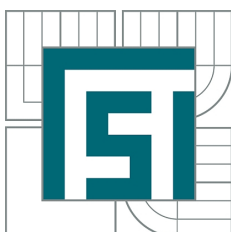


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



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

# MĚŘENÍ ROZLOŽENÍ EKVIVALENTU SUCHÉ HMOTY BUŇKY KVANTITATIVNÍM FÁZOVÝM KONTRASTEM KOHERENCÍ ŘÍZENÉHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU

MEASUREMENT OF THE DISTRIBUTION OF AN EQUIVALENT OF CELL DRY MASS USING  
QUANTITATIVE PHASE CONTRAST OF THE CCHM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

KLÁRA KOVÁŘOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. ANETA KRÍŽOVÁ



Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2012/2013

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

student(ka): Klára Kovářová

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901R043)**

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

### **Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu**

v anglickém jazyce:

### **Measurement of the distribution of an equivalent of cell dry mass using quantitative phase contrast of the CCHM**

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Digitální holografický mikroskop v transmisním módu měří kvantitativním fázovým kontrastem fázové zpoždění, které způsobí průchod transparentním biologickým objektem. Použijte tyto vlastnosti zobrazení CCHM k měření rozložení ekvivalentu suché hmoty v buňce.

Cíle bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši způsobů přepočtu fázového posuvu v buňce na ekvivalent suché hmoty na pixel. Kriticky vybrat a zdůvodnit optimální postup.
2. Upravit vybraný postup pro parametry získávané v CCHM v naší laboratoři.
3. Navrhnout a provést experiment ověřující význam měření ekvivalentu suché hmoty buňky.

Seznam odborné literatury:

- [1] Dunn, G. Transmitted-light Interference Microscopy: A Technique Born Before its Time, Proceedings of the Royal Microscopical Society, 1998, 33, 189-195.
- [2] Dunn, G.; Zicha, D. & others Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1993, 47, 91.
- [3] Barer R.: Interference microscopy and mass determination. Nature 169, 366-367 (1952).
- [4] Rappaz, B.; Marquet, P.; Cuche, E.; Emery, Y.; Depeursinge, C. & Magistretti, P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy, Optics express, Optical Society of America, 2005, 13, 9361-9373.
- [5] Popescu, G.; Park, Y.; Lue, N.; Best-Popescu, C.; Deflores, L.; Dasari, R.; Feld, M. & Badizadegan, K. Optical imaging of cell mass and growth dynamics, American Journal of Physiology-Cell Physiology, Am Physiological Soc, 2008, 295, C538-C544.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Aneta Křížová

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2012/2013.

V Brně, dne 6.12.2012

L.S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.  
Ředitel ústavu

---

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

## **Abstrakt**

Předmětem bakalářské práce je vypracování rešerše k přepočtům fáze na hodnoty suché hmoty buňky a provedení experimentů, které ověřují význam suché hmoty buňky. Teoretická část pojednává nejdříve o historii holografické mikroskopie a vývoji holografie na ÚFI FSI VUT v Brně. Dále se zabývá transmisním holografickým mikroskopem. Je zde uveden stručně jeho konstrukční popis a základní instrukce pro práci s tímto mikroskopem. Poté je v teoretické části pojednáno o významu obrazové fáze. Jsou zde uvedeny dva přístupy k interpretaci fázového zpoždění a také je zde vypracována rešerše k přepočtům fáze na suchou hmotu buňky (podle H. G. Daviese a M. H. F. Wilkinse, G. Popescua, G. Dunna a D. Zichy). V experimentální části je nejdříve popsána kultivace buněk, poté příprava vzorku pro pozorování a následně zpracování dat. Druhá polovina experimentální části je zaměřena přímo na provedené experimenty. Ve všech experimentech byly pozorovány buňky K2 (plné označení LW13K2). Nejdříve byla pozorována nutriční deprivace buněk a poté buněčný růst.

## **Summary**

Subject of this bachelor's thesis is to create an overview of conversions of phase profile to the values of dry mass and to realize experiments verifying the importance of dry mass. In the theoretical part, the history of the holographic microscopy and the development of the holographic microscopy on IPE FME BUT in Brno are summarized. The transmission holographic microscope is also described. This thesis covers its construction description and basic working instructions. The theoretical part also deals with the importance of image phase. Two approaches are presented for the interpretation of the phase delay and there is research on phase conversions to dry cell mass (according to H. G. Davies and M. H. F. Wilkins, G. Popescue, G. Dunn and D. Zicha). In the experimental part cultivation of cells, preparation of observation sample and processing of data are described. This part of thesis is also focused on laboratory experiments. Cells K2 (full name LW13K2) were observed in all experiments. First experiments deal with nutritional deprivation of cells and later with cell growth.

## **Klíčová slova**

Holografická mikroskopie, fázové zobrazení, ekvivalent suché hmoty, buněčný růst, nutriční deprivace buněk.

## **Keywords**

Holographic microscopy, phase imaging, equivalent of dry mass, cell growth, nutritional deprivation of cells.

KOVÁŘOVÁ, K. *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. 28 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu* vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Anety Křížové. Dále prohlašuji, že veškerá odborná literatura a další informační zdroje, které jsou citovány v práci, jsou uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Brně, dne 24.5.2013

Klára Kovářová





## **Poděkování**

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Anetě Křížové za odborné vedení, za cenné rady při práci v laboratoři a za čas věnovaný konzultacím. Dále děkuji Mgr. Veronice Jůzové za přípravu vzorků k pozorování. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině, příteli a všem, kteří si to zaslouží.

Klára Kovářová



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Holografická mikroskopie</b>	<b>4</b>
2.1	Historie . . . . .	4
2.2	Vývoj holografie na ÚFI FSI VUT . . . . .	4
<b>3</b>	<b>Mikroskop CCHM</b>	<b>6</b>
3.1	Konstrukční popis mikroskopu CCHM . . . . .	6
3.2	Práce s mikroskopem . . . . .	6
3.3	Zpracování hologramu . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Význam obrazové fáze</b>	<b>9</b>
4.1	Homogenní typ buněk . . . . .	9
4.2	Heterogenní typ buněk . . . . .	9
4.2.1	Přepočty fáze na suchou hmotu . . . . .	10
4.2.2	Aplikace vzorců . . . . .	11
4.2.3	Shrnutí . . . . .	12
<b>5</b>	<b>Experiment s buňkami K2</b>	<b>13</b>
5.1	Příprava experimentu . . . . .	13
5.1.1	Kultivace buněk . . . . .	13
5.1.2	Příprava vzorku pro pozorování . . . . .	14
5.2	Zpracování naměřených dat . . . . .	15
5.2.1	ImageJ . . . . .	15
5.2.2	Analýza dat . . . . .	15
5.2.3	Vyhodnocení . . . . .	17
5.3	Nutriční deprivace . . . . .	17
5.3.1	První měření . . . . .	17
5.3.2	Druhé měření . . . . .	19
5.3.3	Shrnutí . . . . .	21
5.4	Růst buněk . . . . .	21
5.4.1	Třetí měření . . . . .	22
5.4.2	Čtvrté měření . . . . .	23
5.4.3	Shrnutí . . . . .	25
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>26</b>



# 1. Úvod

Pěstování a pozorování buněčných kultur i samotných buněk je nedílnou součástí výzkumu, diagnostiky i léčby. Uplatňuje se v genovém inženýrství, v biotechnologiích, ve farmaceutickém průmyslu, při přípravě očkovacích protilátek apod. Ačkoli se nejedná o novinku, je toto odvětví stále rozvíjející se a přínosné.

Snaha o pozorování malých objektů a jejich struktur, které nejsou pouhým okem viditelné, vedla k vývoji optických mikroskopů. Zobrazování ve všech typech mikroskopů vzniká interferencí přímého světla (nerozptýleného vzorkem) a světla rozptýleného vzorkem. Protože některé objekty jsou mikroskopem dobře viditelné a další nikoliv, jsou objekty rozděleny podle interakce světelné vlny a objektu na dvě skupiny: amplitudové a fázové. Objekty amplitudové mění amplitudu procházejícího světla, objekty fázové mění fázi světla.

V biologii se lze často setkat s transparentními vzorky (buňkami), které málo rozptylují a odrážejí světlo, a proto se řadí mezi objekty fázové. Aby bylo možné pozorovat živé buňky, včetně jejich pohybů a reakcí na vnější prostředí, je nezbytné je uchovávat ve fyziologických tekutinách (fyziologický roztok, kultivační média). K samotným pozorováním se používají speciální kultivační komůrky v různém provedení a modifikacích (například komůrky stacionární a průtokové). Při zkoumání v běžném optickém mikroskopu, který nedokáže zaznamenat přímo změnu fáze, je jejich obraz málo kontrastní v porovnání s pozadím světlého pole. Pro zvýšení kontrastu se používá barvení nebo speciálních mikroskopických zobrazovacích metod, jakými jsou například metoda klasického fázového kontrastu či interferenční mikroskopie. Ve fluorescenční mikroskopii, v interferenční mikroskopii a v klasickém fázovém kontrastu se využívá toho, že médium, buňky a jejich jednotlivé části se liší indexem lomu, který společně s tloušťkou vzorku ovlivňuje fázi procházejícího světla.

## Interferenční mikroskopie

Interferenční mikroskopie je zobrazovací metoda, která využívá interference světelných svazků procházejících předmětovou a referenční větví. Díky záznamu interference a vyhodnocení interferenčního obrazce lze stanovit zpoždění předmětového světelného svazku (rozdíl fází interferujících vln) způsobené průchodem přes objekt.

Interferenční mikroskopy lze rozdělit do dvou skupin podle úhlu, který svírá předmětový a referenční svazek ve výstupní rovině. V případě, kde je tento úhel nulový (resp. téměř nulový) a paprsky se scházejí v ose (in-line), jedná se o interferometrické mikroskopy. K získání úplné informace o předmětové vlně, tj. o její amplitudě a fázi, je nutné zaznamenat více snímků lišících se definovaným fázovým posuvem. Jestliže je tento úhel nenulový, pak se jedná o mimoosovou interferenci (off-axis) a mikroskopy se nazývají holografické. Z jediného snímku (hologramu) je možné získat kompletní informaci o předmětové vlně [1].

Dále lze interferenční mikroskopy rozdělit na mikroskopy reflexní a transmisní. V případě reflexních mikroskopů se světelný svazek od vzorku odráží. Tento typ mikroskopů se používá ke zkoumání povrchů (topografie). V případě transmisních mikroskopů světelný svazek vzorkem prochází a je vhodný k biologickým aplikacím [2].

Výhodou interferenční mikroskopie je, že pozorování probíhá bez barvení, tzn. bez toxických efektů pro živou buňku, což umožňuje v reálném čase pozorovat změny v buňce. Velikost změny fáze závisí na tloušťce buňky a rozdílu indexu lomu buňky a média. Zároveň je velikost změny fáze přímo úměrná množství suché hmoty a je tedy možné buňky opticky vážit nebo vyhodnocovat změny hustoty vnitrobuněčné hmoty [3]. Tyto změny jsou v relaci s ději, kterými buňka během buněčného cyklu prochází. Příkladem takového děje je buněčný růst nebo dělení.

K experimentům této práce byl použit transmisní holografický mikroskop, a proto je v následujících kapitolách psáno pouze o této skupině interferenčních mikroskopů.

## Další použité metody

Další metody byly v rámci bakalářské práce použity pro vizuální kontrolu buněk před zahájením snímání. Jednalo se o klasický fázový kontrast a diferenciální interferenční kontrast.

### Klasický fázový kontrast

Klasický fázový (Zernikův) kontrast využívá interference světelné vlny, která prochází objektem beze změny (nultý difrakční řád) a vlny, která je objektem difraktována (ostatní difrakční řády). Světelný svazek nejdříve prochází kondenzorovým mezikružím, a tím vzniká dutý světelný kužel. Po průchodu kondenzorem světelný svazek prochází vzorkem, kde jedna část prochází bez difrakce a druhá je objektem difraktována. Obě vlny dále procházejí objektivem a fázovou destičkou (ve tvaru mezikruží) umístěnou v zadní ohniskové rovině objektivu. Fázová destička posouvá fázi světelné vlny rozptýlené objektem vůči nerozptýlené světelné vlně. Následně jsou oba svazky fokusovány do obrazové roviny, kde dochází k interferenci. Rozdíly fáze se projeví kontrastní změnou intenzity (amplitudy).

Nevýhodou klasického fázového kontrastu je existence halo efektů. V důsledku lomu světla na stěnách objektu vzniká jasné záření, které znemožňuje určit přesnou hranici mezi objektem a okolím. A právě detekce okrajů buňky je důležitá pro studium buněk [4].

### Diferenciální interferenční kontrast

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC) převádí rozdíly v optické dráze na rozdíly intenzity pomocí dvou modifikovaných Wollastonových hranolů. První Wollastonův hranol slouží jako dělič polarizovaného světelného svazku. Rozdělené svazky s vzájemně kolmými rovinami polarizace dále procházejí optickou soustavou blízko sebe, ale v jemně odlišných směrech. Po průchodu vzorkem a optickou soustavou jsou světelné svazky skládány dohromady druhým Wollastonovým hranolem. Po průchodu světelných svazků analyzátozem (zajišťuje stejnou polarizaci světelných svazků) dochází k interferenci. Vzorek je pozorován s viditelnými rozdíly v intenzitě.

Výhodou metody DIC je dobré rozlišení a nepřítomnost halo efektů. Nevýhodou je vznik silně zářících parazitních obrazů, které vznikají při zobrazování dvojlomných vzorků. Přesto není v biologických experimentech tato metoda příliš využívána, jelikož většina kultivačních materiálů je vyrobena z dvojlomných látek (např. Petriho miska), které při pozorování touto metodou silně září [5].

## Cíle a rozdělení práce

Prvním cílem této práce je vypracovat rešerši způsobů přepočtu fázového posuvu v buňce na ekvivalent suché hmoty a kriticky vybrat jeden ze způsobů přepočtu, který bude dále ve výpočtech této práce používán. Dalším cílem je provedení odpovídajících experimentů za použití digitálního holografického mikroskopu v transmisním módu. Tento mikroskop měří fázové zpoždění způsobené průchodem světelného svazku transparentním objektem, a proto se hodí k měření rozložení ekvivalentu suché hmoty v buňce.

Samotná bakalářská práce, nesoucí název *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*, je rozdělena do tří částí. V první části je pojednáno o holografické mikroskopii od její stručné historie až po konstrukční popis konkrétního holografického mikroskopu na ÚFI FSI VUT v Brně a zpracování hologramu. Druhá část je zaměřena na význam obrazové fáze a přepočty fázového posuvu na hodnoty ekvivalentu suché hmoty. Poslední, třetí část se věnuje samotným experimentům (nutriční deprivace buněk, růst buněk), které ověřují význam ekvivalentu suché hmoty jako důležitého parametru udávající informaci o buněčném růstu.

## 2. Holografická mikroskopie

### 2.1. Historie

Holografie (z řeckého *holos* – úplný a *grafie* – záznam) vychází z principu holografického zobrazení objeveného v roce 1948 D. Gáborem, který za položení těchto teoretických základů získal v roce 1971 Nobelovu cenu. Přestože holografická (resp. interferenční) mikroskopie jako jediná umožňovala zobrazit i změřit rozdíly optické dráhy, nebyla doceněna. Další vývoj nastal po roce 1952, kdy H. G. Davies a M. H. F. Wilkins publikovali, že rozdíly optické dráhy jsou přímo úměrné množství suché hmoty objektu [3]. Následná etapa přišla s objevením laseru v roce 1960, kdy T. H. Maiman poprvé předvedl laser jako koherentní zdroj monochromatického záření. Pro holografickou mikroskopii je laser ideálním světelným zdrojem, díky své dlouhé koherenční délce. První trojrozměrný záznam, jehož motivem byl vlak, se podařilo vytvořit vědcům na michiganské univerzitě pod vedením E. Leitha a J. Upatniekse v roce 1964 [6].

I přes tyto pokroky nebyla holografická (resp. interferenční) mikroskopie prakticky využívaná kvůli složitému uspořádání, vysoké pořizovací ceně a také proto, že nebyla možnost ukládání a zpracování velkého množství dat. Pro běžné pozorování buněk bylo používáno jiných mikroskopických metod (klasický fázový kontrast, diferenciální interferenční mikroskopie atd.). Až rozvoj výpočetní techniky a digitálního záznamu oživil zájem o holografickou mikroskopii. Dnešní digitální holografické mikroskopy (DHM) obsahují kromě optické soustavy i digitální detekční zařízení a jsou propojeny s počítačem, který umožňuje okamžitý záznam a zpracování hologramu.

V dnešní době jsou holografické mikroskopy používány ve výzkumných centrech pro různé biologické aplikace, avšak v běžné medicínské praxi se zatím příliš nevyužívají [5].

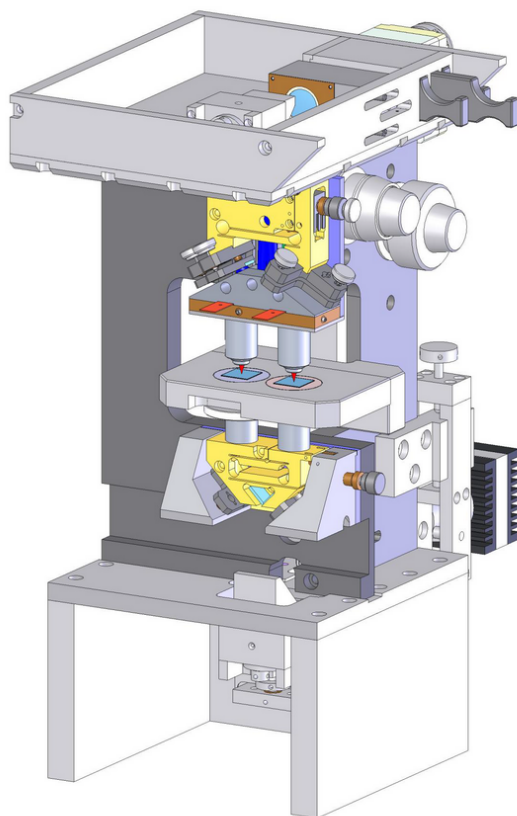
### 2.2. Vývoj holografie na ÚFI FSI VUT

V Laboratoři optické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně byl první holografický mikroskop zkonstruován R. Chmelíkem a Z. Harnou [7]. V roce 1999 v rámci svých diplomových prací začaly vyvíjet transmisní holografický mikroskop I. Chytková [8] a M. Prokopová [9]. Později v rámci doktorského studia M. Prokopové byl vytvořen první prototyp [10], na který navázal svoji práci P. Kolman. V rámci své dizertační práce P. Kolman [1] navrhl a zkonstruoval transmisní holografický mikroskop s mimoosovým achromatickým a prostorově invariantním interferometrem (dále jen CCHM, z anglického *Coherence-Controlled Holographic Microscope*). Celkové schéma CCHM je na obrázku 2.1 a fotografie holografického mikroskopu používaného v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v Brně je na obrázku 2.2.

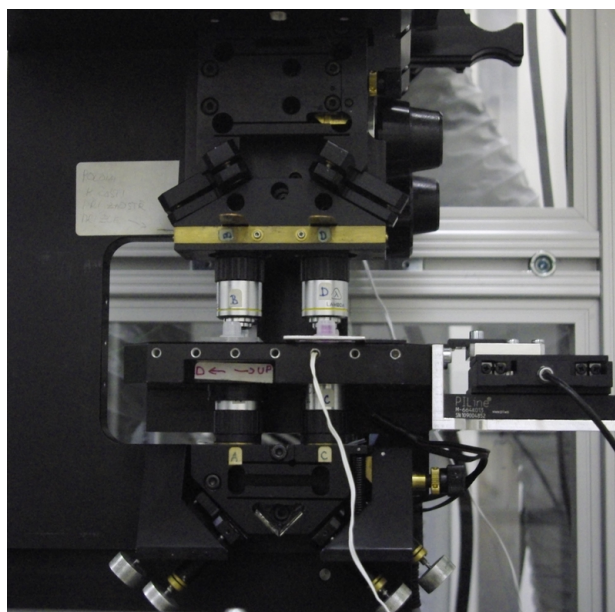
Tento mikroskop je neustále vyvíjen (konstrukčně i softwarově) a je v současnosti používán k pozorování biologických vzorků, především životních cyklů buněk a buněčné dynamiky. Pro biologické aplikace je mikroskop vybaven termoizolačním boxem, který je vyhříván buď proudícím vzduchem nebo dvěma topnými systémy, jež ohřívají podstavec pod mikroskopem a posuvný stolek. Ohřívání termoizolačního boxu zajišťuje stabilní teplotu během pozorování. Tento mikroskop byl použit i k experimentům této práce.



## 2. HOLOGRAFICKÁ MIKROSKOPIE



Obrázek 2.1: Celkové schéma holografického mikroskopu vytvořené P. Kolmanem [1].



Obrázek 2.2: Fotografie holografického mikroskopu v laboratoři Experimentální biofotony na ÚFI FSI VUT v Brně.

# 3. Mikroskop CCHM

## 3.1. Konstrukční popis mikroskopu CCHM

V dizertační práci P. Kolmana je konstrukční popis CCHM proveden do detailů, a proto v této práci je optické uspořádání pouze nastíněno. Základní schéma optického uspořádání je uvedeno na obrázku 3.1. V základním rozdělení se mikroskop CCHM skládá ze stejných částí jako klasický optický mikroskop, a to z osvětlovací a zobrazovací soustavy a detektoru. Zásadní rozdíl CCHM od běžného optického mikroskopu je existence dvou větví, které jsou opticky ekvivalentní a zrcadlově symetrické. Každá z těchto větví obsahuje dva shodné objektivy.

Osvětlovací soustava se skládá ze zdroje světla, matnice (M), clonky (C), interferenčního filtru (IF) a objektivu (O). Zdrojem bílého světla je halogenová lampa. Výběrem clony se určuje prostorová koherence světla. Při použití clony s menším průměrem se dosáhne vyšší prostorové koherence, a tím i lepší interference, ovšem sníží se tím intenzita osvětlení.

Za clonou je umístěn výměník filtrů, ze kterého je možné vybrat jeden z interferenčních filtrů. Obvykle je používán filtr s maximální propustností na vlnové délce 650 nm a s pološířkou maxima propustnosti 10 nm. Červené světlo je vhodné pro zkoumání biologických objektů, protože má nižší energii než bílé světlo, a protože je biologickými objekty málo rozptylováno.

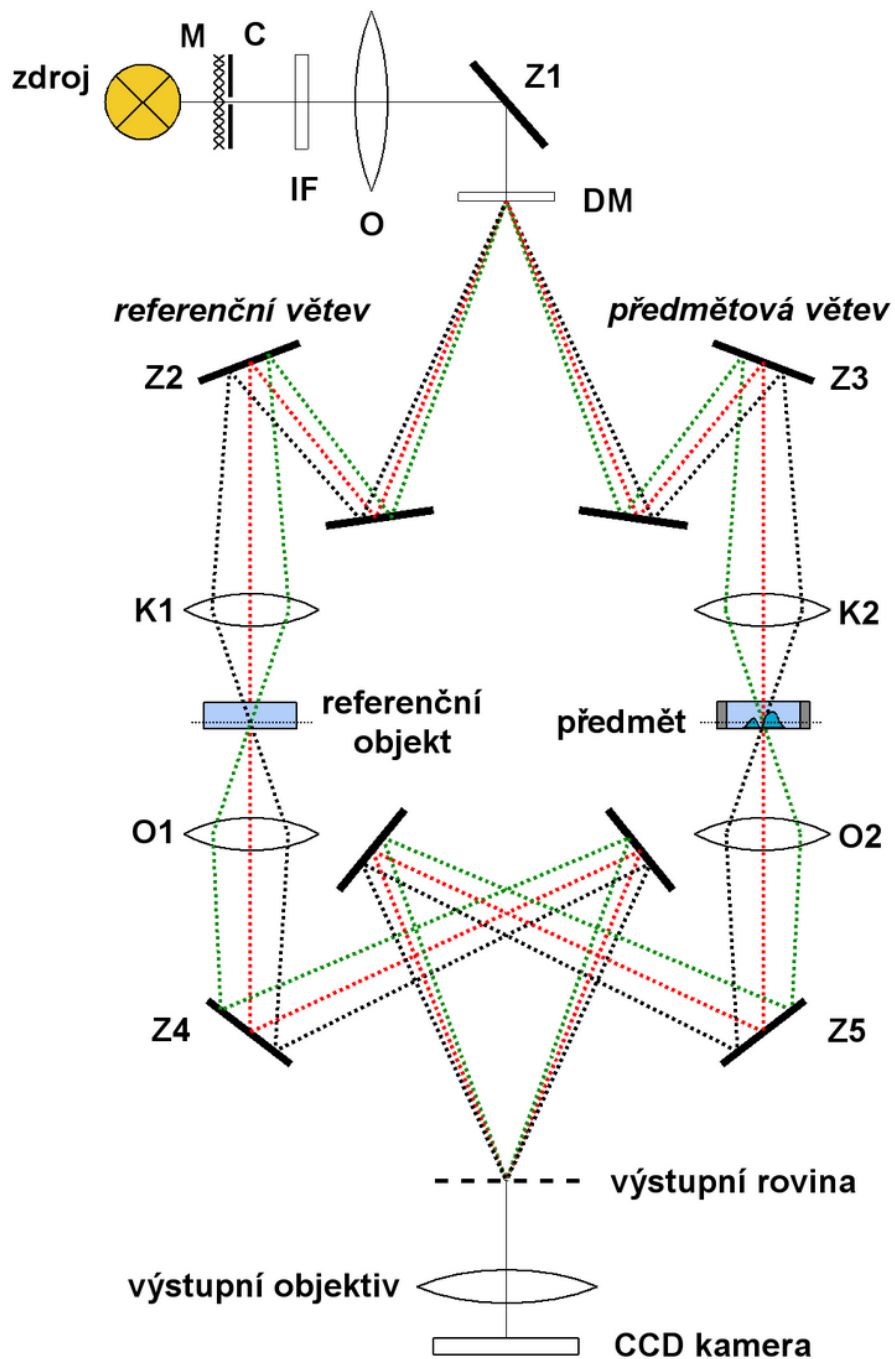
Objektiv (O) zobrazuje světlo přes zrcátko (Z1) na difrakční mřížku (DM), která je použita jako dělič světelného svazku a je vyrobená litograficky se 150 vrypy na milimetr. Na ní svazek difraktuje a zrcátka (Z2 a Z3) je vybrán 1. a  $-1.$  difrakční řád, které tvoří svazky předmětové a referenční větve. Objektiv zobrazuje zdroj přes zrcátka do zadní roviny kondenzorů a tím zajišťuje rovnoměrné osvětlení předmětu. Jedná se o tzv. Köhlerovo osvětlení.

Svazek předmětové větve prochází kondenzorem (K2) a předmětem do objektivu (O2), který předmět zobrazuje do výstupní roviny. Referenční větev má stejnou konstrukci až na to, že mezi kondenzorem (K1) a objektivem (O1) je pouze referenční objekt. Referenční objekt a předmět by se měly v ideálním případě lišit pouze o přítomnost zobrazeného předmětu. Svazky z obou větví jsou zrcátka (Z4, Z5) směřovány do výstupní roviny, kde interferují. Takto vzniklý hologram je zobrazen pomocí výstupního objektivu umístěného za výstupní rovinou na čip CCD kamery. Funkcí objektivu je zvětšit obraz tak, aby byly interferenční proužky rozlišitelné kamerou.

## 3.2. Práce s mikroskopem

Před samotným měřením je nezbytné nastavit mikroskop pro pozorování – nastavit interferenci předmětové a referenční vlny. Pro usnadnění lze nejdříve zaostřit na difrakční mřížku bez vzorku, poté zaostřit obě větve. Jednotlivé větve se zaostřují zvlášť, nejdříve je předmětová větev zavřena a větev referenční se zaostřuje a naopak. Zaostřuje se buď na okraj mřížky, nebo na různé nečistoty, které se na mřížce obvykle vyskytují a které usnadňují posouzení ostrosti. Poté jsou obrazy skládány na sebe a po přizpůsobení optické délky předmětové větve je dosaženo interference. Komůrky, které obsahují stejné médium, jsou následně vloženy do větví mikroskopu. Komůrka, která se vkládá do před-

mětové větve, obsahuje navíc kromě média i samotné vzorky (buňky). Proces zaostřování je s komůrkami zopakován. V programu CCHM2, vytvořeném L. Kvasnicou, se nastaví parametry (interval snímání, průměrování etc.), a poté je možné zahájit samotné snímání. Program CCHM2 ukládá data, která následně zpracovává a zobrazuje. Dokáže v reálném čase zobrazit obrazy amplitudy, intenzity, navázané fáze a také hologramy, které samotné stačí na rekonstrukci a analýzu obrazu.



Obrázek 3.1: Optické uspořádání koherenci řízeného holografického mikroskopu: M – matnice, C – clony, IF – interferenční filtr, O, O1 a O2 – objektivy, Z1-Z5 – zrcátka, DM – difrakční mřížka, K1 a K2 – kondenzory. Převzato z [11].

### 3.3. Zpracování hologramu

Zpracování hologramů probíhá v programu CCHM2. Aby nebyl při snímání počítač zatížen, bylo možné nastavit hodnoty prahování, a aby bylo celkové zpracování pod lepší vizuální kontrolou, zpracování probíhalo v offline módu. K rekonstrukci obrazu je používáno fourierovských metod, díky kterým je z hologramu vypočten obraz amplitudy, intenzity a nenavázané fáze. Více o rekonstrukčním algoritmu a podmínkách je napsáno v [1], [2]. V případě, že se zkoumají průhledné vzorky, klíčovou veličinou pro vyhodnocení snímků je změna fáze světla, a proto je dále zpracováván obraz nenavázané fáze. Jelikož se jedná o funkci periodickou, objevují se v obraze skoky, které se dají odstranit přičtením nebo odečtením  $2\pi n$ , kde  $n$  je celé číslo. Takto upravený obraz se označuje jako obraz navázané fáze.

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

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

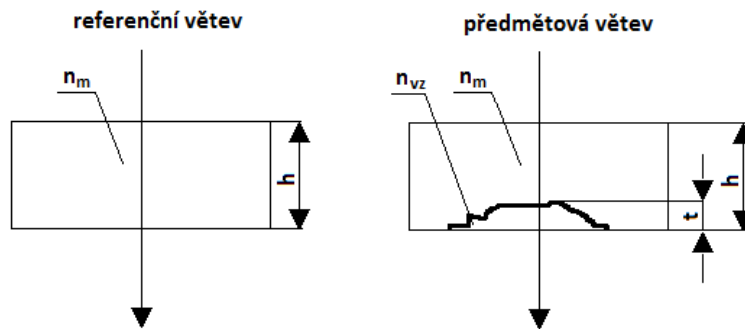
kde  $\Delta\Phi$  je fázový rozdíl světelných svazků,  $\Phi_r$  fáze světelného svazku procházející referenční větví,  $\Phi_p$  fáze světelného svazku procházející předmětovou větví,  $\lambda$  je vlnová délka světla ze zdroje a  $OPD$  je rozdíl optických drah.  $OPD$  je dán indexem lomu a tloušťkou vzorku. V ideálním případě, kdy se jedná o dvě identické komůrky se vzorkem o tloušťce  $t$  (obrázek 3.2), je  $OPD$  dán pouze rozdílem indexů lomu vzorku  $n_{vz}$  a prostředí  $n_m$  a je roven:

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

kde  $OPD$  je rozdíl optických drah,  $n_m$  index lomu média,  $n_{vz}$  index lomu vzorku,  $t$  tloušťka vzorku,  $h$  je výška komůrky a  $\Delta n$  je rozdíl indexů lomu.

Po dosazení výrazu (3.2) do rovnice (3.1):

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



Obrázek 3.2: Znázornění optických drah v referenční a předmětové větvi mikroskopu CCHM;  $n_m$  – index lomu média,  $n_{vz}$  – index lomu vzorku,  $t$  – tloušťka vzorku,  $h$  – výška komůrek.

## 4. Význam obrazové fáze

V následující kapitole jsou uvedeny dva přístupy objevující se v dostupné literatuře k přepočtu fázového posuvu způsobeného buňkou na hodnoty ekvivalentu suché hmoty [12]. Fázovým posuvem se již rozumí posuv fáze navázané. Dále jsou zde uvedeny konkrétní přepočty fáze na suchou hmotu. Suchou hmotou se rozumí bezvodný obsah buňky (proteiny, lipidy, sacharidy).

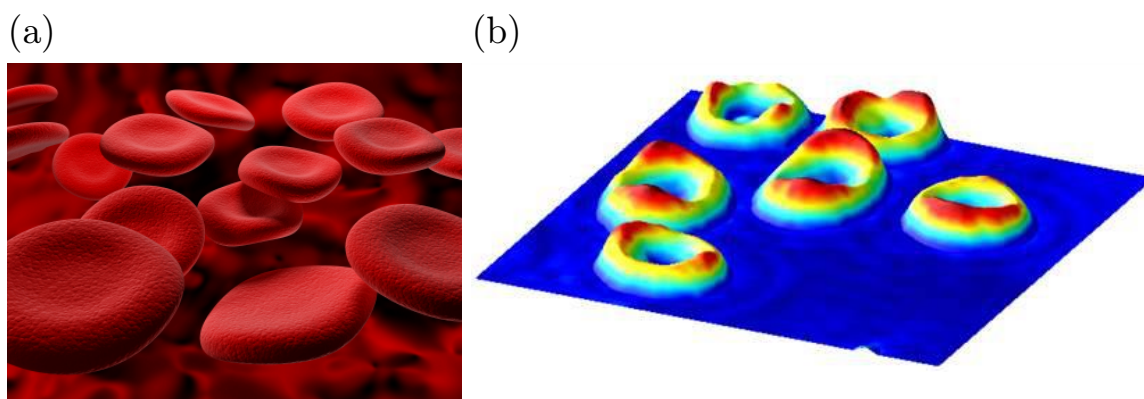
### 4.1. Homogenní typ buněk

První přístup [13],[14],[15] platí především pro homogenní typ buněk, jako jsou například červené krvinky. Buňka je aproximována jedinou hodnotou indexu lomu, protože indexy lomu jednotlivých částí jsou téměř stejné ( $n_b \cong 1,395$ ). Pak fázový obraz odpovídá skutečnému tvaru buňky a hodnota zpoždění fáze  $\Delta\Phi$  je přímo přepočtena na výšku buňky  $t$ :

$$\Delta\Phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda}(n_b - n_m)t(x, y). \quad (4.1)$$

Ve vztahu 4.1 představuje  $\Delta\Phi$  fázový rozdíl,  $\lambda$  vlnovou délku světla zdroje,  $t$  tloušťku buňky,  $n_b$  index lomu buňky a  $n_m$  index lomu média.

Červené krvinky jsou nejběžnější krevní buňky, u savců se vyskytují bez jádra v biconkávním tvaru (obrázky 4.1(a), (b)). Jejich výška se pohybuje okolo 2  $\mu\text{m}$  [16].



Obrázek 4.1: (a) Ilustrační obrázek červené krvinky vytvořený pomocí elektronového mikroskopu. Převzato z [17], (b) Fázový profil červené krvinky vytvořený z měření na holografickém mikroskopu. Převzato z [18].

### 4.2. Heterogenní typ buněk

V druhém přístupu [13],[19],[20], který platí pro heterogenní typ buněk obsahující orgány s různými indexy lomu, je hodnota fáze interpretována jako hustota buňky a její změny. Tvar buněk neodpovídá fázovému obrazu. V tabulce 4.1 jsou uvedeny indexy lomu některých složek buňky.

## 4.2. HETEROGENNÍ TYP BUNĚK

Složka buňky	cytoplazma	jádro	melanin	mitochondrie
Index lomu $n$	1,37	1,39	1,70	1,42

Tabulka 4.1: Tabulka indexů lomu pro některé složky buňky, převzato z [21].

Na mírně nehomogenní typ buněk lze aplikovat první přístup, kdy jsou hodnoty indexů aproximovány jedinou hodnotou a hodnoty fáze jsou přepočteny na přibližnou výšku buňky. Typické hodnoty indexů lomu buněčných složek se pohybují v intervalu 1,37 – 1,41 [21].

Refrakční vlastnosti buňky vykazují vysokou závislost na celkové koncentraci suché hmoty buňky [3]:

$$n(x, y) = n_0 + \alpha C(x, y), \quad (4.2)$$

kde  $n_0$  je index lomu média,  $C$  je koncentrace suché hmoty v buňce a je vyjádřena jako hmotnost na jednotku objemu roztoku (v g/ml), parametr  $\alpha$  je specifický refrakční přírůstek (v ml/g). Různé složky buňky mají odlišné hodnoty refrakčního přírůstku  $\alpha$  (viz tabulka 4.2).

Složka buňky	lipidy	proteiny	DNA	hemoglobin
Refrakční přírůstek $\alpha$ [ml/g]	0,14	0,18	0,18	0,19

Tabulka 4.2: Tabulka specifických refrakčních přírůstků pro některé složky buňky, převzato z [22].

Biologické vzorky (buňky) jsou složené především z proteinů, nukleových kyselin a karbohydrátů. Každá z těchto makromolekul je složena převážně z lehkých atomů jako jsou například uhlík, kyslík a vodík. Elektrony v lehkých atomech interagují se světlem podobným způsobem. Protože specifické refrakční přírůstky charakterizují stupeň interakce se světlem, jsou specifické refrakční přírůstky makromolekul velmi podobné [22]. Jejich typické hodnoty se pohybují v rozmezí 0,18 – 0,21 ml/g. Protože se tyto hodnoty příliš neliší, jejich rozdíly lze zanedbat, a proto je zpoždění fáze přímo úměrné suché hmotě buňky. I další geometrické parametry (obsah buněčné plochy, objem buňky, kulatost, šikmost, špičatost) lze obdržet přímo ze zpoždění fáze, aniž by bylo nutné oddělit index lomu a výšku buňky [12].

### 4.2.1. Přepočty fáze na suchou hmotu

V roce 1952 zjistili H. G. Davies a M. H. F. Wilkins [3], že buněčná interferometrie umožňuje kvantitativně pozorovat růst buněk a další změny v průběhu jednoho buněčného cyklu, aniž by byla živá buňka fixována nebo jinak poškozena. Rozdíl optických drah ( $OPD$ ) způsobený průchodem světelného svazku přes buňku je přímo úměrný ekvivalentu suché hmoty. Hodnoty suché hmoty pak lze vyjádřit ze vztahu:

$$m = \frac{\langle OPD \rangle A}{\chi}, \quad (4.3)$$

kde  $m$  představuje suchou hmotu buňky v pg,  $\langle OPD \rangle$  průměrný rozdíl optických drah v  $\mu\text{m}$ ,  $A$  představuje buněčnou plochu v  $\mu\text{m}^2$  a  $\chi$  specifický refrakční přírůstek v  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$ .  $\chi$  je rovno  $100\alpha$  a hodnoty  $\alpha$  lze vyjádřit ze vztahu (4.2).



Z tohoto vztahu (4.3) vychází všechny další uvedené přepočty, které byly nalezeny v dostupné literatuře a liší se pouze použitou konstantou. Podle G. Popescua [13] lze (po použití výše zmíněného vztahu 4.2) pomocí zpoždění fáze světelného svazku určit plošnou hustotu suché hmoty.

$$\sigma(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\Phi(x, y), \quad (4.4)$$

kde  $\sigma$  představuje plošnou hustotu suché hmoty v  $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ ,  $\lambda$  vlnovou délku zdroje v  $\mu\text{m}$ ,  $\alpha$  specifický refrakční přírůstek v  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$  a  $\Delta\Phi$  fázový rozdíl v radiánech.

Z průměrné hodnoty plošné hustoty suché hmoty lze již snadno určit samotnou hodnotu suché hmoty.

$$m = \langle\sigma\rangle A = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \langle\Delta\Phi\rangle A, \quad (4.5)$$

kde  $m$  představuje suchou hmotu buňky v  $\text{pg}$ ,  $\langle\sigma\rangle$  průměrnou plošnou hustotu suché hmoty v  $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ ,  $A$  plochu buňky v  $\mu\text{m}^2$ ,  $\lambda$  vlnovou délku zdroje v  $\mu\text{m}$ ,  $\alpha$  specifický refrakční přírůstek v  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$  a  $\langle\Delta\Phi\rangle$  průměrný fázový rozdíl v radiánech.

Další přepočet uvádí G. Dunn a D. Zicha [23], podle kterých lze suchou hmotu vyjádřit následovně:

$$m = \langle\Phi\rangle A\beta. \quad (4.6)$$

Ve vzorci (4.6)  $m$  představuje suchou hmotu buňky v  $\text{pg}$ ,  $\langle\Phi\rangle$  průměrný fázový posuv v radiánech,  $A$  buněčnou plochu v  $\mu\text{m}^2$  a  $\beta$  udává množství hustoty suché hmoty (v  $\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ ), které způsobí fázové zpoždění rovné jedné vlnové délce použitého světla. V článku [23] je předpokládána přímá úměra mezi vlnovou délkou a plošnou hustotou a pro vlnovou délku 546 nm je uvedena hodnota  $\beta = 3 \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ . V této práci se však používá zdroj s vlnovou délkou 650 nm, proto je nutné hodnotu hustoty pro tuto vlnovou délku přepočítat.

### 4.2.2. Aplikace vzorců

Pro ověření výše uvedených vztahů (4.3) až (4.6) byly provedeny výpočty suché hmoty buňky pro modelovou situaci s parametry uvedenými v tabulce 4.3.

Vlnová délka zdroje	$\lambda = 650 \text{ nm}$
Průměrný celkový fázový posuv	$\langle\Phi\rangle = 1,95 \text{ rad}$
Průměrný rozdíl optických drah	$\langle OPD \rangle = 0,202 \mu\text{m}$
Plocha buňky	$A = 225 \mu\text{m}^2$

Tabulka 4.3: Tabulka hodnot použitých pro přepočet fáze na suchou hmotu.

#### 1. Přepočet podle H. G. Daviese [3]

$$\chi = 0,18 \mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$$

$$m [\text{pg}] = \frac{\langle OPD \rangle [\mu\text{m}] A [\mu\text{m}^2]}{\chi [\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}]} = \frac{0,202 \cdot 225}{0,18} [\text{pg}] = \underline{\underline{252,5 \text{ pg}}}$$

## 4.2. HETEROGENNÍ TYP BUNĚK

### 2. Přepoččet podle G. Popescua [13]

$$\alpha = 0,2 \mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$$

$$\sigma [\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}] = \frac{\lambda [\mu\text{m}]}{2\pi\alpha [\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}]} \langle \Phi \rangle [\text{rad}] = \frac{650 \cdot 10^{-3}}{2\pi \cdot 0,2} \cdot 1,95 [\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}] = 1,1208 \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$$

$$m [\text{pg}] = \langle \sigma \rangle [\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}] A [\mu\text{m}^2] = 1,1208 \cdot 225 [\text{pg}] = \underline{\underline{252,2 \text{ pg}}}$$

### 3. Přepoččet podle G. Dunna a D. Zichy [23]

$$\lambda = 546 \text{ nm} \quad \dots \quad \beta = 3 \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$$

$$\lambda = 650 \text{ nm} \quad \dots \quad \beta = 3,571 \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$$

$$m [\text{pg}] = \frac{\langle \Phi \rangle [\text{rad}]}{2\pi} A [\mu\text{m}^2] \beta [\text{pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}] = \frac{1,95}{2\pi} \cdot 225 \cdot 3,571 [\text{pg}] = \underline{\underline{249,4 \text{ pg}}}$$

### 4.2.3. Shrnutí

V tabulce 4.4 jsou uvedené výsledky přepočtů fáze na suchou hmotu podle jednotlivých přístupů. Získané výsledky odpovídají biologickým předpokladům.

přepoččet podle H. G. Daviese a M. H. F. Wilkinse	m = 252,5 pg
přepoččet podle G. Popescua	m = 252,2 pg
přepoččet podle G. Dunna a D. Zichy	m = 249,4 pg

Tabulka 4.4: Tabulka výsledných hodnot suché hmoty získaných z modelových výpočtů.

Protože se tyto hodnoty suché hmoty od sebe příliš neliší, a protože v poslední době je nejvíce citován přepoččet podle G. Popescua, i v této práci bude dále používán právě tento přepoččet:

$$M = \langle \sigma \rangle A = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \langle \Delta \Phi \rangle A. \quad (4.7)$$



## 5. Experiment s buňkami K2

V následující kapitole je nejdříve obecně popsána kultivace buněk, následně příprava experimentů, zpracování a vyhodnocení naměřených dat a nakonec jsou představeny výsledky jednotlivých měření, ve kterých bylo cílem pozorovat změny suché hmoty buněk. Celkem byla provedena čtyři měření. V prvních dvou případech byl proveden experiment nutriční deprivace buněk, kdy buňky neměly dostatek živin a v důsledku toho ztrácely na suché hmotě. Ve druhých dvou případech byl proveden opačný experiment – růst buněk, kdy buňky měly dostatek živin, a proto mohly během snímání dále růst. Jako vzorky byly použity nádorové nemetastazující embryonální fibroplasty inbredního potkana Louis Lewis. Tyto buňky jsou označovány jako K2 (plné označení LW13K2) a byly kultivovány v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v Brně. Všechna měření probíhala na holografickém mikroskopu CCHM. Tento mikroskop je neustále softwarově i konstrukčně vyvíjen, mezi prvním a druhým měřením byl například změněn způsob vyhřívání boxu a byly vylepšeny posuvy stolků.

### 5.1. Příprava experimentu

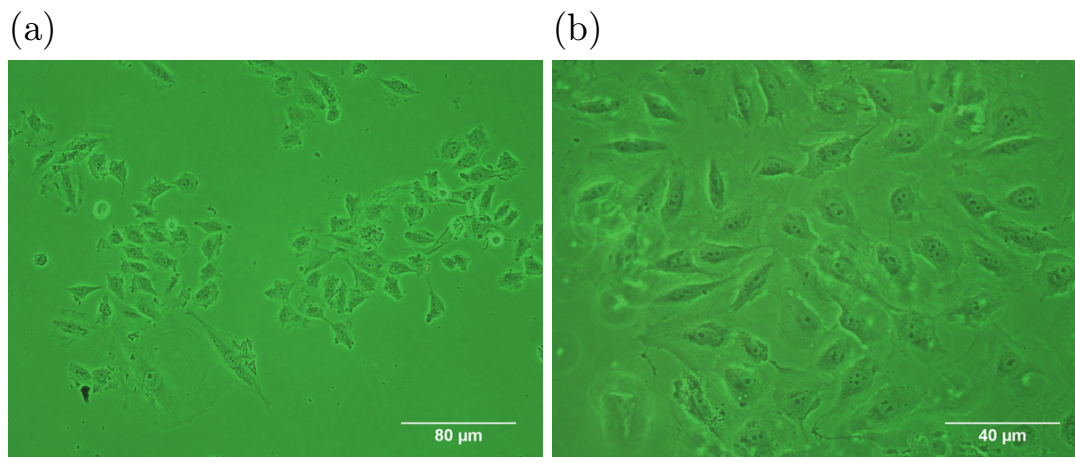
#### 5.1.1. Kultivace buněk

Buněčné linie jsou dlouhodobě uchovávány v zamraženém stavu v kapalném dusíku. Buněčné linie, které jsou aktuálně používané k experimentům, jsou kultivovány v kultivačních lahvičkách v inkubátoru *Sanyo MCO-18AIC* při ideální teplotě pro jejich růst 37°C s 3,5% koncentrací CO<sub>2</sub>. Při kultivaci buněk je nutné pracovat ve sterilním prostředí a udržovat celkovou čistotu. Proto veškerá manipulace probíhá ve flow-boxu *MSC Advantage*, ve kterém je díky proudění vzduchu zabráněno vzniku případné kontaminace.

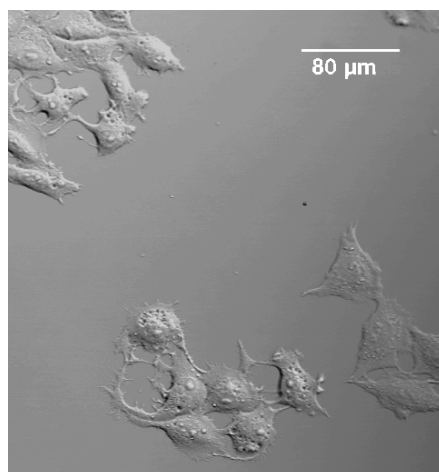
Buňky K2 byly pěstovány v kultivačním médiu uchycené na povrch kultivační lahvičky v inkubátoru. Ke kultivaci buněk bylo použito médium M1H, které bylo obohaceno o fetální telecí sérum (FTS), které slouží jako živiny pro buňky. Celkové složení média M1H k nalezení v [2]. Kultivační médium bylo nezbytné jednou za určitou dobu vyměnit. V momentě, kdy buňky vytvořily konfluentní porost, bylo potřeba je ztrypsinizovat. V tomto procesu dochází k oddělení buněk od povrchu, popis tohoto procesu je detailně popsán v [24]. Po provedení trypsinizace byly buňky přepočítány v Brücknerově komůrce v mikroskopu s fázovým kontrastem. Určitý počet buněk (cca 20 000) byl vložen do kultivační lahvičky, která byla následně doplněna médiem a takto připravená suspenze se mohla dále kultivovat. Ostatní buňky jsou udržovány ve zkumavkách ve stavu suspenze v lednicích při teplotě 5°C (řádově několik dní) a slouží k přípravě vzorků pro experimenty.

Růst buněk byl kontrolován v klasickém fázovém kontrastu (obrázek 5.1) a v diferenciálním interferenčním kontrastu (obrázek 5.2).

## 5.1. PŘÍPRAVA EXPERIMENTU



Obrázek 5.1: Buňky K2 v klasickém fázovém kontrastu při použití objektivu se zvětšením (a) 20× a (b) 40×.



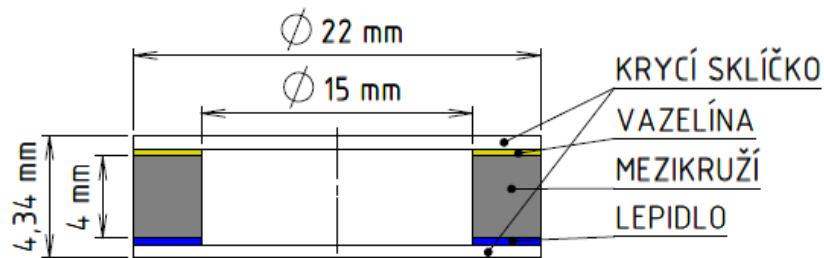
Obrázek 5.2: Buňky K2 v diferenciálním interferenčním kontrastu při použití objektivu se zvětšením 20×.

### 5.1.2. Příprava vzorku pro pozorování

Buňky byly nasazeny do komůrek a vloženy do inkubátoru (koncentrace 12 buněk na  $\text{mm}^2$ ). Po dvou dnech kultivace buněk v inkubátoru bylo v prvních dvou měřeních médium M1H vyměněno za fyziologický roztok HBBS (z anglického výrazu *Hanks Balanced Salt Solution*). Buňky v roztoku HBBS nemají dostatek živin, a proto začnou hladovět. Do předměťové komůrky byly vloženy buňky v roztoku HBBS, v referenční komůrce byl jen roztok HBBS.

Ve třetím a čtvrtém měření bylo médium M1H vyměněno za médium F10, které má téměř stejné složení jako M1H, pouze neobsahuje pH indikátor fenolovou červeň. Médium F10 je více transparentní a obsahuje telecí sérum (FTS), a proto jsou v něm buňky lépe viditelné a mají v něm dostatek živin pro další růst. Do předměťové komůrky byly vloženy buňky s médiem F10, do referenční komůrky bylo vloženo pouze médium F10.

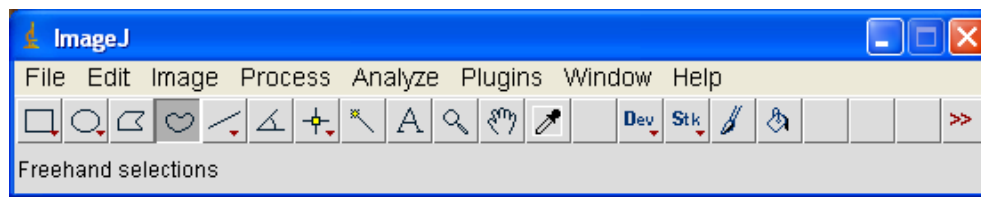
Poté, co byly připraveny příslušné komůrky pro jednotlivé experimenty, byly komůrky vloženy do referenční a předměťové větve mikroskopu CCHM. Schéma komůrky je na obrázku 5.3.



Obrázek 5.3: Stacionární komůrka je složena ze dvou krycích sklíček o tloušťce 0,17 mm a kovového mezikruží. Spodní krycí sklíčko je napevno přilepeno ke kovovému mezikruží, horní krycí sklíčko je po nasazení buněk přichyceno vazelínou.

## 5.2. Zpracování naměřených dat

Z hologramů lze pomocí programu CCHM2 získat nenavázanou fázi, ze které lze poté získat fázi navázanou. Analýza navázané fáze probíhala v programu ImageJ (obrázek 5.4).



Obrázek 5.4: Panel nástrojů programu ImageJ.

### 5.2.1. ImageJ

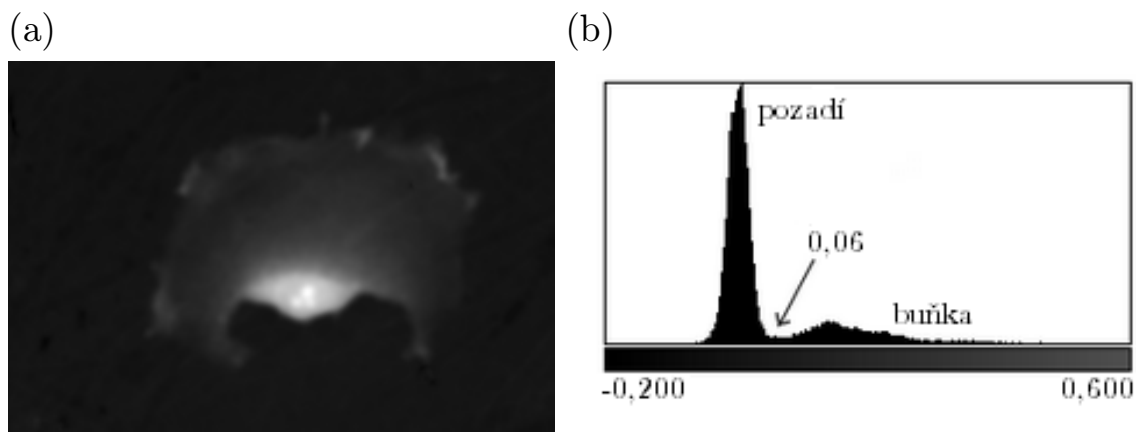
Program ImageJ je volně dostupný program určený pro zpracování a analýzu obrazu. Program dokáže zobrazovat a zpracovávat 8-, 16- a 32-bitové obrazy a také pracovat s mnoha obrazovými formáty – TIFF, JPEG, RAW atd. Podporuje zobrazení sérií obrazů v jednom okně i jejich sériovou analýzu. Program umožňuje počítat plošné statistiky v definovaném výběru. Umožňuje měřit vzdálenosti a úhly, dokáže vytvořit histogramy a čárové profily, podporuje standardní funkce zpracování obrazu jako jsou logické a aritmetické operace mezi obrazy, manipulace s kontrastem, Fourierovy analýzy, ostření, vyhlazování, detekce hran a mediánové filtrování. Program podporuje také zobrazení většího počtu oken současně. Více v [25].

### 5.2.2. Analýza dat

Snímky navázané fáze (obrázek 5.5(a)) byly otevřeny příkazem *Image sequence* (*File* ⇒ *Import* ⇒ *Image sequence*). Poté byl upraven kontrast pro lepší vizuální kontrolu (*Image* ⇒ *Adjust* ⇒ *Brightness/Contrast*). Protože byl používán 32-bitový formát TIFF, který uchovává pouze čísla, operace *Brightness/Contrast* změnila jen zobrazení. Protože se ve všech případech měření jednalo o dlouhodobá časová pozorování, kdy buňka zůstává na stejném místě mřížky, byly také pořízeny snímky pozadí. Pozadím se rozumí snímek, na kterém se nenacházejí buňky. Tyto snímky byly pak v programu ImageJ odečteny

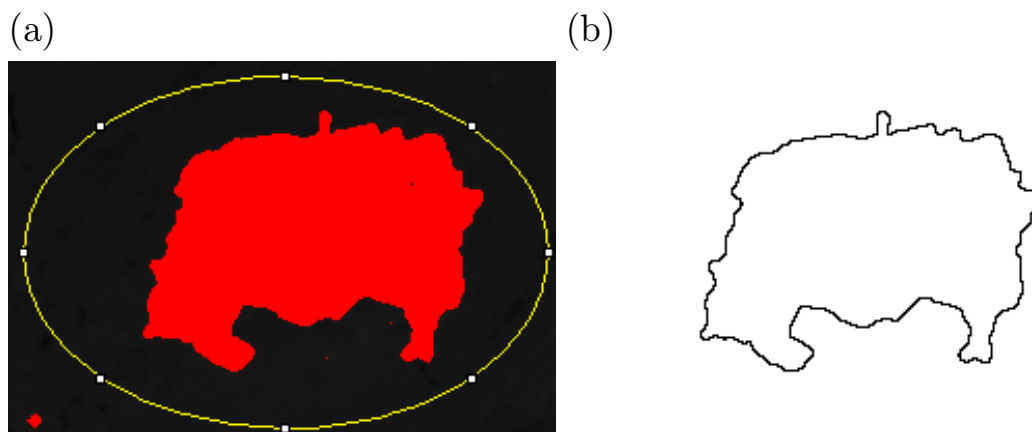
## 5.2. ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

od snímků s buňkami (*Process*  $\Rightarrow$  *Image calculator*). Dále bylo potřeba buňku odprahovat od pozadí (*Image*  $\Rightarrow$  *Adjust*  $\Rightarrow$  *Threshold*). Hodnota prahování byla získána empiricky a zkontrolována pomocí histogramu (*Analyze*  $\Rightarrow$  *Histogram*), který je vidět na obrázku 5.5(b). Na bimodálním histogramu (pro objekt a pozadí) je hodnota prahování vybrána z lokálního minima ležícího mezi dvěma píky histogramu. Výsledkem prahování je obraz, na kterém je červenou barvou označena buňka a černou barvou je označeno pozadí.



Obrázek 5.5: (a) Snímek navázané fáze buňky, (b) histogram použitý při kontrole hodnoty prahování.

V dalším kroku byla buňka označena příkazem *Freehand selections* tak, aby na všech snímcích byla celá buňka uvnitř označené oblasti, ve které bude probíhat analýza. Odprahovaná a označená buňka je zobrazena na obrázku 5.6(a). Poté bylo možné spustit samotnou analýzu (*Analyze*  $\Rightarrow$  *Analyze particles*). Výstupy těchto měření byly nastaveny v *Analyze set measurements*. V našem případě byla jako výstup zvolena pouze suma celkové fáze buňky (*Integrated Density*). Tyto hodnoty lze zobrazit v samostatném okně *Results*. Zároveň lze vykreslit i hranici buňky (obrázek 5.6(b)). Hodnoty celkové fáze byly dále vyhodnocovány.



Obrázek 5.6: (a) Odprahovaná a ohraničená buňka, (b) vykreslená hranice buňky v průběhu analýzy dat v programu ImageJ.

### 5.2.3. Vyhodnocení

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

$$\Delta\Phi = \sum_{ij} \Delta\Phi_{i,j} = \langle \Delta\Phi \rangle p. \quad (5.1)$$

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

$$A = pA_p. \quad (5.2)$$

Po dosažení předchozích vztahů 5.1 a 5.2 byly získané hodnoty celkové fáze na plochu přepočteny na hodnoty ekvivalentu suché hmoty podle již uvedeného vzorce od G. Popescua (4.7).

$$M = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \frac{\Delta\Phi}{p} pA_p = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\Phi A_p, \quad (5.3)$$

kde  $M$  představuje hodnoty ekvivalentu suché hmoty,  $\lambda$  vlnovou délku zdroje,  $\alpha$  specifický refrakční přírůstek,  $\Delta\Phi$  hodnoty celkové fáze a  $A_p$  plochu pixelu.

## 5.3. Nutriční deprivace

V tomto experimentu byla pozorována nutriční deprivace buněk. Jednalo se o dlouhodobé snímání buněk K2 v roztoku HBBS, ve kterém bylo cílem na náhodně vybrané buňce pozorovat úbytek suché hmoty. Buňky se nacházely v roztoku HBBS, který neobsahoval živiny. První měření probíhalo po dobu 18 hodin s intervalem snímání 60 s, druhé měření probíhalo 30 hodin s intervalem snímání 120 s. Druhé snímání bylo zahájeno až 5 hodin poté, co byly buňky s médiem vloženy do komůrky a do příslušné větve mikroskopu, na rozdíl od prvního snímání, které bylo spuštěno ihned. Během snímání nebyl mikroskop po celou dobu ideálně naladěn a zvýšený šum v důsledku rozladění znemožňoval automatickou detekci hranice mezi buňkou a okolím, proto bylo nutné data vizuálně kontrolovat a vzhledem k velkému počtu dat byl pro vyhodnocení použit každý desátý získaný snímek (hologram).

### 5.3.1. První měření

#### Parametry pozorování a nastavení mikroskopu

Před měřením byl mikroskop nastaven stejným způsobem, jak bylo uvedeno v sekci 3.2. Během prvního pozorování byla udržována teplota na hodnotě  $37^\circ\text{C}$  (optimální teplota pro buňky). Pro dosažení a ustálení této teploty byly na holografickém mikroskopu zapnuty dva topné systémy přibližně o dva dny dříve. První systém vyhřívá podstavec pod mikroskopem (žulová deska) a tím vytváří stabilní teplotní gradient uvnitř termoizolačního boxu obklopujícího mikroskop. Aby vzduch dosáhl teploty okolo  $30^\circ\text{C}$ , byla deska zahřívána na  $67^\circ\text{C}$ . Druhý topný systém ohřívá posuvný stolek se vzorkem, a proto zde byla nastavena přímo teplota  $37^\circ\text{C}$ .

### 5.3. NUTRIČNÍ DEPRIVACE

V tomto experimentu byly použity objektivy se zvětšením  $10\times$ , s numerickou aperturou  $NA = 0,25$ , filtr s maximální propustností na vlnové délce  $\lambda = 650$  nm a clona s průměrem 3 mm. Jednalo se o časosběrné snímání s intervalem 60 sekund a průměrováním 3 snímků za sekundu. Důležité parametry nastavení experimentu jsou shrnuty v tabulce 5.1.

Objektivy	10×, numerická apertura $NA = 0,25$
Clona	průměr 3 mm
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650$ nm
	pološířka maxima 10 nm
Průměrování	3 snímky
Interval snímání	60 s
Teplota podstavce	67°C
Teplota stolku	37°C

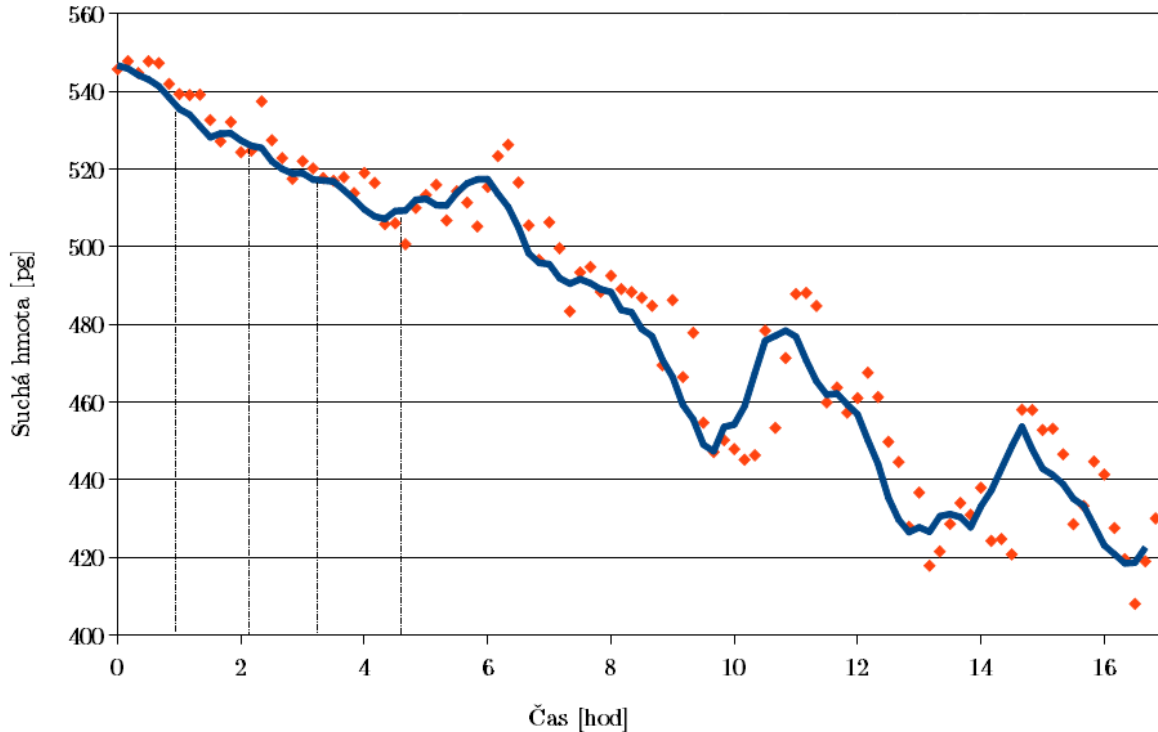
Tabulka 5.1: Tabulka důležitých parametrů při pozorování v prvním měření.

### Výsledky prvního měření

Hodnoty celkové fáze byly přepočteny na hodnoty suché hmoty. V tabulce 5.2 jsou uvedeny výsledky prvního měření ve vybraných časových okamžicích. Data byla vynesena do grafu 5.7. Tento graf zaznamenává úbytek suché hmoty v závislosti na čase. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proloženy klouzavým průměrem. V grafu jsou čerchovanými čarami také zaznamenány okamžiky, ve kterých byl mikroskop kontrolován a případně doladován.

$\tau$ [min]	$\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ [rad· $\mu\text{m}^2$ ]	$M$ [pg]
0	950	546
100	917	527
200	901	518
300	893	513
400	880	505
500	851	489
600	791	455
700	789	454
800	773	447
900	762	438
1000	768	441

Tabulka 5.2: Tabulka hodnot sumy celkové fáze ( $\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ ) a suché hmoty ( $M$ ) pro vybrané časové okamžiky v prvním měření.



Obrázek 5.7: Závislost úbytku suché hmoty na čase v prvním měření. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proloženy křivkou. Tato křivka vznikla klouzavým průměrem na tyto hodnoty. Čerchované čáry označují časy, kdy proběhlo do-  
ladování mikroskopu.

### 5.3.2. Druhé měření

#### Parametry pozorování, nastavení mikroskopu

Mikroskop byl před měřením nastaven klasickým způsobem (sekce 3.2). Optimální teplota pro buňky okolo  $37^{\circ}\text{C}$  byla udržována pomocí termostatem regulované cirkulace teplého vzduchu, který ohřívá celý prostor uvnitř termoizolačního boxu CCHM. Aby se tato teplota ustálila, bylo ohřívání spuštěno 12 hodin před zahájením experimentu. I v tomto experimentu byly použity objektivy se zvětšením  $10\times$ , s numerickou aperturou  $NA = 0,25$ , filtr s maximální propustností na vlnové délce  $\lambda = 650\text{ nm}$  a clona s průměrem  $3\text{ mm}$ . Jako interval snímání byl zvolen čas 120 sekund s průměrováním 3 snímků za sekundu. Tyto parametry jsou shrnuty v tabulce 5.3.

Objektivy	$10\times$ , numerická apertura $NA = 0,25$
Clona	průměr $3\text{ mm}$
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650\text{ nm}$ pološířka maxima $10\text{ nm}$
Průměrování	3 snímky
Interval snímání	120 s
Teplota termostatu	$36,6^{\circ}\text{C}$

Tabulka 5.3: Tabulka důležitých parametrů při pozorování v druhém měření.



### 5.3. NUTRIČNÍ DEPRIVACE

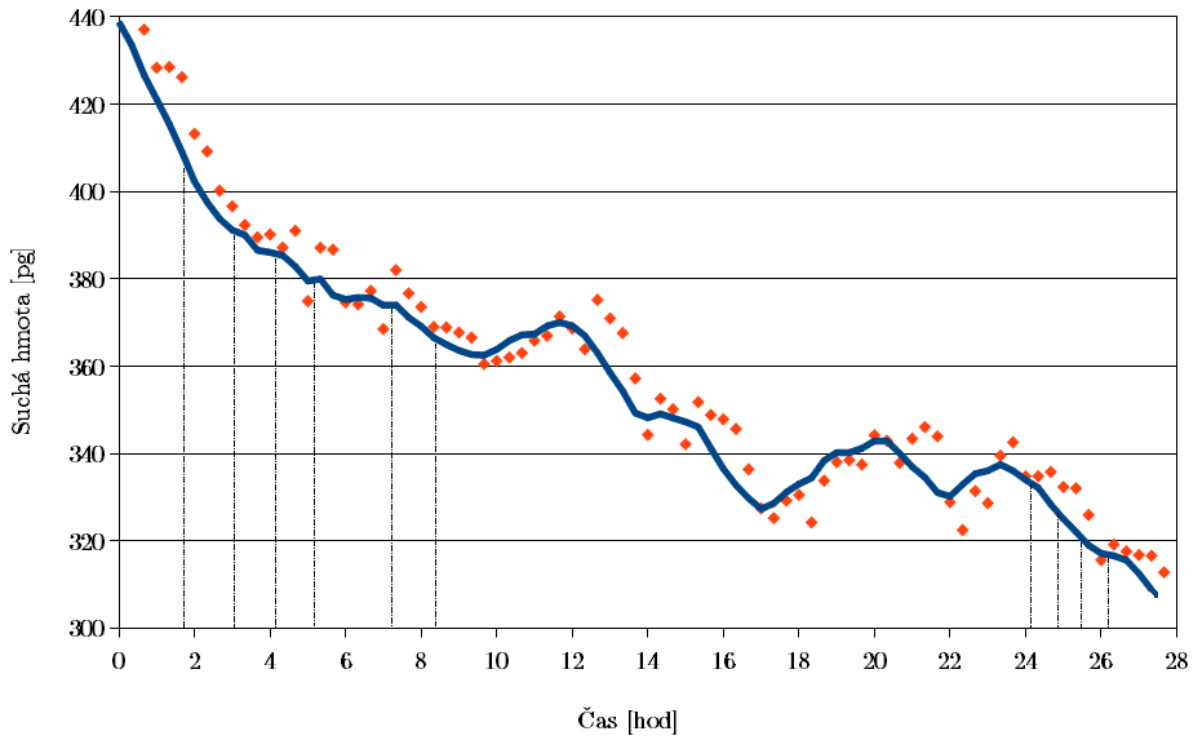
#### Výsledky druhého měření

V tabulce 5.4 jsou uvedeny výsledky druhého měření pro vybrané okamžiky. Je zde zaznamenán přepočet hodnot celkové fáze na plochu na hodnoty suché hmoty. V grafu na obrázku 5.8 je zaznamenán úbytek suché hmoty v závislosti na čase. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty. Tyto body jsou proloženy křivkou, která vznikla klouzavým průměrem hodnot suché hmoty. V grafu jsou čerchovanými čarami zaznamenány okamžiky, ve kterých byl mikroskop kontrolován a doladován.

$\tau$ [min]	$\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ [rad $\cdot\mu\text{m}^2$ ]	$M$ [pg]
0	824	426
100	758	392
200	724	375
300	729	377
400	718	371
500	713	368
600	718	371
700	710	367
800	698	361
900	661	342
1000	650	336
1100	646	334
1200	665	344
1300	664	343
1400	656	339
1500	642	332
1600	614	317
1700	584	302

Tabulka 5.4: Tabulka hodnot sumy celkové fáze ( $\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ ) a suché hmoty ( $M$ ) pro vybrané časové okamžiky v druhém měření.





Obrázek 5.8: Závislost úbytku suché hmoty na čase v druhém měření. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proloženy křivkou. Tato křivka vznikla aplikací klouzavého průměru na tyto hodnoty. Čerchované čáry označují časy, kdy probíhalo doladování mikroskopu.

### 5.3.3. Shrnutí

V obou experimentech byla pozorována náhodně vybraná buňka, na které byl sledován úbytek suché hmoty, když buňce nebyl poskytnut dostatek živin. Z grafů na obrázcích 5.7 a 5.8 je patrný úbytek suché hmoty v závislosti na čase. Větší skoky byly způsobeny rozladěním mikroskopu, v důsledku kterého se zvýšil i šum. Šum znemožnil přesnou detekci hranice mezi buňkou a pozadím, a proto vypočtené hodnoty celkové fáze (resp. suché hmoty) přesně nekopírují teoretickou klesající závislost. V prvním měření mohlo být dalším důvodem rozladění mikroskopu i nefunkčnost nastaveného průměrování. V druhém měření mohlo být rozladění zapříčiněno vypnutím ohřevu systému ke konci snímání (cca 10 min), čímž se snížila teplota – z ideální teploty pro buňky  $37^{\circ}\text{C}$  na  $35^{\circ}\text{C}$ .

## 5.4. Růst buněk

Ve třetím a čtvrtém měření byl sledován růst buněk. Jednalo se o dlouhodobé snímání buněk K2 v médiu F10, ve kterém bylo cílem na náhodně vybrané buňce pozorovat růst buněčné hmoty v závislosti na čase. Třetí měření probíhalo 13 hodin s intervalem snímání 60 s, čtvrté 13 hodin s intervalem snímání 120 s. Ke zpracování byl v obou případech použit každý desátý snímek.

## 5.4. RŮST BUNĚK

### 5.4.1. Třetí měření

#### Parametry pozorování

V tomto experimentu byla udržována ideální teplota pro buňky okolo 37°C pomocí cirkulace teplého vzduchu. Byly použity objektivy se zvětšením 10× a s numerickou aperturou  $NA = 0,25$ , filtr s maximální propustností na vlnové délce  $\lambda = 650$  nm a clona s průměrem 1 mm. Jako interval snímání byl zvolen čas 60 sekund s průměrováním 3 snímků za sekundu. Důležité parametry experimentu jsou shrnuty v tabulce 5.5.

Objektivy	10×, numerická apertura $NA = 0,25$
Clona	průměr 1 mm
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650$ nm pološířka maxima 10 nm
Průměrování	3 snímky
Interval snímání	60 s
Teplota termostatu	36,6°C

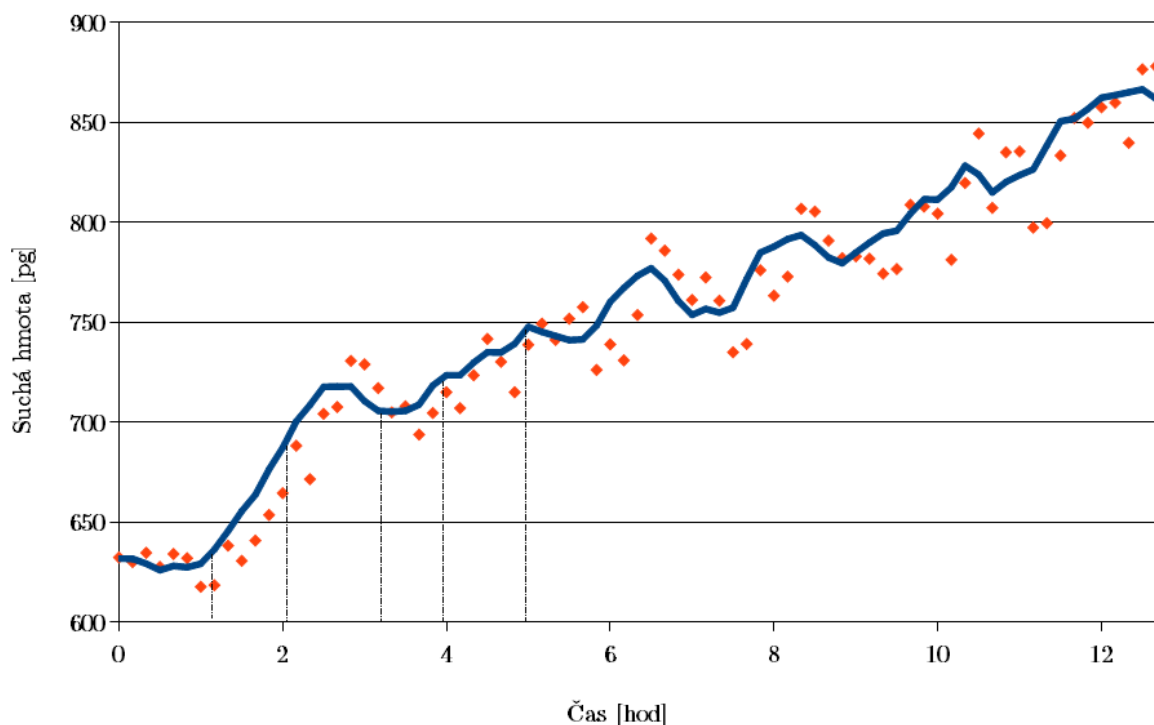
Tabulka 5.5: Tabulka důležitých parametrů při pozorování ve třetím měření.

#### Výsledky

V tabulce 5.6 jsou uvedeny výsledky třetího měření pro vybrané časové okamžiky. Je zde zaznamenán přepočtený počet celkové fáze na hodnoty suché hmoty a v grafu na obrázku 5.9 je zaznamenán růst suché hmoty v závislosti na čase. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proložené klouzavým průměrem. V grafu jsou také čerchovanými čarami zaznamenány okamžiky, ve kterých byl mikroskop kontrolován.

$\tau$ [min]	$\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ [rad· $\mu\text{m}^2$ ]	$M$ [pg]
0	1100	632
100	1115	641
200	1226	705
300	1285	739
400	1367	786
500	1404	807
600	1426	820
700	1483	852
800	1484	853

Tabulka 5.6: Tabulka hodnot sumy celkové fáze ( $\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ ) a suché hmoty ( $M$ ) pro vybrané časové okamžiky ve třetím měření.



Obrázek 5.9: Závislost suché hmoty na čase ve třetím měření. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proloženy křivkou. Tato křivka vznikla aplikací klouzačového průměru na tyto hodnoty. Čerchované čáry označují časy, kdy probíhala kontrola mikroskopu.

### 5.4.2. Čtvrté měření

#### Parametry pozorování

V průběhu tohoto experimentu byla udržována teplota okolo  $37^{\circ}\text{C}$  pomocí 2 topných systémů, které vyhřívaly podstavec pod mikroskopem (žulovou deska) a posuvný stůl s komůrkami. Byly použity objektivy se zvětšením  $10\times$  a numerickou aperturou  $NA = 0,25$ , filtr s maximální propustností na vlnové délce  $\lambda = 650\text{ nm}$  a clona s průměrem  $1\text{ mm}$ . Jako interval snímání byl zvolen čas  $120\text{ s}$  s průměrováním 3 snímků za sekundu. Důležité parametry experimentu jsou shrnuty v tabulce 5.7.

Objektivy	$10\times$ , numerická apertura $NA = 0,25$
Clona	průměr $1\text{ mm}$
Filtr	max. propustnost na $\lambda = 650\text{ nm}$
	pološířka maxima $10\text{ nm}$
Průměrování	3 snímky
Interval snímání	$120\text{ s}$
Teplota podstavce	$67^{\circ}\text{C}$
Teplota stolku	$37^{\circ}\text{C}$

Tabulka 5.7: Tabulka důležitých parametrů při pozorování ve čtvrtém měření.

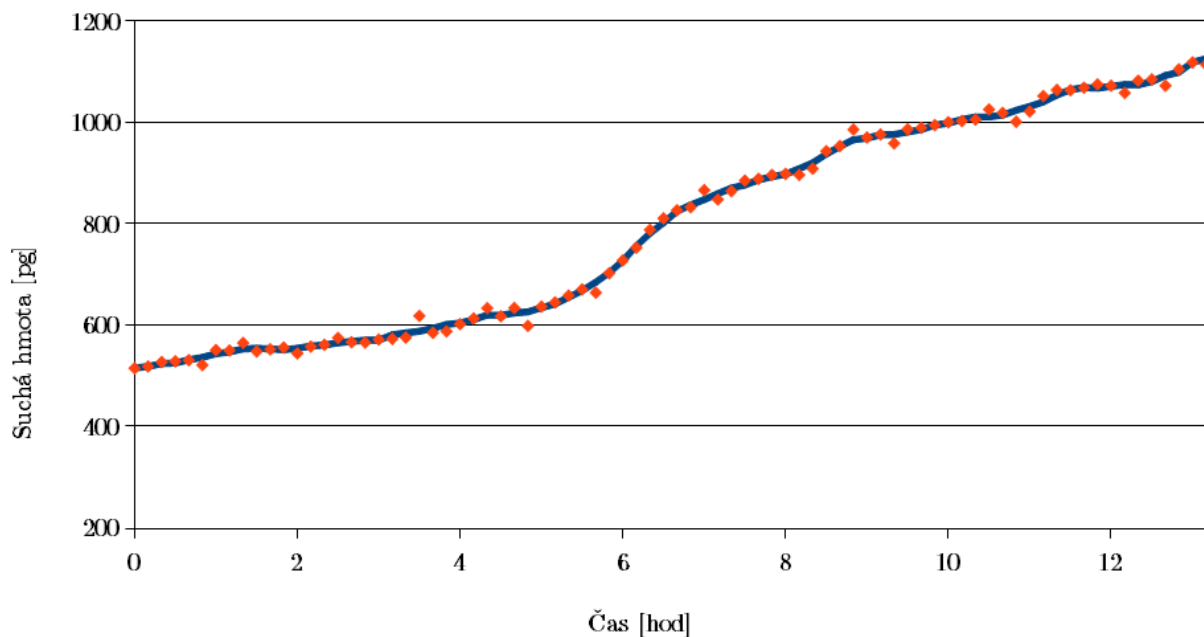
## 5.4. RŮST BUNĚK

### Výsledky

Výsledky čtvrtého měření pro vybrané časové okamžiky jsou uvedeny tabulce 5.8. V této tabulce je zaznamenán přepočet celkové fáze na suchou hmotu a v grafu na obrázku 5.10 je zaznamenán růst suché hmoty v závislosti na čase. Na rozdíl od předchozích snímání nemusel být mikroskop doladován.

$\tau$ [min]	$\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ [rad $\cdot\mu\text{m}^2$ ]	$M$ [pg]
0	894	514
100	959	551
200	999	574
300	1105	635
400	1436	826
500	1580	908
600	1739	999
700	1858	1068
800	1937	1113

Tabulka 5.8: Tabulka hodnot sumy celkové fáze ( $\langle\Phi\rangle \cdot A_c$ ) a suché hmoty ( $M$ ) pro vybrané časové okamžiky ve čtvrtém měření.



Obrázek 5.10: Závislost suché hmoty na čase ve čtvrtém měření. Jednotlivé body představují hodnoty suché hmoty, které jsou proloženy křivkou. Tato křivka vznikla aplikací klouzavého průměru na tyto hodnoty.

### 5.4.3. Shrnutí

V těchto dvou experimentech byla pozorována náhodně vybraná buňka, na které byl pozorován růst suché hmoty v situaci, kdy buňce bylo poskytnuto dostatek živin a buňka mohla dále růst i během snímání. Z grafů na obrázcích 5.9, 5.10 je patrný růst suché hmoty v závislosti na čase. Větší skoky byly způsobeny rozladěním mikroskopu. Ve třetím měření byly dalším důvodem skoků v hodnotách celkové fáze (resp. suché hmoty) i nečistoty, které byly obsaženy v médiu F10. Médium nebylo před snímáním přefiltrováno, proto obsahovalo nečistoty z FTS. Ve čtvrtém měření se nečistotám předešlo přefiltrováním média před snímáním.

## 6. Závěr

V první polovině teoretické části bylo pojednáno nejdříve o historii holografické mikroskopie, poté o vývoji holografie na ÚFI FSI VUT v Brně (kapitola 2) a následně o transmisním holografickém mikroskopu použitém k experimentům této práce, včetně jeho konstrukčního popisu (kapitola 3). V této kapitole bylo také pojednáno o zpracování hologramu (sekce 3.3).

Ve druhé polovině teoretické části byl popsán význam obrazové fáze (kapitola 4). Byly zde uvedeny 2 přístupy k interpretaci fázového posuvu způsobeného buňkou (sekce 4.1 a 4.2). První platí pro homogenní typ buněk (stejný index lomu pro všechny části buňky) a hodnotu zpoždění fáze lze přímo přepočítat na výšku buňky. Druhý přístup platí pro heterogenní typ buněk (různé indexy lomu), kdy je hodnota fáze interpretována jako hustota buňky a její změny. Některé další parametry jakou je i suchá hmota buňky lze obdržet přímo ze zpoždění fáze, aniž by bylo potřeba oddělovat index lomu od tloušťky buňky.

V závěru teoretické části bylo pojednáno o přepočtech celkové fáze na suchou hmotu (podle H. G. Daviese a M. H. F. Wilkinse, G. Popescua, G. Dunna a D. Zichy). K výpočtům u experimentů byl použit přepočet od G. Popescua, který ho aplikoval také na optické vážení buněk a je v poslední době nejvíce citován.

Stěžejní část práce byla tvořena pozorováním živých buněk K2 (kapitola 5). Nejdříve bylo pojednáno o kultivaci buněk, která probíhala v kultivačních lahvíčkách s médiem M1H v inkubátoru *Sanyo MCO-18AIC*. Dále bylo pojednáno o přípravě vzorku pro pozorování. Buňky s médiem byly vloženy do předmětové komůrky, samotné médium bylo vloženo do referenční komůrky. Takto připravené komůrky již bylo možné vložit do mikroskopu a pozorovat. Poté bylo v sekci 5.2 popsáno zpracování naměřených dat, které probíhalo nejdříve v programu CCHM2 a následně v programu ImageJ. V posledních dvou sekcích této experimentální části (sekce 5.3 a 5.4) byly představeny provedené experimenty. Ke všem měřením byl použit transmisní holografický mikroskop (CCHM) a jako vzorky byly použity nádorové nemetastázující embryonální fibroplasty inbredního potkana Louis Lewis označované K2 (plné označení LW13K2). Prvně byly provedeny experimenty nutriční deprivace buněk a následně experimenty, kdy byl sledován růst buněk. Získaná klesající (resp. rostoucí) závislost suché hmoty buněk na čase je zaznamenána v grafech na obrázcích 5.7, 5.8, 5.9 a 5.10.

V rámci bakalářské práce byla zvládnuta problematika měření ekvivalentu suché hmoty buněk. Ve všech experimentech (měření suché hmoty buněk) byly potvrzeny biologické předpoklady. V případě, kdy jsou buňky ve vhodném prostředí, které jim poskytuje dostatek živin, mohou dále růst a poté se dělit. V opačném případě buňky snižují svoji hmotnost (resp. suchou hmotu) a při dlouhodobém nedostatku živin umírají. Změny ekvivalentu suché hmoty jsou důležité především v biologických aplikacích, avšak měřit je lze jen díky různým mikroskopickým metodám. Transmisní holografický mikroskop se jeví jako vhodný nástroj pro dlouhodobá pozorování a měření živých buněk.

# Literatura

- [1] KOLMAN, P. *Koherenční řízený holografický mikroskop*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2010.
- [2] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Diplomová práce, VUT v Brně, 2006.
- [3] DAVIES, H. G., et al. *The use of interference microscope to determine dry mass in living cells and as a quantitative cytochemical method*. Quarterly journal of microscopical science, vol. 3, pp. 271-304, 1954.
- [4] *MicroscopyU*. Introduction to Phase Contrast Microscopy. [cit. 2013-2-4]. Dostupné z: <<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>>.
- [5] JEBÁČKOVÁ, A. *Koherenční řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Diplomová práce, VUT v Brně, 2012.
- [6] *Wikipedia*. Holography. [cit. 2013-2-16]. Dostupné z: <<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Holography.html>>.
- [7] CHMELÍK, R., HARNA, Z. *Parallel-mode confocal microscope*. Optical Engineering, vol. 38, pp. 1635-1639, 1999.
- [8] CHYTKOVÁ, I. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – konstrukce a experiment*. Diplomová práce, VUT v Brně, 1999.
- [9] PROKOPOVÁ, M. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem – teorie a konstrukce*. Diplomová práce, VUT v Brně, 1999.
- [10] PROKOPOVÁ, M. *Transmisní holografický konfokální mikroskop*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2002.
- [11] UHLÍŘOVÁ, H. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Dizertační práce, VUT v Brně, 2012.
- [12] SHAKED, N. T., et al. *Quantitative analysis of biological cells using digital holographic microscopy*. Holography, Research and Technologies, pp. 219-236, 2011.
- [13] POPESCU, G. et al. *Optical imaging of cell mass and growth dynamics*. American Journal of Physiology – Cell Physiology, vol. 295, no.2, pp. C538-C544, 2008.
- [14] POPESCU, G., et al. *Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy*. Journal of biomedical optics, 2005.
- [15] RAPPAZ, B., et al. *Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer*. Cytometry Part A, 2008.
- [16] ALBERTS, B. *Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero publishing, 1998.

## LITERATURA

- [17] *Creation Revolution*. Image of red blood cell. [cit. 2013-2-26].  
Dostupné z: <<http://www.creationrevolution.com/2013/01/red-blood-cells-are-frisbees-tanks-and-wheels>>.
- [18] *Quantitative Light Imaging Laboratory*. Image of red blood cell. [cit. 2013-3-5].  
Dostupné z: <<http://www.light.ece.illinois.edu>>.
- [19] RAPPAZ, B., et al. *Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphology of living cells with holographic microscopy*. Optic express, 2005.
- [20] RAPPAZ, B., et al. *Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with holographic microscopy*. Journal of biomedical optics, 2009.
- [21] DUNN, A., RICHARDS-KORTUM, R. *Three-dimensional computation of light scattering from cells*. IEEE Journal of Selected Topics in a Quantum Electronics, vol. 2, no. 4, pp. 898-905, 1996.
- [22] WAYNE, R. O., *Light and video microscopy*. Academic Press, 2010.
- [23] DUNN, G., ZICHA, D. *Dynamics of fibroblast spreading*. Journal of Cell Science, vol. 108, pp. 1239-1249, 1995.
- [24] BARTONÍČEK, J. *Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Bakalářská práce, VUT v Brně, 2001.
- [25] FERREIRA, T. A., RASBAND, W. *The ImageJ user guide*. National Institutes of Health, USA, 2010.