umożliwia badanie niezwykle wrażliwych struktur, których złożoność budowy uzależniona jest od stanu fizjologicznego owada, jego stadium rozwojowego i biologii. Takim przykładem jest układ tchawkowy. Pierwsze badania pokazujące przestrzenny model tego układu u wszystkich postaci rozwojowych (larwa, poczwarka, forma dorosła) zostały przeprowadzone na chrząszczu mączniku młynarku (Iwan i współaut. 2015, Raś i współaut. 2018). Analizy jakościowa i ilościowa (pomiary liniowe, pole powierzchni i objętość) pozwoliły na przedstawienie zmian układu tchawkowego jakie zachodzą podczas metamorfozy uskrzydlonego chrząszcza Tenebrio molitor i bezskrzydłego Gonopus tibialis. Wyniki powyższych badań pozwoliły na określenie roli poczwarki, a także zdefiniowania bezskrzydłości jako przystosowania do życia w warunkach pustynnych (Raś i współaut. 2022). Niezwykle ciekawe badania dotyczące procesu metamorfozy owadów zostały przeprowadzone u muchy plujki pospolitej (HALL i współaut. 2017, MARTÍN-VEGA i współaut. 2017), pszczoły Megachile rotundata (HELM i współaut. 2018) i motyla rusałki osetnika (Lowe i współaut. 2013). Prześledzono zachodzące w czasie metamorfozy zmiany w obrębie głowy u chrząszczy z rodzaju Chrysomela populi (GE i współaut.

2014), a także rozwój płata ocznego w obrębie układu nerwowego u plujki pospolitej (MARTÍN-VEGA i współaut. 2021). Kilka lat temu ukazała się praca przeglądowa na temat wizualizacji metamorfozy (HALL i MARTÍN-VEGA 2019).

Zdecydowana większość publikacji naukowych dotyczy budowy i funkcji wyodrębnionych struktur wewnętrznych i zewnętrznych ciała owadów. Badania głowy sieciarek (Neuroptera) przedstawione w pionierskiej pracy BEUTELA 1 współaut. (2010), w której został wykorzystany synchrotron, a także głowy chrząszcza Catops ventricosus (ANTUNES-CARVALHO i współaut. 2017), czy mrówki Wasmannia affinis (RICHTER i współaut. 2019), są przykładami standardowych projektów obejmujących poszczególne tagmy morfologiczne, bądź pojedyncze narządy owada. Bardzo często badania odnoszą się do wydzielonych struktur anatomicznych lub/i morfologicznych, takich jak: żuwaczki i powiązane z nimi mięśnie Sympetrum vulgatum (DAVID i współaut. 2016), aparat gębowy larwy ważki Anax imperator (BUSSE i współaut. 2021), oko złożone u chrząszczy Clinidium canaliculatum, Tenebrio molitor, Tribolium castaneum, Pterostichus melas italicus (GIGLIO i współaut. 2022), struktura szyi mrówki Formica exsectoides (NGUYEN i współaut. 2014), atlas mózgu trzmiela Bombus terrestris (ROTHER i współaut. 2021), organ słuchowy muchówek Emblemasoma auditrix (TRON i współaut. 2016), elementy odpowiedzialne za wytwarzanie dźwięku przez motyla zmierzchnicę trupią główkę (BREHM i współaut. 2015), czy zilustrowanie z wykorzystaniem synchrotronu mechanizmu pobierania krwi przez komara Aedes togoi (KIM i współaut. 2012).

Najważniejsze badania przeprowadzone w obrębie tułowia, oprócz jego ogólnej struktury, jak u chrząszczy Helophorus aquaticus i Margarinotus brunneus (Beutel I Komarek 2004), w sposób oczywisty, dotyczą jego funkcji lokomotorycznych. Obrazy 3D były podstawą badań porównawczych budowy tułowia uskrzydlonych i bezskrzydłych populacji Drosophila melanogaster (FABIAN i współaut. 2016), układu mięśniowego kilku gatunków ważek (Aeshna cyanea, Cordulia aenea, Libellula depressa, Onychogomphus forcipatus, Pantala flavescens, Sympetrum striolatum) (BAÜMLER i współaut. 2018), czy konstrukcji skrzydeł pszczoły miodnej (FASTER i współaut. 2017) i muszki Drosophila virilis (BRANDT i współaut. 2015). Na podstawie wyników badań mCT przeprowadzono symulacje komputerową określającą koszty lotu i ewolucji żuwaczek u Cyclommatus metal*lifer*, chrząszcza z rodziny jelonkowatych (GOYENS i współaut. 2015).

Bardzo duża grupa badań z wykorzystaniem mikrotomografii rentgenowskiej dotyczy analiz struktury odwłoka i narządów rozrodczych. Budowa funkcjonalna meskich zewnętrznych narządów rozrodczych została przedstawiona u ważek na przykładzie Ischnura elegans (WILLKOMMEN i współaut. 2015), zilustrowano przestrzenną budowę układu rozrodczego muchy tse-tse przystosowanego do żyworodności (ATTARDO I współaut. 2020), przeprowadzono badania porównawcze pokładełka chrząszczy z rodziny Tenebrionidae, których wyniki zostały wykorzystanych w badaniach filogenetycznych (KAMIŃSKI i współaut. 2022), sporządzono model mechanizmu ruchu pokładełka osy pasożytniczej Diachasmimorpha longicaudata (VAN MEER i współaut. 2020), objęto badaniami morfologię porównawczą żeńskich narządów rozrodczych drapieżnych owadów z rodziny Mantophasmatidae (Notoptera) (KÜPPER I współaut. 2019), przedstawiono model 3D wewnętrznych narządów rozrodczych much w czasie procesu kopulacji, na przykładzie Drosophila melanogaster (MATTEI 2015), a także układ rozrodczy i baketeriom pluskwiaków z rodzaju Diaphorina citri (Alba-Alejandre i współaut. 2020).

Przeprowadzenie badań przyżyciowych pozwoliło na wizualizację bakteriomu pluskiwiaka *Orosius albicinctus* za pomocą synchrotronu (WEINTRAUB i współaut. 2014), opis dwóch nowych gatunków mrówek, *Terataner balrog* i *T. nymeria* (GARCIA i współaut. 2017), określenie tolerancji owadów na wysoką temperaturę, gdzie jednym z badanych czynników była budowa układu tchawkowego, na przykładzie chrząszcza z rodziny kózkowatych *Cacosceles newmannii* (JAVAL i współaut. 2019), czy prześledzenie udziału ruchów odwłoka w zasysaniu pokarmu u pszczoły (ZHAO i współaut. 2019).

Metody rentgenograficzne wykorzystywane są również do wizualizacji struktury żerów owadzich, np. w ziarnach kawy, które stanowiły pokarm dla chrząszcza *Hypothenemus hampei* (ALBA-ALEJANDRE i współaut. 2018) lub w pniach czarnych dębów w przypadku chrząszcza kozioroga dębosza (JACH i współaut. 2018).

Badania dotyczące budowy i funkcjonowania kompleksu złożonych struktur egzoszkieletu wraz z układem mięśniowym pozwoliły na analizę i modelowanie mechanizmów ruchu owadów. Dzięki zastosowaniu rentgenowskiej tomografii dokładnie określony został wpływ poszczególnych mięśni w połączeniu z elementami egzoszkieletu na ruch skrzydeł muszki owocowej (DEORA i współaut. 2017). Opisany został system synchronizacji skrzydeł oraz mechanizmy jego dezaktywacji i modyfikacji. Występowanie specjalnych mięśni pełniacych funkcje "sprzegła" i "skrzyni biegów" pozwala na zmianę częstotliwości ruchów skrzydła. Zastosowanie wysublimowanych technik badawczych umożliwiło przedstawienie mięśni w ruchu w czasie lotu muchówek (WALKER i współaut. 2014). Wyniki przedstawiające funkcjonowanie mięśni tworzących aparatu lotu przedstawione zostały w formie animacji (https://www.youtube.com/watch?v=P6lBkK3 J9wg&t=29s).

MCt wykorzystywany jest do badań owadów wymarłych, zachowanych jako inkluzje w bursztynie (Ryc. 11), bądź jako skamieniałości. Technika ta jest szczególnie przydatna w przypadku bursztynów, których struktura jest matowa, a więc zatrzymuje światło widzialne, np. w przypadku bryłki, w której zatopiony został chrząszcz Orsonius electronefelus (KYPKE i SOLODOVNIKOV 2020). Wykorzystanie mCT pozwala na unikniecie szlifowania bedacego techniką inwazyjną, a także uzyskanie czytelnego modelu cyfrowego inkluzji w przypadku, kiedy ułożenie owada sprawia problemy z jego identyfikacją. Coraz częściej wykorzystuje się do badań mCT owadów zatopionych w bursztynie, np. Caputoraptor elegans, przedstawiciela wymarłej rodziny Alienopteridae (BAI i współaut. 2018), chrząszczy z rodziny Hydrophilidae, Anacaena morla, Crenitis profechuyi i Helochares fog (ARRIAGA-VARELA i współaut. 2021), a także rodziny Histeridae, Acritus



Ryc. 11. Zdjęcie bryłki bursztynu z inkluzją (mrówka) przesłanej do Warszawskiego Gabinetu Zoologicznego przez Konstantego Jelskiego, prawdopodobnie pochodzi z okresu kijowskiego, lata 1858–1863 (kolekcja MIZ PAN); poniżej skan wykonany techniką mikrotomografii rentgenowskiej.

sutirca (ALEKSEEV i BUKEJS 2021). Czasami uzyskuje się dodatkowe informacje, np. okaz chrząszcza Angimordella burmitina należącego do rodziny Mordellidae pokryty był pyłkiem kwiatowym (BAO i współaut. 2019), czy współwystępowanie przedstawicieli rzędów Ephemeroptera i Collembola opisane jako zjawisko forezy (PENNEY i współaut. 2012). W przypadku skamieniałości zastosowanie rentgenowskiej mikrotomografii umożliwiło obrazowanie zachowanych struktur wewnętrznych chrząszcza Onthophilus intermedius należącego do rodziny gnilikowatych (SCHWERMANN i współaut. 2016).

### PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA MIKROTOMOGRAFII RENTGENOWSKIEJ

Miniaturyzacja aparatury badawczej, w tym źródeł promieniowania X, i szybki rozwój narzędzi informatycznych sprawiają, że badania z wykorzystaniem mikrotomografii rentgenowskiej stają się coraz tańsze, a tym samym powszechniejsze. Uproszczenie preparatyki oraz przyspieszenie procesów skanowania i obróbki badanych materiałów pozwalają na szybsze uzyskanie wyników, a tym samym rozszerzenie tematyki badawczej. Problematyka badań entomologicznych z zakresu morfologii, anatomii, fizjologii i biologii w istotny sposób uzależniona jest od pojawienie się nowych technik badawczych. Początkowy okres związany jest z wypracowaniem metodyki badań i dostosowaniem jej do określonych grup owadów, ich stadiów rozwojowych i biologii. Wydaje się, że mikrotomografia rentgenowska stosowana do badań owadów jeszcze nie wyszła z tego okresu. Jednak już widoczne są konkretne osiągnięcia badawcze zmieniające sposób myślenia o budowie, mechanice ruchu czy metamorfozie owadów, które traktowane są jako jednorodne organizmy zachowujące swoiste cechy struktury i funkcji.

Atrakcyjność niezwykle szybko rozwijających się technik rentgenograficznych wykorzystywanych w badaniach naukowych, np. obrazowanie in vivo w trybie ciągłym (uzyskiwanie filmów 3D), powoduje wzrost zainteresowania nimi w życiu codziennym. Nie tylko w procesie edukacji, działalności popularnonaukowej, ale również w kulturze i sztuce. Mogą być przechowywane, udostępniane, powielane i wykorzystywane do tworzenia wydruku 3D (kopii materialnej). Obecny stan zaawansowania technik druku 3D pozwala na bardzo dokładne odwzorowanie obiektu z dokładnością ~35 m przy wykorzystaniu średniej klasy drukarek 3D. Materiały, które zostały poddane procesowi digitalizacji nie ulegają zniszczeniu, mogą służyć do dalszych badań, a uzyskane modele mogą być wykorzystane do realizacji innych tematów badawczych.

Mikrotomografia rentgenowska pozwala na badanie owadów przyżyciowo, a także post mortem, stąd też niezwykle przydatne są materiały badawcze przechowywane na sucho i w płynach konserwujących. Jednocześnie zastosowanie technik rentgenograficznych dla digitalizacji materiałów znajdujących się w kolekcjach entomologicznych umożliwia tworzenie modeli cyfrowych o wyższej wartości badawczej niż tradycyjne techniki fotograficzne. Zdalne wypożyczenia muzealne w czasie, kiedy ograniczona jest mobilność ludzi nauki (epidemie, kryzysy ekonomiczne, wojna) pozwalają na zachowanie ciągłości badań. Kopie umożliwiają zabezpieczenie dla wiedzy szerokiego spektrum informacji o okazach w razie ich zniszczenia lub uszkodzenia w przypadku wystąpienia zdarzeń losowych lub klęsk żywiołowych, czy też zagrożeń związanych z działaniami zbrojnymi. Straty wojenne, to często grabieże, zaplanowane lub przypadkowe. Możliwość precyzyjnej identyfikacji obiektów pochodzących z kolekcji entomologicznych może przyczynić się do podjęcia skutecznej rewindykacji zagrabionych dóbr dziedzictwa przyrodniczego.

Udostępnianie kopii cyfrowych owadów szerokiemu odbiorcy przez wiarygodne portale prezentujące osiągnięcia naukowe przyczynia



Ryc. 12. Głowa i fragment przedplecza chrząszcza *Tenebrio molitor*, model z prawej strony obrazuje wynik wirtualnej sekcji.

się do podwyższenia poziomu wiedzy czerpanej poprzez sieć internetową. Wykorzystanie darmowych i trwałych w eksploatacji cyfrowych modeli do nauczania biologii powinno cechować nowoczesną szkołę. Przeprowadzanie wirtualnych sekcji, poznawanie budowy anatomicznej i morfologicznej (Ryc. 10, 12) oraz szeroko rozumianej biologii owadów, z możliwością uzyskania modeli realnych (wydruk 3D w dowolnej skali), z całą pewnością uatrakcyjni proces nauczania i zachęci młodych ludzi do poznawania przyrody. W ramach projektu digitalizowania zbiorów naukowych Muzeum i Instytutu Zoologicznego PAN generowane są modele cennych okazów zwierząt pochodzących z XIX-wiecznej kolekcji warszawskiego Gabinetu Zoologicznego (Raś i Iwan 2022).

Czy dalszy rozwój technik rentgenograficznych wyeliminuje wykorzystanie skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. scanning electron microscope, SEM)? Zapewne nie, ale w przypadku badań owadów pierwsze próby obrazowania struktur w skali "nano" w przestrzeni 3D wydają się być bardzo obiecujące. W procesie skanowania łuski chrząszcza z rodziny ryjkowcowatych (Curculionidae) (WILTS i współaut. 2018), uzyskano rozdzielczość 70 nm. To oznacza, że tomografia rentgenowska rozwija się niezwykle dynamicznie jako technika badawcza, a jej możliwości, jak na razie, nie są jeszcze w pełni wykorzystane w badaniach owadów.

#### Streszczenie

Mikrotomografia rentgenowska wykorzystuje promieniowanie X do obrazowania struktur biologicznych na podstawie różnic gęstości poszczególnych elementów badanego obiektu. Tworzenie cyfrowych modeli przestrzennych (3D) owadów polega na złożeniu uzyskanych podczas skanowania obrazów dwuwymiarowych (2D) poprzecznych przekrojów badanych obiektów, tzw. tomogramów. Zastosowanie micro-CT do obrazowania owadów stało się bardziej powszechne dopiero na początku XXI w. Technika ta umożliwia przeprowadzenie badań przyżyciowo, bądź materiałów przechowywanych w kolekcjach. Bezinwazyjne skanowanie organizmów pozwala na uniknięcie deformacji i uszkodzeń wynikających z zastosowania metod preparacji, stąd micro-CT jest techniką badawczą umożliwiającą obserwację naturalnych korelacji pomiędzy poszczególnymi narządami ciała owada. Modele uzyskane w wyniku skanowania mogą posłużyć do badań morfologicznych, anatomicznych, fizjologicznych, a także przeprowadzenia symulacji komputerowych różnych procesów zachodzących w obrębie ciała, np. przepływu płynów ustrojowych, funkcjonowania mięśni czy mechaniki ruchu. Cyfrowe kopie zeskanowanych owadów zobrazowanych w skali mikro doskonale nadają się do wykorzystania w wirtualnym systemie sieci informacyjnej. Mogą być przechowywane, udostępniane, powielane i wykorzystywane do analiz, a także tworzenia wydruków 3D. Atrakcyjność uzyskiwanych wyników (przestrzenne modele i animacje cyfrowe) powoduje wzrost zainteresowania nimi w procesie edukacji, promowaniu nauki, prowadzeniu działalności popularnonaukowej, a także w kulturze i sztuce. Zastosowanie technik rentgenograficznych do digitalizacji materiałów znajdujących się w kolekcjach entomologicznych umożliwia zabezpieczenie dla wiedzy szerokiego spektrum informacji o okazach w razie ich zniszczenia lub uszkodzenia w przypadku wystąpienia zdarzeń losowych lub klęsk żywiołowych, a także zagrożeń związanych z działaniami wojennymi.

#### LITERATURA

- ALBA-ALEJANDRE I., ALBA-TERCEDOR J., VEGA F. E., 2018. Observing the devastating coffee berry borer (Hypothenemus hampei) inside the coffee berry using microcomputed tomography. Scient. Rep. 8, 17033.
- ALBA-ALEJANDRE I., ALBA-TERCEDOR J., VEGA F. E., 2019. Anatomical study of the coffee berry borer (Hypothenemus hampei) using micro-computed tomography. Scient. Rep. 9, 17150.
- ALBA-ALEJANDRE I., ALBA-TERCEDOR J., HUNTER W. B., 2020. Anatomical study of the female reproductive system and bacteriome of Diaphorina citri Kuwayama, (Insecta: Hemiptera, Liviidae) using micro-computed tomography. Scient. Rep. 10, 7161.
- ALBA-TELCEDOR J., ALBA-ALEJANDRE I., VEGA F. E., 2019. Revealing the respiratory system of the coffee berry borer (Hypothenemus hampei; coleoptera: curculionidae: Scolytinae) using micro-computed tomography. Scient. Rep. 9, 17753.
- ALEKSEEV V. I., BUKEJS A., 2021. The first extinct species of Acritus LeConte, 1853 (Histeridae: Abraeinae) from Eocene Baltic amber: a microscopic beetle inclusion studied with X-ray micro--computed tomography. Foss. Rec. 24, 223-231.
- ANTUNES-CARVALHO C., YAVORSKAYA M., GNASPINI P., RIBERA I., HAMMEL J. U., BEUTEL R. G., 2017. Cephalic anatomy and three-dimensional reconstruction of the head of Catops ventricosus (Weise, 1877) (Coleoptera: Leiodidae: Cholevinae). Org. Divers. Evol. 17, 199-212.
- ARRIAGA-VARELA E., BRUNKE A., GIRÓN J. C., SZAWARYN K., BRUTHANSOV J., FIKAČEK M., 2021. Micro-CT reveals hidden morphology and clarifies the phylogenetic position of Baltic amber water scavenger beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). Hist. Biol. 33, 1395-1411.
- ATTARDO G. M., TAM N., PARKINSON D., MACK L. K., ZAHNLE X. J., ARGUELLEZ J., TAKÁC P., MALACRIDA A. R., 2020. Interpreting Morphological Adaptations Associated with Viviparity in the Tsetse Fly Glossina morsitans (Westwood) by Three-Dimensional Analysis. Insects 11, 651.
- BAI M., BEUTEL R. G., ZHANG W., WANG S., HÖRNIG M., GRÖHN C., YAN E., YANG X., WIPFLER B., 2018. A new Cretaceous insect with a unique cephalo-thoracic scissor device. Curr. Biol. 28, 438-443.
- BAO T., WANG B., LI J., DILCHER D., 2019. Pollination of Cretaceous flowers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116, 24707-24711.
- BERRY R. P., IBBOTSON M. R., 2010. A three-dimensional atlas of the honeybee neck. PLoS One 5, e10771.
- BAUMLER F., GORB S. N., BÜSSE S., 2018. Comparative morphology of the thorax musculature of adult Anisoptera (Insecta: Odonata): Functional aspects of the flight apparatus. Arthropod Struct. Develop. 47, 430-441.

- BEUTEL R. G., KOMAREK A., 2004. Comparative study of thoracic structures of adults of Hydrophiloidea and Histeroidea with phylogenetic implications (Coleoptera, Polyphaga). Org. Divers. Evol. 4, 1-34.
- BEUTEL R. G., POHL H., 2006. Endopterygote systematics - where do we stand and what is the goal (Hexapoda, Arthropoda)? Syst. Entomol. 31, 202-219.
- BEUTEL R. G., ZIMMERMANN D., KRAUS M., RANDOLF S., WIPFLER B., 2010. Head morphology of Osmylus fulvicephalus (Osmylidae, Neuroptera) and its phylogenetic implications. Org. Divers. Evol. 10, 311-329.
- BRANDT J., DOIG G., TSAFNAT N., 2015. Computa-tional Aerodynamic Analysis of a Micro-CT Based Bio-Realistic Fruit Fly Wing. PLoS One 10, e0124824.
- BREHM G., FISCHER M., GORB S., KLEINTEICH T., KÜHN B., NEUBERT D., POHL H., WIPFLER B., WURDINGER S., 2015. The unique sound production of the Death's-head hawkmoth (Acherontia atropos (Linnaeus, 1758)) revisited. Sci. Nat. 102, 43.
- BUSSE S., TROGER H.-L., GORB S. N., 2021. The toolkit of a hunter – functional morphology of lar-val mouthparts in a dragonfly. J. Zool. 315, 247-260.
- DAVID S., FUNKEN J., POTTHAST W., BLANKE A., 2016. Musculoskeletal modelling of the dragonfly mandible system as an aid to understanding the role of single muscles in an evolutionary context. J. Éxp. Biol. 219, 1041-1049.
- DEORA T., GUNDIAH N., SNE S. P., 2017. Mechanics of
- the thorax in flies. J. Exp. Biol. 220, 1382-1395. Dos Santos Rolo T., Ershov A., Van De Kamp T., BAUMBACH T., 2014. In vivo X-ray cine-tomography for tracking morphological dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 3921-3926.
- FABIAN B., SCHNEEBERG K., BEUTEL R. G., 2016. Comparative thoracic anatomy of the wild type and wingless (wg<sup>1</sup>cn<sup>1</sup>) mutant of Drosophila melanogaster (Diptera). Arthropod Struct. Develop. 45, 611-636.
- FASTER J., BATTAGLIA F., BAYANDOR J., 2017. A computational study on the influence of insect wing geometry on bee flight mechanics. Biol. Open 6, 1784-1795.
- GARCIA F. H., FISCHER G., LIU C., AUDISIO T. L., ALPERT G. D., FISHER B. L., ECONOMO E. P., 2017. X-Ray microtomography for ant taxonomy: An exploration and case study with two new Terataner (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) species from Madagascar. PLoS One 12, e0172641.
- GE S.-Q., HUA Y., REN J., ŚLIPIŃSKI A., HEMING B., BEUTEL R. G, YANG X.-K., WIPFLER B., 2014. Transformation of head structures during the metamorphosis of Chrysomela populi (Coleopte-ra: Chrysomelidae). Arthropod Syst. Phylogeny 70, 129-152.
- GIGLIO A., VOMMARO M. L., AGOSTINO R. G., LO L. K., DONATO S., 2022. Exploring compound eyes in adults of four coleopteran species using synchrotron X-ray phase-contrast microtomography (SR-PhC Micro-CT). Life 12, 741.
- GOYENS J., VAN WASSENBERGH S., DIRCKX J., AERTS P., 2015. Cost of flight and the evolution of stag beetle weaponry. J. R. Soc. Interface 12, 20150222.
- GRECO M., JONES A., SPOONER-HART R., HOLFORD P., 2017. X-ray computerised microtomography (MicroCT): a new technique for assessing exter-

nal and internal morphology of bees. J. Apicult. Res. Bee World 47, 286-291.

- HALL M. J. R., MARTÍN-VEGA D., 2019. Visualization of insect metamorphosis. Phil. Trans. R. Soc. B 374, 20190071.
- HALL M. J. R., THOMAS J., SIMONSEN T. J., MARTÍN-VEGA D., 2017. The 'dance' of life: visualizing metamorphosis during pupation in the blow fly Calliphoravicinaby X-ray video imaging and micro-computed tomography. R. Soc. Open Sci. 4, 160699.
- Helm B. R., PAYNE S., RINEHART J. P., YOCUM G. D., BOWSHER J. H., GREENLEE K. J., 2018. Micro--computed tomography of pupal metamorphosis in the solitary bee Megachile rotundata. Arthropod Struct. Develop. 47, 521-528.
- HIGGINS E. S., 2021. 50 years ago, the first CT scan let doctors see inside a living skull thanks to an eccentric engineer at the Beatles' record com*pany*. The Conversation. https://theconversation.com/50-years-ago-the -first-ct-scan-let-doctors-see-inside-a-living -skull-thanks-to-an-eccentric-engineer-at-the -beatles-record-company-149907.
- IWAN D., KAMINSKI M. J., RAs M., 2015. The Last Breath: A mCT-based method for investigating bleand. If the based include for the sugaring the tracheal system in Hexapoda. Arthropod Struct. Develop. 44, 218e227.
  JACH R., KNUTELSKI S., UCHMAN A., HERCMAN H., DOHNALIK M., 2018. Subfossil markers of climate
- change during the Roman Warm Period of the late Holocene. Sci. Nat. 105, 1-15.
- JAVAL M., THOMAS S., LEHMANN P., BARTON M. G., CONLONG D. E., DU PLESSIS A., TERBLANCHE J. S., 2019. The effect of oxygen limitation on a xylophagous insect's heat tolerance is influenced by life-stage through variation in aerobic scope and respiratory anatomy. Front. Physiol. 10, 1426.
- KAMIŃSKI M. J., GEARNER O. M., RAS M., HUNSINGER E. T, SMITH A. L., MAS-PEINADO P., GIRÓN J. C., BILSKA A. G., STRUMPHER W. P., WIRTH C. C., KANDA K., SWICHTENBERG K., IWAN D., SMITH A. D., 2022. Female terminalia morphology and cladistic relations among Tok-Tok beetles (Tenebrionidae: Sepidiini). Cladistics, doi:10.1111/cla.12510.
- KIM B. H., SEO E. S., LIM J. H., LEE S. J., 2012. Synchrotron X-Ray Microscopic Computed Tomography of the Pump System of a Female Mosquito.
- Micr. Res. Technique 75, 1051-1058. KÜPPER S. C., KLASS K.-D., UHL G., EBERHARD M. J. B., 2019. Comparative morphology of the internal female genitalia in two species of Mantophasmatodea. Zoomorphology 138, 73-83. KYPKE J. L., SOLODOVNIKOV A., 2020. Every cloud has
- a silver lining: X-ray micro-CT reveals Orsunius rove beetle in Rovno amber from a specimen inaccessible to light microscopy. Histor. Biol. 32, 940-950.
- LIN A. S. P., STOCK S. R., GULDBERG R. E. 2019. Microcomputed tomography. [W:] Handbook of microscopy. HAWKES P. W., SPENCE C. H (red.). Springer Nature Switzerland, 1205-1232.
- LOWE T., GARWOOD R. J., SIMONSEN T. J., BRADLEY R. S., WITHERS P. J., 2013. Metamorphosis revealed: time-lapse threedimensional imaging inside a living chrysalis. J R Soc Interface 10, 20130304.
- MARTÍN-VEGA D., SIMONSEN T. J., HALL M. J. R., 2017. Looking into the puparium: Micro-CT visualization of the internal morphological changes during metamorphosis of the blow fly, Calliphora

vicina, with the first quantitative analysis of organ development in cyclorrhaphous dipterans. J. Morphol. 278, 629-651. MARTIN-VEGA D., WICKLEIN M., SIMONSEN T. J., GAR-

- MARTÍN-VEGA D., WICKLEIN M., SIMONSEN T. J., GAR-BOUT A., AHMED F., HALL M. J. R., 2021. Anatomical reconfiguration of the optic lobe during metamorphosis in the blow fly Calliphora vicina (Diptera: Calliphoridae) revealed by Xray microcomputed tomography. Zoologischer Anzeiger 292, 139-149.
- MATSUYAMA S., HAMADA N., ISHII K., NOZAWA Y., OHKURA S., TERAKAWA A., HATORI Y., FUJIKI K., FUJIWARA M., TOYAMA S., 2015. In vivo 3D PIXEmicron-CT imaging of Drosophila melanogaster using a contrast agent. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 348, 123-126.
- NGUYEN V., LILLY B., CASTRO C., 2014. The exoskeletal structure and tensile loading behavior of an ant neck joint. J. Biomechan. 47, 497-504.
- PENNEY D., MCNEIL A., GREEN D. I., BRADLEY R. S., JEPSON J. E., WITHERS P. J., PREZIOSI R. F., 2012. Ancient Ephemeroptera-Collembola Symbiosis Fossilized in Amber Predicts Contemporary Phoretic Associations. PLoS One 7, e47651.
- PÉREZ T.A.V., LÓPEZ J.M.H., MORENO-BARBOSA E., ALONSO B. DE C., MERINO M. R. P., MENESES V. M. C., 2020. Efficient CT image reconstruction in a GPUParallel environment. Tomography 6, 44-53.
- POINAPEN D., KONOPKA J. K., UMOH J. U., NORLEY C. J. D., MCNEIL J. N., HOLDSWORTH D. W., 2017. Micro-CT imaging of live insects using carbon dioxide gas-induced hypoxia as anesthetic with minimal impact on certain subsequent life history traits. BMC Zool. 2, 9.
- POLILOV A. A., 2011. Thoracic musculature of Sericoderus lateralis (Coleoptera, Corylophidae): miniaturization effects and flight muscle degeneration related to development of reproductive system. Entomol. Rev. 91, 735-742.
- RANIERI E., ZITTI G., RIOLO P., ISIDORO N., RUSCHIONI S., BROCCHINI M., ALMEIDA R. P. P., 2020. Fluid dynamics in the functional foregut of xylem-sap feeding insects: A comparative study of two Xylella fastidiosa vectors. J. Insect Physiol. 120, 103995.
- RAŚ M., IWAN D., 2022. Kolekcje Gabinetu Zoologicznego Królewskiego Uniwersytetu Warszawskiego. Harvard Dataverse, V1, doi:10.7910/DVN/8GQXPE.
- RAŚ M., IWAN D., KAMIŃSKI M. J., 2018. The tracheal system in post-embryonic development of holometabolous insects: a case study using the mealworm beetle. J. Anat. 232, 997-1015.
  RAŚ M., WIPFLER B., DANNENFELD T., IWAN D., 2022.
- RAŚ M., WIPFLER B., DANNENFELD T., IWAN D., 2022. Postembryonic development of the tracheal system of beetles in the context of aptery and adaptations towards an arid environment. PeerJ. 10, e13378.
- RICHTER A., KELLER R. A., BAUMGARTEN ROSUMEK F., ECONOMO E. P., HITA GARCIA F., BEUTEL R. G., 2019. The cephalic anatomy of workers of the ant species Wasmannia affinis (Formicidae, Hymenoptera, Insecta) and its evolutionary implications. Arthropod Struct. Develop. 49, 26-49. ROTHER L., KRAFT N., SMITH D. B., JUNDI B., GILL R.
- ROTHER L., KRAFT N., SMITH D. B., JUNDI B., GILL R. J., PFEIFFER K., 2021. A micro-CT-based standard brain atlas of the bumblebee. Cell Tissue Res. 386, 29-45.
- SCHWERMANN A. H., DOS SANTOS ROLO T., CATERINO M. S., BECHLY G., SCHMIED H., BAUMBACH T., VAN DE

KAMP T., 2016. Preservation of three-dimensional anatomy in phosphatized fossil arthropods enriches evolutionary inference. ELife 5, e12129.
SOCHA J. J., FÖRSTER T. D., GREENLEE K. J., 2010.

- SOCHA J. J., FÖRSTER T. D., GREENLEE K. J., 2010. Issues of convection in insect respiration: Insights from synchrotron X-ray imaging and beyond. Resp. Physiol. Neurobiol. 173S, S65-S73.
- SORIANO C., ARCHER M., AZAR D., CREASER P., DELCLŃS X., GODTHELP H., HAND S., JONES A., NEL A., NÉRAUDEAU D., ORTEGA-BLANCO J., PÉREZ-DE LA FUENTE R., PERRICHOT V., SAUPE E., KRAEMER M. S., TAFFOREAU P., 2010. Synchrotron X-ray imaging of inclusions in amber. C. R. Palevol. 9, 361-368.
  TADEUSIEWICZ R., ŚMIETAŃSKI J., 2011. Pozyskiwanie
- TADEUSIEWICZ R., ŚMIETAŃSKI J., 2011. Pozyskiwanie obrazów medycznych oraz ich przetwarzanie, analiza, automatyczne rozpoznawanie i diagnostyczna interpretacja. Wydawnictwo Studenckiego Towarzystwa Naukowego, Kraków.
- TSAGARELI M. G., 2012. Ivane Tarkhnishvili (Tarchanoff): A Major Georgian Figure from the Russian Physiological School. J. Hist. Neurosci. 21, 393-408.
- TRON N., STÖLTING H., KAMPSCHULTE M., MARTELS G., STUMPNER A., LAKES-HARLAN R., 2016. The Auditory System of the Dipteran Parasitoid Emblemasoma auditrix (Sarcophagidae). J. Insect Sci. 16, 1-9.
  VAN MEER N. M. M., CEREVENIK U., SCHLEPÜTZ C. M.,
- VAN MEER N. M. M., CERKVENIK U., SCHLEPÜTZ C. M., VAN LEEUWEN J. L., GUSSEKLOO S. W. S., 2020. The ovipositor actuation mechanism of a parasitic wasp and its functional implications. J. Anat. 237, 689-703.
- WALKER S. M., SCHWYN D. A., MOKSO R., WICKLEIN M., MÜLLER T., DOUBE M., STAMPANONI M., KRAPP H. G., TAYLOR G. K., 2014. In vivo time-resolved microtomography reveals the mechanics of the blowfly flight motor. PLoS Biol. 12, e1001823.
- WEIDE D., BETZ O., 2009. Head morphology of selected Staphylinoidea (Coleoptera: Staphyliniformia) with an evaluation of possible groundplan features in Staphylinidae. J. Morphol. 270, 1503-1523.
- WEINTRAUB P. G., HOCH H., MÜHLETHALER R., ZCHORI--FEIN E., 2014. Synchrotron X-ray micro-computed tomography as a tool for in situ elucidation of insect bacteriomes. Arthropod Struct. Develop. 43, 183-186.
- WILLEMINK M. J., NOËL P. B., 2019. The evolution of image reconstruction for CT – from filtered backprojection to artificial intelligence. Eur. Radiol. 29, 2185-2195.
- WILLKOMMEN J., MICHELS J., GORB S. N., 2015. Functional morphology of the male caudal appendages of the damselfly Ischnura elegans (Zygoptera: Coenagrionidae). Arthropod Struct. Develop. 44, 289-300.
- WILTS B. D., SHENG X., HOLLER M., DIAZ A., GUIZAR-SICAIROS M., RAABE J, HOPPE R, LIU S.-H., LANG-FORD R, ONELLI O. D., CHEN D., TORQUATO S, STEINER U., SCHROER C. G., VIGNOLINI S., SEPE A., 2018. Evolutionary-optimized photonic network structure in white beetle wing scales. Adv. Mat. 30, 1702057.
- ZHAO J., MENG F., YAN S., WU J., LIANG Y., ZHANG Y., 2019. Abdominal pumping involvement in the liquid feeding of honeybee. J. Insect Physiol. 112, 109-116.

#### MARCIN RAŚ, DARIUSZ IWAN

Museum and Institute of Zoology PAS, 64 Wilcza Str., 00-679 Warszawa, E-mail: marcinras1@gmail.com, darek@miiz.waw.pl

#### USE OF THE X-RAY COMPUTED MICROTOMOGRAPHY, A NON-INVASIVE TECHNIQUE, IN INSECT RESEARCH

#### Summary

X-ray microtomography uses X-rays to visualize biological structures based on their density. To obtain threedimensional (3D) models a set of two-dimensional images needs to be combined. At the beginning of the XXI century, X-ray microtomography started to be widely implemented in entomological research. This technique enables the examination of living insects as well as specially processed specimens (dried, stained). Furthermore, historical individuals from entomological collections can also be analyzed. X-ray microtomography has a huge advantage over the standard anatomical or histological methods as it is non-invasive. This opens the possibility to examine the natural arrangement of organs and their correlation. Data obtained from X-ray microtomography can be implemented in different types of research, including morphology, anatomy, and physiology. It is also applicable for computer simulations of various processes such as body fluid circulation, muscle movement, or movement mechanics. X-ray microtomography data are digital and thus can be freely deposited, shared, copied, and printed on 3D printers. Created models are a great asset for education, and the popularization of science, art, and culture. Digitalization of specimens from historical entomological collections adds an additional layer of protection and produces data that can be used even when the original specimens are destroyed.

Key words: entomological collection, insects, morphology, non-invasive technique, X-ray computed tomography