



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

# MĚŘENÍ INDEXU LOMU A MORFOMETRIE ŽIVÝCH BUNĚK POMOCÍ KOHERENCÍ ŘÍZENÉHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU

MEASUREMENT OF REFRACTIVE INDEX AND MORPHOMETRY OF LIVING CELLS BY COHERENCE-  
CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marie Vodičková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Štrbková, Ph.D.

BRNO 2018



# Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka:	<b>Bc. Marie Vodičková</b>
Studijní program:	Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor:	Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce:	<b>Ing. Lenka Štrbková, Ph.D.</b>
Akademický rok:	2017/18

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

## **Měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu**

### **Stručná charakteristika problematiky úkolu:**

Koherencí řízený holografický mikroskop sestavený na ÚFI FSI VUT v Brně umožňuje záznam fázového posuvu způsobeného vzorkem, tedy živými buňkami v médiu. Naměřený fázový posuv přitom závisí současně na indexu lomu pozorované buňky a její výšce v daném bodě. Je důležité zavést experimentální metodiku, která umožní obě tyto veličiny od sebe oddělit, a tak získat možnost pozorovat nezávisle změny indexu lomu vnitřního prostředí buňky a změny její morfometrie v průběhu časosběrného experimentu.

### **Cíle diplomové práce:**

1. Návrh metodiky pro měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu.
2. Návrh a provedení experimentu pro ověření metodiky, získání a zpracování dat.
3. Vyhodnocení výsledků experimentu a významu navržené metodiky.

### **Seznam doporučené literatury:**

POPESCU, G., Quantitative phase imaging of cells and tissues. McGraw Hill Professional, 2011.

RAPPAZ, B. et al. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. Optics Express, Vol. 13 No. 23 (2005): 9361-9373.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2017/18

V Brně, dne

L. S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.  
ředitel ústavu

---

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

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá návrhem metodiky pro měření indexu lomu a tloušťky živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu. Teoretická část práce pojednává o holografické mikroskopii a jejím vývoji na ÚFI FSI VUT v Brně. Dále se práce zaměřuje na holografický mikroskop, jeho popis, princip, postup práce a zpracování dat. Popsána je také konfokální mikroskopie, která slouží pro porovnání získaných hodnot navrženou metodikou. Poslední teoretická část se zabývá problematikou testování statistických hypotéz potřebných pro zpracování naměřených dat. V rámci práce byly pro ověření metodiky určení indexu lomu a tloušťky buňky navrženy příslušné experimenty. V experimentální části je nejdříve popsána příprava vzorků a měření. Následuje postup a výsledky navržených experimentů a jejich vyhodnocení.

## **Abstract**

This master's thesis deals with the design of methodology for measurement of refractive index and thickness of living cells by coherence-controlled holographic microscope. The theoretical part summarises the holographic microscopy and its development at IPE FME BUT in Brno. The thesis focuses on the multimodal holographic microscope, its description, the principle, the procedure of work and data processing. Confocal microscopy is also described, which serves to compare the acquired values with the proposed methodology. The last part of the theoretical part deals with the testing of statistical hypotheses, which is needed for the processing of measured data. Experiments were designed for the verification of methodology for determination of the refractive index and cell thickness. The experimental part of the thesis deals with the sample preparation and measurement. The procedure and results of the proposed experiments and their evaluation follows.

## **Klíčová slova:**

Multimodální holografická mikroskopie, konfokální skenovací mikroskopie, index lomu, tloušťka živých buněk.

## **Keywords:**

Multimodal holographic microscopy, confocal laser scanning microscopy, refractive index, thickness of living cells.



VODIČKOVÁ, M. *Měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherenci řízeného holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018. 49 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Lenka Štrbková, Ph.D..





## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci *Měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu* vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Lenky Štrbkové PhD. a s pomocí odborných a literárních zdrojů uvedených na konci práce v seznamu literatury.

V Brně, květen 2018

Bc. Marie Vodičková



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Ing. Lence Štrbkové PhD., vedoucí mé diplomové práce, za odbornou pomoc, vedení, cenné rady a poskytnutí literatury, které mi pomohly ke zpracování tématu. Dále děkuji Mgr. Veronice Jůzové za přípravu vzorků k pozorování. Mé poděkování patří též všem, kteří mi pomohli s úpravou a gramatickou kontrolou práce.

Bc. Marie Vodičková



# Obsah

1	Úvod .....	3
2	Cíle a rozdělení práce .....	5
3	Holografická mikroskopie .....	7
3.1	Historie holografie .....	7
3.2	Vývoj holografické mikroskopie na VUT .....	7
4	Multimodální holografický mikroskop (MHM) .....	11
4.1	Konstrukční popis MHM .....	11
4.2	Zpracování interferogramu .....	12
4.3	Význam obrazové fáze .....	13
4.4	Metoda určení indexu lomu a tloušťky buňky .....	13
4.5	Spuštění a nastavení mikroskopu .....	14
4.6	Analýza v programu Q-Phase .....	15
5	Konfokální mikroskopie .....	17
5.1	Historie konfokální mikroskopie .....	17
5.2	Základní konstrukční popis .....	17
5.3	Základní vlastnosti konfokální mikroskopie .....	18
5.4	Fluorescenční konfokální mikroskopie .....	18
5.4.1	Fluorescence .....	19
5.4.2	Konstrukční popis .....	20
5.5	Nastavení konfokálního mikroskopu .....	21
6	Testování statistických hypotéz .....	23
6.1	Testování normality dat .....	23
6.2	F-test .....	23
6.3	T-test .....	24
7	Experimentální část .....	27
7.1	Příprava experimentu .....	27
7.1.1	Kultivace buněk .....	27
7.1.2	Pozorovací komůrka .....	27
7.1.3	Pozorování .....	28
7.1.4	Fixace a barvení buněk .....	29
7.1.5	Měření indexu lomu médií .....	29
7.2	Zpracování naměřených dat .....	30

7.3	Výsledky.....	31
7.3.1	Časoběrné snímání.....	31
7.3.2	Měření indexu lomu a tloušťky buněčných struktur.....	33
7.3.3	Měření průměrné hodnoty indexu lomu a tloušťky buněk.....	38
8	Závěr .....	41
	Přílohy.....	43
	Literatura.....	47

# 1 Úvod

Základní stavební a funkční jednotkou všech živých organismů je buňka. Je to nejmenší životaschopný objekt, který je schopný rozmnožování, růstu, komunikace, dynamiky a vývoje. Základní rozdělení buněk je na prokaryotické a eukaryotické, které se dále dělí na rostlinné a živočišné. Každá živočišná buňka je ohraničena cytoplazmatickou membránou tvořenou vrstvami tuků a bílkovin. Uvnitř buňky se pak nachází jádro, jehož hlavní funkcí je řízení celé buňky. V jádru se může též nacházet i jadérko, což je malá vnitřní část buněčného jádra obsahující ribozomální ribonukleovou kyselinu. Další součástí buňky je cytoplazma, což je koloidní roztok obsahující organely a další buněčné struktury. Cytoplazma se skládá ze 75-80% vody, v níž jsou rozpuštěny různé anorganické molekuly, enzymy a další látky. Organely slouží k řízení a dělení buňky, buněčnému dýchání, mechanické podpoře, syntéze a vylučování látek. Buňky jsou složité a velmi důležité pro život, proto jsou předmětem mnoha studií a výzkumů.

Jelikož jsou buňky většinou transparentní a málo rozptylují a odraží světlo, je nutné používat při jejich pozorování jiné metody, než je zobrazení ve světlém poli. Ve světlém poli lze sice pozorovat vzorky až s tisícinásobným zvětšením, ale jsou málo kontrastní. Pro zvýšení kontrastu je možné buňky obarvit a detekovat pomocí fluorescenční mikroskopie. Ta využívá excitace fluorescenčního barviva a detekce emisního záření.

Kombinací fluorescenční a konfokální mikroskopie lze získat vysoce kvalitní snímky pozorovaných vzorků. Konfokální mikroskopie umožňuje pozorování reálného vzorku s vyšší rozlišovací schopností než u běžných světelných mikroskopů. Tato vlastnost je dána potlačením signálů pocházejících z rovin mimo zaostřenou rovinu. Další výhodou je možnost rekonstrukce trojrozměrného modelu preparátu. Fluorescence pak zajišťuje dobrou viditelnost průhledného vzorku díky obarvení a detekci emisního záření. Díky možnostem použití různých barviv, lze pomocí této metody pozorovat přehledně prostorovou strukturu buněk, jader či jednotlivých buněčných organel.

Další možností zobrazení transparentních vzorků je využití speciálních mikroskopických zobrazovacích metod využívající fázový kontrast. Pro zobrazování fázových vzorků je vhodná interferenční mikroskopie, která zobrazuje na základě fázového posuvu vlny, která prochází vzorkem nebo se od vzorku odráží. Podle toho se dělí interferenční mikroskopy do dvou módů, transmisního a reflexního.

Interferenční mikroskopie využívá možností, které poskytuje interferenční záznam mikroskopického zobrazení. Jedná se o zobrazovací techniku využívající interference světelných svazků, kdy jeden svazek prochází vzorkem (resp. se od něj odráží) a druhý slouží jako referenční. Díky záznamu interference lze stanovit zpoždění předmětového svazku, a změřit tak rozdíl optických drah, a zároveň je možné zobrazit celou trojrozměrnou oblast vzorku.

Interferenční záznam je možný jak s koherentním, tak i nekoherentním osvětlením. Jednou z výhod použití nekoherentního zdroje světla je nekoherentní interference bez koherenční zrnitosti. Další výhodou je možnost pozorování tenkých optických řezů. Oproti konfokálnímu mikroskopu však není nutné používat rastrování, protože celá oblast je zobrazena najednou. Proces rekonstrukce je tedy závislý především na schopnostech kamery a počítačového zařízení.

Výhodou interferenční mikroskopie je možnost pozorování živých buněk bez nutnosti barvení, a tudíž bez toxických efektů pro živou buňku. Díky tomu můžeme pozorovat buňky v jejich přirozeném prostředí v reálném čase včetně jejich růstu, dělení a dalších změn.





## 2 Cíle a rozdělení práce

Koherencí řízený holografický mikroskop umožňuje záznam fázového posuvu způsobeného vzorkem, v případě této práce živými buňkami v médiu. Naměřený fázový posuv přitom závisí současně na indexu lomu pozorované buňky a její tloušťce v daném bodě. Cílem této práce je navrhnout metodiku pro měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu. Dále návrh a provedení experimentu pro ověření této metodiky, získání a zpracování dat. V neposlední řadě pak vyhodnotit výsledky experimentu a poukázat na možnosti využití této metodiky.

Diplomová práce s názvem *Měření indexu lomu a morfometrie živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu* je rozdělena do pěti částí. První čtyři části jsou teoretické, pátá se zaměřuje na experimenty. V první části je shrnuta historie holografie a vývoj holografické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně. Druhá část je zaměřena na multimediální holografický mikroskop. Konkrétně na konstrukční popis, zpracování interferogramu, význam obrazové fáze, nastavení a analýzu dat. V této části je také pojednáno o metodě určení indexu lomu a tloušťky buňky. Ve třetí části je zmíněna konfokální mikroskopie, která je využita pro porovnání získaných hodnot tloušťky buněk. Čtvrtá část pojednává o teorii testování statistických hypotéz nutných pro vyhodnocení naměřených dat. V poslední, tedy páté části, je popsána nejprve příprava experimentů a následně samotné experimenty a zpracování výsledků těchto měření. Nakonec jsou výsledky měření vyhodnoceny a porovnány.



## 3 Holografická mikroskopie

### 3.1 Historie holografie

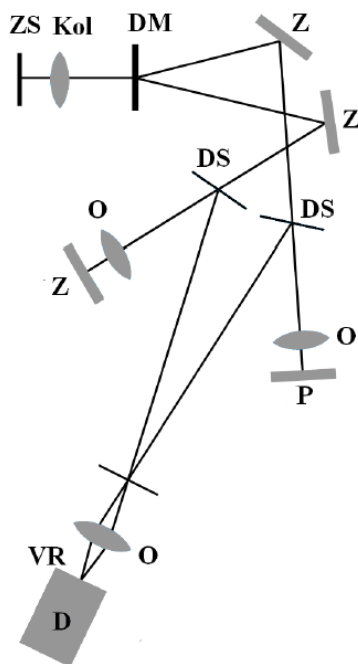
Holografie (z řeckého *holos* – úplný a *grafie* – záznam) je metoda záznamu trojrozměrného obrazu založená na principu interference vyšetřovaného a známého svazku. Teoretický základ této techniky položil kolem roku 1948 D. Gábor, který za objevení principu holografie získal Nobelovu cenu [1][2]. Praktická realizace této techniky byla však v důsledku neexistence dostatečně koherentního zdroje osvětlení problematická [3].

Větší pokrok zaznamenala holografie až po vynalezení laseru v roce 1960. Laser je ideálním zdrojem koherentního světla pro holografické mikroskopy. V tomto období vznikl i první trojrozměrný záznam předmětu, který pořídili E. Leith a J. Upatnieks z michiganské univerzity [4][5]. I přes veškeré výhody oproti jiným mikroskopickým metodám nebyla holografická mikroskopie prakticky využívána, a to kvůli vysoké pořizovací ceně, složitému uspořádání, a především kvůli vysoké náročnosti při ukládání a zpracovávání dat. Zájem o holografickou mikroskopii probudil až rozvoj výpočetní techniky, kdy se ze složitého a časově náročného zpracovávání dat stala záležitost několika okamžiků.

Mikroskopy založené na interferenci se dělí do dvou hlavních skupin podle úhlu, který svírá předmětový a referenční svazek. Jedná se o in-line interferenci, kde úhel je buď nulový nebo téměř nulový a off-axis interferenci, kde je úhel svazků nenulový. Ty mikroskopy, kde svazky svírají nulový úhel, se často označují jako osové nebo interferenční. Naopak ty, kde úhel je nenulový, se nazývají mimoosové nebo holografické. V této práci je pojednáváno o druhé skupině mikroskopů, tedy o mimoosových.

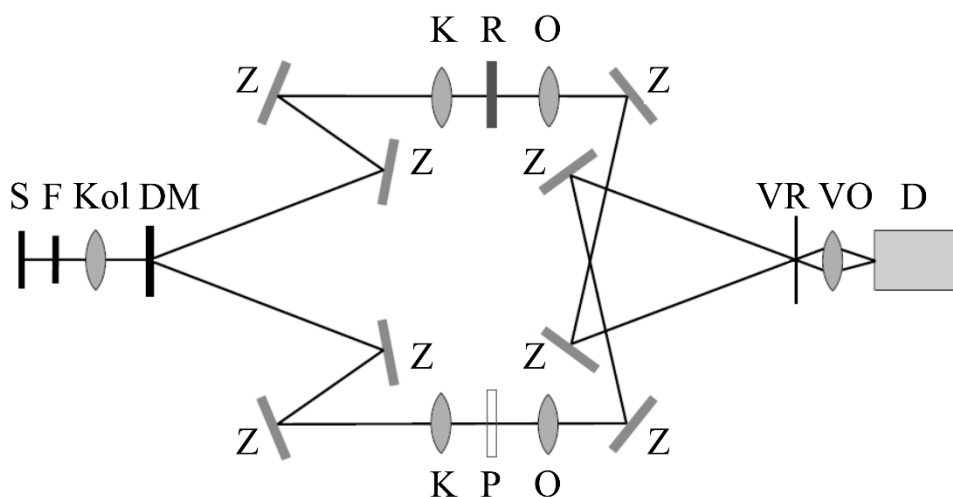
### 3.2 Vývoj holografické mikroskopie na VUT

První achromatický mimoosový holografický mikroskop byl zkonstruován v Laboratoři optické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně R. Chmelíkem a Z. Harnou [6]. Tento reflexní mikroskop byl navržen pro světlo o nízké koherenci a podobně jako konfokální mikroskop umožňoval zobrazovat optické řezy vzorků, ale navíc dokázal zobrazit i výškový profil vzorku díky detekci fáze. Schéma tohoto mikroskopu je na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Optické schéma reflexního holografického mikroskopu. Zdroj světla (ZS), kolektor (kol), difrakční mřížka (DM), zrcadla (Z), dělicí kostky (DS), objektivy (O), předmět (P), objektiv (O), výstupní rovina (VR), detektor (D) [7].

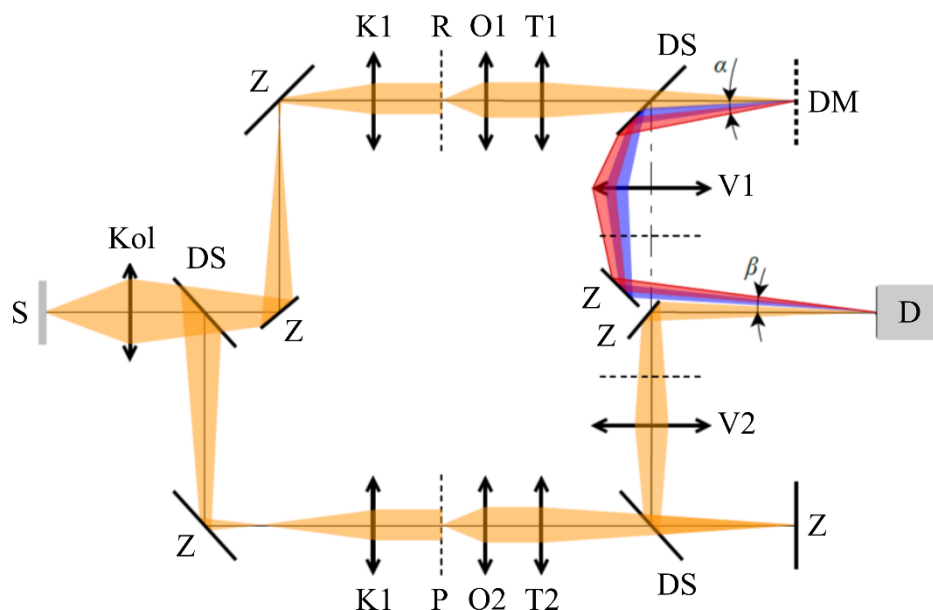
V rámci svých diplomových prací pak I. Chytková [8] a M. Prokopová [9] začaly vyvíjet transmisní holografický mikroskop, na který dále navázal P. Kolman [10]. Ten v rámci své disertační práce zkonstruoval transmisní holografický mikroskop označovaný jako koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM) první generace. Pro rozdělení svazku je zde použita difrakční mřížka, která společně s užitím achromatického prostorově invariantního interferometru zajišťuje, že interferenční struktura má pro všechny vlnové délky a body zdroje stejnou frekvenci a polohu. Schéma tohoto mikroskopu je na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Optické schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu první generace. Zdroj světla (S), interferenční filtr (F), kolektor (Kol), difrakční mřížka (DM), zrcadla (Z), kondenzory (K), pozorovaný vzorek (P), referenční vzorek (R), objektivy (O), výstupní rovina (VR), výstupní mikroobjektiv (VO), detektor (D) [10].

Z prvního CCHM vychází i CCHM druhé generace, kde oproti první není difrakční mřížka použita jako dělič svazku, ale je umístěna v předmětové větvi před výstupní čočkou. Díky drobným úpravám oproti první generaci se výrazně zvětšil prostor pro zkoumané vzorky

a odstranilo se omezení spektrální propustnosti. Zdrojem světla tak může být i obyčejná halogenová žárovka. Schéma CCHM druhé generace je na obrázku 3.



**Obrázek 3:** Optické schéma koherenci řízeného holografického mikroskopu druhé generace. Zdroj světla (S), kolektor (Kol), dělicí kostky (DS), zrcadla (Z), kondenzory (K1, K2), pozorovaný vzorek (P), referenční vzorek (R), objektivy (O1, O2), tubusové čočky (T1, T2), difrakční mřížka (DM), výstupní objektivy (V1, V2), detektor (D) [11].

Další verze mikroskopu vznikla ve spolupráci s firmou Tescan Brno s.r.o. a jedná se o multimodální holografický mikroskop (MHM). Tento mikroskop kombinuje reflexní, transmisní a fluorescenční mód. Reflexní mód umožňuje pozorovat topografii vzorků, například měření profilů. Transmisní mód slouží k pozorování morfologie vzorků, sledování pohybu buněk či měření suché hmoty buněk. Fluorescenční mód pak umožňuje detekovat a identifikovat jednotlivé buněčné struktury.

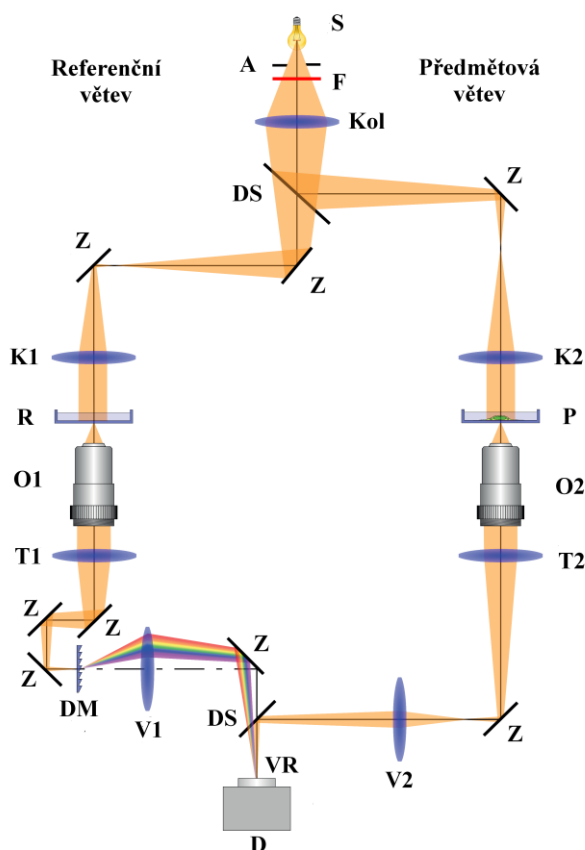
Pro buněčné pozorování je mikroskop vybaven termoizolačním boxem, který díky topnému systému udržuje stabilní teplotu během pozorování a umožňuje tak sledovat buněčnou dynamiku a životní cykly. Tento koherenci řízený holografický mikroskop v transmisním módu byl použit i k experimentům v této práci.



## 4 Multimodální holografický mikroskop (MHM)

### 4.1 Konstrukční popis MHM

Zdrojem světla pro MHM je halogenová lampička (S). Svazek vycházející ze zdroje je omezen aperturní clonou (A) a spektrum tohoto svazku je filtrováno interferenčním filtrem (F). V mikroskopu je použito Köhlerovo osvětlení, kdy rovina zdroje je zobrazena do zadních obrazových rovin kondenzorů (K1, K2) kolektorovou čočkou (Kol). Jako dělič svazku je zde použita dělicí kostka (DS), která rozděluje svazek do dvou identických větví – předmětové a referenční. V obou větvích jsou použity stejné optické prvky, jako jsou kondenzory (K1, K2), objektivy (O1, O2), tubusové čočky (T1, T2), výstupní objektivy (V1, V2) a zrcátka (Z). Svazek z obou větví je pak spojen další dělicí kostkou (DS). Do předmětové větve se vkládá pozorovaný vzorek (P). V referenční větvi, kam se vkládá referenční vzorek (R), je navíc umístěna difrakční mřížka (DM). K interferenci nultého a prvního difrakčního řádu dochází ve výstupní rovině (VR). Zde tedy interferuje předmětový a referenční svazek. Interferenční struktura je zaznamenána detektorem (D), což je CCD čip digitální kamery. Tento interferenční obrazec je achromatický a prostorově invariantní. Schéma MHM je na obrázku 4.

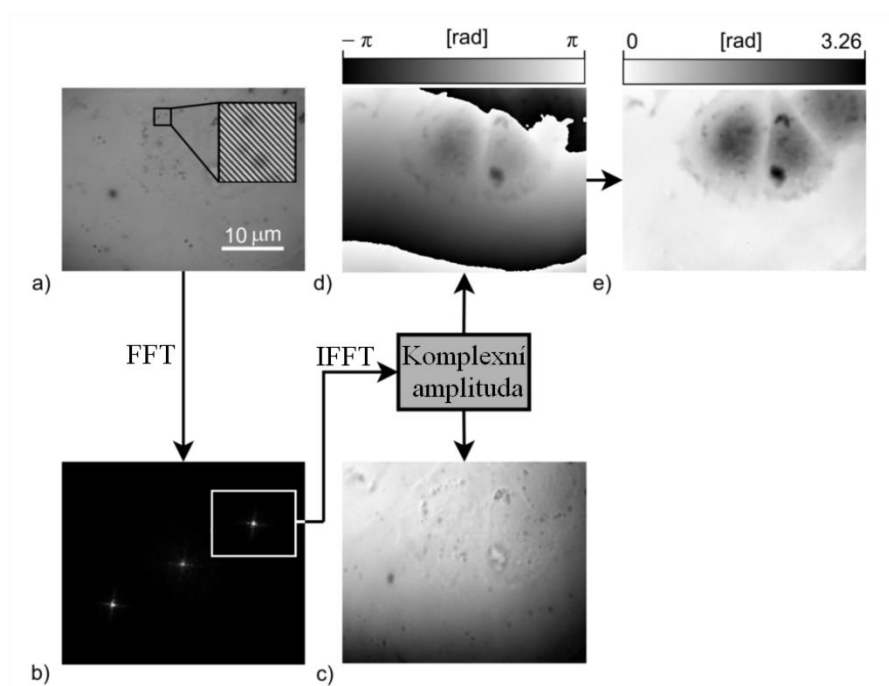


**Obrázek 4:** Optické schéma multimodálního holografického mikroskopu. Zdroj světla (S), aperturní clona (A), interferenční filtr (F), kolektor (Kol), dělicí kostky (DS), zrcadla (Z), kondenzory (K1, K2), pozorovaný vzorek (P), referenční vzorek (R), objektivy (O1, O2), tubusové čočky (T1, T2), difrakční mřížka (DM), výstupní objektivy (V1, V2), výstupní rovina (VR), detektor (D) [12].

## 4.2 Zpracování interferogramu

Díky interferenci předmětové a referenční větve vzniká na detektoru interferogram (hologram). Hologram obsahuje informaci o amplitudě a fázi předmětové větve. Rekonstrukce obrazu se provádí numerickým zpracováním pomocí specializovaného softwaru Q-Phase (TESCAN ORSAY HOLDING a.s., Brno).

Tento software používá fourierovských metod. Díky rychlé Fourierově transformaci (FFT) je získáno spektrum prostorových frekvencí. Pokud je splněna holografická podmínka, jsou zde patrné 3 oblasti. Pro další zpracování je vybrána okrajová oblast odpovídající třetímu nebo čtvrtému členu Fourierovy transformace, která je od prostřední oblasti vzdálena o prostorovou frekvenci interferenčních proužků. Vnější obrazec je vybrán tak, aby jeho maximální intenzita ležela uprostřed výřezu. Dále je provedena inverzní rychlá Fourierova transformace (IFFT), čímž získáme komplexní amplitudu zobrazení vzorku, což je důležité pro výpočet fáze a intenzity předmětové vlny. Z komplexní amplitudy získáme obraz nenavázané fáze, kde jsou patrné skoky rozdílu fází předmětové a referenční vlny. Tyto skoky je nutné odstranit a rozdíl fází navázat přičtením či odečtením  $2\pi n$ , kde  $n$  je celé číslo. Postup zpracování interferogramu je schematicky znázorněn na obrázku 5 [13]. Více informací o zpracování interferogramu lze najít v disertační práci P. Kolmana [10].



**Obrázek 5:** Zpracování obrazu: a) hologram, b) spektrum prostorových frekvencí, c) obraz amplitudy, d) obraz fáze, e) obraz navázané fáze [7].



### 4.3 Význam obrazové fáze

Fázový rozdíl světelných svazků, tedy předmětové a referenční větve, je přímo úměrný rozdílu jejich optických drah:

$$\Delta\varphi(x, y) = \varphi_p(x, y) - \varphi_r(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} OPD(x, y), \quad (4.1)$$

kde  $\Delta\varphi$  je fázový rozdíl světelných svazků,  $\varphi_p$  je fáze předmětového světelného svazku,  $\varphi_r$  je fáze referenčního světelného svazku,  $\lambda$  je vlnová délka použitého světla a  $OPD$  je rozdíl optických drah.  $OPD$  je dán indexem lomu a tloušťkou vzorku:

$$\begin{aligned} OPD(x, y) &= n_m[h - t(x, y)] + n_v(x, y)t(x, y) - n_m h \\ &= (n_v - n_m)t(x, y) = \Delta n(x, y)t(x, y), \end{aligned} \quad (4.2)$$

kde  $n_m$  je index lomu média,  $n_v$  je index lomu vzorku,  $\Delta n$  je rozdíl indexů lomu,  $t$  je tloušťka vzorku a  $h$  je výška komůrky.

Po dosažení výrazu pro  $OPD$  do rovnice pro fázový rozdíl světelných svazků získáme rovnici:

$$\Delta\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n(x, y)t(x, y). \quad (4.3)$$

Z fázových rozdílů lze určit hodnotu plošné hustoty suché hmoty buňky, která je definována jako obsah její hmoty bez vody, tedy hmotnost buňky po odpaření vody. Podle G. Propescua [14] lze tuto hodnotu určit jako

$$m = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\varphi(x, y)A \quad (4.4)$$

kde  $m$  představuje plošnou hustotu suché hmoty buňky v  $\text{pg}$ ,  $\lambda$  vlnovou délku použitého světla,  $A$  plochu buňky v  $\mu\text{m}^2$ ,  $\alpha$  specifický refrakční přírůstek v  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{pg}^{-1}$  a  $\Delta\varphi(x, y)$  průměrný fázový rozdíl v radiánech [15][16].

### 4.4 Metoda určení indexu lomu a tloušťky buňky

Měřený fázový rozdíl závisí na indexu lomu a tloušťce vzorku. Oddělení těchto dvou veličin se nazývá metoda určení indexu lomu a tloušťky buňky. Tato metoda umožňuje měření těchto dvou významných veličin na multimodálním holografickém mikroskopu. Pro změření indexu lomu a tloušťky buňky je nutné změřit fázový rozdíl u týčž buněk ve dvou médiích se stejnou osmolaritou (aby se zabránilo kolísání objemu buňky), ale s jiným indexem lomu [17][18].

Pro každý pixel získáme dvě hodnoty fáze ( $\varphi_{1,i}$ ,  $\varphi_{2,i}$ ). První se získá u vzorku ve standardním médiu

$$\varphi_{1,i} = \frac{2\pi}{\lambda} (\bar{n}_{c,i} - n_m)h_i \quad (4.5)$$

a druhá u vzorku v médiu s vyšším indexem lomu

$$\varphi_{2,i} = \frac{2\pi}{\lambda} (\bar{n}_{c,i} - (n_m + \delta n)) h_i. \quad (4.6)$$

Řešením tohoto systému rovnic získáme pro každý pixel integrální index lomu:

$$\bar{n}_{c,i} = \frac{\delta n \varphi_{1,i}}{(\varphi_{1,i} - \varphi_{2,i})} + n_m \quad (4.7)$$

a tloušťku buňky:

$$h_i = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{(\varphi_{1,i} - \varphi_{2,i})}{\delta n} = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\varphi_{1,i}}{(\bar{n}_{c,i} - n_m)}. \quad (4.8)$$

## 4.5 Spuštění a nastavení mikroskopu

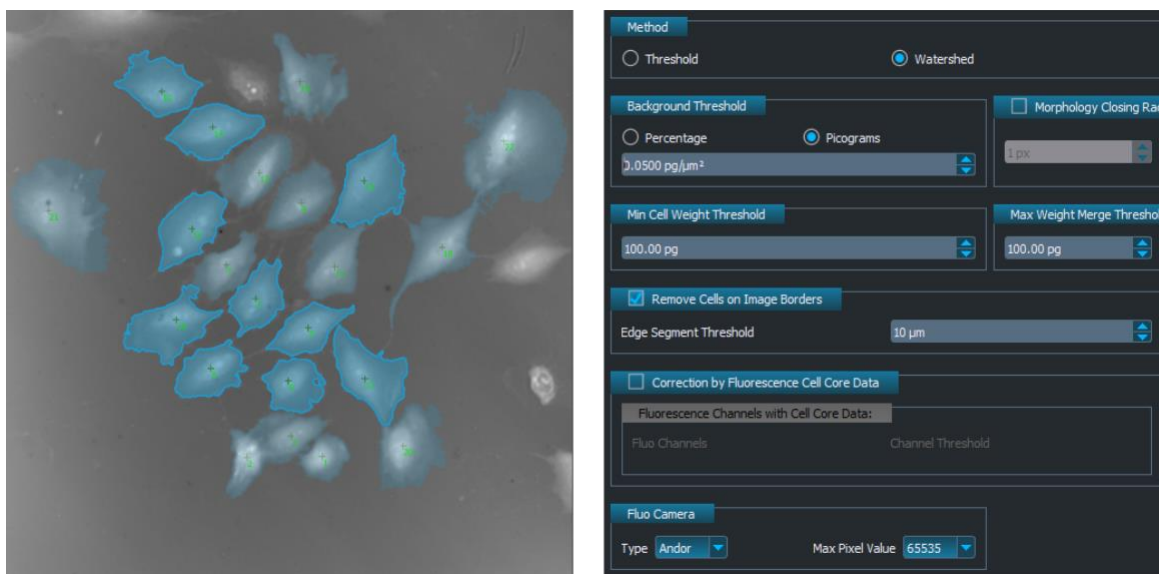
Mikroskop se spouští pomocí spínače umístěného přímo na hlavním boxu. Všechna měření jsou téměř plně automatizovaná, díky použití softwaru Q-Phase. Jediné úkony, které nejsou automatizovány, jsou vložení pozorovaného a referenčního vzorku a otevření a zavření polní clony. V prostředí programu Q-Phase lze jednoduše vybrat mód mikroskopu (transmisní, reflexní a fluorescenční), příslušné objektivy (zvětšení: 4×, 10×, 20×, 40× a 60×), filtry (maximální propustnost na vlnové délce: 515 nm, 547 nm, 580 nm, 620 nm, 650 nm a 676 nm) a nastavit parametry potřebné před zahájením pozorování, jako je intenzita zdroje a hodnota aperturní clony.

K experimentům této práce byl použit transmisní mód mikroskopu a objektivy se zvětšením 10×, filtr s maximální propustností 650 nm, hodnotou osvětlení 90% a numerickou aperturou NA = 0,3.

Před samostatným měřením je třeba zkontrolovat nastavení teploty v boxu, která musí být pro měření buněk konstantní. Následně je vložen vzorek. Dalším krokem je nastavení mikroskopu pro snímání. Nejprve je třeba najít rovinu pozorování pomocí absolutního ostření v předmětové větvi. Zasune se polní clona, která je v předmětové větvi doostřena ručně pomocí šroubu a v referenční větvi pomocí vložení referenčního vzorku – sklíček. Následně dojde k automatickému sesazení obrazů polní clony v obou větvích. Dále je nutné nastavení interference, což je prováděno automaticky. Posledním krokem je nastavení expozice, relativního ostření, popřípadě nastavení masky pozadí, intervalu snímání či průměrování snímků. Program Q-Phase v reálném čase zobrazuje amplitudu, intenzitu, navázanou fázi a hologram. Tato data je možné také pomocí programu uložit, rekonstruovat a zpracovávat.

## 4.6 Analýza v programu Q-Phase

Program Q-Phase je součástí multimodálního holografického mikroskopu a slouží nejen pro nastavení mikroskopu a pro samotná měření, ale také jako program na ukládání a analýzu snímků. Tento program byl použit pro segmentaci buněk (obrázek 6), která slouží pro určení hranic a v případě dotýkajících se buněk k jejich rozdělení a k odstranění nežádoucích objektů v obraze. Program nabízí segmentaci pomocí dvou různých metod – treshold (segmentace na základě dvojúrovňového prahování) a watershed (segmentace buněk využívající stupně šedi). K segmentování buněk byla použita metoda watershed, protože dokáže lépe rozdělit dotýkající se buňky.



**Obrázek 6:** Segmentace buněk. Vlevo segmentované buňky, vpravo tabulka nastavení segmentování metodou watershed.

Metoda watershed má čtyři základní parametry: práh pozadí, minimální práh hmoty buňky, maximální práh hmoty buňky a poloměr morfologického uzavření. Poloměr morfologického uzavření umožňuje odstranění chybně vytvořených děr uvnitř buňky, které mohou vzniknout v místě vakuol či vlivem šumu. Minimální a maximální práh hmoty buňky umožňuje nastavení hranic pro reálné hodnoty buněk, abychom chybně nepovažovali nečistoty a jiné anomálie v obraze za buňku. Zadaný minimální práh by měl vždy být menší jak nejmenší hmotnost buňky ze snímku, aby byla segmentace co nejpřesnější a nemohla být jedna buňka programem rozdělena.

Pro další analýzu je v programu k dispozici řada dalších nástrojů pro zobrazení a vyhodnocení získaných informací. Pro potřebu měření indexu lomu a tloušťky buněk je významná tabulka parametrů, kde jsou zaznamenány u vybraných buněk hodnoty plochy a obvodu buňky, kruhovitost a suchá hmota buňky. Z těchto hodnot jsou pro další výpočty důležité údaje o suché hmotě a ploše. Plocha buňky je dána součtem všech pixelů, na kterých se buňka vyskytuje. Celková plocha buňky  $A$  je dána vzorcem:

$$A = \sum_{i=1}^k n_i S \quad (4.9)$$

kde  $n$  nabývá hodnoty  $n = 1$  pro pixely patřící ploše buňky a mimo ni je  $n = 0$ .  $S$  udává plochu jednoho pixelu a  $k$  je počet pixelů.

Suchá hmota buňky je součet hodnot fáze v pixelech patřící buňce. Celková suchá hmota buňky  $M$  je definována jako

$$M = S \sum_{i=1}^k m_i \quad (4.10)$$

kde  $m_i$  vyjadřuje plošnou hustotu suché hmoty v  $i$ -tém pixelu patřící buňce a  $k$  je počet pixelů.

## 5 Konfokální mikroskopie

### 5.1 Historie konfokální mikroskopie

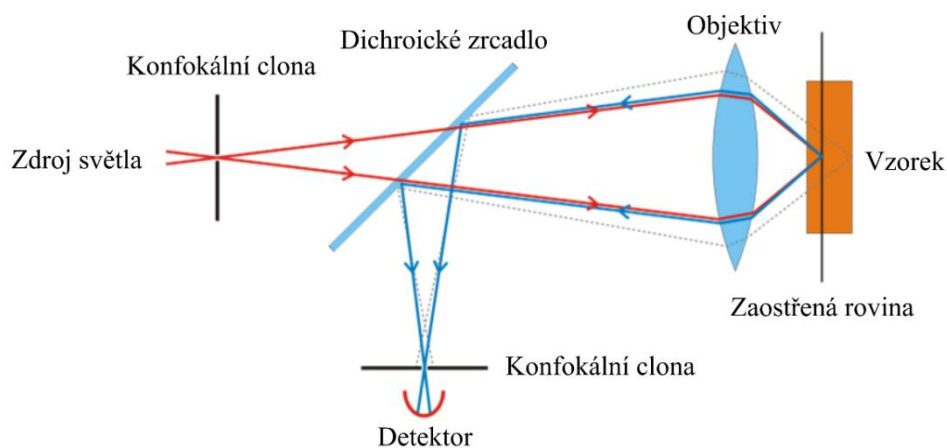
Konfokální mikroskop je založen na principu světelné mikroskopie. Na rozdíl od běžného světelného mikroskopu detekuje světlo pouze z ohniskové roviny, díky čemuž nedochází ke zkreslení obrazu paprsky z jiných rovin vzorku. Metoda umožňuje snímání sérií optických řezů a jejich skládání do prostorových obrazů [19][20].

Princip konfokálního mikroskopu byl patentován v roce 1957 Marvinem Minským [21]. Z důvodů nedostatečného zdroje světla došlo k prvnímu sestavení tohoto mikroskopu až o několik let později. U zrodu prvního konfokálního mikroskopu pak stáli Mojmír Petráň a Milan Hadravský, kteří v roce 1967 patentovali konfokální mikroskop s dvojitým řádkováním [22]. K většímu rozvoji a zlepšení kvality zobrazení pak došlo koncem sedmdesátých let, po zkonstruování prvního laseru. Využití laseru umožnilo rychlejší skenování vzorku, vyšší rozlišení a možnost pozorování fluorescence. První aplikace v buněčné biologii s použitím konfokální laserové řádkovací mikroskopie (CLSM) byly publikovány v roce 1987 [23][24].

### 5.2 Základní konstrukční popis

Intenzivní bodový zdroj světla (laser) směřuje skrz první konfokální clonu na dichroické zrcadlo, které slouží jako dělič svazku. Dále je světelný svazek pomocí objektivu zaostřen na pozorovaný vzorek. Světlo odražené od vzorku je pak sbíráno objektivem. Tento odražený svazek je dichroickým zrcadlem nasměrován přes druhou konfokální clonu na detektor. Druhý konfokální filtr slouží k odfiltrování světla pocházející z oblasti mimo zaostřenou rovinu [19][20].

Základním principem CLSM je tvorba obrazu skládáním informací naskenovaných bod po bodu. Jednotlivé optické řezy jsou umožněny snímáním jednotlivých bodů v rovině xy a přesně definovaným posuvem v ose z. Rastrování je umožněno buď rozmitáním laserového paprsku, příčným posuvem vzorku nebo posuvem objektivu [20][25].



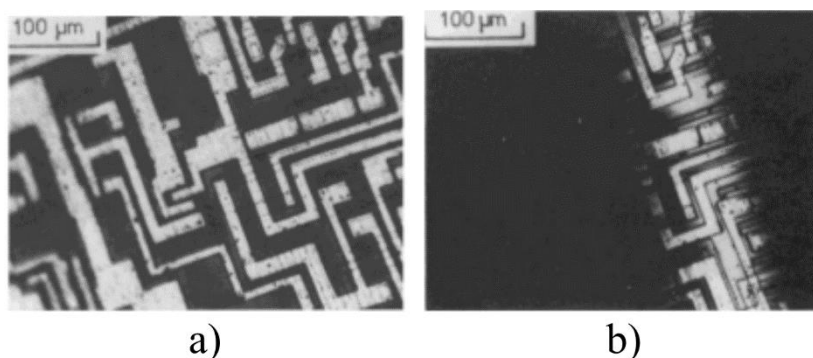
**Obrázek 7:** Základní schéma konfokálního mikroskopu [26].

### 5.3 Základní vlastnosti konfokální mikroskopie

Díky konfokálním clonám je bodový zdroj zobrazen přes vzorek zpět na bodový detektor, tím je zajištěna symetrická konfokální optická soustava. Tuto soustavu, která je znázorněna na obrázku 7, obsahují konfokální mikroskopy umožňující rastrování soustavy pozorováním optických řezů.

Hlavním rysem zobrazení v konfokálním mikroskopu je pozorování ostrých oblastí, které jsou osvětlené. Ostatní oblasti vzorku jsou neosvětlené. Tato vlastnost je znázorněna na obrázku 8. Základní charakteristikou zobrazení konfokálním mikroskopem je osová intenzivní odezva pro rovinný objekt, což je závislost intenzity zobrazení rovinného objektu kolmému k optické ose na jeho rozlišení  $z$ . Další vlastností, která je ovšem stejná i u konvenčních světelných mikroskopů je příčné zvětšení. Tyto dvě vlastnosti závisejí na vlnové délce použitého světla a numerické apertury objektivu, popřípadě na průměru otvorů rastrovacího kotouče u osově odezvy [27].

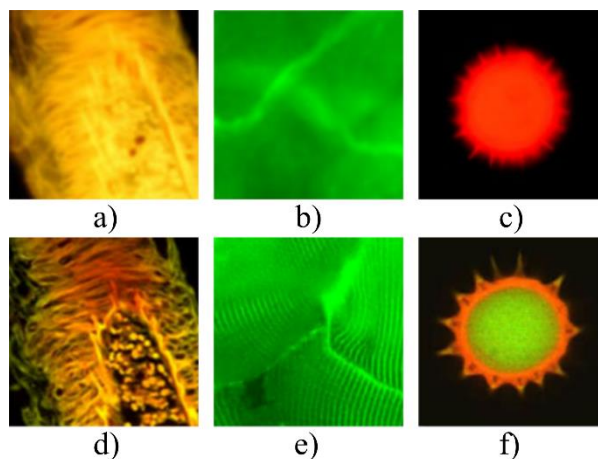
Výhodou této mikroskopické metody je především odstranění informací z mimoohniskových rovin a tím zvýšení rozlišení a kontrastu obrazu. Další výhodou je možnost pozorování prostorových tkání a mnohobuněčných organismů a jejich prostorová rekonstrukce.



**Obrázek 8:** Zobrazení téhož vzorku konvenčním optickým mikroskopem (a) a konfokálním mikroskopem (b). Rozostřené oblasti se v konfokálním mikroskopu jeví jako neosvětlené [27].

### 5.4 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Fluorescenční konfokální mikroskopie kombinuje výhody dvou technik zobrazení, a to fluorescenční, založené na luminiscenci vzorku, a konfokální, umožňující pozorování 3D struktury s vysokým rozlišením. Fluorescenční konfokální mikroskopie využívá laserového zdroje světla k vybuzení vyzařování barviva nebo samotného vzorku. Takto vybuzené světlo prochází konfokálním mikroskopem a je zaznamenáno fotonásobičem. Díky vyloučení fluorescence v oblastech mimo zaostření získáváme kontrastní obraz s viditelnými detaily vzorku. Na obrázku 9 je uvedena řada snímků porovnávající klasickou fluorescenční mikroskopii s konfokální fluorescenční mikroskopií [20].



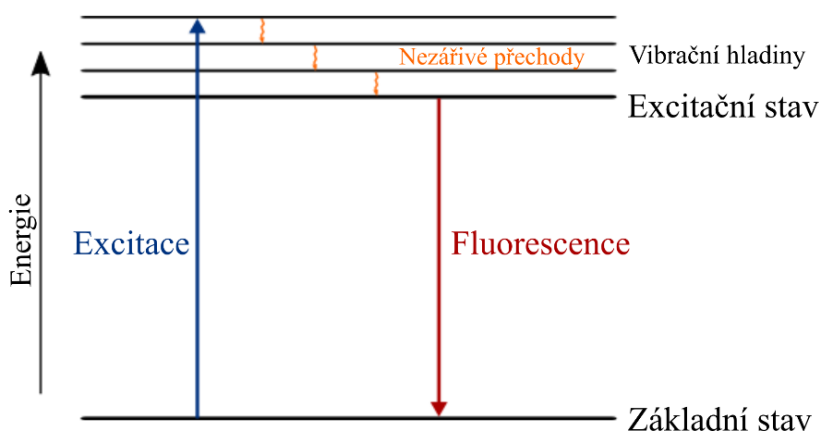
**Obrázek 9:** Vybrané zorné pole v tradičním fluorescenčním mikroskopu (a, b, c) a konfokálním fluorescenčním mikroskopu (d, e, f). [20]

### 5.4.1 Fluorescence

Fluorescence je fyzikální jev založený na schopnosti atomů a molekul absorbovat určité množství excitační energie a vzápětí ji vydat zpět v podobě emisního záření o vyšší vlnové délce a nižší energii. Látka absorbující elektromagnetické záření vstoupí do energeticky vyššího stavu, z něhož se následně vrací do základního stavu pomocí zářivých přechodů s uvolněním fotonu. Tento přechod nastává bezprostředně po excitaci (méně než  $10^{-8}$  s) [19].

Látky vykazující fluorescenci se nazývají fluorochromy. Fluorochromy jsou fluorescenční barviva, která se používají pro barvení preparátů. Jejich vazbou na určitou strukturu či molekulu lze v buňce lokalizovat určité orgány či produkty metabolismu.

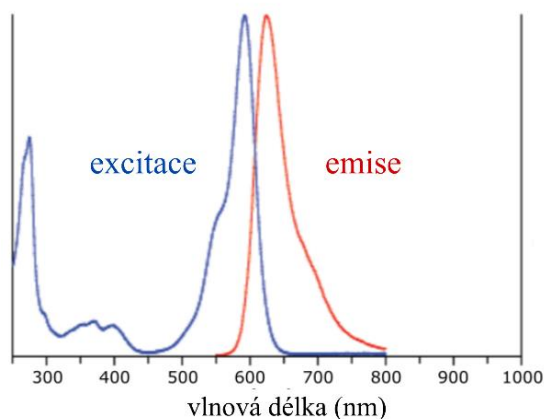
Fluorescence je proces, který se skládá z více stádií, které popisuje Jablonského diagram na obrázku 10. Nejprve zdroj světla emituje foton, který je absorbován fluorochromem. Tím dojde k excitaci elektronu ze základní hladiny do vyššího energetického stavu, tento excitovaný stav trvá však jen určitý čas (1-10 ns) a k excitaci je třeba záření o určité excitační energii. Následně dochází k přechodu elektronu do relaxovaného excitačního stavu, což je nejnižší vibrační hladina. Tento přechod je nezářivý. Z této hladiny pak elektron přechází do původní energetické hladiny a dochází k vyzáření energie ve formě emisního záření – fluorescenci. K tomuto ději nedochází u všech excitovaných elektronů, ale pouze u části. Druhá část pak prochází nezářivými přechody [25][27].



**Obrázek 10:** Jablonského diagram popisující fluorescenci.



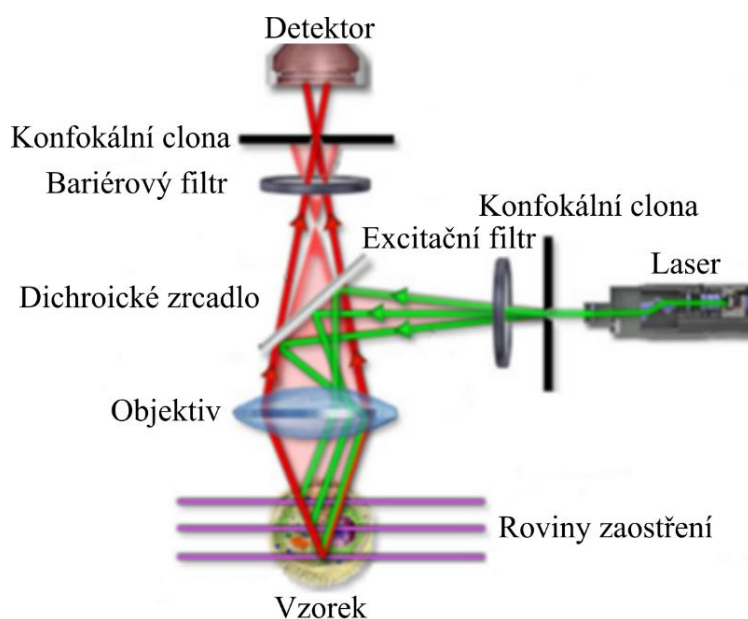
Jako barvivo pro experiment v této práci byl použit Phalloidin (Sigma-Aldrich), což je hepatotoxický cyklický alkaloid, který se používá k barvení biologických preparátů. Vlastností této látky je, že se váže na F-aktin v buňkách, a tím umožňuje fluorescenční pozorování aktinových vláken. Molekuly Phalloidinu jsou malých rozměrů, a tak umožňují husté značení aktinových vláken a detailní zobrazení vzorku s vysokým rozlišením [28]. Toto barvivo má excitaci v 594 nm a emisi v 630 nm, což je patrné na obrázku 11.



**Obrázek 11:** Excitační a emisní spektrum barviva Phalloidin, excitace 594 nm a emise 630 nm [29].

#### 5.4.2 Konstrukční popis

Na obrázku 12 je znázorněna stavba a princip fungování fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Konstrukční popis je obdobný jako u obecného konfokálního mikroskopu. Světlo z bodového zdroje prochází aperturní clonou o velmi malém průměru a excitačním filtrem, který zajistí zdroj světla o potřebné vlnové délce. Vlnové délky prošlé filtrem se odrazí od dichroického zrcadla a po průchodu objektivem dopadnou na vzorek. Pokud na vzorku dojde k fluorescenci, emisní světlo prochází zpět přes objektiv a dichroické zrcadlo. Dále je světlo filtrováno přes bariérový filtr, který blokuje nežádoucí vlnové délky. Nakonec jsou konfokální clonou odfiltrovány informace z nezaostřených rovin a excitované světlo je zaznamenáno na detektor [20].



**Obrázek 12:** Schéma konfokálního fluorescenčního mikroskopu [20].



## 5.5 Nastavení konfokálního mikroskopu

Pro účely této práce byl použit konfokální mikroskop Nikon Confocal system A1R se systémem ECLIPSE Ti-E. K experimentu byly použity apochromatické objektivy se zvětšením 20× a numerickou aperturou  $NA = 0,75$ . Velikost konfokální clony byla nastavena na 14  $\mu\text{m}$ . Snímky byly snímány rychlostí 1 snímek za 16 sekund. Jelikož bylo k barvení použito barvivo Phalloidin, které má vlnovou délku excitace 594 nm, byl jako zdroj světla použit laser o vlnové délce 514 nm, který z možných zdrojů nejlépe odpovídá vlnové délce excitace. Detekce byla nastavena v rozmezí (570 – 620) nm, abychom byli schopni zachytit emisi barviva, která je 630 nm. Nastavené rozlišení snímků je (1024×1024) px, velikost zobrazovaného pole je (635×635)  $\mu\text{m}$ .



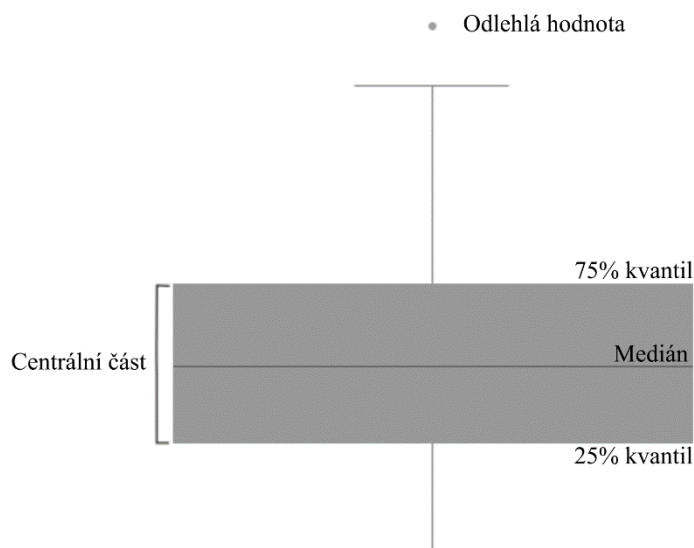
## 6 Testování statistických hypotéz

Testování statistických hypotéz je důležité pro vyhodnocování experimentálně naměřených dat nejen v biologickém a medicínském výzkumu. Statistickou analýzou dat získaných sledováním měřené náhodné veličiny v experimentu jsme schopni rozhodnout o platnosti určitého tvrzení tedy statistické hypotézy na úrovni celé populace.

Nejčastějším typem experimentu je tzv. komparativní experiment, kde pracujeme s minimálně dvěma skupinami. Skupina se změněnými podmínkami se nazývá experimentální skupina, skupina s nezměněnými podmínkami je pak kontrolní skupina. Kontrolní skupina slouží k zachycení případných nepřesností experimentu. Cílem statistické analýzy experimentálních dat je zjištění a kvantitativní specifikace rozdílu mezi jednotlivými skupinami prostřednictvím statistických metod pro vzájemné porovnání výběrových souborů.

### 6.1 Testování normality dat

Normalitu dat je možné předpokládat vizuálně nebo pomocí testů významnosti. Jednou z vizuálních metod je sestavení boxplotu (obrázek 13). Centrální část diagramu je shora ohraničena 3. kvantilem a zespodu 1. kvantilem. Mezi nimi se nachází medián, který je znázorněn vodorovnou linií. Linie vycházející kolmo nahoru a dolů (whiskers úsečky) označují minima a maxima dat bez odlehlých hodnot. Odlehlé hodnoty jsou pak vykresleny jako jednotlivé body. V případě, kdy jsou whiskers úsečky symetrické a medián se nachází přibližně uprostřed, můžeme předpokládat, že soubor má normální rozložení dat.



Obrázek 13: Boxplot.

### 6.2 F-test

Cílem F-testu je ověřit, zda dva výběrové soubory pochází z rozdělení se stejným rozptylem, což znamená ověřit, zda oba soubory vykazují přibližně stejný rozptyl sledované náhodné veličiny. V F-testu testujeme nulovou hypotézu  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ .

Při F-testu předpokládáme, že oba soubory pochází z populace s Gaussovým normálním rozložením. Z těchto dvou souborů s neznámými rozptyly vybereme vzorek s rozsahem  $n_1$ , resp.  $n_2$ . Vypočítáme výběrové rozptyly podle vzorce:

$$s_i^2 = n \frac{\sum_{j=1}^n x_j^2 - \frac{(\sum_{j=1}^n x_j)^2}{n_i}}{n_i - 1}, \quad (6.1)$$

kde je  $x_j^2$  kvadrát j-tého členu náhodného výběru a  $n_i$  je počet členů v náhodném výběru. Stanovíme počet stupňů volnosti  $k_i$  pro oba výběry

$$k_i = n_i - 1, \quad (6.2)$$

a vypočítáme testovací kritérium F pomocí vztahu:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad (6.3)$$

kde do čitatele vždy dosazujeme větší z rozptylů,  $s_1^2 > s_2^2$ . Obdobně platí, že  $k_1 > k_2$ , kde  $k_i$  je počet stupňů volnosti patřící náhodnému výběru s vyšší hodnotou rozptylu  $s_1^2$ . Dále je třeba zvolit hladinu významnosti  $\alpha$ . Ve statistických tabulkách pak lze dohledat odpovídající kritickou hodnotu pro F-test:

$$F_{krit} = 1 - \frac{\alpha}{2}. \quad (6.4)$$

Následně vypočítané testovací kritérium  $F$  porovnáme s tabulkovou kritickou hodnotou. V případě, že  $F > F_{krit}$  zamítneme nulovou hypotézu  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  a dostaneme, že rozptyly obou výběrů se statisticky významně liší. V opačném případě, kdy  $F < F_{krit}$  nulovou hypotézu zamítnout nemůžeme a předpokládáme, že rozptyl obou výběrů se statisticky významně neliší [30].

## 6.3 T-test

Studentův t-test je parametrickým testem, který se používá pro testování rozdílu středních hodnot ( $\mu$ ) dvou náhodných výběrů. T-test je možné rozdělit na jednovýběrový a dvouvýběrový. U jednovýběrového t-testu je náhodný výběr tvořen jednotlivými hodnotami, u dvouvýběrového pak dvojicemi hodnot, u nichž se zkoumají rozdíly. Dvouvýběrový t-test se pak dělí na párový a nepárový. Párový test se používá pro měření jedné skupiny dvěma různými metodami. Nepárový test se používá při zkoumání dvou nezávislých skupin. V praxi se tyto testy používají k porovnání, zda se výsledky měření jedné skupiny výrazně liší od výsledků druhé skupiny. V této práci bude aplikován nepárový t-test.

Hypotéza nepárového dvouvýběrového t-testu je  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ . Výpočet testu vychází z odhadů parametru obou porovnávaných skupin, tj. aritmetického průměru a výběrového rozptylu. Testované parametry mohou být ze souborů se stejným nebo různým rozptylem, proto je nutné rozptyly otestovat pomocí F-testu. Podle výsledku F-testu pak volíme typ t-testu.

Při stejném rozptylu lze použít t-test s testovacím kritériem

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}, \quad (6.5)$$

kde  $n_1$  a  $n_2$  jsou počty členů výběrů,  $\bar{x}_1$  a  $\bar{x}_2$  jsou jejich aritmetické průměry,  $s$  je celková směrodatná odchylka.

Stupně volnosti pro t-test při stejném rozptylu se počítají jako

$$k = n_1 + n_2 - 2. \quad (6.6)$$

Při různém rozptylu lze použít jiný t-test s testovacím kritériem

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}, \quad (6.7)$$

kde  $s_1^2$  a  $s_2^2$  jsou rozptyly výběrů.

Stupně volnosti pro t-test při různém rozptylu jsou dány vztahem:

$$k = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}. \quad (6.8)$$

Vypočítané testovací kritérium  $t$  následně porovnáme s tabulkovou kritickou hodnotou  $t_{1-\frac{\alpha}{2}}$ , kterou najdeme podle stupně volnosti a zvolené hladiny významnosti  $\alpha$ , která může nabývat hodnoty 0,05; 0,01 a 0,001 [30][31].

V případě, že zamítáme nulovou hypotézu  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , tzn. že střední hodnota experimentálního souboru se statisticky významně liší od střední hodnoty kontrolního souboru. Rozdíl středních hodnot je statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a velmi statisticky významný na hladině  $\alpha = 0,001$ . V případě, že nelze nulovou hypotézu zamítnout předpokládáme, že střední hodnota experimentálního souboru se statisticky neliší od hodnoty kontrolního souboru. Rozdíl mezi  $\mu_1$  a  $\mu_2$  je statisticky nevýznamný.



## 7 Experimentální část

V následující kapitole je nejdříve popsána příprava experimentu zahrnující kultivaci buněk, přípravu pozorovací komůrky, fixaci a barvení buněk a měření indexu lomu použitých médií. Následuje podkapitola týkající se zpracování a vyhodnocení naměřených dat. Nakonec jsou představeny výsledky jednotlivých měření, ve kterých bylo cílem změřit index lomu a tloušťku buňky koherencí řízeným holografickým mikroskopem.

Pro tuto práci byly uskutečněny celkem tři experimenty. První – časoběrný, kdy bylo snímáno stejné zorné pole po celou dobu měření, včetně výměny média. Druhý, kdy byly zvláště porovnávány hodnoty z částí buněk – jader, jader a periferie. Data týkající se tloušťky jednotlivých částí buněk pak byla porovnána s daty z CLSM, kde byl změřen týž vzorek a stejné zorné pole. Třetí měření bylo provedeno též jako porovnání dat z MHM a CLSM, ale jednalo se o průměrné hodnoty pozorovaných parametrů z celých buněk.

### 7.1 Příprava experimentu

#### 7.1.1 Kultivace buněk

Pro všechny experimenty této práce byly použity buňky K2 (myší nádorové nemetastazující embryonální fibroblasty). Buněčné linie těchto buněk jsou dlouhodobě uchovávány v zmraženém stavu v kapalném dusíku. Buňky použité pro tento experiment byly kultivovány v laboratoři Experimentální biofotoniky na ÚFI FSI VUT v kultivačních lahvičkách v inkubátoru při teplotě 37°C s 3,5% koncentrací CO<sub>2</sub>. Při kultivaci je třeba pracovat ve sterilním prostředí, proto se při manipulaci s buňkami používá laminární box, kde díky laminárnímu proudění vzduchu a filtrům je udržována maximální čistota. Tento systém také zabraňuje případné kontaminaci vzorku.

Buňky K2 byly pěstovány na povrchu kultivační lahvičky v kultivačním médiu M1H, které bylo obohaceno o fatální telecí sérum (FCS), které slouží k vyživení buněk. Více informací o M1H lze najít například v diplomové práci H. Janečkové [13]. Během kultivace bylo nutné médium několikrát vyměnit, protože jej buněčné metabolity okyselují. V případě, kdy došlo k vytvoření souvislého porostu, bylo třeba buňky oddělit od povrchu. Tento proces nazývaný trypsinizace je blíže popsán v bakalářské práci J. Bartoníčka [32]. Následně byly buňky přepočítány v Bürkerově komůrce v mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro jednotlivé experimenty bylo použito kolem 20 000 buněk.

#### 7.1.2 Pozorovací komůrka

K pozorování buněk v multimodálním holografickém i konfokálním mikroskopu byla použita komůrka  $\mu$ -Slide I Luer od firmy Ibidi. Tato komůrka umožňuje pozorovat pohyb buněk i jejich celkovou dynamiku a umožňuje výměnu média. Komůrka (obrázek 14) se skládá ze tří částí: rezervoáru o délce 50 mm a objemu 200  $\mu$ l, dvou plnicích otvorů a dvou kloboučků sloužících k uzavření plnicích otvorů. Abychom mohli vyměnit během měření médium, bylo třeba komůrku upravit. K plnicím otvorům byly připojeny hadičky, aby mohlo dojít k výměně média během pozorování v prostoru mikroskopu a to tak, aby nedošlo k posunutí komůrky, a tím

i měřeného zorného pole, ani ke kontaminaci prostoru mikroskopu. Pro výměnu média byla použita stříkačka.

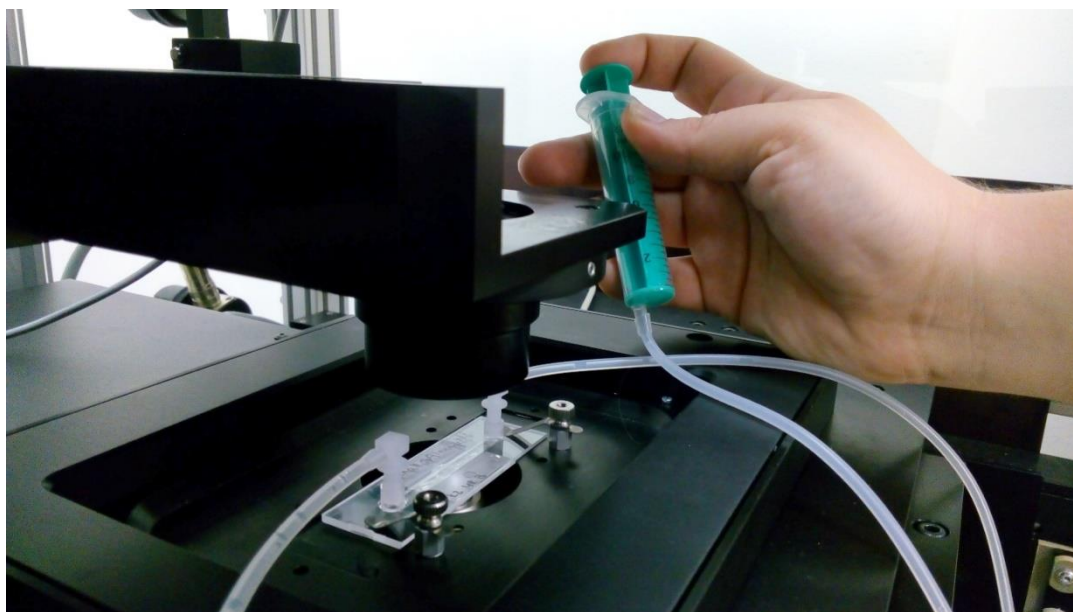


**Obrázek 14:** Komůrka  $\mu$ -Slide I Luer [33].

### 7.1.3 Pozorování

Pro všechny experimentální měření na multimodálním holografickém mikroskopu byl použit objektiv se zvětšením  $10\times$  a numerickou aperturou  $NA = 0,3$ , filtr s maximální propustností  $650\text{ nm}$  a osvětlením na  $90\%$ .

Aby mohlo během měření dojít k výměně média v pozorovací komůrce, byly k plnicím otvorům připojeny hadičky. Jedna sloužila pro připojení stříkačky s médiem s vyšším indexem lomu a druhá pro odtok přebytečného média mimo prostor mikroskopu. Výměna média probíhala se vzorkem umístěným v mikroskopu, jak je vidět na obrázku 15. K výměně docházelo vždy co nejrychleji, ale zároveň velmi opatrně, aby nedošlo k posunutí vzorku či k odplavení pozorovaných buněk.



**Obrázek 15:** Výměna média v pozorovací komůrce během měření.



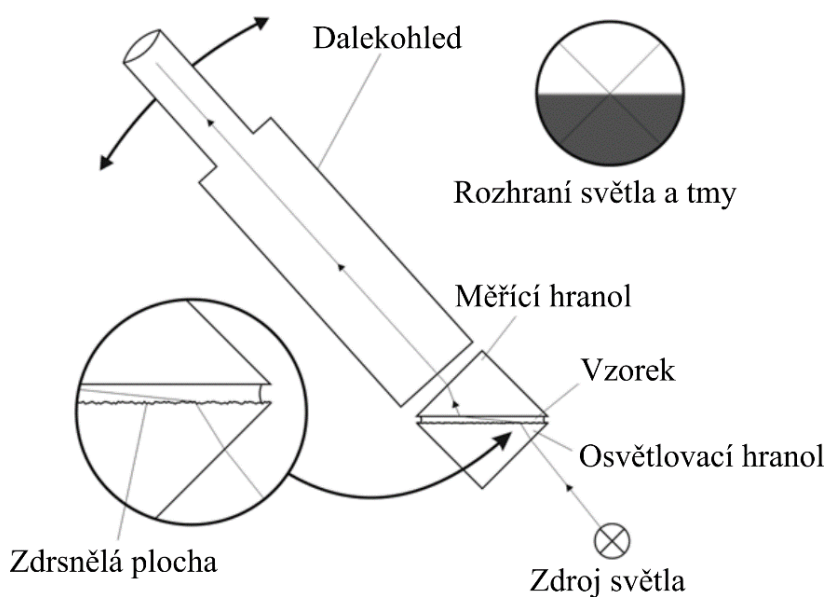
#### 7.1.4 Fixace a barvení buněk

Pokud nechceme pozorovat živé buňky a jejich dynamiku, můžeme buňky fixovat. Fixované buňky vydrží delší dobu a také máme zaručeno, že se během experimentu nebudou hýbat. Jedná se vlastně o chemické usmrcení buněk, které musí být provedeno velice šetrně, aby buňka nezměnila tvar a vnitřní uspořádání. K fixaci lze použít například 3,7 % roztok formaldehydu, který byl použit i pro fixaci buněk pro experimenty měření indexu lomu a tloušťky buněk.

Pro pozorování buněk v konfokálním fluorescenčním mikroskopu je třeba buňky nejen fixovat, ale také obarvit. Před barvením je nutné nejprve permeabilizovat buněčné membrány, čímž je umožněn vstup barvicích látek. K tomuto účelu byl použit detergent Triton X-100. Buňky pak byly barveny Phalloidinem po dobu 40 minut.

#### 7.1.5 Měření indexu lomu médií

Znalost indexu lomu média je nezbytná pro výpočet indexu lomu a tloušťky buněk. K určení indexu lomu kapalin slouží Abbeho dvouhranolový refraktometr. Schéma refraktometru je na obrázku 16. Hlavní část je tvořena osvětlovacím a měřícím hranolem. Tyto hranoly jsou vyrobeny z islandského vápence a umožňují měřit index lomu v rozmezí 1,3 až 1,7.



**Obrázek 16:** Schéma Abbeho refraktometru [34].

Princip měření je založen na zjišťování mezního úhlu lomu, což je maximální možný úhel lomu. Měřená kapalina je kápnuta mezi dva hranoly, čímž se utvoří tenká vrstva. Světlo prochází osvětlovacím hranolem a je rozptýleno jeho zdrsňelou plochou, čímž vstupuje do měřené kapaliny všemi směry. Při vhodném pootočení hranolů tak můžeme pozorovat rozhraní dané mezními paprsky, které vystupují z měřícího hranolu, kde dochází k lomu. Poloha rozhraní mezi světlou a tmavou oblastí závisí na velikosti mezního úhlu a současně na hodnotě indexu lomu kapaliny. U většiny dvouhranolových Abbeho refraktometrů je odečítací stupnice přímo v hodnotách indexu lomu, stejně tomu je i u námi použitého refraktometru (Abbe-Refractometer AR4).

Pro experimenty této práce bylo nutné změřit index lomu dvou médií. Nejprve kultivační médium M1H a následně médium s přidaným Histodenzem, které by mělo mít vyšší

index lomu. Změřené hodnoty indexu lomu jsou zaznamenány v tabulce 1. Oba indexy lomu byly měřeny při teplotě 25°C. Dělení odečítací stupnice je 0,0005 a přesnost měření je 0,0002 [35].

**Tabulka 1:** Naměřené indexy lomu použitých médií.

Měřené médium	Index lomu
M1H	1,3352
M1H + Histodenz	1,3384

## 7.2 Zpracování naměřených dat

Pro analytické zpracování dat byla potřebná nejprve segmentace buněk pomocí programu Q-Phase, což je podrobněji popsáno v kapitole 4.6. Po segmentaci buněk byly informace o ploše a suché hmotě buněk, které lze snadno převést na potřebné hodnoty fáze, importovány do tabulky.

Další zpracování dat probíhalo v programu MATLAB, kde byly sepsány skripty pro výpočet indexu lomu a tloušťky buněk pomocí vzorců 4.7 a 4.8. Do MATLAB byly exportovány data s informacemi o fázi měřených buněk jak v běžném médiu M1H, tak v médiu s vyšším indexem lomu, kde do M1H byl přidán Histodenz. Data byla převedena do matic, jelikož pro MATLAB jsou matice klíčovou datovou strukturou při výpočtech.

Skripty byly napsány dva. První pro výpočet indexu lomu a tloušťky buněk v určitých jejich částech jako je jádérko, jádro a periferie. Nejprve byly načteny matice obsahující informaci o fázi měřených buněk ve dvou různých médiích (*M1H\_array.mat*; *M1H\_Histodenz\_array.mat*). Následně byly pomocí vzorce 4.7 vypočítány integrální indexy lomu buněk v jednotlivých částech a pomocí vzorce 4.8 jejich tloušťky. Dále pomocí funkce *nanmean* byly zjištěny průměrné hodnoty indexu lomu a tloušťky pro jádérko, jádro a periferii buněk.

```
clear all;
close all;
clc;

load M1H_array.mat
load M1H_Histodenz_array.mat

lambda = 650;
delta_RI = 0.003;
RI_M1H = 1.3352;

for i = 1:size(M1H_array,1)
    for j = 1:size(M1H_array,2)
        RI(i,j) = ((delta_RI * M1H_array(i,j))/(M1H_array(i,j) -
M1H_Histodenz_array(i,j))) + RI_M1H;
        thickness(i,j) = (lambda/(2*pi)) * ((M1H_array(i,j)-
M1H_Histodenz_array(i,j))/delta_RI);
    end
end

RI_nucleolus_mean = nanmean(RI(:,1));
RI_nucleus_mean = nanmean(RI(:,2));
RI_perifery_mean = nanmean(RI(:,3));
```

```
thickness_nucleolus_mean = nanmean(thickness(:,1));
thickness_nucleus_mean = nanmean(thickness(:,2));
thickness_perifery_mean = nanmean(thickness(:,3));
```

Druhý skript byl napsán pro výpočet průměrného indexu lomu a tloušťky buňky. Zde podobně jako v předchozím skriptu byly načteny informace o fázi buněk ve dvou různých médiích. V tomto případě se jednalo o průměrné hodnoty fáze z celých buněk. Pro vyhodnocení dat tohoto experimentu byly také použity vzorce 4.7 a 4.8.

Nakonec bylo nutné statistické zpracování dat, které je podrobně popsáno v 6. kapitole. Pro odhad normality dat byly použité boxploty. Pokud soubor dat splňoval podmínku normality, byl na něho aplikovaný F-test s hladinou významnosti  $p_0 = 0,05$ . Tento test byl použit pro zjištění rozdílu rozptylů dvou souborů dat. Výsledek tohoto testu byl důležitý pro správný výběr t-testu.

Podle výsledku F-testu byl vybrán t-test pro soubory se stejným rozptylem, nebo t-test pro soubory s různým rozptylem. Pro t-test byly zvoleny tři hladiny významnosti  $p_0 = 0,05$ ,  $p_1 = 0,01$  a  $p_2 = 0,001$ . V případě, že  $p$  vypočítané z t-testu je  $p > p_0$  předpokládáme, že aplikovaný pokus neměl vliv na změnu středních hodnot pozorovaného parametru a nulovou hypotézu  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  přijímáme. V opačném případě, kdy  $p < p_0$  (\*) (resp.  $p < p_1$  (\*\*);  $p < p_2$  (\*\*\*)) předpokládáme, že aplikovaný pokus měl vliv na změnu střední hodnoty pozorovaného parametru a nulovou hypotézu  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  zamítáme.

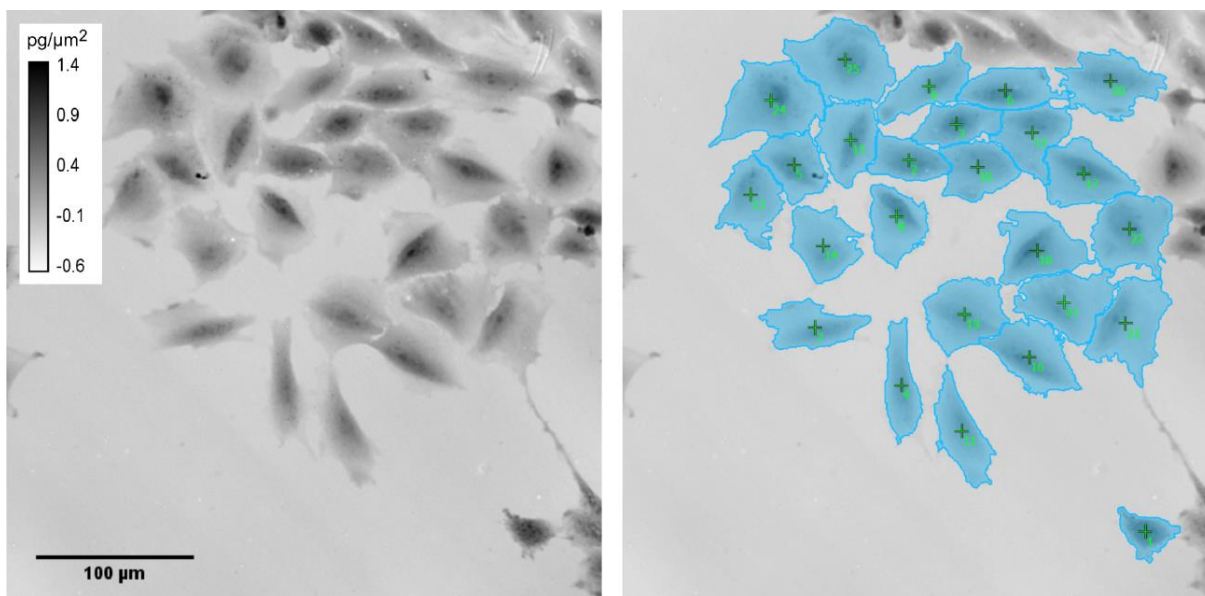
## 7.3 Výsledky

Celkem byly uskutečněny tři měření. Nejprve proběhlo časosběrné snímání buněk, při němž bylo snímáno jedno zorné pole po celou dobu měření včetně výměny média. Následně byly měřeny fixované buňky multimediálním holografickým a konfokálním skenovacím mikroskopem. Z těchto dat pak byly zjišťovány informace o vybraných buněčných strukturách. Poslední měření pak proběhlo kvůli určení průměrných hodnot indexu lomu a tloušťky buněk.

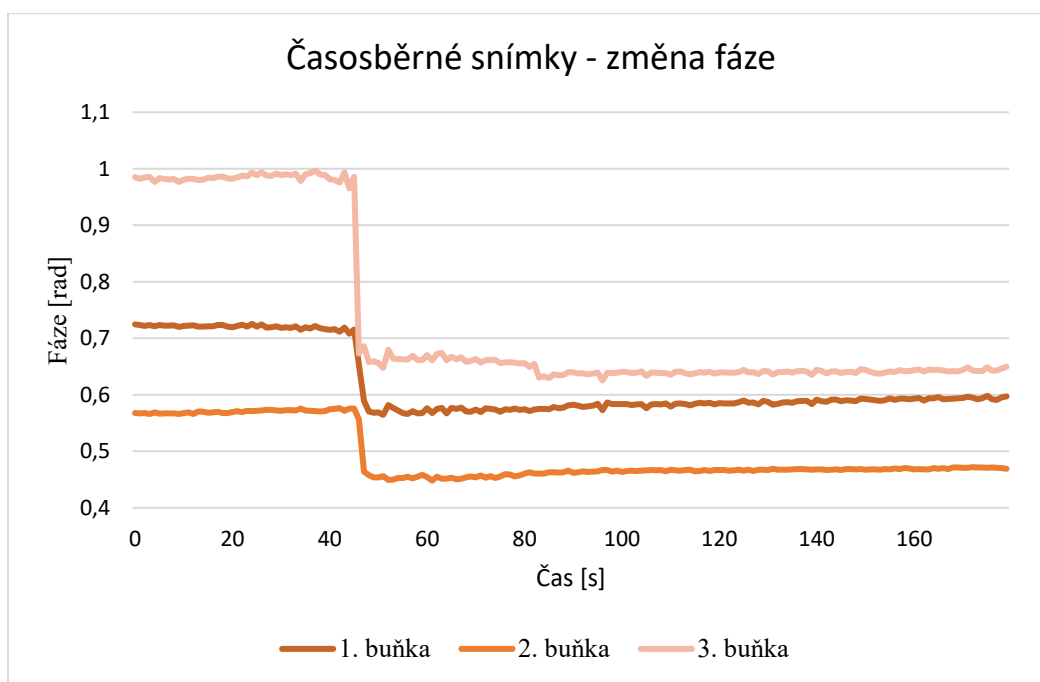
### 7.3.1 Časosběrné snímání

První měření probíhalo jako časosběrné, kdy získávání dat probíhalo po celou dobu pozorování včetně výměny média. Snímání probíhalo po dobu 179 s. Nejprve byly pozorovány buňky ve standardním médiu M1H. Po přibližně 45 s došlo k postupné výměně celého objemu pozorovací komůrky za médium s vyšším indexem lomu (M1H + Histodenz). Po celou dobu měření bylo snímáno stejné zorné pole.

Naměřená data byla následně zpracována. Segmentace buněk je znázorněna na obrázku 17. Pro vybrané buňky byl ze zpracovaných dat vytvořen graf znázorňující závislost fáze vztažené na jeden pixel na čase. Z obrázku 18 je patrné, že okamžitě po výměně média, tedy přibližně po 45 s, došlo k výraznému snížení fáze.



**Obrázek 17:** Zobrazení buněk K2 multimodálním holografickým mikroskopem a jejich segmentace.

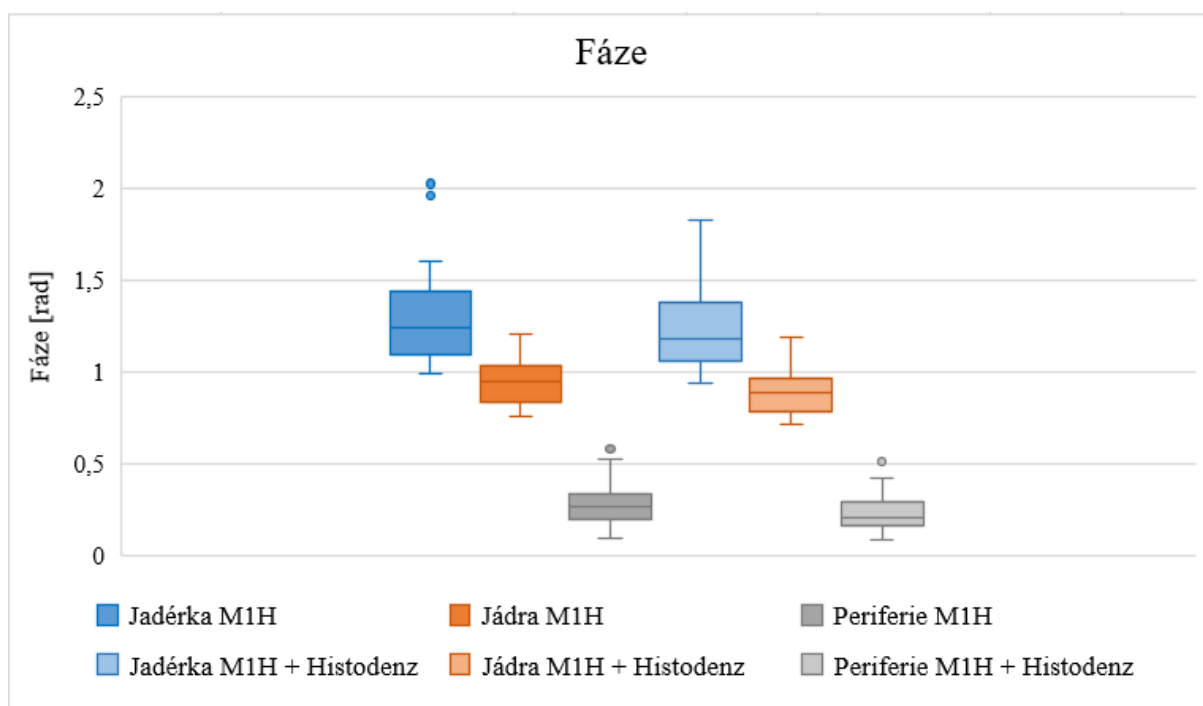


**Obrázek 18:** Graf znázorňující vývoj fáze v čase při výměně média buněk.

Tímto měřením jsme potvrdili předpoklady pro použití metody určení indexu lomu a tloušťky buněk, která předpokládá různé hodnoty fáze při použití médií o různých indexech lomu. Je jasně patrné, že při zvýšení indexu lomu média dojde ke snížení fáze. Z tohoto rozdílu lze určit index lomu a tloušťku buňky v daném pixelu.

### 7.3.2 Měření indexu lomu a tloušťky buněčných struktur

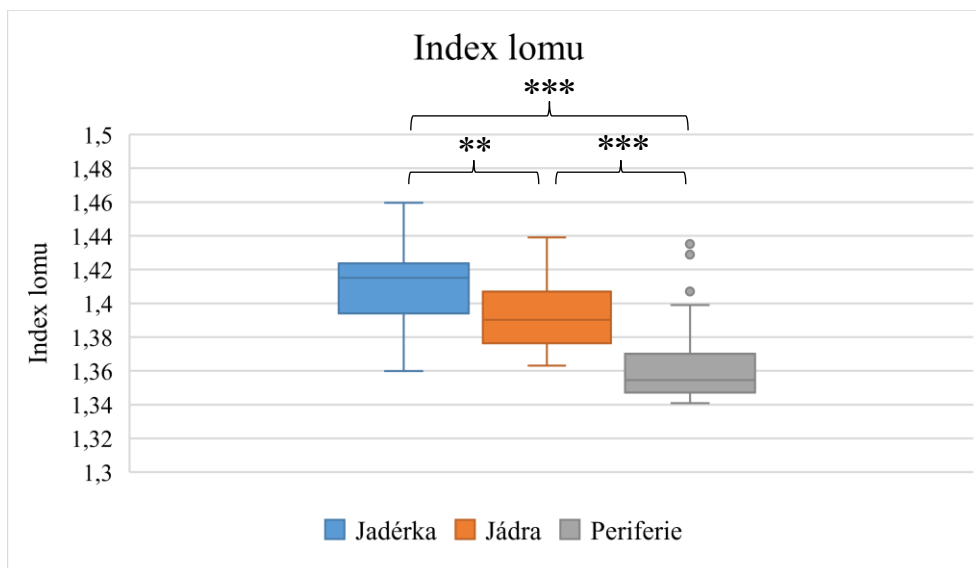
V druhém měření byly pozorovány tytéž buňky na multimodálním holografickém mikroskopu a konfokálním skenovacím mikroskopu. Analyzovány byly vybrané buněčné struktury, tedy jádérka, jádra a periferie buňky. Buňky pro tento experiment byly barveny a fixovány (viz podkapitola 7.1.4), aby byly snímány tytéž buňky a jejich struktury ve stejném stavu a nedošlo během přenosu vzorku k jejich přesunu či změně uspořádání. Změřené fáze v médiu M1H i M1H + Histodenz jsou graficky znázorněny na obrázku 19.



**Obrázek 19:** Graf zaznamenaných fází v médiu M1H a M1H + Histodenz.

Zjištěné hodnoty fáze jsou dále použity pro výpočet indexu lomu a tloušťky v daných částech buněk. Hodnoty fáze v obou médiích jsou pomocí skriptu vytvořeného v MATLABU (viz podkapitola 7.2) převedeny metodou určení indexu lomu a tloušťky buněk na hodnoty požadovaných parametrů buněk, tedy na index lomu a tloušťku.

Indexy lomu vybraných částí buněk vypočítaných pomocí vzorce pro výpočet integrálního indexu lomu (vztah 4.7) byly dále analyzovány. Ze statistického zpracování, jehož výsledky jsou na obrázku 20 a tabulkách 2 a 3 lze říci, že indexy lomu jednotlivých částí buňky se statisticky významně liší. Různost indexů lomu značí, že struktura a složení jednotlivých částí buněk není stejná a mohou tedy vykazovat různé optické vlastnosti.



**Obrázek 20:** Graf zobrazující výsledky měření indexu lomu jednotlivých částí buněk. V grafu jsou vyznačeny symboly popisující statistickou významnost hypotézy  $p > p_0$  (o),  $p < p_0$  (\*),  $p < p_1$  (\*\*),  $p < p_2$  (\*\*\*)

**Tabulka 2:** Výsledky F-testu aplikovaného na index lomu pozorovaných částí buněk.

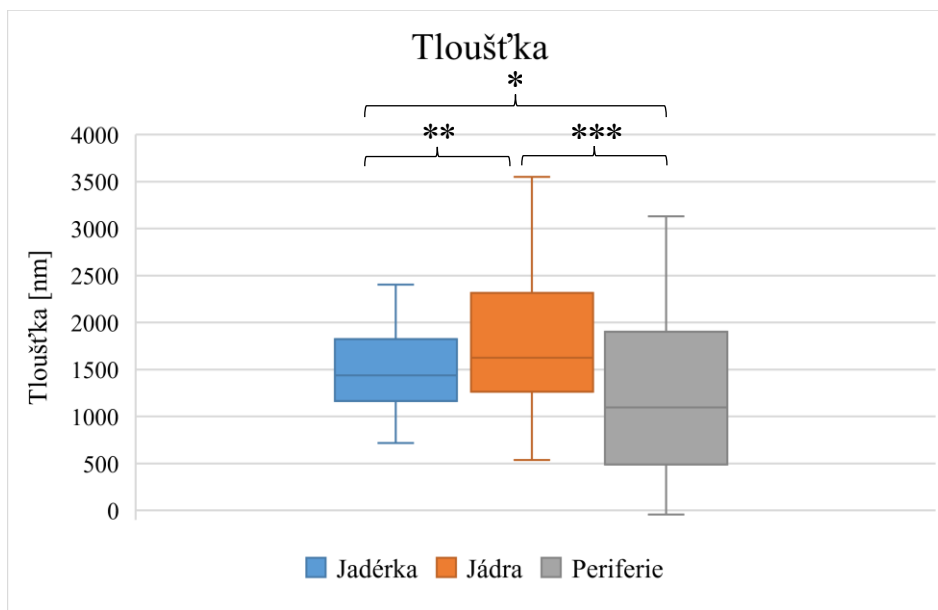
	jadérka a jádra	jádra a periferie	jadérka a periferie
p =	0,198967	0,500741	0,389498
	$p > p_0$	$p > p_0$	$p > p_0$
	stejné $\sigma^2$	stejné $\sigma^2$	stejné $\sigma^2$

**Tabulka 3:** Výsledky t-testu aplikovaného na index lomu pozorovaných částí buněk.

	jadérka a jádra	jádra a periferie	jadérka a periferie
p =	0,004107	$2,26476 \times 10^{-8}$	$4,45167 \times 10^{-11}$
	$p < p_1$	$p < p_2$	$p < p_2$
	různé $\mu$ (**)	různé $\mu$ (***)	různé $\mu$ (***)

Posledním z pozorovaných parametrů byla tloušťka buněk v jednotlivých jejich částech. Vypočítané hodnoty v jadérku a jádru nejsou čistě tloušťkou těchto organel, ale zahrnují i údaje o objemu cytoplasmy pod a nad těmito strukturami. Určení výškových rozměrů jednotlivých organel není možný, protože změřené hodnoty fáze zahrnují informace o průchodu celou buňkou a nikoli pouze jejich částmi (jadérkem či jádrem).

Po statistickém zpracování získaných hodnot tloušťky buněk v pozorovaných částech jsme dospěli také k závěru, že tloušťky buněk v daných částech se statisticky významně liší. Tyto informace se shodují s všeobecným modelem buňky, kde největší výškový rozměr je v oblasti jádra, a naopak nejmenší na okrajích buněk tedy v periferii. Tyto výsledky jsou zaznamenány na obrázku 21 a tabulkách 4 a 5.



**Obrázek 21:** Graf zobrazující výsledky měření tloušťky jednotlivých částí buněk. V grafu jsou vyznačeny symboly popisující statistickou významnost hypotézy  $p > p_0$  (o),  $p < p_0$  (\*),  $p < p_1$  (\*\*),  $p < p_2$  (\*\*\*)

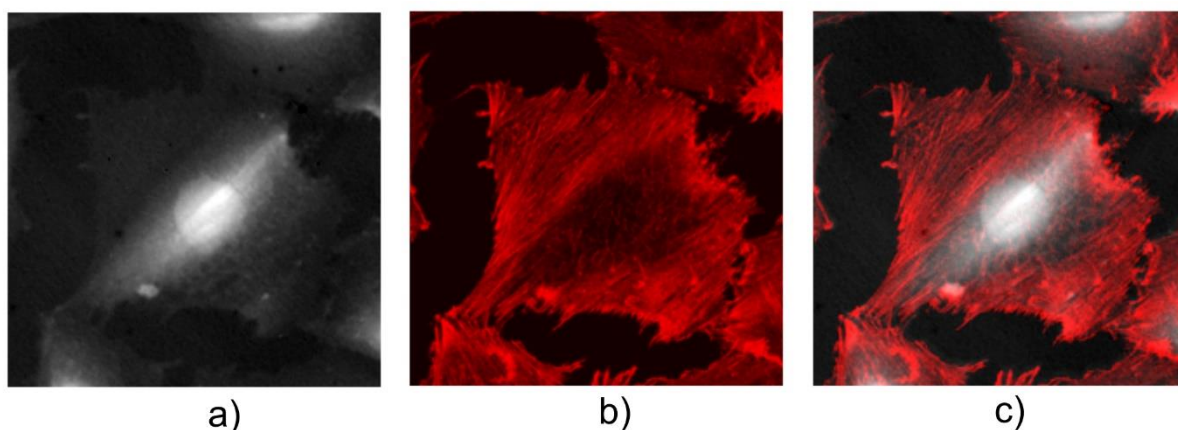
**Tabulka 4:** Výsledky F-testu aplikovaného na tloušťku pozorovaných částí buněk.

	jadérka a jádra	jádra a periferie	jadérka a periferie
p =	0,024192	0,820767	0,012647
	$p < p_0$	$p > p_0$	$p < p_0$
	různé $\sigma^2$	stejné $\sigma^2$	různé $\sigma^2$

**Tabulka 5:** Výsledky t-testu aplikovaného na tloušťku pozorovaných částí buněk.

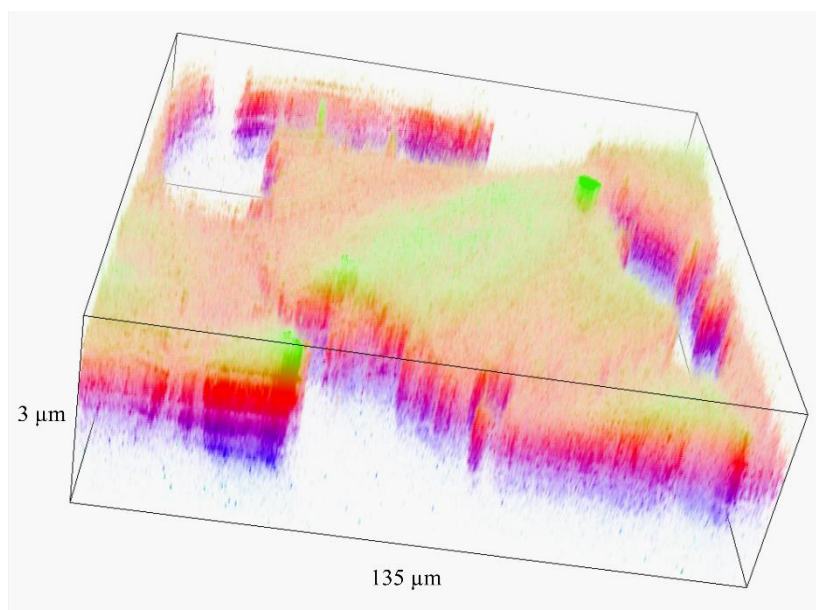
	jadérka a jádra	jádra a periferie	jadérka a periferie
p =	0,036085	0,000652	0,039473
	$p < p_1$	$p < p_2$	$p < p_0$
	různé $\mu$ (**)	různé $\mu$ (***)	různé $\mu$ (*)

Výsledky vyhodnocení tloušťky buněk v částech buňky, kde je jádro a periferie, byly porovnány s tloušťkou získanou z dat naměřených konfokálním skenovacím mikroskopem. Porovnat hodnoty tloušťky jadérka se nepodařilo, protože ze snímků buněk barvených Phalloidinem není možné jadérka lokalizovat, jelikož jsou barvena aktinová vlákna, která se vyskytují v cytoplasmě a nikoli jádru, kde jsou jadérka umístěna. Hodnoty v oblasti jádra lze získat díky aktinovým vláknům procházejícím nad a pod jádrem. Lokaci jádra ve snímcích z konfokálního mikroskopu lze určit pomocí snímků z multimodálního holografického mikroskopu, a to konkrétně po proložení obrazů téže buňky v MHM, kde je jádro viditelné, a obrázku z CLSM, kde jsou značena aktinová vlákna. Snímky téže buňky pořízené multimodálním holografickým a konfokálním skenovacího mikroskopem jsou na obrázku 22. Na témže obrázku je vidět i proložení těchto snímků sloužící k určení polohy jádra.



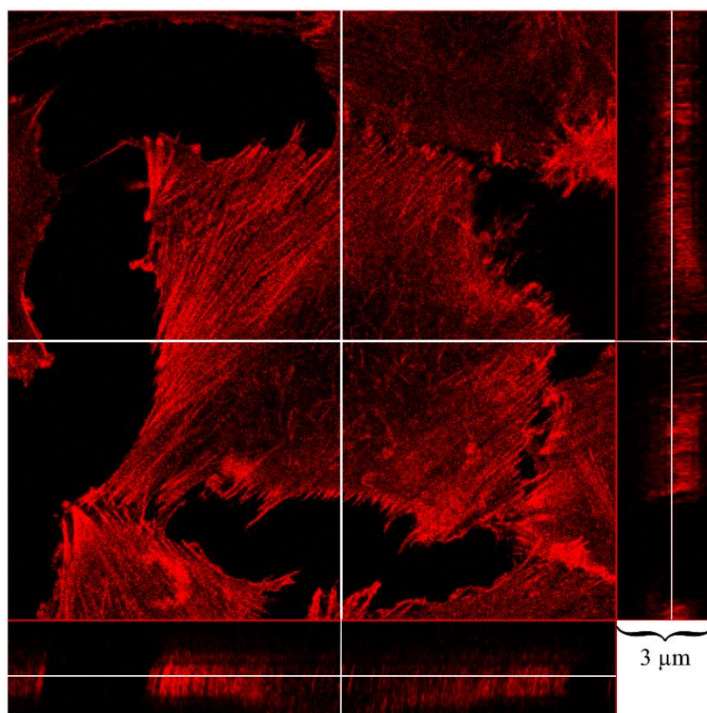
**Obrázek 22:** Snímek téže buňky pořízený multimodálním holografickým mikroskopem (a) a konfokálním skenovacím mikroskopem (b). Na posledním obrázku (c) je pak proložení snímků pořízených oběma technikami. Velikost zobrazené části je  $135\ \mu\text{m} \times 135\ \mu\text{m}$ .

Ze snímků z konfokálního skenovacího mikroskopu lze určit tloušťku buňky pomocí odečtení hodnot z řezu buňkou. Na obrázku 23 je 3D zobrazení buňky pořízené CLSM. Pomocí řezu buňkou lze stanovit první a poslední snímek zachycující buňku v pozorovaném místě. Rozdíl těchto snímků v nm pak udává tloušťku buňky v daném bodě. Tento proces vyhodnocování tloušťky je znázorněn na obrázku 24.



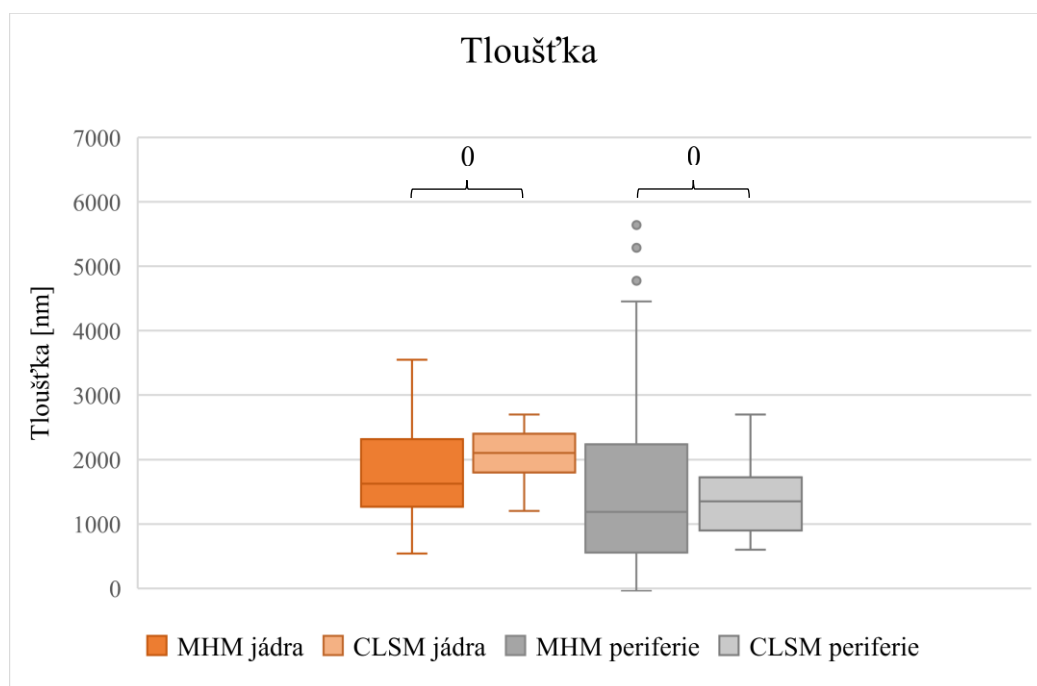
**Obrázek 23:** 3D zobrazení pozorované buňky v CLSM.





**Obrázek 24:** Ukázka řezu pozorovanou buňkou sloužící k určení tloušťky buňky v CLSM. Velikost zobrazeného pole je  $135\ \mu\text{m} \times 135\ \mu\text{m}$ . Tloušťka řezu je  $3\ \mu\text{m}$ .

Hodnoty tloušťky buněk v místě jader a periferie byly statisticky zpracovány. Pomocí testování, zda jsou hodnoty naměřené multimodálním holografickým mikroskopem a konfokálním skenovacím mikroskopem stejné či nikoli bylo zjištěno, že lze předpokládat, že tloušťky buněk v daných částech jsou stejné. Výsledky testování jsou znázorněny na obrázku 25 a tabulkách 6 a 7.



**Obrázek 25:** Graf porovnávající naměřené tloušťky buněk v MHM a CLSM. V grafu jsou vyznačeny symboly popisující statistickou významnost hypotézy  $p > p_0$  (o),  $p < p_0$  (\*),  $p < p_1$  (\*\*),  $p < p_2$  (\*\*\*)

**Tabulka 6:** Výsledky F-testu aplikovaného na tloušťku pozorovaných částí buněk v MHM a CLSM.

	jádra v MHM a CLSM	periferie v MHM a CLSM
p =	0,000149	$2,3651 \times 10^{-8}$
	p < p <sub>0</sub>	p < p <sub>0</sub>
	různé $\sigma^2$	různé $\sigma^2$

**Tabulka 7:** Výsledky t-testu aplikovaného na tloušťku pozorovaných částí buněk v MHM a CLSM.

	jádra v MHM a CLSM	periferie v MHM a CLSM
p =	0,380302	0,327843
	p > p <sub>0</sub>	p > p <sub>0</sub>
	stejně $\mu$ (0)	stejně $\mu$ (0)

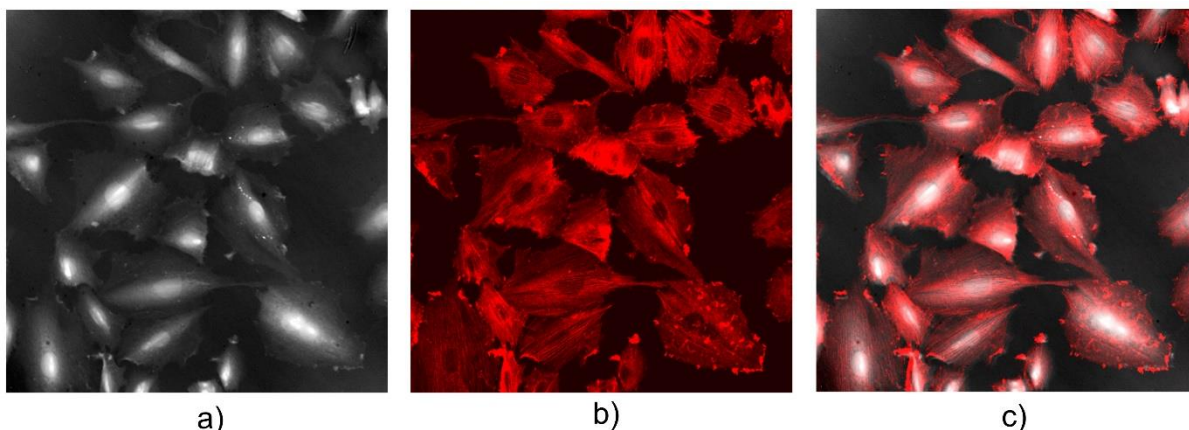
Nakonec byly z tohoto měření stanoveny průměrné hodnoty indexu lomu a tloušťky pro jednotlivé části buněk. V příloze I. jsou doloženy všechny vypočítané hodnoty těchto pozorovaných parametrů. Tabulka 8 pak shrnuje zjištěné údaje o průměrném indexu lomu jednotlivých částí buněk a porovnává průměrné hodnoty tloušťky těchto částí zjištěné pomocí metody určení indexu lomu a tloušťky buněk z hodnot fází pořízených multimodálním holografickým mikroskopem a určením tloušťky ze snímků z konfokálního skenovacího mikroskopu.

**Tabulka 8:** Tabulka porovnávající hodnoty indexu lomu a tloušťky v pozorovaných částech buňky měřené MHM a CLSM  $\pm$  směrodatná odchylka.

		Index lomu	Tloušťka [nm]
Jadérko	MHM	$1,4182 \pm 0,0395$	$2185,33 \pm 1801,60$
	CLSM	-	-
Jádro	MHM	$1,4009 \pm 0,0394$	$1850,00 \pm 803,71$
	CLSM	-	$1995,00 \pm 416,50$
Periferie	MHM	$1,3751 \pm 0,1400$	$1545,49 \pm 1370,50$
	CLSM	-	$1350,00 \pm 544,98$

### 7.3.3 Měření průměrné hodnoty indexu lomu a tloušťky buněk

Ve třetím měření byly zjišťovány hodnoty indexu lomu a tloušťky pro celé buňky. Tloušťka buněk z multimodálního holografického mikroskopu byla porovnána též s hodnotami získanými z konfokálního skenovacího mikroskopu. Snímáno bylo více zorných polí, abychom získali více dat a mohli je statisticky zpracovat. Na obrázku 26 jsou ilustrační obrázky pořízené MHM a CLSM téže zorného pole, které je pak vyhodnocováno. Na obrázku je také porovnání těchto buněk metodou překrytí obrazů.



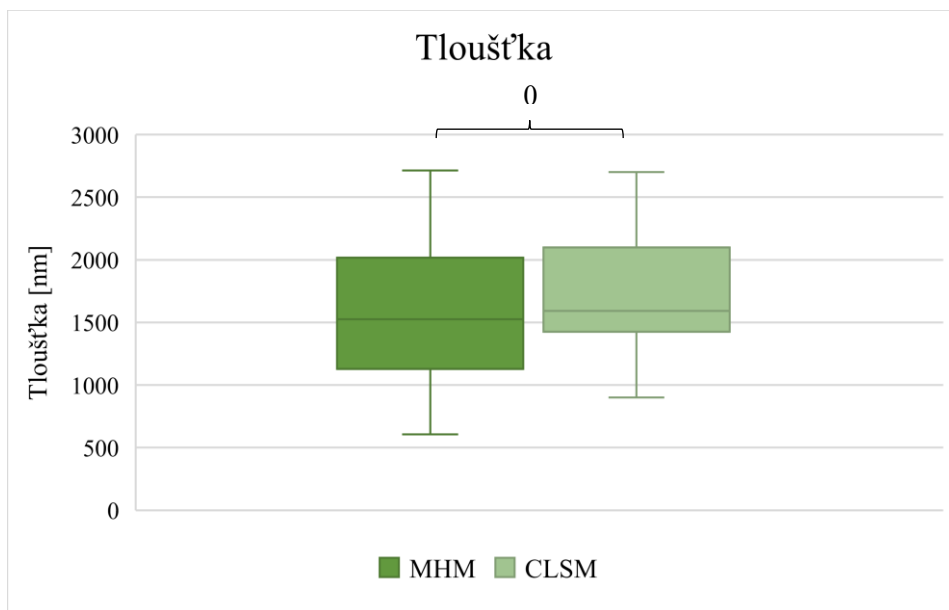
**Obrázek 26:** Snímek pozorovaného zorného pole pořízený multimodálním holografickým mikroskopem (a) a konfokálním skenovacím mikroskopem (b). Na obrázku (c) jsou snímky z obou technik pozorování překryty přes sebe. Velikost pozorovaného zorného pole je  $376 \mu\text{m} \times 376 \mu\text{m}$ .

Z naměřených hodnot fáze, pro obě média byly pomocí vzorce 4.7 vypočítány indexy lomu. Z těchto dat byl vytvořen průměrný index lomu buněk, který je v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Průměrný index lomu buněk stanovený pomocí metody určení indexu lomu a tloušťky buňky  $\pm$  směrodatná odchylka.

Průměrný index lomu buňky	$1,3939 \pm 0,0210$
---------------------------	---------------------

Posledním zkoumaným parametrem byla průměrná tloušťka buněk. V této analýze byly zpracovávány údaje o průměrné tloušťce buněk zjištěné ze snímků z multimodálního holografického a konfokálního skenovacího mikroskopu. Tato data byla porovnána. Na základě testování statistických hypotéz lze říci, že průměrná tloušťka měřená dvěma různými metodami, pomocí metody určení indexu lomu a tloušťky buňky na MHM a odečtením hodnot z CLSM, se shoduje. Výsledky této analýzy jsou shrnuty na obrázku 27 a tabulkách 10 a 11.



**Obrázek 27:** Graf porovnávající naměřenou tloušťku buněk v MHM a CLSM. V grafu jsou vyznačeny symboly popisující statistickou významnost hypotézy  $p > p_0$  (o),  $p < p_0$  (\*),  $p < p_1$  (\*\*),  $p < p_2$  (\*\*\*)

**Tabulka 10:** Výsledky F-testu aplikovaného na průměrnou tloušťku pozorovaných buněk v MHM a CLSM.

MHM a CLSM	
p =	0,569891
	$p > p_0$
	stejné $\sigma^2$

**Tabulka 11:** Výsledky t-testu aplikovaného na průměrnou tloušťku pozorovaných buněk v MHM a CLSM.

MHM a CLSM	
p =	0,328727
	$p > p_0$
	stejné $\mu$ (0)

Průměrné hodnoty tloušťky buněk zjištěné pomocí dvou různých metod (metody určení indexu lomu a tloušťky buňky a odečtením ze snímků z CLSM) jsou zobrazeny v tabulce 12. V příloze II. jsou zaznamenány všechny vypočítané hodnoty indexu lomu a tloušťky tohoto měření.

**Tabulka 12:** Průměrné hodnoty tloušťky buněk zjištěné ze snímků z MHM a CLSM  $\pm$  směrodatná odchylka.

	MHM	CLSM
Průměrná tloušťka buněk [nm]	1574,76 $\pm$ 535,50	1681,82 $\pm$ 483,96

## 8 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navrzení metodiky pro měření indexu lomu a tloušťky živých buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu. Tento mikroskop sestavený na ÚFI FSI VUT v Brně umožňuje záznam fázového posuvu způsobeného vzorkem, který závisí současně na indexu lomu pozorované buňky a její výšce v daném bodě. Navržená metodika má za úkol tyto dvě veličiny od sebe oddělit, aby bylo možné pozorovat nezávisle změny indexu lomu vnitřního prostředí buňky a změny její morfometrie v průběhu měření.

První polovina práce je teoretická. Je zaměřena na historii a vývoj holografické mikroskopie. Stručně popisuje multimediální holografický mikroskop, který byl použit k experimentům diplomové práce, včetně jeho konstrukčního popisu, principu, nastavení, zpracování interferogramu a významu naměřené obrazové fáze. Dále je zde navržena metoda určení indexu lomu a tloušťky buňky, která vychází ze změny fáze při různém indexu lomu použitého média. Zmíněna je také konfokální mikroskopie, která slouží k porovnání dat získaných navrženou metodikou. Stručně je popsán základní konstrukční popis, vlastnosti konfokálního mikroskopu, fluorescence a její použití při pozorování vzorků v CLSM. Závěr teoretické části pojednává o testování statistických hypotéz, které je důležité pro vyhodnocování experimentálně naměřených dat.

Druhá polovina diplomové práce je věnována experimentální části. Zde je nejdříve popsána příprava experimentu včetně kultivace, fixace a barvení buněk, úpravy pozorovací komůrky, nastavení mikroskopu a měření indexu lomu médií. Přesné určení indexu lomu použitých médií je důležité pro výpočet sledovaných parametrů buněk pomocí navržené metodiky. Následuje popis analýzy naměřených dat pomocí segmentace v programu Q-Phase a zpracování výpočtu indexu lomu a tloušťky v programu MATLAB.

V experimentální části práce byly navrženy experimenty pro ověření metodiky určení indexu lomu a tloušťky buňky. První experiment byl proveden jako časosběrný, kdy byly buňky snímány po celou dobu měření včetně výměny média. Toto měření potvrzuje základní předpoklad pro metodu určení indexu lomu a tloušťky buňky, která je založena na změně fáze při použití médií s různými indexy lomu. Při použití média s vyšším indexem lomu došlo k okamžitému snížení fáze. Tento rozdíl je základem pro určení indexu lomu a tloušťky buňky.

Další experiment proběhl na fixovaných buňkách, aby nedošlo během experimentu k pohybu buněk a změně jejich vnitřní struktury a změřené výsledky byly relevantní. V tomto experimentu byly vyhodnocovány parametry určitých buněčných struktur, a to konkrétně jádérka, jádra a periferie. Přepočítané hodnoty fáze na tloušťku jednotlivých struktur buněk byly porovnány s tloušťkami vybraných částí buněk odečtených ze snímků CLMS. Výsledné hodnoty zjištěné pomocí MHM a metody určení indexu lomu a tloušťky buňky jsou podle statistického testování shodné s hodnotami zjištěnými pomocí CLSM. Díky navržené metodice byl zjištěn i různý index lomu pozorovaných struktur. Různost těchto hodnot značí odlišné složení a strukturu organel, které díky tomu mají jiné optické vlastnosti.

V posledním experimentu jsou z měřených fází zjišťovány průměrné hodnoty indexu lomu a tloušťky buněk. Získané hodnoty průměrné tloušťky pomocí MHM a metody určení indexu lomu a tloušťky buňky ( $1574,76 \pm 535,50$  nm) jsou podle t-testu v dobré shodě s hodnotami zjištěnými ze snímků CLSM ( $1681,82 \pm 483,96$  nm). Mírně vyšší hodnoty u CLSM je možné vysvětlit nepřesným odečítáním tloušťky v závislosti na přesnosti ( $0,3 \mu\text{m}$ ). Zjištěný průměrný index lomu buňky je  $1,3939 \pm 0,0472$ .

Díky navržené metodice, která umožňuje z naměřených hodnot fázového posuvu způsobeného vzorkem určit index lomu a tloušťku buňky, je možné pozorovat nezávisle změny

indexu lomu vnitřního prostředí buňky a změny její morfometrie. Tato metoda poskytuje efektivní řešení výpočtu indexu lomu a tloušťky na živých buňkách. Jedná o neinvazivní pozorování, což je velkou výhodou oproti běžně používaným technikám, např. určování tloušťky pomocí CLSM, kde je nutné pozorované buňky obarvit.

Tato metoda, která je ověřena sérií experimentů, jež jsou popsány nejen v této práci, umožňuje určení indexu lomu a morfometrie živých buněk. Multimodální holografický mikroskop společně s metodou určení indexu lomu a tloušťky buňky je schopný určit tyto parametry a pozorovat jejich změny. Index lomu, který je citlivý k patologickým změnám, je důležitý pro diagnostiku. Přesné určení zkoumaných parametrů může vést k včasnému zachycení modifikací ve struktuře a složení buňky. Tyto poznatky mohou být užitečné pro zkoumání živých buněk, jejich vývoje, změn a reakcí na okolní prostředí. Návrh a vývoj metodiky je důležitý též pro budoucí využití multimodálního holografického mikroskopu v buněčné biologii.

## Přílohy

### I. Tabulka hodnot indexu lomu získaných pomocí MHM a tloušťky pomocí MHM a CLSM

#### MHM

	Index lomu				Tloušťka			
	Jadérka	Jádra	Periferie		Jadérka	Jádra	Periferie	
	1,3916	1,3811	1,3921	1,3775	1822,83	1890,27	359,57	550,94
	1,4596	1,3879	1,3737	1,3526	851,61	1645,57	775,15	1178,62
	1,4123	1,4391	1,3796	1,3435	1731,76	814,98	563,81	2278,30
	1,4425	1,3936	1,3546	1,3423	1160,72	1630,52	1095,54	5289,37
	1,4205	1,3667	1,3641	1,4289	1422,19	2705,84	1224,24	479,89
	1,4322	1,3927	1,3497	1,3459	1163,30	1360,93	3084,58	4776,49
	1,4190	1,4071	1,3419	1,3801	1558,40	1091,97	4454,83	489,15
	1,4267	1,4074	1,3844	1,3462	1261,84	1266,62	623,43	2729,77
	1,4152	1,4105	1,3512	0,6909	1372,42	1339,00	1620,13	-42,20
	1,4176	1,3818	1,3616	1,3630	2016,34	2220,12	475,67	1261,14
	1,3966	1,4054	1,3582	1,4071	2402,47	1258,50	1447,36	430,04
	1,4004	1,3644	1,3501	1,3554	2063,76	3305,53	2338,63	1902,01
	1,3599	1,3710	1,3435	1,3438	8495,54	3166,09	1685,36	2397,66
	1,5482	1,3701	1,3614	1,3442	719,59	2992,33	761,27	1653,18
	1,3777	1,3973	1,8572	1,3831	4786,06	1602,55	39,80	616,34
	1,4193	1,4052	1,3514	1,3989	1510,55	1128,77	672,61	618,68
	1,4147	1,4171	1,3510	1,3467	1437,28	1029,08	932,10	2377,38
	1,3728	1,3749	1,4075	1,3469	3559,31	2172,46	261,49	1632,04
		1,5668	1,3522	1,3563		538,63	1194,97	906,70
		1,4028	1,4594	2,0124		1459,16	192,05	17,23
		1,3704	1,3917	1,3499		3163,94	425,35	2053,71
		1,3858	1,3466	1,3695		2085,70	1300,63	662,53
		1,4181	1,3656	1,3513		1403,31	683,46	2129,61
		1,4067	1,3652	1,3475		1558,14	1496,50	2254,32
		1,4112	1,3682	1,3601		1622,62	305,21	2416,11
		1,3817	1,3472	1,3498		2598,34	1116,11	3129,18
		1,4835	1,4352	1,3539		637,72	369,03	2185,7
		1,3810	1,3701	1,5325		2127,38	1032,32	142,778
		1,3631	1,3449	1,3545		3549,45	5638,64	1630,59
		1,3835	1,3536	1,3408		2134,45	2658,65	5753,79
Průměr	1,4182	1,4009	1,3751		2185,33	1850,00	1545,49	
Směrodatná odchylka	0,0395	0,0394	0,1398		1801,60	803,71	1370,50	

### CLSM

Tloušťka			
Jadérka	Jádra	Periferie	
x	1800	600	
x	2100	900	
x	1500	1500	
x	2400	2700	
x	1500	600	
x	1800	900	
x	2100	900	
x	2700	1500	
x	1200	1200	
x	2100	1500	
x	2400	600	
x	2100	2700	
x	2400	1500	
x	1800	600	
x	1500	1800	
x	2400	1500	
x	2100	900	
x	2700	1800	
x	1800	1200	
x	2100	1200	
x	2400	1500	
x	1200	900	
x	2400	2700	
x	1800	1800	
x	1200	1200	
x	1500	1500	
x	1500	1800	
x	1800	900	
x	1800	1800	
x	2100	1200	
x	2400	900	
x	2700	1500	
x	2100	900	
x	2400	1800	
x	1800	1500	
x	2400	1200	
x	1500	900	
x	1800	1800	
x	2100	1500	
x	2400	600	
Průměr	x	1995	1350
Směrodatná odchylka	x	416,50	544,98



II. Tabulka zobrazující získané hodnoty indexu lomu a tloušťky při určování průměrných hodnot indexu lomu a tloušťky buněk

MHM				CLSM
Index lomu		Tloušťka [nm]		Tloušťka [nm]
1,4529	1,3860	1354,71	1669,42	900
1,4263	1,3865	1509,81	1680,55	1200
1,4252	1,4226	1528,32	1688,95	1500
1,4403	1,3822	605,93	1736,20	1500
1,4146	1,3865	1207,22	1799,49	1500
1,4161	1,3844	645,21	1809,11	1200
1,4106	1,3795	676,45	1831,74	900
1,4129	1,3799	707,20	1886,36	1800
1,3992	1,3843	909,79	1925,04	2100
1,3997	1,3815	931,09	1937,55	2100
1,4730	1,3837	940,13	889,65	1800
1,4014	1,3808	980,26	2029,40	1500
1,3919	1,3782	1062,57	2043,21	900
1,3913	1,4285	1071,28	966,67	2400
1,3969	1,3814	1087,99	2083,23	2100
1,3924	1,3781	1127,44	2093,25	1200
1,3917	1,3829	1147,08	2101,31	1500
1,3931	1,3800	1167,89	931,36	1800
1,3915	1,3807	1279,54	2179,33	1800
1,3888	1,4012	1284,91	2237,62	1500
1,3893	1,3769	1291,65	2254,31	2400
1,3885	1,3817	1307,59	954,91	1800
1,3886	1,4158	1355,73	2321,22	1500
1,3853	1,3820	1410,75	2359,07	2100
1,3897	1,3812	1433,88	960,73	2400
1,3806	1,3794	1441,02	2375,79	2400
1,3879	1,3822	1448,15	2417,55	2100
1,4214	1,4049	1451,60	2455,54	1800
1,3813	1,3778	1456,41	2464,85	1500
1,3891	1,3788	1459,82	2480,21	900
1,3876	1,3809	1496,70	1093,10	1200
1,3858	1,3755	1524,47	2016,62	2700
1,3835	1,4817	1526,79	2643,94	1500
1,3843	1,3748	1539,19	2681,39	
1,4104	1,3773	1542,64	2712,50	
1,3958	1,3846	1549,09	1085,19	
1,3840	1,3782	1617,82	2391,88	
1,3815	1,3757	1624,15	1067,12	
1,3827	1,3798	1649,84	1224,06	
Průměr	1,3939	1574,76		1681,82
Směrodatná odchylka	0,0210	535,50		483,96



## Literatura

- [1] GÁBOR, D. *New Microscopic Principle*. Nature. 1948, vol. 161, no. 4098, s. 777–778.
- [2] GÁBOR, D. *Microscopy by Reconstructed Wave-Fronts*. Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 1949, vol. 197, no. 1051, s. 454–487.
- [3] KOVÁŘOVÁ, K. *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherenci řízeného holografického mikroskopu*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [4] LEITH E. N., UPATNIEKS J. *Reconstructed Wavefronts and Communication Theory*. J. Opt. Soc. Am. 1962, vol. 52, no. 10, s. 1123.
- [5] LEITH E. N., UPATNIEKS J., HAINES K. A. *Microscopy by Wavefront Reconstruction*. J. Opt. Soc. Am. 1965, vol. 55, no. 8, s. 981.
- [6] CHMELÍK R., HARNA Z. *Parallel-mode confocal microscope*. Opt. Eng. 1999, vol. 38, no. 10, s. 1635.
- [7] DOSTÁL, Z. *Interference microscopy*. Přednáška – předmět Mikroskopie a spektroskopie. 2017.
- [8] CHYTKOVÁ, I. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem - konstrukce a experiment*. Brno, 1999. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [9] PROKOPOVÁ, M. *Holografický konfokální mikroskop zobrazující prošlým světlem - teorie a konstrukce*. Brno, 1999. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [10] KOLMAN, P. *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Brno, 2010. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [11] SLABÝ, T. *Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace*. Brno, 2014. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [12] SLABÝ, T., KŘÍŽOVÁ, A., LOŠŤÁK, M., a kol. *Coherence-controlled holographic microscopy for live-cell quantitative phase imaging*. Proc. SPIE. 2015, vol. 9336, s. 93360K.
- [13] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Brno, 2006. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [14] POPESCU, G., PARK, Y. K., LUE, N., a kol. *Optical imaging of cell mass and growth dynamics*. Am. J. Physiol. Physiol. 2008, vol. 295, no. 2, s. C538–C544.
- [15] ŠTRBKOVÁ, L., ZICHA, D., VESELÝ, P., CHMELÍK, R. *Automated classification of cell morphology by coherence-controlled holographic microscopy*. J. Biomed. Opt. 2017, vol. 22, no. 8, s. 1.

- [16] ŠTRBKOVÁ, L. *Biophysical interpretation of quantitative phase image*. Brno, 2017. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [17] RAPPAZ, B., MARQUET, P., CUCHE, E., a kol. *Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy*. Opt. Express. 2005, vol. 13, no. 23, s. 9361.
- [18] RAPPAZ, B., BARBUL, A., EMERY, Y., a kol. *Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer*. Cytom. Part A. 2008, vol. 73A, no. 10, s. 895–903.
- [19] Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Konfokální mikroskopie. [Duben 2018].  
Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/y/confmicro/index.php>.
- [20] Olympus Microscopy Resource Center. Confocal Microscopy - Introduction. [Duben 2018].  
Dostupné z: <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>.
- [21] MINSKY, M. *Microscopy apparatus*. 1957. US3013467A.
- [22] PETRÁŇ, M., HADRAVSKÝ, M. *Method and arrangement for improving the resolving power and contrast*. 1967. US3517980A.
- [23] AMOS, W. B., WHITE, J.G., M. FORDHAM, M. *Use of confocal imaging in the study of biological structures*. Appl. Opt. 1987, vol. 26, no. 16, s. 3239.
- [24] WHITE, J.G., AMOS, W. B., FORDHAM, M. *An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy*. J. Cell Biol. 1987, vol. 105, no. 1, s. 41–8.
- [25] SEMWOGERERE, Denis; WEEKS, Eric R. *Confocal microscopy*. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. 2005, no. 23, s. 1-10.
- [26] New York University, Department of Medicine. Clinical correlations. [Duben 2018].  
Dostupné z: <http://www.clinicalcorrelations.org/?p=6410>
- [27] Vysoké učení technické v Brně. Učební texty z předmětu Speciální praktikum II. Konfokální mikroskopie. 2017  
Dostupné z: <http://physics.fme.vutbr.cz/files/opory/pdf/SpecParktikumIIa/konfokmikroskopie.pdf>
- [28] COOPER, J. A. *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J. Cell Biol. 1987, vol. 105, no. 4, s. 1473–8.
- [29] Sigma-Aldrich. Phalloidin–Atto 590 suitable for fluorescence. [Květen 2018].  
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93042?lang=en&region=CZ>.

- [30] Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Biostatistika - testování hypotéz ve statistice. [Duben 2018].  
Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/hypotezy.htm>
- [31] SATTERTHWAIT, F. E. *An Approximate Distribution of Estimates of Variance Components. Biometrics Bull.* 1946, vol. 2, no. 6, s. 110.
- [32] BARTONÍČEK, J. *Koherenci řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky.* Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [33] Ibidi.  $\mu$ -Slide I Luer - Channel Slide for Flow Assays. [Květen 2018].  
Dostupné z: <https://ibidi.com/channel-slides/50--slide-i-luer.html>.
- [34] Abbé refractometer. [Květen 2018].  
Dostupné z: <http://www.refractometer.pl/Abbe-refractometer>.
- [35] Krüss. Refractometers. [Květen 2018].  
Dostupné z: [http://www.kruess.com/documents/BR\\_Refraktometer\\_EN\\_4.2.pdf](http://www.kruess.com/documents/BR_Refraktometer_EN_4.2.pdf)