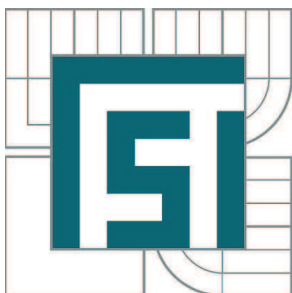


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



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

KOHERENCÍ ŘÍZENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP VE VÝZKUMU ŽIVOTNÍHO CYKLU BUŇKY

COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE IN CELL'S LIFE CYCLE
RESEARCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ANETA JEBÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. HANA UHLÍŘOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Aneta Jebáčková

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:

Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky

v anglickém jazyce:

Coherence-controlled holographic microscope in cell's life cycle research

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Digitální holografický mikroskop v transmisním módu je vhodným nástrojem pro pozorování transparentních biologických preparátů. Požijte zobrazení tímto mikroskopem pro záznam a analýzu životního cyklu buňky.

Cíle diplomové práce:

Pozorujte životní cykly buněk v holografickém mikroskopu a analyzujte je využitím dynamických fázových diferencí nebo jinou navrženou metodou. Porovnejte fáze cyklu zobrazení v tomto mikroskopu s jinou mikroskopovou technikou.

Seznam odborné literatury:

- [1] Dunn G. A.: Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time. Proceedings of the Royal Microscopical Society 33, 189-196 (1998).
- [2] Ross K. F. A.: Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. Edward Arnold Ltd., London (1967).
- [3] Barer R.: Interference microscopy and mass determination. Nature 169, 366-367 (1952).
- [4] Cuhe E., Bevilacqua F., Depeursinge C.: Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. Opt. Lett. 24, 291-293 (1999).
- [5] Dubois F., Joannes L., Legros J.-C.: Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. Appl. Opt. 38, 7085-7094 (1999).
- [6] Indebetouw G., Klysubun P.: Imaging through scattering media with depth resolution by use of low-coherence gating in spatiotemporal digital holography. Opt. Lett. 25, 212-214 (2000).
- [7] Dubois F., Yourassowsky C., Monnom O., Legros J.-C., Debeir O., Ham P. V., Kiss R., Decaestecker C.: Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. Journal of Biomedical Optics 11 (5), 054032 (2006).
- [8] Janečková H.: Interferenční mikroskopie biologických vzorků. Diplomová práce, Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně (2006).

Vedoucí diplomové práce: Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2011/2012.

V Brně, dne 24.11.2011

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan fakulty

Abstrakt

Předmětem diplomové práce bylo použití koherencí řízeného holografického mikroskopu ve výzkumu životního cyklu buňky.

V práci je stručně popsána historie interferenční mikroskopie a její aplikace v biologii. Zmíněny jsou i ostatní mikroskopové techniky používané k zobrazování transparentních objektů a stručně je vysvětlena biologie buněčného cyklu.

V rámci práce byly navrženy charakteristiky pro popis tvaru buňky, které byly testovány s ohledem na identifikaci jednotlivých fází života buňky. Metoda dynamických fázových diferencí byla modifikována tak, aby byl odlišen vnitřní pohyb hmoty buňky od pohybu hmoty buňky jako celku. Vybrané charakteristiky pak byly použity k vyhodnocení pozorování provedených v holografickém mikroskopu a byly navrženy možnosti jejich dalšího využití.

V závěru práce byly shrnuty získané poznatky a byly navrženy úpravy konstrukce mikroskopu a softwaru pro zpracování dat.

Klíčová slova

Digitální holografická mikroskopie, zobrazování živých buněk, online řízení mikroskopu, charakteristiky tvaru buněk.

Abstract

The goal of this diploma thesis was using of a coherence-controlled holographic microscope in cell's life research.

A brief history of interference microscopy and it's applications in biology is described. Also other microscopy techniques routinely used for transparent objects imaging are mentioned and the biology of cell's life cycle briefly explained.

Characteristics describing the shape of a cell were proposed and tested with respect to identification of particular phases of its life cycle. The method of dynamic phase differences was modified in order to distinguish the internal motion of cell's mass from the movement of the whole cell. Selected characteristics were used to evaluate observations carried out with the holographic microscope and the possibilities of their further applications were depicted.

In conclusion, obtained findings were summarized and modifications of microscope construction as well as data-processing software were suggested.

Key words

Digital holographic microscope, live cell imaging, online controlled microscope, cell's shape characteristics.

Bibliografická citace této práce

JEBÁČKOVÁ, A.: Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky, Brno, 2012. 59 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Vedoucí diplomové práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala v celém rozsahu samostatně pod vedením Ing. Hany Uhlířové, Ph.D. a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Brně 25. 5. 2012

.....

Aneta Jebáčková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala Ing. Haně Uhlířové, Ph.D za odborné vedení a cenné připomínky. Děkuji také MUDr. Pavlu Veselému, CSc. za biologické konzultace a všem z laboratoří Optické mikroskopie a Experimentální biofotoniky, kteří mi byli nápomocni. Můj srdečný dík patří také příteli a rodině za velkou podporu během studia.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Stručná historie interferenční mikroskopie	1
1.2.	Aplikace interferenčních mikroskopů v biologii.....	2
1.3.	Rozdělení interferenčních mikroskopů	3
1.4.	Holografická mikroskopie na VUT v Brně	3
2.	Motivace práce a cíle práce	4
3.	Metody zobrazování fázových objektů	5
3.1.	Fluorescenční mikroskopie	5
3.2.	Klasický fázový kontrast	7
3.3.	Diferenciální interferenční kontrast	9
3.4.	Digitální holografická mikroskopie	11
4.	Buněčný cyklus	13
5.	Zpracování hologramu a význam obrazové fáze	16
6.	Matematický popis tvaru buňky	18
6.1.	Popis tvaru buňky v rovině	18
6.2.	Popis tvaru buňky v prostoru	22
7.	Průběh vybraných charakteristik během buněčného dělení	25
8.	Metoda dynamických fázových diferencí	32
8.1.	Modifikovaná metoda dynamických fázových diferencí	33
9.	Experimenty	36
9.1.	Příslušenství digitálního holografického mikroskopu pro biologii	36
9.2.	Pozorování buněčného dělení	37
9.3.	Pozorování životního cyklu buňky.....	41
10.	Závěr	47
	Bibliografie.....	49

1. Úvod

Snaha o lepší zobrazení transparentních biologických objektů vedla k rozvoji optických metod, které zvyšují kontrast v obraze. V biologii se v současné době k neinvazivnímu zobrazení transparentních objektů nejvíce využívá metod klasického fázového kontrastu a diferenčního interferenčního kontrastu. Tyto metody sice zviditelňují transparentní objekty, ale představa získaná o rozložení fáze je pouze kvalitativní. Kvantitativní informaci o velikosti a rozložení fáze v transparentních objektech poskytují interferenční techniky [1].

Ještě před čtyřiceti nebo padesáti lety byly interferenční mikroskopy považovány za vrchol optických a mechanických možností v oboru světelné mikroskopie. Výrobci mezi sebou soupeřili o to, kdo vyrobí nový a lepší model, některé modely byly stejně drahé jako tehdejší elektronové mikroskopy. A každý optik, který zdatně zvládal jejich obsluhu, byl zahrnován úctou blízkou obdivu (volně přeloženo z [2]).

1.1. Stručná historie interferenční mikroskopie

První praktický interferenční mikroskop s odděleným předmětovým a referenčním svazkem popsal J. L. Sirks v roce 1893. To uplynulo přibližně 200 let od doby, kdy R. Hooke poprvé popsal interferenci, fantastické barvy interferenčních proužků pozorovaných na kousku slídy [2].

V 50. letech 20. století zkonstruoval W. Horn transmisní interferenční mikroskop. Konstrukčně se jednalo o dva mikroskopy ve dvou větvích Machova-Zehnderova interferometru. Jednoduchý systém hranolů a děličů svazku rozdělil osvětlovací svazek rovnoměrně mezi dvě větve mikroskopu a identický systém prošlé svazky znovu skládal [2]. V 60. letech 20. století byla navržena konstrukce označovaná „Jamin-Lebedeff“, ve které bylo využíváno polarizovaného světla [2]. Tato konstrukce umožňovala měření rozdílu optických drah svazků předmětové a referenční větve. Další konstrukcí interferenčních mikroskopů bylo nepřeberné množství a tyto mikroskopy byly využívány především v interferometrii [3]. V biologii se interferenční mikroskopie v tomto období nevyužívala, s výjimkou práce H. G. Davise a M. H. Wilkinse, kteří v roce 1952 interpretovali význam rozdílu optických drah způsobený buňkou [4].

Až do 90. let 20. století nebyla interferenční mikroskopie doceněna, a to především kvůli vysoké ceně interferenčních mikroskopů a kvůli chybějící výpočetní technice, která by umožňovala rychlý a jednoduchý záznam obrazu a jeho následné zpracování [2].

V posledních 20. letech dochází k obnovení zájmu o interferenční mikroskopii především v biomedicínských aplikacích. I když tato technika nedosáhla rozšířenosti fluorescenčních či konfokálních mikroskopů, stala se opět i komerčně dostupnou (Lyncée Tec, Phase Holographic Imaging AB a Resolution Optics).

1.2. Aplikace interferenčních mikroskopů v biologii

Význam interferenční mikroskopie pro biologii odhaluje ve svém článku [2] G. A. Dunn, který uvádí historický přehled a nastiňuje možnosti využití interferenční mikroskopie v budoucnosti s podporou výkonnější výpočetní techniky. G. A. Dunn společně s D. Zichou zkonstruovali interferenční mikroskop založený na Hornově konstrukci. Systém nazvaný „DRIMAPS“ (digitally recorded interference microscopy with automatic phase shifting) používali k analýze růstu a chování savčích kultivovaných buněk [2].

V současné době se biologickými aplikacemi interferenční mikroskopie zabývá několik výzkumných skupin. Významné výsledky a aplikace tří skupin jsou shrnuty v následujících odstavcích.

K nejvýznamnějším vědeckým skupinám v tomto oboru patří skupina ze švýcarského Lausanne, kterou vede Ch. Depeursinge. Tato skupina zkonstruovala digitální holografický mikroskop založený na původním rekonstrukčním algoritmu [5] s uspořádáním odpovídajícím Machovu-Zehnderovu interferometru. Jejich aplikace se zabývají především zobrazením kultivovaných savčích buněk, např. neuronů [1]. Pro dlouhodobá pozorování navrhuje metodu kompenzace mechanické a termální nestability systému monitorováním změn optické dráhy v oblastech mimo buňky. Výšku buněk určují z přepočtu obrazové fáze pomocí průměrného indexu lomu buňky ($n=1,375$, převzatého z [6]). V publikaci z roku 2008 [7] tato skupina uvádí, že optický dráhový rozdíl poskytuje informaci jak o buněčné morfologii, tak o indexu lomu buňky v daném místě. Z tohoto důvodu zůstává obrazová fáze velmi těžká pro interpretaci. Aby vyřešili tento problém, navrhuje metodu digitální holografické mikroskopie se dvěma vlnovými délkami, která umožňuje současně určit tvar i index lomu v daném místě pozorovaného vzorku.

Dále se digitální holografickou mikroskopií zabývá skupina z německého Muensteru, kterou vede B. Kemper. Využívají komerční světelný mikroskop, který upravili pro digitální holografickou mikroskopii zařazením laserového zdroje, z něhož jsou světelné svazky předmětové a referenční větve přivedeny jednomodovými optickými vlákny ke vzorku a kameře. Výšku buněk určují přepočtem z optické dráhy změřené pomocí holografického mikroskopu a integrálního indexu lomu buňky. Index lomu buňky vypočítají z referenčního objektu, kterým je vzduchová bublina zachycená v tom stejném preparátu [8]. Zavádí nově automatizovaný multifokus numerickým přeastřováním obrazu, což jim umožňuje dlouhodobá pozorování, jako na příklad monitorování reakcí buněk na toxiny, osmotické změny a změny morfologie červených krvinek [9].

Významná je také americká výzkumná skupina, kde působí G. Popescu. Tato skupina používá širší spektrum interferenčních technik a ve svých publikacích [10], [11], [12] se zabývají především numerickou analýzou obrazové fáze. Navržené postupy používají například při monitorování suché hmoty buňky vypočtené z obrazové fáze za rozdílných kultivačních podmínek [11].

1.3. Rozdělení interferenčních mikroskopů

Interferenční mikroskopy lze rozdělit do dvou základních skupin podle úhlu, který svírá předmětový a referenční svazek ve výstupní rovině interferometru.

Jako interferometrické, případně fourierovské, se označují mikroskopy s nulovým úhlem, kde se předmětový a referenční svazek schází v ose (in-line) a k rekonstrukci obrazu je třeba více interferogramů [1], [13]. Standardně se k rekonstrukci obrazu používají čtyři interferogramy, které se zaznamenávají při různých hodnotách posuvu fáze mezi předmětovou a referenční vlnou. Tato metoda se označuje jako „phase shifting“ nebo „phase stepping“. Nevýhodou této metody je vyšší časová náročnost a nižší stabilita, kvůli nutnosti mechanicky realizovat fázové posuvy [14].

Jako holografické, případně hilbertovské, se označují mikroskopy s nenulovým úhlem, ve kterých nastává mimosová interference (off-axis). Zobrazení digitálního holografického mikroskopu umožňuje rekonstrukci obrazu intenzity i obrazu fáze z jediného hologramu a výhodou je nižší časová náročnost a vyšší stabilita metody [1], [13], [14], [15].

1.4. Holografická mikroskopie na VUT v Brně

První holografický mikroskop využívající achromatického interferometru pro mimoosové holografické zobrazení v odraženém světle byl zkonstruován autory R. Chmelíkem a Z. Harnou [16].

Vývoj transmisního holografického mikroskopu byl započat v roce 1999 v rámci diplomových prací I. Chytkové [17] a M. Prokopové [18]. V rámci doktorského studia M. Prokopové byl pak vytvořen první prototyp [19].

Na tuto práci navázal P. Kolman, který v rámci své disertační práce [13] navrhl a zkonstruoval transmisní holografický mikroskop s mimoosovým achromatickým a prostorově invariantním interferometrem. Mikroskop umožňuje osvětlení plošným, časově i prostorově nekoherentním zdrojem světla. Tento mikroskop má podobu samostatně stojícího přístroje a byl použit pro získání experimentálních dat této diplomové práce. Základní fyzikální principy a uspořádání mikroskopu jsou shrnuty v části 3.4.

Biologickým aplikacím transmisního holografického mikroskopu se věnovala H. Uhlířová, jak ve své diplomové [20], tak disertační práci [15]. Pozorování biologických preparátů umožnila spolupráce s J. Brábkem a D. Röselem z Laboratoře invazivity nádorových buněk, Karlovy University v Praze a s P. Veselým z Laboratoře popálenin nemocnice Na Vinohradech v Praze. Na základě této spolupráce byla na Ústavu fyzikálního inženýrství zřízena Laboratoř experimentální biofotoniky, jejíž součástí jsou i prostory pro kultivaci buněk.

2. Motivace práce a cíle práce

Holografická mikroskopie je neinvazivní zobrazovací technika, která umožňuje zobrazování transparentních preparátů bez složité předchozí přípravy. Tato metoda nedosahuje specifčnosti fluorescenční mikroskopie, která umožňuje detekovat až jednotlivé molekuly. Na druhou stranu však téměř nezasahuje do fyziologie vzorku, což je velkou výhodou především při dlouhodobých pozorováních. Poskytuje také jedinečnou informaci o fázi indukované vzorkem, která je v případě zobrazení buněk přímo úměrná jejich suché hmotě.

Buněčný životní cyklus je dlouhodobý proces, který je možné věrohodně interpretovat pouze v podmínkách velmi citlivé kontroly fyziologie buňky. Proto je důležité volit takové metody zobrazení, které co nejméně zasáhnou do přirozeného procesu buňky. Digitální holografický mikroskop s nízkou koherencí světla poskytuje kvantitativní kontrast bez přítomnosti barviv při použití nízké intenzity osvětlení. Kvantitativní kontrast této metody navíc reflektuje dynamiku suché hmoty buňky.

Cílem mojí diplomové práce bylo provést pozorování na rekonstruovaném přístroji a najít optimální nastavení parametrů mikroskopu. Hlavním cílem experimentální části bylo zmonitorovat celý životní cyklus buňky a provedená měření zpracovat a analyzovat. K zpracování naměřených dat měl být otestován a použit již částečně vyvinutý program pro zpracování hologramů wxide. Provedená měření měla být analyzována a vyhodnocena s prověřením možnosti budoucího online řízení mikroskopu.

Online řízením mikroskopu se rozumí definice vhodných parametrů, které by sloužili pro automatický výběr vhodné buňky pro pozorování, automatické sledování vybrané buňky, nastavení vhodného intervalu snímání, identifikaci správného zaostření a nastavení mikroskopu. Online řízení mikroskopu by výrazně snížilo nároky na budoucího uživatele a usnadnilo tak komerční uplatnění mikroskopu.

3. Metody zobrazování fázových objektů

Zobrazování živých buněk je jedním z hlavních cílů světelné mikroskopie již od samotného jejího počátku. Živé buňky, ačkoli obsahují fotosyntetické pigmenty nebo vysoké koncentrace barevných metabolických produktů, se blíží fázovým (transparentním) objektům. To znamená, že prochází-li světlo buňkou, mění se významně jen jeho fáze a ne amplituda. Protože typické detektory (oko, kamera) jsou citlivé na změnu intenzity světla a změnu světelné fáze zaznamenat nemohou, jsou pozorované buňky při zobrazování ve světlém poli většinou málo kontrastní [21]. Kontrast v obraze můžeme v jednoduchém optickém systému ovlivnit nastavením aperturní a polní clony, eliminací optických vad jednotlivých komponentů nebo použitím detektoru s větším dynamickým rozsahem. Mnohem účinnější je však použití speciálních technik, například: barvení buněk, které se vyvinulo do podoby fluorescenční mikroskopie; nebo technik zvýšení kontrastu, které převádějí rozdíly ve fázi na zaznamenatele rozdíly v intenzitě.

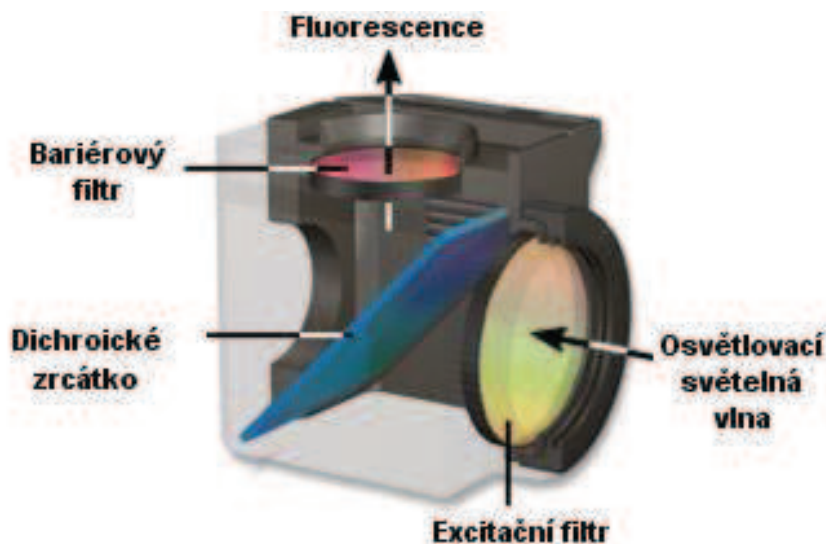
3.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční jev jako první popsal v roce 1852 britský vědec G.G.Stokes, když pozoroval fluorit, který po ozáření ultrafialovým světlem vyzařuje světlo viditelné. Fluorescenční jev je založen na principu absorpce světla a následného vyzáření světla delší vlnové délky, což odpovídá představě o energiových hladinách atomů a pohlcení části energie při nezářivých procesech. Rozdíl mezi vlnovou délkou emitovaného světla a vlnovou délkou excitačního světla se označuje jako Stokesův posuv.

Některé látky vykazují fluorescenci zcela přirozeně, takové látky se nazývají autofluorescenční. Aby mohly být pozorovány i ostatní látky, musí být uměle obarveny. Možnost vysoce specifického barvení biologických tkání a buněk umožnila fluorescenční mikroskopii stát se velmi významnou technikou v biologii a v medicíně. Fluorescenční barviva jsou nyní vyráběny s různými excitačními a emisními vlnovými délkami a lze je cíleně na specifické složky živé hmoty i na samotné molekuly. Fluorescenční mikroskop tak může odhalit i přítomnost jediné molekuly, aniž by jeho rozlišovací schopnost překračovala difrakční limit.

Základní funkcí fluorescenčního mikroskopu je ozářit vzorek požadovanými vlnovými délkami a poté spektrálně separovat emitované světlo mnohem nižší intenzity (řádově stotisíckrát) a přivést je k detektoru. Výběr požadovaných vlnových délek je realizován optickými filtry, které jsou uspořádány do takzvané fluorescenční kostky. Její schéma je na obrázku 3–1. Součástí fluorescenční kostky je excitační filtr, dichroické zrcátko a bariérový (emisní) filtr. Světelný svazek prochází nejprve excitačním filtrem, který propouští pouze požadované vlnové délky. Tyto vlnové délky jsou následně odraženy dichroickým zrcátkem a dopadají na vzorek. Ze vzorku vychází zpět ke kostce emitované světlo o delší vlnové

délce, které dichroickým zrcátkem prochází a bariérovým filtrem jsou vybrány pouze vlnové délky fluorescence, kterou chceme pozorovat.

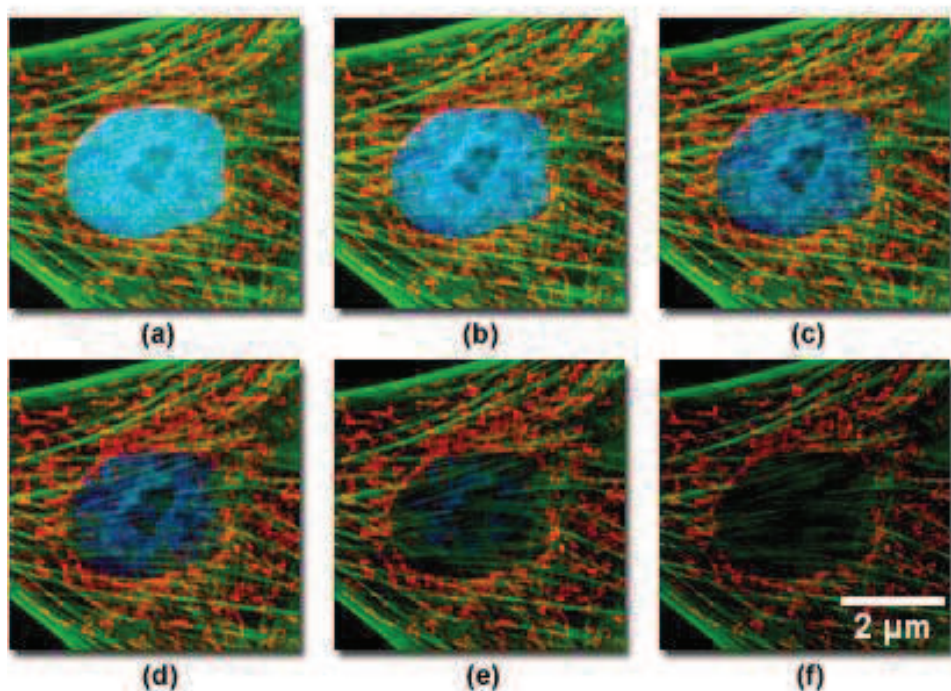


Obrázek 3-1: Schéma fluorescenční kostky, převzato z [22].

V současné době existuje mnoho zobrazovacích technik využívajících fluorescence, jako například:

- FLI (fluorescence lifetime imaging) – měření života fluorescenční molekuly,
- FRET (Förster resonance energy transfer) – nezářivý energetický přenos mezi molekulami dárce a příjemce v blízkém kontaktu,
- FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) – zotavení fluorescence po vybělení,
- TIRF (total internal reflection fluorescence) – fluorescence vybuzená evanescentní vlnou při totálním odrazu.

Problémem fluorescence je blednutí barviv v důsledku konečného počtu excitačně-emisních cyklů. Různá barviva jsou v tomto ohledu různě stabilní, jak ukazuje obrázek 3–2. Základem pro minimalizaci tohoto efektu je velmi citlivý detektor (fotonásobiče s vysokou citlivostí) společně s nízkou intenzitou osvětlení.



Obrázek 3-2: Příklad blednutí fluorescence pozorované na sekvenci snímků s intervalem 2 minuty. Na snímcích jsou savčí fibroblasty, jádro je obarveno modře, mitochondrie jsou obarveny červeně a aktinový cytoskelet je obarven zeleně. Z obrázků je zřejmé, že různá fluorescenční barviva blednou různě rychle. Převzato z [22].

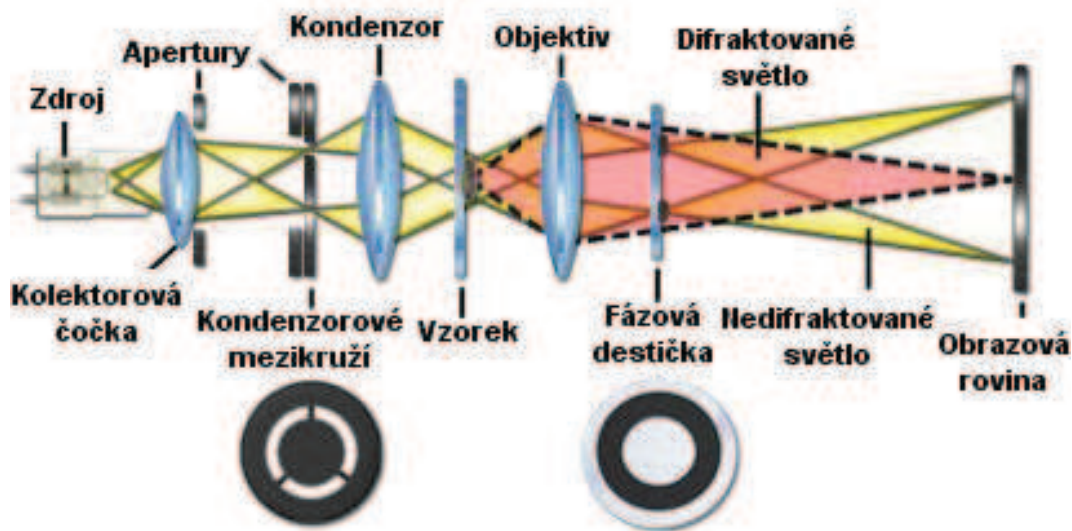
Více informací o fluorescenční mikroskopii lze najít například v [21] a [22].

3.2. Klasický fázový kontrast

Klasický, nebo také Zernikův, fázový kontrast byl poprvé popsán v roce 1934 holandským fyzikem F. Zernikem a umožnil zobrazování typicky transparentních objektů s vysokým kontrastem. Ke zvýšení kontrastu je využíváno optického principu, který převádí malé rozdíly ve fázi na detekovatelné změny v amplitudě.

Hlavní výhodou klasického fázového kontrastu je možnost zobrazování živých buněk, bez předchozího barvení a fixace, v jejich přirozeném stavu a tedy možnost pozorování biologických procesů.

Schéma typického vzpřímeného fázového mikroskopu i se znázorněním principu převězení změny fáze na změnu amplitudy je zobrazeno na obrázku 3–3.

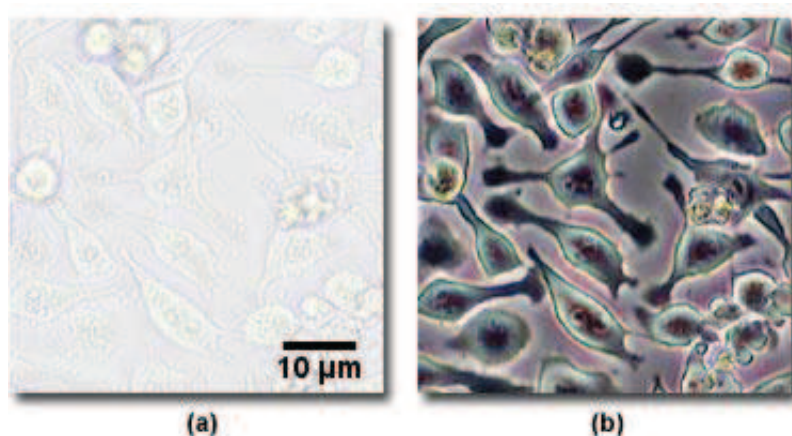


Obrázek 3-3: Optické schéma mikroskopu s klasickým fázovým kontrastem, převzato z [23].

Částečně koherentní osvětlení vytvářené wolfram-halogenovou žárovkou je kolektorovou čočkou fokusováno na kondenzorové mezikruží umístěné v přední ohniskové rovině kondenzoru. Vzniká tak dutý světelný kužel, který osvětluje vzorek. Světlo pak prochází rovinou vzorku a je rozděleno na dvě části: na světelnou vlnu, která je vzorkem difraktována a na světelnou vlnu, která prochází bez difrakce. Obě vlny dále procházejí objektivem a fázovou destičkou, která je umístěná v zadní ohniskové rovině objektivu. Přitom každá ze světelných vln prochází jinou částí fázové destičky. Při pozitivním fázovém kontrastu prochází nedifraktovaná vlna tou částí destičky, která posune její fázi o $+\pi/4$. Obě světelné vlny jsou fokusovány do obrazové roviny, kde v důsledku uvedeného posuvu dochází k destruktivní interferenci a vytváří se kontrastní obraz. Při negativním fázovém kontrastu je posuv způsobený fázovou destičkou $-\pi/4$ a dochází ke konstruktivní interferenci.

Nevýhodou zobrazování v klasickém fázovém kontrastu je vznik halo efektu v místech velkých gradientů optické dráhy.

Obrázek 3-4 zachycuje vzorek pozorovaný ve světlém poli a v klasickém fázovém kontrastu. Ve světlém poli se buňky jeví téměř průhledné, vidíme jen oblasti s velkou změnou optické dráhy, jako jsou membrány nebo jádra. Na snímku z klasického fázového kontrastu stejné zorné pole ukazuje mnohem více strukturních detailů a v obraze je vyšší kontrast.



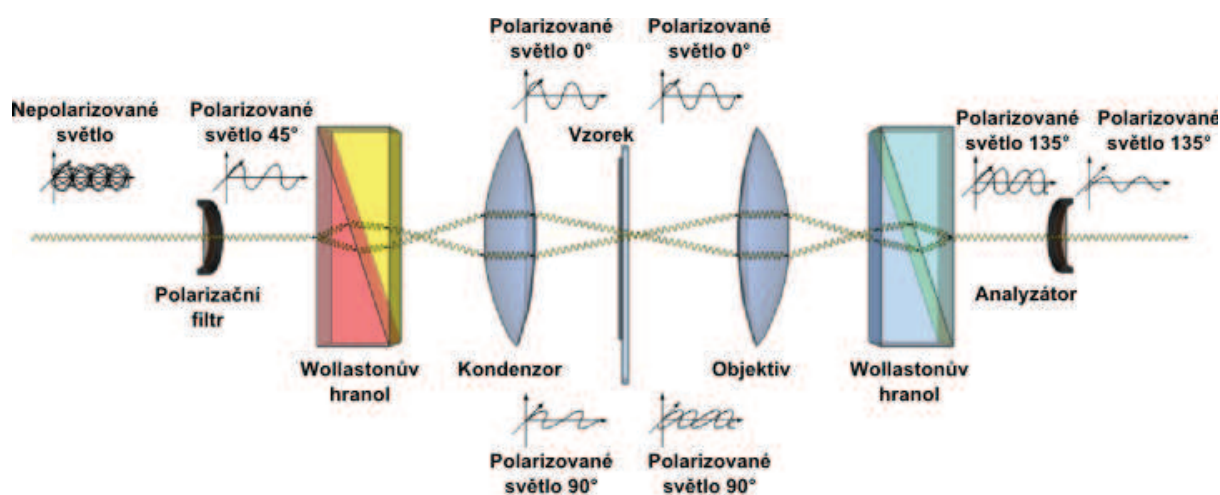
Obrázek 3-4: Zobrazení (a) ve světlém poli, velmi malý kontrast, buňky jsou téměř průhledné (b) v klasickém fázovém kontrastu, vyšší kontrast a více strukturních detailů; převzato z [23].

Více informací o technice klasického fázového kontrastu lze nalézt v [21], [23] a [24].

3.3. Diferenciální interferenční kontrast

Metoda diferenciálního interferenčního kontrastu je založena na použití modifikovaného Wollastonova hranolu. Tento hranol, sloužící k detekci optických gradientů a jejich převedení na rozdíly v intenzitě, modifikoval pro potřeby mikroskopie v 50. letech 20. století francouzský fyzik G. Nomarski.

Základní schéma uspořádání optických prvků pro diferenciální interferenční kontrast je zachyceno na obrázku 3–5.

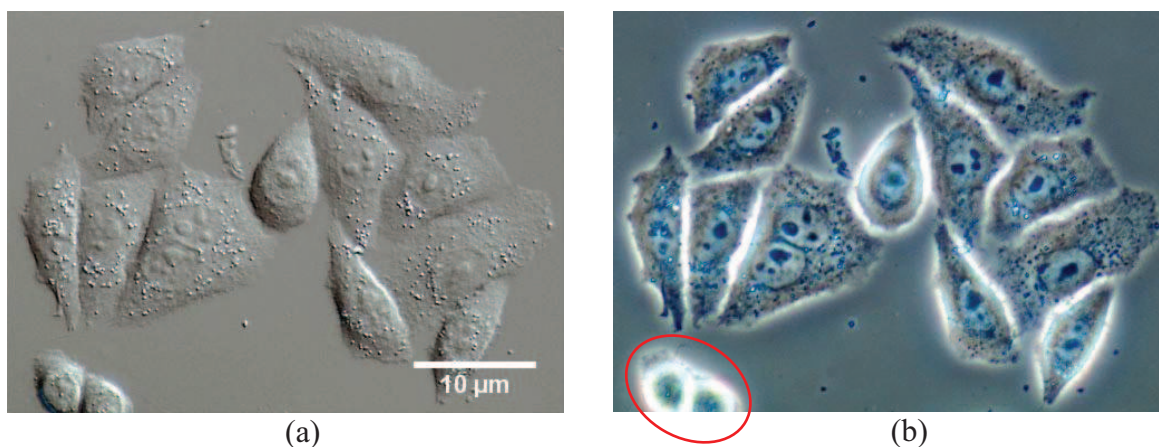


Obrázek 3-5: Optické schéma mikroskopu s diferenciálním interferenčním kontrastem, převzato z [25].

Světelný svazek je nejprve polarizován a pak vstupuje do modifikovaného dělicího Wollastonova hranolu, kde je rozdělen na dva svazky s vzájemně kolmými rovinami polarizace. Tyto dva svazky procházejí sestavou blízko sebe (ve vzorku asi $0,2\text{ }\mu\text{m}$ od sebe), ale v jemně odlišných směrech. Svazky se kříží v přední ohniskové rovině kondenzoru, protože jsou však jejich polarizace navzájem kolmé, nemohou interferovat. Rozdělené svazky dále prochází vzorkem, kde je jejich vlnoplocha modifikována v závislosti na tloušťce nebo indexu lomu vzorku. Poté svazky vstupují do objektivu a jsou fokusovány před jeho zadní ohniskovou rovinu, kde vstupují do druhého modifikovaného Wollastonova hranolu. Tento hranol skládá oba svazky dohromady v definované rovině mimo hranol. Tím je odstraněno posunutí svazků. Jako výsledek průchodu vzorkem jsou dráhy svazků rozdílné. Aby došlo k interferenci, je třeba, aby oba svazky byly stejně polarizované. Toto zajišťuje analyzátor umístěný za druhým Wollastonovým hranolem. Světelné svazky interferují a vzorek je pozorován s viditelnými rozdíly v intenzitě a barvě.

Mezi výhody metody diferenciálního interferenčního kontrastu patří dobré rozlišení a nepřítomnost halo efektů. Nevýhodou je vyšší cena zařízení a vznik parazitních obrazů při zobrazování dvojlomných vzorků.

Ukázka zobrazení metodou diferenciálního interferenčního kontrastu v porovnání s klasickým fázovým kontrastem je na obrázku 3–6. Další informace lze nalézt v [21] a [26].



Obrázek 3-6: Savčí buňky zobrazené (a) v diferenciálním interferenčním kontrastu, (b) v klasickém fázovém kontrastu, halo efekt je nejvíce patrný u buněk v levém spodním rohu. Převzato z [23].

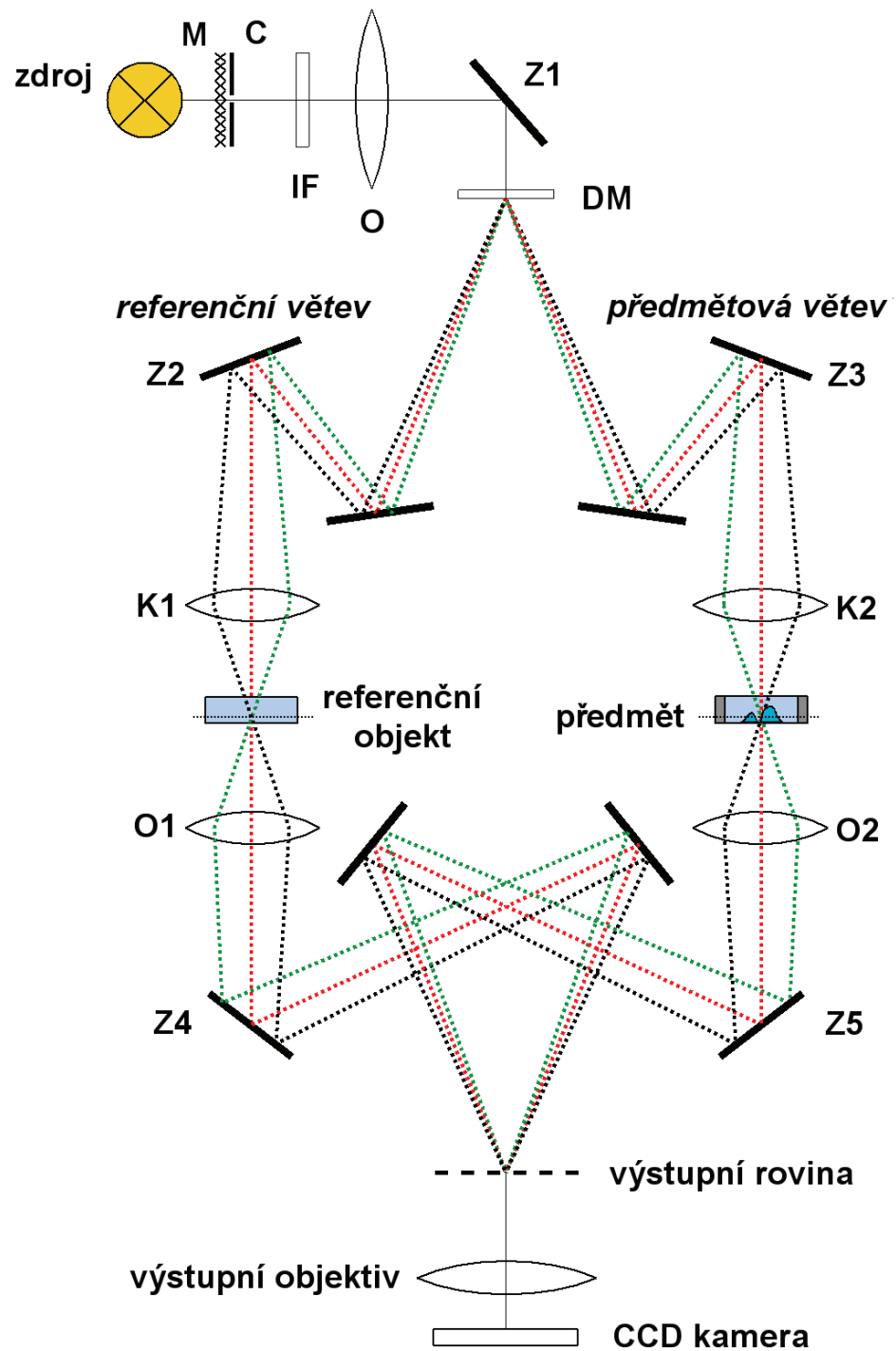
3.4. Digitální holografická mikroskopie

V digitální holografické mikroskopii je interferenční obrazec opticky vytvářen superpozicí předmětového a referenčního svazku. Přičemž šíření optického pole je kompletně a přesně popsáno difrakční teorií, která umožňuje numerickou rekonstrukci obrazu amplitudy i fáze [5]. Digitální holografická mikroskopie, v transmisní i reflexní podobě, byla na VUT v Brně rozebírána již v řadě publikací, například [15], [20], [27], proto je zde uveden pouze stručný popis použitého mikroskopu.

Koherenčně řízený holografický mikroskop, který byl použit k získání experimentálních dat pro tuto práci, byl sestaven P. Kolmanem v rámci disertační práce [13]. V této práci je také detailně popsán jak z konstrukčního tak z funkčního hlediska. Pro přehlednost je zde na obrázku 3–7 uvedeno základní schéma uspořádání tohoto mikroskopu.

Koherenčně řízený holografický mikroskop se v základním členění výrazně neliší od běžného optického mikroskopu. Skládá se z osvětlovací a zobrazovací soustavy a na výstupu je opatřen detektorem. Hlavní rozdíl spočívá v tom, že je složen ze dvou totožných mikroskopů, které jsou umístěny ve větvích Machova-Zehnderova interferometru. Obě větve interferometru jsou vzhledem k možnosti použití nekoherentního osvětlení opticky shodné a zrcadlově symetrické podél osy interferometru [13].

Osvětlovací soustava se skládá ze zdroje, matnice (M), vyměnitelných clonek (C), interferenčního filtru (IF) a čočky (O). Jako zdroj slouží halogenová lampy, která poskytuje bílé světlo. Interferenčním filtrem (IF) je vybíráno červené světlo o vlnové délce 650 nm, které má nižší energii než bílé světlo a je tkáněmi méně rozptylováno. Čočka (O) zobrazuje zdroj přes zrcátka (Z1, Z2 a Z3) do zadní ohniskové roviny kondenzorů (K1 a K2) a tím zajišťuje rovnoměrné osvětlení předmětu. Lineární fázová difrakční mřížka (DM) působí jako dělič světelného svazku. Zrcátka (Z2 a Z3) se následně vybírají +1. a -1. difrakční řády, které tvoří svazky předmětové a referenční větve. Svazek předmětové větve prochází kondenzorem (K2) a předmětem do objektivu (O2), který předmět zobrazí do výstupní roviny. Průchod svazku referenční větvi je stejný až na to, že mezi kondenzorem (K1) a objektivem (O1) je pouze referenční objekt. Referenční objekt a předmět se v ideálním případě liší pouze přítomností zobrazovaného předmětu. V našem konkrétním případě používáme identickou pozorovací komůrku se stejným médiem jako je ve vzorku a jedinou odlišností je tedy samotný předmět (buňky). Zrcátka (Z4 a Z5) jsou svazky předmětové a referenční větve směřovány do výstupní roviny. Ve výstupní rovině svazky z obou větví interferují. Tak vzniká hologram s interferenčními proužky s nosnou prostorovou frekvencí. Za výstupní rovinou je umístěn výstupní objektiv, který hologram zvětšuje a zobrazuje na čip CCD kamery.



Obrázek 3-7: Optické schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu;
M - matnice, C - clony, IF - interferenční filtr, O - čočka, Z1-Z5 - zrcátka, DM - difrakční mřížka,
K1 a K2 - kondenzory, O1 a O2 - objektivy.

4. Buněčný cyklus

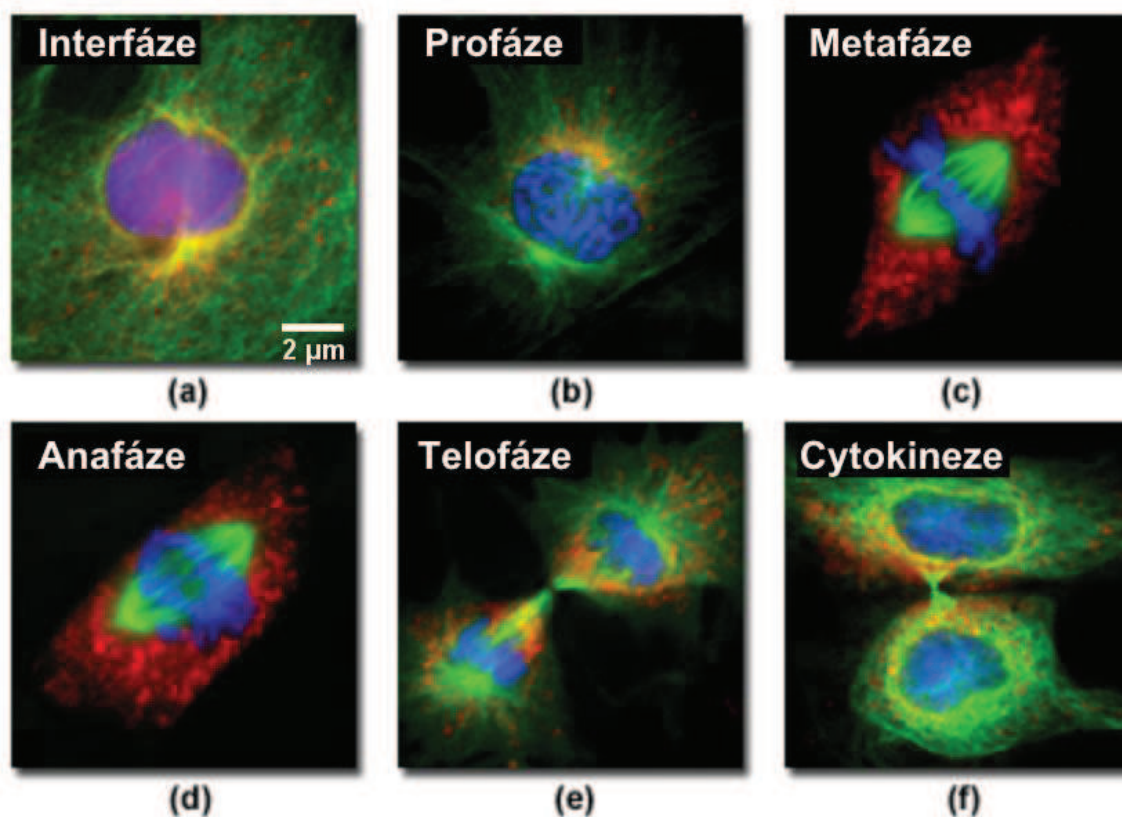
Buněčný cyklus je uspořádaný sled akcí, ve kterých buňka zdvojnásobí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě dceřiné buňky. Detaily jednotlivých buněčných cyklů se mohou lišit, některé charakteristiky jsou však univerzální. V následujícím textu se budu zabývat buněčným cyklem živočišné buňky.

Buněčný cyklus se tradičně dělí na M-fázi a interfázi. V M-fázi dochází jednak k postupné kondenzaci chromozomů a jejich rozdělení do dvou dceřiných jader, tento proces se nazývá mitóza, a jednak k rozdělení buňky na dvě dceřiné buňky v procesu nazývaném cytokineze. V interfázi buňka přepisuje své geny, syntetizuje proteiny a roste. Přípravuje se tak na další M-fázi.



Obrázek 4-1: Schematické znázornění buněčného cyklu, M-fáze a interfáze s jejich složkami. Rozložení jednotlivých dějů neodpovídá skutečné časové délce. Převzato z [28].

Pro ilustraci jednotlivých částí buněčného cyklu jsou použity snímky z fluorescenční mikroskopie. Jak již bylo zmíněno v odstavci 3.1, jednou z hlavních výhod fluorescence je vysoká specifičnost. Tím se myslí kontrastní rozlišení jednotlivých komponent buňky, které vykazují fluorescenci v důsledku přítomnosti fluorescenčních molekul. Jak přístrojová technika, tak i škála chemických vlastností barviv umožňuje současné zobrazení více barviv zároveň.



Obrázek 4-2: Zobrazení fází životního cyklu buňky pomocí fluorescenční mikroskopie. Ve vzorku kultivovaných savčích buněk byly chromozomy obarveny modře, mitochondrie červeně a mikrotubuly zeleně. Snímky a-f zobrazují vývoj obarvených komponent od interfáze (G₂) po cytokinezi. Převzato z [29].

Mitóza, která trvá zhruba 5 % délky životního cyklu, je rozdělována na:

- Profázi, obrázek 4–2(b), ve které dochází ke kondenzaci replikovaných chromozomů a ke vzniku mitotického vřeténka vně jádra. V závěru této fáze se rozpadá jaderná membrána.
- Metafázi, obrázek 4–2(c), v níž jsou chromozomy uspořádávány do roviny největšího rozměru mitotického vřeténka.
- Anafázi, obrázek 4–2(d), ve které se oddělují sesterské chromatidy a posunují se po mitotickém vřeténku k opačným pólům buňky.
- Telofázi, obrázek 4–2(e), kde dochází k vytváření jaderného obalu kolem každé sady chromozomů a ke vzniku dvou jader. Chromozomy se pak mění v chromatin, mitotické vřeténko je rozloženo v cytoskelet a cytoplazma se dělí do dvou dceřiných buněk.

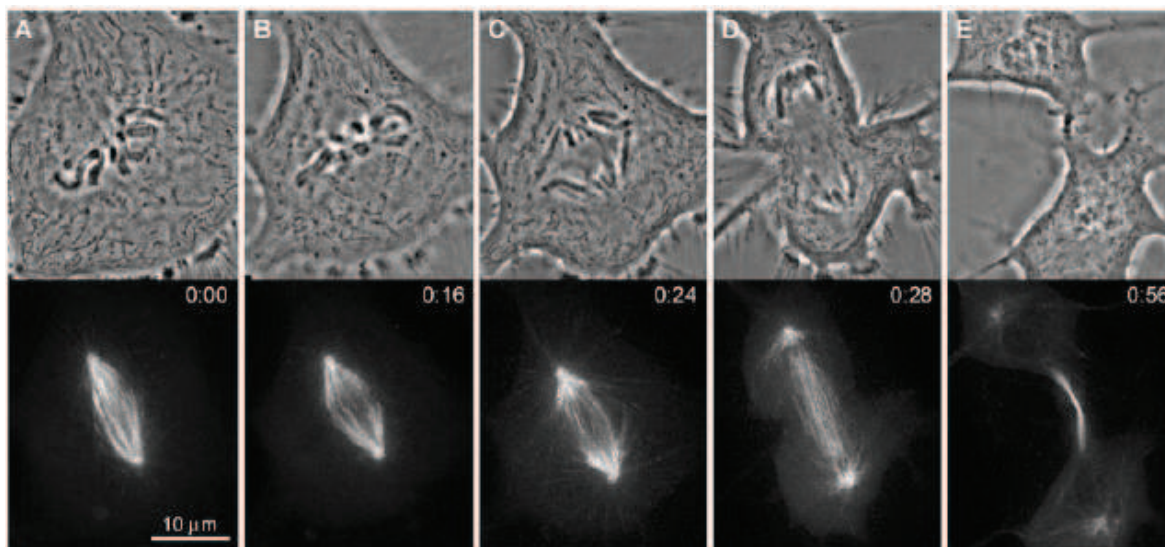
V následné cytokinezi, obrázek 4–2(f) dochází k rozdělení buňky na dvě dceřiné. K tomu u živočišné buňky slouží kontraktilní prstenec, který je tvořený aktinovými a miosinovými vlákny a vzniká na konci mitózy pod plazmatickou membránou v ekvatoriální rovině buňky.

V interfázi, obrázek 4–2(a), je buněčné jádro dobře patrné a je ohraničeno jadernou membránou. Interfáze se dělí na fáze:

- G_1 – zhruba 50 % délky životního cyklu,
 - buňka roste, dochází k zdvojnásobení buněčné hmoty, tvoří se RNA a proteiny, připravuje se zásoba nukleotidů a enzymů pro replikaci DNA,
- S – zhruba 30 % délky životního cyklu,
 - replikuje se DNA,
- G_2 – zhruba 15 % délky životního cyklu,
 - dochází ke zdvojování organel a tvorbě struktur potřebných pro dělení buňky.

Celý buněčný cyklus trvá u savčích buněk obvykle 24 hodin, mitóza trvá přibližně 1 hodinu. Podrobnější popis buněčného cyklu, popřípadě biologie buňky lze nalézt například v [28].

Pro některé aplikace může být dostačující zobrazení částí buněčného cyklu v méně specifickém klasickém fázovém kontrastu. Obrázek 4–3 porovnává simultánní zobrazení procesu mitózy od anafáze po cytokinezi u savčích kultivovaných buněk v klasickém fázovém kontrastu a pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenčně jsou zde značeny mikrotubuly. Z porovnání obou kontrastů je zřejmé, že ačkoli zobrazují ten samý preparát, značně se liší. Jedním z důvodů je halo efekt, který zkresluje obraz fázového kontrastu [30].



Obrázek 4-3: Simultánní zobrazení mitózy klasickým fázovým kontrastem a fluorescenční mikroskopií. Fluorescenčně jsou označeny mikrotubuly. Během anafáze se chromozomy pohybují k pólům buňky (B a C), póly se však vzdalují i sami od sebe (B-D). Během tohoto prodlužování jsou mezi skupinami chromozomů formovány kmenové mikrotubuly (D), které v cytokinezi splynou v jediný mikrotubul (E). Čas pozorování (hh:mm) je uveden v pravém horním rohu každého z obrázků. Převzato z [30].

5. Zpracování hologramu a význam obrazové fáze

K základní rekonstrukci obrazu z hologramu je využíváno fourierovských metod, pomocí nichž je z jediného zaznamenaného hologramu vypočten obraz komplexní amplitudy, intenzity a nenavázané fáze. Základní rekonstrukční algoritmus hologramu byl popsán v publikaci [5]. Celý proces rekonstrukce obrazu, tak jak probíhá v naší laboratoři, i podmínky k tomu nutné jsou popsány v publikaci [20].

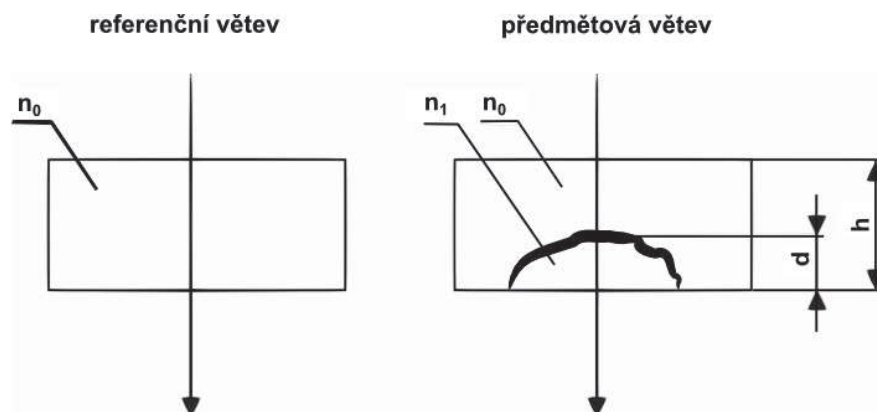
Při zobrazování transparentních objektů nás nejvíce zajímá právě informace o fázi, proto dále upravujeme a zpracováváme obraz nenavázané fáze. Protože fáze je vyjádřena periodickou funkcí, objevují se v obrazu nenavázané fáze skoky. Tyto skoky jsou odstraněny přičtením nebo odečtením celočíselného násobku hodnoty 2π a získaný obraz označujeme jako navázanou fázi.

Obraz navázané fáze je však stále zatížen deformacemi, pravděpodobně způsobenými optickými aberacemi zobrazovacího systému, nedokonalým seřazením mikroskopu a případnými změnami teploty součástí. Předpokládáme, že tyto nedokonalosti jsou v obrazu fáze reprezentovány pokrivenou plochou, která je přičtena k pozorovaným objektům. Pokud v obraze vybereme místa se známou fází, to je místa bez pozorovaných objektů, je možné tato místa proložit vyrovnávací plochou a tuto plochu následně odečíst. V časosběrné sérii snímků lze pro odečítání vyrovnávací plochy použít algoritmus dynamické fázové masky [31]. Ten v prvním kroku vezme hodnoty ze zadaných oblastí mimo buňky a metodou nejmenších čtverců určí vhodnou vyrovnávací plochu, kterou následně odečte od obrázku navázané fáze. Ve vyrovnaném obrázku navázané fáze pak najde všechna místa, kde je hodnota fáze nižší než zvolená prahová hodnota. Tato místa pak tvoří oblast bez buněk, to je masku, která je použita pro výpočet vyrovnávací plochy v následujícím snímku. Masku pro daný snímek tvoří program vždy z předešlého vyrovnaného snímku, což zaručuje dobrý souhlas masky s aktuální pozicí buněk. Přesnost vyrovnaní pozadí můžeme určit z jeho střední hodnoty, která by po odečtení vyrovnávací plochy měla být nulová, a hodnoty směrodatné odchylky vyrovnaného pozadí.

V takto upraveném obrazu je obrazová fáze přímo úměrná rozdílu délek optických drah předmětové a referenční větve podle vztahu:

$$\begin{aligned}\Delta\phi(x, y) &= \phi_p(x, y) - \phi_r(x, y) \\ &= \frac{2\pi}{\lambda} [n_0(h - d(x, y)) + n_1(x, y)d(x, y)] - \frac{2\pi}{\lambda} n_0 h \\ &= \frac{2\pi}{\lambda} d(x, y)(n_1(x, y) - n_0) = \frac{2\pi}{\lambda} d(x, y)\Delta n(x, y),\end{aligned}\tag{1}$$

kde $\Delta\phi$ je rozdíl obrazové fáze předmětové a referenční vlny, ϕ_p je obrazová fáze předmětové vlny, ϕ_r obrazová fáze referenční vlny, λ je vlnová délka použitého světla, Δn je rozdíl indexu lomu v daném místě buňky a indexu lomu media, d je tloušťka buňky a h je výška použitých komůrek. Situaci zachycuje obrázek 5–1.



Obrázek 5-1: Znázornění optických drah v referenční a předmětové větvi mikroskopu; n_0 - index lomu media, n_1 - index lomu buňky, d - výška buňky, h - výška pozorovacích komůrek.

K interpretaci obrazové fáze se v dostupné literatuře objevují dva přístupy.

Podle prvního z nich (např. [11], [32]) závisí hodnota indexu lomu buňky n_1 na obsahu suché hmoty buňky podle vztahu [33]:

$$n_1(x, y) = n_0 + \alpha C(x, y), \quad (2)$$

kde α je refrakční přírůstek (v ml/g) a C je koncentrace suché hmoty v roztoku (v g/ml). Dále se předpokládá, že různé složky buňky mají velmi podobné specifické refrakční přírůstky, a proto je zpoždění fáze světelného svazku procházejícího živou buňkou úměrné hmotě bezvodého obsahu buňky, tedy suché hmotě. Plošnou hustotu suché hmoty buňky σ lze určit podle vztahu [33]:

$$\sigma(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\phi(x, y). \quad (3)$$

V publikaci [32] je uvedeno, že zpoždění rovné jedné vlnové délce zeleného světla ($\lambda=546$ nm) odpovídá plošné hustotě suché hmoty $3 \text{ pg } \mu\text{m}^{-2}$ ($=3 \text{ g m}^{-2}$).

Ve druhém přístupu [1], [9] je buňka aproximována jedinou hodnotou indexu lomu a informace o fázi je přepočtena na výšku buňky podle vztahu (1). Typické hodnoty indexu lomu pro aproximaci buňky jsou 1,38–1,41 [11]. Hodnoty indexu lomu vybraných složek buňky jsou uvedeny v tabulce 5–1.

Složka buňky:	Cytoplasma	Jádro	Mitochondrie	Melanin
Index lomu:	1,37	1,39	1,42	1,7

Tabulka 5-1: Složky buňky a jejich indexy lomu, převzato z [6].

6. Matematický popis tvaru buňky

Matematický popis tvaru buňky a rozložení hodnot obrazové fáze, stejně jako vyhodnocení změn v průběhu časových pozorování je důležitým nástrojem, který může být dále použit k vyhodnocení probíhajících buněčných dějů, k identifikaci různých druhů buněk nebo k online řízení mikroskopu.

K základnímu popisu v rovině můžeme použít standardních matematických charakteristik týkajících se průmětu buňky do roviny kolmé na optickou osu. Jsou to: plocha, obvod, těžiště, hlavní a vedlejší osa vhodné elipsy, úhel natočení hlavní osy vhodné elipsy od vodorovného směru, poměr hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy, kruhovitost, kulatost a celistvost.

K popisu buňky v prostoru, kde třetí rozměr tvoří obrazová fáze, můžeme použít metodu momentů. Nultému momentu odpovídá celková obrazová fáze buňky. Prvním momentem jsou určeny souřadnice těžiště obrazové fáze. Další momenty jsou již počítány z histogramu hodnot obrazové fáze, a proto nezávisí na translaci ani rotaci buňky. Druhému momentu odpovídá směrodatná odchylka hodnot obrazové fáze, z třetího momentu je určována šikmost a ze čtvrtého momentu je určena špičatost rozložení hodnot obrazové fáze.

Kvůli jednoznačnosti jsou u některých charakteristik uvedeny i anglické názvy.

6.1. Popis tvaru buňky v rovině

Pro vyhodnocení rovinných (2D) charakteristik je snímek obrazové fáze nejprve převeden na její průmět. V tomto snímku nejsou zachovány hodnoty obrazové fáze v jednotlivých pixelech. Pixely, kde je buňka, mají hodnotu $z_p = 1$, ostatní pixely mají hodnotu $z_p = 0$. Souřadnice jednotlivých pixelů jsou určeny hodnotami (x, y) . Všechny parametry v této kapitole byly počítány využitím programu ImageJ.

Definice uvedených parametrů a návrhy jejich možného použití:

- Plocha průmětu S

$$S = \sum_{x,y} z_p \quad (4)$$

- určuje počet pixelů, které buňka okupuje.

- Obvod o

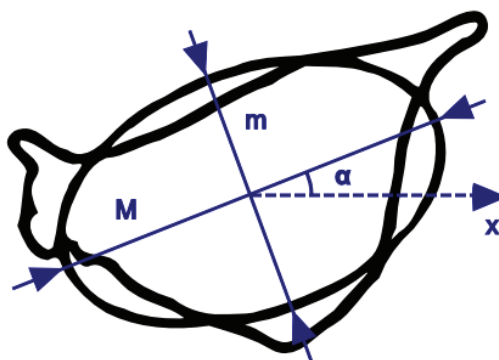
- určuje délku vnější hranice oblasti kde $z_p = 1$.

- Souřadnice těžiště průmětu x_p, y_p

$$x_p = \frac{1}{S} \sum_{x,y} x \cdot z_p \quad (5)$$

$$y_p = \frac{1}{S} \sum_{x,y} y \cdot z_p \quad (6)$$

- určují těžiště průmětu.
- Vhodná elipsa (fitting ellipse)
 - určuje elipsu, která nejlépe odpovídá danému tvaru buňky, vybraná elipsa má stejnou plochu, orientaci a těžiště jako původní průmět,
 - je určena velikostí hlavní osy (Major) M , vedlejší osy (minor) m a úhlem natočení (orientation) α hlavní osy M vzhledem k ose x .



Obrázek 6-1: Schéma tvaru buňky, vhodné elipsy a jejích parametrů.

- Poměr hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy (aspect ratio) AR

$$AR = \frac{M}{m} \quad (7)$$

- určuje odchylku od kruhového tvaru,
- hodnotě $AR = 1$ odpovídá kruh,
- hodnotě $AR > 1$ odpovídá prodloužený tvar.

- Kruhovitost (circularity) *Circ*

$$Circ = \frac{4\pi S}{o^2} \quad (8)$$

- určuje odchylku od kruhového tvaru v závislosti na obvodu a ploše průřezu,
- hodnotě $Circ = 1$ odpovídá kruh,
- hodnotě $Circ < 1$ odpovídá prodloužený tvar.

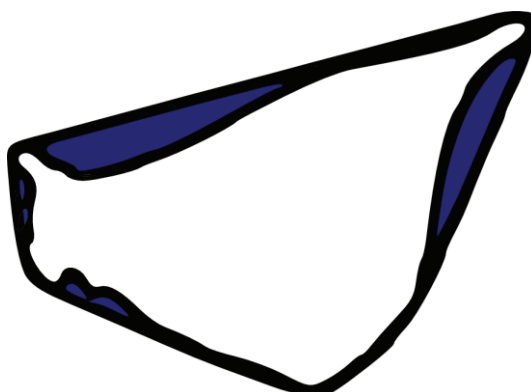
- Kulatost (roundness) *Round*

$$Round = \frac{4S}{\pi M^2} \quad (9)$$

- určuje odchylku od kruhového tvaru v závislosti na ploše průřezu a hlavní ose vhodné elipsy,
- hodnotě $Round = 1$ odpovídá kruh,
- hodnotě $Round < 1$ odpovídá prodloužený tvar.

- Celistvost (solidity) *Solid*

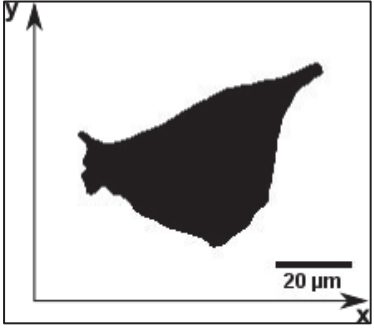
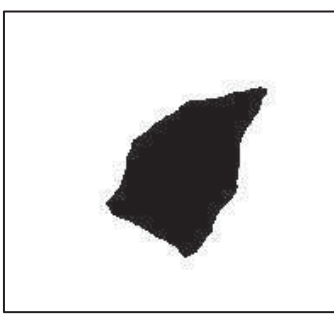
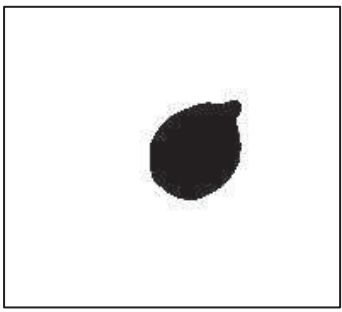
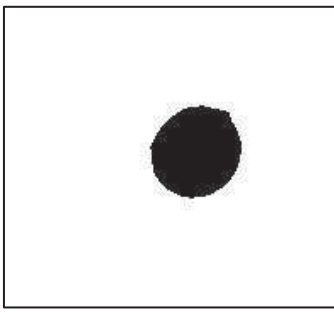
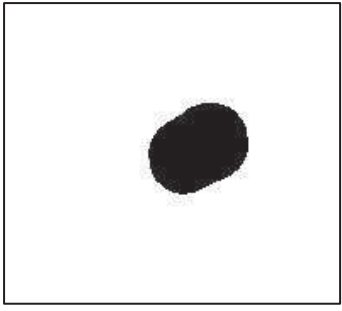
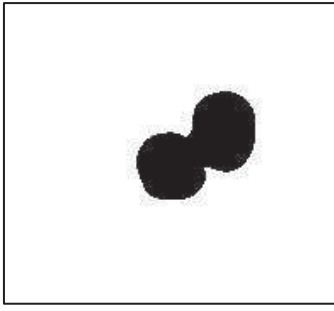
- určuje poměr celkové plochy průřezu buňky k opsané konvexní ploše.



Obrázek 6-2: Schéma tvaru buňky a konvexní plochy.

Parametry jako plocha a obvod vypovídají především o rozpínání a smršťování buňky. Poměr hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy, kruhovitost, kulatost a celistvost jsou citlivé ke změnám tvaru buňky a tudíž mohou identifikovat zásadní změny buněčného cyklu doprovázené změnami morfologie (např. mitóza, apoptóza, nekróza a jiné). Parametry vhodné elipsy pak více specifikují tvar a orientaci buňky. Souřadnice těžiště průřezu a jejich změny v čase pak vypovídají o pohybu buňky.

Průmět buňky v průběhu mitózy a spočtené 2D charakteristiky

 1	<i>S</i>: 1454,44 μm^2 <i>o</i>: 194,91 μm <i>x_p</i>: 41,86 μm <i>y_p</i>: 38,81 μm <i>M</i>: 54,48 μm <i>m</i>: 33,98 μm α: 24,54° <i>Round</i>: 0,6235 <i>Circ</i>: 0,4811 <i>Solid</i>: 0,815	 2	<i>S</i>: 977,88 μm^2 <i>o</i>: 138,70 μm <i>x_p</i>: 47,52 μm <i>y_p</i>: 37,29 μm <i>M</i>: 44,78 μm <i>m</i>: 27,80 μm α: 54,98° <i>Round</i>: 0,6205 <i>Circ</i>: 0,6387 <i>Solid</i>: 0,905
 3	<i>S</i>: 468,62 μm^2 <i>o</i>: 84,70 μm <i>x_p</i>: 49,43 μm <i>y_p</i>: 41,31 μm <i>M</i>: 27,63 μm <i>m</i>: 21,60 μm α: 50,94° <i>Round</i>: 0,7816 <i>Circ</i>: 0,8213 <i>Solid</i>: 0,961	 4	<i>S</i>: 426,28 μm^2 <i>o</i>: 77,74 μm <i>x_p</i>: 50,09 μm <i>y_p</i>: 40,00 μm <i>M</i>: 24,45 μm <i>m</i>: 22,20 μm α: 50,53° <i>Round</i>: 0,9077 <i>Circ</i>: 0,8869 <i>Solid</i>: 0,967
 5	<i>S</i>: 445,56 μm^2 <i>o</i>: 80,43 μm <i>x_p</i>: 49,35 μm <i>y_p</i>: 40,00 μm <i>M</i>: 27,43 μm <i>m</i>: 20,68 μm α: 31,33° <i>Round</i>: 0,754 <i>Circ</i>: 0,8655 <i>Solid</i>: 0,967	 6	<i>S</i>: 520,79 μm^2 <i>o</i>: 102,48 μm <i>x_p</i>: 51,57 μm <i>y_p</i>: 40,32 μm <i>M</i>: 35,87 μm <i>m</i>: 18,48 μm α: 36,07° <i>Round</i>: 0,5152 <i>Circ</i>: 0,6231 <i>Solid</i>: 0,880

Tabulka 6-1: Tvar průmětu mitotické buňky a navržené 2D charakteristiky. Interval mezi jednotlivými obrázky odpovídá 10 minutám, uvedené měřítko je pro všechny obrázky shodné.

6.2. Popis tvaru buňky v prostoru

Pro vyhodnocení prostorových (3D) charakteristik je použit snímek obrazové fáze. Hodnoty obrazové fáze jsou ponechány v radiánech. Pixely, kde je buňka, mají hodnotu $z = f_{\text{áze}}$ a pixely bez buňky hodnotu $z = 0$. Souřadnice jednotlivých pixelů jsou určeny hodnotami (x, y) . Charakteristiky v této kapitole byly počítány v prostředí Matlab, vzorce byly převzaty z [34].

Definice uvedených parametrů a návrhy jejich možného použití:

- Celková hodnota fáze (mass) M

$$M = \sum_{x,y} z \quad (10)$$

- určuje součet hodnot obrazové fáze v buňce,
- hodnoty obrazové fáze jsou úměrné hmotě buňky, proto označení M (mass).

- Poloha těžiště fáze x_M, y_M

$$x_M = \frac{1}{M} \sum_{x,y} x \cdot z \quad (11)$$

$$y_M = \frac{1}{M} \sum_{x,y} y \cdot z \quad (12)$$

- určuje souřadnice těžiště obrazové fáze.

- Průměrná hodnota fáze $\bar{z}$

$$\bar{z} = \frac{1}{n} \sum_{x,y} z \quad (13)$$

- určuje aritmetický průměr hodnot obrazové fáze.

- Rozptyl hodnot fáze $D(z)$

$$D(z) = \frac{1}{n} \sum_{x,y} (z - \bar{z})^2 \quad (14)$$

- určuje rozptyl hodnot obrazové fáze.

- Směrodatná odchylka hodnot fáze $\sigma(z)$

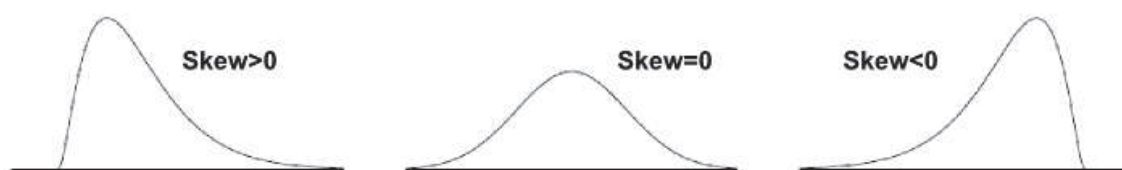
$$\sigma(z) = \sqrt{D(z)} \quad (15)$$

- určuje rozptyl hodnot obrazové fáze.

- Šikmost rozložení hodnot fáze (skewness) *Skew*

$$Skew = \frac{\frac{1}{n} \sum (z - \bar{z})^3}{[\sigma(z)]^3} \quad (16)$$

- určuje symetrii rozložení hodnot obrazové fáze,
- hodnotě $Skew = 0$ odpovídá symetrické rozdělení,
- hodnotě $Skew < 0$ odpovídá rozdělení asymetrické doleva,
- hodnotě $Skew > 0$ odpovídá rozdělení asymetrické doprava.



Obrázek 6-3: Charakteristický tvar rozdělení pro různé hodnoty šikmosti.

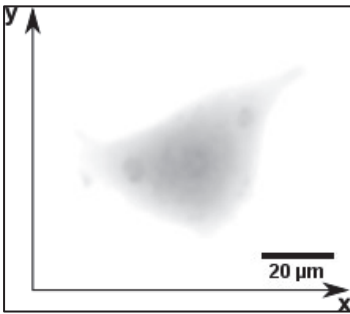
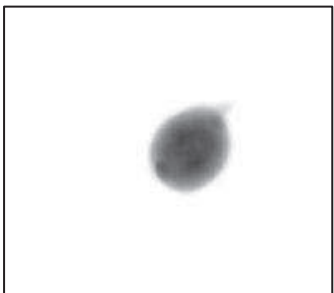
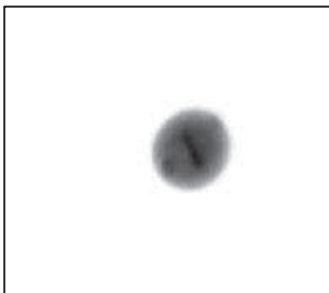
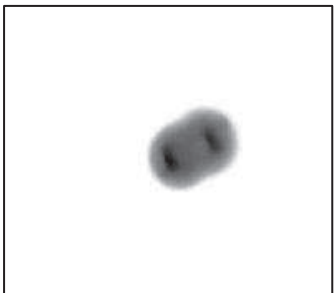
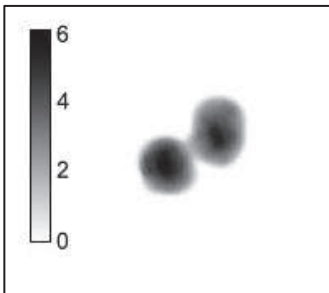
- Špičatost rozložení hodnot fáze (kurtosis) *Kurt*

$$Kurt = \frac{\frac{1}{n} \sum (z - \bar{z})^4}{[\sigma(z)]^4} \quad (17)$$

- určuje špičatost rozložení hodnot obrazové fáze,
- hodnotě $Kurt = 0$ odpovídá Gaussovské (normální) rozdělení,
- hodnotě $Kurt < 0$ odpovídá rozdělení plošší než normální,
- hodnotě $Kurt > 0$ odpovídá rozdělení vyšší než normální.

Parametr celkové hodnoty obrazové fáze je úměrný hmotě buňky, vypovídá tedy o celkové hmotě buňky a jeho změny pak o růstu nebo strádání buňky. Souřadnice těžiště fáze charakterizují pohyb buňky. Průměrná hodnota fáze vypovídá o tloušťce buňky. Rozptyl a směrodatná odchylka určují variabilitu hodnot fáze. Šikmost udává jestli je větší zastoupení nižších nebo vyšších hodnot fáze a špičatost porovnává rozdělení hodnot fáze s normálním rozdělením.

Obrazová fáze buňky v průběhu mitózy a spočtené 3D charakteristiky

 1	M: 6365,44 rad x_M: 42,80 μm y_M: 41,36 μm $\bar{z}$: 0,827 rad $D(z)$: 0,251 rad $\sigma(z)$: 0,501 rad $Skew$: 0,324 $Kurt$: -1,076	 2	M: 6514,53 rad x_M: 45,61 μm y_M: 41,45 μm $\bar{z}$: 1,259 rad $D(z)$: 0,519 rad $\sigma(z)$: 0,721 rad $Skew$: 0,056 $Kurt$: -1,303
 3	M: 6627,52 rad x_M: 49,04 μm y_M: 37,13 μm $\bar{z}$: 2,673 rad $D(z)$: 2,173 rad $\sigma(z)$: 1,474 rad $Skew$: -0,449 $Kurt$: -1,231	 4	M: 6639,73 rad x_M: 49,09 μm y_M: 37,24 μm $\bar{z}$: 2,944 rad $D(z)$: 2,459 rad $\sigma(z)$: 1,568 rad $Skew$: -0,483 $Kurt$: -1,089
 5	M: 6679,16 rad x_M: 49,52 μm y_M: 37,48 μm $\bar{z}$: 2,834 rad $D(z)$: 2,152 rad $\sigma(z)$: 1,467 rad $Skew$: -0,480 $Kurt$: -0,951	 6	M: 6712,92 rad x_M: 49,48 μm y_M: 37,41 μm $\bar{z}$: 2,437 rad $D(z)$: 2,064 rad $\sigma(z)$: 1,437 rad $Skew$: -0,048 $Kurt$: -1,064

Tabulka 6-2: Tvar mitotické buňky a navržené 3D charakteristiky. Úrovně šedé odpovídají hodnotám obrazové fáze v radiánech. Interval mezi jednotlivými obrázky odpovídá 10 minutám, uvedené měřítko je pro všechny obrázky shodné.

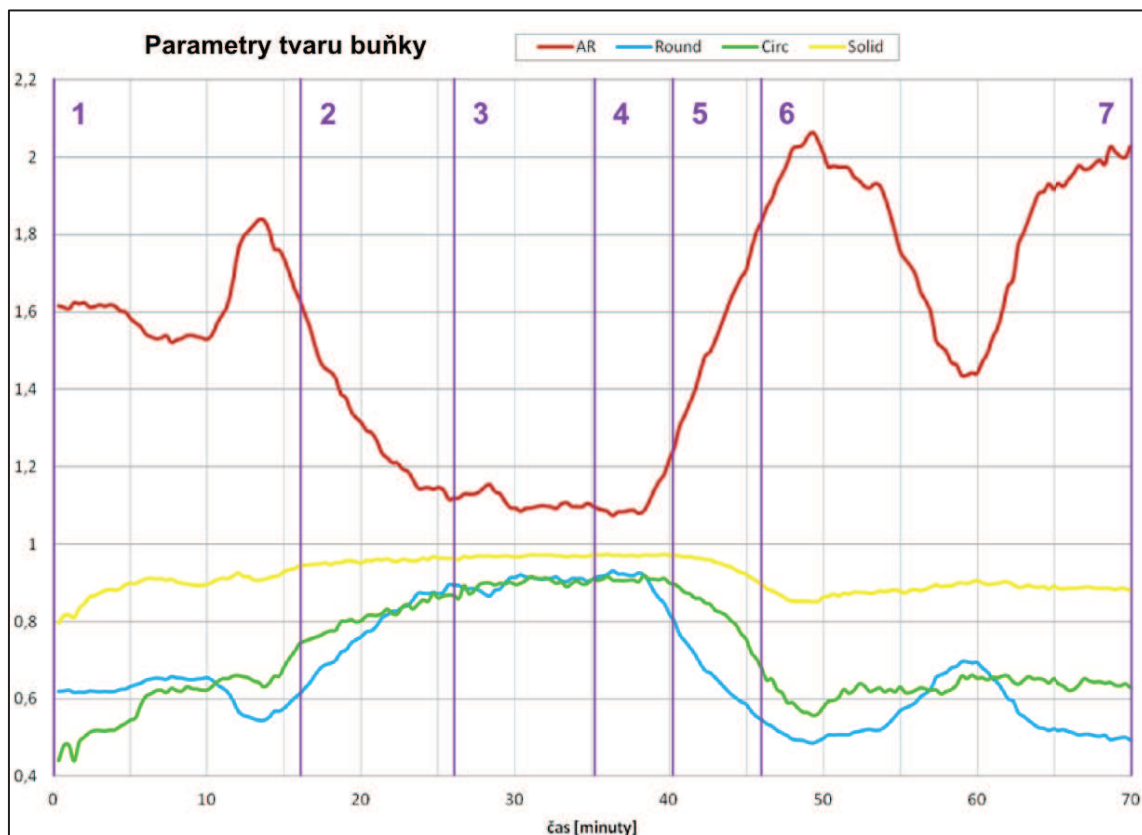
7. Průběh vybraných charakteristik během buněčného dělení

Charakteristiky navržené v kapitole 6 jsem aplikovala na pozorování získaná pomocí digitálního holografického mikroskopu. Pro testování vhodnosti jednotlivých charakteristik jsem použila již pořízená data buněčného dělení, jejichž autorem je J. Bartoníček. Buněčné dělení je část cyklu, ve které dochází k nejrapidnějším změnám morfologie i složení buňky a je tudíž vhodné právě pro testování. V následujících grafech jsou vykresleny časové průběhy vytipovaných charakteristik od interfáze (G_2) až po cytokinezi. V každém z grafů jsou čarami vyznačeny jednotlivé fáze dělení určené korelací obrazové fáze a publikovaných zobrazení mitózy v klasickém fázovém a fluorescenčním kontrastu.

Popis jednotlivých fází vyznačených v grafech

- 1–2 smršťování buňky a její příprava na mitózu, plocha buňky se zmenšuje poměrně rychle, ne však ve všech směrech rovnoměrně.
- 2–3 zakulacování buňky, začátek profáze s kondenzací chromozomů a vznik mitotického vřeténka.
- 3–4 průběh metafáze, buňka zaujímá kulatý tvar, chromozomy jsou uspořádávány do roviny největšího rozměru mitotického vřeténka.
- 4–5 anafáze, oddělování a posun chromatid po mitotickém vřeténku.
- 5–6 průběh cytokineze, oddělování dceřiných buněk od sebe.
- 6–7 vytváření krčku, oddělení a roztažení dceřiných buněk.

Na obrázku 7–1 jsou zaznamenány průběhy parametrů tvaru buňky. Je to: poměr hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy (AR); parametr kulatosti (Round), který závisí na ploše průmětu buňky a hlavní ose vhodné elipsy; parametr kruhovitosti (Circ), který závisí na ploše i obvodu průmětu buňky a parametr celistvosti (Solid), který je určen jako poměr plochy průmětu buňky a konvexní plochy.



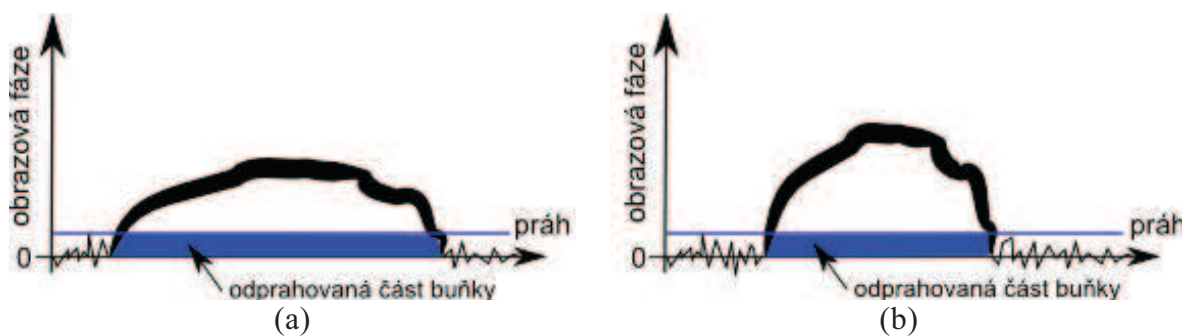
Obrázek 7-1: Časový vývoj parametrů charakterizujících tvar průmětu buňky.

Typickým jevem před začátkem buněčného dělení je smrštění a zakulacení buňky. Z vývoje hodnot v obrázku 7–1 je patrné, že nejcitlivějším parametrem reflektujícím tuto změnu je parametr *AR*. Protože se však buňka v úseku 1–2 nesmršťuje ve všech směrech rovnoměrně, objevilo se v průběhu parametru *AR* lokální maximum, které značí protažený tvar buňky. V úseku 2–3 dochází k výrazným změnám hodnot všech parametrů, které se přibližují hodnotě rovné jedné charakterizující dokonale kulatý tvar. Během úseku 3–4 jsou průběhy parametrů poměrně stabilní a odpovídají zakulacenému tvaru buňky. V úseku 4–5 dochází v průběhu parametrů ke změně, která značí začátek oddělování dceřiných buněk. Protože při oddělování buněk, úsek 5–6 převládá pohyb dceřiných buněk od sebe, tedy v jediném směru, a celkový tvar obou buněk se jeví jako protažený, dochází opět k výrazným změnám hodnot parametrů. Následné nerovnoměrné roztahování dceřiných buněk, úsek 6–7, způsobuje lokální maxima a minima v průběhu parametrů, která odpovídají aktuálnímu tvaru buňky (pro parametr *AR* odpovídá maximum protaženému tvaru a minimum kulatějšímu tvaru buňky). Průběhy všech parametrů jsou podobné, ne však totožné. Proto by pro jednoznačnost vyhodnocení bylo vhodné sledovat více parametrů zároveň. Jako nejvíce vypovídající se z obrázku 7–1 jeví parametr *AR*. Druhým vhodným parametrem by mohl být parametr *Circ* nebo parametr *Round*. Citlivost parametru *Solid*, se v uvedeném obrázku jeví jako velmi malá.

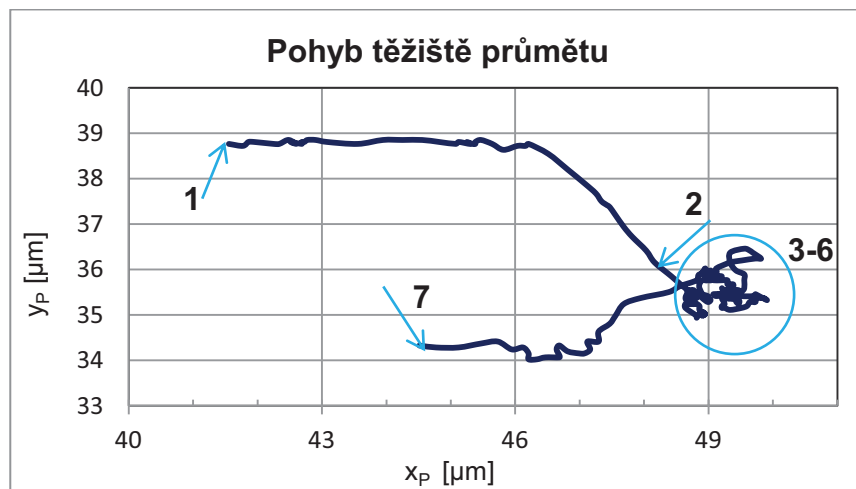


Obrázek 7-2: Časový vývoj celkové obrazové fáze a plochy průmětu buňky.

Z obrázku 7-2 je zřejmé, že zatímco plocha průmětu dosahuje během mitózy (úsek 2–6) svého minima, celková fáze má stále rostoucí tendenci. Rostoucí průběh celkové fáze je typický pro zdravou buňku, která prochází normálním buněčným cyklem. Není tedy v mezifázi G_0 , která charakterizuje zpravidla pro buňku nepříznivé podmínky. Prudký nárůst celkové obrazové fáze v oblasti označené červenou elipsou je však poněkud nepřirozený a je patrně způsoben nedokonalým prahováním v procesu zpracování dat. Současné prahování pravděpodobně ořezává část obrazové fáze a celková hodnota takto ořezané fáze je tím menší, čím menší je plocha průmětu buňky. Tento artefakt je vysvětlen na obrázku 7-3.

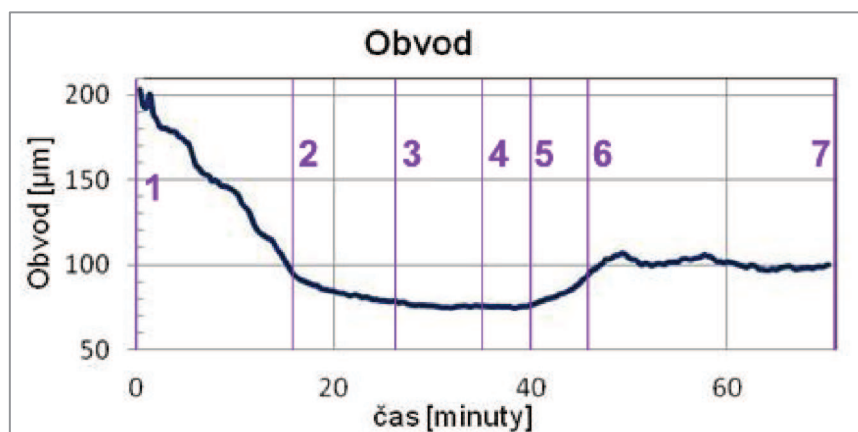


Obrázek 7-3: Ukázka artefaktu prahování, (a) buňka je roztažená, odprahovaná část je větší; (b) buňka je zakulacená, odprahovaná část je menší.



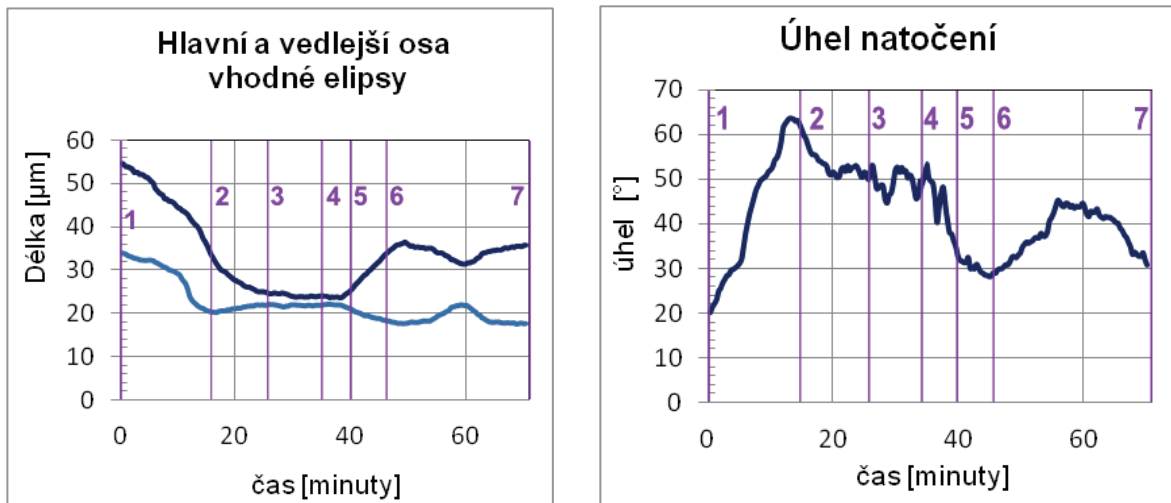
Obrázek 7-4: Pohyb těžiště průmětu buňky v časovém intervalu 70 minut.

Obrázek 7-4 zachycuje pohyb těžiště průmětu buňky. Poloha těžiště je také ovlivněna změnami tvaru buňky při buněčném dělení. V úseku 1–2 dochází ke smršťování buňky, v oblasti 3–6 probíhá mitóza a následně dochází k oddělování dceřiných buněk.



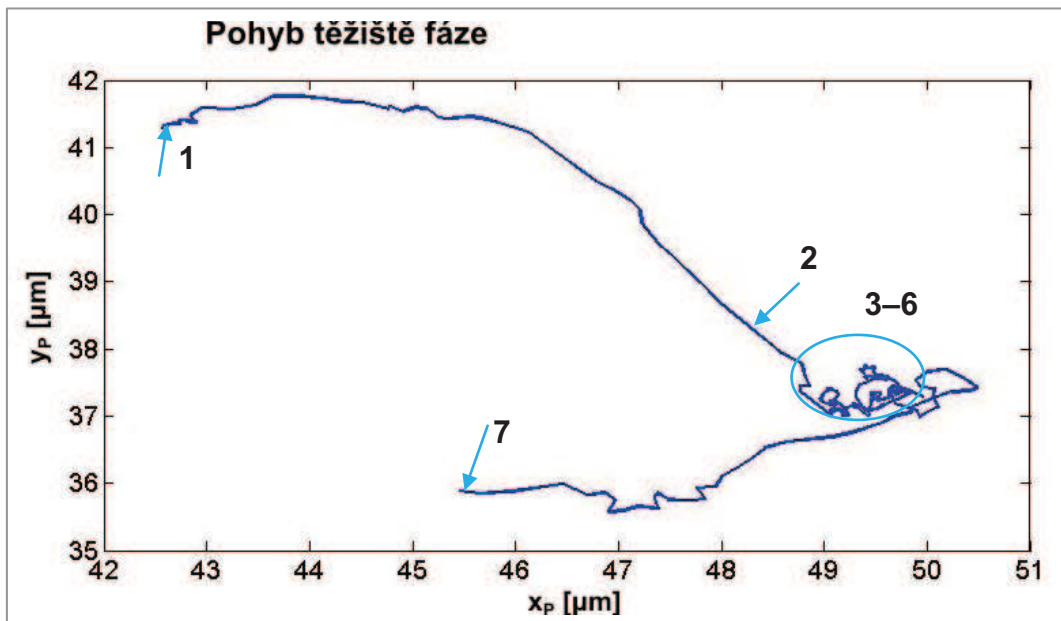
Obrázek 7-5: Časový vývoj hodnot obvodu buňky.

V obrázku 7-5 je zachycen vývoj hodnot obvodu buňky. Opět je vidět, že během mitózy (úsek 2–6) dosahuje obvod minimální hodnoty. To samozřejmě odpovídá kulatému tvaru buňky.



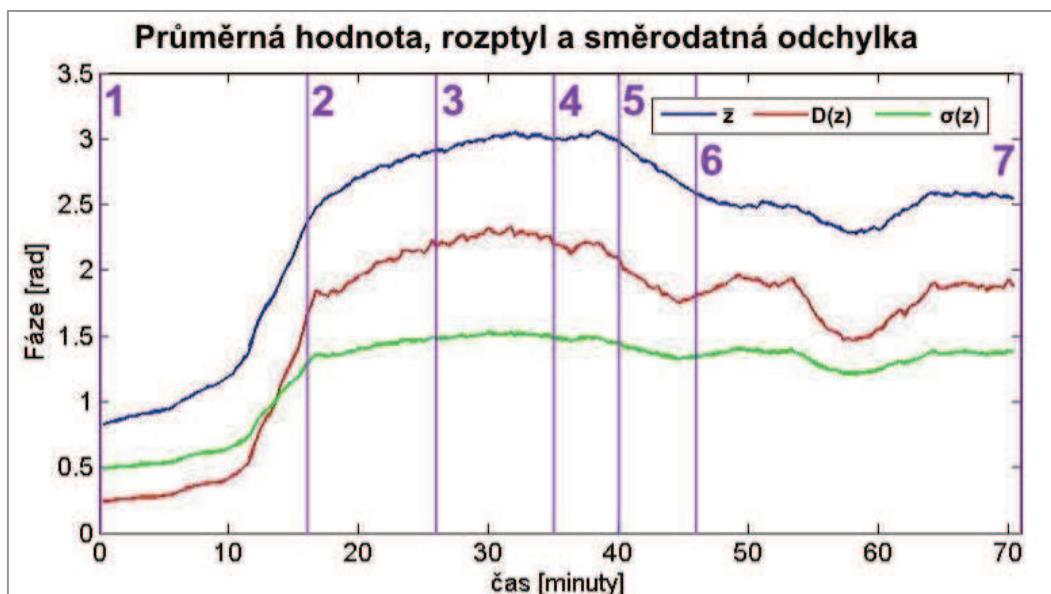
Obrázek 7-6: Časový vývoj délek hlavní (tmavší barva) a vedlejší (světlejší barva) osy vhodné elipsy a úhlu natočení elipsy.

V obrázcích 7–6 jsou znázorněny parametry vhodné elipsy. Hlavní osa (tmavší barva) dosahuje během buněčného dělení svého minima. Po anafázi (od čáry 5) hodnota hlavní osy většinou výrazně vzroste, protože dvě vzniklé dceřiné buňky se pohybují směrem od sebe. Hodnota hlavní osy by po anafázi nevzrostla v případě, že by se pohyb dceřiných buněk od sebe neodehrával v rovině pozorování. Dceřiné buňky by byly například nad sebou. Úhel natočení v anafázi určuje směr, ve kterém se dceřiné buňky od sebe oddělují. V jiných okamžicích nemá úhel natočení příliš dobře interpretovatelný význam.



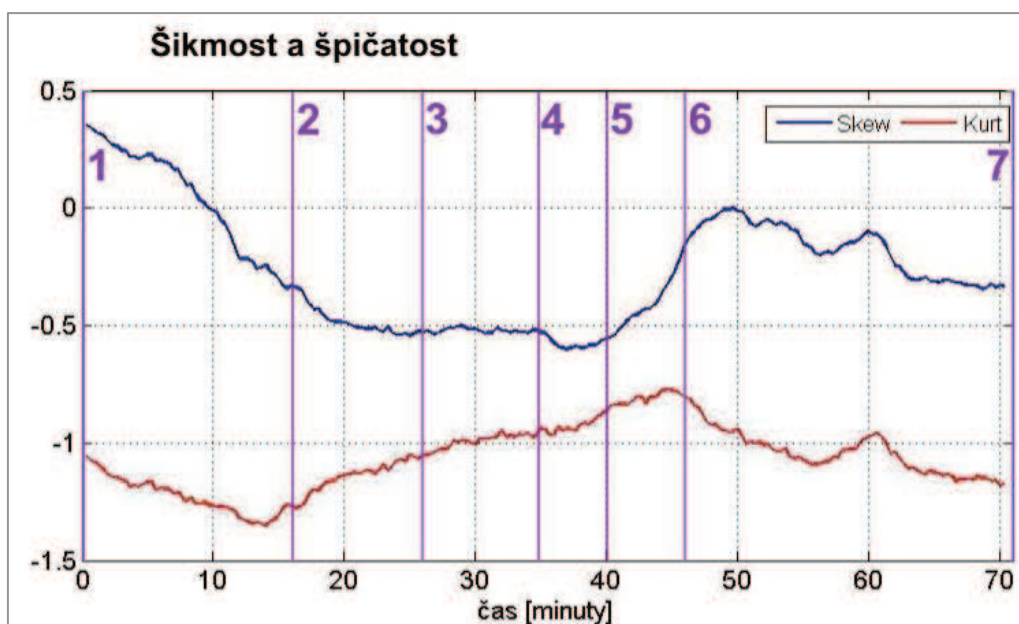
Obrázek 7-7: Pohyb těžiště obrazové fáze.

Obrázek 7-7 zachycuje pohyb těžiště obrazové fáze. Vliv na jeho hodnoty mají i změny rozložení hodnot obrazové fáze. Graf má podobný průběh jako graf 7-4 a hodnoty jsou taktéž ovlivněny změnami tvaru buňky. V úseku 1-2 dochází ke smršťování buňky, v oblasti 3-6 probíhá mitóza a následně dochází k oddělování dceřiných buněk.



Obrázek 7-8: Časový vývoj minimální a maximální hodnoty, průměru a standardní odchylky obrazové fáze.

Z obrázku 7–8 je zřejmé, že průměrná hodnota obrazové fáze dosahuje během mitózy (úsek 2–6) své maximální hodnoty. To znamená, že i tloušťka buňky je během mitózy maximální. Hodnoty rozptylu i směrodatné odchylky mají velmi podobný průběh, protože jsou to závislé veličiny. Pro vyhodnocování je vhodnější rozptyl, protože křivka vykazuje výraznější deformace.



Obrázek 7-9: Časový vývoj hodnot šikmosti a špičatosti.

Zakulacení buňky při mitóze (úsek 2–6) se projeví i v obrázku šikmosti a špičatosti 7–8. V průběhu buněčného dělení je hodnota šikmosti nejmenší. V buňce jsou tedy více zastoupeny vyšší hodnoty obrazové fáze. Hodnota špičatosti je největší těsně po rozdělení buňky, rozložení hodnot obrazové fáze je ale stále plošší než normální rozdělení.

Pro následné vyhodnocení pozorování životního cyklu byly vybrány tyto charakteristiky:

- Parametry tvaru *AR*, *Round*, *Circ*, protože jsou citlivé vůči změnám tvaru buňky.
- Plocha průmětu buňky *S*, protože zobrazuje změnu velikosti průmětu buňky.
- Celková hodnota fáze *M*, která může sloužit jako indikátor růstu buňky.
- Těžiště fáze x_M, y_M , jako identifikace změn polohy buňky.
- Průměrná hodnota fáze $\bar{z}$, která vypovídá o aktuální průměrné tloušťce buňky.
- Šikmost a špičatost *Skew* a *Kurt*, které informují o rozložení hodnot fáze buňky.

Obvod, těžiště průmětu, úhel natočení, rozptyl a směrodatná odchylka nebyly vybrány, protože vykazují jen malé změny závislé na probíhajících dějích v buňce, nebo vykazují velmi podobný průběh jako již vybrané charakteristiky. Hlavní a vedlejší osa elipsy jsou již obsaženy v parametru *AR* a nebyly vybrány z tohoto důvodu.

8. Metoda dynamických fázových diferencí

Pro využití kvantitativní informace, kterou poskytuje snímek obrazové fáze, má význam jak absolutní hodnota obrazové fáze v jednotlivých snímcích, tak relativní hodnota obrazové fáze vůči obrazové fázi v jiných časových okamžicích během pozorování. Pro zviditelnění změn rozložení suché hmoty buňky během pozorování byla v rámci disertační práce H. Uhlířové [15] navržena metoda dynamických fázových diferencí.

Metoda dynamických fázových diferencí je založena na barevném zobrazení rozdílů obrazové fáze mezi dvěma snímky obrazové fáze v jednotlivých bodech. Body, ve kterých se hodnota fáze zvětšila, tedy suchá hmota buňky se přesunula do těchto míst, jsou zobrazeny červeně. Naopak zeleně jsou zobrazeny body, ve kterých došlo k poklesu fáze a tedy k úbytku suché hmoty. Jas obou barev odpovídá relativní hodnotě velikosti změny obrazové fáze. Dynamické fázové difference můžeme zobrazovat buď s konstantním krokem, jako rozdíl dvou po sobě následujících snímků, anebo s kumulativním krokem (postupné dynamické fázové difference), jako rozdíl příslušného a počátečního snímku.

Konstantní dynamické fázové difference jsou počítány podle vztahu:

$$\phi_{D,i}(x, y) = \phi_{i+1}(x, y) - \phi_i(x, y), \quad i = 1, 2, \dots, p - 1. \quad (18)$$

Postupné dynamické fázové difference jsou počítány podle vztahu:

$$\phi_{D,i}(x, y) = \phi_i(x, y) - \phi_1(x, y) \quad i = 1, 2, \dots, p, \quad (19)$$

kde p je počet snímků v časosběrné sérii pozorování a x, y udávají polohu v obraze.

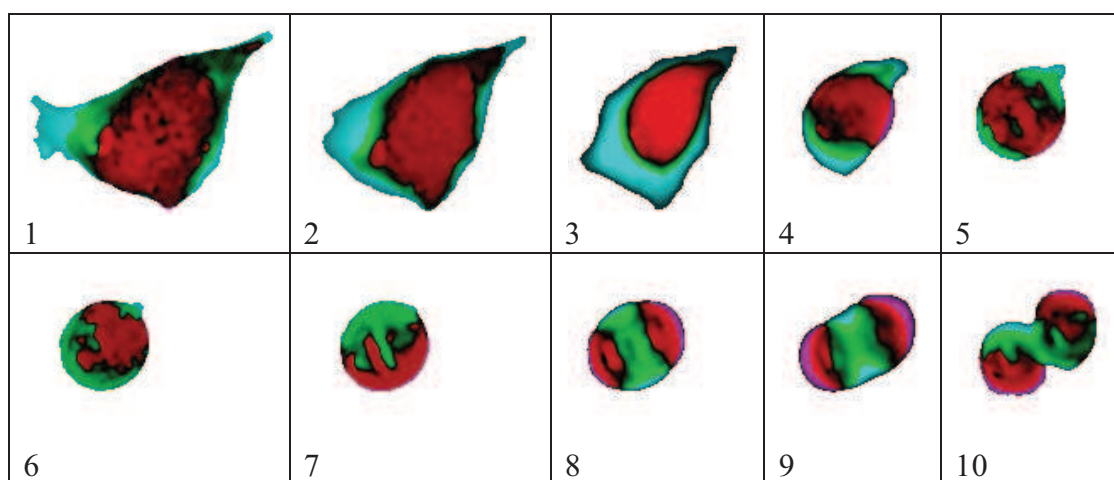
Přínosem tohoto zobrazení je zviditelnění drobných pohybů částí buňky, které jsou z pozorování snímků obrazové fáze velmi těžko zaznamenatelné. Výhodou je dobré časové rozlišení a možnost promítnout po sobě následující dynamické fázové difference a tak vizuálně i elektronicky vyhodnotit průběh změn obrazové fáze, který odpovídá změnám rozmístění suché hmoty buňky.

Nevýhodou oproti tomu je, že v tomto zobrazení od sebe nejsou odlišeny pohyby hmoty uvnitř buňky a pohyby buňky jako celku z jednoho místa na jiné. Proto jsem navrhla modifikaci spočívající v přidání další barvy do stávající metody dynamických fázových diferencí.

8.1. Modifikovaná metoda dynamických fázových diferencí

Pro odlišení pohybu hmoty uvnitř buňky a buňky jako celku byla do stávající metody DPD přidána další barva. Tato barva se zobrazí v každém bodě, kde je absolutní hodnota změny obrazové fáze rovna hodnotě obrazové fáze v jednom ze snímků. Tedy v místech odkud se buňka stáhla úplně pryč je nyní zelená a modrá barva, která se jeví jako tyrkysová. V místech, kde buňka předtím nebyla je nyní červená a modrá barva, která se jeví jako fialová. Jas barev opět odpovídá relativní hodnotě velikosti změny fáze.

Ukázka Metody dynamických fázových diferencí se čtyřmi barvami



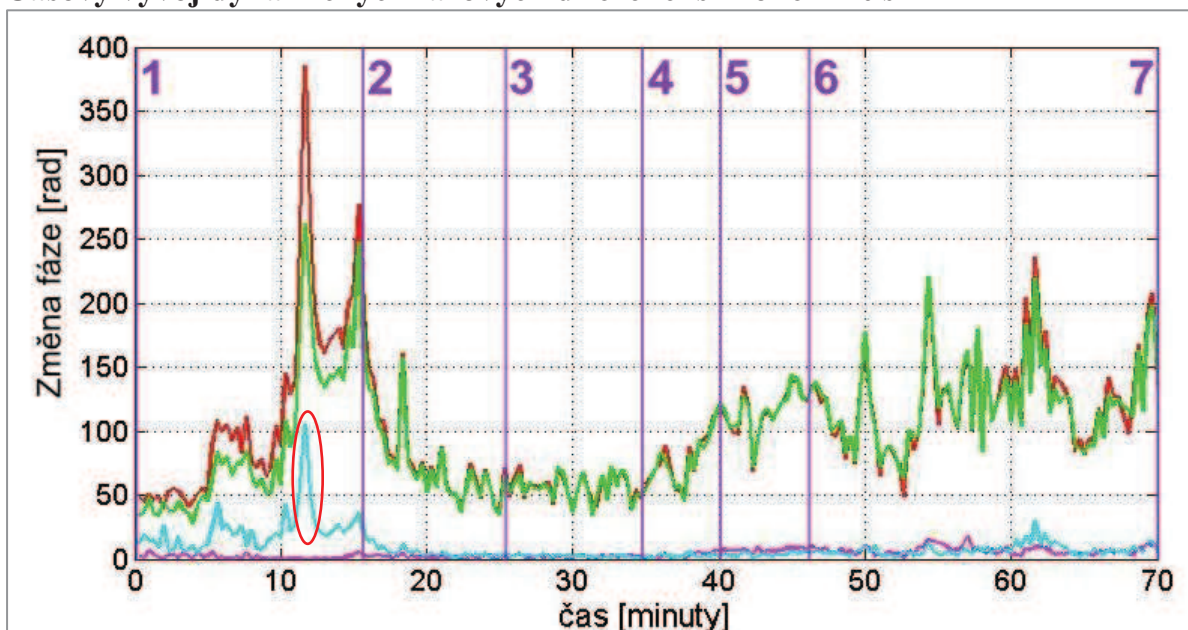
Tabulka 8-1: Tvar buněk a jejich dynamické fázové difference s časovým krokem 5 minut, časová prodleva mezi jednotlivými obrázky odpovídá 5 minutám. Kontrast v obrázcích byl upraven pro lepší viditelnost.

V tomto znázornění metody dynamických fázových diferencí můžeme dobře odlišit pohyb hmoty uvnitř buňky od pohybu buňky jako celku z jednoho místa na jiné. V tabulce 8-1 je zpracováno stejné pozorování jako v kapitole 7. Ze snímku 3 je zřejmé, že došlo k výraznému smrštění buňky. Naopak ve snímcích 5–8 dochází pouze k přesunu hmoty uvnitř buňky, velmi dobře je patrný průběh mitózy s rozestupem chromozomů k pólům buňky. Ve snímcích 9 a 10 již dochází k roztažení a oddělování dvou vznikajících buněk. Pro názornější kvantitativní představu o velikosti přesunuté hmoty v čase můžeme data získaná metodou dynamických fázových diferencí vynést do grafů.

V grafech je:

- Tyrkysovou barvou znázorněna velikost obrazové fáze v oblasti, ze které se buňka stáhla pryč.
- Fialovou barvou je znázorněna velikost obrazové fáze v nově obsazené oblasti.
- Zelená barva znázorňuje velikost obrazové fáze, která ubyla v oblasti buňky.
- Červená barva zobrazuje velikost obrazové fáze, která přibyla v oblasti buňky.

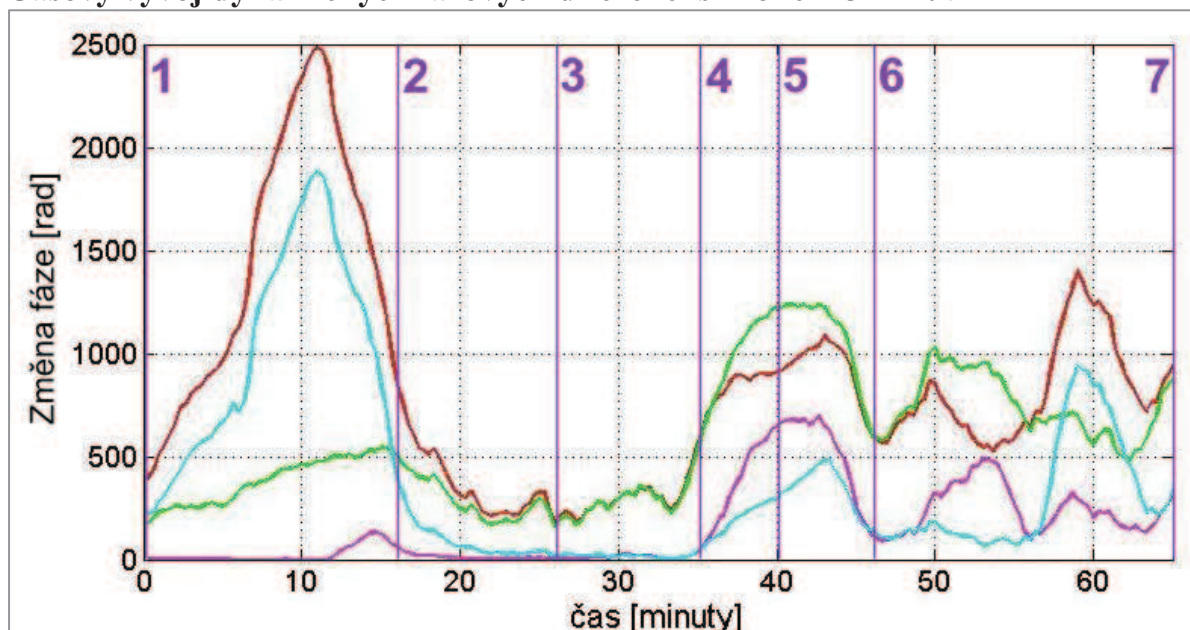
Časový vývoj dynamických fázových diferencí s krokem 20 s



Obrázek 8-1: Dynamické fázové difference s krokem 20 sekund; barvy znázorňují součty obrazové fáze, červená znázorňuje přírůstek a zelená úbytek obrazové fáze uvnitř buňky, tyrkysová barva znázorňuje součet obrazové fáze, o kterou se buňka smršťila, a fialová barva znázorňuje součet obrazové fáze, o kterou se buňka roztáhla.

Z obrázku 8–1 je zřejmé, že při profázi (úsek 2–3) a metafázi (úsek 3–4) převažuje pohyb hmoty uvnitř buňky (červená a zelená barva) nad vnějším pohybem buňky jako celku (fialová a tyrkysová barva). Na začátku celého děje si můžeme všimnout smrštění buňky (v grafu vyznačeno červenou elipsou).

Časový vývoj dynamických fázových diferencí s krokem 5 minut



Obrázek 8-2: Dynamické fázové difference s krokem 5 minut; barvy znázorňují součty obrazové fáze, červená znázorňuje přírůstek a zelená úbytek obrazové fáze uvnitř buňky, tyrkysová barva znázorňuje součet obrazové fáze, o kterou se buňka smrštila, a fialová barva znázorňuje součet obrazové fáze, o kterou se buňka roztáhla.

Zobrazením dynamických fázových diferencí s větším krokem můžeme lépe vyhodnotit celý děj. Na začátku sledovaného děje (úsek 1–2) došlo k výraznému smrštění buňky a k přesunu hmoty dovnitř buňky (tyrkysové maximum kopírované vyšším červeným maximem). Během části mitózy (úseky 2 – 3 profáze, 3 – 4 metafáze), byl pohyb buňky jako celku velmi malý, ale stále probíhal pohyb hmoty uvnitř buňky. V anafázi (úsek 4–5) došlo k rozestupu chromatid a k roztážení buňky. To je zachyceno fialovým maximem, které znázorňuje velikost obrazové fáze v oblasti, do které se buňka roztáhla. V cytokinezi (úsek 5–6) pak došlo k vytvoření krčku a ke změně tvaru buňky. Změnu tvaru buňky charakterizují současné vyšší hodnoty fialové a tyrkysové barvy, buňka se roztáhla do nové oblasti a současně se smrštila v jiné oblasti, tedy změnila tvar.

9. Experimenty

V experimentální části jsem nejdříve zopakovala pozorování samostatné mitózy. Toto pozorování sloužilo především k optimalizaci celého experimentu, mikroskopu, jeho příslušenství a přípravy buněk. Následně jsem provedla několik pozorování celého buněčného cyklu od mitózy po mitózu.

Všechny experimenty probíhaly na Ústavu fyzikálního inženýrství, VUT v Brně, v laboratoři Experimentální biofotoniky. Kultivaci a přípravu buněk zajišťovala V. Jůzová.

Buňky použité v experimentech

Pro pozorování byly použity buňky kultivované v laboratoři Experimentální biofotoniky na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně. Pro všechna pozorování byly použity buňky s označením K2, což jsou embryonální fibroblasty inbredního potkana Louis Lewis. Tyto buňky jsou nádorové a nemetastazující.

9.1. Příslušenství digitálního holografického mikroskopu pro biologii

Pro biologická pozorování je mikroskop umístěn ve velkém plastovém boxu, který napomáhá udržení stabilní teploty v okolí mikroskopu. Součástí boxu je také elektroinstalace, která slouží k ovládání vytápění a osvětlení boxu i mikroskopu. Celý box je vytápěn spirálou umístěnou v kameni pod mikroskopem. Stabilní a přesnou teplotu v pozorovací komůrce zajišťuje topení umístěné přímo pod ní ve stolečku mikroskopu.

Optimální nastavení vytápění

Pro udržení stabilní teploty v boxu kolem mikroskopu je třeba dobře nastavit také režim klimatizace v místnosti. Důležité je především zvolit režim bez větrání místnosti, protože nadměrná cirkulace vzduchu v místnosti způsobuje větší ztráty tepla z boxu. K udržení stabilní teploty 34°C v boxu se osvědčilo nastavení uvedené v tabulce 9–1.

Klimatizace v místnosti	23°C, topení	Zapnuto 2 dny před pozorováním
Vytápění kamene	67°C	Zapnuto 2 dny před pozorováním
Vytápění stolečku	37°C	Zapnuto 1 hodinu před pozorováním

Tabulka 9-1: Používané hodnoty nastavení vytápění.

Pozorovací komůrky

Pro pozorování v koherenci řízeném holografickým mikroskopu byly postupně vyvinuty stacionární pozorovací komůrky. Stacionární pozorovací komůrky jsou tvořeny dvěma krycími sklíčky, mezi kterými je umístěno mezikruží. Spodní sklíčko je k mezikruží pevně přilepeno, vrchní sklíčko se na komůrku připevňuje vazelínou po nasazení buněk. Medium v komůrce nelze během pozorování již měnit.

9.2. Pozorování buněčného dělení

Po přestěhování mikroskopu do laboratoře Experimentální biofotoniky a zprovoznění veškerého potřebného příslušenství bylo možné začít s experimenty. Protože teplota uvnitř boxu a teplota mikroskopu nebyla zatím dostatečně stabilní, rozhodla jsem se pozorovat pouze kratší biologický proces, buněčné dělení.

Proces přípravy buněk

Buňky byly nejprve standardně trypsinizovány. Jeden až dva dny poté byly odebrány ze suspenze a nasazeny do pozorovací komůrky. Pozorování začalo druhý den po nasazení buněk do komůrek.

Nastavení mikroskopu pro pozorování

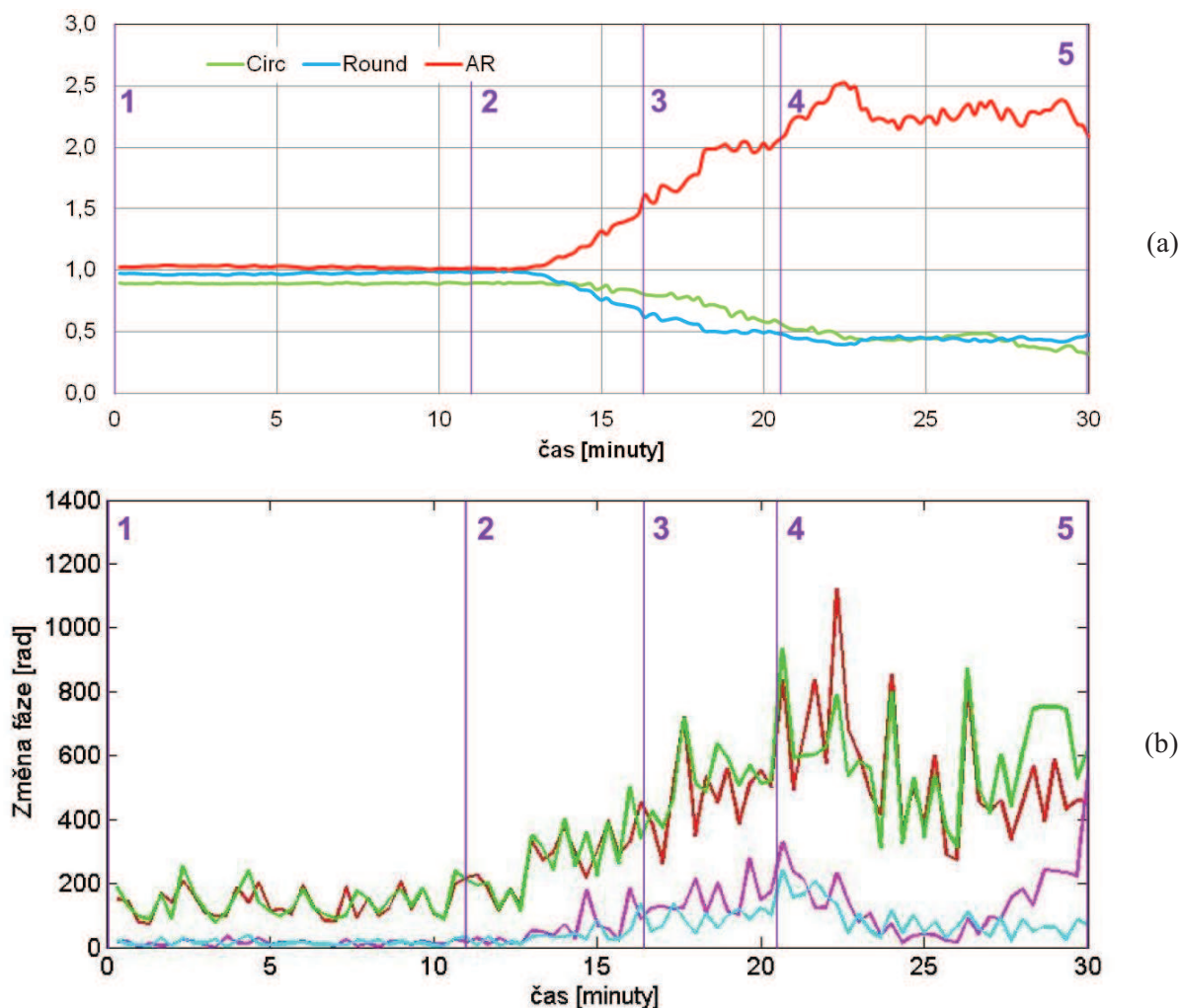
Označení	1	2	3
Filtr	max. propustnost na vlnové délce 650 nm, FWHM = 30 nm	max. propustnost na vlnové délce 650 nm, FWHM = 30 nm	max. propustnost na vlnové délce 650 nm, FWHM = 30 nm
Objektivy	20x; numerická apertura NA = 0,40	20x; numerická apertura NA = 0,40	20x; numerická apertura NA = 0,40
Zisk	0	0	0
Expozice	10 ms	10 ms	15 ms
Průměrování	1 snímek	1 snímek	1 snímek
Interval snímání	10s	10s	20s
Teplota v boxu	31,5°C	31,5°C	32,0°C

Tabulka 9-2: Nastavení mikroskopu při pozorování buněčných dělení.

Výsledky

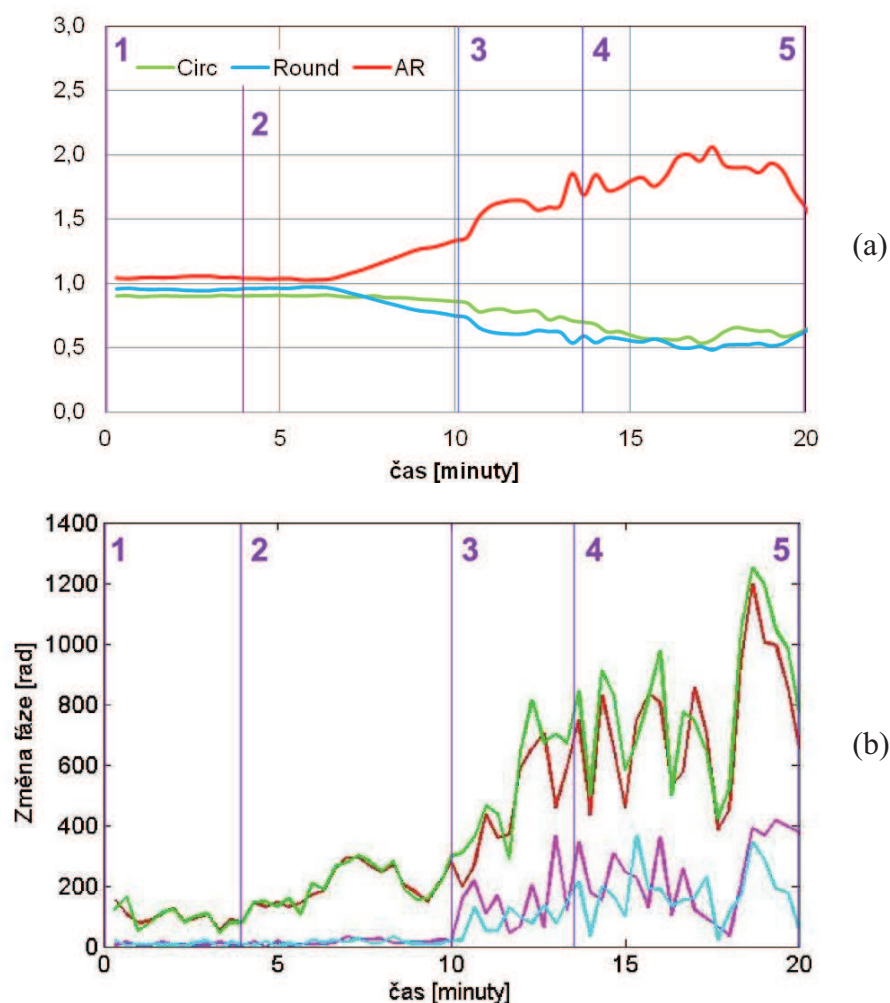
Výběr buňky pro pozorování probíhal na základě jejího tvaru. Na začátku experimentu byla vybrána vždy kulatá buňka s předpokladem, že se jedná o počáteční stadium mitózy. Z přibližně deseti provedených měření se pozorovaná buňka rozdělila pouze ve dvou případech. Tato malá úspěšnost pramenila z nedostatku zkušeností při rozlišení kulaté buňky v důsledku mitózy a kulaté buňky v důsledku její smrti.

V následujících obrázcích 9–1 a 9–2 jsou zobrazeny průběhy charakteristik pro živou, mitotickou buňku a v 9–3 pro mrtvou buňku. Vyhodnoceny jsou parametry kruhovitosti (*Circ*), kulatosti (*Round*), poměru hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy (*AR*) a dynamické fázové difference s krokem 20 s.



Obrázek 9-1: Časové průběhy (a) parametrů tvaru a (b) dynamických fázových diferencí s krokem 20 s mitotické buňky. Úseky označují: 1–2 metafázi, 2–3 anafázi, 3–4 cytokinezi a 4–5 tvorbu krčku a rozdělení buňky.

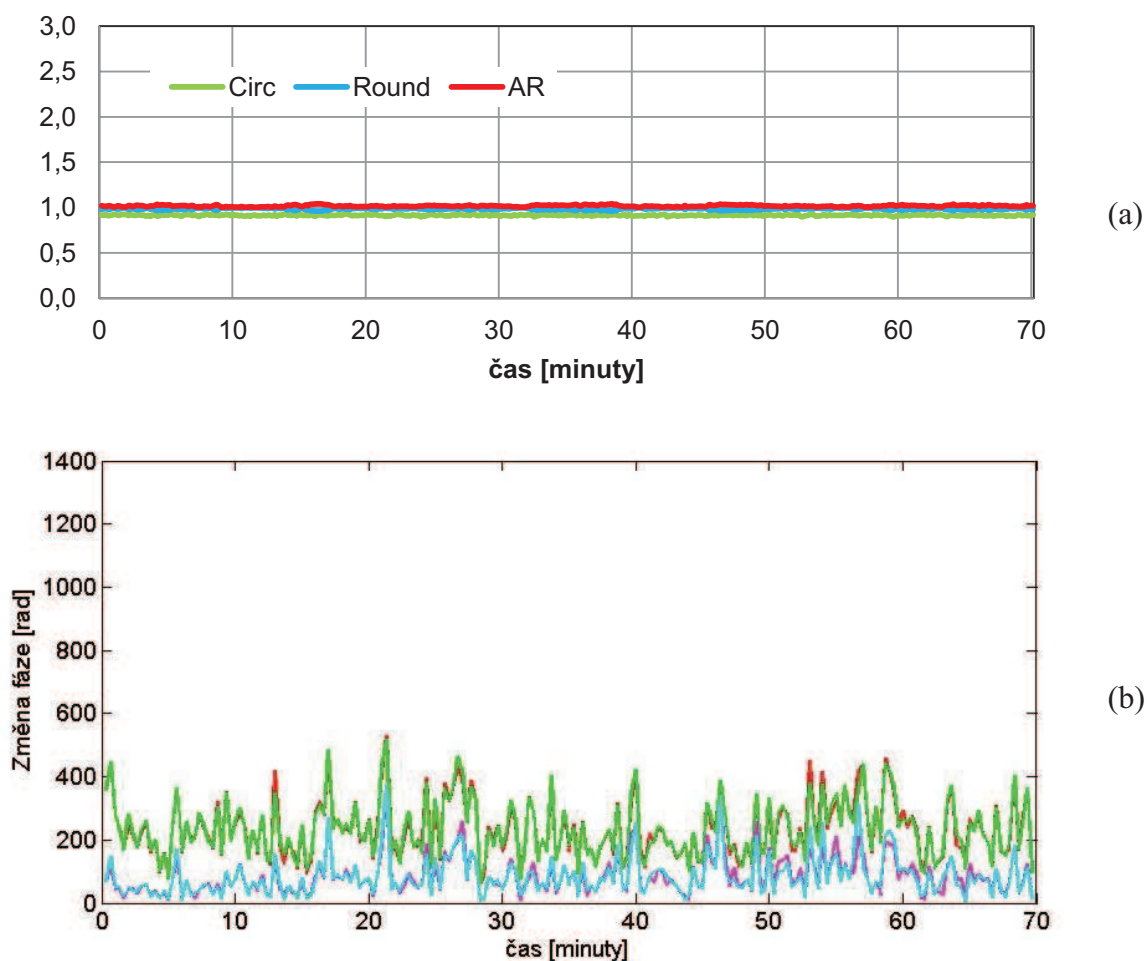
V průběhu metafáze (úsek 1–2) má buňka kulatý tvar charakterizovaný hodnotami parametrů tvaru, které jsou blízko hodnotě rovné jedné. Také pohyb buňky je v této fázi minimální a značně převažuje pohyb hmoty uvnitř buňky nad vnějším pohybem buňky. V anafázi (úsek 2–3) nastává u parametrů tvaru změna, která značí počátek dělení buňky. Tato změna je doprovázena i zvýšeným pohybem hmoty uvnitř i vně buňky. Změny v parametrech tvaru, které odpovídají prodlužování buňky, pokračují i v cytokinezi (úsek 3–4). Stejně tak v cytokinezi pokračuje nárůst pohybu, který přechází v náhodné fluktuace v další části (úsek 4–5). Parametry tvaru nabývají v této fázi (úsek 4–5) také lokálních minim a maxim, které odpovídají aktuálnímu tvaru buňky.



Obrázek 9-2: Časové průběhy (a) parametrů tvaru a (b) dynamických fázových diferencí s krokem 20 s mitotické buňky. Úseky označují: 1–2 metafáze, 2–3 anafáze, 3–4 cytokineze, 4–5 tvorba krčku a rozdělení buňky.

Komentář k obrázku 9–2 je stejný jako k obrázku 9–1, jen s rozdílem, že je zachycena menší část metafáze a závěrečného rozdělování buňky.

Při porovnání průběhů charakteristik zdravých buněk v obrázcích 9–1 a 9–2 je tedy vidět velmi podobné chování charakterizované kulatým tvarem průmětu buňky, útlumem vnějšího pohybu buňky v metafázi a změnou tvaru a postupným zvýšením pohybu během anafáze a cytokineze.



Obrázek 9-3: Průběhy (a) parametrů tvaru a (b) dynamických fázových diferencí s krokem 20 s mrtvé buňky.

Z grafu 9–3 je zřejmé, že průběhy charakteristik tvaru mrtvé buňky nevykazují žádné významné změny v dlouhém čase a fluktuace v průběhu dynamických fázových diferencí jsou způsobeny patrně Brownovým pohybem.

Vzhledem k malé úspěšnosti určení mitotických buněk byl navržen nový proces přípravy vzorků, popsáný v následujícím odstavci, který mírně zvýšil úspěšnost výběru buněk (3 dělení z 8 pokusů).

9.3. Pozorování životního cyklu buňky

Životní cyklus buňky je dlouhodobý děj trvající přibližně 24 hodin. Cílem pozorování bylo zachytit celý životní cyklus buňky od jednoho dělení po následující. Na začátku pozorování byla vybrána kulatá buňka, u které se očekávalo dělení, a ta byla dále pozorována. Při pozorování, které je zde zpracováno, trvalo však zaostřování mikroskopu poněkud delší dobu. Vybraná buňka se během této doby téměř rozdělila, a proto jsou v tomto pozorování od počátku patrné dvě dceřiné buňky. Tato pozorování byla zároveň testem stability mikroskopu.

Proces přípravy buněk

Z kultivační lahvičky bylo opatrně odebráno živné medium, které bylo nahrazeno 5 ml pozorovacího media. Tímto mediem byl poté několikrát omýván kultivační povrch lahvičky tak, aby došlo k uvolnění méně přisedlých buněk (to jsou především buňky chystající se k buněčnému dělení). Vzniklá suspenze byla odebrána a přenesena do zkumavky, ve které buňky po 10 minutách klesly ke dnu. Pipetou pak bylo ode dna zkumavky odebráno dostatečné množství suspenze, která byla nasazena do pozorovací komůrky. Pozorování bylo zahájeno téměř okamžitě po nasazení buněk do pozorovacích komůrek.

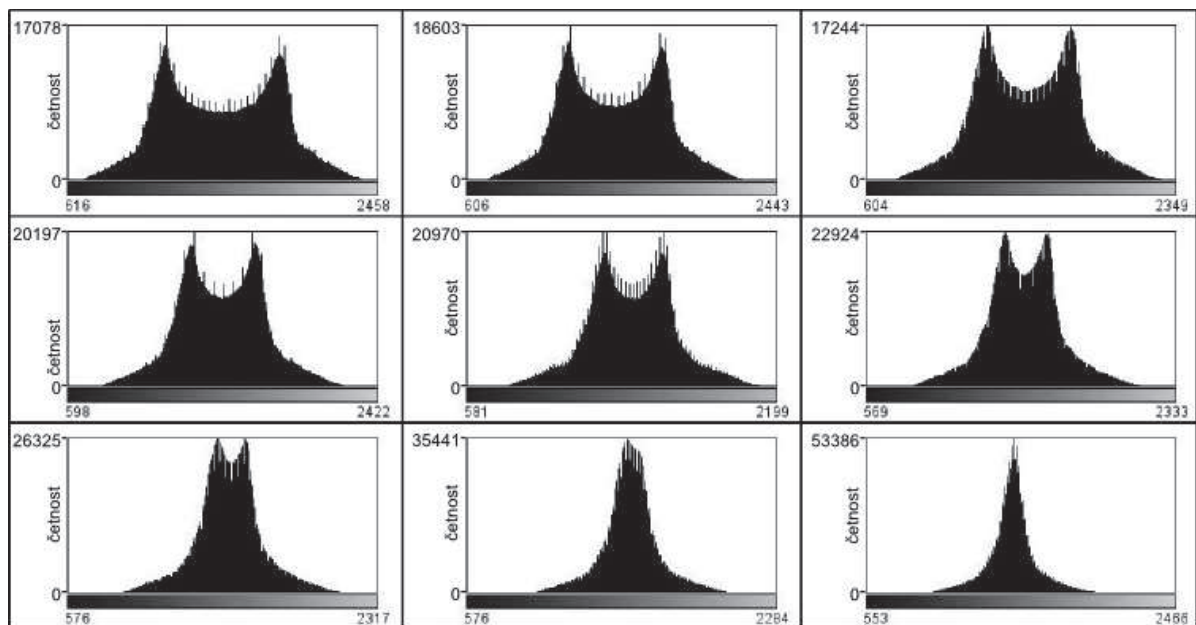
Nastavení mikroskopu pro pozorování

Filtr	max. propustnost na vlnové délce 650 nm, FWHM = 10 nm
Objektivy	20x; numerická apertura NA = 0,40
Zisk	1
Expozice	15ms
Průměrování	3 snímky
Interval snímání	20s
Teplota v boxu	32,7°C

Tabulka 9-3: Nastavení mikroskopu při pozorování buněčného cyklu.

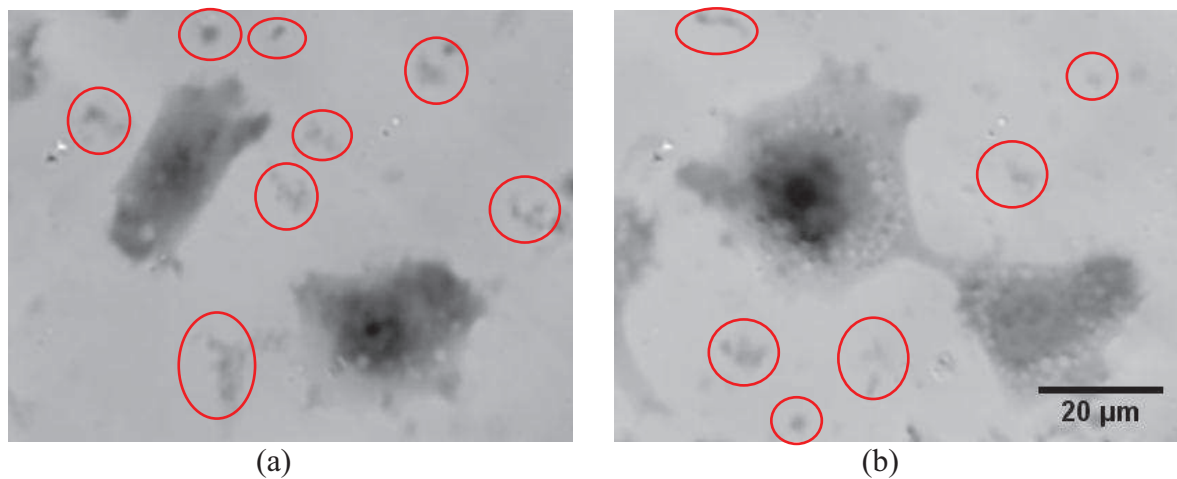
Během pozorování se vyskytlo několik problémů:

1. Pohyblivost buněk: průměrná pohyblivost buněk při normálním cyklu je přibližně 10 μm /hodinu, takže je velmi pravděpodobné, že se buňka během pozorování přesune mimo zorné pole. Proto je nutné vizuálně kontrolovat každých 60 minut polohu sledované buňky a manuálně regulovat pozici zorného pole. Tento problém by do budoucna mohl řešit automatický posuv stolku zpětnou vazbou na polohu těžiště průmětu buňky.
2. Nestabilní nastavení mikroskopu: způsobeno posunem obrazů referenční a předmětové větve vůči sobě. Tím došlo ke ztrátě proužků v hologramu. Nutná je vizuální kontrola nastavení mikroskopu. Tento způsob rozladování lze nejlépe poznat z histogramů hologramů, kde původně kontrastní proužky (dvě maxima v histogramu) postupně splývají v jedinou barvu šedi (jedeno maximum v histogramu). Obrázek 9-4 zobrazuje sérii histogramů hologramů při rozladování. V budoucnu by tento problém měl být vyřešen automatickou justáží mikroskopu.



Obrázek 9-4: Histogramy hologramů při postupném rozladování mikroskopu, interval mezi histogramy je 1 hodina.

3. Zvýšená náročnost na čistotu média: Objeví-li se nečistota v oblasti buňky, je považována programem za součást buňky a znemožňuje tak její přesnou detekci a následný výpočet parametrů. Pro kvalitní pozorování a analýzu dat je tedy nutné medium filtrovat. Ukázka snímků s velkým počtem nečistot je na obrázku 9-5.



Obrázek 9-5: Ukázka snímků s velkým počtem různých částic v mediu označených červenými elipsami, které znemožnili kvalitní rekonstrukci obrazu a analýzu charakteristik z tohoto pozorování

Výsledky

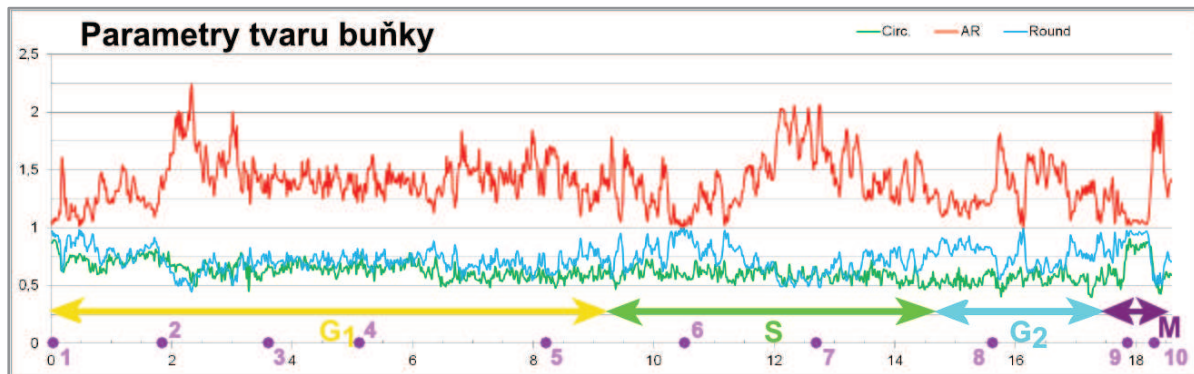
Pozorování buněčného cyklu, od jednoho buněčného dělení po další s intervalem snímání 20 sekund, trvalo celkem 18 hodin a 37 minut. Nasnímáno bylo tedy 3351 snímků.

Všechny snímky byly zpracovány v programu wxide (verze 77), jehož autory jsou Ing. L. Kvasnica a Ing. T. Zikmund. Protože v prvních 564 snímcích byly programem detekovány obě dceřiné buňky, byla v programu ImageJ manuálně vytvořena maska a jedna z dceřiných buněk byla takto odstraněna.

Celý buněčný cyklus byl zpracován v podobě navržených charakteristik do grafů s intervalem vzorkování 1 minuta. Tyto grafy jsou zachyceny na následujících obrázcích a komentovány v textu. Pro základní orientaci byla ke všem grafům přidána osa s typickým časovým průběhem fází životního cyklu buňky. Skutečný tvar buňky ve vybraných okamžicích je zachycen na obrázku 9–6.

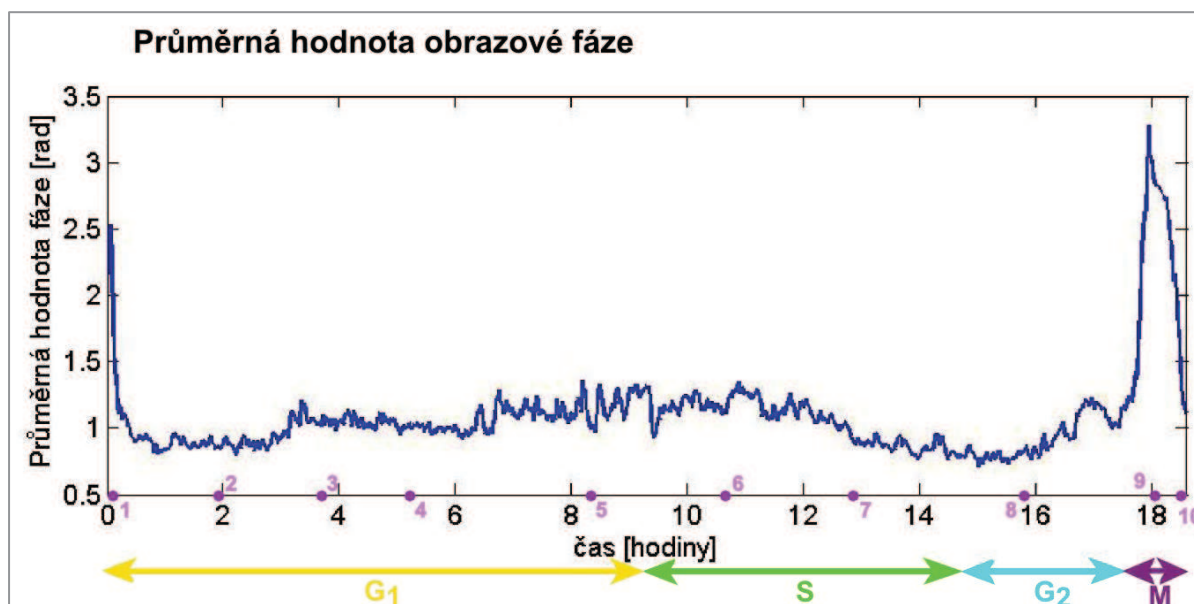


Obrázek 9-6: Tvary buňky ve vyznačených okamžicích během životního cyklu. Buňka vybraná po první mitóze je označena červenou elipsou. Úrovně šedé odpovídají hodnotám obrazové fáze v radiánech.



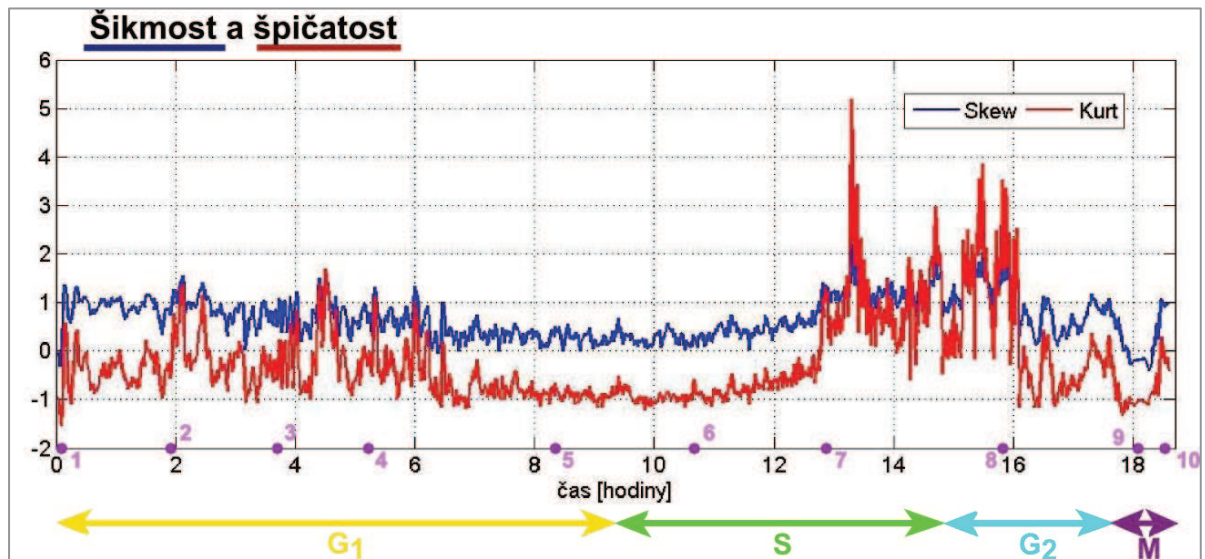
Obrázek 9-7: Časový vývoj hodnot parametrů tvaru buňky během životního cyklu. Uvedené fáze jsou určeny podle typického časového rozložení jednotlivých fází v životním cyklu. K vyznačeným časovým okamžikům jsou v obrázku 9-3 uvedeny skutečné tvary buňky.

Parametry tvaru buňky vykazují v průběhu celého životního cyklu poměrně velké fluktuace. Všechny tři parametry *Circ*, *Round* a *AR* nabývají však současně hodnoty blízké jedné, charakteristické pro kulatý tvar, právě jen v průběhu mitózy.



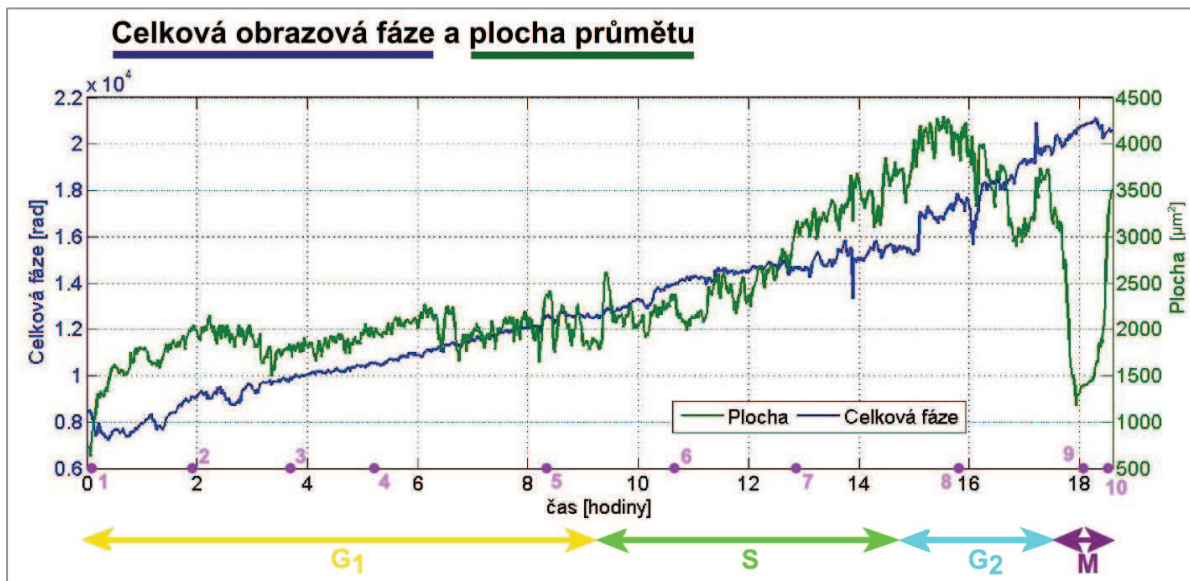
Obrázek 9-8: Časový vývoj průměrné hodnoty obrazové fáze buňky během životního cyklu. Uvedené fáze jsou určeny podle typického časového rozložení jednotlivých fází v životním cyklu. K vyznačeným časovým okamžikům jsou v obrázku 9-3 uvedeny skutečné tvary buňky.

Průměrná hodnota obrazové fáze, která odpovídá průměrné tloušťce buňky, má v oblasti mitózy výrazné maximum. Buňka je tedy během mitózy nejtlustší.



Obrázek 9-9: Časový vývoj hodnot parametrů šikmosti a špičatosti histogramů hodnot obrazové fáze buňky během životního cyklu. Uvedené fáze jsou určeny podle typického časového rozložení jednotlivých fází v životním cyklu. K vyznačeným časovým okamžikům jsou v obrázku 9-3 uvedeny skutečné tvary buňky.

V průběhu parametrů šikmosti a špičatosti můžeme najít tři oblasti (střední fluktuace, malé fluktuace a velké fluktuace). Tyto fluktuace jsou posunuté oproti standardnímu průběhu fází během buněčného cyklu (G_1 , S , G_2), mohly by však dobře vypovídat o skutečném průběhu dějů v buňce. Ve fázi G_1 dochází především k růstu buňky, který je doprovázen lokálními změnami obrazové fáze a odráží se tak v hodnotách šikmosti a špičatosti. Naproti tomu v S fázi dochází k replikaci DNA, což je děj, který se odehrává v jádře buňky. Tento děj tedy nemá vliv na změny vnějšího tvaru buňky, které by se mohly projevit v hodnotách uvedených parametrů. V G_2 fázi pak dochází ke tvorbě vakuol a organel, které mají opět velký vliv na hodnoty obrazové fáze. V průběhu mitózy pak hodnoty obou parametrů významně klesnou.



Obrázek 9-10: Časový vývoj hodnot celkové obrazové fáze a plochy průmětu buňky během životního cyklu. Uvedené fáze jsou určeny podle typického časového rozložení jednotlivých fází v životním cyklu. K vyznačeným časovým okamžikům jsou v obrázku 9–3 uvedeny skutečné tvary buňky.

Obrazová fáze by měla být úměrná hmotě buňky. Hmotu, a proto i obrazová fáze, buňky by se měla v průběhu životního cyklu zvětšovat. Tato tendence je z uvedeného grafu dobře patrná. Občasné skoky v grafu, především ke konci buněčného cyklu jsou způsobeny nečistotami na kameře, které se nepodařilo numericky odstranit v případech, kdy se nacházely na stejných místech jako pozorovaná buňka.

Plocha průmětu buňky během životního cyklu také roste, v průběhu mitózy však prudce klesá a dosahuje svého minima, poté opět roste.

Pohyby těžišť a dynamické fázové difference nebyly vyhodnoceny, protože jejich průběhy byly narušeny posuvy stolku. Stolek musel být během pozorování posouván tak, aby pozorovaná buňka zůstala po celou dobu měření v zorném poli.

10. Závěr

V rámci svojí diplomové práce jsem se zabývala použitím koherencí řízeného holografického mikroskopu ve výzkumu životního cyklu buňky.

V první části práce je stručně shrnuta historie interferenční mikroskopie a její aplikace v biologii. Dále je popsána metoda digitální holografické mikroskopie a způsob zpracování obrazu tak, jak je prakticky realizován na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně. Následně jsou uvedeny běžně užívané mikroskopové techniky sloužící k zobrazování transparentních objektů.

V kapitole zabývající se buněčným cyklem jsou popsány základní fáze života buňky z biologického pohledu. Jednotlivé fáze buněčného cyklu jsou zde zobrazeny pomocí různých mikroskopových technik a jsou zde zhodnoceny výhody a nevýhody uvedených zobrazování.

Z porovnání zobrazení jednotlivých fází buněčného cyklu různými mikroskopovými technikami je zřejmé, že metoda digitální holografické mikroskopie zdaleka nedosahuje specifičnosti fluorescenční mikroskopie. Poskytuje však kvantitativní informaci o obrazové fázi, která je přímo úměrná hmotě buňky. Tuto informaci nelze získat žádnou jinou mikroskopovou technikou, a proto je použití a vývoj digitální holografické mikroskopie pro biologický výzkum zajímavý.

V další části práce byly navrženy a definovány matematické charakteristiky, které by mohly sloužit k online řízení mikroskopu. Navržené charakteristiky byly testovány na naměřených datech a vyhodnoceny. Již dříve používaná metoda dynamických fázových diferencí, která zviditelňuje pohyb hmoty buňky, byla modifikována tak, aby byl odlišen pohyb hmoty uvnitř buňky od vnějšího pohybu buňky jako celku.

V experimentální části bylo provedeno několik pozorování mitózy i celého životního cyklu buňky. Byly stanoveny nutné podmínky pro uskutečnění kvalitního pozorování a měření byla vyhodnocena pomocí navržených matematických charakteristik.

Ze získaných zkušeností vyplývá, že by bylo vhodné provést úpravy jak konstrukční tak softwarové.

Pro konstrukční úpravy bych navrhla především zautomatizovat posuv stolku mikroskopu v osách x a y . To by usnadnilo nejen dlouhodobá pozorování, kdy je nutný posuv stolku tak, aby pozorovaná buňka zůstala v zorném poli, ale i plánovaná statistická měření. V těchto měřeních bude totiž potřeba posunovat zorné pole v přesně definovaných úsecích, což zatím není možné.

Ve vyvíjení softwaru je mnoho věcí ke zlepšení. Za důležité však považuji upravení algoritmu prahování tak, aby se neztrácela informace o odprahované části buňky, a možnost automaticky udržovat těžiště buňky ve středu zorného pole. Toto by mohlo být zajištěno přes zpětnou vazbu na automatizovaný posuv stolku.

Z vyhodnocení vybraných matematických charakteristik lze usuzovat, že pro online řízení mikroskopu by bylo vhodné použít:

- Parametry tvaru buňky a plochu průmětu buňky k identifikaci mitózy a k automatické volbě intervalu snímkování.
- Hodnoty celkové obrazové fáze jako indikátory zdravé rostoucí buňky.

- Hodnoty těžiště obrazové fáze ke zpětné vazbě pro posuv automatizovaného stolku tak, aby pozorovaná buňka byla stále v zorném poli.
- Průměrnou hodnotu fáze k vyhodnocování průměrné tloušťky buňky.
- Parametry šikmosti a špičatosti by bylo vhodné podrobit dalšímu zkoumání během více buněčných cyklů. Pokud by jejich hodnoty vypovídaly o skutečných dějích v buňce, bylo by dobré je využít k tomuto účelu.

Hlavním přínosem práce je ověření funkčnosti koherencí řízeného holografického mikroskopu po provedené rekonstrukci a vyhodnocení navržených matematických charakteristik s ohledem na možnost online řízení mikroskopu.

Bibliografie

1. MARQUET, P. et al., *Digital holographic microscopy for study cellular dynamics*. International Society for Optical Engineering, vol. 5864, (2005).
2. DUNN, G. A., *Transmitted-light Interference Microscopy: a Technique Born Before its Time*. Proceedings of the Royal Microscopical Society, vol. 33, pp. 189-196, (1998).
3. KRUG, W., RIENITZ, J. & SCHULTZ, G., *Contributions to interference microscopy* (Hilger&Watts, London, 1964).
4. DAVIES, H. G. & WILKINS, M. H., *Interference microscopy and mass determination*. Nature, vol. 169, pp. 541, (1952).
5. CUCHE, E., BEVILACQUA, F. & DEPEURSINGE, C., *Digital holography for quantitative phase contrast imaging*. Optics Letters, vol. 24, no. 5, pp. 291-293, (1999).
6. DUNN, A. & RICHARDS-KORTUM, R., *Three-dimensional computation of light scattering from cells*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, vol. 2, no. 4, pp. 898-905, (1996).
7. RAPPAZ, B. et al., *Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium*. Optics Letters, vol. 33, no.7, pp. 744-746, (2008).
8. KEMPER, B. et al., *Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy*. Journal of Biomedical Optics, vol. 11, no. 3, pp. 034005, (2006).
9. KEMPER, B. et al., *Techniques and applications of digital holographic microscopy for life cell imaging*. International Society for Optical Engineering, vol. 6633, (2007).
10. POPESCU, G. et al., *Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics*. Optics Letters, vol. 29, no. 21, pp. 2503-2505, (2004).
11. POPESCU, G. et al., *Optical imaging of cell mass and growth dynamics*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 295, pp. C538-C544, (2008).
12. SRIDHARAN, S., MIR, M. & POPESCU, G., *Simultaneous optical measurements of cell motility and growth*. Biomedical Optics Express, vol. 2, pp. 2815-2820, (2011).
13. KOLMAN, P., *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Disertační práce, VUT v Brně, (2010).
14. MYUNG, K. K., *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications* (Springer, 2011). ISBN 1441977929.
15. UHLÍŘOVÁ, H., *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Disertační práce, VUT v Brně, (2010).

16. CHMELÍK, R. & HARNA, Z., *Parallel-mode confocal microscope*. Optical Engineering, vol. 38, pp. 1635-1639, (1999).
17. CHYTKOVÁ, I., *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – konstrukce a experiment*. Diplomová práce, VUT v Brně, (1999).
18. PROKOPOVÁ, M., *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – teorie a konstrukce*. Diplomová práce, VUT v Brně, (1999).
19. PROKOPOVÁ, M., *Transmisní holografický konfokální mikroskop*. Disertační práce, VUT v Brně, (2002).
20. JANEČKOVÁ, H., *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Diplomová práce, VUT v Brně, (2006).
21. CHANDLER, D. E. & ROBERSON, R. W., *Bioimaging: current concepts in light and electron microscopy* (Jones and Bartlett Publishers, 2009). ISBN 0763738743.
22. Introduction to Fluorescence Microscopy, dostupné z <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html> (22.4.2012).
23. Introduction to Phase Contrast Microscopy, dostupné z <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html> (22.4.2012).
24. MURPHY, D. B., *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging* (John Wiley and Sons, 2001). ISBN 047123429X.
25. Differential interference contrast microscopy, dostupné z http://en.wikipedia.org/wiki/Differential_interference_contrast_microscopy (22.4.2012).
26. Microscopy Resource Center, dostupné z <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html> (22.4.2012).
27. BARTONÍČEK, J., *Koherenci řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Bakalářská práce, VUT v Brně, (2011).
28. ALBERTS, B., *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky* (Espero Publishing, 2000). ISBN 8090290604.
29. Observing Mitosis with Fluorescence Microscopy, dostupné z <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis/index.html> (13.5.2012).
30. RIEDER, C. L. & KHODJAKOV, A., *Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells*. Science, vol. 300, pp. 91-96, (2003).

31. ZIKMUND, T., KVASNICA, L., UHLÍŘOVÁ, H., LOVICAR, L. & CHMELÍK, R., *Dynamical deformation compensation of phase in digital holographic*. Proceedings of SPIE, vol. 7746, (2010).
32. DUNN, G. A. & Zicha, D., *Dynamics of fibroblast spreading*. Journal of Cell Science, vol. 108, pp. 1239-1249, (1995).
33. BABER, R., *Interference microscopy and mass determination*. Nature, vol. 169, pp. 366-367, (1952).
34. KARPÍŠEK, Z., *Matematika IV. Statistika a pravděpodobnost* (CERM, Brno, 2003). ISBN: 978-80-214-3380-9.