



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**STUDIUM VLIVU MIGRASTATIK NA DYNAMIKU
MIGRACE NÁDOROVÝCH BUNĚK POMOCÍ
KOHERENCÍ ŘÍZENÉHO HOLOGRAFICKÉHO
MIKROSKOPU**

STUDY OF THE EFFECT OF MIGRASTATICS ON THE DYNAMICS OF TUMOUR CELL MIGRATION
USING A COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Muchová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MUDr. Pavel Veselý, CSc.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

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

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

Studium vlivu migrastatik na dynamiku migrace nádorových buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

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

Cíle diplomové práce:

1. Osvojit si optické principy hiQPI a experimentální postupy pozorování tkáňových kultur včetně jejich přípravy.
2. Navrhnout experimentální postup a provést pozorování v oblasti biologie živé buňky pomocí techniky hiQPI. Zpracovat obrazový záznam a interpretovat výsledky experimentu, která jsou zaměřena na snímání nádorových buněk s migrastatiky. Zaměření se na dynamiku migrace živých buněk z hlediska diskontinuity migrační aktivity a změn rychlosti.

Seznam doporučené literatury:

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

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

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

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

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

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

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

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

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

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá propojením koherencí řízeného holografického mikroskopu s výzkumem vlivu migrastatik na dynamiku migrace rakovinných buněk. Teoretická část stručně popisuje historii holografické mikroskopie a vývoj holografického mikroskopu na FSI VUT v Brně ve spolupráci s firmou Telight. Zahrnuje náhled do konstrukce a principu funkce koherencí řízeného holografického mikroskopu. Následně se zabývá stručným popisem současné onkologické léčby a představením kandidátů na nová léčiva označená jako migrastatika. Stěžejní částí je navržení experimentálního postupu pozorování, zaznamenání a zpracování obrazových dat pomocí techniky hiQPI. V poslední části diplomové práce je následná analýza vlivu vybraných léčiv na rakovinné buňky a porovnání získaných výsledků s již existujícími studiemi. Pro zahájení protokolu „Rychlé vyšetření růstu a migrace buňky *in vitro*“ byla porovnána vhodnost objektivů se zvětšením 4x a 10x.

Klíčová slova: holografická mikroskopie, koherence, migrace, metastáze, migrastatika, nádorová buňka

Abstract

The thesis is focused on the exploitation of the coherence controlled holographic microscopy for the investigation of the influence of the supposed migrastatic drugs on the dynamics of cancer cell migration. The theoretical part briefly describes the history of holographic microscopy and the development of the holographic microscope at the Brno University of Technology in collaboration with Telight, Brno, including an insight into the design and principle of operation of the coherence-controlled holographic microscope. Next a brief description of current cancer treatments introduces new class of anti-cancer drug candidates designated migrastatics that should impair cancer cell migration and thus prevent late metastases formation. The main part of the thesis deals with the design of the experimental observation procedure and data processing using the holographic incoherent Quantitative Phase Imaging technique. The last part of the thesis is the subsequent analysis of the migrastatic effect of the selected drugs on cancer cells *in vitro* and the comparison of the obtained results with existing studies. Finally, the objectives with magnification 4x and 10x were evaluated and compared for starting “the Rapid Assessment of Cell Growth and Migration”.

Keywords: holographic microscopy, coherence, migration, metastasis, migrastatics, cancer cell

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci MUDr. Pavla Veselého, CSc. a veškeré materiály použité k sepsání jsem řádně uvedla v seznamu literatury.

V Brně

Bc. Nikola Muchová

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala MUDr. Pavlu Veselému, CSc. a Mgr. Markétě Šuráňové za pomoc a cenné rady při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Veronice Jůzové za její čas a ochotu pomoci při tvorbě této práce. Velké díky patří kolegyním Veronice Kolínkové a Magdaléně Zábranské za vzájemnou podporu. V neposlední řadě děkuji své rodině, příteli a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali a motivovali.

Obsah

Úvod	13
1 Koherencí řízený holografický mikroskop	15
1.1 Historie holografické mikroskopie	15
1.2 Holografický mikroskop na VUT v Brně.....	16
1.3 Optické schéma.....	16
1.4 Multimodální zobrazení	18
2 Kvantitativní fázové zobrazení	20
3 Onkologická léčba	22
3.1 Migrastatika	23
3.2 Metastatická kaskáda	24
3.3 Potenciální migrastatika.....	25
3.4 Časoběrné snímání živých nádorových buněk.....	26
4 Segmentace buněk	28
5 Analýza dat	29
5.1 Objektiv 4x	31
5.1.1 Časová závislost	31
5.1.2 Motilita.....	51
5.1.3 Statistika	52
5.1.4 Korelační diagram	55
5.2 Objektiv 10x	59
5.2.1 Časová závislost	60
5.2.2 Statistika	61
6 Diskuze	64
7 Závěr	67

Úvod

Diplomová práce se zabývá studiem vlivu migrastatik na dynamiku migrace nádorových buněk pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM = Coherence – Controlled Holographic Microscope). Tato mikroskopická technika je výhodná pro 2D časosběrnou neinvazivní analýzu chování neoznačených buněk.

Cílem diplomové práce je navrhnout metodiku pro vyhodnocení dynamiky migrace živých nádorových buněk *in-vitro* po aplikaci migrastatik, která brání všem způsobům invazivity a metastazování nádorových buněk.

Invaze rakovinných buněk do okolních tkání a vznik metastáz způsobují úmrtnost pacienta z více než 90 %. V současné době jsou způsoby terapie zaměřeny proti buněčné proliferaci a zabraňují tak růstu nádoru. V procesu protinádorové léčby však chybí specifická kategorie léků bojující proti invazi rakovinných buněk a metastázám. Výzkumem těchto léčiv se zabývá tým kolem biologa prof. RNDr. Jana Brábka, Ph.D. Nová terapie nese název migrastatika. Nejedná se o samostatně stojící proceduru, ale o doplnění již stálých čtyř metod jako pátý pilíř protirakovinné léčby, která by tak mohla smrtelné nádorové onemocnění změnit v pouhou chronickou nemoc. Požadovaným účinkem migrastatik by měla být polymerace aktinu a snížení kontraktility buňky, což zabrání buňkám v pohybu, a tedy jejich vycestování z nádoru do okolních tkání. [9]

Do výzkumu vlivu migrastatik na nádorové buňky se zapojil i tým Experimentální biofotoniky na VUT v Brně. Tým okolo prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D. vytvořil koherencí řízený holografický mikroskop, který umožňuje neinvazivní pozorování živých buněk bez imunoznačení. To přináší velkou výhodu pro hodnocení účinku migrastatik na živých lidských buněčných liniích.

V následujících kapitolách je popsán koherencí řízený holografický mikroskop, jeho principy a funkce. Následuje charakteristika současné onkologické léčby a problematika týkající se tématu migrastatika. Diplomová práce obsahuje stručný popis softwaru holografického mikroskopu a jeho funkcí využívaných pro segmentaci a zpracování získaných data setů. V neposlední řadě je uvedena analýza a výsledné zhodnocení použitých migrastatik na buněčnou kulturu označovanou HT1080.

1 Koherencí řízený holografický mikroskop

Koherencí řízený holografický mikroskop od firmy Telight byl vyvinut ve spolupráci s VUT v Brně. Využívá holografické mikroskopie s nekoherentním zdrojem osvětlení, jenž na buňky působí s minimální fototoxicitou. Technika použita mikroskopem spočívá v kvantitativním fázovém zobrazení (hiQPI = Holographic Incoherent-light-source Quantitative Phase Imaging). Tuto technologii původně vyvinul prof. Radim Chmelík ze skupiny Experimentální biologie na fakultě strojního inženýrství VUT v Brně.

V následujících kapitolách je popsána historie holografické mikroskopie, stručné shrnutí vývoje holografického mikroskopu na VUT v Brně a v neposlední řadě popis jeho konstrukčního schématu a jeho multimodálního zobrazení.

1.1 Historie holografické mikroskopie

Teoretické základy holografie byly publikovány již roku 1948 anglickým fyzikem Dennisem Gaborem. Myšlenka vznikla ze zlepšení rozlišení elektronového mikroskopu. Teoretický postup provedení se skládal ze dvou fází. Nejprve byl elektronovým mikroskopem vytvořen interferenční obraz mezi předmětovým svazkem a koherentním pozadím. Vzniklý interferenční obrazec byl nazván hologram z řeckého *holos*, tj. úplný, jelikož zaznamenává úplnou informaci o dopadající vlně, tedy její amplitudu a fázi. V druhém kroku bylo třeba tento hologram rekonstruovat světelnou vlnou v optickém systému. Předpokladem tohoto postupu bylo výrazně zvýšit rozlišovací schopnost oproti nedokonalým čočkám elektronových mikroskopů a také jeho zvětšení v řádu až 10^5 . Avšak úsilí o experimentální provedení tohoto pokusu nebyly úspěšné kvůli tehdejšímu nedostatečně koherentnímu zdroji elektronového i světelného svazku. I přesto byla holografie hojně využívána a v roce 1971 za tento objev Dennis Gabor dostal Nobelovu cenu. [19]

K významnému rozvoji holografie došlo v letech 1960, kdy byl objeven laser. Ten pro holografickou mikroskopii představoval ideální světelný zdroj, díky své dlouhé koherenční délce. První záznam trojrozměrného obrazu, kterým byl vlak, vytvořili vědci Emmett Leith a Juris Upatnieks. Jejich velkým objevem bylo tzv. mimoosové holografické uspořádání, které

umožnilo odstranit nežádoucí koherentní šum, což bylo velkou nevýhodou Gaborova tzv. osového uspořádání. [5, 23]

Dříve se hologram zaznamenával na fotografickou desku jako tzv. interferogram, jehož obraz byl vyvolán a rekonstruován osvětlením samotnou referenční vlnou. Pro získání fáze bylo nutné nasnímat čtyři a více interferogramů, které jsou od sebe posunuty o určitou část 2π . Nebylo tedy možné ukládat a zpracovávat velké množství dat. To se změnilo příchodem digitálních detektorů a rozvojem výpočetní techniky, což umožňovalo okamžité digitální a numerické zpracování hologramu pomocí počítače. [5, 23, 26]

1.2 Holografický mikroskop na VUT v Brně

V roce 1999 byl první holografický mikroskop vyvinut a zkonstruován na ústavu fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně autory R. Chmelíkem a Z. Harnou. V rámci několika diplomových prací byl teoreticky i experimentálně rozvíjen a testován s technickými i biologickými vzorky.

Mikroskop pracuje na principu mimoosové holografie využívající světla s nízkou časovou a prostorovou koherencí, čímž je např. běžná halogenová lampa. Nízká koherence tak umožňuje zlepšení laterálního rozlišení a zobrazení obecně, zejména upravuje vlastnosti zobrazení dle typu pozorovaného vzorku vhodnou volbou koherence osvětlení. Z tohoto důvodu byl zaveden název Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM). [21, 23]

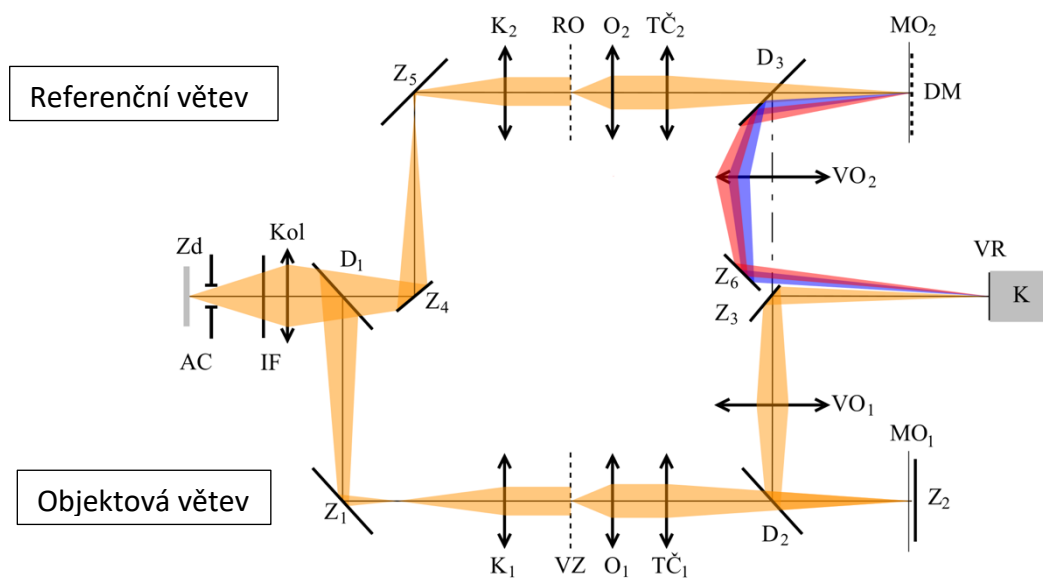
1.3 Optické schéma

CCHM se z hlediska základních komponent výrazně neliší od běžného optického mikroskopu inverzně sestaveného. Obsahuje osvětlovací soustavu, zobrazovací soustavu a na výstupu je opatřen detektorem. Avšak dle typu Mach-Zehndera CCHM je sestaven ze dvou symetrických větví (objektové a referenční), které jsou opticky shodné a obsahují společný zdroj osvětlení (Obr. 1). [2]

Osvětlovací částí mikroskopu je tvořena nekoherentním zdrojem světla Z_d (halogenová výbojka/ LED), clonou řídící prostorovou koherenci AC a pásmovým interferenčním filtrem 650/10 IF, který řídí stupeň časové koherence. Filtr je použit pro vlnovou délku 650 nm, tedy

červené světlo, které je vhodné pro pozorování biologických objektů. Červené světlo má nižší energii než modré světlo, které je více fototoxické pro buňky a je biologickými vzorky méně rozptylováno. [5]

Vytvořený svazek je kolektorovou čočkou Kol soustředěn do děliče svazku D_1 , který ho rozděluje do dvou optických větví, a to referenční a objektové. Světelný svazek v každé z větví prochází kondenzorem K, soustředící světlo do referenční RO nebo předměťové VZ roviny. Dále prochází objektivy O a tubusovými čočkami TČ zajišťující nekonečnou tubusovou vzdálenost. Součástí referenční větve je difrakční mřížka DM, která odklání difrakční svazek od optické osy. V objektové větvi se svazek pouze odráží od zrcadla Z_2 , aby si zachoval stejnou optickou dráhu, jako ve druhé větvi. Oba svazky prochází výstupními čočkami VL, odráží se od zrcadel Z do výstupní roviny VR. Díky posledním zrcadlům svazky z obou větví vzájemně dopadají pod úhlem a vytváří tak ve výstupní rovině mimoosovou interferenci, která je následně snímána detektorem. [3]



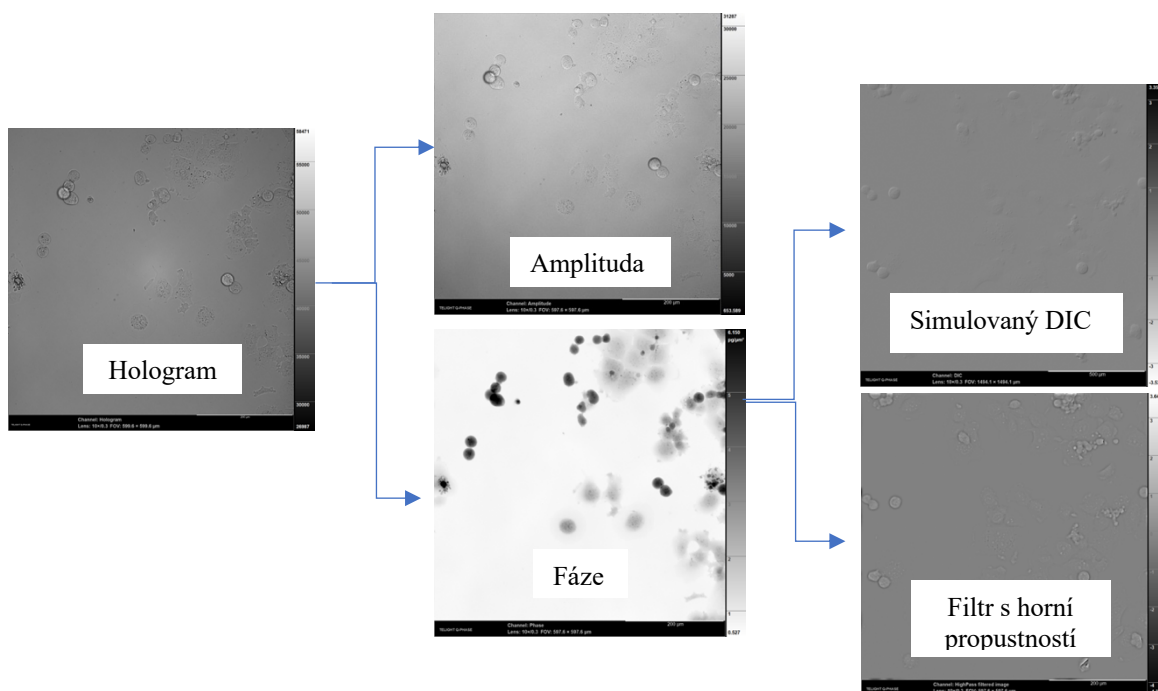
Obrázek 1: Optické schéma CCHM. Zdroj Zd, aperturní clona AC, interferenční filtr IF, kolektorová čočka Kol, děliče svazku D, zrcadla Z, kondenzory K, referenční rovina RO, předměťová rovina se vzorkem VZ, objektivy O, tubusové čočky TČ, difrakční mřížka DM, výstupní čočky VO, výstupní rovina VR, kamera K. Převzato z [24]

Důležitým komponentem mikroskopu je již zmíněná difrakční mřížka v referenční rovině navržená podle Leitha, díky níž je možné použití nekoherentního zdroje osvětlení. Mřížka z dopadajícího svazku propouští pouze 0. a 1. difrakční řád. Zbylé řády jsou prostorovou filtrací eliminovány pro zajištění co nejkontrastnějšího obrazu interferenčních proužků ve výstupní rovině. [4]

1.4 Multimodální zobrazení

Při použití koherentního zdroje světla se do optických systémů dostává koherenční šum a parazitní interference, čímž se zhoršuje kvalita mikroskopických snímků. Právě použitím principu mimoosové nekoherentní holografie je dosaženo prostorové invariance, tedy možnost podstatně snížit prostorovou i časovou frekvenci, díky použití tzv. achromatického interferometru. Snížením prostorové koherence zdroje světla se podstatně zamezí výskytu šumu, a tím dojde ke zlepšení kvality obrazu. [1]

Počítačový software pro zhotovení hologramu nese název SophiQ a je schopen přímo vytvořit těchto pět základních metod zobrazení – hologram, amplituda, fáze, simulovaný DIC, filtr s horní propustností.



Obrázek 2: Multimodální zobrazení CCHM. Použitý objektiv 10x/0.3.

Hlavním výstupem CCHM je hologram, který nese úplnou optickou informaci o pozorovaném vzorku. Skrz počítačový software lze ze zaznamenané intenzity extrahovat další obrazové výstupy. Záznam intenzity i lze popsat pomocí interference předmětové vlny o a referenční vlny r takto:

$$i = |o + r|^2 = or^* + o^*r + |o|^2 + |r|^2. \quad (1.1)$$

Hologram se nejprve převádí dvojrozměrnou Fourierovou transformací (2FFT) na spektrum prostorových frekvencí. Spektra získaná z $|o|^2$ a $|r|^2$ se nachází v nulté prostorové frekvenci, kde nedochází k interferenci a nesou tedy záznam světlého pole. Vytvoří se zde však další dvě spektra or^* a o^*r , která jsou posunutá o nosnou frekvenci. Na jedno z těchto vedlejších spekter je aplikována zpětná Fourierova transformace (IFFT) z které se získá komplexní amplituda. Následně modulací argumentů komplexní amplitudy se získává obraz výsledné amplitudy a fáze. Tato holografická technika umožňuje pozorování dějů v reálném čase. [16, 26]

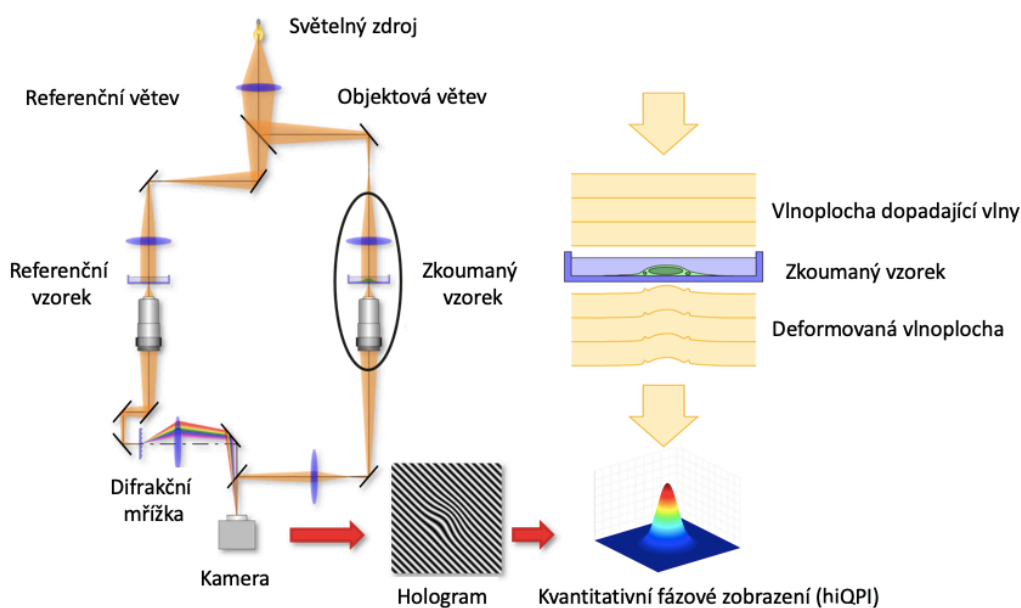
Záznam amplitudy se velmi podobá zobrazovací metodě ve světlém poli, a proto se nejčastěji používá pro orientaci na vzorku či jeho zaostřování. Využívá se pro kontrolu kvality signálu, kde tmavé části na amplitudovém obraze označují oblasti se slabým signálem. [3]

Hlavní zobrazovací metodou je fáze neboli hiQPI, která tvoří základ pro segmentaci obrazu a následnou kvantitativní analýzu. Nejčastěji je vyobrazena v černobílé variantě, avšak CCHM umožňuje vybrat různé zbarvení pro pseudobarvení struktur a detailů uvnitř vzorku. [3, 25, 26]

Pomocí dalších počítačem tvořených algoritmů lze z hiQPI vytvořit simulovaný diferenciální interferenční kontrast (DIC= Differential Interference Contrast) a fázový kontrast filtru s horní propustností. Pro běžné získání obrazu DIC by se k mikroskopu musely přidat dodatečné systémy, ale zde nejsou potřeba, jelikož je zobrazení touto metodou pouze digitálně simulované. Díky tomu lze vzdálenost i směr řezu skrze počítač nastavovat. Fázový obraz z filtru s horní propustností je opět konstruován ze záznamu hiQPI. Filtr propouští pouze signál o vysokých frekvencích, čímž zvyšuje kontrast velmi jemných detailů uvnitř vzorku. [3]

2 Kvantitativní fázové zobrazení

HiQPI pracuje na principu změny časového šíření vlny v závislosti na odlišném indexem lomu a výšce či tloušťce vzorku. Průsvitné objekty, jakými jsou například buňky, obvykle pohlcují a rozptylují malé množství světla, což ztěžuje jejich pozorování zejména v mikroskopech se světelným polem. Tkáňové struktury však vyvolávají fázové posuny dopadající světelné vlny, čehož hiQPI využívá. Pozorovaný vzorek má vyšší index lomu a odlišnou tloušťku a výšku od okolního pozadí, proto dochází ke změně fázového rozložení prošlé vlny. Tento fázový posun vzniklý na ploše vzorku je následně počítán z interference vln referenčního a objektového ramene. Výsledkem je hologram, který nese úplnou informaci o amplitudě a fázovém kontrastu. [16, 17]



Obrázek 3: Schéma vzniku hiQPI

Změna fázového rozložení lze vyjádřit pomocí vztahu

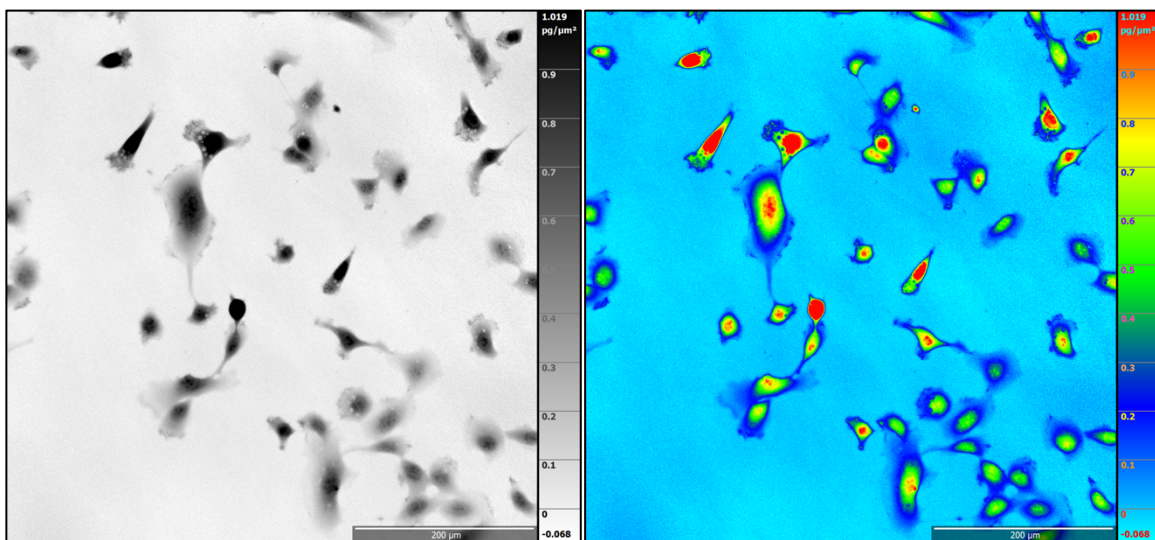
$$\varphi = \frac{2\pi(n_s - n_m)t_s}{\lambda}, \quad (2.1)$$

kde φ je výsledná fáze, n_s je index lomu vzorku a n_m index lomu okolního média, t_s představuje tloušťka vzorku a λ vlnovou délku ($\lambda = 0,65 \mu m$). Fáze je závislá na dvou

parametrech, kterými jsou tloušťka a index lomu vzorku. Tyto parametry se navzájem ovlivňují a nedají se od sebe snadno oddělit. [16,17]

Díky hiQPI mikroskop poskytuje lepší zobrazení než u metod např. Zernikeho fázového kontrastu či diferenciálního fázového kontrastu. Umožňuje vzorek velmi dobře oddělit od pozadí, což je výhodou pro rychlou a přesnou segmentaci buněk potřebnou pro analýzu migraci buněk či zkoumání změny jejich tvaru.

Navíc také dokáže změřit a zmapovat 2D rozložení suché hmoty uvnitř buňky [$\text{pg}/\mu\text{m}^2$]. Suchá hmota neboli biomasa je tvořena proteiny, mastnými kyselinami, lipidy, cukry, metabolity, ionty atd., tedy vším, co tvoří buňku, kromě vody. Tato funkce je vhodná např. pro rozpoznání buněk v apoptóze či v nekróze, právě pro rozdílné rozložení vnitřní hmoty buňky při těchto procesech. Z hodnoty suché hmoty software SophiQ dopočítává další parametry, jako je např. rozloha, hustota či rychlost růstu buněk. [25]



Obrázek 4: HiQPI v černobílé a barevné variantě s vyobrazenou škálou v $\text{pg}/\mu\text{m}^2$ znázorňující 2D rozložení suché hmoty uvnitř buněk. Objektiv 10x/0.3. Měřítka 200 μm .

3 Onkologická léčba

Většina onkologických onemocnění se léčí kombinací různých léčebných postupů. Jejich nejvhodnější sestavení určuje diagnóza pacienta, která je závislá na věku, zdravotním stavu a stádiu onemocnění. V současné době se proti rakovině bojuje pomocí čtyř základních léčivých metod – chirurgická, biologická, chemoterapie a radioterapie. [15]

Léčba rakoviny chirurgickou cestou spočívá ve vyjmutí nádoru či k odstranění pigmentových skvrn. Tento způsob může pacienta zcela vyléčit a zabránit nemoci rozšířit se do dalších tkání. Na základě šíření nádorových buněk lze nádor rozdělit na dva typy, maligní a benigní, jejichž znaky jsou blíže popsány v kapitole 3.2. Jedinec s nádorem, který lze radikálně odoperovat, má šanci na úplné uzdravení. Chirurgická léčba může být pro prognózu pacienta velmi zásadním krokem k uzdravení, ovšem nese to s sebou i jistá rizika v podobě pooperační komplikace či snížení kvality života, po odebrání znetvořené části těla nádorem. [15]

Biologickou léčbou se nazývají typy léků, které mění vlastnosti nádorových buněk. Některé druhy cílených terapeutik blokuji biologické procesy, které umožňují nádorovým buňkám růst a rozmnožovat se. Jiné typy léků zamezují průtok krve nádorem, což způsobí zahynutí nádorových buněk. Řadí se sem mimo jiné i imunoterapeutika, která posilují vlastní imunitní systém pacient, nebo hormonální terapeutika, která pozastavuje účinek hormonů, které se podílí na růstu nádoru. [15]

Chemoterapie k léčbě nádoru používají tzv. cytostatika. Tato protinádorová léčba se podává nejčastěji formou nitrožilních injekcí nebo infuzí, případně požíváním tablet v pravidelných cyklech. Jedná se o léčbu, které působí na rychle rostoucí a dělící se buňky tak, že mění jejich genetickou informaci. Rakovinná buňka se vyznačuje svojí schopností se rychle dělit. Nejedná se však o jediný typ buňky, který tuto schopnost v lidském těle má. Do této skupiny můžeme zařadit např. buňky vlasového folikulu či sliznice zažívacího ústrojí. Z tohoto důvodu mají chemoterapeutika nežádoucí účinky, jako je vypadávání vlasů nebo podráždění zažívacích cest. [15]

Radioterapie je jedním ze základních způsobů protinádorové léčby. Na rozdíl od chemoterapie na nádor působí přímo, a to díky dávce záření, která zcela zničí nebo významným způsobem omezí jeho růst. Cílem radioterapie je vyléčit nádor nebo zmírnit potíže

způsobené nádorem. Princip léčby spočívá v narušení DNA rakovinných nádorových buněk a zastavení tak jejich množení. Rakovinné buňky jsou na ozáření vysoce citlivé a při léčbě ihned umírají. Dochází i k poškození zdravé tkáně okolo nádoru, která je však odolnější a je schopna se po procesu zcela zotavit. Při této léčbě se objevují nežádoucí účinky jako je únava či ztráta chuti k jídlu. [15]

3.1 Migrastatika

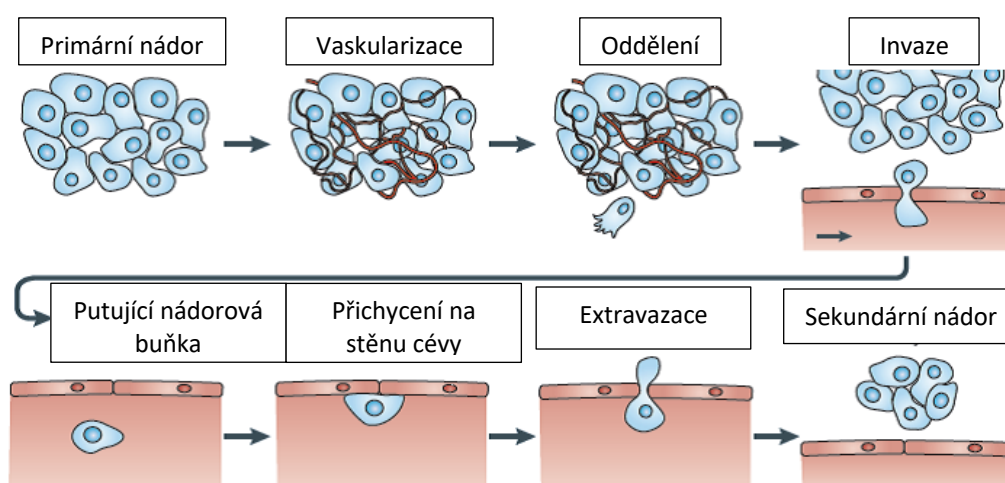
Rakovinné onemocnění se vyznačuje abnormální buněčnou proliferací a potenciálem šířit se do dalších částí těla. Převládajícím znakem je nekontrolovatelný klonální růst, proti němuž se projevila chemoterapie a radioterapie jako účinné řešení. Nádory jsou však provázeny lokální invazí a metastazováním. Z tohoto důvodu je hlavní příčinou selhání léčby vytvoření nových mutací, které jsou proti těmto metodám rezistentní. Léčba by tedy měla být doplněna o inhibitory zastavující schopnost nádorových buněk proniknout skrz extracelulární tkáň a založit sekundární nádory. Těmito léčivými by mohly být tzv. migrastatika (z latinského „migrare“ a řeckého „statikos“). [9]

Buněčná invaze je ovlivňována různými extracelulárními podněty a zahrnuje mnoho signálních drah, které v konečném důsledku regulují kontraktilitu aktomyozinu a polymerizaci aktinu, což jsou dva základní mechanismy řídící buněčnou motilitu. Vzhledem k tomu, že signální dráhy regulující buněčnou invazi jsou vysoce redundantní, inhibice kterékoli z těchto drah může být překonána a povede k rezistenci, která vychází z jiného signálního okruhu obcházejícího inhibovanou dráhu. Migrastatika by se tedy měla zaměřit na základní mechanismy (buněčnou kontraktilitu a polymerizaci aktinu), aby účinně inhibovala buněčnou invazi. [8,9]

Migrastatika vznikla z myšlenky prof. RNDr. Jana Brábka, Ph.D. a výzkumného týmu českých vědců z mezinárodního centra Biocev, jako pátý pilíř protirakovinné léčby. [8]

3.2 Metastatická kaskáda

Z vědeckých výzkumů vyplývá, že nádory mohou být benigní či maligní, jejichž rozdílem je nepřítomnost či přítomnosti invazivního šíření rakovinných buněk. Maligní šíření vzniká tehdy, pokud nastane nepříznivé prostředí pro rakovinné buňky v nádoru. S narůstající velikostí potřebuje i vlastní cévní zásobování, jelikož bez dostatku kyslíku by jeho buňky zahynuly. Vaskularizace nádoru je chaotická a nedokáže vyživovat všechny jeho části. Proto se buňky z tohoto prostředí snaží dostat pryč a prochází klonální evolucí. Následný průběh nám popisuje tzv. metastatická kaskáda. (obr. 5) Dochází k tvorbě buněčných svalů a schopnosti améboidního pohybu buňky, pomocí něhož se rakovinná buňka protlačí skrz póry v mezibuněčné hmotě pryč z nádoru. Po zdolání této překážky se ocitá v krevním či lymfatickém řečišti, kde musí být schopna čelit nežádoucímu prostředí a přežít. Během těchto procesů jsou buňky intenzivně selektovány a pokud přežijí, stanou se odolnějšími. Pokud se pomocí invaze dostanou do více přívnivého prostředí, adhezí se zachytí na cévní stěně a rychlou proliferací vytvoří sekundární nádor, tedy metastázu. [8,9]



Obrázek 5: Metastatická kaskáda – U primárního nádoru dojde k jeho vaskularizaci, která v určité fázi již nestačí nádor vyživovat. Dojde tedy k odpojení určitých rakovinných buněk, které se dostanou do krevního či lymfatického řečiště. Ve vyhovujícím mikroprostředí se začnou uchycovat k cévní stěně a později procházejí skrze její stěny. Tím se rakovinné buňky dostanou do vzdálených míst v těle a vytvoří sekundární nádory. [18]

3.3 Potenciální migrastatika

Potenciální migrastatika jsou léky, které jsou původně schváleny k léčbě jiných diagnóz. Pokud by se projevila jejich účinnost na potlačení migrace rakovinných buněk, jejich cesta k pacientům by byla díky této skutečnosti mnohem rychlejší. [8]

Mezi kandidáty se mimo jiné řadí i těchto osm zástupců, vinkristin (VIN), midostaurin (MID), pimozid (PIM), doxycyklin (DOXY), 4-hydroxyacetofenon (4HAP), niklosamid (NICLS), fasudil (FAS) a belumosudil (BEL). V rámci průzkumu je cílem dokázat, že léky ničí aktinová vlákna v rakovinných buňkách, znemožní jejich kontraktilitu a dosáhnou tak neschopnosti jejich pohybu. Je nepravděpodobné, že by nádorové buňky byly schopny obnovit či nahradit polymerizaci aktinu nebo vyvinout náhradní kontraktilní aparát, proto by tento způsob terapie mohl být velkým přínosem. [10]

VIN se řadí do léčivých přípravků zvaných antimitotická cytostatika. Brání růstu rakovinných buněk navázáním se na tubulinový protein, který zabraňuje proliferaci mikrotubulů, potřebných pro dělení chromozomů během metafáze. Přípravek je běžně používán pro léčbu řady typu rakovin, zejména lymfatické leukémie, retinoblastomu, rakoviny prsu či sarkomů. MID je cílená protirakovinná terapie. Tento lék je kvalifikován jako inhibitor tyrosinkinázy a je používán především na určité typy leukémie. Váže se na receptory leukemických buněk a blokuje buněčné dělení a způsobuje jejich smrt. PIM je antipsychotikum, které je nejčastěji předepisováno k léčbě proti Tourettovu syndromu a schizofrenii. DOXY se řadí do širokospektrálních antibiotik. Používá se k léčbě např. infekcí dýchacích cest, krčních, nosních, ušních cest i močového ústrojí, zánětu spojivek a trachom. 4-HAP, jinak nazývaný také piceol, je používán k syntéze několika farmaceutických léků, přesněji jako ketonová složka potenciálních cytotoxických látek. NICL je běžně používán k léčbě infekce tasemnicí. Jeho dalším účinkem byla zjištěna schopnost snížení proliferace nádorových buněk a vyvolání apoptózy. Omezuje vstup transkripčních faktorů do jádra buňky a jejich vazbu na DNA. V neposlední řadě snižuje možnost migrace a invaze. [11] FAS patří do třídy antagonistů vápníku. Způsobuje inhibici kontrakce a vykazuje vazodilatační účinky. Vyvolává dezorganizaci aktinových vláken a pozastavuje migraci buněk. [12] BEL je schválené léčivo pro chronické reakce štěpu proti hostiteli a systémové sklerózy. [13]

Pro tyto léky byly vyselektovány hodnoty koncentrací pro správné vyhodnocení účinku na rakovinné buňky. Tabulka 1 ukazuje hodnoty použitých koncentrací pro výzkumnou část této diplomové práce.

Tabulka 1: Přehled potenciálních migrastatik

Migrastatika	Použitá koncentrace
Vinkristin (VIN)	100 nM
Midostaurin (MID)	1 μ M
Pimozid (PIM)	10 μ M
Doxycyklin (DOXY)	1 μ g/ 1 ml
4-hydroxyacetofenon (4HAP)	4 μ M
Niklosamid (NICLS)	1 μ M
Fasudil (FAS)	10 μ M
Belumosudil (BEL)	1 μ M

3.4 Časoběrné snímání živých nádorových buněk

Ke studiu dynamiky migrace nádorových buněk byla vybrána rakovinná buněčná kultura označována HT1080. HT1080 představuje buněčnou kulturu fibrosarkomu, jenž se nachází jak na měkkých tkáních, jako jsou šlachy nebo klouby, tak na kostech. Tato linie byla do výzkumu zapojena zejména kvůli malé citlivosti na radioterapeutickou léčbu a protinádorovou chemoterapii. [20]

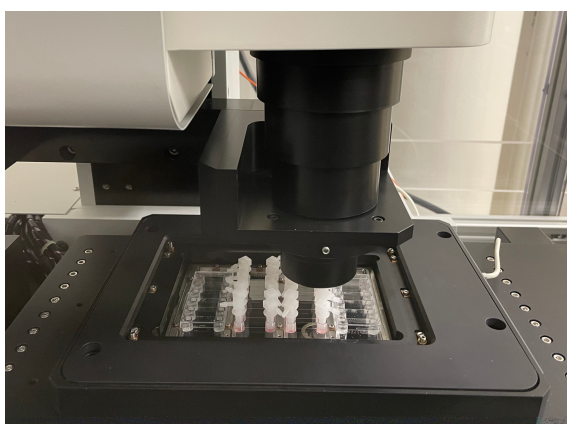
Kultivace buněčné linie probíhala při 37 °C ve zvlhčeném inkubátoru s 3,5 % CO₂ ve standardním médiu Eagle MEM s 10% fetálním bovinním sérem, 20 μ M gentamicinu a 2 mM L-glutaminu. Pro časoběrné snímání byly buňky vloženy do 6 kanáلكové průtokové komůrky Ibidi μ -Slide VI^{0.4} (obr. 6) s médiem obohaceným o 20 mM HEPES pro udržení pH 7,4. V této komůrce byly buňky ponechány 24 hodin z důvodu potřebné adheze a následné výměně média s migrastatikem.



Obrázek 6: Ibidi μ -Slide VI^{0.4}.

Při přípravě vzorku se pomocí pipety odsálo všechno médium a do jednotlivých kanálků se přidalo 80 μ l testovaného migrastatika a média smíchaném v základní koncentraci uvedené v tabulce 1. Pro zachování stálé hodnoty roztoku se na výstup kanálku aplikovalo 20 μ l oleje od firmy Ibidi a otvor byl zakryt plastovou krytkou. Všechna příprava se konala ve sterilním prostředí zajištěné flowboxem.

Ihned po přípravě byl vzorek vložen do speciálního držáku pro čtyři ibidi komůrky, který byl vložen do motorizovaného stolku umožňující vícepolohové časoběrné nahrávání (obr. 7). V uzavřeném prostoru CCHM byla udržována teplota 37 °C.



Obrázek 7: Uložení nástavce s dvěma Ibidi komůrkami do motorizovaného stolku CCHM.

Po nastavení poloh bylo spuštěno nahrávání 20hodinového data setu, kde bylo snímáno 30 - 36 vybraných pozic každých 5 minut.

4 Segmentace buněk

Segmentace je hlavním krokem pro zkoumání a analýzu dat získaných z fázového obrazu. Pro její správnost je nutné provést vyrovnání pozadí. Jelikož existují jisté vady použité optiky, pozadí není fázově všude stejné. Jelikož buňky mají odlišnou výšku od pozadí, jsou lehce detekovatelné. Toho využívá software SophiQ, který umožňuje separovat obraz pozadí bez buněk a následně jej odečíst od obrazu fáze. Výsledkem je vyrovnání pozadí, odstranění nežádoucího šumu a zvýšený kontrast buněk. [21, 22, 25]

Pro segmentaci je zde použita metoda watershed, která spočívá v metodě běžného prahování a je lehce představitelná jako zaplavování krajiny vodou. Hladina, která je volena uživatelem v $\text{pg}/\mu\text{m}^2$, omezuje rozlohu segmentované buňky. Čím vyšší bude hodnota hladiny, tím menší část buňky bude segmentována. Další nastavení spočívá v minimálním a maximálním omezení poloměru buněk a zvolení minimální hodnoty hmotnosti buněk, která filtruje některé anomálie v obraze, např. plovoucí nečistoty v roztoku. Volí se i maximální prahová hodnota hmotnosti pro sloučení buněk. Tato funkce dokáže odlišit dvě buňky, které se navzájem dotýkají. Zabraňuje např. falešnému rozdělení jedné buňky, která se svými dvěma výraznými vrcholy může být detekována jako dvě dotýkající se buňky. Jinými slovy řečeno se jedná o horní parametr hodnoty váhy, jakou by buňka v experimentu měla mít. Pro odstranění buněk na okraji zorného pole slouží hranová hodnota. Software následně umožňuje i manuální úpravy spočívající v oddělení či sloučení buněk nebo v jejich úplném odstranění. [21, 25]

Po úspěšné segmentaci je spuštěna analýza, která hodnotí několik parametrů. Pro účely této diplomové práce byly sledovány zejména parametry rychlosti, kruhovitosti, Meandr indexu, Eukleidovské vzdálenosti a motility buněk.

5 Analýza dat

Pro analýzu dat je proveden výzkum nazývaný se „Rychlé vyšetření růstu a migrace buňky *in vitro*“ (RAC-GM = Rapid assessment of cell growth and migration). Jedná se o propojení všech objektivů CCHM pro zkoumání komplexního účinku migrastatik na růst a motilitu rakovinných buněk.

Metoda RAC-GM spočívá ve vybrání buněčné linie a k ní vhodných migrastatik, u kterých je předpoklad snížení pohybu těchto lidských buněčných linií. Dalším krokem je nasnímání buněk pomocí objektivu 4x/0.1, a to 3-5 pozic v jednom kanálku každých 5 minut po dobu 20 hodin (5 min./20 h.). Objektiv 4x/0.1 se vyznačuje velkým zorným polem, který zachytává vysoký počet buněk, jenž je vhodné pro statistiku pohybu. Pokud se prokáže, že některá migrastatika pohyb buněk opravdu zpomaluje, opakuje se měření téže buněčné linie s těmito vybranými migrastatiky pomocí objektivu se zvětšením 10x/0.3 (5 min./20 h.). Migrastatika se v této fázi ředí a hledá se taková koncentrace, která je stále schopna ovlivnit dynamiku pohybu a nezpůsobuje výrazné morfologické změny či dokonce buněčnou smrt. Po prokázání této teorie u některého z migrastatik se přechází k následné části snímání, a to pomocí objektivu se zvětšením 20x/0.5 (5 min./20 h.). Díky velkému zvětšení je možné zkoumat morfologické změny buňky zaměřené zejména na studii jádra, membrány a buněčného dělení či buněčné smrti. Posledním z kroků je snímání pomocí objektivu 40x/0.75, který je určen pro záznam nitrobuněčných aktivit v krátkém časovém úseku (1 s./15 min.).

Následující analýza je zaměřená na první část metody RAC-GM, která zahrnuje snímání buněk pomocí objektivu 4x a následnou analýzu a statistické zpracování získaných hodnot a parametrů. V druhé části pak porovnání zobrazení stejné buněčné linie pomocí objektivu 10x. Vybranými parametry pro výzkum motility jsou rychlost, Eukleidovská vzdálenost, kruhovitost a meandr index.

Kruhovitost určuje odchylku tvaru buňky od kruhovitého tvaru, jenž vyplývá z podílu její plochy a obvodu. Tvar buňky je úzce spjat s jejím pohybem. Pokud je buňka zakulacena, setrvává na místě, jelikož nejsou přítomny výběžky cytoplazmy, které uskutečňují améboidní pohyb. Důvodem zakulacení buňky může být příprava na její dělení nebo v druhém případě na apoptózu (buněčnou smrt). Kruhovitost je udávána v % a vztah pro její výpočet vypadá takto:

$$Kruhovitost = \frac{100 \cdot 4 \cdot \pi \cdot Plocha}{Obvod^2}. \quad (5.1)$$

Pro výpočty vzdálenosti, rychlosti a meandru indexu buněk je zaveden parametr těžiště buňky CW , který je počítán pozicí a velikostí pixelů:

$$CW = \frac{\sum_{\text{pro každý pixel buňky}} \text{Pozice pixelu} * \text{Velikost pixelu} * \varphi}{\sum_{\text{pro každý pixel buňky}} \varphi}, \quad (5.2)$$

kde φ [rad] představuje detekovanou hodnotu fáze.

Eukleidovská vzdálenost má jednotku μm a říká, jakou dráhu buňka urazila od počátku měření do jeho konce. Spočtena je pomocí parametru těžiště buňky:

$$E. \text{ vzdálenost}_{(t)} = CW_{(t)} - CW_{(0)}. \quad (5.3)$$

Rychlost buněčné translokace udávána v $\mu\text{m}/h$ je počítána pomocí podílu Eukleidovské vzdálenosti a času:

$$Rychlost_{(t)} = 3600000 * \frac{|CW_{(t)} - CW_{(t-1)}|}{\text{čas}_{(t)} - \text{čas}_{(t-1)}}. \quad (5.4)$$

Index meandrovitosti udává podíl Eukleidovské vzdálenosti a těžiště buňky měřený v %. Poukazuje na odchylku od přímočarosti a udává tak informaci o invazivitě buněk. Pokud by dráha buňky byla dokonale rovná, podíl by byl roven 1. Čím vyšší je podíl, tím více se dráha buňky klikatí.

$$MeanderingI_{(t)} = 100 * \frac{EDist_{(t)}}{\sum_{i=0}^{t-1} |CW_{(i)} - CW_{(i+1)}|}. \quad (5.5)$$

Pro tuto diplomovou práci byly pořízeny dva data sety s buňkami HT1080 s použitím dvou objektivů popsaných v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité objektivy pro první a druhý data set.

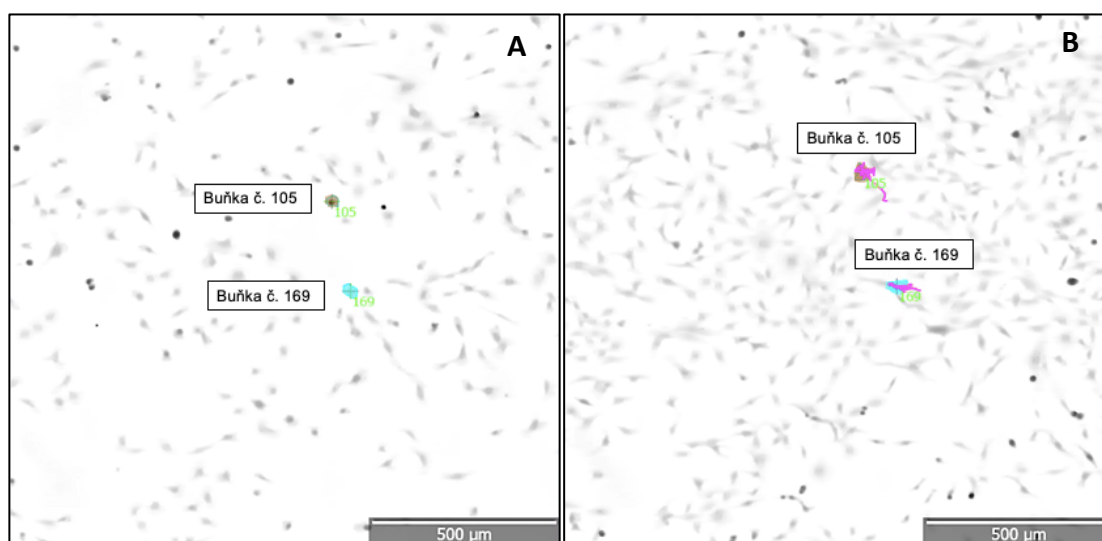
Zvětšení objektivu	Numerická apertura	Pracovní vzdálenost [mm]	Zorné pole [μm]	Hloubka ostrosti [μm]
4x	0.1	30,0	1494x1494	67,6
10x	0.3	16,0	598x598	42,4

5.1 Objektiv 4x

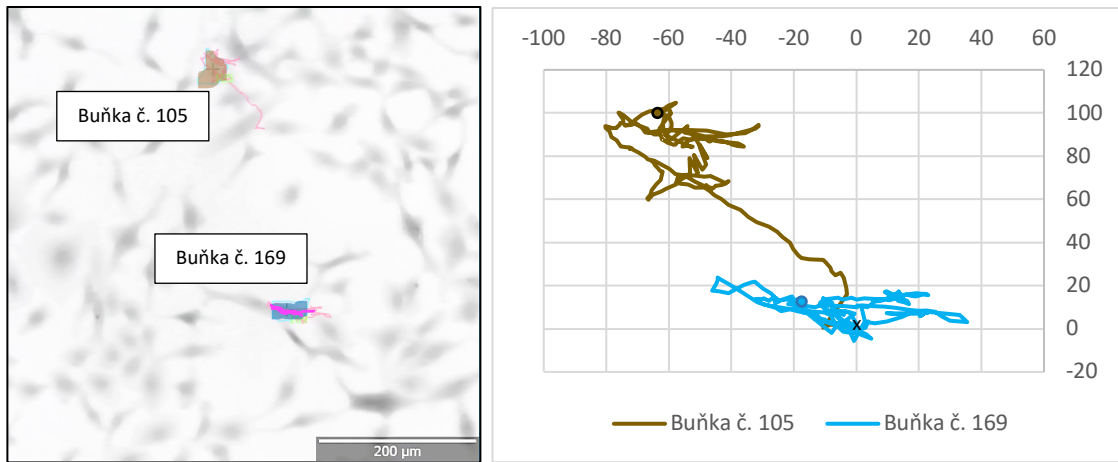
První data set byl měřen s uvedenými kandidáty migrastatik pro názorné zhodnocení motility buněčné kultury HT1080 skrze objektiv 4x v časovém úseku 20 hodin s intervalem 5 minut. Z data setu byl pořízen záznam tří pozic pro každý kanálek s jedním migrastatikem. Jeden z kanálků byl naplněn pouze médiem bez léčiva, jehož data se použijí jako kontrola (CNT). Následující hodnoty jsou vybrány pouze z jedné pozice v každém kanálku.

5.1.1 Časová závislost

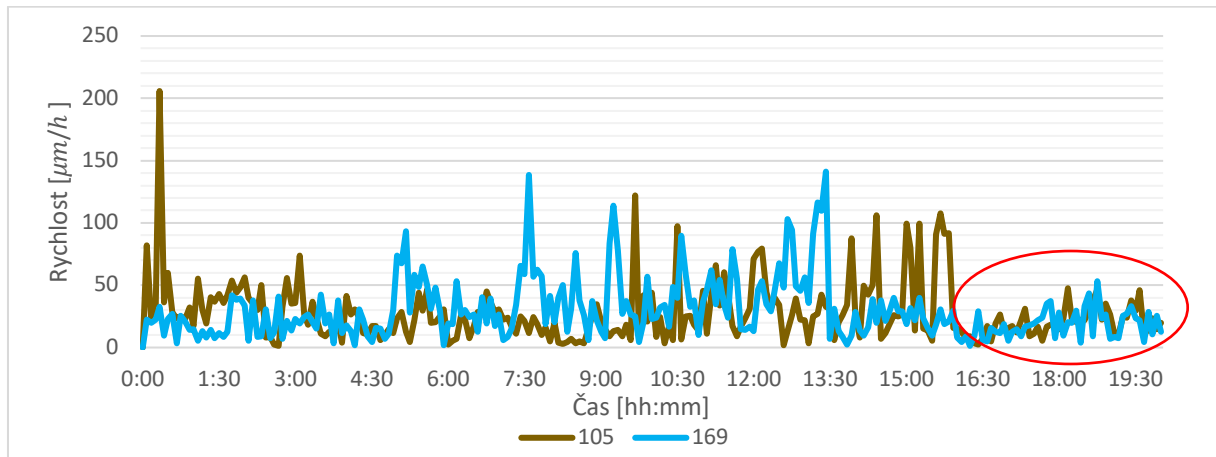
První obrázek a grafy poukazují na chování buněk kontroly, které nejsou ovlivněny léčivem. Dle obrázku 8 jde vidět vysoký nárůst počtu buněk, jejímž vlivem se vybrané buňky č. 105 a č. 169 udržovaly převážně na místě. Vysoké hodnoty vykazuje graf rychlosti 1 a průběh indexu meandrovitosti 3 zejména v první polovině snímání. Od 15 hodiny je vidět pozastavení migrace buněk v grafu 1 a 2, která mohla být ovlivněna nedostatkem místa.



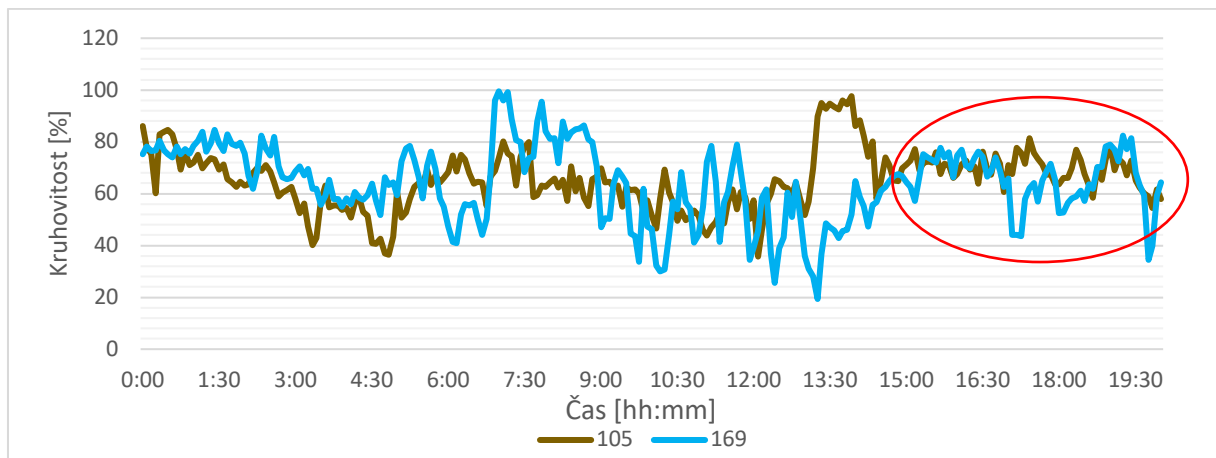
Obrázek 8: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s CNT a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 200 μm .



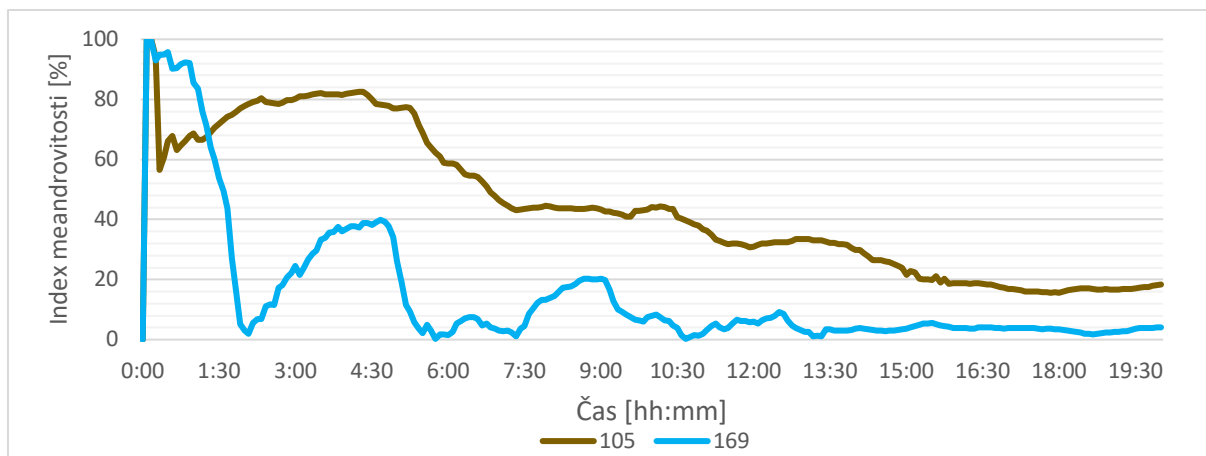
Obrázek 9: Buňky HT1080 v CNT na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm .
 Vykreslení trajektorie buněk č. 105 a č. 169. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0].
 Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 1: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.105 a č. 169 v CNT.

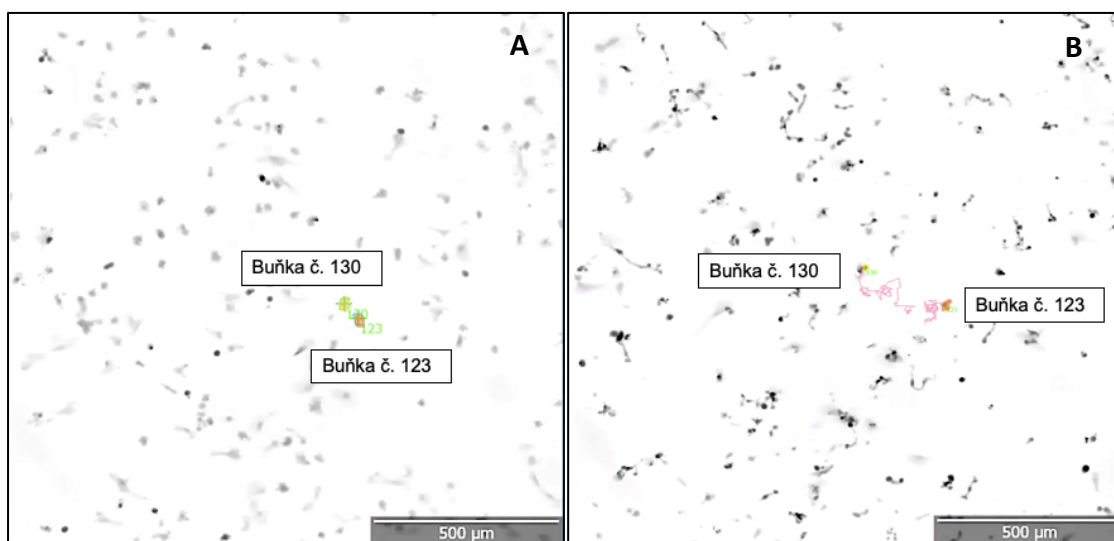


Graf 2: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.105 a č. 169 v CNT.

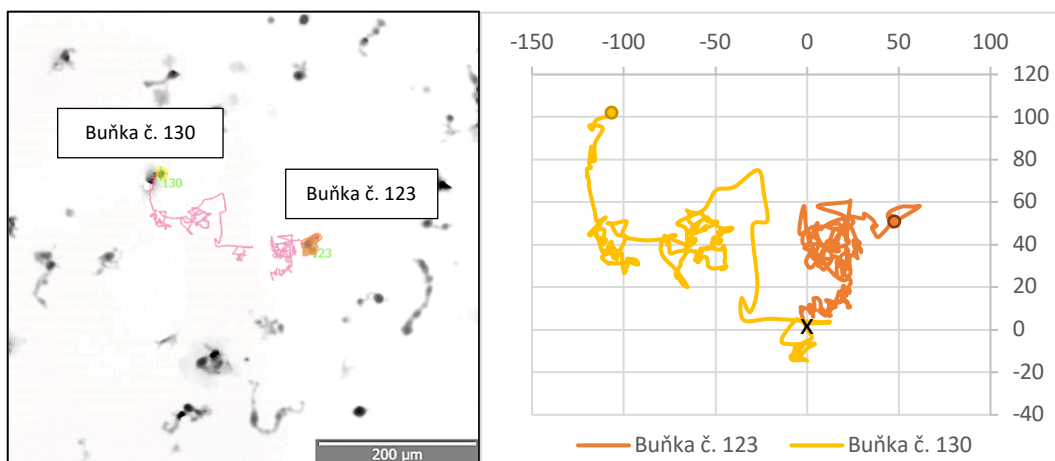


Graf 3: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.105 a č. 169 v CNT.

Následující kanálek byl naplněn léčivem VIN. Toto migrastatikum je považováno jako pozitivní kontrola, jelikož jsou jeho účinky na rakovinné buňky známé. Jedná se o cytostatikum, které pozastavuje tvorbu dělicího vřeténka, a tedy zamezuje růstu buněk. Pro názorné zobrazení parametrů byly vybrány dvě buňky. Na obrázcích 10 a 11 jde vidět změnu jejich polohy s vykreslenou trajektorií, kterou urazily během 20 hodin. Dále je z obrázků patrné, že se buňky nedělily, a naopak nastala buněčná smrt.

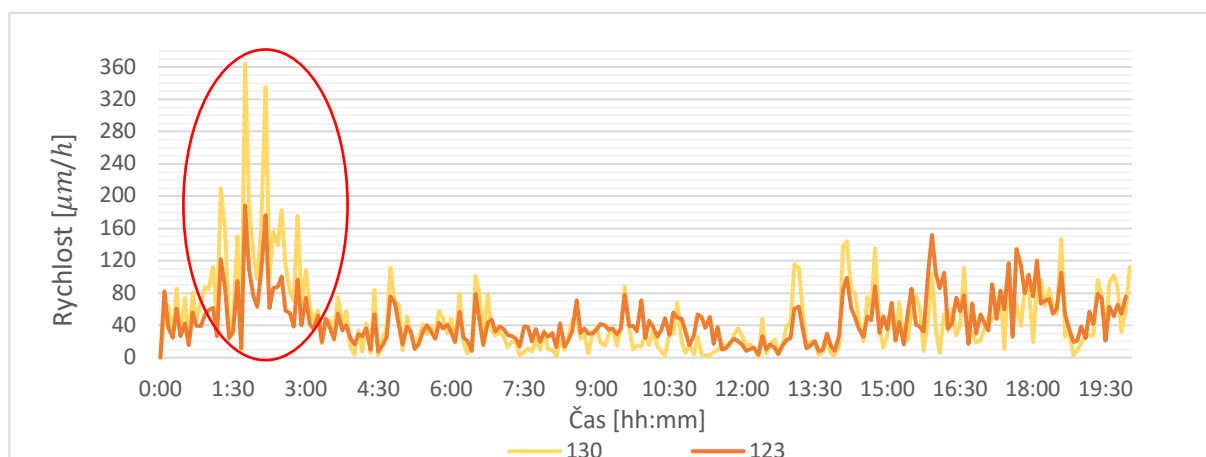


Obrázek 10: Segmentace dvou buněk HT 1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem VIN a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 500 μm .

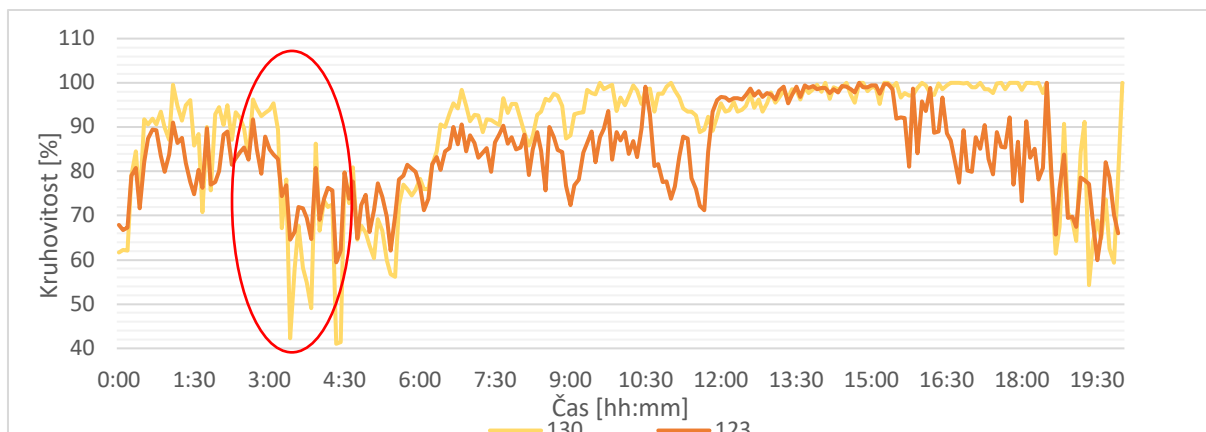


Obrázek 11: Buňky HT1080 pod vlivem léčiva VIN na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 123 a č. 130. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .

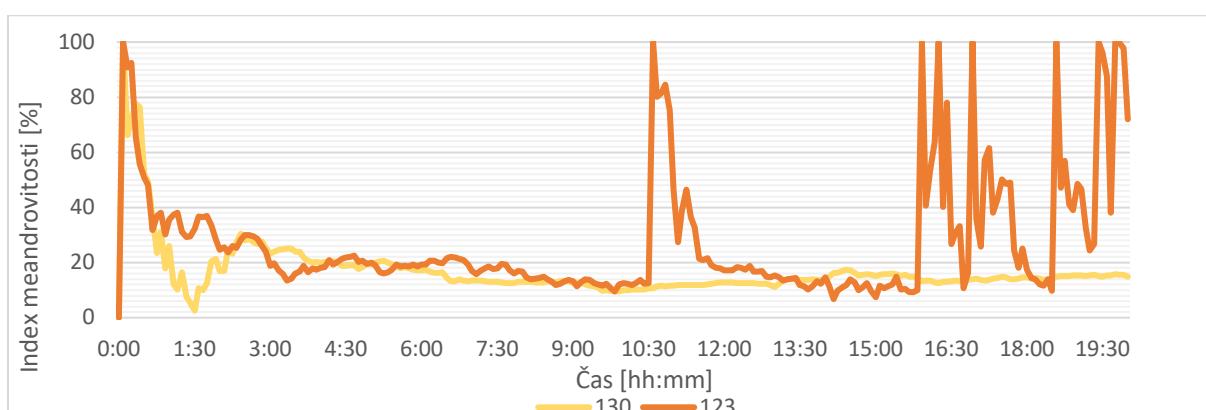
Označené místo v grafech nám udává důkaz, že pokud se snížila kruhovitost, zapříčinilo to vzrůst rychlosti obou buněk. Graf 6 vykreslující časovou závislost indexu meandrovitosti ukazuje na zvláštní případ, kdy se buňka č. 123 v 11 hodině a pravidelně od 16 hodiny až do konce měření pohybovala velmi přímočaře. S jistou pravděpodobností došlo k rozpadu buňky, která se takto pohybovala vlivem proudů v médiu.



Graf 4: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.123 a č. 130 s migrastatikem VIN.

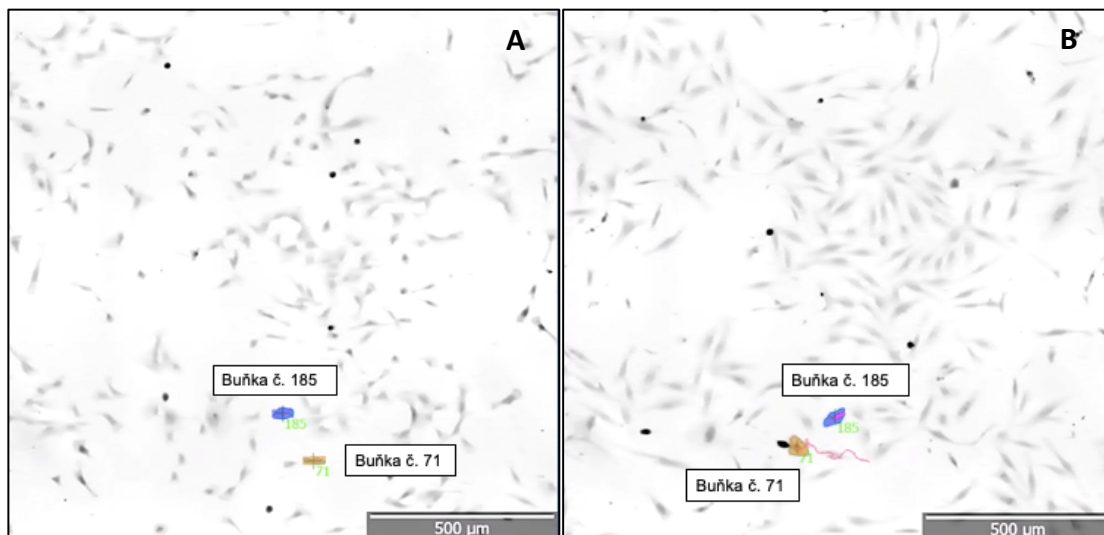


Graf 5: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.123 a č. 130 s migrastatikem VIN.

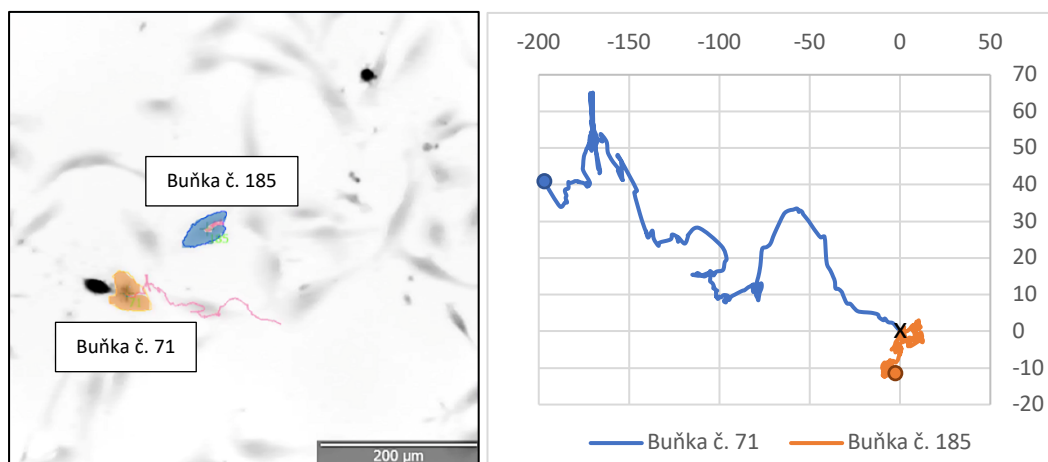


Graf 6: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.123 a č. 130 s migrastatikem VIN.

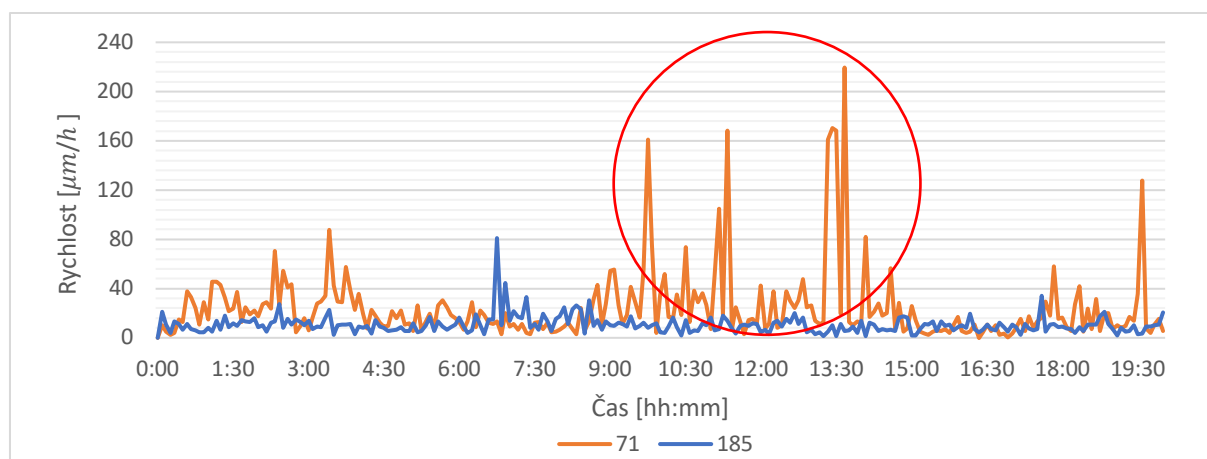
Druhý kanálek obsahoval léčivo MID. Na obrázcích 12 a 13 je vidět trajektorie dvou buněk, kde buňka č. 185 neurazila téměř žádnou vzdálenost oproti buňce č. 71, což dokazuje graf rychlosti 7. Kruhovitost buňky č. 180 je téměř konstantní, oproti buňce č. 71, jejíž tvar se v průběhu 20hodinového časoběru několikrát proměňuje. Propadům hodnot kruhovitosti u buňky č. 71 lze dle časové osy přiřadit nárůst rychlosti. Graf 9 potvrzuje, že se buňka č. 71 pohybovala přímočařeji nežli buňka č. 185.



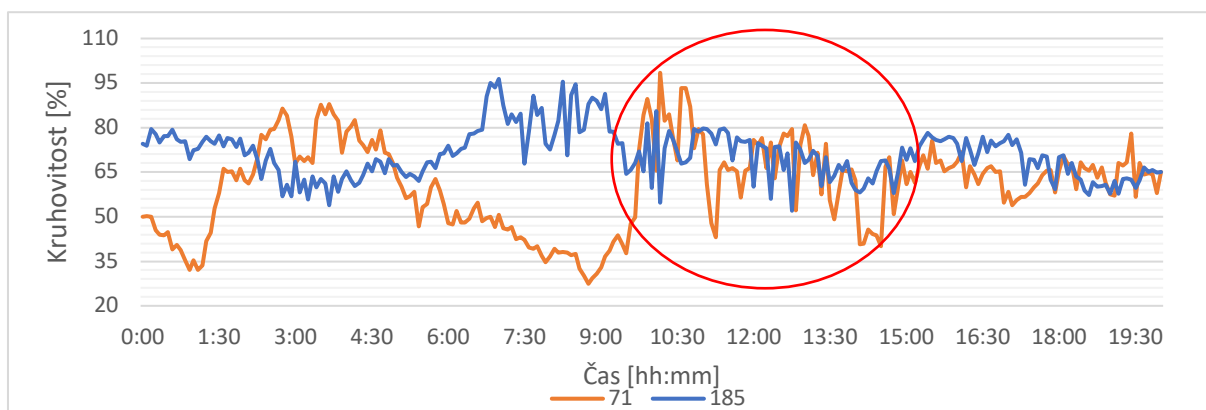
Obrázek 12: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem MID a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 500 μm .



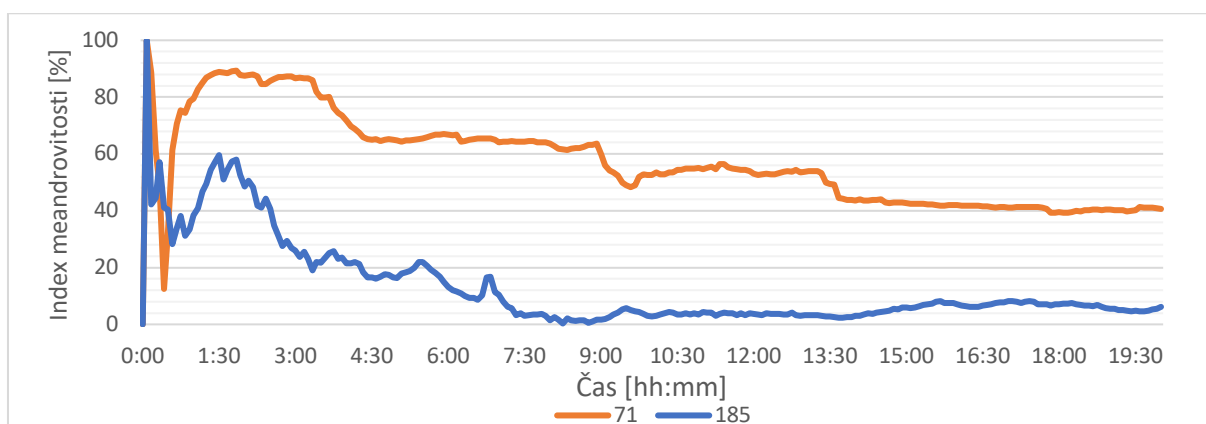
Obrázek 13: Buňky pod vlivem MID na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 71 a č. 185. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 7: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.71 a č. 185 s migrastatikem MID.

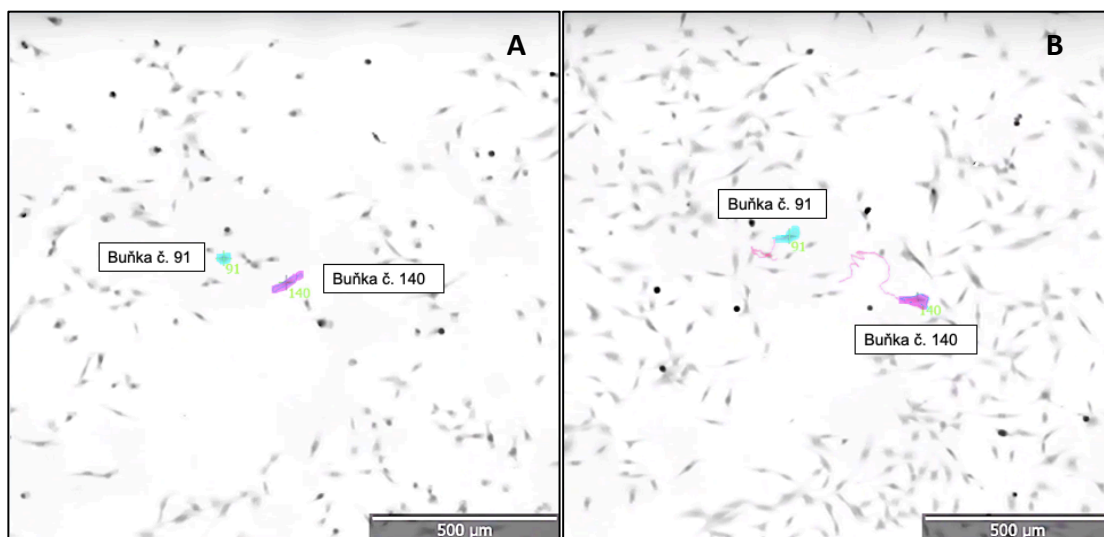


Graf 8: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.71 a č. 185 s migrastatikem MID.

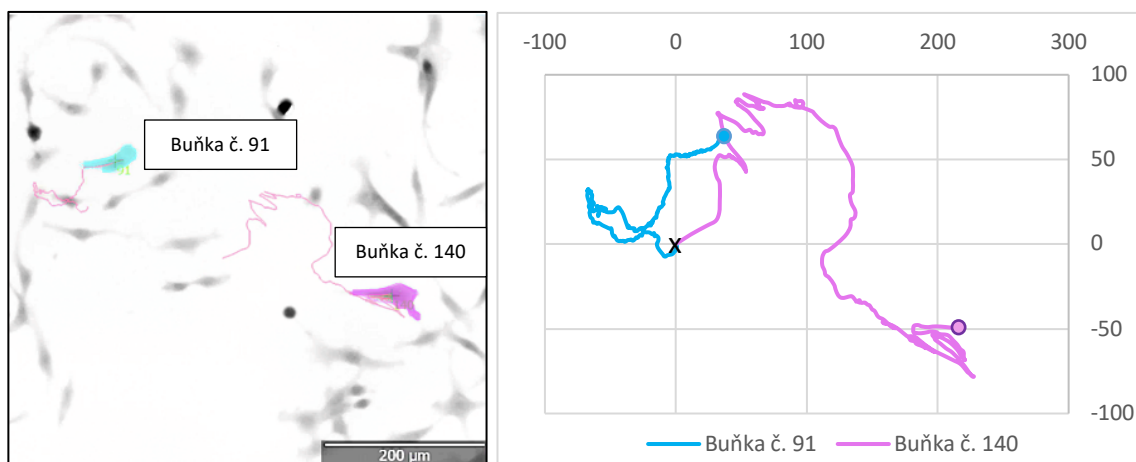


Graf 9: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.71 a č. 185 s migrastatikem MID.

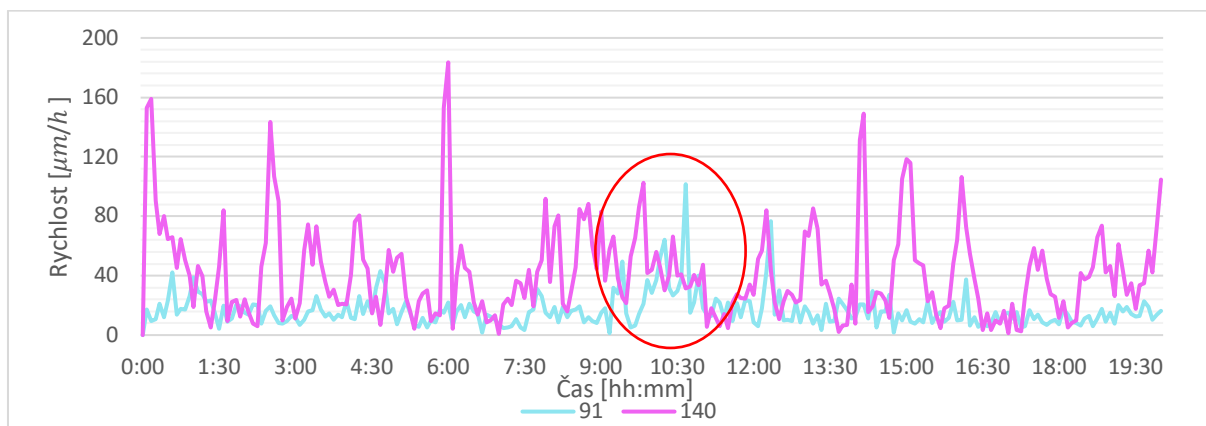
Následující kanálek obsahoval léčivo PIM. Vybrané buňky se v průběhu časové osy chovaly velmi odlišně. Buňka č. 140 vykazuje mnohem vyšší rychlost, čemu odpovídá i nižší hodnoty kruhovitosti. Buňka č. 91 se kolem 10 hodiny pravděpodobně rozdělila, což nasvědčuje vzrůst a pokles kruhovitosti, jenž je viditelné ve vyznačeném poli v grafu 11. Následně její rychlost i index meandrovitosti poklesli, což ilustrují vyznačená místa v grafech.



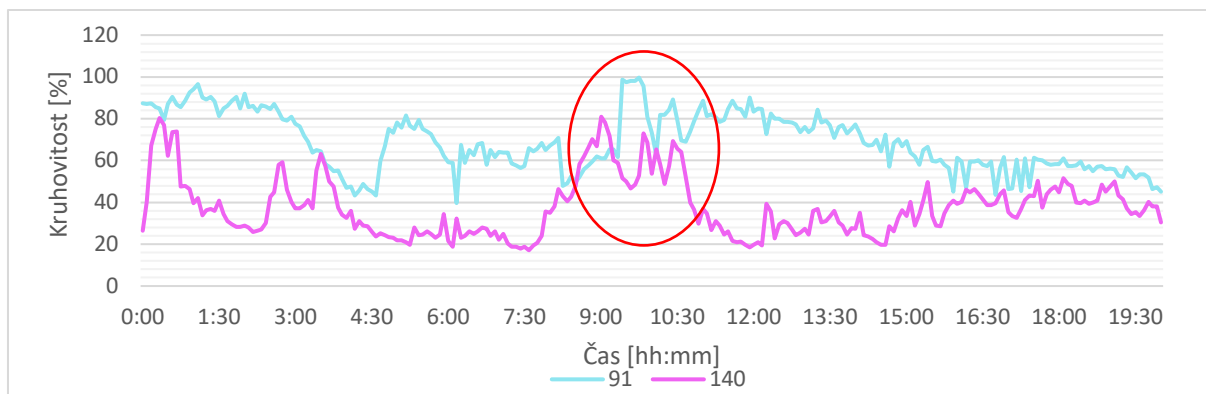
Obrázek 14: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem PIM a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektív 4x/0.1. Měřítko 500 μm .



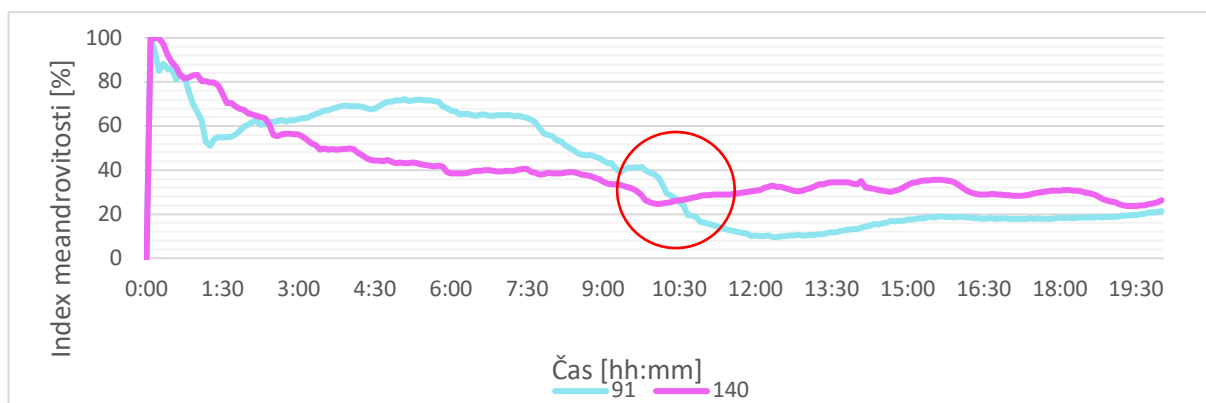
Obrázek 15: Buňky pod vlivem léčiva PIM na konci měření skrze objektív 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 91 a č. 140. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 10: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č. 91 a č. 140 s migrastatikem PIM.

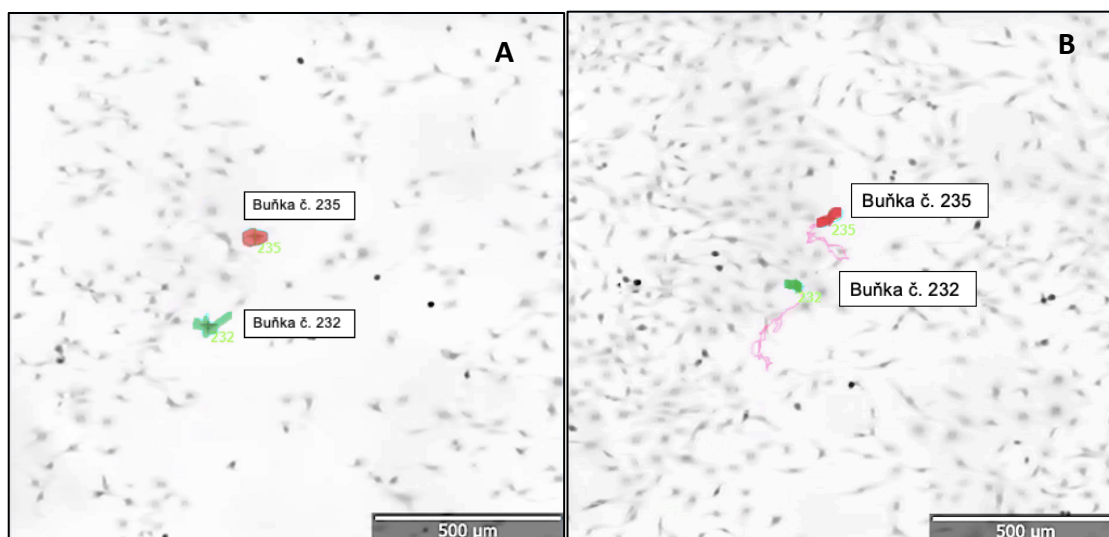


Graf 11: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č. 91 a č. 140 s migrastatikem PIM.

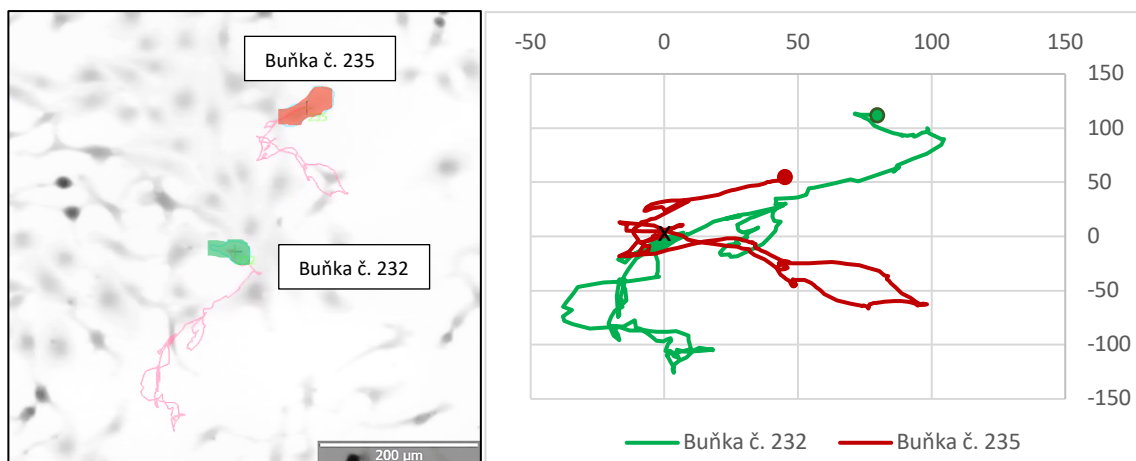


Graf 12: Časová závislost indexu meandrovitosti HT1080 č.91 a č. 140 s migrastatikem PIM.

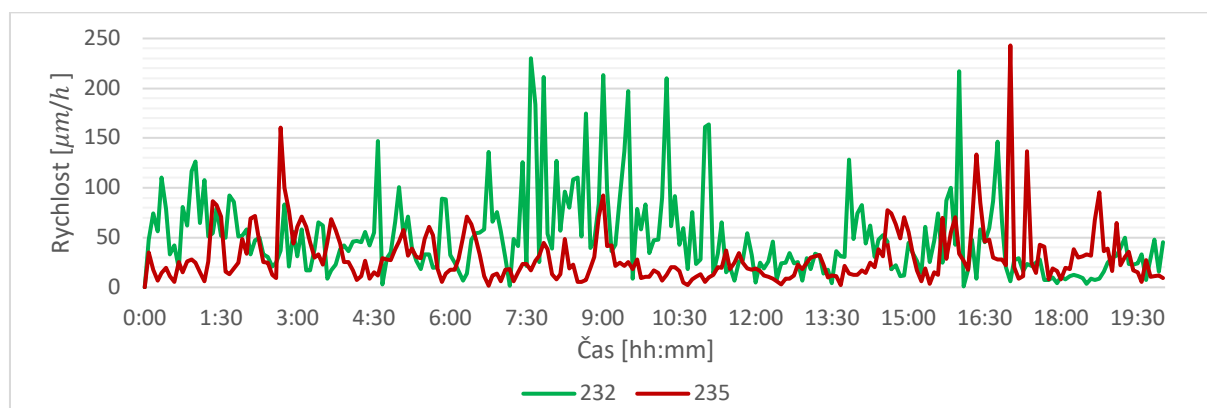
Další použité léčivo byl FAS. Na obrázku 16 B je patrný vysoký nárůst buněk, čemu odpovídá i graf kruhovitosti 14, kde jsou vidět časté píky, kdy se buňka zakulatila a poklesy, kdy se rozdělila. Obě buňky vykazovaly vysokou rychlost, avšak poměrně nízký index meandrovitosti.



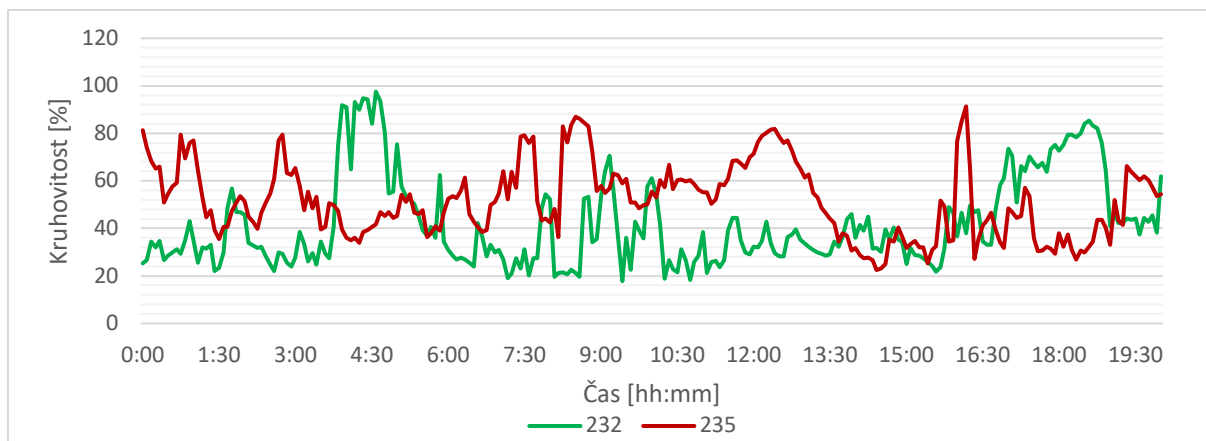
Obrázek 16: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem FAS a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 500 μm .



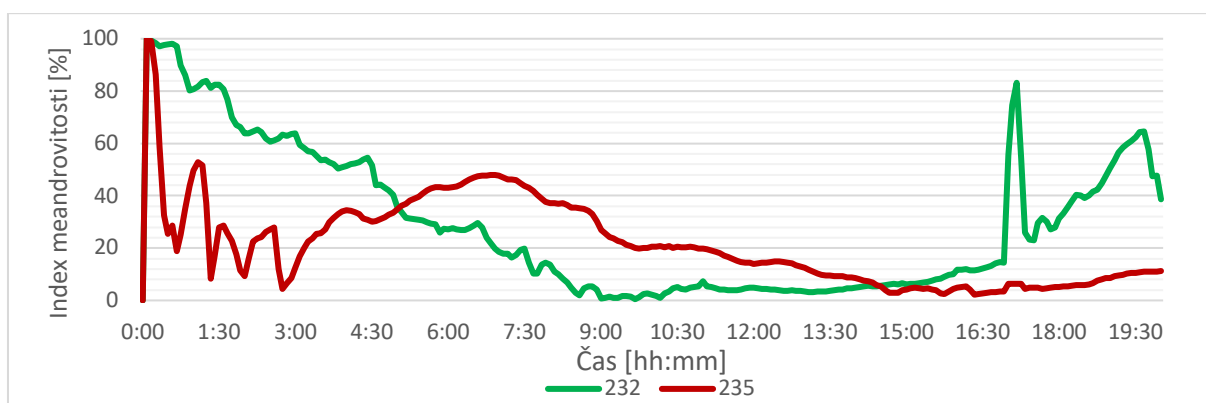
Obrázek 17: Buňky pod vlivem léčiva FAS na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 232 a č. 235. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 13: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.232 a č. 235 s migrastatikem FAS.

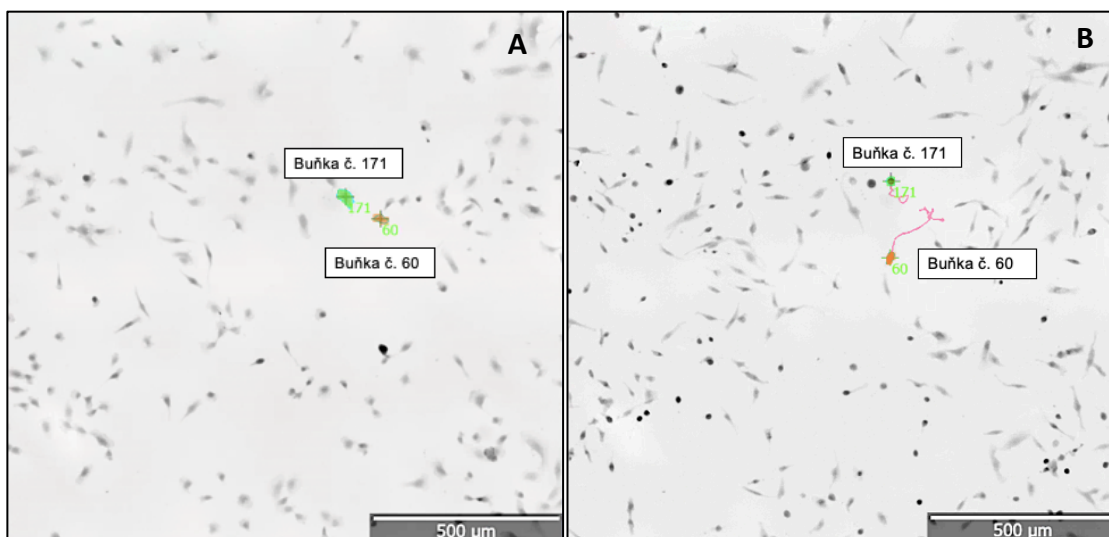


Graf 14: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.232 a č. 235 s migrastatikem FAS.

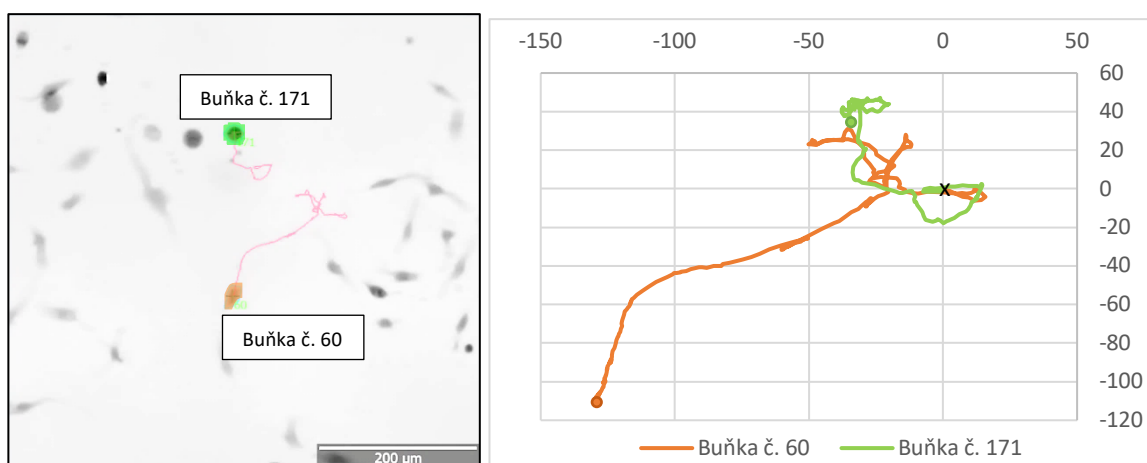


Graf 15: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.232 a č. 235 s migrastatikem FAS.

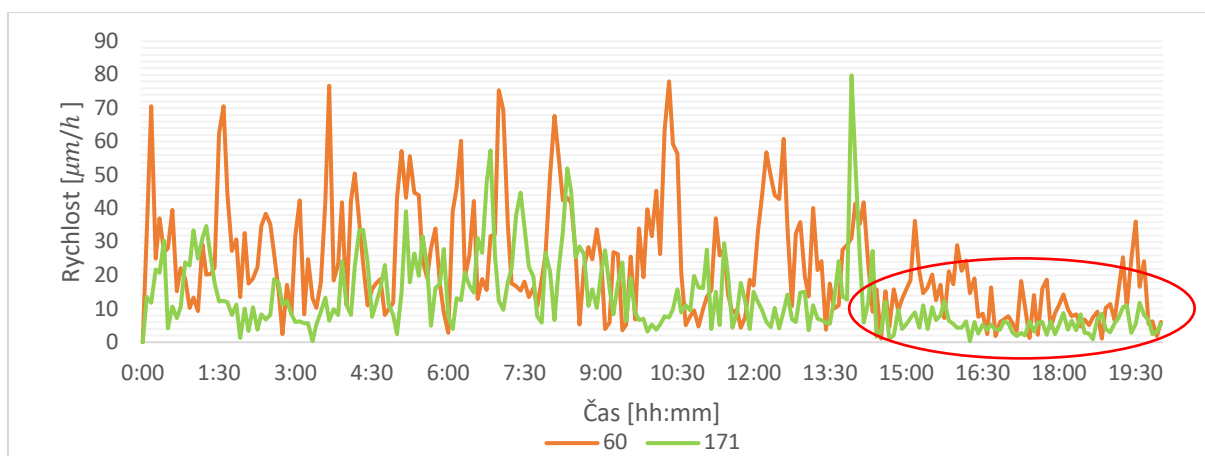
V následujícím kanálku byly vybrány buňky č. 60 a č. 171, které reagovaly na migrastatikum NICL celkově sníženou aktivitou pohybu. Jak je patrné na obrázku 18 B, převážná část buněk je zakulacených a počet buněk výrazně nestoupá. U vybrané buňky č. 171 zakulacení nastalo po 14 hodinách, jak můžeme vidět vyznačeno v grafu 17. V závislosti na tom se zpomalila i její rychlost. Index meandru byl v obou případech nižší než CNT.



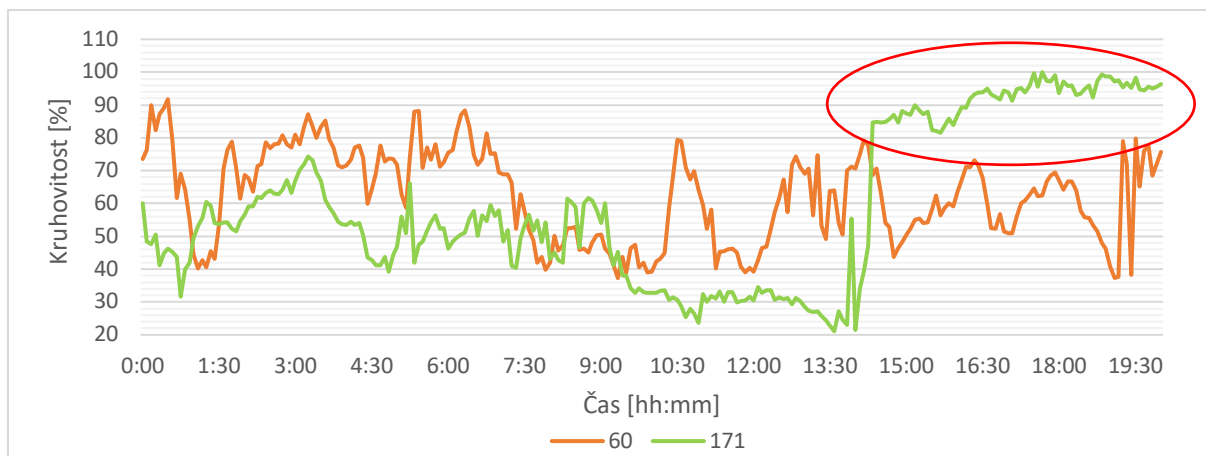
Obrázek 18: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem NICL a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítka 500 μm .



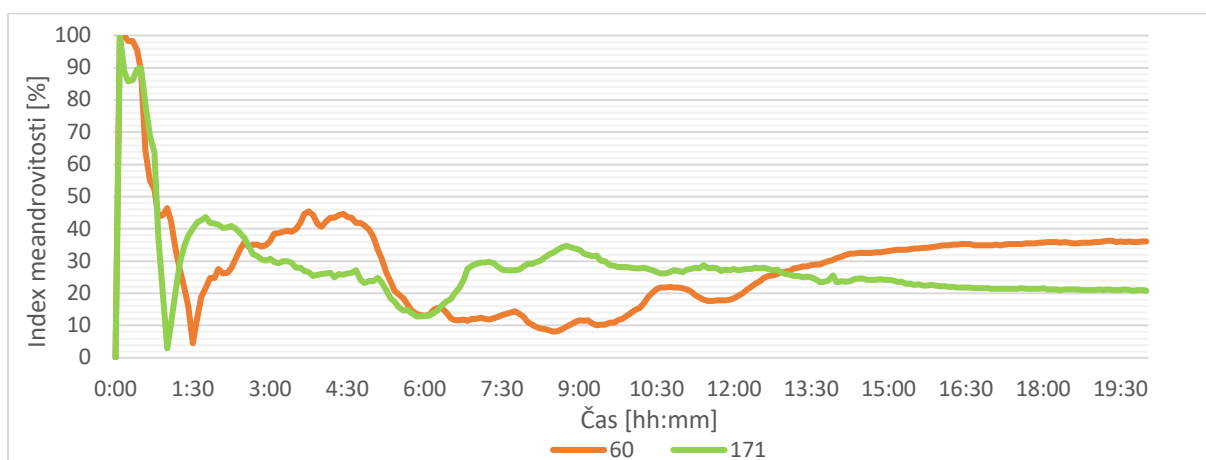
Obrázek 19: Buňky pod vlivem léčiva NICL na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítka 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 60 a č. 171. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 16: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.60 a č. 171 s migrastikem NICL.

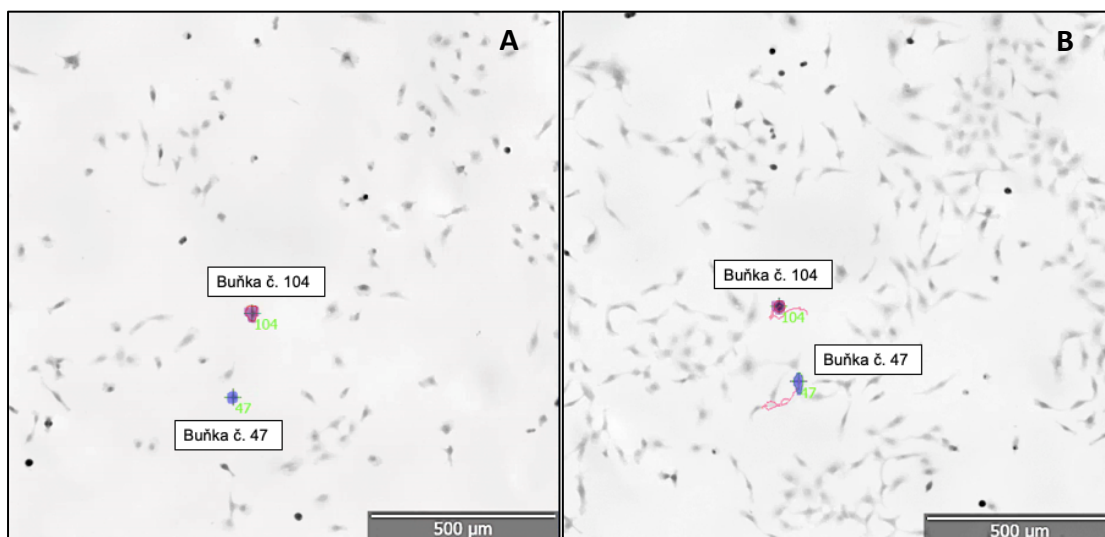


Graf 17: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.60 a č. 171 s migrastatikem NICL.

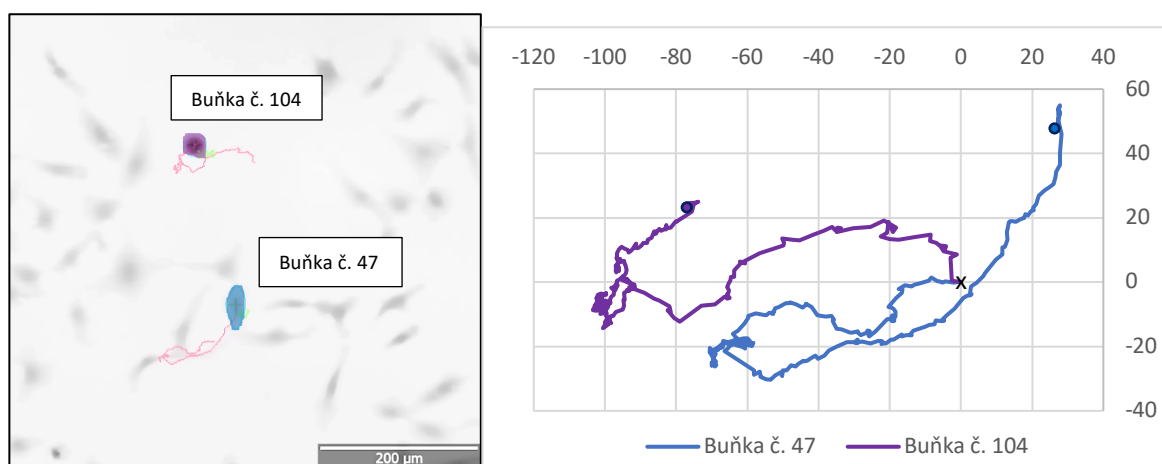


Graf 18: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.60 a č. 171 s migrastatikem NICL.

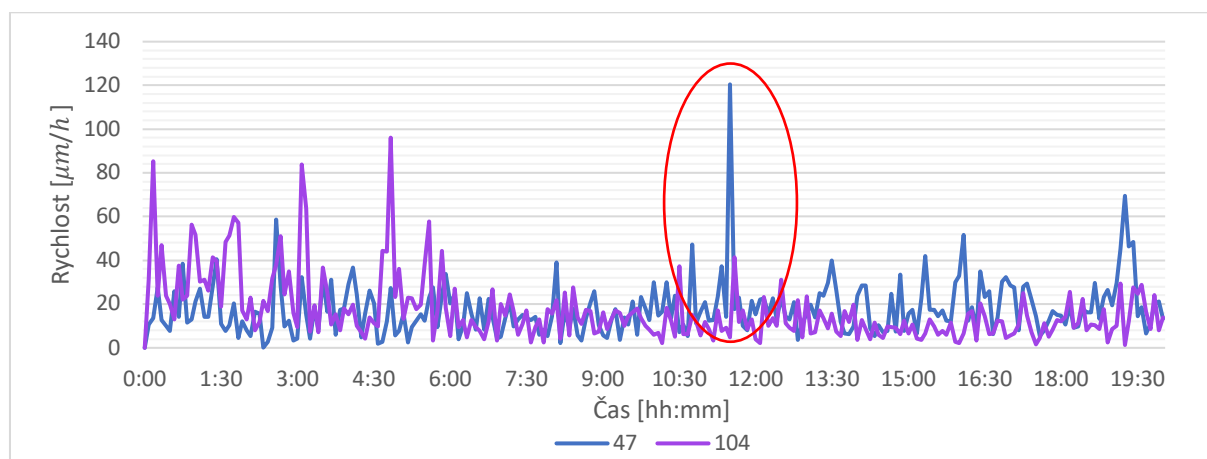
Migrastatikum DOXY působilo na vybrané buňky č. 47 a č. 104 snížením jejich rychlosti. Vysoký pík rychlosti buňky č. 47 kolem času 11:30 způsobilo její dělení, což dokazuje prudké zakulacení vyznačené v grafu 20. Index meandrovitosti poukazuje na vysoké hodnoty. Na obrázku 20 lze vidět, že počet buněk narostl.



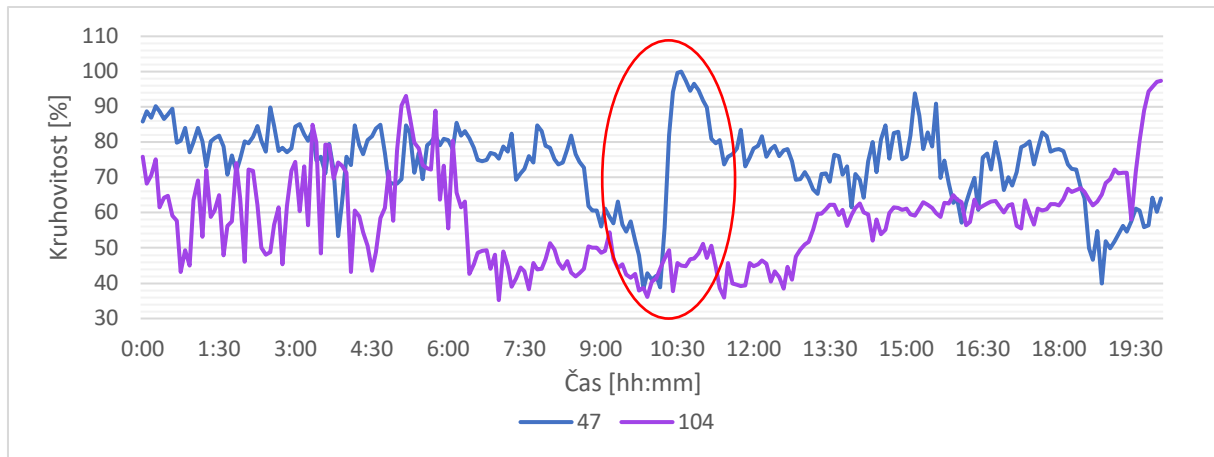
Obrázek 20: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem DOXY a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 500 μm .



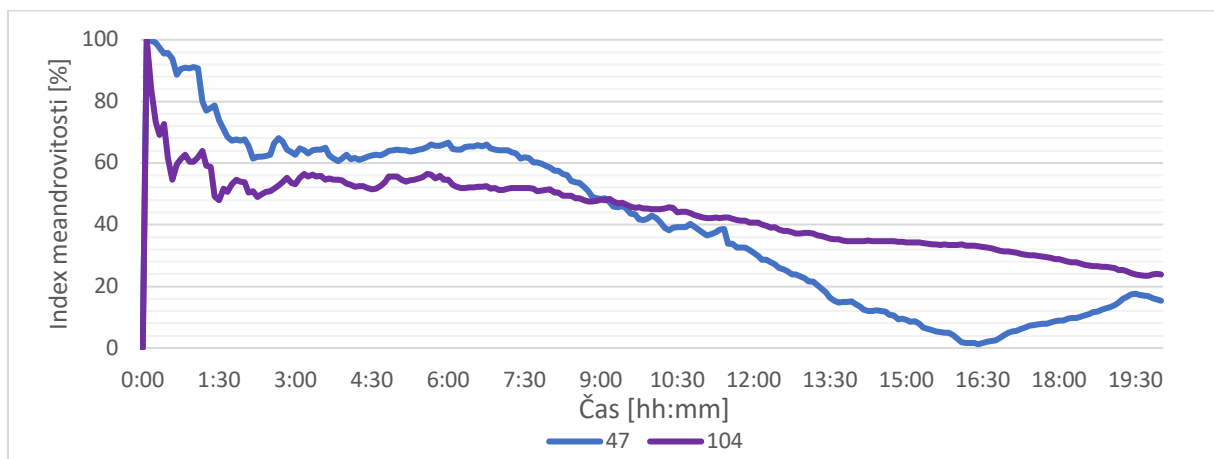
Obrázek 21: Buňky pod vlivem léčiva DOXY na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 47 a č. 104. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 19: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.47 a č. 104 s migrastatikem DOXY.



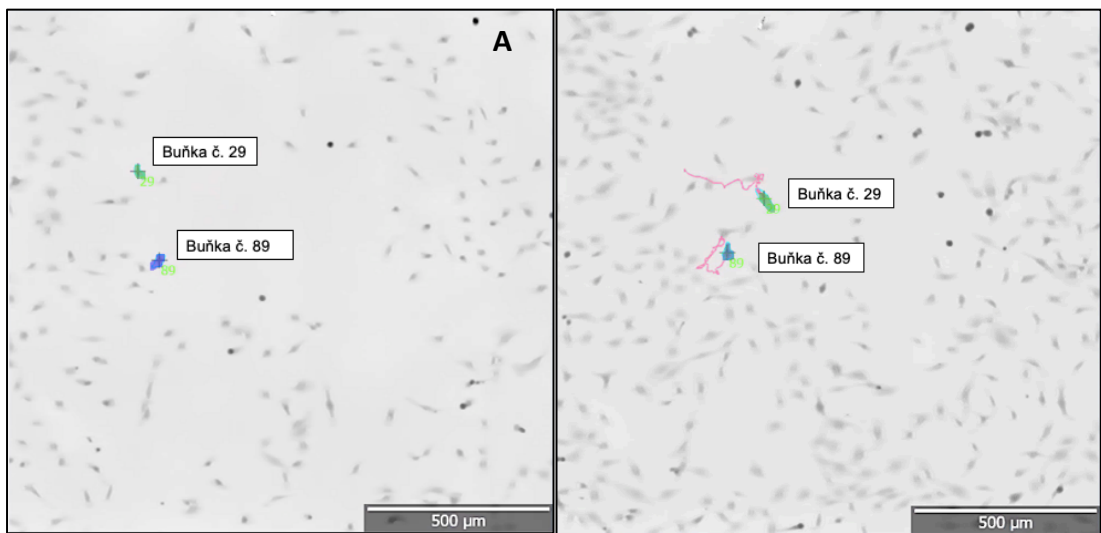
Graf 20: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.47 a č. 104 s migrastatikem DOXY.



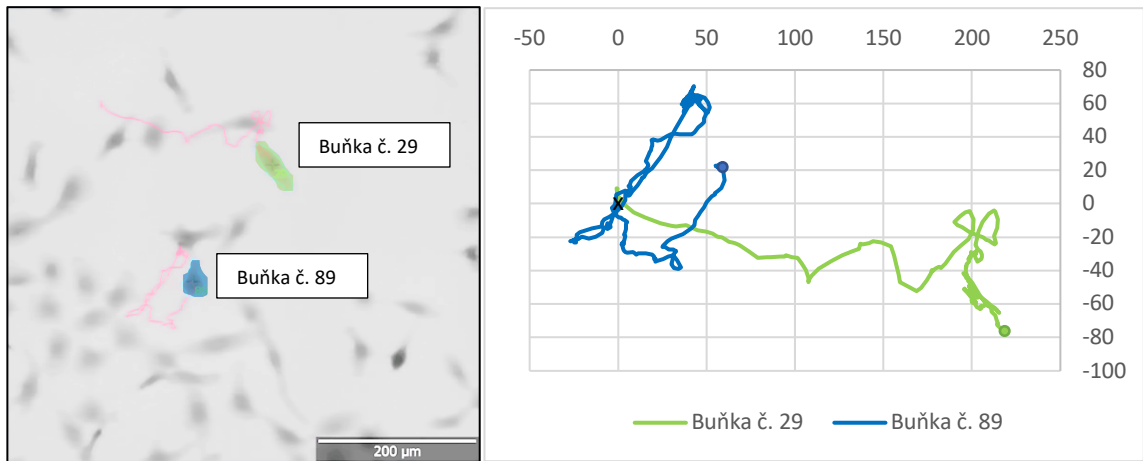
Graf 21: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.47 a č. 104 s migrastatikem DOXY.

Následující kanálek obsahoval léčivo BEL. Opět lze vidět, že se sníženou kruhovitostí vyznačenou v grafu 23 se navyšuje rychlost dle grafu 22. Počet buněk v obrázku 22 B opět narostl. Index meandru opět vykazuje vysoké hodnoty, zvláště u buňky č. 29.

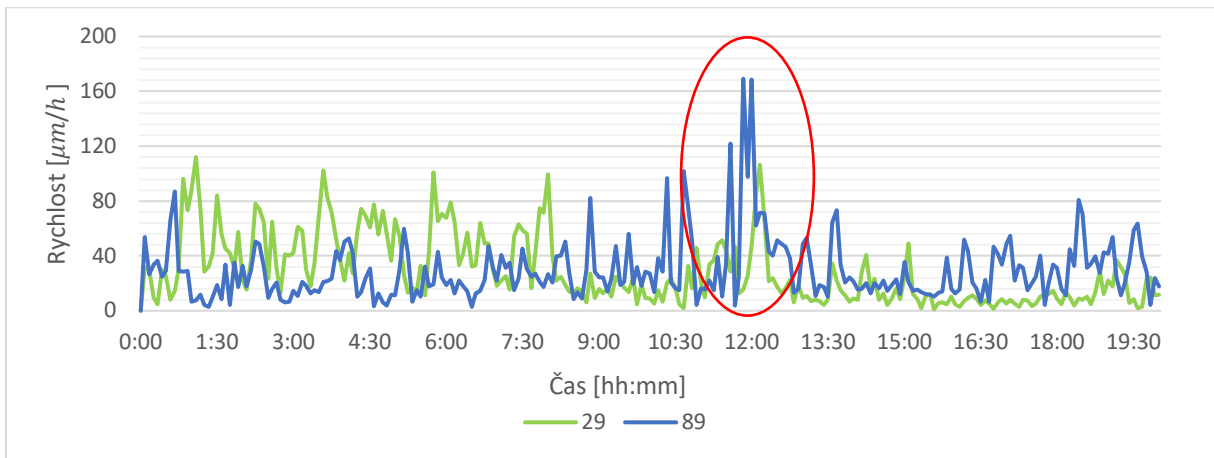
B



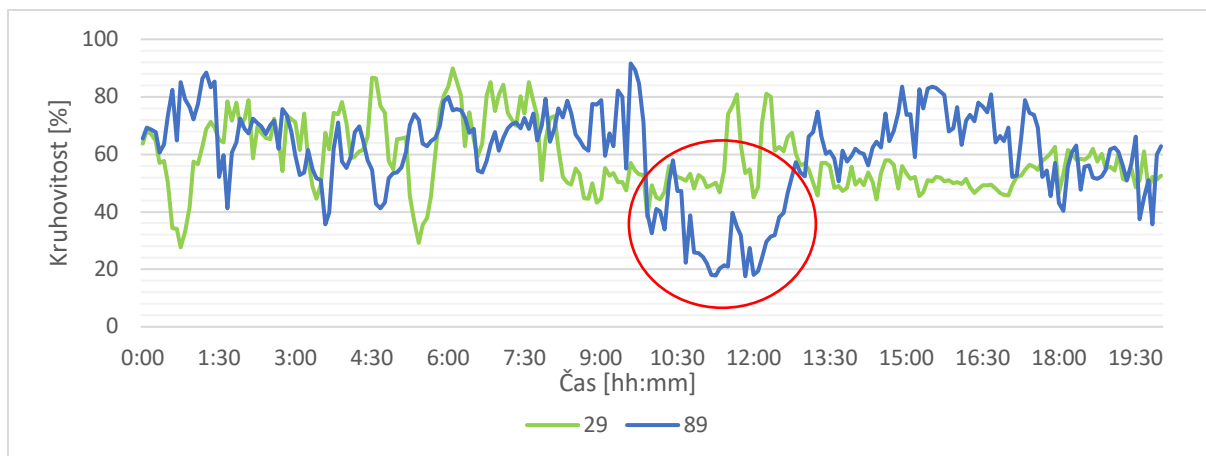
Obrázek 22: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem BEL a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřítko 500 μm .



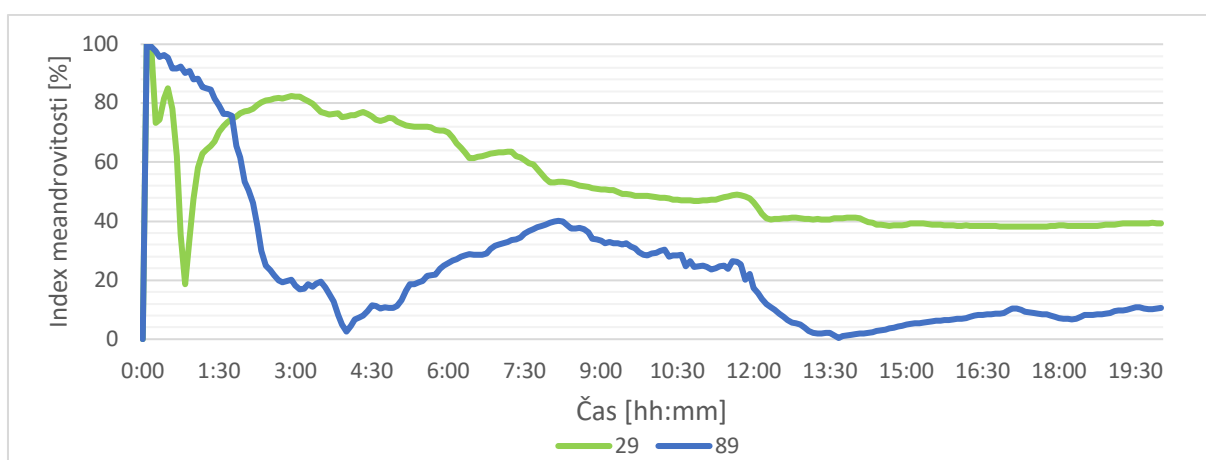
Obrázek 23: Buňky pod vlivem léčiva BEL na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 29 a č. 89. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 22: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.29 a č. 89 s migrastatikem BEL.

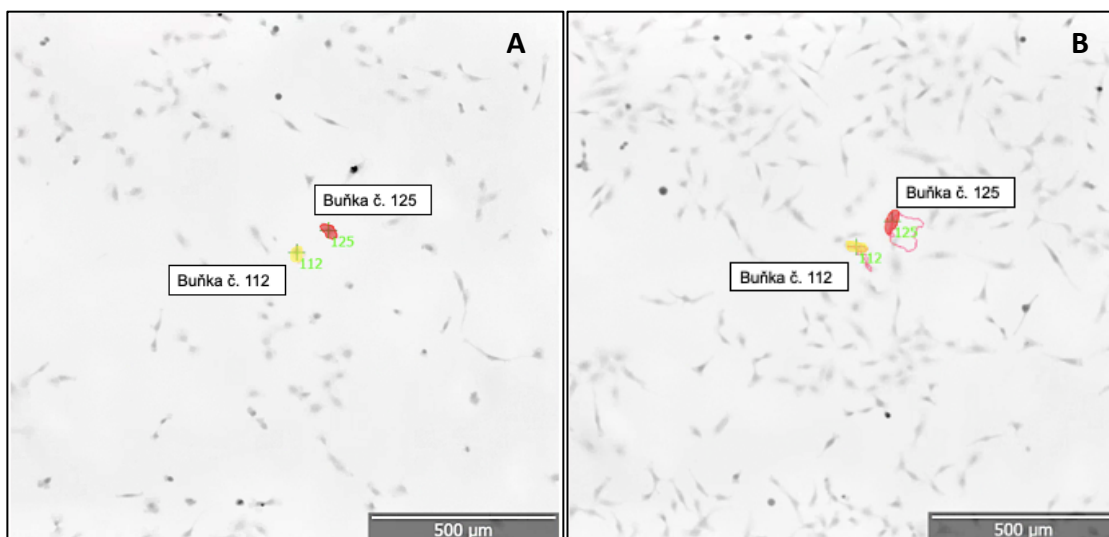


Graf 23: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.29 a č. 89 s migrastatikem BEL.

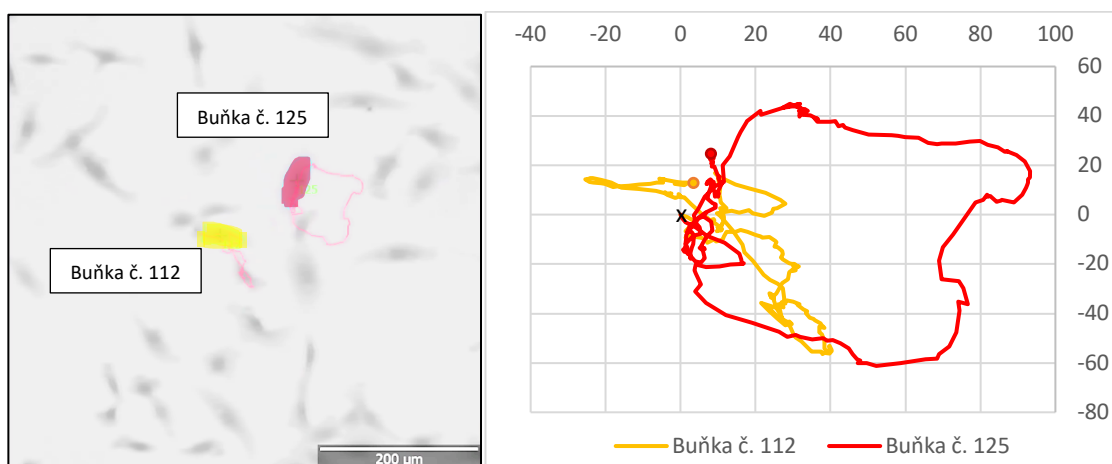


Graf 24: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.29 a č. 89 s migrastatikem BEL.

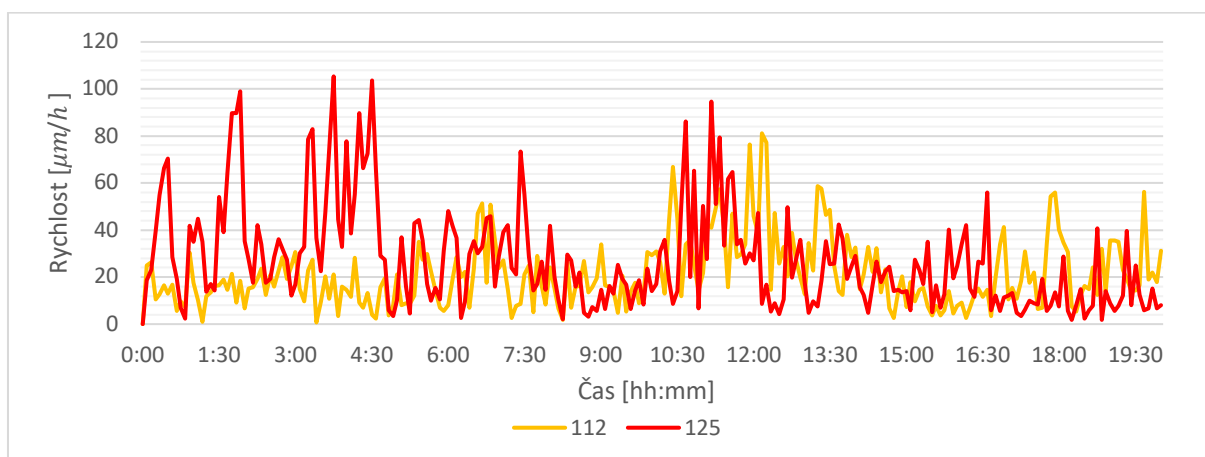
Jak lze vidět na obrázku 24, v průběhu 20hodinového časosběru s léčivem 4HAP došlo k nárůstu buněk. Dle grafu 27 jde vidět, že buňky po 12 hodině setrvaly na místě. Opět to mohlo zapříčinit nedostatek místa k pohybu vlivem narůstajícího počtu buněk.



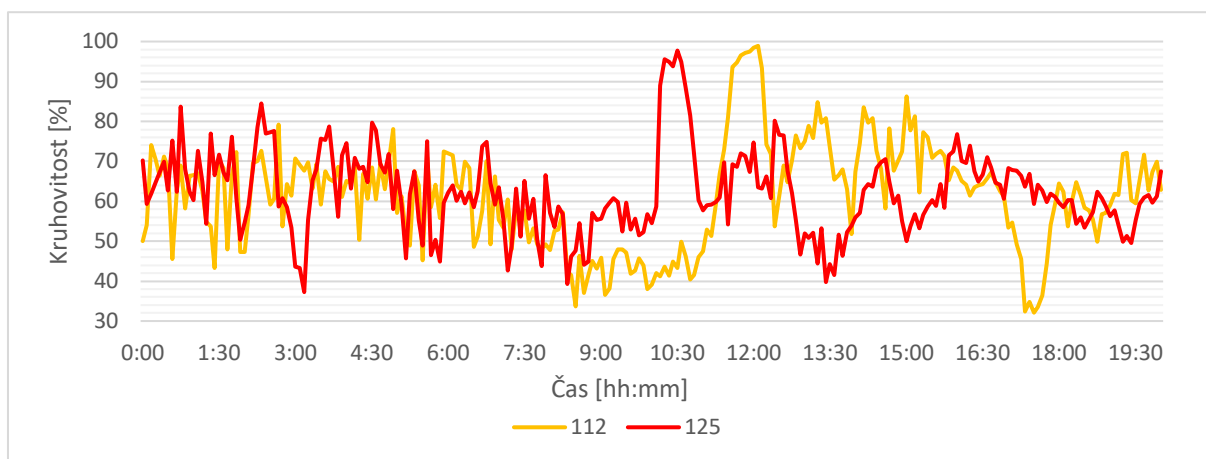
Obrázek 24: Segmentace dvou buněk HT1080 na počátku A a na konci B měření s léčivem 4HAP a s vykreslenou trajektorií pohybu. Objektiv 4x/0.1. Měřitko 500 μm .



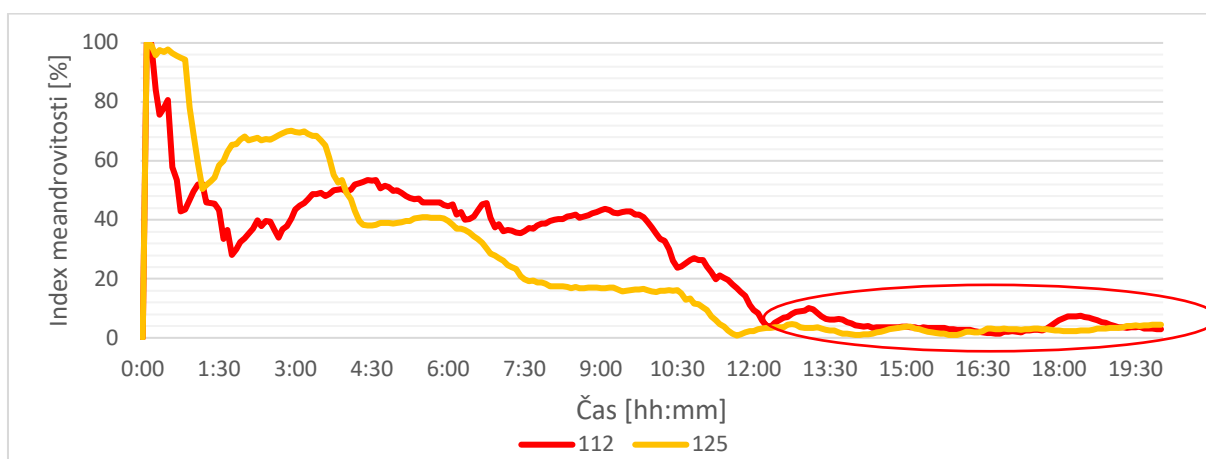
Obrázek 25: Buňky pod vlivem léčiva 4HAP na konci měření skrze objektiv 4x/0.1 s přiblížením na měřítko 200 μm . Vykreslení trajektorie buněk č. 112 a č. 125. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .



Graf 25: Časová závislost rychlosti buněk HT1080 č.112 a č. 125 s migrastatikem 4HAP.

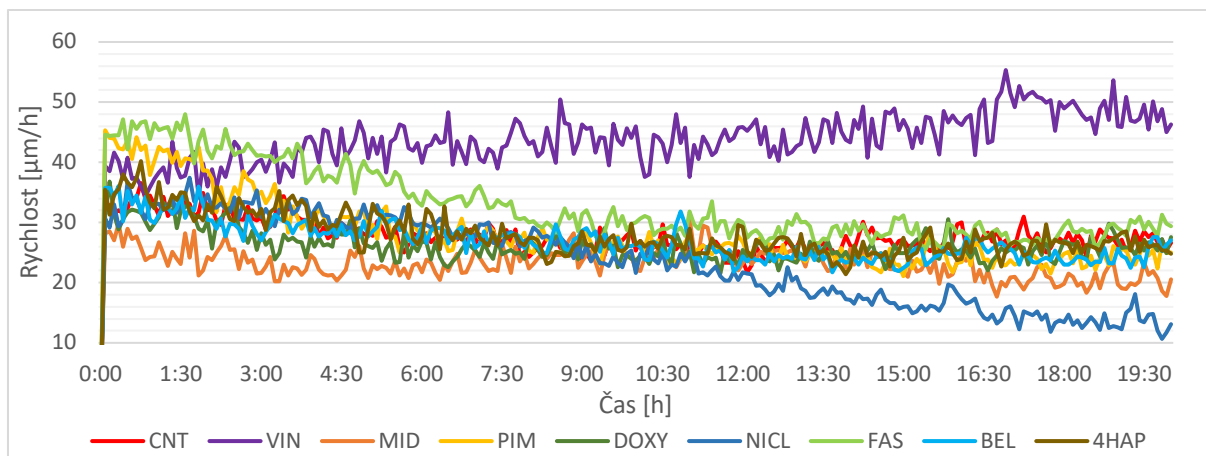


Graf 26: Časová závislost kruhovitosti buněk HT1080 č.112 a č. 125 s migrastatikem 4HAP.

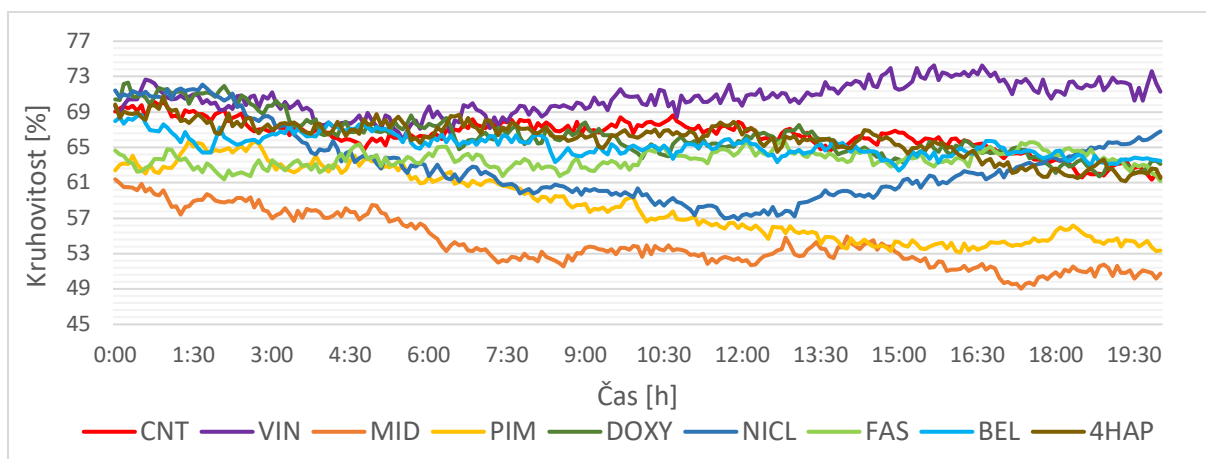


Graf 27: Časová závislost indexu meandrovitosti buněk HT1080 č.112 a č. 125 s migrastatikem 4HAP.

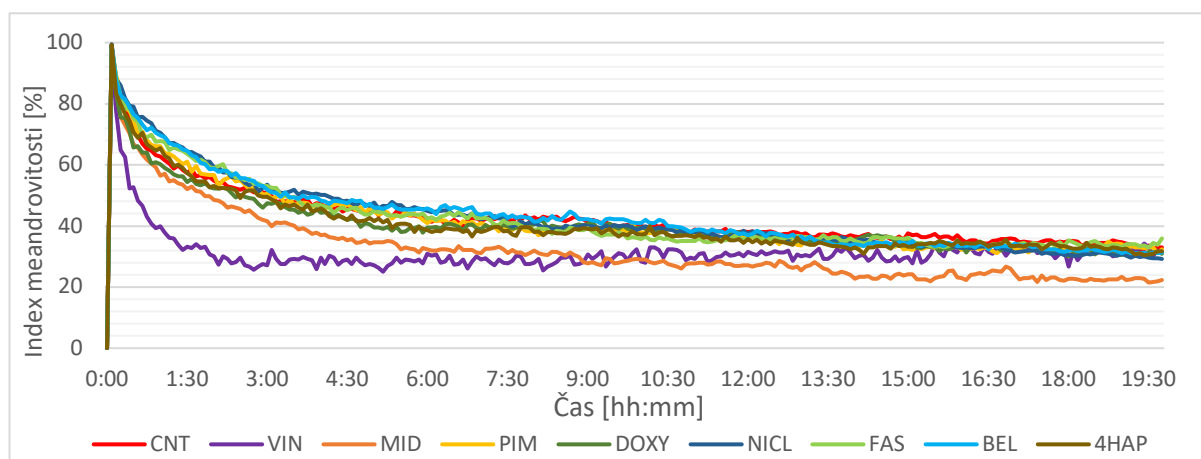
Srovnání průměrných hodnot všech buněk vykreslují následující grafy 28, 29, 30. Nejvyšší rychlost vykazuje léčivo VIN, což podle jeho cytostatických vlastností nemělo nastat. Dle obrázku č.10, který najdeme výše, je vidět, že jsou buňky vlivem léčiva zničeny a podléhají apoptóze či nekróze. Více odpovídající hodnoty jsou viditelné u dalších dvou parametrů, nejnižší hodnota indexu meandrovitosti a vysoká kruhovitost. Pokud tedy pomíneme léčivo VIN, nejvyšší rychlost se projevila u FAS, který se však po 9 hodinách začal rovnat kontrole. Nejnižší hodnotu rychlosti měly buňky s léčivem NICL, přičemž kruhovitost buněk v průběhu času byla nižší než u kontroly. Z celkového pohledu byla motilita rakovinných buněk snížena vlivem migrastatika MID, kde hodnoty všech tří zkoumaných parametrů jsou nižší nežli kontrola.



Graf 28: Časová závislost průměrné rychlosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 4x.



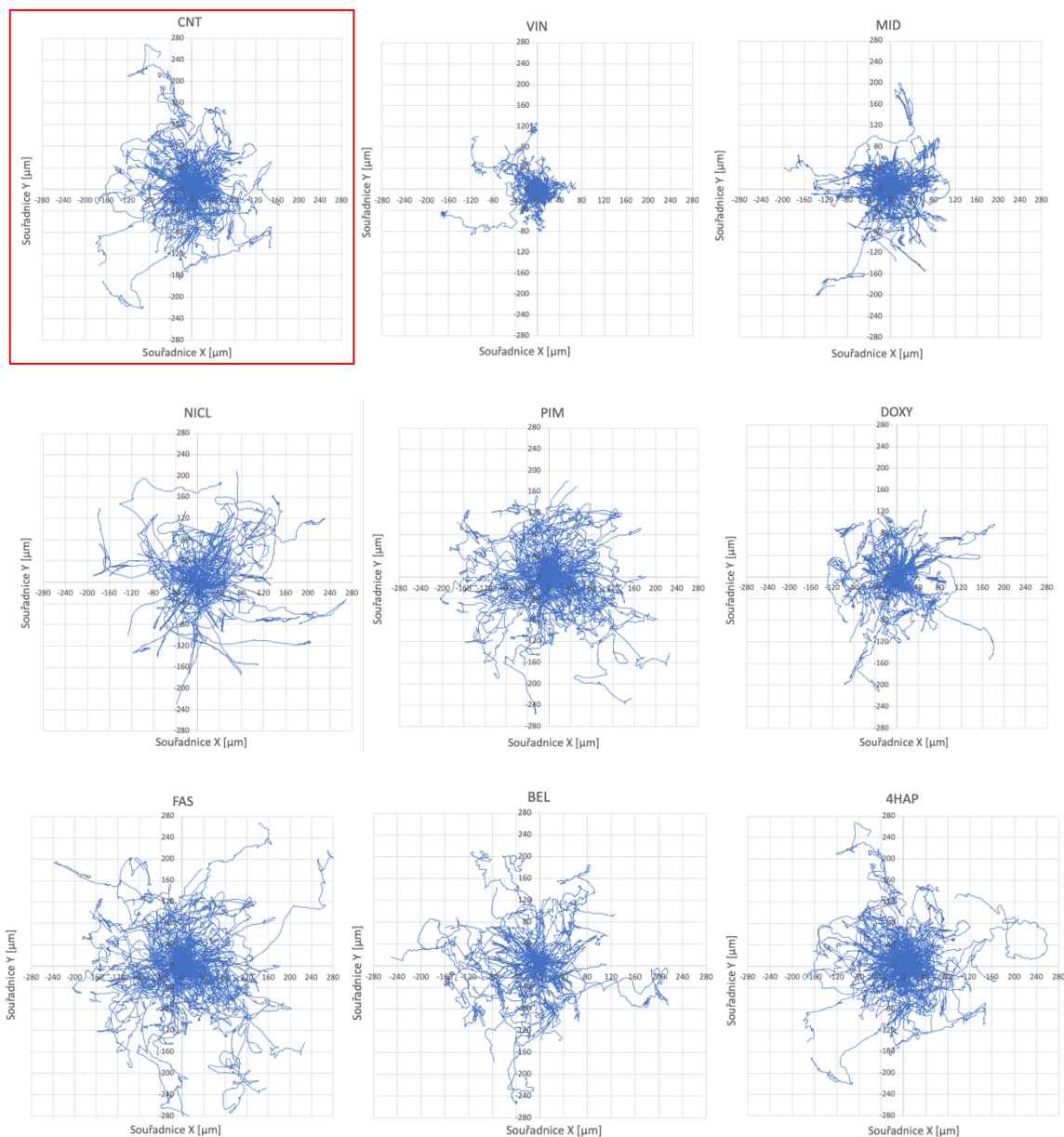
Graf 29: Časová závislost průměrné kruhovitosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 4x.



Graf 30: Časová závislost průměrného indexu meandrovitosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 4x.

5.1.2 Motilita

Následující grafy vytvořené v programu excel vykreslují trajektorii buněk po dobu 20hodinového časoběru s vlivem jednotlivých migrastatik. Vizuálně lze zhodnotit, že vlivem léčiv VIN, MID se buňky oproti CNT udržovaly více na místě. Naopak léčiva 4HAP, FAS, DOXY, BEL, PIM a NICL motilitu buněk oproti CNT výrazně neovlivnila.



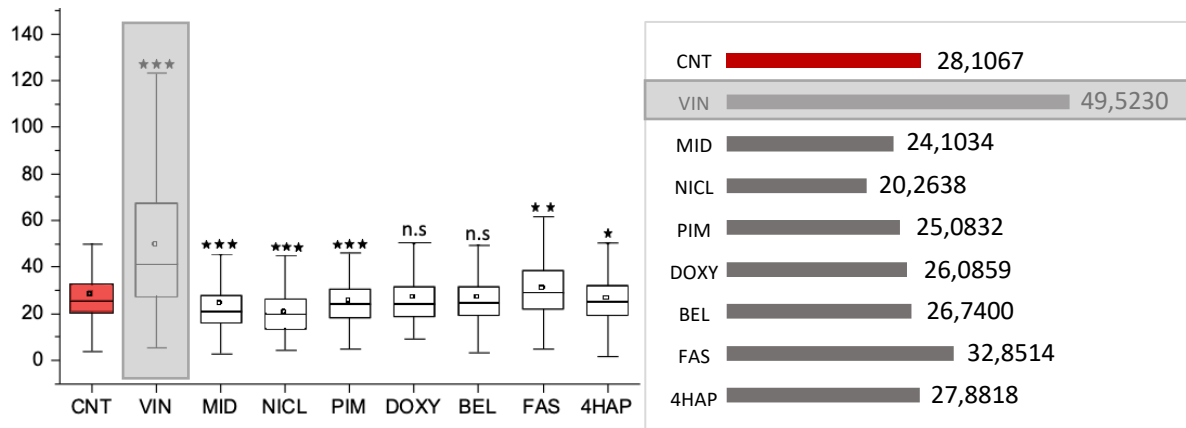
Obrázek 26: Motility Rose grafy všech použitých migrastatik s daty pořízenými skrze objektiv 4x. Jednotlivé trajektorie byly posunuty do společného středu [0,0]. Osy x, y představují vzdálenosti v μm .

5.1.3 Statistika

Průměrné hodnoty rychlosti, kruhovitosti, Eukleidovské vzdálenosti a indexu meandru jednotlivých buněk byly statisticky zpracovány v programu excel pomocí T-testu a jejich hodnoty vykresleny pomocí krabicových grafů v programu origine. Hvězdičkami jsou označena migrastatika, která se vyznačovala vůči kontrole určité signifikance rychlosti, kruhovitosti, meandrovitosti a Eukleidovské vzdálenosti, a to v míře p-hodnoty $< 0,05 = *$, $< 0,01 = **$ a $< 0,001 = ***$. Nesignifikantní výsledky byly označeny n.s.

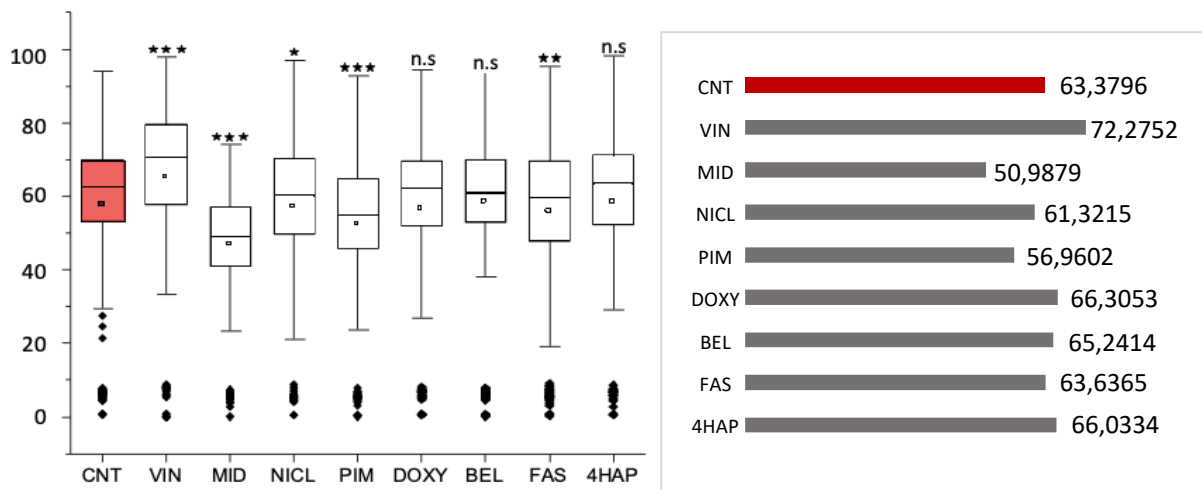
Výsledky statistického zpracování poukazují na vysokou signifikanci léčiva VIN vůči kontrole ve všech zkoumaných parametrech, čímž VIN můžeme považovat za pozitivní kontrolu. Výjimkou je statistické zpracování rychlosti, jejíž hodnoty jsou považovány za chybné. Významnost vznikla díky velkému rozdílu hodnot, avšak hodnoty rychlosti VIN by měly být mnohem menší nežli u kontroly. Z tohoto důvodu jsou hodnoty VIN z grafu 31 vyřazeny. U léčiva MID se projevila vysoká významnost především v nízké rychlosti, kruhovitosti a indexu meandru. U Eukleidovské vzdálenosti se projevila signifikance nejnižšího stupně označené jednou hvězdičkou. Jistá významnost se projevila i u léčiva NICL, jenž se prokázala vysoká signifikance u rychlosti a Eukleidovské vzdálenosti. Index meandrovitosti poukazuje na střední signifikanci označenou dvěma hvězdičkami a kruhovitost na nízkou signifikanci označenou jednou hvězdičkou. Nulová signifikance vůči kontrole ke všem čtyřem parametrům se projevila u jednoho léčiva, a to u DOXY.

Rychlost translokace buněk HT1080



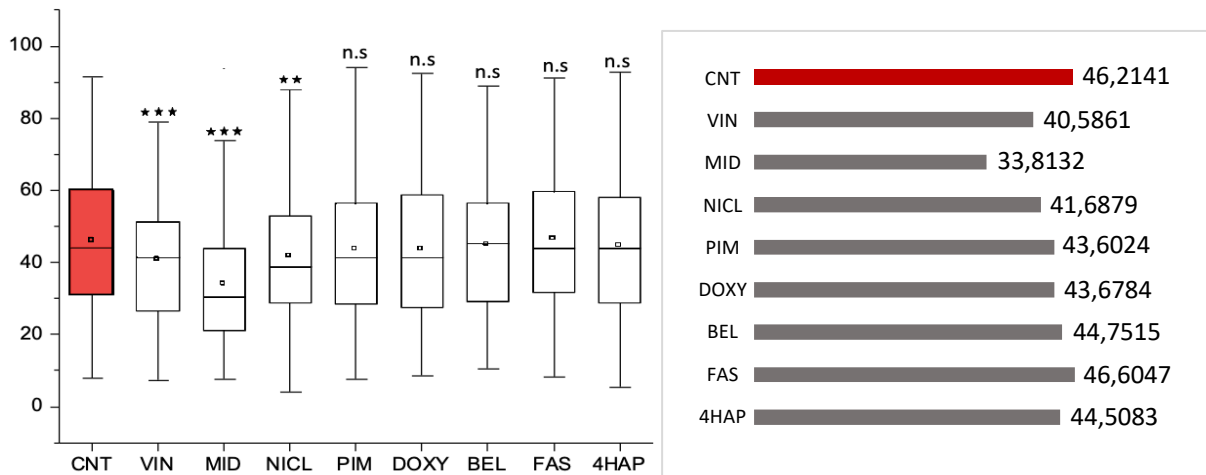
Graf 31: Levý krabicový graf pro hodnoty rychlosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty rychlosti buněk. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Kruhovitost buněk HT1080



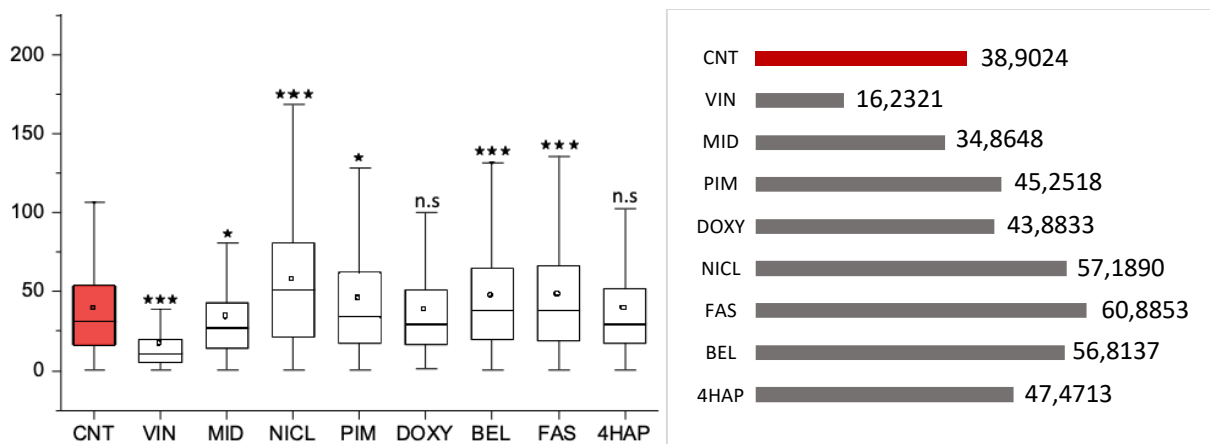
Graf 32: Levý krabicový graf pro hodnoty rychlosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty kruhovitosti buněk. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Index meandrovitosti buněk HT1080



Graf 33: Levý krabicový graf pro hodnoty rychlosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty indexu meandrovitosti buněk. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Eukleidovská vzdálenost buněk HT1080



Graf 34: Levý krabicový graf pro hodnoty rychlosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty Eukleidovské vzdálenosti buněk. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

5.1.4 Korelační diagram

Dle statistického zpracování vyplývá, že léky VIN, MID a NICL by měly ovlivňovat motilitu rakovinných buněk. V následujících grafech je ukázána závislost Eukleidovské vzdálenosti na indexu meandrovitosti na počátku a na konci měření, což by mělo poukazovat na působení léčiv na motilitu rakovinné buňky. V závislosti na tvaru buněk vyplývající z kruhovitosti je možné určit jejich dynamický stav, jehož popis je ustanoven v tabulce 3.

Tabulka 3: Popis dynamického buněčného stavu dle jejich tvaru vyplývajícího z hodnot kruhovitosti.

Typ	Kruhovitost [%]	Tvar	Dynamické stavy buněk
1.	0-25	Velmi protáhlý	Migrující/ anomálie
2.	25-50	Protáhlý	Pravděpodobně migrující
3.	50-75	Oválný	Klidové stádium
4.	75-100	Téměř kulatá	Mitotické dělení/buněčná smrt

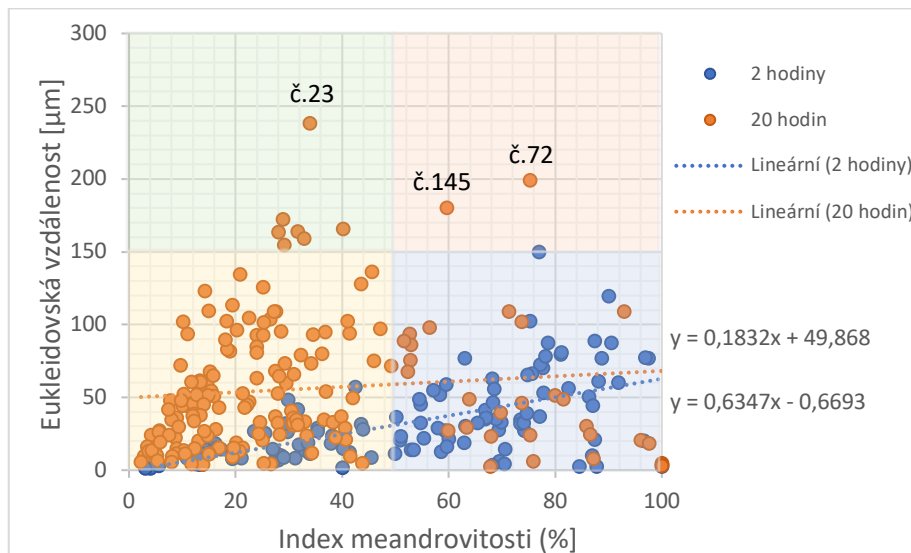
Grafy 35-38 jsou barevně rozděleny do čtyř kvadrantů, které poukazují na případnou invazivitu buněk. Pokud by se buňky nacházely v kvadrantu HP (viz. tabulka 4), který vykazuje maximální hodnoty Eukleidovské vzdálenosti a maximální hodnoty indexu meandrovitosti, jednalo by se o přímé přemístění buněk s přímou stopou, což naznačuje jejich vysoký dynamický pohyb. Kvadrant DL (viz. tabulka 4) naopak zahrnuje buňky s malým přemístěním a nepřímou stopou, tedy s minimální Eukleidovskou vzdáleností a minimálním indexem meandrovitosti. V tomto kvadrantu se jedná o buňky s nízkým dynamickým pohybem.

Tabulka 4: Barevné rozdělení a popis jednotlivých kvadrantů.

		Eukleidovská vzdálenost	Index meandrovitosti
	Horní levý kvadrant (HL)	max.	min.
	Horní pravý kvadrant (HP)	max.	max.
	Dolní levý kvadrant (DL)	min.	min.
	Dolní pravý kvadrant (DP)	min.	max.

Graf 35 ukazuje rozmístění buněk na počátku (po 2 hodinách) a na konci (po 20 hodinách) měření. Přímka poukazuje na lineární vzrůst či pokles. U CNT se buňky na počátku

měření udržovaly v DP a v DL kvadrantu, což je logické z hlediska nízké počáteční uražené vzdálenosti. Na konci měření se některé dostaly do HP a HL kvadrátu. Nejvzdálenější buňky jsou popsány v tabulce.



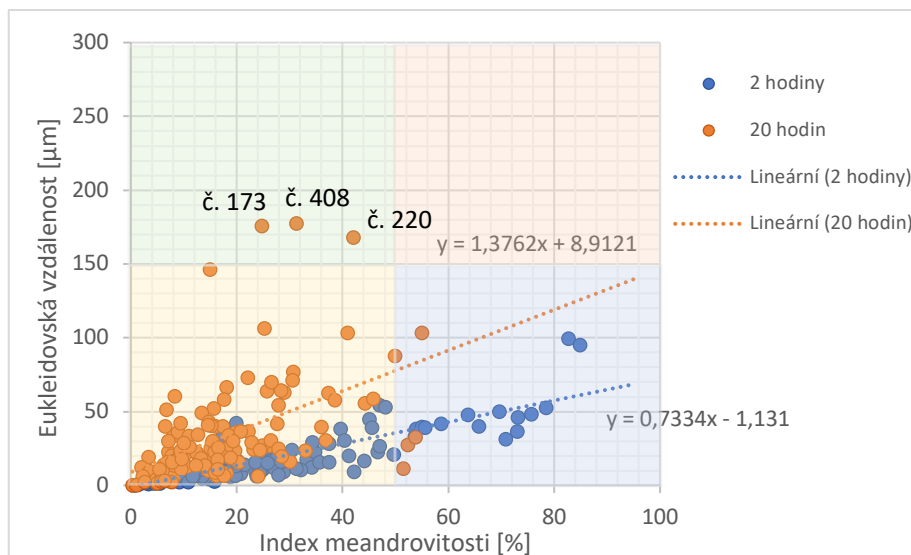
Graf 35: Závislost Eukleidovské vzdálenosti na indexu meandrovitosti na počátku a na konci kontrolního měření bez použití léčiv na nádorové buňky HT1080.

Buňka č. 72 by se měla podle grafu 35 projevovat jako nejinvazivnější, což potvrzuje i typ dynamického pohybu v závislosti na kruhovitosti. Buňky č. 23 a č. 145 odpovídají spíše oválnému tvaru typu 3. (viz. tabulka 5), které odpovídají klidovému stádiu. Dle vysokých hodnot obvodu nad 100 μm lze usoudit, že se opravdu jedná o buňky, nikoliv o buněčné kusy či nečistoty v médiu, které by se mohly zaznamenat chybnou segmentací.

Tabulka 5: Hodnoty kruhovitosti a obvodu buněk vyznačených v grafu.

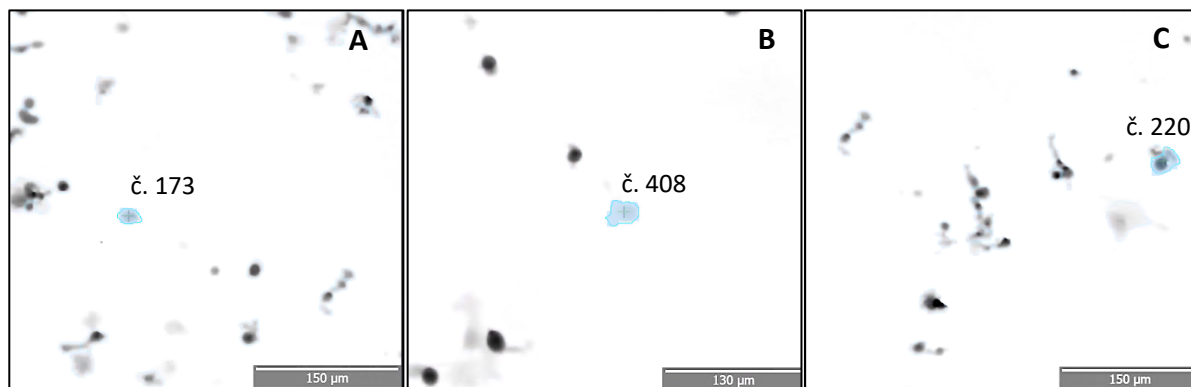
Číslo buňky	Umístění	Kruhovitost [%]	Typ	Obvod [μm]
23	HL	57,7156	3.	128,0831
72	HP	34,5739	2.	201,7580
145	HP	59,3111	3.	154,9328

Buňky s léčivem VIN se na počátku měření nachází v dolních dvou kvadrantech, jak vykresluje graf 36. Na konci tohoto měření se udržují v DL, což poukazuje na výrazné potlačení jejich motility, což je od tohoto léčiva očekávané a je proto pozitivní kontrolou.



Graf 36: Závislost Eukleidovské vzdálenosti na indexu meandrovitosti na počátku a na konci měření s použitým léčivem VIN na nádorové buňky HT1080.

Tabulka 6 vykazuje vysokou kruhovitost zejména u buněk č. 173 a č. 408. Obě buňky mají menší obvod než 100 μm a dle obrázku 27 lze říct, že se v obou případech jedná pouze o oddělenou část buňky vlivem léčiva. Oproti tomu buňka č. 220 má obvod vyšší než 100 μm a nižší kruhovitost, díky které spadá do třetího typu dynamického stádia. Lze tedy konstatovat, že se opravdu jedná o buňku, nikoliv pouze o její část.

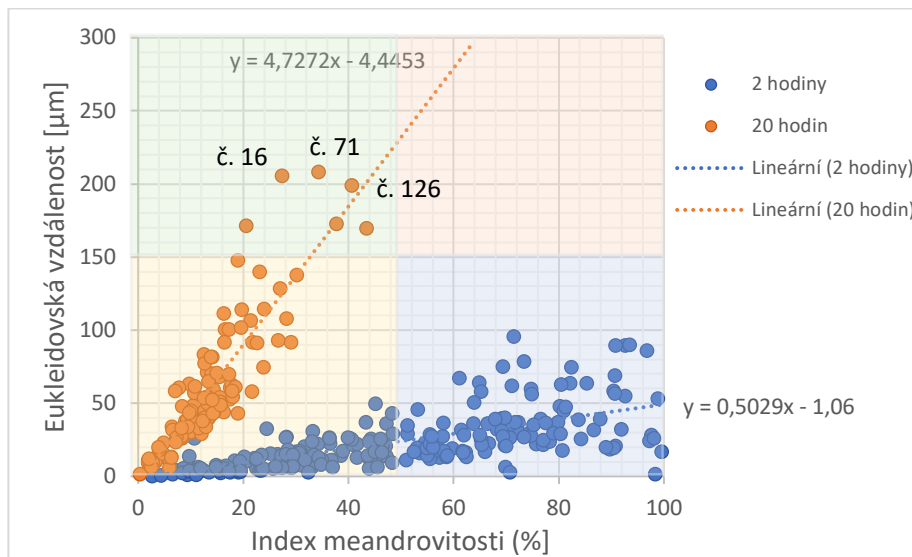


Obrázek 27: Na obrázku A a B je ukázka segmentace oddělených částí buňky vlivem léčiva VIN. Na obrázku A s měřítkem 150 μm se nachází část buněčné cytoplasmy označena č. 173 a na obrázku B s měřítkem 130 μm část buněčné cytoplasmy označena č. 401. Obrázek C ukazuje buňku č. 220 v klidovém stádiu. Přibližné obrázky byly pořízeny objektivem 4x/0.1.

Tabulka 6: Hodnoty kruhovitosti a obvodu buněk nacházejících se v horních dvou kvadrátech s léčivem VIN.

Číslo buňky	Umístění	Kruhovitost [%]	Typ	Obvod [μm]
173	HL	75,8957	4.	78,2061
220	HL	69,5979	3.	123,7439
408	HL	78,2569	4.	87,4359

Graf 37 opět ilustruje, že na počátku měření se buňky nachází v DP a DL kvadrantech. Po 20 hodinách se většina dostane do kvadrantu DL. Pouze sedm buněk se nachází v HL kvadrantu, který vykazuje vysoké přímé přemístění s nízkým indexem meandrovitosti, což znamená, že se buňky pohybovaly spíše na místě.



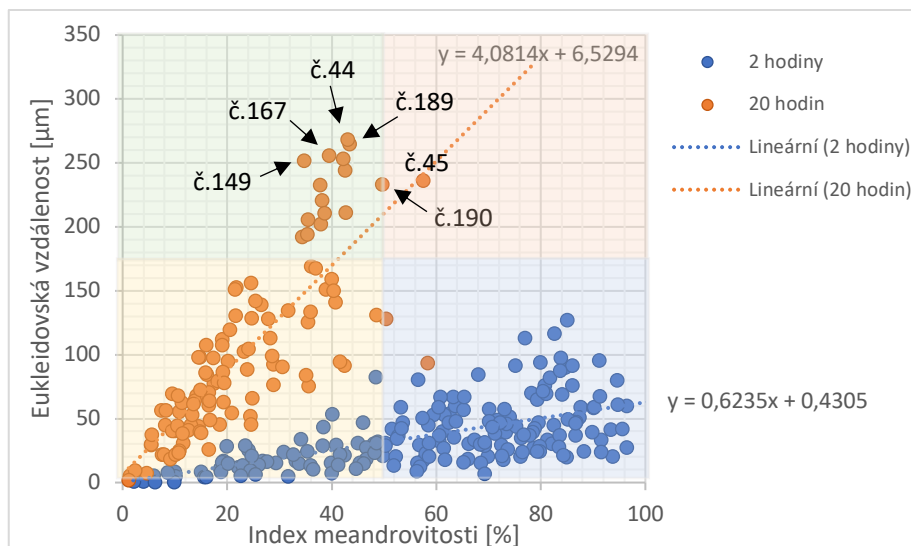
Graf 37: Závislost Eukleidovské závislosti na indexu meandrovitosti v čase s použitím léčivem MID na nádorové buňky HT1080.

Tabulka 7 ukazuje parametry tří nejvýše umístěných buněk. Buňka č. 71 spadá do druhého typu, tedy do dynamického stavu, což odpovídá i vysoké Eukleidovské vzdálenosti. Zbylé dvě buňky č. 16 a č. 126 spadají do třetího typu, čímž je klidové stádium.

Tabulka 7: Hodnoty kruhovitosti a obvodu buněk nacházejících se v horních dvou kvadrátech s léčivem MID.

Číslo buňky	Umístění	Kruhovitost [%]	Typ	Obvod [μm]
16	HL	50,0296	3.	128,0831
71	HL	46,8029	2.	154,9328
126	HL	60,6515	3.	201,758039

Graf 38 poukazuje opět na zdržování se buněk na počátku měření v kvadrantech DL a DP. Na konci měření se velká většina buněk udržovala zejména v DL kvadrantu, což pravděpodobně poukazuje na snížení dynamiky jejich pohybu vlivem migrastatika NICL. Pouhých 15 buněk se dostalo do HL kvadrátu a jedna do HP kvadrátu.



Graf 38: Závislost Eukleidovské vzdálenosti na indexu meandrovitosti na počátku a na konci měření s použitým léčivem NICL na nádorové buňky HT1080.

Tabulka 8 ilustruje nejvýše postavené buňky v kvadrantu HL a HP. Dle obvodu buněk a jejich kruhovitosti lze s jistotou říci, že se jedná o buňky, nikoliv o nečistoty v médiu či plovoucí části buněk oddělné vlivem léčiva.

Tabulka 8: Hodnoty kruhovitosti a obvodu buněk nacházejících se v horních dvou kvadrátech s léčivem NICL.

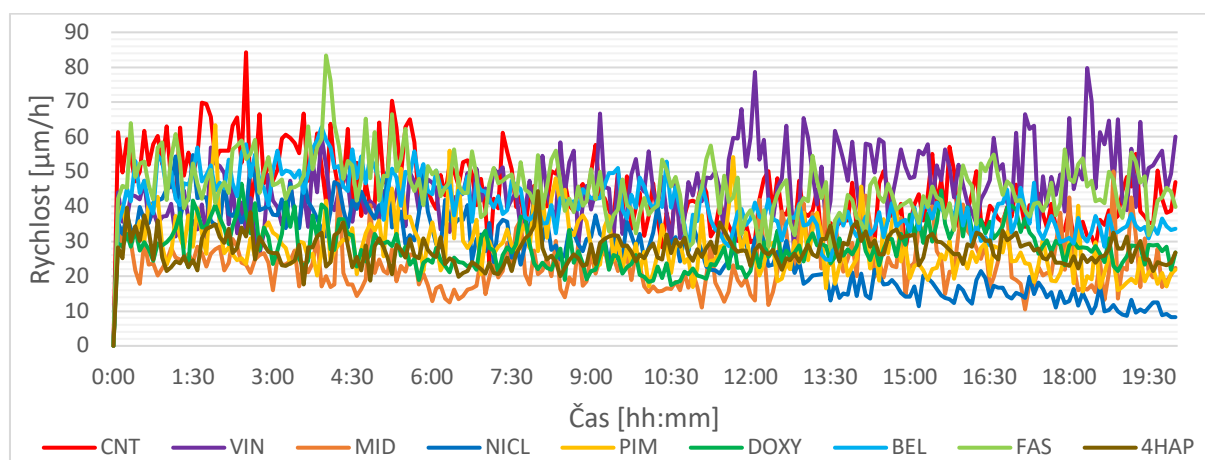
Číslo buňky	Umístění	Kruhovitost [%]	Typ	Obvod [µm]
44	HL	67,6470	3.	112,7613
45	HP	42,9251	2.	139,5457
149	HL	71,0158	3.	107,9989
167	HL	77,3398	4.	109,4509
189	HL	38,4479	2.	246,4576
190	HL	45,3898	2.	210,2721

5.2 Objektiv 10x

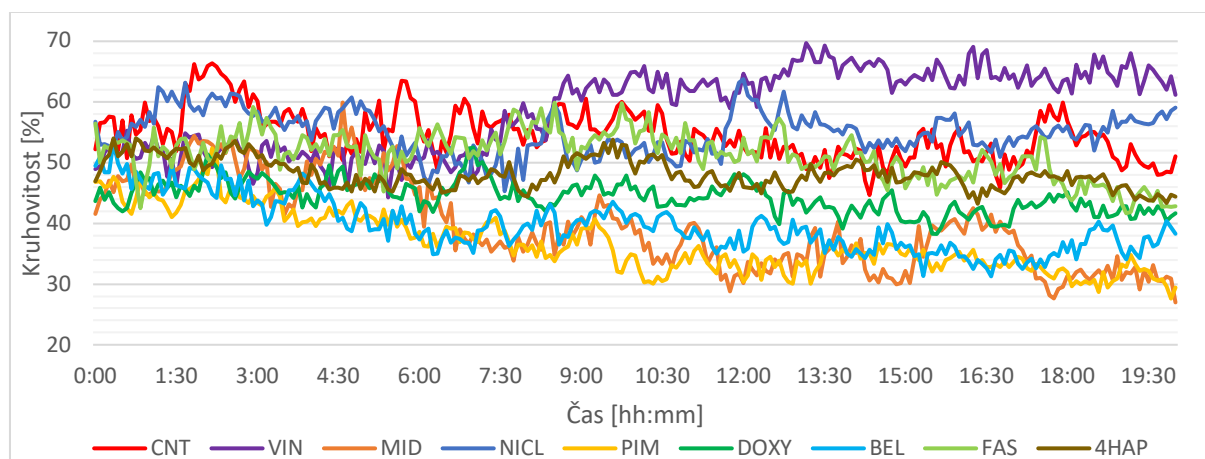
Druhý z data setů byl pořízen na objektivu se zvětšením 10x. Skrze něj bylo snímáno 5 pozic v jednom kanálku každých pět minut po dobu 20 hodin. Opět byla vybrána jedna pozice pro konkrétní zpracování. Dle metody RAC-GM by měla následovat analýza koncentrací migrastatik, jenž se projevila signifikantní během měření s objektivem 4x. Avšak v tomto případě byla použita všechna migrastatika, pro účely srovnání obou objektivů.

5.2.1 Časová závislost

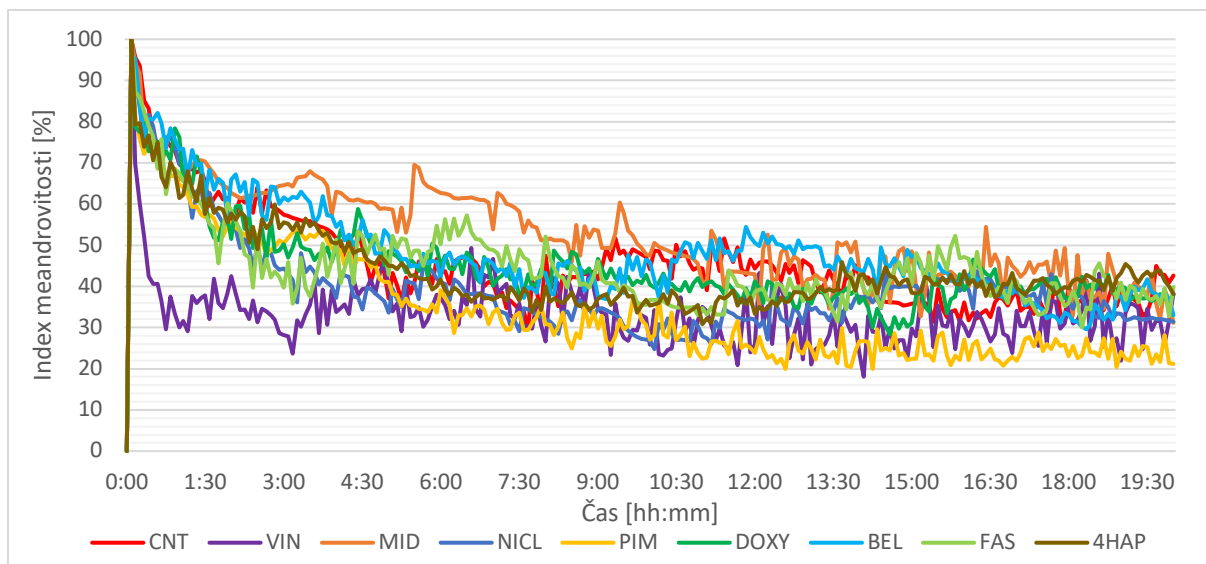
Dle grafu rychlosti 39 průměrných hodnot buněk je vidět, že se všechna migrastatika pohybují na úrovni nebo pod úrovni CNT. Jediný VIN se opět nachází nad CNT. Vyskytuje se zde stejná chyba, jako u objektivu se zvětšením 4x. Vysoký parametr kruhovitosti a nízký index meandrovitosti odpovídají skutečnosti, že buňky byly zakulaceny a udržovaly se spíše na místě. Nejnižší rychlost vykazují léčiva MID a NICL. Jejich kruhovitost se pohybuje mezi 30-40 %, což poukazuje na 2. typ dynamického stavu buněk.



Graf 39: Časová závislost průměrné rychlosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 10x.



Graf 40: Časová závislost průměrné kruhovitosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 10x.



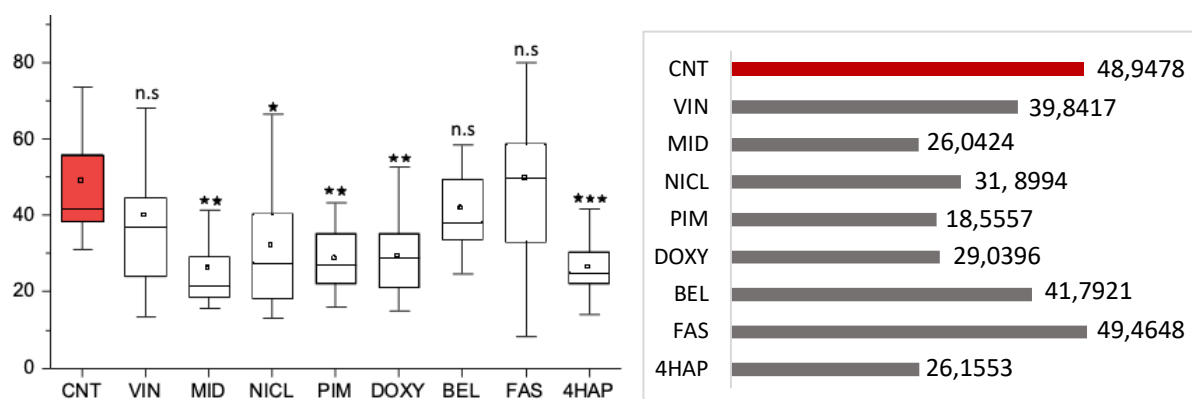
Graf 41: Časová závislost průměrného indexu meandrovitosti buněk HT1080 s jednotlivými migrastatiky pořízeným skrze objektiv 10x.

5.2.2 Statistika

Průměrné hodnoty rychlosti, kruhovitosti, Eukleidovské vzdálenosti a indexu meandru jednotlivých buněk byly opět statisticky zpracovány v programu excel pomocí T-testu a jejich hodnoty vykresleny pomocí krabicových grafů v programu origine. Hvězdičkami jsou označena migrastatika, která vyznačovala určité signifikance těchto parametrů vůči kontrole. P-hodnoty jsou následně odstupňovány dle hodnot významnosti vůči kontrole $< 0,05 = *$, $< 0,01 = **$ a $< 0,001 = ***$. Nesignifikantní výsledky byly označeny n.s.

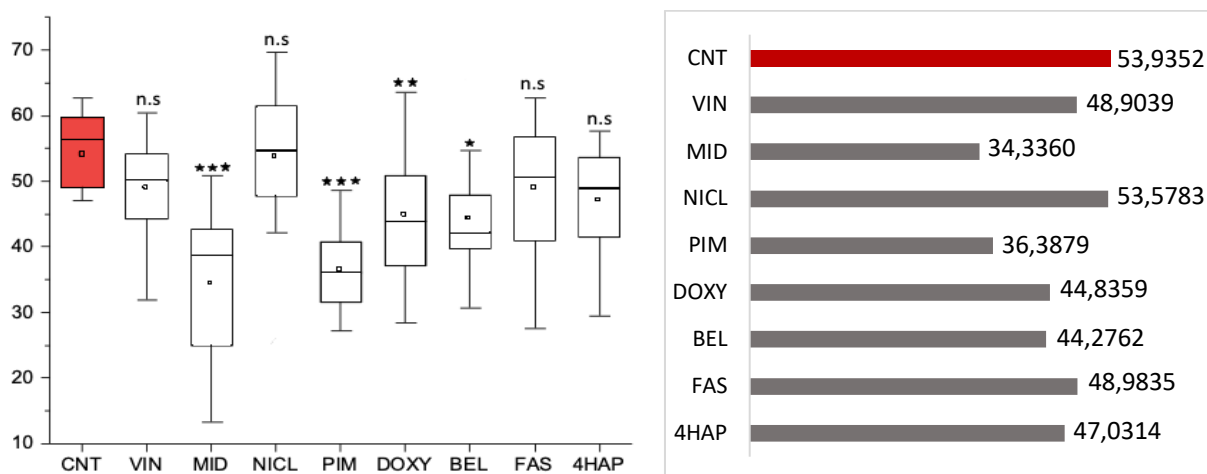
Statistické zpracování dat pořízených objektivem 10x se v tomto ohledu liší od statistického zpracování objektivu 4x. Vysoká signifikance v rychlosti vůči kontrole se projevila u léčiva 4HAP, střední signifikance u léčiv MID, PIM a DOXY a nízká u léčiva NICL. U kruhovitosti se vysoký význam projevil u léčiv MID a PIM, střední u DOXY a nízký u léčiva BEL. Eukleidovskou vzdálenost vysoce ovlivňuje léčivo VIN vůči kontrole, nízká signifikance se projevila u léčiv MID a DOXY. Index meandrovitosti níže ovlivnily léčiva MID a PIM. Žádnou signifikanci u jednotlivých parametrů neprokázalo pouze léčivo FAS. Za významná léčiva ovlivňující motilitu buněk lze v tomto případě označit MID, PIM a DOXY.

Rychlost buněčné translokace buněk HT1080



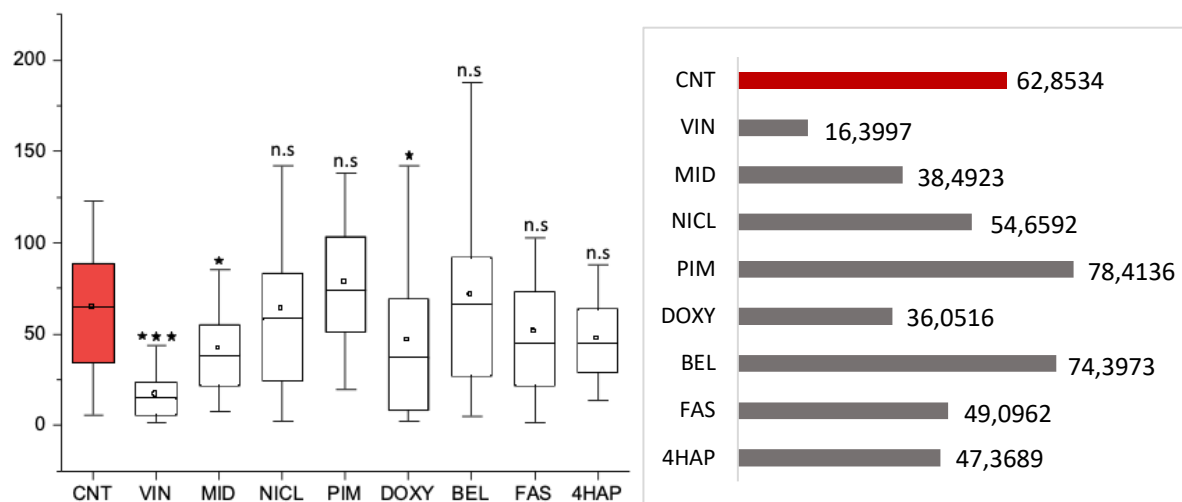
Graf 42: Levý krabicový graf pro hodnoty rychlosti buněčné translokace HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná čára medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty rychlosti. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Kruhovitost buněk HT1080



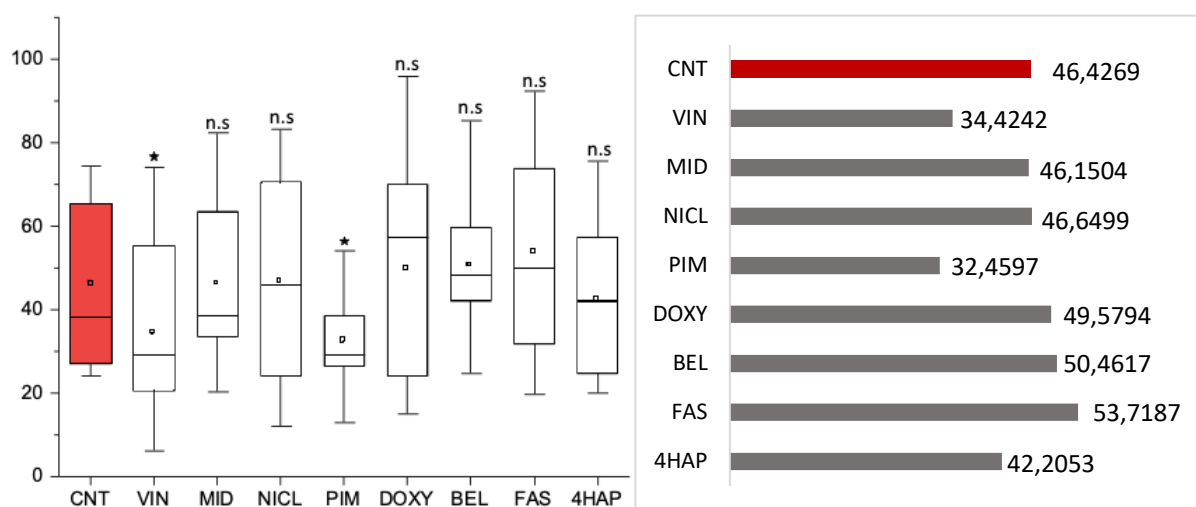
Graf 43: Levý krabicový graf pro hodnoty kruhovitosti buněčné translokace HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná čára medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty kruhovitosti. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Eukleidovská vzdálenost buněk HT1080



Graf 44: Levý krabicový graf pro hodnoty Eukleidovské vzdálenosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty Eukleidovské vzdálenosti. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

Index meandrovitosti buněk HT1080



Graf 45: Levý krabicový graf pro hodnoty indexu meandrovitosti buněčné linie HT1080 se všemi vybranými migrastatiky. Svislé čáry zahrnují 75 % hodnot, boxy 25 %. Čtvereček uvnitř boxů představuje průměrnou hodnotu a vodorovná linie medián. Pravý graf vykresluje průměrné hodnoty indexu meandrovitosti. Červenou barvou je označeno kontrolní měření, ke kterému se statistické zpracování vztahuje.

6 Diskuze

Výsledky časových grafů se pro oba objektivy převážně shodují. V blízkosti hodnot kontroly se pohybovaly rakovinné buňky ovlivněné léčivy DOXY, FAS, BEL, 4HAP. Časový průběh hodnot VIN byl v rámci grafů rychlosti a kruhovitosti v obou případech větší a u indexu meandru menší. Rychlost pro MID byla v obou případech menší než u CNT a stejně tak jeho kruhovitost. Odlišné hodnoty se projeví u indexu meandrovitosti, kdy se u objektivu 4x pohyboval pod CNT a u objektivu 10x opačně nad CNT. V obou měření se u NICL rychlost po 12 hodinách začala výrazně snižovat a kruhovitost i index meandrovitosti se pohybovala v těsné blízkosti CNT. U léčiva PIM se odchylka od kontroly projevila zejména u snížené kruhovitosti a u objektivu 10x se projevila s nízkou hodnotou indexu meandrovitosti.

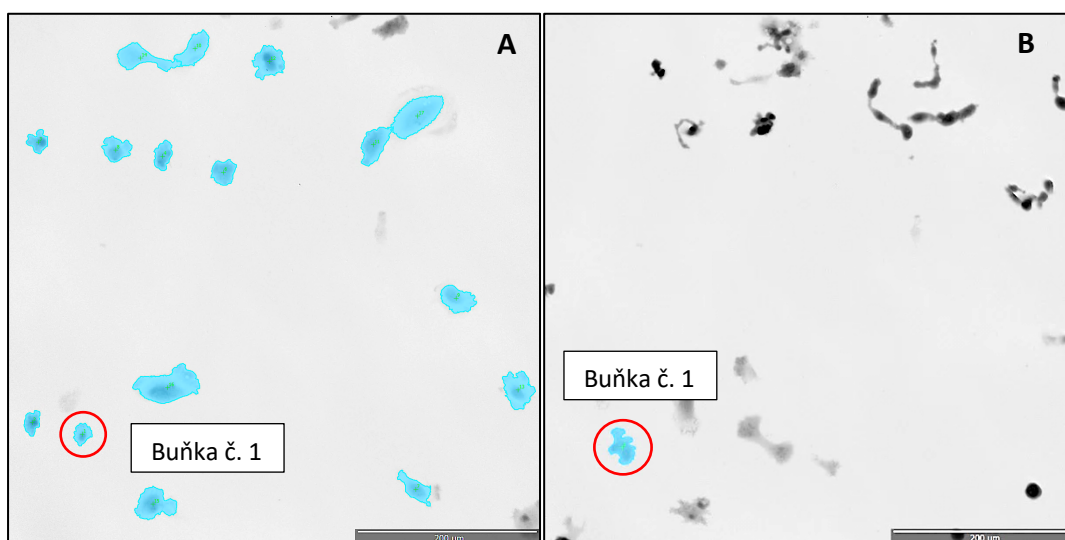
Dle statistického zpracování se hodnoty signifikance u objektivů 4x a 10x neshodly. Statistika byla provedena pro průměrné hodnoty jednotlivých buněk získaných po dobu celého měření. V případě objektivu 10x bylo zahrnuto menší množství buněk, což může být důvodem nehomogenity, a tedy zkreslení výsledků. Pro statistické zpracování je vyhovující vyšší počet buněk pro komplexnější hodnoty a prokazatelnější výsledky, jak je tomu u objektivu 4x.

Po statistickém zpracování dat pořízených objektivem 4x se projevila signifikance ovlivnění motility buněk u léčit VIN, MID a NICL. K těmto léčivům byly vytvořeny korelační diagramy poukazující na invazivní typy buněk. Po ovlivnění buněk léčivy by se buňky na konci měření měly ideálně nacházet v DL kvadrantu, tedy mít minimální hodnoty Eukleidovské vzdálenosti a indexu meandrovitosti. To se v poměrné většině povedlo u léčiv MID a VIN. U léčiva NICL se určitá část buněk pohybovala v HL kvadrantu, tedy měly větší Eukleidovskou vzdálenost a střední hodnoty meandrovitosti. Pro buňky nacházející se v HP nebo v HL kvadrantu byly zpracovány tabulky s jejich hodnotami kruhovitosti a obvodu pro odhalení chybné segmentace. Ta mohla zachytit místo buněk pouze jejich zničené části vlivem léčiv, které by se mohly chybně považovat za invazivní buňky, jelikož se rychle pohybují zřejmě vlivem proudů v médiu. Tento případ nastal u léčiva VIN.

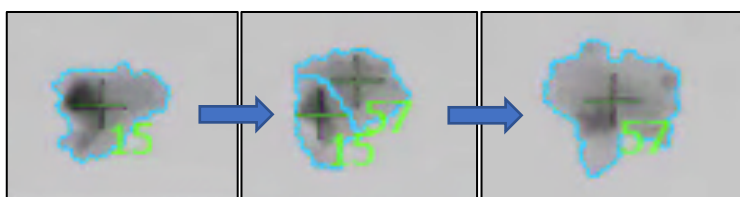
Segmentace spočívá ve správném nastavení mezních parametrů, které by daná buňka měla splňovat. Pokud se tyto parametry naruší, buňka se přestane segmentovat, nebo se naopak segmentuje jako dvě. Každá z buněk nese identifikační číslo, které je třeba udržet po celý časový záběr. U objektivu se zvětšením 4x je v zorném poli vyobrazeno v průměru 100

buněk, které se jedna po druhé musí během celého záběru hlídat a v případě chybné segmentace či přečíslování ručně opravit. Toto se stalo v naměřeném časovém úseku 20 hodin téměř nemožné splnit. U objektivu 10x se v zorném poli pohybuje okolo 20 buněk, jejichž správná nastavení a případné ruční úpravy zaberou mnohem méně času.

Následný obrázek 28 zachycuje chybnou segmentaci buněk snímány objektivem 10x ze začátku A a z konce B měření. Jde vidět, že se bez úprav číslování buněk na konci měření nachází pouze jedna z buněk označených na počátku. Obrázek 29 ukazuje příčinu této chyby. Buňka č. 15 se během časového záběru segmentovala jako dvě a následně se opět spojila v jednu. To zapříčinilo její přečíslování na č. 57.



Obrázek 28: Ukázka chybné segmentace buněk HT1080 s léčivem VIN snímány objektivem 10x, kdy se správné číslování udrželo pouze u jedné z buněk. Objektiv 10/0.3. Měřítka 200 µm.



Obrázek 29: Ukázka chybné segmentace s přečíslováním buňky.

Dosažené výsledky v této práci jsou porovnány s již existujícími studiemi. Lék MID se v monoterapii potvrdil jako dobře tolerované léčivo pro léčbu leukémie. Avšak s kombinací s konvenčními chemoterapeutiky se výrazně zvýšila gastrointestinální toxicita. Lze používat jako udržovací léčbu nebo jako léčbu stabilizující onemocnění u nejtěžších případů. [27] U NICL

stejně jako v této práci byl prokázán pozitivní účinek proti rakovinným buňkám. Působí na více signálních drah, avšak jeho přesné mechanismy nejsou zcela objasněny. [28] Léčivo VIN se již používá jako cytostatikum, které působí buněčnou apoptózu. Tato skutečnost se odehrávala i v případě této diplomové práce, kdy byly buňky na konci měření vysoce zakulacené či úplně rozpadlé na jednotlivé části. [29] Účinky inhibice růstu a potlačení aktivity rakovinných buněk vlivem léčiva DOXY byly prokázány u rakoviny prostaty či prsu. [30] Pro buněčnou linii HT1080 se tento účinek neprojevil. U FAS bylo v některých studiích prokázáno snížení metastazování zejména u buněk HT1080 a inhibice invaze buněk karcinomu vaječníků a plic. [31] V této práci se tyto účinky bohužel potvrdit nedokázaly. U léčiva 4HAP se prokázala inhibice adheze, invaze a migrace buněk rakoviny tlustého střeva in vitro. [32] Pro linii HT1080 tato skutečnost potvrzena nebyla. Pro antipsychotikum PIM byly obecně prokázány pozitivní cytotoxické účinky na rakovinné buňky melanomu, nervového systému, rakoviny prsa, prostaty a vaječníků a tlustého střeva. [33] Pro linii HT1080 se účinky v rámci této práce potvrdit nepovedly. Pro ovlivnění rakovinných buněk s použitím léčiva BEL nebyla nalezena žádná studie pro porovnání jeho účinnosti.

7 Závěr

Diplomová práce pojednává o vlivu kandidátních migrastatik na motilitu a invazivitu rakovinných buněk značných HT1080, jenž byly pozorovány prostřednictvím dvou objektivů CCHM se zvětšením 4x a 10x.

Teoretická část práce byla zaměřena na krátký popis historie holografické mikroskopie a na vývoj a princip CCHM. Dále byl přiblížen současný stav a průběh onkologické léčby pevného nádoru a nová cesta léčby pomocí migrastatik. V následující části bylo popsáno osm potenciálních kandidátů migrastatik a jejich příprava pro časoběrné měření s kultivační linií rakovinných buněk HT1080.

Experimentální část se zabývala analýzou dat v programu SophiQ. Ze získaných dat z obou objektivů byly vytvořeny časové grafy s parametry rychlosti, indexu meandrovitosti a kruhovitosti. Pro objektiv 4x byly vytvořeny časové grafy pro ilustraci chování jednotlivých rakovinných buněk po dobu časoběrného snímání a porovnání vzájemné závislosti těchto parametrů. Statistickým zpracování parametrů rychlosti, kruhovitosti, Eukleidovské vzdálenosti a indexu meandrovitosti průměrných hodnot buněk pod vlivem léčiv se prokázala signifikance vůči kontrole u léčiv VIN, MID a NICL. Pro tato léčiva byly vytvořeny korelační diagramy zachycující invazivní typy rakovinných buněk v HL kvadrantu, ke kterým bylo možné dle parametru kruhovitosti a obvodu přiřadit jejich morfotyp a tak kvalifikovat míry exprese jejich invazivního fenotypu. Pro porovnání zobrazení a práci v programu SophiQ byly porovnány výhody a nevýhody objektivů se zvětšením 4x a 10x. Konečné výsledky vlivu migrastatik na rakovinné buňky kultury HT1080 byly následně porovnány s již existujícími studii, kde se potvrdil význam na potlačení dynamiky pohybu u léčiv VIN, MID a NICL.

Dle metody RAC-GM a dosažených výsledků lze usoudit, že je vhodné použít nejprve objektiv se zvětšením 4x pro pozorování dynamiky pohybu a statistické zpracování získaných dat, díky velkému zornému poli a zahrnutí vysokého počtu buněk. Objevilo se však obtížné udržet správnou identifikaci všech buněk a zamezit jejich přechíslovávání během analýzy časoběru. Proto pro detailnější pozorování morfologických dějů a podchycení nedostatků vlivem segmentace je vhodné použít objektiv se zvětšením 10x, kde jsou trajektorie buněk či změny tvaru lépe viditelné. Navržená a ověřovaná metoda RAC-GM je ilustračním postupem,

jak by s využitím CCHM biotechnologie takové získávání a zpracovávání dat o vlivu migrastatik na migrační chování nádorových buněk mohlo probíhat.

Výsledky diplomové práce budou publikovány na konferenci European Conference of Oncology Pharmacy pod názvem „Advanced Microscopical Non-Invasive Examination of the Supposed Migrastatics for Impact on *In Vitro* Cell Migration“.

SEZNAM LITERATURY

[1] Pavel Kolman and Radim Chmelík, "Coherence-controlled holographic microscope," *Opt. Express* 18, 21990-22004 (2010). Dostupné na www:

<https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-18-21-21990&id=206096>

[2] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D. Dostupné na www: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/1245/final-thesis.pdf?sequence=11&isAllowed=y>

[3] Slabý, T., Kolman, P., Dostál, Z., Antoš, M., Lošťák, M., & Chmelík, R. (2013). *Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope*. *Optics Express*, 21(12), 14747-14762. Dostupné na www: <https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-21-12-14747&id=257423>

[4] Radim Chmelik, Miroslav Duris, Lenka Strbkova, "Quantitative phase imaging in turbid media by coherence controlled holographic microscopy," *Proc. SPIE10677, Unconventional Optical Imaging, 106771C* (24 May 2018); doi:10.1117/12.2309907

[5] KOVÁŘOVÁ A. *Měření rozložení ekvivalentu suché hmoty buňky kvantitativním fázovým kontrastem koherencí řízeného holografického mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2013. Vedoucí bakalářské práce Ing. Aneta Křížová. Dostupné na www: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=65970

[6] STRAKA B. *Komponenty pro laserovou mikromanipulaci v koherencí řízeném digitálním holografickém mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zbyněk Dostál. Dostupné na www: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/365/final-thesis.pdf?sequence=9>

[7] Prescher, J. A., & Bertozzi, C. R. (2005). Chemistry in living systems. *Nature chemical biology*, 1(1), 13-21. <http://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>

[8] Týdeník TÉMA, *Jak zarazit stěhování nádorů*. 2022. The Kellner family foundation. Dostupné na www: <https://www.kellnerfoundation.cz/aktuality/jak-zarazit-stehovani-nadoru>

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

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

[11] MARTÍNKOVÁ P. *Karboxypeptiasa B1 a možnosti jejího terapeutického ovlivnění*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2019. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D. Dostupné na www: https://is.muni.cz/th/d5pme/DP_Martinkova_verejna.pdf

[12] Fasudil. 2013 Selleck Chemicals. Dostupné na www: [https://www.selleckchem.com/products/Fasudil-HCl\(HA-1077\).html](https://www.selleckchem.com/products/Fasudil-HCl(HA-1077).html)

[13] Blair HA. Belumosudil: First Approval. Drugs. 2021 Sep;81(14):1677-1682. doi: 10.1007/s40265-021-01593-z. Erratum in: Drugs. 2021 Nov;81(17):2075. PMID: 34463931; PMCID: PMC8590654. Dostupné na www: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34463931/>

[14] BARTONÍČEK, J. *Koherenci řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

[15] BÍLÁ, V. *Rakovina. Nemoc, která mění životy*. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta sociálních studií, 2011. Vedoucí bakalářské práce Ing. Rudolf Burgr. Dostupné na www: https://is.muni.cz/th/dmvgj/BP_final_Bila_344522.pdf

[16] ĎURIŠ, M. *Imaging of an object in turbid medium by combining the signal of ballistic and diffuse photons in the coherence-controlled holographic microscope*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Mechanical Engineering, 2018. 56 p. Supervisor prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

[17] KASTL, L. et al.: *Quantitative phase imaging for cell culture quality control*. *Cytometry Part A*, vol. 91, no. 5, 2017: pp. 470–481, ISSN 15524930, Available from: doi:10.1002/cyto.a.23082.

[18] KNOPFOVÁ L. *Funkce proteinu c-Myb e vybraných aspektech kancerogeneze*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2013. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. An Šmarda, CSc. Dostupné na www: https://is.muni.cz/th/znl0d/Knopfova_Lucia.pdf

[19] GABOR, D. Holography, 1948–1971. In: *Nobel Lectures, Physics 1971–1980*. Singapore: World Scientific Publishing, 1992. Dostupné na www: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/gabor-lecture.pdf>

[20] Co je fibrosarkom? Netinbag.com. Dostupné na www: <https://www.netinbag.com/cs/health/what-is-fibrosarcoma.html>

[21] KŘÍŽOVÁ A. *Vývoj biofyzikální interpretace dat kvantitativního fázového zobrazování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018, 71 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D. Dostupné na www: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=184244

[22] Telight. 2022: Pragolab s.r.o. Publikáční systém WebGet® - IT STUDIO s.r.o. Dostupné na www: <https://www.pragolab.cz/opticke-mikroskopy/holograficke-mikroskopy/telightq-phase>

[23] SLABÝ T. *Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 91 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, PhDr.

[24] UKROPCOVÁ I. *Kritický přehled kultivačních zařízení používaných pro mikroskopická sledování živých buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství,

2018, 58 s., Vedoucí Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D. Dostupné na [www:
https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=174758](http://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=174758)

[25] SLABÝ T. *Teligh Q-Phase*, Instruction for us.

[26] DOSTÁL Z. přednáška: *Interference a holografická mikroskopie*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta strojního inženýrství. 2022.

[27] Tor Henrik Tvedt, Ina Nepstad & Øystein Bruserud (2017) *Antileukemic effects of midostaurin in acute myeloid leukemia – the possible importance of multikinase inhibition in leukemic as well as nonleukemic stromal cells*, Expert Opinion on Investigational Drugs, 26:3, 343-355, DOI: [10.1080/13543784.2017.1275564](https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1275564)

[28] Pan JX, Ding K, Wang CY. *Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells*. Chin J Cancer. 2012;31(4):178-184. doi:10.5732/cjc.011.10290

[29] Tilaoui, M., Mouse, H.A., Jaafari, A. et al. *Differential Effect of Artemisinin Against Cancer Cell Lines*. Nat. Prod. Bioprospect. **4**, 189–196 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0024-4>

[30] ROSE S. F., SLEDGE G. W. Jr., RHOT B. J., PROCTOR C. *Effects of doxycycline on human prostate cancer cells in vitro*, 1998 Elsevier Science Ireland Ltd. Cancer Letters, Str. 37-41

[31] GLANDALOVIČOVÁ A., ROSEL D., VESELÝ P., BRÁBEK, J. A SPOL. *Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges*, 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc., Str. 391-406

[32] BRIAN S. D., STACK M., KRYSZTOFIK K., WEICHELBAUM R. R., *4-Hydroxyacetophenone modulates the actomyosin cytoskeleton to reduce metastasis*, Universita Brandeis, Waltham, MA, 2020, 117 (36) 22423-22429)

[34] GONCALVES J.M., SILVA C. A. B., RIVERO E. R. C., CORDEIRO M. M. R., *Inhibition of cancer stem cells promoted by Pimozide*, Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2018, Dostupné na www: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13049>

SEZNAM ZKRATEK:

CCHM	Coherence- controlled holographic microscope
hiQPI	Holographic incoherent-light-source quantitative phase image
DIC	Differential interference contrast
RAC-GM	Rapid assessment of cell growth and migration
CNT	kontrola
VIN	vinkristin
MID	midostaurin
DOXY	doxycyklin
PIM	pimozid
NICL	niklosamid
FAS	fasudil
BEL	belumosudil
4HAP	4-hydroxyacetofenon
např.	například
tj.	to jest, to je
tzv.	takzvaný
atd.	a tak dále