

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

POZOROVÁNÍ VLIVU VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ NA ŽIVÉ BUŇKY HOLOGRAFICKÝM MIKROSKOPEM

OBSERVATION OF EXTERNAL ENVIRONMENT INFLUENCE ON LIVING CELLS WITH
HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. KLÁRA KOVÁŘOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ANETA KŘÍŽOVÁ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Klára Kovářová

který/která studuje v **magisterském navazujícím studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem

v anglickém jazyce:

Observation of external environment influence on living cells with holographic microscope

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Vliv vnějšího prostředí na živé buňky je předmětem výzkumu mnoha vědeckých oborů. Pomocí holografického mikroskopu lze živé buňky a jejich reakce na vnější prostředí sledovat neinvazivně. Zároveň tato metoda umožňuje měřit suchou hmotu buněk, která může sloužit k hodnocení vitality buněk.

Cíle diplomové práce:

1. Návrh vhodných experimentů s ohledem na využití výhod holografické mikroskopie.
2. Provedení a optimalizace navržených experimentů.
3. Zpracování a vyhodnocení získaných dat.

Seznam odborné literatury:

- [1] Popescu, G. Quantitative phase imaging of cells and tissues McGraw Hill Professional, 2011
- [2] Kim, M. Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications Springer, 2011
- [3] Witte, S.; Plauska, A. & Groot, M. Short-Coherence Off-Axis Holographic Microscopy of Live Cell Dynamics Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, 2012
- [4] Boss, D.; Kühn, J.; Jourdain, P.; Depeursinge, C.; Magistretti, P. J. & Marquet, P. Measurement of absolute cell volume, osmotic membrane water permeability, and refractive index of transmembrane water and solute flux by digital holographic microscopy Journal of Biomedical Optics, International Society for Optics and Photonics, 2013, 18, 036007-036007

Vedoucí diplomové práce: Ing. Aneta Křížová

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2014/2015.

V Brně, dne 24.11.2014

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
Ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Předmětem diplomové práce je pozorování vnějšího vlivu na buňky za použití multimodálního holografického mikroskopu. Teoretická část práce pojednává nejdříve o vývoji holografické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně. Dále se práce zaměřuje na multimodální holografický mikroskop, který umožňuje neinvazivně pozorovat živé buňky. V diplomové práci je také uveden jeho popis, postup práce a zpracování hologramu. Stěžejní částí je i rešerše na téma chemotaxe buněk a osmotické jevy v buňkách. V rámci práce byly na tato témata navrženy příslušné experimenty. V experimentální části je nejdříve popsána kultivace buněk, poté příprava vzorku a komůrek pro pozorování a následně zpracování dat. Druhá polovina experimentální části je zaměřena přímo na provedená měření. Ve všech experimentech byly pozorovány buňky K2 (plné označení LW13K2).

Summary

Subject of this master's thesis is the observation of influence of external environment on the living cells with the use of multimodal holographic microscope. The theoretical part is summarising the development of the holographic microscopy at IPE FME BUT. The theoretical part also describes multimodal holographic microscope, which allows non-invasive observing of living cells. The thesis also covers construction of the microscope, basic working instructions and the hologram processing method. The main subject of the thesis is the research on the topic of chemotaxis and osmotic processes in the cells. Experiments were designed for the purpose of this thesis to cover topics mentioned above. The experimental part of the thesis deals with cultivation of the cells, preparation of the sample and observation chambers and processing of the data. This part later focuses directly on the laboratory measurements. In all experiments, cells K2 (full name LW13K2) were observed.

Klíčová slova

Multimodální holografický mikroskop, chemotaxe buněk, osmotické jevy v buňkách.

Keywords

Multimodal holographic microscope, chemotaxis of cells, osmotic processes in cells.

KOVÁŘOVÁ, K. *Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 52 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem *Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem* vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Anety Křížové. Dále prohlašuji, že veškerá odborná literatura a další informační zdroje, které jsou citovány v práci, jsou uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Brně, dne 24.5.2015

Bc. Klára Kovářová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Anetě Křížové za odborné vedení, cenné rady, připomínky a za čas věnovaný konzultacím. Dále děkuji Mgr. Veronice Jůzové za přípravu vzorků k pozorování. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině, příteli a všem, kteří mi jakkoli pomáhali při tvorbě této práce.

Bc. Klára Kovářová

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle a rozdělení práce	3
3	Multimodální holografický mikroskop	4
3.1	Holografická mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně	4
3.2	Popis multimodálního holografického mikroskopu	6
3.3	Zpracování interferogramu	8
3.4	Spuštění a nastavení mikroskopu	9
4	Vliv vnějšího prostředí	11
4.1	Difúze	11
4.2	Chemotaxe	12
4.2.1	Historie výzkumu chemotaxe	12
4.2.2	Význam chemotaxe	13
4.2.3	Chemotaxe buněk v mikroskopii	14
4.3	Osmotické jevy v buňkách	17
4.3.1	Význam osmózy	18
4.3.2	Osmóza buněk v mikroskopii	18
5	Experimentální část	22
5.1	Příprava experimentů	22
5.1.1	Kultivace buněk	22
5.1.2	Pozorovací komůrky	23
5.2	Chemotaxe buněk	25
5.2.1	Analýza dat — trasování buněk	26
5.2.2	I. měření	30
5.2.3	II. měření	31
5.2.4	III. měření	33
5.2.5	Shrnutí	35
5.3	Osmotické jevy v buňkách	36
5.3.1	Analýza dat — přepočet fáze na suchou hmotu	37
5.3.2	I. měření	38
5.3.3	II. měření	39
5.3.4	III. měření	40
5.3.5	IV. měření	43
5.3.6	V. měření	45
5.3.7	Shrnutí	46
6	Závěr	48

1. Úvod

Základní stavební a funkční jednotkou všech živých organismů je buňka. Jedná se o nejmenší životaschopný objekt, který je schopný se vyvíjet, růst, komunikovat s okolím a samostatně se reprodukovat. Každá buňka je vyplněna koncentrovaným vodným roztokem, ve kterém jsou rozptýleny jednotlivé funkční části buňky, a je ohraničena plazmatickou membránou, která reguluje přístup látek jak do buňky, tak i ven. Základní dělení rozlišuje buňky prokaryotické a eukaryotické. Zatímco některé organismy jsou pouze jednobuněčné (např. bakterie či různé prvoci), jiné organismy jsou mnohobuněčné (např. živočichové, vyšší rostliny). Lidské tělo obsahuje více než 200 typů buněk, kdy mnohé z nich vykonávají více než jednu funkci. A právě proto jsou buňky cílem mnoha studií a výzkumů [1].

Jelikož buňky jsou většinou průhledné a bezbarvé objekty, je těžké je zobrazit. Vynález mikroskopu v 17. stol. učinil buňky poprvé viditelnými a v roce 1655 Robert Hooke poprvé nazval malé komůrky buňkami. Avšak teprve v 19. stol. se začalo více využívat světelného mikroskopu k pozorování živých buněk.

Světelný mikroskop umožňuje zvětšit až tisíckrát obraz buňky, ale ve světlém poli je její obraz málo kontrastní. Pro zvýšení kontrastu se používá barvení buněk, při kterém se každé barvivo váže na jinou složku buňky a tím ji zviditelňuje. Dále se také používají fluorescenční barviva, která lze detekovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Tento mikroskop využívá dvou filtrů, kdy první filtr propouští vlnové délky světla, které excitují dané fluorescenční barvivo. Druhý filtr pak propouští pouze světlo vzniklé fluorescencí barviva. Obarvené objekty se poté jeví jako zářící předměty na tmavém pozadí.

Další možností, jak zobrazit buňky, je využití speciálních mikroskopických zobrazovacích metod, jako jsou klasický fázový kontrast a diferenciální interferenční kontrast. Tyto metody využívají toho, že jednotlivé složky buňky a médium se od sebe navzájem nepatrně liší v indexu lomu [2].

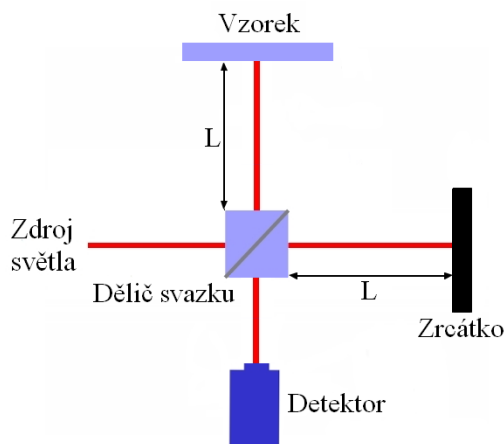
Většího zvětšení lze dosáhnout použitím elektronové mikroskopie (transmisní či rastrovací), která dokáže zobrazit detaily buňky až o velikosti několika nanometrů. Avšak elektronová mikroskopie vyžaduje velmi tenké a zafixované vzorky a tudíž neumožňuje pozorovat živé buňky [1].

Další z možností, jak pozorovat živé a neobarvené buňky, je použití interferenční mikroskopie. Jedná se o zobrazovací metodu, která využívá interference světelných svazků. Svazek, který prochází vzorkem (resp. se od něj odráží), je nazýván předmětový, ten druhý referenční. Díky záznamu interference lze stanovit zpoždění předmětového svazku. Interferenční mikroskopy lze rozdělit na reflexní a transmisní. Jejich základem jsou vždy interferometry. V případě reflexní mikroskopie se světelný svazek od vzorku odráží. Jeden z prvních reflexních interferometrů byl sestaven A. A. Michelsonem v roce 1881, jeho schéma je zobrazeno na obrázku 1.1(a) [3].

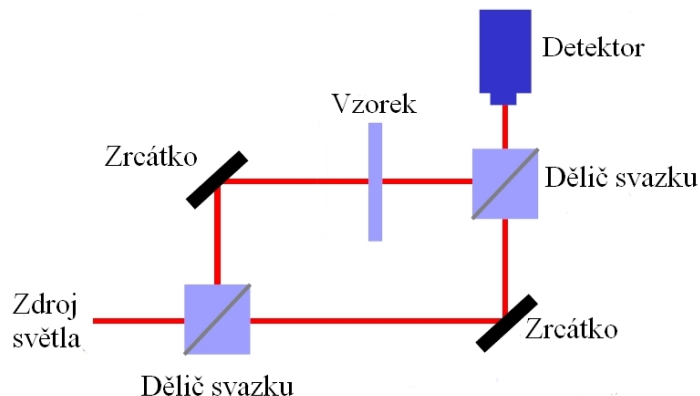
V případě transmisních mikroskopů světelný svazek prochází přes vzorek. V roce 1891 Ludwig Mach a Ludwig Zehnder zkonstruovali první transmisní interferometr. Princip Machova–Zehnderova interferometru je dodnes jedním z nejpoužívanějších v oblasti výzkumu transparentních objektů. Jeho schéma je zobrazeno na obrázku 1.1(b) [3].

V případě, kdy světelné svazky interferují v ose (in-line), jedná se o interferometrické mikroskopy. Jestliže světelné svazky interferují pod úhlem (off-axis), mikroskopy jsou nazývány holografické.

(a)



(b)



Obrázek 1.1: Schéma: (a) Michelsonova interferometru, (b) Machova–Zehnderova interferometru. Převzato z [4] a upraveno.

Základy holografické mikroskopie položil Denis Gábor v roce 1948, v roce 1971 získal Nobelovu cenu. Dalšího rozvoje dosáhla tato metoda až s vynálezem laseru v roce 1960, který dodal bodové a koherentní světlo. Avšak až díky digitální technice (např. použití CCD kamery), která umožňuje vzniklý hologram dále zpracovávat, byl oživen zájem o holografickou mikroskopii. Tato metoda umožňuje pozorovat živé buňky i jejich detaily a dynamiku, jelikož dokáže zobrazit i změřit rozdíly v optické dráze vzniklé při průchodu světla v předmětové větvi přes vzorek [2].

2. Cíle a rozdělení práce

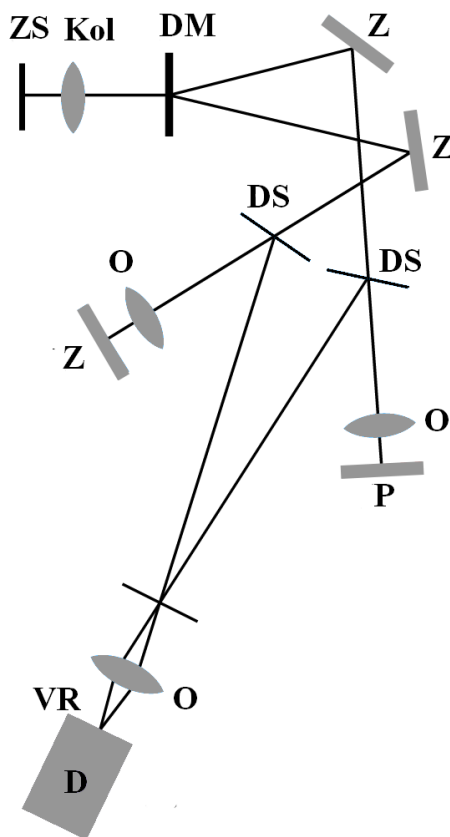
Prvním cílem této práce je navrhnout vhodné experimenty zabývající se tématem *vliv vnějšího prostředí na živé buňky* s ohledem na využití výhod holografické mikroskopie. Dalším cílem je provedení a optimalizace odpovídajících experimentů za použití multimodálního holografického mikroskopu (dále MHM). Tento mikroskop měří fázové zpoždění způsobené průchodem světelného svazku přes vzorek. Tím umožňuje neinvazivně pozorovat živé buňky a jejich reakce na vnější prostředí, a proto se hodí k navrženým experimentům. Posledním cílem je zpracování a vyhodnocení získaných dat.

Diplomová práce s názvem *Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem* je rozdělena do tří částí. První dvě části jsou teoretické, ta třetí se zaměřuje na experimenty. V první části je pojednáno o multimodálním holografickém mikroskopu, který je umístěn v laboratoři Experimentální biofotoniky. Je zde také uveden vývoj holografické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně. Dále je v této části pojednáno o zpracování hologramu. Druhá část pojednává o vlivu vnějšího prostředí na živé buňky se zaměřením na difúzi, chemotaxi a osmózu buněk. Tato část také obsahuje rešerši na téma chemotaxe a osmotické jevy v mikroskopii. V poslední, třetí části jsou popsány samotné experimenty, které byly v rámci této práce provedeny. Jednalo se o pozorování chemotaxe — pohybu buněk směrem k chemoatraktantu a pozorování osmózy — hypotonického děje.

3. Multimodální holografický mikroskop

3.1. Holografická mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně

První achromatický mimoosový holografický konfokální mikroskop byl navržen a zkonstruován R. Chmelíkem a Z. Harnou [5]. Tento mikroskop byl navržen pro odražené světlo o nízké koherenci. Podobně jako klasický konfokální mikroskop i tento konfokální holografický mikroskop umožňuje optické řezy vzorků (3D zobrazení), avšak navíc dokáže i detekovat jejich fázi a tím zobrazit výškový profil vzorku. Jeho schéma je zobrazeno na obrázku 3.1.

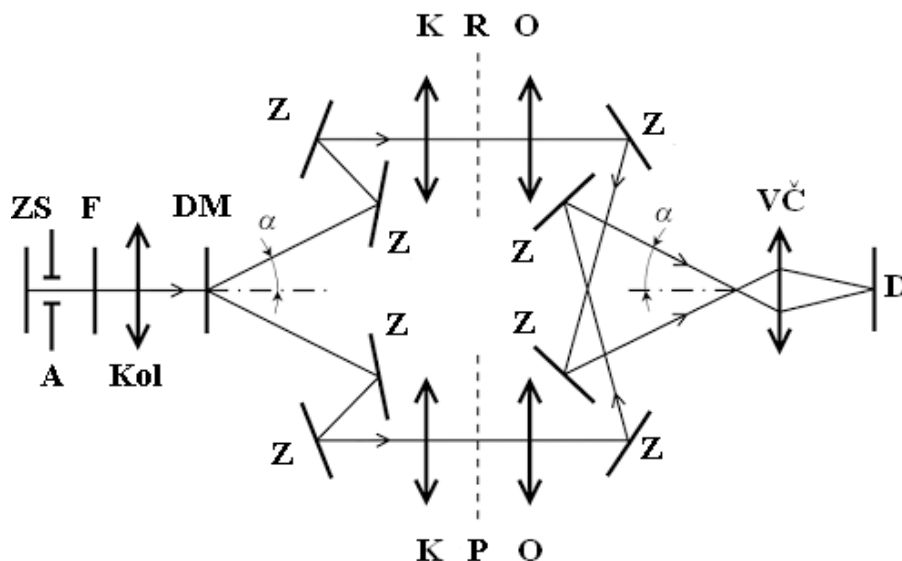


Obrázek 3.1: Schéma konfokálního holografického mikroskopu. ZS – zdroj světla, Kol – kolektor, DM – difrakční mřížka, Z – zrcátko, DS – dělič svazku, O – objektiv, P – předmět, VR – výstupní rovina, D – detektor. Převzato z prezentace [4].

P. Kolman navázal na dřívější práce I. Chytkové [6] a M. Prokopové [7], [8] a v rámci své dizertační práce zkonstruoval transmisní holografický mikroskop. V roce 2010 byl tento mikroskop poprvé představen pod názvem *koherencí řízený holografický mikroskop* (anglicky *coherence-controlled holographic microscope*, dále jen CCHM) [9]. Tento mikroskop využívá spojení mimoosové holografie s achromatickým a prostorově invariantním interferometrem. Pro rozdělení světelného svazku do referenční a předmětové větve je zde použita difrakční mřížka. Právě toto uspořádání s mřížkou zaručuje, že interferenční

3. MULTIMODÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

struktura má stejnou frekvenci a polohu pro všechny vlnové délky a body zdroje. Schéma tohoto mikroskopu je zobrazeno na obrázku 3.2.

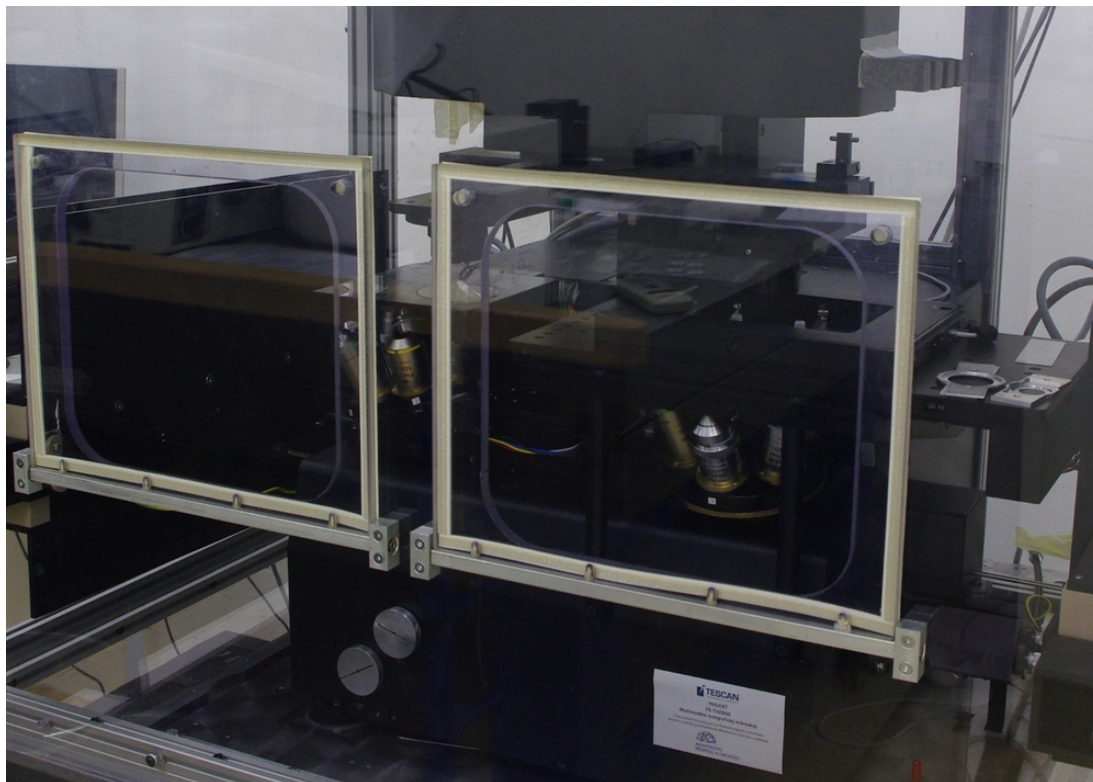


Obrázek 3.2: Schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu. ZS – zdroj světla, A – aperturní clona, F – filtr, Kol – kolektor, DM – difrakční mřížka, Z – zrcátko, K – kondenzor, R – referenční objekt, P – předmět, O – objektiv, VČ – výstupní čočka, D – detektor. Převzato z prezentace [4].

Z konceptu CCHM vychází i další holografický mikroskop, který byl navržen a zkonstruován na ÚFI FSI VUT v Brně ve spolupráci se společností Tescan Brno, s.r.o. a je představován pod názvem *multimodální holografický mikroskop* – dále jen MHM [10]. Nově navržený holografický mikroskop řeší některé z nevýhod svého předchůdce. První změnou oproti původnímu konceptu CCHM bylo využití běžných kondenzorů a objektivů korigovaných na nekonečno. Díky této změně byl získán větší pracovní prostor pro manipulaci se vzorkem a zároveň možnost kombinace s dalšími klasickými optickými technikami. To vedlo ke vzniku fluorescenčního módu [11]. Další velmi důležitou změnou bylo použití běžné dělicí kostky pro dělení světelného svazku do dvou větví. Tím byla získána větší spektrální propustnost. Difrakční mřížka byla umístěna pouze do referenční větve, kde vychyluje svazek.

MHM je od roku 2013 umístěn také v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v Brně (obrázek 3.3) a je dále konstrukčně i softwarově vyvíjen. Tento mikroskop disponuje celkem třemi módy, a to transmisním, reflexním a fluorescenčním. Reflexní mód umožňuje pozorovat topografii vzorků (například měření profilů), transmisní mód umožňuje pozorovat morfologii vzorků, měření suché hmoty či sledování pohybu buněk a ve fluorescenčním módu lze detekovat a identifikovat buněčné struktury. K pozorování biologických vzorků (životních cyklů buněk a buněčné dynamiky) se používá transmisní mód. A právě pro tyto biologické aplikace je mikroskop vybaven termoizolačním boxem, který je vyhříván topným systémem a zajišťuje stabilní teplotu během pozorování. Holografický mikroskop v transmisním módu byl použit i k experimentům této diplomové práce.

3.2. POPIS MULTIMODÁLNÍHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU



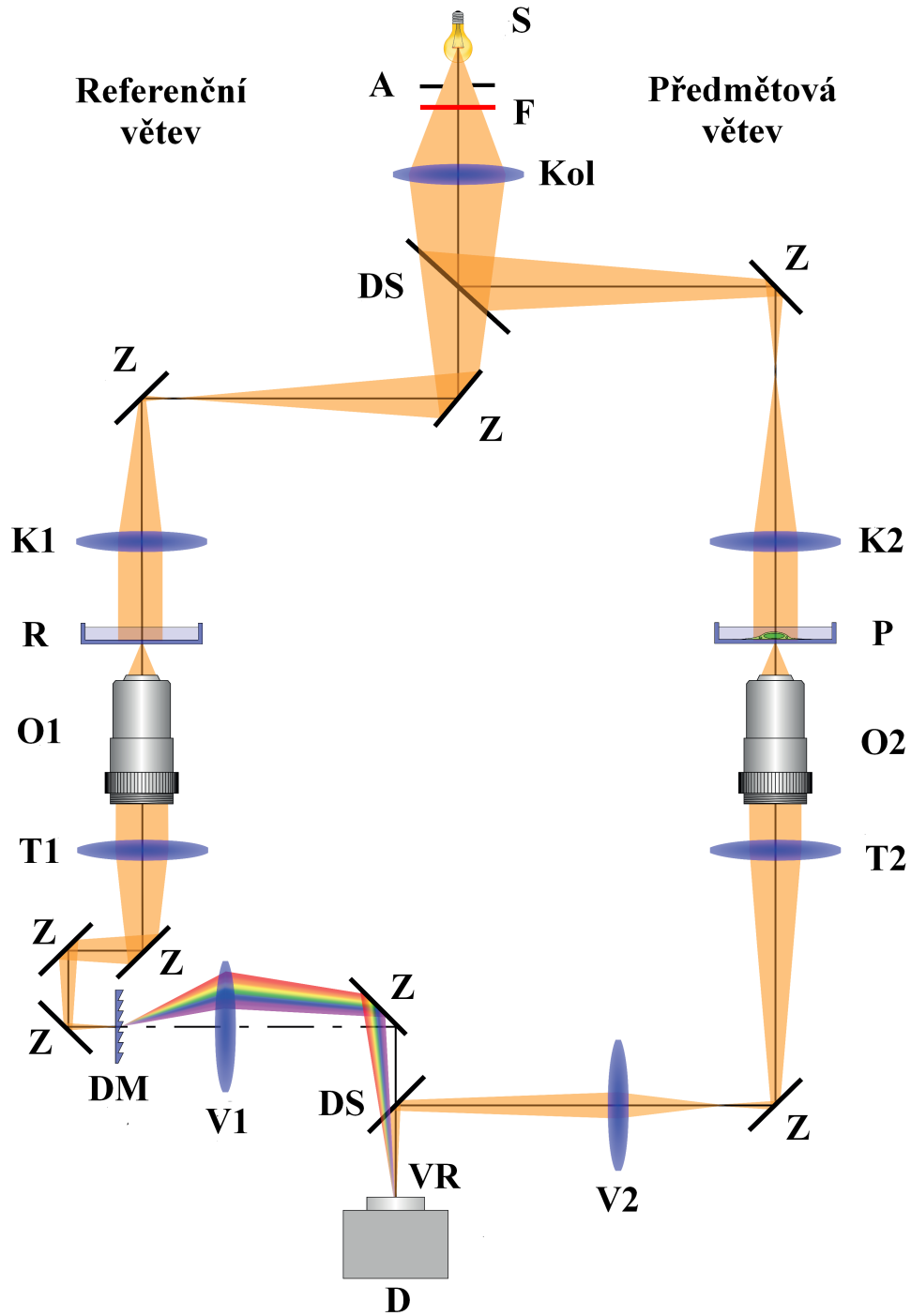
Obrázek 3.3: Fotografie multimodálního holografického mikroskopu v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v Brně.

3.2. Popis multimodálního holografického mikroskopu

MHM používá jako nekoherentní zdroj světla halogenovou lampu (S). Velikost světelného svazku je omezena aperturní clonou (A) a spektrum je filtrováno interferenčním filtrem (F). Kolektorová čočka (Kol) dále zobrazuje rovinu zdroje do zadních ohniskových rovin kondenzorů (K1, K2). Tento způsob osvětlení se nazývá Köhlerovo osvětlení. Jako dělič využívá mikroskop běžnou dělicí kostku (DS), která rozděljuje světelný svazek do dvou opticky ekvivalentních větví – předmětové a referenční. Obě větve obsahují stejné komponenty — kondenzory (K1, K2), objektivy (O1, O2), tubusové čočky (T1, T2), výstupní objektivy (V1, V2), zrcátka (Z) a dělicí kostky (DS). Do předmětové větve se vkládá vzorek (P) a do referenční větve se vkládá referenční objekt (R). Dále je v referenční větvi umístěna difrakční mřížka (DM) a v předmětové větvi je umístěné rovinné zrcátko (Z).

Ve výstupní rovině (VR) interferuje nultý (předmětová větev) a první (referenční větev) difrakční řád mřížky [12]. Vzniklá interferenční struktura (interferogram) je achromatická a prostorově invariantní a je zaznamenávána CCD čipem digitální kamery (D). Optické schéma mikroskopu je zobrazeno na obrázku 3.4.

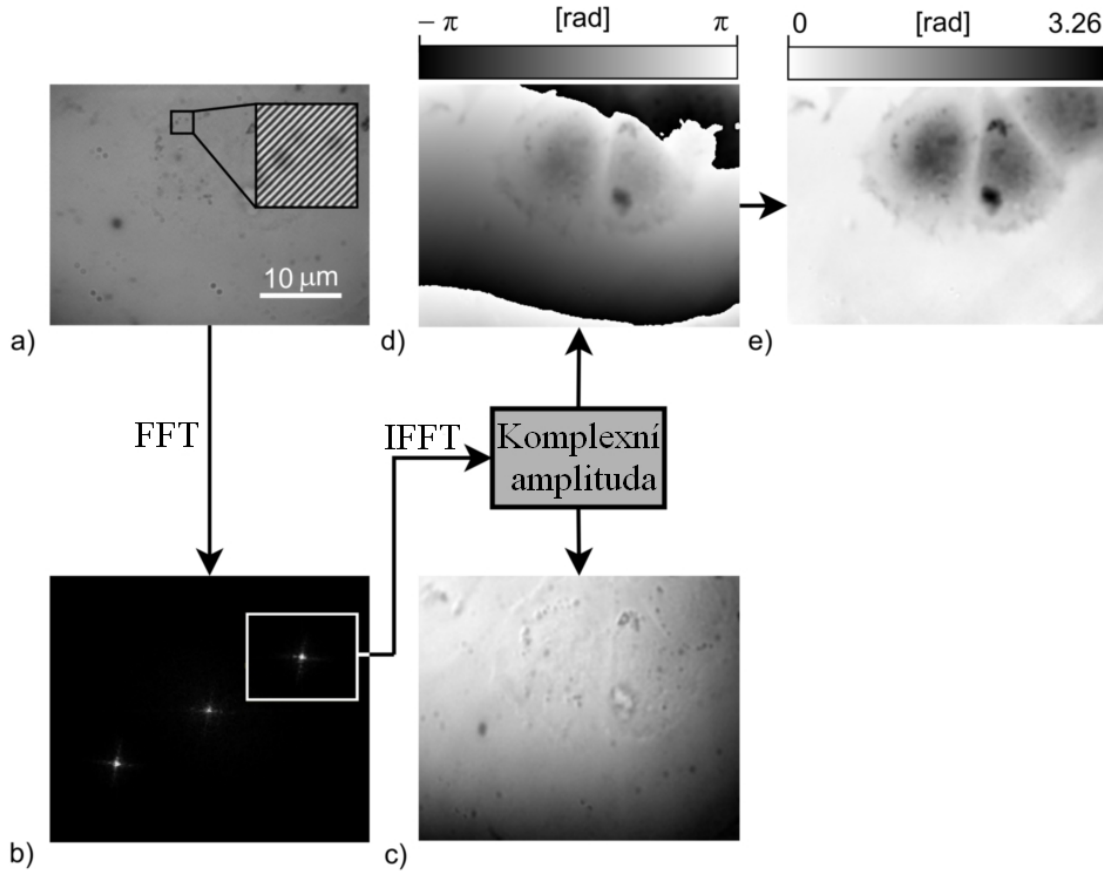
3. MULTIMODÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP



Obrázek 3.4: Optické schéma multimodálního holografického mikroskopu. S – zdroj světla, A – aperturní clona, F – filtr, Kol – kolektorová čočka, Z – zrcátko, K1,K2 – kondenzory, P – vzorek, R – referenční objekt, O1,O2 – objektivy, DM – difrakční mřížka, DS – dělič svazku, T1,T2 – tubusové čočky, V1,V2 – výstupní objektivy, VR – výstupní rovina, D – detektor. Převzato z článku [10].

3.3. Zpracování interferogramu

Zaznamenaný interferogram je přímo hologramem a obsahuje informaci o amplitudě a fázi objektové vlny, která je dále zpracována. K této rekonstrukci obrazu je používáno fourierovských metod, díky kterým je z hologramu vypočten obraz amplitudy, intenzity a nenavázané fáze (obrázek 3.5). Jelikož nenavázaná fáze je funkce periodická, objevují se v obraze skoky, které se dají odstranit přičtením nebo odečtením $2\pi n$, kde n je celé číslo. Takto upravený obraz se označuje jako obraz navázané fáze. Více o rekonstrukčním algoritmu a podmínkách je napsáno například v dizertační práci P. Kolmana [9], v diplomové práci H. Uhlířové [13] nebo dizertační práci T. Zikmunda [14].



Obrázek 3.5: Zpracování obrazu: a) hologram, b) spektrum prostorových frekvencí, c) obraz amplitudy, d) obraz fáze, e) obraz navázané fáze. Převzato z prezentace [4].

Fázový rozdíl světelných svazků procházejících referenční a předmětovou větví je přímo úměrný rozdílu jejich optických drah:

$$\Delta\Phi(x, y) = \Phi_p(x, y) - \Phi_r(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} OPD(x, y), \quad (3.1)$$

kde $\Delta\Phi$ je fázový rozdíl světelných svazků, Φ_r fáze světelného svazku procházejícího referenční větví, Φ_p fáze světelného svazku procházejícího předmětovou větví, λ je vlnová délka světla ze zdroje a OPD je rozdíl optických drah (*Optical Path Difference*). OPD je dán indexem lomu a tloušťkou vzorku. V ideálním případě je OPD dán pouze rozdílem indexů lomu vzorku n_{vz} a média n_m a je roven:

3. MULTIMODÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

$$\begin{aligned} OPD(x, y) &= n_m[h - t(x, y)] + n_{vz}(x, y)t(x, y) - n_m h \\ &= (n_{vz} - n_m)t(x, y) = \Delta n(x, y)t(x, y), \end{aligned} \quad (3.2)$$

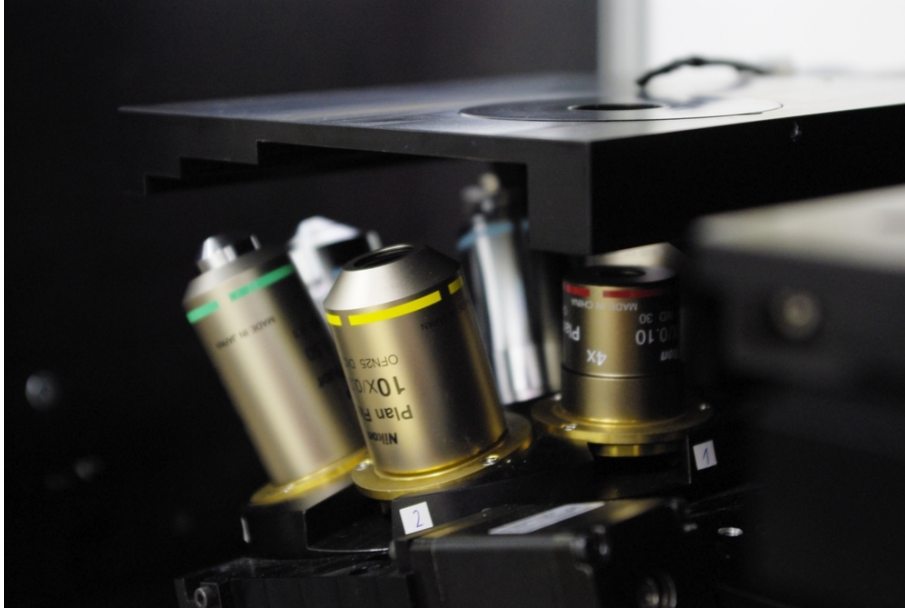
kde n_m index lomu média, n_{vz} index lomu vzorku, t tloušťka vzorku, h je výška komůrky a Δn je rozdíl indexů lomu.

Po dosazení výrazu (3.2) do rovnice (3.1) získáme [15]

$$\Delta\Phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n(x, y)t(x, y). \quad (3.3)$$

3.4. Spuštění a nastavení mikroskopu

Mikroskop se spouští velkým spínačem na hlavním boxu. Všechna měření na mikroskopu jsou řízena pomocí programu CCHM 2. V tomto programu se zapíná lampa, vybírají se objektivy (zvětšení: 4×, 10×, 20×, 40× a 60×)(obrázek 3.6), vybírají se filtry (maximální propustnost na vlnové délce: 515 nm, 547 nm, 580 nm, 620 nm, 650 nm a 676 nm) a nastavují se další potřebné parametry před zahájením snímání. Informační panel je zobrazen na obrázku 3.7. K experimentům této práce byl využíván mikroskop v transmisním módu s objektivem se zvětšením 10×, numerickou aperturou $NA = 0,3$, pracovní vzdáleností $WD = 16$ mm a filtrem s maximální propustností na vlnové délce 650 nm s pološířkou maxima 10 nm.

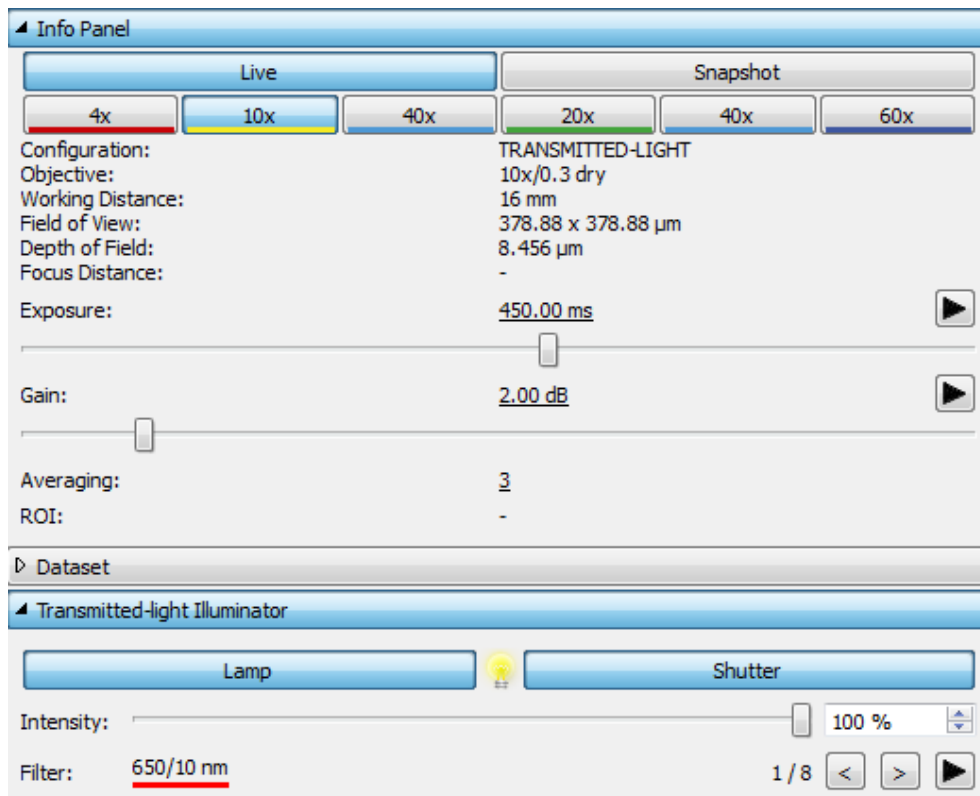


Obrázek 3.6: Objektivy na mikroskopu MHM.

Před zahájením experimentu je potřeba nejdříve najít rovinu vzorku pomocí absolutního ostření v předmětové větvi. Následně je zasunuta polní clona, která je v předmětové větvi doostřena manuálně pomocí velkého šroubu a v referenční větvi pomocí vložených sklíček. Sesazení obrazů polní clony (v předmětové a referenční větvi) je provedeno pomocí tlačítek posuvů na hlavním panelu (*Objective Piezo*). Polní clona je následně otevřena. V dalším kroku je potřeba docílit interference. Hledání interferenčních proužků je

3.4. SPUŠTĚNÍ A NASTAVENÍ MIKROSKOPU

automatické, stačí nastavit interval a krok hledání (*Service configuration* $\Rightarrow$ *Autoadjust*). Snímání sledujeme v jednotlivých oknech: *Hologram*, *Amplitude*, *Unwrapper phase*, *Wrapper phase*. Dále je nutné ještě nastavit expozici, zisk a průměrování snímků na hlavním panelu. Poté je nastaven interval snímání (např. 60 s, 120 s) a snímání lze zahájit pomocí červeného tlačítka *Rec*.



Obrázek 3.7: Informační panel programu CCHM.

4. Vliv vnějšího prostředí

Buňky jsou jako živé organismy schopny reagovat na vnější a vnitřní podněty. Tato schopnost je nazývána dráždivost. Jedním z projevů životaschopnosti buněk je jejich pohyb. Pohyb buněk lze rozdělit na Brownův pohyb (krátké pohyby do všech směrů), při kterém do sebe buňky naráží a obecně se řídí fyzikálními zákony, a na tzv. skákavý pohyb (pravidelný pohyb určitým směrem), jehož přesný mechanismus pohybu není znám [1]. V případě, kdy k pohybu dochází v reakci na chemické gradienty různých látek, je proces nazýván chemotaxe buněk.

Jednou z dalších hlavních funkcí a reakcí buněk na své okolí je příjem a výdej látek. Obecně dochází k fyzikálnímu jevu difúze, při kterém probíhá transport částic z míst vyšší koncentrace do míst s nižší koncentrací. Zvláštní případ difúze je osmóza, při které dochází pouze k jednosměrné difúzi přes polopropustnou membránu buňky.

V této kapitole je nejdříve pojednáno o difúzi a difúzním koeficientu, následně o chemotaxi buněk a poté o osmotických jevech v buňkách. Dále jsou zde představeny řešerše článků na tato témata.

4.1. Difúze

Základem osmotických i chemotaktických dějů je fyzikální jev zvaný difúze, popisující proces rozptylování látek v prostoru. Veškeré látky mají tendenci přecházet z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací. Difúze je proces, při kterém dochází k lokální změně koncentrace částic v látce. Typické pro všechny látky s pohybujícími se částicemi je to, že pokud přecházejí z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací, rozptylují se do prostoru tak, aby ve všech částech prostoru dosáhly stejné koncentrace. K difúzi dochází v různých skupenstvích, ve skupenství plynném, kapalném i pevném. Difúze je důležitým jevem ve velkém množství chemických, fyzikálních i biologických procesů [16].

Poprvé byla difúze popsána v roce 1855 Adolfem Fickem, který navázal na dřívější experimenty Thomase Grahama. Fickovy závěry vyústily ve dva fyzikální zákony [17]. První Fickův zákon vyjadřuje, jak velké množství částic a jak rychle částice difundují materiálem. Tento pohyb vyjadřuje tok $\mathbf{j}$:

$$\mathbf{j} = -D\nabla c, \quad (4.1)$$

kde c je koncentrace a D je difúzní koeficient vyjadřující rychlost difúze z míst s vyšší koncentrací do míst s nižší koncentrací. Znaménko mínus značí, že přesun látky probíhá proti gradientu koncentrace. Může nastat i opačný přesun, pak se tento jev nazývá obrácená difúze.

Druhý Fickův zákon je dosazením prvního zákona do rovnice kontinuity, která má tvar $\nabla \cdot \mathbf{j} = -\partial c / \partial t$ a vyjadřuje zákon zachování hmoty (částic) v daném objemu. Tato parciální diferenciální rovnice je nazývána difúzní rovnicí

$$\nabla \cdot (D\nabla c) = \frac{\partial c}{\partial t}. \quad (4.2)$$

4.2. CHEMOTAXE

V případě, kdy se částice pohybují v homogenním a izotropním prostředí, je difúzní koeficient konstantní ($D = \text{konst.}$) a lze ho vytknout před operátor divergence a získat rovnici

$$D\nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t}, \quad (4.3)$$

kde ∇^2 představuje Laplaceův operátor Δ .

Difúzní koeficient

Difúzní koeficient závisí na teplotě T , dynamické viskozitě kapaliny η a poloměru difundujících částic R podle Stokesovy–Einsteinovy rovnice ve tvaru

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (4.4)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$). Dynamická viskozita η je fyzikální veličina, která udává poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami proudící kapaliny [18].

$$\eta = \sigma \cdot \frac{\Delta x}{\Delta v} \quad (\text{Pa} \cdot \text{s}), \quad (4.5)$$

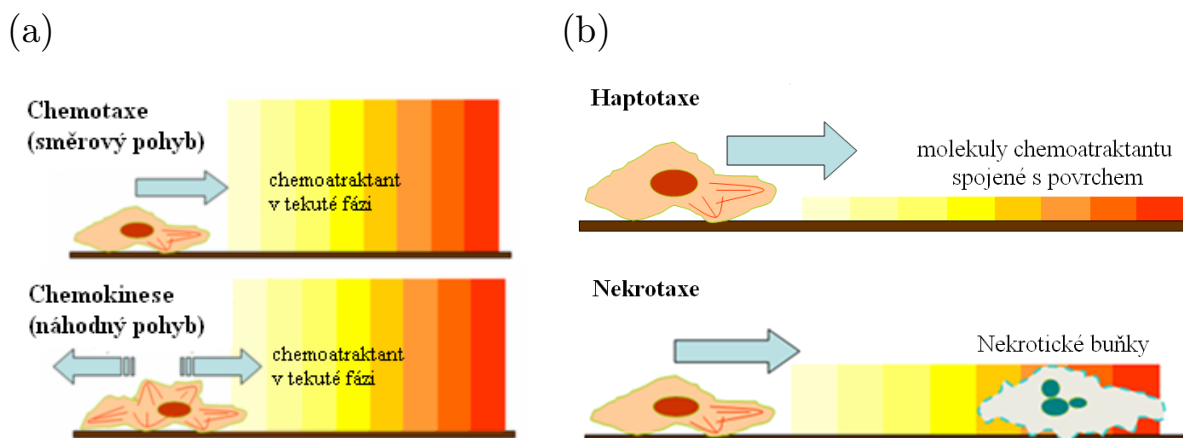
kde Δx je vzdálenost vrstev, Δv rozdíl rychlostí a σ tečné napětí.

4.2. Chemotaxe

Chemotaxe (z řeckého *chemeia* = chemie a *taxis* = řád, pochod) je pohyb organismu nebo buňky, který probíhá v určitém směru na základě chemického podnětu (chemického gradientu). Rozlišují se dva typy chemotaxe: pozitivní a negativní. Pokud dochází k pohybu ve směru k chemickému podnětu, jedná se o pozitivní chemotaxi a příslušná chemická látka se nazývá atraktant. V opačném případě jde o negativní chemotaxi a látka je nazývána repelent. Ačkoliv chemotaxe je nejčastěji studovanou formou migrace, existuje i několik dalších forem pohybu na buněčné úrovni – chemokinese, haptotaxe a nekrotaxe (obrázek 4.1). Chemokinese je směrově náhodný pohyb, reakce buněk na chemické látky, které způsobují změnu v jejich migračním chování (zvýšení/snížení rychlosti, změny amplitudy nebo frekvence pohybu, směr migrace). Haptotaxe je pohyb buněk na základě struktury povrchu či gradientu nerozpustné látky (molekuly chemoatraktantu jsou spojené s povrchem). Nekrotaxe je zvláštní typ chemotaxe, kdy jsou molekuly chemoatraktantu uvolněné z nekrotických nebo apoptotických buněk [19], [20].

4.2.1. Historie výzkumu chemotaxe

První poznatky o migraci buněk byly zaznamenány již v raných fázích vývoje mikroskopu. Avšak první studie a popis chemotaxe bakterií vznikly až v letech 1881 (T. W. Engelmann) a 1884 (W. F. Pfeffer). V roce 1906 proběhly studie pohybu nálevníků (H. S. Jennings). Další studie chemotaxe vyústily v roce 1908 v objev fagocytózy (I. Metchnikoff) [20].



Obrázek 4.1: Znázornění a) chemotaxe a chemokinese b) haptotaxe a nekrotaxe. Převzato z [20] a upraveno.

Teprve v 30. letech 20. stol. byl přijat význam chemotaxe v oblasti biologie. Další pokroky ve výzkumu chemotaxe nastaly až v letech 1950 až 1970 v období tzv. revoluce moderní buněčné biologie. Významný zlom v chápání celého procesu chemotaxe představoval v roce 1973 výzkum signálních drah řídících chemotaxi bakterií *E. Coli* (J. Adler, H. C. Berg). Tyto historické milníky jsou zobrazeny na obrázku 4.2 [20].

V roce 2006 získal Dr. Dennis Bray evropskou cenu vědy Microsoft Award za svou práci na téma chemotaxe *E. Coli* [21]. I tato cena dokazuje, že chemotaxe buněk je nadále velmi zajímavá a studovaná oblast.



Obrázek 4.2: Historické milníky ve výzkumu chemotaxe. Převzato z [20].

4.2.2. Význam chemotaxe

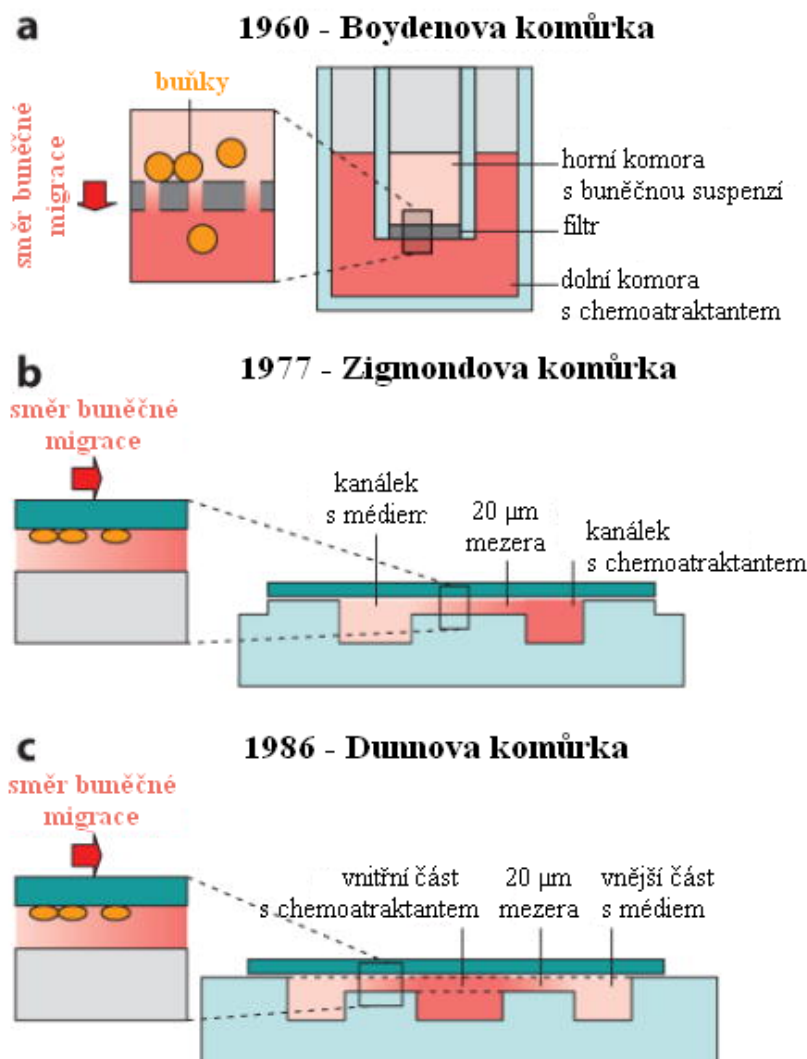
Téměř každá buňka v lidském těle se v průběhu svého života pohybuje. Migrace embryonálních buněk pomáhá během vývoje definovat umístění a tvar nových orgánů. Pohyb bílých krvinek je rozhodující pro vytváření účinných bariér proti šíření nákazy a hojení ran vyžaduje, aby se nové buňky dostaly na místo poškozené tkáně. V případě rakoviny může blokování migrace nádorových buněk zabránit vzniku metastáz. Pohyb buněk je zásadní proces ve všech mnohobuněčných organismech a ve většině případů je směrový. A proto je

4.2. CHEMOTAXE

chemotaxe buněk cennou součástí mnoha výzkumů z oblasti genetiky, biochemie, buněčné fyziologie a patologie. Ve studiu chemotaxe je kladen důraz na směrovou migraci bakterií, neutrofilů a modelových buněk *Dictyostelium discoideum* [22].

4.2.3. Chemotaxe buněk v mikroskopii

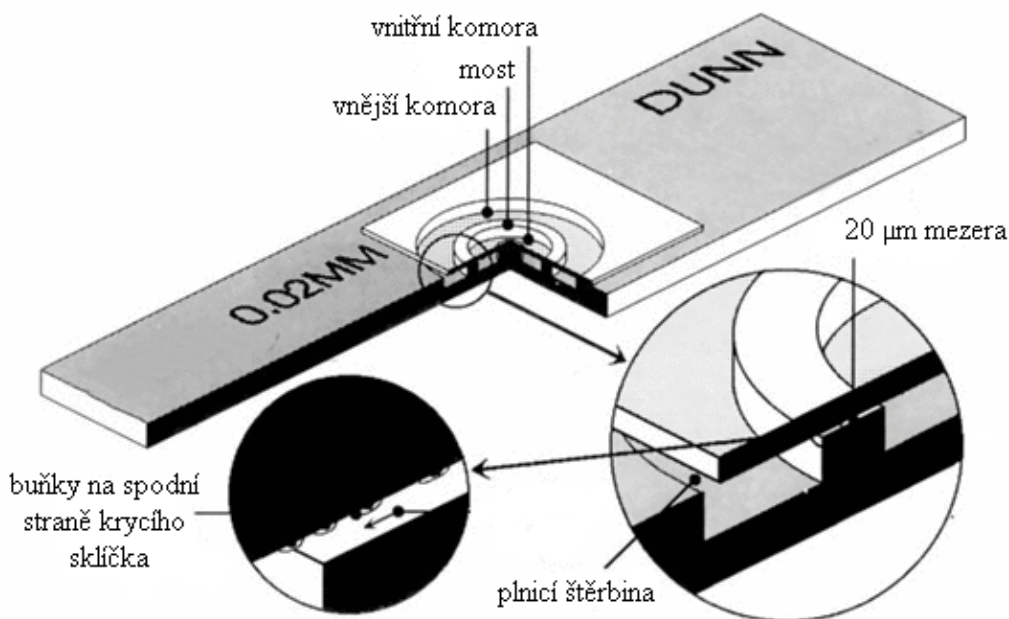
V článku D. Irimia [22] je zhodnocen současný stav techniky a jsou vyvozené směry pro aktuální vývoj technologií pro studium chemotaxe. Je zde popsána důležitost vzniku nových nástrojů, které by usnadňovaly experimenty, během kterých by bylo možné buněčné mikroprostředí přesně kontrolovat v čase a prostoru. Většina buněk v těle má schopnost měnit svoje umístění v průběhu fyziologických nebo patologických událostí, jako je zánět, hojení ran nebo například rakovina. Pokud buněčná migrace směřuje k chemickým látkám, je proces známý jako chemotaxe. Ve výzkumu chemotaxe je kladen důraz na směrovou migraci bakterií, neutrofilů a *Dictyostelium discoideum*. Dále je v článku konkrétně pojednáno i o několika nástrojích, které se nyní používají ke studiu chemotaxe jako je Boydenova, Zigmondova či Dunnova komůrka (obrázek 4.3).



Obrázek 4.3: Tradiční nástroje sloužící k pozorování chemotaxe — Boydenova, Zigmondova a Dunnova komůrka. Převzato z článku [22] a upraveno.

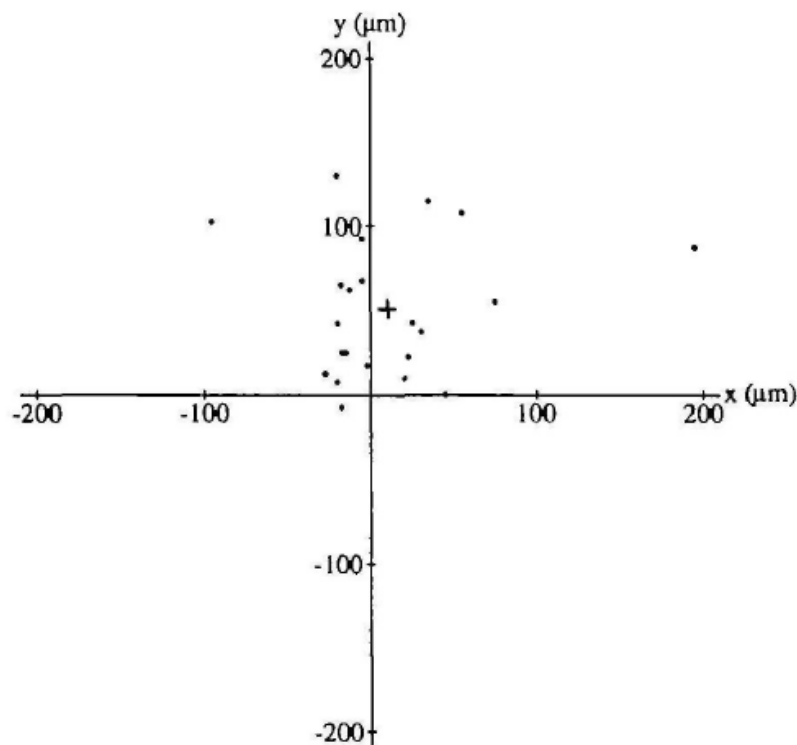
V dalším článku [23], který vznikl ve spolupráci Masarykova onkologického ústavu a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, je pojednáno o chemotaxi a celkově o migraci buněk jako o důležitém faktoru při zkoumání metastázuujících nádorových buněk. Jsou zde popsány jak *in vitro*, tak i *in vivo* modelové systémy pro studium migrace, včetně používaných Boydenových a Dunnových komůrek sloužících k pozorování chemotaxe. Důraz je také kladen na videomikroskopii, která umožňuje vizualizaci a kvantifikaci zejména u nádorových buněk. Pomocí videomikroskopie lze například vyhodnocovat vliv inhibitorů na chemotaxi. Inhibitory jsou považovány za terapeutika zamezující metastázování [24].

V článku [25] z roku 1991 od D. Zichy a G. A. Dunna byla představena nová komůrka *direct-viewing chemotaxis chamber* k pozorování chemotaxe. Řez touto komůrkou je zobrazen na obrázku 4.4. Její návrh navázal na principy Zigmondovy komůrky. Komůrka byla určena především ke studiu chemotaxe fibroplastů s využitím interferometrické mikroskopie a hlavním kritériem bylo vylepšit optické vlastnosti (ve srovnání se Zigmondovou komůrkou). Jako základní experiment s použitím této komůrky je v článku uvedena chemotaxe neutrofilů. Na obrázku 4.5 je zobrazen vektorový rozptylový diagram posunutí buněk. Každý bod v diagramu představuje konečnou polohu buňky po uražení dráhy po 60 minutách pozorování. Průměrné posunutí je označeno symbolem +.



Obrázek 4.4: Dunnova komůrka. Převzato z článku [25] a upraveno.

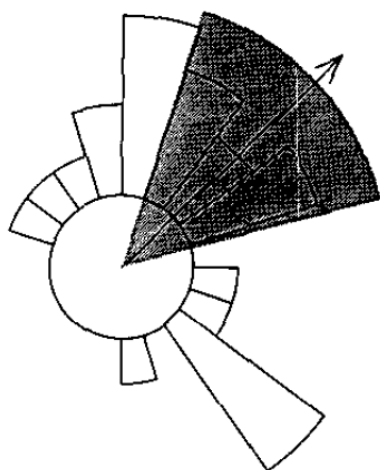
4.2. CHEMOTAXE



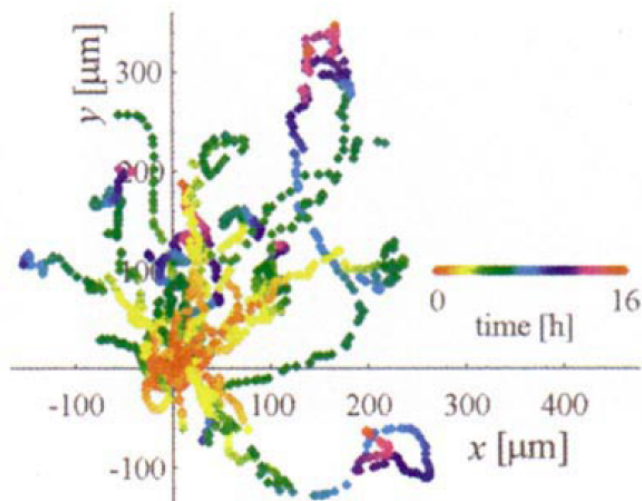
Obrázek 4.5: Vektorový rozptylový diagram posunutí. Převzato a z článku [25].

V roce 1995 představuje D. Zicha a G. A. Dunn v krátkém článku [26] další experimenty — přímá pozorování chemotaxe, ke kterým byla použita dříve navržená komůrka *direct-viewing chemotaxis chamber*. K experimentům byly použity pomalu se pohybující rakovinotvorné buňky T15 (RPSL4T15) a K2 (LW13K2). Na obrázku 4.6(a) je ukázán kruhový histogram, který zobrazuje preferovaný směr pohybu buněk a na obrázku 4.6(b) jsou ukázány trajektorie buněk T15 zanesené do grafu.

(a)



(b)



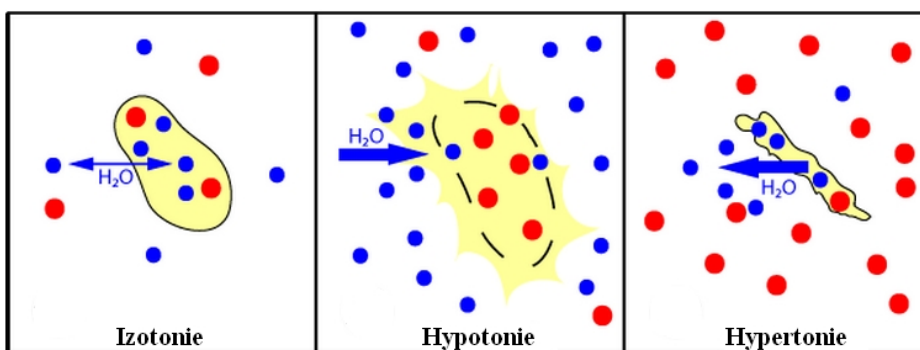
Obrázek 4.6: (a) Kruhový histogram zobrazující směr pohybu buněk T15, (b) trajektorie buněk T15. Převzato z článku [26].

4.3. Osmotické jevy v buňkách

Osmotické jevy v buňkách jsou založeny na polopropustnosti membrán. Při osmóze dochází k vyrovnání koncentrací dvou roztoků přes polopropustnou membránu. Rozdíly v koncentracích se vyrovnávají pouze přesunem vody směrem do místa s vyšší koncentrací, což vede k vyrovnání koncentrací na obou stranách membrány. Tok vody přes buněčnou membránu způsobuje bobtnání nebo smrštění buňky. Roztok, který obklopuje buňku, může být vůči ní:

- izotonický,
- hypotonický,
- hypertonický.

V izotonickém prostředí (tzv. izotonie), kdy je koncentrace vně a uvnitř buňky stejná, nedochází k pohybu vody do prostředí ani dovnitř buňky, a tím nejsou narušovány její životní pochody. V hypotonickém prostředí (tzv. hypotonie) je koncentrace vně buňky nižší než uvnitř a voda proniká přes polopropustnou membránu dovnitř buňky. Buňka zvětšuje objem a může dojít až k prasknutí plazmatické membrány. Tento jev je nazýván plazmoptýza. V případě hypertonického prostředí (tzv. hypertonie) je koncentrace vně buňky vyšší než uvnitř a dochází k opačnému jevu — voda prochází přes membránu z buňky ven. Buňka se smršťuje a může dojít až k zániku buňky. U živočišných buněk se smrštění celé buňky včetně membrány říká plazmorýza. U rostlinných buněk je tento jev nazýván plazmolýza. V případě, kdy je buňka zavedena zpět do hypotonického roztoku, je schopna se vrátit do původního stavu. Tento jev se nazývá deplazmolýza. Osmotické jevy v buňce (izotonie, hypertonie a hypotonie) jsou znázorněny na obrázku 4.7.



Obrázek 4.7: Osmotické jevy v buňce (izotonie, hypotonie, hypertonie). Převzato z [27] a upraveno.

Difúze vody přes polopropustnou membránu vytváří tlak, který se nazývá osmotický tlak. Díky osmotickému tlaku nedochází k samovolnému pronikání molekul rozpouštědla do koncentrovanějšího roztoku. Osmotický tlak je závislý na teplotě a koncentraci roztoku, je označován písmenem π a lze ho vypočítat pomocí vzorce:

$$\pi = \Delta cRT = (c_b - c_a)RT, \quad (4.6)$$

kde Δc je rozdíl koncentrací roztoku, c_a a c_b jsou koncentrace roztoků na každé ze stran membrány, R je molární plynová konstanta a T je absolutní teplota [28].

4.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH

4.3.1. Význam osmózy

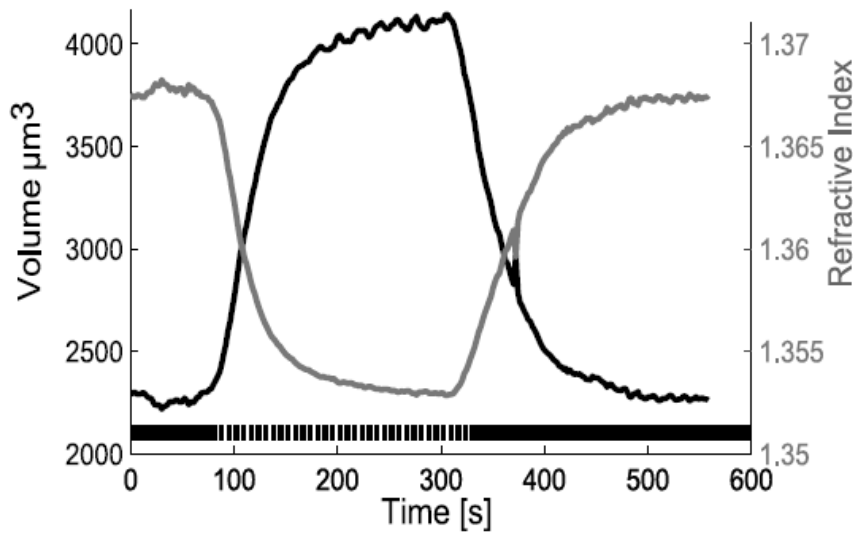
Role osmózy je dvojí — jednak pomáhá udržovat stabilní vnitřní prostředí v živém organismu tím, že drží tlak intercelulárních a intracelulárních tekutin v rovnováze, a také umožňuje vstřebávání živin a vyhoštění odpadů z různých tělesných orgánů na buněčné úrovni. Bez osmózy by nebylo možné, aby naše těla vyloučila toxické odpady a udržela krevní oběh bez nečistot. Také pouze díky osmóze je možné, že kořeny rostlin jsou schopny absorbovat vlhkost z půdy a přepravovat vodu směrem vzhůru k listům, kde je výživa vytvořena prostřednictvím fotosyntézy [27].

4.3.2. Osmóza buněk v mikroskopii

Podle D. Bosse [29] vodní tok přes buněčnou membránu způsobuje bobtnání nebo smrštění buňky, resp. změny v koncentracích intracelulárních komponent, zejména proteinů, což vede ke změně indexu lomu buňky. Zpoždění fáze způsobené buňkou je dáno:

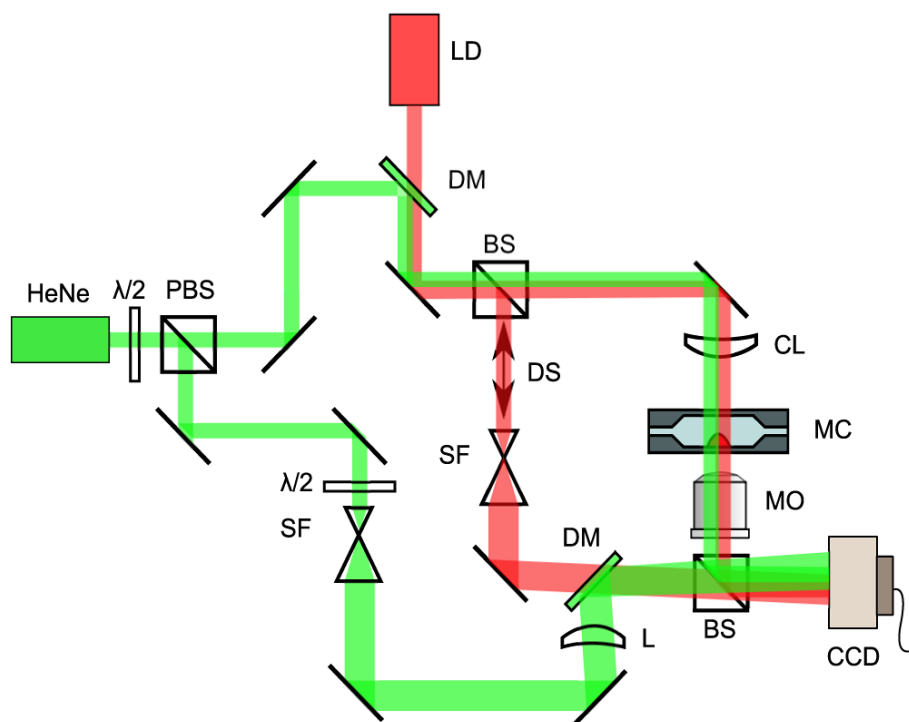
$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} d(n_b - n_m) \propto d\Delta n = OPD, \quad (4.7)$$

kde λ je vlnová délka zdroje, d tloušťka buňky, n_b index lomu buňky, n_m index lomu média a OPD je rozdíl optických drah. V průběhu toku vody přes buněčnou membránu se zvyšuje pouze jeden parametr (např. d), který je doprovázen snížením druhého parametru (např. n) a opačně (viz obrázek 4.8). Ze změny fáze lze také vypočítat další parametry buňky, jako je například objem buňky či ekvivalent suché hmoty buňky. V tomto článku bylo k experimentům (měření propustnosti buněčné membrány, změny objemu a indexu lomu buňky během osmotického děje etc.) využíváno tzv. dual-wavelength DHM. Jedná se o 2 interferometry Machova-Zehnderova typu využívající 2 zdroje světla, a to He-Ne laser ($\lambda_1 = 543$ nm) a laserovou diodu ($\lambda_2 = 682$ nm). DHM je zobrazen na obrázku 4.9.



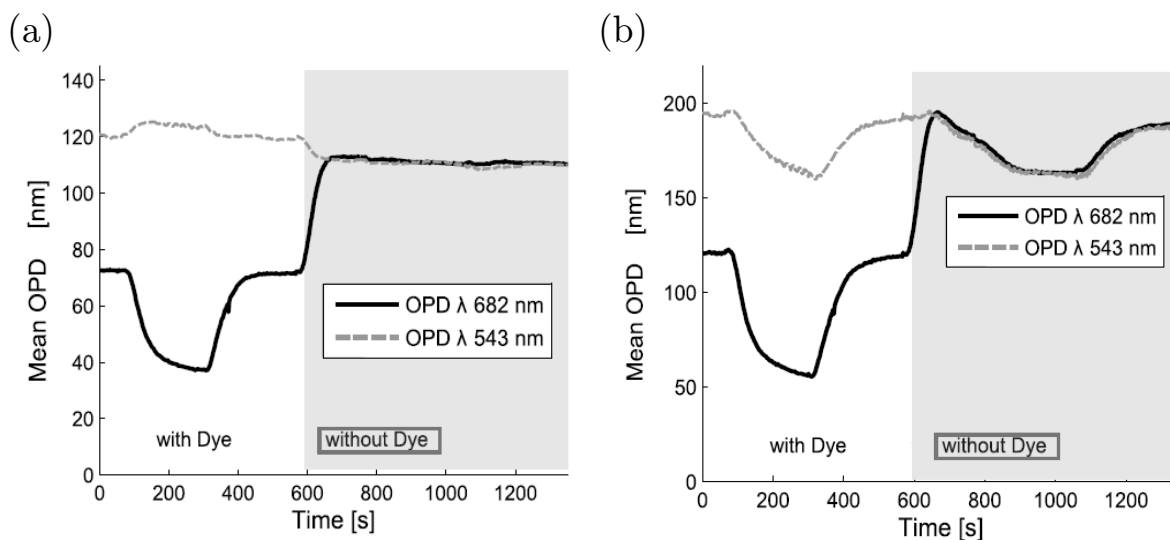
Obrázek 4.8: Buněčný objem a index lomu během hypotonického osmotického děje. Převzato z článku [29].

Podle D. Bosse také volba média a jeho modifikace může výrazně ovlivnit index lomu, a tím i OPD , fázový signál, resp. hodnoty suché hmoty. V tomto článku je popisován



Obrázek 4.9: Optické schéma dual-wavelength DHM. Převzato z článku [29].

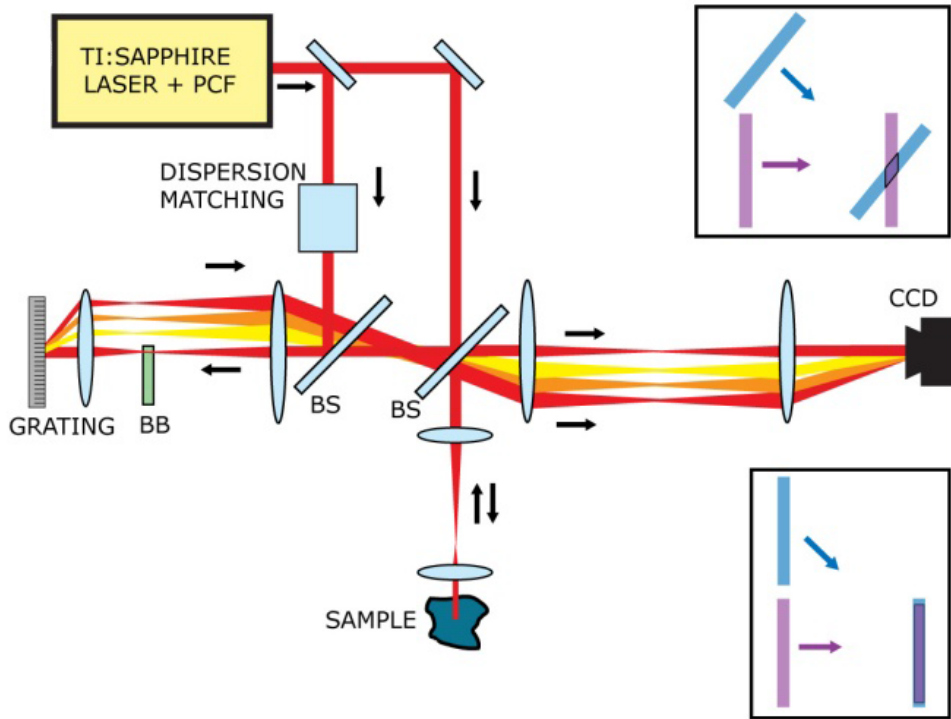
hypotonický děj, který byl jednou pozorován s buňkami HEK293 v médiu se zeleným barvivem FCF a podruhé s médiem bez barviva. V případě, kdy analýza probíhala na celé ploše buňky, byl skok v hodnotách *OPD* naměřen pouze v případě použití barviva (obrázek 4.10(a)). Dále byl výpočet prováděn v oblasti okolo jádra, skok v hodnotách byl poté naměřen i bez použití barviva (obrázek 4.10(b)).



Obrázek 4.10: Signál *OPD* během hypotonického osmotického děje v přítomnosti a nepřítomnosti zeleného FCF barviva v roztoku. Výpočet hodnot *OPD* probíhal v oblasti (a) celé buňky, (b) okolo jádra. Převzato z článku [29].

4.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH

V článcích [30] a [31] od S. Witta zkombinovali výhody (krátká koherenční délka a mimoosové uspořádání) technik *Optical Coherence Tomography* [32] a *Digital Holographic Microscopy* [33]. Vytvořili tak jeden DHM systém (*Short-Coherence Off-Axis Holographic Microscopy*), který umožňuje kvantitativní fázové zobrazení s vysokým rozlišením (obrázek 4.11). Tato technika umožňuje zaznamenávat zpoždění fáze způsobené průchodem buňkou v průběhu osmotického děje. Tím jsou zaznamenány i dynamické změny, například změny plochy či objemu buňky. V hypoosmotickém ději je pokles indexu lomu větší než geometrický nárůst výšky, což způsobuje úbytek fázového signálu. Změna plochy buňky HEK293, indexu lomu a fáze v průběhu hypoosmotického děje je zobrazena na obrázku 4.12.

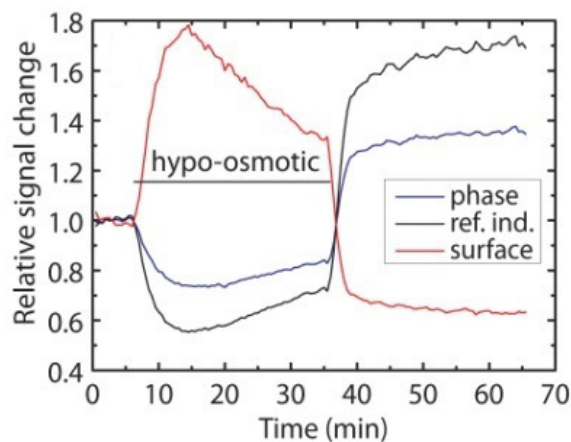


Obrázek 4.11: Optické schéma *Short-Coherence Off-Axis Holographic Microscopy*. Převzato z článku [30].

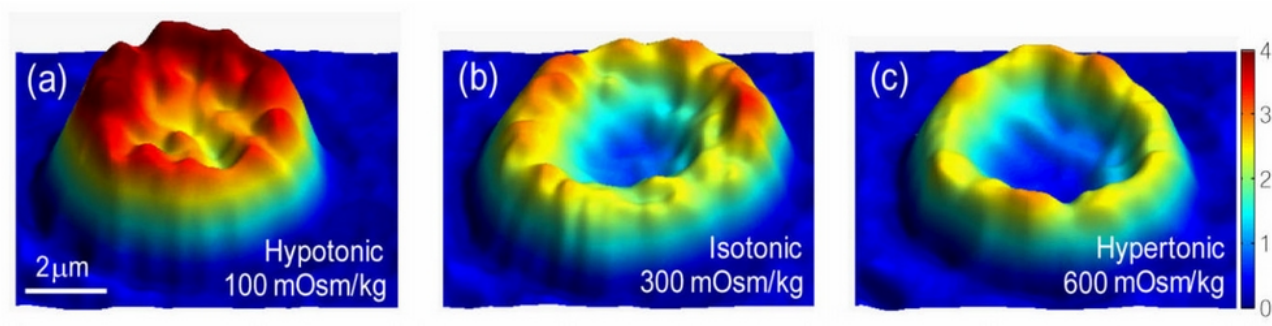
V článku [34] od Y. Parka ve spolupráci s G. Popescuem je popisován hypertonický, izotonický i hypotonický osmotický děj v červených krvinkách. V hypotonickém ději buňky bobtnají, zatímco v hypertonickém ději se buňky smršťují. Pro měření bylo použito techniky *Diffraction Phase Microscopy*. Jedná se o techniku, která využívá Machův-Zehnderův interferometr spojený s několika atributy současných QPI (*Quantitative Phase Imaging*) metod. Umožňuje zobrazit buněčné struktury a buněčnou dynamiku (tloušťka buňky, suchá hmota buňky etc.). Tloušťkové profily červených krvinek v průběhu hypotonického, izotonického a hypertonického osmotického děje jsou zobrazeny na obrázku 4.13. Hodnoty buněčné tloušťky jsou získány ze změn v buněčné dráze:

$$h(x, y, t) = \frac{2\pi}{\lambda} \delta n \cdot \varphi(x, y, t) = \frac{2\pi}{\lambda} (n_b - n_p) \cdot \varphi(x, y, t), \quad (4.8)$$

kde λ je vlnová délka zdroje, $\varphi(x, y, t)$ je fáze, n_b index lomu buňky, n_p index lomu prostředí.



Obrázek 4.12: Změna plochy, indexu lomu a fáze v buňce HEK293 v průběhu hypoosmotického děje. Převzato z článku [30].



Obrázek 4.13: Tloušťkové profily červených krvinek v průběhu hypotonického, izotonického a hypertonického osmotického děje. Převzato z článku [34].

Shrnutí

Z článků vyplývá, že autoři se shodují na obecné teorii osmózy. Ve všech člancích je popsán rozdíl mezi hypertonickým, hypotonickým a izotonickým dějem. Každý z nich ovšem pro svůj experiment vybral jinou techniku pozorování (DHM, DPM) a jiné vzorky (buňky HEK293, červené krvinky). Nicméně určitě lze potvrdit, že při osmotických dějích záleží na okolním prostředí, volbě média a přítomnosti barviva. Dále záleží na prahování vybraného okolí buněk a na vybrané hloubce ostrosti (fokusu).

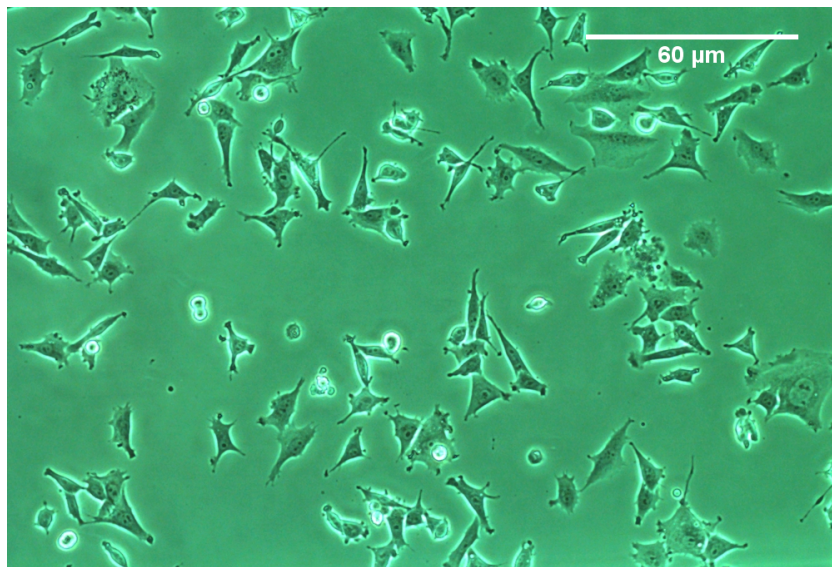
5. Experimentální část

V následující kapitole je v první sekci popsána příprava experimentů (sekce 5.1), kde je nejdříve pojednáno o kultivaci buněk (část 5.1.1) a následně o pozorovacích komůrkách (část 5.1.2), včetně jejich přípravy k experimentům. V dalších sekcích jsou popsány samotné experimenty — chemotaxe (sekce 5.2) a osmóza buněk (sekce 5.3). V těchto sekcích je také popsáno zpracování a vyhodnocení naměřených dat a nakonec jsou představeny výsledky jednotlivých měření. V případě chemotaxe buněk bylo cílem pozorovat pohyb buněk směrem k chemoatraktantu. Celkem byla provedena tři dlouhodobá měření. V případě osmózy bylo cílem pozorovat hypotonický děj a celkem bylo provedeno pět měření. Jako vzorky byly použity buňky K2. Všechna měření probíhala na multimodálním holografickém mikroskopu MHM. Tento mikroskop umožňuje díky termoregulačnímu boxu udržovat teplotu okolo 37 °C, která je ideální pro buňky.

5.1. Příprava experimentů

5.1.1. Kultivace buněk

Jako vzorky ke všem experimentům byly použity buňky K2 (obrázek 5.1). Jedná se o nádorové nemetastazující embryonální fibroplasty inbredního potkana Louis Lewis. Jejich plné označení je LW13K2 [35]. Kultivace těchto buněk probíhala přímo v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v Brně.



Obrázek 5.1: Buňky K2 zobrazené v mikroskopu s fázovým kontrastem. Zvětšení 10×.

Buňky K2 byly pěstovány v kultivačním médiu uchycené na povrch kultivační lahvičky v inkubátoru *Sanyo MCO-18AIC* při ideální teplotě pro jejich růst 37 °C s 3,5% koncentrací CO₂. Ke kultivaci buněk bylo použito médium M1H, které bylo obohaceno o fetální telecí sérum (FTS), které slouží jako živiny pro buňky. Celkové složení média M1H je možné nalézt například v diplomové práci H. Uhlířové [13]. V momentě, kdy buňky vytvořily konfluentní porost, bylo potřeba je oddělit od povrchu — provést tzv. trypsinizaci. Popis tohoto procesu je detailně popsán v bakalářské práci J. Bartoníčka

[36]. Po provedení trypsinizace byly buňky přepočítány v Bürkerově komůrce (obrázek 5.2) v mikroskopu s fázovým kontrastem [37]. Pro experimenty se obvykle používá okolo 15 000 buněk. Veškerá manipulace s buňkami probíhala ve flow-boxu *MSC Advantage*, ve kterém bylo díky proudění vzduchu zabráněno vzniku případné kontaminace [15].



Obrázek 5.2: Bürkerova komůrka.

5.1.2. Pozorovací komůrky

K pozorování chemotaxe buněk i osmotických jevů v buňce byly vybrány komůrky μ -Slide Chemotaxis 2D a μ -Slide I Luer od firmy Ibidi. Oba typy komůrek umožňují pozorovat pohyb buněk a jejich celkovou dynamiku v multimodálním holografickém mikroskopu.

μ -Slide Chemotaxis 2D



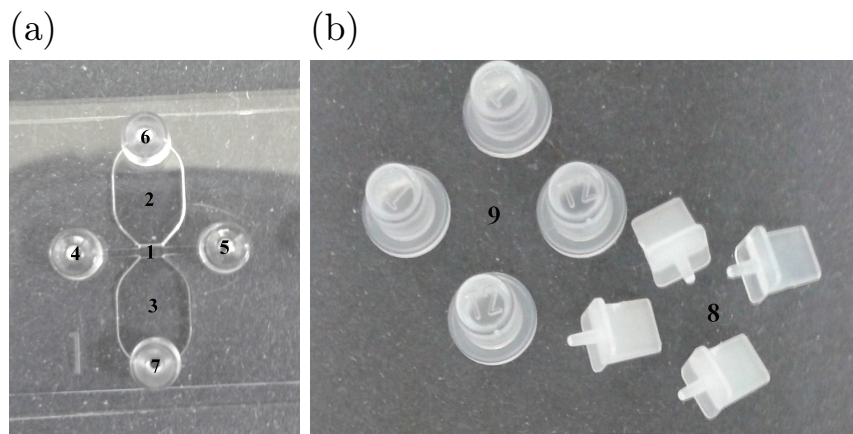
Obrázek 5.3: Komůrka μ -Slide Chemotaxis 2D [38].

Jeden μ -slide obsahuje tři komůrky (obrázek 5.3), které umožňují současné pozorování až tří experimentů chemotaxe. Každá komůrka (obrázek 5.4(a)) se skládá ze sedmi částí: 1 – pozorovací část ($2000 \times 1000 \mu\text{m}^2$); 2, 3 – rezervoár (objem 40 μl); 4, 5 – otvor sloužící k naplnění tunýlku; 6, 7 – otvor sloužící k naplnění rezervoáru. μ -Slide obsahuje také několik kloboučků a zátek (8, 9) potřebných k uzavření otvorů (obrázek 5.4(b)).

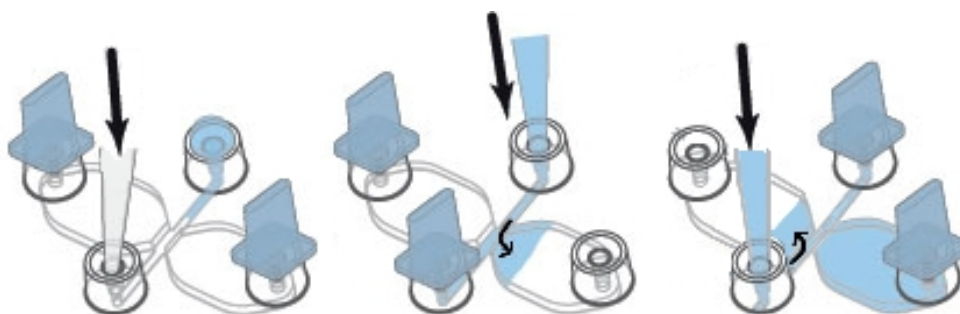
Princip plnění

Princip plnění jednotlivých částí komůrky je znázorněn na následujících snímcích (obrázek 5.5). V případě plnění pozorovací části jsou zátkami uzavřeny otvory 6 a 7. Při plnění rezervoáru 3 (resp. 2) jsou uzavřeny otvory 4 a 6 (resp. 5 a 7).

5.1. PŘÍPRAVA EXPERIMENTŮ



Obrázek 5.4: (a) Komůrka a její jednotlivé části: 1 – pozorovací část; 2, 3 – rezervoár; 4, 5 – otvor sloužící k naplnění pozorovací části; 6, 7 – otvor sloužící k naplnění rezervoáru, (b) 8 – zátka a 9 – klobouček.



Obrázek 5.5: Znázornění plnění jednotlivých částí komůrky [38].

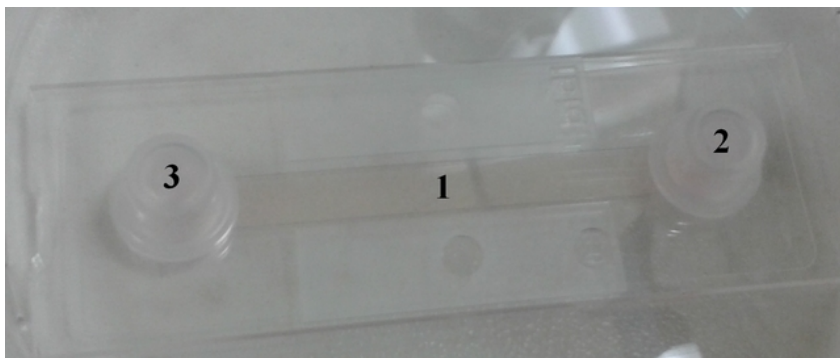
μ-Slide I Luer



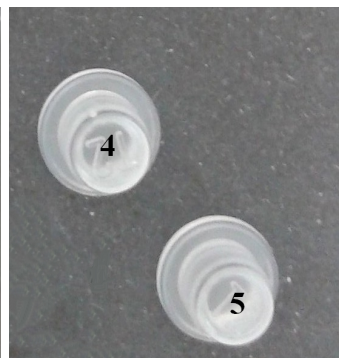
Obrázek 5.6: Komůrka μ-Slide I Luer. Převzato z [38].

Komůrka μ-Slide I Luer (obrázek 5.6) se skládá ze tří částí: 1 – rezervoár o délce 50 mm a objemu 200 μl ; 2, 3 – plnicí otvory (obrázek 5.7(a)) a 4, 5 – kloboučky, sloužící k uzavření otvorů (obrázek 5.7(b)).

(a)



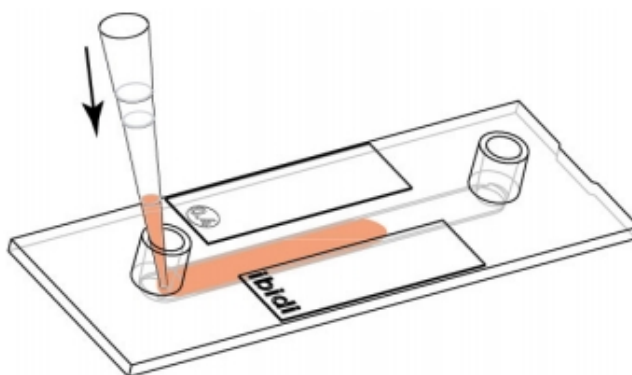
(b)



Obrázek 5.7: (a) Komůrka a její jednotlivé části: 1 – rezervoár; 2, 3 – plnicí otvory, (b) 4, 5 – kloboučky.

Princip plnění

Princip plnění je znázorněn na obrázku 5.8. Jedním z otvorů (část komůrky 2 nebo 3) probíhá jak vkládání buněčné suspenze s médiem M1H, tak později doplnění fetálního telecího séra FTS.



Obrázek 5.8: Znázornění plnění komůrky [38].

5.2. Chemotaxe buněk

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat a zaznamenávat pohyb buněk směrem k chemoatraktantu, tedy chemotaxi buněk). Pro pozorování chemotaxe byly použity komůrky μ -Slide Chemotaxis 2D (viz část 5.1.2), do kterých byly nasazeny buňky v médiu M1H. Jako chemoatraktant bylo ve všech měřeních použito fetální telecí sérum FTS, které bylo vloženo do jednoho z otvorů komůrky. Toto sérum obsahuje mimo jiné i živiny pro buňky a v ideálním případě by se měly buňky pohybovat právě směrem za živinami. Celkem byla provedena tři dlouhodobá měření. První snímání trvalo 16 hodin, druhé 18 a třetí 12 hodin. U prvních dvou byl interval snímání nastaven na 120 s a u třetího na 64 s. U všech měření byl zaznamenáván pohyb buněk a tzv. trasování bylo provedeno v programu ImageJ. Ze získaných hodnot byla dále vyhodnocena celková dráha buňky, Euklidova vzdálenost, celková rychlost pohybu a směrovost pohybu buněk. Ve všech měřeních

5.2. CHEMOTAXE BUNĚK

byl použit objektiv se zvětšením $10\times$ a numerickou aperturou $NA=0,3$. Dále byl použit filtr s maximální propustností na vlnové délce $\lambda = 650$ nm (tabulka 5.1).

Tabulka 5.1: Tabulka parametrů při pozorování chemotaxe.

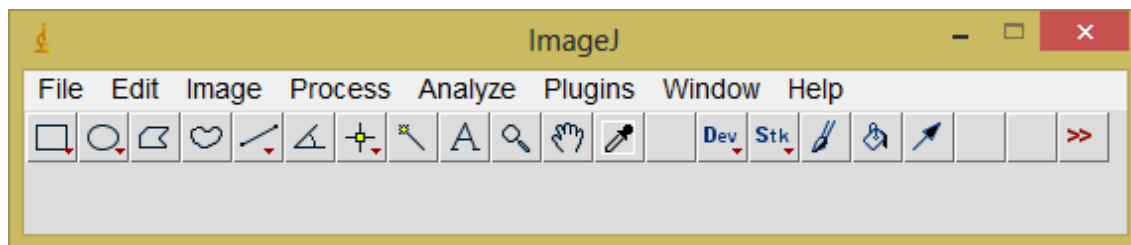
Objektiv	zvětšení $10\times$
	numerická apertura $NA=0,3$
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650$ nm
	pološířka maxima 10 nm

5.2.1. Analýza dat — trasování buněk

Trasování (sledování) buněk je způsob, jak jejich pohyb zaznamenávat a kvalifikovat. Trasování lze provádět ručně pomocí Tracking pluginu v programu ImageJ nebo pomocí speciálního softwaru, jakým je například WimTaxis [39]. Další možností je odprahování buněk a zaznamenávání souřadnic těžiště buňky. Tento způsob lze provést také v programu ImageJ.

ImageJ

ImageJ (obrázek 5.9) je volně dostupný program vyvinutý společností National Institutes of Health určený pro zpracování a analýzu obrazu. Dokáže pracovat s mnoha obrazovými formáty — například TIFF, GIF, JPEG, BMP, a RAW. Tento program umožňuje počítat plošné statistiky v definovaném výběru. Umožňuje měřit vzdálenosti a úhly a dokáže vytvořit histogramy. Podporuje standardní funkce zpracování obrazu, jako jsou logické a aritmetické operace mezi obrazy, manipulace s kontrastem, konvoluce, ostření, vyhlazování, detekce hran a další. Program podporuje také zobrazení většího počtu oken současně. ImageJ umí provádět geometrické transformace obrazu, jako jsou změny měřítka, rotace nebo překlopení. Více je k nalezení v [40].



Obrázek 5.9: Panel nástrojů programu ImageJ.

Odprahování buňky a získání souřadnice jejího těžiště

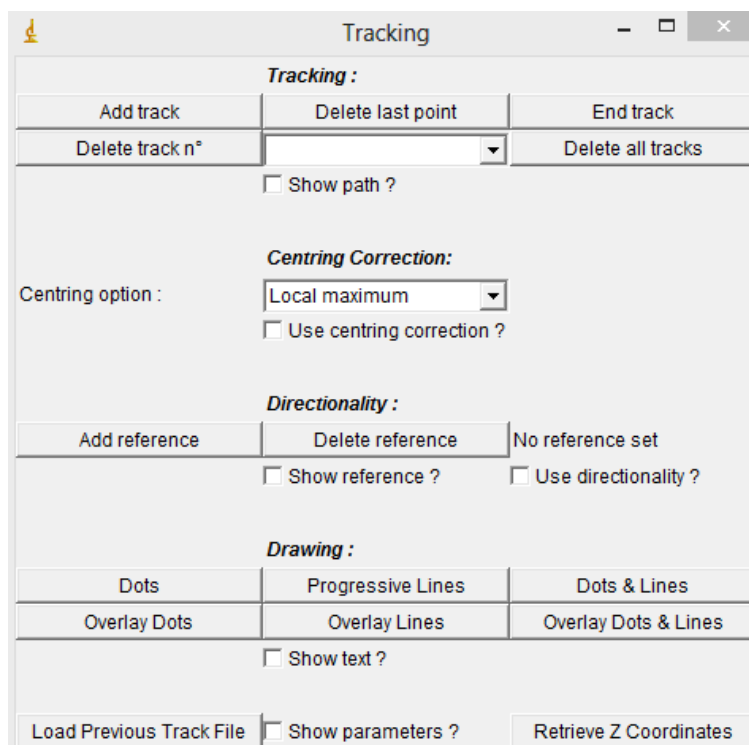
V prvním kroku byla buňka odprahována od okolí (*Image* $\Rightarrow$ *Adjust* $\Rightarrow$ *Threshold*). Příklad odprahovaných buněk je zobrazen na obrázku 5.10(a). Dále bylo v *Analyze* $\Rightarrow$ *Set measurement* nastaveno ukládání souřadnic těžiště a poté spuštěna samotná analýza (*Analyze* $\Rightarrow$ *Analyze particles*). Do samostatného okna lze vykreslit hranice buňky (obrázek 5.10(b)) a souřadnice těžiště zobrazit v okně *Results* (obrázek 5.10(c)). Stejně se pracuje i se sekvencí snímků. Získané výsledky byly exportovány a dále zpracovávány.



Obrázek 5.10: (a) Odprahované buňky od svého okolí, (b) vykreslené hranice buněk, (c) tabulka zaznamenaných souřadnic těžiště buňky.

Manual tracking plugin

Po spuštění Manual tracking pluginu (*Plugins* $\Rightarrow$ *Manual Tracking*) je zobrazeno okno *Tracking* (viz obrázek 5.11), ve kterém lze spustit trasování stisknutím *Add track*. Ukončení trasování lze zastavit funkcí *End track*. Je možné také vymazat poslední bod (*Delete last point*), celou dráhu buňky (*Delete track n°*) nebo všechny zaznamenané dráhy (*Delete all tracks*). V momentě zahájení trasování lze již manuálně označovat buňku a zaznamenávat souřadnice x , y její dráhy. Souřadnice jsou zaznamenávány do tabulky (obrázek 5.12), stejně jako vzdálenost mezi dvěma po sobě jdoucími obrazy a rychlost pohybu. Výsledky lze exportovat a dále zpracovávat a dráhu lze vykreslit.



Obrázek 5.11: Otevřené okno trasování.

5.2. CHEMOTAXE BUNĚK

	Track n°	Slice n°	X	Y	Distance	Velocity
1	1.000	1.000	90.000	76.000	-1.000	-1.000
2	1.000	2.000	90.000	76.000	0.000	0.000
3	1.000	3.000	94.000	78.000	0.577	0.288
4	1.000	4.000	95.000	79.000	0.182	0.091
5	1.000	5.000	92.000	80.000	0.408	0.204
6	1.000	6.000	88.000	81.000	0.532	0.266
7	1.000	7.000	83.000	88.000	1.110	0.555
8	1.000	8.000	79.000	92.000	0.730	0.365
9	1.000	9.000	73.000	96.000	0.930	0.465
10	1.000	10.000	75.000	98.000	0.365	0.182

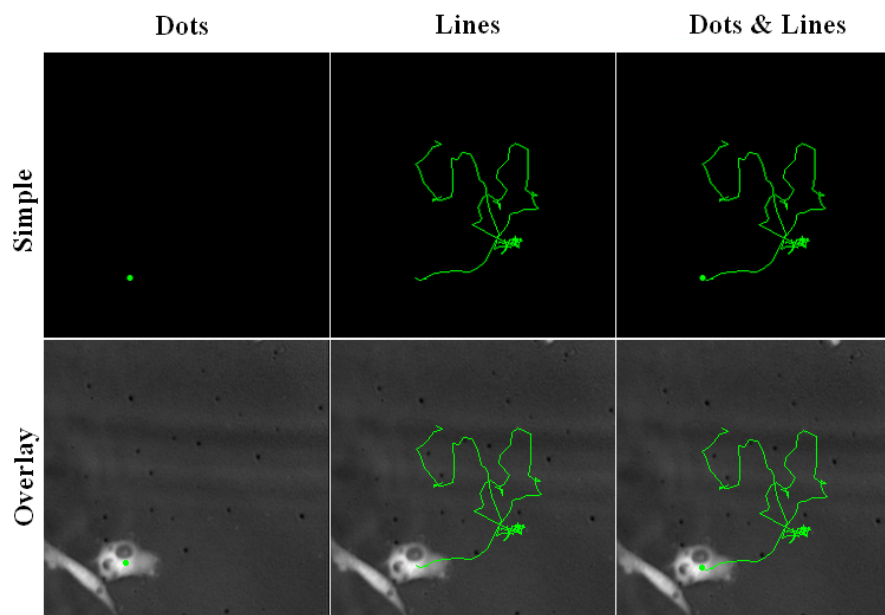
Obrázek 5.12: Ukázka tabulky naměřených dat.

Zobrazení dat

Výsledky trasování je možné zobrazit několika možnými způsoby.

- Simple: data jsou vykreslena na černém pozadí.
- Overlay: data jsou vykreslena na původním snímku.
- Dots: tečka je zakreslená podle aktuální pozice objektu a zaznamenaných souřadnic x, y .
- Lines: celá trajektorie je zakreslená podle zaznamenaných souřadnic x, y .
- DotsLines: zakreslená je celá trajektorie a tečka podle aktuální pozice objektu a zaznamenaných souřadnic x, y .

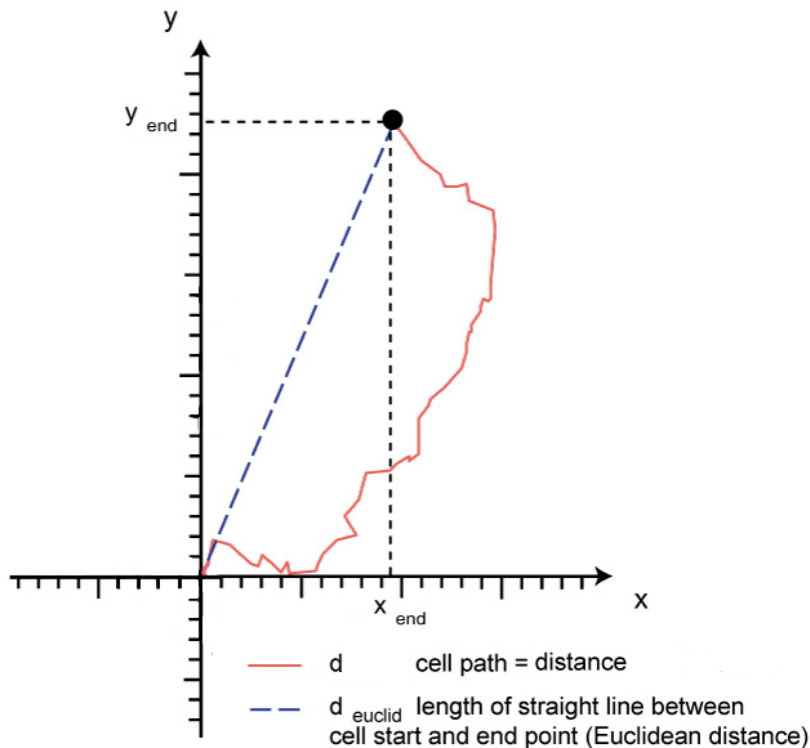
Ilustrace zobrazení je uvedena na obrázku 5.13. Pro každou stopu lze použít jinou barvu. Velikost teček, šířku čar a velikost písma lze nastavit v parametrech. Více informací je k nalezení v [41].



Obrázek 5.13: Zobrazení výsledků trasování. Převzato z [41].

Vyhodnocení dat

Ze získaných dat lze vyhodnotit celkovou uraženou vzdálenost, vzdálenost za určitý čas, tzv. Euklidovu vzdálenost (přímá vzdálenost mezi počátečním a konečným bodem), rychlost, směrovost atd. Na obrázku 5.14 je znázorněna celková a Euklidova vzdálenost.



Obrázek 5.14: Znázornění celkové uražené vzdálenosti a Euklidovy vzdálenosti. Upraveno a převzato z [42].

- Celková uražená vzdálenost: celková vzdálenost mezi počátečním a konečným bodem

$$d = \sum_{i=1}^n \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}. \quad (5.1)$$

- Euklidova vzdálenost: přímá vzdálenost mezi počátečním $(x_{\text{ini}}, y_{\text{ini}})$ a konečným bodem $(x_{\text{end}}, y_{\text{end}})$

$$d_{\text{Euclid}} = \sqrt{(x_{\text{end}} - x_{\text{ini}})^2 + (y_{\text{end}} - y_{\text{ini}})^2}. \quad (5.2)$$

- Rychlost: poměr celkové vzdálenosti a celkového času

$$v = \frac{d}{t}. \quad (5.3)$$

- Směrovost: poměr Euklidovy a celkové vzdálenosti

$$S = \frac{d_{\text{Euclid}}}{d}. \quad (5.4)$$

5.2. CHEMOTAXE BUNĚK

5.2.2. I. měření

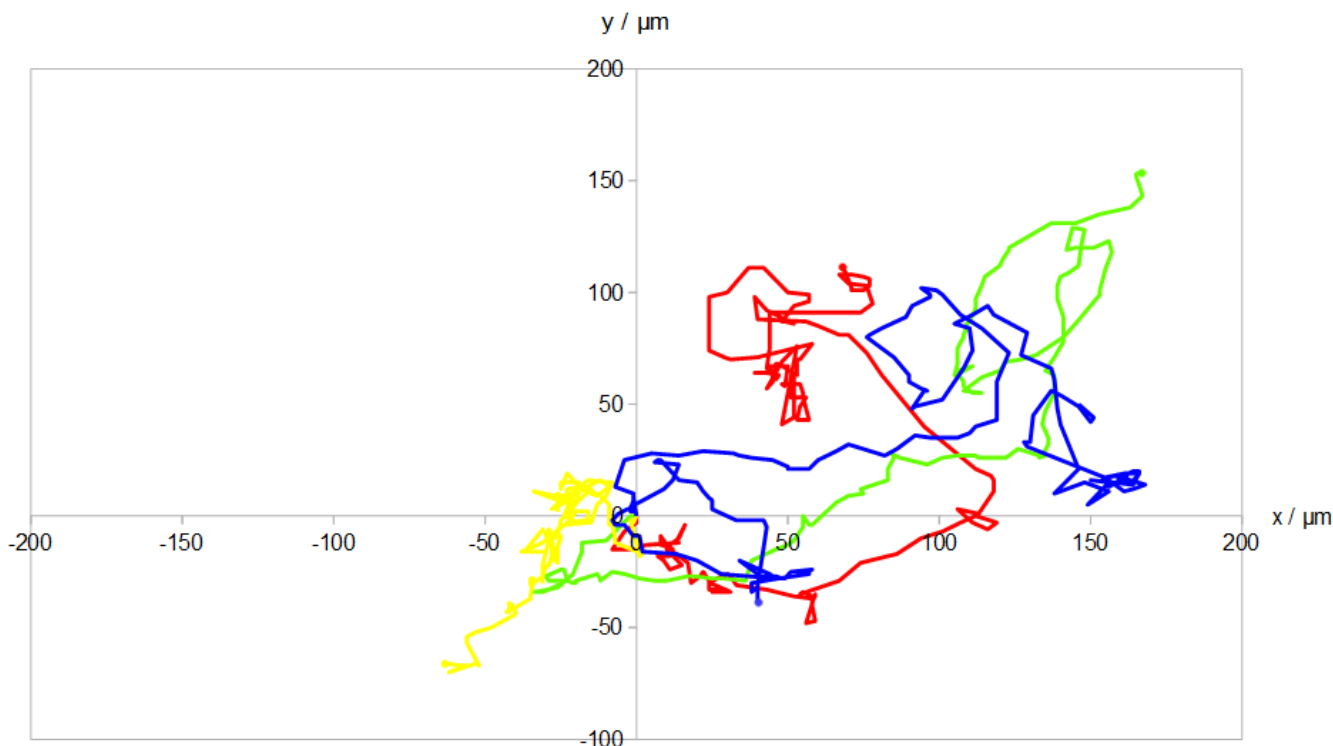
V prvním měření se jednalo o dlouhodobé snímání s intervalem 120 sekund a průměrováním 5 snímků za sekundu. Snímání bylo zahájeno několik hodin po přidání FTS (fetální telecí sérum) jako chemoatraktantu. Celkem bylo získáno 480 snímků. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Tabulka 5.2: Tabulka parametrů při pozorování v prvním měření.

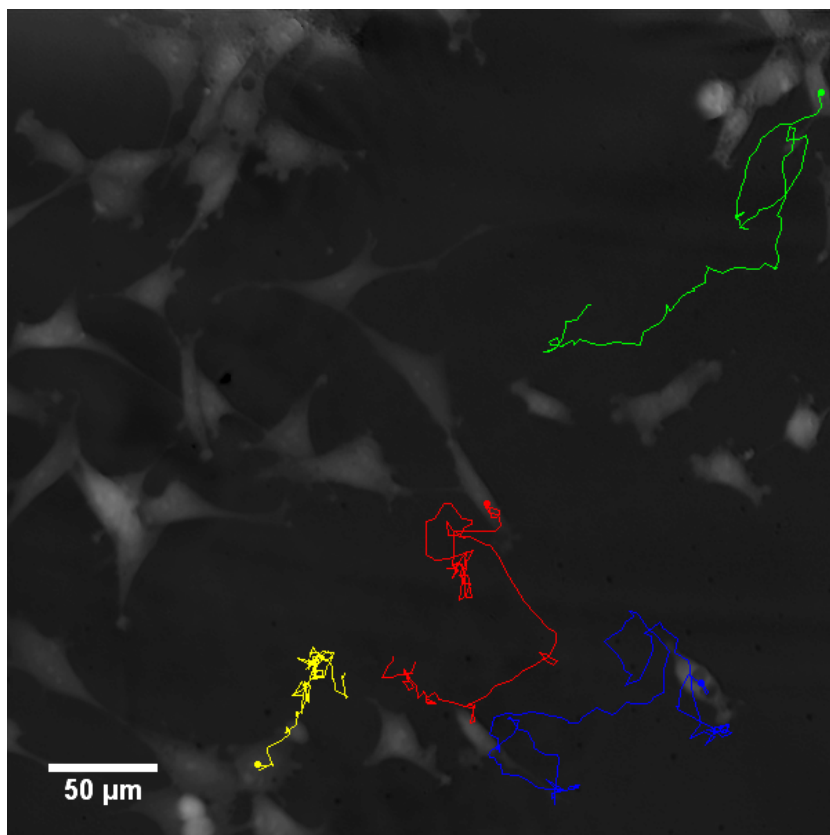
Průměrování	5 snímků za sekundu
Interval snímání	120 s
Celková doba snímání	16 hodin
Počet snímků	480

Vyhodnocení

Pro vyhodnocení byly vybrány čtyři buňky, u kterých byl zaznamenáván pohyb, resp. změna polohy těžiště buňky. Dráhy buněk jsou zaznamenány v grafu na obrázku 5.15. Dále jsou dráhy buněk zakresleny přímo na snímku fáze, viz obrázek 5.16. Ze získaných dat byla dále vyhodnocena celková dráha buňky, Euklidova vzdálenost, celková rychlost pohybu a směrovost pohybu buněk. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.3. Snímání bylo zahájeno až několik hodin po přidání chemoatraktantu FTS, a proto se v průběhu snímání chemoatraktant nacházel již v celé komůrce. Buňky se pohybovaly do všech směrů, nicméně se nejednalo o chemotaxi, ale o klasický pohyb buněk.



Obrázek 5.15: Dráhy buněk v prvním měření.



Obrázek 5.16: Dráhy buněk zakreslené ve snímku fáze v prvním měření.

Tabulka 5.3: Tabulka vyhodnocených dat v prvním měření.

Buňka	n°1	n°2	n°3	n°4
Celková vzdálenost d [μm]	1015,68	613,77	688,64	940,31
Euklidova vzdálenost d_{Euclid} [μm]	154,32	91,24	227,17	130,70
Rychlost v [$\mu\text{m/s}$]	$4,232 \cdot 10^{-2}$	$2,557 \cdot 10^{-2}$	$2,869 \cdot 10^{-2}$	$3,918 \cdot 10^{-2}$
Směrnost S	0,15	0,15	0,33	0,14

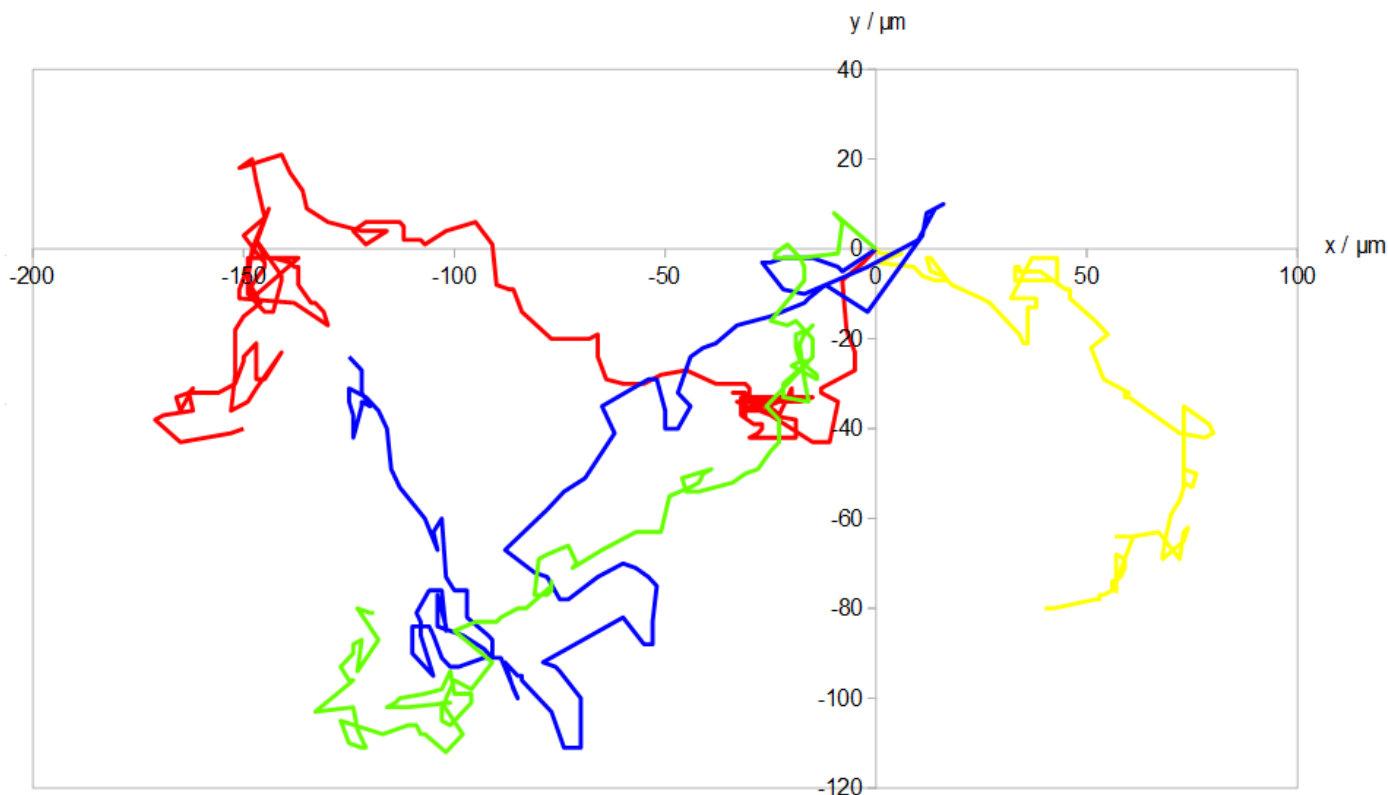
5.2.3. II. měření

Ve druhém měření se také jednalo se o dlouhodobé snímání s intervalem 120 sekund a průměrováním 3 snímky za sekundu. Celkem bylo získáno 550 snímků. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.4. Snímání bylo zahájeno ihned po přidání chemoatraktantu FTS.

Tabulka 5.4: Tabulka parametrů při pozorování v druhém měření.

Průměrování	3 snímky za sekundu
Interval snímání	120 s
Celková doba snímání	18 hodin
Počet snímků	550

5.2. CHEMOTAXE BUNĚK



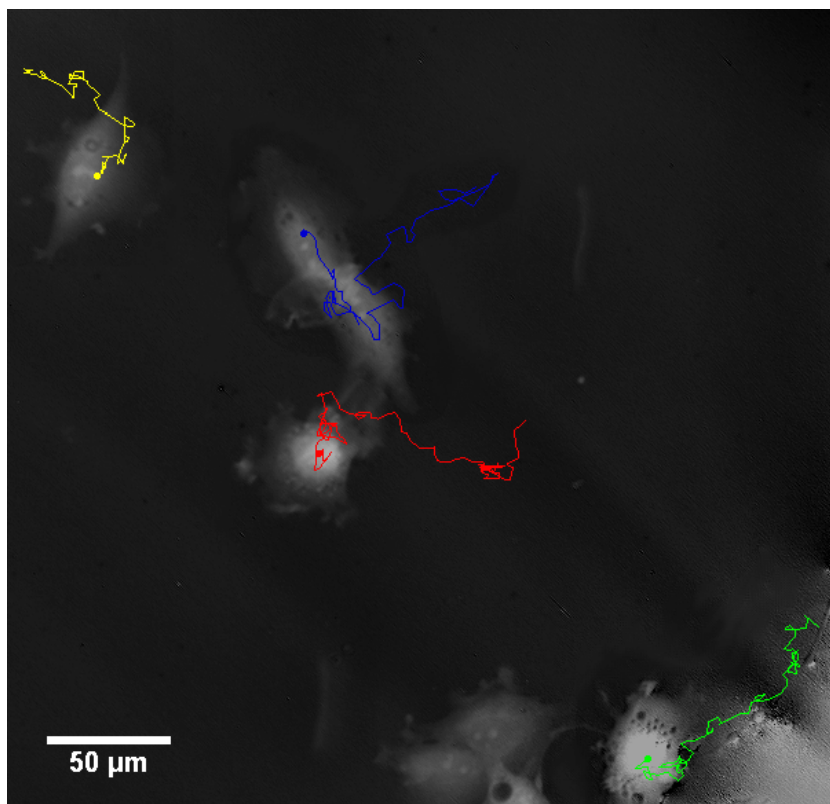
Obrázek 5.17: Dráhy buněk v druhém měření.

Vyhodnocení

Pro vyhodnocení byly opět vybrány čtyři buňky, u kterých byl zaznamenáván pohyb, resp. změna polohy těžiště buňky. Dráhy buněk jsou zaznamenány v grafu na obrázku 5.17. Dále jsou dráhy buněk zobrazeny na obrázku 5.18. Ze získaných dat byla dále vyhodnocena celková dráha buňky, Euklidova vzdálenost, celková rychlost pohybu a směrovost pohybu buněk. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.5. Snímání bylo zahájeno ihned po přidání chemoatraktantu FTS, přesto nebyla pozorována chemotaxe. Buňky se začaly pohybovat až několik hodin po zahájení snímání, kdy se FTS už opět nacházelo v celé komůrce. Mikroskop v tomto měření nebylo možné zcela naladit (světlý roh ve snímku fáze), jelikož jeden z děličů svazků neodpovídal požadovaným parametrům a nevydržel teplotu 37 °C.

Tabulka 5.5: Tabulka vyhodnocených dat v druhém měření.

Buňka	n°1	n°2	n°3	n°4
Celková vzdálenost d [μm]	515,33	637,72	340,82	737,97
Euklidova vzdálenost d_{Euclid} [μm]	143,95	127,28	93,74	155,24
Rychlost v [$\mu\text{m/s}$]	$2,147 \cdot 10^{-2}$	$2,657 \cdot 10^{-2}$	$1,420 \cdot 10^{-2}$	$3,074 \cdot 10^{-2}$
Směrovost S	0,28	0,20	0,28	0,21



Obrázek 5.18: Dráhy buněk zakreslené ve snímku fáze v druhém měření.

5.2.4. III. měření

Ve třetím měření se jednalo se o dlouhodobé snímání s intervalem 64 sekund a průměrováním 3 snímky za sekundu. Snímání bylo zahájeno ihned po přidání chemoatraktantu. Celkem bylo získáno 1300 snímků, ale zpracován byl jen každý druhý. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.6.

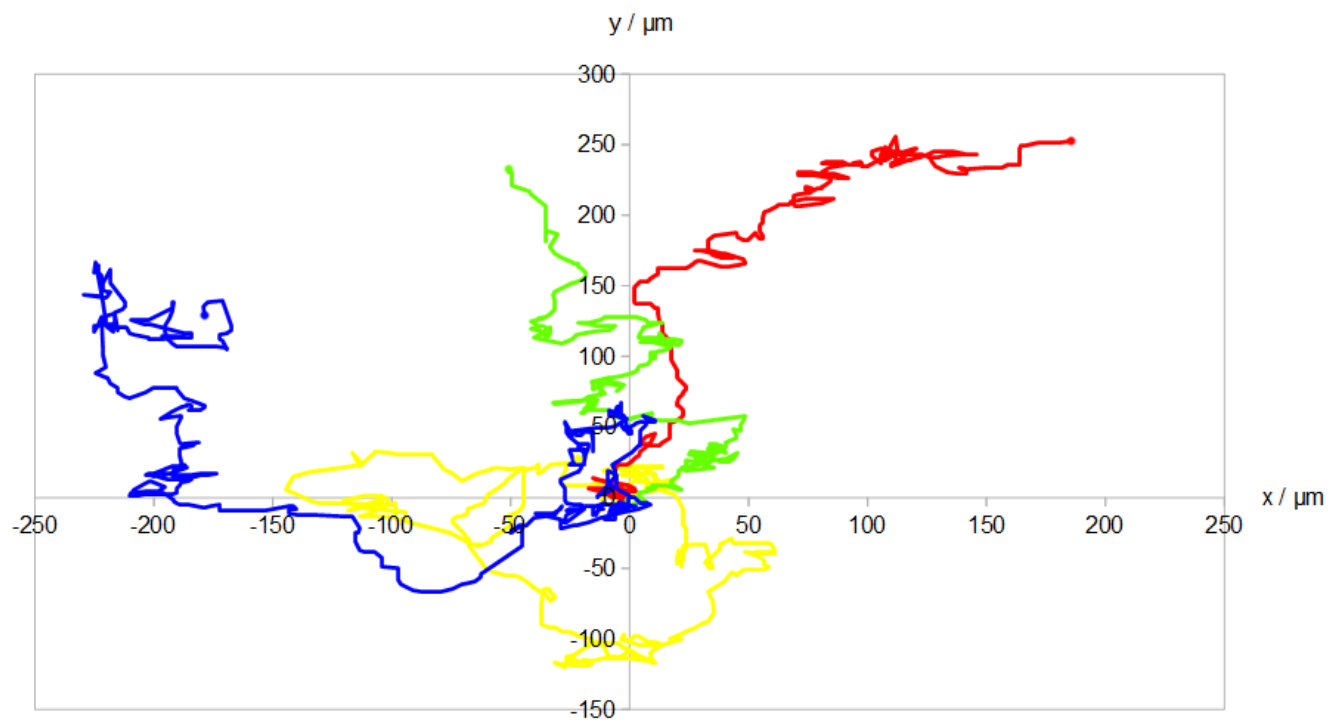
Tabulka 5.6: Tabulka parametrů při pozorování ve třetím měření.

Průměrování	3 snímky za sekundu
Interval snímání	64 s
Celková doba snímání	12 hodin
Počet snímků	1300
Počet zpracovaných snímků	650

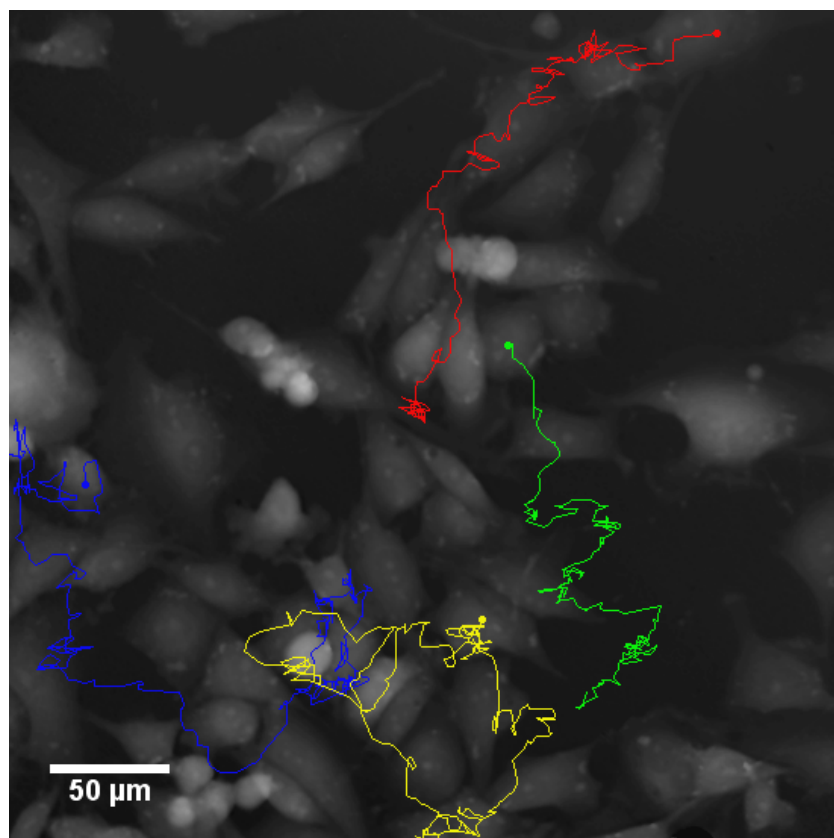
Vyhodnocení

Pro vyhodnocení byly opět vybrány čtyři buňky, u kterých byl zaznamenáván pohyb, resp. změna polohy těžiště buňky. Dráhy buněk jsou zaznamenány v grafu na obrázku 5.19. Dále jsou dráhy buněk zobrazeny na obrázku 5.20. Hodnoty celkové dráhy buňky, Euklidovy vzdálenosti, celkové rychlosti pohybu a směrovosti pohybu buněk jsou uvedeny v tabulce 5.7. Ve třetím měření bylo zahájeno snímání ihned po přidání chemoatraktantu FTS a buňky se také hned začaly pohybovat. Ale ani v tomto případě nebyla chemotaxe potvrzena, protože buňky se pohybovaly do všech směrů.

5.2. CHEMOTAXE BUNĚK



Obrázek 5.19: Dráhy buněk ve třetím měření.



Obrázek 5.20: Dráhy buněk zakreslené ve snímku fáze ve třetím měření.

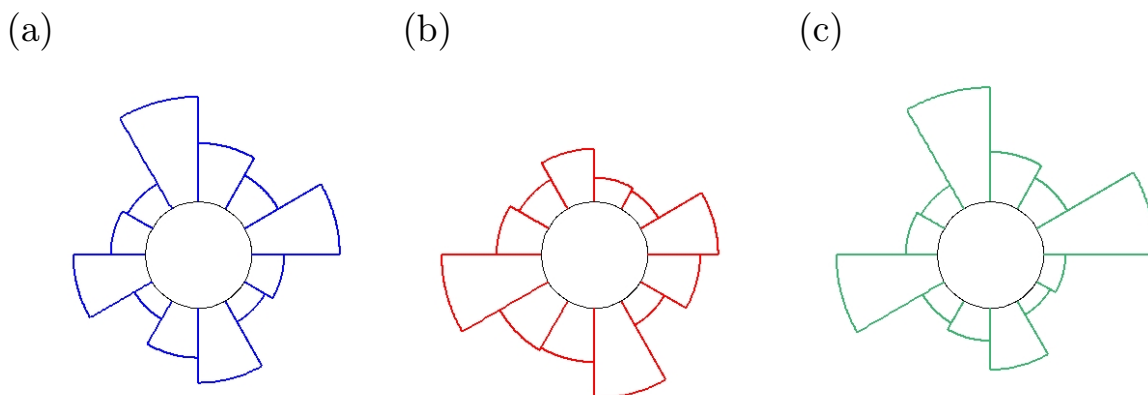
Tabulka 5.7: Tabulka vyhodnocených dat ve třetím měření.

Buňka	n°1	n°2	n°3	n°4
Celková vzdálenost d [μm]	1884,15	997,39	1063,48	1524,44
Euklidova vzdálenost d_{Euclid} [μm]	216,36	234,83	318,21	18,36
Rychlost v [$\mu\text{m/s}$]	$4,199 \cdot 10^{-2}$	$2,223 \cdot 10^{-2}$	$2,370 \cdot 10^{-2}$	$3,397 \cdot 10^{-2}$
Směrovost S	0,11	0,24	0,30	0,10

5.2.5. Shrnutí

Celkem byla provedena tři měření, ve kterých byl zaznamenáván pohyb buněk v komůrkách μ -Slide Chemotaxis 2D. V prvních dvou případech se buňky začaly pohybovat až několik hodin poté, co bylo přidáno fetální telecí sérum. A proto v době, kdy byl pohyb zaznamenán, se chemoatraktant nacházel v prostoru celé komůrky a chemotaxe nebyla očekávána. Ve třetím měření se buňky začaly pohybovat ihned po přidání chemoatraktantu, kdy bylo také zahájeno snímání. Ale ani v tomto případě se nepodařilo prokázat chemotaxi buněk, jelikož buňky se pohybovaly do všech směrů. Ve všech třech měřeních byl sice sledován pohyb buněk, ale nejednalo se o chemotaxi. Ani v jednom případě se nepotvrdil pohyb v jednom směru.

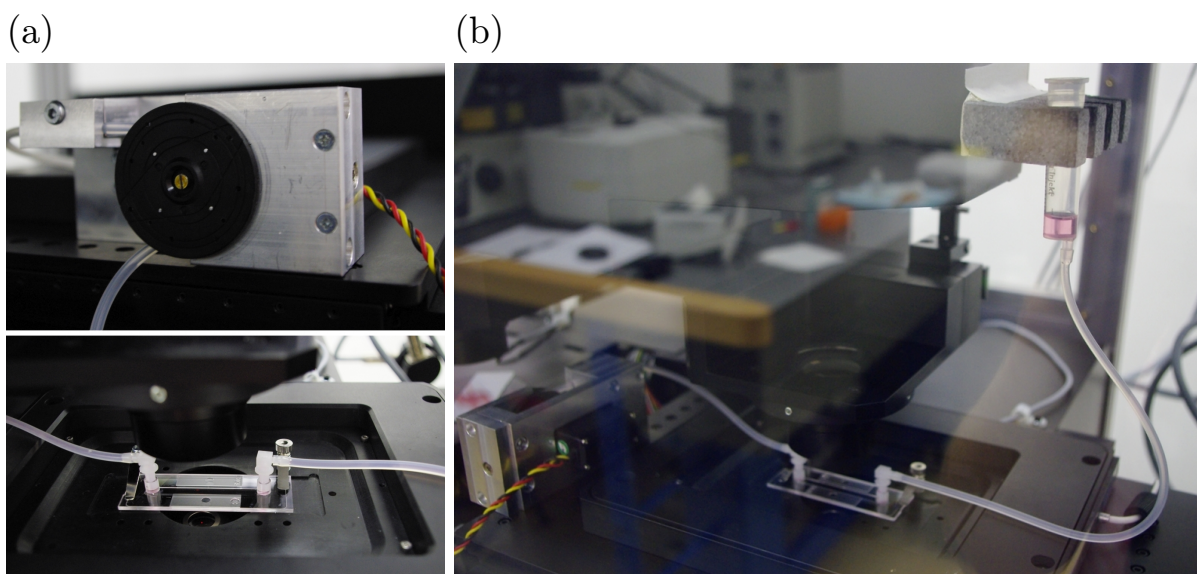
Jednotlivé trajektorie buněk byly vytvořeny z bodů, resp. vektorů $(x_i - x_{i-1}, y_i - y_{i-1})$. Následně byl určen úhel vektoru od 0° do 360° (bez nulových vektorů) a tyto úhly byly roztrženy do kategorií po 30° . Tím vznikly četnosti zastoupení jednotlivých směrů pohybu buněk, které jsou zaznačeny v kruhových histogramech (obrázek 5.21). Rychlost pohybu buněk se pohybovala mezi hodnotami $1,420 \cdot 10^{-2}$ a $4,232 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{m/s}$. Nejkratší uražená celková vzdálenost byla 340,82 μm a nejdelší 1884,15 μm .



Obrázek 5.21: Kruhový histogram zobrazující směry pohybu všech čtyř buněk z (a) I. měření, (b) II. měření a (c) III. měření.

5.3. Osmotické jevy v buňkách

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat a zaznamenávat osmotické jevy v buňkách. Pro pozorování byly použity komůrky μ -Slide I Luer, do kterých byly nasazeny buňky v médiu (viz část 5.1.2). Komůrka byla napojená na pumpu, která zajišťovala kontrolovaný průtok kapaliny. Zapojení je zobrazené na obrázcích 5.22(a) a 5.22(b). V prvních čtyřech měření komůrkou protékalo nejdříve médium M1H, poté médium v určitém poměru zředěné s vodou (9:1, 7:3, 3:7 a 1:9). Průtok této kapaliny způsobil bobtnání buněk ve snaze o vyrovnaní koncentrace přes polopropustnou membránu buněk (hypotonický děj). V pátém měření komůrkou protékal nejdříve roztok tvořen z médií F10 a H-MEMd 10 $\times$ v poměru 3:7, kdy došlo ke smrštění buněk (hypertonický děj). Poté přes komůrku protékalo pouze médium F10, došlo ke zpětné reakci a buňky se vrátily do původního stavu (hypotonický děj).



Obrázek 5.22: (a) Fotografie pumpy a zapojení komůrky μ -Slide I Luer, (b) celkový pohled na zapojení komůrky k pumpě.

Celkem bylo provedeno pět měření. Každé ze snímání trvalo okolo 10 minut, interval snímání byl nastaven vždy na 2 sekundy. Ve všech měřeních bylo vybráno několik buněk, jejichž fáze byla zaznamenávána. K experimentům byl použit objektiv se zvětšením 10 $\times$ a numerickou aperturou NA= 0,3. Dále byl použit filtr s maximální propustností na vlnové délce $\lambda = 650$ nm (viz tabulka 5.8).

Tabulka 5.8: Tabulka parametrů při pozorování osmózy.

Objektiv	zvětšení 10 $\times$
	numerická apertura NA= 0,3
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650$ nm
	pološířka maxima 10 nm
Průměrování	3 snímky za sekundu

5.3.1. Analýza dat — přepoččet fáze na suchou hmotu

Stejně jako v případě chemotaxe byly snímky navázané fáze v těchto experimentech otevřeny a zpracovány v programu ImageJ. Opět byly buňky nejdříve odprahovány od pozadí ($Image \Rightarrow Adjust \Rightarrow Threshold$). Prahovací hodnoty se pohybovaly okolo hodnoty 0,08 rad. V dalším kroku byla označena oblast, ve které probíhala analýza (*Freehand selections*). Výstupem tohoto experimentu byla zvolena pouze suma celkové fáze buňky (*Integrated Density*), jejíž hodnoty byly zobrazeny v okně *Results*. Hodnoty celkové fáze byly dále vyhodnocovány a přepočítány na hodnoty ekvivalentu suché hmoty.

Přepoččet fáze na hodnoty suché hmoty [15]

Podle G. Popescua [43] lze pomocí zpoždění fáze světelného svazku určit hodnoty suché hmoty:

$$m = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \langle \Delta\Phi \rangle A, \quad (5.5)$$

kde m představuje suchou hmotu buňky v pg, A plochu buňky v μm^2 , λ vlnovou délku zdroje v μm , α specifický refrakční přírůstek v $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$ a $\langle \Delta\Phi \rangle$ průměrný fázový rozdíl v radiánech.

Vyhodnocení dat

Pomocí programu ImageJ byly získány hodnoty celkové změny fáze $\Delta\Phi$. Jedná se o součet hodnot v jednotlivých pixelech (p je počet pixelů buňky), které byly označeny jako buňka:

$$\Delta\Phi = \sum_{ij} \Delta\Phi_{i,j} = \langle \Delta\Phi \rangle p. \quad (5.6)$$

Při použití objektivů se zvětšením $10\times$ odpovídá 1 pixel ploše $A_p = 0,4 \mu\text{m}^2$, a proto bylo potřeba hodnoty získané pomocí programu ImageJ vynásobit číslem 0,4. Plocha buňky A je rovna:

$$A = pA_p. \quad (5.7)$$

Po dosazení předchozích vztahů (5.6) a (5.7) byly získané hodnoty celkové změny fáze na plochu přepočteny na hodnoty ekvivalentu suché hmoty M podle již uvedeného vzorce od G. Popescua (5.5):

$$M = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \frac{\Delta\Phi}{p} pA_p = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\Phi A_p. \quad (5.8)$$

5.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH

5.3.2. I. měření

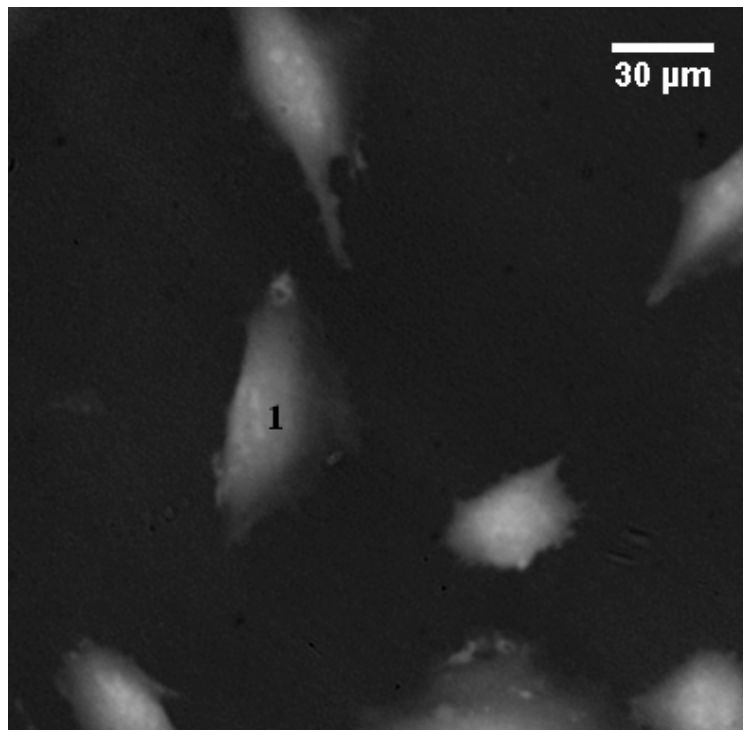
V prvním měření se jednalo o snímání s intervalem 2 sekundy a průměrováním 3 snímky za sekundu. Celkem bylo během 14 minut získáno přes 400 snímků. Poměr média a vody byl 9:1. Hypotonický roztok začal protékat přes komůrku po páté minutě. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.9.

Tabulka 5.9: Tabulka parametrů při pozorování osmózy v prvním měření.

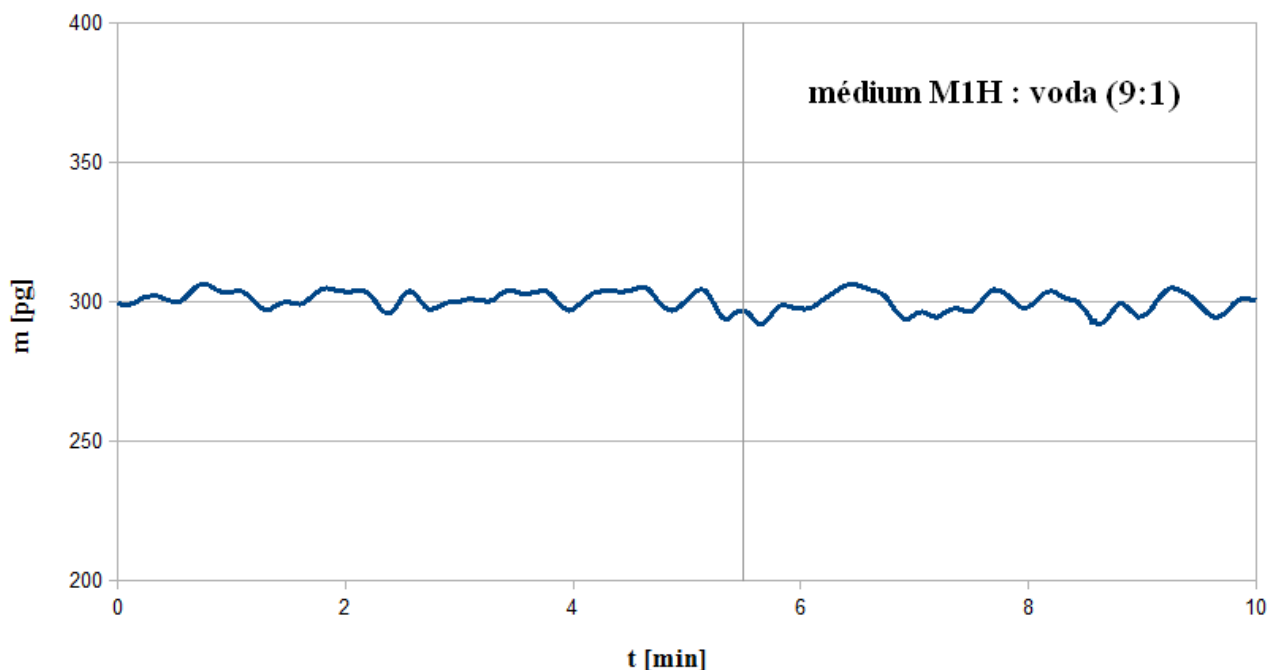
Interval snímání	2 s
Celková doba snímání	14 minut
Počet snímků	416
Poměr média a vody	9:1
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku	5. minuta

Vyhodnocení

Pro vyhodnocení prvního měření byla vybrána pouze jedna buňka, protože s poměrem média M1H a vody 9:1 nebyl očekáván hypotonický děj. Tento předpoklad byl naplněn. Na obrázku 5.23 je zobrazena vybraná buňka. Na dalším obrázku 5.24 je zobrazen graf — hodnoty suché hmoty v závislosti na čase.



Obrázek 5.23: Vybrané buňky z prvního měření osmózy.



Obrázek 5.24: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase v prvním měření osmózy.

5.3.3. II. měření

Druhé měření trvalo 10 minut a bylo získáno přes 300 snímků. Interval snímání byl nastaven na 2 sekundy s průměrováním 3 snímky za sekundu. Poměr média M1H a vody byl 7:3. Hypotonický roztok začal protékat přes komůrku přibližně v páté minutě. Parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.10.

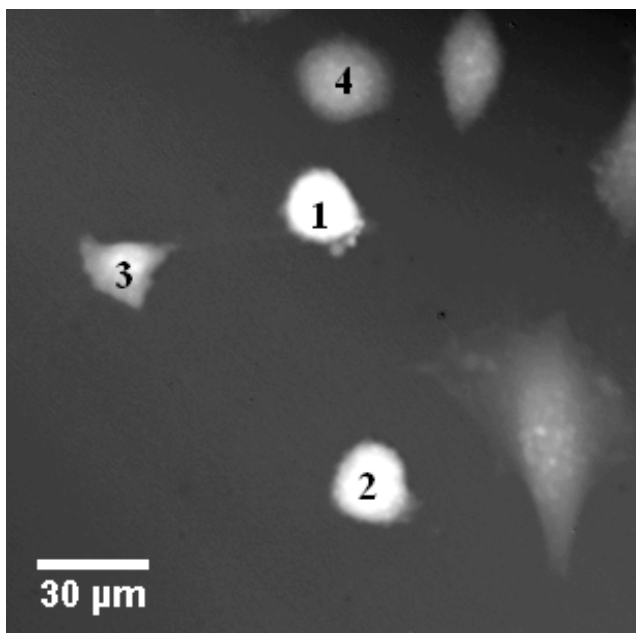
Tabulka 5.10: Tabulka důležitých parametrů při pozorování osmózy v druhém měření.

Interval snímání	2 s
Celková doba snímání	10 minut
Počet snímků	308
Poměr média a vody	7:3
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku	5. minuta

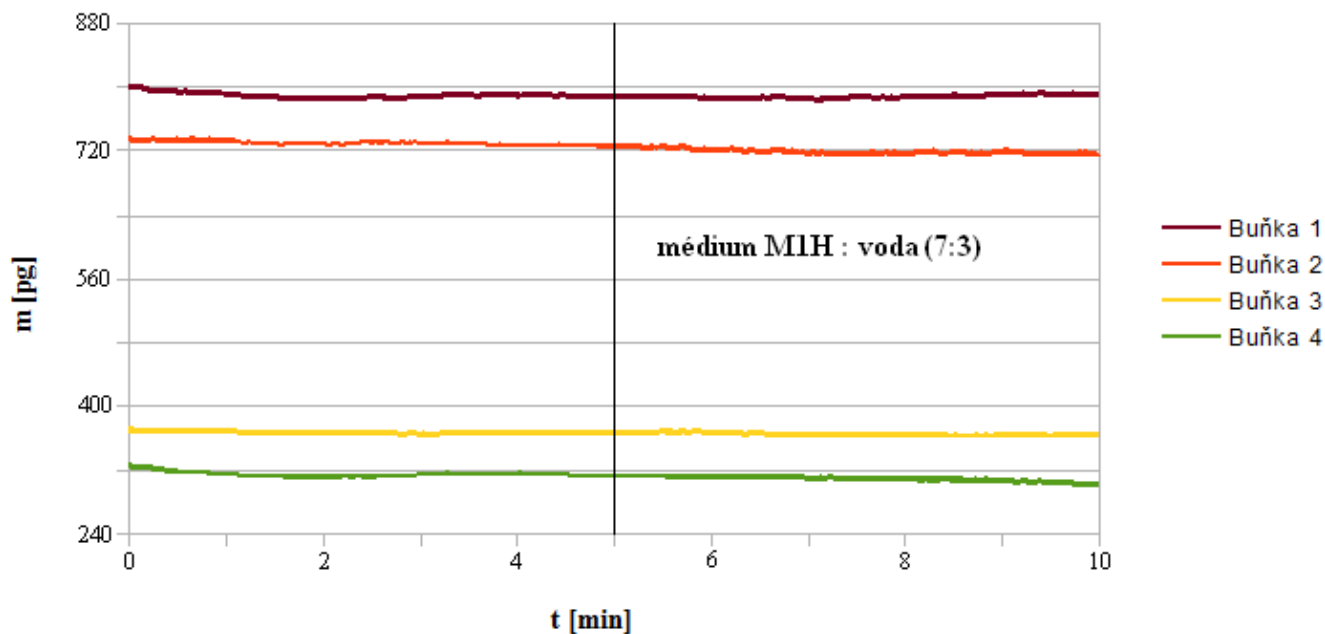
Vyhodnocení

Pro vyhodnocení druhého měření byly vybrány čtyři buňky. Hypotonický roztok byl tvořen médiem M1H s vodou v poměru 7:3. Ani v tomto případě nebyl pozorován skok v hodnotách suché hmoty — hypotonický děj nenastal. Na obrázku 5.25 jsou zobrazeny vybrané buňky. Na dalším obrázku 5.26 je zobrazen graf — hodnoty suché hmoty v závislosti na čase.

5.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH



Obrázek 5.25: Vybrané buňky z druhého měření osmózy.



Obrázek 5.26: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase v druhém měření osmózy.

5.3.4. III. měření

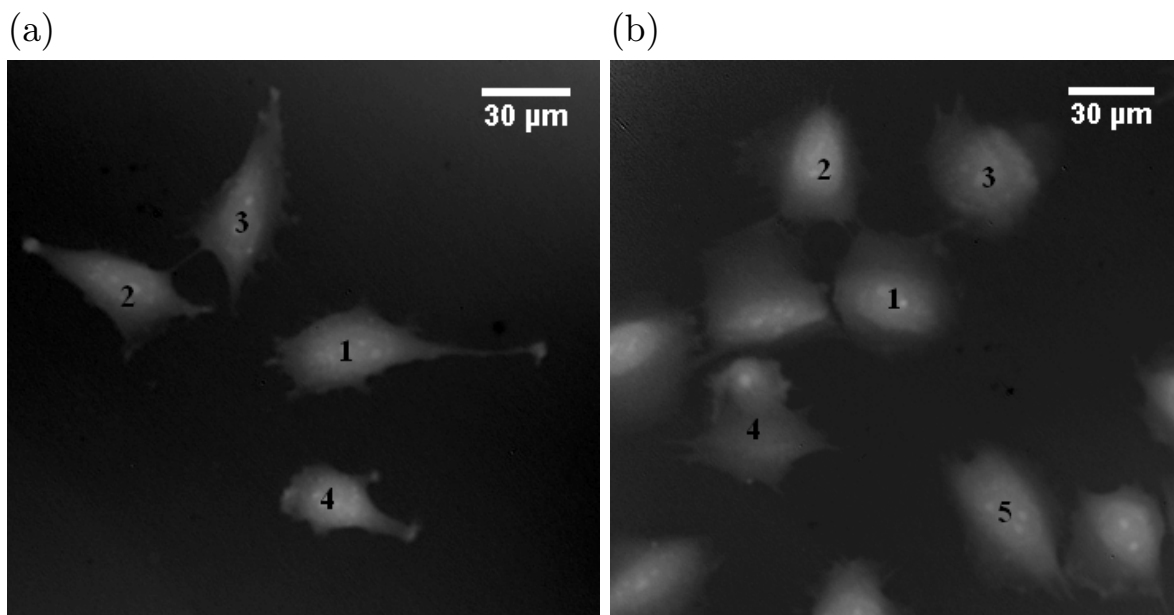
Třetí měření s poměrem média a vody 3:7 proběhlo celkem dvakrát. Poprvé trvalo 6 minut a získáno bylo 187 snímků (III A), podruhé 8 minut a získáno bylo 240 snímků (III B). Interval snímání byl v obou případech nastaven na 2 sekundy s průměrováním 3 snímků za sekundu. Hypotonický roztok začal protékat přes komůrku v prvním případě po čtvrté minutě a v druhém hned ze začátku měření, a to před první minutou. Tyto parametry jsou uvedeny v tabulce 5.11.

Tabulka 5.11: Tabulka důležitých parametrů při pozorování osmózy ve třetím měření.

Interval snímání	2 s
Poměr média a vody	3:7
Celková doba snímání III A	6 minut
Počet snímků III A	187
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku III A	4. minuta
Celková doba snímání III B	8 minut
Počet snímků III B	240
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku III B	1. minuta

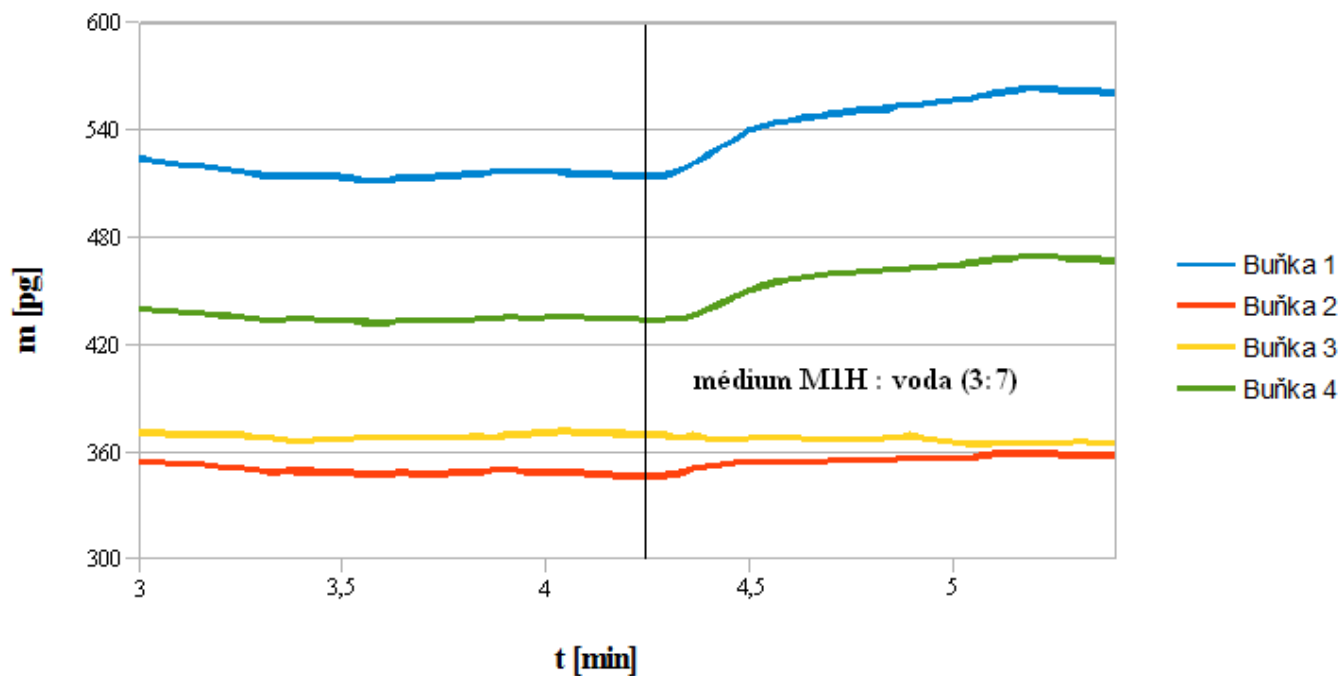
Vyhodnocení

Pro vyhodnocení třetího měření byly vybrány čtyři resp. pět buněk. Hypotonický roztok byl tvořen médiem M1H s vodou v poměru 3:7. V prvním pokusu došlo k hypotonickému ději pouze u dvou buněk, proto byl tento experiment zopakován. U druhého pokusu došlo ke skoku v hodnotách suché hmoty u všech pěti buněk. Na obrázcích 5.27(a) a 5.27(b) jsou zobrazeny vybrané buňky. Na dalších obrázcích 5.28 a 5.29 jsou zobrazeny grafy — hodnoty suché hmoty v závislosti na čase.

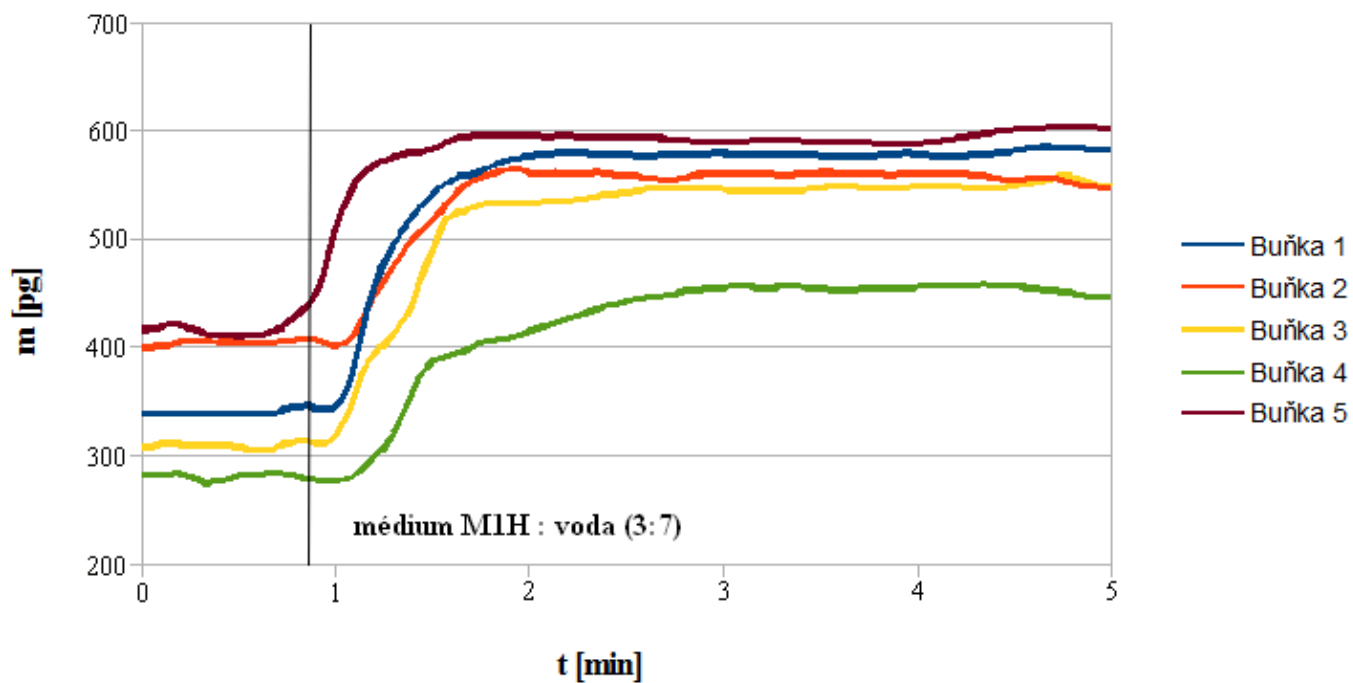


Obrázek 5.27: (a), (b) Vybrané buňky ze třetího měření osmózy.

5.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH



Obrázek 5.28: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase ve třetím měření osmózy.



Obrázek 5.29: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase ve třetím měření osmózy.

5.3.5. IV. měření

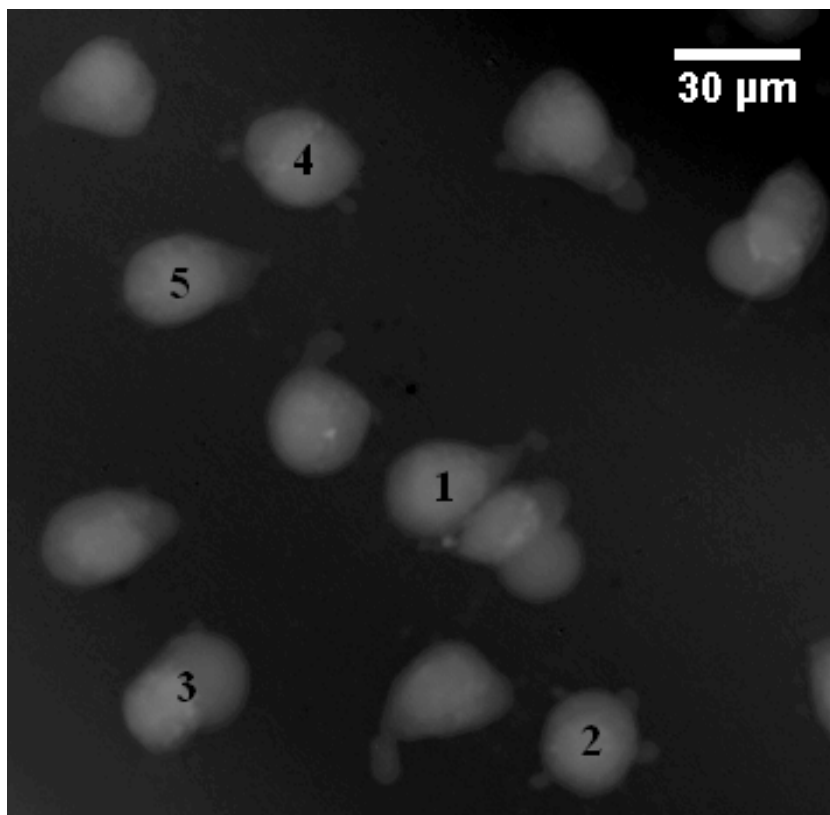
Čtvrté měření trvalo 9 minut a bylo získáno 270 snímků. Interval snímání byl nastaven na 2 sekundy s průměrováním 3 snímky za sekundu. Poměr média M1H a vody byl 1:9. Hypotonický roztok začal protékat přes komůrku přibližně v sedmé minutě. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.12.

Tabulka 5.12: Tabulka důležitých parametrů při pozorování osmózy ve čtvrtém měření.

Interval snímání	2 s
Celková doba snímání	9 minut
Počet snímků	270
Poměr média a vody	1:9
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku	7. minuta

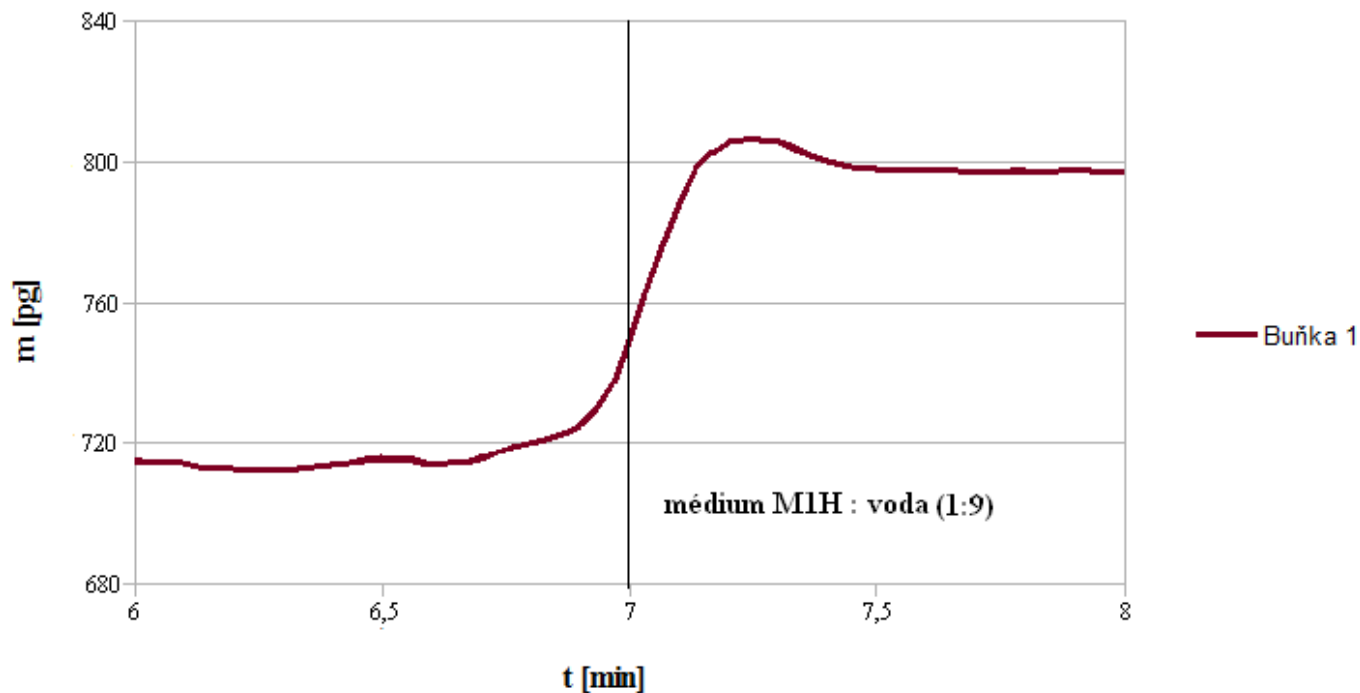
Vyhodnocení

Pro vyhodnocení čtvrtého měření byly vybrány čtyři buňky. Hypotonický roztok byl tvořen médiem M1H s vodou v poměru 1:9. Hypotonický děj, resp. skok v hodnotách suché hmoty nastal ihned po zahájení průtoku hypotonického roztoku. Na obrázku 5.30 jsou zobrazeny vybrané buňky. Na obrázku 5.31 je zobrazen graf pro buňku č. 1, která má vyšší hodnoty suché hmoty, a proto jsou její hodnoty zaneseny do grafu zvlášť. Na dalším obrázku 5.32 je zobrazen graf pro další čtyři buňky.

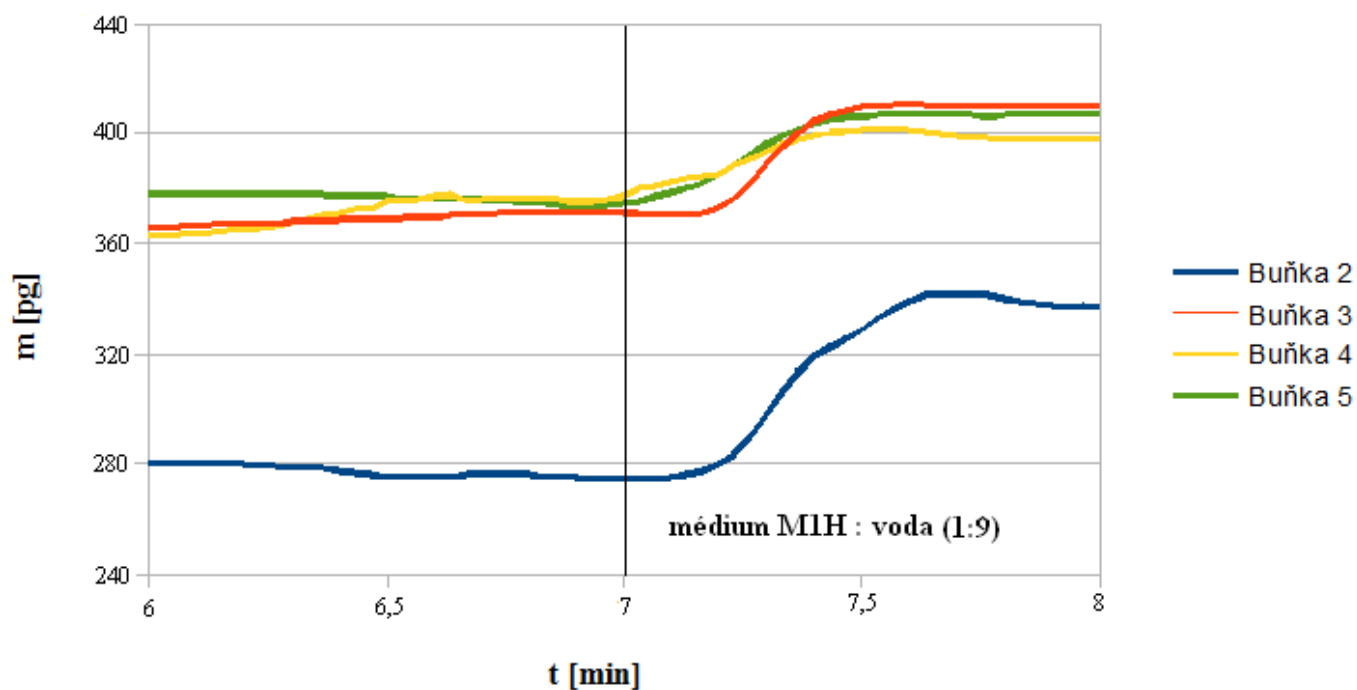


Obrázek 5.30: Vybrané buňky z čtvrtého měření osmózy.

5.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH



Obrázek 5.31: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase ve čtvrtém měření osmózy pro buňku č. 1.



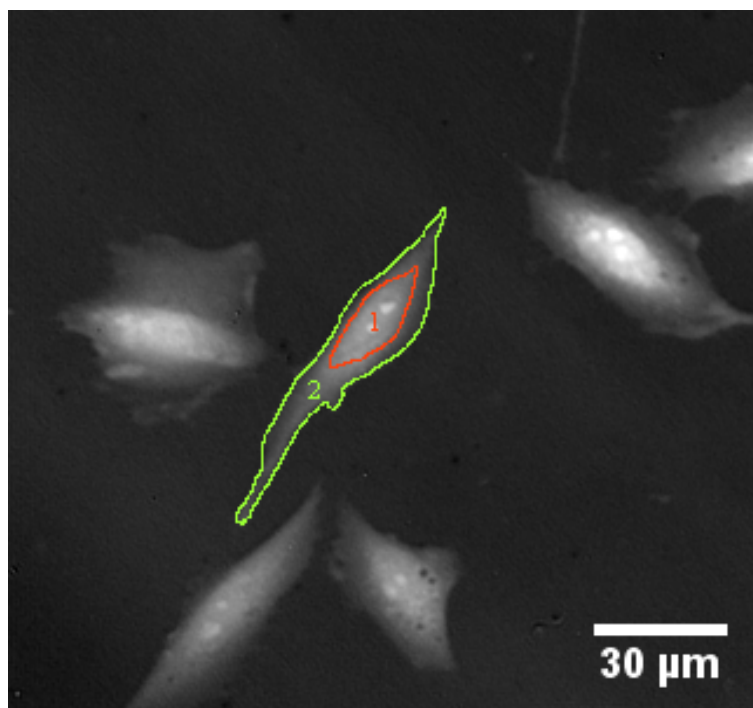
Obrázek 5.32: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase ve čtvrtém měření osmózy pro buňky č. 2, 3, 4 a 5.

5.3.6. V. měření

Páté měření trvalo přibližně 13 minut a získáno bylo přes 400 snímků. Jako médium byl použitý roztok složený z média F10 a H-MEMd (10× naředěné s tkáňovou vodou) v poměru 3:7. Nejdříve komůrkou s buňkami protékal zmíněný roztok, poté jen samotné médium F10. V tomto měření bylo cílem pozorovat hypotonický děj s použitím různé prahovací hodnoty, resp. různého výběru oblasti v buňce pro analýzu. Interval snímání byl nastaven na 2 sekundy s průměrováním 3 snímky za sekundu. Hypotonický roztok začal protékat přes komůrku přibližně v deváté minutě. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 5.13.

Tabulka 5.13: Tabulka důležitých parametrů při pozorování osmózy v pátém měření.

Interval snímání	2 s
Celková doba snímání	13 minut
Počet snímků	400
Poměr média F10 a H-MEMd	3:7
Čas zahájení průtoku hypotonického roztoku	9. minuta



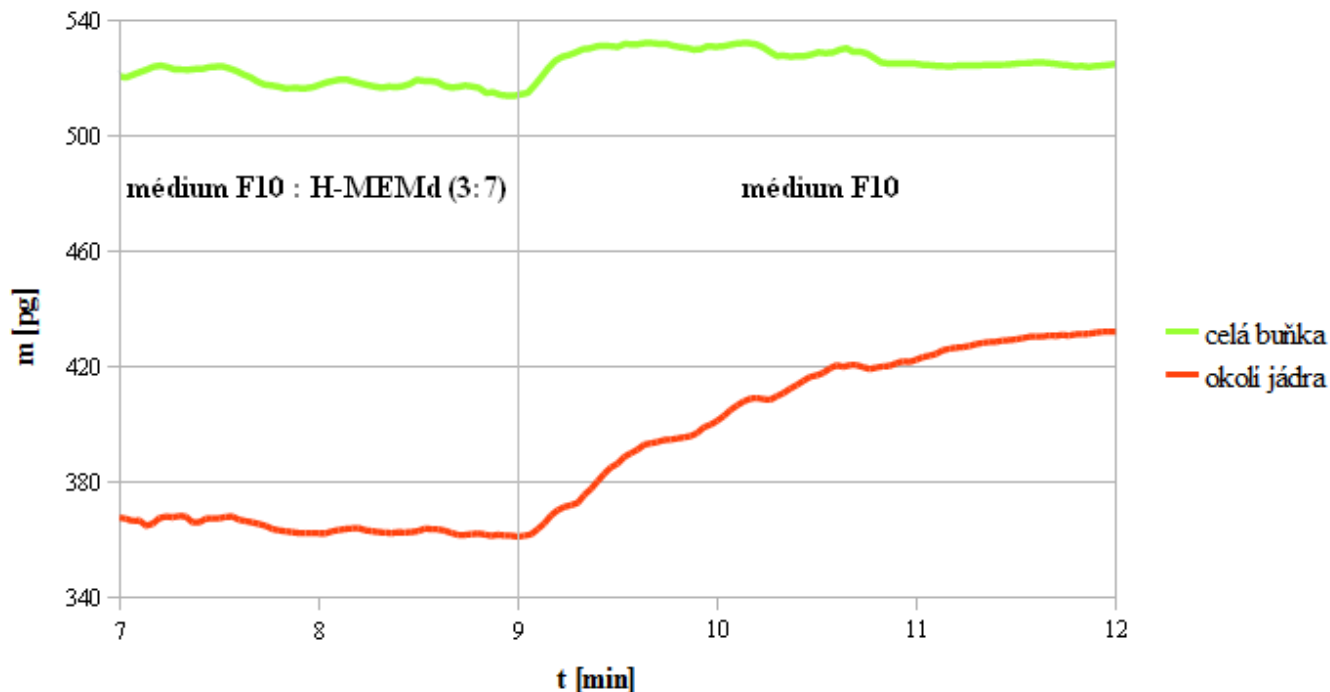
Obrázek 5.33: Vybraná buňka z pátého měření osmózy.

Vyhodnocení

Pro vyhodnocení pátého měření byla vybrána jedna buňka (obrázek 5.33). Roztok byl tvořen médiem F10 a společně s médiem H-MEMd v poměru 7:3. Roztok způsobil, že se buňky nejdříve smrštily (hypertonický děj), nicméně po deváté minutě, kdy přes komůrku začalo protékat opět jen médium F10, se buňky vrátily do původního stavu (hypotonický děj). Zaznamenána byla pouze druhá část, kdy došlo k nárůstu v hodnotách suché hmoty.

5.3. OSMOTICKÉ JEVY V BUŇKÁCH

Nejdříve proběhla analýza přes celou plochu buňky, poté pouze v okolí jádra. V prvním případě byla použita prahovací konstanta 0,06 rad a skok v hodnotách suché hmoty byl nepatrný. Až v druhém případě, kdy výpočet probíhal v okolí jádra a prahovací hodnota byla nastavena na 0,40 rad, byl skok výraznější. Vyhodnocená data byla zanesena do grafu, viz obrázek 5.34.



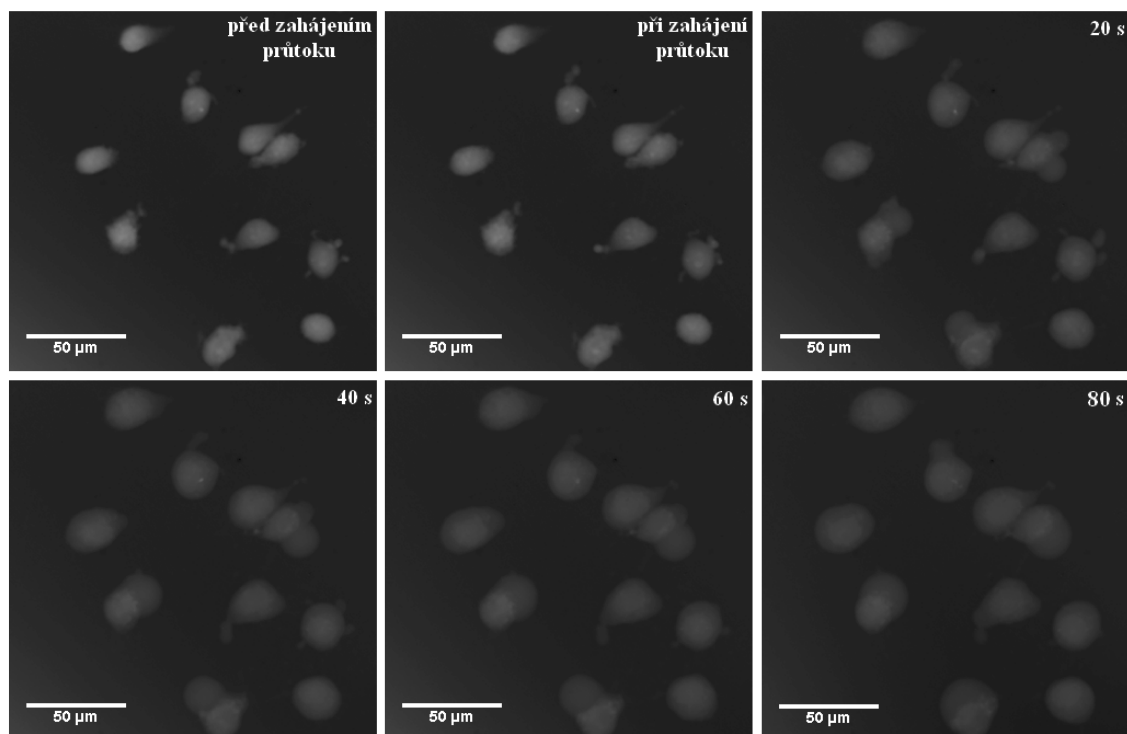
Obrázek 5.34: Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase v pátém měření osmózy.

5.3.7. Shrnutí

Celkem bylo provedeno pět měření, ve kterých byl sledován hypotonický děj. Byla zaznamenávána fáze, která byla přepočtena na hodnoty suché hmoty. Hypotonický děj byl pozorován v komůrce μ -Slide I Luer, která byla napojena na pumpu. Tato pumpa umožňovala kontrolovat průtok hypotonického roztoku. Ve čtyřech měřeních se jednalo o médium M1H v různém poměru s vodou — 9:1, 7:3, 3:7 a 1:9. V prvních dvou případech hypotonický děj nebyl sledován, nicméně tato reakce byla očekávána, protože rozdíl koncentrací uvnitř a vně buňky byl malý. V dalších měřeních již skok v hodnotách suché hmoty nastal v reakci na průtok hypotonického roztoku. V tabulce 5.14 jsou shrnuty výsledky těchto měření. $\overline{M}_1$, resp. $\overline{M}_2$ zde představují průměrné hodnoty suché hmoty buňky před a po zahájení průtoku hypotonického roztoku. Na obrázku 5.35 je zachycen růst suché hmoty ze čtvrtého experimentu. V pátém měření bylo použito médium F10 a médium H-MEMd 10× v poměru 3:7. Nejdříve komůrkou protékal zmíněný roztok, který způsobil smrštění buněk (hypertonický děj). Od 9. minuty přes komůrku protékalo pouze médium F10, a proto se buňky vrátily do původního stavu (hypotonický děj). Data byla vyhodnocována pouze z druhé části měření. V případě, kdy byla data vyhodnocována z celé plochy buňky, skok v hodnotách suché hmoty téměř nenastal. Výraznější skok byl pouze v případě analýzy v okolí jádra buňky. Celkově jednotlivá měření splnila očekávání a biologické předpoklady.

Tabulka 5.14: Tabulka shrnující výsledky měření hypotonického děje, resp. hodnot suché hmoty. $\overline{M}_1$ a $\overline{M}_2$ představují průměrné hodnoty suché hmoty buňky před a po zahájení průtoku hypotonického roztoku.

Poměr média a vody	buňka	$\overline{M}_1$ [pg]	$\overline{M}_2$ [pg]
9:1	1	605,0	601,4
7:3	1	794,0	794,0
	2	732,8	721,5
	3	368,8	366,1
	4	314,9	307,3
3:7	1	516,7	557,2
	2	349,6	356,6
	3	369,2	364,6
	4	435,2	464,8
3:7	1	340,1	577,3
	2	404,5	553,3
	3	309,6	542,2
	4	280,5	443,9
	5	421,8	596,4
1:9	1	716,5	798,7
	2	279,2	318,2
	3	363,4	398,7
	4	363,8	395,9
	5	377,3	399,2



Obrázek 5.35: Růst suché hmoty buněk zachycený v posledním experimentu.

6. Závěr

Diplomová práce s názvem *Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem* je rozdělena do tří částí. První dvě části jsou teoretické, ta třetí se zaměřuje na experimenty. V první části (kapitola 3) je nejdříve popsán vývoj holografické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně, včetně schémat navržených mikroskopů. Dále je představen nový multimodální holografický mikroskop, který byl umístěn v laboratoři Experimentální biofotoniky v roce 2013. Tento mikroskop byl také použit k experimentům diplomové práce. Disponuje celkem třemi módy (reflexní, transmisní a fluorescenční). Jeho schéma je zobrazeno na obrázku 3.4 a popsáno v sekci 3.2. V této sekci je také popsáno spuštění a nastavení mikroskopu před pozorováním a následně i zpracování získaného interferogramu.

V další části (kapitola 4) je pojednáno o vlivu vnějšího prostředí na buňky. V sekcích 4.2 a 4.3 je představena chemotaxe a osmóza buněk jako jeden z projevů jejich života. Části 4.2.3 a 4.3.2 obsahují rešerše na téma chemotaxe a osmotické jevy v mikroskopii. V rámci rešerše chemotaxe jsou představeny komůrky používané pro pozorování chemotaxe. V případě rešerše osmózy jsou představeny různé techniky použité k pozorování a také různé způsoby zpracování výsledků.

Druhá polovina diplomové práce je věnována experimentální části (kapitola 5). Je zde nejdříve pojednáno o kultivaci buněk K2 (část 5.1.1), které byly použity k experimentům. Dále jsou představeny používané komůrky μ -Slide Chemotaxis 2D a μ -Slide I Luer od firmy Ibidi, včetně jejich přípravy k pozorování (část 5.1.2). V dalších sekcích jsou představeny experimenty této práce — chemotaxe buněk (sekce 5.2) a osmóza buněk (sekce 5.3). V těchto částech je popsáno jak zpracování výsledků, tak i vyhodnocení dat a následně výsledky jednotlivých měření.

Sekce 5.2 je věnována experimentům chemotaxe buněk. Celkem byla provedena tři měření, ve kterých bylo cílem pozorovat pohyb buněk K2 na základě chemického podnětu. Jako chemoatraktant bylo použito fetální telecí sérum. V prvních dvou případech se buňky začaly pohybovat až několik hodin poté, co bylo přidáno fetální telecí sérum. V době, kdy byl pohyb zaznamenáván, se chemoatraktant nacházel v prostoru celé komůrky a chemotaxe nebyla očekávána. Ve třetím měření se buňky začaly pohybovat ihned po přidání chemoatraktantu, kdy bylo také zahájeno snímání. Ale ani v tomto případě se nepodařilo prokázat chemotaxi buněk, buňky se pohybovaly do všech směrů. Ve všech třech měřeních byl zaznamenán pohyb buněk, bohužel ani v jednom měření se však nejednalo o směrovou migraci — chemotaxi, nýbrž pouze o klasický pohyb buněk. Ani v jednom případě se nepotvrdil preferovaný směr pohybu (viz obrázek 5.21). Pohyby buněk byly zaznamenány do grafů a jsou zobrazeny na obrázcích 5.15, 5.17 a 5.19.

V další sekci (5.3) jsou představeny experimenty, ve kterých bylo cílem sledovat a zaznamenávat osmotické jevy v buňkách K2. Bylo provedeno dohromady pět měření. V prvních čtyřech měřeních bylo použito médium M1H v určitém poměru zředěné s vodou (9:1, 7:3, 3:7 a 1:9). V pátém měření bylo použito médium F10 s médiem H-MEMd 10 $\times$ v poměru 3:7. Ve všech případech protékalo médium pomocí pumpy přes komůrku s buňkami K2. Průtokem média M1H bylo způsobeno bobtnání buněk ve snaze o vyrovnání koncentrace přes polopropustnou membránu buněk. V případě, kdy bylo médium M1H v poměru s vodou 9:1 a 7:3, nebyl skok v hodnotách suché hmoty zpozorován. Nicméně tato reakce byla očekávána, protože rozdíl koncentrace vně a uvnitř buňky nebyl výrazný. V dalších dvou měřeních, kdy byl poměr média s vodou 3:7 a 1:9, skok v hodnotách suché hmoty

nastal. Hodnoty suché hmoty v závislosti na čase během osmotického děje jsou zobrazeny v grafech na obrázcích 5.24, 5.26, 5.28, 5.29, 5.31 a 5.32. V případě použití média F10 bylo způsobeno nejdříve smrštění buněk — komůrkou protékalo médium F10 společně s médiem H-MEMd 10× (hypertonický děj). Následně proběhl i opačný proces způsobený průtokem samotného média F10, kdy se buňky vrátily do původního stavu (hypotonický děj). Na této druhé části měření byla ukázána důležitost výběru oblasti (resp. hodnota prahování), ve které probíhalo vyhodnocení dat. V případě, kdy analýza probíhala v oblasti celé buňky a hodnota prahování byla nastavena na 0,06 rad nebyl zpozorován výrazný skok v hodnotách suché hmoty. Poté, co byla hodnota prahování nastavena na 0,40 rad a analýza proběhla pouze v okolí jádra buňky, byl skok v hodnotách suché hmoty daleko výraznější. Obě závislosti jsou zobrazeny v grafu na obrázku 5.34. Jednotlivá měření splnila očekávání a potvrdila biologické předpoklady.

Předem dané cíle (návrh vhodných experimentů s ohledem na využití výhod holografické mikroskopie, provedení a optimalizace navržených experimentů za použití multimodálního holografického mikroskopu, zpracování a vyhodnocení získaných dat) diplomové práce byly splněny. Byly navrženy a provedeny odpovídající experimenty chemotaxe a osmózy buněk. Získaná data byla dále zpracována a vyhodnocena. V případě chemotaxe buněk byla zvládnuta problematika trasování buněk, ke které sloužil program ImageJ. U osmotických jevů bylo navázáno na bakalářskou práci s názvem *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*. Pro výpočty byl opět použit přepočít fáze na hodnoty suché hmoty podle G. Popescua [15].

V rámci diplomové práce byly ukázány aplikace, které využívají výhod multimodálního holografického mikroskopu. Mezi největší výhody použití MHM v těchto aplikacích patří skutečnost, že hologram nese kvantitativní informaci o fázi, která je přímo úměrná suché hmotě buňky. Experimenty potvrdily, že multimodální holografický mikroskop je vhodným nástrojem pro neinvazivní pozorování živých buněk.

Literatura

- [1] ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [2] SHAKED, N. T., ZALEVSKY, Z., SATTERWHITE, L. L. *Biomedical optical phase microscopy and nanoscopy*. Academic Press, 2012.
- [3] RÝC, J., *Michelsonův interferometr*. Diplomová práce, VUT Brně, 2011.
- [4] Dostál, Z. *Interference microscopy*. Přednáška — předmět Mikroskopie a spektroskopie. 2015
- [5] CHMELÍK, R., HARNA, Z. *Parallel-mode confocal microscope*. Optical Engineering, vol. 38, p. 1635-1639, 1999.
- [6] CHYTKOVÁ, I. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – konstrukce a experiment*. Diplomová práce, VUT v Brně, 1999.
- [7] PROKOPOVÁ, M. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – teorie a konstrukce*. Diplomová práce, VUT v Brně, 1999.
- [8] PROKOPOVÁ, M. *Transmisní holografický konfokální mikroskop*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2002.
- [9] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2010.
- [10] CHMELÍK, R., ČOLLÁKOVÁ, J., KRÍŽOVÁ, A., DOSTÁL, Z., ANTOŠ, M., VAŠÍČEK D. *Multimodální holografický mikroskop — Společný projekt VUT a TESCAN*. Jemná mechanika a optika, č. 6-7, 2014.
- [11] SLABÝ, T., KOLMAN, P., DOSTÁL, Z., ANTOŠ, M., LOŠŤÁK, M., CHMELÍK, R. *Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope*. Optics Express, vol. 21, 14747-14762, 2013.
- [12] LEITH, E. N., UPATNIEKS, J. *Holography with Achromatic-Fringe Systems*. Journal of the Optical Society of America, vol. 57, p. 975-979, 1967.
- [13] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Diplomová práce, VUT v Brně, 2006.
- [14] ZIKMUND, T. *Matematické metody pro zpracování obrazu v biologických pozorováních*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2012.
- [15] KOVÁŘOVÁ, K. *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*. Bakalářská práce, VUT v Brně, 2013.
- [16] *Wikiskripta*. Difúze. [cit. 2015-2-16].
Dostupné z: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Difuze.html>>.

- [17] FICK, A. *Über diffusion*. Annalen der Physik, vol. 170, 1855.
- [18] Wikiskripta. Viskozita. [cit. 2015-2-16].
Dostupné z: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Viskozita.html>>.
- [19] BioMEMS Resource center. Chemotaxis. [cit. 2015-2-16].
Dostupné z: <http://www.biomemsrc.org/images/pdfs/lab2_chemotaxis.pdf>.
- [20] Wikipedia. Chemotaxis. [cit. 2015-2-16].
Dostupné z: <<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Chemotaxis.html>>.
- [21] ŠAFRÁNEK, D. *Úvod do systémové biologie*. Seminář. 2008
- [22] IRIMIA, D. *Microfluidic technologies for temporal perturbations of chemotaxis*. Annual review of biomedical engineering, vol 12, p. 259, 2010.
- [23] KOVAŘÍKOVÁ, P. et al. *Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk*. Klinická Onkologie, 2014.
- [24] ZANTL R., HORN E. *Chemotaxis of slow migrating mammalian cells analysed by video microscopy*. Cell Migration. Humana Press, p. 191-203, 2011.
- [25] ZICHA D., DUNN G. A. et al. *A new direct-viewing chemotaxis chamber*. Journal of Cell Science, vol. 99, p. 769-775, 1991.
- [26] ZICHA D., DUNN G. A. *Are growth factors chemotactic agents?*. Experimental cell research, vol. 221, p. 526-529, 1995.
- [27] Infoplease. Principles and importance of osmosis. [cit. 2015-2-16].
Dostupné z: <<http://www.infoplease.com/encyclopedia/science/osmosis-principles-osmosis.html>>.
- [28] LODISH, H. *Molecular cell biology*. Macmillan, 2008.
- [29] BOSS, D. et al. *Measurement of absolute cell volume, osmotic membrane water permeability, and refractive index of transmembrane water and solute flux by digital holographic microscopy*. Journal of biomedical optics, vol. 18, 036007-036007, 2013.
- [30] WITTE, S. et al. *Short-coherence off-axis holographic phase microscopy of live cell dynamics*. Biomedical optics express, 2012.
- [31] WITTE, S., PLAUSKA, A., GROOT, M. *Short-Coherence Off-Axis Holographic Microscopy of Live Cell Dynamics*. Digital Holography and Three-Dimensional Imaging. Optical Society of America, vol. 3, p. 2184-2189 2012.
- [32] HUANG, D. et al. *Optical coherence tomography*. Science, vol. 254, p. 1178-1181, 1991.
- [33] CUCHE, E., BEVILACQUA, F., DEPEURSINGE, C. *Digital holography for quantitative phase-contrast imaging*. Optics letters, vol. 24, p. 291-293, 1999.
- [34] PARK, Y. et al. *Measurement of the nonlinear elasticity of red blood cell membranes*. Physical Review E, vol. 83, 051925, 2011.

LITERATURA

- [35] VESELÝ, P., et al. *Spontaneously metastasizing rat sarcomas LW13K2 and RPS: assessment by the immunogenetic test of malignancy, in vitro behaviour and karyology*. Folia biologica, vol. 35, p. 1-12, 1988.
- [36] BARTONÍČEK, J. *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Bakalářská práce, VUT v Brně, 2001.
- [37] *MicroscopyU*. Introduction to Phase Contrast Microscopy. [cit. 2013-2-4]. Dostupné z: <<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>>.
- [38] *Ibidi*. Cells in focus. [cit. 2015-2-16]. Dostupné z: <<http://www.ibidi.com.html>>.
- [39] *Wimtaxis*. Automated cell tracking. [cit. 2015-4-10]. Dostupné z: <<http://www.wimasis.com/en/products/11/WimTaxis>>.
- [40] FERREIRA, T. A., RASBAND, W. *The ImageJ user guide*. National Institutes of Health, USA, 2010.
- [41] *Tracking plugin*. Manual Tracking. [cit. 2014-9-10]. Dostupné z: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/ManualTrackingplugin.pdf>>.
- [42] *Chemotaxis tools*. Chemotaxis and Migration Tools. [cit. 2014-9-10]. Dostupné z: <http://ibidi.com/fileadmin/products/software/chemotaxis_tool/Manual_ChemotaxisTool_2.0_eng.pdf>.
- [43] POPESCU, G., et al. *Optical imaging of cell mass and growth dynamics*. American Journal of Physiology — Cell Physiology, vol. 295, p. C538-C544, 2008.