



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**ANALÝZA ZMĚN FENOTYPU NÁDOROVÝCH
BUNĚK NAVOZENÝCH MIGRASTATIKY
V KVANTITATIVNÍM FÁZOVÉM ZOBRAZENÍ**

ANALYSIS OF CHANGES IN THE PHENOTYPE OF TUMOUR CELLS INDUCED BY
MIGRASTATICS IN QUANTITATIVE PHASE IMAGING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Kolínková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MUDr. Pavel Veselý, CSc.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka:	Bc. Veronika Kolínková
Studijní program:	Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor:	Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce:	MUDr. Pavel Veselý, CSc.
Akademický rok:	2021/22

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.1111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Analýza změn fenotypu nádorových buněk navozených migrastatiky v kvantitativním fázovém zobrazení

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Význam kvantitativního fázového zobrazování (hiQPI) v biomedicině stále roste. hiQPI, stejně jako Zernikův fázový kontrast a Nomarského DIC, zobrazuje tvar a polohu živých buněk s vysokým kontrastem, a to neinvazivně, bez použití markerů. Kromě toho hiQPI měří v každém obrazovém bodě fázový posuv, který je úměrný hustotě hmoty nevodného materiálu v živých buňkách. Tímto způsobem lze v dlouhodobých časověných experimentech s tkáňovou kulturou dosáhnout velmi podrobného a kvantitativního hodnocení chování neznačených živých nádorových buněk. Pomocí hiQPI lze vyhodnotit chování buněk a jejich reakce na vnější podněty včetně terapeutik kvantitativním způsobem.

Cíle diplomové práce:

1. Osvojit si optické principy hiQPI a experimentální postupy pozorování tkáňových kultur včetně jejich přípravy.
2. Navrhnout experimentální postup a provést pozorování v oblasti biologie živé buňky pomocí techniky hiQPI. Zpracovat obrazový záznam a interpretovat výsledky experimentů, která jsou zaměřena na charakterizaci proměnlivosti fenotypu nádorové buňky vlivem migrastatik.

Seznam doporučené literatury:

SLABÝ, T., KOLMAN, P., DOSTÁL, Z., ANTOŠ, M., LOŠŤÁK, M., CHMELÍK, R. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. OPTICS EXPRESS 21(12), 2013, p. 14747 - 16, doi: 10.1364/OE.21.014747

GANDALOVIČOVÁ A., ROSEL D., FERNANDES M., VESELÝ P., HENEBERG P., ČERMÁK V., PETRUŽELKA L., KUMAR S., SANZ-MORENO V., BRÁBEK J. Migrastatics-Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. Trends Cancer, 2017 Jun;3(6):391-406. doi: 10.1016/j.trecan.2017.04.008. PMID: 28670628; PMCID: PMC5482322.

PARK, Y., DEPEURSINGE, C. & POPESCU, G. Quantitative phase imaging in biomedicine. Nature Photon, 2018, 12, 578–589. <https://doi.org/10.1038/s41566-018-0253-x>

ZANGLE, T., TEITELL, M. Live-cell mass profiling: an emerging approach in quantitative biophysics. Nat Methods 11, 2014, 1221–1228. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3175>

TOLDE, O., GANDALOVIČOVÁ, A., KŘÍŽOVÁ, A., VESELÝ, P., CHMELÍK, R., RÖSEL, D., BRÁBEK, J. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. Scientific Reports, 2018, č. 8, s. 1-13. ISSN: 2045-2322.

GÁL, B., VESELÝ, M., ČOLLÁKOVÁ, J., NEKULOVÁ, M., JŮZOVÁ, V., CHMELÍK, R., VESELÝ, P. Distinctive behaviour of live biopsy-derived carcinoma cells unveiled using coherence-controlled holographic microscopy. PLOS ONE, 2017, roč. 12, č. 8, s. 1-14. ISSN: 1932-6203.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2021/22

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
ředitel ústavu

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

Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na pozorování živých buněk pomocí neinvazivní metody kvantitativního fázového zobrazování (hiQPI). Takové zobrazení je umožněno pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM) vyvinutého v laboratoři experimentální biofotoniky na VUT. Pomocí této zobrazovací technologie jsou v rámci experimentální části práce vyhodnoceny morfologické změny nádorových buněk A549 a MCF7 po aplikaci potenciálních migrastatik. Jako migrastatika jsou označována již schválená léčiva, která by mohla zamezit migraci nádorových buněk z primárního nádoru a tím předejít vzniku metastáz. Pro posouzení jejich účinku na nádorové buňky byla zvolena metoda RAC-GM (Rychlé vyšetření růstu a migrace buněk in vitro).

Abstract

This thesis focuses on the observation of living cells using the non-invasive methods of quantitative phase imaging (hiQPI). The imaging is enabled by a coherence-controlled holographic microscope (CCHM) developed in the Laboratory of Experimental Biophotonics at the VUT. Using this imaging technology, morphological changes of A549 and MCF7 after application of potential migrastatic drugs tumor cells are evaluated in the experimental part of the thesis. Migrastatics are defined as already approved drugs that could prevent the migration of cancer cells from the primary tumor and thus prevent metastasis. The RAC-GM (Rapid Assessment of Cell Growth and Migration in Vitro) method was chosen to assess their effect on tumor cells.

Klíčová slova

Koherencí řízený holografický mikroskop, kvantitativní fázové zobrazování, migrastatika, nádorové buňky

Keywords

Coherence controlled holographic microscope, quantitative phase imaging, migrastatics, tumor cells

KOLÍNKOVÁ, Veronika. *Analýza změn fenotypu nádorových buněk navozených migrastatiky v kvantitativním fázovém zobrazení*. Brno, 2022. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce MUDr. Pavel Veselý, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze za odborného vedení MUDr. Pavla Veselého, CSc., a všechny podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 20. května 2022

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce MUDr. Pavlu Veselému, CSc. a Mgr. Markétě Šuráňové za jejich pomoc, čas a cenné rady při zpracovávání této práce. Další poděkování patří Mgr. Veronice Jůzové za pomoc s přípravou vzorků a také odborníkům z Laboratoře experimentální biofotoniky. Velký dík patří i mým kolegyním Magdaléně Zábranské a Nikole Muchové za vzájemnou pomoc a podporu.

Obsah

Úvod.....	15
1. Kvantitativní fázové zobrazování	16
1.1. Princip kvantitativního fázového zobrazení.....	16
1.2. Suchá hmota buňky	17
2. Koherenci řízený holografický mikroskop	19
2.1. Popis optického uspořádání CCHM.....	20
2.2. Technické parametry Q-Phase	24
2.3. Q-Phase versus HoloMonitor	24
3. Migrastatika	27
3.1. Migrastatika jako léčiva proti metastázím	28
3.2. Zkoumaná migrastatika	29
4. Nádorové buňky.....	31
4.1. Nádorové buňky A549 a MCF7	32
4.2. Příprava a měření nádorových buněk.....	33
5. Analýza fenotypových změn	36
5.1. Nekróza vs. apoptóza	36
5.2. Ukázka apoptózy	39
5.3. Ukázka nekrózy.....	42
5.4. Ukázka buněčného dělení	45
5.5. Analýza buněk A549 ovlivněných migrastatiky	48
5.6. Analýza buněk MCF7 ovlivněných migrastatiky	53
6. Míra invazivního fenotypu.....	58
6.1. Buněční linie A549	58
6.2. Buněční linie MCF7	62
7. Diskuse.....	67
Závěr	68
Zdroje.....	69
Seznam zkratk	74

Úvod

Tato diplomová práce se věnuje popisu a využití kvantitativního fázového zobrazování (hiQPI-Holographic Incoherent-light-source Quantitative Phase Imaging) ke zhodnocení chování nádorových buněk pod vlivem potenciálních migrastatik. HiQPI je metoda využívaná pro dlouhodobé pozorování chování živých buněk *in vitro*. Jde o neinvazivní zobrazovací techniku, při níž je vytvořeno kontrastní zobrazení fázových objektů, aniž by byla potřeba zvýšení jejich kontrastu pomocí imunofluorescence. Pro získání hiQPI byl na fakultě VUT speciálně navržen multimodální koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM-Coherence Controlled Holographic Microscope). Holografie byla vynalezena Dennisem Gaborem už v roce 1948, když se pokoušel zlepšit rozlišení elektronové mikroskopie. Ve své době to byl významný pokrok, avšak požadavek na koherentní světelný zdroj znemožňoval jeho praktické využití. Vynález laseru v roce 1960 a rozvoj počítačových technik umožnili vznik digitální holografické mikroskopie. Po průchodu světla vzorkem biologické objekty rozptylují dopadající světlo, avšak toto světlo je řádově slabší. Ovlivňují tedy významně fázi, nikoli amplitudu, a proto se nazývají „fázovými objekty“. Gabor ukázal, že záznam intenzity světla po průchodu objektem zahrnuje informace jak o amplitudě, tak i fázi. Na základě obou těchto získaných informací dostaneme trojrozměrný obraz pozorovaného objektu. Ukázalo se, že spojením holografie a mikroskopie lze provést vysoce citlivá měření tloušťky a indexu lomu biologických vzorků. [1, 2]

V této práci je CCHM využit pro zhodnocení čtyř léčiv, mezi které patří belumosudil, midostaurin, vinkristin a niklosamid. Tato léčiva budou posuzována z hlediska jejich účinku na konkrétních buněčných liniích nádorových buněk. Jedná se o buněčnou linii A549, což jsou buňky lidského nemalobuněčného karcinomu plic a o buňky rakoviny prsu MCF7. Zmíněná léčiva jsou zkoumána pro jejich možné účinky na migraci a změnu fenotypu nádorových buněk. Pokud by se takový účinek prokázal, mohla by být léčiva zařazena mezi potenciální možná migrastatika. Pojem migrastatika představuje skupinu již schválených léčiv, které by se v budoucnu mohly stát další možností v léčbě nádorových onemocnění. Tato skupina léčiv by konkrétně měla zabraňovat vzniku metastáz, které bývají z velké části zodpovědné za úmrtí pacientů se zhoubnými nádory.

Práce se zaměřuje na analýzu proměnlivosti fenotypu nádorových buněk po aplikaci potenciálních migrastatik. Pro toto zadání byl zvolen objektiv se zvětšením 20x, díky němuž je možné se zaměřit zejména na podrobnou morfologickou analýzu fenotypu buňky v mitóze a také v buněčné smrti (apoptóza, nekróza).

1. Kvantitativní fázové zobrazování

Zobrazování živých buněk a tkání je ústředním bodem pro biologický výzkum a lékařskou diagnózu. Mikroskopie je jednou z nejdůležitějších technik v medicíně a biologii. Proto je optické zobrazování biologických prvků stále důležitou oblastí výzkumu, jelikož cílem je překonat dosavadní prostorová a časová rozlišení, kontrast, hloubku průniku atd.

Mnoho biologických vzorků, jako jsou živé buňky a jejich intracelulární složky, často vykazují velmi malý amplitudový kontrast, což v běžné mikroskopii světlého pole ztěžuje odlišení od jejich okolí. Proto byly vyvinuty techniky fázového kontrastu jako je Zernike, Normansky a mikroskopie tmavého pole. Díky těmto technikám se zlepšila viditelnost vzorků, aniž by je chemicky nebo fyzikálně měnily procesem barvení. Tyto techniky se osvědčily jakožto neocenitelné nástroje pro studium živých buněk a pro pochopení buněčných procesů.

HiQPI je vhodnou metodou pro pozorování morfologie a motility buněk v přirozeném prostředí. Jedná se o neinvazivní techniku pro zobrazování i průhledných struktur bez nutnosti jakéhokoliv označování. Buňky jsou transparentní vzorky, jež málo rozptylují a odráží světlo. Aby bylo možné je pozorovat živé, a to včetně jejich pohybů a reakcí na vnější prostředí, je nezbytné uchovávat je v kultivačním médiu. HiQPI umožňuje zobrazovat vzorky i v rozptylujícím médiu, například v kolagenu. [1, 2, 3]

1.1. Princip kvantitativního fázového zobrazení

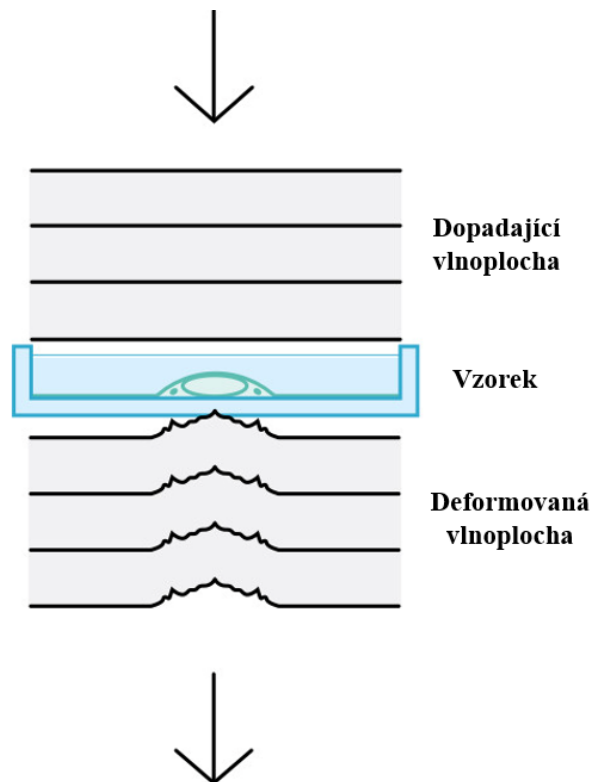
V roce 1873 přišel Ernst Abbe s první teorií tvorby obrazu pomocí optického mikroskopu. Myšlenkou bylo, že je obraz vytvářen superpozicí vln, které vystupují pod různými úhly a ukázalo se, že obrazem je interferogram. Mikroskop však nedokázal rozlišit objekty menší, než je polovina vlnové délky šířících se vln. Dalším průlomem v historii zobrazování byly metody zvyšující kontrast. Pokud prochází světlo průhledným preparátem lišícím se od okolního prostředí pouze tím, že má odlišný index lomu, tak je toto světlo modulováno fázově a tato změna je pro zrak neviditelná.

Pomocí hiQPI lze identifikovat fázový posun způsobený buňkou. Pokud vlna prochází vzorkem, tak se její vlnoplocha deformuje, což je způsobeno změnou indexu lomu a její tloušťkou. V oblasti s vyšším indexem lomu se rychlost světla zmenšuje, a to má za následek zpoždění odpovídající části vlnoplochy. Tvar přenášené vlnoplochy ze vzorku je detekován a reprezentován jako fázový obraz. Jednotkami fáze jsou radiány, avšak fázové hodnoty jsou závislé na dvou časově a prostorově proměnných parametrech. Těmito parametry jsou refrakční index a tloušťka vzorku. Oba uvedené parametry mohou ovlivnit výsledné hodnoty a není jednoduché je od sebe oddělit. [3, 4, 5]

Fáze závisí na vnějších parametrech a vyjadřujeme ji podle následujícího vzorce:

$$\varphi = \frac{2\pi(n_s - n_m)t_s}{\lambda}, \quad (1)$$

kde φ označuje detekovanou hodnotu fáze, n_s odpovídá indexu lomu vzorku a n_m indexu lomu okolního média, t_s je tloušťka vzorku v μm , λ udává použitou vlnovou délku (650 nm). [1, 3]



Obrázek 1: Princip kvantitativního fázového zobrazování. [3]

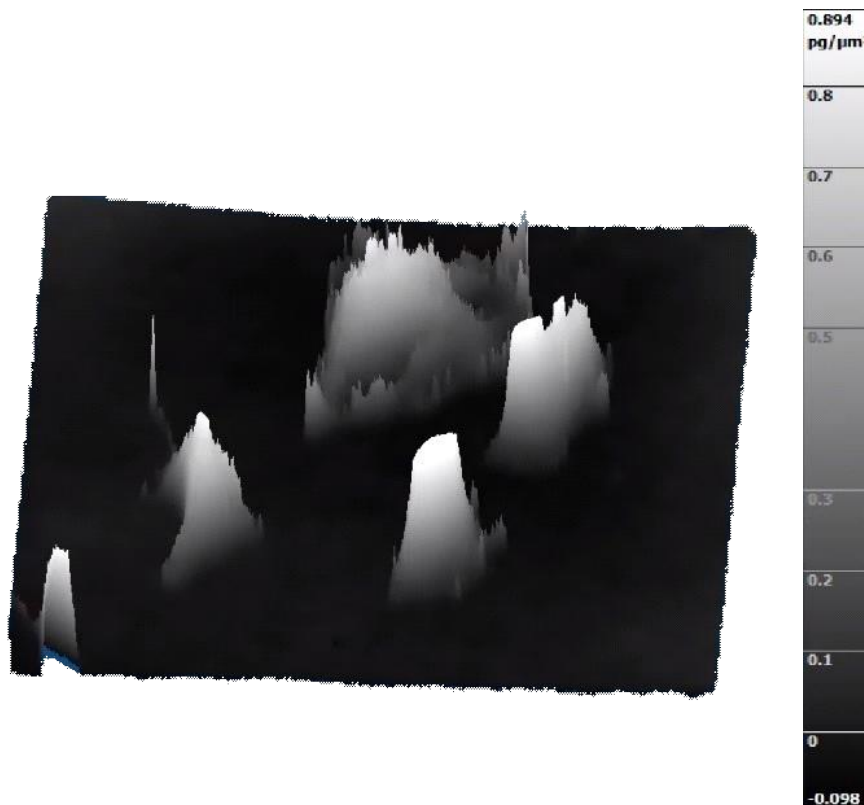
1.2. Suchá hmota buňky

HiQPI poskytuje informace o morfologii vzorku nebo hustotě suché hmoty buňky v jednotkách $\text{pg}/\mu\text{m}^2$. Suchá hmota buňky představuje vše, z čeho je buňka složena, kromě vody. Jedná se o bílkoviny, nukleové kyseliny, lipidy, cukry, metabolity, ionty a další. Většina biomolekul vykazuje lineární vztah mezi indexem lomu a koncentracemi. Tento vztah se označuje jako specifický přírůstek refrakce α , a určuje souvislost změny indexu lomu se zvýšením hustoty hmoty biomolekul. Specifický přírůstek refrakce pro biomolekuly patří do úzkého rozmezí, a tato průměrná hodnota se využívá právě k výpočtu buněčné hmoty. Obvykle se volí průměrná hodnota přibližně $0.18 \mu\text{m}^3/\text{pg}$. To znamená, že zvýšení refraktivního indexu o hodnotu 0,0018 značí zvýšení o 1 procento

suché hmoty buňky. Díky průměrné hodnotě lze také převést fázové hodnoty (v radiánech) na hodnotu suché hmoty (v $\text{pg}/\mu\text{m}^2$), a to pomocí rovnice:

$$m = \frac{\varphi\lambda}{2\pi\alpha}, \quad (2)$$

kde m značí hustotu suché hmoty buňky, φ je detekovaná hodnota fáze, λ je vlnová délka a α označuje specifický refrakční přírůstek. Je potřeba zmínit, že ačkoli se průměrná hodnota $\alpha = 0,0018$ využívá pro většinu biologických aplikací, tak nemusí platit úplně ve všech případech. [3]



Obrázek 2: 3D hiQPI se zobrazením škály suché hmoty pro buňku A549.

2. Koherencí řízený holografický mikroskop

Živé buňky lze pozorovat pomocí laseru či laserové diody, avšak toto osvětlení není úplně vhodné, jelikož může vnášet různé artefakty (např. halo efekt) a obraz má poté horší rozlišení. Aby se tomu zamezilo, vznikla snaha o to, aby se osvětlovalo pomocí žárovky, výbojky nebo LED diody jako u klasického světelného mikroskopu. Dalším kritériem bylo, aby bylo umožněno sledovat živé buňky, a to bez potřeby jakéhokoliv kontrastního barvení. Kontrastní látky mohou totiž na buňky působit toxicky a pokud je na buňky použito léčivo i kontrastní látka, tak nemusíme být schopni odlišit účinky těchto dvou látek.

Na Fakultě strojního inženýrství v Brně začal vznikat první prototyp multimodálního holografického mikroskopu. Na jeho vývoji pracoval tým profesora Radima Chmelíka, a stále probíhá snaha o jeho zdokonalení. První pokusy s digitální holografií začali v polovině 90. let a v roce 2003 vznikl první prototyp. Mikroskop je patentovaný v České republice, Spojených státech Amerických, Číně a Japonsku. CCHM je vyráběn společností Telight, která na něj v roce 2011 získala komerční licenci, a prodává se pod názvem Q-Phase. [6, 7]

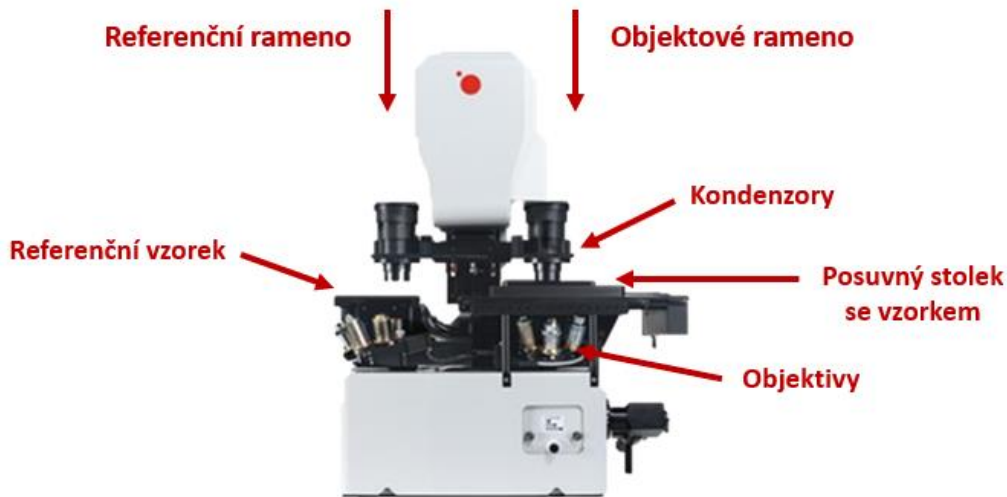
Pro fázová měření bylo navrženo velké množství interferometrických přístrojů, které je možné rozdělit na dva typy. Prvním typem jsou in-line mikroskopy, kde úhel mezi objektovým a referenčním svazkem je nulový, jsou tedy paralelní vůči sobě. In-line typ využívá světelných zdrojů s nízkou koherencí, což může být například halogenová žárovka. Zde je nutné zaznamenat více než jeden interferogram s různými fázovými posuvy, aby bylo možné zaznamenat amplitudu a fázi. Právě toto je omezující v případech pozorování rychle se měnících jevů.

Druhým typem jsou off-axis holografické mikroskopy, které jsou charakterizovány nenulovým úhlem mezi objektovým a referenčním paprskem. Vytváří tak interferogram s dostatečně vysokou prostorovou frekvencí vzniklých interferenčních proužků, což umožňuje rekonstrukci vlnění pouze pomocí jednoho interferogramu. Výhodou je vysoká snímkovací frekvence, a to především při použití Fourierových výpočtů k rekonstrukci. Díky tomu, že k rekonstrukci objektové vlny stačí jeden zaznamenaný interferogram, je tento typ vhodný hlavně pro zobrazování rychle se měnících jevů a poskytuje značnou stabilitu fázového měření. Tyto systémy ale neumožňují použití nekoherentních světelných zdrojů, a tak postrádají vlastnost optického dělení. Ze stejného důvodu je také laterální rozlišení omezené.

Tím, že CCHM kombinuje off-axis sestavu s achromatickým mřížkovým interferometrem, je umožněno použití nízkokoherentního zdroje světla. Díky této kombinaci lze získat výhody off-axis a in-line systému a zároveň odstranit jejich nevýhody. Nejdříve byl teoretický popis zobrazovacího procesu CCHM porovnán s dalšími zobrazovacími systémy. Roku 2010 byl poprvé uveden název „Koherencí řízený holografický mikroskop“, jelikož odráží stěžejní schopnost mikroskopu a to je, že řídí své zobrazovací vlastnosti stupněm prostorové a časové koherence zdroje osvětlení.[8] [9]

2.1. Popis optického uspořádání CCHM

Optický systém CCHM je založen na principu Mach-Zehnderova interferometru pro achromatickou off-axis holografickou mikroskopii. Mikroskop je složen ze dvou ramen, které představují dvě optické cesty, kterými se šíří světlo ze zdroje. Jedna optická cesta se nazývá objektová a nese informace o pozorovaném vzorku, druhá je referenční a prochází referenční rovinou, kde se nenachází žádný vzorek.



Obrázek 3: Popis Q-Phase mikroskopu. [3]

Obě ramena mikroskopu jsou tvořena identickou soustavou, která se skládá z kondenzorů, objektivů s korekcí na nekonečnou vzdálenost a tubusových čoček. Zásadním prvkem mikroskopu je reflexní difrakční mřížka, která se nachází v referenčním rameni interferometru a je zobrazována do výstupní roviny. Rovina difrakční mřížky a objektové roviny objektivů jsou opticky sdruženy s výstupní rovinou objektivů a výstupními čočkami. Obraz mřížky není tvořen přímo referenčním svazkem světla ve výstupní rovině, jelikož se pro zobrazování používá jen +1. řád difrakční mřížky a ostatní difrakční řády jsou odstraněny prostorovou filtrací v místě ohniskové roviny výstupní čočky. Díky tomu je zabráněno degradaci hologramu interferencí dalších řádů mezi sebou. Ve výstupní rovině se objektový a referenční svazek rekombinují a vzniká interferenční obrazec ve formě proužků, který odpovídá obrazu vrypů difrakční mřížky tak, jak byla vytvořena přímo 0. a +1. řádem difrakční mřížky. Prostorová frekvence interferenčních proužků ve výstupní rovině je rovna prostorové frekvenci drážek difrakční mřížky f_G , ale snižené o zvětšení výstupních čoček m_{OL} . Taková prostorová frekvence f_C je rovna:

$$f_c = \frac{f_G}{m_{OL}} . \quad (3)$$

Mikroskop používá Köhlerova osvětlení, takže nekoherentní zdroj světla je zobrazován do předních ohniskových rovin kondenzorů pomocí kolektorové čočky. Dále vzniká sekundární obraz zdroje v zadních ohniskových rovinách objektivů a vzniká též terciální obraz zdroje v blízkosti ohniskových rovin výstupních čoček. Terciální obraz zdroje v zadní ohniskové rovině čočky v referenčním rameni je spektrálně rozptýlený s ohledem k disperzní síle difrakční mřížky. Čím delší je vlnová délka světla, tím dále je tvořen obraz zdroje světla od osy referenčního ramene. Pokud bychom sledovali axiální paprsek vycházející ze zdroje procházející referenčním ramenem mikroskopu až na difrakční mřížku, a pokud bychom uvažovali +1. řád difrakční mřížky, tak zjistíme, že dopadající paprsek je ohýbán mřížkou dle rovnice:

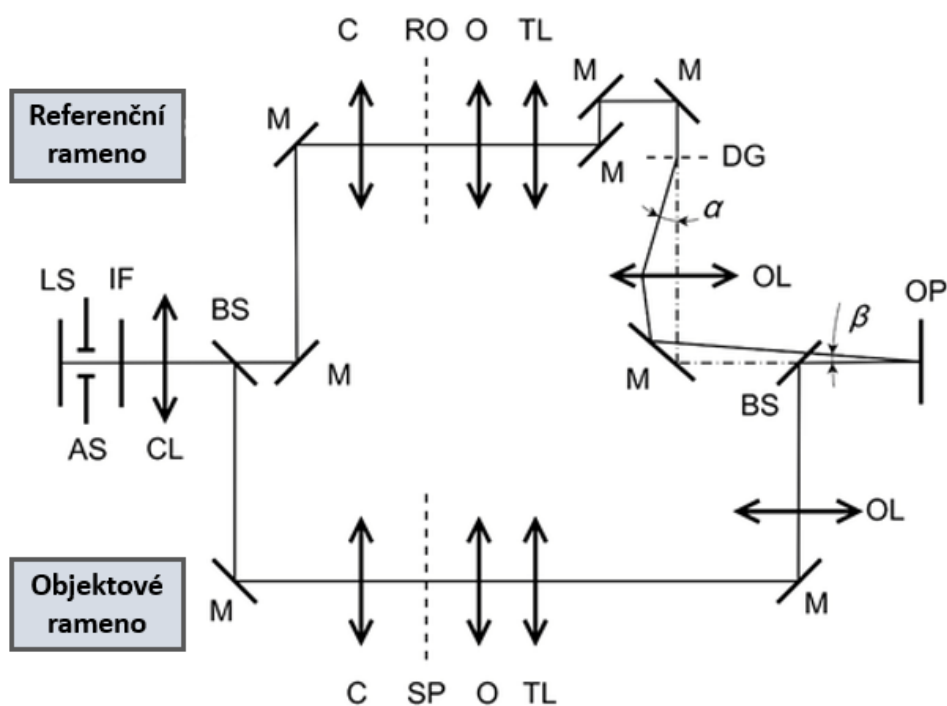
$$\sin(\alpha) = f_G \cdot \lambda . \quad (4)$$

Tento paprsek následně prochází výstupní čočkou a do výstupní roviny vstupuje pod úhlem β :

$$\sin(\beta) = \frac{\sin(\alpha)}{m_{OL}} . \quad (5)$$

Naopak v objektovém rameni není procházející svazek světla nijak spektrálně rozptýlen, jelikož neobsahuje žádnou difrakční mřížku. Světlo se pouze odráží na zrcadle a prochází výstupní čočkou. Paprsky různých vlnových délek z odlišných bodů terciálních obrazů zdroje z obou ramen se spojují ve výstupní rovině pod různými úhly β . To je způsobeno disperzní silou difrakční mřížky a vznikají interferenční proužky rovnoběžné s vrypy difrakční mřížky a prostorové frekvence f_c , která je konstantní pro všechny vlnové délky a interferometr je achromatický. Jestliže je pozorován vzorek, tak se ve výstupní rovině vytvoří mimoosový hologram obrazové roviny s prostorovou frekvencí f_c .

Výstupní úhel β pro všechny vlnové délky je důležitý pro achromaticnost mikroskopu. Pokud je zavedeno jakékoliv vychýlení θ od úhlu β , tak se začnou vytvářet interferenční proužky odlišných nosných frekvencí při různých vlnových délkách. Tento fakt ovlivňuje jednak achromaticnost mikroskopu, ale následně i kontrast interferenčních proužků v hologramu. Hologram je následně zaznamenán detektorem a kvantitativní fázový obraz je extrahován z hologramu v reálném čase pomocí počítače. Proces numerické rekonstrukce je založen na Fourierových transformacích. [4, 5, 8, 9, 10]

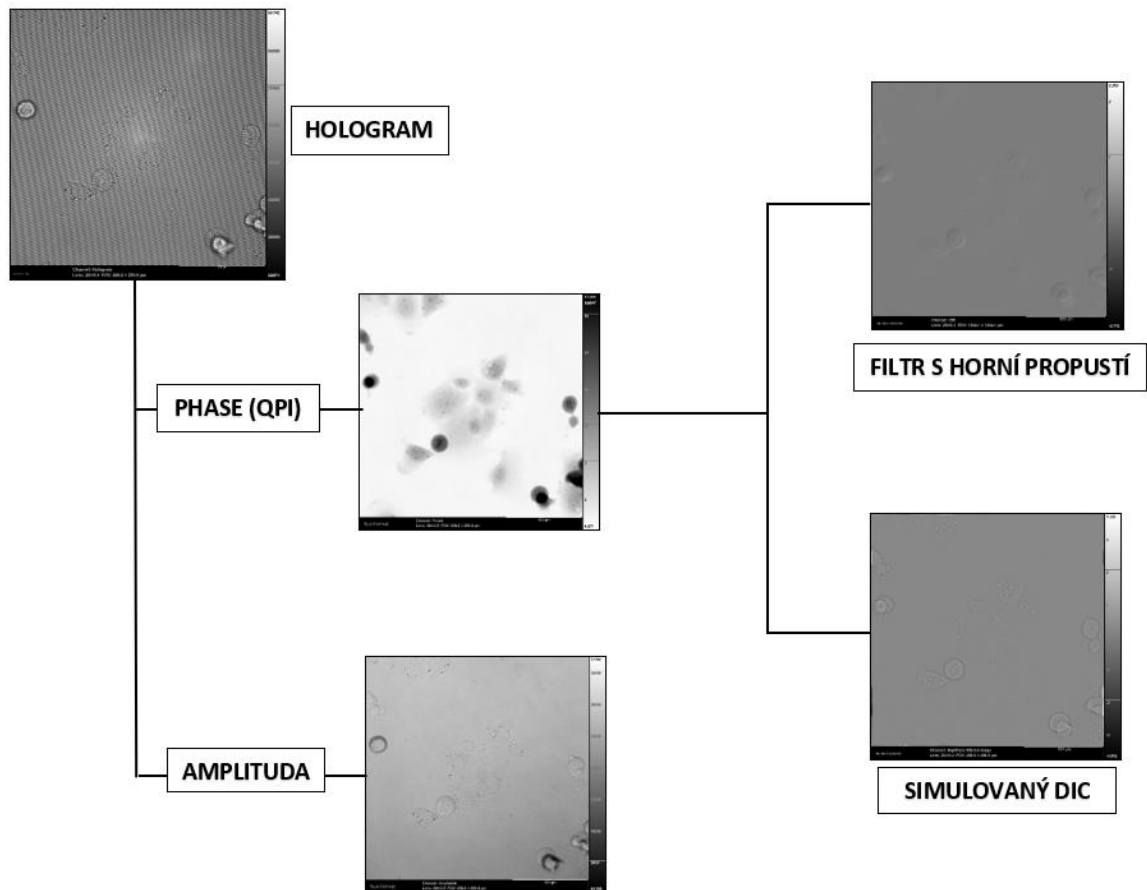


Obrázek 4: Schéma CCHM. Světelný zdroj (S), kolektorová čočka (L), dělič paprsků (BS), zrcadla (M), kondenzory (C), rovina vzorku (Sp), referenční rovina (R), objektivy (O), tubusové čočky (TL), difrakční mřížka (DG), výstupní čočky (OL), výstupní rovina (OP), detektor (D). [12]

Zmíněný CCHM umožňuje off-axis holografickou mikroskopii za využití časově a prostorově nekoherentních zdrojů světla. Stupeň koherence má významný vliv na zobrazovací charakteristické rysy CCHM. Tudiž pomocí řízení stupně koherence je možné přizpůsobovat zobrazovací charakteristické rysy dle konkrétních požadavků. Mikroskop CCHM je vyvinutý záměrně pro pozorování živých buněk *in vitro*. Q-Phase je vybaven inkubátorem, a to z důvodu zachování stabilní teploty okolo 37 stupňů Celsia. Jedná se o multimodální zobrazovací systém s fluorescenčním modulem, který je dodáván spolu s druhou kamerou pro zajištění fluorescenčního zobrazování.

Nejdůležitějším obrazovým výstupem tohoto mikroskopu je hologram, pomocí kterého lze extrahovat více obrazových výstupů. Mezi tyto výstupy patří především QPI a amplituda. Na schématu (obr. 6) je uvedeno schéma, které ukazuje všechny výstupy zaznamenaného hologramu. Hologram je tvořen obrazem světlého pole, který je překryt charakteristickými interferenčními proužky. Takový obrazový výstup je však pozorován pouze tehdy, když je mikroskop správně naladěný. Přímou ze zaznamenaného hologramu je rekonstruován fázový obraz, který je základem pro segmentaci obrazu a následné kvantitativní analýzy. Pomocí doplňkových algoritmů pro zpracování obrazu lze z fázového obrazu rekonstruovat simulovaný diferenciální

interferenční kontrast (DIC-Differential interference contrast) a taktéž obraz s filtrem s horní propustí. DIC je metoda sloužící ke zvýšení kontrastu při pozorování průhledných a bezbarvých vzorků. Obrazový výstup s filtrem s horní propustí je určený pro zvýšení kontrastu u velmi jemných struktur uvnitř vzorku. Funguje tak, že zvýrazní vysoké prostorové frekvence a zároveň potlačí nízké prostorové frekvence v obrazu. Z hologramu je dále přímo rekonstruován také amplitudový obraz. Amplitudový kontrast je podobný zobrazení ve světlém poli. [3, 11, 12]



Obrázek 5: Schéma výstupů zaznamenaného hologramu. Objektiv 20x/0.5.

2.2. Technické parametry Q-Phase

Pro tuto diplomovou práci byl pro pozorování a následné vyhodnocení chování nádorových buněk po aplikaci léčiv použit výše popsáný CCHM mikroskop Q-Phase. K jeho bližší specifikaci jsou v následující tabulce uvedeny vybrané technické parametry.[3]

Tabulka 1: Technické parametry Q-Phase [3]

Konfigurace mikroskopu	Transmisní inverzní
Mikroskopické techniky	QPI, epifluorescence, simulovaný DIC, mikroskopie světlého pole, filtr s vysokou propustí
Objektivy	4x až 60x
Zdroj světla	LED
Vlnová délka	660 nm
Laterální rozlišení	4 μm (objektiv 4x, NA 0.1) 0,58 μm (objektiv 60x, NA 1.4)
Citlivost detekce fáze	až na 0,011 rad
Rozměr	1100x950x1620 mm (bez inkubátoru) 2515x974x1620 mm (včetně inkubátoru)
Váha	350 kg

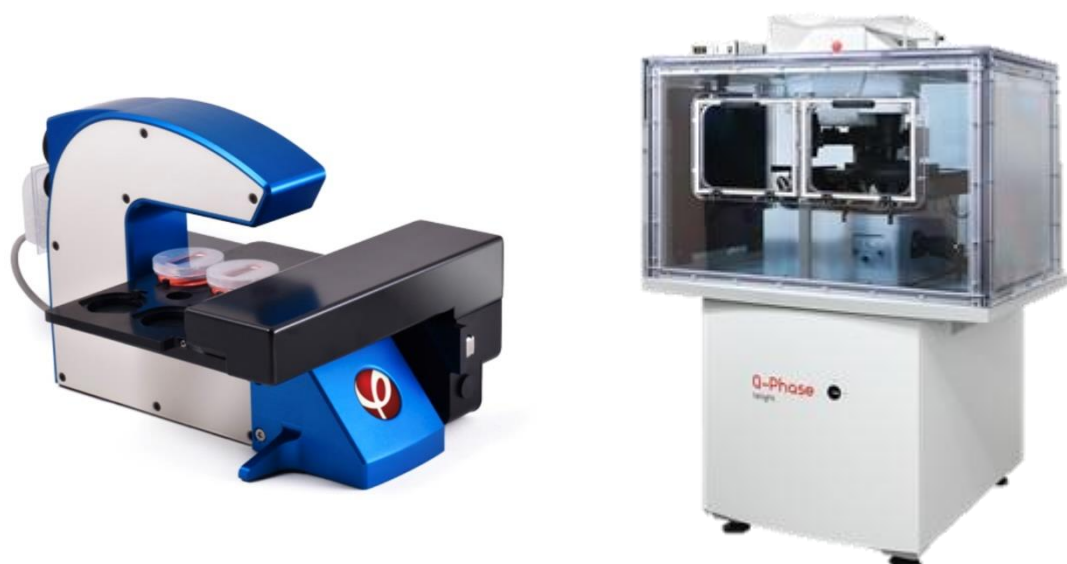
2.3. Q-Phase versus HoloMonitor

HoloMonitor je digitální holografický mikroskop, zkratkou DHM, pro zobrazování živých buněk. Jeho součástí je kompaktní mikroskop pro buněčné kultury a také software App Suite navržený přímo pro tento mikroskop. Pracuje v reálném čase v CO₂ inkubátoru nebo v hypoxické komoře, což umožňuje dlouhodobé pozorování kultur *in vitro* ve stabilním a fyziologickém prostředí. Dokáže neinvazivně kvantifikovat přes 30 buněčných parametrů reflektující buněčnou proliferaci, migraci, morfologii a diferenciaci. Buněčné kultury lze analyzovat jednak na úrovni populace, ale také na úrovni jednotlivých buněk. Při zkoumání buněk pomocí HoloMonitoru není třeba vzorky nijak označovat, aby je bylo možné pozorovat, stejně jako u mikroskopu Q-Phase. Je zde použit nízkoenergetický laser udržující nízkou fototoxicitu. Buňky jsou po dokončeném procesu pozorování nepoškozené a je možné je tedy znovu použít pro další studie pomocí jiných zobrazovacích technik.

Pro srovnání s mikroskopem Q-Phase jsou v tabulce č. 2 uvedeny jeho technické parametry. HoloMonitor má nižší hmotnost a rozměry v porovnání s Q-Phase, ale disponuje pouze jedním typem objektivu a má nižší laterální rozlišení.

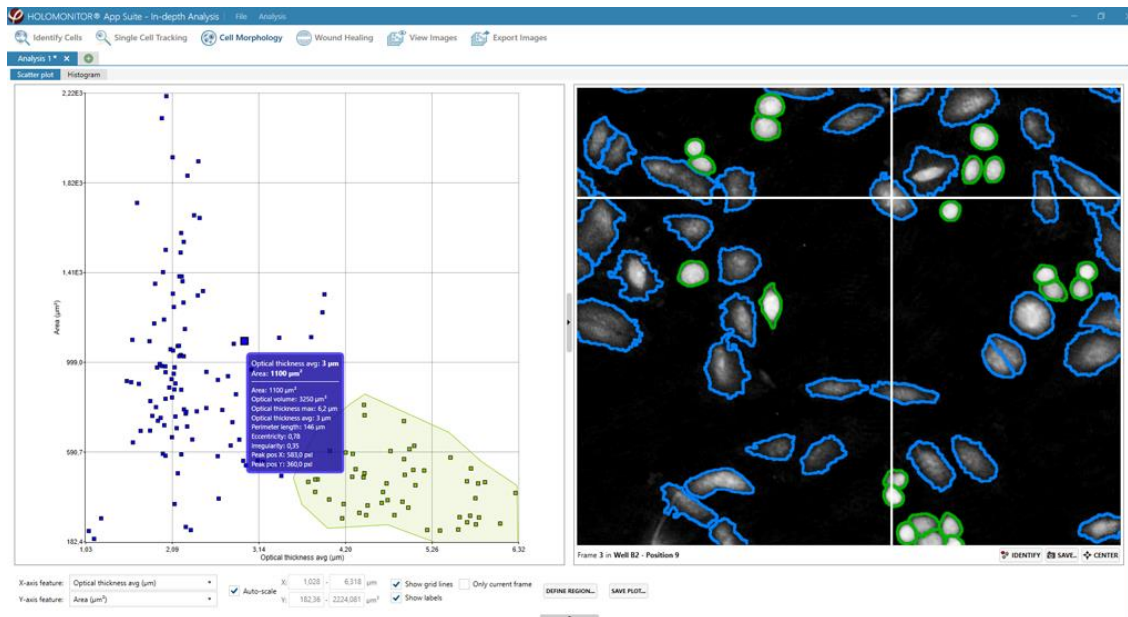
Tabulka 2: Technické parametry HoloMonitoru.[13]

Technické parametry	
Zdroj světla	laser
Vlnová délka	635 nm
Laterální rozlišení	1 μm
Objektiv	10x
Rozměr	290×200×190 mm (bez inkubátoru)
Váha	5,15 kg
Vzorky a prostředí	
Buňky	Adherentní buněčná monovrstva
Nádoby pro buněčné kultury	6-, 24-, 96-jamkové, Petri, IBIDI
Provozní teplota	10-40°C
Provozní vlhkost	max 95%

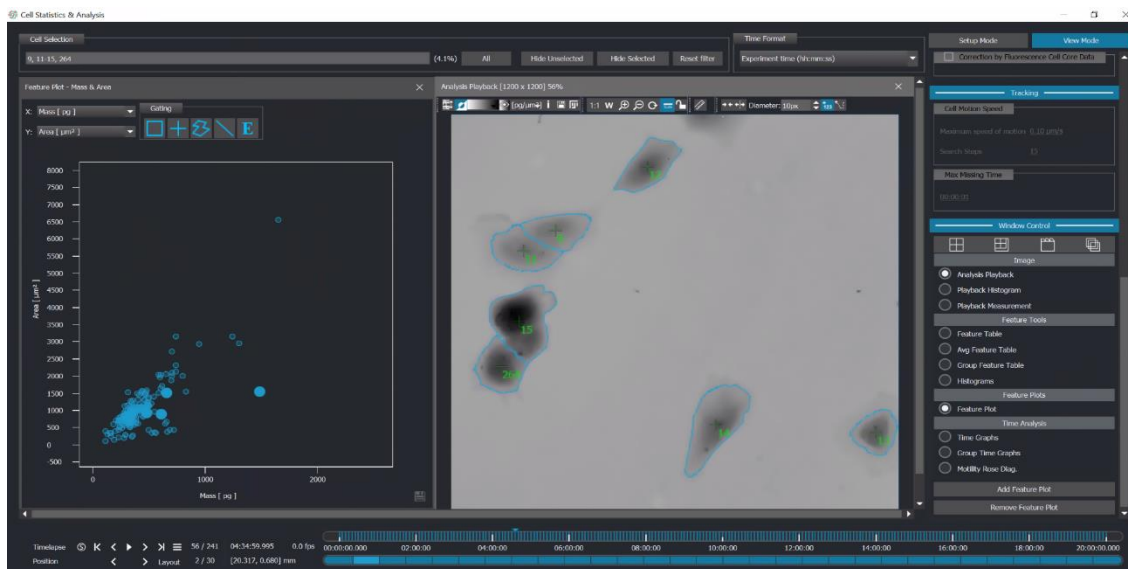


Obrázek 6: HoloMonitor (vlevo); Q-Phase včetně inkubátoru (vpravo). [3,14]

Na následujících obrázcích je pro představu znázorněno pracovní prostředí softwaru App Suite u HoloMonitoru a SophiQ používaného u Q-Phase. Oba zmíněné softwary jsou v anglickém jazyce. SophiQ slouží jednak k ladění mikroskopu, tak i k segmentaci a analýze buněk. Avšak neumožňuje analyzovat tolik parametrů jako App Suite.[13, 14]



Obrázek 7: Ukázka pracovního prostředí softwaru App Suite. [14]



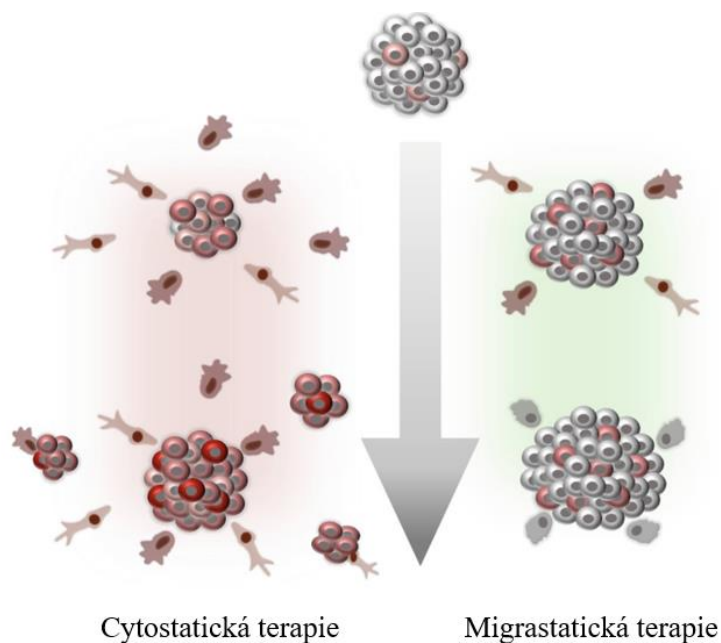
Obrázek 8: Ukázka pracovního prostředí programu SophiQ.

3. Migrastatika

Celosvětově počet úmrtí způsobených rakovinou roste. V případech pevných nádorů tvoří invaze a metastázy více než 90 % mortality pacientů s rakovinou. V současné době chybí specifická kategorie antiinvazivních a antimetastatických léčiv. Zavedl se zcela nový termín „migrastatika“ pro léčiva, jejichž cílem je zamezit všem způsobům invazivního pohybu nádorových buněk skrze buněčná prostředí. Tímto výzkumem se věnuje pan profesor Jan Brábek se skupinou z laboratoře Invazivity nádorových buněk na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Biocevu. [15]

Migrastatická léčba by se mohla v budoucnu stát dalším pilířem v léčbě rakoviny. Mezi dosavadní pilíře boje proti rakovině patří chirurgie, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie. Jedná se tedy o doplnění chemoterapie. Testování látek v rámci klinických studií trvá deset až dvanáct let. Migrastatika se však mohou k onkologicky nemocným pacientům dostat dříve, jelikož je zde možnost využití stávajících a již schválených léčiv. Zavedení pojmu „migrastatika“ slouží tedy i jako odlišení se od běžných cytostatických léčiv, jež jsou cíleny hlavně proti buněčné proliferaci. Díky cytostatické léčbě tedy dochází k omezení růstu nádorových buněk, ale nevýhodou je zasažení i buněk zdravých.

Záměrem však není, aby byla běžná cytostatická terapie nahrazena migrastatiky, ale aby byla o migrastatika doplněna. Na obr. 9 je ilustrativně ukázán rozdíl účinků migrastatik a cytostatik na nádorovou buňku. Při cytostatické léčbě dochází nejdříve ke zmenšení samotného nádoru, ale nijak nezabraňují migraci nádorových buněk. U znázornění migrastatické léčby není ovlivněna velikost primárního nádoru, avšak invaze do okolní tkáně je pouze nízká. [16]



Obrázek 9: Rozdíl účinku migrastatické a cytostatické léčby na nádor. [16]

3.1. Migrastatika jako léčiva proti metastázám

Hlavním problémem u onkologického onemocnění není jen růst rakovinné buňky, ale i její invaze a schopnost metastáz, kdy se nádorové buňky aktivně šíří z míst primárních nádorů do dalších částí organismu. Nádorové buňky tedy oddělí od hlavního nádoru a dostanou se do krevního řečiště nebo do lymfatického systému. Dochází k metastatické kaskádě, což je proces, u něhož dochází ke změnám v morfologii buněk, především aktivní motilitě buněk se změnami v genové expresi. Tyto změny jsou komplikované, jelikož mohou být charakteristické nejen pro různé typy rakoviny související s prvotní transformací rakoviny, ale též pro odlišné skupiny rakovin pacientů souvisejících s jejich genetickým pozadím, které vyžaduje individuální přístup k léčbě. [5]

Mezi hlavní rysy zhoubných nádorů tedy patří abnormální buněčná proliferace a potenciál rozšiřovat se i do jiných částí těla. To však neplatí pro benigní nádory, které nemají potenciál šířit se do okolních tkání. U maligních nádorů se mohou nádorové buňky rozšířit téměř do všech částí těla. Některé typy nádorových buněk mají tendenci se šířit do určitých částí těla. Např. rakovina prsu má sklon šířit se do kostí, jater, plic, hrudní stěny a mozku. Rakovina plic má dispozice se rozšiřovat do mozku, kostí, jater a nadledvin. U rakoviny tlustého střeva a konečníku byla pozorována tendence k šíření do jater a plic. V orgánech, jako je například kůže nebo svaly vznikají metastázy jen vzácně. Je důležité zmínit, že metastázy označujeme stejným názvem jako je primární nádor. Například rakovina prsu rozšířená do jater se označuje jako metastazující rakovina prsu, a nikoliv jako rakovina jater. Jelikož původní nádor je v prsu a tím pádem metastázy obsahují stejné buňky. Takto rozšířené metastázy spolu navzájem komunikují, čímž vytváří zmatek signalizace v pacientově těle a narušuje tak celou rovnováhu těla. Následkem je například kachexie, při níž nádor bere energii potřebnou pro tělo a pacient následkem toho hubne. Důvodem, proč nádorové buňky mají potřebu se šířit do dalších částí těla je jejich závislost na cévním zásobení. Pokud se nádor zvětšuje, nemají buňky dostatek kyslíku, aby byly schopny přežít, a proto cestují jinam. [5, 17, 18, 19]

Fenotypové a dynamické změny nádorových buněk navozené migrastatiky lze neinvazivně monitorovat pomocí hiQPI (viz 1. kapitola). Míra invazivního fenotypu je nejdůležitějším znakem, jenž odlišuje maligní nádor od benigních. Většina morbidity a mortality u pevných nádorů je připisována právě metastázám. Hematologické malignity postihují krev, kostní dřeň a lymfatický systém a převládajícím znakem je nekontrolovaná proliferace. U pevného karcinomu je to především lokální invaze a metastázy, proto je důležité, aby součástí léčby byly léky inhibující schopnost rakovinných buněk pronikat přes extracelulární matrix a vytvářet sekundární nádory.

U nádorové léčby chemoterapií jsou buňky nádoru vystaveny stresu, přičemž některé buňky tento stres přežijí a získají tím mnohem větší odolnost. Zároveň dochází k migraci buněk z původního nádoru a metastázování. Při migrastatické léčbě by nádorové buňky nebyly vystaveny tomuto cytotoxickému stresu a tím pádem by nemuselo docházet k jejich migraci.

Mechanismy související s procesy vedoucí k tvorbě metastáz jsou tedy buněčná motilita, řízená migrace a invaze přeměněné rakovinné buňky. Jelikož se medicínské výzkumy zaměřují především na antiproliferativní látky, je zde nedostatek antimetastatických léčiv. Proto vznikla iniciativa hledat mezi již existujícími léčivy vhodné kandidáty, které by mohly být zařazeny mezi migrastatika. [15, 17, 19, 20, 21]

3.2. Zkoumaná migrastatika

Pro tuto diplomovou práci bylo zvoleno posouzení následujících čtyř potenciálních migrastatik z hlediska jejich účinku na nádorové buňky, především na změnu fenotypu nádorových buněk. Konkrétně se jedná o belumosudil (BEL), vinkristin (VIN), midostaurin (MID) a niklosamid (NICL).

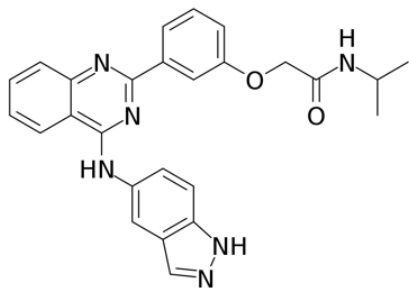
BEL je lék používaný k léčbě chronické reakce štěpu proti hostiteli a patří do třídy známých jako inhibitory serin/threonin kinázy. Prodává se pod značkou Rezero a pro lékařské použití byl schválen ve Spojených státech v roce 2021.

VIN je chemoterapeutické léčivo používané k léčbě mnoha typů rakoviny jako je akutní lymfocytární leukémie, akutní myeloidní leukémie, Hodgkinova choroba, neuroblastom a malobuněčná rakovina plic. Je známý též pod názvem leukristin a prodává se pod značkou Oncovin. VIN funguje tak, že se naváže na tubulinový protein a tím zastaví polymeraci tubulinových dimerů za vzniku mikrotubulů. To způsobí, že buňka není schopna oddělit své chromozomy během metafáze. Taková buňka poté podléhá apoptóze neboli programované buněčné smrti. Neovlivňuje však takto jen dělení rakovinných buněk, nýbrž i všechny rychle se dělící typy buněk. [22, 23]

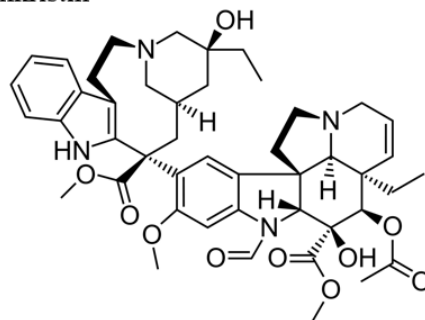
Další účinnou látkou je MID, používá se s jinými chemoterapeutickými léky k léčbě určitých typů akutní myeloidní leukémie. MID se také používá na určité typy mastocytózy. Je zařazen ve třídě léků nazývaných inhibitory kinázy. Funguje tak, že blokuje působení abnormálního proteinu, který signalizuje množení rakovinných buněk, což pomáhá zastavit šíření žírných a rakovinných buněk. Jedná se o polosyntetický derivát staurosporinu, alkaloidu z bakterie *Streptomyces staurosporeus*. [24]

NICL je lékem užívaným při léčbě napadení tasemnicemi, jelikož u nich inhibuje vychytávání glukózy, oxidativní fosforylaci a anaerobní metabolismus. Je studován u řady typů rakoviny a ze studií se ukázalo, že má potenciál působit i proti virovým infekcím, jako je například narušení replikace viru hepatitidy E. Byly zahájeny klinické studie s NICL pro léčbu COVID-19. [25, 26, 27]

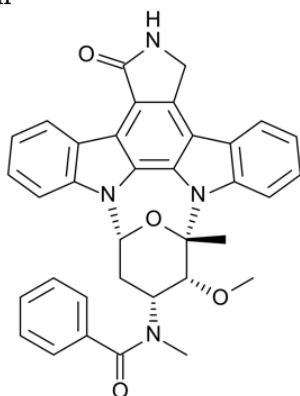
Belumosudil



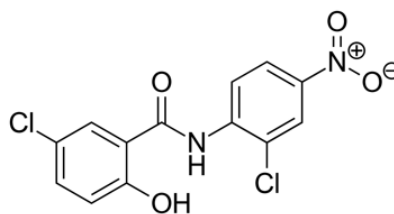
Vinkristin



Midostaurin



Niklosamid

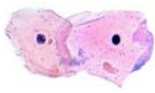

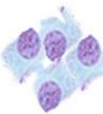
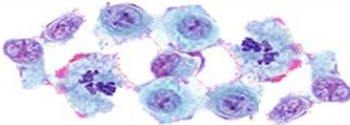

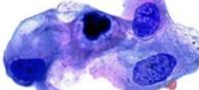
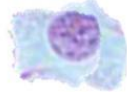



Obrázek 10: Chemické vzorce pro BEL, VIN, MID a NICL. [27]

4. Nádorové buňky

Nádorové onemocnění je definováno jako onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému růstu a dělení lidských buněk. Takové buňky se pak mohou šířit do dalších částí těla. Lidské tělo využívá proces dělení buněk k opravám a také růstu. Mateřská buňka se za běžných podmínek dělí a vytváří dvě buňky, které se nazývají dceřiné. Tyto buňky jsou určeny pro tvorbu nové tkáně, anebo k náhradě těch buněk, jež odumřely následkem stáří či poškození. Pokud však dojde k narušení tohoto cyklu, nastává abnormální dělení buněk neboli proliferace. Přeměna normálních buněk na nádorovou závisí na vícero krocích, které vedou na změnu buněčné funkce a struktury. Mezi hlavní vlastnosti nádorových buněk patří nezávislost na tvorbě růstových faktorů, neomezený replikační potenciál, zvýšená proliferace, rezistence k buněčné smrti, schopnost indukovat angiogenezi a zvýšená invazivita a tvorba metastáz. Tyto charakteristické vlastnosti se projeví tím, že se nádorové buňky dopracují ke svému agresivnímu až ničivému fenotypu. Tento nový fenotyp buněk vzniká postupnou změnou genotypu buňky, který je následován mutacemi dceřiných buněk. Přeměna buňky zdravé v buňku nádorovou je tedy onemocněním buněčného cyklu, který může být ovlivněn několika faktory. Patří sem například karcinogenní látky, viry, kvalita potravin, genetické vlivy, chronický stres a ultrafialové záření.

Nádorová buňka v porovnání s normální buňkou má při kultivaci neomezenou schopnost růstu. Kultura je nesmrtelná, takže vzniká neomezený počet generací. Dále má nižší požadavky na množství proteinových růstových faktorů v kultivačním médiu a nemá zachován svůj charakteristický tvar. Dalším specifikem nádorových buněk je jejich získaná rezistence k apoptóze neboli jejich programované buněčné smrti. [28, 29, 30]

Normální buňka	Nádorová buňka	
		Velká a specificky tvarovaná jádra
		Velké množství dělících se buněk Neuspořádanost buněk
		Změna tvaru a velikosti
		Ztráta fyziologických rysů

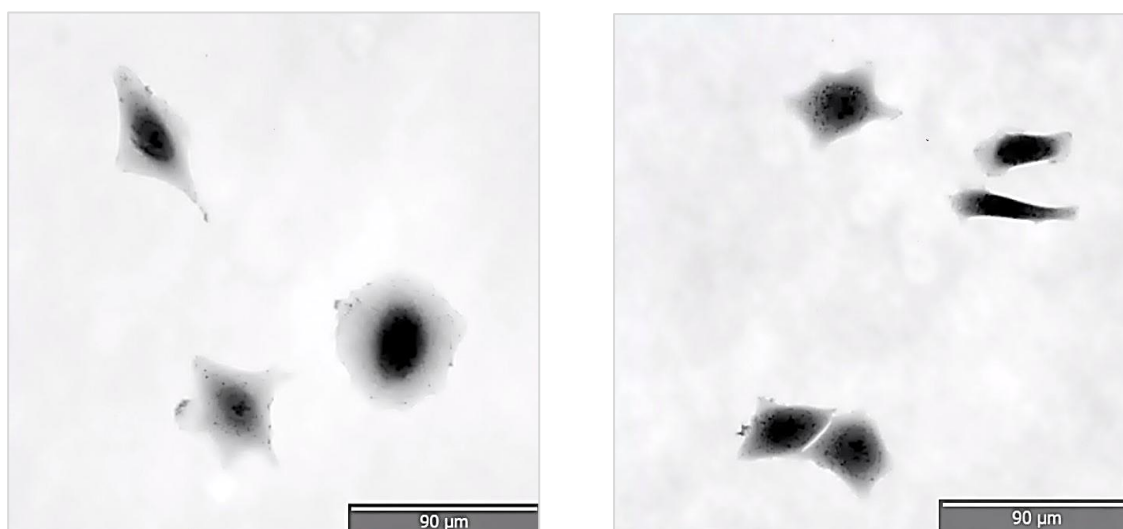
Obrázek 11: Popis rozdílů mezi normální a nádorovou buňkou. [30]

4.1. Nádorové buňky A549 a MCF7

Tato diplomová práce se zabývá výzkumem lidských živých nádorových buněk A549 a MCF7.

Buňky A549 jsou epiteliální buňky karcinomu plic, které tvoří buněčnou linii. Jsou běžně používanou buněčnou linií lidského nemalobuněčného karcinomu plic jak pro základní výzkum, tak pro objevování léků. A549 se skládá z hypotriploidních alveolárních bazálních epiteliálních buněk. Tato buněčná linie byla poprvé vyvinuta DJ Giardem a kol. roku 1972 odstraněním a kultivací tkáně plicního karcinomu 58letého muže. Buňky mají skvamózní povahu a jsou zodpovědné za difúzi vody a elektrolytů přes alveoly. Při kultivaci *in vitro* tyto buňky rostou jako monovrstva přilnutá ke kultivační nádobě. Mají schopnost syntetizovat lecitin a obsahují vysoké procento nenasycených mastných kyselin, jejichž úkolem je udržování membránových fosfolipidů. Tyto buňky jsou velice užitečné pro *in vitro* a *in vivo* testování nových léků. Déle se využívají pro modelování alveolárního plicního epitelu typu II. Studie ukázaly, že to může být zvláště užitečné ve studiu metabolického zpracování plicní tkáně a pro identifikaci mechanismů dodávání léků do tkáně. Buněčná linie A549 byla využita nejen pro studium rakoviny plic, ale též pro jiné infekce související s plícemi, jako jsou alergie, astma a infekce dýchacích cest. [31, 32]

Dalšími buňkami jsou buňky MCF7, jedná se o buněčnou linii rakoviny prsu. MCF7 je zkratkou pro Michigan Cancer Foundation-7 odkazující na institut v Detroitu. Tato buněčná linie byla poprvé izolovaná v roce 1970 z prsní tkáně 69leté ženy. Ze dvou mastektomií, které prodělala, byla první benigní. Z druhé odebrané tkáně o pět let později byl odhalen maligní adenokarcinom v pleurálním výpotku, z něj vznikla buněčná linie MCF7. Buňky MCF7 jsou užitečné pro studie rakoviny *in vitro* v důsledku toho, že si buněčná linie zachovává několik charakteristik specifických pro epitel mléčné žlázy. Patří mezi ně schopnost těchto buněk zpracovávat estrogen ve formě estradiolu prostřednictvím estrogenových receptorů v buněčné cytoplazmě. [33, 34]



Obrázek 12: Buněčná linie A549 (vlevo) a buněčná linie MCF7 (vpravo). Byl použit objektiv se zvětšením 20x, NA 0.5 a zorným polem 298,8 x 298,8 µm. Měřítka 90 µm.

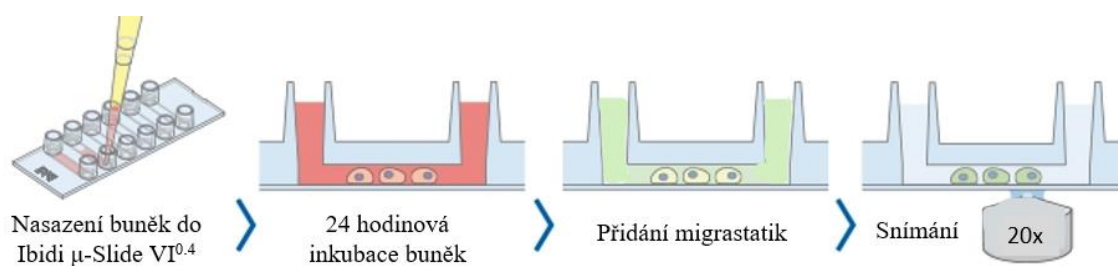
4.2. Příprava a měření nádorových buněk

Buněčné linie A549 a MCF7, jež byly popsány v předcházející kapitole, byly před vlastním snímáním pomocí CCHM kultivovány při teplotě 37 °C v inkubátoru s 3,5% CO₂. Bylo použito standardní médium Eagle MEM s 10% fetálním bovinním sérem, 20 μM gentamicinu a 2 mM L-glutaminu. Médium Eagle MEM je syntetické médium pro kultivaci buněk, které se používá k udržení buněk v tkáňové kultuře. Je složeno ze 6 solí, konkrétně chloridu vápenatého, chloridu draselného, chloridu sodného, síranu hořečnatého, fosforečnanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného. Dále je složeno z glukózy a doplněno esenciálními aminokyselinami a vitamíny. Koncentrace aminokyselin souvisí s proteinovým složením lidských buněk. Díky větším koncentracím živin, lze zachovat delší intervaly mezi výměnou či doplněním média. Eagle MEM je jedním z nejvíce používaných buněčných kultivačních médií, [35, 36]

Pro časoběrné snímání bylo toto médium obohaceno o 20 mM HEPES, aby bylo dosaženo pH 7,4. HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová) je pufrovací činidlo široce využívané v buněčných kulturách, hlavně kvůli svojí schopnosti udržovat fyziologické pH při změnách koncentrace oxidu uhličitého. [37]

Pro měření byla využita průtoková komůrka s 6 kanálky, konkrétně Ibidi μ-Slide VI^{0.4}. Díky této průtokové komůrce lze zobrazovat buňky v reálném čase za statických či průtokových podmínek. Ibidi μ-Slide VI^{0.4} je tedy vhodné pro pozorovací experimenty s malým počtem buněk a nízkými objemy činidel. Nádorové buňky v kultivačním médiu se připraví do zmíněného Ibidi plata 24 hodin před jejich mikroskopováním. Buňky během této doby přilnou ke dnu sklíčka a těsně před mikroskopováním se pomocí pipety nahradí kultivační médium médiem s migrastatiky. [38]

V rámci této diplomové práce byly použity následující molární koncentrace potenciálních migrastatik, která byla popsána v 3. kapitole.



Obrázek 13: Schéma postupu přípravy vzorku. [38]

Tabulka 3: Molární koncentrace migrastatik.

Migrastatikum	Molární koncentrace
BEL	1 uM
VIN	100 nM
MID	1uM
NICL	1 uM

Po přípravě samotných buněk se Ibidi μ -Slide VI^{0.4} vkládá do objektového ramene mikroskopu, který je opatřen motorizovaným stolcem pro vícepolohové časosběrné snímání. V každém kanálku průtokové komůrky bylo nalezeno 5 vhodných pozic, které byly po dobu 20 hodin snímány s intervalem 5 minut. Pro pozorování morfologických změn nádorových buněk byl zvolen objektiv 20x s numerickou aperturou 0.5 a zorným polem 298,8 x 298,8 μm . Q-Phase je vybaven vlastním softwarem SophiQ, který je speciálně vyvinut jak pro správné nastavení časosběrného snímání, tak i pro následnou segmentaci a analýzu naměřených dat. Pro analýzu v rámci této diplomové práce byly použity zejména tyto parametry: hmotnost, plocha, hustota, kruhovitost neboli zakulacení buněk, index meandrovitosti, Euklidovská vzdálenost. [3]

Pro výpočet hmotnosti byl použit následující vzorec:

$$Hmotnost = \frac{0,65 \cdot \text{šířka pixelu} \cdot \text{výška pixelu} \cdot \sum_{\text{pro každý pixel buňky}} \varphi}{0,18 \cdot 2\pi}. \quad (6)$$

Dále pro výpočet plochy [μm^2]:

$$Plocha = \text{počet pixelů v celku} \cdot \text{šířka pixelu} \cdot \text{výška pixelu}. \quad (7)$$

Výpočet hustoty [$\text{pg}/\mu\text{m}^2$]:

$$Hustota\ buněk = \frac{Hmotnost}{Plocha}. \quad (8)$$

Výpočet kruhovitosti buněk [%]:

$$Zakulacení = \frac{100 \cdot 4 \cdot \pi \cdot plocha}{Perimetr^2}. \quad (9)$$

Pro výpočty vztahující se k mobilitě buněk je zapotřebí znát vážené těžiště buněk.

Vážené těžiště (CW) [μm , μm]:

$$CW = \frac{\sum_{\text{pro každý pixel buňky}} \text{Pozice pixelu} \cdot \text{Velikost pixelu} \cdot \varphi}{\sum_{\text{pro každý pixel buňky}} \varphi}. \quad (10)$$

Euklidovská vzdálenost [μm]:

$$EDist_{(t)} = CW_{(t)} - CW_{(t-1)}. \quad (11)$$

Index meandrovitosti [%]:

$$Index\ meandrovitosti_{(t)} = 100 \cdot \frac{E_{ist}(t)}{\sum_{i=0}^{t-1} |CW_{(t)} - CW_{(t-1)}|}. \quad (12)$$

5. Analýza fenotypových změn

Z hlediska morfologických změn nádorových buněk pod vlivem migrastatik se tato práce bude zajímat hlavně o buněčnou smrt, dělení buněk a míru invazivity fenotypu. Pochopení průběhu buněčné smrti je důležité k určení, o jaký typ buněčné smrti se jedná. Tyto skutečnosti mohou být užitečné pro plánování terapeutických přístupů a navrhování léčiv ovlivňujících nádorová onemocnění. Buňky mohou podlehnout různými způsoby buněčných smrtí, mezi která patří apoptóza, nekróza, autofagie a onkóza. Tato práce se zaměřuje na apoptózu a nekrózu, především na jejich fenotyp, a tedy morfologické změny. [3, 39, 40]

Pozorování morfologických změn nádorových buněk A549 a MCF7 pomocí hiQPI dovoluje měřit a následně i vyhodnocovat tyto změny navozené léčivy BEL, MID, NICL a VIN. Pro zkoumání komplexního účinku potenciálních migrastatik k analýze růstu a migraci buněk se zavedla nová metoda s názvem RAC-GM (Rapid assessment of cell growth and migration, Rychlé vyšetření růstu a migrace buněk in vitro). Tento způsob vyhodnocování účinků léčiv na nádorové buňky spojuje výsledky získané z více objektivů na CCHM. Prvním kritériem pro vhodného kandidáta na migrastatikum je léčivo negativně ovlivňující migraci nádorových buněk. Toto zjištění by bylo odhaleno s objektivy 4x a 10x. Druhým kritériem je, aby léčivo nezpůsobilo žádné výrazné morfologické změny nebo případně buněčnou smrt i u normálních buněk, což se odhalí s objektivy 10x, 20x a 40x.

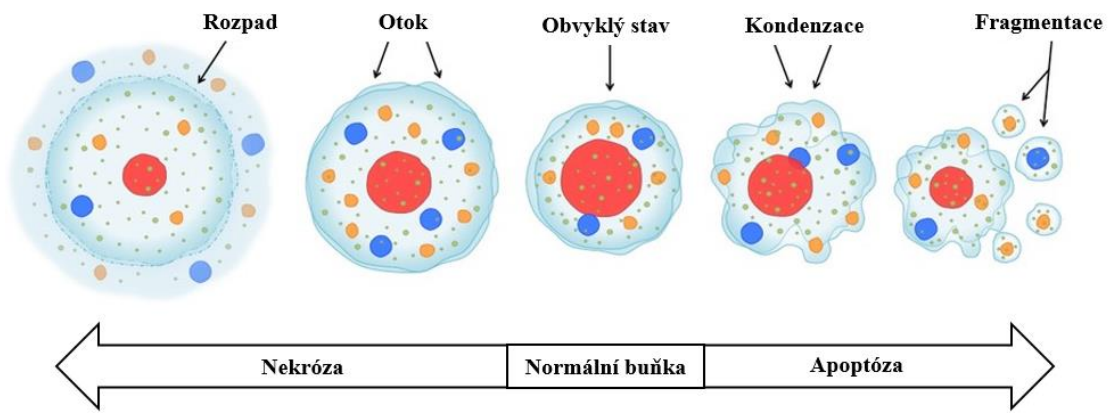
5.1. Nekróza vs. apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je proces charakteristický svými odlišnými morfologickými znaky a energeticky závislými biochemickými mechanismy. Apoptóza je zodpovědná například za správnou funkci imunitního systému, embryonálního vývoje a chemicky indukované buněčné smrti. Apoptóza je obranný mechanismus vyskytující se při imunitních reakcích nebo v případě poškození buněk nemocí nebo jinými škodlivými faktory. Je také zodpovědná za homeostatický mechanismus pro udržení buněčných populací ve tkáních. Důležitou roli hraje i během vývoje, kdy je zodpovědná kupříkladu za proces vzniku prstů, kdy dochází k odstranění tkáně mezi prsty. Je-li apoptóza nadměrná anebo nedostatečná, může být faktorem mnoha lidských stavů jako jsou např. neurodegenerativní onemocnění, ischemická poškození, autoimunitní poruchy a vzniku mnoha typů rakoviny. Apoptózu spouští široká škála stimulů a stavů, které mohou být jak fyziologické, tak patologické. Ne všechny buňky umírají v reakci na stejný stimul. Například léky používané k chemoterapii naruší DNA v některých buňkách, což vede k apoptotické smrti. Apoptóza je koordinovaný a většinou na energii závislý děj zahrnující aktivaci skupiny cysteinových proteáz nazývaných „kaspázy“ a komplexní kaskádu událostí, které spojují iniciační stimuly s definitivním zánikem buňky. Díky mikroskopickým technikám lze identifikovat různé morfologické

změny vyskytující se během apoptózy, jako je smršťování buňky, pyknotizace jádra, fragmentace do apoptotických tělísek a fagocytóza okolními buňkami. Apoptózu je možné rozdělit do biochemicky a morfologicky odlišných fází. V první fázi spouští proapoptotické podněty aktivaci centrálního molekulárního aparátu apoptózy (fáze iniciace). Ve druhé fázi se molekulární popravčí mechanismus plně aktivuje a až ve třetí degradační fázi se projevují znaky apoptózy. Nástup apoptózy je patrný zejména smrštěním buňky a jádra, probíhá kondenzace jaderného chromatinu (pyknóza) a později jádro postupně kondenzuje a rozpadá se (karyolýza). Dochází k tvorbě tzv. blebů, což jsou výdutě plazmatické membrány, aby mohlo dojít k vytvoření samostatné membrány kolem odděleného buněčného materiálu. Tato apoptotická tělíska jsou tvořena buněčnými organelami a fragmenty jádra. Apoptotická tělíska jsou dále fagocytována okolními buňkami. Uvnitř těchto buněk lze i rozpoznat apoptotická tělíska, po určitém čase ale dochází k jejich degradaci. Pokud fragmentovaná buňka není fagocytována, tak podléhá degradaci podobající se nekróze a tento jev se nazývá sekundární nekróza. Apoptóza probíhá bez přidruženého zánětu, který by nastal důsledkem uvolňování intracelulárního obsahu do tkání. [41, 42, 43]

Apoptóza je v kontrastu s nekrózou, což je buněčná smrt způsobená v důsledku patologického procesu. Jedná se o nekontrolovanou buněčnou smrt, jež má za následek otok buněčných organel, prasknutí plazmatické membrány a případnou lýzu buněk a rozlití intracelulárního obsahu do okolní tkáně, což vede k jejímu poškození. Na rozdíl od apoptózy generované z vnitřních signálů, k nekróze dochází následkem škodlivého stimulu přicházejícího z vnějšího prostředí buňky a proces je téměř vždy spojen se zánětlivými reakcemi. Pokud buňka umírá na nekrózu lze pozorovat typické morfologické znaky lišící se od apoptózy. Mezi běžné znaky strukturální znaky nekrózy patří otok plazmatické membrány, tvorba cytoplazmatických vakuol, ruptura mitochondrií a lyzozomálních organel a případný rozpad plazmatické membrány vedoucí k uvolnění cytosolického obsahu do extracelulární oblasti. Mikroskopicky lze pozorovat zvětšení buňky s vyšším obsahem vody. Může nastat karyolýza, kdy se jaderný obsah rozpouští a vyplavuje se přes jaderný obal nebo karyorhexe, kdy se jádro fragmentuje na hrudky nepravidelného tvaru a poté postupně vymizí. Třetí možnost je, že nastane pyknóza, kdy se kondenzuje chromatin a jádro se následně rozpadne.

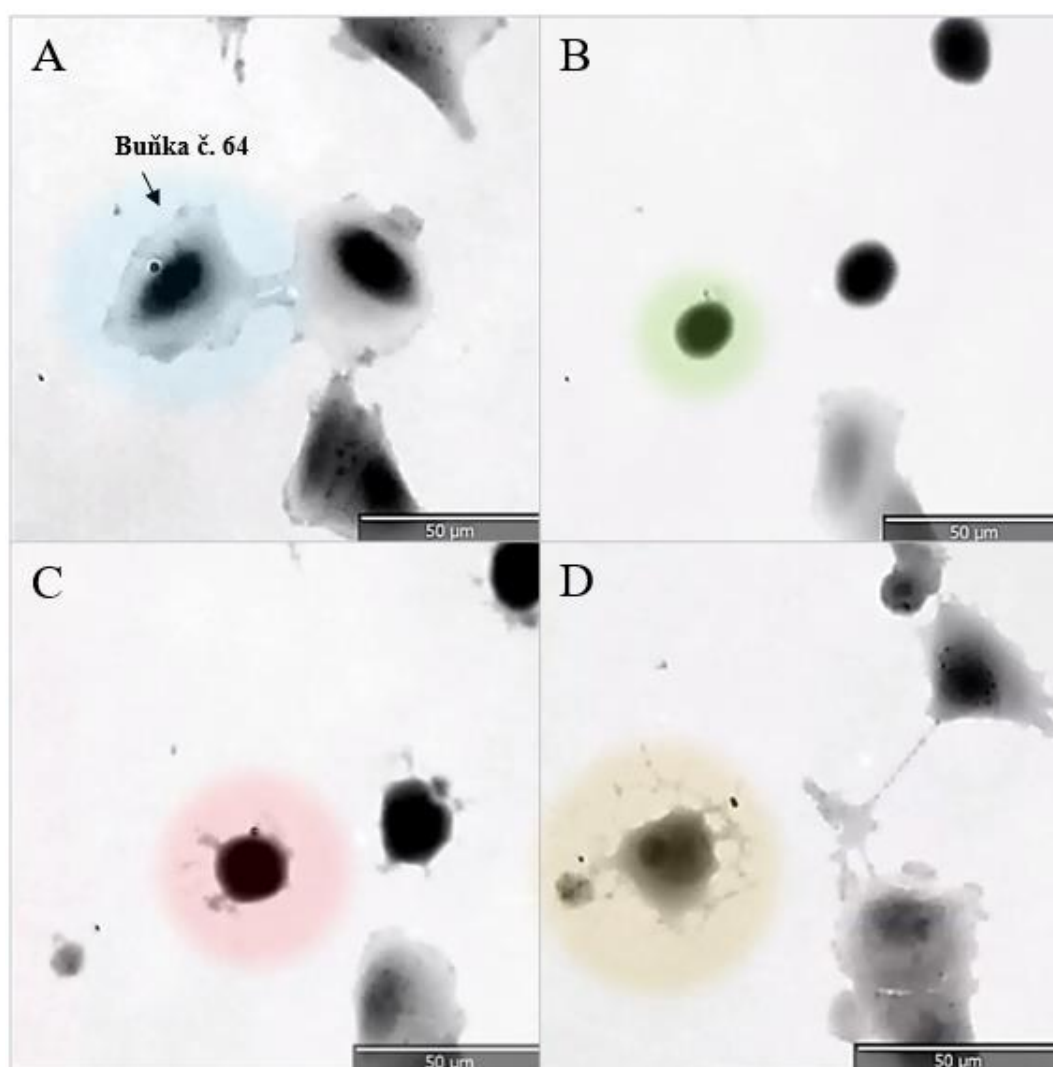
Přesná morfologie nekrotických buněk je variabilní v závislosti na vlastnostech původce zániku buňky. Termín nekróza se netýká pouze změn, ke kterým dochází během buněčné smrti, ale také degradace po odumření buněk. I apoptotické buňky mohou podléhat sekundární nekróze poté, co byla provedena odlišná apoptotická morfologie. U nekrotických buněk chybí aktivace specifických kaspáz a fragmentace DNA, jako je tomu u apoptózy. Také na rozdíl od apoptózy jde o nekontrolovatelný a pasivní proces postihující velké pole buněk, jelikož apoptóza je řízený a energeticky závislý děj omezující se na jednotlivé či malé shluky buněk. Poškození nekrotických buněk je zprostředkováno dvěma hlavními mechanismy, a to zásahem do energetického zásobování buňky a přímé poškození buněčných membrán. Příčiny nekrózy mohou být fyzikální, chemické nebo biologické. [44, 45, 46, 47]



Obrázek 14: Ilustrace změny buňky v průběhu apoptózy a nekrózy. [47]

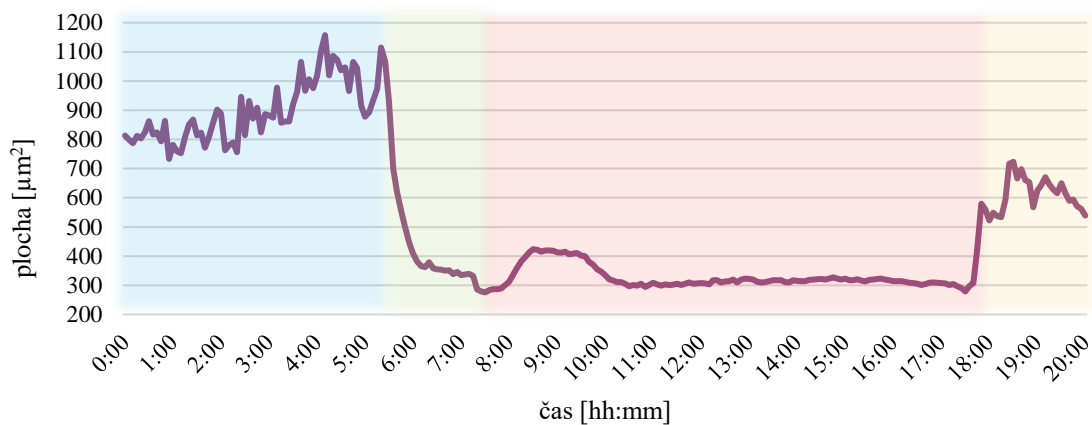
5.2. Ukázka apoptózy

Pro názornou demonstraci buňky podléhající apoptóze byla vybrána konkrétní buňka z buněčné linie A549. Buňce bylo po segmentaci přiřazené číslo 64 (viz obr. 15) Tato buňka byla pod vlivem VIN. Na snímku A lze pozorovat buňku předtím, než podlehla apoptóze. Ze snímku lze rozlišit její jádro od cytoplazmy a je možno pozorovat i celistvost plazmatické membrány. Na dalším snímku B je již buňka smršťená a není možné rozlišení jejích vnitřních struktur, zde probíhá kondenzace jádra. Oproti třetímu snímku C je však stále zachována celistvost membrány. To tedy již neplatí pro následující fázi apoptózy (snímek C). Zde vznikají tzv. bleby, tedy výduťe měnící dosavadní kruhovitý tvar buňky. V posledním záběru buňky (D) je znázorněna počínající fragmentace do apoptotických tělísek.

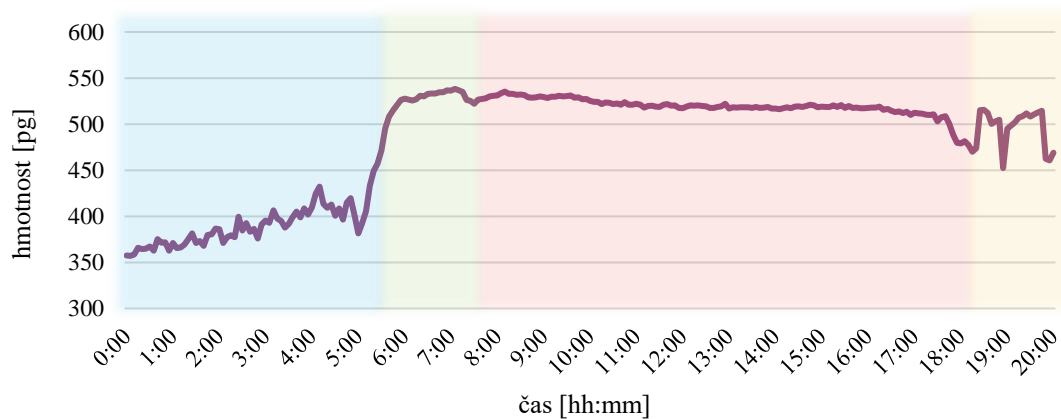


Obrázek 15: Demonstrace buňky během apoptózy pomocí CCHM. Snímky pořizeny v časech A) 1:00, B) 6:30, C) 9:00, D) 19:00. Byl použit objektiv se zvětšením 20x, NA 0,5 a zorným polem 298,8 x 298,8 µm. Měřítka 50 µm.

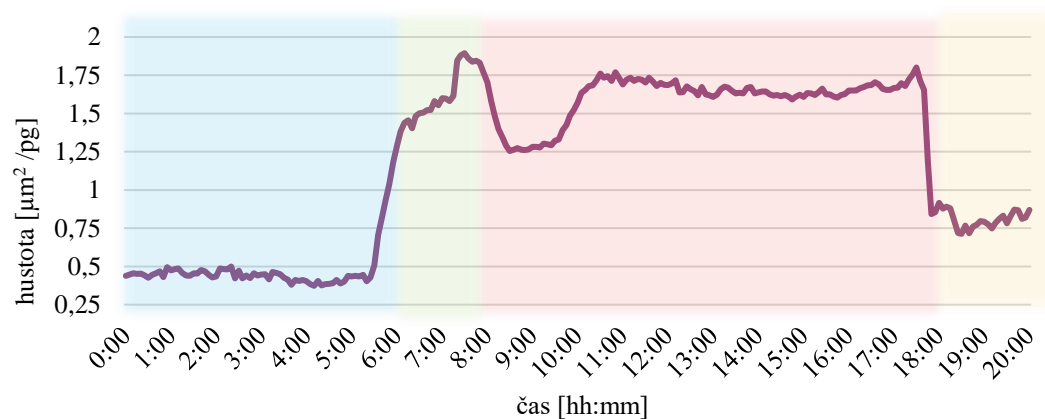
V následujících grafech je znázorněn časový průběh apoptózy konkrétní buňky č. 64. Grafy ukazují, jak je ovlivněná plocha, hmotnost, hustota a kruhovitost buňky v závislosti na čase.



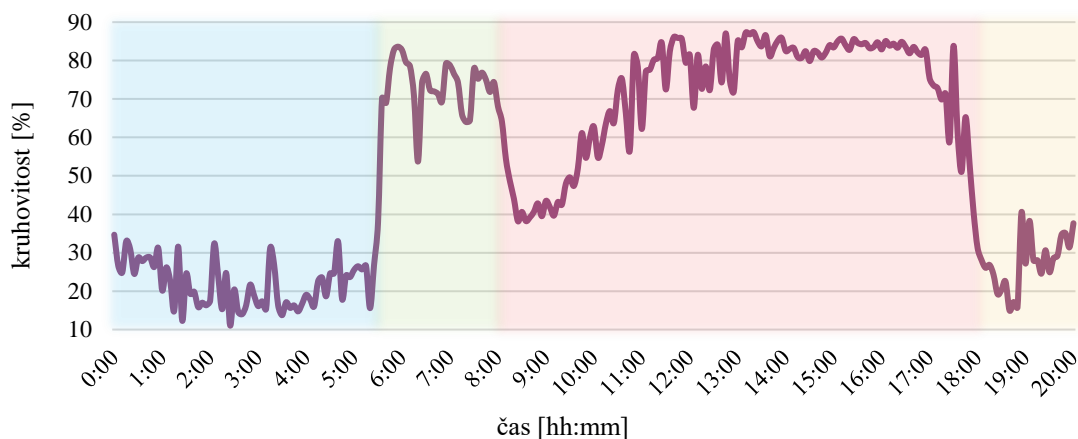
Obrázek 16: Graf závislosti plochy buňky č. 64 na čase.



Obrázek 17: Graf závislosti hmotnosti buňky č. 64 na čase.



Obrázek 18: Graf závislosti hustoty buňky č. 64 na čase.

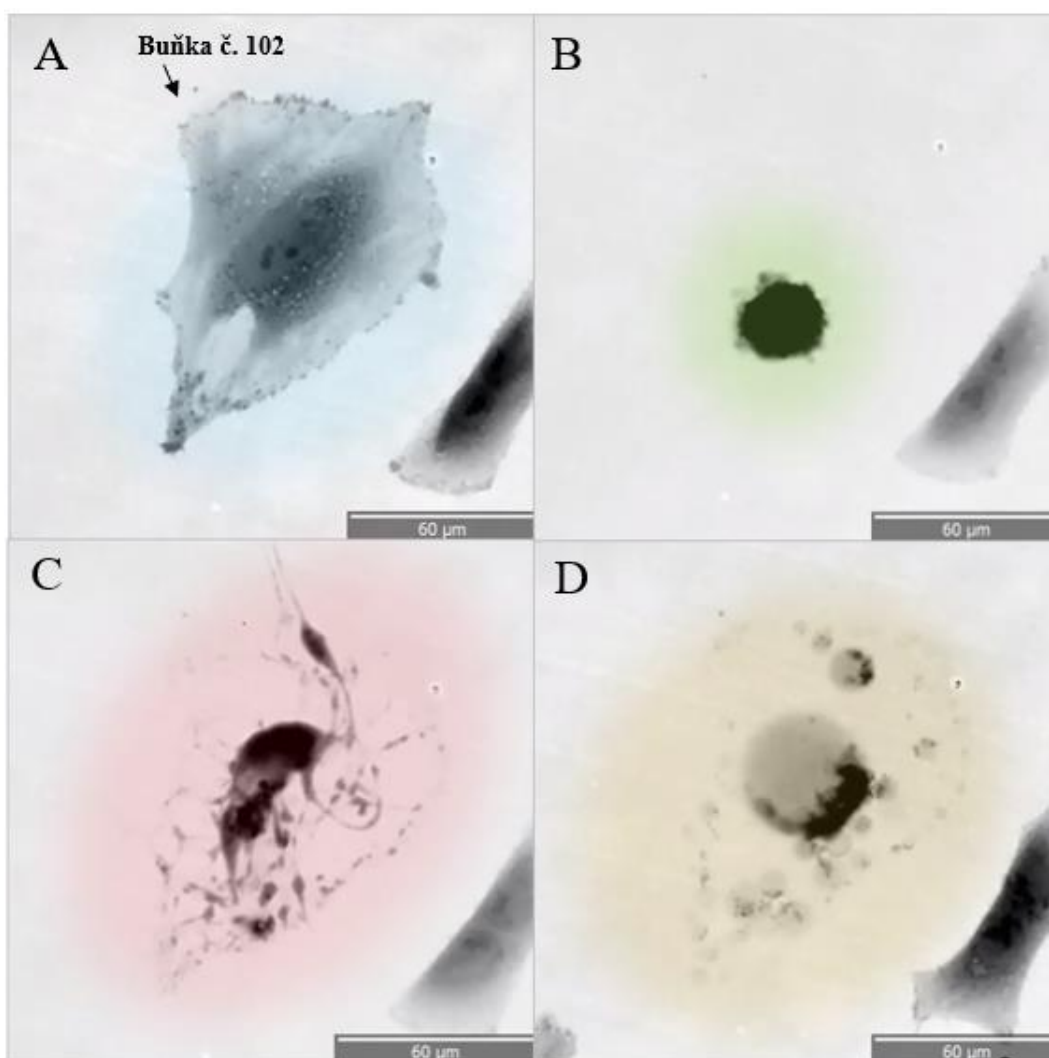


Obrázek 19: Graf závislosti kruhovitosti buňky č. 64 na čase.

Jak vyplývá z uvedených grafů (obr. 16-19), buňka č. 64 začala podléhat apoptóze po 5. hodině měření. Smrštěním jejího obsahu klesla výrazně plocha buňky, a naopak se zvýšila hmotnost, hustota i kruhovitost buňky. Vznik tzv. blebů dle grafu nastal po 8. hodině měření, což je patrné především z grafu kruhovitosti, kdy tvorbou výběžků plazmatické membrány kruhovitost poklesla. Tento pokles je pozorován i u hustoty buňky. Začátek rozpadu buňky na apoptotická tělíčka ukazují všechny uvedené grafy kolem 18. hodiny měření. Nejvíce patrné je to opět z grafu kruhovitosti, kde nastal výrazný pokles skoro až na počáteční hodnoty. Spolu s poklesem kruhovitosti je zřetelný i pokles hustoty. Rozpad buňky je demonstrován i na grafu plochy buňky, jelikož je znatelně menší oproti původnímu stavu buňky před apoptózou.

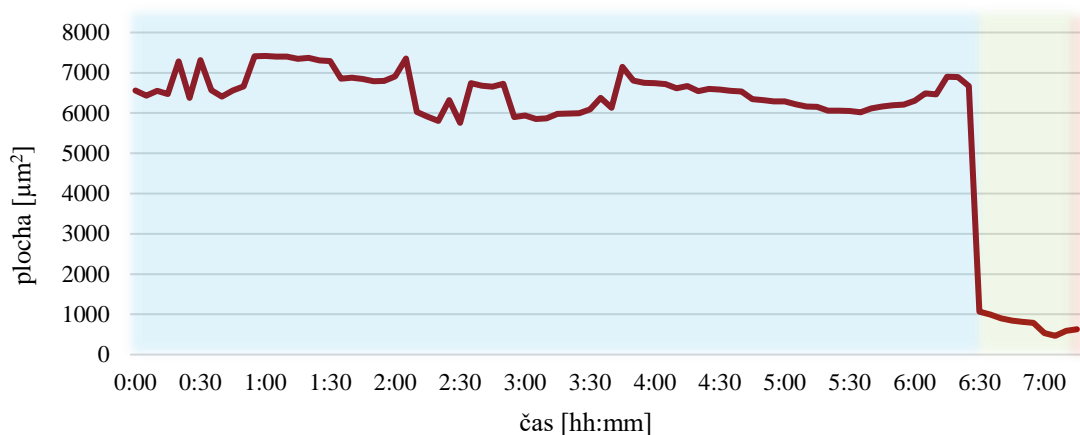
5.3. Ukázka nekrózy

Následující rozbor buňky podléhající nekróze je znázorněn na konkrétní buňce z linie A549, po segmentaci značené číslem 102. Jedná se o buňku pozorovanou pod vlivem MID. Na prvním snímku A je záznam buňky předtím, než podlehla nekróze. Na snímku jsou rozeznatelné vnitřní buněčné struktury buňky a je zachována i celistvost plazmatické membrány. Na snímku B je již zřetelné smršťení a nabobtnání nekrotické buňky, také dochází k destabilizaci plazmatických a organelových membrán. To vede k edému buňky a jejích organel. V důsledku zvýšeného osmotického tlaku nakonec buňka praskne, viz třetí snímek C. Na posledním snímku D je znázorněno uvolňování buněčného obsahu do okolí.

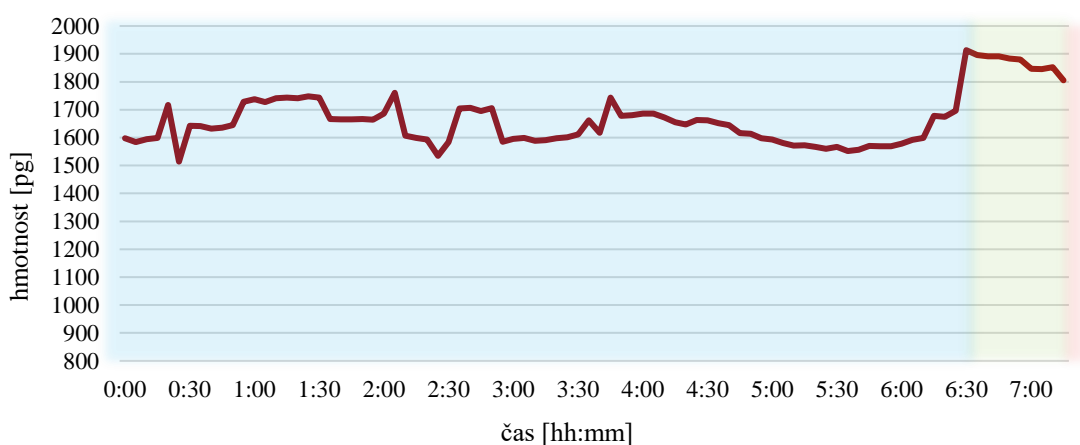


Obrázek 20: Demonstrace buňky během nekrózy pomocí CCHM. Snímky pořízeny v časech A) 1:00, B) 7:00, C) 7:10, D) 9:00. Byl použit objektiv se zvětšením 20x, NA 0,5 a zorným polem 298,8 x 298,8 µm. Měřítka 60 µm.

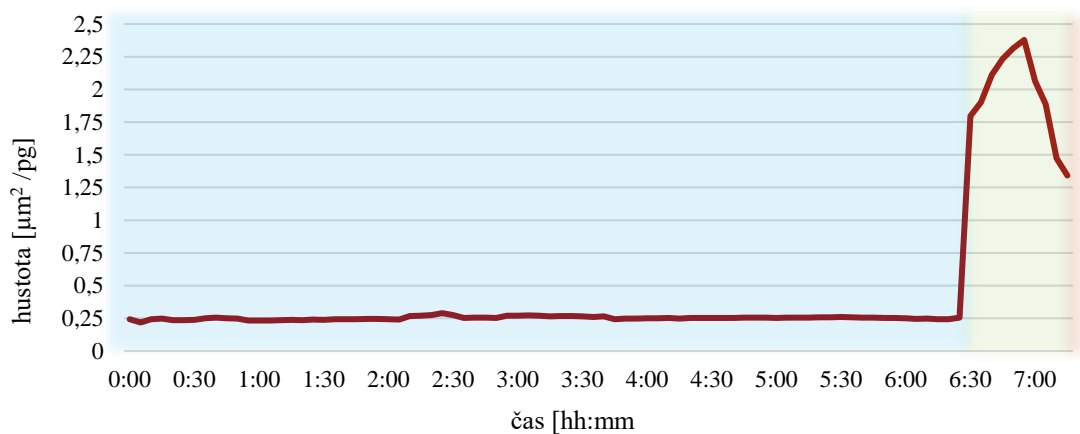
Pomocí následujících grafů je znázorněn časový průběh plochy, hmotnosti, hustoty a kruhovitosti nekrotické buňky. Časový záznam končí po 7. hodině měření, jelikož poté došlo k prasknutí buňky a uvolnění jejího obsahu do okolí.



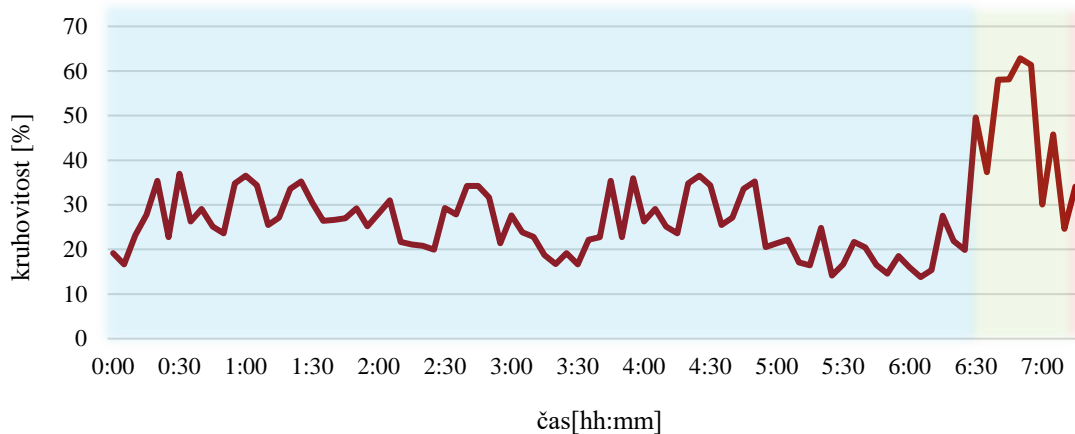
Obrázek 21: Graf závislosti plochy buňky 102 na čase během nekrózy.



Obrázek 22: Graf závislosti hmotnosti buňky 102 na čase během nekrózy.



Obrázek 23: Graf závislosti hustoty buňky 102 na čase během nekrózy.

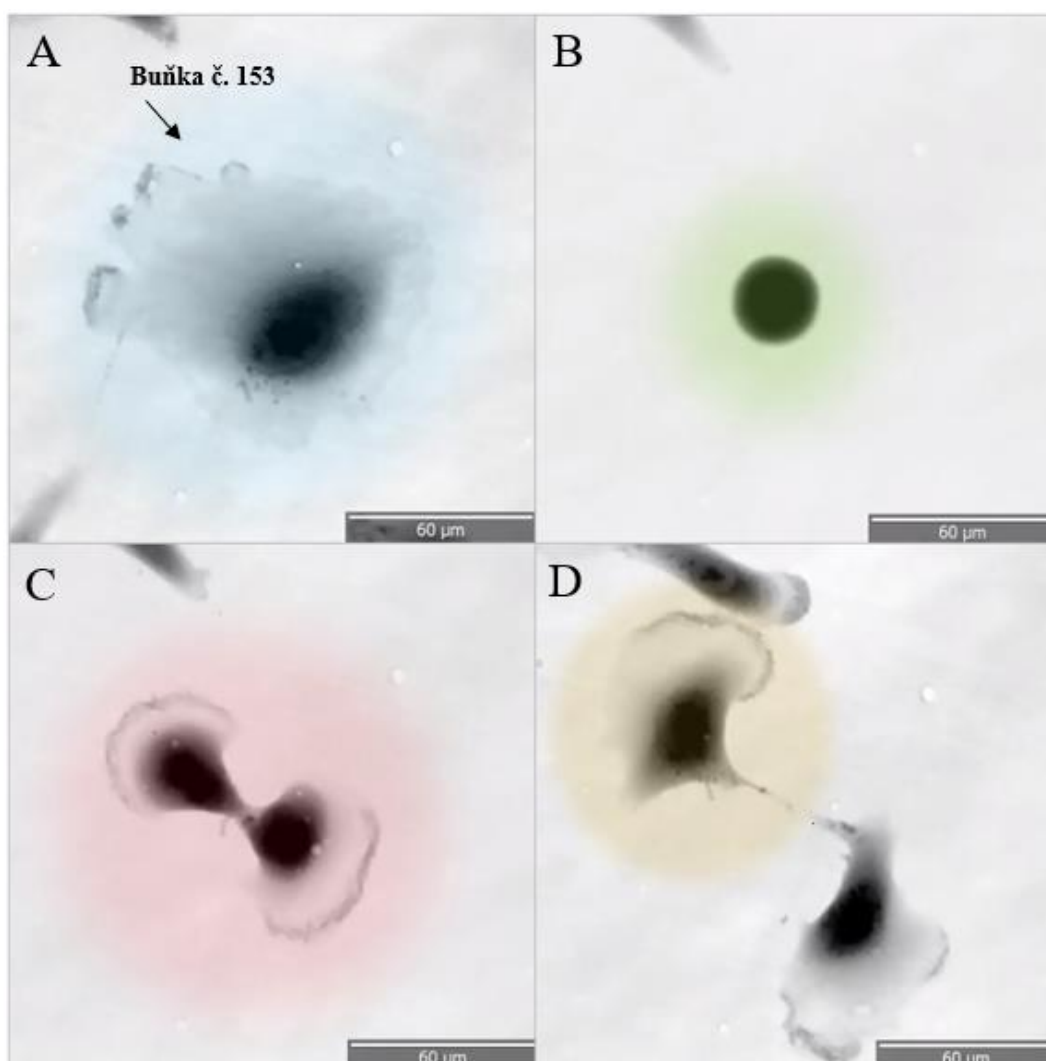


Obrázek 24: Graf závislosti kruhovitosti buňky 102 na čase během nekrózy.

Z přiložených grafů lze demonstrovat časový průběh buňky č. 102 během nekrózy. Po 6. hodině měření je ze všech grafů patrné, že se buňka smrštila a nabobtnala, tedy klesla její plocha a zvýšila se její hmotnost spolu s hustotou. Tento jev je patrný i z grafu kruhovitosti, kde je též patrný nárůst hodnot. Ke konci měření je vidět pokles u všech zkoumaných parametrů. Pravděpodobně je to způsobeno vyhodnocením jedné části buňky během její ruptury předtím, než se ztratila segmentace.

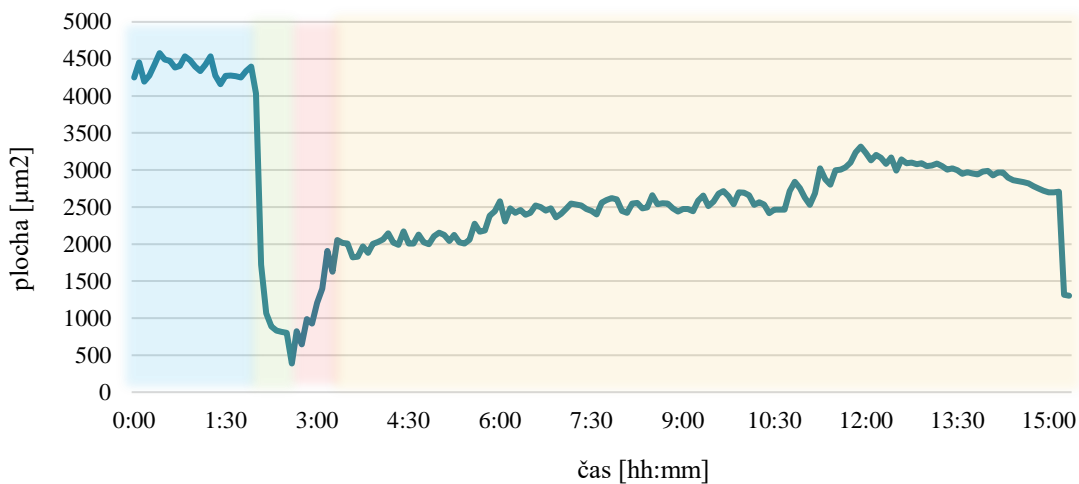
5.4. Ukázka buněčného dělení

V rámci pozorování nádorových buněk pomocí CCHM bylo pozorováno i mnoho případů, kdy docházelo k buněčnému dělení. Pro demonstraci buněčného dělení byla vybrána buňka s označením 153 pocházející z buněčné linie A549. Tato buňka nebyla během měření pod vlivem žádného léčiva. Obrázek č. 24 ilustruje změny v morfologii buňky č. 153 v průběhu jejího dělení. První snímek A ukazuje, jak vypadala buňka před samotným rozdělením. Na snímku B je buňka smrštěná, jelikož zdvojnásobila svůj buněčný obsah a je připravena na rozdělení. Na posledních dvou snímcích C a D je buňka zachycená při samotném dělení na dvě dceřiné.

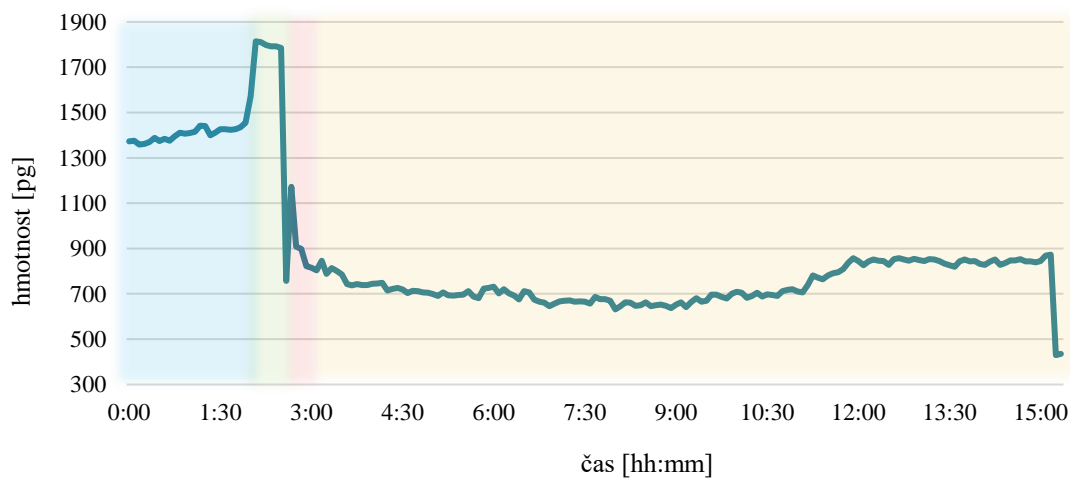


Obrázek 25: Demonstrace buňky během jejího dělení pomocí CCHM. Snímky pořízeny v časech A) 1:00, B) 2:30, C) 3:00, D) 15:00. Byl použit objektiv se zvětšením 20x, NA 0.5 a zorným polem 298,8 x 298,8 µm. Měřítka 60 µm.

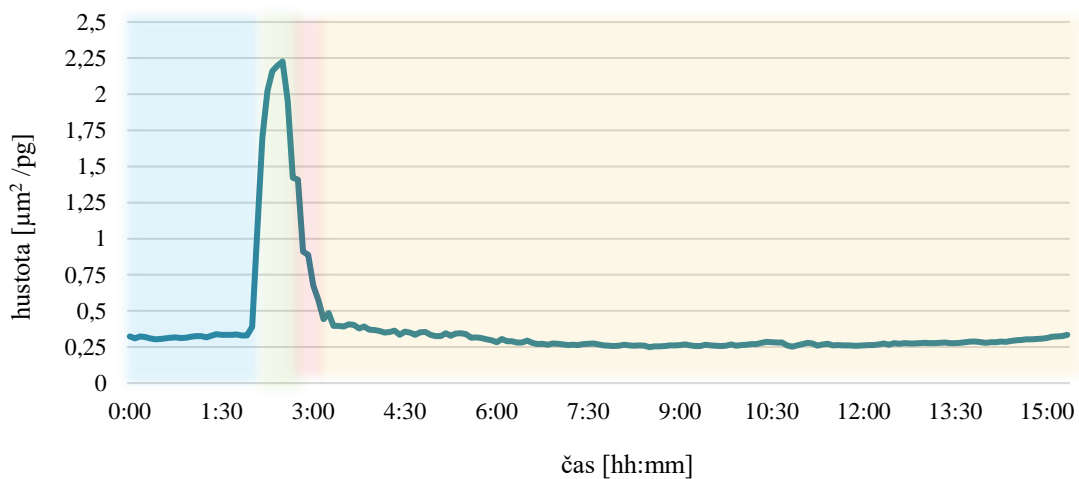
Časový průběh plochy, hmotnosti, hustoty a kruhovitosti dělení buňky č. 153 je ilustrován na následujících grafech.



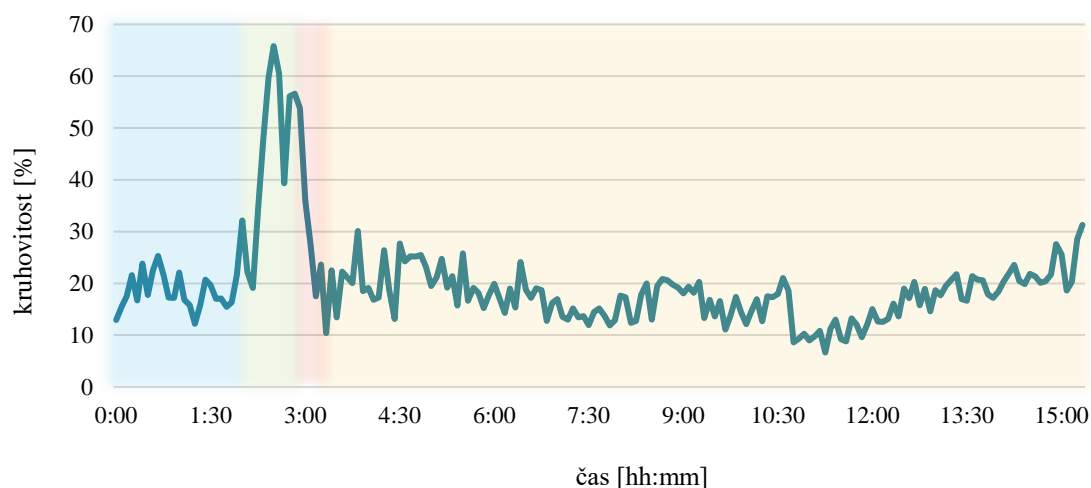
Obrázek 26: Graf závislosti plochy buňky č. 153 na čase během jejího dělení.



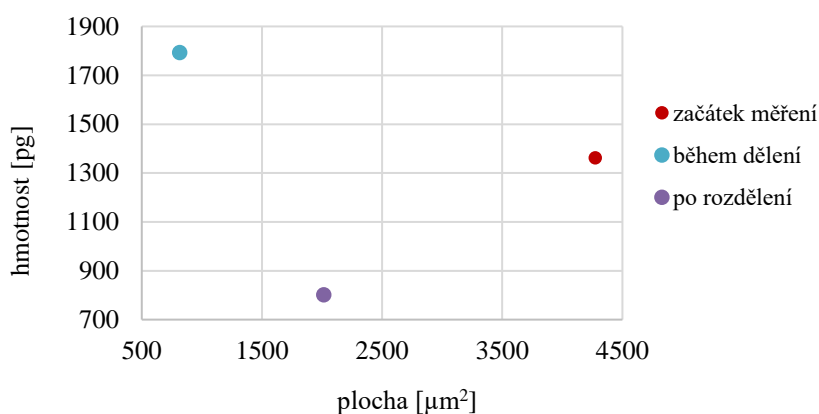
Obrázek 27: Graf závislosti hmotnosti buňky č. 153 na čase během jejího dělení.



Obrázek 28: Graf závislosti hustoty buňky č. 153 na čase během jejího dělení.



Obrázek 29: Graf závislosti kruhovitosti buňky č. 153 na čase během jejího dělení



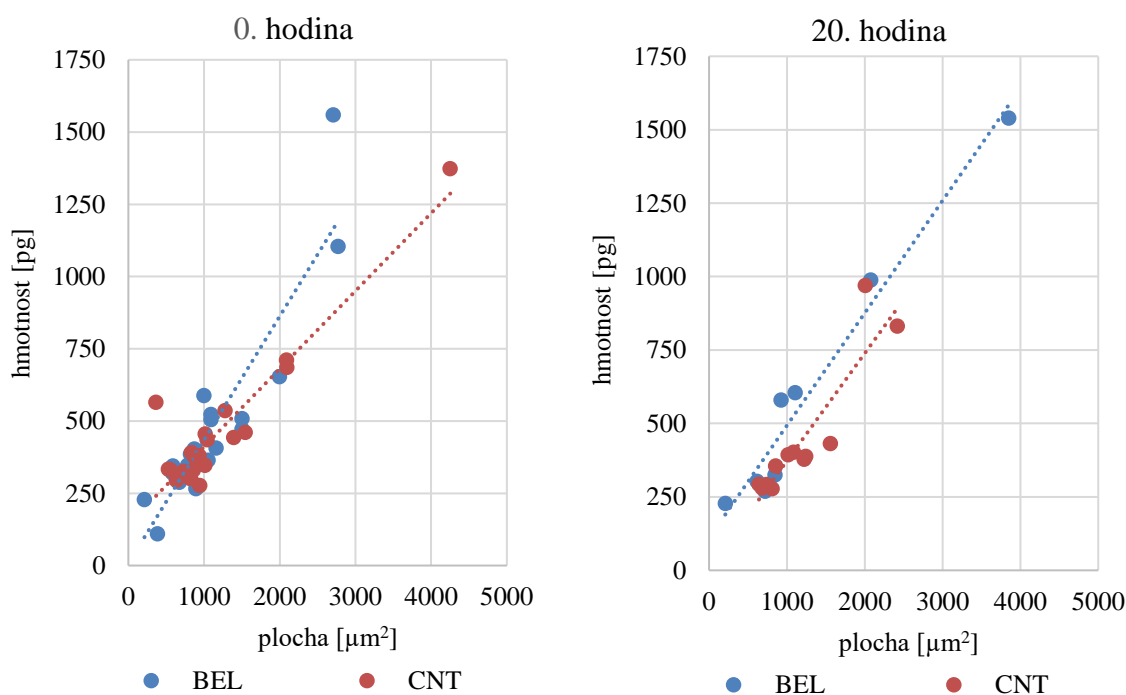
Obrázek 30: Graf závislosti plochy na hmotnosti buňky č. 153 ve třech časových úsecích.

Z výše uvedených grafů vyplývá, jaké morfologické změny buňka podstupuje při buněčném cyklu. Kolem 2. hodiny měření se buňka smrští, což je zřejmé ze všech doložených grafů. Plocha klesá, a naopak se zvyšuje její hmotnost, hustota i kruhovitost. Následně se buňka začíná rozdělovat na dvě, což je demonstrováno zvýšením plochy na zhruba polovinu svojí původní hodnoty. Dále buňka sníží svoji hmotnost na polovinu původní. Porovnání hmotnosti a plochy ve třech časových úsecích (začátek měření, během dělení a po rozdělení buňky) je na obrázku č. 29. Tento graf dokazuje předešlá tvrzení o chování hmotnosti a plochy buňky během dělení. Záznam končí v 15. hodině, jelikož buňka 153. opustila zorné pole objektivu.

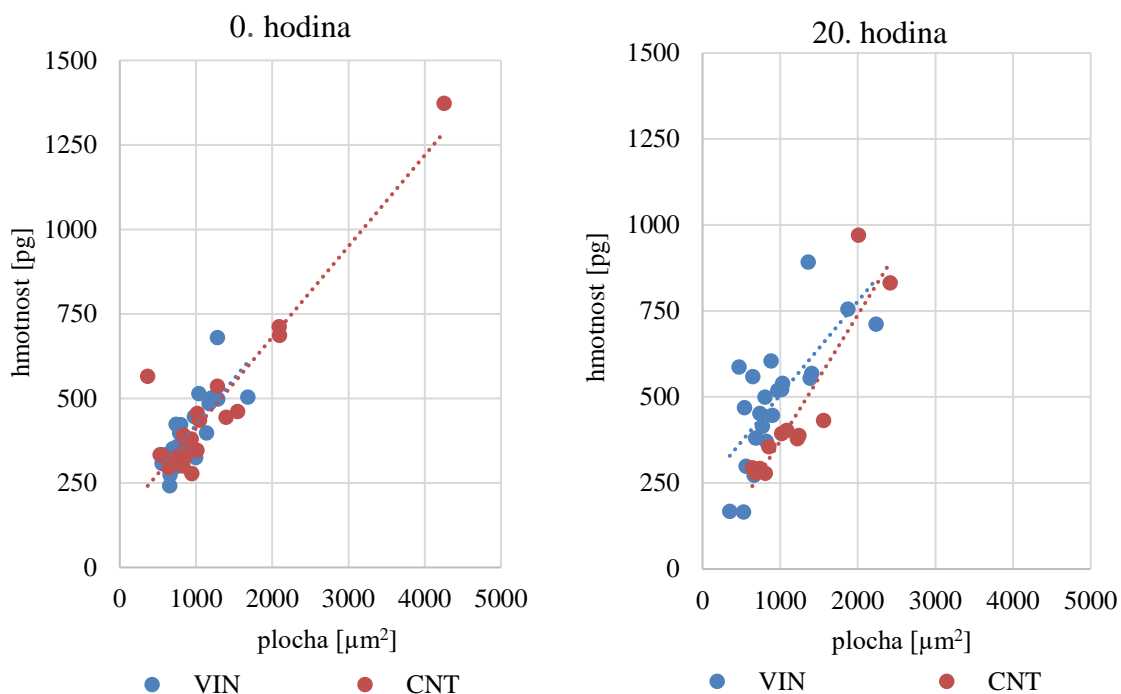
5.5. Analýza buněk A549 ovlivněných migrastatiky

V následujících grafech je znázorněna velikost plochy a hmotnosti konkrétních buněk. Dle těchto grafů je možné odhadnout, zda buňka podléhá apoptóze či nekróze. Apoptotická buňka je méně rozprostřená než buňka nekrotická, tím pádem její poloha v grafu odpovídá menším hodnotám na ose reprezentující plochu. Dále ji můžeme popsat jako více zakulacenou, tzn. má větší hmotnost. Nekróza má sice podobné znaky, ale buňka není až tak zakulacená a je rozsáhlejší. Nelze však jednoznačně z těchto grafů určit, zda buňka opravdu podléhá nekróze či apoptóze, jelikož v daný časový okamžik může u buňky rovněž docházet k jejímu dělení, během něhož se buňka také smršťuje. Dělení buněk na apoptotické či nekrotické dle uvedených grafů tedy není úplně spolehlivé, tato metoda může být spíše brána jako podpůrná možnost určení buněčné smrti buněk.

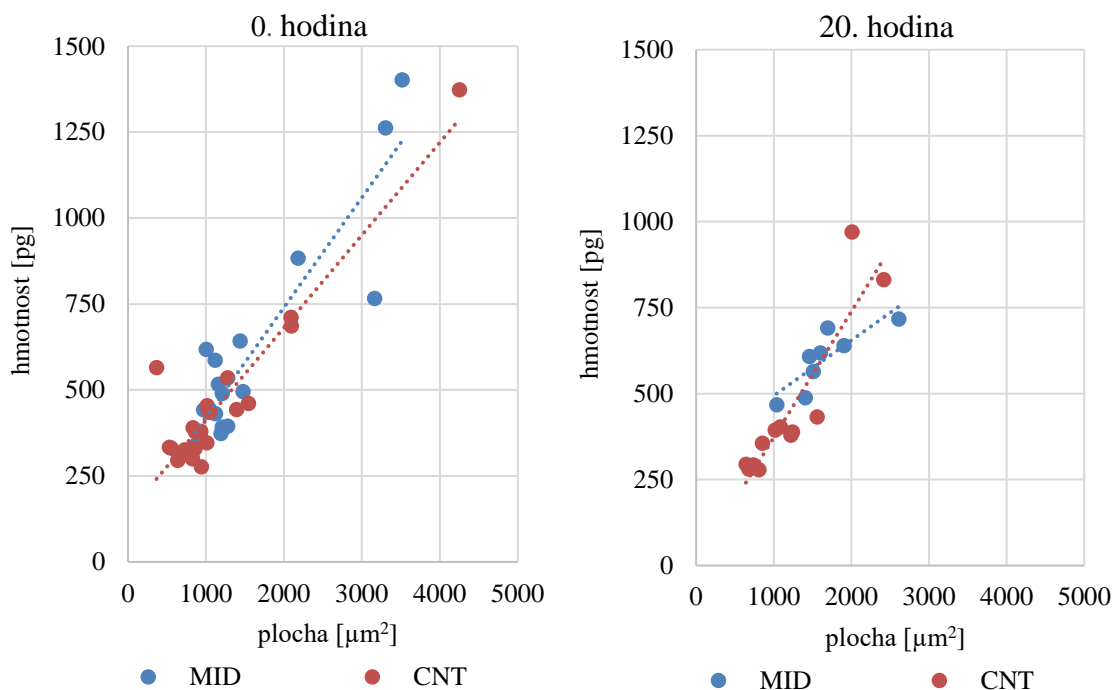
Následující grafy odpovídají měření buněk na začátku časosběrného snímání a na jejím konci, tedy ve 20. hodině měření. V těchto časech, po podrobném zkoumání časových snímků jednotlivých buněk, odpovídá výše zmíněná hypotéza nejvíce. Na začátku, kdy jsou buňky vystaveny vlivu léčiv pouze krátce, je jejich rozložení v grafu různorodé. Není zde zcela patrné, zda se buňka připravuje na rozdělení nebo podléhá apoptóze či nekróze. Při zkoumání buněk v závěru měření lze již pozorovat u buněk ovlivněných léčivem, že buňky nacházející se v levém dolním rohu podléhají nekróze. Toto tvrzení však neplatí pro buňky v CNT, kde se buňky dělí a nekróze či apoptóze podléhají pouze ojediněle. Dále je možné pozorovat, že u grafů z 20. hodiny měření se nachází menší počet buněk, což je způsobeno migrací buněk ze zorného pole objektivu.



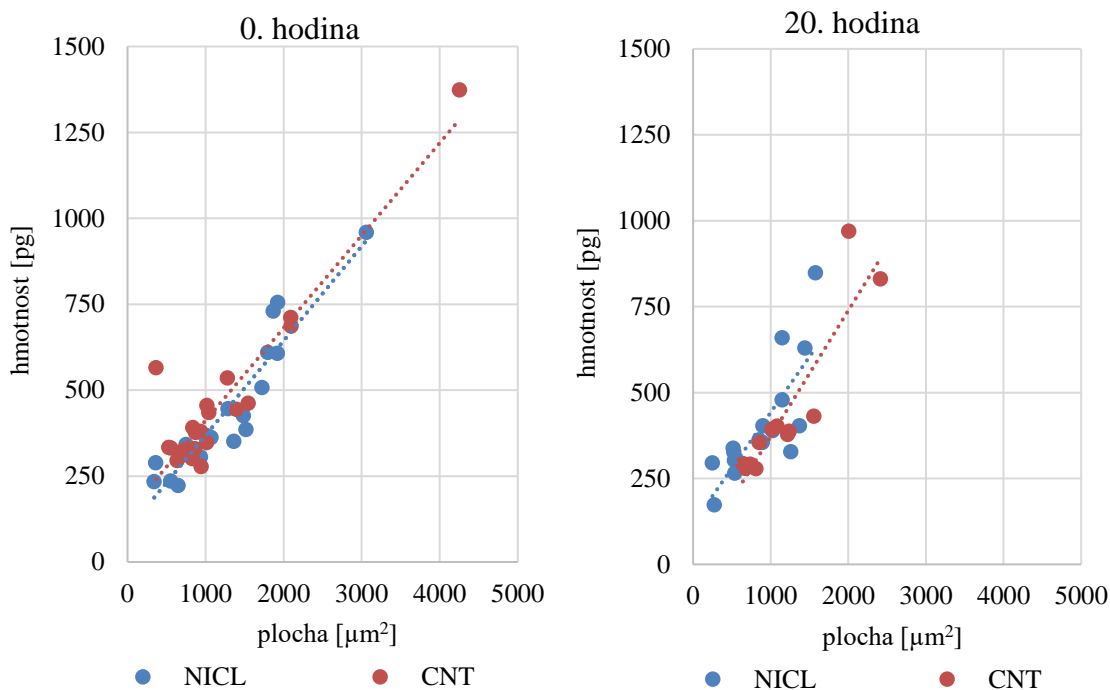
Obrázek 31: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk A549 pod vlivem BEL.



Obrázek 32: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk A549 pod vlivem VIN.



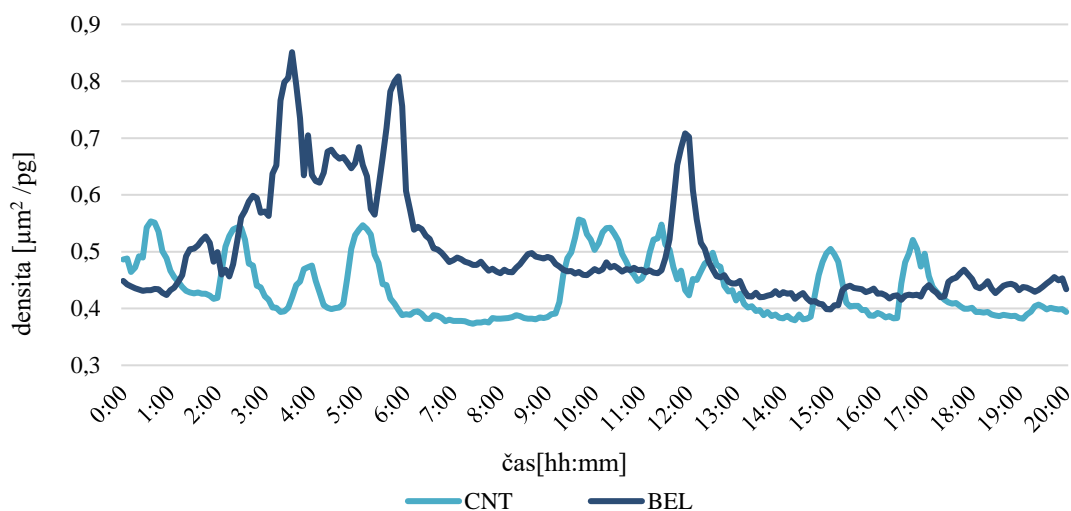
Obrázek 33: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk A549 pod vlivem MID.



Obrázek 34: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk A549 pod vlivem NACL.

Z grafů a samotného pozorování buněk vyplývá, že nejvíce byly buňky v porovnání s CNT ovlivněny léčivy VIN, NACL a MID. U těchto buněk nedocházelo k dělení buněk vůbec. U NACL a MID lze vidět, že buňky mají menší hmotnost i plochu na konci měření, což je způsobeno nektrózou vlivem léčiv. Největší rozdíl je zaznamenán u buněk pod vlivem VIN, zde buňky podstoupily buněčnou smrt již v začátku měření, jelikož na konci mají větší plochu i hmotnost jako na počátku. To může být zapříčiněno tím, že buňka podléhající nektróze se po smrštění opět rozprostře při probíhajícím zánětlivém rozkladu. U VIN je dále možné pozorovat skoro totožný počet buněk na konci měření jako na začátku. Což je způsobeno velmi nízkou migrací buněk ze zorného pole objektivu, a tak jsou prokázány účinky VIN na zpomalení migrace nádorových buněk. U buněk s CNT lze pozorovat podobné rozmístění buněk jako na počátku, pouze s malým úbytkem způsobeným migrací mimo zorné pole.

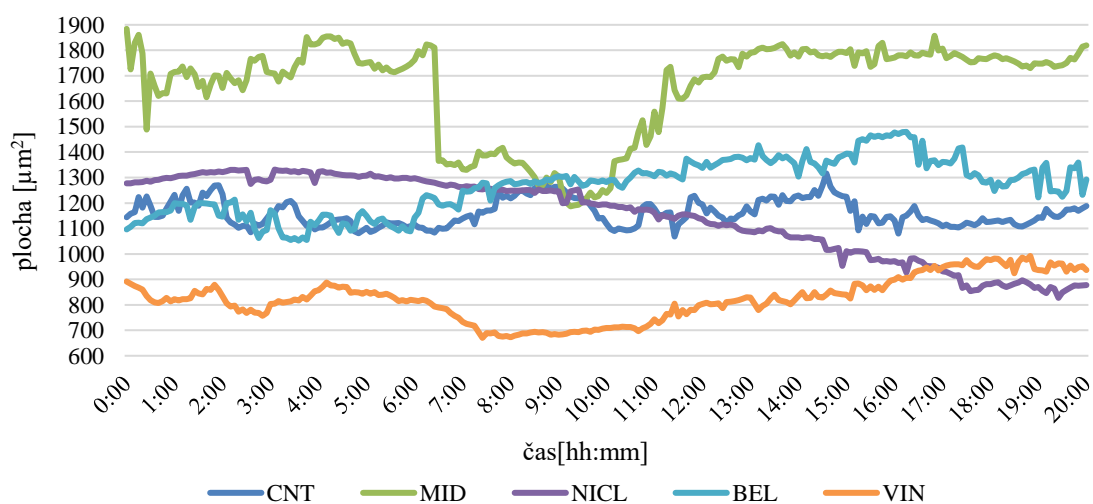
Aby bylo možné vyhodnotit, jak jednotlivá léčiva ovlivňují dělení buněk A549, byly vybrány ze záznamu měření konkrétní buňky, které se v časovém rozmezí 20 hodin rozdělily. Tyto buňky byly zvlášť označeny a byl pro ně sestaven graf průměrné hustoty. Z grafu průměrné hustoty dělicích se buněk lze posoudit, jaké léčivo mělo na dělení největší vliv, viz graf na obr. 35.



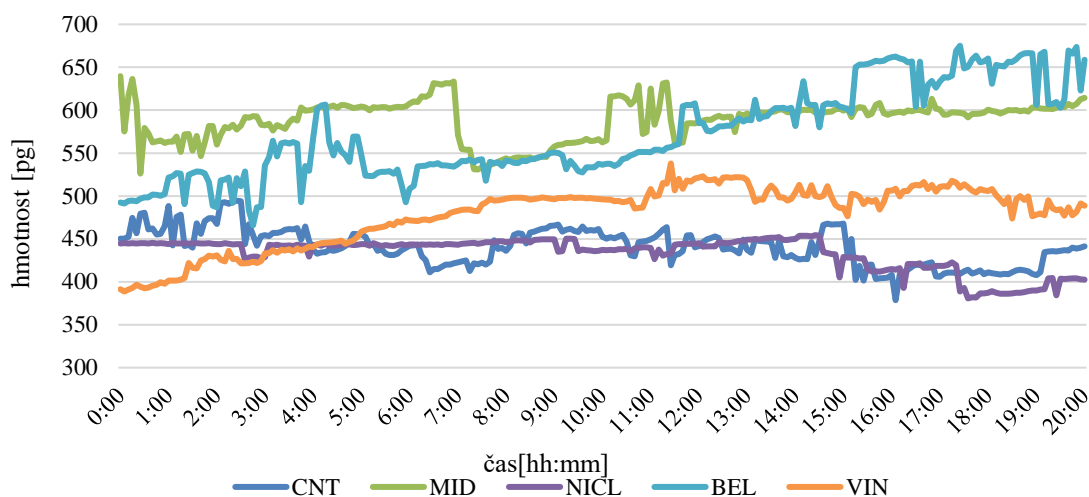
Obrázek 35: Graf průměrné hustoty vybraných dělicích se buněk buněčné linie A549.

Dle výše uvedeného grafu vyplývá, že nejvíce se dle očekávání dělily buňky A549 v CNT. Buňky se dále dělily i pod vlivem BEL, avšak VIN, NICL a MID nedocházelo k dělení vůbec. Také je zde prokázáno, že u CNT se buňky začínají dělit dříve, než je tomu u BEL.

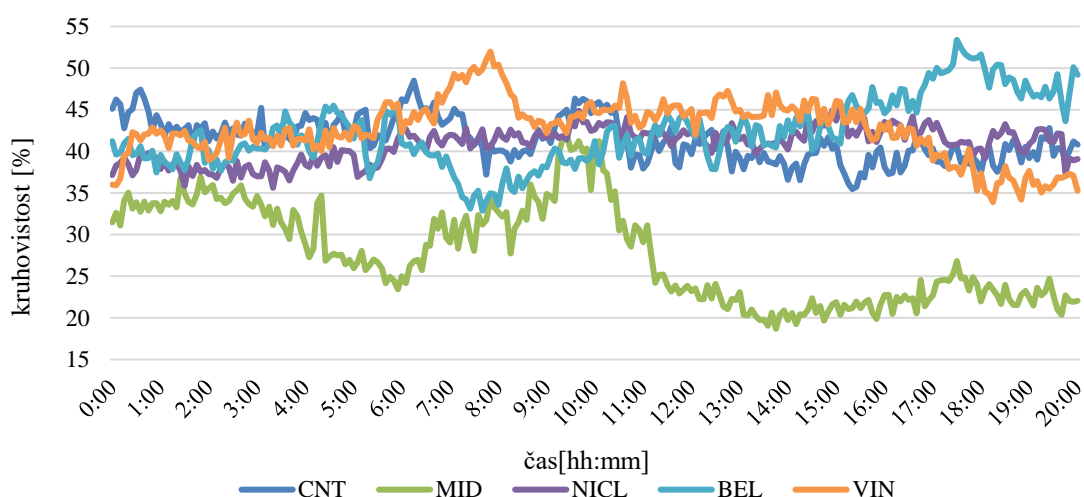
Další morfologické změny buněčné linie A549 vlivem migrastatik lze pozorovat na časovém průběhu průměrných hodnot plochy, hmotnosti a kruhovitosti. Všechna potenciální migrastatika jsou porovnávána v kontrastu s CNT.



Obrázek 36: Graf závislosti průměrné plochy buněčné linie A549 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.



Obrázek 37: Graf závislosti průměrné hmotnosti buněčné linie A549 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.

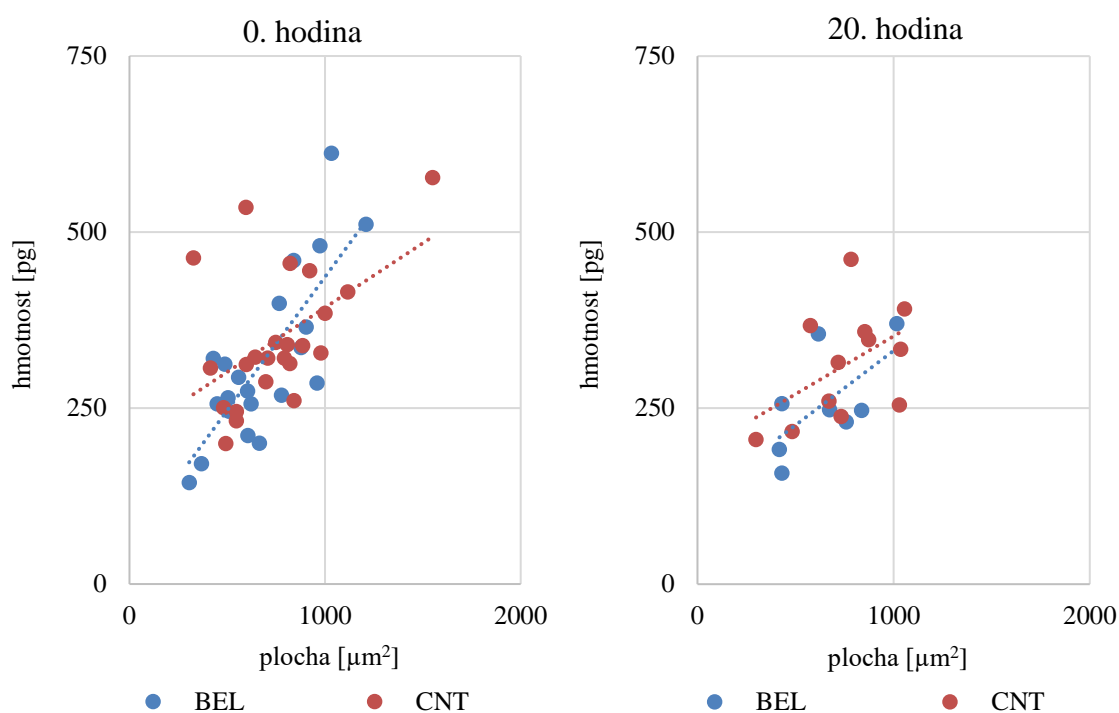


Obrázek 38: Graf závislosti průměrné kruhovitosti buněčné linie A549 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.

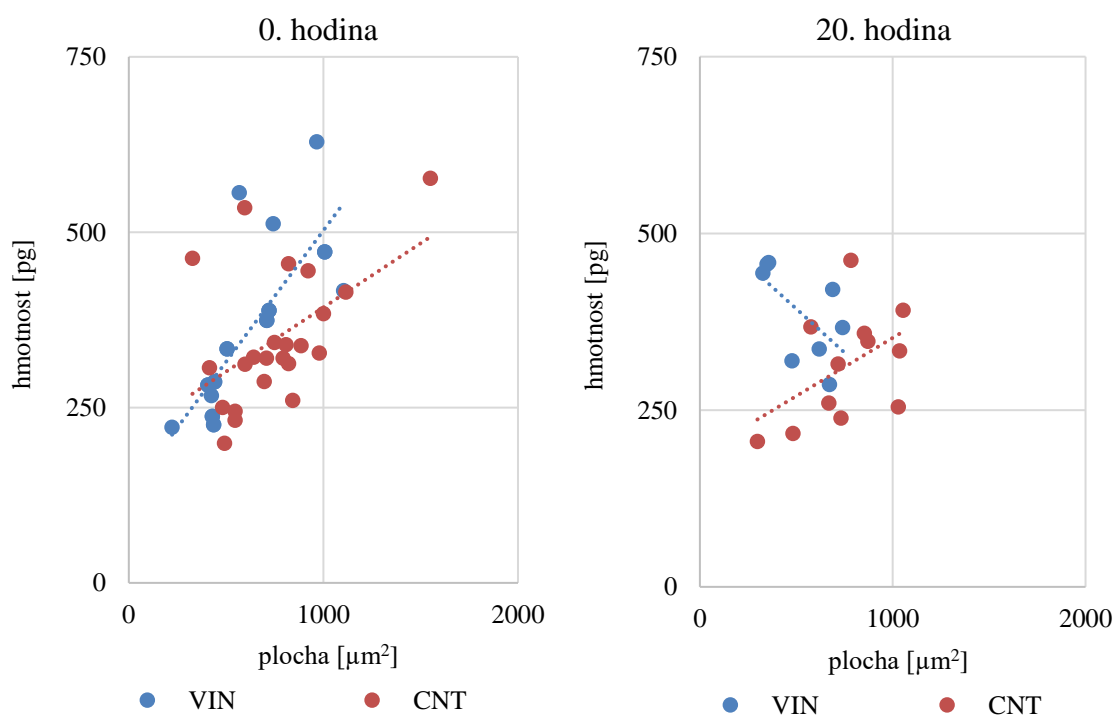
Dle těchto grafů lze vyvodit některé zajímavé skutečnosti. Z naměřených dat pro VIN je zřejmé, že buňky mají oproti CNT menší plochu a větší hmotnost, což je znakem toho, že buňky během měření podléhaly buněčné smrti. U MID lze pozorovat kolem 7. hodiny pokles plochy i hmotnosti, což může ukazovat na smrt nektrózou či apoptózou většího počtu buněk, jelikož buněčné dělení u MID bylo vyvráceno v předchozích grafech.

5.6. Analýza buněk MCF7 ovlivněných migrastatiky

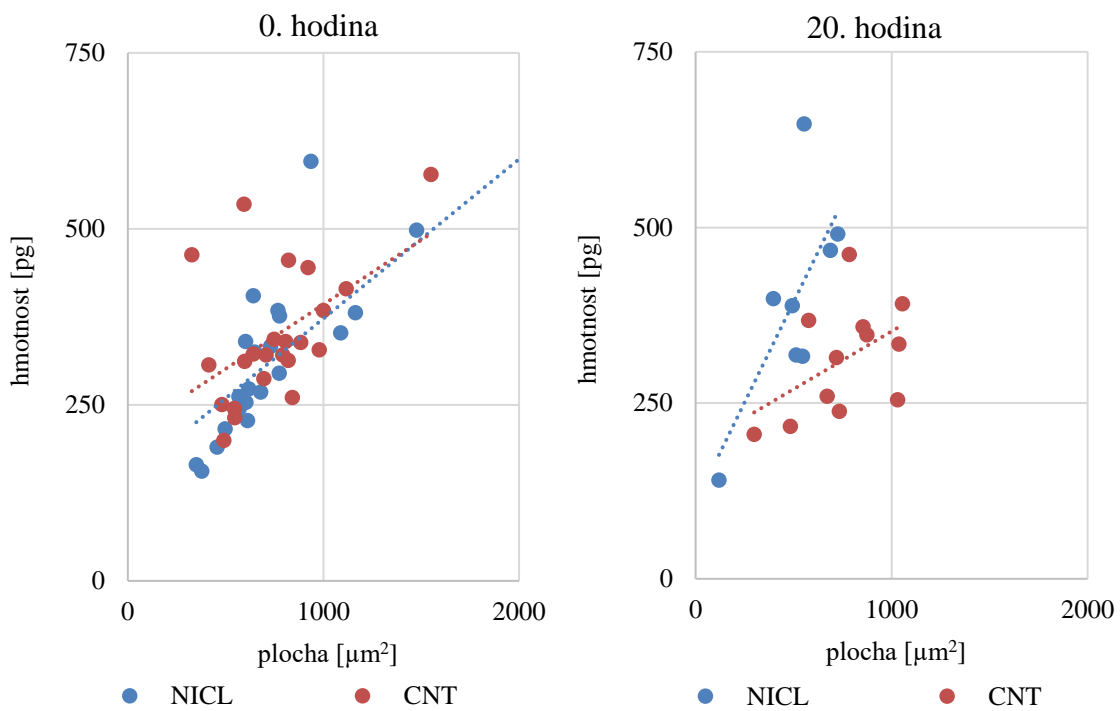
V této podkapitole je pomocí znázorněna velikost plochy a hmotnosti buněk MCF7. Pro vyhodnocování výsledků platí stejná tvrzení uvedená v kapitole 5.5.



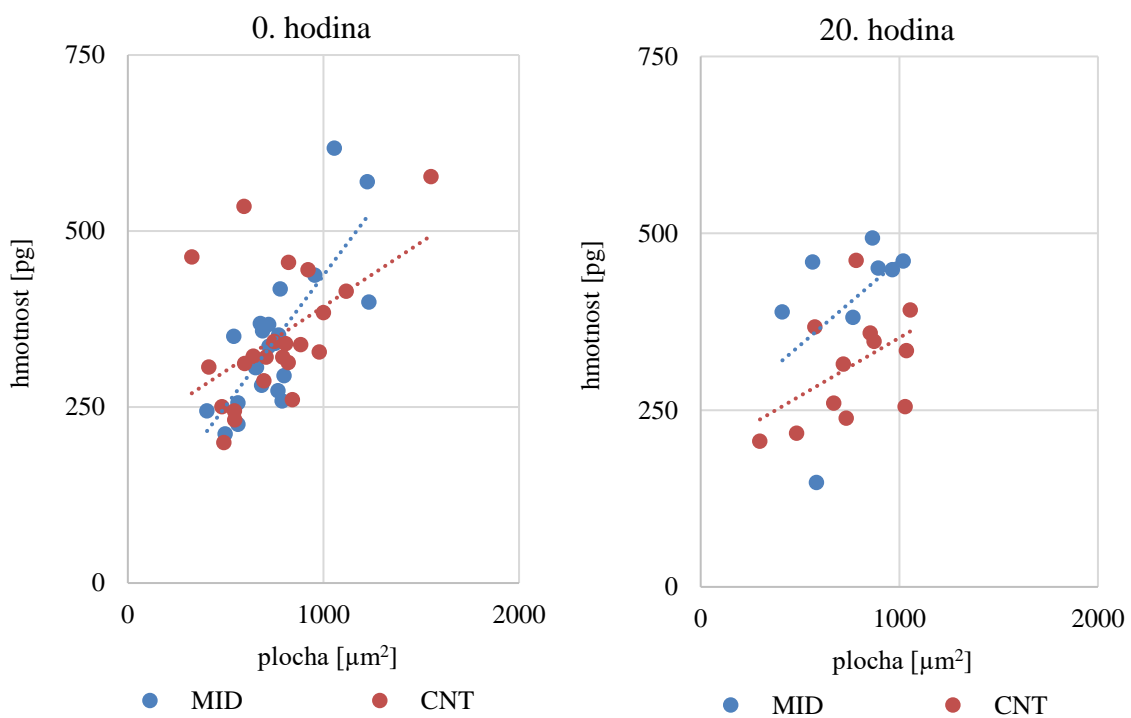
Obrázek 39: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk MCF7 pod vlivem BEL.



Obrázek 40: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk MCF7 pod vlivem VIN.



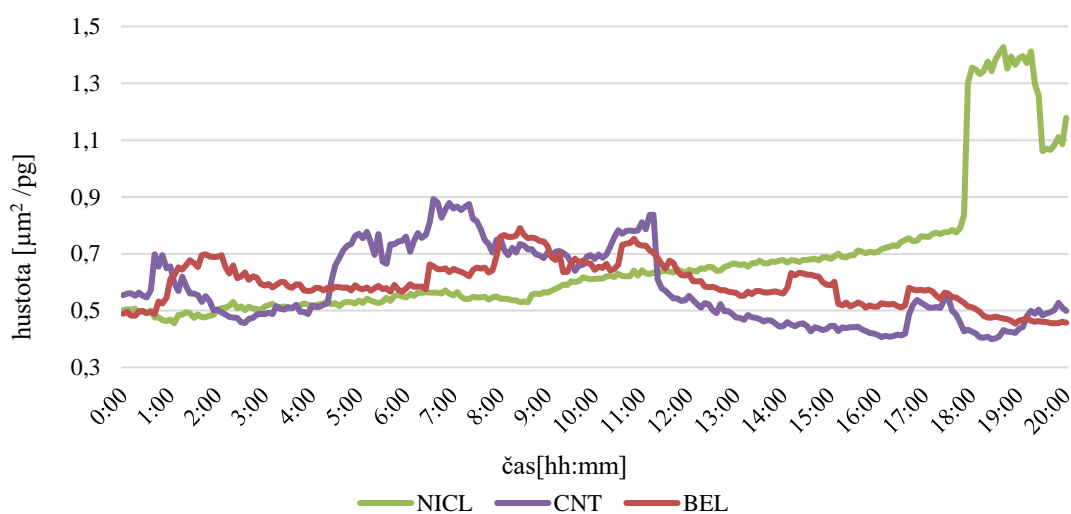
Obrázek 41: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk MCF7 pod vlivem NICL.



Obrázek 42: Graf hmotnosti a plochy na začátku měření a na jejím konci u buněk MCF7 pod vlivem MID.

Z předešlých grafů lze vyvodit chování buněk MCF7 po aplikaci léčiv BEL, VIN, MID a NICL v porovnání buněk v CNT. U buněk s VIN a MID dle časoběrného videozáznamu nedocházelo k buněčnému dělení. U buněk s CNT a BEL docházelo na začátku měření k dělení, proto jsou některé buňky v grafu v oblasti s malou hmotností a plochou. VIN ve 20. hodině měření snížil oproti začátku nejen svou hmotnost a plochu, ale i počet buněk. V tomto případě neukazuje snížený počet buněk na migraci ze zorného pole objektivu, ale na rozklad buněk po jejich smrti a s tím spojenou ztrátu segmentace. Podobný jev lze pozorovat i u chování buněk pod vlivem NICL, MID a BEL.

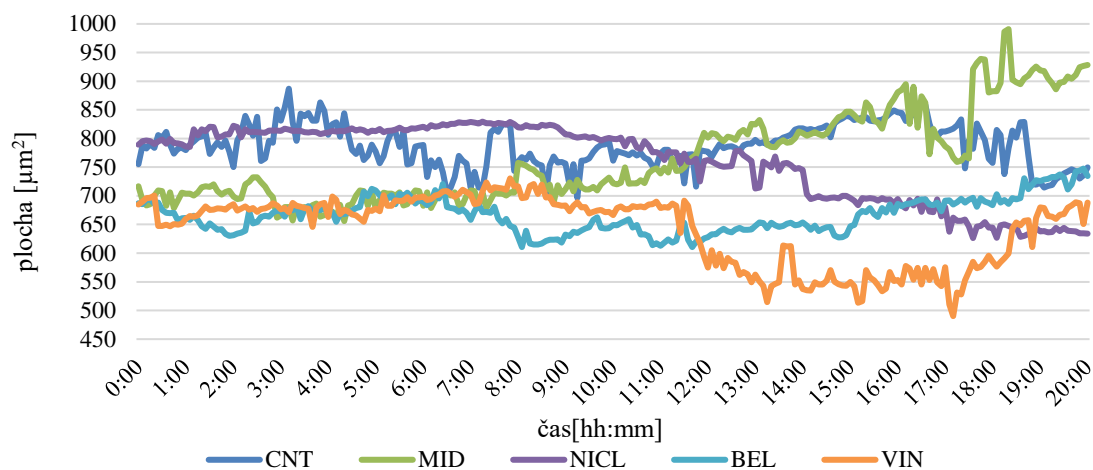
K nadcházejícím grafu je znázorněno, jak vybraná léčiva ovlivňují dělení buněk MCF7. Pro toto zhodnocení byly dle časoběrného videozáznamu vybrány pouze buňky, které se během 20 hodin skutečně rozdělily. Pro tyto konkrétní buňky byl sestaven graf průměrné hustoty, kde lze podle charakteristických píků posoudit, v jakém léčivu se buňky nejvíce dělily a v jakém čase.



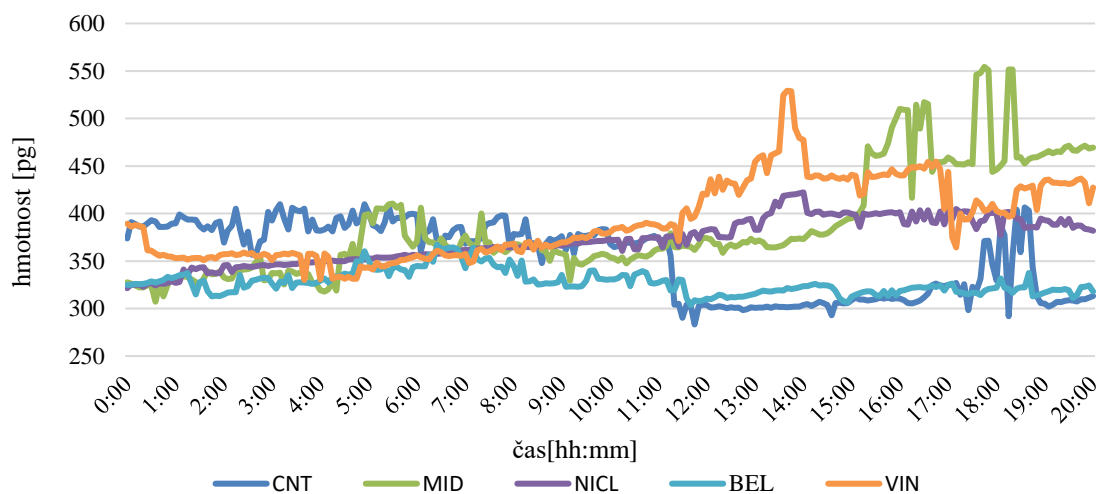
Obrázek 43: Graf průměrné hustoty vybraných dělících se buněk buněčné linie MCF7.

Z grafu na obr. č. 43 lze vyvodit, že nejvíce se podle předpokladu nejvíce dělily buňky v CNT a to hlavně v časovém úseku mezi 5. a 12. hodinou. U CNT a BEL se buňky začaly dělit již na počátku měření, u NICL až v 18. hodině měření. U buněk s léčivy VIN a MID nedocházelo k žádnému buněčnému dělení.

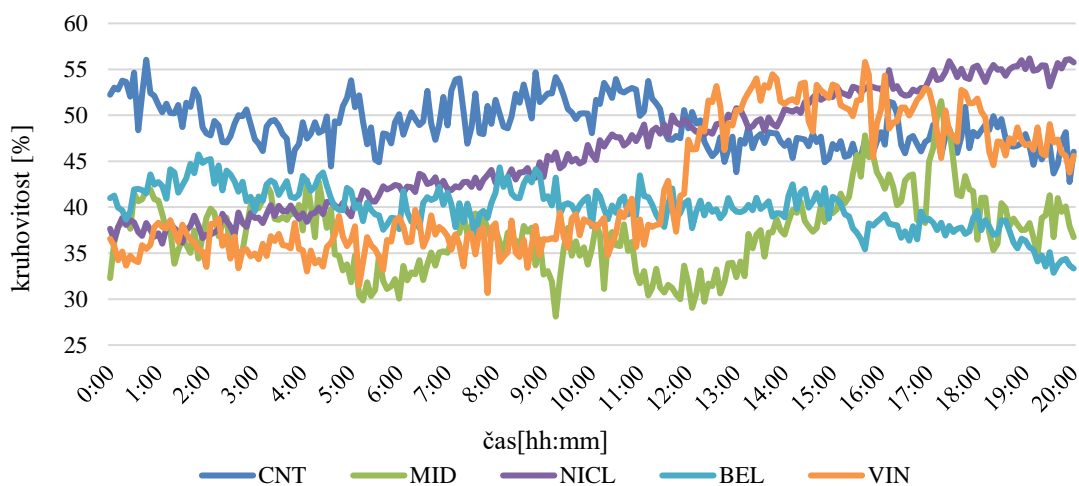
Následující grafy zaznamenávají morfologické změny buněčné linie MFC7 pod vlivem potenciálních migrastatik na časovém průběhu průměrných hodnot plochy, hmotnosti a kruhovitosti. Všechna léčiva jsou porovnávána v kontrastu s CNT.



Obrázek 44: Graf závislosti průměrné plochy buněčné linie MCF7 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.



Obrázek 45: Graf závislosti průměrné hmotnosti buněčné linie MCF7 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.



Obrázek 46: Graf závislosti průměrné kruhovitosti buněčné linie MCF7 na čase vlivem CNT, MID, NICL, BEL a VIN.

Dle výše uvedených grafů je možné zhodnotit některé odlišnosti účinků jednotlivých léčiv na buňky. VIN má v porovnání s CNT menší kruhovitost spolu s plochou. Kolem 12. hodiny se začne snižovat plocha a zároveň se zvýší hmotnost a kruhovitost, což ukazuje na smrštění buněk předtím, než podlehnou apoptóze či nekróze. Podobně je tomu i u MID, zde však dle grafů dochází k buněčné smrti ke konci měření.

NICL má na začátku podobnou hodnotu jako CNT, kruhovitost a hmotnost se nachází pod hodnotami CNT. Během měření se buňky začaly postupně zakulacovat, což je vidět hlavně z grafů kruhovitosti a plochy. U BEL si lze povšimnout, že buňky měly menší hodnoty u všech zmíněných parametrů oproti CNT.

6. Míra invazivního fenotypu

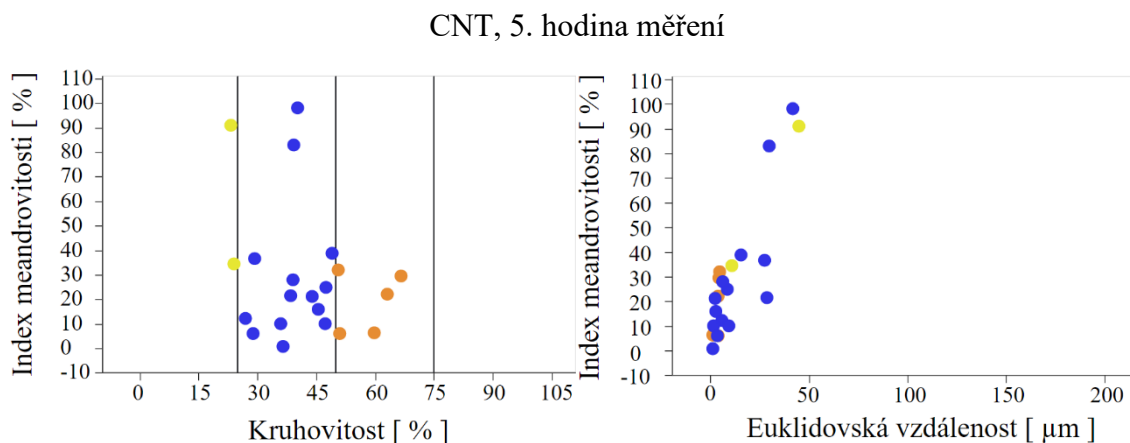
V této kapitole budou zkoumány parametry ukazující jak morfologické, tak i dynamické změny nádorových buněk pod vlivem potenciálních migrastatik. Prvním parametrem je závislost indexu meandrovitosti na kruhovitosti buňky a dalším je závislost indexu meandrovitosti na Euklidovské vzdálenosti. Index meandrovitosti udává, jak přímočaře se buňka pohybovala do určitého bodu, tedy odchylku od přímočarého pohybu. Pokud se jeho hodnota pohybuje ve větších hodnotách, znamená to, že buňka se pohybovala přímočaře a je blíže hodnotě Euklidovské vzdálenosti. Pomocí následujících grafů je možné odhadnout i míru invazivního fenotypu buněk. Jestliže má buňka malou kruhovitosť, vysoký index meandrovitosti a vysokou hodnotu Euklidovské vzdálenosti, jedná se s největší pravděpodobností o invazivní fenotyp. O neinvazivní fenotyp se jedná v případě buňky s vysokou hodnotou kruhovitosti, nízkým indexem meandrovitosti a nízkou hodnotou Euklidovské vzdálenosti. Následující grafy byly vytvořeny pro 5. a 20. hodinu měření. Barevné rozlišení tvaru buněk podle jejich kruhovitosti je následující:

Tabulka 4: Barevné rozlišení buněk.

Barva	Kruhovitost [%]	Tvar buňky	Stav buňky
●	0-25	Výrazně protáhlá	Anomální nebo migrující
●	25-50	Protáhlá	Nejspíše migrující
●	50-75	Oválná	Klidové stádium
●	75-100	Skoro kulatá	Okolo mitózy nebo umírající

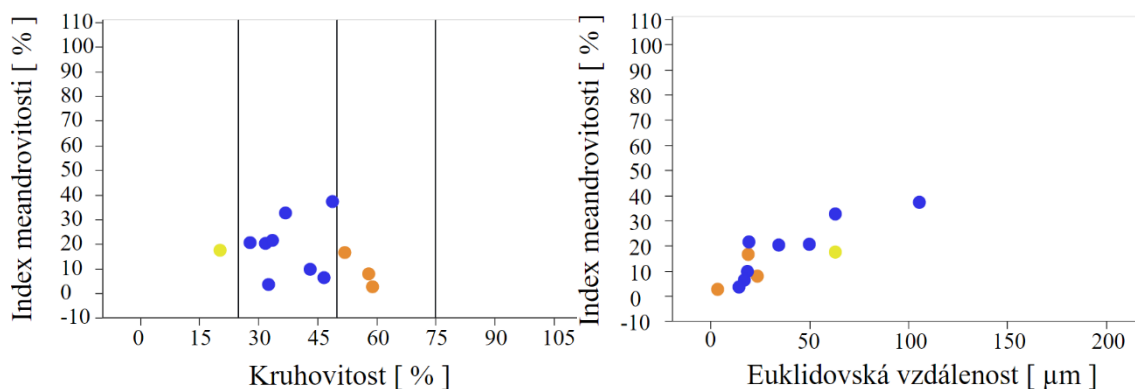
6.1. Buněční linie A549

Následující grafy byly vytvořeny pro 5. a 20. hodinu měření pro všechna zkoumaná potenciální migrastatika.



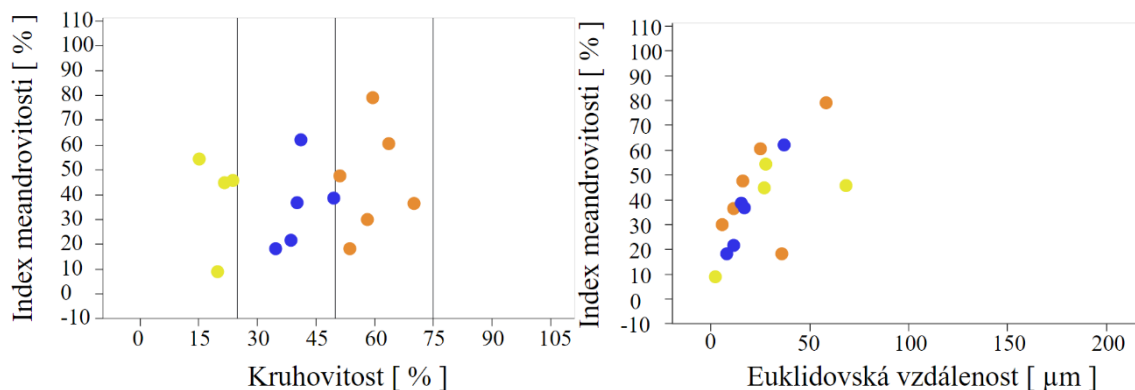
Obrázek 47: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

CNT, 20. hodina měření



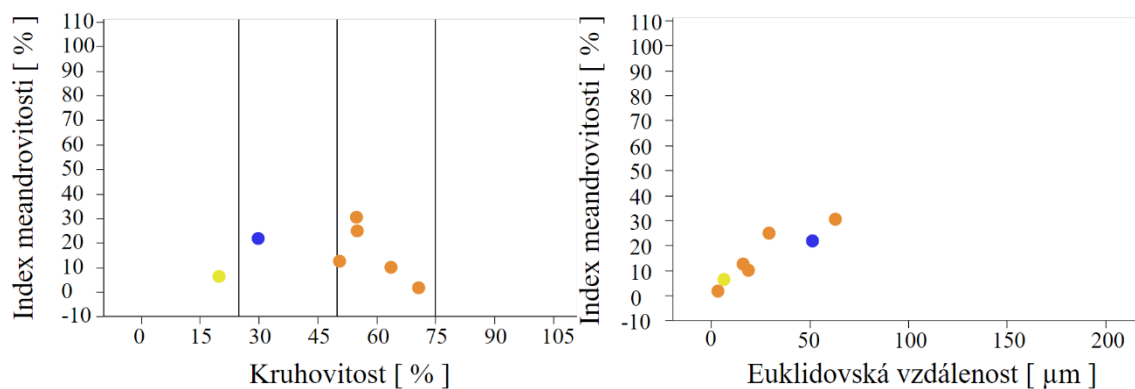
Obrázek 48: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

BEL, 5. hodina měření



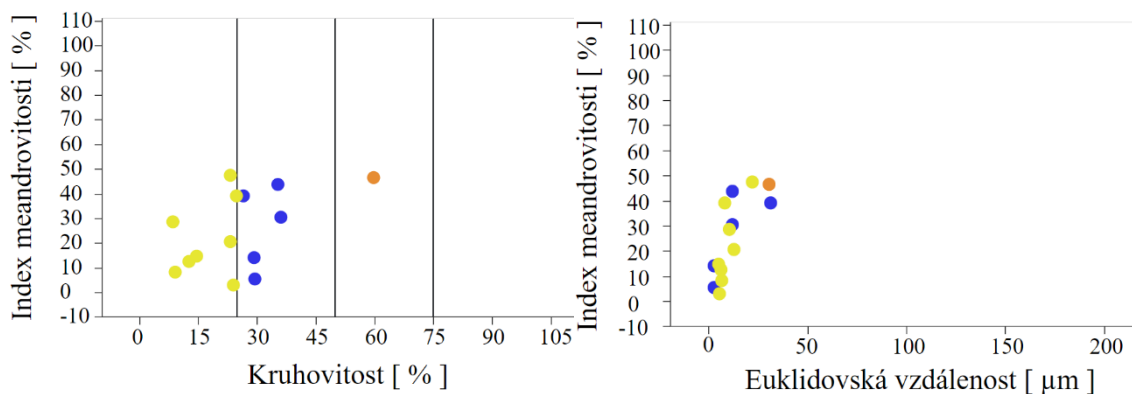
Obrázek 49: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

BEL, 20. hodina měření



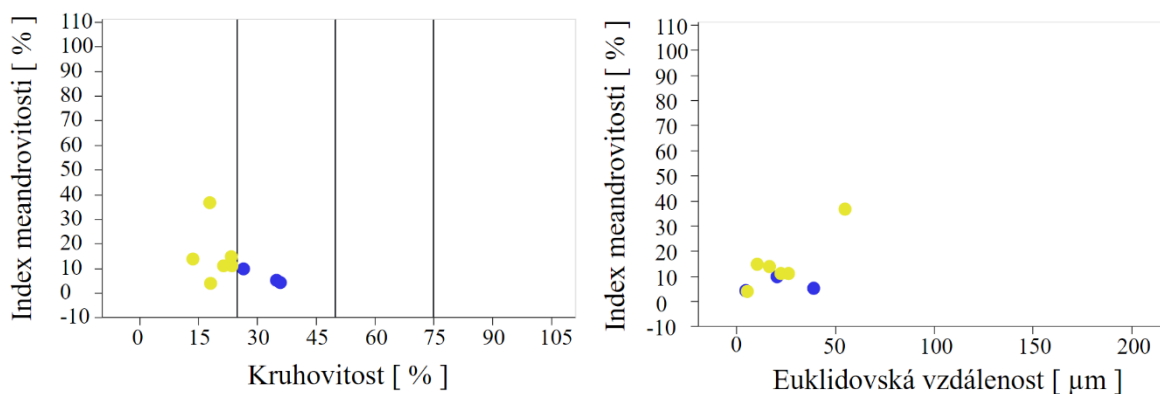
Obrázek 50: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

MID, 5. hodina měření



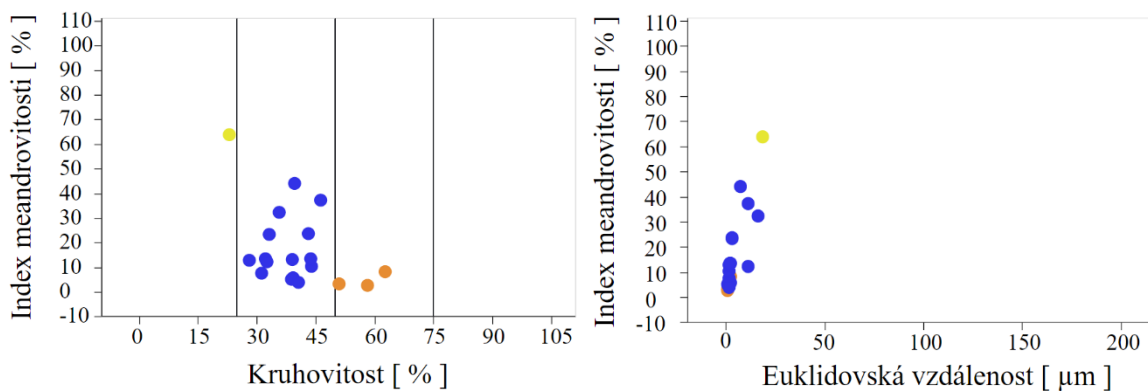
Obrázek 51: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

MID, 20. hodina měření



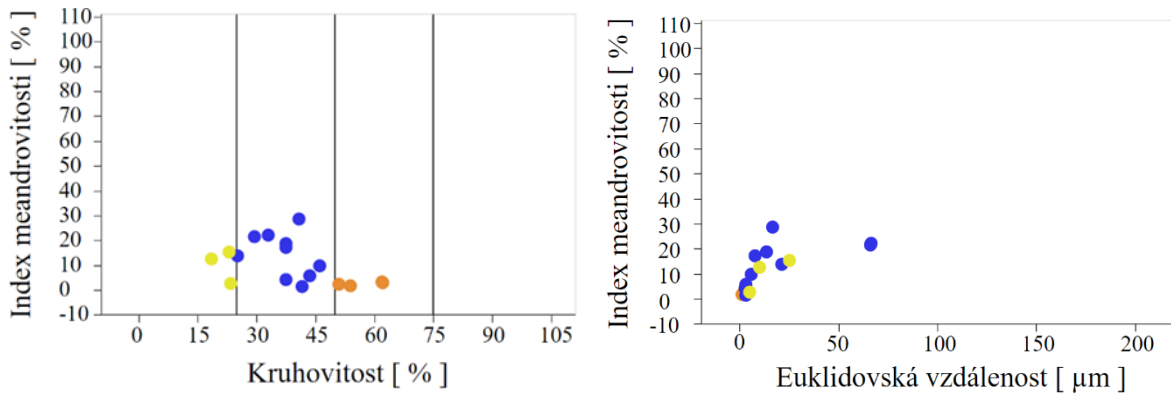
Obrázek 52: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

NICL, 5. hodina měření



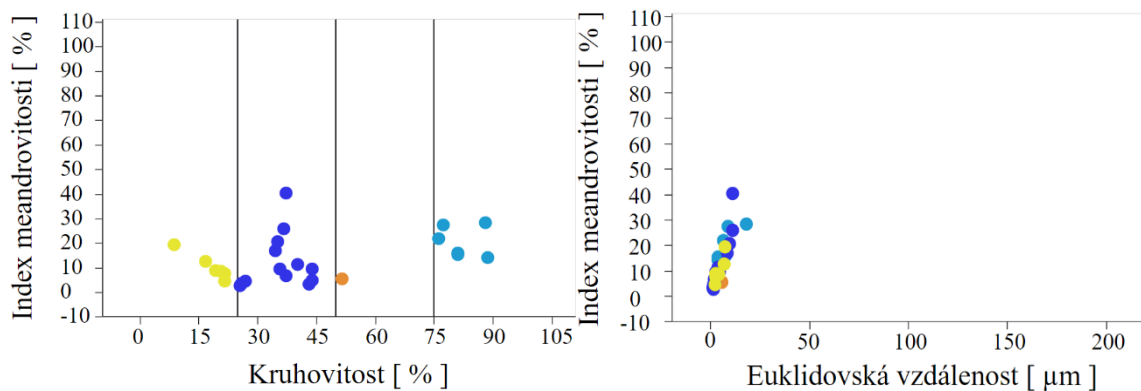
Obrázek 53: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

NICL, 20. hodina měření



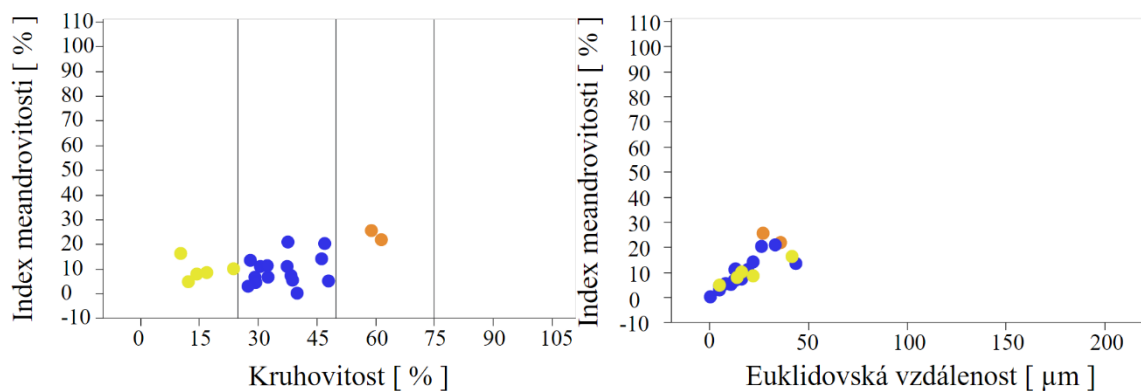
Obrázek 54: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

VIN, 5. hodina měření



Obrázek 55: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

VIN, 20. hodina měření



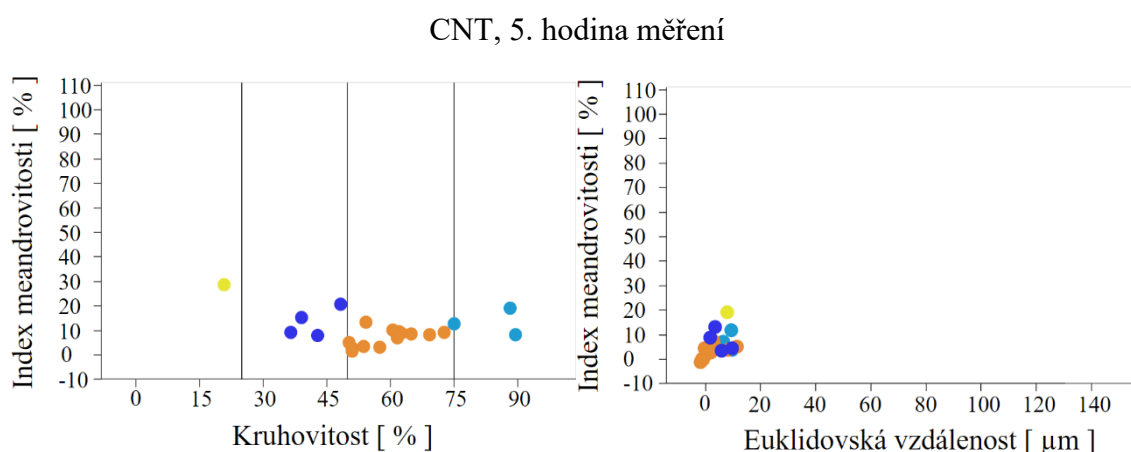
Obrázek 56: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

Z výše uvedených grafů lze identifikovat chování nádorových buněk A549 po aplikaci vybraných léčiv a CNT. Úbytek buněk ve 20. hodině měření je způsobený migrací buněk ze zorného pole objektivu nebo jejich buněčnou smrtí.

Nádorové buňky v CNT dosahovaly dle očekávání největší hodnotu indexu meandrovitosti a tedy se i dráha nejméně lišila od Euklidovské vzdálenosti. Nejvíce buněk v CNT vykazovalo protáhlý tvar buněk, což odpovídá předpokladu, že buňky právě migrují. Taktéž jejich Euklidovská vzdálenost dosahuje největších hodnot, zejména ve 20. hodině měření. BEL v 5. hodině měření dosahoval větších hodnot indexu meandrovitosti oproti 20. hodinám při podobné Euklidovské vzdálenosti. Tzn. že se na začátku měření buňky pohybovaly spíše přímočaře. Také je možné si všimnout, že ve 20. hodině měření ubylo nejvíce buněk protáhlého tvaru, což ukazuje na migraci těchto buněk ze zorného pole. Buněk tvaru oválného, který značí klidové stádium buňky, naopak nebylo vůbec. U MID byla většina buněk menší kruhovitosti a index meandrovitosti dosahoval nanejvýš hodnoty 50 %. Na konci měření index meandrovitosti výrazně klesnul, což napovídá tomu, že jeho vlivem se na konci měření více pohybovaly na místě. Buňky, které byly pod vlivem NICL byly především protáhlého tvaru a v 5. hodině měření dosahovaly větší hodnoty indexu meandrovitosti než na konci měření. U VIN se v 5. hodině měření vyskytují i buňky, které mají vyšší kruhovitost oproti ostatním léčivům. To ukazuje na buňky podléhající buněčné smrti, což dokazuje i to, že tyto buňky se ve 20. hodině měření již nevyskytují. Index meandrovitosti na konci měření mírně klesnul a nízká je i Euklidovská vzdálenost.

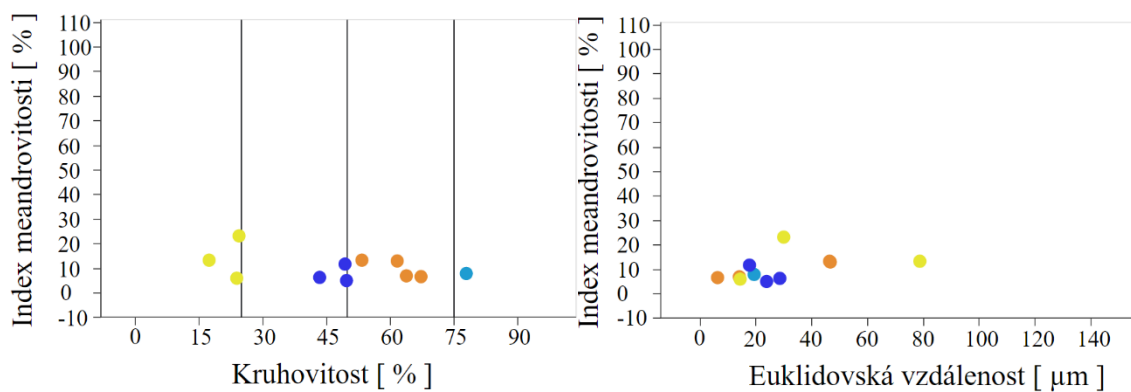
6.2. Buněční linie MCF7

Následující grafy byly též vytvořeny pro 5. a 20. hodinu měření pro všechna zkoumaná potenciální migrastatika.



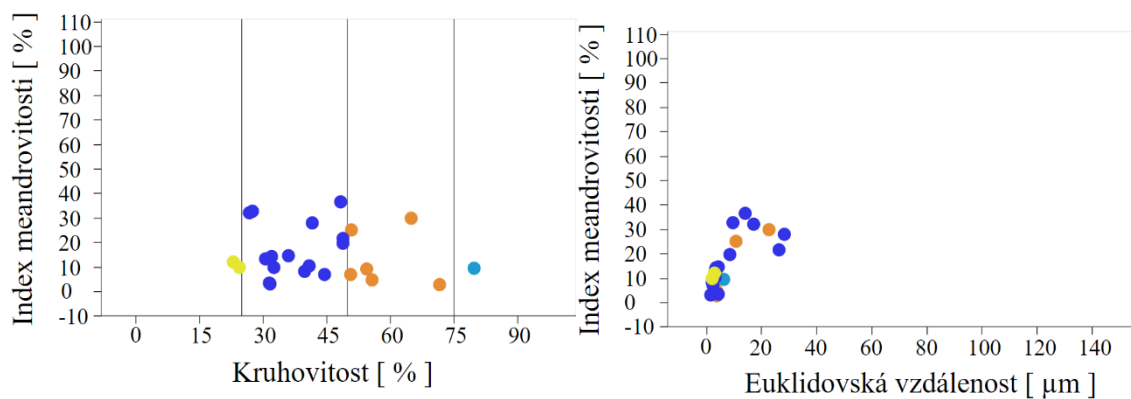
Obrázek 57: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

CNT, 20. hodina měření



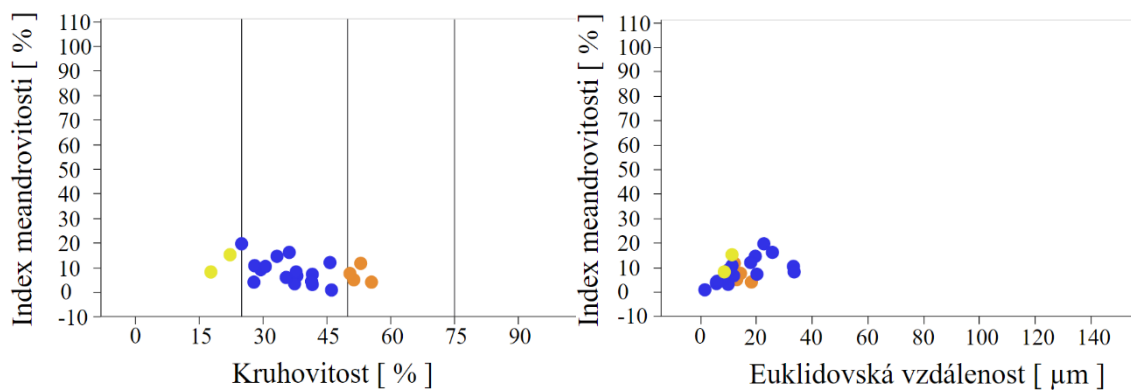
Obrázek 58: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

BEL, 5. hodina měření



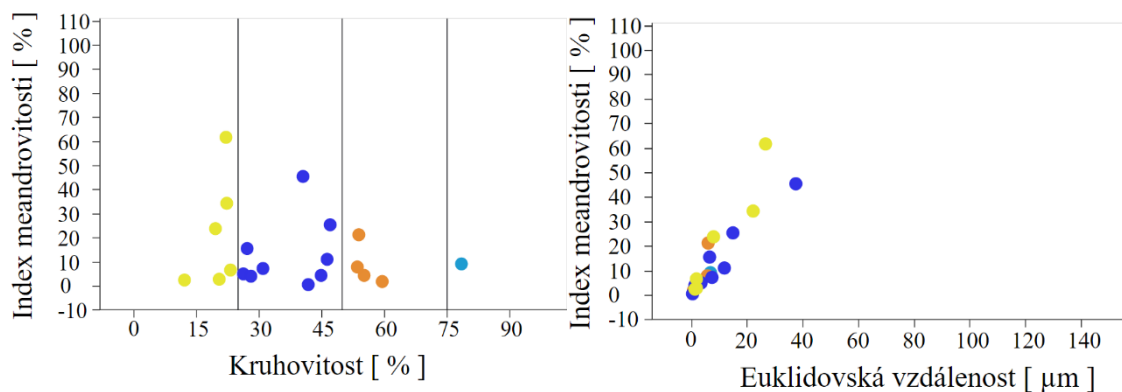
Obrázek 59: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

BEL, 20. hodina měření



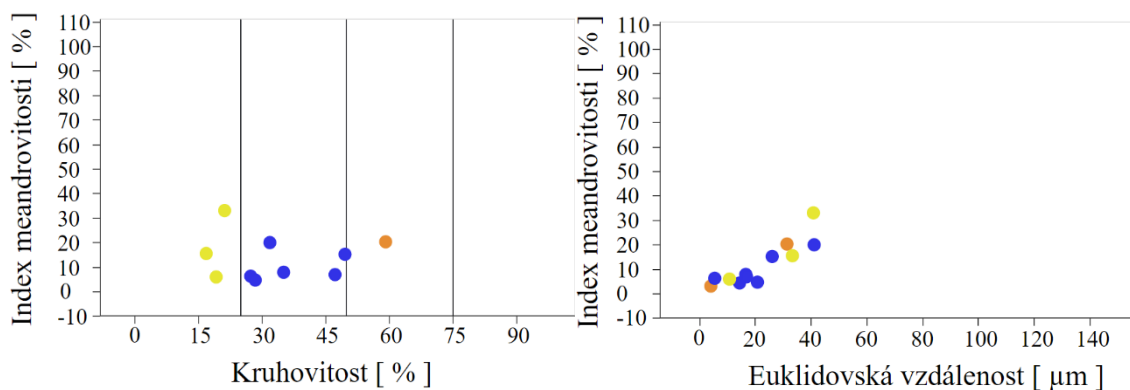
Obrázek 60: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

MID, 5. hodina měření



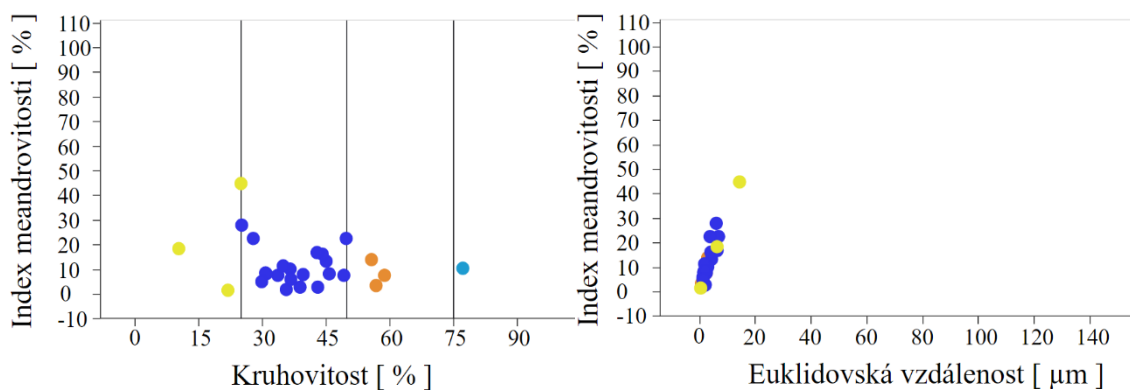
Obrázek 61: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

MID, 20. hodina měření



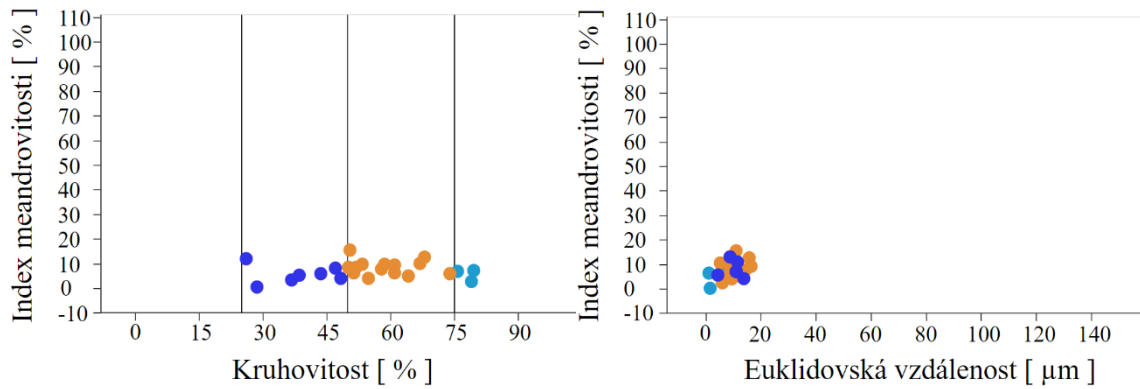
Obrázek 62: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

NICL, 5. hodina měření



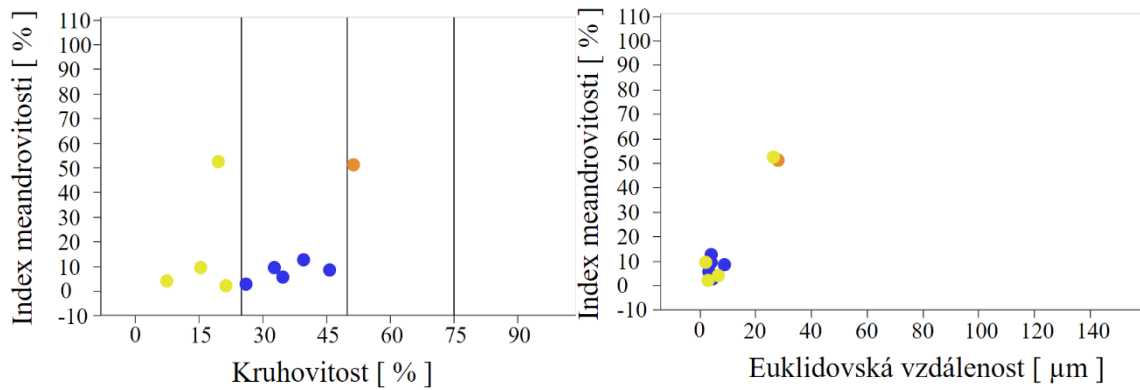
Obrázek 63: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

NICL, 20. hodina měření



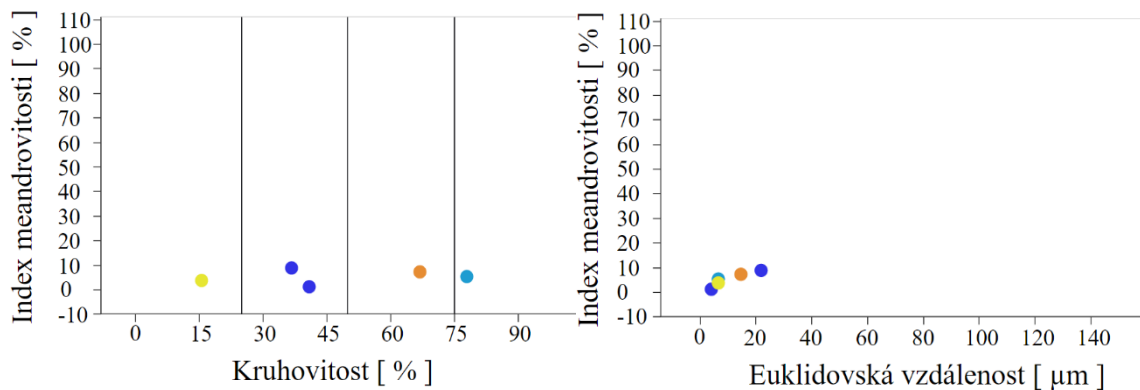
Obrázek 64: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

VIN, 5. hodina měření



Obrázek 65: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

VIN, 20. hodina měření



Obrázek 66: Graf závislosti indexu meandrovitosti na kruhovitosti a Euklidovské vzdálenosti.

Z grafu pro CNT v 5. hodině měření lze vidět, že většina buněk byla oválného tvaru, což je tvar typický pro klidové stádium buňky. Tomu odpovídá i graf indexu meandrovitosti k Euklidovské vzdálenosti, obě hodnoty jsou nízké. Na konci měření buněk ubylo kvůli migraci mimo zorné pole objektivu a mírně se zvedla Euklidovská vzdálenost. U BEL nejvíce buněk odpovídalo v obou časech protáhlému tvaru. Na konci měření klesl index meandrovitosti téměř o půlku hodnoty z 5. hodiny měření. Podobnou situaci lze sledovat i u MID a NICL. U obou léčiv se snížil index meandrovitosti na konci měření. NICL oproti MID vykazuje menší Euklidovskou vzdálenost v obou časech měření. U VIN je dosaženo malé Euklidovské vzdálenosti v obou vyhodnocovaných časech a v závěru měření se snížil i index meandrovitosti. Účinkem VIN ubylo i nádorových buněk, zejména ve 20. hodině, následkem buněčné smrti.

7. Diskuse

V rámci diskuse bych ráda shrnula získané poznatky, které jsem získala v průběhu vypracování své experimentální části. Mnou dosažené výsledky budou porovnávány i s předešlými studii zabývající se studiem účinků léčiv BEL, VIN, MID a NICL na nádorové buňky A549 a MCF7.

U NICL byl mnoha studii prokázán jeho protirakovinný účinek, např. u orálního spinocelulárního karcinomu, kde je NICL schopen inhibovat proliferaci jeho nádorových buněk tím, že způsobuje zastavení buněčného cyklu, podporuje apoptózu a snižuje migraci i invazi. U adenokarcinomu jícnu bylo prokázáno, že inhibuje buněčnou proliferaci. U buněk A549 bylo prokázáno, že NICL indukuje apoptózu a také potlačuje růst nádoru. V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že NICL výrazně potlačil buněčné dělení buněk, především u buněk A549, a naopak indukoval buněčnou smrt u buněk A549 i MC7. [48–50]

U MID byly studii prokázány antiproliferativní účinky přímo u mnoha typů buněk rakoviny plic, včetně buněk A549. Ze získaných dat pro tuto práci byly antiproliferativní účinky zjištěny u obou buněčných linií A549 a MCF7. Vlivem MID také podléhalo větší množství nádorových buněk apoptóze a nekróze ve srovnání s buňkami v CNT. [51]

VIN je chemoterapeutikum široce používané k léčbě nádorových onemocnění. Svou protinádorovou aktivitu zajišťuje indukci mikrotubulové poruchy a inhibicí mitózy, což vede k buněčné apoptóze. Z dosažených dat této práce se potvrdil účinek VIN u buněk A549 i MCF7. U těchto buněk nedocházelo k mitóze vůbec, naopak k apoptóze docházelo již začátkem měření. [52]

Léčivo BEL podle získaných dat nemělo dle získaných výsledků na nádorové buňky obou linií takový vliv jako ostatní potenciální migrastatika. Během celého časosběrného snímání docházelo průběžně k dělení buněk.

Cílem této práce bylo i vyhodnocení míry exprese invazivního fenotypu buněčných linií A549 a MCF7. Pro takové určení byly zvoleny parametry jako je kruhovitost, index meandrovitosti a Euklidovská vzdálenost. Grafy byly sestaveny pro 5. a 20. hodinu měření. U všech čtyř zkoumaných léčiv v obou buněčných liniích byl patrný pokles indexu meandrovitosti na konci měření. To znamená, že buňky se nepohybovaly do koncového bodu přímočaře, ale spíše se nahodile pohybovaly na místě. Dle charakterizace rozdělení na invazivní a neinvazivní fenotyp v 6. kapitole nelze u buněk A549 a MCF7 jednoznačně určit, o jaký fenotyp se jedná. Avšak v porovnání obou linií dosahuje buněčná linie A549 celkově větších hodnot indexu meandrovitosti i Euklidovské vzdálenosti a buňky jsou spíše protáhlého tvaru, čímž vykazují vyšší invazivní potenciál. Zároveň pokles indexu meandrovitosti v průběhu 20 hodin svědčí pro migrastatický efekt testovaných látek.

Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala analýzou morfologických změn nádorových buněk dvou buněčných linií, A549 a MCF7. Zmíněné nádorové buňky byly vystaveny vlivu čtyř různých léčiv (vinkristin, belumosudil, niklosamid a midostaurin), které byly porovnávány s kontrolním vzorkem nádorové linie bez aplikace jakéhokoli léčiva. Léčiva jsou zkoumána pro jejich možný pozitivní účinek na nádorové buňky z hlediska zamezení jejich migrace z primárních nádorů. Jelikož je tato práce zaměřena na analýzu změn fenotypu nádorových buněk, byly zkoumány především parametry posuzující morfologické změny buněk.

V 5. kapitole je dále zmíněno a názorně ukázáno, jak vypadá nádorová buňka podléhající apoptóze a nekróze, a také ukázka buňky při jejím dělení. Tyto jevy jsou demonstrovány pomocí snímků konkrétních buněk a také ukázány důležité změny jejich parametrů pomocí časových grafů. V kapitole č. 6 jsem se zaměřila na dynamiku jejich pohybu pod vlivem jednotlivých léčiv, konkrétně se zaměřením na jejich tvar a uraženou vzdálenost.

V rámci této diplomové práce bylo potvrzeno, že látka VIN používaná k léčbě mnoha typů rakoviny, skutečně inhibuje proces mitózy a vede k buněčné apoptóze u obou mnou zkoumaných buněčných linií. Podobný účinek jsem zaznamenala i u léčiva MID, kde se buňky v průběhu měření nedělily a podléhaly buněčné smrti. V porovnání s VIN k procesu buněčné smrti docházelo v pozdějším časovém úseku. S léčivem NICL se u buněčné linie A549 neprojevila mitóza vůbec, u buněk MCF7 pouze ojediněle, častá však byla smrt buněk u obou linií. Nejmenší účinek se prokázal u BEL v případě obou buněčných linií. Nádorové buňky se nadále dělily, ačkoli ne v takové míře jako u CNT.

Pozorování a následné vyhodnocování chování buněk bylo provedeno metodou hiQPI umožněnou pomocí CCHM, jak bylo popsáno v 1. a 2. kapitole této práce. Analýza a zpracování výsledků bylo provedeno pomocí softwaru SophiQ mikroskopu Q-Phase. Dále byly výsledky upraveny v Microsoft Excel a editoru vektorové grafiky Inkscape.

Výsledky této práce budou publikovány na onkologické konferenci European Conference of Oncology Pharmacy.

Zdroje

- [1] PARK, Yongkeun, C. DEPEURSINGE a G. POPESCU. Quantitative phase imaging in biomedicine. *undefined* [online]. 2018 [vid. 2022-03-05]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Quantitative-phase-imaging-trends-in-biomedical-Cacace-Bianco/5c9aad4a0d1f89bf9c44fa2286ac42da39fe1807>
- [2] MANN, Christopher J, Lingfeng YU a Myung K KIM. Movies of cellular and sub-cellular motion by digital holographic microscopy. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 2006, **5**, 21 [vid. 2022-02-23]. ISSN 1475-925X. Dostupné z: [doi:10.1186/1475-925X-5-21](https://doi.org/10.1186/1475-925X-5-21)
- [3] *Telight Q-Phase • Telight* [online]. [vid. 2022-03-06]. Dostupné z: <https://telight.eu/products/telight-q-phase/>
- [4] LU, Hangwen, Jaebum CHUNG, Xiaoze OU a Changhui YANG. Quantitative phase imaging and complex field reconstruction by pupil modulation differential phase contrast. *Optics Express* [online]. 2016, **24**(22), 25345–25361 [vid. 2022-05-19]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: [doi:10.1364/OE.24.025345](https://doi.org/10.1364/OE.24.025345)
- [5] ZICHA, Daniel. Addressing cancer invasion and cell motility with quantitative light microscopy. *Scientific Reports* [online]. 2022, **12**(1), 1621 [vid. 2022-02-23]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-022-05307-7](https://doi.org/10.1038/s41598-022-05307-7)
- [6] S.R.O, Webguide. *Rozhovor: Profesor Radim Chmelík o Ceně města Brna 2017* [online]. [vid. 2022-05-14]. Dostupné z: <https://www.ceitec.cz/rozhovor-profesor-radim-chmelik-o-cene-mesta-brna-2017/t9871>
- [7] VUT, CVIS. *Radim Chmelík: Uvidíme ještě zajímavé věci* [online]. [vid. 2022-05-14]. Dostupné z: http://www.zvut.cz/lide/lide-f38102/radim-chmelik-uvitime-jeste-zajimave-veci-d106350?aid_redir=1
- [8] SLABÝ, Tomáš, Pavel KOLMAN, Zbyněk DOSTÁL, Martin ANTOŠ, Martin LOŠŤÁK a Radim CHMELÍK. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2013, **21**(12), 14747–14762 [vid. 2022-03-09]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: [doi:10.1364/OE.21.014747](https://doi.org/10.1364/OE.21.014747)
- [9] KOLMAN, Pavel a Radim CHMELÍK. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2010, **18**(21), 21990–22004 [vid. 2022-03-09]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: [doi:10.1364/OE.18.021990](https://doi.org/10.1364/OE.18.021990)
- [10] BOUCHAL, Petr, Petr BOUCHAL, Radim CHMELÍK, Radim CHMELÍK a Zdeněk BOUCHAL. Phase of white light and its compatibility to the optical path. *Optics Express* [online]. 2021, **29**(8), 12398–12412 [vid. 2022-03-16]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: [doi:10.1364/OE.418878](https://doi.org/10.1364/OE.418878)
- [11] SLABÝ, Tomáš, Pavel KOLMAN, Zbyněk DOSTÁL, Martin ANTOŠ, Martin LOŠŤÁK a Radim CHMELÍK. Off-axis setup taking full advantage of incoherent

- illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2013, **21**(12), 14747–14762 [vid. 2022-03-16]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.21.014747
- [12] Fig. 1 (a) Optical setup of coherence-controlled holographic microscopy... *ResearchGate* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/a-Optical-setup-of-coherence-controlled-holographic-microscopy-CCHM-LS-light_fig1_281515391
- [13] *HoloMonitor---M4-live-cell-imaging-analysis-system-_product-brochure.pdf* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: https://www.agilrom.ro/wp-content/uploads/2021/08/HoloMonitor---M4-live-cell-imaging-analysis-system-_product-brochure.pdf
- [14] HoloMonitor M4 Base Unit. *PHI* [online]. [vid. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://phiab.com/product/holomonitorm4-base-unit-42100/>
- [15] DANIELDURAN.CZ, Design: Martin Kolerus, Code: Daniel Duran. *Migrastatika: nadějná léčba | Biocev* [online]. [vid. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://www.biocev.eu/cs/sluzby/ceske-centrum-pro-fenogenomiku.2/migrastatika-nadejna-lecba.284?t=p>
- [16] ROSEL, Daniel, Michael FERNANDES, Victoria SANZ-MORENO a Jan BRÁBEK. Migrastatics: Redirecting R&D in Solid Cancer Towards Metastasis? *Trends in Cancer* [online]. 2019, **5**(12), 755–756 [vid. 2022-05-20]. ISSN 2405-8033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2019.10.011
- [17] What is Metastasis? *Cancer.Net* [online]. 2. únor 2016 [vid. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-metastasis>
- [18] Jak zarazit stěhování nádorů. *Nadace The Kellner Family Foundation* [online]. [vid. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.kellnerfoundation.cz/aktuality/jak-zarazit-stehovani-nadoru>
- [19] SOLOMON, Jonathan, Magdalena RAŠKOVÁ, Daniel RÖSEL, Jan BRÁBEK a Hava GIL-HENN. Are We Ready for Migrastatics? *Cells* [online]. 2021, **10**(8), 1845 [vid. 2022-03-16]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10081845
- [20] GANDALOVIČOVÁ, Aneta, Daniel ROSEL, Michael FERNANDES, Pavel VESELÝ, Petr HENEGER, Vladimír ČERMÁK, Luboš PETRUŽELKA, Sunil KUMAR, Victoria SANZ-MORENO a Jan BRÁBEK. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer* [online]. 2017, **3**(6), 391–406 [vid. 2022-03-16]. ISSN 2405-8033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2017.04.008
- [21] Migrastatika – metoda proti metastázování nádorů. *Sciencemag.cz* [online]. 2. prosinec 2019 [vid. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://sciencemag.cz/migrastatika-metoda-proti-metastazovani-nadoru/>

- [22] VinCRISTine Monograph for Professionals. *Drugs.com* [online]. [vid. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/vincristine.html>
- [23] MORRIS, Patrick G. a Monica N. FORNIER. Microtubule Active Agents: Beyond the Taxane Frontier. *Clinical Cancer Research* [online]. 2008, **14**(22), 7167–7172 [vid. 2022-04-22]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0169
- [24] *Midostaurin: MedlinePlus Drug Information* [online]. [vid. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a617033.html>
- [25] Niclosamid a ciclesonid dalšími nadějnými kandidáty pro léčbu koronaviru. *Sciencemag.cz* [online]. 7. květen 2020 [vid. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://sciencemag.cz/niclosamid-a-ciclesonid-dalsimi-nadejnymi-kandidaty-pro-lecbru-koronaviru/>
- [26] LI, Yunlong, Pengfei LI, Qiyu HE, Ruyi ZHANG, Yang LI, Nassim KAMAR, Maikel P. PEPPELENBOSCH, Robert A. DE MAN, Lin WANG a Qiuwei PAN. Niclosamide inhibits hepatitis E virus through suppression of NF-kappaB signalling. *Antiviral Research* [online]. 2022, **197**, 105228 [vid. 2022-04-22]. ISSN 0166-3542. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2021.105228
- [27] *Chemical Products Search* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: https://m.chemicalbook.com/Search_DE.aspx?keyword=&start=0
- [28] *What Is Cancer? - NCI* [online]. 17. září 2007 [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [29] *Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy | Genotoxicita a karcinogeneze / Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html
- [30] *Characteristics of Cancer Cells* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/ph/ph709_cancer/ph709_cancer7.html
- [31] Everything You Need To Know About A549 Cells. *Synthego* [online]. [vid. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.synthego.com/a549-cells>
- [32] *A549 / ATCC* [online]. [vid. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
- [33] *MCF7 / ATCC* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/htb-22>
- [34] *MCF-7 Cell Line - Breast Cancer Cell Lines | MCF-7 Cells* [online]. 19. červenec 2014 [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <http://www.mcf7.com/>

- [35] YAO, Tatsuma a Yuta ASAYAMA. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. 2017, **16**(2), 99–117 [vid. 2022-05-20]. ISSN 1445-5781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12024
- [36] EAGLE, Harry. Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. *Science* [online]. 1959, **130**(3373), 432–437 [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: doi:10.1126/science.130.3373.432
- [37] HEPES - CZ [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/hepes.html>
- [38] μ -Slide VI 0.4 | Channel Slide for Parallel Flow Assays. *ibidi* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://ibidi.com/channel-slides/57--slide-vi-04.html>
- [39] *Telight solutions for Cell death research* [online]. 4. listopad 2020 [vid. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://telight.eu/applications/cell-death/>
- [40] BALVAN, Jan, Aneta KRIZOVA, Jaromir GUMULEC, Martina RAUDENSKA, Zbysek SLADEK, Miroslava SEDLACKOVA, Petr BABULA, Marketa SZTALMACHOVA, Rene KIZEK, Radim CHMELIK a Michal MASARIK. Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(3), e0121674 [vid. 2022-05-11]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0121674
- [41] SARASTE, Antti a Kari PULKKI. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* [online]. 2000, **45**(3), 528–537 [vid. 2022-05-20]. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6363(99)00384-3
- [42] Necrosis vs Necroptosis vs Apoptosis. *ImmunoChemistry Technologies* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.immunochemistry.com/pages/necrosis-vs-necroptosis-vs-apoptosis>
- [43] ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology* [online]. 2007, **35**(4), 495–516 [vid. 2022-05-20]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- [44] What are the major differences between Apoptosis, Necroptosis & Autophagy? *Novus Biologicals* [online]. 24. březen 2017 [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/what-are-the-major-differences-between-apoptosis-necroptosis-and-autophagy>
- [45] KARKI, Gaurab. Apoptosis (Programmed cell death) Cell Biology. *Online Biology Notes* [online]. 6. červenec 2020 [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/apoptosis-programmed-cell-death/>
- [46] VICAR, Tomas, Martina RAUDENSKA, Jaromir GUMULEC a Jan BALVAN. The Quantitative-Phase Dynamics of Apoptosis and Lytic Cell Death. *Scientific*

- Reports* [online]. 2020, **10**(1), 1566 [vid. 2022-05-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58474-w
- [47] *Cell Death / BioNinja* [online]. [vid. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-death.html>
- [48] LI, Xiaoxu, Ruiyu DING, Zewen HAN, Zeyun MA a Yixiang WANG. Targeting of cell cycle and let-7a/STAT3 pathway by niclosamide inhibits proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 2017, **96**, 434–442. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2017.09.149
- [49] LEE, Ming-Cheng, Yin-Kai CHEN, Yih-Jen HSU a Bor-Ru LIN. Niclosamide inhibits the cell proliferation and enhances the responsiveness of esophageal cancer cells to chemotherapeutic agents. *Oncology Reports* [online]. 2020, **43**(2), 549–561. ISSN 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.2019.7449
- [50] CHAI, Woei-Horng, Yi-Rong LI, Sheng-Hao LIN, Ya-Husan CHAO, Cheng-Hsiung CHEN, Po-Chiang CHAN a Ching-Hsiung LIN. Antihelminthic Niclosamide Induces Autophagy and Delayed Apoptosis in Human Non-small Lung Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Anticancer Research* [online]. 2020, **40**(3), 1405–1417. ISSN 1791-7530. Dostupné z: doi:10.21873/anticancer.14082
- [51] CTORTECKA, Claudia, Vinayak PALVE, Brent M. KUENZI, Bin FANG, Natalia J. SUMI, Victoria IZUMI, Silvia NOVAKOVA, Fumi KINOSE, Lily L. Remsing RIX, Eric B. HAURA, John Matthew KOOMEN a Uwe RIX. Functional Proteomics and Deep Network Interrogation Reveal a Complex Mechanism of Action of Midostaurin in Lung Cancer Cells *. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2018, **17**(12), 2434–2447 [vid. 2022-05-18]. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.RA118.000713
- [52] ZHOU, Chengwei, Yonggang ZHU, Bin LU, Weijun ZHAO a Xiaodong ZHAO. Survivin expression modulates the sensitivity of A549 lung cancer cells resistance to vincristine. *Oncology Letters* [online]. 2018, **16**(4), 5466–5472 [vid. 2022-05-18]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2018.9277

Seznam zkratek

QPI	Kvantitativní fázové zobrazování
CCHM	Koherenci řízený holografický mikroskop
A549	Adenokarcinomické lidské alveolární bazální epiteliální buňky
MCF7	Buněčná linie rakoviny prsu
BEL	Belumosudil
VIN	Vinkristin
MID	Midostaurin
NICL	Niklosamid
CNT	Kontrolní vzorek
S	Světelný zdroj
L	Kolektorová čočka
BS	Dělič paprsků
M	Zrcadla
C	Kondenzory
Sp	Rovina vzorku
R	Referenční rovina
O	Objektiv
TL	Tubusová čočka
DG	Difrakční mřížka
OL	Výstupní čočka
OP	Výstupní rovina
D	Detektor
DIC	Diferenciální interferenční kontrast
μm	mikrometr
nm	nanometr