VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

BIOFYZIKÁLNÍ INTERPRETACE KVANTITATIVNÍHO FÁZOVÉHO ZOBRAZENÍ S VYUŽITÍM KOHERENCÍ ŘÍZENÉ HOLOGRAFICKÉ MIKROSKOPIE

BIOPHYSICAL INTERPRETATION OF QUANTITATIVE PHASE IMAGING OF LIVE CELLS GENERATED BY COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPY

ZKRÁCENÁ VERZE DIZERTAČNÍ PRÁCE

SHORT VERSION OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE Mgr. Markéta Šuráňová

AUTHOR

ŠKOLITEL MUDr. Pavel Veselý, CSc.

SUPERVISOR

BRNO 2023

ABSTRAKT

Dizertační práce pojednává o biofyzikální interpretaci kvantitativního fázového zobrazování (QPI – Quantitative Phase Imaging) získaného pomocí koherencí řízeného holografické mikroskopie (CCHM – Coherence-Controlled Holographic Microscopy) v provedení Q-PHASE mikroskop, Telight, Brno). Teoretická část této práce se zabývá charakteristikou kvantitativního fázového zobrazení, které poskytuje neinvazivní metodou informace o aktivitě živých buněk *in vitro*. Hlavní část práce spočívá ve vytvoření koncepce a ověření nové metody primárního kritického ohodnocení léků pro očekávaný anti-migrační/metastatický potenciál (PAMP – Primary Assessment of Migrastatic Potential). Výsledek této metody je prvním třídícím hodnocením při zvažování konkrétních migrastatických látek pro budoucí komplexní onkologickou léčbu. Hodnotí nejen růst nádorových buněk, rychlost pohybu buněk, ale i odhalení rizika nebezpečných invazivních fenotypů. Dále je navržena metoda korelační mikroskopie mezi Q-PHASE mikroskopem a laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem (LSCM) pro účel hodnocení chování buněk a výskytu fokálních adhezí po aplikaci léčiv. Kvantitativní fázové zobrazení získané pomocí Q-PHASE mikroskopu je srovnáno s kvantitativním fázovým zobrazením z HoloMonitoru (PHI AB, Švédsko), na kterém je následně ověřena metody PAMP.

KLÍČOVÁ SLOVA

Koherencí řízený holografický mikroskop, kvantitativní fázové zobrazování, solidní nádory, metastáze, živá nádorová buněčná linie, migrastatika, laserový skenovací konfokální mikroskop, protein 4.1B, fokální adhezní kinázy, HoloMonitor

ABSTRACT

The dissertation thesis deals with the biophysical interpretation of quantitative phase imaging (QPI – Quantitative Phase Imaging) obtained using coherence-controlled holographic microscopy (CCHM – Coherence-Controlled Holographic Microscopy) in the Q-PHASE microscope, Telight, Brno). The theoretical part of this thesis deals with the characteristics of quantitative phase imaging, which provides non-invasive information on the activity of living cells *in vitro*. The main part of the work consists in elaborating a concept and verifying it of a new methodology (PAMP – Primary Assessment of Migrastatic Potential) for the first critical evaluation of drugs for expected anti-migratory/metastatic potential. The result of this method is considered the first sorting evaluation when considering specific migrastatic agents for future complex oncological treatment. PAMP evaluates the speed of cell migration, the growth of tumor cells and controls the risk of appearance of invasive phenotypes. Furthermore, the correlation microscopy method between the Q-PHASE microscope and the laser scanning confocal microscope (LSCM) is proposed to evaluate cell behavior and the occurrence of focal adhesions after drug application. The quantitative phase image obtained using the Q-PHASE microscope is compared with the quantitative phase image from the HoloMonitor (PHI AB, Sweden), on which the PAMP method has been positively verified.

KEYWORDS

Coherence-controlled holographic microscope, quantitative phase imaging, solid tumor, metastasis, live tumor cell line, migrastatics, laser scanning confocal microscope, protein 4.1B, focal adhesion kinases, HoloMonitor

CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo navrhnout a ověřit vhodnou metodiku pro prvotní hodnocení potenciálu kandidátních migrastatik způsobit inhibici migrace za současného sledování růstu nádorových buněk v modelové situaci 2D buněčné kultury. Dále pak pro potřebná měření a vyhodnocování využít biofyzikální interpretaci kvantitativního fázového zobrazení živých nádorových buněk v mikroskopu Q-PHASE (Telight, Brno).

AIMS OF THESIS

The aim of this work was to propose and verify a fitting methodology for the primary evaluation of the potential of candidate migrastatics to inhibit cancer cell migration while controlling cell growth in model situations of 2D cell culture. Use the biophysical interpretation of the quantitative phase imaging of life tumor cells in the microscope Q-PHASE (Telight, Brno) for necessary measurements and assessment.

CITACE

ŠURÁŇOVÁ, Markéta. *Biofyzikální interpretace kvantitativního fázového zobrazení s využitím koherencí řízené holografické mikroskopie.* Brno, 2023. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/146683. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce Pavel Veselý.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená disertační práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem ve své práci neporušila autorská práva (ve smyslu Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

V Brně dne 30. 8. 2023 ....

Mgr. Markéta Šuráňová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému supervisorovi MUDr. Pavlu Veselému, CSc., za odborné rady, motivaci a podporu během celého studia.

Dále patří poděkování prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, PhD., a Ing. Danielu Zichovi, CSc. a kolegům Ing. Miroslavu Ďurišovi a paní Mgr. Veronice Jůzové za jejich obětavost a pomoc s filmováním buněčných linií. Děkuji všem z laboratoře Experimentální biofotoniky za přátelské prostředí.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu firmy Telight za poskytnuté informace k mikroskopu Q-PHASE a softwaru SophiQ.

Též děkuji panu prof. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D., a panu RNDr. Ondřejovi Tolde, Ph.D., z Laboratoře invazivity nádorových buněk, Univerzity Karlovy v Praze, Přírodovědecké fakulty, BIOCEV za jejich odborné rady ohledně migrastatik a holografického mikroskopu HoloMonitor.

Poděkování patří taktéž paní PharmDr. Ireně Štenglové Netíkové, Ph.D., vedoucí Oddělení klinické farmakologie a farmacie z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za cenné rady.

Velké poděkování patří mé rodině za psychickou podporu po celou dlouhou dobu mého studia.

…………………………..

Mgr. Markéta Šuráňová

Obsah

Úvod **1**
1. Kvantitativní fázové zobrazení (QPI) **3**
1.1. Segmentace a prahování QPI 6
1.2. Analýza QPI 7
2. Koherencí řízený holografický mikroskop Q-PHASE **9**
2.1. Optické nastavení a principy fungování 9
2.2. Multimodální zobrazení 11
3. Materiál pro biofyzikální interpretace QPI **11**
3.1. Buněčné linie 11
3.2. Potenciální migrastatika 13
4. Migrace nádorových buněk **16**
4.1. Kolektivní migrace buněk 17
4.1.1. Epiteliální migrace 18
4.1.2. Mezenchymální migrace 18
4.1.3. Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) 19
4.2. Individuální imigrace buněk 19
4.2.1. Améboidní pohyb 19
4.2.2. Mezenchymální pohyb 21
4.2.3. Mezenchymálně-améboidní tranzice (MAT) 23
5. Primární hodnocení léků pro očekávaný migrastatický potenciál (PAMP) **24**
5.1. Materiál 25
5.2. Metodika 26
5.3. Výsledky metody 31
5.3.1. Analýza růstu buněk 31
5.3.2. Výskyt patologických jevů 34
5.3.3. Hodnocení migrační reakce 37
5.3.4. Invazivní fenotyp 40
6. Korelační mikroskopie s fluorescencí **41**
6.1. Korelace 42
6.2. Fokální adhezní kinázy 43
7. Srovnání holografických mikroskopů Q-PHASE a HoloMonitor **45**
7.1. HoloMonitor 45
7.1.1. Současná verze M4 mikroskopu 46
7.2. Srovnání Q-PHASE mikroskopu a HoloMonitoru 48
7.3. Srovnání výsledků metody PAMP měřené na mikroskopech 54
7.3.1. Materiál 54
7.3.2. Výsledky hodnocení migrastatik 54
8. Navržené změny v SophiQ pro analýzu buněk **57**
Diskuze **64**
Závěr **69**
Seznam použitých zkratek a symbolů **71**
Životopis autorky a autorské výstupy **85**

Úvod

Cílem této práce je navrhnout vhodnou metodiku pro biofyzikální interpretace QPI hodnotící účinky migrastatik, která brání všem způsobům invazivity a metastazování nádorových buněk. Metastáze solidních nádorů způsobují většinu úmrtí souvisejících s onkologickým onemocněním. V prevenci jejich vzniku chybí vhodná antimetastatická léčiva. Léčiva s tímto účinkem se označují jako migrastatika. Hlavním přínosem migrastatické léčby [1] je omezení schopnosti nádorových buněk lokálně migrovat do okolích tkání. Invazí pak mohou vytvořit sekundární ložiska, tzv. metastáze. Rozdílem migrastatické léčby [2] oproti cytostatické je to, že nádorové buňky nejsou vystaveny cytotoxickému stresu, nedochází k přerušení dělícího cyklu a buněčné smrti. Buňky jsou pouze méně pohyblivé. U většiny solidních nádorů by to mohlo znamenat posun od fatální prognózy k lokalizovanému chronickému onemocnění. Synergie migrastatik s antiproliferativními léky proti nádorovému onemocnění se ve skutečnosti jeví jako slibný přístup k léčbě a prevenci metastáz [2]. Kritické hodnocení těchto nových antimetastatických látek je oprávněné a vede k nové a vylepšené možnosti léčby solidních nádorů vytvářející pevná ložiska tvořená nádorovými buňkami, která je v souladu s přerušením přirozeného průběhu onemocnění. Očekává se, že onkologické předpisy brzy zohlední pokyny pro vývoj léků zaměřených na prevenci a léčbu metastáz. Jsou již zavedeny všechny prvky pro vstup migrastatik do další fáze protinádorového výzkumu a vývoje.

Cílem této práce je tak vytvořit metodiku, která by dokázala hodnotit morfologické změny buňky a zároveň odhalila její migrační a invazivní potenciál po aplikaci předem vytipovaných léčiv či látek. A vybrat tak potenciální migrastatika, které by mohlo být dále preklinicky testováno. Proces objevování migrastatik a jejich kontraindikací lze účinně podpořit dynamickou časosběrnou analýzou živých nádorových buněk pomocí QPI získaného z Q-PHASE mikroskopu a hodnocením chování. Jiné standardní mikroskopické techniky, jako je fázový kontrast, vyžadují dlouhé doby pozorování a obrazy je obtížné kvantifikovat. Proto lze využít všech výhod QPI pro výběr vhodného kandidáta pro migrastatickou léčbu.

Předložená dizertační práce popisuje biofyzikální interpretaci kvantitativního fázového zobrazování (QPI – Quantitative Phase Imaging) získaného pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM – Coherence-Controlled Holographic Microscope, Q-PHASE) [3]. Cílem této práce je navrhnout vhodnou metodiku pro *in vitro*

model QPI hodnocení migrastatik jako účinných inhibitorů migrace a invazivity nádorových buněk.

Práce je rozdělena do 8 kapitol. Kapitoly 1 a 2 jsou věnovány popisu kvantitativního fázového zobrazení a holografického mikroskopu Q-PHASE, který toto zobrazení poskytuje. V kapitole 3 jsou popsány vybrané lidské buněčné linie, které jsou v této práci vyšetřovány pomocí Q-PHASE mikroskopu. Zejména tato kapitola popisuje buněčné linie (A549, HT1080 a NDHF) a dále léčiva (migrastatika; 4-hydroxyacetofen, belumosudil, doxycyklin, fasudil, midostaurin, niklosamid a pimosid), která by měla ovlivnit migraci buněk. Druhy migrace nádorových buněk jsou charakterizovány v následující kapitole 4.

Hlavní část tvoří kapitola 5, která pojednává o metodě PAMP (Primary Assessment of Medicines for Expected Migrastatic Potential) vyvinuté pro hodnocení migrastatik. V této kapitole je popsána metodika, která se skládá ze tří kroků, hodnocení morfologie, dynamiky a invazivního fenotypu buněk. Ověření této metody je provedeno na buněčných liniích. Buňky jsou vystaveny účinkům potenciálních migrastatik. Cílem je analýza chování buněk, které jsou monitorovány pomocí QPI získaného z mikroskopu Q-PHASE. Výsledky účinků léčiv na buněčné linie jsou uveřejněny v publikaci [1] a v této práci dále rozšířeny.

Další metoda, která hodnotí migrastatický účinek vybraných léčiv a navazuje na metodu PAMP, je zde popsána v kap. 6. Jedná se metodu korelační mikroskopie mezi holografickým mikroskopem Q-PHASE a laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem (LSCM) [4]. Snímání začíná tím, že jsou buňky po aplikaci migrastatik zobrazeny pomocí Q-PHASE mikroskopu a následně imunocytochemicky ošetřeny pro detekci proteinu 4.1B a fokálních adhezních kináz a snímány na LSCM.

V předposlední kapitole 7 jsou porovnávány dva holografické mikroskopy, a to Q-PHASE mikroskop a HoloMonitor. Jedná se o porovnání nejen parametrů optických a technických, ale také výsledků jednotlivých měření. Metodika PAMP byla provedena i na HoloMonitoru. Ověřovány byly reakce buněk HT1080 na migrastatika ve všech základních koncentracích.

Poslední kapitola 8 pak popisuje navržené změny v softwaru SophiQ pro buněčnou analýzu. Změny byly konzultovány s firmou Telight a většina z nich realizována. Jednalo se o zobrazení a ukládání jednotlivých grafů a tabulek. Největším úspěchem je zjednodušený systém pro hodnocení celého vyšetřovací plata najednou, který byl kvůli metodě PAMP inicializován.

1. Kvantitativní fázové zobrazení (QPI)

Kvantitativní fázové zobrazení [5-10] je neinvazivní zobrazovací systém živých buněk a tkání. Tato zobrazovací metoda nepoužívá žádnou imunochemii a umožňuje tak monitorování živých buněk v reálném čase s minimální fototoxicitou a bez nežádoucích artefaktů, jako je např. halo efekt známý ze Zernikova fázového kontrastu. Tato technika je přímo úměrná buněčné suché hmotě buněk a může být použita pro monitorování a přímou kvantifikaci změn suché hmotnosti uvnitř buněk v pg/μm^2 a kvůli vysoké citlivosti umožňuje detekovat a kvantifikovat i ty nejmenší změny hmotnosti.

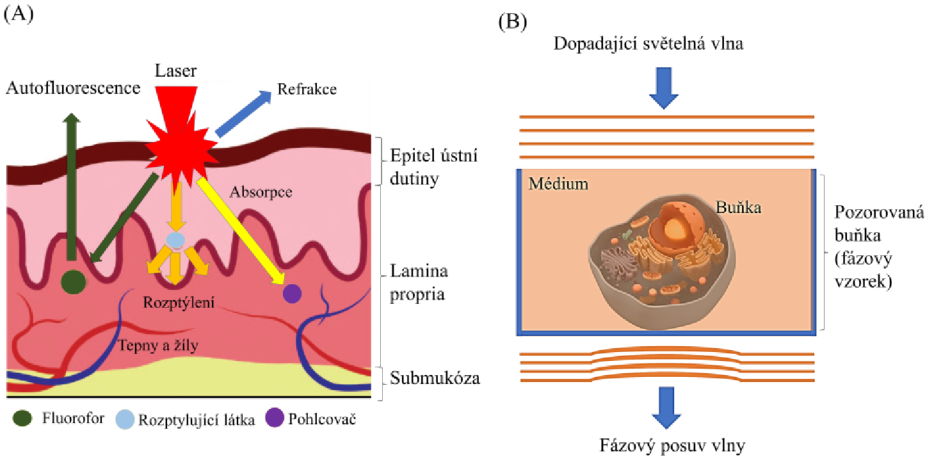
Průsvitné objekty mají vlastnost pohlcovat a rozptylovat jen malé množství světla, viz obr. 1 (A). Díky tomu je možné průsvitné objekty snáze pozorovat v běžných světelných mikroskopech [7, 8] pomocí fázového kontrastu. Na rozdíl od konvenčních snímků s fázovým kontrastem jsou snímky vhodné pro zpracování pomocí softwaru pro analýzu, protože měření fázového zpoždění v buňkách poskytuje kvantitativní informace o morfologii a rozložení suché hmoty jednotlivých buněk [11-13].

Neinvazivně jsou buněčné kultury snímány např. v koherencí řízeném holografickém mikroskopu (Coherence-Controlled Holographic Microscope; CCHM), který je označen firmou Telight jako Q-PHASE mikroskop) [11–18]. Tento mikroskop poskytuje kvantitativní fázové zobrazení (Quantitative Phase Imaging; QPI) a využívá nekoherentního osvětlení [19–28].

Zobrazovací technika QPI mikroskopu Q-PHASE vychází z faktu, že doba šíření světla v konkrétním prostředí závisí buď na indexu lomu a výšce objektu, nebo přímo na délce optické dráhy, protože ta je dána indexem lomu a výškou objektu. Proto, když světelná vlna prochází vzorkem s proměnným indexem lomu a různou výškou (např. tkání nebo buňkou), její vlnoplocha je zdeformována a dochází k fázovému posuvu vlny [3, 6]. Např. středy buněk jsou obvykle silnější a dochází zde k většímu fázovému posuvu než na tenkých okrajích, kde je posuv menší, viz obr. 1 (B).

S referenční vlnou pak interferuje pouze balistická část signálního svazku, tedy světlo rozptýlené pouze pozorovaným objektem (buňkou) [16, 17]. Výsledkem je lepší kontrast zaostřeného obrazu a je umožněno zkoumání intracelulárního prostředí a dynamiky buňky. Samotné buňky mají různé tvary a velikosti v řádu desítek mikrometrů. Dochází ke zviditelnění částí buněk a tkání [29, 30], jako je např. extracelulární matrix (ECM), který je složen primárně z kolagenových a elastinových vláken o velikosti od 10 do 500 nm v průměru. Buňky se taky skládají z menších struktur, jako jsou

membrány (10 nm), organely včetně jádra (5–10 µm), mitochondrie (0,2–2 µm) a mnoho dalších. Buňky také obsahují cytoskelet vytvořených z vláken o průměru 7 až 25 nm. Jádro obsahuje jadérka (0,5–1,0 µm) a DNA ve formě chromatinu, které mají různou hustotu a tvoří globule s délkou v řádu stovek nanometrů [31]. Je tedy zřejmé, že v buňce dochází k mnoha fázovým posuvům kvůli její heterogenitě [32]. Ale pro zjednodušený výpočet fázového posuvu světelné vlny v buňce lze předpokládat homogenního rozložení materiálu uvnitř buňky.



Obrázek č. 1: Ilustrace interakce světla s heterogenním prostředím tkáně a buňky. A) Šíření světla ve tkáni v zásadě řídí 3 jevy: rozptyl, absorpce a fluorescence (převzato z [31]). Část elektromagnetického záření vzorkem (buňkou či tkání) neprojde, ale může být jím rozptýlena nebo absorbována. B) Fázový posuv vlny, která prochází buňkou.

Výpočet fázového posuvu $\varphi_b(x, y)$ indukovaného buňkou s homogenním rozložením indexu lomu buňky n_b, která je obklopena prostředím o indexu lomu média n_m (jako je zobrazeno na obr. 1 (B)), může být popsán následujícím vztahem podle [3, 11]

$$\varphi_b(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} d_b(x, y)(n_b - n_m), \quad (1)$$

kde $d_b(x, y)$ je tloušťka buňky, λ je vlnová délka světla (λ = 660 nm pro Q-PHASE od firmy Telight), x, y jsou prostorové souřadnice v rovině objektu.

Celkový fázový posuv navozený buňkou φ_{total} se vypočítá jako součet fázových hodnot v pixelech patřících do oblasti buňky, tedy platí

$$\varphi_{total} = \sum_{i=1}^{k} \varphi_i, \quad (2)$$

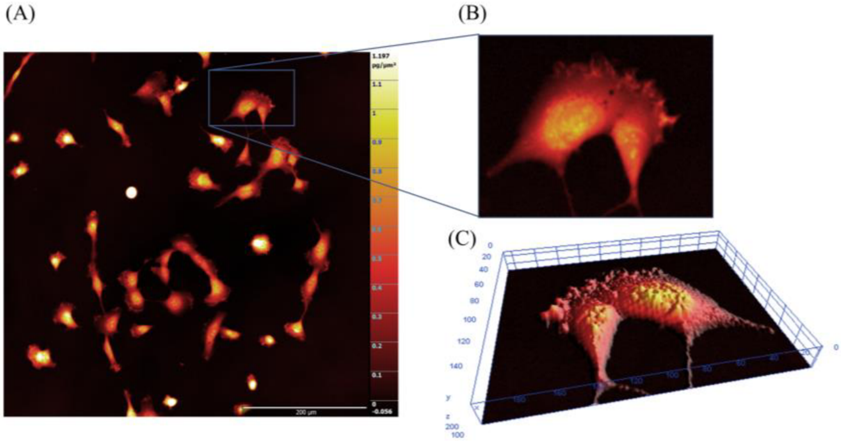
kde k je počet pixelů a φ_i je hodnota fáze v $i - tém$ pixelu patřícím do oblasti buňky.

Fázový posuv $\varphi_b(x, y)$ nese informaci o hustotě suché hmoty, která je úměrná fázovému posuvu způsobenému buňkou

$$\mu(x, y) \approx \frac{1}{\gamma}\, \varphi_b\,(x, y), \tag{3}$$

kde konstanta γ je známa jako specifický přírůstek indexu lomu světla a je průměrně 0,18 μm^3/pg. Hustota suché hmoty buňky se udává v pg/μm^2.

Na základě modelu indexu lomu buňky zavedeného Barerem [33] je efektivní index lomu buňky lineárně úměrný koncentraci proteinu v buňce. Ze vzorce (3) se z QPI získává informaci o hustotě suché hmoty buňky z každého pixelu. QPI snímky jsou následně zobrazeny v barevné škále v jednotkách pg/μm^2, viz obr. 2 (A-C).



Obrázek č. 2: Ilustrace QPI zobrazující buňky adenokarcinomu plic A549 a zobrazující škálu hustoty suché hmoty. Jedná se o ukázku v pseudobarevné škále, která zobrazuje hustotu suché hmoty. A) Ukázka QPI zobrazující buňky A549. Rozložení hustoty suché hmoty buňky v pg/m^2. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm. B) Vybrané buňky z předešlého snímku QPI. C) Ilustrace 3D rozložení hustoty suché hmoty buněk pomocí programu FIJI.

V posledních letech se tak QPI ukázalo jako nenahraditelná zobrazovací metoda v biologickém výzkumu [34, 35]. QPI poskytuje neinvazivní zobrazení v reálném čase a vysoce kontrastní kvantitativní prostředek pro zobrazení průhledných vzorků. Dále je QPI vhodné pro screening buněk a tkání bez nutného imunobarvení [36] a při automatizované analýze obrazových dat pomocí umělé inteligence [13, 27]. Mimo jiné slouží pro identifikaci vzácných dějů v biologii, zejména při objevování a testování léků [1, 37], zkoumání rakovinných buněk [38] a kmenových buněk [39]. Ale i při identifikaci patologických dějů buněk, jako jsou např. apoptóza, nekróza atd. [40, 41]. Dále má uplatnění v aplikacích sledujících změny migrace buněk a morfologie, jako je sledování distribuce suché hmoty v buňkách [42], nebo sledování chování buněk ve 3D kolagenovém matrixu [34, 43, 44].

Jednou z dalších výzev a využití v biomedicínském výzkumu je vývoj zobrazovacích metod v zakalených médiích [18]. Při zobrazení přes zakalená média, jako jsou buněčné struktury, je obraz degradován světlem rozptýleným z jiných rovin než z rovin vzorku [19]. Zobrazovací metody tak lze rozdělit do dvou skupin, přičemž první skupina se snaží minimalizovat vliv rozptýleného světla [12] a druhá jej opticky či digitálně řídit [15]. První skupina metod stále více využívá efekt koherenční brány [16, 17]. Tento efekt filtrace vzniká z omezené prostorové a časové koherence osvětlení, a je proto součástí částečně koherentních optických systémů. Zobrazovací techniky, které využívají koherenční bránu k oddělení pouze balistického světla (rozptýleného jen objektem) od nežádoucího mnohonásobně rozptýleného (nebalistického) světla [17], zahrnují optickou koherenční tomografii a mikroskopii [18], achromatickou digitální holografii [3, 19], Hornovu mikroskopii [20] nebo difrakční tomografii v bílém světle [21].

Ve srovnání s koherentním osvětlením poskytuje částečně koherentní osvětlení kvalitnější QPI, bez koherentního šumu a se zlepšeným příčným rozlišením. Cílem biologických experimentů je vyhodnotit přínos QPI pro klasifikaci morfologie dynamiky tkáňových kultur a začít zavádět QPI do klinické praxe.

1.1. Segmentace a prahování QPI

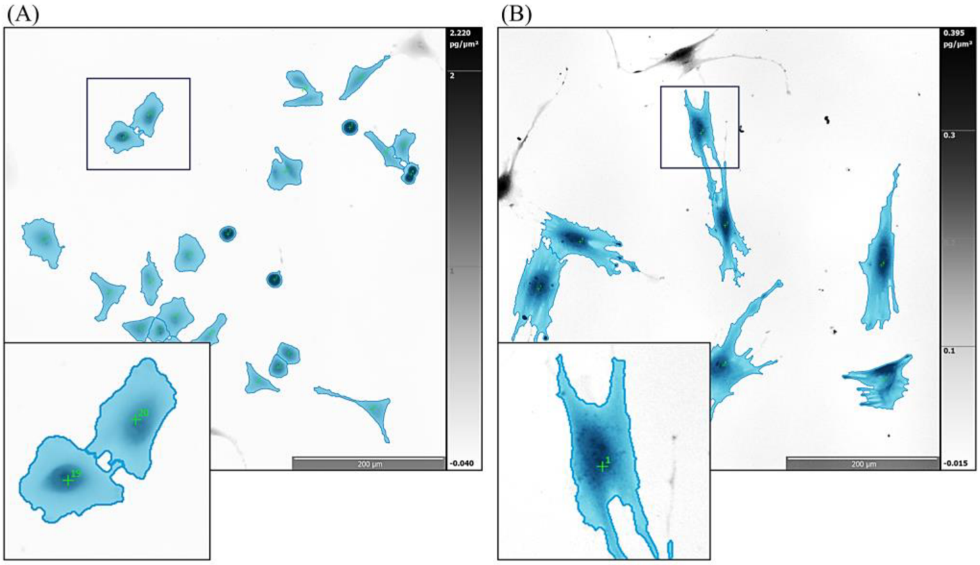
Při konkrétním časosběrném experimentu jsou snímky shromážděny v databázi. Např. pro metodu PAMP (popsanou v kap. 5) se obvykle filmovalo během jednoho experimentu přibližně 30 až 40 zorných polí, záleželo na počtu léčiv (migrastatik - popsané v kap. 3) a počtu využitých kanálků v Ibidi µ-slide VI$^{0.4}$. Snímání trvalo vždy 20 hodin a snímky byly pořizovány každých 5 minut. Celkem se pracovalo s 241 QPI snímky z každé pozice na vzorku. Filmovali se 3 buněčné linie (A549, HT1080 a NDHF – popsané v kap. 3) a vytvořilo se celkem pro metodu PAMP 13 jednotlivých experimentů, 418 videí a 100 738 snímků QPI. Každý snímek QPI byl dále zpracován, každá jednotlivá buňka v něm segmentována a analyzována. Segmentace se prováděla pomocí softwaru SophiQ (Telight).

Segmentace obrazu QPI [45] je metoda postavená na různých principech digitálního zpracování obrazu, která slouží k automatickému rozdělení vlastního obrazu na oblasti se společnými vlastnostmi. Typickým cílem segmentace obrazu je identifikace buňky a její odlišení od pozadí. Pro tento účel segmentace používá software SophiQ (k mikroskopu Q-PHASE) metodu watershed [46, 47] .

Významnou operací je též prahování hran segmentu (*Edge Segment Threshold*). Tato operace určuje minimální délku segmentace buňky, ve které se buňka dotýká okraje obrazu. Pokud se segmentovaná buňka dotýká okraje zorného pole, je odstraněna ze segmentace tohoto obrazu a následné analýzy.

Samotná segmentace funguje vždy jen s jedním obrazem QPI (viz obr. 3). V případě časosběrného QPI lze zvolit algoritmus a pomocí něj určit, který segment na předchozím a aktuálním obrazu patří ke stejné buňce. Tento algoritmus se používá pro sledování (*Tracking*) trajektorií buněk. Algoritmus pracuje se dvěma obrazy a se seznamem těžišť buněk pro každý z obrazů QPI a pokouší se určit, které z těžišť na novém obrazu QPI nejlépe odpovídá těžišti předešlého obrazu. Toto se opakuje několikrát, nejprve pro každou buňku s nejmenším poloměrem a pak pro dosud nesegmentované buňky.

Po celou dobu segmentace časosběrného QPI mají buňky své identifikační číslo a určené těžiště, viz obr. 3. Pokud se číslování buněk mění, jedná se o chybné nastavení prahových hodnot.



Obrázek č. 3: Ukázka segmentace QPI pomocí programu SophiQ. A) QPI získané z Q-PHASE mikroskopu a ilustrující epiteliální fenotyp buněk A549 a B) mezenchymální fenotyp buněk NDHF. Nejsou segmentovány buňky dotýkající se okraje zorného pole. Každé buňce z QPI je přiděleno číslo pro přesnější analýzu jejího pohybu. Těžiště buňky je označeno zeleným křížkem. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm.

1.2. Analýza QPI

Analýzu jsem prováděla v softwaru SophiQ, pomocí něhož se hodnotí parametry pro morfologické a dynamické změny chování buněk. Zde uvedené parametry [46]

se používají pro analýzu primárního hodnocení léků pro očekávaný migrastatický potenciál (PAMP, metodika popsaná v kap. 5).

Např. pro hodnocení morfologie buněk se využívá parametr tzv. celkové hmotnosti buňky (z angl. *Mass*). Tento parametr je vypočítán jako součet hodnot hustoty suché hmoty buněk M a vychází se tak ze vzorce č. 3 (viz kap. 1) určených z fáze na každém pixelu spojeném s konkrétní buňkou, tedy platí

$$Mass = \sum_{i=1}^{N} whM(i), \tag{4}$$

kde w a h jsou šířka a výška pixelu, N je počet pixelů buňky a M je hustota suché hmoty buňky.

Pomocí pixelů v oblasti buňky lze vypočítat plochu buněk (*Area*) definovanou jako

$$Area = Nwh, \tag{5}$$

Dalším parametrem, který hodnotí morfologické změny buněk, je procento kruhovitosti (z ang. *Circularity*) jednotlivých buněk:

$$Circularity = 100\frac{4\pi \cdot Area}{Perimeter^2}. \tag{6}$$

Pro výpočet obvodu buňky (*Perimeter*) používá software iterativní přístup, který přesněji sleduje dráhu pixelů na okraji buňky.

Pro analýzu pohybu buněk (dynamických vlastností buňky) je důležité vypočítat rychlost migrace (*Speed*) buněk následujícím vztahem

$$Speed(t_n) = \frac{|WCG(t_n) - WCG(t_{n-1})|}{t_n - t_{n-1}}, \tag{7}$$

kde t_n je čas v okamžiku *n* a t_{n-1} je čas v předchozím okamžiku *n-1*, těžiště WCG (*Weighted Center of Gravity*) je dvourozměrný vektor se souřadnicemi *x* a *y*. Tento vektor je dalším důležitým parametrem i pro následné parametry a je definován jako

$$WCG = \frac{\sum_{i=1}^{N} whM(i)(x_i, y_i)}{Mass}. \tag{8}$$

Těžiště je součástí výpočtu indexu meandrovitosti (*Meandering index*) pohybu buněk a platí pro něj následující vztah

$$MeanderingI(t_n) = \frac{|WCG(t_n) - WCG(t_0)|}{\sum_{i=1}^{N}|WCG(t_n) - WCG(t_{n-1})|,}, \tag{9}$$

Čitatel zlomku (9) představuje Euklidovskou vzdálenost (*Euclidean distance*).

2. Koherencí řízený holografický mikroskop Q-PHASE

V této práci je popsán Q-PHASE mikroskop od firmy Telight Brno vyvinutý ve spolupráci s VUT v Brně. Tento přístroj je založen na patentované technologii CCHM.

Koherencí řízený holografický mikroskop CCHM (Q-PHASE) [3, 48], kombinuje konfiguraci off-axis a achromatický mřížkový interferometr umožňující použití osvětlení libovolně nízké koherence. Když se totiž objektový a referenční paprsek tohoto mikroskopu rekombinují ve výstupní rovině, objeví se interferenční obrazec, který odpovídá obrazu drážek difrakční mřížky. To umožňuje Q-PHASE mikroskopu [3] využít popsané výhody in-line i off-axis systémů při současném odstranění nevýhod.

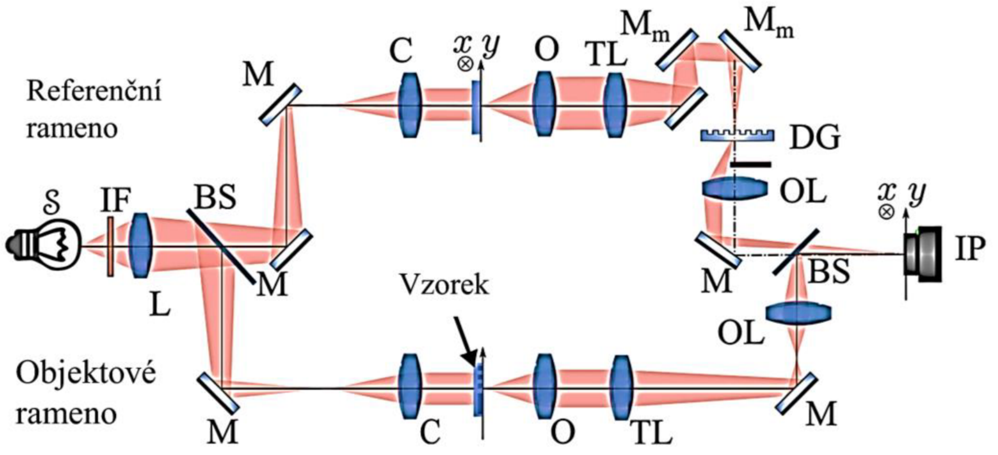
2.1. Optické nastavení a principy fungování

Optické nastavení Q-PHASE mikroskopu (2. generace) je založeno na Mach-Zehnderově interferometru [49] upraveného pro achromatickou mimoosovou holografickou mikroskopii Tomášem Slabým [3] a Pavlem Kolmanem [28]. Vychází se z 1. generace tohoto mikroskopu, který byl zkonstruován profesorem Chmelíkem a docentem Harnou [50].

Oproti 1. generaci mikroskopu je docíleno vyšší spektrální propustnosti změnou umístění difrakční mřížky. Dále jsou použity identické kondenzory (C), na nekonečno korigované objektivy (O) a tubusové čočky (TL), aby se získal větší pracovní prostor.

Optická sestava Q-PHASE mikroskopu 2. generace, viz obr. 4, se skládá z opticky ekvivalentního objektového a referenčního ramene, přičemž v objektovém rameni je přítomen fázový vzorek.

V systému Q-PHASE se k osvětlení (S) používá LED (LED Engin LZ4-00R208, vlnová délka 660 nm, výkon až 2,9 W) pro zajištění prostorově širokého nekoherentního osvětlení. Je použit interferenční filtr (IF) s centrální vlnovou délkou 660 nm a pološířkou 10 nm. Zdroj je zobrazen dvojicí achromatických čoček - dubletů (L; ohniskové vzdálenosti 63,5 a 350 mm) přes dělič svazků (BS) do předních ohniskových rovin kondenzorů (C; kondenzory Nikon LWD, 0,52 NA).



Obrázek č. 4: Optické nastavení koherencí řízeného holografického mikroskopu: S, světelný zdroj; IF, interferenční filtr; L, čočka; BS, děliče svazků; M, zrcadla; Mm, pohyblivá zrcátka; C, kondenzory; O, objektivy; TL, tubusové čočky; DG, difrakční mřížka; OL, výstupní čočky; IP, interferenční rovina.

Rozhodující funkce a výhody tohoto mikroskopu závisí na difrakční mřížce (DG; transmisní fázová mřížka s frekvencí drážek 150 mm^{-1}) implementované v referenčním rameni podle principů navržených Leithem [19]. Zajišťuje tvorbu mimoosového hologramu v interferenční rovině (IP) pro zdroje libovolného stupně koherence.

Základní obrazové vlastnosti závisí na parametrech kondenzorů (C; kondenzorové čočky Nikon LWD, 0,52 NA) a objektivů (O; Nikon Plan Fluorite Objectives, 10x/0,3 NA/16 mm WD a Nikon Plan Fluorite 20x/0,5 NA/2,1 mm WD) v kombinaci s tubusovými čočkami (TL; Nikon, ohnisková vzdálenost 200 mm).

Dvoubodové rozlišení v mikroskopu Q-PHASE se pro výše uvedené experimentální parametry blíží teoretické hodnotě 1,3 μm (pro objektiv 10x/0,3) a 0,8 μm (pro objektiv 20x/0,5) stanovené poloměrem Airyho disku mikroskopové rozptylové funkce (*Point Spread Function – PSF*), viz [48], kap. 6.2. Rozptylová funkce popisuje světlo vznikající v jednotlivých bodech snímaného obrazu.

Mikroskop je velmi dobře automatizován a lze jej jemně nastavit díky piezomotorům. Hologramy jsou zaznamenány v IP pomocí kamery Andor Zyla 4.2 sCMOS. Hologram zaznamenaný kamerou se dále zpracovává a lze z něj extrahovat kvantitativní fázové informace. Pro zobrazení se používá pouze +1. řád difrakční mřížky (ostatní řády difrakce jsou eliminovány prostorovou filtrací v ohniskové rovině výstupních čoček OL).

2.2. Multimodální zobrazení

Q-PHASE je multimodální holografický mikroskop. Jakmile je získán fázový obraz, lze z něj pomocí dalších algoritmů pro zpracování obrazu získat obraz se simulovaným diferenciálním interferenčním kontrastem, případně použít filtr typu horní propust (viz obr. 5).

Simulovaný diferenciální interferenční kontrast (simulovaný DIC) je vypočten jako 1D gradient kvantitativního fázového obrazu [51]. Technika DIC je dobře zavedená mezi uživateli. Zde je toto zobrazení získáno bez jakýchkoliv dalších nastavení mikroskopu, které jsou při použití běžného mikroskopu jinak nutné. Filtr s horní propustí [52] zvýrazňuje vysoké prostorové frekvence (jemné detaily buněk) a zároveň potlačuje nízké prostorové frekvence (větší objekty) v obraze.

Dále lze získat systémem Q-PHASE timelapse (časosběrné snímání), multi-position, multi-channel a Z-stack, aby se synergicky poskytl úplnější obraz a kompletnější analýza vzorku.

3. Materiál pro biofyzikální interpretace QPI

Pro pozorování, vyhodnocování chování živých lidských buněk *in vitro* a pro ukázku metodiky PAMP pomocí zobrazovací techniky QPI jsou v této kapitole popsány vybrané tři buněčné linie a sedm léčiv tzv. migrastatik.

3.1. Buněčné linie

Pro metodu PAMP a další studii v této práci jsou vybrány a zkoumány živé lidské nádorové a nenádorové buněčné linie A549, HT1080 a NDHF. Tyto buňky se liší nejen morfologií (obr. 5), ale i dynamikou migrace (kap. 5).

Buňky nemalobuněčného karcinomu plic A549 [52] jsou lidské alveolární buňky epiteliálního typu. Jsou široce používány jako model plicních epiteliálních buněk typu II pro výzkum metabolismu léčiv a jako transfekční hostitel.

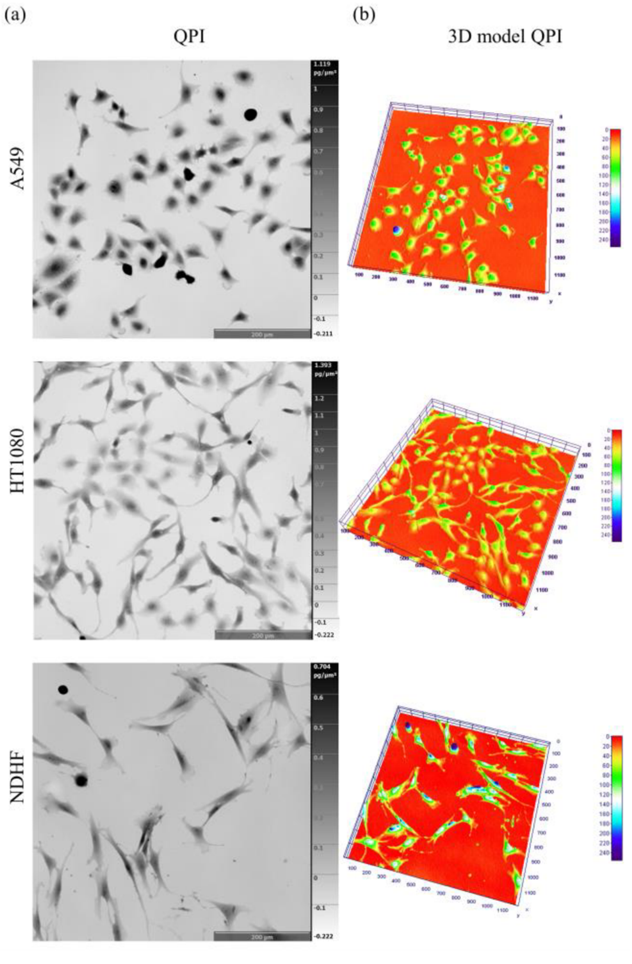
Buněčná linie HT1080 [53-55] představuje typ fibroblastického sarkomu. Tento sarkom je maligní mezenchymální nádor odvozený z fibrózní pojivové tkáně. Vzniká ve

vazivových tkáních kostí. Napadá dlouhé a ploché kosti jako např. stehenní a holenní kost a překrývající sval.

Buněčná linie NDHF [56] normálních dermálních lidských fibroblastů (dar Dr. Evy Pagáčové, Biofyzikální ústav, Brno, Akademie věd ČR) hraje důležitou roli v systému buněčné obnovy a při udržování integrity kůže. Jedná se o nenádorovou buněčnou linii.

Morfologie těchto buněk je odlišná, buňky A549 jsou podle získaných QPI více zakulaceny než HT1080 a NDHF buňky, které mají více protáhlý charakter.

Všechny tři buněčné linie jsou kultivovány při 37 °C ve zvlhčeném inkubátoru s 3,5% CO_2 v Hankově minimálním esenciálním médiu (HMEM) doplněném o neesenciální aminokyseliny, 1 mM pyruvátu sodného, 2 mM L-glutaminu, 10% fetální hovězí sérum a gentamicin (10 µg/ml). Pro časosběrný záznam je médium obohaceno o 20 mM HEPES pro udržení pH 7,4. V inkubátoru mikroskopu Q-PHASE je udržována teplota 37 °C.



Obrázek č. 5: Ukázka QPI snímků jednotlivých buněčných linií. A) Jsou zobrazeny buňky A549, HT1080 a NDHF pomocí QPI. Objektiv 10x/0,3.šedá škála je v pg/µm²). Měřítko 200 µm. B) 3D zobrazení buněk pomocí programu FIJI.

3.2. Potenciální migrastatika

Šíření nádorových buněk z místa původního primárního solidního nádoru vede k vytváření dceřiných ložisek tzv. metastáz po celém těle. Metastazování [57] způsobuje více než 90 % mortality onkologických pacientů [58, 59]. I když jde o klíčovou příčinu selhání léčby solidních nádorů a vysoké úmrtnosti, metastazování není natolik objasněno, aby mu mohlo být účinně zabráněno.

Metastazování je komplexní jev [60], který vyžaduje použití více terapeutických zásahů, aby se mu účinně zabránilo. Proto přijetí modelu kombinované terapie a současné cílení na více signálních cest jeví klíčem k boji proti významným genomickým a fenotypovým změnám metastazujících nádorových buněk.

Léčba solidních nádorů by proto měla být doplněna léky, které snižují schopnost nádorových buněk pronikat přes extracelulární matrix (ECM) a následně vytvářet metastázy. Vzhledem k tomu, že mechanismy určující klonální proliferaci a migraci buněk jsou odlišné, měly by být antiproliferativní strategie při objevování protinádorových léčiv doplněny o mechanismy cílené na motilitu a migraci [59].

V protinádorových terapiích se v nedávné době začala do výzkumu zavádět migrastatika. Termín „migrastatika“ (z latinského „migrare“ a řeckého „statikos“) je určen pro léčiva interferující se všemi způsoby migrace nádorových buněk [1, 2, 58, 59, 61, 62]. Migrastatika se zásadně liší od tradičních cytostatik, které jsou primárně zaměřeny na inhibici buněčné proliferace a interferují s mechanismy migrace buněk. Tím zabraňují invazivitě a následnému metastázování nádorových buněk.

Pro následující metodu PAMP (viz kap. 5) prováděnou pomocí QPI jsou vybrána tato migrastatika:

4-hydroxyacetofenon (4-HAP) [64], který je známý jako bioaktivní sloučenina nacházející se v několika léčivých bylinách, má silný stimulační účinek na sekreci žluči v játrech. Tato chemikálie inhibuje adhezi a migraci nádorových buněk *in vitro* a snižuje metastatickou zátěž v modelu jaterních metastáz *in vivo*.

Belumosudil (BEL) je inhibitor proteinkinázy obsahující vinuté spirálky (ROCK) související s Rho [65], který byl vyvinut společností Kadmon Pharmaceuticals pro léčbu chronické reakce štěpu proti hostiteli (cGVHD) a systémové sklerózy (sklerodermie). Byl podle [66] schválen pro lékařské účely v USA v červenci 2021, zejména pro léčbu dospělých a dětských pacientů ve věku ≥ 12 let s cGVHD po selhání alespoň dvou předchozích linií systémové terapie. BEL podléhá regulačnímu přezkumu v Austrálii, Kanadě, Velké Británii a Švýcarsku pro cGVHD. V USA probíhala klinická studie [65]

beumosudilu na léčbu systémové sklerózy. Studie Grazianiho a kol. [67] ukazuje, že tento lék může inhibovat pohyb améboidních buněk.

Doxycyklin (DOXY) je tetracyklinové antibiotikum druhé generace [68], které bylo schváleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro prevenci a léčbu specifických infekčních stavů, jako jsou sexuálně přenosné infekce, respirační infekce, bakteriální infekce, lymská borelióza, oční infekce, antrax, akutní střevní amébiasis, cestovatelský průjem a těžké akné. Byl také zkoumán [69] pro léčbu specifických nádorů, protože některé studie naznačují, že doxycyklin může inhibovat buněčnou proliferaci a migraci, indukovat apoptózu a blokovat mezeru v buněčném cyklu.

Fasudil (FAS) je chemická látka, která je silným inhibitorem Rho-kinázy a vazodilatátorem [70]. Od jeho objevení se používá k léčbě cerebrálních vazospasmů, které jsou často způsobeny subarachnoidálním krvácením, a také ke zlepšení kognitivního poklesu pozorovaného u pacientů s mrtvicí. Bylo zjištěno ve studii [70], že je účinný při léčbě plicní hypertenze, která by mohla mít pozitivní vliv na migraci buněk z hlediska migrastatické léčby. Podle studie [71] jsou možnými mechanismy FAS ještě zlepšení koronární vazodilatace, inhibice apoptózy a oxidačního stresu, zmírnění zánětu a snížení endoplazmatického retikula.

Midostaurin (MID) je více cílený inhibitor proteinkinázy, který byl zkoumán pro léčbu akutní myeloidní leukémie, myelodysplastického syndromu a pokročilé systémové mastocytózy. Podle studie Stone et al. [72] přidání midostaurinu do standardní chemoterapie významně prodloužilo celkové přežití u onkologických pacientů a také pacientů s akutní myeloidní leukémií a mutací FLT3. Klinická studie [73] zkoumala užitečnost MID u solidních nádorů, leukemie a lymfomů, ale nepodařilo se zopakovat preklinické nálezy.

Niklosamid (NICL) je antihelmintikum používané k léčbě zamoření tasemnicemi [74], ale není účinný proti jiným červům, jako jsou motolice nebo škrkavky. Studie [75-78] ale ukázaly, že NICL může mít široké klinické využití pro léčbu jiných onemocnění, než jsou onemocnění způsobená parazity. Tato onemocnění a symptomy mohou zahrnovat nádory, bakteriální a virové infekce, metabolická onemocnění, jako je diabetes typu II, NASH a NAFLD, zúžení tepen, endometrióza, neuropatická bolest, revmatoidní artritida, sklerodermózní reakce štěpu proti hostiteli a systémová skleróza. Mezi základní mechanismy spojené s lékovým působením NICL patří odpojení oxidativní fosforylace a modulace signálních drah Wnt/β-kateninu, mTORC1, STAT3, NF-KB a Notch. Tento lék dále indukuje apoptózu u lidských nemalobuněčných plicních nádorů linie A549 a CL1-

5 buněk podle studie Chai a kol. [79]. Další studie od Lin a kol. [80] a Yeh a kol. [81] potvrdily, že tento lék inhibuje migraci buněk.

Pimozid (PIM) je antipsychotikum ze třídy difenylbutylpiperidinu, který má ve srovnání s chlorpromazinem vyšší účinnost než haloperidol. Má také speciální neurologické indikace pro Tourettův syndrom a rezistentní tiky [82]. Studie Dakir a kol. [83] demonstruje toto léčivo jako novou *in vitro* a *in vivo* protinádorovou léčbu proti buňkám nádoru prsu a plic a poskytuje důkaz koncepce domnělého léku jako nového přístupu k protinádorové terapii.

Pro ověření 2D navrhované metody PAMP (kap. 4) jsou zkoumány interakce výše uvedených sedmi migrastatických kandidátů: 4-hydroxyacetofenonu, belumosudilu, doxycyklinu, fasudilu, midostaurinu, niklosamidu a pimozidu s lidskými buněčnými liniemi A549, HT1080 a NDHF. Vychází se z teorie, že jednotlivé nádorové buňky vykazují dva způsoby invaze, a to mezenchymální a améboidní [84, 85]. Proto pro zkoumání různých lékových inhibitorů buněčné invaze jsou vybráni zástupci obou skupin invaze.

Předpokládaní migrastatičtí kandidáti jsou dále charakterizováni v tabulce 1 (zkoumané koncentrace) a v tabulce 2 (jaký druh invazivity inhibují). Koncentrace jsou stanoveny podle doporučené terapeutické plazmatické koncentrace při podávání léků. Výsledky zkoumání snížených (faktor 0,1 a 0,3) a zvýšených (faktor 1,3) koncentrace

Tabulka č. 1: Koncentrace potenciálních migrastatik

Potenciální migrastatika	**Léčivo (L) nebo chemická látka (CH)**	**Koncentrace**			
		Faktor 1,3	**Faktor 1 (základní)**	**Faktor 0,3**	**Faktor 0,1**
4-Hydroxyacetofenon (4HAP)	CH	5,2 µM	4 µM	1,2 µM	0,4 µM
Belumosudil (BEL)	L	1,3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM
Doxycyklin (DOXY)	L	1,3 µg/ ml	1 µg/ml	0,3 µg/ ml	0,1 µg/ ml
Fasudil (FAS)	L i CH	13 µM	10 µM	3 µM	1 µM
Midostaurin (MID)	L	1,3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM
Niclosamid (NICL)	L	1,3 µM	1 µM	0,3 µM	0,1 µM
Pimozid (PIM)	L	13 µM	10 µM	3 µM	1 µM

Tabulka č. 2: Migrastatika jako inhibitory améboidní a mesenchymální buněčné invaze

Potenciální Migrastatika	**Důvod výběru / inhibitor buněčné invazivity**	**Ref.**
4-Hydroxyacetofenon (4HAP)	Inhibují zejména améboidní invazivitu	[64]
Belumosudil (BEL)	Inhibitor améboidní invazivity	[67]
Doxycyklin (DOXY)	Inhibitor mezenchymální invazivity	[86]
Fasudil (FAS)	Inhibitor améboidní invaziv ity	[70]
Midostaurin (MID)	Inhibitor mezenchymální invazivity	[87]
Niclosamid (NICL)	Potenciálně inhibuje mezenchymální a améboidní invazivitu	[80]
Pimozid (PIM)	Inhibitor mezenchymální invazivity Inhibuje metastázy na zvířecím modelu	[83, 88]

4. Migrace nádorových buněk

Migrace nádorových buněk je zásadní pro vznik metastáz. Průběh metastáz zahrnuje řadu fází, které vedou ke vzniku sekundárních nádorů ve vzdálených orgánech a jsou z velké části odpovědné za mortalitu a morbiditu pacientů. Pro invazi do okolních tkání využívají buňky různé typy migrace a invaze, proto je žádoucí zohlednit typ migrace nádorových buněk při výběru vhodného migrastatika, aby došlo ke správnému antiimigračnímu účinku léčiv.

Tvorba metastáz začíná. jakmile nádorové buňky získají schopnost pronikat do okolních tkání, je iniciován proces invaze a následně tvorba metastáz. Tento proces je organizován molekulárními cestami působícími v buňkách karcinomu. Metastázy se tvoří po dokončení komplexního sledu buněčně biologických událostí, které se souhrnně nazývají „metastatickou kaskádou“ [89–91], viz obr. 7. Tato kaskáda začíná, když jsou epiteliální buňky v primárních nádorech schopné lokálně pronikat (lokální invaze, intravazace) přes okolní extracelulární matrix (ECM). Stromální buňky [92, 93], pak intravazují do průsvitu krevních cév, přežijí ztížený transport a následně se dostanou do vzdálených míst v lidském těle (translokace) [94, 95]. Ze vzdálených míst se buňky extravazují do parenchymu vzdálených tkání, kde pokud přežijí v těchto cizích mikroprostředích, jsou schopné vytvořit mikrometastázy. Pokud buňky v mikroprostředí

zahájí své proliferační programy v metastatických místech, vytvoří se tím tzv. „metastatické kolonizace“ [96]. Deregulace těchto vnitřních a vnějších signálních kaskád umožňuje buňkám počínajícího metastatického karcinomu generovat život ohrožující malignity vysokého stupně.

Kromě migrace mohou buňky také provádět invazi. V biologii se termín migrace a invaze buněk často zaměňuje. Buněčná migrace je definována jako řízená translokace buněk na 2D substrát nebo přes 3D matrici. Naproti tomu buněčná invaze je definována jako pohyb buňky skrze 3D matrici, který je doprovázen restrukturalizací 3D prostředí. Proces buněčné invaze zahrnuje buněčnou adherenci k extracelulární matrici (ECM) a následnou remodelaci ECM pomocí degradace stávajících složek ECM a ukládání nových složek ECM, než budou moci migrovat přes ECM. Termín invaze tedy popisuje specifický způsob 3D migrace, včetně degradace ECM.

Buněčnou migraci lze kategorizovat na individuální a kolektivní. Každý typ migrace je dále rozdělen do několika různých typů migrace, viz obr. 8 a následující kapitoly.

4.1. Kolektivní migrace buněk

Kolektivní buněčná migrace má klíčovou roli při morfogenezi, při hojení ran a obnově tkání u dospělých a podílí se na šíření nádorových buněk [97, 98]. Kromě toho, že buňky vykazují koordinované migrační chování, kolektivně migrující buňky se pohybují efektivněji, než kdyby migrovaly odděleně. Což naznačuje, že během kolektivní migrace buněk dochází k buněčné souhře [99]. Během posledních let se nashromáždily důkazy potvrzující důležitost mezibuněčné komunikace a zkoumání molekulárních mechanismů. Tyto mechanismy jsou založeny jak na přímých fyzikálních interakcích, které koordinují buněčné reakce, tak na společném chování buněk, které vytváří prostředí optimální pro účinnou řízenou migraci. Tyto studie [97, 100] popsaly, jak vůdčí buňky v přední části buněčných skupin řídí migraci, a zdůraznily význam následujících buněk, které komunikují mezi sebou a následují buňky tzv. vůdce, aby se zlepšila efektivita kolektivního pohybu.

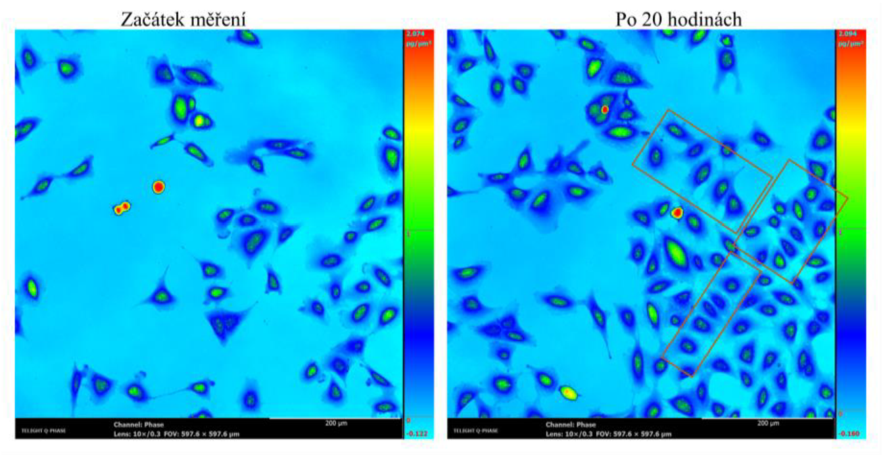
Během kolektivní migrace migruje více buněk stejným směrem a podobnou rychlostí. Např. pohyb buněk určitým směrem na základě chemického podnětu se nazývá chemotaxe [102, 103]. Fototaxe [104, 105] je pak pohyb buněk za světlem. Při hydrotaxii [106, 107] se buňky pohybují za vodou a při termotaxi za teplem [108, 109].

Kolektivní migraci buněk [110] lze rozdělit na migraci epiteliálních buněk a mezenchymálních buněk. Jakýkoli mezistupeň mezi epiteliální a mezenchymální kolektivní migrací buněk může probíhat v závislosti na typu buňky a jejím stavu, jedná se pak o epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT).

4.1.1. Epiteliální migrace

Epitelová tkáň [111] je tvořena pevně semknutými buňkami, které mají pravidelný tvar a leží na sobě v jedné nebo ve více vrstvách, viz obr. 6. Navzájem jsou propojeny mezibuněčnými spoji jako jsou těsné, vodivé, adhezní spoje a desmozomy. Na nich se významně podílí proteiny jako např. epitelový E-cadherin, integriny a cytokeratiny, které zároveň pomáhají udržovat a stabilizovat epiteliální stav.

Během kolektivní migrace si epiteliální buňky [112] udržují stabilní buněčnou adhezi, a tak stále plní svou bariérovou funkci. Toto spojení je často spojení buňka-buňka (adheren junctions, desmosomes, tight junctions a gap junctions).



Obrázek č. 6: Ukázka QPI epiteliální migrace buněk A549. Kolektivně migrující epiteliální buňky A549 se nacházejí ve shluku buněk po 20 hodinách. V oranžových čtvercích je ukázáno, že buňky mají pravidelný tvar. Objektiv 10x/0,3.

4.1.2. Mezenchymální migrace

Mezenchymová buňka [113, 114] nemá přesně definovaný tvar (připomíná stavbou fibroblast). Nemá pevné mezibuněčné spojení se svým okolím a ani není polarizovaná. S tímto se vážou i specificky produkované proteiny a markery, mezi které patří např. mezenchymové kadheriny (N-kadherin) a integriny (β1 a β3), vimentin, fibronektin a další.

Mezenchymální buňka [115, 116] je schopná pomocí stresových vláken a tvorbou výběžků (filopodia a lamellipodia) vyšší pohyblivosti a vyššího pronikání (až

invazivity). Při interakci a zachycení na jiné buňky či na extracellulárním matrixu využívají fokální adhezi prostřednictvím svých integrinů. Jelikož se jedná o multipotentní kmenové buňky, mají další vlastnosti jako schopnost diferenciace a rezistenci k apoptóze.

4.1.3. Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT)

Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) je důležitý biologický proces, který je kritický ve vývojové biologii a hojení ran, ale také se podílí na fibróze a malignitě [117, 118]. Jde o reverzibilní biologický proces spojený se ztrátou buněčné polarity a kadherinem zprostředkované buněčné adheze v epiteliálních buňkách [119]. Tyto buňky přecházejí na mezenchymální buňky, a naopak získávají migrační a invazivní schopnosti. EMT je zprostředkována řadou signálních drah, včetně transformačního růstového faktoru-beta (TGF-β), Wnt-β-kateninu, Hedgehog (Hh), Notch, kostního morfogenetického proteinu a receptorových tyrosinkináz [120]. Ztráta E-cadherinu je považována za klíčový krok v EMT [121, 122]. V kontextu malignity může EMT vést podle [123] k metastázám buněk z primárních nádorových lokalizací, což je spojeno s horší prognózou.

Přeměna v mechanicky odolnější buňku je nezbytná pro odloučení se od své buněčné tkáně a vycestování do krevního oběhu, kterým je přivedena na cílové místo. Zde se poté uplatňuje opačný proces, mezenchymálně-epiteliální přechod (MET), při kterém buňky získají původní epiteliální fenotyp a zakládají nová ložiska [124].

4.2. Individuální imigrace buněk

Podle různých morfologických znaků a molekulární exprese lze migraci jednotlivých buněk rozdělit na dva odlišné morfologické a funkční typy pohybu: améboidní a mezenchymální. Tento typ migrace je charakterizován ztrátou mezibuněčných spojení a šířením jako jediná nádorová buňka. Ačkoli jednotlivé buňky [125] mají vyšší okamžitou rychlost, podléhají méně trvalé migraci, rychle a často mění směr.

4.2.1. Améboidní pohyb

Migrace améboidů je pojmenována podle specifického typu motility améby, která je charakterizována cykly expanze a kontrakce buněčného těla, zprostředkované kortikálně lokalizovaným aktinem a myosine [126]. Améboidní pohyb u vyšších eukaryot je popsán u leukocytů [127] a některých typů nádorových buněk [128–131].

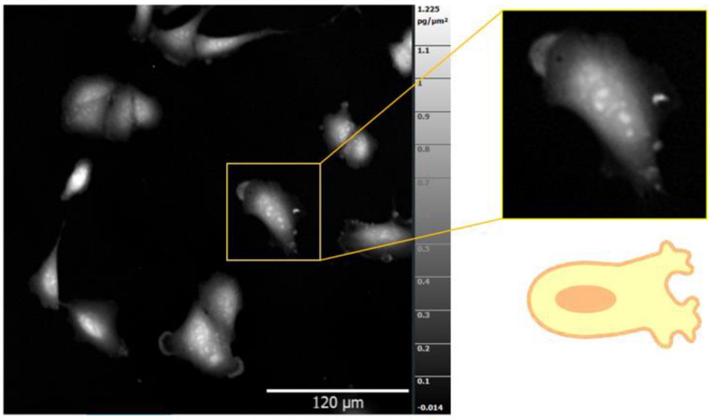
První forma migrace améboidů se nazývá migrace blebby (obr. 7) a je charakterizována pohybem zaoblených nebo elipsoidních buněk bez zralých fokálních adhezí a filopodií.

Druhý typ migrace je plazivý typ pohybu dosažený výčnělkem cytoplazmy buňky, který zahrnuje tvorbu pseudopodií (falešných nohou, obr. 8) a zadních uropodů. V závislosti na organismu může být produkována jedna nebo více pseudopodií najednou. Sarkomy nebo nádory [132, 133] vznikající z buněk pojivové tkáně jsou zvláště zběhlé v pohybu améboidů, což vede k jejich vysoké míře metastáz.

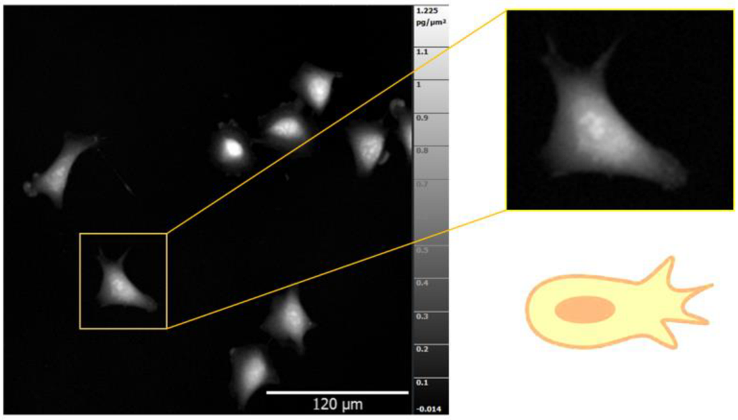
Nádorové buňky, které přijímají améboidní styl migrace, mají charakteristický zaoblený tvar ve 3D. Migrační strategie améboidních buněčných linií ve 3D substrátech je založena na kontraktilitě Rho/ROCK. Původně navrhovaný model améboidní migrace ve 3D mřížkách spočíval v tom, že buňky se protlačují již existujícími prostory v ECM bez remodelace okolní matrice Nedávno se však ukázalo, že kontraktilita Rho/ROCK nejen udržuje vysokou deformovatelnost buněk, ale také vyvíjí dostatečnou sílu ke strukturální změně ECM [134]. Améboidně migrující buňky se pohybují ve 3D substrátech nezávisle na degradaci ECM.

Améboidní pohyb umožňuje buňkám ve 3D prostředí pohybovat se relativně vysokou rychlostí - v rozmezí od 2 μm/min do 25 μm/min. Tato rychlost byla pozorována u buněčné linie A375m2 ve studii Sahai et al. [129] a představuje maximální migrační rychlost lymfocytů v kolagenním gelu [134].

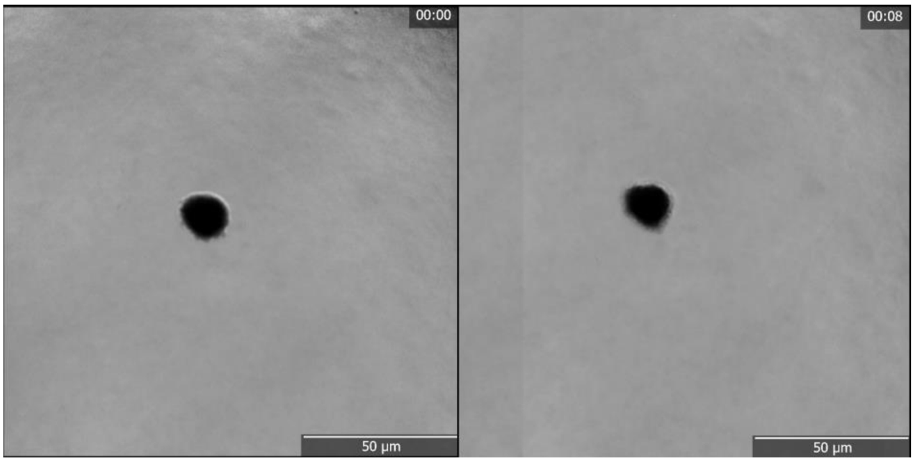
Pro následné studium migrastatik jsou zkoumané buňky A549 ve 2D prostředí, ale pro srovnání morfologických a dynamických vlastností jsou zobrazeny pomocí QPI i ve 3D kolagenovém matrixi, viz obr. 9.



Obrázek č. 7: Ukázka QPI buněk A549 a zvýraznění améboidního pohybu blebby. Je vybrána buňka představují tento typ migrace. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 120 μm.



Obrázek č. 8: Ukázka QPI buněk A549 a zvýraznění améboidního pohybu pomocí pseudopodií. Je vybrána buňka představují tento typ migrace. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 120 µm.



Obrázek č. 9: Ukázka améboidních buněk A549 v kolagenovém matrixu. Snímek QPI pořízený pomocí holografického mikroskopu Q-PHASE. Objektiv 20x/0,5 Měřítko 50 µm.

4.2.2. Mezenchymální pohyb

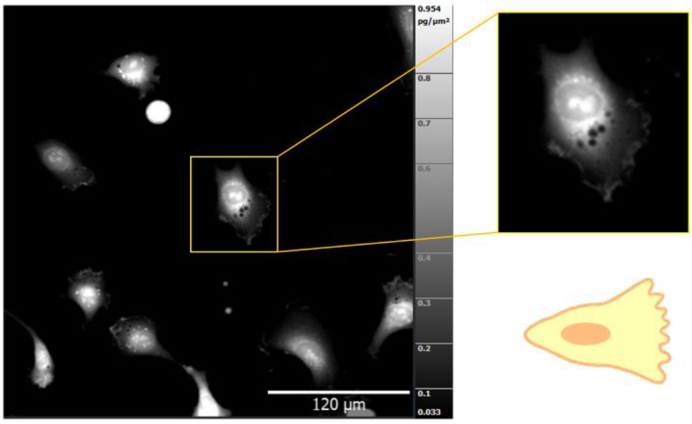
Mezenchymální typ migrace nádorových buněk lze přirovnat k fibroblastové motilitě. Kromě fibroblastů tento způsob migrace využívají také keratinocyty, endoteliální buňky a některé nádorové buňky. Buňky s mezenchymálním typem motility mají specifický podlouhlý tvar vřetena, jako je zobrazeno na obr. 10.

Ve 3D matricích jsou buňky polarizovány, což vytváří zřejmou náběžnou hranu s jedním nebo více vedoucími pseudopody [133] a zaostávajícím buněčným tělem (obsahujícím jádro, cytoplazmu a organely).

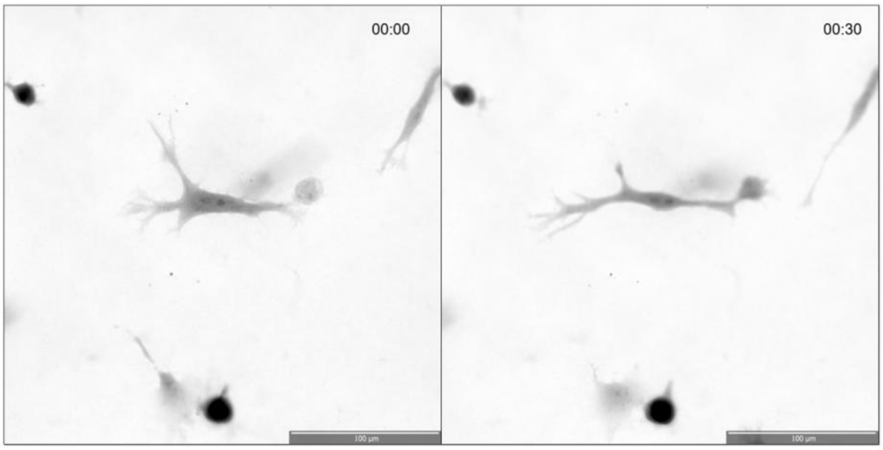
Translokace mezenchymálně migrujících buněk začíná tvorbou filopodií bohatých na aktin a lamellipodií na náběžné hraně. Tento proces je řízen malými GTPázami z

rodiny Rho, především Rac a Cdc42 [135, 136]. Adhezivní interakce s ECM jsou přítomny na obou buněčných pólech a kontraktilní aktinová stresová vlákna, která jsou k nim připojena, vytvářejí tažné síly mezi předním a zadním buněčným okrajem [137]. Rychlost migrace mezenchymálních buněk ve 3D matricích je přibližně 0,1–0,5 µm/min podle [138]. Poměrně nízká rychlost je způsobena relativně pomalým obratem ohniskových adhezí během translokace [139].

Pro ukázku mezenchymálního pohybu buněk ve 3D kolagenovém matrixu jsou zvoleny buňky HT1080, které jsou pomocí QPI zobrazeny na obr. 11.



Obrázek č. 10: Ukázka QPI buněk HT1080 a zvýraznění mezenchymálního pohybu pomocí specifických podlouhlých vřeten. Je vybrána buňka představují tento typ migrace. Objektiv 10x/0,3.



Obrázek č. 11: Ukázka mezenchymálních buněk HT1080 v kolagenovém matrixu. Snímek QPI pořízený pomocí holografického mikroskopu Q-PHASE. Objektiv 20x/0,5. Měřítko 100 µm.

Ze snímků 12–16 QPI a tabulky 3 je patrné, že améboidní buňky vykazují dynamické změny v distribuci buněčné hmoty. Během invaze blebby-améboidů je translokace buněčné hmoty do značné míry nepolarizovaná uvnitř buňky. Naopak podle [31] zvýšené

přerozdělení buněčné hmoty do vedoucího výběžku je charakteristické pro mezenchymální buňky. Dále je zjištěno ve studii [140], že améboidní motilita je preferována v situacích metabolického stresu, jako je hypoxie, což může znamenat, že režim améboidního pohybu je méně energeticky náročný a efektivnější ve srovnání s mezenchymálním režimem.

Tabulka č. 3: Srovnání améboidního a mezenchymálního pohybu buněk [133].

Parametr	Améboidní pohyb	Mezenchymálních pohyb
Morfologie	Zaoblený tvar	Prodloužený tvar
Připevnění k ECM	Slabé, krátkodobé, integriny rozptýlené v membráně	Prostřednictvím integrinových klastrů vytvářejících ohniskové kontakty a adheze
Migrace v ECM	Proteolýza nezávislá tlačení prostřednictvím ECM	Degradace ECM, remodeling
Organizace aktinového cytoskeletu	Kontraktilní aktinová kůra	Aktinová síť (náběžná hrana), napěťová vlákna (procházející buňkou)
Rychlost pohybu ve 3D	Vysoká přibližně 2 µm/min	Nízký přibližně 0,1–0,5 µm/min
Rozšíření buněčné membrány	Intenzivní blebbing	Filopodia a lamellipodia

4.2.3. Mezenchymálně-améboidní tranzice (MAT)

Některé typy buněk mohou používat oba režimy invazivity. Přechody se nazývají mezenchymální-améboidní (MAT) nebo améboidně-mezenchymální tranzice (AMT). Tranzice MAT / AMT [141, 142] zahrnuje rychlé změny v migračním režimu, které vznikají jako odpověď na současná specifika prostředí. Přechody mohou hrát roli v různých fázích metastatického procesu, kdy určité mikroprostředí vyžaduje fenotypovou adaptaci nádorových buněk. Studie mechanismů, které mohou případně spustit MAT / AMT tranzice [61] pomáhá pochopit plasticitu v migračních strategiích nádorových buněk, obr. 18. To je důležité pro vývoj léčby nádoru, která by účinně potlačila invazivitu nádorových buněk prostřednictvím inhibice obou způsobů migrace [133].

Oboustranný mezenchymálně-améboidní tranzice [142] byla prokázána pouze v *in vitro* prostředí, její relevance v *in vivo* musí být ještě potvrzena.

Výzkum améboidních a mezenchymálních buněk ve 3D kolagenovém matrixu je podpořen organizací Czech-Bioimaging: National Infrastructure for Biological and Medical Imaging (LM2018129) a výsledky byly prezentovány na Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2022 [41].

5. Primární hodnocení léků pro očekávaný migrastatický potenciál (PAMP)

Pro efektivní perspektivu realizace konceptu migrastatik musí být splněny dva klíčové požadavky. Nejprve je potřeba doladit předpisy pro schvalování protinádorových léků s důrazem na antimetastatické účinky charakterizující migrastatika (související motilitou a invazivitou nádorových buněk). To umožní klinické hodnocení kandidátů na léky i při absenci efektu zmenšení tumoru.

Dalším požadavkem jsou screeningové knihovny, které by měly být dostupné ve velkém měřítku a měly by se využívat zejména pro předběžné v *in vitro* 2D zjišťování na vybraných liniích nádorových buněk nové migrastatické funkce u prokazatelně bezpečných léků s vytipovaným migrastatickým potenciálem. Rovněž nelze opomenout vyhledání nových sloučenin, které vykazují nízkou toxicitu a interferují s migrací nádorových buněk.

Jako řešení těchto dvou požadavků je zde vypracována 2D metodologie PAMP (Primary Assessment of Migrastatic Potential) založená na QPI, která poskytuje rychlé posouzení migrastatického potenciálu léků na živých buňkách. Vzhledem k tomu, že metoda zahrnuje zobrazování nádorových buněk ve zjednodušených 2D prostředích *in vitro* a její výstupy vyžadují další validaci ve složitějších kultivačních systémech, je tato metoda označena jako Primární hodnocení léků pro očekávaný migrastatický potenciál (PAMP). Tato metoda může také sloužit jako první krok při zvažování konkrétních migrastatických látek pro individualizaci onkologické léčby. Ukazuje se, že migrastatické kandidáty lze rychle vyhodnotit na základě buněčné dynamiky migrace, morfologických změn, buněčného růstu a cytopathogenicity při sledování buněk v reálném čase. To

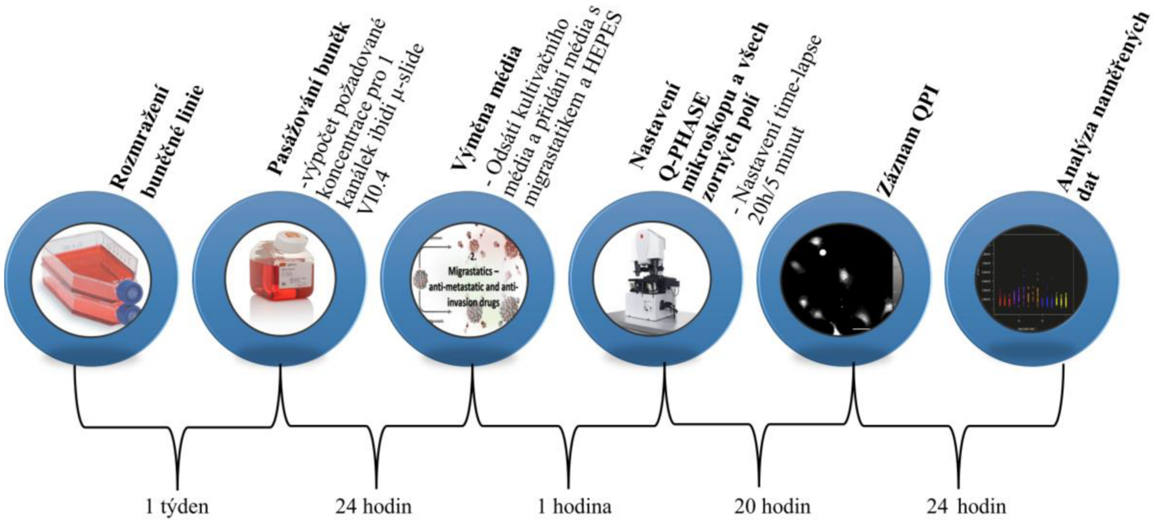
pomáhá sledovat i neočekávané změny v chování nádorových buněk vůči nežádoucí zvýšené směrovosti náhodné migrace po aplikaci migrastatik.

5.1. Materiál

Metoda PAMP spočívá v tom, že jsou buňky (A549, HT1080 a NDHF) kultivovány v počtu 60 000 buněk/ml v Ibidi µ-Slide VI$^{0.4}$ po dobu 24 hodin v inkubátoru s 3,5 % CO_2. Následně je médium nahrazeno migrastatickým činidlem v dané koncentraci uvedené v tabulce 1 kap. 3 (viz obr. 12). Biokompatibilní silikonový olej (Ibidi anti-evaporation oil) je přidán do zásobníků Ibidi µ-Slide VI$^{0.4}$, aby se zabránilo nežádoucímu odpařování média během časosběrného záznamu. Zásobníky jsou uzavřeny konektory (Elbow Luer Connector Male, Ibidi). Vzorek je vložen do objektového ramene Q-PHASE. Časosběrný záznam probíhá po dobu 20 hodin (přibližně délka jednoho buněčného cyklu) v 5minutových intervalech. Snímání QPI je realizováno pomocí objektivu Nikon Plan Fluorite 10x/0,3 NA/16 mm WD. Mikroskop Q-PHASE je vybaven motorizovaným stolkem, který umožňuje snímat více zorných polí v jednom experimentu. Záznam více pozic je tak velkou výhodou při použití vícekanálové Ibidi µ-Slide VI$^{0.4}$. Po naskenování jednoho zorného pole se mikroskop přesune do jiného zorného pole ve vyšetřovacím kanálku.

V Ibidi µ-Slide VI$^{0.4}$ je použito všech šest vyšetřovacích kanálů. V tomto případě je jeden kanál vybrán jako kontrolní vzorek (CNT) a dalších 5 obsahuje médium s migrastatikem. V jednom platě Ibidi je vždy kultivována pouze jedna buněčná linie. Při použití kovového držáku lze zkoumat buňky ve dvou platech Ibidi (12 kanálků) najednou. Každé realizované měření má vždy svoji kontrolu (CNT). Nejsou sloučeny data získaná z různých měření. Je to pro účely přesnější statistiky.

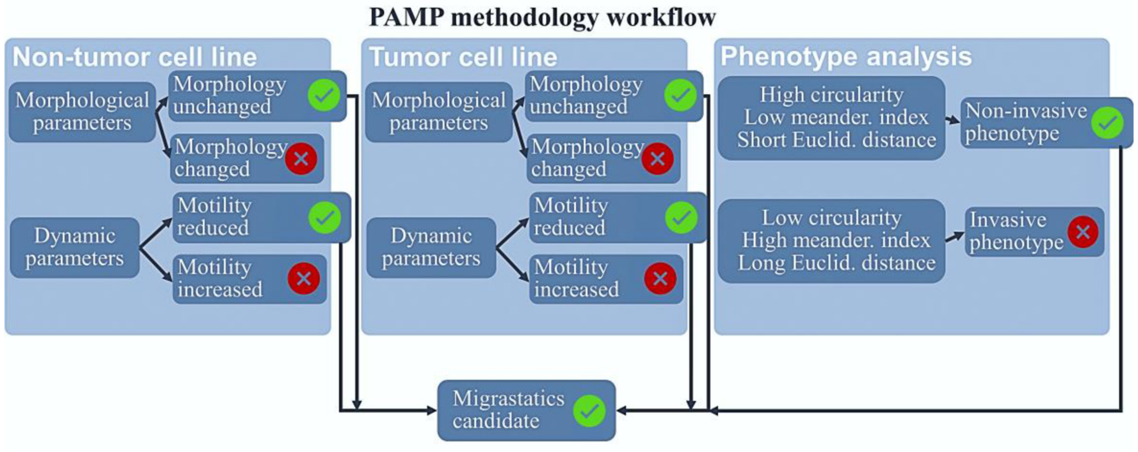
Záznamy obvykle začínají do jedné hodiny po přidání migrastatika do media a k buňkám. Toto zpoždění je způsobené potřebným laděním mikroskopu a všech zorných polí. Software SophiQ poskytuje parametry pro buněčnou analýzu a umožňuje tak hodnotit morfologické a dynamické vlastnosti buněk, které jsou popsány v kap. 1. Celý klasifikační postup je proveden v programech SophiQ, Microsoft Excel a OriginPro.



Obrázek č. 12: Diagram ukazující postup přípravy buněčných linií a hodnocení QPI. Zjednodušené schéma ukazující postup od rozmrazení buněk po analýzu dat z QPI.

5.2. Metodika

Metoda PAMP se skládá ze tří na sebe navazujících kroků (viz obr. 13).



Obrázek č. 13: Diagram ukazující postup metody PAMP. Tento koncept se skládá ze tří částí (hodnocení nenádorových buněk, nádorového a invazivního fenotypu). Následně se tyto části rozeberou a určí se vhodný kandidát na migrastatickou léčbu.

Prvním krokem je vyhodnocení stavu kontrolního vzorku (CNT) v nenádorové buněčné linii NDHF. Individuální časosběrné QPI nenádorových buněk NDHF (obr. 14 (a)) lze zobrazit za účelem zjištění přítomnosti buněčné smrti, infekce nebo jiných nepříznivých účinků. Důležitým parametrem pro hodnocení stavu těchto buněk je nárůst počtu buněk (obr. 14 (b)) v kontrolním vzorku. Pokud se počet buněk v kontrolním vzorku sníží, lze předpokládat, že buňky jsou ovlivněny nežádoucím vedlejším účinkem a mohou

být ovlivněny i výsledky migrace. Další parametry hmotnost a plocha jsou znázorněny na obr. 14 (c - d) a pomáhají určit, zda buňky přestaly růst. Zastavení dělení buněk není účelem migrastatik, ale cytostatik. Zastavení růstu nebo buněčná smrt vede k ovlivnění křivky hmotnosti a plochy. Hodnoty těchto parametrů získané na začátku měření by se neměly příliš lišit od hodnot na konci měření.

Kromě morfologických změn v chování buněk je nutné hodnotit také dynamické vlastnosti buněk v kontrolním vzorku, zejména rychlost migrace znázorněnou na grafu na obr. 14 (e). V kontrolním vzorku by rychlost migrace měla být přibližně konstantní.

Tento postup vyhodnocení kontrolního vzorku platí také pro kontroly nádorové linie A549 a HT1080 znázorněné na obr. 14 (a - e). Analýza těchto parametrů je shodná s analýzou účinku migrastatického kandidáta a hodnoty jsou porovnány s hodnotami kontrolního vzorku.

Pokud je negativně ovlivněno morfologické a dynamické chování buněk v kontrolním vzorku, není možné daný experiment analyzovat.

Druhým krokem je hodnocení migrastatického potenciálu u nádorových buněk (A549 a HT1080) a nenádorových buněk NDHF.

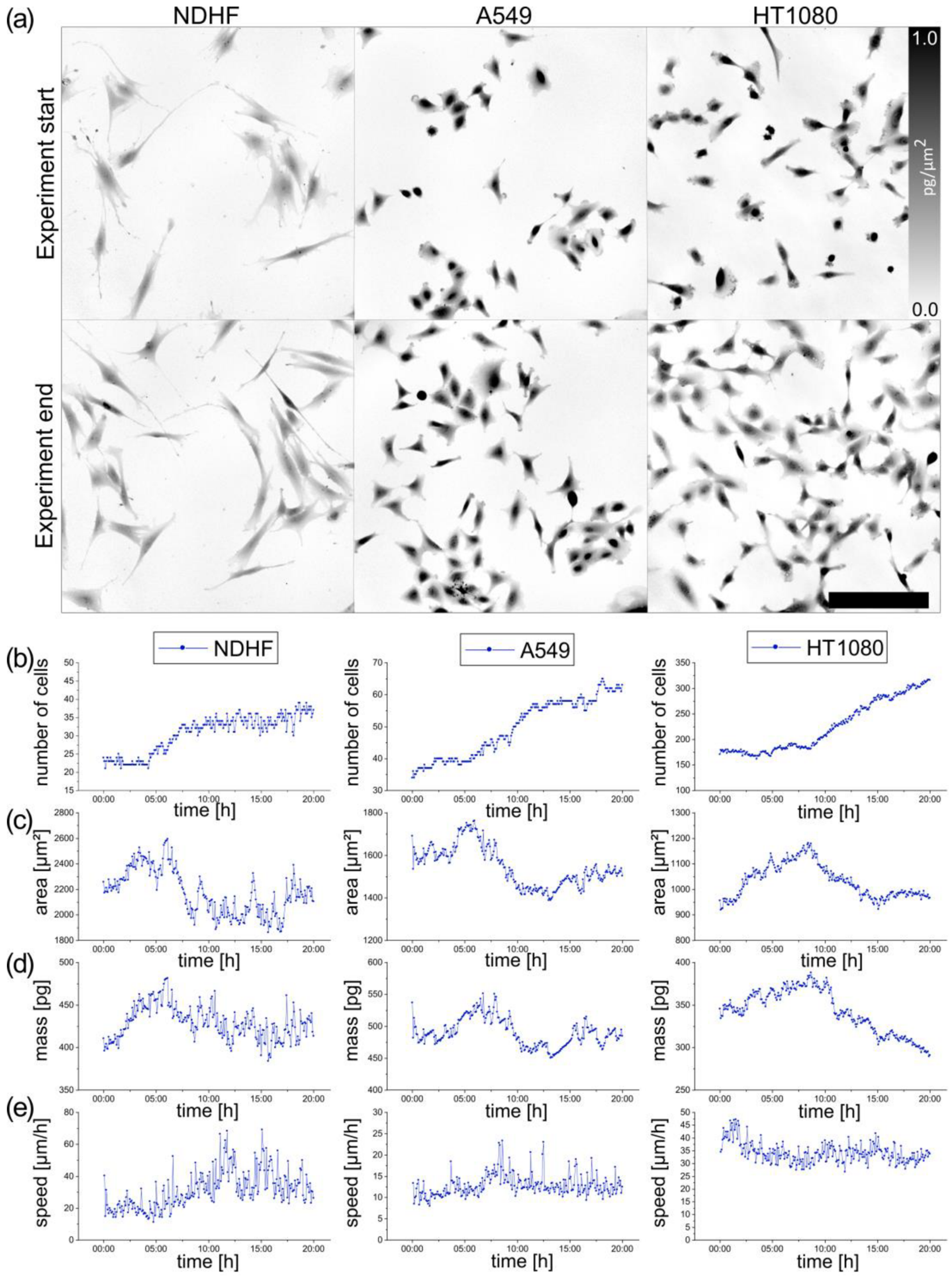
Výchozí hypotézou pro tuto studii je, že by migrastatika neměla žádným způsobem ovlivňovat morfologické chování nenádorových buněk, čili je také nežádoucí, aby docházelo k buněčné smrti nebo zástavě buněčného cyklu. To lze pozorovat v grafech plochy (area) a hmoty (mass), ale také grafech cirkularity (kruhovitost). Pro tu platí, že čím vyšší procento zakulacení buněk (cirkularity), tím vyšší výskyt apoptóz nebo nekróz. Dynamické změny a rychlost migrace lze opět porovnat s kontrolním vzorkem. Je žádoucí, aby migrastatičtí kandidáti snižovali rychlost buněčné migrace oproti kontrole.

Některá potenciální migrastatika mohou mít pozdní nebo rychlý nástup účinku. Proto jsou výsledky 20hodinového časosběrného záznamu rozděleny do dvou stejně dlouhých časových úseků.

Požadavkem je, aby migrastatičtí kandidáti zachovali průměrnou rychlost migrace nenádorových buněk a zároveň zpomalili migraci nádorových buněk a nezpůsobovali morfologické změny signalizující cytopatogenitu, zejména nenádorových buněk.

Třetím krokem je posouzení invazivního fenotypu. Tento krok se opírá o buněčnou segmentaci (obr. 15 (a)) a následné třídění buněk pomocí parametrů hmotnosti (y) a

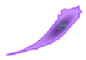
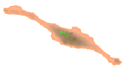
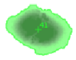
kruhovitosti (x), viz obr. 15 (b). Hodnoty buněk lze rozdělit do čtyř skupin podle procenta cirkularity (viz tabulka 4). Každé buňce je při analýze přiřazena barevná segmentace a ID číslo, které má po celou dobu hodnocení. Lze také vyhodnotit trajektorie jednotlivých buněk, jak je znázorněno na obr. 15 (c).



Obrázek č. 14: Příklad prvního kroku metody PAMP – hodnocení nenádorových buněk NDHF a nádorových buněčných linií A549 a HT1080 v kontrolním vzorku. *(a) Obrázky QPI buněk NDHF, A549 a HT1080 v kontrolním vzorku. Barevný pruh v pg/µm². Časosběrné QPI na začátku a na konci měření. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm. (b) Časový graf počtu buněk. (c) Časový graf oblasti. Tento parametr*

se vypočítá v µm^2. Jsou zobrazeny průměrné hodnoty v čase. (d) Časový graf hmotnosti. Tento parametr je vypočítán v str. Jsou zobrazeny průměrné hodnoty v čase. (e) Časový graf rychlosti pohybu buněk NDHF v [µm/h].

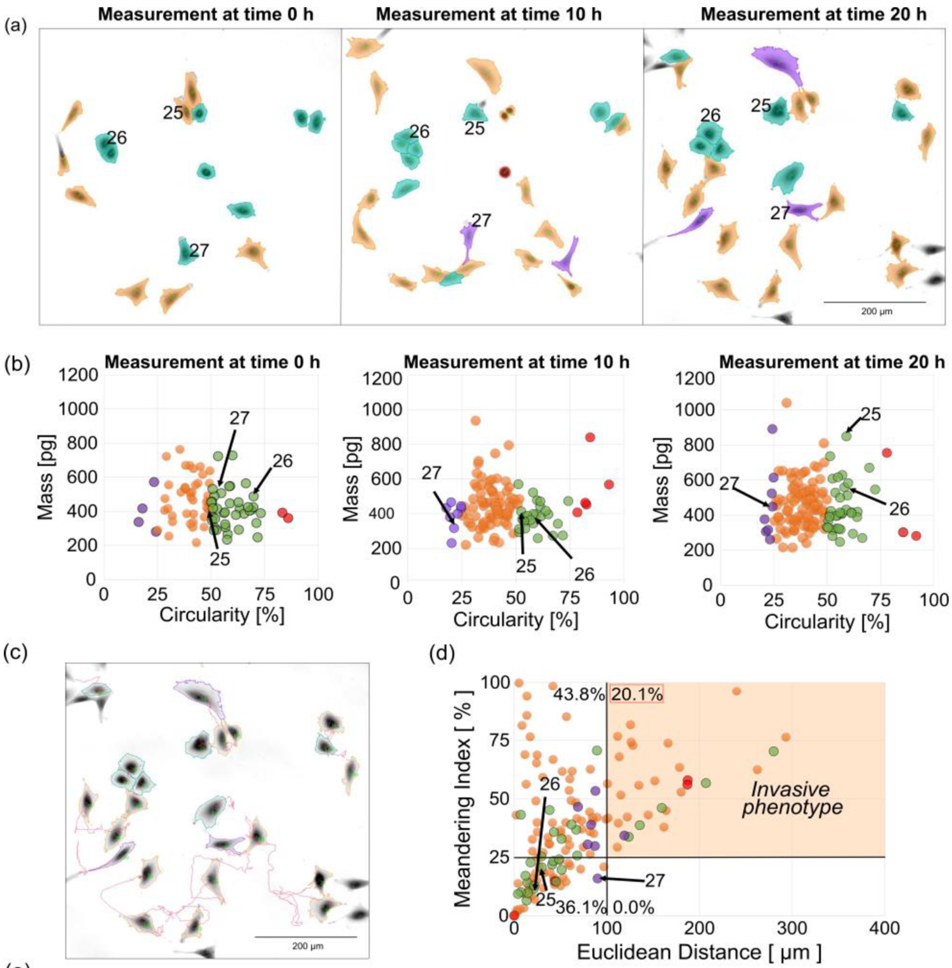
Tabulka č. 4: Separace buněk podle procenta cirkularity (kruhovitosti buněk) pro posouzení a hledání invazivního fenotypu.

Barevná segmentace	Cirkularita [%]	Morfologie (tvar buněk)	Stav buňky
	0 – 25	Velmi protáhlý	Anomální nebo migrující buňka – pravděpodobně invazivní fenotyp
	25 – 50	Protáhlý	Pravděpodobně migrující buňka
	50 – 75	Oválný	Klidový stav
	75 –100	Zaoblený	Dělící se buňka nebo buňka podléhající buněčné smrti

Následně jsou buňky zobrazeny na grafu Euklidovské vzdálenosti (na ose x, značí vzdálenost z počátečního bodu do konečného bodu) a indexu meandrovitosti (na ose y, čím vyšší procento, tím je pohyb více přímý a naopak). Procento invazivních buněk je v pravém horním kvadrantu tohoto grafu, tj. Euklidovská vzdálenost větší než 100 µm a index meandrovitosti je větší než 25 % (obr. 15 (d)).

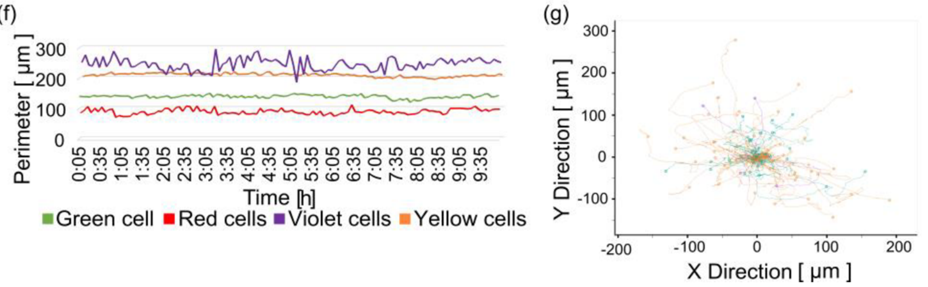
Účelem je upřesnit klasifikaci invazivního fenotypu nádorových buněk na základě pozice v bodovém grafu a určit tak procento buněk, které jsou invazivní a mohly by případně způsobit metastáze. Čím vyšší počet invazivních buněk opustí primární nádor, tím větší je šance, že některé buňky přežijí metastatickou kaskádu a vznikne sekundární ložisko nádoru. Proto jsou tyto buňky zkoumány i po účinku migrastatik. V případě invazivního fenotypu má buňka nízké procento cirkularity (značí protáhlý tvar buněk), vysoký index meandrovitosti (trajektorie pohybu je přímá) a vysokou hodnotu Euklidovské vzdálenosti (délka trajektorie z počátečního bodu do konečného bodu je delší než 100 µm).

Pro přesnější analýzu buněk je možné vyhodnotit morfologické a dynamické parametry pro jednotlivé skupiny buněk pomocí tabulek (obr. 15 (e)), časových grafů (obr. 15 (f)) a růžicových grafů trajektorií (obr. 15 (g)). Barevné odlišení odpovídá dělení podle procenta kruhovitosti z tabulky 4.



(e)

Group	Cell Count	Cell Share [%]	Mass [pg]	Area [µm²]	Density [pg/µm²]	Speed [µm/h]	Perimeter [µm]	Circularity [%]
Green cells	33	22.759	455.025	1241.669	0.403	11.712	163.052	57.615
Red cells	3	2.069	446.228	332.213	1.294	29.965	69.409	85.043
Violet cells	8	5.517	467.316	1388.053	0.353	20.162	267.223	23.113
Yellow cells	101	69.655	457.871	1356.797	0.35	12.836	209.949	38.625



Obrázek č. 15: Ukázka hodnocení invazivního fenotypu jednotlivých nádorových buněk A549 v kontrolním vzorku. (a) Ukázka QPI jednoho snímaného zorného pole na začátku a na konci experimentu. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm. Barevná škála v pg/µm^2. (b) Ukázka grafu kruhovitosti na hmotu na začátku a na konci experimentu. (c) Příklad snímků QPI s trajektoriemi jednotlivých buněk na konci měření. Trajektorie jsou v µm. (d) Graf rysů pro invazivní fenotyp. Graf poměru Euklidovské vzdálenosti (x) a indexu meandrování (y) s rozdělením buněk do čtyř kvadrantů. (e) Tabulka všech parametrů jednotlivých skupin buněk. (f) Časový graf průměrných hodnot obvodu (perimetr) (g) Růžicový graf migrace buněk. Začátky jednotlivých trajektorií jsou posunuty do společného původu. Osy jsou uvedeny v µm.

5.3. Výsledky metody

5.3.1. Analýza růstu buněk

Mikroskop Q-PHASE umožňuje hodnocení morfologického profilu migrujících buněk spolu s měřením jejich distribuce suché hmotě v jádře a periferní. V této části metody PAMP se hodnotí nejen zmíněná suchá hmota buněk - densita [pg/μm²], ale i cirkularita (kruhovitost v [%]) zkoumaných buněk.

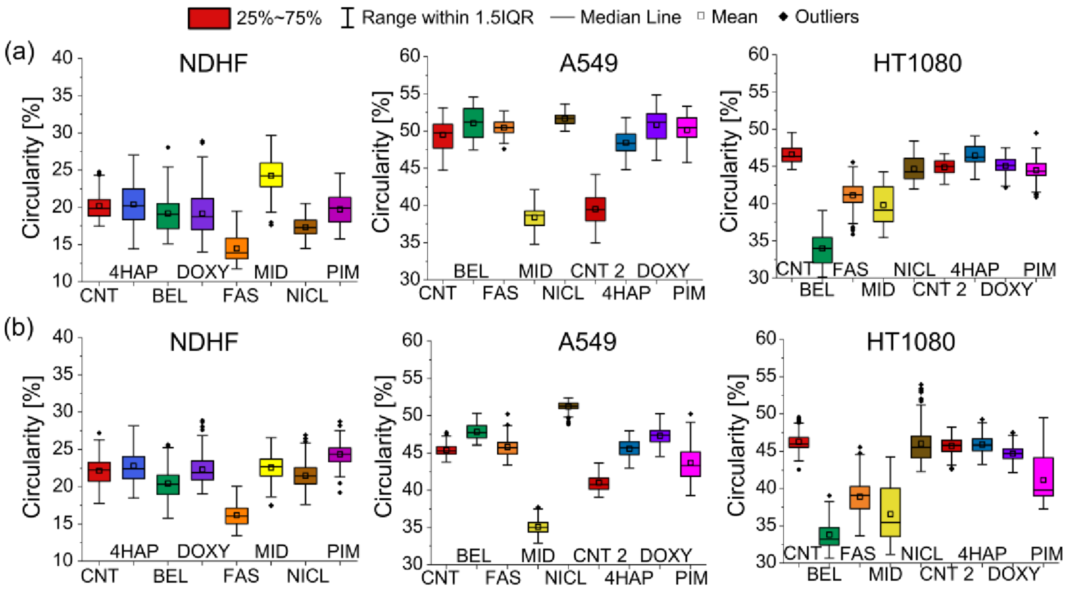
Analýza je rozdělena do dvou časových úseků – prvních 10 hodin (obr. 16 (a)) a druhých 10 hodin měření (obr. 16 (b)). Jedná se o ukázku reakce buněčných linií na migrastatika v základní koncentraci (faktor 1, viz kapitola 3.2.).

Densita buňky je vypočtena v PAMP jako poměr hmotnosti [pg] k ploše [μm²]. Hodnocení je opět rozděleno do dvou časových úseků – prvních 10 hodin (obr. 17 (a)) a druhých 10 hodin měření (obr. 17 (b)). Pro přesnější analýzu hustoty jsou hodnoty v časových obdobích 0, 10 a 20 hodin zapsány v tabulce 5.

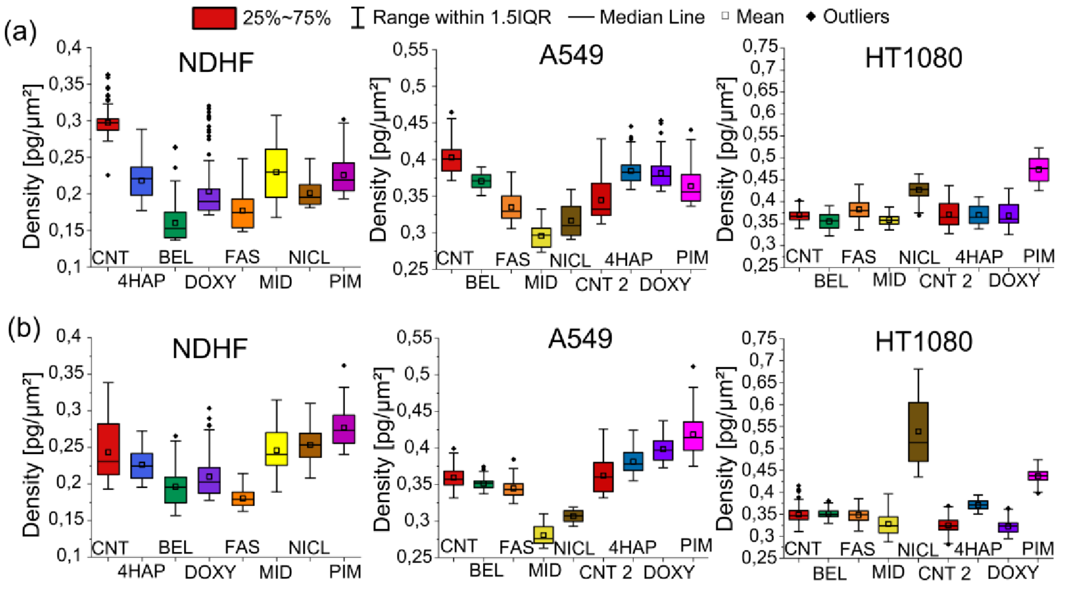
Tabulky udávají hodnoty počtu buněk, cirkularity (průměrná hodnota) a density (průměrná hodnota) na začátku měření a na konci měření, tedy po 20 hodinách snímání buněk.

Výsledky z tabulek 5-7 ukazují, že počet buněk ve všech kontrolách se zvýšili, což je známka správného růstu buněk v kontrole a data s léčivy mohli být dále hodnoceny. V případě nenádorových buněk NDHF nedošlo ke snížení počtu buněk po aplikaci migrastatik. Tabulka buněk NDHF ukazuje, že MID a BEL nejvíce ovlivnily hustotu (densita). Nejnižší cirkularita je zaznamenána u FAS.

Zde došlo ke snížení počtu buněk po aplikaci MID, PIM a NICL. Cirkularita je u těchto léčiv též snížena, a densita je zvýšena pouze po aplikaci PIM.



Obrázek č. 16: Ukázka krabicových grafů cirkularity ilustrující odpovědi nenádorové buněčné linie NDHF a nádorových buněčných linií A549 a HT1080 na vybraná migrastatika v základní koncentraci. Čára představuje mediány a čtverec představuje průměr. (a) Krabicové grafy v prvních 10 hodinách měření (00:00–10:00). (b) Krabicové grafy během druhých 10 hodin (10:05–20:00) měření. Kruhovitost se počítá v %. Každá migrastatika má ve všech grafech svou barvu.



Obrázek č. 17: Ukázka krabicových grafů hustoty (density v pg/µm²) ilustrující odpovědi nenádorové buněčné linie NDHF a nádorových buněčných linií A549 a HT1080 na vybraná migrastatika v základní koncentraci. Čára představuje mediány a čtverec představuje průměr. (a) Krabicové grafy v prvních 10 hodinách měření (00:00-10:00). (b) Krabicové grafy během druhých 10 hodin (10:05-20:00) měření. Každá migrastatika má ve všech grafech svou barvu.

Tabulka č. 5: Hodnocení morfologických parametrů buněčných linií NDHF.

Vzorek / *NDHF*	**Počet buněk**		**Cirkularita [%]**		**Densita [pg/µm²]**	
	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření
CNT 1	24	37	20,2	19,6	0,3	0,2
4HAP	22	38	21,6	27,1	0,2	0,3
BEL	17	25	18,5	21,6	0,1	0,3
DOXY	18	37	20,8	28,0	0,2	0,3
FAS	24	42	16,7	16,8	0,1	0,2
MID	26	27	25,1	17,5	0,2	0,2
NICL	27	31	20,0	26,0	0,2	0,3
PIM	24	39	23,5	24,0	0,2	0,2

Tabulka č. 6: Hodnocení morfologických parametrů buněčných linií A549

Vzorek / *A549*	**Počet buněk**		**Cirkularita [%]**		**Densita [pg/µm²]**	
	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření
CNT 1	65	122	50,7	46,8	0,4	0,4
4HAP	106	189	54,2	51,7	0,4	0,4
BEL	116	193	56,2	50,3	0,4	0,4
DOXY	108	174	54,5	48,4	0,4	0,3
FAS	98	157	51,0	45,2	0,4	0,4
MID	90	74	48,6	40,8	0,4	0,3
NICL	84	87	47,8	39,8	0,5	0,4
PIM	100	125	52,6	45,4	0,4	0,4

Tabulka č. 7: Hodnocení morfologických parametrů buněčných linií HT1080

Vzorek / *HT1080*	**Počet buněk**		**Cirkularita [%]**		**Densita [pg/µm²]**	
	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření
CNT 1	93	135	44,9	36,0	0,4	0,4
4HAP	75	116	47,2	36,7	0,5	0,5
BEL	84	134	50,5	36,5	0,4	0,4
DOXY	92	116	43,7	35,8	0,4	0,5
FAS	71	109	34,0	34,1	0,4	0,4
MID	74	75	35,1	27,3	0,4	0,4
NICL	76	78	46,7	36,7	0,4	0,4

PIM	63	77	45,1	28,8	0,5	0,6

5.3.2. Výskyt patologických jevů

Nejběžnějšími patologickými jevy detekovatelnými *in vitro* jsou zvýšení procenta cirkularity buněk, změny plochy a hmoty buněk během časosběrného QPI. Tyto změny morfologických parametrů mohou znamenat buněčnou smrt (apoptózu a nekrózu) nebo např. tvorbu cytoplazmatické vakuolizace.

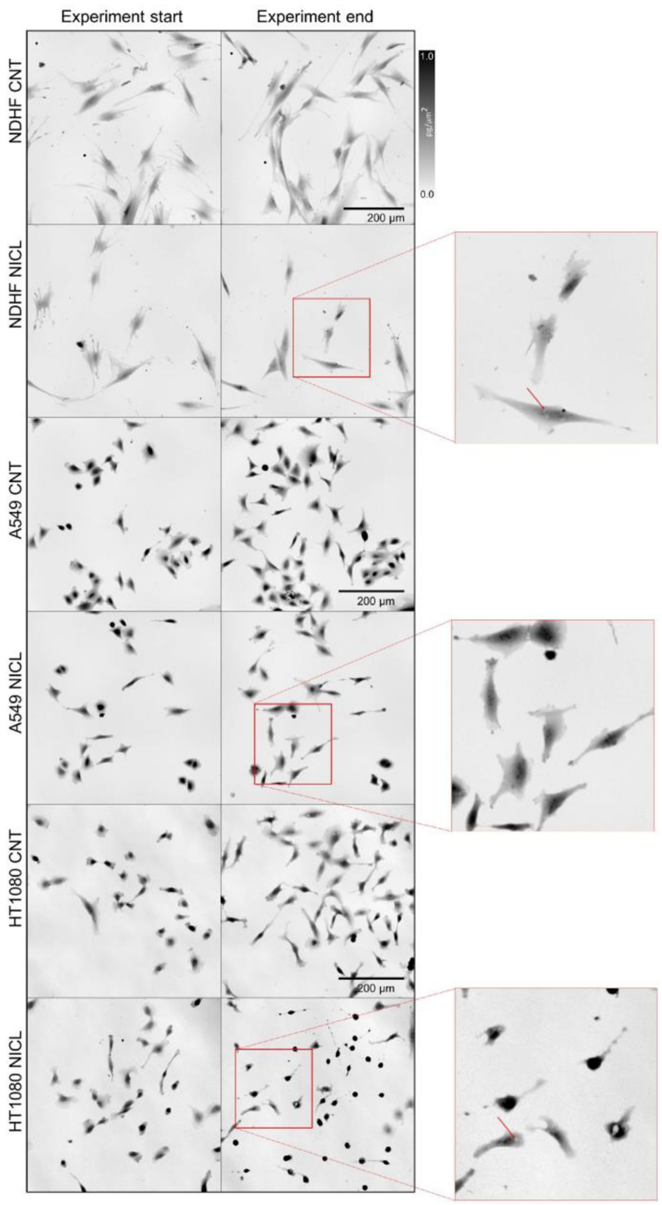
Dělení buněk je sice nepatologický jev, ale vzhledem k faktu, že je možné jej zobrazit pomocí QPI a analyzovat změny morfologických parametrů, je zařazen do této kategorie. Obvykle platí, že pokud se buňka nemůže rozdělit, přejde zpět do klidového stavu nebo u ní nastane buněčná smrt.

5.3.2.1. Cytoplasmatická vakuolizace

Změny v okolí jádra buněk jsou varovným signálem, že na buňku působí něco negativně. Takový případ může nastat např. po aplikaci niklosamidu. V tomto případě dojde k vytvoření cytoplazmatické vakuolizace po stresu endoplazmatického retikula [143]. Pomocí QPI jsou zobrazeny vakuolizace na buňkách NDHF a HT1080 po aplikaci niklosamidu v základní koncentraci (obr. 18).

Vakuoly obvykle obklopují membrány buněk, z nichž některé obsahují ribozomy. To ukazuje na možnost vytvářet intracelulární vakuolizace [143, 144] v hrubém endoplasmatickém retikulu. Kromě toho jsou vakuoly obklopeny jednovrstvou membránou a některé buňky vykazují větší vakuoly blízko jádra, ty vznikají dilatací lumenu endoplasmatického retikula.

Buněčná smrt spojená s cytoplazmatickou vakuolizací je způsobena především stresem endoplazmatického retikula a nedostatkem aktivace kaspázy navozené např. léčivem.



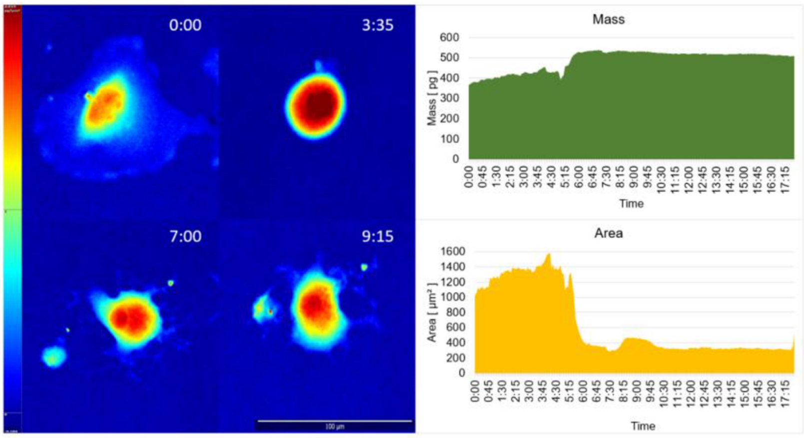
Obrázek č. 18: Příklady obrázků QPI získaných z časosběrných záznamů buněk NDHF, A549 a HT1080 ukazují morfologické změny vyvolané niklosamidem. Ve zvětšených oblastech jsou zobrazeny červené šipky ukazující na cytoplazmatickou vakuolizaci. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm.

5.3.2.2. Apoptóza

Apoptóza je forma programované buněčné smrti, která se vyskytuje u mnohobuněčných organismů. Při apoptóze dochází k tvorbě bublin, smršťování buněk, fragmentaci jádra, kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a rozkladu mRNA [145, 146]. Morfologie buňky v apoptóze je více zakulacená (viz obr. 19 a čas 3:35).

Ozařování nebo léky používané pro chemoterapii nádorů mají za následek poškození DNA v některých buňkách, což může vést k apoptotické smrti [147].

Apoptózu je možné zaznamenat pomocí QPI [148] např. po aplikaci vinkristinu (cytostatikum). Jsou zobrazeny i časové grafy hmoty (mass) a plochy (area) buňky. Je patrný nárůst plochy a hmoty do času cca 6:00 hodin, který vede podle QPI k zakulacení buňky.

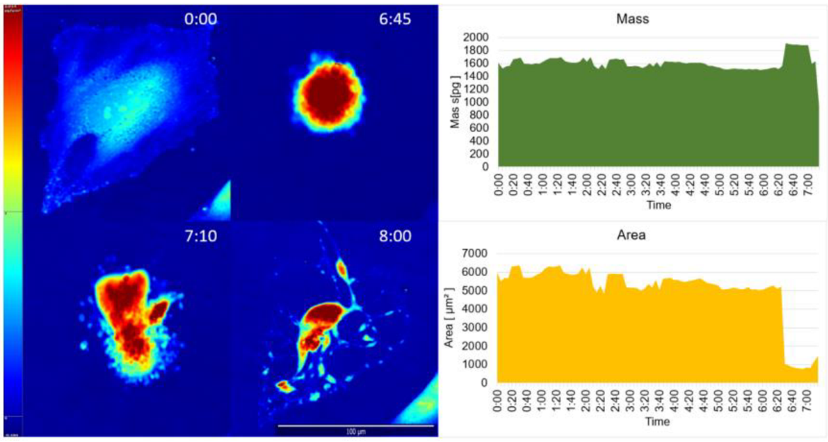


Obrázek č. 19: Ukázka apoptózy buněk A549. Apoptóza je způsobená působením vinkristinu. Ukázka časových grafů plochy a hmotnosti analyzované buňky v čase. Objektiv 20x/0,5. Měřítko 100 µm.

5.3.2.3. Nekróza

Nekróza je forma poškození buněk , která má za následek předčasnou smrt buněk v živé tkáni autolýzou. Nekróza je způsobena faktory vně buňky nebo tkáně, jako je infekce nebo trauma, které vedou k neregulovanému trávení buněčných složek. Naproti tomu apoptóza [149] je přirozeně se vyskytující naprogramovaná a cílená příčina buněčné smrti. Buněčná smrt v důsledku nekrózy je aktivována různými receptory a vede ke ztrátě integrity buněčné membrány a nekontrolovanému uvolňování produktů buňky do extracelulárního prostoru [150].

Nekrózu navozenou léčivem je možné zaznamenat pomocí QPI [148]. Jsou zobrazeny opět i časové grafy hmoty (mass) a plochy (area) buňky. Je patrný pozvolný pokles plochy a hmoty do času cca 6:20 hodin a následně dojde k prudkému poklesu obou těchto parametrů z důvodů uvolnění buněčného obsahu, viz obr. 20.

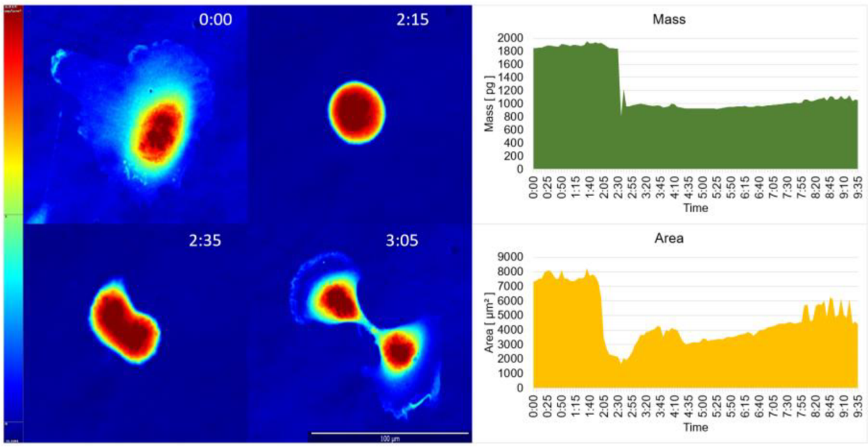


Obrázek č. 20: Ukázka apoptózy buněk A549. Nekróza je způsobená působením niklosamidu. Ukázka časových grafů plochy a hmotnosti analyzované buňky v čase. Objektiv 20x/0,5. Měřítko 100 µm.

5.3.2.4. Dělení buněk

Dělení buňky neboli cytokineze je děj, při kterém se mateřská buňka fyzicky rozdělí na dvě dceřiné buňky. V případě mitózy [151] jsou buňky identické, v případě meiózy si jsou sesterské.

Tento děj sice nepatří mezi patologické děje, ale lze jej též zaznamenat pomocí QPI [148]. Dělení je často patrné zejména u kontrolních vzorků, viz obr. 21.



Obrázek č. 21: Ukázka apoptózy buněk A549. Jedná se o dělení buněk v kontrolním vzorku. Ukázka časových grafů plochy a hmotnosti analyzované buňky v čase. Objektiv 20x/0,5. Měřítko 100 µm.

5.3.3. Hodnocení migrační reakce

5.3.3.1. Posouzení migrační reakce nenádorové linie NDHF

Po 20 hodinách si buňky v kontrolních podmínkách udržely svůj fyziologický stav, zatímco buňky vystavené působení migrastatik reagovaly na dané prostředí. Klasifikace rychlosti migrace je nejprve provedena na kontrolních nenádorových buňkách NDHF.

Stejný postup je poté opakován pro nádorové linie. Klasifikace je založena na vyhodnocení metody na základě časosběrného QPI.

Medián zde představuje střední hodnotu v daném časovém období a používá se pro srovnání s průměrem rychlosti migrace. Rychlost migrace buněk v procentech je vypočtena jako procento poměru rychlosti daných léků ke kontrole.

Signifikance je určena p-hodnotou dvou-výběrového F-testu pro rozptyl a následně je proveden T-test. P-hodnota zapsaná v tabulkách odpovídá T-testu. Symboly indikující významnost jsou umístěny v tabulce: * představuje $P < 0{,}05$, ** $P < 0{,}01$, *** $P < 0{,}001$ a n. s. není významné/signifikantní.

Výsledky v tabulce 8 ukazují rychlosti buněk po aplikaci migrastatických kandidátů v základní koncentraci (faktor 1). Z této tabulky vyplývá, že BEL a NICL jsou schopni snížit rychlost migrace v obou časových úsecích.

Tabulka č. 8: Hodnocení hodnot rychlosti buněčné migrace v nenádorovém NDHF po aplikaci doporučené koncentrace migrastatik

Vzorek	Časový úsek	Průměr [µm/h]	Medián [µm/h]	Rychlost [%]	P-value
CNT	**00:05-10:00**	**24,4 ± 8,6**	**22,6**	–	–
	10:05-20:00	**38,6 ± 11,2**	**35,7**	–	–
4HAP	00:05-10:00	33,2 ± 9,9	32,9	↑ 36,1	***
	10:05-20:00	36,7 ± 10,5	34,4	↓ 5,1	N. S.
BEL	00:05-10:00	19,5 ± 10,5	15,7	↓ 20,2	***
	10:05-20:00	37,2 ± 11,9	34,0	↓ 3,8	N. S.
DOXY	00:05-10:00	31,5 ± 9,5	29,1	↑ 29,2	***
	10:05-20:00	36,0 ± 7,6	34,3	↓ 6,9	*
FAS	00:05-10:00	32,5 ± 12,8	30,5	↑ 33,3	***
	10:05-20:00	32,1 ± 10,0	30,0	↓ 16,9	***
MID	00:05-10:00	35,4 ± 11,2	33,4	↑ 45,2	***
	10:05-20:00	29,5 ± 10,6	27,7	↓ 23,7	***
NICL	00:05-10:00	20,6 ± 9,4	16,9	↓ 15,4	**
	10:05-20:00	26,2 ± 9,5	24,3	↓ 32,3	***
PIM	00:05-10:00	28,8 ± 7,8	27,8	↑ 18,2	***
	10:05-20:00	36,8 ± 9,2	35,0	↓ 4,8	N. S.

5.3.3.2. Posouzení migrační reakce nádorové linie A549

Hodnoty pro hodnocení rychlosti migrace nádorové buněčné linie A549 (tabulka 9) jsou také vypočteny za použití stejných metod jako v případě nenádorových buněk. Výsledky ukázaly, že u A549 pouze FAS nezpůsobil nesignifikantní změny rychlosti buněk. Nejvíce (o 30 % a více) snížili rychlost MID, NICL a PIM.

Tabulka č. 9: Hodnocení hodnot rychlosti buněčné migrace v nenádorovém A549 po aplikaci doporučené koncentrace migrastatik

Vzorek	Časový úsek	Průměr [µm/h]	Medián [µm/h]	Rychlost [%]	P-value
CNT	**00:05-10:00**	**13,0 ± 3,9**	**11,9**	–	–
	10:05-20:00	**13,4 ± 3,0**	**13,2**	–	–
4HAP	00:05-10:00	11,2 ± 1,7	10,9	↓ 13,8	***
	10:05-20:00	9,9 ± 1,7	9,5	↓ 26,1	***
BEL	00:05-10:00	10,5 ± 2,0	10,2	↓ 19,2	***
	10:05-20:00	10,2 ± 2,1	9,8	↓ 23,9	***
DOXY	00:05-10:00	10,9 ± 1,7	10,5	↓ 16,2	***
	10:05-20:00	10,5 ± 1,9	10,0	↓ 21,6	***
FAS	00:05-10:00	12,5 ± 2,2	12,3	↓ 3,8	N.S.
	10:05-20:00	10,8 ± 1,9	10,6	↓ 19,4	***
MID	00:05-10:00	9,1 ± 2,2	8,7	↓ 30,0	***
	10:05-20:00	8,8 ± 2,5	8,3	↓ 34,3	***
NICL	00:05-10:00	8,4 ± 2,1	8,0	↓ 35,4	***
	10:05-20:00	8,6 ± 2,5	8,1	↓ 39,6	***
PIM	00:05-10:00	7,8 ± 1,6	7,4	↓ 43,1	***
	10:05-20:00	8,4 ± 1,8	8,1	↓ 39,6	***

5.3.3.3. Posouzení migrační reakce nádorové linie HT1080

Hodnoty pro hodnocení rychlosti migrace nádorové buněčné linie HT1080 (tabulka 10) jsou vypočteny za použití stejných postupů jako v případě nenádorových buněk NDHF. Výsledky z tab. 10 ukázaly, že u buněčné linie HT1080 rychlost migrace buněk snížili pouze DOXY a NICL.

Tabulka č. 10: Hodnocení hodnot rychlosti buněčné migrace v nenádorovém HT1080 po aplikaci doporučené koncentrace migrastatik

Vzorek	Časový úsek	Průměr [µm/h]	Medián [µm/h]	Rychlost [%]	P-value
CNT	**00:05-10:00**	**43,3 ± 7,8**	**42,2**	–	–
	10:05-20:00	**46,0 ± 8,0**	**45,0**	–	–
4HAP	00:05-10:00	44,1 ± 8,6	43,9	↑ 1,8	N.S.
	10:05-20:00	42,2 ± 7,4	41,1	↓ 8,3	***
BEL	00:05-10:00	44,8 ± 8,8	43,5	↑ 3,5	N.S.
	10:05-20:00	41,6 ± 8,2	41,0	↓ 9,6	***
DOXY	00:05-10:00	41,2 ± 8,3	39,3	↓ 4,8	N.S.
	10:05-20:00	42,5 ± 8,7	41,0	↓ 7,6	***
FAS	00:05-10:00	43,9 ± 10,4	42,0	↑ 1,4	N.S.
	10:05-20:00	45,2 ± 9,6	43,7	↓ 1,7	N.S.
MID	00:05-10:00	49,5 ± 13,2	47,2	↑ 14,3	***
	10:05-20:00	38,0 ± 6,5	36,1	↓ 17,4	***
NICL	00:05-10:00	41,8 ± 8,0	40,6	↓ 3,5	N.S.
	10:05-20:00	30,8 ± 11,6	31,5	↓ 33,0	***
PIM	00:05-10:00	47,8 ± 10,2	44,9	↑ 10,4	***
	10:05-20:00	37,8 ± 6,3	36,2	↓ 17,8	***

5.3.4. Invazivní fenotyp

Třetím krokem metody PAMP je hodnocení míry invazivity buněk po aplikaci migrastatik. Tabulka 11 ukazuje procento buněk, které jsou stále invazivní i po působení léčiva v základní koncentraci (faktor 1). Invazivními buňkami jsou označeny buňky, jejichž trajektorie je delší než 100 µm (počítáno pomocí Euklidovské vzdálenosti) a index meandrovitosti je vyšší než 25 %.

Pro obě nádorové buněčné linie je kontrolní vzorek CNT 1 navázán k měření BEL, FAST, MID a NICL a kontrolní vzorek CNT 2 se váže k 4HAP, DOXY a PIM, aby nedošlo ke spojení dvou různých měření získaných v různých dnech.

Výsledky ukazují, že v případě buněk A549 nejvíce snížil počet invazivních buněk NICL. Naopak po 4HAP, DOXY a PIM nedošlo k žádnému významnému snížení procenta invazivních buněk. V buňkách HT1080 neměl NICL tak silný účinek jako v případě buněk A549. Největšího snížení počtu invazivních buněk se dosáhlo po aplikaci PIM.

Stejným způsobem jsou hodnoceny nejen další koncentrace léčiv a látek, ale i kombinace migrastatik, viz nezkrácená verze dizertační práce.

Tabulka č. 11: Ukázka exprese invazivního fenotypu buněk NDHF po 10 a 20 hodinách léčby migrastatik v základní koncentraci

Vzorek		Invazivní fenotyp [%]	
		10 h	20 h
NDHF	**Kontrola**	38,3	22,5
	4-hydroxyacetofenon	25	26,9
	Belumosudil	36	34,1
	Doxycyklin	39,3	27,8
	Fasudil	45,1	37,3
	Midostaurin	34,1	31,7
	Niklosamid	48,8	35
	Pimozid	30	10
A549	**Kontrola 1**	16,2	29
	Belumosudil	13,3	20
	Fasudil	12	21,3
	Midostaurin	9,2	14,2
	Niklosamid	0	8,8
	Kontrola 2	25,1	38,5
	4-hydroxyacetofenon	22,5	37,4
	Doxycyklin	15,3	29,9
	Pimozid	28,6	41,2
HT1080	**Kontrola 1**	32,7	30,7
	Belumosudil	38,9	30,3
	Fasudil	34,5	29,3
	Midostaurin	37,5	37,4
	Niklosamid	32,9	34,5
	Kontrola 2	36,4	40,8
	4-hydroxyacetophenone	36,6	34,2
	Doxycyklin	34,2	31,9
	Pimozid	41,7	32,5

6. Korelační mikroskopie s fluorescencí

V mnoha oblastech biologie patří mezi základní výzkumné metody mikroskopická studie chování a migrace buněk, stejně jako výzkum nádorů, objevování léků, smrt buněk, fenotypový screening, studium patologických procesů nebo interakce buněk s biomateriály.

Tato metoda zahrnuje postup pro korelační mikroskopii mezi kvantitativním fázovým zobrazováním (QPI) a laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem (LSCM). Hlavním cílem je získat počáteční povědomí o chování buněčné kultury, které by mohlo být přeneseno do dalšího vývoje metody. Data získaná z obou mikroskopů (Q-

PHASE a LSCM) by měla dále sloužit k rozšíření projektu o studiu dalších buněčných struktur nádorových buněk v reakci na systémovou léčbu nebo cílenou diagnostiku solidního nádoru, jakož i účinnost léčby. Zavedený postup korelační mikroskopie mezi QPI a LSCM je neocenitelný pro jiné projekty se společným cílem identifikovat korelaci mezi přesnou kvantifikací chování buněk a expresí/lokalizací konkrétních molekulárních druhů v jednotlivých buňkách v tkáňové kultuře.

V této metodě je testována přítomnost a nepřítomnost biomarkerů fokálních adhezních kinází (FAK) a proteinu 4.1B v nádorových liniích po aplikaci migrastatik pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. Snímky QPI jsou tak korelovány se snímky z bodového LSCM A1R NIKON.

Fokální adhezní kináza (FAK) je nereceptorová proteinová tyrosinkináza [153], která je nadměrně exprimována a aktivována u několika druhů nádorového onemocnění a přispívá k progresi a metastazování prostřednictvím své důležité role v buněčné proliferaci, přežití, adhezi, šíření, invazi a migraci. FAK také hraje roli v imunitní odpovědi nádorů, epiteliálně mezenchymálních přechodech, opravě poškození DNA a regulaci kmenových buněk.

Protein 4.1B je protein obsahující doménu 4.1/ezrin/radixin/moesin [154], jehož exprese je často ztracena u různých lidských nádorů, včetně meningeomů, nemalobuněčných karcinomů plic a karcinomů prsu. Nicméně jeho potenciální funkce v podmínkách *in vivo* zbývá ověřit. Při screeningu genů zapojených do metastáz nádoru prostaty bylo zjištěno ve studii Wong a kol. [155], že exprese 4.1B je snížena u vysoce metastatických nádorů.

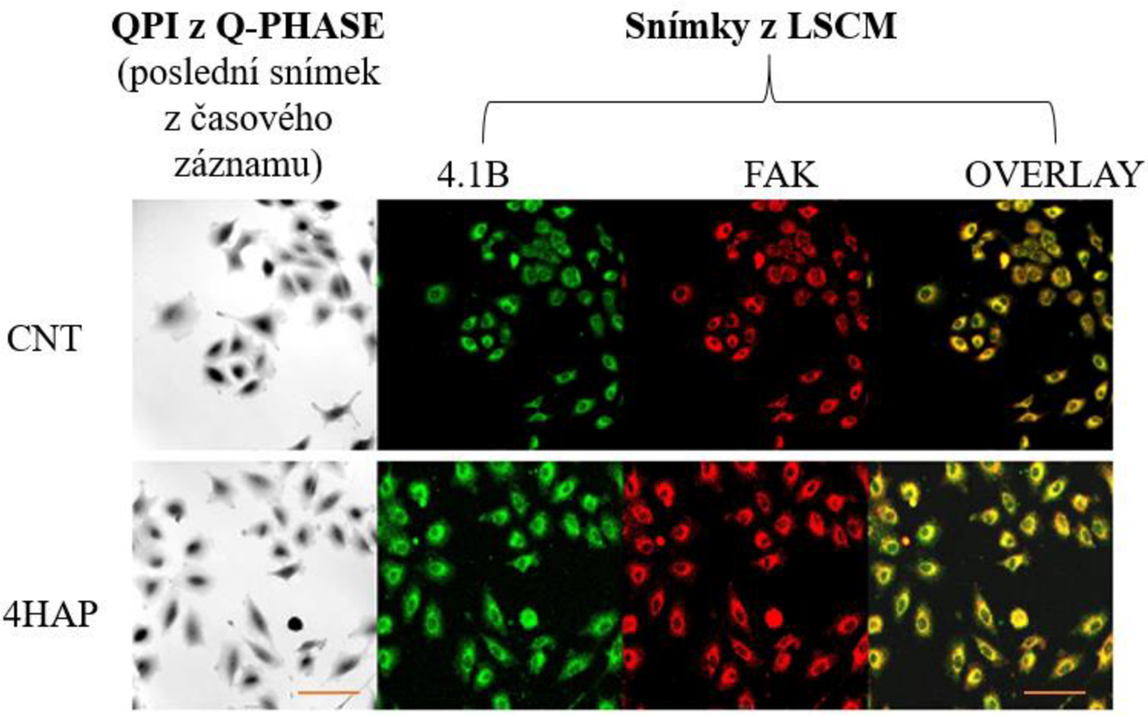
6.1. Korelace

Buňky jsou snímány s migrastatiky v časosběrném režimu s 5 minutovým intervalem po dobu 20 hodin s využitím režimu více polí v Ibidi μ-Slide VI$^{0.4}$ pomocí Q-PHASE mikroskopu a jsou zaznamenány QPI jednotlivých polí, viz obr. 22. Následuje fixace 4% folmaldehydem snímaných buněk a imunobarvení pomocí protilátek. Jako primární protilátky jsou zvoleny: FAK (Tyr 861, Rabbit antibody), 4.1B (Mouse antibody) a jako sekundární pak Alexa 488 a 647.

Držák vzorků z Q-PHASE mikroskopu je přenesen na motorizovaný stolek LSCM. Souřadnice jednotlivých snímaných zorných polí z holografického mikroskopu jsou exportovány z SophiQ a transformovány pro softwaru NIKON od LSCM a to speciálně vyvinutým postupem pro tento projekt. Tyto pozice se následně importují do softwaru

LSCM a po jejich načtení se automaticky identifikují buňky. Snímky z LSCM jsou pořízeny pomocí argonového (emise 488 nm) a diodového laseru (emise 647 nm).

Analýza časosběrných QPI buněk A549 a léčiv je popsána v kapitole 3 a 5. Zde jsou pouze zobrazeny snímky z LSCM.



Obrázek č. 22: Ukázka buněk A549 z QPI po následném imunocytochemii. Pomocí speciální transformace je nalezena stejná pozice QPI na LSCM. Jedná se o snímky s 4-hydroxyacetophenonem v koncentraci s faktorem 0,3. Měřítko 100 µm. Objektiv Q-PHASE 10x/0,3 a objektiv LSCM 20x/0,8.

6.2. Fokální adhezní kinázy

Fokální adhezní kinázy jsou patrné na periferii buněk, viz obrázek 23 a 24. Předpokládá se, že tyto kinázy jsou zvláště důležité pro adenokarcinom plic. Jsou známy svou agresivitou a v případě snížení/inhibice FAK [157] dochází k významnému poklesu buněčné proliferace, invaze, migrace a k indukované zástavě buněčného cyklu a k tvorbě apoptóz.

U buněk A549 platí podle studie [158, 159], že zvýšená aktivita FAK po oddělení buněk může přispívat k potenciálu metastáz maligních nádorů .

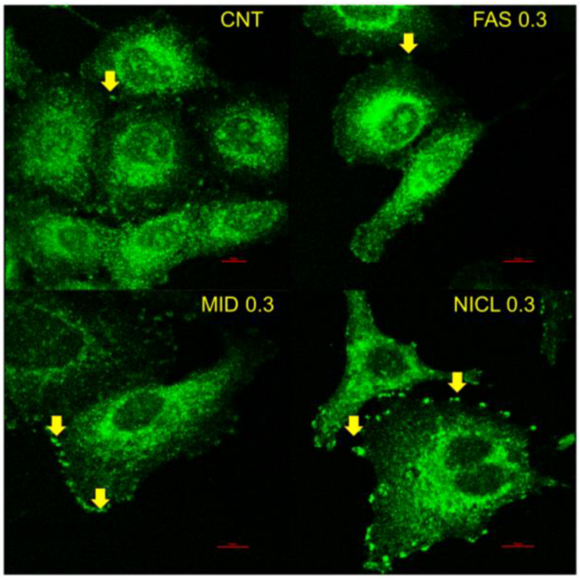
Podle dat v kap. 5nejvýznamněji snížili migraci buněk A549 právě FAS, MID a NICL. Podle snímků je zřetelné, že FAK se vyskytovaly v periferiích buněk A549 po předešlé aplikaci MID 0,3 a NICL 0,3. Naopak po aplikaci FAS 0,3 nejsou FAK příliš zřetelné. Snížené koncentrace jsou vybrány, aby se zachovala odpovídající morfologie

buněk. Po vyšších dávkách léčiva není možné na buňkách přesně proteiny identifikovat kvůli velkým morfologickým změnám v buňkách.

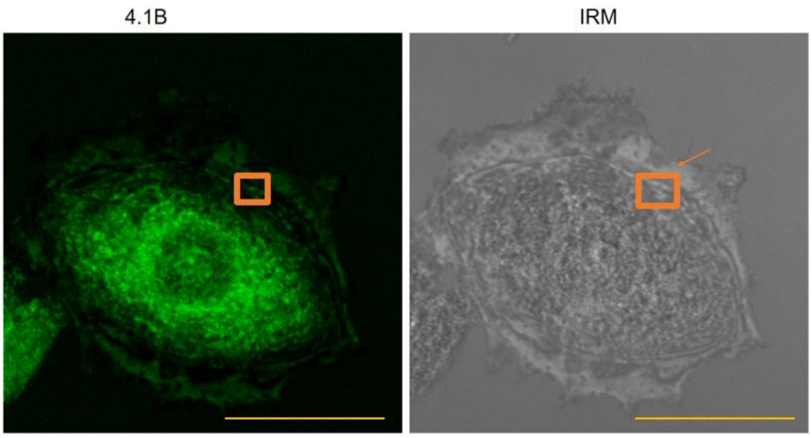
Pracuje se s hypotézou, že po aplikaci migrastatik by buňky neměly být vystaveny stresu a neměly by tak tvořit stresová vlákna. Na tyto vlákna v periferii se tak naváže FAK.

Zde jsou zobrazeny snímky z LSCM, které ukazují výskyt a velikost fokálních adhezních kinází po aplikaci vybraných migrastatik, viz obr. 23.

Z ukázek vyplývá, že po aplikaci MID 0,3 a NICL 0,3 je velký výskyt FAK na rozdíl od FAS 0,3. Lze se domnívat, že buňky byly vystavenu stresu po aplikaci MID 0,3 a NICL 0,3.



Obrázek č. 23: Ukázka snímků buněk A549 vizualizovaných pomocí LSCM a následně imunocytochemii po časosběrném snímání na QPI po aplikaci migrastatik. Šipky označují příklady fokálních adhezí. Měřítko 10 µm. Objektiv 20x/0,8.



Obrázek č. 24: Ukázka snímků buněk A549 vizualizovaných pomocí LSCM a následně imunocytochemií ošetřeny proteinem 4.1B. Čtverec označuje příklady fokálních adhezí se zvýšenými koncentracemi 4.1B. Měřítko 50 µm. Objektiv 20x/0,8.

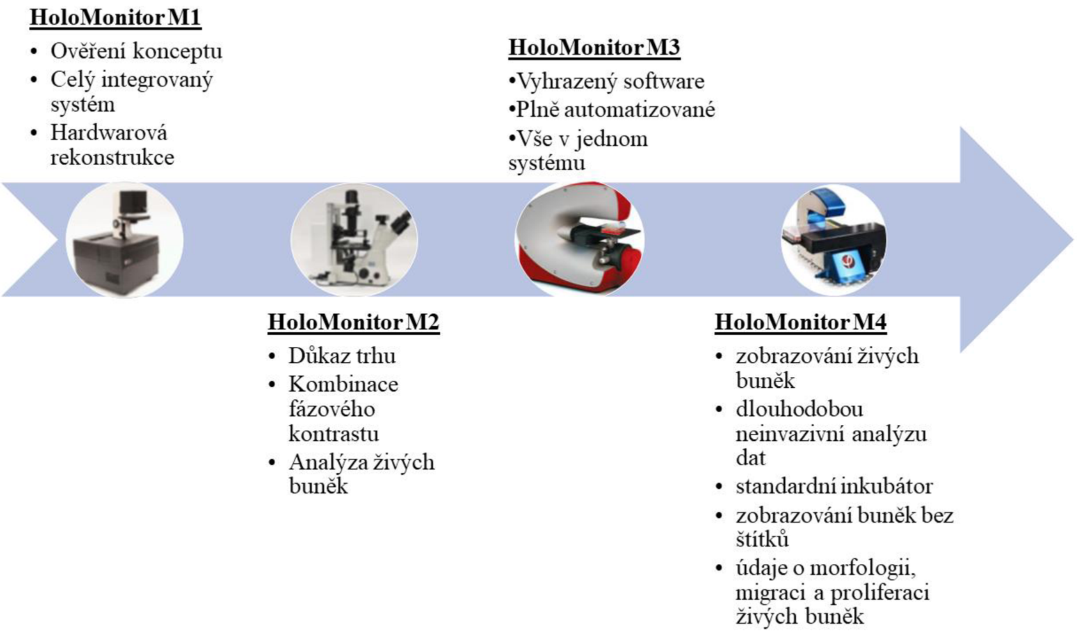
Tento výzkum korelační mikroskopie je podpořen organizací Czech-Bioimaging: National Infrastructure for Biological and Medical Imaging (LM2018129) a výsledky byly prezentovány na Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2021 [4].

7. Srovnání holografických mikroskopů Q-PHASE a HoloMonitor

Pro ověření platnosti metody PAMP (popsané v kapitole 3) je nutné otestovat vzorky a postup i na jiném holografickém mikroskopu. K tomu byl zvolen holografický mikroskop HoloMonitor M4 (Phase Holographic Imaging PHI AB, Švédsko). Parametry mikroskopu HoloMonitor jsou porovnány v této kapitole s parametry koherencí řízeného holografického mikroskopu Q-PHASE popsaného v kapitole 2.

7.1. HoloMonitor

Současné verze přístrojů HoloMonitor (M4 – která se pro účely této práce testovala v BIOCEVu v laboratoři pana prof. Jana Brábka) vychází z konceptu tří předchozích verzí založených na QPI konceptu, viz obr. 25.



Obrázek č. 25: Klíčové vlastnosti HoloMonitoru během evoluce. Jedná se o zobrazení všech 4 generací tohoto mikroskopu.

7.1.1. Současná verze M4 mikroskopu

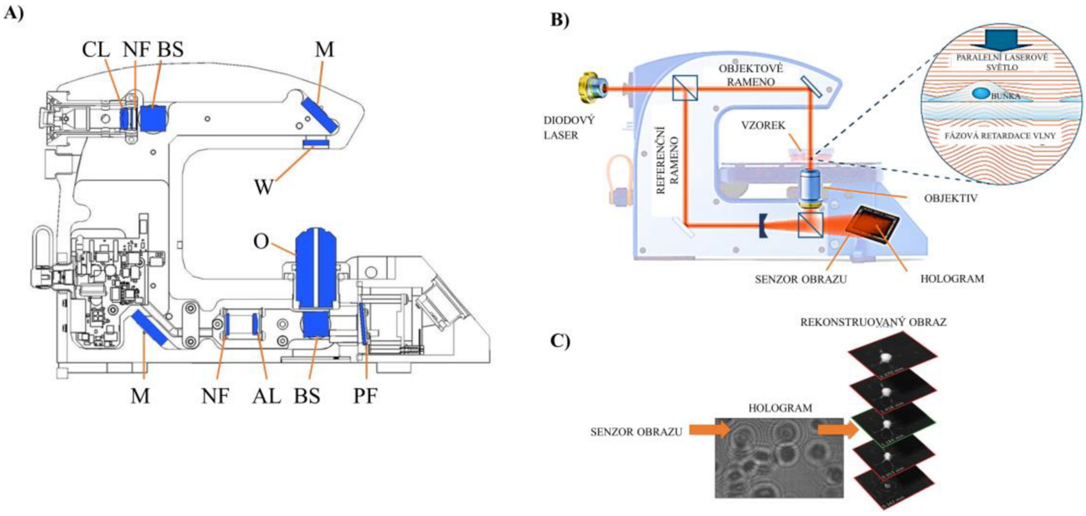
S rostoucím počtem používaných přístrojů HoloMonitor je specifikace požadavků na další generaci přístrojů HoloMonitor M4 [160–162] založena na uživatelských zkušenostech a zpětné vazbě. Vývojové úsilí upřednostňovalo snadnost použití, cenovou dostupnost, robustnost a provoz v prostředí inkubátoru. Překrytí fázovým kontrastem používané v HoloMonitor M2 a M3 je vyřazeno, protože podstatně zvýšilo optickou složitost, aniž by poskytlo nějaké větší výhody. Kromě toho mají nyní uživatelé přístup ke stále většímu množství ověřených publikovaných výsledků QPI, které vedou k interpretaci fázových obrazů, čímž se sníží prahová hodnota pro přijetí nové technologie.

Jediný pevný objektiv mikroskopu s nízkým rozlišením (Olympus PLCN 20x/0,4 Plan Achromat) je vybrán za účelem potřeby širokého zorného pole pro analýzu populace namísto analýzy jednotlivých buněk s vysokým rozlišením. Tato konfigurace povzbudila použití přístroje pro aplikace, jako jsou testy hojení ran nebo studie motility buněk, trasování buněk, kde existuje požadavek na kvantifikaci neinvazivní instrumentace. Pevná optická konfigurace zároveň snížila riziko a vývojové úsilí nutné k tomu, aby HoloMonitor M4 obstál v prostředí běžného inkubátoru napájeného CO_2.

Optické nastavení HoloMonitor M4 je znázorněno na obrázku 26 (a). Světelným zdrojem je externí laserové světlo o vlnové délce 635 nm, které vede do mikroskopu přes polarizaci udržující vláknový patch kabel a vstupuje do přístroje přes utěsněný FC/APC

vláknový konektor. Laserové světlo je kolimováno achromatickou čočkou (CL) do paralelního paprsku, jehož intenzita je omezena absorpčním neutrálním filtrem (NF). Paprsek je rozdělen děličem paprsků do dvou větví: předmětové a referenční. Paprsek předmětové větve je směrován zrcadlem (M) přes utěsněné okénko (W) na vzorek. Světlo procházející vzorkem je shromážděno objektivem mikroskopu Olympus PLN 20x/0,4 (O) a poté je směrováno děličem paprsků (BS) přes polarizační filtr (PF) do 1,3 MP CMOS fotoaparátu. Paprsek v referenční větvi je směrován zrcadlem (M) přes neutrální filtr (NF) a achromatickou čočku (AL) a je poté kombinován se světlem předmětu pomocí děliče (BS) paprsku. Dělič paprsku (BS) je nakloněn pod malým úhlem k optické ose, aby se vytvořila konfigurace mimo osu. Veškerá optika nebo optické podsestavy jsou připevněny k šasi. Aby se minimalizovaly účinky vnějších vibrací a maximalizovala optická robustnost, jsou v celé optické konfiguraci pouze dva seřizovací body.

Holografický mikroskop tak vytváří (kvantitativní) fázové obrazy tím, že nechá paprsek vzorku (objektové větve) a referenční paprsek (referenční větve) interferovat a vytvoří hologram, jak je znázorněno na obrázku č. 26 (b). Hologram je zaznamenán obrazovým snímačem a počítačově zpracován za účelem vytvoření konečného fázového obrazu (obr. 26 (c)). Tato verze mikroskopu používá pro nastavení vzorku, snímání a následnou analýzu buněk software App Suite.



Obrázek č. 26: Optické schéma holografického mikroskopu HoloMonitor. A) Optické schéma: CL, kolimátorová čočka; ND, neutrální filtr; BS, dělič paprsků; M, zrcadlo; W, okno pro vzorek; O, objektiv; PF, polarizační filtr; AL achromatická čočka. B) Znázornění chodu paprsku laseru v mikroskopu. C) Zobrazení rekonstrukce obrazu.

Z rekonstruovaného fázového obrazu ale nelze získat parametr mass jako u Q-PHASE mikroskopu, ale pro měření buňky lze použít tzv. optický objem (V). Ten se odhaduje nezávisle na tvaru buňky a vypočítá se z fázového posuvu [160]

$$V = \frac{\lambda \cdot s_{xy}^2}{n_c - n_m} \varphi_{sum} , \qquad (11)$$

kde V značí optický objem v [µm^3], s_{xy}^2 je kalibrovaná velikost oblasti zobrazené jedním pixelem a N je počet pixelů buňky. λ je vlnová délka použitého světla (externí diodový laser s vlnovou délkou 635 nm). Dále n_c je indexu lomu buňky a n_m značí index lomu média. Součet fázového posuvu způsobený buňkami při průchodu světla je označen jako φ_{sum} a je definován jako [160]

$$\varphi_{sum} = \sum_{i=1}^{N} \varphi_i , \qquad (12)$$

kde φ_i je průměrný fázový posuv v [rad] vytvořený plochou zobrazenou pixelem objektu i a dělený 2π.

Průměrná optická tloušťka buňky (*Optical thickness* –Tavg) se získá z objemu buňky a plochy buňky

$$T_{avg} = \frac{V}{Area} = \frac{\lambda}{n_c - n_m} \cdot \frac{\varphi_{sum}}{N} , \qquad (13)$$

kde $Area$ je plocha buňky [µm] a N je počet pixelů, které zobrazují oblast buňky. Optická tloušťka je udávána v [µm] a podle ní se rekonstruují 3D obrazy.

Plocha buňky $Area$ se vypočítá stejným způsobem jako při použití běžné mikroskopie

$$Area = N s_{xy}^2 , \qquad (14)$$

kde s_{xy}^2 je kalibrovaná velikost oblasti zobrazené jedním pixelem a N je počet pixelů buňky.

7.2. Srovnání Q-PHASE mikroskopu a HoloMonitoru

Oba mikroskopy umožňují zobrazit systém živých buněk jako kompletní zobrazovací řešení na úrovni jedné buňky bez barvení za ideálních kultivačních podmínek.

Srovnává se Q-PHASE mikroskop druhé generace a HoloMonitor čtvrté generace. Oba mikroskopy mají vlastní softwary pro obsluhu a analýzu dat. V případě Q-PHASE mikroskopu se program nazývá SophiQ (Telight, Česká republika) a pro HoloMonitor

byl vyvinut program App Suite (PHI AB, Švédsko). Oba programy jsou ukázány na obr. 27.

Rozdíl mezi mikroskopy je v jejich hmotnosti a velikosti, viz tabulka 12. Zásadní rozdíl mezi oběma je ve výběru zdroje světla. Zatím co Q-PHASE mikroskop využívá LED osvětlení, HoloMonitor využívá diodový laser, který je vysoce koherentní, viz tabulka 13.

Q-PHASE nabízí více mikroskopických technik z jednoho hologramu a má k dispozici větší počet objektivů a tím i rozlišení obrazu než HoloMonitor. Jsou srovnány i fázové obrazy, viz obr. 28. Je zřejmé, že fázový obraz z HoloMonitoru je více zatížen koherentním šumem. Není zřetelná přesná hranice buňky, zejména její hranice membrány. Ladění hologramu je u tohoto mikroskopu sice jednodušší, ale výsledné fázové zobrazení nedosahuje kvality QPI z Q-PHASE. Výhodou Q-PHASE je tak měření suché hmoty (barevná škála v pg/μm^2). HoloMonitor měří tloušťku buňky v µm a ne jako Q-PHASE ve fázovém zpoždění na pixel v [rad], které se dále převádí na pg. Tedy se buňka váží a navíc topologicky, což je hlavní rozdíl mezi Q-PHASE a HoloMonitor.

Segmentace jednotlivých buněk a následné trasování pohybu buněk (obr. 29) je možné u obou mikroskopů a v jejich softwarech (SophiQ a App Suite). V případě HoloMonioru není segmentace tak přesná jako v případě SophiQ. Na druhou stranu tento program nabízí více parametrů pro analýzu buněčného chování.

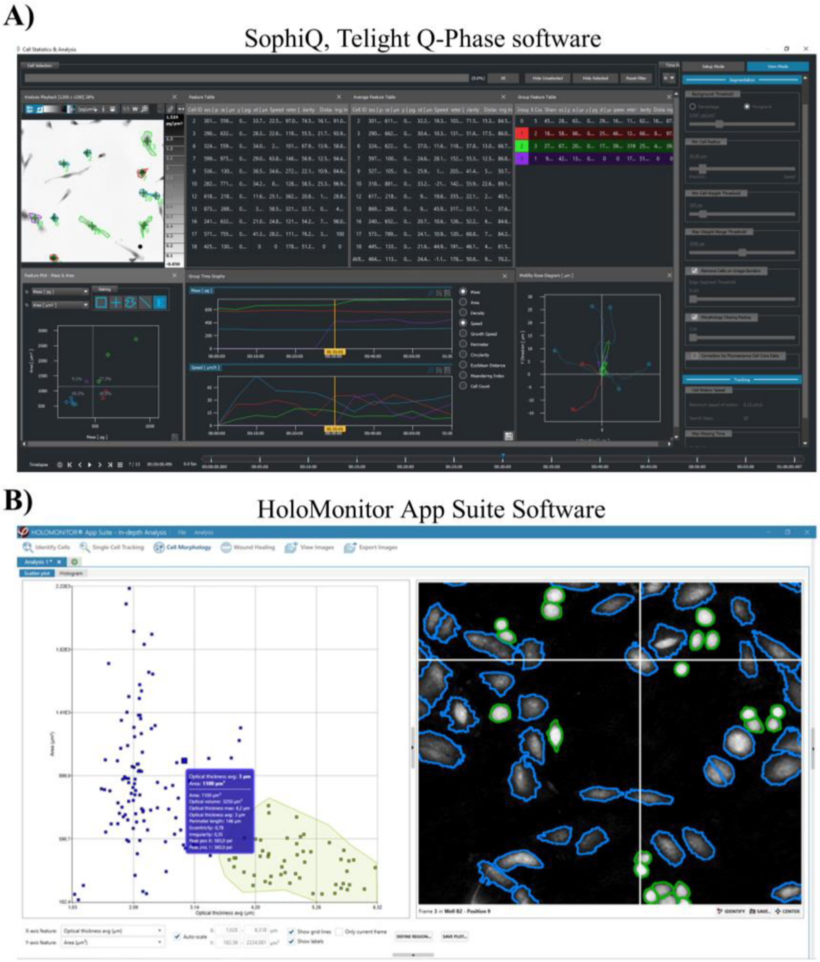
Data parametrů pro buněčnou analýzu je možné v případě obou softwarů zobrazit různými typy grafů. App Suite nabízí i analýzu dělení buněk a sledování dceřiných buněk. Vytvoří tak rodokmen buněk. Ukázky nejsou velmi graficky upravovány, aby bylo možné lépe porovnat jejich rozdíly.

Růžicové grafy (*motility rose graph*) jsou odlišné, protože SophiQ zobrazuje všechny trajektorie buněk jednou barvou, na rozdíl od App Suite. Barevná varianta těchto grafů je možná, ale pouze po rozdělení buněk do více skupin podle feature table, jako je ukázáno v kapitole 3 (třetí krok- invazivní fenotyp). SophiQ zobrazuje trajektorie buněk, které jsou analyzovány v konkrétním QPI v daném čase měření. App Suite ale zobrazí trajektorie všech buněk z celého nahrávání.

Časové grafy (*time graph*) lze zobrazit dvojím způsobem, buď pro každou buňku zvlášť nebo jako průměr všech buněk zorného pole. To je výhoda SophiQ. V případě App Suite se zobrazí hodnoty všech buněk (odlišeny barvami) a mezi nimi průměrná hodnota (obvykle zvýrazněná černou barvou) v jednom grafu.

Oba mikroskopy nabízí grafy pro libovolné zvolení parametrů na ose x a y. (*feature table*) a histogramy. Rozdíl mezi oběma je ale v zobrazení počtu buněk. Zatímco SophiQ zobrazuje v grafu jen hodnoty buněk určitého časosběrného QPI, App Suite zobrazí v grafu všechny hodnoty ze všech časosběrných QPI. Proto je počet buněk na ilustračních obrázcích různý. Tohle je případ i histogramů.

V neposlední řadě je nutné ke grafickým ilustracím získat i tabulky s daty pro všechny parametry, ze kterých byly tyto grafy zhotoveny. SophiQ umožňuje uložení dat jako textového souboru s oddělovači pro Microsoft Excel (.csv) a App Suite pak ukládá data ve formátu List Microsoft Excelu (.xlsx). Nutno ale podotknout, že data z App Suite jsou dále zpracovatelná. V jednom dokumentu jsou všechny parametry všech buněk, průměrů a grafů z celého měření. V případě SophiQ je nutné každý parametr zvlášť ručně uložit a průměrnou hodnotu si ručně vypočítat.



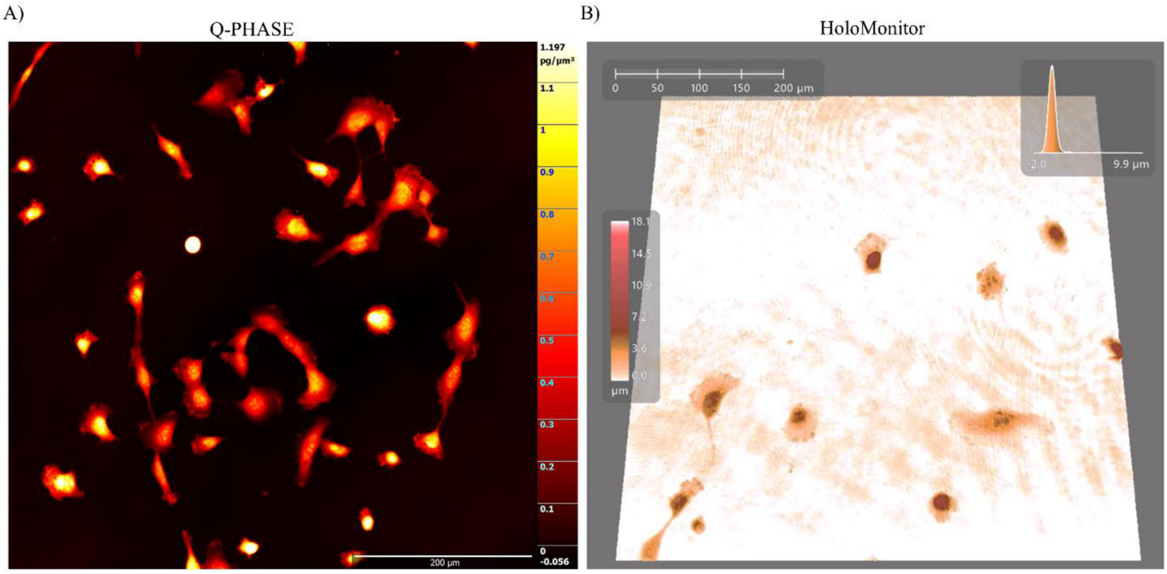
Obrázek č. 27: Ukázka analýzy buněk v softwarech SophiQ a App Suite. A) SophiQ, TELIGHT Brno s.r.o. B) App Suite, Phase Holographic Imaging PHI AB (upraveno z [160]).

Tabulka č. 12: Srovnání technických parametrů mikroskopů [43, 160, 161]

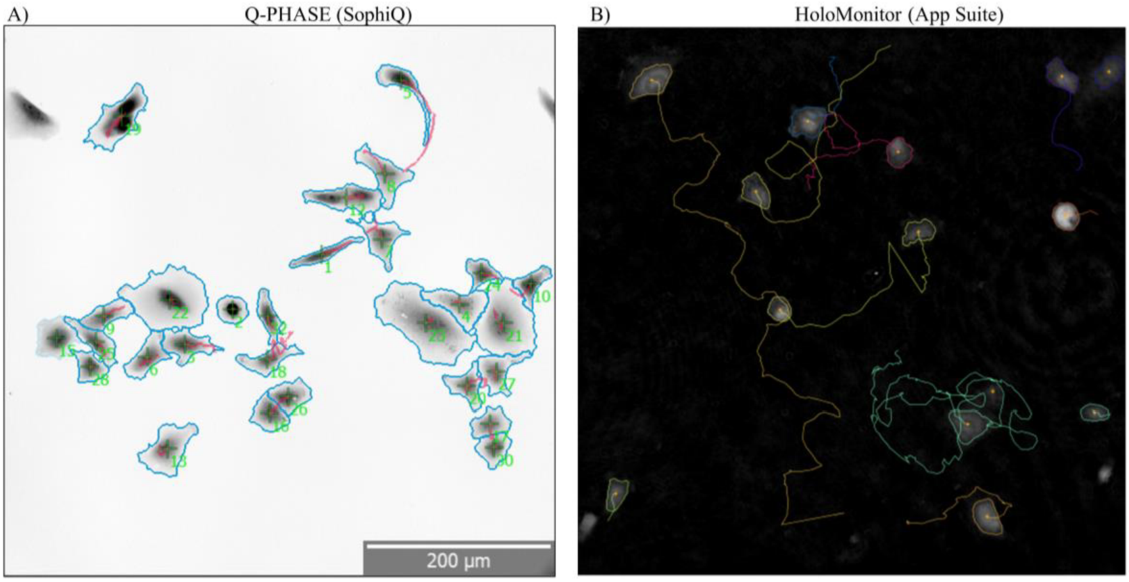
Princip	Q-PHASE	HoloMonitor
Rozměry (W × L × H)	1100 mm × 950 mm × 1620 mm microscope with incubator, 2515 mm × 974 mm × 1620 mm total with operator table	290×200×190mm HoloMonitor® M4 dimensions, 400×270×190mm Space required in incubator
Váha	350 kg	5,15 kg
Vyšetřovací plata	Cells: Adherent cell monolayer, samples in scattering media Cell culture vessels:1, 6-, 24-IBIDI um-slide	Cells: Adherent cell monolayer Cell culture vessels: 6 –, 24 –, 96 –well, Petri, IBIDI Operating temperature: 10 – 40°C Operating humidity: Max 95%
Teplota inkubátoru	37°C	37°C
CO_2	Není standardně součástí inkubátoru, ale je možnost jej připojit TES, HEPES do média	Ano, přímo v inkubátoru
Parametry pro analýzu buněk	Area, mass, speed, density, confluence, perimeter, growth speed, circularity, Euclidean distance, Meandering index, motility rose, histogram, time-graphs	Area, optical volume, Optical thickness, Optical thickness Max, Optical path length, Boxed length and breadth, Boxed center position x and y, Centroid position x and y, Eccentricity, Hull convexity, Irregularity, Migration distance, Motility distance and speed, Migration directness, Peak position, Perimeter length, Phase shif, Roughness, Shape convexity, Texture

Tabulka č. 13: Srovnání optických parametrů mikroskopů [43, 160, 161]

Parametr	Q-PHASE	HoloMonitor
Osvětlení	Halogenová lampa nebo LED 660 nm, 0,9 mw/cm^2	Externí diodový laser 635 nm, 0,2 mw/cm^2
Mikroskopické techniky	Holography (quantitative phase imaging), epifluorescence, simulated DIC, brightfield, high-pass filtered phase	Holography (quantitative phase imaging)
Objektivy	Nikon Plan 4x/0,10 NA/30 mm WD Nikon Plan Fluorite Objectives, 10x/0.3 NA/16 mm WD Nikon Plan Fluorite 20x/0,5 NA/,1 mm WD Nikon Plan Apo 40x/1,0 NA/0,16 mm WD DIC H Nikon Plan Apo VC 60x/1,4 NA/0,13 mm WD Oil Zaostřovací motorizovaná věž objektivu	Olympus PLCN 20x/0,4 Plan Achromat
Kondenzor	Kondenzorové čočky Nikon LWD, 0,52 NA, s nastavitelným dorazem apertury	Nespecifikováno
Boční rozlišení	4 µm with 4x NA 0,1 objective 0,58 µm with 60x NA 1,4 objective	1 µm
Zorné pole	598x598 µm pro objektiv 10x/0,3	567x567 µm pro objektiv 20x/0,4
Velikost obrazu	1200 × 1200 pixel	1024 × 1024 pixel
Mikroskopický stůl	Ano, s antivibračním odpružením	Ne
Motorizovaný XYZ-stage	Motorizovaný, rozsah zdvihu 130 mm × 90 mm Zaostřovací motorizovaná věž objektivu, Rozsah zdvihu 8 mm Volitelné piezo ostření – rozsah zdvihu 500 µm	Stage travel range: 100×70×10 (x×y×z) Stage repeatability: 5µm



Obrázek č. 28: Srovnání fázových obrázků z holografických mikroskopů. A) Kvantitativní fázové zobrazení z Q-PHASE mikroskopu. Buňky HT1080. Barevná škála v pg/μm^2. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm. B) Kvantitativní fázové zobrazení z HoloMonitoru. Buňky HT1080. Barevná škála v µm. Objektiv 20x/0,4. Měřítko 200 µm.



Obrázek č. 29: Srovnání segmentace a trasová buněk z holografických mikroskopů . A) Kvantitativní fázové zobrazení z Q-PHASE mikroskopu buněk HT1080, segmentace a trasování buněk provedeno v softwaru SophiQ. Červeně jsou zobrazeny trajektorie buněk. Objektiv 10x/0,3. B) Kvantitativní fázové zobrazení z HoloMonitoru buněk HT1080, segmentace a trasování buněk provedeno v softwaru App Suite. Každá buňka mateřská a dceřiná má stejnou barvu. Objektiv 20x/0,4.

7.3. Srovnání výsledků metody PAMP měřené na mikroskopech

V této kapitole je metoda PAMP aplikována i na holografický mikroskop HoloMonitor. Pro tento test jsou zvoleny buňky HT1080 a migrastatika. Výsledky měření těchto buněk na obou mikroskopech jsou porovnány.

7.3.1. Materiál

Buňky HT1080 [163] jsou kultivovány pro filmování na Q-PHASE mikroskopu stejným způsobem jako v kap. 3.1.

Pro filmování na mikroskopu HoloMonitor se použilo médium DMEM, které je modifikované a původně navržené pro myší fibroblasty. DMEM má dvojnásobnou koncentraci aminokyselin a čtyřnásobnou koncentraci vitamínů oproti MEM, s dvojnásobnou koncentrací HCO_3- a CO_2 pro lepší pufrování. Inkubátor je vytopen na 37°C s 5 % CO_2. Buňky jsou kultivovány v počtu 1 000 – 2 000 na jednu jamku. Objem jamky je 170 μl média. Kultivační médium je po 24 hodinách nahrazeno médiem s migrastatikem. Koncentrace migrastatik odpovídají koncentracím pro metodu PAMP a jsou popsány v kapitole 3 této práce. Pro časosběrné snímání jsou zvoleny 96 well plate, které jsou přiklopeny víky HoloLids. Tato víka jsou navržena pro optimální ventilaci vzduchu a pomáhají eliminovat poruchy obrazu způsobené povrchovými vibracemi. Časosběrný záznam je opět 20 hodin (přibližně délka jednoho buněčného cyklu) v 5minutových intervalech. Je využit objektiv Olympus PLCN 20x/0,4 Plan Achromat.

7.3.2. Výsledky hodnocení migrastatik

U obou mikroskopů se jednalo o analýzu růstu buněk a motility. Pro analýzu růstu buněk je vybrány parametry area a perimetr (densitu HoloMonitor nepočítá) a pro analýzu dynamiky pohybu pak rychlost migrace a Euklidovská vzdálenost (u HoloMonitoru označena jako migrační vzdálenost). Výpočty jednotlivých parametrů jsou zapsány v tabulce 14.

Výpočet arei se liší, SophiQ zohledňuje výšku a šířku pixelu, ale App Suite počítá kalibrovanou oblast jednoho pixelu. Výpočet perimetru a Euklidovy vzdálenosti je totožný pro oba softwary. V případě analýzy rychlosti SophiQ počítá s těžišti buňky, ale u App Suite to není zřejmé.

Těžiště u HoloMonitoru je dáno jako aritmetický průměr všech bodů vážený optickou tloušťkou buňky. Pro Q-PHASE platí vzorek č. 9 a počítá se podobným způsobem.

Tabulka č. 14: Výpočet parametrů pro analýzu buněk [43, 160, 161]

Parametr	**Q-PHASE**	**HoloMonitor**
Plocha (area) *[μm²]*	$Area = Nwh$, kde w a h jsou šířka a výška pixelu, N je počet pixelů buňky a součet jde od $i = 1$ přes všechny N pixely buňky.	$Area = Ns_{xy}^2$, kde s_{xy}^2 je kalibrovaná velikost oblasti zobrazené jedním pixelem a N je počet pixelů buňky.
Perimetr *[μm]*	Pro obvod buňky používá software iterativní přístup, který sleduje dráhu pixelů na okraji buňky.	Výpočty jsou založeny na nastavení prahu, který odlišuje pozadí od buňky.
Rychlost (speed) *[μm/h]*	$Speed(t_n) = \frac{\lvert WCG(t_n) - WCG(t_{n-1})\rvert}{t_n - t_{n-1}}$, kde t_n je čas v okamžiku *n* a t_{n-1} je čas v předchozím okamžiku *n-1*, těžiště WCG (Weighted Center of Gravity) je dvourozměrný vektor se souřadnicemi *x* a *y*.	Rychlost motility je vzdálenost motility dělená dobou, kterou buňce trvalo, než se z ní dostala z výchozího bodu do koncového bodu.
Euklidova vzdálenost *[μm]*	$EDist_{(t)} = WCG_{(t)} - WCG_{(0)}$ kde těžiště WCG (Weighted Center of Gravity) je dvourozměrný vektor se souřadnicemi *x* a *y*.	Migrační vzdálenost je nejkratší vzdálenost mezi výchozím bodem a koncovým bodem cesty buňky.

7.3.2.1. Analýza morfologických změn

Buňky HT1080 jsou analyzovány pomocí parametrů area a perimetr. Tyto parametry jsou vybrány, protože nebyly přímo zařazeny do kap. 5 a oba mikroskopy je počítají podobným způsobem.

Tabulka 15 hodnotí morfologické změny po aplikaci migrastatik. Migrastatika jsou zkoumána v základních koncentracích (faktor 1, viz kap. 3.2). Jsou zobrazeny hodnoty na začátku (00:00) a na konci měření (20:00). Jedná se o průměrné hodnoty všech buněk vybraných zorných polí.

Je zřejmé, že buňky HT1080 snímané pomocí Q-PHASE mají vyšší plochu (areu) než z HoloMonitoru. To platí i pro perimetr.

Analýza pomocí SophiQ ukázala, že MID nejvíce ovlivnil plochu buněk, a to zvýšením hodnoty z 1208,3 μm² na 2338 μm². Mírné zvýšení plochy zaznamenal i App

Suite. Toto migrastatikum podle SophiQ navýšilo i hodnotu perimetru buněk na konci měření. Ale podle App Suite došlo ke snížení hodnoty perimetru oproti stavu na začátku měření.

Je tedy zřejmé, že hodnoty naměřené oběma mikroskopy se mírně liší.

7.3.2.2. Analýza dynamických změn

Opět je hodnocena rychlost migrace buněk, tentokrát jsou zobrazeny v tabulce 16 průměrné hodnoty z dat z celého časosběrného snímání, tedy z 20 hodin.

Z dat vyplývá, že průměrná rychlost buněčné migrace naměřená pomocí snímků z HoloMonitoru je vyhodnocena softwarem AppSuite a je nižší než v případě QPI z Q-PHASE analyzovaných softwarem SophiQ. Rychlosti kontrolních vzorků z obou mikroskopů jsou srovnatelné.

Výsledky snížených a zvýšených koncentrací migrastatik jsou v nezkrácené verzi dizertační práce.

Tabulka č. 15: Analýza arei a perimetru buněk HT1080

	Q-PHASE				**HoloMonitor**			
Vzorek buněk HT1080	Area [μm²]		Perimetr [μm]		Area [μm²]		Perimetr [μm]	
	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření	Na začátku měření	Na konci měření
CNT 1	**1340,9**	**1311,1**	**204,9**	**227,7**	**655**	**698**	**106**	**106**
4HAP	1028,9	1241,2	182,6	216,9	491	416	87	80
BEL	1202,0	1161,5	185,8	210,8	500	529	89	98
DOXY	1197,7	1328,4	196,3	226,6	616	559	104	103
FAS	1435,1	1427,6	244,3	246,4	858	522	122	106
MID	1570,4	1603,8	252,9	291,2	475	592	90	103
NICL	1208,6	1130,4	193,1	224,3	566	712	96	109
PIM	1215,8	1045,8	200,3	236,8	548	342	99	86

Tabulka č. 16: Srovnání výsledků dynamických parametrů

vzorek	**Q-PHASE**	**HoloMonitor**	**Q-PHASE**	**HoloMonitor**
	Průměrná rychlost migrace buněk [µm/h]	Průměrná rychlost migrace buněk [µm/h]	Průměrná hodnota Euklidovské vzdálenosti [µm]	Průměrná hodnota Euklidovské vzdálenosti [µm]
CNT 1	**44,7 ± 8,2**	**41,3 ± 7,5**	**189,0**	**108,0**
4HAP	43,2 ± 8,1	50,0 ± 24,6	138,1	87,8
BEL	43,2 ± 8,6	44,6 ± 11,2	200,6	217,0
DOXY	41,8 ± 8,5	45,5 ± 9,8	183,7	80,9
FAS	44,6 ± 10,1	44,6 ± 8,4	161,2	80,7
MID	43,7 ± 11,9	32,1 ± 8,5	169,0	81,6
NICL	36,2 ± 11,5	39,4 ± 9,5	151,8	69,9
PIM	42,8 ± 9,9	32,3 ± 15,5	227,6	103,2

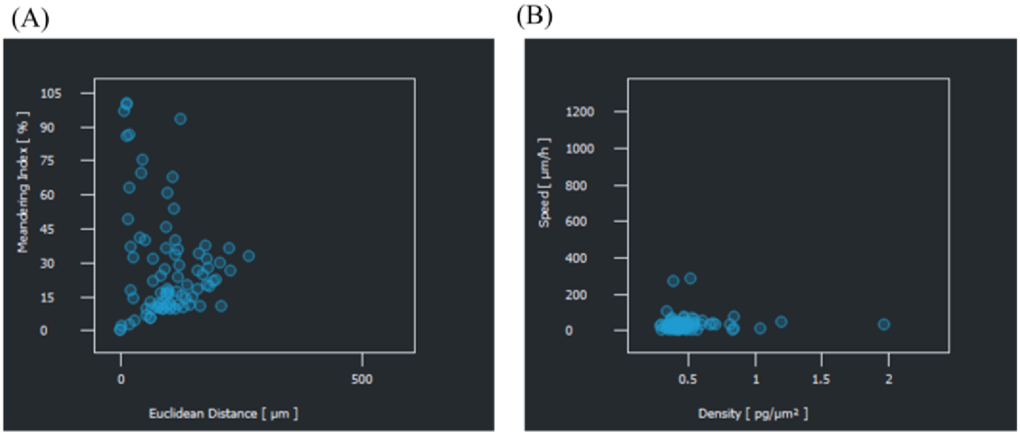
8. Navržené změny v SophiQ pro analýzu buněk

Pro analýzu buněk je v této práci použit primárně software SophiQ, který je k dispozici k mikroskopu Q-PHASE. SophiQ slouží pro analýzu naměřených QPI a firma Telight ji pravidelně aktualizuje. Možnosti pro buněčnou analýzu ale z počátku řešení metody PAMP nevyhovovaly. Proto ve spolupráci s firmou bylo navrhnuto a realizováno několik změn. Změny se týkaly zobrazení jednotlivých grafů, a tabulek, jejich ukládání a hromadné hodnocení celého datasetu najednou.

Úpravy grafů se týkaly zejména jejich ukládání. Dosud bylo možné ukládat grafy jen ve formátu png, svg a csv a to jako snímek obrazovky, nikoli ve standardní velikosti obrazu. V poslední verzi SophiQ je přidána možnost uložit grafy ve formátu jpeg, bmp s tiff. Tento požadavek byl firmě navržen, aby bylo možné grafy lépe prezentovat a nemuseli se tak vytvářet znovu v požadovaném formátu z tabulek.

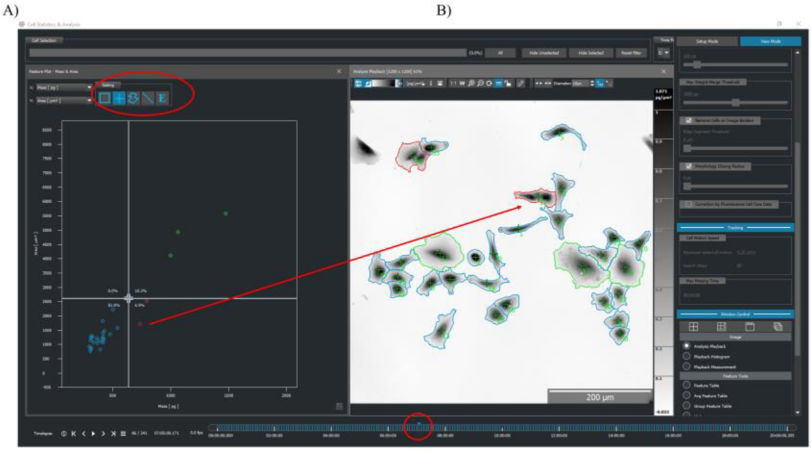
Např. grafy rysů (*feature grafy*) je možné ukládat ve výše zmíněných formátech, ale je potřeba každý graf uložit jednotlivě pro každou dvojici parametrů. Též není možné si u těchto grafů libovolně volit rozsah os x a y, což by bylo žádoucí pro srovnání kontroly s léčivy. Obrázek 30 zobrazuje modře hodnoty jednotlivých buněk. Snímky jsou získané přímo ze SophiQ a jsou v původním formátě png. V případě Euklidovské vzdálenosti (obr. 30 (a), osa x) by bylo lepší libovolně upravit rozsah např. z 0–500 µm na přibližně 0-300 µm a po krocích 100 µm. Stejný problém je i u rychlosti (*Speed*) (obr. 30 (b), osa y). Velikost písma těchto grafů je velmi malá, což grafy bohužel činí málo čitelnými.

Všechny grafy tohoto typu popsané v kapitole 5 metody PAMP byly z těchto důvodů vytvořeny ručně v Excelu.



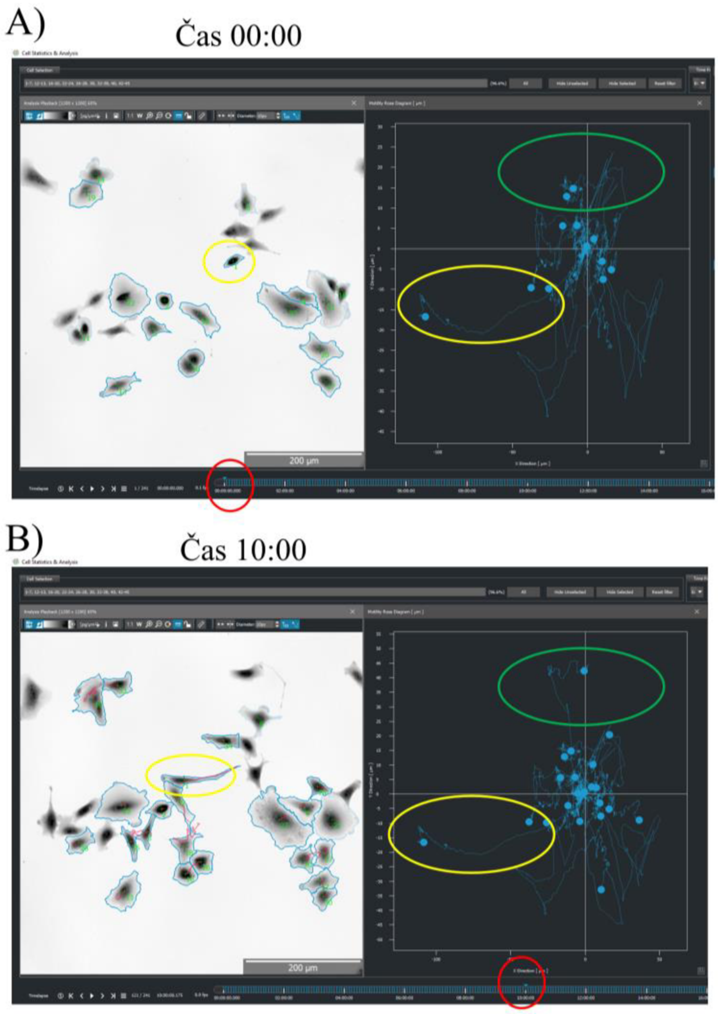
Obrázek č. 30: Ukázka grafů ze SophiQ. A) graf poměru Euklidovské vzdálenosti a indexu meandrovitosti. B) Ukázka grafu density buněk a rychlosti buněk.

Dále SophiQ neumožňuje zobrazit každou buňku jiné barvy v těchto grafech. App Suite ale hned na začátku přiřadí každé zvlášť buňce barvu a tou označí i její dceřiné buňky v případě, že e buňka rozdělí. Barevné rozlišení buněk v SophiQ je možné jen manuálně, viz obr. 31. Dále jsou v případě těchto grafů zobrazeny jen hodnoty buněk v jednom daném časovém úseku z celého měření, např. čase 10:05 z 20 hodin filmování (grafy zobrazují jaké zrovna mají buňky hodnotu např. massy). Neukazují průměrnou hodnotu za celou dobu měření jako v případě App Suite, který zobrazuje i průměrné hodnoty za celou dobu měření.



Obrázek č. 31: Ukázka barevného rozdělení buněk pomocí SophiQ. Software SophiQ pracuje s tmavým pozadím. A) Graf poměru hmotnosti buněk a plochy buněk. V červeném kolečku jsou zobrazeny možnosti dělení buněk v tomto grafu. B) Ukázka QPI snímku, kde jsou pomocí barevné segmentace označeny buňky. Každá barva segmentace buňky odpovídá hodnotě z grafu vlevo. Objektiv 10x/0,3. Měřítko 200 µm.

Též by bylo vhodné mírně upravit růžicové grafy (*motility rose graph*). Např. nynější grafy zobrazují trajektorie buněk, které se vyskytují v daném zvoleném časovém úseku. SophiQ neukazuje jako App Suite trajektorie všech naměřených buněk najednou v jednom grafu. Dále nelze zobrazit, jak se buňka průběžně pohybovala (pouze v obrázku QPI a nikoliv samostatně). Zobrazení trajektorií buněk v tomto grafu v SophiQ jsou matoucí, viz obr. 32 (a). Např. v čase 00:00 zobrazuje SophiQ, že buňka migrovala 100 µm (obr. 32 (b) - žlutě vyznačená). Což s ohledem na fyzikální zákon o rychlosti pohybu není možné. Dále má tato samá buňka ale v QPI v čase 10:00 stále stejnou trajektorii v grafu. Růžicový graf se ale po 10 hodinách měření změnil (zeleně vyznačená část). Je to z toho důvodu, že se změnit počet segmentovaných buněk v zorném poli a některé trajektorie buněk tak z grafu zmizely a jiné přibyly.



Obrázek č. 32: Ukázka růžicového grafu v SophiQ. Software SophiQ zobrazuje grafy s tmavým pozadím. A) QPI s vyznačenou segmentací buněk a růžicový graf s trajektoriemi těchto buněk. Jedná se o počátek měření. B) QPI s vyznačenou segmentací buněk a růžicový graf s trajektoriemi těchto buněk. Jedná se o data z 10 hodiny filmování. Barevně jsou zobrazeny rozdíly.

Dále by bylo vhodné zavést do SophiQ detekci dělení buněk a možnost tak vytvořit rodokmen buněk, jako je tomu u App Suite. To by pomohlo usnadnit práci při detekci růstu buněk a hodnocení stavu buněk po aplikaci léčiv/migrastatik.

Dále SophiQ poskytuje časové grafy. Časové grafy hrají důležitou roli při hodnocení účinku léčiv, a proto byly též využity v metodě PAMP. V případě časových grafů není možné zobrazit dohromady v jednom grafu kontrolu a léčivo přímo v SophiQ. V případě App Suite je tento problém již vyřešený. Pro PAMP se tak grafy kompletovali v OriginPro z tabulek z jednotlivých měření. Tohle byl jeden z hlavních požadavků pro metodu PAMP. Tento požadavek byl ale nakonec úspěšně realizován v nynější poslední aktualizaci SophiQ, viz níže.

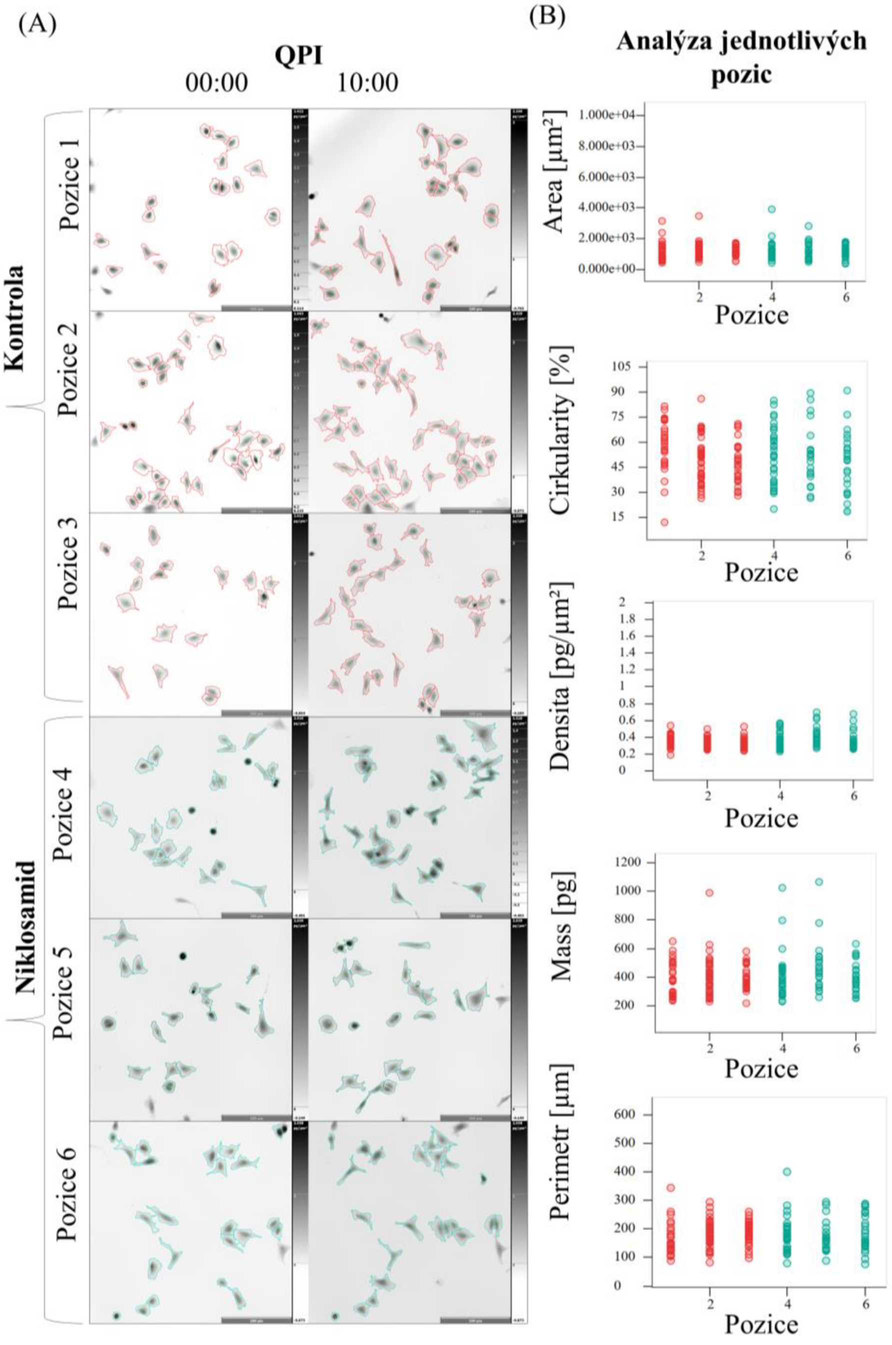
Hodnoty z časových grafů v tabulkách ze SophiQ jsou rozděleny do dvou sloupců, sloupec A ukazuje reálný čas a datum, sloupec B pak ukazuje buď průměrnou hodnotu všech buněk pro jednotlivý parametr (obr. 45 (a)) nebo pro jednotlivou buňku. Průměrné hodnoty z těchto naměřených hodnot buněk musí být vypočítány ručně. Naopak tomu je v případě App Suite, který v jednom dokumentu ukazuje hodnocení každé buňky a průměrné hodnoty. Dokonce tento dokument obsahuje jednotlivé grafy. Čas je zapsán podle nastaveného time-lapse měření, tedy podle délky měření a jednotlivých časových krocích.

Upraveno je nyní ukládání jednotlivých časových grafů. Dříve se pro metodu PAMP musel ukládat každý časový graf pro jednotlivý parametr zvlášť. Dnes se ukládají všechny najednou ve zvoleném formátu.

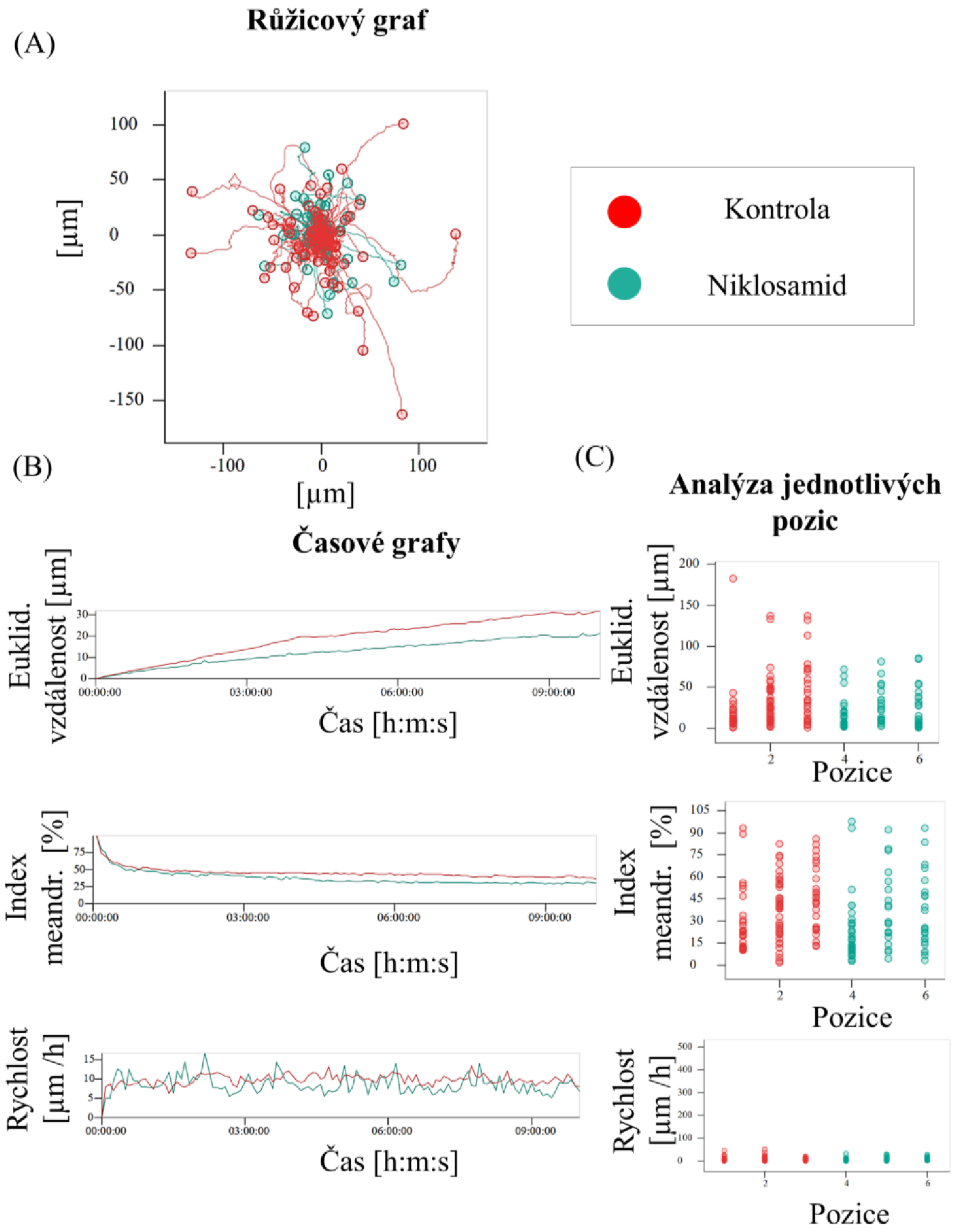
Velký pokrok nastal již ve zmíněné poslední aktualizaci SophiQ a jedná se o zavedení možnosti analyzovat celý dataset najednou a vyznačit v něm jednotlivé pozice léčiv a kontrol podle vyšetřovacího plata či komůrek. Dosud se každá pozice či kanálek v ibidi musel v datasetu analyzovat samostatně a postupně. Nyní se jedná o zjednodušením hodnocení metody PAMP a výrazné zkrácení doby analýzy. Toto zjednodušení analýzy je inspirováno právě programem App Suite pro HoloMonitor. Toto nastavení se zobrazí např. v časových grafech, ve kterých má každé léčivo a kontrola svoji vlastní barvu. Není již potřeba analyzovat každé léčivo nebo pozici zvlášť. V tabulkách jsou jednotlivé hodnoty každé skupiny odlišeny a stejně tak jsou barevně odlišeny buňky v QPI snímcích.

Toto nastavení analýzy pozic umožňuje hodnotit jednotlivé pozice v jednom vyšetřovacím kanálku mezi sebou, ale i léčiva mezi sebou. Např. na obr. 33 je provedeno

pilotní testování tohoto nastavení pozic. Jedná se o analýzu kontroly a niklosamidu v základní koncentraci (faktor 1). Červenou segmentací buněk jsou označeny tři QPI v kanálku kontroly a tři zelené v kanálku s niklosamidem (obr. 33 (a)). Hodnotilo se chování buněk během 10 hodin. Zobrazeny jsou rysové grafy (obr. 33 (b)) pro každou pozici (osa x) a parametry pro analýzu morfologických vlastností buněk (osa y). Výsledky těchto grafů ukazují, že buňky v niklosamidu měli vyšší cirkularitu a densitu než buňky v kontrole. Což značí, že buňky byly více zakulaceny a mohlo u nich posupně docházet k apoptóze. Analýza dynamických vlastností buněk ukázala, že trajektorie měli buňky kratší po účinku niklosamidu než v kontrole (obr. 34 (a)). Dále se buňky v niklosamidu více pohybovaly na místě (obr. 34 (c), nízký index meandru) s nižší rychlostí (obr. 34 (d). K tomto výsledků se dospělo i v původní ručním hodnocení popsaném v kapitole 5 této práce.



Obrázek č. 33: Ukázka analýzy buněk A549 a rozdělení pozic do dvou skupin (kontrola a niklosamid). A) Kvantitativní fázové zobrazení z mikroskopu Q-PHASE a segmentace buněk A549. Pro kontrolu jsou analyzovány tři pozice a pro NICL též. Objektiv 10x/0.3. Měřítko 200 µm. B) Ukázka výsledků jednotlivých pozic. Hodnoceny jsou morfologické parametry. Červeně je kontrola, zeleně niklosamid.



(D) **Tabulka s průměrnými hodnota v čase 10h**

Skupina	Počet buněk	Mass [pg]	Area [µm²]	Densita [pg/µm²]	Rychlost [µm/h]	Perimetr [µm]	Cirkular. [%]	Euklid. vzdálenost [µm]	Index meandrovitosti [%]
Niklosamid	74	424,86	1211,22	0,38	6,94	180,47	50,91	21,30	30,99
Kontrola	95	394,68	1231,85	0,34	8,19	177,40	51,58	31,92	37,71

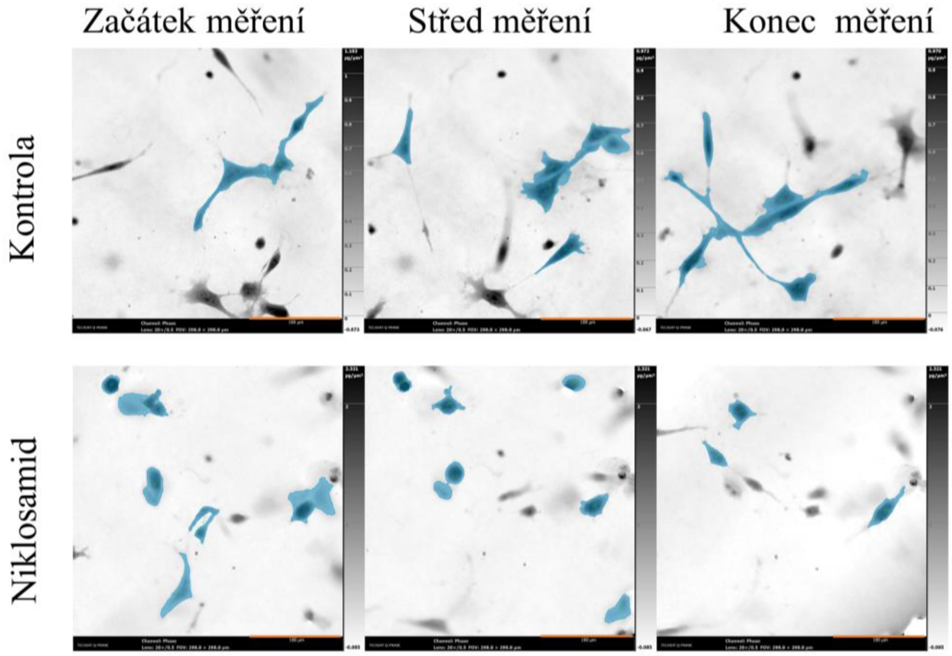
Obrázek č. 34: Ukázka analýzy dynamiky buněk a rozdělení pozic do dvou skupin (kontrola a niklosamid). A) Růžicový graf. Začátky jednotlivých trajektorií jsou posunuty do společného původu. Osy jsou uvedeny v µm. Pro kontrolu jsou analyzovány tři pozice a pro NICL též. Objektiv 10x/0.3. Měřítko 200 µm. B) Ukázka časových grafů jednotlivých pozic. Hodnoceny jsou dynamické parametry. C) Ukázka výsledků jednotlivých pozic. D) Tabulka pro jednotlivé parametry obou skupin. Červeně je kontrola, zeleně niklosamid.

Diskuze

V této dizertační práci je popsána vyvinutá metoda primární hodnocení migrastatického potenciálu (PAMP) *in vitro*. Jedná se o rychlý screening úvodního hodnocení domnělé potence migrastatik. Tato metoda byla navržena pro měření snížení rychlosti náhodné migrace buněk v podmínkách 2D po aplikaci vybraných léčiv a chemických látek. Kromě analýzy dynamických změn buněk slouží též k analýze růstu buněk.

Obrazy QPI umožňují spolehlivě identifikovat buňky a pomocí SophiQ jsou snímky segmentovány a analyzovány. Výhoda tohoto systému je využita pro zobrazení buněk A549 a HT1080 nejen ve 2D prostředí, ale i v kolagenovém matrixu (3D prostředí) pro ukázku améboidního a mezenchymálního pohybu buněk a tvaru buněk [164].

V kolagenovém matrixu nebyly snímány jen buňky HT1080 v kontrole, ale do média ke kolagenu byl přidán i niklosamid. Pomocí QPI jsou zobrazeny buňky HT1080 [41], jejichž tvar je více zakulacený než tvar buněk v kontrole (obr. 35).

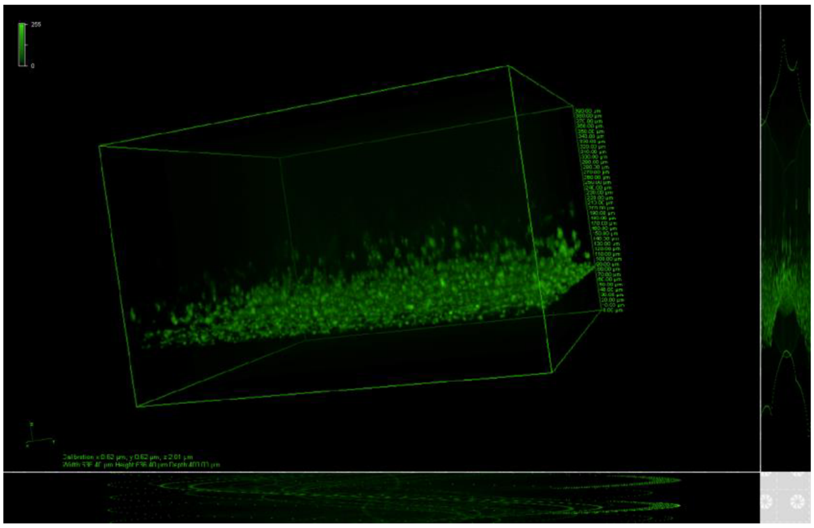


Obrázek č. 35: Ukázka morfologie buněk HT1080 v kolagenovém matrixu. Jedná se o ukázku QPI buněk v kontrole a po aplikaci niklosamidu. Objektiv 20x/0,4. Měřítko 100 µm.

Avšak měřit přesnou rychlost migrace a tvar buněk ve 3D prostředí pomocí QPI je komplikované. Klasické QPI snímky jsou pouze ve 2D verzi. Proto je výhodné použít

např. z-stacky jednotlivých buněk. To ale vyžaduje spoustu algoritmů pro poskládání výsledného obrazu a následné vyhodnocení. Což bohužel není nyní možné pomocí současného systému Q-PHASE.

Alternativou by mohly být z-stacky pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu (obr. 36). Postup metody spočívá v nasazení buněk do Petriho misky a po 24 hodinách se na ně aplikuje kolagen. Po 48 hodinách, kdy buňky mají tendenci migrovat směrem vzhůru do kolagenu, se jádra buněk nabarvila pomocí Syto 9 [165], aby se lépe identifikovaly pomocí LSCM. Podle pozic jader v z-stacku lze určit, kolik µm buňka migrovala v kolagenu. To lze aplikovat i s migrastatiky. Tento test je tak další metodou vhodnou pro zkoumání migrastatického potenciálu buněk.



Obrázek č. 36: Ukázka morfologie buněk HT1080 v tzv. antigravitačním kolagenovém matrixu. Jedná se o ukázku z-stacky z LSCM buněk v kontrole z pilotního testování. Objektiv 20x/0,4. Měřítko 100 µm.

Hlavním přínosem této práce je již zmíněná metoda PAMP. Ta využívá 2D prostředí buněk *in vitro* pro testování potenciálních migrastatik. Byly nejprve testovány doporučené koncentrace. Vzhledem k faktu, že některá léčiva v těchto koncentracích způsobila morfologické změny na nenádorových buňkách a následně i nádorových (jako např. midostaurin a niklosamid) se přistoupilo k testování nižších koncentrací. V případě, že účinek léčiv nebyl dostatečně silný k omezení rychlosti migrace buněk, se testovaly vyšší koncentrace tohoto léčiva.

Prvním krokem této metody bylo hodnocení růstu buněk a výskyt nežádoucích patologických jevů po aplikaci migrastatik. U migrastatik je nežádoucí, aby měla

podobný účinek jako cytostatika, tedy způsobovala apoptózy (jako je zobrazeno na obr. 19 – apoptóza je zde způsobena působením vinkristinu). Proto se musí brát zřetel na výskyt buněčné smrti či stresovou vakuolizaci buněk. Např. po aplikaci midostaurinu ve vyšší koncentraci se vyskytly apoptózy u nenádorových buněk, ale u nižších koncentrací nikoliv. Proto by mohl být midostaurin použit jako případné migrastatikum pouze v nižších dávkách (stejně tak v případě belumosudilu).

Z tabulek a grafů (nejen této zkrácené verze, ale i dlouhé verze) hodnotících cirkularitu buněk je zřejmé, že zvolené buněčné linie se od sebe morfologicky liší. Cirkularita nenádorových buněk NDHF se pohybovala přibližně od 14 do 34 %. Hodnoty cirkularity nádorových buněk A549 se pohybovaly v rozmezí 40–61 %. Podobně tomu bylo i v případě buněk HT1080, kdy se cirkularita buněk pohybovala od 26–do 52 %.

Z grafů 13 vyplývá, že midostaurin způsobil vyšší zakulacení nenádorových buněk NDHF v prvních 10 hodinách svého působení na buňky. Z čehož plyne, že toto léčivo má rychlejší nástup účinku. Průměrná hodnota cirkularity kontroly byla přibližně 20.2 %, zatímco u midostaurinu se jednalo o hodnotu okolo 25.1 %. Ostatní léčiva nezpůsobily výraznější navýšení cirkularity v porovnání s kontrolou. U nádorových buněk A549 byla zaznamenána vyšší cirkularita než v kontrole u 4-hydroxyacetofenonu, doxycyklinu a pimozidu, u buněk HT1080 pak po aplikaci niklosamidu. U obou nádorových linií se jednalo o navýšení v obou časových úsecích měření. V tabulkách 5, 6 a 7 jsou zaznamenány hodnoty, které měly buňky na začátku měření i na konci.

Graf 14 a tabulky pro hodnocení density [pg/μm^2] neodhalily významné změny. Jen u nádorových buněk A549 byla zaznamenána vyšší průměrná hodnota density než v kontrole po aplikaci pimozidu a u buněk HT1080 po aplikaci niklosamidu a též pimozidu.

Dalším parametrem hodnocení migrastatik byla analýza rychlosti motility buněk. Zaznamenávala se průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou, medián, procentní snížení či zvýšení oproti kontrole a signifikance. Významná jsou ta migrastatika, která sníží rychlost v jak v prvních, tak druhých 10 hodinách měření, a snížení je signifikantní. U buněk NDHF došlo k takovému snížení u belumosudilu a niklosamidu.

U nádorových buněk A549 snížila rychlost migrace signifikantně všechna migrastatika v základní koncentraci, kromě fasudilu. Dále pak midostaurin, niklosamid.

Signifikantní snížení rychlosti u buněk HT1080 nastalo po aplikaci doxycyklinu a niklosamidu v základních koncentracích.

Z kroků PAMP dále vyplývá, že midostaurin a belumosudil ve vyšších koncentracích nemohou být použity kvůli výskytu buněčné smrti u nenádorových buněk.

Invazivní fenotyp buněk byl testován jako třetí krok metody PAMP. Podle výsledků testování základních koncentrací nejlépe ovlivnil chování buněk A549 midostaurin a niklosamid. U buněk HT1080 pak pimozid a belumosudil.

Podle této tří krokové metody lze doporučit migrastatické kandidáty pro další testování, zejména klinické. Výsledky jednotlivých léčiv ukázaly, že nelze aplikovat na všechny druhy buněčných linií stejná léčiva. Účinky léčiv se liší podle toho, zda je léčivo inhibitorem améboidního nebo mezenchymálního typu migrace. V případě améboidních buněk A549 se doporučuje podle studie v této práci jako tzv. migrastatikum midorstaurin a niklosamid, oba v nižších koncentracích. Pro buňky mezenchymální HT1080 by mohly být vhodným kandidátem niklosamid a doxycyklin v základních koncentracích.

Testovaly se v této práci i kombinace migrastatik. Nejvýznamnější účinek na buňky A549 a HT1080 měla kombinace midostaurinu s belumosudilem a midostaurinu s fasudilem. Obě tyto kombinace dokázaly snížit rychlost pohybu buněk, zkrátit trajektorii pohybu buněk a nepodpořily růst buněk. To potvrzuje účinek midostaurinu na nádorové buňky. Tento lék se i podle dalších studií [166] doporučuje jako terapeutický prostředek pro léčbu malignity, zejména pokud lze vyvinout bezpečné a účinné synergické kombinace. Podle studie [167] se očekávají klinické studie u hematologických malignit založených na schopnosti midostaurinu cílit na různé onkogenní kinázy s dobrou snášenlivostí a kompatibilitou s řadou dalších terapeutických látek.

Snímky z LSCM ukazují výskyt a velikost fokálních adhezních kinází po aplikaci vybraných migrastatik. Zobrazily výskyt FAK v periferii buněk A549.

Z ukázek vyplývá, že po aplikaci MID 0,3 a NICL 0,3 je velký výskyt FAK na rozdíl od FAS 0,3. Lze se domnívat, že buňky byly vystavenu stresu po aplikaci MID 0,3 a NICL 0,3 a to i ve snížených koncentracích. Pro další testování FAK se doporučuje otestovat koncentraci s faktorem 0,1.

Předposlední části této práce se věnovala srovnání dvou holografických mikroskopů (Q-PHASE a HoloMonitor). Zásadní rozdíl mezi oběma mikroskopy je ve výběru zdroje světla.

Výhody Q-PHASE jsou, že poskytuje lepší/kvalitnější obraz QPI, tedy bez koherentního šumu a halo efektu, více parametrů pro přesnější nastavení segmentace a má k dispozici více objektivů k dispozici. Dalším bonusem je to, že mikroskop je multimodální (simulovaný DIC, QPI, amplituda, filtr s horní propustí, fluorescence). Vzorky není potřeba barvit a nejsou vystaveny velké fototoxicitě. Mikroskop umožňuje snímání více zorných polí v jednom experimentu, ale HoloMonitor za stejný čas stihl nasnímat přibližně 6x více zorných polí (za 20 hodin v 5minutovém intervalu jen 30-40 pozic- Holomonitor kolem 200 pozic). Další výhodou je možnost naměřená data analyzovat ve stejném programu pro obsluhu mikroskopu.

Nevýhodou Q-PHASE mikroskopu je, že není v inkubátoru napájeném CO_2. Je k dispozici Tokai Hit jako přídatné zařízení, které ale může snížit výsledný signál a kvalitu obrazu. Dále je nevýhodná delší doba potřebná pro naladění Köhlerova osvětlení a správného zobrazení všech zorných polí vzorků (cca 1 hodina potřebná pro naladění 30 pozic na vzorku). Též mikroskop neumožňuje zobrazit buňky např. v 96 well plate, ani přes speciální víko. Vyžaduje použití pouze tenké vzorky bez vzduchového prostoru.

Další nevýhodou tohoto mikroskopu a SophiQ jsou grafy, které generuje, jak je popsáno v kapitole 8. Ale v rámci spolupráce s firmou Telight se podařila řada nevýhod SophiQ vyřešit.

Mikroskop Q-PHASE má své výhody i nevýhody. Velkou výhodou je QPI bez nutnosti barvení vzorku a bez koherentního šumu. A toho je plně využito pro metody hodnocení chování nádorových buněk a vytváření biofyzikálních intepretací.

Jeho nevýhodou je software SophiQ, ve kterém analýza jednotlivých snímů QPI není ještě dostačující. Ale jeho vývoj stále pokračuje.

Díky QPI se podařilo vyvinout metodu PAMP a určit midostaurin jako potenciální migrastatikum.

Závěr

Ve své dizertační práci se zabývám biomedicinským využitím pokročilých QPI metod obrazové analýzy umožněné systémem Q-PHASE mikroskopu. Pomocí této techniky jsem vyvinula metodu (PAMP) pro hodnocení chování živých buněk. Primární hodnocení migrastatického potenciálu (PAMP) je založeno na výběru vhodných nádorových buněčných linií pro vice-poziční časosběrné QPI snímání a sledování antimigračního účinku testovaných léčiv. Takový přístup byl umožněn využitím kvality QPI mikroskopu Q-PHASE pro přesné neinvazivní zobrazování buněk a měření jejich suché hmoty.

Zkoumala jsem látky tzv. migrastatika, která slouží jako léčiva ovlivňují migraci a chování buněk, protože maligní šíření začíná invazí do nádorového okolí a pokračuje tvorbou vzdálených metastáz, které jsou velmi nebezpečné pro pacienty a jsou velkým problémem v léčbě nádorů. V důsledku toho byla v této práci vytipována a zkoumána léčiva (4-hydroxyacetophenon, belumosudil, doxycyklin, fasudil, midostaurin, niklosamid a pimozid), která by mohla omezit migraci nádorových buněk z primárního ložiska a tím snížit riziko metastáz. Vybraná léčiva byla zkoumána pomocí PAMP v koncentraci odpovídající terapeutické plazmatické koncentraci při podávání léků a doplněna o další dvě snížené a jednu vyšší koncentraci.

Na základě výsledků tohoto pilotního experimentu navrhuji midostaurin jako potenciální migrastatikum pro další preklinické ověření. Ukázalo se, že QPI je spolehlivá a ekonomická mikroskopická technologie pro in vitro zkoumání dynamiky migračního chování buněk indukovaného potenciálními migrastatiky.

Dalším tématem této práce je zkoumání fokálních adhezí a imunocytochemie pomocí biomarkerů FAK a 4.1B. Cílem je zkoumat, zda migrastatika ovlivňují výskyt fokálních adhezí v buňkách. Tímto testováním lze doplnit metodu PAMP, pomocí níž se získají informace o morfologii a dynamice konkrétních buněk, které jsou následně imunocytochemicky ošetřeny a zobrazeny pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu (LSCM, Nikon). Na snímcích z LSCM buněk A549 byly fokální adheze nalezeny po účinku midostaurinu a niklosamidu ve snížených koncentracích.

Metoda PAMP byla následně ověřena i na dalším holografickém mikroskopu. Jednalo se tak o srovnání mikroskopu Q-PHASE [3] (nekoherentní světelný zdroj) a HoloMonitoru [161] (koherentní světelný zdroj). Pomocí testování vyšetřovací metody

PAMP na tomto mikroskopu lze říci, že obraz je zatížen šumem, ale pro analýzu buněk bylo k dispozici více parametrů a jejich hodnocení bylo snadnější na rozdíl od Q-PHASE.

V poslední kapitola popisuje návrhy na zlepšení analýzy buněk v softwaru SophiQ. Většina mnou navrhovaných změn byla ve spolupráci s firmou Telight realizována, a nadále zlepšují a zjednodušují práci spojenou s hodnocením chování buněk. Zejména ukládání a zobrazení grafů a hodnocení kompletního jednoho měření s více zornými poli najednou.

Výsledky práce byly publikovány v publikaci [1] a na mezinárodních konferencích [4, 35, 41, 148]. Další výstupy a projekty jsou zapsány v příloze této práce v sekci autorské výstupy.

Seznam použitých zkratek a symbolů

V textu jsou použity následující zkratky:

4HAP	4 – hydroxyacetofenon
BEL	Belumosudil
CCHM	Z angl. Coherence-Controlled Holographic Microscope; Koherencí řízený holografický mikroskop
CNT	Z angl. Control; Kontrolní vzorek
DHM	Z angl. Digital Holographic Microscopy; Digitální holografická mikroskopie
DIC	Diferenciální interferenční contrast
DOXY	Doxycyklin
ECM	Extracelulární matrix
FAK	Fokální adhezní kináze
FAS	Fasudil
FFT	Rychlá Fourierova transformace
LSCM	Z angl. Laser Scanning Confocal Microscope; Laserový skenovací konfokální mikroskop
MID	Midostaurin
NDHF	Z angl. Normal Dermal Human Fibroblast; Normální dermální lidské fibroblasty
NICL	Niklosamid
PAMP	Z angl. Primary Assessment of Medicines for Expected Migrastatic Potential; Primární hodnocení léčiv pro migrastatický potenciál
PIM	Pimozid
QPI	Z angl. Quantitative Phase Imaging; Kvantitativní fázové zobrazení
WCG	Z angl. Weighted Center of Gravity; těžiště

d_b	Tloušťka buňky
f_c	Prostorová frekvence interferenčních proužků
f_g	Prostorová frekvence drážek difrakční mřížky
H	Výška pixelu
m_{OL}	Zvětšení výstupních čoček
N	Počet pixelů v oblasti buňky
n_b	Index lomu buňky
n_m	Index lomu média
o	Objektová vlna

r	Referenční vlna
S	Kalibrovaná velikost oblasti zobrazené jedním pixelem (u HoloMonitoru)
V	Optický objem [μm^3]
w	Šířka pixelu

V textu jsou použity následující symboly:

γ	Specifický přírůstek indexu lomu
$\boldsymbol{\lambda}$	Vlnová délka [nm] , λ = 660 nm pro Q-PHASE
$\boldsymbol{\mu_\varphi}$	Průměrná fáze [rad]
$\boldsymbol{\varphi_b}$	Fázový posuv indukovaný buňkou [rad]
$\boldsymbol{\varphi_i}$	Hodnota fáze v *i* pixelu patřícího do oblasti buňky
$\boldsymbol{\varphi_{sum}}$	Součet fázového posuvu
$\boldsymbol{\varphi_{total}}$	Celkový fázový posuv
$\boldsymbol{\tau}$	Relativním časovém zpoždění objektů rozptýlených a referenčních polí

Reference

1. ŠURÁŇOVÁ, Markéta, Miroslav ĎURIŠ, Irena ŠTENGLOVÁ NETÍKOVÁ, Jan BRÁBEK, Tomáš HORÁK, Veronika JŮZOVÁ, Radim CHMELÍK a Pavel VESELÝ. Primary assessment of medicines for expected migrastatic potential with holographic incoherent quantitative phase imaging. *Biomedical Optics Express* [online]. 2023, **14**(6) [cit. 2023-04-01]. ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.488630
2. 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 [cit. 2023-04-28]. ISSN 24058033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2019.10.011
3. 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) [cit. 2023-04-20]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.21.014747
4. ŠURÁŇOVÁ, Markéta. The methodology of correlative microscopy between holographic incoherent quantitative phase imaging (Q-Phase) and laser scanning confocal microscopy (NIKON). Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2021.
5. CUCHE, Etienne, Frédéric BEVILACQUA a Christian DEPEURSINGE. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics Letters* [online]. 1999, **24**(5) [cit. 2023-04-18]. ISSN 0146-9592. Dostupné z: doi:10.1364/OL.24.000291
6. PARK, YongKeun, Christian DEPEURSINGE a Gabriel POPESCU. Quantitative phase imaging in biomedicine. *Nature Photonics* [online]. 2018, **12**(10), 578-589 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1749-4885. Dostupné z: doi:10.1038/s41566-018-0253-x
7. KEMMLER, Manuel. Noninvasive time-dependent cytometry monitoring by digital holography. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2007, 2007-11-01, **12**(6) [cit. 2023-04-08]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.2804926
8. BON, Pierre, Guillaume MAUCORT, Benoit WATTELLIER a Serge MONNERET. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells. *Optics Express* [online]. 2009, **17**(15) [cit. 2023-04-08]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.17.013080
9. KIM, Myung K. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy* [online]. [cit. 2023-04-18]. ISSN 1947-7988. Dostupné z: doi:10.1117/6.0000006
10. CHEN, Claire Lifan, Ata MAHJOUBFAR, Li-Chia TAI, Ian K. BLABY, Allen HUANG, Kayvan Reza NIAZI a Bahram JALALI. Deep Learning in Label-free Cell Classification. *Scientific Reports* [online]. 2016, 2016-03-29, **6**(1) [cit. 2023-04-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep21471
11. LOŠŤÁK, Martin, Radim CHMELÍK, Michala SLABÁ a Tomáš SLABÝ. Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Optics Express* [online]. 2014, **22**(4) [cit. 2023-04-28]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.22.004180
12. KANG, Sungsam, Seungwon JEONG, Wonjun CHOI, et al. Imaging deep within a scattering medium using collective accumulation of single-scattered waves. *Nature Photonics* [online]. 2015, **9**(4), 253-258 [cit. 2023-08-29]. ISSN 1749-4885. Dostupné z: doi:10.1038/nphoton.2015.24
13. STRBKOVA, Lenka, Daniel ZICHA, Pavel VESELY a Radim CHMELIK. Automated classification of cell morphology by coherence-controlled holographic microscopy. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2017, 2017-8-1, **22**(08) [cit. 2023-04-20]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.22.8.086008
14. O'SULLIVAN, Thomas D., Albert E. CERUSSI, David J. CUCCIA a Bruce J. TROMBERG. Diffuse optical imaging using spatially and temporally modulated light. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2012, 2012-07-01, **17**(7) [cit. 2023-04-20]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.17.7.071311
15. VELLEKOOP, I. M. a A. P. MOSK. Focusing coherent light through opaque strongly scattering media. *Optics Letters* [online]. 2007, **32**(16) [cit. 2023-05-05]. ISSN 0146-9592. Dostupné z: doi:10.1364/OL.32.002309

16. ĎURIŠ, Miroslav, Petr BOUCHAL a Radim CHMELÍK. Single-shot super-resolution quantitative phase imaging allowed by coherence gate shaping. *APL Photonics* [online]. 2023, 2023-04-01, **8**(4) [cit. 2023-07-20]. ISSN 2378-0967. Dostupné z: doi:10.1063/5.0127950

17. ĎURIŠ, Miroslav a Radim CHMELÍK. Coherence gate manipulation for enhanced imaging through scattering media by non-ballistic light in partially coherent interferometric systems. *Optics Letters* [online]. 2021, **46**(18) [cit. 2023-07-20]. ISSN 0146-9592. Dostupné z: doi:10.1364/OL.432484

18. IZATT, Joseph A., Eric A. SWANSON, James G. FUJIMOTO, Michael R. HEE a Gabrielle M. OWEN. Optical coherence microscopy in scattering media. *Optics Letters* [online]. 1994, **19**(8) [cit. 2023-06-02]. ISSN 0146-9592. Dostupné z: doi:10.1364/OL.19.000590

19. LEITH, E. N. a J. UPATNIEKS. Holography with Achromatic-Fringe Systems*. *Journal of the Optical Society of America* [online]. 1967, **57**(8) [cit. 2023-06-21]. ISSN 0030-3941. Dostupné z: doi:10.1364/JOSA.57.000975

20. ZICHA, Daniel a Graham A. DUNN. An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *Journal of Microscopy* [online]. 1995, **179**(1), 11-21 [cit. 2023-06-02]. ISSN 00222720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.1995.tb03609.x

21. KIM, Taewoo, Renjie ZHOU, Lynford L. GODDARD a Gabriel POPESCU. White-light Diffraction Tomography (WDT) of Live Cells. In: *Biomedical Optics 2014* [online]. Washington, D.C: OSA, 2014, BM4B.6- [cit. 2023-06-02]. ISBN 978-1-55752-997-8. Dostupné z: doi:10.1364/BIOMED.2014.BM4B.6

22. KRIZOVA, Aneta, Jana COLLAKOVA, Zbynek DOSTAL, Lukas KVASNICA, Hana UHLIROVA, Tomas ZIKMUND, Pavel VESELY a Radim CHMELIK. Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2015, 2015-11-01, **20**(11) [cit. 2023-06-20]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.20.11.111214

23. GÁL, Břetislav, Miroslav VESELÝ, Jana ČOLLÁKOVÁ, Marta NEKULOVÁ, Veronika JŮZOVÁ, Radim CHMELÍK, Pavel VESELÝ a Thomas ABRAHAM. Distinctive behaviour of live biopsy-derived carcinoma cells unveiled using coherence-controlled holographic microscopy. *PLOS ONE* [online]. 2017, 2017-8-28, **12**(8) [cit. 2023-06-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0183399

24. VICAR, Tomas, Jan BALVAN, Josef JAROS, Florian JUG, Radim KOLAR, Michal MASARIK a Jaromir GUMULEC. Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: review and comprehensive comparison. *BMC Bioinformatics* [online]. 2019, **20**(1) [cit. 2023-06-20]. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-019-2880-8

25. VICAR, Tomas, Jiri CHMELIK, Jiri NAVRATIL, et al. Cancer cell viscoelasticity measurement by quantitative phase and flow stress induction. *Biophysical Journal* [online]. 2022, **121**(9), 1632-1642 [cit. 2023-06-25]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2022.04.002

26. RAUDENSKÁ, Martina, Jan BALVAN a Michal MASAŘÍK. Cell death in head and neck cancer pathogenesis and treatment. *Cell Death & Disease* [online]. 2021, **12**(2) [cit. 2023-06-25]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-021-03474-5

27. STRBKOVA, Lenka, Brittany B. CARSON, Theresa VINCENT, Pavel VESELY a Radim CHMELIK. Automated interpretation of time-lapse quantitative phase image by machine learning to study cellular dynamics during epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2020, 2020-8-1, **25**(08) [cit. 2023-05-10]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.25.8.086502

28. KOLMAN, Pavel a Radim CHMELÍK. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express* [online]. 2010, **18**(21) [cit. 2023-05-22]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.18.021990

29. BERGERS, Gabriele a Sarah-Maria FENDT. The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2021, **21**(3), 162-180 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/s41568-020-00320-2

30. XU, Y., X. DENG, Y. SUN, X. WANG, Y. XIAO, Y. LI, Q. CHEN a L. JIANG. Optical Imaging in the Diagnosis of OPMDs Malignant Transformation. *Journal of Dental Research* [online].

2022, **101**(7), 749-758 [cit. 2023-06-04]. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/00220345211072477

31. ROGERS, Jeremy D., Andrew J. RADOSEVICH, JI YI a Vadim BACKMAN. Modeling Light Scattering in Tissue as Continuous Random Media Using a Versatile Refractive Index Correlation Function. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* [online]. 2014, **20**(2), 173-186 [cit. 2023-06-14]. ISSN 1077-260X. Dostupné z: doi:10.1109/JSTQE.2013.2280999

32. GILSON, Pauline, Jean-Louis MERLIN a Alexandre HARLÉ. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. *Cancers* [online]. 2022, **14**(6) [cit. 2023-06-21]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14061384

33. BARER, R. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature* [online]. 1952, **169**(4296), 366-367 [cit. 2023-06-21]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/169366b0

34. TOLDE, Ondřej, Aneta GANDALOVIČOVÁ, Aneta KŘÍŽOVÁ, Pavel VESELÝ, Radim CHMELÍK, Daniel ROSEL a Jan BRÁBEK. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2023-06-06]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30408-7

35. VICAR, Tomas, Jiri CHMELIK, Roman JAKUBICEK, Larisa CHMELIKOVA, Jaromir GUMULEC, Jan BALVAN, Ivo PROVAZNIK a Radim KOLAR. Self-supervised pretraining for transferable quantitative phase image cell segmentation. *Biomedical Optics Express* [online]. 2021, **12**(10) [cit. 2023-06-15]. ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.433212

36. KOLLAROVA, Vera, Jana COLLAKOVA, Zbynek DOSTAL, Pavel VESELY a Radim CHMELIK. Quantitative phase imaging through scattering media by means of coherence-controlled holographic microscope. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2015, 2015-11-01, **20**(11) [cit. 2023-06-22]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.20.11.111206

37. LANG, Paul, Karen YEOW, Anthony NICHOLS a Alexander SCHEER. Cellular imaging in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2006, **5**(4), 343-356 [cit. 2023-06-20]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2008

38. ŠURÁŇOVÁ, Markéta, Magdaléna ZÁBRANSKÁ, Veronika KOLÍNKOVÁ, Nikola MUCHOVÁ, Veronika JŮZOVÁ, Radim CHMELÍK, a Pavel VESELÝ. Advanced Microscopical Non-Invasive Examination of the Supposed Migrastatics for Impact on In Vitro Cell Migration. 5th European Conference of Oncology Pharmacy, Hamburg, 2022.

39. COSTA, Marcos R., Felipe ORTEGA, Monika S. BRILL, Ruth BECKERVORDERSANDFORTH, Ciro PETRONE, Timm SCHROEDER, Magdalena GÖTZ a Benedikt BERNINGER. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* [online]. 2011, 2011-03-15, **138**(6), 1057-1068 [cit. 2023-07-20]. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.061663

40. 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) [cit. 2023-07-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58474-w

41. COLLAKOVA, Jana, Aneta KRIZOVA, Vera KOLLAROVA, Zbynek DOSTAL, Michala SLABA, Pavel VESELY a Radim CHMELIK. Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2015, 2015-11-01, **20**(11) [cit. 2023-07-10]. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.20.11.111213

42. DAVIES, H. G. a M. H. F. WILKINS. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature* [online]. 1952, **169**(4300), 541-541 [cit. 2023-07-10]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/169541a0

43. DUBOIS, Frank, Luc JOANNES a Jean-Claude LEGROS. Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. *Applied Optics* [online]. 1999, **38**(34) [cit. 2023-07-10]. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/AO.38.007085

44. ŠURÁŇOVÁ, Markéta. Methodology of Microscopical Assessment of Tumour Cells Behaviour in 2D or 3D in vitro Environment with Coherence - Controlled Holographic Microscope. Imaging

principles of life, book of abstracts, Hustopece. Czech-BioImaging Annual Scientific Conference: Czech-Bioimaging, 2022. p. 43-44.

45. DOUGHERTY, Geoff. *Digital image processing for medical applications*. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-86085-7.

46. TELIGHT: Manuál-Telight Q-PHASE. [cit. 2023-07-10]. Dostupný na: https://telight.eu/products/telight-q-phase/ [Online]

47. BARNES, Richard, Clarence LEHMAN a David MULLA. Priority-flood: An optimal depression-filling and watershed-labeling algorithm for digital elevation models. *Computers & Geosciences* [online]. 2014, **62**, 117-127 [cit. 2023-08-29]. ISSN 00983004. Dostupné z: doi:10.1016/j.cageo.2013.04.024

48. CHMELIK, Radim, Michala SLABA, Vera KOLLAROVA, Tomas SLABY, Martin LOSTAK, Jana COLLAKOVA a Zbynek DOSTAL. *The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy* [online]. In: . Elsevier, 2014, s. 267-335 [cit. 2023-07-10]. Progress in Optics. ISBN 9780444633798. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63379-8.00005-2

49. ZETIE, K P, S F ADAMS a R M TOCKNELL. How does a Mach-Zehnder interferometer work? *Physics Education* [online]. 2000, 2000-01-01, **35**(1), 46-48 [cit. 2023-07-12. ISSN 0031-9120. Dostupné z: doi:10.1088/0031-9120/35/1/308

50. CHMELIK, Radim, Zdenek HARNA, Irving J. BIGIO, Herbert SCHNECKENBURGER, Jan SLAVIK, Katarina SVANBERG a Pierre M. VIALLET. [online]. In: . s. 101-109 [cit. 2023-07-12]. Dostupné z: doi:10.1117/12.336823

51. BALVAN, Jan, Aneta KRIZOVA, Jaromir GUMULEC, et al. Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLOS ONE* [online]. 2015, 2015-3-24, **10**(3) [cit. 2023-07-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0121674

52. VAFA, Ali P., Parisa KARIMI a Amin KHAVASI. Analog optical edge detection by spatial high-pass filtering using lithography-free structures. *Optics Communications* [online]. 2021, **495** [cit. 2023-07-14]. ISSN 00304018. Dostupné z: doi:10.1016/j.optcom.2021.127084

53. KOPARAL, A. Tansu a Melih ZEYTINOGLU. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology* [online]. 2003, **43**(1-3), 149-154 [cit. 2023-07-14]. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1023/B:CYTO.0000039917.60348.45

54. BAHRAMI, Armita a Andrew L. FOLPE. Adult-type Fibrosarcoma: A Reevaluation of 163 Putative Cases Diagnosed at a Single Institution Over a 48-year Period. *American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2010, **34**(10), 1504-1513 [cit. 2023-07-14]. ISSN 0147-5185. Dostupné z: doi:10.1097/PAS.0b013e3181ef70b6

55. HAYASHI, Daichi, Toshiharu SHIRAI, Ryu TERAUCHI, et al. Pristimerin inhibits the proliferation of HT1080 fibrosarcoma cells by inducing apoptosis. *Oncology Letters* [online]. 2020, 2020-02-17 [cit. 2023-07-18]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.11405

56. HARATI, KAMRAN, PAWEL SLODNIK, ANSGAR MICHAEL CHROMIK, et al. Pro-apoptotic effects of pycnogenol on HT1080 human fibrosarcoma cells. *International Journal of Oncology* [online]. 2015, 2015-4-27, **46**(4), 1629-1636 [cit. 2023-07-18]. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2015.2854

57. KISIEL, Marta A. a Agnes S. KLAR. Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. In: BÖTTCHER-HABERZETH, Sophie a Thomas BIEDERMANN, ed. *Skin Tissue Engineering* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019, s. 71-78 [cit. 2023-07-18]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9472-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9473-1_6

58. FARES, Jawad, Mohamad Y. FARES, Hussein H. KHACHFE, Hamza A. SALHAB a Youssef FARES. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2020, **5**(1) [cit. 2023-07-18]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-0134-x

59. SLEEMAN, Jonathan a Patricia S. STEEG. Cancer metastasis as a therapeutic target. *European Journal of Cancer* [online]. 2010, **46**(7), 1177-1180 [cit. 2023-07-19]. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2010.02.039

60. GANDALOVIČOVÁ, Aneta, Daniel ROSEL, Michael FERNANDES, et al. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer* [online]. 2017, **3**(6), 391-406 [cit. 2023-07-19]. ISSN 24058033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2017.04.008

61. FARES, Jawad, Deepak KANOJIA, Aida RASHIDI, Ilya ULASOV a Maciej S. LESNIAK. Landscape of combination therapy trials in breast cancer brain metastasis. *International Journal of Cancer* [online]. 2020, **147**(7), 1939-1952 [cit. 2023-07-19]. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.32937

62. SOLOMON, Jonathan, Magdalena RAŠKOVA, Daniel RÖSEL, Jan BRÁBEK a Hava GIL-HENN. Are We Ready for Migrastatics? *Cells* [online]. 2021, **10**(8) [cit. 2023-07-20]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10081845

63. RAUDENSKÁ, Martina, Kateřina PETRLÁKOVÁ, Tamara JURIŇÁKOVÁ, et al. Engine shutdown: migrastatic strategies and prevention of metastases. *Trends in Cancer* [online]. 2023, **9**(4), 293-308 [cit. 2023-07-20]. ISSN 24058033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2023.01.001

64. FERNANDES, M., D. ROSEL a J. BRÁBEK. Translation in solid cancer: are size-based response criteria an anachronism? *Clinical and Translational Oncology* [online]. 2015, **17**(1), 1-10 [cit. 2023-07-20]. ISSN 1699-048X. Dostupné z: doi:10.1007/s12094-014-1207-5

65. BRYAN, Darren S., Melinda STACK, Katarzyna KRYSZTOFIAK, et al. 4-Hydroxyacetophenone modulates the actomyosin cytoskeleton to reduce metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2020, 2020-09-08, **117**(36), 22423-22429 [cit. 2023-07-21]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2014639117

66. BLAIR, Hannah A. Belumosudil: First Approval. *Drugs* [online]. 2021, **81**(14), 1677-1682 [cit. 2023-07-22]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-021-01593-z

67. ALI, Faraat a Anam ILYAS. Belumosudil with ROCK-2 inhibition: chemical and therapeutic development to FDA approval for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Current Research in Translational Medicine* [online]. 2022, **70**(3) [cit. 2023-07-22]. ISSN 24523186. Dostupné z: doi:10.1016/j.retram.2022.103343

68. GRAZIANI, Vittoria, Irene RODRIGUEZ-HERNANDEZ, Oscar MAIQUES a Victoria SANZ-MORENO. The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme. *Trends in Cell Biology* [online]. 2022, **32**(3), 228-242 [cit. 2023-07-22]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2021.10.004

69. HOLMES, Natasha E. a Patrick G.P. CHARLES. Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics* [online]. 2009, **1** [cit. 2023-07-22]. ISSN 1179-1713. Dostupné z: doi:10.4137/CMT.S2035

70. KUNDU, Chanakya Nath, Sarita DAS, Anmada NAYAK, Shakti Ranjan SATAPATHY, Dipon DAS a Sumit SIDDHARTH. Anti-malarials are anti-cancers and vice versa – One arrow two sparrows. *Acta Tropica* [online]. 2015, **149**, 113-127 [cit. 2023-07-22]. ISSN 0001706X. Dostupné z: doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.028

71. KOCH, Jan C., Josua KUTTLER, Fabian MAASS, Teresa LENGENFELD, Eirini ZIELKE, Mathias BÄHR a Paul LINGOR. Compassionate Use of the ROCK Inhibitor Fasudil in Three Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neurology* [online]. 2020, 2020-3-13, **11** [cit. 2023-07-22]. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2020.00173

72. HUANG, Yue-yue, Jian-ming WU, Tong SU, Song-yue ZHANG a Xiao-ji LIN. Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, Exerts Cardioprotective Function in Animal Models of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: A Meta-Analysis and Review of Preclinical Evidence and Possible Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2018, 2018-10-1, **9** [cit. 2023-07-22]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01083

73. STONE, Richard M., Sumithra J. MANDREKAR, Ben L. SANFORD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine* [online]. 2017, 2017-08-03, **377**(5), 454-464 [cit. 2023-07-22]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa161435

74. ABBAS, Hussein A., Mansour ALFAYEZ, Tapan KADIA, Farhad RAVANDI-KASHANI a Naval DAVER. Midostaurin In Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review And Patient Selection. *Cancer Management and Research* [online]. 2019, **11**, 8817-8828 [cit. 2023-07-22]. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S177894

75. CHEN, Wei, Robert A. MOOK, Richard T. PREMONT a Jiangbo WANG. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cellular Signalling* [online]. 2018, **41**, 89-96 [cit. 2023-07-23]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2017.04.001

76. PEARSON, RICHARD D. Niclosamide Therapy for Tapeworm Infections. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1985, 1985-04-01, **102**(4) [cit. 2023-07-23]. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-102-4-550

77. SATOH, Kei, Lisa ZHANG, Yaqin ZHANG, et al. Identification of Niclosamide as a Novel Anticancer Agent for Adrenocortical Carcinoma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2016, 2016-07-15, **22**(14), 3458-3466 [cit. 2023-07-23]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2256

78. LU, Wenyan, Cuihong LIN, Michael J. ROBERTS, William R. WAUD, Gary A. PIAZZA, Yonghe LI a Lin MEI. Niclosamide Suppresses Cancer Cell Growth By Inducing Wnt Co-Receptor LRP6 Degradation and Inhibiting the Wnt/β-Catenin Pathway. *PLoS ONE* [online]. 2011, 2011-12-16, **6**(12) [cit. 2023-07-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0029290

79. KARAKAS, Didem, Buse CEVATEMRE, Nazlihan AZTOPAL, Ferda ARI, Veysel Turan YILMAZ a Engin ULUKAYA. Addition of niclosamide to palladium(II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **23**(17), 5580-5586 [cit. 2023-07-26]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2015.07.026

80. 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, 2020-03-04, **40**(3), 1405-1417 [cit. 2023-07-26]. ISSN 0250-7005. Dostupné z: doi:10.21873/anticanres.14082

81. LIU, Junjun, Hanzhi DING, Hong QUAN a Jing HAN. Anthelminthic niclosamide inhibits tumor growth and invasion in cisplatin-resistant human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Oncology Letters* [online]. 2021, 2021-07-14, **22**(3) [cit. 2023-07-26]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2021.12927

82. YEH, Liang-Tsai, Chiao-Wen LIN, Ko-Hsiu LU, Yi-Hsien HSIEH, Chao-Bin YEH, Shun-Fa YANG a Jia-Sin YANG. Niclosamide Suppresses Migration and Invasion of Human Osteosarcoma Cells by Repressing TGFBI Expression via the ERK Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(1) [cit. 2023-07-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010484

83. MCLEOD, Donald C., Carol L. COLVIN a Roberta M. TANKANOW. Pimozide: Use in Tourette's Syndrome. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy* [online]. 1985, **19**(6), 421-424 [cit. 2023-07-26]. ISSN 0012-6578. Dostupné z: doi:10.1177/106002808501900602

84. DAKIR, EL-Habib, Adam PICKARD, Kirtiman SRIVASTAVA, et al. The anti-psychotic drug pimozide is a novel chemotherapeutic for breast cancer. *Oncotarget* [online]. 2018, 2018-10-09, **9**(79), 34889-34910 [cit. 2023-07-26]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.26175

85. HECHT, Inbal, Yasmin BAR-EL, Frederic BALMER, Sari NATAN, Ilan TSARFATY, Frank SCHWEITZER a Eshel BEN-JACOB. Tumor Invasion Optimization by Mesenchymal-Amoeboid Heterogeneity. *Scientific Reports* [online]. 2015, 2015-09-01, **5**(1) [cit. 2023-07-26]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep10622

86. TALKENBERGER, Katrin, Elisabetta Ada CAVALCANTI-ADAM, Anja VOSS-BÖHME a Andreas DEUTSCH. Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2023-07-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-09300-3

87. QIN, Yuan, Qiang ZHANG, Shan LEE, et al. Doxycycline reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses the proliferation and metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget* [online].

2015, 2015-12-01, **6**(38), 40667-40679 [cit. 2023-07-28]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.5842

88. GARITANO-TROJAOLA, Andoni, Ana SANCHO, Ralph GÖTZ, et al. Actin cytoskeleton deregulation confers midostaurin resistance in FLT3-mutant acute myeloid leukemia. *Communications Biology* [online]. 2021, **4**(1) [cit. 2023-07-28]. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-021-02215-w

89. HUANG, Shenglan, Dan LI, LingLing ZHUANG, Liying SUN a Jianbing WU. Identification of Arp2/3 Complex Subunits as Prognostic Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2021, 2021-7-9, **8** [cit. 2023-07-28]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2021.690151

90. WU, Junyu, Yang LONG, Man LI a Qin HE. Emerging nanomedicine-based therapeutics for hematogenous metastatic cascade inhibition: Interfering with the crosstalk between “seed and soil.” *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2021, **11**(8), 2286-2305 [cit. 2023-07-29]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2020.11.024

91. SERENO, Marta, Mafalda VIDEIRA, Imola WILHELM, István A. KRIZBAI a Maria Alexandra BRITO. MiRNAs in Health and Disease: A Focus on the Breast Cancer Metastatic Cascade towards the Brain. *Cells* [online]. 2020, **9**(8) [cit. 2023-07-29]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9081790

92. BARNHOORN, M C, S K HAKUNO, R S BRUCKNER, G ROGLER, L J A C HAWINKELS a M SCHARL. Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* [online]. 2020, 2020-07-30, **14**(7), 995-1009 [cit. 2023-07-29]. ISSN 1873-9946. Dostupné z: doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa009

93. DÍAZ-FLORES, Lucio, Ricardo GUTIÉRREZ, Miriam GONZÁLEZ-GÓMEZ, Maria Pino GARCÍA, Lucio DÍAZ-FLORES, José Luís CARRASCO a Pablo MARTÍN-VASALLO. CD34+ Stromal Cells/Telocytes as a Source of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(7) [cit. 2023-07-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073686

94. VAN PUYENBROECK, Victor a Kurt VERMEIRE. Inhibitors of protein translocation across membranes of the secretory pathway: novel antimicrobial and anticancer agents. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, **75**(9), 1541-1558 [cit. 2023-07-30]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-017-2743-2

95. PEI, Dehua a Ross E. DALBEY. Membrane translocation of folded proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2022, **298**(7) [cit. 2023-07-30]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2022.102107

96. VALASTYAN, Scott a Robert A. WEINBERG. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* [online]. 2011, **147**(2), 275-292 [cit. 2023-08-02]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.09.024

97. MAYOR, Roberto a Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE. The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2016, **17**(2), 97-109 [cit. 2023-08-02]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2015.14

98. FRIEDL, Peter, Yael HEGERFELDT a Miriam TUSCH. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. 2004, **48**(5-6), 441-449 [cit. 2023-08-02]. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.041821pf

99. WEIJER, Cornelis J. Collective cell migration in development. *Journal of Cell Science* [online]. 2009, 2009-09-15, **122**(18), 3215-3223 [cit. 2023-08-02]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03651

100. SZABÓ, András a Roberto MAYOR. Modelling collective cell migration of neural crest. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2016, **42**, 22-28 [cit. 2023-08-02]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2016.03.023

101. FRIEDL, Peter. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2004, **16**(1), 14-23 [cit. 2023-08-02]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2003.11.001

102. ROUSSOS, Evanthia T., John S. CONDEELIS a Antonia PATSIALOU. Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2011, **11**(8), 573-587 [cit. 2023-08-05]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3078

103. SOON, Lilian. A discourse on cancer cell chemotaxis: Where to from here? *IUBMB Life* [online]. 2007, **59**(2), 60-67 [cit. 2023-08-05]. ISSN 1521-6543. Dostupné z: doi:10.1080/15216540701201033

104. KINOSHITA, Nana, Chikako NAGASATO a Taizo MOTOMURA. Phototaxis and chemotaxis of brown algal swarmers. *Journal of Plant Research* [online]. 2017, **130**(3), 443-453 [cit. 2023-08-05]. ISSN 0918-9440. Dostupné z: doi:10.1007/s10265-017-0914-8

105. WITMAN, George B. Chlamydomonas phototaxis. *Trends in Cell Biology* [online]. 1993, **3**(11), 403-408 [cit. 2023-08-05]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/0962-8924(93)90091-E

106. PRINGAULT, O. a F. GARCIA-PICHEL. Hydrotaxis of Cyanobacteria in Desert Crusts. *Microbial Ecology* [online]. 2004, **47**(4) [cit. 2023-08-05]. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-002-0107-3

107. CHEN, Hui, Yuanhang GE, Sunjie YE, et al. Water transport facilitated by carbon nanotubes enables a hygroresponsive actuator with negative hydrotaxis. *Nanoscale* [online]. 2020, 2020-03-12, **12**(10), 6104-6110 [cit. 2023-08-06]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/D0NR00932F

108. XIAO, Wanglong, Mengdi YU, Yan YUAN, Xingzhu LIU a Ying CHEN. Thermotaxis of mammalian sperm. *Molecular Human Reproduction* [online]. 2022, 2022-08-01, **28**(8) [cit. 2023-08-06]. ISSN 1360-9947. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gaac027

109. BAHAT, Anat a Michael EISENBACH. Sperm thermotaxis. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2006, **252**(1-2), 115-119 [cit. 2023-08-06]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2006.03.027

110. KUNWAR, Prabhat S., Daria E. SIEKHAUS a Ruth LEHMANN. In Vivo Migration: A Germ Cell Perspective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2006, 2006-11-01, **22**(1), 237-265 [cit. 2023-08-06]. ISSN 1081-0706. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.103337

111. MICALIZZI, Douglas S a Heide L FORD. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer. *Future Oncology* [online]. 2009, **5**(8), 1129-1143 [cit. 2023-08-08]. ISSN 1479-6694. Dostupné z: doi:10.2217/fon.09.94

112. D'ELISEO, Donatella, Giuliana DI ROCCO, Rossella LORIA, Silvia SODDU, Angela SANTONI a Francesca VELOTTI. Epitelial-to-mesenchimal transition and invasion are upmodulated by tumor-expressed granzyme B and inhibited by docosahexaenoic acid in human colorectal cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [online]. 2016, **35**(1) [cit. 2023-08-08]. ISSN 1756-9966. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-016-0302-6

113. WU, Jia-shun, Jian JIANG, Bing-jun CHEN, Ke WANG, Ya-ling TANG a Xin-hua LIANG. Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology* [online]. 2021, **14**(1) [cit. 2023-08-08]. ISSN 19365233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2020.100899

114. KALLURI, Raghu a Eric G. NEILSON. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2003, 2003-12-15, **112**(12), 1776-1784 [cit. 2023-08-08]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI20530

115. YANG, Jing, Parker ANTIN, Geert BERX, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2020, 2020-06-10, **21**(6), 341-352 [cit. 2023-08-08]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-020-0237-9

116. DONGRE, Anushka a Robert A. WEINBERG. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2019, **20**(2), 69-84 [cit. 2023-08-08]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-018-0080-4

117. BANI-HANI, Ahmad H., Matthew T. CAMPBELL, Daniel R. MELDRUM a Kirstan K. MELDRUM. Cytokines in Epithelial-Mesenchymal Transition: A New Insight Into Obstructive Nephropathy. *Journal of Urology* [online]. 2008, **180**(2), 461-468 [cit. 2023-08-09]. ISSN 0022-5347. Dostupné z: doi:10.1016/j.juro.2008.04.001

118. THIERY, Jean Paul, Hervé ACLOQUE, Ruby Y.J. HUANG a M. Angela NIETO. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* [online]. 2009, **139**(5), 871-890 [cit. 2023-08-09]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.11.007

119. BARRIERE, Guislaine, Pietro FICI, Giulia GALLERANI, Francesco FABBRI a Michel RIGAUD. Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. *Clinical and Translational Medicine* [online]. 2015, **4**(1) [cit. 2023-08-09]. ISSN 2001-1326. Dostupné z: doi:10.1186/s40169-015-0055-4

120. LAMOUILLE, Samy, Jian XU a Rik DERYNCK. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2014, **15**(3), 178-196 [cit. 2023-08-09]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3758

121. PEINADO, Héctor, David OLMEDA a Amparo CANO. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer* [online]. 2007, **7**(6), 415-428 [cit. 2023-08-09]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2131

122. ONDER, Tamer T., Piyush B. GUPTA, Sendurai A. MANI, Jing YANG, Eric S. LANDER a Robert A. WEINBERG. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Research* [online]. 2008, 2008-05-15, **68**(10), 3645-3654 [cit. 2023-08-09]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2938

123. VESUNA, Farhad, Paul VAN DIEST, Ji Hshiung CHEN a Venu RAMAN. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2008, **367**(2), 235-241 [cit. 2023-08-09]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.151

124. HILL, Charlotte a Yihua WANG. The importance of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resistance* [online]. 2019 [cit. 2023-08-09]. Dostupné z: doi:10.20517/cdr.2019.75

125. TREPAT Xavier, Zaozao CHEN a Ken JACOBSON. Cell migration. *Comprehensive Physiology* [online]. Wiley, 2011 [cit. 2023-08-09]. ISBN 9780470650714. Dostupné z: doi:10.1002/cphy

126. YUMURA, S, H MORI a Y FUKUI. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. *The Journal of cell biology* [online]. 1984, 1984-09-01, **99**(3), 894-899 [cit. 2023-08-09]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.99.3.894

127. MANDEVILLE, John T H, Moira A LAWSON a Frederick R MAXFIELD. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 1997, 1997-02-01, **61**(2), 188-200 [cit. 2023-08-09]. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1002/jlb.61.2.188

128. GEORGE, Samantha, Joshua Alexander James MARTIN, Vittoria GRAZIANI a Victoria SANZ-MORENO. Amoeboid migration in health and disease: Immune responses versus cancer dissemination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2023, 2023-1-5, **10** [cit. 2023-08-09]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2022.1091801

129. SAHAI, Erik a Christopher J. MARSHALL. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology* [online]. 2003, **5**(8), 711-719 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1019

130. WOLF, Katarina, Irina MAZO, Harry LEUNG, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2003, 2003-01-20, **160**(2), 267-277 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200209006

131. WYCKOFF, Jeffrey B., Sophie E. PINNER, Steve GSCHMEISSNER, John S. CONDEELIS a Erik SAHAI. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Current Biology* [online]. 2006, **16**(15), 1515-1523 [cit. 2023-08-11]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2006.05.065

132. PRESTON, T. M., L. G. COOPER a C. A. KING. Amoeboid Locomotion of Naegleria gruberi: the Effects of Cytochalasin B on Cell-Substratum Interactions and Motile Behaviour. *The Journal of Protozoology* [online]. 1990, **37**(4), 6s-11s [cit. 2023-08-11]. ISSN 00223921. Dostupné z: doi:10.1111/j.1550-7408.1990.tb01139.x

133. PAŇKOVÁ, K., D. RÖSEL, M. NOVOTNÝ a Jan BRÁBEK. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2010, **67**(1), 63-71 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-009-0132-1

134. NIGGEMANN, Bernd, Kerstin MAASER, Hongqi LÜ, Ronald KROCZEK, Kurt S. ZÄNKER a Peter FRIEDL. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three-dimensional collagen lattice. *Cancer Letters* [online]. 1997, **118**(2), 173-180 [cit. 2023-08-11]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3835(97)00328-5

135. RIDLEY, Anne J., Hugh F. PATERSON, Caroline L. JOHNSTON, Dagmar DIEKMANN a Alan HALL. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* [online]. 1992, **70**(3), 401-410 [cit. 2023-08-11]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(92)90164-8

136. NOBES, Catherine D a Alan HALL. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* [online]. 1995, **81**(1), 53-62 [cit. 2023-08-11]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4

137. SHEETZ, Michael P., Dan P. FELSENFELD a Catherine G. GALBRAITH. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends in Cell Biology* [online]. 1998, **8**(2), 51-54 [cit. 2023-08-11]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/S0962-8924(98)80005-6

138. RIBEIRO, F. O., M. J. GÓMEZ-BENITO, J. FOLGADO, P. R. FERNANDES a J. M. GARCÍA-AZNAR. Computational model of mesenchymal migration in 3D under chemotaxis. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* [online]. 2017, 2017-01-02, **20**(1), 59-74 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1025-5842. Dostupné z: doi:10.1080/10255842.2016.1198784

139. BROOKS, Peter C, Staffan STRÖMBLAD, Lurаynne C SANDERS, Tami L VON SCHALSCHA, Ronald T AIMES, William G STETLER-STEVENSON, James P QUIGLEY a David A CHERESH. Localization of Matrix Metalloproteinase MMP-2 to the Surface of Invasive Cells by Interaction with Integrin αvβ3. *Cell* [online]. 1996, **85**(5), 683-693 [cit. 2023-08-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81235-0

140. LIU, Yan-Jun, Maël LE BERRE, Franziska LAUTENSCHLAEGER, et al. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* [online]. 2015, **160**(4), 659-672 [cit. 2023-08-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2015.01.007

141. BRÁBEK, Jan, Claudia T MIERKE, Daniel RÖSEL, Pavel VESELÝ a Ben FABRY. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2010, **8**(1) [cit. 2023-08-12]. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/1478-811X-8-22

142. KOPFSTEIN, L. a G. CHRISTOFORI. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* [online]. 2006, **63**(4), 449-468 [cit. 2023-08-12]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-005-5296-8

143. SHARMA, Sachin, Shaikh Maryam GHUFRAN, Sampa GHOSE a Subhrajit BISWAS. Cytoplasmic vacuolation with endoplasmic reticulum stress directs sorafenib induced non-apoptotic cell death in hepatic stellate cells. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2023-08-12]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-82381-3

144. KAR, R, P K SINGHA, M A VENKATACHALAM a P SAIKUMAR. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene* [online]. 2009, 2009-07-16, **28**(28), 2556-2568 [cit. 2023-08-12]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2009.118

145. XU, Xuebo, Yueyang LAI a Zi-Chun HUA. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* [online]. 2019, 2019-01-31, **39**(1) [cit. 2023-08-12]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20180992

146. BOHM, I. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. *Molecular Imaging & Biology* [online]. 2003, **5**(1), 2-14 [cit. 2023-08-12]. ISSN 15361632. Dostupné z: doi:10.1016/S1536-1632(03)00024-6

147. ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2007, **35**(4), 495-516 [cit. 2023-08-12]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337

148. ŠURÁŇOVÁ, Markéta, Tomáš HORÁK a Pavel VESELÝ. Advantages of Using Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging in Oncology with Q-PHASE Microscope. Conferene PHASE IN BRNO 2022: 3rd International Meeting Phase in Brno, 2022.

149. PROSKURYAKOV, Sergey Y.a, Anatoli G KONOPLYANNIKOV a Vladimir L GABAI. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* [online]. 2003, **283**(1), 1-16 [cit. 2023-08-12. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-4827(02)00027-7

150. POOPITI, Robert J., Michael MARGULIES, Beria CABELLO a Arkadi M. RYWLIN. Membranous Fat Necrosis. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 1986, **10**(1), 62-69 [cit. 2023-08-12]. ISSN 0147-5185. Dostupné z: doi:10.1097/00000478-198601000-00007

151. CANMAN, Julie C. a Clemens CABERNARD. Mechanics of cell division and cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2018, 2018-03-15, **29**(6), 685-686 [cit. 2023-08-12]. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.E17-11-0671

152. BEEKERS, Inés, Kirby R. LATTWEIN, Joop J.P. KOUIJZER, et al. Combined Confocal Microscope and Brandaris 128 Ultra-High-Speed Camera. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 2019, **45**(9), 2575-2582 [cit. 2023-08-15]. ISSN 03015629. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.06.004

153. ABOUBAKAR NANA, Frank, Marie VANDERPUTTEN a Sebahat OCAK. Role of Focal Adhesion Kinase in Small-Cell Lung Cancer and Its Potential as a Therapeutic Target. *Cancers* [online]. 2019, **11**(11) [cit. 2023-08-15]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11111683

154. YUAN, Xiaofeng, Lianhua PIAO, Luhui WANG, Xu HAN, Ming ZHUANG a Zhiwei LIU. Pivotal roles of protein 4.1B/DAL-1, a FERM-domain containing protein, in tumor progression (Review). *International Journal of Oncology* [online]. 2019, 2019-09-13 [cit. 2023-08-15]. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2019.4877

155. WONG, Sunny Y., Herbert HAACK, Joseph L. KISSIL, et al. Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, 2007-07-31, **104**(31), 12784-12789 [cit. 2023-08-15]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0705499104

156. ZACHARY, Ian. Focal adhesion kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 1997, **29**(7), 929-934 [cit. 2023-08-16]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/S1357-2725(97)00008-3

157. CHEN, Feiyu, Zhangfeng ZHONG, Cheng ZHANG, Yuanjun LU, Yau-Tuen CHAN, Ning WANG, Di ZHAO a Yibin FENG. Potential Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Management of Cancer: Therapeutic Opportunities from Herbal Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(21) [cit. 2023-08-16]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232113334

158. LIU, G, X MENG, Y JIN, J BAI, Y ZHAO, X CUI, F CHEN a S FU. Inhibitory role of focal adhesion kinase on anoikis in the lung cancer cell A549. *Cell Biology International* [online]. 2008, **32**(6), 663-670 [cit. 2023-08-16]. ISSN 10656995. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellbi.2008.01.292

159. WEI, Wei-Chun, Hsi-Hui LIN, Meng-Ru SHEN a Ming-Jer TANG. Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. 2008, **295**(6), C1579-C1589 [cit. 2023-08-1]. ISSN 0363-6143. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.00223.2008

160. PHI AB. Manuá*l*. [online]. [cit. 2023-07-18]. l. Dostupn*é z*: https://phiab.com/holomonitor/

161. POPESCU, Gabriel, YongKeun PARK, Mikael SEBESTA, Peter J. EGELBERG, Anders LANGBERG, Jens-Henrik LINDSKOV, Kersti ALM a Birgit JANICKE. *HoloMonitor M4: holographic imaging cytometer for real-time kinetic label-free live-cell analysis of adherent cells* [online]. In: . 971813- [cit. 2023-07-18]. Dostupné z: doi:10.1117/12.2216731

162. ZHANG, Yuntian a Robert L. JUDSON. Evaluation of holographic imaging cytometer holomonitor M4® motility applications. *Cytometry Part A* [online]. 2018, **93**(11), 1125-1131 [cit. 2023-07-28]. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23635

163. HAYASHI, Daichi, Toshiharu SHIRAI, Ryu TERAUCHI, et al. Pristimerin inhibits the proliferation of HT1080 fibrosarcoma cells by inducing apoptosis. *Oncology Letters* [online]. 2020, 2020-02-17 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.11405

164. WOLF, Katarina, Stephanie ALEXANDER, Vivien SCHACHT, Lisa M. COUSSENS, Ulrich H. VON ANDRIAN, Jacco VAN RHEENEN, Elena DERYUGINA a Peter FRIEDL. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2009, **20**(8), 931-941 [cit. 2023-08-20]. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2009.08.005

165. LARROSA, Mar, Pilar TRUCHADO, Juan Carlos ESPÍN, Francisco A. TOMÁS-BARBERÁN, Ana ALLENDE a María Teresa GARCÍA-CONESA. Evaluation of Pseudomonas aeruginosa (PAO1) adhesion to human alveolar epithelial cells A549 using SYTO 9 dye. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2012, **26**(3), 121-126 [cit. 2023-08-20]. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcp.2012.03.001

166. SCHMALBROCK, Laura K., Anna DOLNIK, Sibylle COCCIARDI, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3 -ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood* [online]. 2021, 2021-06-3, **137**(22), 3093-3104 [cit. 2023-08-23]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2020007626

167. GALLOGLY, Molly M., Hillard M. LAZARUS a Brenda W. COOPER. Midostaurin: a novel therapeutic agent for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis. *Therapeutic Advances in Hematology* [online]. 2017, **8**(9), 245-261 [cit. 2023-08-23]. ISSN 2040-6207. Dostupné z: doi:10.1177/2040620717721459

168. MARTENS, Henri J. a Vincent GEENEN. Focal Adhesion Kinases: Interest in Immunoendocrinology, Developmental Biology, and Cancer. *Endocrine* [online]. 2000, **13**(3), 233-242 [cit. 2023-08-25]. ISSN 0969-711X. Dostupné z: doi:10.1385/ENDO:13:3:233

Životopis autorky a autorské výstupy

KONTAKT:

Email: mmsuranova@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8256-1175

VZDĚLÁNÍ:

- 2018 – doposud VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
  - Fakulta: Fakulta strojního inženýrství, program: Fyzikální a materiálové inženýrství, Přesná mechanika a optika, Experimentální Biofotonika
  - Typ studia: Doktorské
  - Téma disertační práce: Biofyzikální interpretace kvantitativního fázového zobrazení s využitím koherencí řízené holografické mikroskopie
  - Ukončení studia - do konce roku 2023
- 2016 – 2018 MASARYKOVA UNIVERZITA
  - Lékařská fakulta, Katedra Optometrie a ortoptiky
  - Studijní obor: Specializace ve zdravotnictví, Optometrie
  - Diplomová práce: Optická versus automatická pachymetrie
  - Magisterský titul
- 2013 – 2016 UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
  - Přírodovědecká fakulta, Katedra Optiky
  - Studijní obor: Specializace ve zdravotnictví, Optometrie
  - Bakalářská práce: Insuficience konvergence
  - Bakalářský titul

ZAHRANIČNÍ STÁŽ:

- od 1. 4. 2019 do 30. 9. 2019
  - IMPERIAL COLLEGE UK, Londýn, Výzkumná skupina Dr. Oliviera E. Pardo
  - Lékařská fakulta, Chirurgická a onkologická klinika
  - Náplň stáže:
    - Práce s buňkami karcinomu plic A549, H1299 a získávání znalostí v oblasti mikroskopických technik, časosběrného záznamu, vyhodnocování dat, migračního testu, interference RNA a western blot.

PROJEKTY:

- 2022 – Methodology for Monitoring Changes in Tumor Cell Motility in 3D Environments Obtained by Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging and Laser Scanning Confocal Microscopy.
  - Výzkum podpořen: **Czech-Bioimaging**: National Infrastructure for Biological and Medical Imaging
  - Výsledky prezentovány na konferenci Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2022

- 2021 – Exploration of the Potential for Nanostructured Hydrogel Surface in the Prevention of Cells Upregulating Cytoskeletal Structures and Losing Transparency.
    - **KING projekt (Kvalitní Interní grantová soutěž)**
    - Výsledky publikovány v časopise Scientific Reports
    - Hlavní řešitel

- 2021 – Methodology Of Correlation Microscopy Between Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging And A Laser Scanning Confocal Microscope
    - Výzkum podpořen: **Czech-Bioimaging:** National Infrastructure for Biological and Medical Imaging
    - Výsledky prezentovány na konferenci Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2021

PUBLIKACE A KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY:

PUBLIKACE:

- **ŠURÁŇOVÁ, M.;** ĎURIŠ, M.; ŠTENGLOVÁ NETÍKOVÁ, I.; BRÁBEK, J.; HORÁK, T.; JŮZOVÁ, V.; CHMELÍK, R.; VESELÝ, P. Primary assessment of medicines for expected migrastatic potential with holographic incoherent quantitative phase imaging. Biomedical Optics Express, 2023, vol. 14, no. 6, p. 2689-2708. ISSN: 2156-7085.
    - **(Q1, FI=3,57)**
- KRAJŇÁK, T.; ČERNÁ, E.; **ŠURÁŇOVÁ, M**.; ŠAMOŘIL, T.; ZICHA, D.; VOJTOVÁ, L.; ČECHAL, J. Replica-mold nanopatterned PHEMA hydrogel surfaces for ophthalmic applications. Scientific Reports, 2022, vol. 12, no. 1, p. 14497 (p.) ISSN: 2045-2322.
    - **(Q1, FI=4,6)**

KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY:

- **ŠURÁŇOVÁ, M**.; ZICHA, D.; VESELÝ, P.; BRÁBEK, J.; JŮZOVÁ, V.; CHMELÍK, R. In Vitro Screening with Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging Focuses on Finding Medicaments for Repurposing as Anti-Metastatic Agents Designated as Migrastatics. In Optics InfoBase, OSA's Digital Library: European Conferences on Biomedical Optics (2021). Optics InfoBase Conference Papers. Optics InfoBase, OSA's Digital Library: Optics InfoBase, OSA's Digital Library, 2021. p. 1-3. ISBN: 978-15-5752-820-9. ISSN: 2162-2701.
- **ŠURÁŇOVÁ, M.;** ZÁBRANSKÁ, M.; KOLÍNKOVÁ, V.; MUCHOVÁ, N.; JŮZOVÁ, V.; CHMELÍK, R.; VESELÝ, P. Non-Invasive Imaging Method for Evaluating Effect of Migrastatics on Tumor Cells In Vitro Based on Coherence - Controlled Holographic Microscopy. 16th Multinational Congress on Microscopy, 04–09 September 2022, Brno, Czech Republic, 16MCM, BOOK ABSTRACT. Czechoslovak Microscopy Society: 16th Multinational Congress

on Microscopy. Czechoslovak Microscopy Society, 2022. p. 532-533. ISBN: 978-80-11-02253-2.

- **ŠURÁŇOVÁ, M.;** ČERNÁ, E.; KRAJŇÁK, T.; VOJTOVÁ, L.; ŠAMOŘIL, T.; VESELÝ, P.; CHMELÍK, R.; ZICHA, D. Exploration of the potential for nanostructured hydrogel surface in prevention of cell upregulating cytoskeletal structures and loosing transparency. Journal of Physical Chemistry & Biophysics, ISSN 2155-9570, 2021. p. 50-51
- **ŠURÁŇOVÁ, M**.; BRÁBEK, J.; ŠTENGLOVÁ NETÍKOVÁ, I.; CHMELÍK, R.; VESELÝ, P. Rapid In Vitro Screening Test of Tumour Cells Migratory Reactions to Potential Migrastatics. XXV. BIOLOGICKÉ DNY- Od nádorové biologie po precizní onkologii. Cesko-Slovenská biologická spolecnost, z.s. 2022. Cesko-Slovenská biologická společnost, z.s.: XXV. BIOLOGICKÉ DNY- Od nádorové biologie po precizní onkologii., 2022. p. 1-2.
- KŘÍŽOVÁ, A.; NOVÁKOVÁ, Z.; **ŠURÁŇOVÁ, M**. Time-lapse Quantitative Phase Imaging for the Study of Cell Migration. In VÝROCNÍ KONFERENCE CSMS, MIKROSKOPIE 2023. 2023.
- KŘÍŽOVÁ, A.; NOVÁKOVÁ, Z.; **ŠURÁŇOVÁ, M.;** JŮZOVÁ, V. Time-lapse Quantitative Phase Imaging for the Study of Cell Migration. 2023. FOM 2023, PRESENTATION AND BOOK ABSTRACT.
- **ŠURÁŇOVÁ, M.;** HORÁK, T.; VESELÝ, P. Advantages of Using Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging in Oncology with Q-PHASE Microscope. PHASE IN BRNO 2022: 3rd International Meeting Phase in Brno, 2022.
- HORÁK, T.; **ŠURÁŇOVÁ, M.;** ŠTENGLOVÁ NETÍKOVÁ, I.; ZICHA, D.; JŮZOVÁ, V.; CHMELÍK, R.; VESELÝ, P. Identification of Tumor Cells Behavior Changes by Holographic Incoherent-light-source Quantitative Phase Imaging Focuses on Migrastatics. 16th Multinational Congress on Microscopy, 04–09 September 2022, Brno, Czech Republic, 16MCM, BOOK ABSTRACT.: Czechoslovak Microscopy Society: 16th Multinational Congress on Microscopy., 2022.
- **ŠURÁŇOVÁ, M**. The methodology of correlative microscopy between holographic incoherent quantitative phase imaging (Q-Phase) and laser scanning confocal microscopy (NIKON). Czech-Bioimaging Scientific Conference, 2021.
- **ŠURÁŇOVÁ, M.;** ZÁBRANSKÁ, M.; KOLÍNKOVÁ, V.; MUCHOVÁ, N.; JŮZOVÁ, V.; CHMELÍK, R.; VESELÝ, P. Advanced Microscopical Non-Invasive Examination of the Supposed Migrastatics for Impact on In Vitro Cell Migration. 5th European Conference of Oncology Pharmacy: European Conference of Oncology Pharmacy, 2022. p. 14-14.
- **ŠURÁŇOVÁ, M.** Methodology of Microscopical Assessment of Tumour Cells Behaviour in 2D or 3D in vitro Environment with Coherence - Controlled Holographic Microscope. IMAGING PRINCIPLES OF LIFE, BOOK OF ABSTRACTS, October 4-5, 2022, Hotel Amande, Hustopece. Czech-BioImaging Annual Scientific Conference: Czech-Bioimaging, 2022. p. 43-44.