



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**VÝVOJ BIOFYZIKÁLNÍ INTERPRETACE DAT
KVANTITATIVNÍHO FÁZOVÉHO ZOBRAZOVÁNÍ**

DEVELOPMENT OF BIOPHYSICAL INTERPRETATION OF QUANTITATIVE PHASE IMAGE DATA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Aneta Křížová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

BRNO 2018

Abstrakt

Doktorská práce se zabývá biofyzikální interpretací dat kvantitativního fázového zobrazování (QPI – quantitative phase imaging) získaného pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM – coherence-controlled holographic microscope). V práci jsou nejprve popsány metody vyhodnocující informace z QPI jako analýza tvarových a dynamických charakteristik segmentovaných objektů a také vyhodnocování samotné fázové informace. Dále je navržena metoda dynamických fázových diferencí (DPD – dynamic phase differences), která umožňuje detailněji sledovat přesuny hmoty uvnitř buněk. Všechny uvedené metody jsou pak využity v biologických aplikacích. V rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí jsou informace z QPI porovnány s daty z průtokové cytometrie a s výhodou je využita kombinace QPI a fluorescenční mikroskopie. Metoda DPD je pak využita při studiu přesunů hmoty uvnitř buňky při osmotických jevech. Zjednodušená metoda DPD je aplikována při výzkumu mechanismu pohybu nádorových buněk v kolagenových gelech.

Abstract

This doctoral thesis deals with biophysical interpretation of quantitative phase imaging (QPI) gained with coherence-controlled holographic microscope (CCHM). In the first part methods evaluating information from QPI such as analysis of shape and dynamical characteristics of segmented objects as well as evaluation of the phase information itself are described. In addition, a method of dynamic phase differences (DPD) is designed to allow more detailed monitoring of cell mass translocations. All of these methods are used in biological applications. In an extensive study of various types of cell death, QPI information is compared with flow cytometry data, and preferably a combination of QPI and fluorescence microscopy is used. The DPD method is used to study mass translocations inside the cell during osmotic events. The simplified DPD method is applied to investigate the mechanism of tumor cell movement in collagen gels.

Klíčová slova

Koherencí řízený holografický mikroskop, kvantitativní fázové zobrazování, dynamické fázové diference, buněčná smrt, osmotické jevy, zobrazování ve 3D prostředích, dynamika buněk, kolagenové gely, filtrace prostorových frekvencí.

Keywords

Coherence-controlled holographic microscope, quantitative phase imaging, dynamic phase differences, cell death, osmotic challenge, imaging in 3D environments, cell dynamics, collagen gels, spatial frequencies filtration.

KŘÍŽOVÁ A. *Vývoj biofyzikální interpretace dat kvantitativního fázového zobrazování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018, 71 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D., a že veškeré materiály, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Ing. Aneta Křížová

Poděkování

Děkuji prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. a MUDr. Pavlu Veselému, CSc. za jejich pomoc, motivaci a nesčetné rady při řešení úkolů této práce. Děkuji také všem kolegům z Laboratoře experimentální biofotoniky za přátelské prostředí a příjemné společně strávené chvíle.

Můj velký dík patří mojí rodině za podporu po celou dlouhou dobu mého studia.

Ing. Aneta Křížová

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Kvantitativní fázové zobrazování (QPI) živých buněk	3
1.2	Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM)	4
1.2.1	Uspořádání a základní vlastnosti.....	4
1.2.2	Kombinace QPI a fluorescence	5
2	Metody biofyzikální interpretace QPI.....	7
2.1	Modelový experiment	8
2.2	Segmentace	9
2.3	Vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik	10
2.4	Vyhodnocování fázové informace.....	13
2.4.1	Vztah QPI a suché hmoty buňky.....	13
2.5	Metoda dynamických fázových diferencí (DPD).....	15
2.5.1	Příprava vstupních dat pro metodu DPD.....	15
2.5.2	Výpočet DPD	15
2.5.3	Omezení přesnosti DPD určené šumem	16
2.5.4	Ilustrace metody DPD na biologickém ději.....	17
3	Zobrazování pomocí CCHM ve 3D prostředích	19
3.1	Závislost zobrazení na míře rozostření vzorku.....	19
3.2	Závislost zobrazení na stupni prostorové koherence osvětlení	22
3.3	Zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření	23
3.3.1	Numerický model.....	25
3.3.2	Experiment	26
3.3.3	Filtrace prostorových frekvencí.....	28
4	Aplikace metod při analýzách buněčných smrtí.....	35
4.1	Porovnání metody QPI a FC	35
4.2	Mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu	38
4.3	Identifikace onkózy	40
5	Aplikace metody DPD při sledování osmotických jevů.....	41
5.1.1	Roztažení buňky v laterálním směru	41
5.1.2	Roztažení buňky v axiálním směru	42
6	Aplikace metod ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech	47
6.1	Zobrazování buněk v kolagenových gelech	47
6.2	Metoda DPD ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech.....	49
7	Závěr	55
	Seznam použité literatury.....	57

1 Úvod

V moderní biologii se od zobrazovacích systémů, jako jsou mikroskopy, již neočekává pouhé zobrazování vzorků, ale také vyhodnocování získané obrazové informace, které dává uživateli možnost pozorované jevy ihned číselně či graficky charakterizovat. Proto je důležité se vyhodnocováním získané obrazové informace zabývat a vyvíjet jeho nové metody.

Předložená doktorská práce se zabývá pokročilými metodami vyhodnocujícími kvantitativní fázové zobrazení (QPI – quantitative phase imaging), které je vytvářeno koherencí řízeným holografickým mikroskopem (CCHM – coherence-controlled holographic microscope) a aplikacemi těchto metod ve výzkumu živých buněk.

Cílem práce bylo vybrat a navrhnout vhodné biofyzikální metody interpretace QPI získaného pomocí CCHM a následně tyto metody využít v biologických aplikacích.

Práce je rozdělena do několika kapitol. Nejprve se v kapitole 2 věnuje výběru a vývoji metod vyhodnocujících QPI, v kapitole 3 se zabývá zobrazováním vzorku ve 3D prostředí a v následujících kapitolách 4, 5, 6 jsou uvedeny konkrétní publikované výsledky jednotlivých metod interpretace QPI v biologickém výzkumu.

Metody biofyzikální interpretace dat vyhodnocující vizuální změny v čase jsou základním prostředkem pochopení biologických dějů již od nepaměti. Výhoda použití CCHM, jakožto nové metody pro tato pozorování, tkví v jedinečnosti získaného kvantitativního fázového obrazu. CCHM totiž poskytuje velmi kvalitní QPI, který zachycuje fázové objekty s velmi vysokým kontrastem. QPI pořízený pomocí CCHM není, v porovnání s metodami používajícími jako zdroj osvětlení laser, rušen parazitními interferencemi ani koherenční zrnitostí (tzv. speklemi) a dosahuje až dvakrát lepšího rozlišení [1, 2]. Přirozený vysoký kontrast zobrazovaných fázových objektů je výhodný především v biologii, kde odpadá nutnost složité přípravy vzorků zahrnující jejich barvení, které může být pro daný vzorek toxické. Kontrastní zobrazení živých buněk navíc umožňuje jejich jednodušší segmentaci a následné sledování a vyhodnocování nejrůznějších tvarových a dynamických charakteristik a jejich změn v čase.

Výhodou QPI je také možnost kvantitativní interpretace získaných dat, která není možná u klasických metod zviditelnění fáze, jako je Zernikův fázový kontrast nebo Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC – differential interference contrast). Protože je fázový signál v QPI přímo úměrný plošné hustotě suché hmoty pozorovaného objektu [3, 4], umožňuje nám jeho vyhodnocení v podstatě pozorované buňky vážit. Pro vyhodnocení biologických dějů může být přínosné také vyhodnocování změn rozložení suché hmoty v buňce. Pro tento způsob vyhodnocování je v práci navržena metoda dynamických fázových diferencí (DPD – dynamic phase differences).

Poněkud uvážlivější přístup vyhodnocování obrazu je třeba zvolit, zobrazujeme-li vzorek umístěný ve 3D prostředí. Proto jsou v kapitole 3 zabývající se touto problematikou nejprve zmíněny podmínky pro dobré zobrazení a teoreticky jsou pak rozebrány vlastnosti zobrazení ve 3D prostředích. Tyto vlastnosti jsou dále demonstrovány na modelovém a reálném zobrazení buňky. Vzhledem k rezervám reálného zobrazení oproti modelové situaci je uvážena možnost použití metod dekonvoluční mikroskopie k dodatečnému zlepšení obrazu.

Poznatky a metody uvedené v kapitolách 1-3 práce jsou použity v biologických aplikacích, jejichž výsledky jsou shrnuty v kapitolách následujících.

Při rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí pomocí CCHM, uvedené v kapitole 4, jsou vyhodnocovány časové záznamy změny tvarových a dynamických charakteristik, stejně jako samotné fázové informace. Pro kontrolní identifikaci jednotlivých typů buněčných smrtí v QPI

je navíc využito fluorescenční mikroskopie. Data získaná z QPI jsou porovnána s daty získanými pomocí průtokové cytometrie, což je standardně používaná metoda v této oblasti. Výsledky vyhodnocovaných tvarových a dynamických charakteristik jsou společně s vysokou kvalitou záznamů QPI jednotlivých dějů přínosem pro studium a rozlišování jednotlivých typů buněčných smrtí.

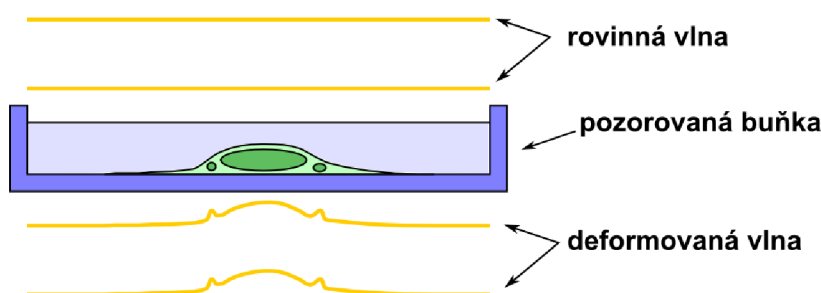
V kapitole 5 jsou shrnuty výsledky aplikace metody DPD ke studiu osmotických jevů, při kterých dochází ke změnám rozložení suché hmoty uvnitř buňky v důsledku ovlivnění vnějšího prostředí. Na tomto experimentu je prokázáno, že navržená metoda DPD umožňuje detailní sledování změn rozložení hmoty buňky, které není dobře identifikovatelné ze samotného QPI.

Kapitola 6 se zabývá výzkumem dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech, tedy v částečně rozptýlném 3D prostředí. CCHM umožňuje buňky v tomto prostředí dobře zobrazit a detailně monitorovat jejich pohyb v čase. Pomocí zjednodušené metody DPD jsou navíc názorně prezentovány změny rozložení hmoty při různých typech pohybu buněk.

1.1 Kvantitativní fázové zobrazování (QPI) živých buněk

QPI je neinvazivní zobrazovací technika, která využívá fyzikálních vlastností živých buněk k vytvoření kontrastního zobrazení. QPI nepoužívá žádná barviva ani značení, která by mohla ovlivnit výsledky pozorování. Na rozdíl od tradičních neinvazivních technik, jako je Zernikův fázový kontrast nebo DIC, získáváme pomocí QPI přímo velikost fázového posuvu způsobeného buňkou.

Fázový posuv je určen odchylkou optické dráhy způsobenou buňkou v daném místě, která je zjednodušeně popsána součinem integrálního indexu lomu a výšky buňky v daném místě [5]. Graficky lze fázový posuv znázornit jako deformaci vlnoplochy rovinné vlny při interakci se zobrazovanou buňkou, což je schematicky znázorněno na obr. 1.



Obr. 1: Schéma znázorňující interakci rovinné vlny s pozorovanou buňkou. Tmavě zelené oblasti uvnitř buňky mají vyšší index lomu než světle zelená oblast, výsledný fázový posuv je dán deformací rovinné vlny po průchodu vzorkem.

Pokud ve výsledném zobrazení reprezentujeme hodnoty obrazové fáze stupni šedé, jsou buňky v QPI zachyceny jako světlé oblasti se silným signálem na téměř nulovém tmavém pozadí. Buňky jsou uprostřed obvykle silnější a dávají zde vyšší fázový signál (větší fázový posuv) než na tenkých okrajích, kde je signál nižší a bez nežádoucích artefaktů, jako je například halo efekt známý ze Zernikova fázového kontrastu [6]. Z tohoto pohledu jsou data získaná z QPI podobná datům z fluorescenční mikroskopie, a proto na ně mohou být použity podobné vyhodnocovací postupy [7].

Pro tištěnou prezentaci dat z QPI je však vhodnější invertované zobrazení. Proto jsou na obrázcích této práce buňky zachyceny jako tmavé objekty na světlém pozadí.

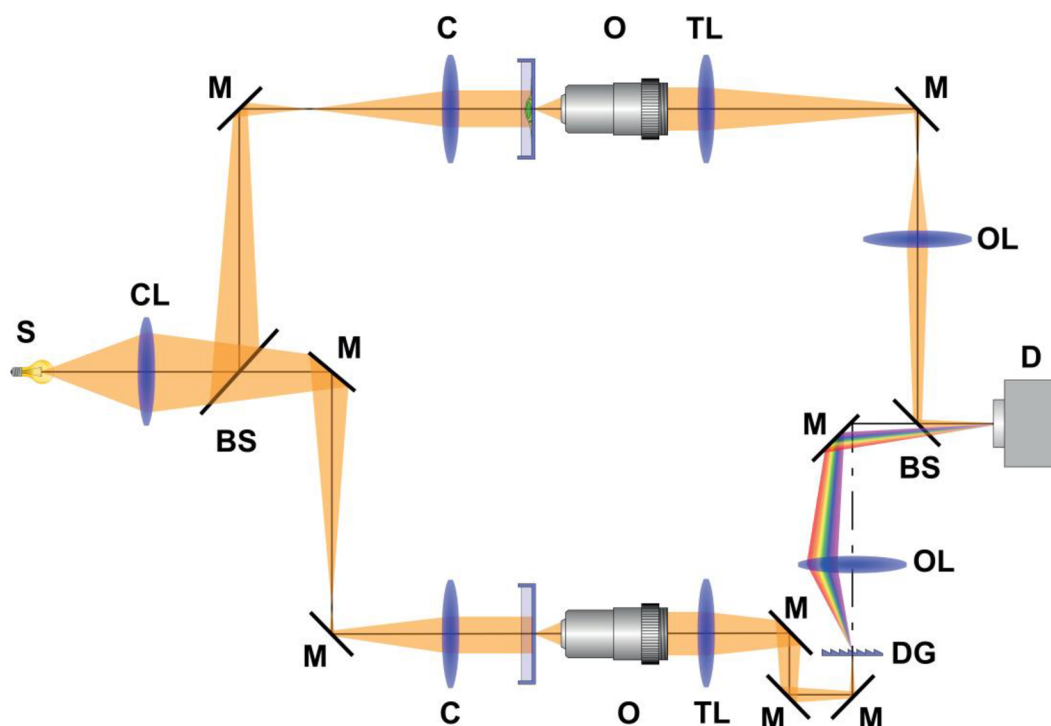
Pro QPI byly vyvinuty různé metody, například digitální holografická mikroskopie [8], ptychografie [9], nebo prostorová interferenční mikroskopie (SLIM – spatial light interference microscopy) [10]. Jednotlivé metody se vyskytují v různých variacích a jejich principy, srovnání a ukázky aplikací lze nalézt v mnoha publikacích. Přehled metod a biologických aplikací poskytuje například kniha *Quantitative phase imaging of cells and tissues* [11]. V posledních letech se přístroje umožňující QPI stávají i komerčně dostupné, což svědčí o jejich potenciálu pro biologický výzkum.

1.2 Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM)

Experimentální část této práce byla prováděna na prototypu multimodálního holografického mikroskopu (MHM) Q-PHASE, který je založen na koncepci CCHM [1,12] a umožňuje jej spojit s dalšími zobrazovacími technikami, například s fluorescenční mikroskopií. MHM Q-PHASE byl vyvíjen v rámci stejnojmenného projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR. Na projektu se podílela firma Tescan Brno, s. r. o., Vysoké učení technické v Brně a Ústav molekulární genetiky AV ČR. Důraz byl kladen především na motorizaci a uživatelskou přístupnost celého přístroje, proto byl vyvinut ovládací program s automatickými justážními procedurami. Do stávajícího ovládacího programu jsou postupně implementovány také nástroje pro vyhodnocování získaných dat, vyvíjené mimo jiné i na základě poznatků této dizertační práce.

1.2.1 Uspořádání a základní vlastnosti

CCHM umožňuje QPI vysoké kvality a s příčným rozlišením, které se blíží rozlišení standardního světelného mikroskopu se širokým polem (wide-field) [1, 2]. Díky koherenčnímu bránovému efektu umožňuje dokonce zobrazování vzorků v rozptýlných prostředích [13, 14]. Optické schéma mikroskopu je uvedeno na obr. 2. Podrobnému popisu uspořádání a základních vlastností mikroskopu se věnují jiné práce, například [1, 15, 16].

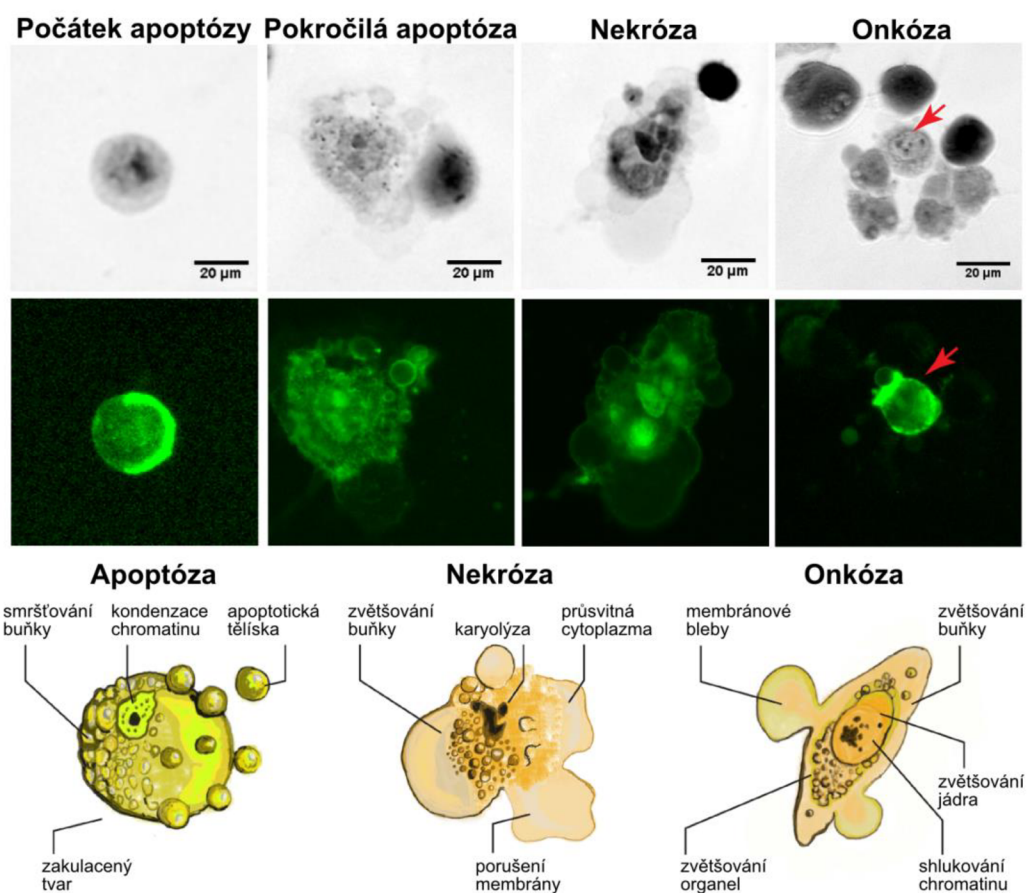


Obr. 2: Schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu. Světelný svazek je rozdělen do dvou větví mikroskopu – předmětové (v obrázku nahoře) a referenční (dole). Obě větve obsahují kondenzor (C), objektiv (O) a tubusovou čočku (TL). V referenční větvi je umístěna difrakční mřížka (DG). Svazky objektové a referenční větve se stýkají ve výstupní rovině a tvoří hologram, který je zaznamenán kamerou (D). S – zdroj; CL – kolektorová čočka; BS – dělič svazku; M – zrcadlo; C – kondenzor; O – objektiv; TL – tubusová čočka; DG – difrakční mřížka; OL – vstupní objektiv; D – detektor.

1.2.2 Kombinace QPI a fluorescence

Za velmi přínosnou je považována také kombinace QPI a fluorescence v MHM Q-PHASE, protože QPI zachycuje celkovou fázovou informaci o vzorku a fluorescenční zobrazení můžeme použít ke zviditelnění nebo potvrzení specifického objektu nebo děje.

Kombinaci QPI a fluorescenční mikroskopie jsme úspěšně použili ve studii různých typů buněčné smrti vyvolané na buňkách PC3 látkou plumbagin [17]. Pomocí QPI byly na buňkách identifikovány základní morfologické znaky jednotlivých typů smrti a fluorescenční značení látkou Annexin V zviditelnilo buněčné membrány a potvrdilo tak jednotlivé druhy buněčné smrti. Ukázka jednotlivých typů buněčných smrtí zobrazených v QPI a fluorescenční mikroskopii spolu se schémata znázorňujícími hlavní morfologické znaky jednotlivých typů buněčných smrtí je na obr. 3.



Obr. 3: Morfologické znaky jednotlivých typů buněčných smrtí. První řádek: snímky QPI; druhý řádek: snímky fluorescenční mikroskopie, barvení Annexin V; třetí řádek: schémata jednotlivých typů buněčných smrtí s vyznačením hlavních morfologických znaků. Pro QPI i fluorescenční mikroskopii byly použity objektivy 20×/0,5. Převzato z [17].

2 Metody biofyzikální interpretace QPI

Pro pozorování a vyhodnocování chování živých nebarvených buněk *in vitro* se často používají metody jako Zernikův fázový kontrast nebo DIC. Obě tyto metody používají speciálních optických sestav, které převádějí změny ve fázi světla na zaznamenané změny amplitudy světla. Kontrast ve snímcích z těchto metod je obvykle nižší než ve snímcích z QPI a má pouze kvalitativní význam. Hodnoty signálu v jednotlivých pixelech tedy nelze interpretovat v přímé závislosti na jakékoli fyzikální charakteristice pozorovaného objektu. Navíc jsou tyto snímky obtížněji segmentovatelné než snímky z QPI.

Hodnoty signálu QPI mají přímou souvislost s plošnou hustotou suché hmoty buňky (podrobněji v části 2.4.1) a díky jednoznačnému a vysokému kontrastu mezi pozorovanými objekty a pozadím jsou snímky jednodušeji segmentovatelné. QPI tedy umožňuje studovat jednotlivé buňky, jejich fenotypy a heterogenitu i vývoj v čase robustněji. V porovnání se zkoumáním pouze průměrných hodnot celých populací buněk má studium charakteristik jednotlivých buněk možnost citlivěji rozlišovat a lépe tak porozumět různým biologickým dějům [18].

Správná segmentace je základním předpokladem pro správné vyhodnocení jak tvarových, tak dynamických charakteristik jednotlivých buněk a má tedy vliv na následnou biologickou interpretaci získaných dat. Stejně jako existuje mnoho různých metod zobrazení buněk, tak existuje i mnoho metod pro segmentaci získaného obrazu [19, 20, 21]. Pro segmentaci QPI živých buněk získaného pomocí CCHM byla vybrána metoda watershed [22, 23].

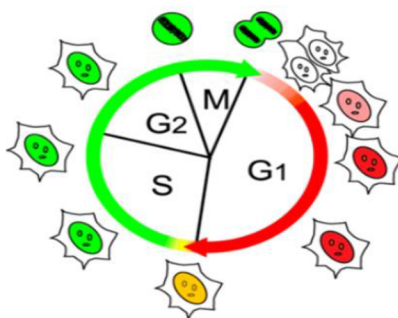
Výběr vyhodnocovaných tvarových, fázových a dynamických charakteristik pak probíhal na základě testování parametrů měřených ve volně dostupných softwarech (ImageJ, CellProfiler) a dle požadavků kolegů biologů pro testované biologické aplikace. Rozsáhlejší soubor charakteristik, který lze použít pro automatickou klasifikaci morfologie buňky pomocí CCHM je uveden v článku [24].

Vybraná segmentační metoda a vyhodnocované tvarové, fázové i dynamické charakteristiky QPI byly následně začleněny přímo do ovládacího programu mikroskopu MHM Q-PHASE, na jehož testování jsem se osobně podílela.

Části 2.2, 2.3 a 2.4 popisují vybraný proces segmentace a vyhodnocování tvarových, fázových i dynamických charakteristik QPI na modelovém experimentu tak, jak probíhá v ovládacím programu mikroskopu. V části 2.5 je samostatně popsána navržená metoda DPD. Využití jednotlivých metod v biologických aplikacích je pak ukázáno v kapitolách 4, 5 a 6.

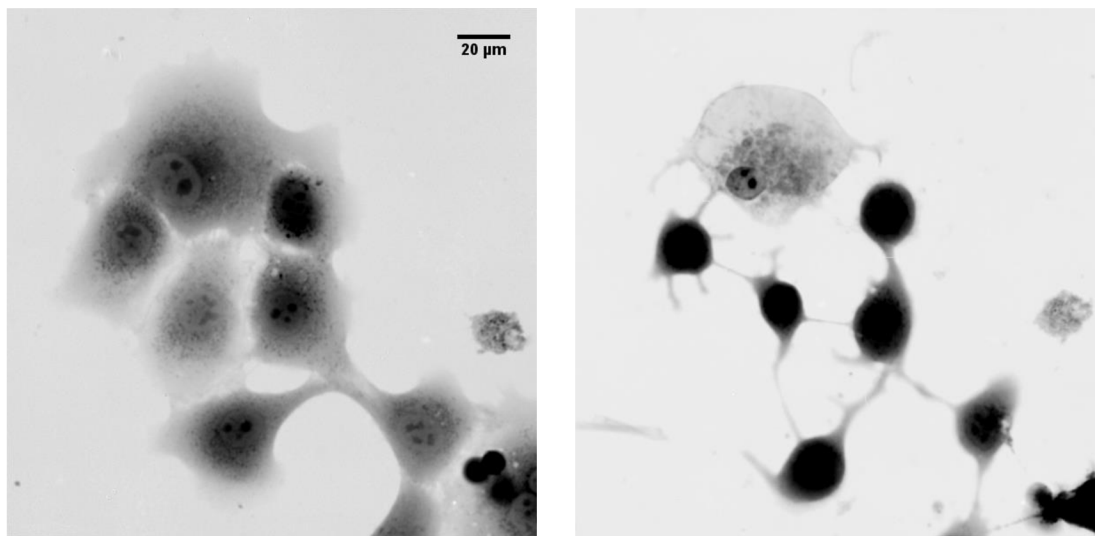
2.1 Modelový experiment

Jako modelový experiment byla použita data z prvních šesti hodin měření životních cyklů buněk, která vzhledem k poruše vytápění boxu mikroskopu nebylo možné použít k původnímu záměru. Vlivem zvýšení teploty totiž došlo k výrazným morfologickým změnám buněk a jejich následné smrti. Pro experiment byly použity buňky označované jako NMuMG/Fucci2, které byly kultivovány ve standardním médiu DMEM za teploty 37 °C a při 5 % CO₂. Díky použitému specifickému značení (ThermoFisher, Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor) bylo možno u jednotlivých buněk rozlišit různé fáze jejich buněčného cyklu (viz. obr. 4), a to přechod mezi mitózou (M) a fází G1, a přechod buňky do S fáze [25]. Informace z fluorescenčního modulu mikroskopu zde byla použita pouze jako doplňující a nesloužila k segmentaci buněk. Na začlenění informace z fluorescenčního modulu do procesu segmentace a dalších analýz se však pracuje.



Obr. 4: Barva emisního záření použitého barevného značení během životního cyklu buňky NMuMG/Fucci2. Převzato z [25].

Počáteční a koncový stav buněk modelového experimentu ukazuje obr. 5.



Obr. 5: Počáteční a koncový stav buněk modelového experimentu (časový rozdíl mezi snímky je 6 hodin), pro které byly vyhodnocovány tvarové a dynamické charakteristiky. Objektivy 20×/0,5, invertované zobrazení fáze (tmavší odstíny šedé odpovídají větším fázovým posuvům).

2.2 Segmentace

Segmentace je klíčovým krokem při vyhodnocování QPI živých buněk. QPI získané pomocí CCHM poskytuje po nutných procesech navazování a kompenzace fáze, popsanych v [26, 27, 28], již zobrazení vhodné pro samotnou segmentaci. Živé buňky, v klasických metodách mikroskopie nekонтрастní fázové objekty, jsou v QPI zachyceny ve velmi dobrém kontrastu, kdy hodnoty fázového posuvu fluktuující kolem nuly odpovídají pozadí a vyšší hodnoty potom sledovaným živým buňkám. Rozdělení hodnot signálu v zobrazení je tedy bimodální a umožňuje použití jednoduchých segmentačních metod, jako jsou prahování nebo watershed [20, 22, 23].

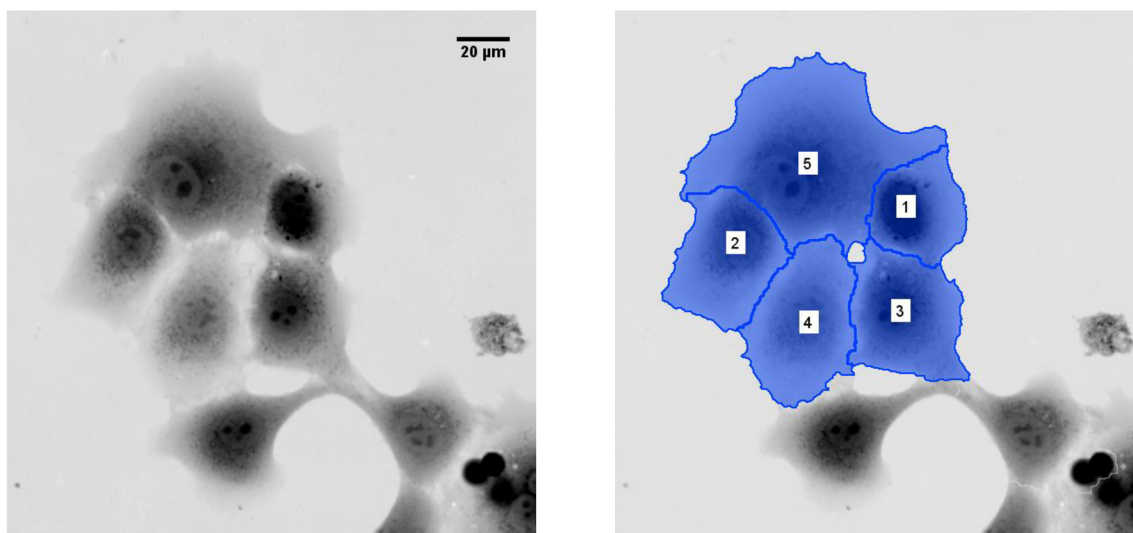
V této práci byla pro segmentaci využívána metoda watershed [23], která je založena na názorné představě zaplavování krajiny vodou. Hodnoty jednotlivých pixelů obrazu jsou chápány jako hodnoty nadmořské výšky a hranice segmentů jsou pak určeny linií, kde se stýkají dvě zaplavené oblasti. Metoda watershed je vhodná pro segmentaci zobrazení živých buněk, protože dobře funguje i na částečně konfluentních porostech buněk. Metoda je implementována přímo v ovládacím programu mikroskopu, kde navíc umožňuje použití volitelných operací, které slouží uživateli k větší kontrole prováděné segmentace a filtraci nežádoucích artefaktů.

Segmentace tedy probíhá následovně:

- Pomocí běžného prahování je obraz rozdělen na pozadí a objekty - buňky (hodnota pro prahování je zadávána uživatelem v $\text{pg}/\mu\text{m}^2$).
- Volitelně je provedena operace morfologického uzavření na odprahovaných objektech (to umožňuje odstranit v buňkách falešné díry, které mohou být způsobeny například vakuolami nebo šumem v blízkosti okraje buňky).
- Metodou watershed jsou rozsegmentovány jednotlivé buňky.
 - Filtrován je výstřelový šum nebo malé nečistoty – objekty s hmotností nižší než je zadaná hodnota.
 - Dotýkající se objekty, které mají hmotnost nižší, než je zadaná hodnota, jsou spojeny a považovány za jediný objekt.
- Volitelně jsou odstraněny buňky, které se dotýkají okraje zorného pole.

Následně je v softwaru umožněna ještě manuální korekce získaných dat, chybně rozdělenou buňku lze spojit a případné spojené buňky rozdělit. Pokud se v obraze úspěšně podaří buňky segmentovat, lze začít s vyhodnocováním jejich tvarových, fázových i dynamických charakteristik a jejich změn.

Ukázka segmentace shluku buněk modelového experimentu metodou watershed je na obr. 6.



Obr. 6: Ukázka segmentace shluku buněk v modelovém experimentu metodou watershed, hranice mezi buňkou a pozadím je $0,04 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$, objektivy $20\times/0,5$, invertované zobrazení.

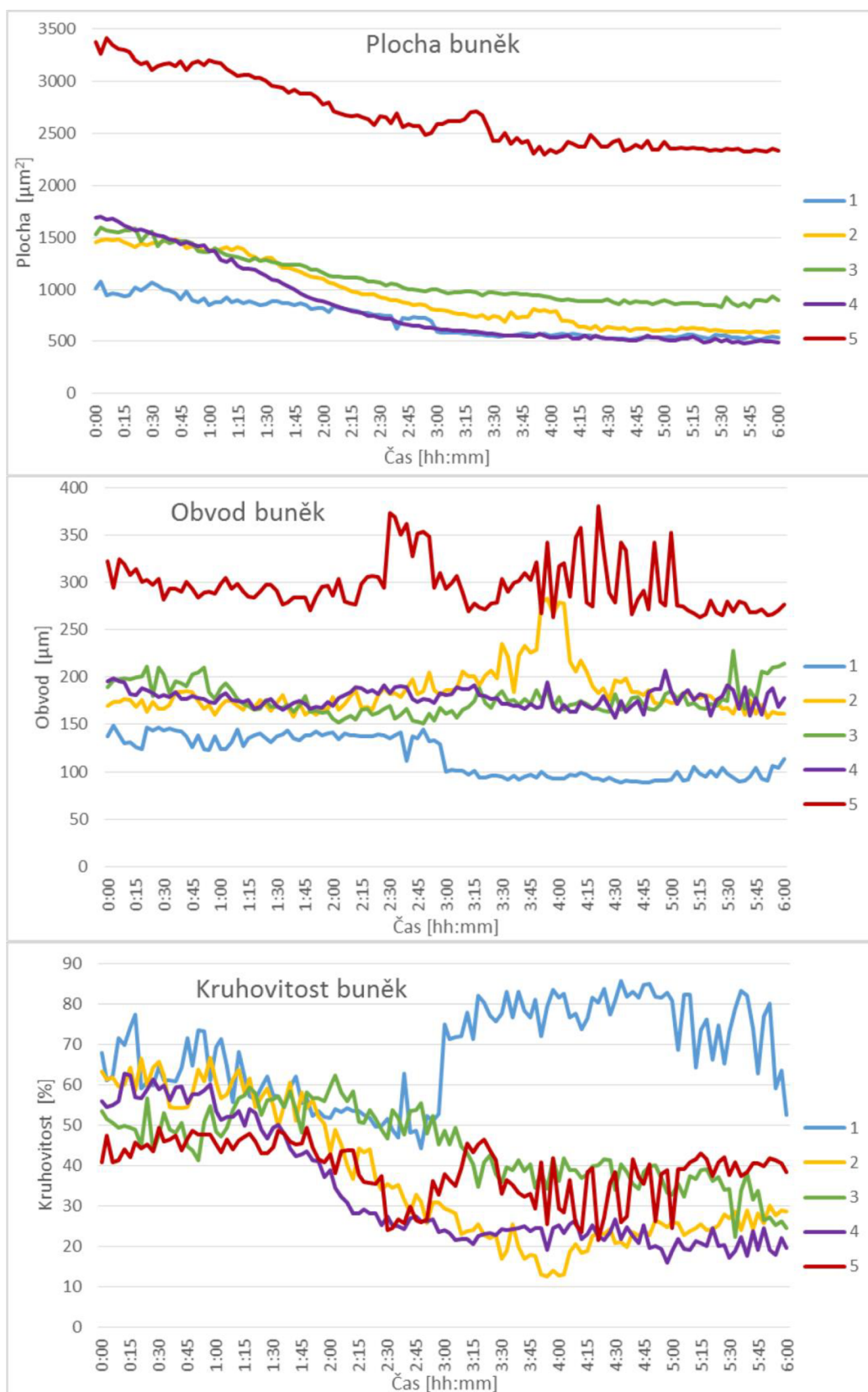
2.3 Vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik

V současné době lze pomocí ovládacího softwaru MHM Q-PHASE analyzovat tyto vybrané

- **tvarové charakteristiky:**
 - plocha buňky S – plocha projekce buňky do obrazové roviny,
 - obvod buňky o – obvod projekce buňky do obrazové roviny,
 - kruhovitost buňky C – určuje odchylku tvaru projekce buňky od kruhového tvaru v závislosti na ploše buňky a obvodu buňky podle vztahu $C = 4\pi S/o^2$, hodnotě $C = 1$ odpovídá kruh,
- **dynamické charakteristiky:**
 - trajektorie buňky – geometrická čára, kterou při pohybu opisuje projekce těžiště buňky, jehož poloha je vypočtena s využitím naměřené distribuce suché hmoty buňky,
 - celková uražená vzdálenost buňkou – délka trajektorie buňky,
 - směrovost pohybu buňky – poměr vzdálenosti počátečního a koncového bodu trajektorie buňky a celkové uražené vzdálenosti udávaný v procentech.

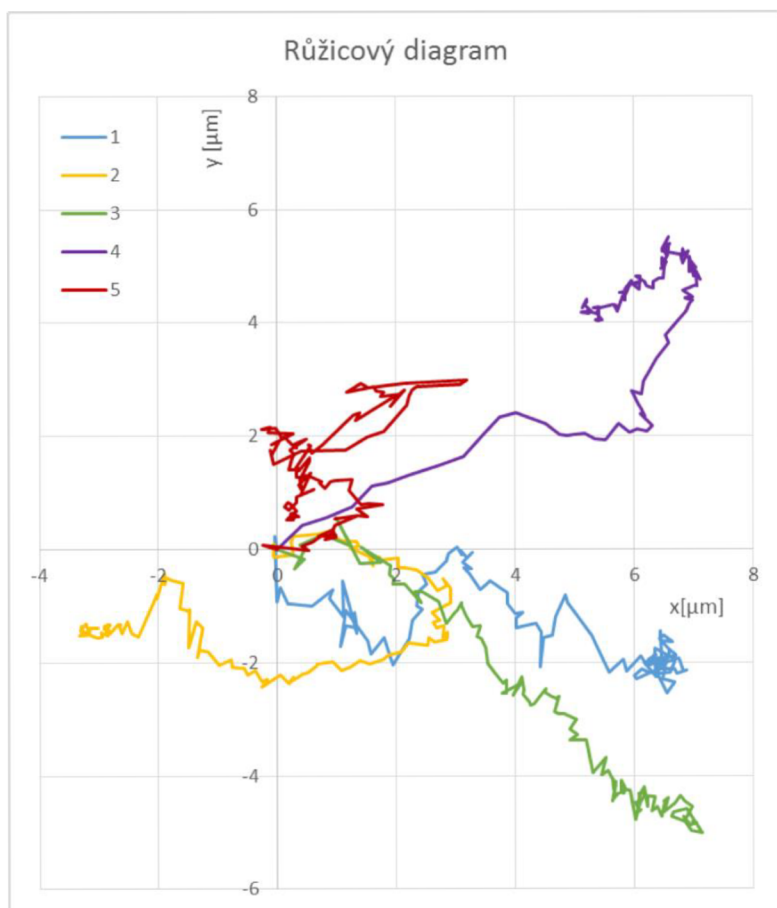
Průběh vyhodnocovaných tvarových charakteristik vybraných buněk modelového experimentu (obr. 6) ukazuje obr. 7, dynamické charakteristiky jsou zachyceny na obr. 8. a v tabulce 1.

Z grafů na obr. 7 je zřejmé, že během modelového experimentu (viz. část 2.1) se plocha všech buněk zmenšila, zatímco hodnota jejich obvodu zůstala téměř nezměněna. To znamená, že tvar buněk se stal členitějším a naznačuje to také určitou degeneraci buněk. Parametr kruhovitost vykazuje zvýšení u buňky 1, která se oproti ostatním výrazně zakulatila.



Obr. 7: Průběh tvarových charakteristik vybraných buněk modelového experimentu.

Trajektorie buněk znázorňuje růžicový diagram na obr. 8. Ukazuje, že všechny buňky se během experimentu pohybovaly velmi málo, jen o několik μm . Hodnoty celkové uražené vzdálenosti jednotlivých buněk a směrovosti jejich pohybu jsou uvedeny v tabulce 1. Největší směrovost vykazovala buňka 3, nejmenší buňka 5, která se první polovinu experimentu pohybovala jedním směrem a druhou polovinu směrem opačným.



Obr. 8: Trajektorie pohybu vybraných buněk modelového experimentu v podobě růžicového diagramu.

Buňka	1	2	3	4	5
Celková uražená vzdálenost [μm]	29,7	20,7	24,1	21,8	25,6
Směrovost pohybu [%]	23	17	35	31	2

Tabulka 1: Hodnoty celkové uražené vzdálenosti a směrovosti pohybu vybraných buněk modelového experimentu.

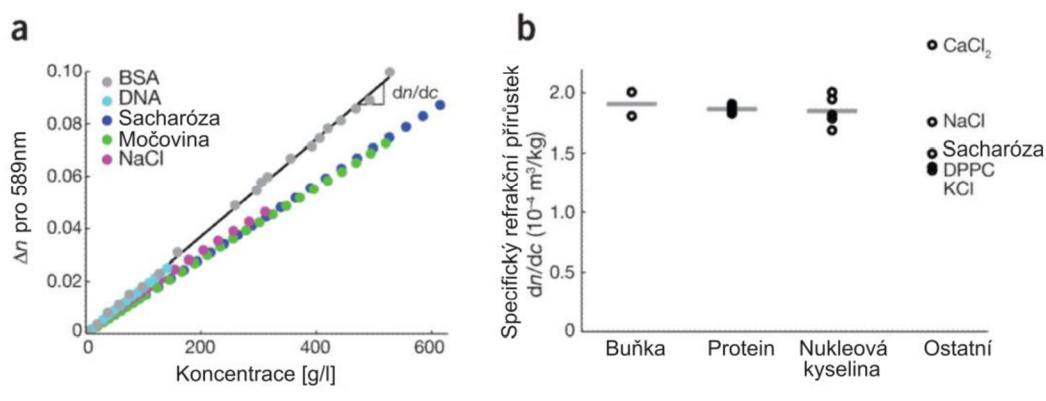
2.4 Vyhodnocování fázové informace

V metodách nazývaných společně QPI nebo kvantitativní fázová mikroskopie je fázový posuv způsobený pozorovaným vzorkem přesně měřen.

Fázový posuv koresponduje s optickým dráhovým rozdílem, který je určen indexem lomu buňky a výškou buňky [29], vliv těchto parametrů však nelze jednoduše zkoumat samostatně. Pro odlišení příspěvku indexu lomu buňky a výšky buňky byly vyvinuty různé metody [5, 30, 31, 32]. Vztah mezi fázovým posuvem a plošnou hustotou suché hmoty buňky v daném místě je však přímočarý a odlišení příspěvku indexu lomu a výšky buňky pro přepočítání fázového posuvu na suchou hmotu buňky není třeba. Schéma znázorňující fázový posuv (nebo také deformaci vlnoplochy) je znázorněno na obr. 1.

2.4.1 Vztah QPI a suché hmoty buňky

Suchá hmota buňky je tvořena jejím bezvodým obsahem a byla definována jako hmotnost buňky po odpaření vody. Suchá hmota buňky je tvořena biomolekulami proteinů, lipidů, nukleových kyselin a sacharidů [4]. Tyto biomolekuly se skládají především z lehkých atomů jako uhlík, kyslík, vodík a dusík, které jsou spojeny jednoduchými vazbami. Proto tyto biomolekuly mají podobné elektrické vlastnosti a se světlem interagují podobným způsobem [33]. Většina biomolekul totiž vykazuje lineární závislost mezi indexem lomu a koncentrací, jak ukazuje obr. 9(a).



Obr. 9: Specifický refrakční přírůstek různých biomolekul. (a) Změny indexu lomu Δn různých biomolekul v závislosti na jejich koncentraci, sklon křivky dn/dc , kde n je index lomu a c je koncentrace, definuje specifický refrakční přírůstek používaný k určení suché hmoty buňky v QPI. (b) Specifický refrakční přírůstek různých skupin biomolekul, průměrná hodnota je vyznačena vodorovnou čarou. BSA – bovinní sérum, DPPC – fosfolipid. Převzato z [29].

Hodnota specifického refrakčního přírůstku, která je definována jako poměr změny indexu lomu a změny koncentrace, je pro většinu biomolekul velmi podobná (viz. obr. 9(b)). Proto je možné hodnoty specifického refrakčního přírůstku nahradit jedinou průměrnou hodnotou a z ní potom vycházet při přepočtu fázového posuvu způsobeného buňkou na její hmotu [29]. Přírůstek indexu lomu pak odpovídá přírůstku suché hmoty buňky. Index lomu je tedy přímo úměrný suché hmotě buňky a konstanta úměrnosti α je nazývána specifický refrakční přírůstek [33].

Celková suchá hmota buňky je pak dána integrálem přes plochu buňky [34]:

$$m = \iint \left[\frac{OPD}{(100-\alpha)} \right] dA,$$

kde m je celková suchá hmota buňky v pg, OPD je optický dráhový rozdíl měřený v μm , α je specifický refrakční přírůstek v $\mu\text{m}^3/\text{pg}$ a A je plocha buňky v μm^2 . Uvedený vztah platí pro živé buňky ve vodných médiích.

Hodnota průměrného specifického refrakčního přírůstku je obvykle aproximována hodnotou:

$$\alpha = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}.$$

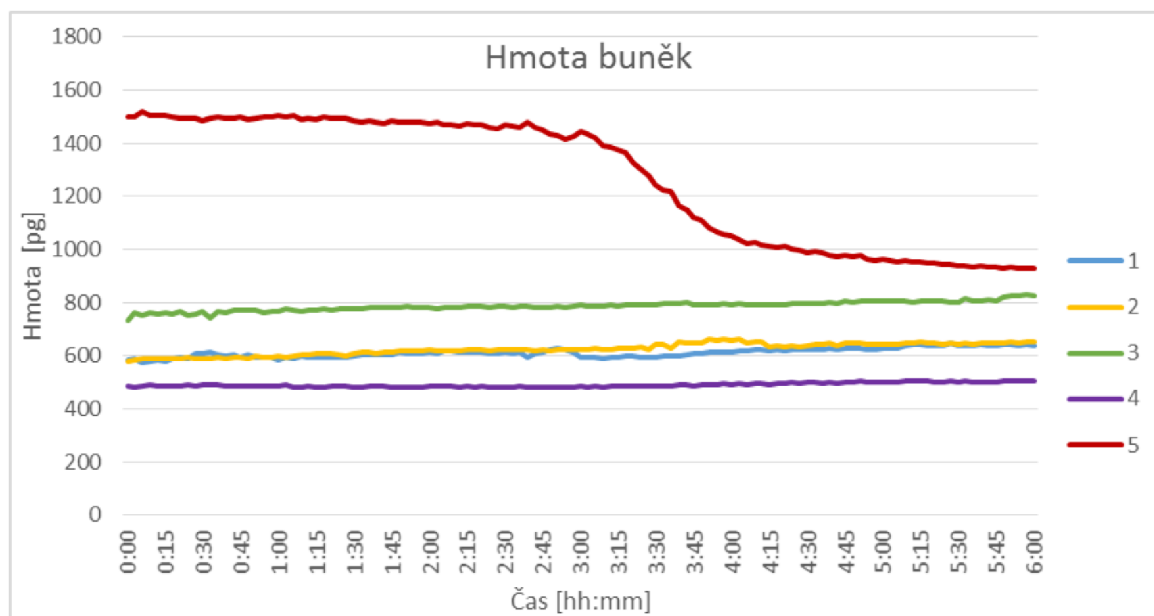
Vztah pro celkovou suchou hmotu buňky i přibližná hodnota specifického refrakčního přírůstku byly více rozebrány a experimentálně ověřeny v práci Ing. Jany Čollákové [35].

Použití celkové suché hmoty buňky je oprávněné především při měření a porovnávání hmoty buněk mezi jednotlivými populacemi nebo při zkoumání časového vývoje hmoty buněk, kdy je důležitější relativní poměr, či změna hmoty a ne její absolutní hodnota. Interpretace fázového posuvu jako suché hmoty buňky je často používána v biologických aplikacích QPI a lze ji najít například v [33, 34, 36, 37, 38]. V dalším textu budeme suchou hmotu buňky označovat zkráceně jako hmotu buňky.

Měřením hmoty buněk v čase přímo pomocí CCHM se zabývala také Ing. Klára Kovářová ve své bakalářské a diplomové práci [39, 40].

Zajímavou biologickou aplikací, pro níž se používá jak měření hmoty buněk tak vyhodnocování tvarových parametrů buněk, je studium životních cyklů buněk nebo studium vlivu různých látek na buňky. Příklady těchto studií lze nalézt například v článcích [7, 34, 36, 37, 38, 41, 42].

Na obr. 10 je ukázka vývoje hmoty buněk v modelovém experimentu, kde vzhledem k prasknutí a vylití obsahu buňky 5 do jejího okolí hmota buňky výrazně poklesla. Hmota ostatních buněk navzdory nepříznivým kultivačním podmínkám modelového experimentu dokonce po celou dobu pozorování mírně rostla.



Obr. 10: Vývoj hmoty vybraných buněk během modelového experimentu.

2.5 Metoda dynamických fázových diferencí (DPD)

Při snímání s krátkým časovým intervalem, které CCHM umožňuje, mohou být rozdíly mezi jednotlivými fázovými obrazy na první pohled velmi nepatrné. Proto jsme pro zviditelnění přesunů suché hmoty uvnitř buňky a malých, z nezpracovaného fázového obrazu, těžko rozeznatelných změn, navrhli metodu DPD. Tato metoda využívá barevného kódování ke zviditelnění rozdílů mezi fázovými obrazy.

Základy metody DPD byly navrženy již v práci dr. Hany Uhlířové [43] a dále pak rozšířeny v méj diplomové práci [44]. V rámci mého doktorského studia jsme metodu dále optimalizovali, především jsme specifikovali vstupní data metody a stanovili limit nejmenší možné detekovatelné změny daný šumem v časové sekvenci obrázků. Metodu jsme použili při studiu osmotických jevů a získané výsledky jsme publikovali [45].

Metodu DPD jsme vyvíjeli dříve, než byla do ovládacího programu mikroskopu začleněna segmentační metoda watershed, proto v tomto případě probíhala příprava vstupních dat způsobem popsaným v části 2.5.1. Pro přehlednost uvádím v následujících částech, jak požadavky na vstupní data a definici nejmenší detekovatelné změny, tak vzorce pro výpočet DPD. Dále jsou v samostatných kapitolách 5 a 6 uvedeny výsledky získané při použití metody DPD pro výzkum osmotických jevů a výsledky zjednodušené metody DPD ve výzkumu dynamiky nádorových buněk ve 3D prostředí.

2.5.1 Příprava vstupních dat pro metodu DPD

V případě CCHM zaznamenává kamera komplexní informaci o světelné vlně, tato informace se nazývá hologram. Z hologramu se následně pomocí rychlé Fourierovy transformace [46] vypočítá fáze vlny a amplituda. Na fázi jsou pak aplikovány běžné metody navazování fáze [26, 27]. Deformace způsobené optickým systémem jsou odstraněny naší vlastní metodou [28]. Výsledná fáze obsahuje pouze informace o fázovém posuvu způsobeném pozorovaným objektem a hodnoty fáze pozadí, které kvůli šumu fluktuují kolem nulové hodnoty.

Živé buňky pozorované v QPI způsobují obvykle vyšší fázový posuv v oblasti jádra a jadérek. Tento fakt lze využít k detekci buněk. V obraze jsou detekovány vysoké hodnoty fázového posuvu, objekty považované za buňky jsou limitovány minimální velikostí plochy a okraje buňky jsou určeny limitní hodnotou pozadí. Z pozadí snímku je určován prostorový a časový šum. Hodnoty pozadí a objektů neodpovídajících buňkám jsou pak nahrazeny nulovými hodnotami a buňky jsou tak segmentovány od pozadí snímku. Takovýto snímek tvoří vstupní data pro následný výpočet DPD.

2.5.2 Výpočet DPD

Pokročilý výpočet zahrnuje segmentaci buňky a pozadí a díky tomu umožňuje také zviditelnění hranic buňky a rozšíření barevného kódování DPD o barvy pro oblast opuštěnou a nově zabranou buňkou.

Předpokládejme časovou sekvenci o N snímcích kompenzované fáze se segmentovanou buňkou a pozadím, potom hodnoty DPD jsou dány rovnicí (maticový výpočet):

$$DPD_{i+k} = \varphi_{i+k} - \varphi_i ,$$

kde φ_i je fázový snímek i , k je krok výpočtu a uvažujeme pouze DPD_{i+k} větší než minimální detekovatelná změna suché hmoty buňky σ_{max} (viz. část 2.5.3). DPD_{i+k} lze počítat s libovolným krokem k , pokud je krok k menší než počet snímků N v sekvenci.

V obrazové reprezentaci jsou záporné hodnoty DPD znázorněny zelenou barvou a představují úbytek suché hmoty buňky v daném místě. Kladné hodnoty DPD jsou znázorněny červenou barvou a představují přírůstek suché hmoty v daném místě. Intenzita barvy odpovídá velikosti změny. Změny menší než je hodnota minimální detekovatelné změny suché hmoty buňky σ_{max} jsou znázorněny černou barvou a pozadí je znázorněno bílou barvou.

Aby bylo možné rozeznat opuštěnou oblast a oblast nově zabranou buňkou, byla do základního barevného kódu DPD přidána další barva – modrá. Modrá barva je přiřazena těm místům, kde právě jeden z fázových snímků φ_i, φ_{i+k} má nulové hodnoty. V těchto místech je vždy také už červená nebo zelená barva, v RGB zobrazování se tedy opuštěná oblast zobrazí v tyrkysové barvě (modrá a zelená) a nově zabraná oblast se zobrazí ve fialové barvě (červená a modrá).

2.5.3 Omezení přesnosti DPD určené šumem

Šumem je limitováno každé měření. Rozlišujeme mezi časovým a prostorovým šumem, které jsou určovány jako fluktuace hodnot fáze pro zobrazení bez přítomnosti objektu v předmětové rovině. Časový šum popisuje fluktuace hodnoty fáze v každém pixelu v průběhu časové sekvence měření. Prostorový šum popisuje fluktuace hodnoty fáze mezi jednotlivými pixely snímku ve stejném čase. Pro metodu DPD je limitující šum časový, který určuje nejmenší možnou změnu suché hmoty buňky připadající na jeden pixel, kterou je možné detekovat. Tento limitující parametr může být u různých měření rozdílný, záleží především na použitém vzorku a na nastavení mikroskopu, proto je nezbytné tuto hodnotu určovat pro každé měření zvlášť.

V sekvenci obrázků určené pro vyhodnocení pomocí metody DPD je nejdříve určena oblast prázdného pozadí bez buněk a statistické parametry časového šumu (průměrná hodnota, rozptyl) jsou určeny na této sekvenci pro každý pixel prázdného pozadí podle vztahů:

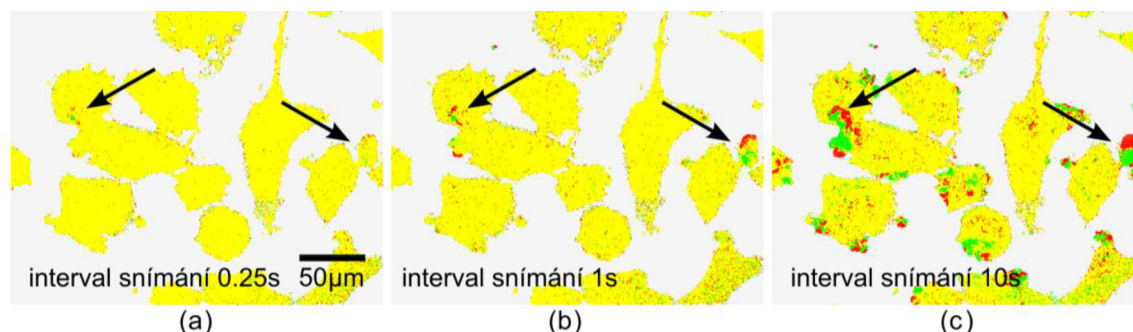
$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_i \hat{x}_i$$

$$\sigma_N^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{x}_i - \bar{x})^2$$

kde σ_N^2 je rozptyl, N je počet snímků v časové sekvenci, \hat{x}_i je hodnota fáze v určitém pixelu snímku i a \bar{x} je průměrná hodnota pro tento pixel v časové sekvenci. Při výpočtu na vybrané oblasti získáme matici hodnot rozptylů σ_N^2 nebo směrodatných odchylek σ_N . Minimální detekovatelná změna suché hmoty buňky je pak určena jako maximální hodnota směrodatné odchylky σ_{max} na vybrané oblasti snímku.

Při zkracování intervalu snímání získáváme nižší hodnoty DPD, hodnota minimální detekovatelné změny suché hmoty buňky se však nesnižuje. Proto bylo na mikroskopu CCHM s objektivy 10×/0,3 testováno rychlé zobrazování a možnost aplikace metody DPD. Bylo zjištěno, že v případě pozorování buněčné linie spontánně transformovaných embryonálních krysích fibroblastů LW13K2 [47] při standardních kultivačních podmínkách je vhodný minimální interval snímání 1 s. Při kratších intervalech byla již většina hodnot DPD nižších než hodnota minimální detekovatelné změny suché hmoty buňky. Hodnota minimální detekovatelné změny suché hmoty buňky byla v tomto případě rovna $\sigma_{max} = 0,04$ rad ($0,0230$ pg/ μm^2).

Na obr. 11 jsou zobrazeny snímky z testovacího měření vyhodnocené metodou DPD, kde pozadí je zobrazeno bílou barvou, změny menší než σ_{max} jsou zobrazeny žlutou barvou a změny větší než σ_{max} jsou zobrazeny červenou nebo zelenou barvou. Je zřejmé, že při kratším intervalu snímání než 1 s je většina detekovaných změn nižších než limitující hodnota šumu, při intervalu 1 s se začínají objevovat souvislé oblasti se změnami nad limitující hodnotou a při intervalu 10 s jsou tyto oblasti již z hlediska pozorování velké.

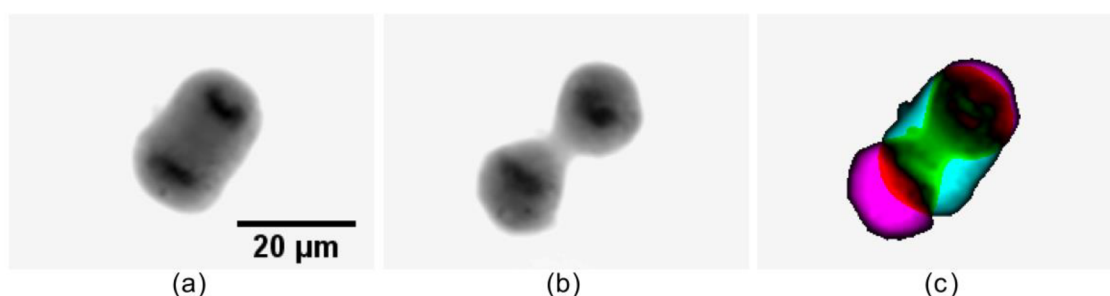


Obr. 11: Testovací měření pro aplikaci metody DPD. Pozadí - bílé, změny menší než určený šum - žluté a změny větší než určený šum - červené nebo zelené. Při kratším intervalu snímání než 1 s (a) je většina detekovaných změn nižších než σ_{max} , při intervalu 1 s (b) se začínají objevovat souvislé oblasti se změnami nad σ_{max} (označené šipkami) a při intervalu 10 s (c) jsou tyto oblasti již z hlediska pozorování velké.

Interval pozorování zvolený pro vyhodnocování metodou DPD závisí samozřejmě na rychlosti děje, který chceme analyzovat. Nemá však význam analyzovat snímky, kde změny větší než určená limitující hodnota σ_{max} nastávají pouze v izolovaných pixelech a neposkytují tak smysluplnou biologickou informaci.

2.5.4 Ilustrace metody DPD na biologickém ději

Příkladem biologické situace, k jejímuž vyhodnocení může být metoda DPD využita, je mitóza, to je rozdělení mateřské buňky na dvě dceřiné. Pro ilustraci metody DPD je zde uveden obrázek s velkým časovým krokem mezi odčítanými snímky, takže rozdíl mezi oběma obrazy je pro větší názornost patrný i okem.



Obr. 12: Dělení buňky znázorněné metodou DPD s krokem 240 s, objektivy 20×/0,40. QPI buňky v (a) anafázi a (b) cytokinezi; (c) DPD reprezentace přesunu hmoty během přeměny buňky z (a) do (b).

Na snímcích v obr. 12 lze vidět přechod buňky od anafáze (a) do cytokineze (b) v QPI. V anafázi jsou dvě sady dceřiných chromozomů taženy po mitotickém vřeténku k opačným stranám buňky a buňka má prodloužený tvar. Poté, v cytokinezi, je buňka ještě více prodloužena a mezi dvěma dceřinými buňkami se tvoří krček a obnovuje se zde buněčná membrána. Na obr. 15(c) je tato změna zachycena metodou DPD. Nově obsazené oblasti buňky na jejich vzdálenějších koncích jsou vykresleny fialově, oblasti s přírůstkem hmoty červeně, opuštěné oblasti v okolí

krčku mezi dceřinými buňkami jsou zachyceny tyrkysovou barvou a oblasti s úbytkem hmoty zelenou barvou. V experimentech uvedených v části 5 je pro metodu DPD zvolen kratší interval mezi dvěma fázovými snímky a význam metody je zřetelnější. V části 6 je pak uvedena aplikace zjednodušené verze metody DPD pro analýzu dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech.

3 Zobrazování pomocí CCHM ve 3D prostředích

Současným trendem v moderní biologii je nejen změna přístupu od fixovaných vzorků a různých tkáňových řezů přímo k *in vivo* analýze, ale v případě *in vitro* studií také přechod od 2D kultivací ke kultivacím v komplexnějších 3D prostředích. Tím se *in vitro* výzkum více přibližuje realitě [48].

V oblasti QPI se pro výzkum buněk ve 3D prostředích s výhodou využívá především takových systémů digitální holografické mikroskopie, které mají koherentní zdroj, a proto pak umožňují získaný obraz v určitém rozsahu numericky přeastřovat a tím korigovat optické rozostření [49]. CCHM používá zdroj nekoherentní, a proto umožňuje numerické přeastřování pouze ve značně omezeném rozsahu. Pro automatické dlouhodobé zobrazování v 3D prostředích pomocí CCHM bylo tedy výhodné vyvinout systém autofokusu, který ve vybraných intervalech umožňuje určit rovinu zaostření buňky a případný posun buňky v ose z pak kompenzovat posunutím piezo stolku. Systém autofokusu vychází ze závislosti vlastností zobrazení na míře rozostření vzorku, a také ze závislosti vlastností zobrazení na stupni prostorové koherence osvětlení. Využívá toho, že pomocí uzavření aperturní clony lze zvýšit prostorovou koherenci osvětlení a takto získaný obraz může být následně numericky přeastřen. Ze série numericky přeastřených obrazů je pak podle kritéria minima variace [50] automaticky vybrán obraz s nejlepším zaostřením a zjištěný posun se použije ke korekci pozice piezo stolku. Tím je zajištěno snímání ostrého obrazu, který není třeba dodatečně numericky přeastřovat.

3D prostředí pro kultivaci buněk se nejčastěji realizují pomocí kolagenových gelů [51], které způsobují i rozptyl světla. V takových prostředích je však zobrazení v systémech s koherentním osvětlením narušeno rozptýleným světlem, difrakcí a parazitními interferencemi. Při použití CCHM s nízkou prostorovou koherencí světla je výhodou vznikající efekt koherenční brány [2], který zabraňuje světlu rozptýlenému mimo předmětovou rovinu významně se podílet na výsledném obraze. Díky malé koherenční délce také nevznikají parazitní interference a můžeme tak získat kvalitnější zobrazení. Pokud navíc v časosběrném pozorování ve 3D prostředích zajistíme stále zaostření vzorku, například pomocí zmiňovaného automatického autofokusu, můžeme vyhodnocovat stejné tvarové, dynamické a fázové charakteristiky jako ve 2D prostředích.

Zobrazování ve 3D prostředích také umožňuje měnit rovinu zaostření a pozorovat tak různé části vzorku. Vlastnosti takového zobrazování pomocí CCHM byly teoreticky popsány v článku [2]. Numerickou simulaci pak v programu Matlab provedl prof. Jiří Petráček, a tento numerický model byl následně porovnáván s provedeným experimentem. Jak na numerickém modelu, tak na experimentálních datech, byla se záměrem zúžení zobecněného optického řezu následně vyzkoušena dodatečná filtrace prostorových frekvencí, popsaná v části 3.3.3.

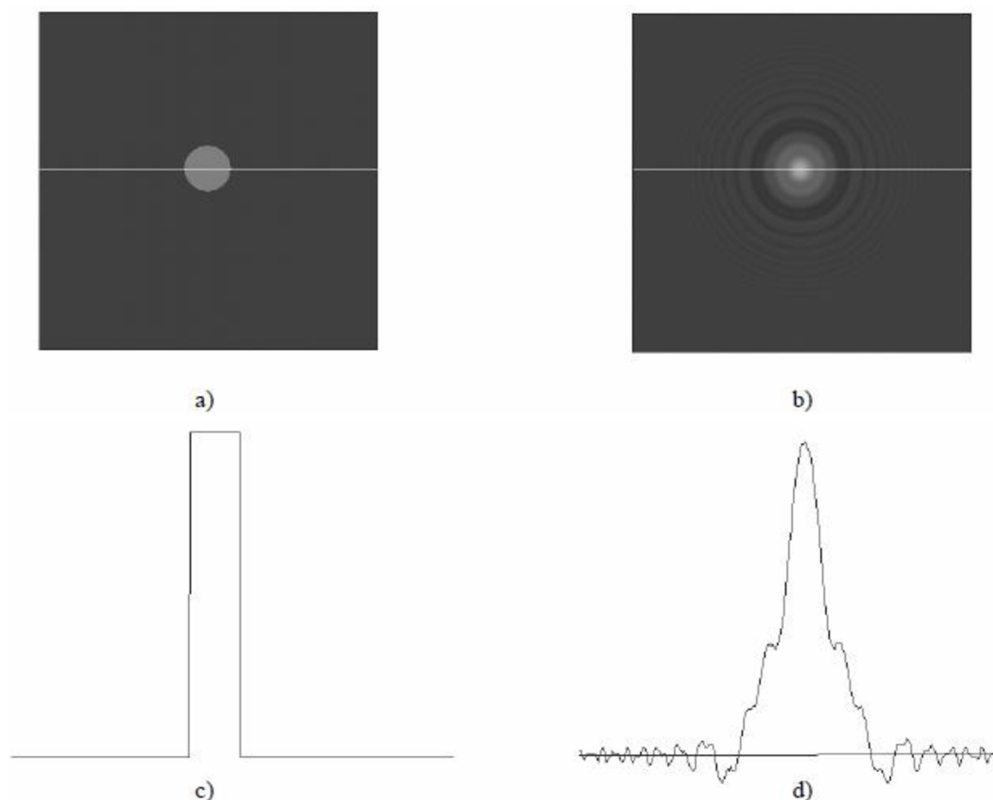
3.1 Závislost zobrazení na míře rozostření vzorku

Kritériím detekce roviny zaostření v transmisní digitální holografické mikroskopii pro amplitudové i fázové objekty se věnuje článek [52]. V tomto článku jsou uvažovány čistě amplitudové a čistě fázové objekty, které jsou osvětleny v transmisním módu rovinnou vlnou postupující podél osy z a které mají malou flouštku vzhledem k hloubce ostrosti zobrazovacího systému. Je ukázáno, že v případě čistě amplitudového objektu dosahuje integrál modulu komplexní amplitudy $|u_d(x, y)|$ v rovině zaostření svého minima [52] a platí tedy

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |u_d(x, y)| dx dy \leq \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |u_d(x', y')| dx' dy',$$

kde $u_d(x, y)$ je komplexní amplituda v rovině zaostření a $u_d(x', y')$ je komplexní amplituda mimo rovinu zaostření.

Toto tvrzení ilustruje jednoduchý příklad na obr. 13, kde je uvažováno zobrazení kruhového otvoru ve stínítku (obr. 13(a)) osvětleného centrálně rovinnou vlnou. Pokud není otvor zaostřen, pozorujeme typický difrakční jev (obr. 13(b)). Amplitudové profily v příčném řezu vedeném osou otvoru jsou zobrazeny na obr. 13(c) a (d). Integrál modulu komplexní amplitudy je zřejmě menší pro zaostřený objekt než pro rozostřený, kde se projeví difrakční jev [52]. Ukázka na obr. 13 je ilustrací chování optického pole, které splňuje předpoklad zachování celkové intenzity a amplitudy.



Obr. 13: Zobrazení amplitudového objektu – kruhového otvoru ve stínítku. (a) v rovině zaostření; (b) mimo rovinu zaostření; (c) amplitudový profil v řezu vedeném osou objektu v rovině zaostření; (d) amplitudový profil v řezu vedeném osou objektu mimo rovinu zaostření. Převzato z [52].

V případě fázového objektu můžeme komplexní amplitudu vlny v rovině ležící za objektem vyjádřit jako

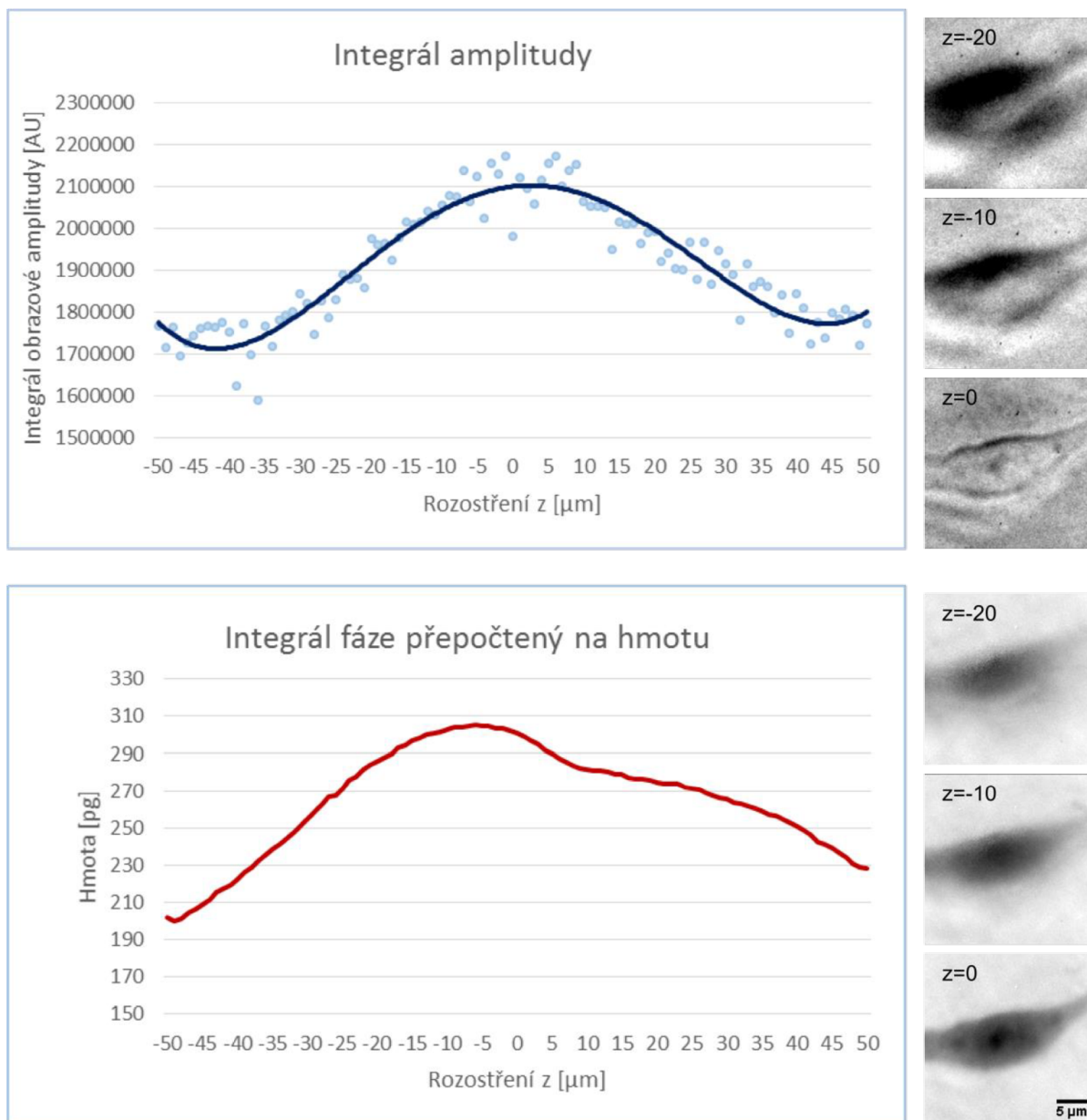
$$u_d(x, y) = a \exp\{i\varphi(x, y)\},$$

kde $\varphi(x, y)$ je změna fáze světla způsobená objektem a a je konstantní reálná amplituda osvětlující rovinné vlny [52].

Pokud je pozorovaný fázový objekt rozostřen, lom světla způsobený objektem moduluje amplitudu, která je pak nutně menší než a . Při zaostření je amplituda rovna a a integrál amplitudy pro čistě fázové objekty tak dosahuje svého maxima [52].

Zmiňovaný článek se i v případě fázových objektů zabývá pouze průběhem amplitudy v závislosti na zaostření. Pro studium průběhu fáze v závislosti na zaostření byl proto proveden jednoduchý experiment.

Buňka, jakožto čistě fázový objekt, připravená pro pozorování v kolagenu, byla zobrazena v různých rovinách s rozostřením z a byl sledován jak průběh amplitudy, tak průběh fáze zobrazování. Integrál amplitudy a fáze byl určen numerickou integrací obrazové amplitudy a fáze. Zobrazování bylo provedeno s objektivy Nikon Plan Apo $40\times/0,95$, s kondenzory s numerickou aperturou $NA_S = 0,52$ a interferenčním filtrem s centrální vlnovou délkou 650 nm a pološířkou hlavního maxima propustnosti 10 nm . Přeastřování bylo provedeno pomocí piezo posuvu držáku vzorku s krokem $1\text{ }\mu\text{m}$ v rozsahu $\pm 50\text{ }\mu\text{m}$ od předpokládané roviny ostrosti. Grafy na obr. 14 zachycují hodnoty integrálu obrazové amplitudy a integrálu obrazové fáze přepočtené na hmotu buňky pro různá rozostření z . Ukázka zobrazení amplitudy a fáze pro vybraná rozostření je na obrázcích vpravo od grafů.



Obr. 14: Průběh hodnot integrálu amplitudy, naměřené hodnoty zobrazené jako body proložené křivkou, (nahore) a fáze přepočtené na hmotu (dole) pro čistě fázový objekt (buňku v kolagenu) v závislosti na rozostření z . Ukázky zobrazení amplitudy a fáze pro vybraná rozostření (vpravo od grafů).

Z naměřených výsledků je zřejmé, že nejen integrál amplitudy, ale také integrál fáze dosahuje v případě čistě fázových vzorků přibližně v rovině ostrosti svého maxima.

Z experimentální zkušenosti vyplývá, že maximalizace integrálu fáze v rovině ostrosti je obecným jevem při pozorování živých buněk, pokud buňce odpovídá pozitivní hodnota fáze vyšší než hodnota pozadí, která se pohybuje kolem nuly. Pro výpočet správné roviny zaostření je zvláště u objektů pozorovaných v 3D prostředích vhodné uvažovat pouze malý výřez objektu, například oblast jádra buňky, protože okrajové výběžky buňky mohou mít často jinou rovinu zaostření. Vliv jiných rovin zaostření okrajových částí buňky se výrazněji projeví v integrálu amplitudy než v integrálu fáze, protože ve fázovém signálu přispívá hmotnější jádro buňky k integrálu fáze významnější hodnotou než méně hmotné okrajové části buňky nebo její výběžky.

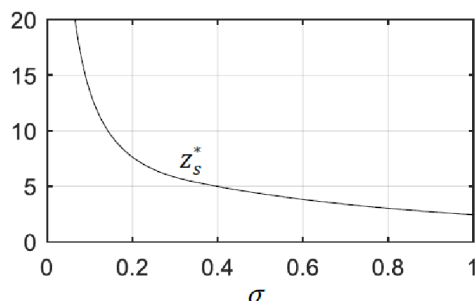
3.2 Závislost zobrazení na stupni prostorové koherence osvětlení

V CCHM s procházejícím světlem nelze navodit vznik optických řezů obdobných konfokální mikroskopii. Lze však uvažovat vznik zobecněných optických řezů. Za tloušťku zobecněného optického řezu je přitom považován dvojnásobek osové polohy z_s 2D objektu, v níž je zcela utlumen přenos některé prostorové frekvence. Veličina z_s^* je vyjádřena v násobcích poloviny difrakční hloubky ostrosti objektivu $n\lambda_v/2NA^2$, kde n je index lomu prostředí, λ_v je vlnová délka osvětlení ve vakuu a NA je numerická apertura objektivu [53].

Vliv prostorové koherence na tloušťku zobecněného optického řezu je teoreticky odvozen v článku [53]. V tomto článku je také uveden graf, zde na obr.15, který zachycuje závislost tloušťky zobecněného optického řezu z_s^* na faktoru částečné koherence

$$\sigma = NA_s/NA,$$

kde NA_s je numerická apertura osvětlení a NA je numerická apertura objektivu.

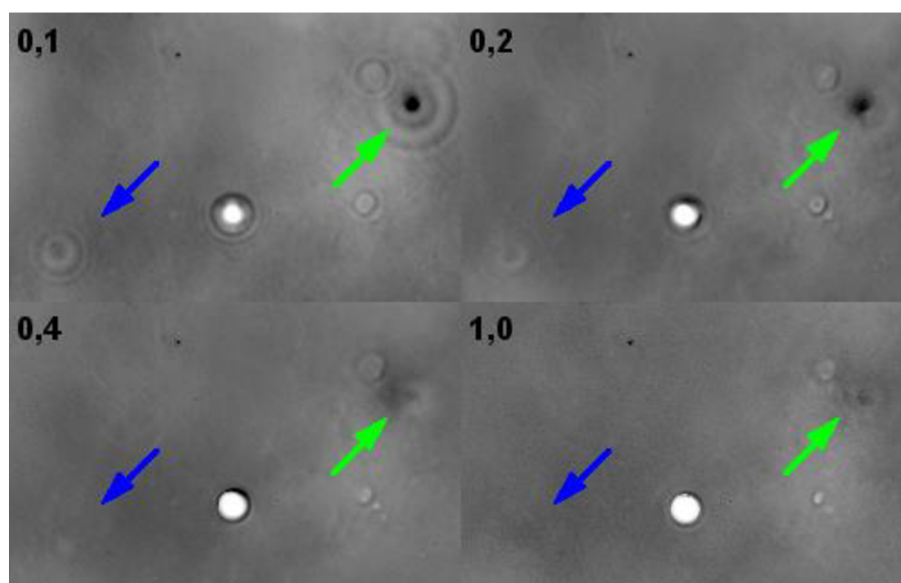


Obr. 15: Závislost z_s^* poloviny tloušťky zobecněného optického řezu na faktoru částečné koherence σ . Veličina z_s^* je v jednotkách $n\lambda_v/2NA^2$, kde n je index lomu prostředí, λ_v je vlnová délka osvětlení ve vakuu a NA je numerická apertura objektivu. Převzato z [53].

Pro $\sigma \geq 1/3$ odpovídá hodnota nejrychleji tlumené normované frekvence poloviční hodnotě mezní frekvence soustavy $Q_{max} = 1 + \sigma$. Normovaná frekvence je vyjádřena v násobcích NA/λ_v [53].

Vliv faktoru částečné koherence na zobrazení rozostřených objektů jsme testovali na vzorku polystyrenových kuliček o průměru $(5,0 \pm 0,3)$ μm (Duke Standards™ 2000 Series Uniform Polymer Particles), které byly přimíchány do kolagenového gelu místo suspenze buněk. Index lomu polystyrenových kuliček podle specifikace výrobce je 1,59. Index lomu kolagenového gelu 1,34 jsme změřili na Abbeově refraktometru. Prostorová koherence osvětlení byla regulována pomocí aperturní clony měnící hodnotu apertury osvětlení NA_s . Experimentální QPI takto připraveného vzorku pro faktor částečné koherence σ rovný 0,1; 0,2; 0,4; a 1,0 jsou na obr. 16. Šipkami je vyznačena rozostřená kulička (zelená šipka) a jiný drobný objekt

(modrá šipka), které jsou dobře viditelné pro $\sigma = 0,1$, tedy pro nejširší optický řez. Pro vyšší σ se tyto objekty postupně stávají méně viditelnými.



Obr. 16: QPI polystyrenových kuliček v kolagenu pro různé faktory částečné koherence σ . Šipkami je vyznačena rozostřená kulička (zelená šipka) a jiný drobný objekt (modrá šipka), které jsou dobře viditelné pro σ rovné 0,1, tedy pro nejširší optický řez, zatímco pro vyšší σ se tyto struktury postupně stávají méně viditelnými.

Z grafu na obr. 15 je zřejmé, že rostoucí hloubka optického řezu se projeví až při nižším faktoru částečné koherence σ . To potvrdily i experimentální výsledky.

Vliv faktoru částečné koherence σ na zobrazení dobře ukazuje také numerický model zobrazení buňky. O numerickém modelu je pojednáno v samostatné části 3.3.1.

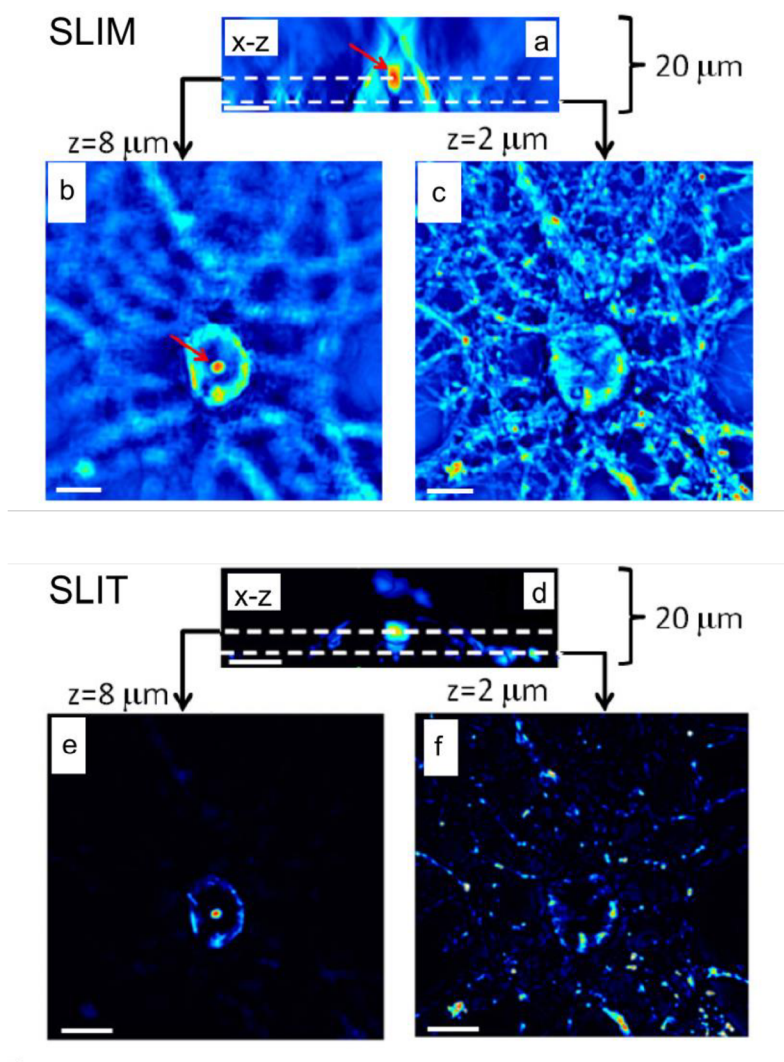
3.3 Zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření

Studium zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření přispívá jednak k lepšímu porozumění celému zobrazovacímu procesu a jednak následně umožňuje využít získaná data pro 3D zobrazování.

3D optické zobrazování buněk je v současnosti nejčastěji realizováno pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie, kde je vzorek obvykle fixován a označen fluorescenčními barvivy [55]. Použití konfokálního mikroskopu je výhodné především proto, že v zobrazení je výrazně redukován signál pocházející z jiných rovin než z roviny zaostření. Získaná data pak mají omezenou hloubku ostroty, zobrazují jen určitý optický řez. Následně je pak možné pomocí zobrazení z různých rovin vytvořit 3D zobrazení vzorku. Nevýhodou fluorescenční konfokální mikroskopie je však její invazivita a velké množství světla potřebné pro vytvoření obrazu.

Alternativou je proto použití dekonvoluční mikroskopie, jejíž výhodou je fakt, že každé zobrazení lze do jisté míry aproximovat jako konvoluci rozptylové funkce zobrazovacího systému a funkce charakterizující zobrazovaný vzorek. Proto lze každé zobrazení, ať už z klasické mikroskopie světelného pole, klasické fluorescenční nebo i konfokální mikroskopie, použitím správně vybrané a nastavené dekonvoluční metody vylepšit [56]. Každá dekonvoluční metoda však vnáší do zobrazení i artefakty, je tedy lépe dosáhnout co nejlepšího rozlišení, příčného i osového, opticky, již pomocí sestavy mikroskopu.

Použitím dekonvoluce pro 3D zobrazení z QPI se zabývá například publikace [57]. V uvedené publikaci autoři u metody SLIM (spatial light interference microscopy) nejprve prezentují možnost 3D zobrazování pomocí optických řezů, jejichž šířka závisí na NA objektivu. Metodu SLIM pak autoři použitím experimentálně získané rozptylové funkce zobrazovacího systému a iterační dekonvoluční metody popsané v [58] dále vylepšují a označují jako SLIT (spatial light interference tomography). Rozptylovou funkci zobrazovacího systému autoři změřili tak, že zobrazovali mikrokuličky s průměrem rovným cca $1/3$ teoretické difrakční stopy při zobrazení bodu, které dobře reprezentují bodový rozptyl. Rozptylová funkce zobrazovacího systému byla pak určena jako reálná část měřeného komplexního analytického signálu. Dosažené výsledky ukazuje porovnání zobrazení neuronu oběma metodami na obr. 17, kde je u metody SLIT zřejmé výrazné potlačení signálu z jiných rovin ostrosti.



Obr. 17: Porovnání zobrazení neuronu metodami SLIM a SLIT. SLIM: (a) x-z zobrazení neuronu, patrné je tělo neuronu a jádro (označené šipkou), (b) a (c) x-y zobrazení neuronu v rovinách vyznačených v (a). SLIT: (d) x-z zobrazení neuronu, (e) a (f) x-y zobrazení neuronu v rovinách vyznačených v (d), zřejmé je výrazné potlačení signálu pocházejícího z jiných rovin ostrosti. Převzato z [57].

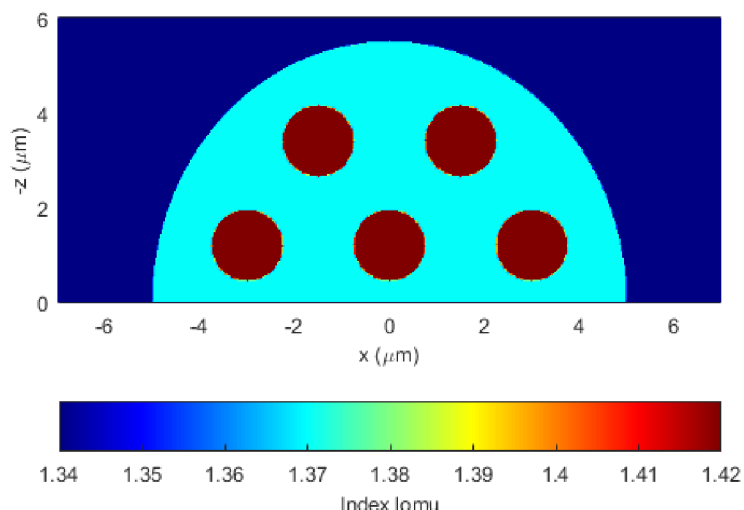
Další možností, jak získat 3D zobrazení vzorku, je samozřejmě tomografie. Použitím tomografie s QPI se zabývají publikace [30, 59, 60]. Tomografické metody však nejsou předmětem zájmu této práce.

V dizertační práci je dále posuzována možnost docílení 3D zobrazení při použití CCHM pomocí omezení prostorové koherence osvětlení a pomocí dodatečné filtrace prostorových frekvencí. Obě metody jsou hodnoceny pomocí numerického modelování a metoda dodatečné filtrace prostorových frekvencí i experimentálně.

3.3.1 Numerický model

Teoretické odvození vlastností zobrazování CCHM je uvedeno v člancích [2, 53, 61]. Teorie odvozená v člancích [2, 61] vychází z první Bornovy aproximace teorie rozptylu a je proto vhodná pro popis zobrazení tenkých (2D) vzorků, případně slabě rozptylujících 3D vzorků. Objemovými vzorky, které nelze považovat za slabě rozptylující, jsou také živé buňky [35]. Je proto třeba je buď aproximovat 2D funkcí propustnosti, nebo rozptyl světla modelovat pomocí přesnějšího přístupu. Toto numerické modelování, s nímž jsme porovnávali výsledky testovacích experimentů, provedl na základě teoretických výpočtů prof. Radima Chmelíka v Rytovově aproximaci [53] prof. Jiří Petráček v programu Matlab.

Geometrie modelu buňky, pro kterou bylo numericky vypočteno zobrazení pomocí CCHM, je zachycena na obr. 18.



Obr. 18: Geometrie a indexy lomu modelu buňky, pro kterou bylo numericky vypočteno zobrazení pomocí CCHM pro různé roviny zaostření. Ve 3D lze model buňky popsat jako polokouli, ve které je umístěno 5 kuliček.

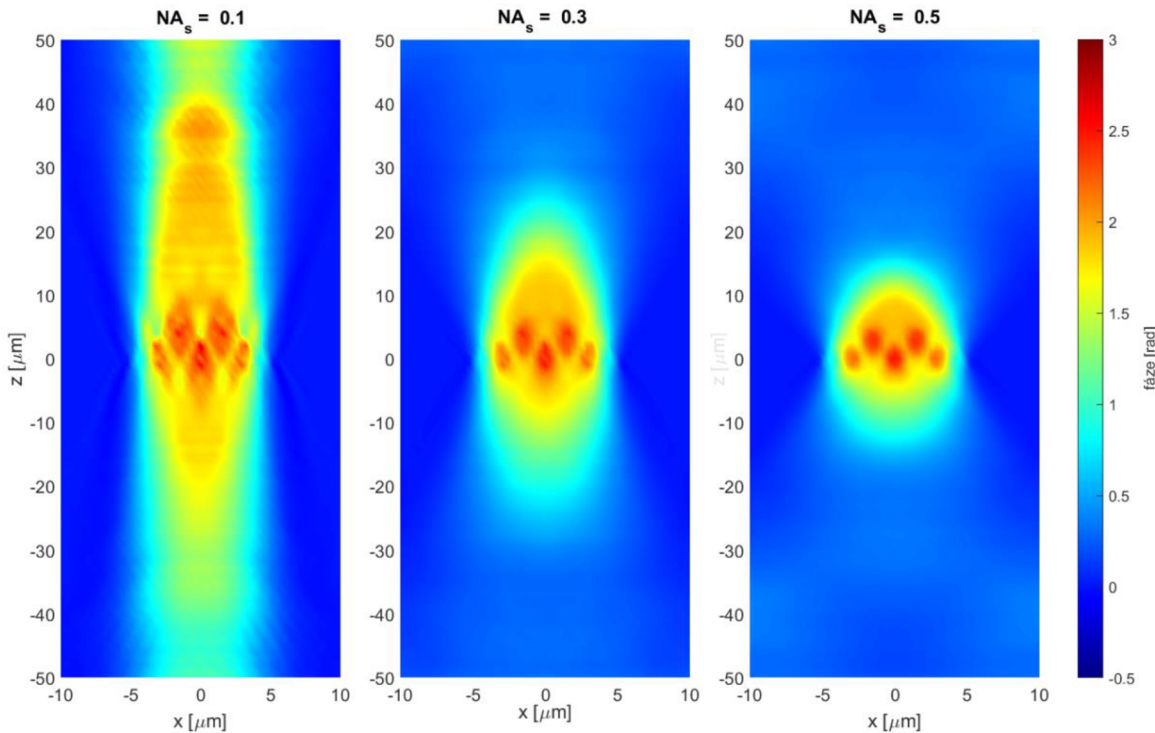
Hodnota indexu lomu těla buňky byla nastavena na 1,37 a hodnota indexu lomu menších kulových struktur uvnitř těla buňky na 1,41. Indexy lomu tak odpovídají běžně udávaným hodnotám pro cytoplazmu buňky (1,37) [62, 63] a hmotnější kulové struktury v modelu odpovídají hodnotám udávaným například pro mitochondrie buněk (1,41) [62, 63].

Nejdříve bylo v Rytovově aproximaci vypočteno blízké pole pro určitý úhel dopadu rovnoběžného svazku tvořícího köhlerovské osvětlení a z něj pak holografický obrazový signál, který byl finálně sečten pro všechny úhly dopadu osvětlovacího svazku omezené hodnotou NA_S . Tento výpočet byl proveden pro různé roviny zaostření.

Zobrazení bylo modelováno pro osvětlení vlnovou délkou 650 nm, pro různé hodnoty numerické apertury osvětlení NA_S a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$.

Ze zobrazení získaných modelováním (obr. 19) je zřejmý podstatný vliv parametru NA_S , který charakterizuje prostorovou koherenci osvětlení, na to, v jaké vzdálenosti od roviny zaostření

je buňka ještě zobrazována. S rostoucí NA_S , tedy i s rostoucím faktorem částečné koherence σ , viditelně klesá šířka zobecněného optického řezu. Oblast ve směru osy z , ve které se zobrazení buňky významně projevuje, je menší pro větší hodnoty NA_S . Prodlužování zobrazení předmětu v ose z s klesající NA_S je typickým znakem zobrazování v širokém poli oproti zobrazování konfokálnímu. Čím větší osvětlovací aperturu NA_S tedy použijeme, tím více přiblížíme charakter zobrazování CCHM konfokálnímu.



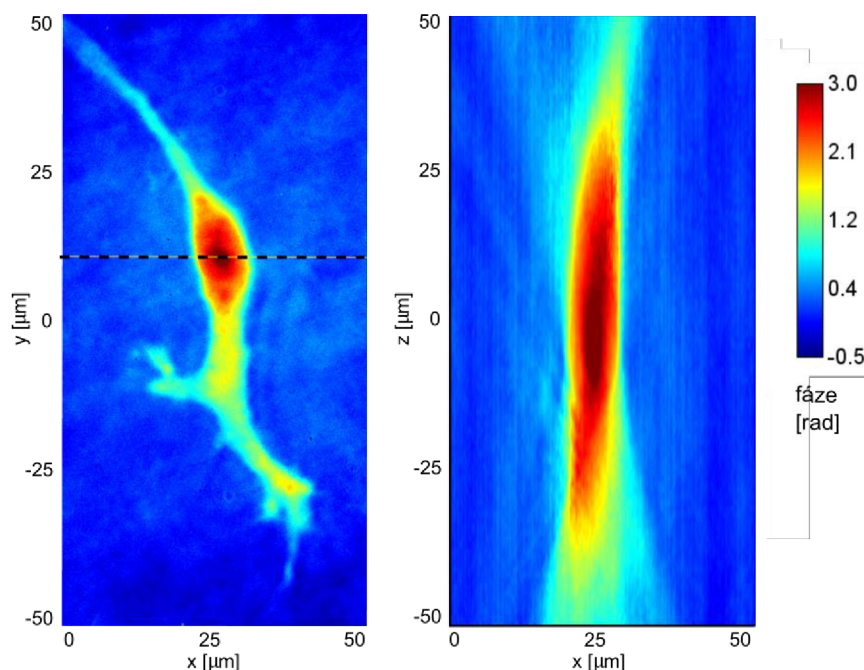
Obr. 19: Numericky vypočtené zobrazení buňky pro různé hodnoty numerické apertury osvětlení NA_S a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$. Je zřejmé, že s rostoucí NA_S , tedy i s rostoucím faktorem částečné koherence σ , klesá šířka zobecněného optického řezu. Jinými slovy, oblast ve směru osy z , v níž se zobrazení modelové buňky významně projevuje, je menší pro větší NA_S .

3.3.2 Experiment

Pro reálný experiment byla použita buněčná linie HT1080. Buňky byly kultivovány ve standardních kultivačních podmínkách (37 °C a 5 % CO₂) v mediu DMEM obohaceném o 10 % FBS a 0,1 % ciprofloxacin. Buňky byly poté připraveny na koncentraci 1x10⁶ buněk/ml v mediu DMEM bez fenolové červeně a s 10 % FBS. Pufrovaný roztok byl smíchan s vodou pro tkáňovou kulturu a roztokem 1 mg/ml bovinního kolagenu. Buněčná suspenze byla přidávána v poměru 1:10. Směs byla umístěna do komůrek μ -Slide Angiogenesis (Ibidi) a tuhnutí gelu probíhalo při 37 °C. Po ztuhnutí gelu byly připravené vzorky doplněny médiem a přikryty krycím sklíčkem.

Následně byla v mikroskopu vybrána buňka vhodná pro testovací zobrazení. Preferovali jsme buňku protáhlého tvaru, ležící v jedné rovině a menší než zorné pole. Vybraná buňka byla zobrazena v rozsahu $\pm 50 \mu\text{m}$ od předpokládané roviny zaostření s krokem 1 μm mezi jednotlivými snímky. Pro zobrazení byly použity objektivy Nikon Plan Apo 40 \times /0,95 a aperturní clona byla zcela otevřená, využívala se tedy celá numerická apertura kondenzorů, která je nominálně rovna $NA_S = 0,52$.

Ukázka zobrazení buňky z předpokládané roviny zaostření $z = 0$ a řez snímky z různých rozostření dle naznačené linie je na obr. 20.



Obr. 20: Zobrazení buňky v kolagenovém gelu s numerickou aperturou osvětlení $NA_S = 0,52$ a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$ v předpokládané rovině zaostření $z = 0$ a řez x - z dle zobrazené linie.

Výsledky z numerické simulace zobrazení a reálného experimentu jsou na obr. 19 a obr. 20 zachyceny ve stejné barevné škále a stejném rozsahu. Je tedy možné je dobře porovnat.

Můžeme předpokládat, že reálně zobrazovaná buňka má v ose z v místě řezu stejný rozměr jako v ose x , tedy přibližně $12 \mu\text{m}$, a je tedy dvakrát tlustší než modelová buňka. Dvakrát větší by tedy měla být i mezní vzdálenost, ve které se zobrazení buňky významně projevuje. Pro numerickou simulaci takovéto buňky a použité hodnoty NA a NA_S by se zobrazení mělo významně projevat v rozsahu $\pm 35 \mu\text{m}$. Hranice reálně zobrazované buňky v ose z by na zobrazeném rozsahu $\pm 50 \mu\text{m}$ tedy měly být jasně zřetelné. Tak tomu ale není, a je proto zřejmé, že reálná situace neodpovídá numerické simulaci se stejnými parametry NA a NA_S . Příčinou tohoto nesouladu je patrně skutečnost, že kondenzory použité v CCHM, které určují velikost NA_S , nejsou opticky ekvivalentní, a proto je efektivní NA_S nižší než udávaná hodnota $0,52$.

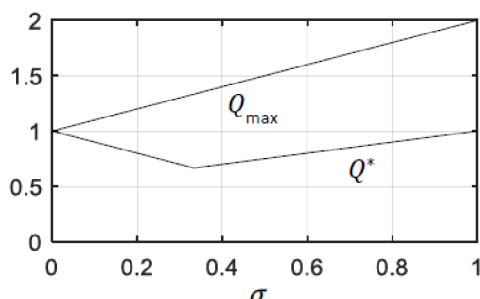
Experimentálně jsme ověřili, že při otevírání aperturní clony holografický signál neroste od hodnoty $NA_S = 0,3$. Efektivní numerická apertura osvětlení nemůže být tedy větší než tato experimentálně získaná hodnota.

V tomto případě by se numericky simulované zobrazení odpovídající reálně zobrazované buňce významně projevvalo až do vzdálenosti $\pm 65 \mu\text{m}$, hranice buňky v ose z by tedy byly mimo zobrazovaný rozsah. Pro hodnotu $NA_S = 0,3$ jsou si již numericky simulované a experimentální zobrazení bližší.

Pro další přiblížení experimentálního zobrazení numerické simulaci byla vyzkoušena metoda filtrace prostorových frekvencí.

3.3.3 Filtrace prostorových frekvencí

Podle teorie odvozené v člancích [2, 53] se při zobrazování pomocí CCHM s faktorem částečné koherence $\sigma \geq 1/3$ při rozostřování nejrychleji tlumí střední normovaná prostorová frekvence. Závislost maximální normované přenesené frekvence Q_{max} a nejrychleji tlumené frekvence Q^* na faktoru částečné koherence σ je zachycena v grafu na obr. 21. Normované frekvence jsou vyjádřeny v násobcích NA/λ_v .



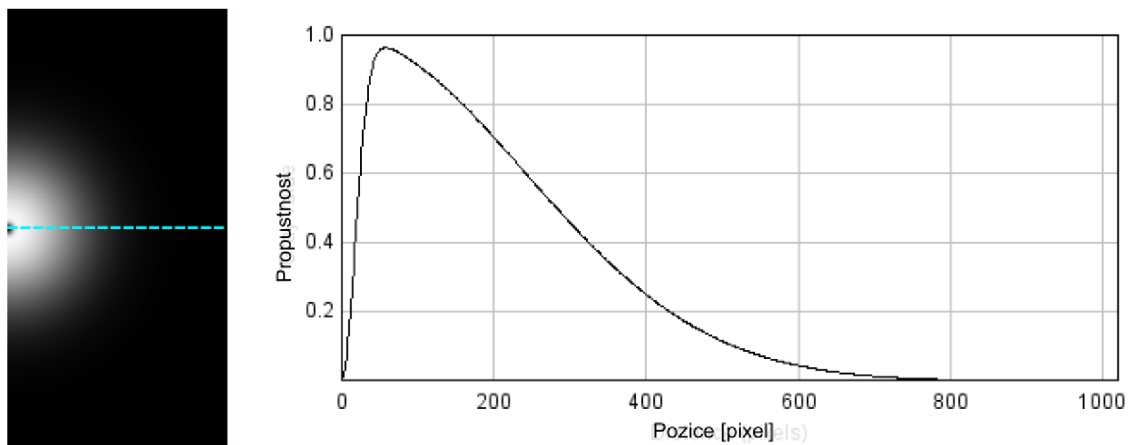
Obr. 21: Závislost maximální normované přenesené frekvence Q_{max} a nejrychleji tlumené normované frekvence Q^* na faktoru částečné koherence σ . Převzato z [53].

Pro zobrazení získané pomocí CCHM by podle této teorie mělo být pro ztenčení zobecněného optického řezu vhodné zesílení normované nejrychleji tlumené frekvence Q^* a potlačení frekvencí nižších a vyšších. Tato teorie byla aplikována jak na numerický model zobrazení buňky pomocí CCHM, tak přímo na experimentální zobrazení buňky v CCHM.

Filtrace prostorových frekvencí je v oboru zpracování obrazu využívána metodou nazývanou No neighbors [64], která bývá řazena mezi metody dekonvoluční mikroskopie. Metoda No neighbors využívá toho, že detaily jsou v obraze zaznamenány pomocí vyšších prostorových frekvencí a rozostřený obraz, pocházející z jiných rovin zaostření, je zachycen nižšími prostorovými frekvencemi. Vyšší frekvence proto tato metoda zesiluje a nižší potlačuje [64].

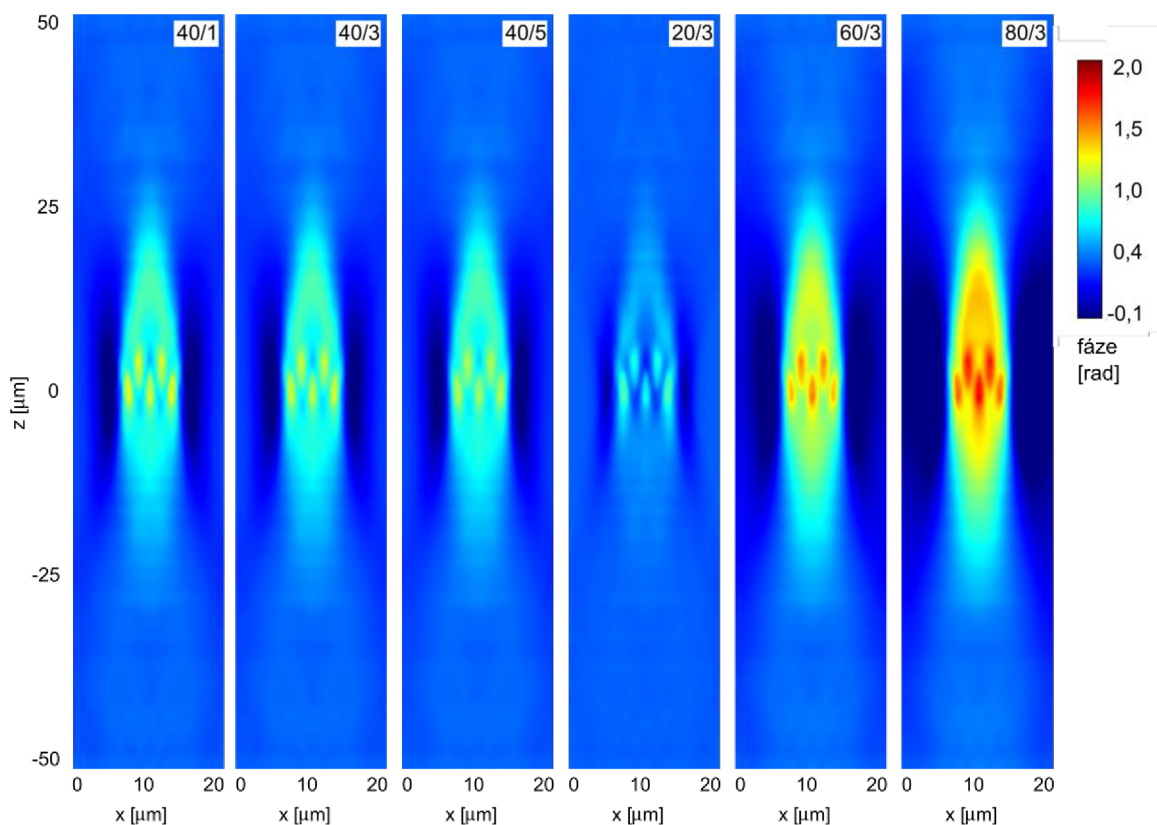
V našem případě byla filtrace prostorových frekvencí prováděna v programu ImageJ pomocí funkce *Bandpass filter* [65]. U numerického modelu byl filtrován přímo řez x-z fázového signálu, protože použitý numerický model snímky z jednotlivých rovin x-y nepočítal. Na experimentálních datech probíhala filtrace pro každý snímek x-y fázového signálu zvlášť a z filtrovaných snímků byl pak vytvořen výsledný řez x-z fázového signálu.

Použitím funkce *Bandpass filter* je nejprve provedena Fourierova transformace snímku a na tu je následně aplikován pásmový filtr. Pomocí zpětné Fourierovy transformace jsou zpět získány filtrované snímky. Hranice propustnosti pásmového filtru jsou v programu ImageJ zadávány jako rozměry struktur, které mají být filtrovány, v pixelech. Filtry v této práci označuji jako A/B, kde parametr A označuje nejmenší velikost filtrovaných velkých struktur a parametr B největší velikost filtrovaných malých struktur. Hranice propustnosti použitého pásmového filtru nejsou ostré. Tvar poloviny použitého pásmového filtru 40/3 a jeho přesný průběh podél naznačené linie je na obr. 22.



Obr. 22: Tvar poloviny použitého pásmového filtru 40/3 schematicky znázorněný v odstínech šedi (vlevo) a jeho přesný průběh podél naznačené linie (vpravo).

Výsledky filtrace numericky vypočteného zobrazení pro hodnoty $NA_S = 0,3$ a $NA = 0,9$ filtry s různými parametry A/B jsou zachyceny na obr. 23. Porovnání s původními daty pomocí fázových profilů podél naznačených linií A, B a C jsou pak na obr. 24. Protože provedená filtrace prostorových frekvencí omezuje rozsah hodnot filtrovaných snímků, jsou filtrované snímky kvůli kontrastu zobrazeny v užším rozsahu hodnot.



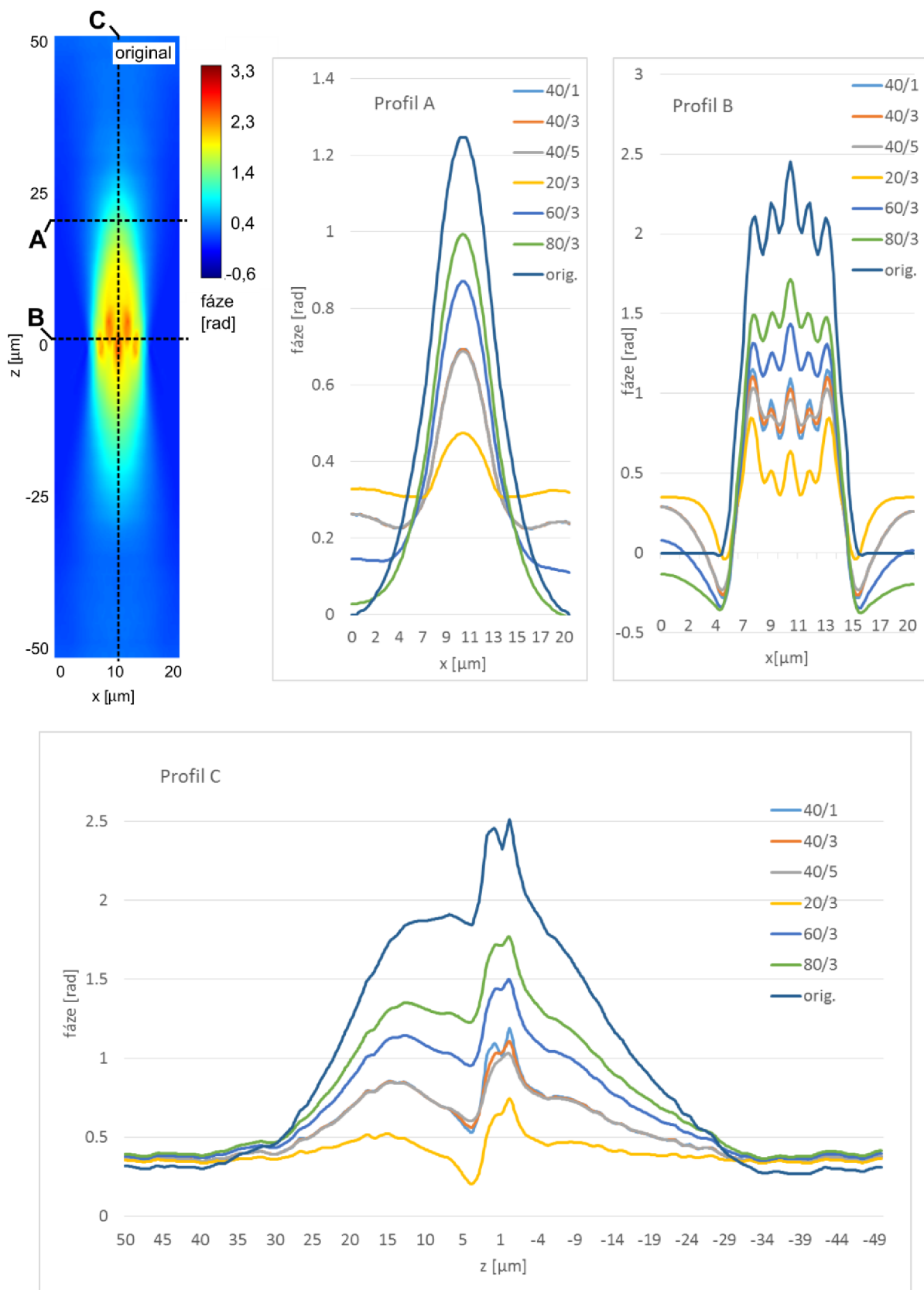
Obr. 23: Výsledky filtrace numerické simulace zobrazení pro hodnoty $NA_S = 0,3$ a $NA = 0,9$ pásmovým filtrem s různými parametry A/B.

Profil podél linie A zohledňuje zobrazování jiných rovin ostrosti ve vybrané rovině a protažení zobrazení v ose z . U všech použitých filtrů je patrné mírné zúžení obrazu ale také vzestup hodnot pozadí (v oblastech mimo buňku). Filtry 40/1, 40/3 a 40/5 dávají velmi podobné výsledky.

Profil podle linie B zohledňuje především schopnost rozlišení menších struktur. Ta zůstává zachována u všech použitých filtrů. Výrazný je však vznik artefaktu podobnému halo efektu známému u Zernikova fázového kontrastu. V těsné blízkosti okrajů buňky se totiž hodnoty fáze propadají do záporných hodnot, a to nejvíce u filtrů 60/3 a 80/3. U filtru 20/3 je navíc zřejmý pokřivený kontrast jednotlivých malých struktur, kde struktury v blízkosti okraje buňky jsou zachyceny falešně nejkontrastněji. Filtry 40/1, 40/3 a 40/5 dávají opět velmi podobné výsledky, použití vyššího parametru B však data více vyhlazuje a omezuje tak zobrazení detailů.

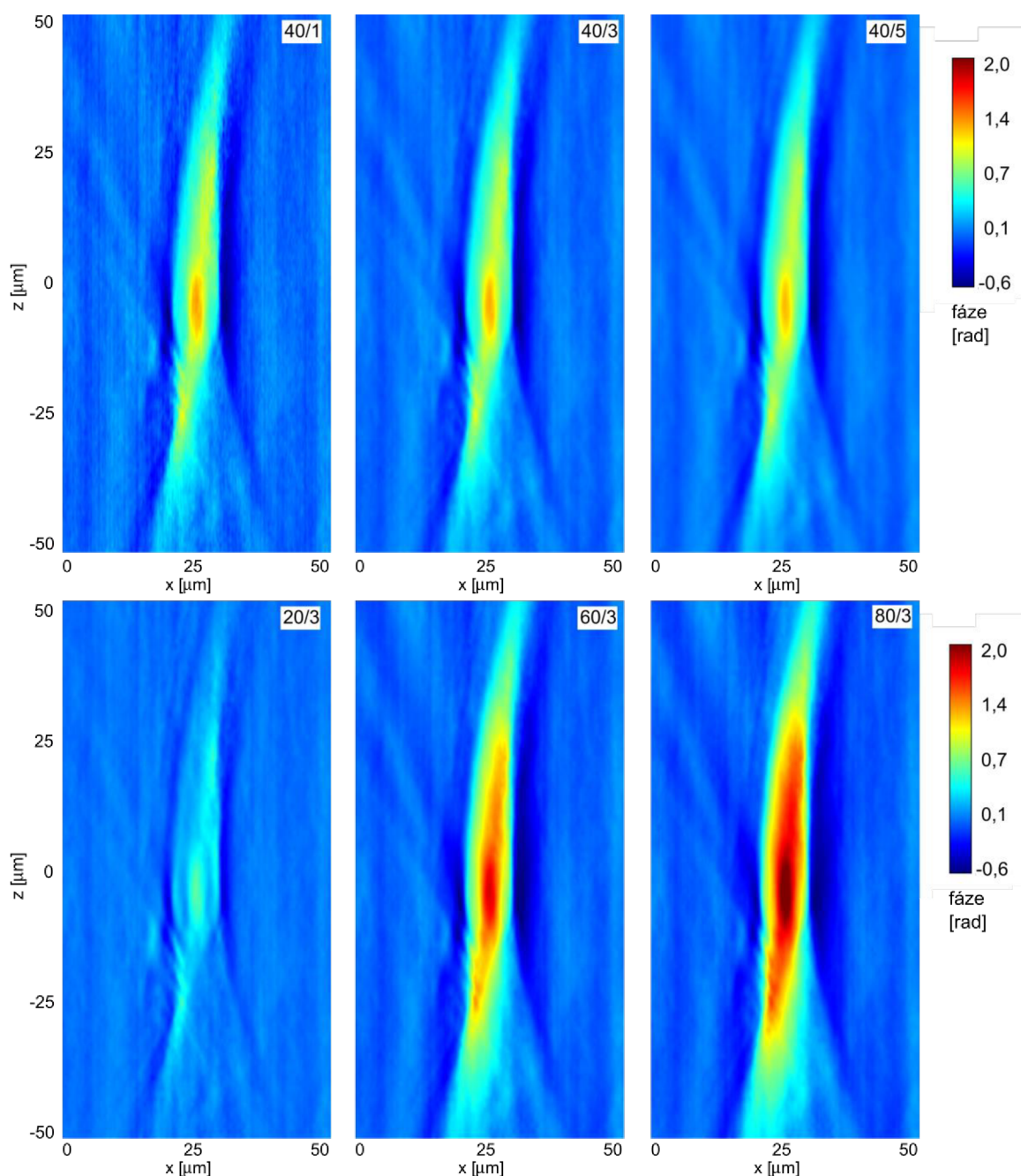
Profil podle linie C vyhodnocuje protažení zobrazení v ose z , tedy šířku zobecněného optického řezu. Použité pásmové filtry však nemají na tento parametr téměř žádný vliv a při použití filtrů s nižším parametrem A se navíc objevuje falešný propad hodnot fáze před zobrazením malé hmotnější struktury uprostřed buňky.

Ze zobrazených výsledků tedy vyplývá, že filtrace prostorových frekvencí na datech získaných z numerického modelování nepřinesla očekávaný výsledek v podobě omezení šířky zobecněného optického řezu ani jiné zlepšení zobrazení. Numerický model však reprezentuje zobrazení téměř ideální bez parazitních jevů a navíc byla filtrace provedena pouze jednorozměrně. Proto byla filtrace prostorových frekvencí dále testována i na experimentálních datech.



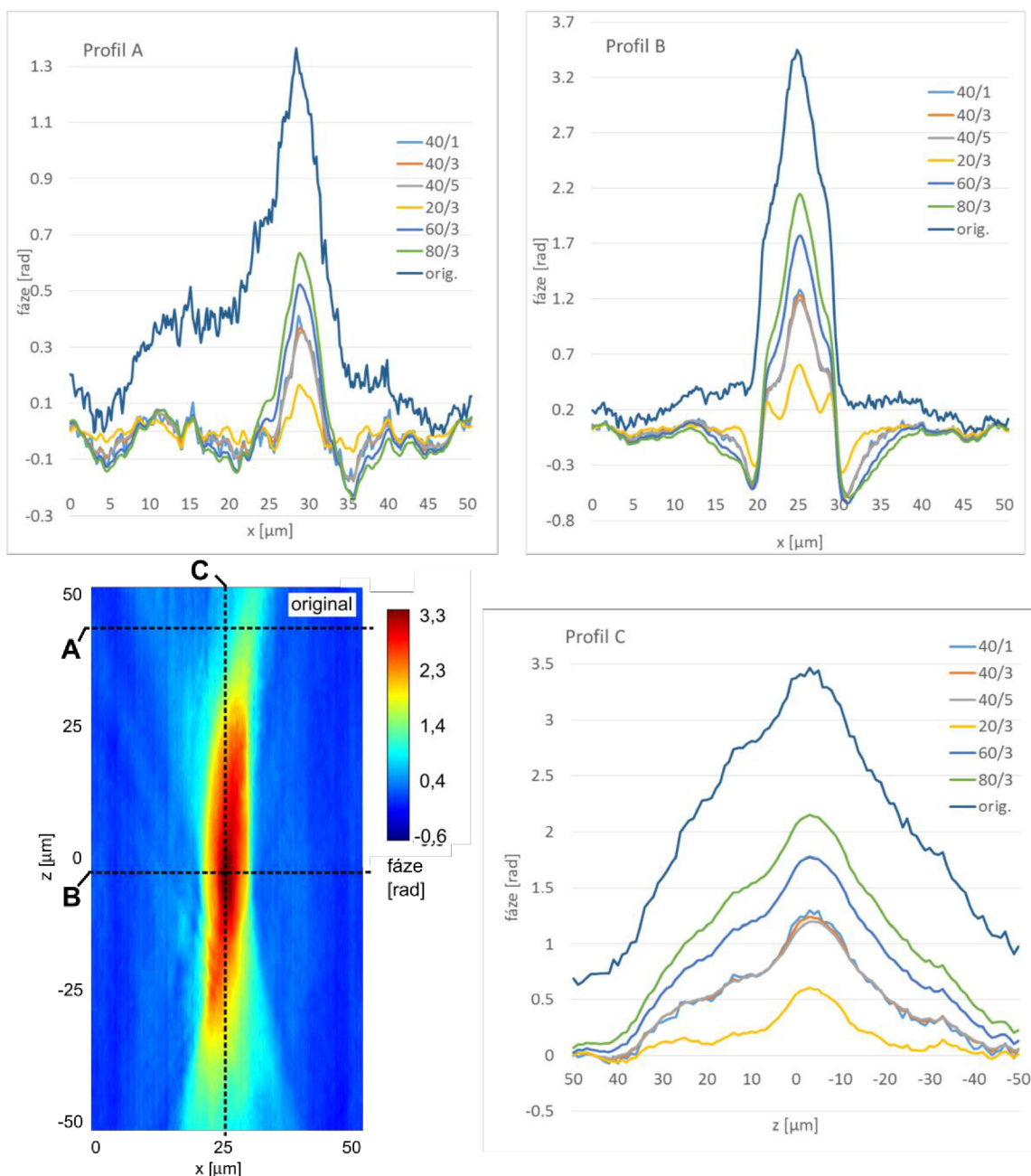
Obr. 24: Porovnání výsledků filtrace numerické simulace s původními numericky vypočtenými daty. Grafy porovnávají fázové profily filtrovaných a původních dat podél označených linií.

Výsledky filtrace experimentálních dat pásmovým filtrem s různými parametry A/B jsou zachyceny na obr. 25. Porovnání s původními experimentálními daty je pak na obr. 26.



Obr. 25: Výsledky filtrace prostorových frekvencí pásmovým filtrem s různými parametry A/B na experimentálních datech.

Stejně jako u numerické simulace zobrazení buňky omezuje provedená filtrace prostorových frekvencí rozsah hodnot filtrovaných snímků, proto jsou filtrované snímky kvůli kontrastu zobrazeny v užším rozsahu hodnot. Výsledky filtrace experimentálních dat jsou taktéž hodnoceny pomocí fázových profilů podél naznačených linií A, B a C.



Obr. 26: Porovnání s původními daty. Grafy porovnávají fázové profily podél naznačených linií filtrovaných a původních dat.

Fázové profily filtrovaných dat podél linie A vykazují zúžení především v oblasti levého okraje buňky, kde potlačují původní rozostřené zobrazení. Na rozdíl od numericky vypočtených dat zde při filtraci nestoupají hodnoty pozadí nad původní hodnoty. U pravého okraje buňky lze však pozorovat především u filtrů 60/3 a 80/3 propad do záporných hodnot a vznik zmiňovaného artefaktu. Filtry 40/1, 40/3 a 40/5 dávají opět velmi podobné výsledky

U profilu podél linie B lze u všech filtrů pozorovat mírné zúžení profilu buňky. Výrazný je však také propad do záporných hodnot při vnějších okrajích buňky. U filtru 20/3 navíc vznikají u okrajů buňky falešné struktury.

Vyhodnocení profilu podél linie C ukazuje v případě filtrovaných dat pokles hodnot fáze až k nulovým hodnotám. Hranice buňky jsou ve směru osy z tedy ostřejší, zúžení zobecněného optického řezu však dosaženo nebylo.

Pomocí filtrace prostorových frekvencí na experimentálních datech se podařilo částečně eliminovat rozostřené zobrazení v rovinách vzdálenějších od roviny zaostření. Nevýhodou je však vznik artefaktu, který je podobný halo efektu známému u Zernikova fázového kontrastu, či vznik falešných struktur při okrajích buňky. Filtrace prostorových frekvencí oproti očekáváním vycházejícím z teorie zobrazení pomocí CCHM nezúžila šířku vznikajícího zobecněného optického řezu.

V našich experimentech nebyla proto filtrace prostorových frekvencí využita a neúčinnějším nástrojem pro zúžení zobecněného optického řezu zůstává použití kondenzorů s co největší numerickou aperturou.

Další metody dekonvoluční mikroskopie jsou pak sofistikovanější a výpočetně náročnější, jsou však zajímavým námětem pro další práci.

4 Aplikace metod při analýzách buněčných smrtí

Výzkum různých typů buněčných smrtí a jejich významu při vzniku nádorů a rezistence k terapii je rychle se rozvíjející oblastí základního výzkumu medicíny [66]. Správná identifikace typu buněčné smrti je důležitá také při diagnostice, toxikologických studiích a určování dávkování různých látek. Převažující typy buněčných smrtí jsou obvykle určovány pomocí průtokové cytometrie (FC – flow cytometry), kde však absence analýzy morfologie buněk vede k chybám v určení typů buněčné smrti především v důsledku podhodnocení onkózy. Onkóza přitom vykazuje potenciální reverzibilitu, a proto je její správné určení jedním z mnoha hlavních úkolů moderní medicíny [67].

QPI umožňuje kontrastně vizualizovat změny v morfologii buněk v čase, a tyto změny mohou být i kvantitativně vyhodnocovány, měřeny. Přepočtení fázového posuvu na suchou hmotu buňky navíc umožňuje usuzovat na viabilitu pozorovaných buněk. S těmito nově získanými informacemi je možné zpřesnit identifikaci různých typů buněčných smrtí a získané výsledky pak dále využít v navazujícím výzkumu léčby nádorů a rezistence k terapii.

Výzkumem typů buněčných smrtí pomocí QPI se zabývají publikace [17, 69], které byly připraveny ve spolupráci s dr. Janem Balvanem z Masaříkovy laboratoře výzkumu rakoviny Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Všechny prezentované výsledky QPI jsme měřili na MHM Q-PHASE instalovaném v Laboratoři experimentální biofotoniky na VUT v Brně.

Ve všech experimentech zmiňovaných v této kapitole byly použity buňky PC-3. Buňky byly kultivovány v Ham's F12 mediu doplněném o penicilin (100 U/ml) a 7 % FBS za teploty 37 °C a při 5 % CO₂. Před samotným pozorováním byly buňky ovlivněny roztokem plumbaginu (2 μM) v dimethylsulfoxidu (DMSO).

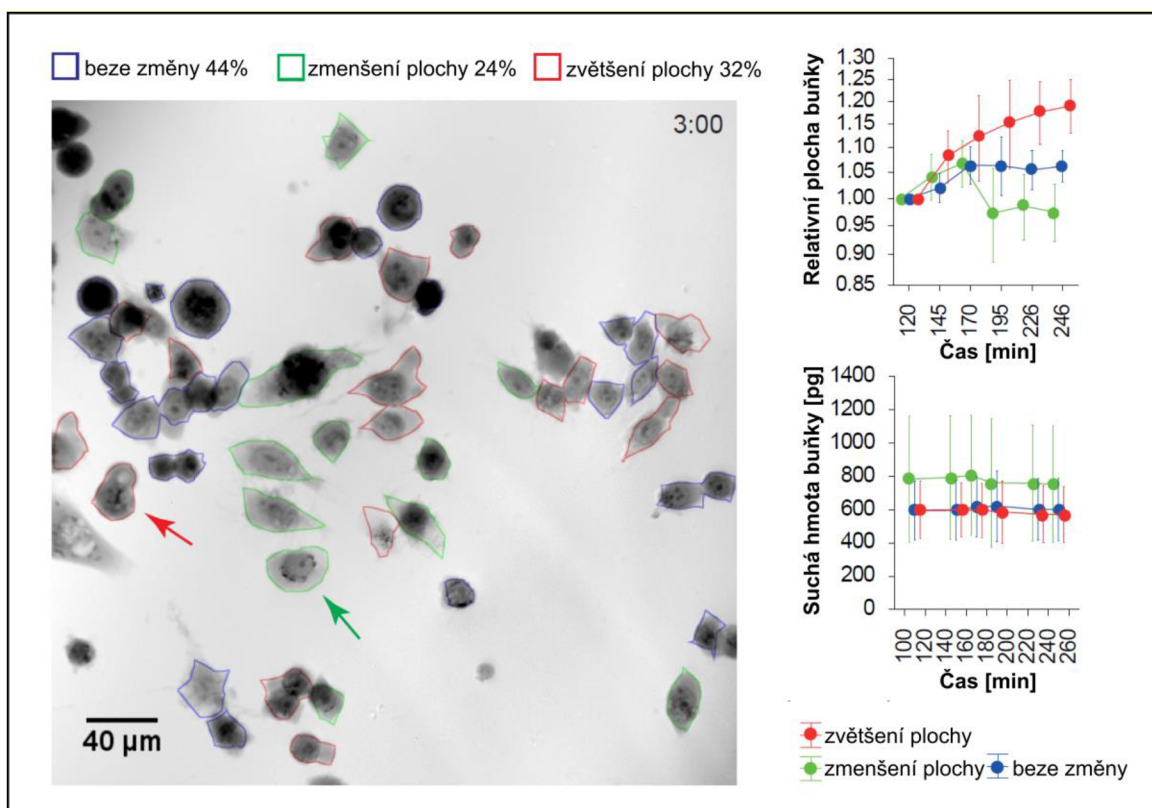
4.1 Porovnání metody QPI a FC

V prvně zmíněném článku [17] jsme provedli porovnání metod QPI a FC pro identifikaci různých typů buněčných smrtí indukovaných působením látky plumbagin.

Pomocí časového pozorování v QPI byly identifikovány tři populace buněk: buňky, které svoji plochu nezměnily (označené modrou barvou); buňky, které svoji plochu zmenšily (označené zelenou barvou); buňky, které svoji plochu zvětšily (označené červenou barvou). Celková suchá hmota buněk u všech populací zůstala během experimentu neměnná, což při zohlednění délky experimentu a nepřívětivého prostředí ovlivněného látkou plumbagin odpovídá biologickým předpokladům. Snímek z průběhu pozorování s buňkami rozříděnými dle změny plochy a s grafy vývoje plochy buněk a celkové suché hmoty buněk je na obr. 27.

V souladu s pozorovanými morfologickými změnami buněk byly tyto populace vyhodnoceny jako:

- buňky viabilní, beze změny plochy (označené modrou barvou);
- buňky apoptotické, se zmenšenou plochou (označené zelenou barvou);
- buňky nekrotické a onkotické, se zvětšenou plochou (označené červenou barvou).

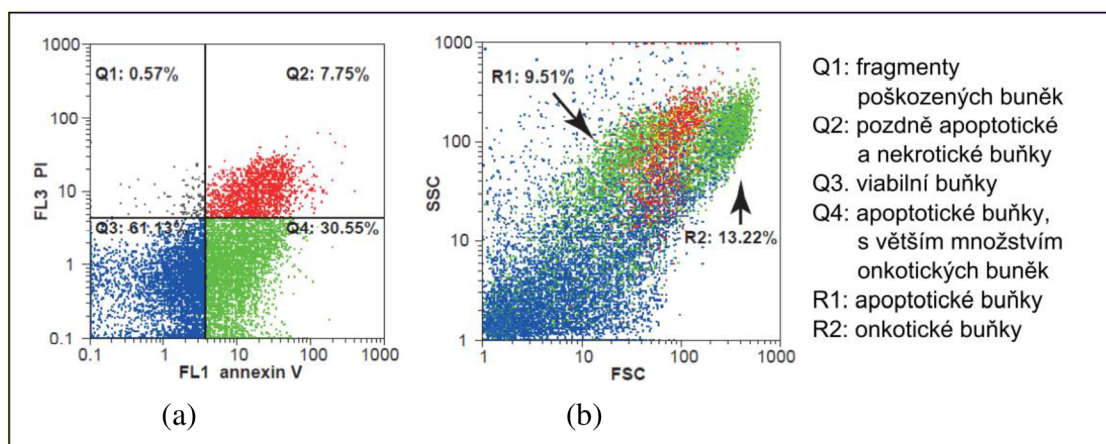


Obr. 27: Výsledky identifikace různých typů buněčné smrti z QPI. Z časového QPI byla vyhodnocena změna plochy a celková suchá hmota jednotlivých buněk. Podle změny plochy byly buňky roztrženy do tří populací: buňky, které svoji plochu nezměnily, 44 %, označené modrou barvou; buňky, které svoji plochu zmenšily, 24 %, označené zelenou barvou; a buňky, které svoji plochu zvětšily, 32 %, označené červenou barvou.

Pro identifikaci různých typů buněčných smrtí pomocí FC jsme použili barvení Annexin V/Propidium jodid. FC třídí buňky do populací podle pozitivitu jednotlivých barviv, výsledky jsou zobrazeny pomocí rozptylových diagramů na obr. 28(a). Pomocí FC byly buňky rozděleny na:

- buňky viabilní – negativní na Annexin V i Propidium jodid;
- buňky pozdně apoptotické a nekrotické – pozitivní na Annexin V i Propidium jodid;
- buňky apoptotické (ale pravděpodobně se v této populaci může vyskytovat i větší počet onkotických buněk) – pozitivní pouze na Annexin V;
- fragmenty nebo poškozené buňky – populace pozitivní pouze na Propidium jodid.

Třídění do jednotlivých populací je tedy odlišné a při třídění nemohou být uvažovány tvarové charakteristiky buněk. Problémem je také smíšená populace apoptotických a onkotických buněk, pozitivní pouze na Annexin V. Pro podrobnější vyhodnocení výsledků z FC lze využít tzv. backgating, při kterém jednotlivé populace roztržené podle pozitivitu na fluorescenční barvení zobrazíme v rozptylovém diagramu dávajícího do souvislosti boční rozptyl (SSC – side scatter) a přímý rozptyl (FSC – forward scatter). Přímý rozptyl dává informaci o velikosti buňky, menší buňky mají nižší FSC a větší buňky mají vyšší FSC. Při tomto vyhodnocení byly identifikovány dvě populace buněk pozitivních pouze na Annexin V, kde buňky s nižším FSC (menší) byly identifikovány jako apoptotické a buňky s vyšším FSC (větší) byly identifikovány jako onkotické. Výsledky této analýzy jsou zachyceny na obr. 28(b).



Obr. 28: Výsledky identifikace různých typů buněčné smrti z FC. (a) rozptylový diagram vyhodnocující barvení Annexin V/Propidium jodid (A/PI), Q1: A-/PI+ fragmenty nebo poškozené buňky; Q2: A+/PI+ pozdně apoptotické a nekrotické buňky; Q3: A-/PI- viabilní buňky; Q4: A+/PI- apoptotické a onkotické buňky. (b) rozptylový diagram s využitím backgating podle fluorescenčního barvení umožňující rozlišení dvou populací buněk A+/PI-, R1: nižší FSC (forward scatter) – apoptotické buňky; R2: vyšší FSC – onkotické buňky.

Výsledky získané z časového pozorování v QPI byly porovnávány s výsledky FC. Při porovnání QPI s FC zohledňující pouze barvení buněk se výsledky obou metod lišily. FC totiž výrazně nadhodnocuje populaci apoptotických buněk. Při porovnání QPI s FC po aplikaci backgatingu, který umožnil oddělit populaci onkotických buněk od apoptotických, byla shoda mezi oběma metodami lepší.

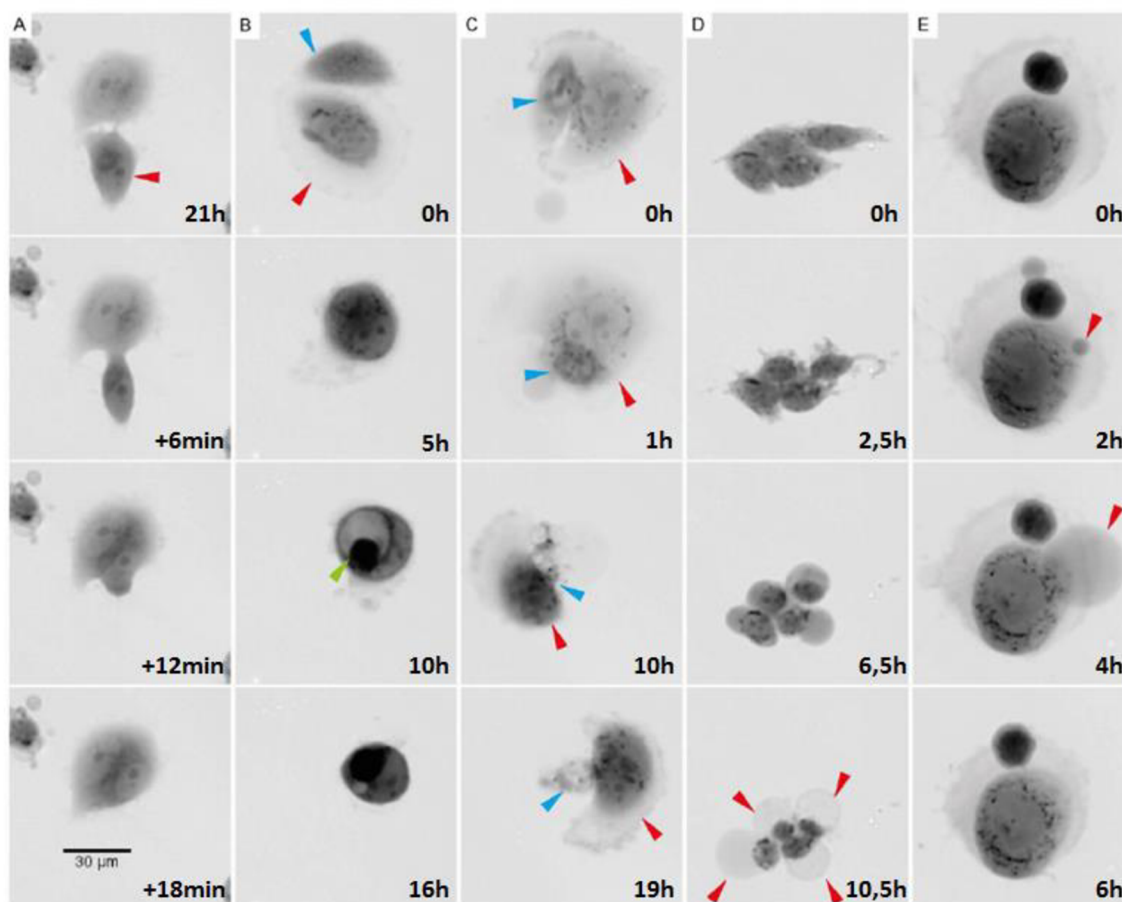
Výsledky získané z QPI jsou považovány za významné především proto, že zohledňují morfologické znaky různých typů buněčných smrtí a QPI tak může být považováno za vhodný nástroj k identifikaci právě různých typů buněčných smrtí. Morfologické znaky základních typů buněčných smrtí, které lze pozorovat pomocí QPI a ověřit ve fluorescenční mikroskopii, jsou uvedeny v následující tabulce.

Morfologický znak / Typ smrti	Onkóza	Nekróza	Apoptóza
Velikost buňky	zvětšená	zvětšená	zmenšená
Plazmatická membrána	neporušena	porušena	neporušena
Jádro	dilatace jádra a shlukování chromatinu	karyolýza	kondenzace jaderného chromatinu, nepravidelnost jádra
Specifický znak	membránové bleby	průsvitná cytoplazma, prasknutí plazmatické membrány	apoptotická tělíska, zatažení pseudopodií, sférický tvar buňky
PI/Annexin V	Annexin V+/PI-, Annexin V+/PI+	Annexin V+/PI+	Annexin V+/PI-
*Následný zánět	často	často	vzácně

Tabulka 2: Charakteristické morfologické znaky onkózy, nekrózy a apoptózy pozorovatelné v QPI kombinovaném s fluorescenční mikroskopií; PI – propidium jodid; *uvedený znak nelze pozorovat; převzato z [17].

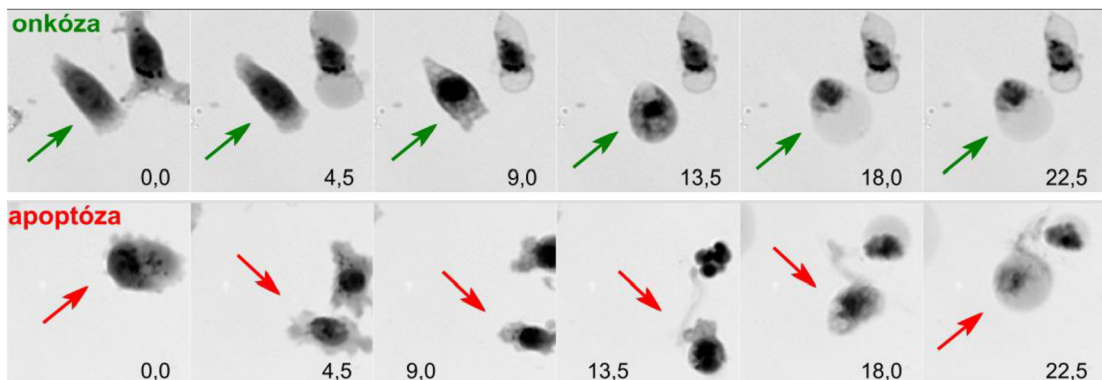
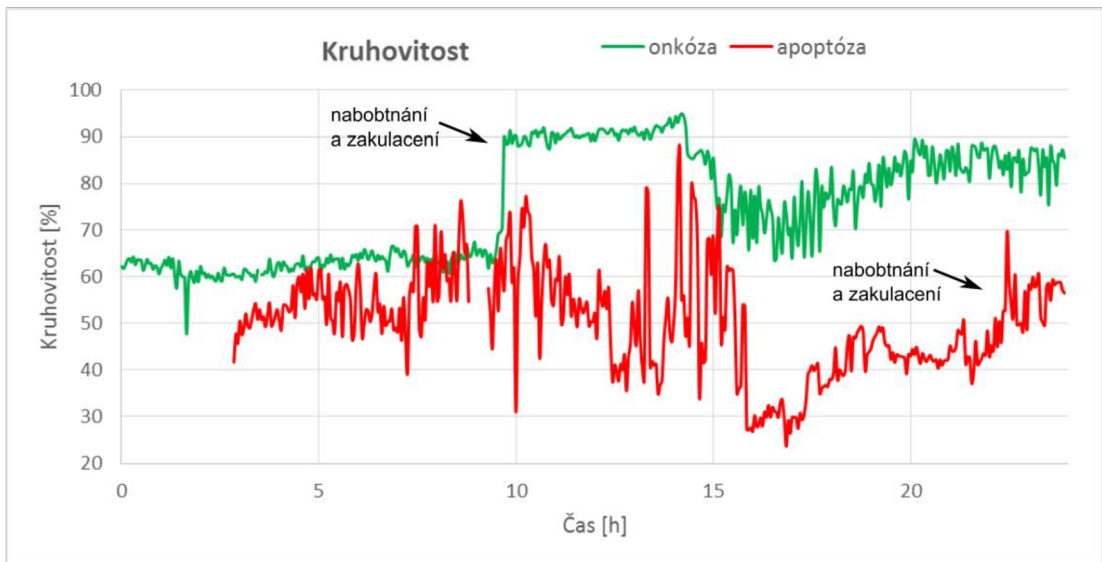
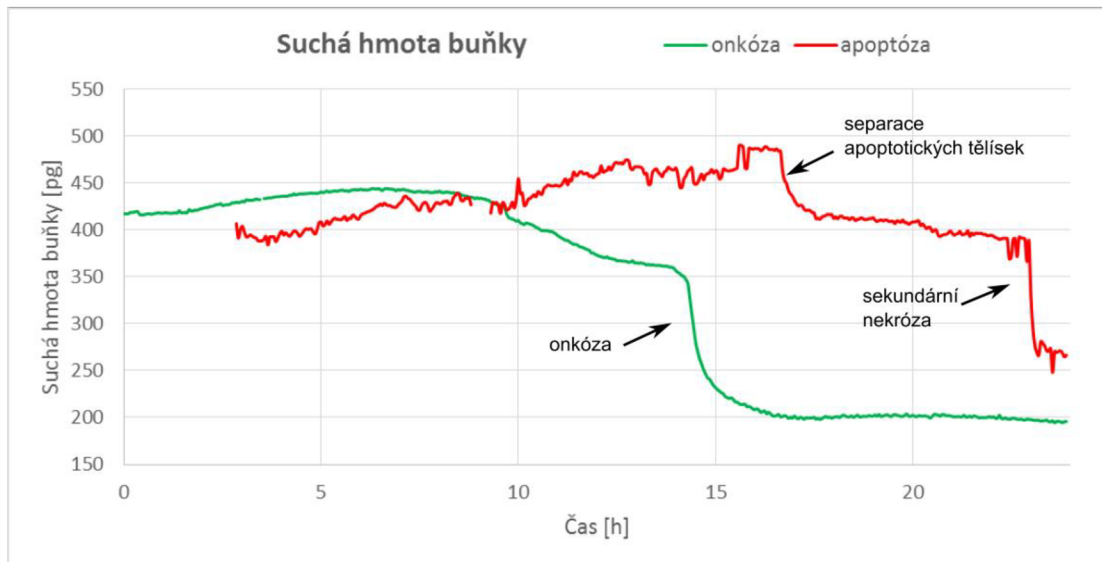
4.2 Mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu

V druhém článku [69] jsme studovali mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu. V QPI bylo provedeno několik pozorování, v kterých se podařilo tyto mechanismy dobře zaznamenat a videa z QPI tak byla podstatnou částí experimentálního materiálu článku. Obsahem článku je především biologický rozbor pozorovaných situací a ověřování souvislosti pomocí dalších metod (FC, měření viability buněk, zobrazování transmisním elektronovým mikroskopem, ...). Pro ilustraci přínosu QPI je zde uveden obr. 29 s charakteristickými znaky jednotlivých mechanismů resistance buněk vůči oxidativnímu stresu.



Obr. 29: QPI mechanismů resistance buněk vůči oxidativnímu stresu. (A) entóza, pohlcená buňka (červená šipka) byla před samotným pohlcením aktivnější, obě buňky byly viabilní po delší dobu než ostatní buňky; (B) pohlcení buňky s kanibalismem, pohlcovaná buňka (modrá šipka) je postupně trávena pohlcující buňkou (červená šipka), vzniká charakteristická struktura označovaná jako „birdeye“ (zelená šipka); (C) kanibalismus bez pohlcení buňky, umírající buňka (modrá šipka) byla napadena a využita kanibalizující buňkou (červená šipka); (D) onkóza, onkotické buňky tvořící typické cytoplazmatické bleby, obvykle vedoucí k nekróze (červené šipky); (E) reverzní onkóza, na počátku vytvořený cytoplazmatický bleb (červená šipka) byl absorbován a buňka zůstala viabilní.

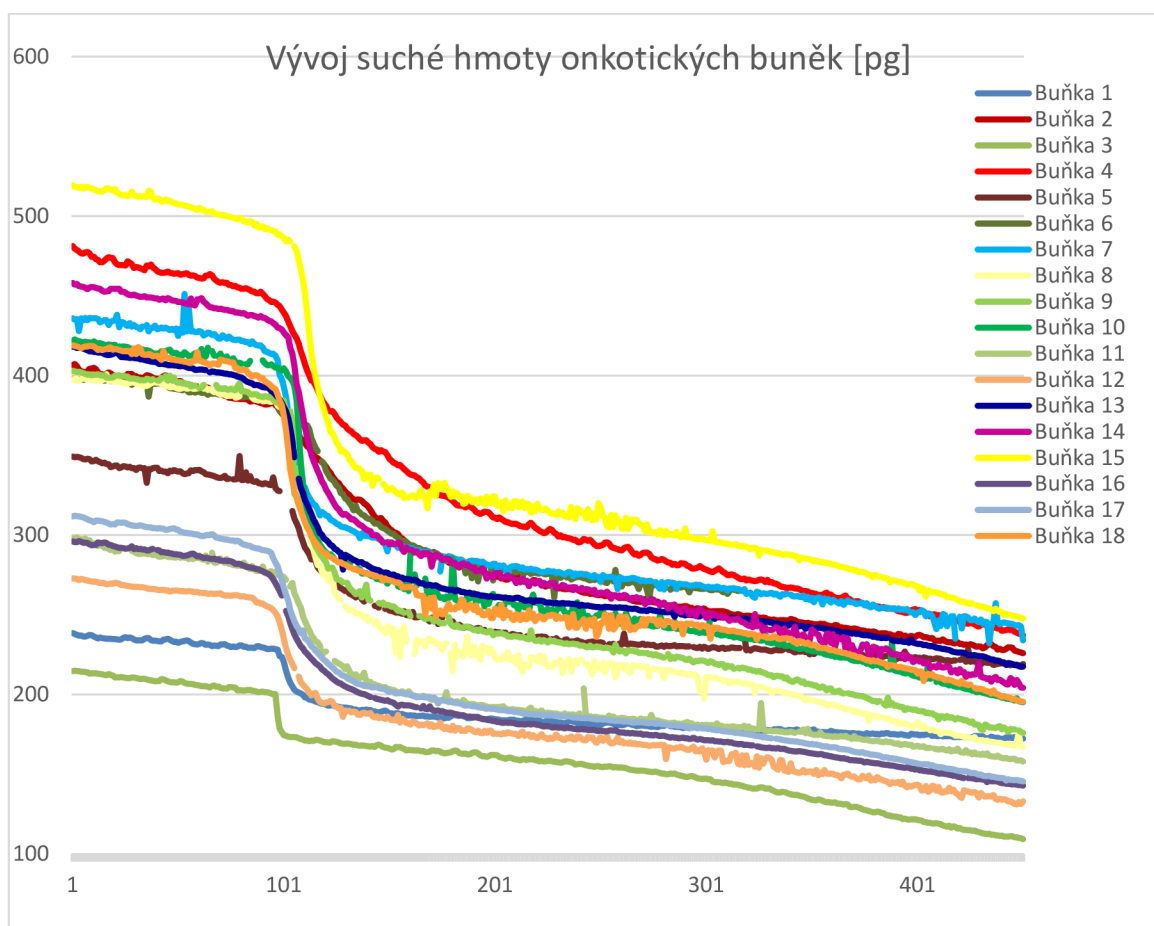
Při vyhodnocování dat nasbíraných pro tento článek byla započata práce na metodice pro identifikaci různých typů buněčné smrti na základě změn tvarových charakteristik a vývoje suché hmoty a souvisejících charakteristik jednotlivých buněk. První výsledky, porovnání typických průběhů křivek apoptózy a onkózy zachycené na obr. 30, byly představeny na mezinárodní konferenci [70].



Obr. 30: Porovnání charakteristických křivek onkózy a apoptózy. Onkóza (zelená) je charakterizovaná roztažením buňky a následným prasknutím plazmatické membrány. Apoptóza naopak vykazuje smrštění buňky a tvorbu apoptotických tělísek, které se od buňky postupně odlučují. S tvorbou apoptotických tělísek souvisí vyšší výkyvy kruhovitosti u apoptózy. Nejsou-li přítomny buňky imunitního systému, podléhají nakonec apoptotické buňky tzv. sekundární nekróze, která je charakterizovaná zakulacením buňky a následným poklesem hmoty buňky.

4.3 Identifikace onkózy

Identifikace a výzkum různých typů buněčných smrtí je v současné biologii velmi aktuální téma. Proto jsem se dále zabývala studiem onkózy, jakožto typem smrti, který při ovlivnění buněk látkou plumbagin nastává nejčastěji. Při dalších pozorováních jsem nasnímala řadu onkotických buněk a do grafu (obr. 31) jsem zobrazila vývoj jejich hmotnosti tak, aby typický výrazný pokles nastal vždy ve stejném okamžiku. Z uvedeného grafu je zřejmé, že křivka vývoje hmotnosti má charakteristický tvar a lze podle ní identifikovat proběhlou onkózu. Do analýzy byly zahrnuty buňky s typickým průběhem onkózy (vytvoření velkého blebu, přelití hmoty do blebu a jeho následné rychlé prasknutí a „vylití“ hmoty buňky do jejího okolí). Buňky, které zpočátku vytvořily více menších blebů (typický znak pro apoptózu), nebo buňky, jejichž bleb patrně pouze napraskl a hmota se pak do okolí přesouvala pomalu, do analýzy zahrnuty nebyly. Pro přehlednost byly z grafu vyřazeny buňky s hmotností větší než 600 pg.



Obr. 31: Charakteristické křivky vývoje suché hmoty onkotických buněk. Při onkóze je nejdříve vytvořen bleb, ten se naplnění hmotou a poté rychle praskne a jeho hmota se vylíje do okolí buňky. Toto vylití hmoty buňky do okolí je v grafech zachyceno jako výrazný pokles hmoty buňky. Křivky jsou zobrazeny tak, aby prasknutí blebu nastalo ve stejný okamžik.

V Masaříkově laboratoři výzkumu rakoviny LF MU je v současnosti instalován jeden z prototypů mikroskopu Q-PHASE, který je intenzivně používán právě k výzkumu buněčných smrtí. Výsledky výzkumu lze najít například v publikaci [67].

5 Aplikace metody DPD při sledování osmotických jevů

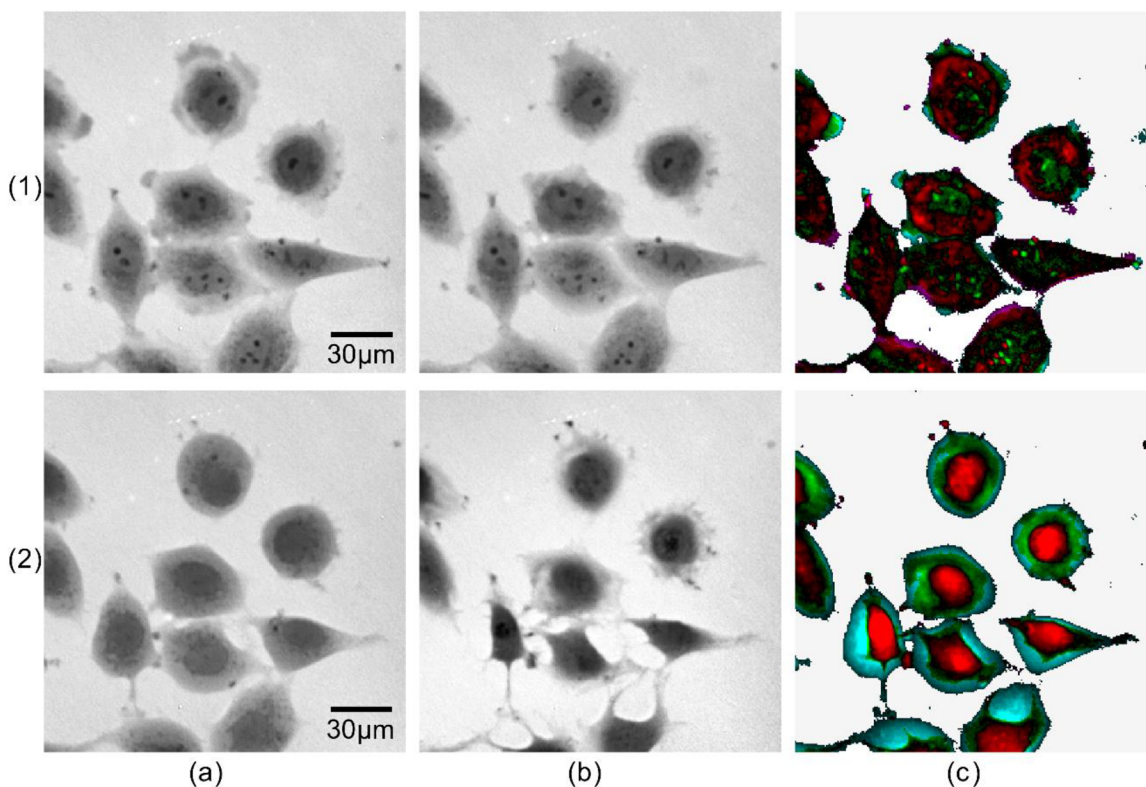
Osmotické jevy byly jako aplikace metody dynamických fázových diferencí vybrány proto, že pomocí změny okolního prostředí buněk můžeme indukovat přesuny hmoty uvnitř buněk. Zároveň se jedná o dostatečně rychlé procesy, takže můžeme vyloučit ostatní změny hmoty, způsobené například růstem nebo strádáním buněk.

Digitální holografická mikroskopie byla pro studium osmotických jevů již použita v publikaci [71], kde se podařilo detekovat větší výšku buňky během hypoosmotického šoku. V publikaci [72] byla použita mimoosová holografická fázová mikroskopie s nízkou časovou koherencí k demonstraci významu ZN^{2+} iontů k potlačení aktivní regulace objemu buňky. Rozsáhlá studie osmotických jevů v holografické mikroskopii byla také provedena v publikaci [73], kde byl studován i vliv disperzních vlastností média na měřený fázový posuv. Bylo zjištěno, že pokud nějaká složka média (např. barvivo) významně ovlivňuje index lomu média, tak měřený fázový posuv během osmotických jevů není dán pouze změnou rozložení suché hmoty uvnitř buňky, ale zohledňuje také prostup vody přes membránu buňky. Také bylo prokázáno, že během osmotických jevů zůstává celková suchá hmota uvnitř buňky zachována a v měřeném fázovém posuvu se tedy nevyskytují žádné změny.

Pro naše experimenty byla zvolena buněčná linie spontánně transformovaných embryonálních krysích fibroblastů LW13K2 [47]. Buňky byly kultivovány jako přisedlé na kultivačním povrchu ve standardním médiu M1H při 37 °C a 3,5 % CO₂. Pro pozorování v mikroskopu byly buňky nasazeny do průtokových komůrek μ -Slide I (Luer Family cat. num. 80196, Ibidi, Martinsried, Germany). Před samotným pozorováním bylo standardní médium M1H vyměněno za médium F10, které je pro pozorování v našem mikroskopu vhodnější a neobsahuje žádná barviva, která by ovlivňovala index lomu média. Pro hypoosmotický šok bylo toto médium ředěno vodou pro tkáňové kultury v poměru 1:9. Během hypoosmotických šoků pak byly zaznamenány dva typy reakce buněk, a to roztažení buňky v laterálním a axiálním směru.

5.1.1 Roztažení buňky v laterálním směru

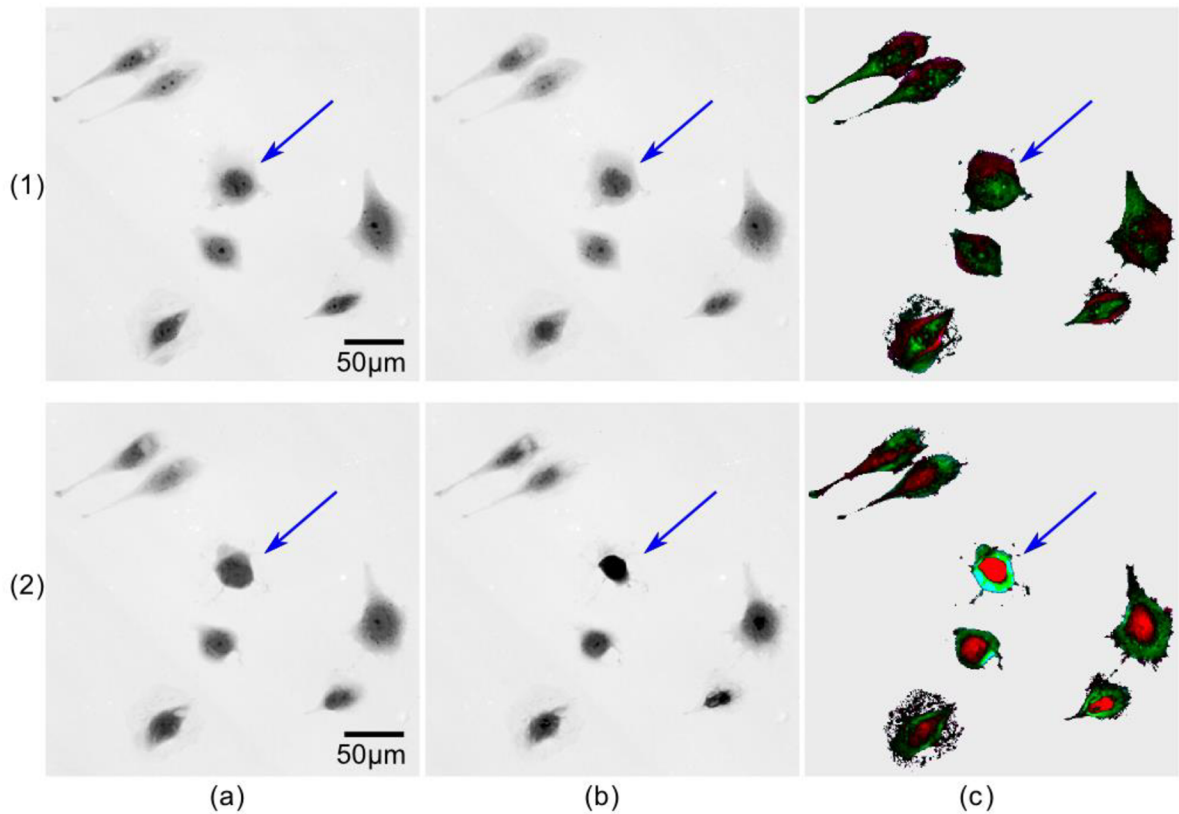
V prvním experimentu bylo během hypoosmotického šoku pozorováno roztahování buněk především v laterálním směru. V první fázi experimentu, tedy při změně prostředí z izotonického na hypotonické nebyly v zobrazení QPI patrné velké změny. Pomocí metody DPD však byly odhaleny výrazné přesuny suché hmoty buňky směrem k jejím okrajům. Při reverzním procesu, tedy změně z hypotonického prostředí na izotonické byl pozorovaný děj výrazně dynamičtější a na jeho konci zaujímaly buňky dokonce menší oblast než na počátku experimentu. Přesuny suché hmoty byly patrné tedy i ze samotného QPI, metoda DPD je však umožnila lépe identifikovat. Metoda DPD byla použita s časovým intervalem 60 s a výsledky jsou zachyceny na obr. 32. Roztažení a následné smrštění buněk je lépe identifikovatelné ze snímků metody DPD než z QPI. V DPD je pro roztažení buňky charakteristická oblast přírůstků suché hmoty při okrajích buněk (červená barva) a úbytků suché hmoty uprostřed buněk (zelená barva). Reverzní smrštění buněk je v DPD charakterizováno úbytky suché hmoty při okrajích buněk (zelené, případně tyrkysové oblasti, pokud buňka zmenšila svoji plochu) a přírůstků suché hmoty uprostřed buněk (červená barva).



Obr. 32: Buňky LW13K2 vystavené hypoosmotickému šoku, objektivy 10×/0,3. První řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich roztahování, (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, roztažení buněk je charakterizováno přírůstkou suché hmoty kolem okrajů buněk (červená barva) a úbytky suché hmoty uvnitř buněk (zelená barva). Druhý řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich smršťování, (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, smrštění buněk je charakterizováno přírůstkou suché hmoty v jejich střezech (červená barva) a úbytky suché hmoty na okrajích buněk (zelená barva).

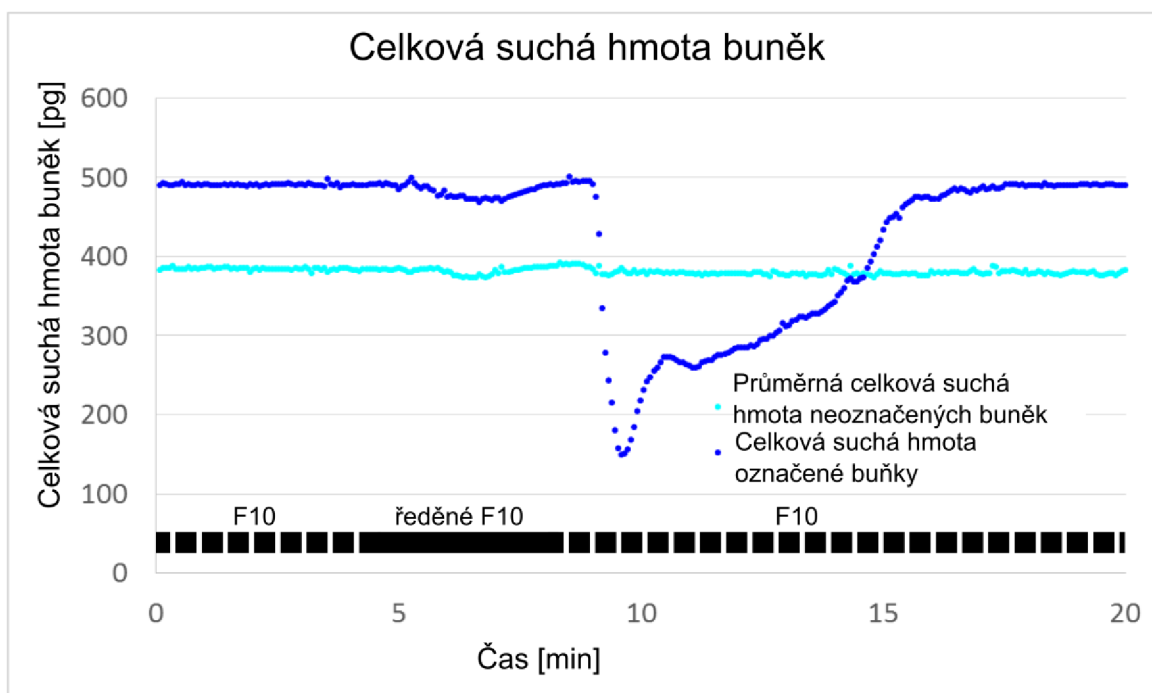
5.1.2 Roztažení buňky v axiálním směru

Ve druhém experimentu se podařilo identifikovat jednu buňku, která na hypoosmotický šok reagovala intenzivněji než ostatní buňky v zorném poli. Situaci zachycuje obr. 33, kde je buňka vykazující intenzivnější reakci na hypoosmotický šok označena šipkou. QPI snímky a znázornění metodou DPD při změně z izotonického na hypotonické médium je zachyceno v horní části obrázku. Spodní část pak zachycuje reverzní děj, tedy změnu z hypotonického prostředí na izotonické. Ve snímcích z QPI nejsou změny způsobené hypoosmotickým šokem téměř patrné (u neoznačených buněk). Metoda DPD však přesuny suché hmoty uvnitř buněk jasně zviditelňuje. Význam barevného kódování je stejný jako v předchozím obrázku, pro roztažení buňky je zvolena červená barva při okrajích buněk a zelená v jejich střezech, smrštění buňky je naopak znázorněno zelenou barvou na okrajích a červenou barvou ve střezech buněk.



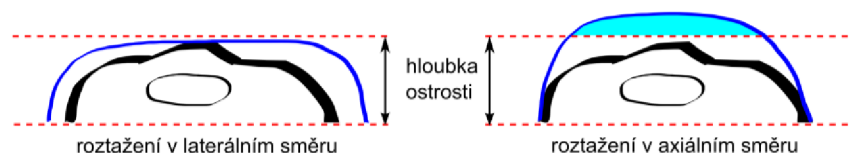
Obr. 33: Buňky LW13K2 vystavené hypoosmotickému šoku, objektivy 10×/0,3. První řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich roztahování, čas 5,5 min a 6,5 min (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, roztažení buněk je charakterizováno přírůstkou suché hmoty kolem okrajů buněk (červená barva) a úbytky suché hmoty uvnitř buněk (zelená barva). Druhý řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich smršťování, čas 8,5 min a 9,5 min (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, smrštění buněk je charakterizováno přírůstkou suché hmoty v jejich středech (červená barva) a úbytky suché hmoty na okrajích buněk (zelená barva). Buňka vykazující intenzivnější reakci na hypoosmotický šok je označena šipkou.

Protože provedené experimenty byly velmi krátké, byly tak vyloučeny ostatní vlivy na přesuny nebo změny obsahu suché hmoty v jednotlivých buňkách. Celková suchá hmota dané buňky by tedy měla zůstat zachována. Pro ověření tohoto biologického předpokladu byla celková suchá hmota jednotlivých buněk v každém okamžiku experimentu vynesena do grafu. Z tohoto grafu na obr. 34 bylo zjištěno, že biologický předpoklad splňují všechny buňky až na jedinou, která vykazovala intenzivnější reakci na hypoosmotický šok (buňka označená šipkou v obr. 33). U této buňky pozorujeme pokles celkové suché hmoty, který následuje po vystavení buňky hypoosmotickému šoku.



Obr. 34: Závislost suché hmoty buňky na čase během hypoosmotického šoku. Vyhodnocované buňky jsou zobrazeny na obr. 33. Tmavě modrá křivka znázorňuje vývoj měřené suché hmoty označené buňky s intenzivnější reakcí. Světle modrá křivka znázorňuje vývoj průměrné hodnoty suché hmoty ostatních buněk.

Časovou změnu QPI této buňky vizualizovanou pomocí DPD (obr. 33) a časovou závislost její suché hmoty (obr. 34) lze interpretovat následujícím způsobem. Nejprve došlo k roztažení buňky v laterálním směru, při následném smrštění však buňka výrazně zmenšila zaujímanou plochu a její suchá hmota byla přesunuta do axiálního směru. Protože je přesnost měření fázového posuvu a tedy i suché hmoty buňky ovlivněna hloubkou ostrosti systému [35] a protože se část buňky axiálně přesunula do oblasti, ve které nemůže být přesně měřena, byl v grafu závislosti suché hmoty na čase zaznamenán pokles. Hloubka ostrosti pro použitou sestavu s objektivy Nikon Plan 10×/0,3 a vlnovou délkou 650 nm činí přibližně 7 μm . Vliv koherenční délky systému na měřený fázový posuv není uvažován, protože koherenční délka systému s filtrem 650 nm/10 nm je větší než hloubka ostrosti použitých objektivů. Hloubkou ostrosti nebo také tloušťkou optického řezu v CCHM se podrobněji zabývá část 3.2. S postupem času však buňka opět přisedala ke kultivačnímu povrchu a její suchá hmota se tak opět posunula do korektně měřitelné oblasti. Toto je zachyceno v grafu na obr. 34 jako zpětný nárůst měřené suché hmoty buňky na počáteční hodnotu. Popsaná situace je zakreslena ve schématu na obr. 35.



Obr. 35: Možné směry roztahování buňky během hypoosmotického šoku. Pokud roztážení nastane v laterálním směru, zůstává suchá hmota buňky v rámci hloubky ostrosti systému a fázový posuv je měřen správně. Pokud roztážení buňky nastane v axiálním směru, je možné, že se část suché hmoty buňky dostane do oblasti mimo hloubku ostrosti systému a fázový posuv tak nemůže být přesně měřen. Ve schématu je počáteční stav buňky zobrazen černou barvou a stav po roztážení buňky tmavě modrou barvou, oblast buňky, ve které nemůže být suchá hmota buňky přesně měřena, je vyznačena světle modrou barvou.

Můžeme tedy říct, že přesnost měřeného signálu závisí na hloubce ostrosti systému i na lokalizaci měřeného objektu v rámci této hloubky ostrosti. Pokud se buňka výrazně roztáhne i v axiálním směru, může se její část nalézat v oblasti mimo hloubku ostrosti systému a fázový posuv tak nemůže být přesně měřen. Pokud však roztážení buňky nastává v laterálním směru, celá buňka zůstává v rámci oblasti hloubky ostrosti systému a fázový posuv je měřen správně.

Výše uvedené experimenty demonstrují skutečnost, že metoda DPD umožňuje vizuálně rozlišit a identifikovat přesuny suché hmoty v buňce s vyšší citlivostí, než by bylo možné při přímém pozorování. Tím se podstatně rozšiřují možnosti QPI.

Jak již bylo zmíněno, při sledování osmotických jevů byly pozorovány indukované přesuny suché hmoty uvnitř buněk. Mezi buňkami a okolím dochází během osmotických dějů pouze k prostupu vody přes buněčnou membránu, přičemž vodná složka buňky není zahrnuta do měřené suché hmoty buňky. Biologický předpoklad o zachování celkové suché hmoty buňky během experimentu byl potvrzen u všech pozorovaných buněk až na jedinou buňku, která vykazovala intenzivnější reakci na hypoosmotický šok. Pozorované změny ve vývoji celkové suché hmoty této buňky byly vysvětleny lokalizací části buňky mimo hloubku ostrosti systému.

6 Aplikace metod ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech

Při studiu nádorových buněk je jednou ze základních zkoumaných vlastností jejich schopnost tvořit metastázy. Tato schopnost je dána mírou invazivity nádorových buněk. Běžně se invazivita studuje v *in vitro* systémech, kde jsou buňky kultivovány v kolagenových gelech [51] a pomocí zobrazení v Hoffmanově modulačním kontrastu se hodnotí statická morfologie buněk nebo hloubka kolagenového gelu, do které se nádorovým buňkám podařilo proniknout [74]. Detailní znalosti o dynamice pohybu buněk ve 3D prostředích a o interakcích mezi buňkou a okolím stále chybějí a jsou předmětem zájmu současného výzkumu. Touto problematikou se zabývají například články [54, 75, 76], kde jsou použity metody jako reflexní konfokální mikroskopie nebo mikroskopie generování druhé harmonické (SHG – second harmonic generation). QPI však zatím pro tyto účely používáno nebylo.

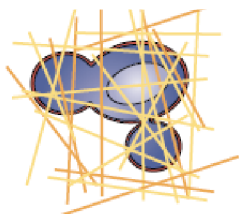
V této práci byl nejprve proveden pilotní experiment zobrazování buněk v kolagenových gelech, který prokázal vhodnost použití QPI pro takováto měření. S výhodou byla použita nelineární filtrace obrazu pomocí metody adaptivní kontroly kontrastu ACC (Adaptive Contrast Control © software by SOFO), která umožňuje současně zvýraznit jak zobrazená kolagenová vlákna, tak struktury uvnitř zobrazených buněk.

Ve výzkumu invazivity buněk v kolagenových gelech pak pokračoval především dr. Ondřej Tolde a dr. Aneta Gandalovičová z Laboratoře invazivity nádorových buněk Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Na jimi získaná data jsem úspěšně aplikovala metodu Dynamických fázových diferencí a výsledky jsou publikovány v článku [77].

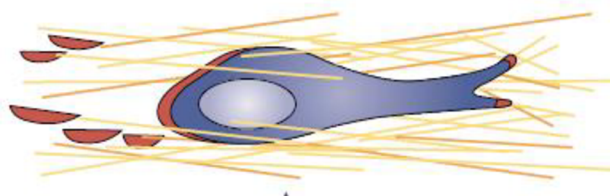
6.1 Zobrazování buněk v kolagenových gelech

Za účelem ověření možností QPI při zobrazování živých buněk v 3D prostředích jsme pozorovali buňky s améboidním a mezenchymálním typem pohybu [54]. Améboidní buňky mají zakulacený tvar, neformují fokální adheze a pohybují se díky dynamickým deformacím těla buňky. Bleby jsou vytvářeny zvýšením vnitrobuněčného tlaku cytoplazmy a odpojením membrány od kortikálního skeletu. Mezenchymální buňky mají protažený tvar, který je výsledkem adhezivních a kontraktálních sil vznikajících při pohybu. Buňky jsou proteolyticky aktivní a tvoří adhezivní spoje s extracelulární matrix. Schematické nákresy obou typů buněk jsou na obr. 36.

améboidní buňka



mezenchymální buňka



Obr. 36: Schematické znázornění améboidní a mezenchymální buňky v extracelulární matrixi. Převzato z [54].

Jako buňky s améboidním typem pohybu jsme vybrali linii A3, což jsou kryší nádorové buňky, a jako buňky s mezenchymálním typem pohybu linii MCF-7, což jsou lidské nádorové buňky. Obě linie byly kultivovány ve standardním médiu M1H obohaceném o 10 % FBS za teploty

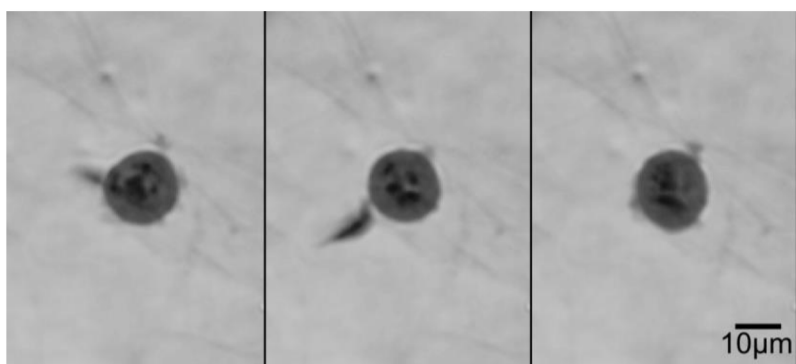
37 °C a při 3,5 % CO₂, pro pozorování byly buňky připraveny na koncentraci 2 x 10⁵ buňk/ml.

V obou případech byly buňky pozorovány v kolagenovém gelu (Serva Collagen R 2 mg/ml). Přípravu vzorků, při níž je velmi důležitá preciznost a dodržování teplotních podmínek, prováděla laborantka skupiny Experimentální biofotoniky Mgr. Veronika Jůzová. Vzorky byly připravovány do komůrek vytvořených ze dvou mikroskopových sklíček a nerezového mezikruží o výšce 4 mm. Výška kolagenového gelu byla cca 2 mm a zbylá část komůrky byla zaplněna kultivačním médiem.

Pro pozorování byly zvoleny objektivy Nikon Plan 10×/0,3 s pracovní vzdáleností 16 mm a Nikon Fluor 20×/0,5 s pracovní vzdáleností 2,1 mm, které umožnily pozorování buněk v celé výšce kolagenového gelu.

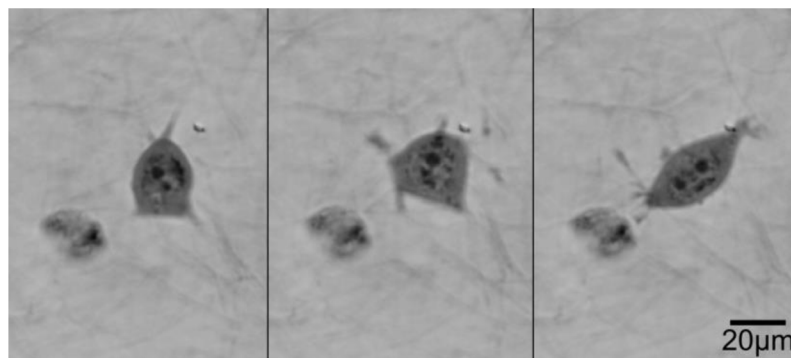
Pro úpravu snímků QPI jsme úspěšně aplikovali metodu adaptivní kontroly kontrastu ACC, která umožnila ve snímcích kontrastně zobrazit jak kolagenová vlákna, tak struktury uvnitř buňky.

Buňky s améboidním typem pohybu mají zakulacený až elipsovitý tvar s průměrem 10 μm – 30 μm. Rychlost jejich migrace může být velmi různá, asi 0,1 μm/min – 20 μm/min. K vláknům extracelulární matrice se obvykle přichytávají velmi slabě nebo vůbec, spíše mezi vlákna jakoby proplouvají [54]. Ukázka QPI améboidní buňky pomocí CCHM je na obr. 37.



Obr. 37: QPI améboidní buňky pomocí CCHM; krysí nádorové buňky A3 v kolagenové matrici, objektivy 10×/0,3, interval mezi jednotlivými snímky 9 min.

Buňky s mezenchymálním typem pohybu mají prodloužený tvar s délkou 50 μm – 200 μm. Rychlost jejich migrace je nízká, asi 0,1 μm/min – 1 μm/min. K vláknům extracelulární matrice se silně přichytávají a interagují s nimi, tak si vytvářejí cestu pro svoji migraci [54]. Ukázka QPI mezenchymální buňky pomocí CCHM je na obr. 38.



Obr. 38: QPI mezenchymální buňky pomocí CCHM; lidské nádorové buňky MCF-7 v kolagenové matrici, objektivy 10×/0,3, interval mezi jednotlivými snímky 9 min.

Experimenty se zobrazováním buněk v kolagenu se jeví biologicky velmi zajímavé. Snímky získané z QPI jsou dostatečně kvalitní a bez artefaktů, jako je například halo efekt, který znemožňuje pozorování těchto zakulacených buněk v Zernikově fázovém kontrastu [6]. Podařilo se nám nasnímat několik videí, která dobře charakterizují způsob pohybu améboidních i mezenchymálních buněk. Jako výhodné se také ukázalo zpracování získaného obrazu metodou ACC. Proto je v tomto výzkumu dále pokračováno pod vedením biologů z Laboratoře invazivity nádorových buněk PF UK.

6.2 Metoda DPD ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech

V Laboratoři invazivity nádorových buněk PF UK byly provedeny experimenty zaměřené na studium znaků mezenchymální a améboidní invazivity rakovinných buněk v kolagenových gelech. Na data QPI získaná pomocí prototypu MHM Q-PHASE jsem pro analýzu přesunů hmoty u různých charakteristických dějů použila metodu DPD. Protože se však jednalo o experimenty v kolagenových gelech, kde je obtížnější určit přesné hranice buněk a kde hodnoty pozadí nefluktují vlivem kolagenu pouze okolo nulové hodnoty, byla použita zjednodušená verze metody DPD. Tato zjednodušená verze DPD znázorňuje v použité barevné škále pouze rozdíly mezi dvěma po sobě jdoucími snímky. Lze tak rozlišit, v kterých místech buňky hmota přibyla a v kterých ubyla. Nejsou však rozlišena místa, která buňka opustila nebo nově obsadila, a také nejsou odlišeny hodnoty způsobené šumem. V použitých časových intervalech nemá toto omezení pro biologickou interpretaci dat ale nijak zásadní význam.

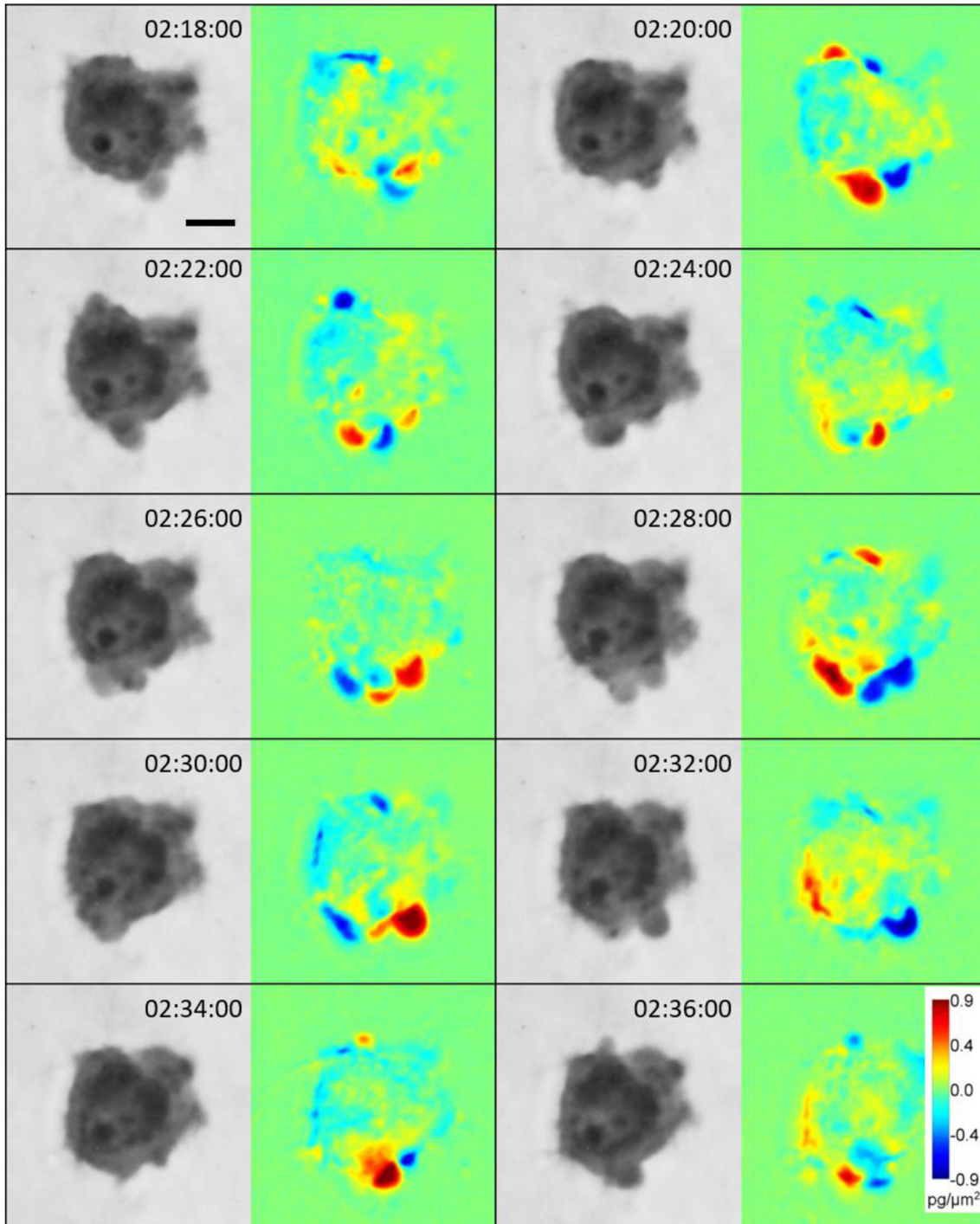
Pro experimenty byly použity buněčné linie HT1080 a HT1080 s konstitutivně aktivním RhoA (RHoA G14V). Obě linie byly kultivovány ve standardních kultivačních podmínkách (37 °C a 5 % CO₂) v mediu DMEM obohaceném o 10 % FBS a 0,1 % ciprofloxacin. Buňky byly poté připraveny na koncentraci 1 x 10⁶ buněk/ml v mediu DMEM bez fenolové červeně a s 10 % FBS. Pufrovaný roztok byl smíchán s vodou pro tkáňové kultury a s kolagenem v závislosti na finální koncentraci kolagenu. Buněčná suspenze byla přidávána v poměru 1:10. Pro analýzu mezenchymální invazivity byl použit roztok 1 mg/ml bovinního kolagenu, který tvořil jasně viditelná silná vlákna. Roztok 1 mg/ml krysího kolagenu byl použit pro analýzu améboidní invazivity. Směs byla umístěna buď do komůrek μ -Slide Angiogenesis (Ibidi) nebo do misek (Mattek). Tuhnutí gelu probíhalo při 37 °C nebo při pokojové teplotě, kdy je zaručena tvorba silnějších vláken. Nejméně 1 hodinu po ztuhnutí gelu byly připravené vzorky doplněny médiem a přikryty krycím sklíčkem nebo víčkem, aby bylo zabráněno tvorbě menisku, který by mohl narušit interferenci a kvalitu QPI.

Pro pozorování na MHM Q-PHASE byly použity objektivy Nikon Plan 10x/0,3, Nikon Plan Fluor 20x/0,5 a Nikon Plan Apo 40x/0,95. Prezentované fázové obrázky byly navíc pro lepší kontrast při tisku upraveny pomocí nelineární filtrace v programu ACC. Pro DPD byla použita barevná škála, kde modrá barva znázorňuje úbytky hmoty a červená barva znázorňuje přírůstky hmoty v daném místě buňky. Malé rozdíly jsou zachyceny jako malé hodnoty v okolí nuly v odstínech zelené barvy.

Invazivita améboidních buněk závisí především na dynamických deformacích těla buňky díky zvýšenému vnitrobuněčnému tlaku a následné formaci membránových blebů. MHM Q-PHASE umožnil sledovat tyto dynamické změny a zároveň analyzovat přesuny hmoty uvnitř buňky nebo přímo měřit hustotu suché hmoty uvnitř blebů.

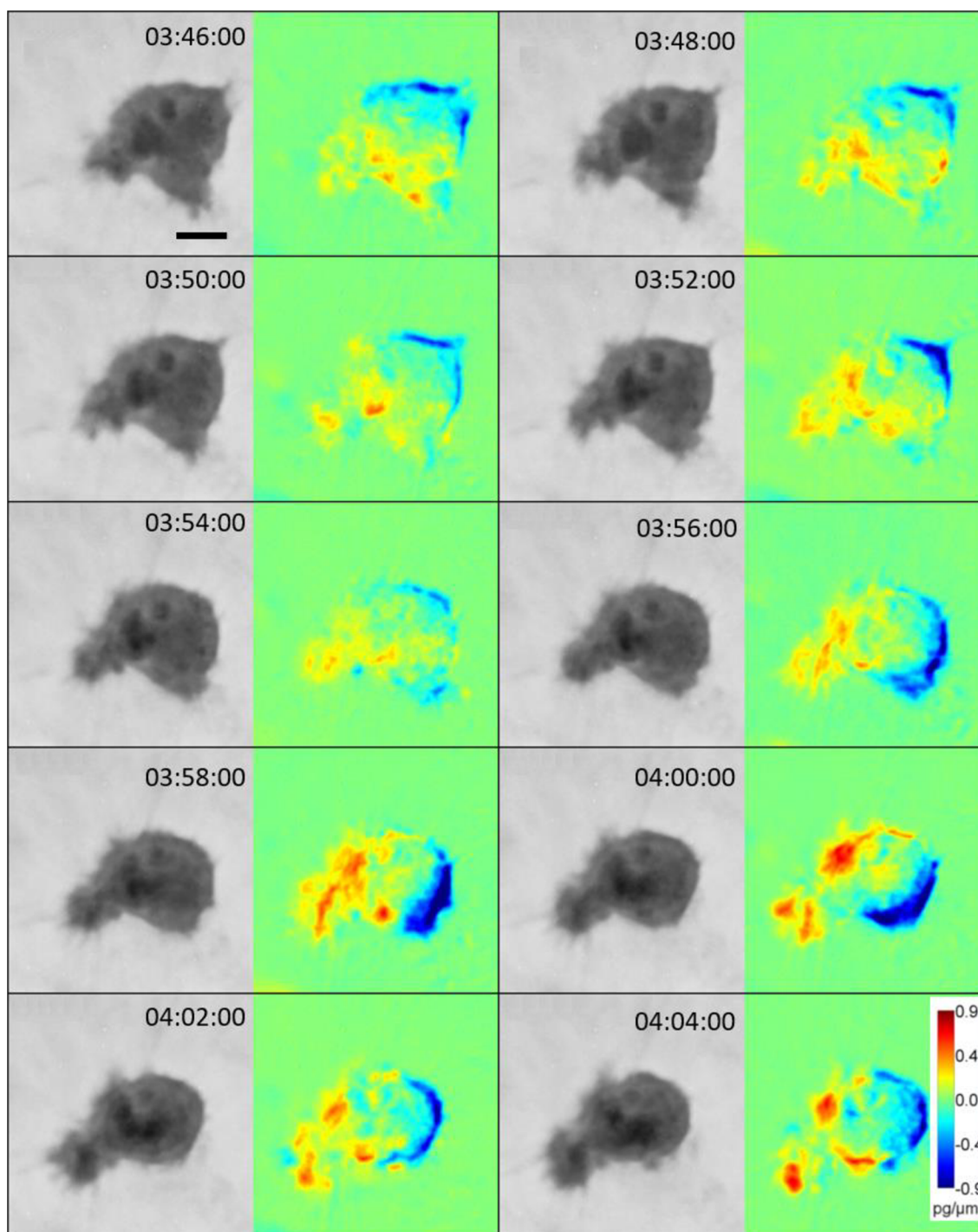
Pozorování ukázala, že intenzita vznikání blebu není konstantní. Zvýšená tvorba blebů nastává v případech, kdy je buňka sevřená v ECM a nemůže se přesunout. Pomocí metody DPD bylo pozorováno, že rozložení hmoty buňky není v této situaci nijak polarizováno a že bleby se

tvoří především ve směru nastávajícího pohybu buňky. Ukázka takové situace je zachycena na obr. 39.



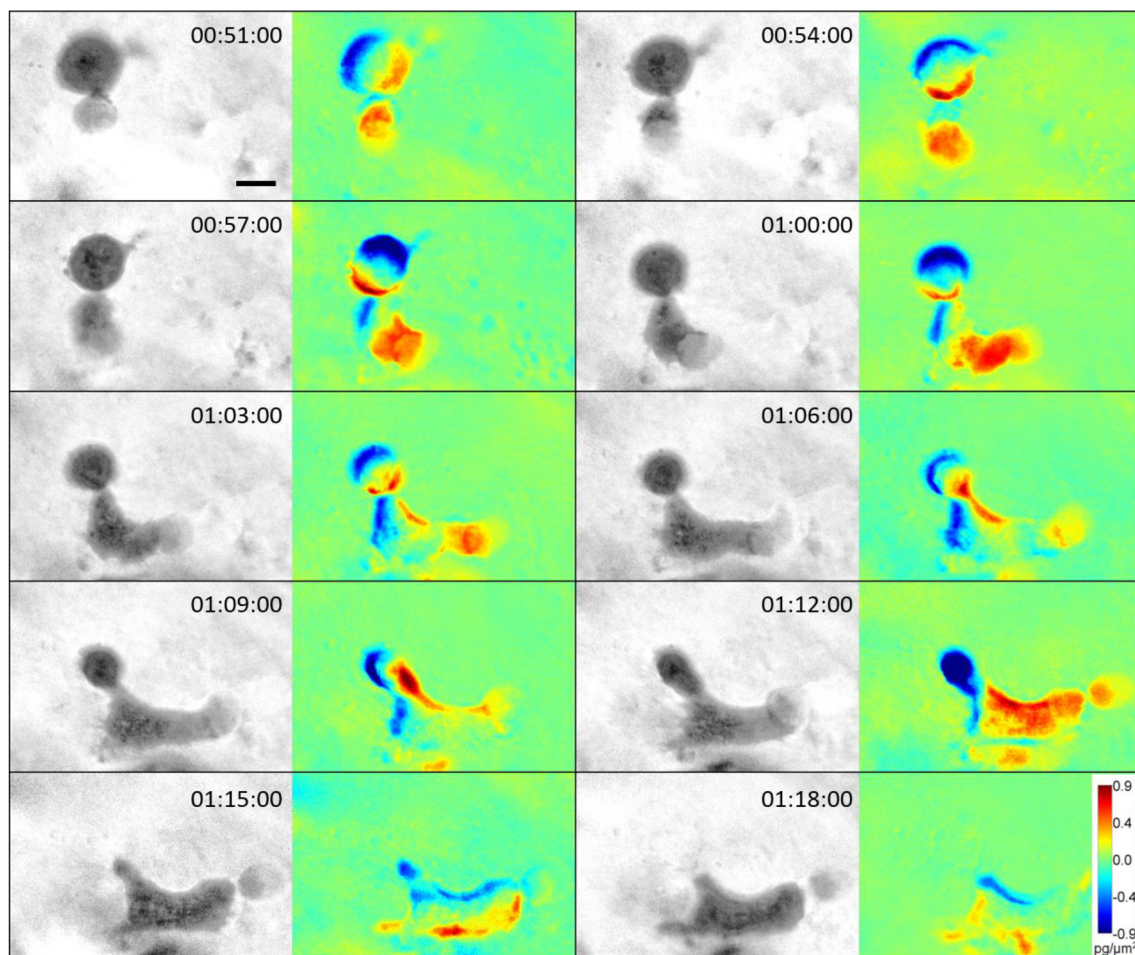
Obr. 39: Tvorba dynamických blebů pozorovaná na améboidní buňce. QPI je zachyceno v odstínech šedi, DPD ukazují dynamiku tvorby blebů a nepolarizované rozložení hmoty. Měřítka 10 μm .

Intenzita tvorby blebů ustává v případě, že je umožněn pohyb buňky skrz ECM. Místo blebů se tvoří stabilnější pseudopodium, do kterého se postupně přesouvá hmota buňky a celá buňka se přesunuje daným směrem. Tato situace je zachycena na obr. 40.



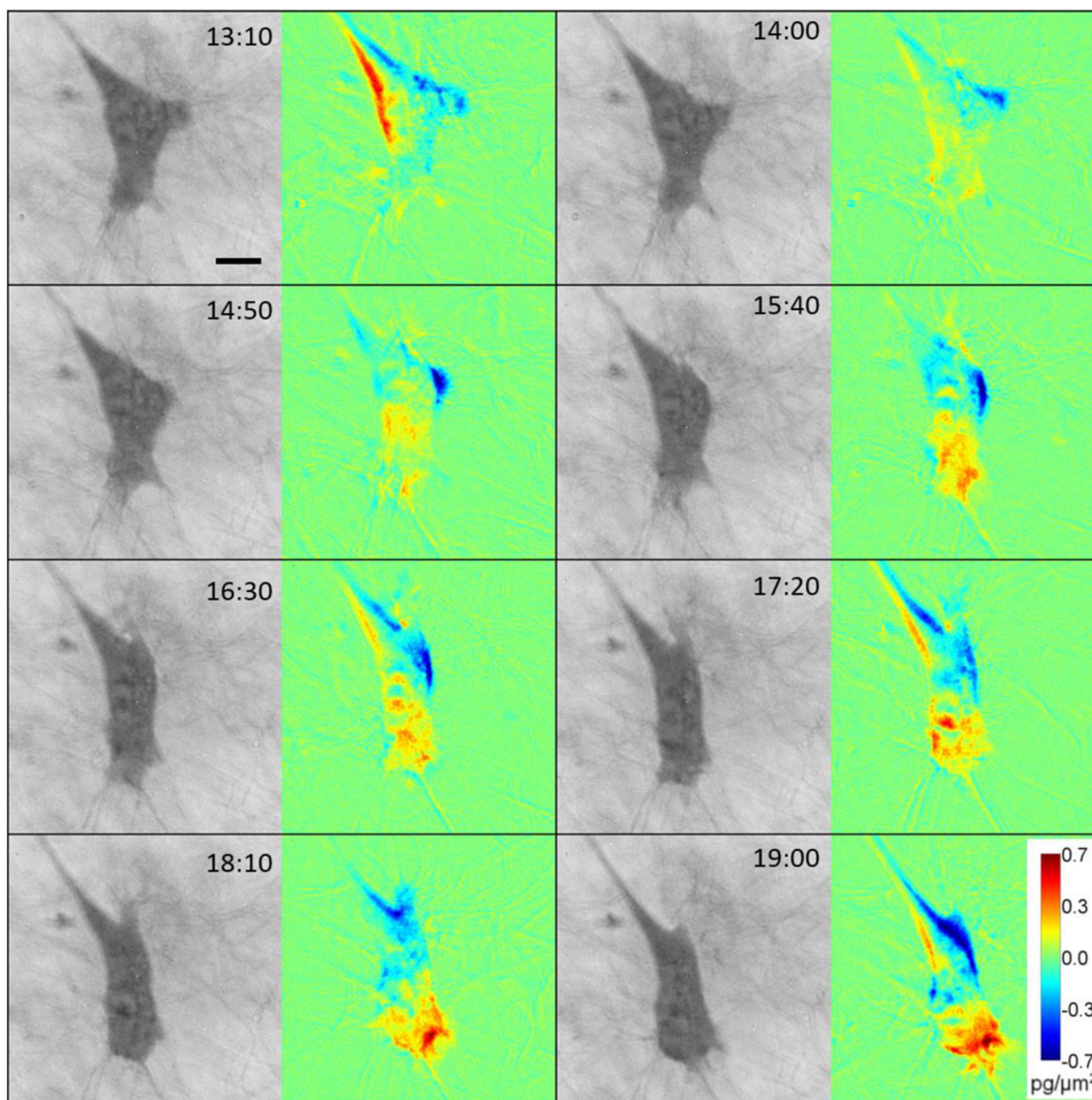
Obr. 40: Analýza rozložení hmoty buňky v průběhu migrace améboidní buňky. QPI je zachyceno v odstínech šedi, DPD ukazují rozložení hmoty polarizované ve směru nastávajícího pohybu buňky. Měřítka 10 μm .

Je známo a bylo již opakovaně demonstrováno, že největším omezením pro améboidní migraci buňky je velikost a tuhost jejího jádra [76, 78]. Proto jsme pomocí metody DPD analyzovali také situaci, při níž améboidní buňka prostupuje skrz úzký otvor v síti ECM a výrazně se proto deformuje. Pozorovaná buňka nejprve vytvoří velký membránový bleb, který prostupuje úzkým otvorem. Z něj se pak stává pseudopodium, do kterého postupně přesune buňka svoji hmotu. K největšímu přesunu hmoty dochází v okamžiku, kdy je možné, aby se skrz úzký otvor protlačilo i jádro buňky. Celá situace je zachycena na obr. 41.



Obr. 41: Analýza rozložení hmoty buňky v průběhu prostupu buňky skrz úzký otvor v ECM. QPI je zachyceno v odstínech šedi, DPD pak zachycují postupné přesouvání hmoty buňky do vytvořeného blebu. Nejvýraznější přesun hmoty nastává v okamžiku, kdy se do blebu přesouvá samotné jádro buňky. Měřítko 10 μm .

Migrace mezenchymálních buněk je založena na proteolytické aktivitě na vedoucím okraji buňky, tvorbě pseudopodií a následném přesunu hmoty do tohoto pseudopodia. Rozložení hmoty buňky je při jejím pohybu značně polarizováno a přesuny hmoty jasně určují směr pohybu buňky. Migrace mezenchymální buňky je zachycena na obr. 42.



Obr. 42: Analýza rozložení hmoty mezenchymální buňky během její migrace. QPI jsou zobrazeny v odstínech šedi, DPD zachycují polarizované rozložení hmoty buňky a výrazný přesun hmoty buňky ve směru jejího pohybu. Měřítko 10 μm .

Použití zjednodušené metody DPD pro výzkum dynamiky nádorových buněk ve 3D prostředích ukázalo výhody tohoto způsobu vizualizace dat. Zřetelně tak mohly být zobrazeny rozdíly mezi různými druhy pohybu améboidních buněk ve 3D prostředích i rozdíly mezi pohybem améboidních a mezenchymálních buněk. Ucelené výsledky z těchto měření jsou publikovány v článku [77].

7 Závěr

Ve své doktorské práci jsem se zabývala pokročilými metodami vyhodnocujícími QPI vytvářené pomocí CCHM a aplikacemi těchto metod ve výzkumu živých buněk.

Experimenty jsem prováděla na prototypu MHM Q-PHASE, který je založen na principu CCHM a na jehož vývoji jsem se v rámci projektu *Multimodální holografický mikroskop (FR-TI4/660)* podílela. Výhodou tohoto mikroskopu je jeho automatizace a možnost kombinace QPI s fluorescenční mikroskopií.

V práci jsem se nejdříve v kapitole 2 věnovala výběru a vývoji metod vyhodnocujících QPI. Byly vybrány základní parametry popisující tvarové a dynamické charakteristiky buněk a vyhodnocování těchto parametrů bylo implementováno přímo do ovládacího programu mikroskopu. Stejně tak bylo do ovládacího programu přidáno i vyhodnocování fázové informace tzv. vážení buněk, které je výhodou metod QPI oproti ostatním mikroskopickým metodám. Pro vyhodnocování změn rozložení hmoty v čase jsme navrhli metodu DPD. V kapitole 3 jsem se pak zabývala vlastnostmi zobrazování vzorku ve 3D prostředí a možností zúžení zobecněného optického řezu pomocí filtrace prostorových frekvencí.

Popsané metody jsem použila k vyhodnocení dat v jednotlivých biologických aplikacích.

V rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí, kde bylo provedeno několik dlouhodobých časosběrných pozorování, bylo plně využito vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik. Podstatnou informaci o typu buněčné smrti poskytlo také sledování hmoty jednotlivých buněk v čase. V této studii byla také využita možnost kombinace QPI a fluorescenční mikroskopie.

Při studiu osmotických jevů byla využita metoda DPD, která u těchto velmi dynamických dějů umožnila sledování změn rozložení hmoty uvnitř jednotlivých buněk.

Při výzkumu dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech byly využity jednak znalosti o vlastnostech zobrazování pomocí CCHM v 3D prostředích a jednak se podařilo aplikovat i zjednodušenou metodu DPD. Ta umožnila dobře zobrazit rozdíly při jednotlivých typech pohybu buněk.

Výsledky práce byly publikovány v odborných časopisech [17, 45, 69, 77] a prezentovány na mezinárodních konferencích [70].

Seznam použité literatury

1. Slabý, T., Kolman, P., Dostál, Z., Antoš, M., Lošťák, M. and Chmelík, R. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, 2013, 21(12), 14747-14762.
2. Chmelík, R., Slaba, M., Kollarova, V., Slaby, T., Lostak, M., Collakova, J. and Dostal, Z. The role of coherence in image formation in holographic microscopy. *Progress in Optics*, 2014, 59, 267-335.
3. Davies, H.G. and Wilkins, M.H.F. Interference microscopy and mass determination. *Nature*, 1952, 169, 541.
4. Barer, R. Interference microscopy and mass determination. *Nature*, 1952, 169, 366-367.
5. Rappaz, B., Marquet, P., Cuche, E., Emery, Y., Depeursinge, C. and Magistretti, P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*, 2005, 13(23), 9361-9373.
6. Pastorek, L., Venit, T. and Hozák, P. Holography microscopy as an artifact-free alternative to phase-contrast. *Histochemistry and cell biology*, 2018, 149(2), 179-186.
7. Rappaz, B., Breton, B., Shaffer, E. and Turcatti, G. Digital holographic microscopy. A quantitative label-free microscopy technique for phenotypic screening. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2014, 17(1), 80-88.
8. Cuche, E., Bevilacqua, F. and Depeursinge, C. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics Letters*, 1999, 24(5), 291-293.
9. Marrison, J., Ráty, L., Marriott, P. and O'Toole, P. Ptychography-a label free, high-contrast imaging technique for live cells using quantitative phase information. *Scientific reports*, 2013, 3, 2369.
10. Wang, Z., Millet, L., Mir, M., Ding, H., Unarunotai, S., Rogers, J., Gillette, M. and Popescu, G. Spatial light interference microscopy (SLIM). *Optics Express*, 2011, 19(2), 1016-1026.
11. Popescu, G. Quantitative phase imaging of cells and tissues. *McGraw Hill Professional*, 2011, ISBN 978-0-07-166342-7.
12. Kolman, P. and Chmelík, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, 2010, 18(21), 21990-22003.
13. Lošťák, M., Chmelík, R., Slabá, M. and Slabý, T. Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express*, 2014, 22(4), 4180-4195.
14. Kollarova, V., Collakova, J., Dostal, Z., Vesely, P. and Chmelik, R. Quantitative phase imaging through scattering media by means of coherence-controlled holographic microscope. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11), 111206-111206.
15. Kolman, P. Koherenci řízený holografický mikroskop. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
16. Slabý, T. Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 91 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
17. Balvan, J., Krizova, A., Gumulec, J., Raudenska, M., Sladek, Z., Sedlackova, M., Babula, P., Sztalmachova, M., Kizek, R., Chmelik, R. and Masarik, M. Multimodal holographic microscopy: distinction between apoptosis and oncosis. *PLoS one*, 2015, 10(5), e0121674.

18. Kasprovicz, R., Suman, R. and O'Toole, P. Characterising live cell behaviour: Traditional label-free and quantitative phase imaging approaches. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2017, 84, 89-95.
19. Russ, J.C., *The image processing handbook*, 6th edition. CRC Press, 2016, ISBN 978-1-4398-4063-4.
20. Sezgin, M. and Sankur, B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic imaging*, 2004, 13(1), 146-166.
21. Meijering, E. Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2012, 29(5), 140-145.
22. Bengtsson, E., Wahlby, C. and Lindblad, J. Robust cell image segmentation methods. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2004, 14(2), 157-167.
23. Parvati, K., Rao, P. and Mariya Das, M. Image segmentation using gray-scale morphology and marker-controlled watershed transformation. *Discrete Dynamics in Nature and Society*, 2008, 2008.
24. Strbkova, L., Zicha, D., Vesely, P. and Chmelik, R. Automated classification of cell morphology by coherence-controlled holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2017, 22(8), 086008.
25. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H. and others. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 2008, 132(3), 487-498.
26. Strand, J., Taxt, T. and Jain, A.K., Two-dimensional phase unwrapping using a block least-squares method. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1999, 8(3), 375-386.
27. Goldstein, R., Zebker, H. and Werner, C., Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping. *Radio Science*, 1988, 23(4), 713-720.
28. Zikmund, T., Kvasnica, L., Týč, M., Křížová, A., Čolláková, J. and Chmelík, R., Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*, 2014, 256(2), 117-125.
29. Zangle, T. A. and Teitell, M. A. Live-cell mass profiling: an emerging approach in quantitative biophysics. *Nature methods*, 2014, 11(12), 1221-1228.
30. Charrière, F., Pavillon, N., Colomb, T., Depeursinge, C., Heger, T.J., Mitchell, E.A., Marquet, P. and Rappaz, B. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba. *Optics Express*, 2006, 14(16), 7005-7013.
31. Rappaz, B., Charrière, F., Depeursinge, C., Magistretti, P.J. and Marquet, P. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium. *Optics Letters*, 2008, 33(7), 744-746.
32. Kemper, B., Carl, D., Schnekenburger, J., Bredebusch, I., Schäfer, M., Domschke, W. and von Bally, G. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2006, 11(3), 034005-034005.
33. Wayne, R.O. *Light and video microscopy*. Academic Press, 2013.
34. Dunn, G.A. and Zicha, D. Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. In *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1992, 47, 91-106.
35. Čolláková, J. Využití koherencí řízené holografické mikroskopie ke sledování dynamiky živých buněk. Pojednání k dizertační práci, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 27 s. Vedoucí práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

36. Rappaz, B., Cano, E., Colomb, T., Kühn, J., Depeursinge, C., Simanis, V., Magistretti, P.J. and Marquet, P. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2009, 14(3), 034049-034049.
37. Popescu, G., Park, Y., Lue, N., Best-Popescu, C., Deflores, L., Dasari, R.R., Feld, M.S. and Badizadegan, K. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008, 295(2), C538-C544.
38. Girshovitz, P. and Shaked, N.T. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(8), 1757-1773.
39. Kovářová, K. Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu. Bakalářská práce, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 28 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.
40. Kovářová, K. Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem. Diplomová práce, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 52 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.
41. Marrison, J., Rätty, L., Marriott, P. and O'Toole, P. Ptychography - a label free, high-contrast imaging technique for live cells using quantitative phase information *Scientific reports*, 2013, 3, 2369.
42. Janicke, B., Kårnsås, A., Egelberg, P. and Alm, K. Label-free high temporal resolution assessment of cell proliferation using digital holographic microscopy. *Cytometry Part A*, 2017, 91(5), 460-469.
43. Uhlířová, H. Mikroskopie časově proměnných biologických objektů, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 61 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
44. Křížová, A. Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky. Diplomová práce, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 59 s. Vedoucí Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.
45. Krizova, A., Collakova, J., Dostal, Z., Kvasnica, L., Uhlirova, H., Zikmund, T., Vesely, P. and Chmelik, R. Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior. *Journal of biomedical optics*, 2015, 20(11), 111214-111214.
46. Kreis, T. Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method. *JOSA A*, 1986, 3(6), 847-855.
47. Veselý, P., Melezinkova, H., Krenova, D., Kren, V., Matouskova, E. and Chaloupkova, A. Spontaneously metastasizing rat sarcomas LW13K2 and RPS: assessment by the immunogenetic test of malignancy, in vitro behaviour and karyology. *Folia biologica*, 1988, 35(1), 1-12.
48. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. and Yamada, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001, 294(5547), 1708-1712.
49. Dubois, F., Yourassowsky, C., Monnom, O., Legros, J.-C., Debeir, O., Van Ham, P., Kiss, R., Decaestecker, C. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. *Journal of biomedical optics*, 2006, 11(5), 054032.

50. Langehanenberg, P., Kemper, B., Dirksen, D. and Von Bally, G. Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging. *Applied optics*, 2008, 47(19), D176-D182.
51. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. and Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and drug development technologies*, 2014, 12(4), 207-218.
52. Dubois, F., Schockaert, C., Callens, N. and Yourassowsky, C. Focus plane detection criteria in digital holography microscopy by amplitude analysis. *Optics Express*, 2006, 14(13), 5895-5908.
53. Chmelík, R., Petráček, J., Slabá, M., Kollárová, V., Slabý, T., Čolláková, J., Komrska, J., Dostál, Z., Veselý, P. Holographic microscopy in low coherence. In *Quantitative phase imaging II*, 2016, 9718, 971806.
54. Friedl, P. and Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(5), 362-374.
55. Pawley, J. B. *Handbook of biological confocal microscopy*, 2nd edition. Plenum Press, New York, 1995. ISBN 0-306-44826-2.
56. McNally, J. G., Karpova, T., Cooper, J. and Conchello, J. A. Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods*, 1999, 19(3), 373-385.
57. Wang, Z., Marks, D. L., Carney, P. S., Millet, L. J., Gillette, M. U., Mihi, A., Braun, P. V., Shen, Z., Prasanth, S. G. and Popescu, G. Spatial light interference tomography (SLIT). *Optics Express*, 2011, 19(21), 19907-19918.
58. Dougherty, R. Extensions of DAMAS and benefits and limitations of deconvolution in beamforming. In *11th AIAA/CEAS aeroacoustics conference*, 2005, 2961.
59. Charrière, F., Marian, A., Montfort, F., Kuehn, J., Colomb, T., Cuhe, E., Marquet, P. and Depeursinge, C., Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy. *Optics letters*, 2006, 31(2), 178-180.
60. Choi, W., Fang-Yen, C., Badizadegan, K., Oh, S., Lue, N., Dasari, R. R. and Feld, M. S. Tomographic phase microscopy. *Nature methods*, 2007, 4(9), 717.
61. Chmelík, R. Three-dimensional scalar imaging in high-aperture low-coherence interference and holographic microscopes. *Journal of Modern Optics*, 2006, 53(18), 2673-2689.
62. Dunn, A. and Richards-Kortum, R. Three-dimensional computation of light scattering from cells. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 1996, 2(4), 898-905.
63. Zhang, Q., Zhong, L., Tang, P., Yuan, Y., Liu, S., Tian, J. and Lu, X. Quantitative refractive index distribution of single cell by combining phase-shifting interferometry and AFM imaging. *Scientific reports*, 2017, 7(1), 2532.
64. Monck, J. R., Oberhauser, A. F., Keating, T. J. and Fernandez, J. M. Thin-section ratiometric Ca²⁺ images obtained by optical sectioning of fura-2 loaded mast cells. *The Journal of cell biology*, 1992, 116(3), 745-759.
65. FFT Filter. *RSB Home Page* [online]. Dostupné z: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fft-filter.html>
66. Wlodkowic, D., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z., Cytometry in cell necrobiology revisited. Recent advances and new vistas. *Cytometry Part A*, 2010, 77(7), 591-606.
67. Vicar, T., Gumulec, J., Balvan, J., Hracho, M. and Kolar, R. Label-Free Nuclear Staining Reconstruction in Quantitative Phase Images Using Deep Learning. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2018*, 2019, 239-242.
68. Trump, B.E., Berezsky, I.K., Chang, S.H. and Phelps, P.C., The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*, 1997, 25(1), 82-88.

69. Balvan, J., Gumulec, J., Raudenska, M., Krizova, A., Stepka, P., Babula, P., Kizek, R., Adam, V. and Masarik, M. Oxidative stress resistance in metastatic prostate cancer: Renewal by self-eating. *PloS one*, 2015, 10(12), e0145016.
70. Krizova, A., Balvan, J., Gumulec, J., Slaby, T., Masarik, M., Chmelik, R., Cell death type identification by quantitative phase imaging. In *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26.
71. Kemper, B., Langehanenberg, P., Bredebusch, I., Schnekenburger, J. and von Bally, G., Techniques and applications of digital holographic microscopy for life cell imaging. In *European Conference on Biomedical Optics*, 2007, 6633_12.
72. Witte, S., Plauška, A., Ridder, M.C., van Berge, L., Mansvelter, H.D. and Groot, M.L. Short-coherence off-axis holographic phase microscopy of live cell dynamics. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(9), 2184-2189.
73. Boss, D., Kühn, J., Jourdain, P., Depeursinge, C., Magistretti, P.J. and 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*, 2013, 18(3), 036007-036007.
74. Paňková, D., Jobe, N., Kratochvílová, M., Buccione, R., Brábek, J. and Rösel, D. NG2-mediated Rho activation promotes amoeboid invasiveness of cancer cells. *European Journal of Cell Biology*, 2012, 91(11), 969-977.
75. Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L.M., von Andrian, U.H., van Rheenen, J., Deryugina, E. and Friedl, P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(8), 931-941.
76. Wolf, K., Te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., Te Riet, J., Willis, A.L., Hoffman, R.M., Figdor, C.G., Weiss, S.J. and Friedl, P. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 201(7), 1069-1084.
77. Tolde, O., Gandalovičová, A., Křížová, A., Veselý, P., Chmelík, R., Rosel, D., and Brábek, J. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. *Scientific Reports*, 2018, 8(1), 12020.
78. McGregor, A. L., Hsia, C.-R. and Lammerding, J., Squish and squeeze - the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016, 40, 32-40.