

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

*Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 807*

*ISSN 1213-418X*

**Renata Štysová Rychtáriková**

**ANALÝZA PRIMÁRNÍHO SIGNÁLU  
DIGITÁLNÍHO SENZORU SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU  
PRO ZÍSKÁNÍ STRUKTUR  
A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ  
BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ**

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
FAKULTA CHEMICKÁ

Ing. et Bc. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.

**ANALÝZA PRIMÁRNÍHO SIGNÁLU DIGITÁLNÍHO SENZORU  
SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU PRO ZÍSKÁNÍ STRUKTUR  
A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ  
BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ**

ANALYSIS OF THE PRIMARY SIGNAL  
OF A DIGITAL LIGHT MICROSCOPE SENSOR TO RETRIEVE  
THE STRUCTURES AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES  
OF BIOLOGICAL MATERIALS

ZKRÁCENÁ VERZE HABILITAČNÍ PRÁCE  
V OBORU FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BRNO 2025

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mikroskopie v procházejícím světle, mikroskopie v odraženém světle, zobrazení buněk a tkání, systémový přístup, informační entropie, optická spektroskopie

## **KEYWORDS**

Transmitted light microscopy, reflected light microscopy, cell and tissue imaging, system approach, information entropy, optical spectroscopy

## **MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE**

Habilitační práce je uložena v areálové knihovně FCH VUT v Brně.

© Renata Štysová Rychtáriková, 2025

ISBN 978-80-214-6316-5

ISSN 1213-418X

---

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 PŘEDSTAVENÍ AUTORKY</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2 ÚVOD</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3 TEORETICKÁ VÝCHODISKA VÝVOJE SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU</b>          | <b>6</b>  |
| <b>4 KONSTRUKCE SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU</b>                            | <b>9</b>  |
| 4.1 Konstrukce hardwaru . . . . .                                    | 9         |
| 4.1.1 Digitální kamera . . . . .                                     | 10        |
| 4.1.2 Zdroj světla . . . . .   | 10        |
| 4.1.3 Optika . . . . .   | 11        |
| 4.1.4 Mechanika . . . . .  | 11        |
| 4.2 Vývoj řídicího softwaru . . . . .                                | 12        |
| 4.2.1 NanoScope . . . . .  | 12        |
| 4.2.2 SuperScope . . . . .   | 12        |
| 4.2.3 CAMEX . . . . .  | 13        |
| 4.3 Analýza signálu z kamerového senzoru . . . . .                   | 13        |
| 4.3.1 Kalibrace optické dráhy . . . . .                              | 14        |
| 4.3.2 Informační přínos jednotlivých pixelů . . . . .                | 15        |
| 4.3.3 Kvazispektrální analýza . . . . .                              | 19        |
| 4.3.4 Profilometrie . . . . .  | 20        |
| 4.3.5 Segmentace mikroskopického obrazu buněk a organel . . . . .    | 20        |
| 4.3.6 Měření vnitrobuněčné dynamiky . . . . .                        | 21        |
| 4.3.7 Vizualizace metodou nejmenší informační ztráty . . . . .       | 23        |
| <b>5 VYVÍJENÉ APLIKACE METOD SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE</b>                | <b>24</b> |
| 5.1 Histologické řezy . . . . .                                      | 24        |
| 5.2 Živé neznačené leukocyty a mesenchymální kmenové buňky . . . . . | 27        |
| 5.3 Skelety pro regenerativní medicínu . . . . .                     | 30        |
| <b>6 ZÁVĚR</b>   | <b>33</b> |
| <b>7 POUŽITÁ LITERATURA</b>  | <b>34</b> |
| <b>8 ABSTRACT</b>  | <b>39</b> |

---

# 1 PŘEDSTAVENÍ AUTORKY



Jméno: **Ing. et Bc. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.**  
Narozena: 3. března 1983 v Jihlavě  
Trvalé bydliště: Vilová čtvrť 197, 373 33 Nové Hradý  
Národnost: česká  
Rodinný stav: vdaná, jeden syn (nar. 2017)

## Vzdělání a kvalifikace

- 2011 **Ph.D. (Biotechnologie)** – společná akreditace ÚCHP AV ČR a FPBT VŠCHT Praha  
2006 **Bc. (Učitelství odborných předmětů)** – VŠCHT Praha  
2006 **Ing. (Konzervace potravin a technologie masa)** – FPBT VŠCHT Praha  
2001 **maturita (všeobecné sedmileté studium)** – Gymnázium Otokara Březiny v Telči

## Zaměstnání

- od 1/2023 **Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR, Praha** – externí hodnotitel projektů OP TAK a OP PIK – DPČ
- od 12/2012 **Ústav komplexních systémů FROV JU, Nové Hradý** – postupně postdoktorand, vědecký pracovník a akademický pracovník v Laboratoři experimentálních komplexních systémů – výuka předmětů Fyzikální biologie (termodynamika), Chemie II (organická chemie a spektroskopie), Bioinformatika (světelná mikroskopie), Technické normy (garant předmětu) a Modelování přírodních systémů  
– 5 obhájených bakalářských prací (FROV JU, Università degli Studi di Padova), 4 obhájené dizertační práce (školitel-specialista, PřF JU), projekty mezinárodních letních škol  
– vývoj světelně mikroskopických metod, algoritmizace – 5 průmyslových projektů jako (co)-PI (MPO, TAČR)
- 8/2011–1/2013 **FARMEKO, VOŠZ a SOŠ, s.r.o., Jihlava** – učitel předmětů Klinická biochemie, Mikrobiologie, toxikologie a hygiena, Biochemie a biotechnologie, Farmakognosie
- 7/2011 **Safibra, s.r.o., Říčany u Prahy** – výzkumný a školící pracovník přípravy optických biosenzorů
- 9/2006–6/2011 **Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i., Praha** – vědecký pracovník–doktorand v Laboratoři imobilizovaných biomateriálů a optických senzorů  
– techniky imobilizace biologických materiálů, vývoj samosterilovatelných biomateriálů a optických senzorů, příprava sol-gelů a hydrogelů, fotochemie a fotobiologie, mikrobiologie, práce s GMO

---

## 2 ÚVOD

*„Kdyby to mělo nějakou praktickou hodnotu, my sami bychom to vynalezli už dávno.“ Z nobelovské přednášky Fritse Zernikeho (1953) citujícího vedoucího vědeckého pracovníka firmy Zeiss.*

V současné době žijeme v nanoéře, kdy je vyžadována znalost spektrálně rozlišených informací o lokalizaci nanostrukturovaných objektů. Pro zkoumání (sub)mikroskopických struktur je světelná mikroskopie hlavní metodou již několik staletí a v případě živých buněk často nemá alternativu. Mikroskopie atomárních sil mapuje pouze buněčný povrch a elektronmikroskopické metody vyžadují velké úpravy vzorku, přičemž zmrazení je tou úpravou, která vzorek modifikuje nejméně. Environmentální elektronová mikroskopie (ESEM) stále zůstává zřídka se vyskytující měřicí a experimentální metodou.

Historické snímky získané světelnou mikroskopií, ale kreslené ručně nebo získané klasickou filmovou fotografií, obsahují překvapivé množství detailů, které v digitální světelné mikroskopii nenajdeme, ať je obraz jakkoli zvětšený. Světelná mikroskopie také skrývá potenciál určení fyzikálně-chemických vlastností sloučenin pozorovaného objektu (např. tkáně, buňky či orgány) v prvku (pixelu nebo voxelu) diskretizovaného prostoru pozorovaného digitálním mikroskopem.

Cílem výzkumu a vývoje popsaného v této habilitační práci bylo analyzovat informaci poskytovanou digitální světelnou mikroskopií až na úroveň limitů současné techniky a experimentální a teoretické fyziky. Světlo jako pole elektromagnetického záření je zkoumáno na úrovni jednotlivých voxelů, jejichž velikost je limitována technickým nastavením experimentu, především velikostí pixelu digitální kamery a krokem podél optických řezů. To je jediný způsob, jak identifikovat lokální (bio)chemické složení a molekulární interakce. Uživatelé světelné mikroskopie se tak mohou dostat k informacím, které možná nebyli zvyklí hledat, ale které popisují skutečné vlastnosti objektu a mohou být praktické nebo alespoň zajímavé v případě vědecké zvědavosti. Dostatečnou výpočetní statistiku potom zajistí velké zorné pole kamery mikroskopu. Odhalení a pochopení těchto technických limitů ve světelném mikroskopu potom může vyústit ve zpochybnění teoretických limitů interpretace světelné mikroskopického obrazu.

Při vývoji světelného mikroskopu pro biologické účely jsme vycházeli z principů teorie měření v živých dynamických systémech [1, 2] a z měření a modelování primitivních samoorganizujících se multifraktálních systémů [3–5]. Vědecký aspekt naší práce spočíval v metodologickém použití nejmodernějších existujících technologií (komponent nejvyšší třídy), neboť jenom tak je možno dosáhnout odborně nejsprávnější interpretace informace poskytované mikroskopem. Při vývoji analytického softwaru jsme využívali fyzikálně-chemický přístup.

Znalosti technických limitů světelné mikroskopie získané základním výzkumem jsme poté využili při návrhu a stavbě jednotlivých mikroskopů pro vybrané biologické a potenciální medicínské aplikace.

---

### 3 TEORETICKÁ VÝCHODISKA VÝVOJE SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU

Pozorování vzorků světelnou mikroskopií je omezeno fyzikálními vlastnostmi světla a konstrukčními limity optické soustavy. Pokusy o úplný popis elektromagnetického pole podél optické dráhy mikroskopu sahají až do 40. let 20. století [6–9]. Tyto Nijboerovy-Zernikeho integrály, které popisují změnu elektromagnetického pole po průchodu optickou čočkou, jsou vypočitatelné pouze pro velmi idealizovaný objekt a velmi idealizovanou soustavu čoček. Reálné vzorky však mají nenulovou tloušťku a jsou nehomogenní, stejně jako reálnou mikroskopickou optiku nelze snadno aproximovat modelem tenké čočky.

Dle našich znalostí je nekomplexnější popis elektromagnetického pole vznikajícího interakcí světelného elektromagnetického pole s reálnými vzorky, tedy nehomogenními vzorky nenulové tloušťky, uveden v [10, 11]. Jedná se o nejlepší aproximaci řešení inverzního problému (odhadu tvaru pozorovaného objektu z jeho rozptylové funkce) při mikroskopii reálných vzorků nenulové tloušťky. V tomto případě se také dle našich znalostí jedná o poslední limity v pochopení tvorby interferenčního obrazce reálného (tj. nenulové tlustého) vzorku.

Konstrukce soustav reálných optických čoček je založena na různých implementacích principů paprskové optiky, např. [12]. Tímto přístupem však lze překvapivě dosáhnout dostatečně detailního popisu tvorby obrazu. Principy paprskové optiky je třeba také vzít v úvahu při analýze mikroskopického obrazu jakožto interferenčního obrazce.

Mikroskopický obraz je světelný (elektromagnetický) interferenční obrazec, typicky analyzovaný v rovině zvané ohnisková. Ohnisková rovina odpovídá rovině extrémní intenzity elektromagnetického pole v průběhu vlnoplochy světla podél optické osy z optické soustavy [9, 10]. Schopnost rozlišit zaostřené odezvy světelného elektromagnetického pole s jednotlivými objekty v ohniskové rovině se v běžném jazyce nazývá rozlišení.

Samotný pojem *rozlišení* tak, jak je běžně užiteli světelné mikroskopie používán, tedy ve smyslu Abbeho rozlišení [13] vychází ze zjednodušeného popisu interferenčního obrazce [14] a je limitujícím faktorem při pokusech o získání více informace ze světelně mikroskopického obrazu. Abbeho difrakční limit totiž při běžné světelné mikroskopii teoreticky zneumožňuje odlišit dva body bližší než přibližně 250 nm.

Nicméně již od konce 60. let je známa možnost pozorovat objekt o velikosti 25 nm ve světlém poli bez pokusů o jeho přesnou lokalizaci metodou zvanou videozesílená mikroskopie [15, 16]. V 80. letech 20. století byly dále popsány metody sub-rozlišené lokalizace fluorescenčně značených objektů ve zředěných vzorcích [17]. V tomto textu jsou tyto metody nazývány superlokalizačními.

Superrozlišovací mikroskopie je světelná mikroskopie umožňující pozorovat objekty s rozlišením vyšším než teoreticky odvozený Abbeho difrakční limit. Superrozlišení ve fluorescenční mikroskopii bylo oceněno Nobelovou cenou za chemii v roce 2014. Moerner [18, 19] studoval opticko-absorpční spektrum molekuly pentacenu v hostitelském krystalu. Superrozlišovací metoda PALM (z angl. Photoactivated Localization Microscopy, [20, 21]) je naopak určena pro sledování dynamických procesů v živých buňkách a založena na stochastické aktivaci fluorescence a přerušovaném rozsvěcování jednotlivých fotoaktivovatelných molekul. Ty jsou pak zobrazeny a působením světla zhaseny. Molekuly, které sídlí ve stejném difrakčně omezeném objemu a jinak by byly prostorově nerozlišitelné, jsou takto časově odděleny. Mikroskopie STED (z angl. Stimulated Emission Depletion) [22, 23] využívá osvětlení dvěma různými tvary laserového paprsku, kdy „obyčejný“ paprsek excituje fluorofor, zatímco další paprsek toroidního tvaru vypíná fluorofory mimo ohniskovou rovinu. Typy a nové perspektivy superrozlišovacích

---

mikroskopických metod jsou detailněji popsány například v pracích [24, 25].

Současné superrozlišovací/superlokalizační metody se většinou zabývají pouze analýzou každého optického řezu s fluorescenčním signálem zaostřeného objektu zvlášť. V reálných vzorcích nenulové flouščky je však nezbytné analyzovat vzájemné informace v celém ohniskovém rozsahu několika optických řezů. Navíc naše předběžná pozorování videozesílenou mikroskopií naznačují, že tvar rozptylové funkce se liší podle intenzity dopadajícího světla [26].

My jsme prokázali, že superrozlišení/superlokalizace lze dosáhnout i při použití běžného mikroskopu v režimu světlého pole [27–32]. Tento přístup pro superrozlišení/superlokalizaci je obecnější a převádí zdánlivě optický problém na problém informační vědy, založený na filtrování primárních digitálně mikroskopických obrazových dat výpočtem využívajícím Rényiho entropii. Přístup čistě informační vědy skýtá potenciál změnit celý obor světelné mikroskopie.

Toto naše nové paradigma analýzy mikroskopického obrazu je v souladu s Nijboerovou-Zernikeho teorií: podél optické dráhy mikroskopu můžeme najít bod („nulové“ velikosti), který odpovídá intenzitnímu maximu odezvy světla na pozorovaný objekt. Při digitálním zobrazování lze tento bod „nulové“ velikosti promítnout na pixel kamery. Tomuto bodu říkáme elektromagnetický centroid. Novým aspektem našeho paradigmatu je, že za určitého statistického předpokladu hledáme body/pixely stejné intenzity mezi dvěma po sobě jdoucími obrazy optických řezů, čímž provedeme analýzu jednotlivých voxelů. Jinými slovy, provedeme experiment ověřený jiným experimentem. Tyto objekty jsme nazvali 3D elektromagnetické centroidy (informační těžiště; srovnej s 2D centroidem ve fluorescenčním zobrazování po proložení dat metodou nejmenších čtverců, např. [33]), a lze je nalézt v difrakčním, fluorescenčním i reflexním zobrazení s ohledem na multifraktalitu obrazu. Za předpokladu, že se tyto body nacházejí na opačných stranách skutečné ohniskové roviny obrazu pozorovaného objektu, můžeme definovat ohniskovou rovinu odezvy pozorovaného objektu. Výrazně jsme tak zjednodušili 3D mapu odezvy elektromagnetického pole při jeho interakci s pozorovaným objektem. Zkonstruovali jsme 3D model této odezvy, který lze porovnat s pozorováním mikroskopií atomárních sil (AFM) [27, 30]) nebo elektronovou mikroskopií [1]. Lokalizace elektromagnetických centroidů je dosažena s přesností v rozsahu lokalizace super/sub-rozlišení. Tato metoda je také použitelná pro neznačené vzorky odražející světlo včetně plastových nanovláčených scaffoldů a živých buněk a tkání. Stanovení vlastností uvnitř prostorového prvku (voxelu) je prvním krokem ke stanovení spektra absorbovaného, difrakčního, reflektančního, fluorescenčního světla a následně i chemického složení a fyzikálního stavu pozorovaného objektu [34]. Takto nově definovaná pozice ohniskové vzdálenosti umožňuje účinnou segmentaci obrazu [35, 36] a měření vnitrobuněčné dynamiky [32, 37].

V kontextu tohoto fyzikálně-matematického přístupu dále přinášíme technické požadavky na konstrukci mikroskopu pro dosažení superrozlišení [30]. Z hlediska multifraktality je však naše metoda obecná a nevyžaduje „superrozlišenou“ diskretizaci elektromagnetického pole. Technicky se daná velikost voxelu promítá do rozložení (histogramu) intenzit obrazu změnou jeho multifraktality [38].

Komplexně kombinujeme různé přístupy a technická řešení, která jednotlivě nemají k lepšímu řešení inverzního problému odhadu tvaru objektu z jeho rozptylové funkce velký přínos. Při konstrukci digitálního světelného mikroskopu a relevantního softwaru vycházíme ze tří základních teoretických předpokladů:

1. „Naředit“ signálu pozorovaných objektů pro účely superrozlišení a superlokalizace lze dosáhnout bez jakékoliv úpravy elektromagnetického pole mikroskopickou optikou. Postačuje velmi jednoduchá optika. Jedinou úpravou je změna polohy vzorku vzhledem k optice mikroskopu (proostření).

- 
2. Zkoumaný jev (mikroskopické zobrazení) je výsledkem chování souboru fotonů a lze jej analyzovat přístupem spojitého elektromagnetického pole, který zajišťuje, že můžeme hledat maximum/minimum v časoprostorovém rozložení elektromagnetického pole.
  3. Pozorovaný obraz má multifraktální charakter odrážející dané technické nastavení (velikost kamerového pixelu a kroku podél optické osy) a jako takový je třeba ho zkoumat. Multifraktální charakter obrazu je způsoben tím, že obraz obsahuje odezvy velkého množství podobných objektů zkreslených průchodem optickou soustavou podobným způsobem ve vztahu k jejich poloze vůči optice mikroskopu a tento signál je diskretizován čipem kamery.

---

## 4 KONSTRUKCE SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU

Námi zkonstruované mikroskopy jsou běžné digitální světelné mikroskopy s vázaným sofistikovaným řídicím a analytickým softwarem. Základem zařízení je co nejjednodušší konstrukce mikroskopu, díky čemuž dochází k eliminaci optických i mechanických vad obvyklých u složitějších komerčních zařízení (mikroskopů). Na vývoji spolupracujeme s externími českými a rakouskými strojírenskými, hardwarovými a softwarovými firmami: Petr Tax-Optax, Praha; Pavel Tichovský, Nové Hradky; ImageCode-Petr Macháček, Brloh; Synchronics Engineering, Heidenreichstein a Martin Novák, Nové Hradky.

První mikroskopy byly konstruovány v transmisním osvětlení, nicméně v pozdějším vývoji jsme se zaměřili na konstrukci mikroskopů v odraženém světle.

V první fázi technického vývoje jsme se zaměřili na mikroskop určený zejména pro detailní pozorování a analýzu jedné savčí buňky, zatímco nyní stavíme mikroskopy s velkým zorným polem, kde je možné sledovat v jednom obraze až stovky savčích buněk s rozlišením pod Abbeho difrakčním limitem, čímž je pro vyhodnocování dynamiky biologického procesu zajištěn velký statistický soubor.

Výběr konstrukčních prvků mikroskopu je vždy podřízen dané aplikaci. Nicméně lze z konstrukčního hlediska vystopovat námi obecně používané konstrukční principy k tomu, aby byla zajištěna maximální extrakce informace ze světelně mikroskopického obrazu:

1. **Výběr jednoduché optiky.** Obecně se vyhýbáme optice, která poskytuje kompromisní nebo „hezky vypadající“ (dez)informaci o objektu. Pokud aplikace nevyžaduje jinak, upřednostňujeme optiku telecentrickou, u níž se zvětšení nemění s polohou podél optické osy. Hloubku ostrosti je poté nutno definovat s ohledem na informaci v sousedních pixelech kamerového systému. Hranici objektu lze nalézt, pokud je gradient intenzity dostatečně strmý, aby mezi dvěma sousedními body na senzoru byla informace odlišná. Tím získáme nejlokalizovanější obrazovou (interferenční) odezvu světelné vlnoplochy na objekt.
2. **Konstrukce mikroskopu s vysokým časovým a prostorovým rozlišením,** který dokáže zachytit tyto lokalizované informace v jednom voxelu. To je zajištěno malým (v řádu až jednotek nm), ale rychlým krokem z-motoru, velikostí teoretického objektu promítaného na jeden pixel kamery (v rádech několika málo desítek nm), sběrem primárního digitálního RGB kamerového signálu s vysokou bitovou hloubkou a vysokou intenzitou osvětlení vzorku.
3. **Analýza informace až na limit datové sady** pomocí informačně-entropických a spektroskopických přístupů.

Zatímco většina metod superrozlišené/superlokalizované mikroskopie je založena na předpokladu detekce signálu oddělených objektů, např. [20, 22, 33], my snímáme obraz tkáně, buněk nebo materiálu kompletně a komplexně a výpočetně hledáme hranice signálů jednotlivých objektů až na úroveň velikosti jednoho obrazového bodu.

Přístup k vývoji mikroskopu je přitom primárně založen na experimentu. V kterémkoli ze základních kroků výzkumu a vývoje, ať už je to kalibrace kamery, detekce zaostřených objektů, shlukování na základě entropie obrazu nebo výpočet spektrálních vlastností objektu, spoléháme výhradně na výsledky experimentálních měření. Ta sice mohou být podobná teoretickým očekáváním, ale obecně spíše nejsou.

### 4.1 Konstrukce hardwaru

V rámci základního výzkumu jsme postupně sestrojili tři plně digitální světelné mikroskopy:

- 
- NanoScope 2011 [30–32, 34, 37, 39, 40],
  - SuperScope 2019 [41],
  - FutureScope 2021 [35, 36].

Mikroskopy byly postaveny na základě výběru špičkových komponent dostupných na tehdejšímu trhu. Tyto komponenty byly vyžadovány proto, aby byly splněny předpoklady multifraktality a vysokého poměru signálu k šumu v mikroskopickém obrazu. Tímto jsme získali co nejčistší a nejsnázeji interpretovatelný signál pozorovaného objektu.

#### 4.1.1 Digitální kamera

Prvním klíčovým bodem v návrhu je použití digitální kamery s vysokým počtem pixelů. Využíváme velkoformátové kamerové čipy s pixely submikronové velikosti. Postupným vývojem přecházíme ke stále větším kamerovým čipům se zmenšujícím se kamerovým pixelem.

NanoScope 2011 byl vybaven CCD čipem o formátu full-frame s pixelem 7,4  $\mu\text{m}$ . Tento senzor neobsahuje UV a IR filtr a nežádoucí světelné intenzity musely být odstraněny pomocí příslušných optických filtrů mikroskopu. Všechny ostatní kamery jsou již CMOS, u SuperScope 2019 o formátu full-frame s velikostí pixelu 4,6  $\mu\text{m}$ , u FutureScope 2021 o formátu kamerového senzoru APS-H s 2,2  $\mu\text{m}$  pixelem. Tím při použití objektivu zvětšujícího 10 $\times$  dosahujeme velikosti objektu promítaného na kamerový pixel 220 nm. Trh však již nabízí kamerové senzory s velikostí pixelů 0,4 $\times$ 0,4  $\mu\text{m}^2$ , což vede u kamerového senzoru APS-H k počtu pixelu obrazu 2,5 Gpx. Tato kamera Canon LI8020 je v současné době pro využití ve světelné mikroskopii v sestavě FutureScope testována. NanoScope 2011 obsahuje též průmyslovou vysokorychlostní 2Mpx kameru pro časosběrné snímání.

Všechny kamery byly přeprogramovány tak, aby poskytovaly primární, pokud možno 12bitový, signál. Výjimkou je 120Mpx kamera SVS Vistek mikroskopu FutureScope 2021 dávající 8bitový signál, která nahradila původní 10-bitovou kameru Arducam AR1820HS. Nicméně i kamera SVS Vistek je na trhu dostupná jako 10bitová.

Všechny kamery jsou barevné (RGB), jejich senzor je vybaven Bayerovou maskou. Z těchto primárních obrazových dat (raw) dále rekonstruujeme barevný (RGB) obraz bez interpolace obrazových bodů (kap. 4.3.7), či je využíváme k výpočtu viditelného světelného spektra každého jednotlivého obrazového pixelu (kap. 4.3.3).

Rychlost snímání je limitována velikostí obrazu (počtem pixelů) a případně krokem podél os  $z$  či  $x$ ,  $y$ .

#### 4.1.2 Zdroj světla

Preferovaným zdrojem viditelného záření pro dosažení videozesílení jsou supersvítivé intermitentní LED. Ty byly v páru použity u NanoScope 2011. Vzhledem k jednoduchému řízení mikroskopu bylo schéma blikání LED nepravidelné. Intenzita záření byla nastavována jako proud procházející elektrodou (0–5000 mA). U SuperScopu 2019 byla instalována jedna silná LED, jejíž intenzita je nastavována v procentech maximální hodnoty. Přerušované záření je v tomto případě již naprogramováno tak, že světelný puls odpovídá času spouštění kamerové uzávěrky po posunu mikroskopického stolku.

V současné době je FutureScope 2021 vybaven jednoduchým, komerčně dostupným typem kontinuálního LED světla, kde není dosaženo videozesílení. Tento mikroskop je možné použít jak v režimu procházejícího světelného záření, tak v režimu odraženého záření. V případě procházejícího záření je použit prosvětlovací stolek Schott TLS-BF. Pro snímání v odraženém světle, což je v současné době nejčastější režim, je použito kruhové světlo se sadou LED Schott VisiLED upevněné kolem objektivu.

---

Při snímání v režimu odraženého světla má obraz intenzitní histogram podobný obrazu získaného z fluorescenčního mikroskopu.

Vždy byla nastavována nejvyšší možná světelná intenzita, a tedy nejnižší možný expoziční čas kamery, které ještě nevedly k saturaci senzoru. Vzorek živých buněk tedy snímáme co nejrychleji pro eliminaci skokových změn v obraze.

### 4.1.3 Optika

Optika mikroskopu byla postupně zjednodušována, z klasických mikroskopů s nekonečnou optikou a 4× zvětšující projekční čočkou Mitutoyo (NanoScope 2011) přes nekonečnou optiku, ale fixovanou v pozici nejmenších optických vad (SuperScope 2019), až po konstrukci kamera-adaptační nástavec-tubusový objektiv integrované dohromady (FutureScope 2021). Optická dráha je tak nakonec velice jednoduchá, bez vložených optických prvků.

Při mikroskopickém měření NanoScopem 2011 a SuperScopem 2019 jsme využívali všechny typy běžných optických objektivů:

- achromatické (pro korekci jedné vlnové délky na otvorovou vadu a dvou vlnových délek na barevnou vadu),
- apochromatické (pro korekci tří barevných vad a zaostření těchto tří barev do jednoho bodu).

Výrazné zjednodušení optické soustavy mikroskopu nastalo s využitím tubusových objektivů. Tato sestava kamera-objektiv se pohybuje podél optické dráhy, zatímco stolek zůstává pevný nebo je možné jej vynechat či nahradit jinými mechanickými zařízení vhodnými pro dané měření. Tubusové objektivy jsou ve většině případů vybaveny měřicí telecentrickou optikou s pevnou vzdáleností.

Koncept telecentrické optiky je pro vysvětlení konceptu našeho výzkumu nejzajímavější. Ta je používána u zařízení FutureScope 2021. Telecentrickou optikou vybereme po interakci světelného záření se vzorkem převážně centrální světelné paprsky rovnoběžné s optickou osou. Tím získáme obraz postřádající „perspektivu“. Obrazy objektu ve všech vzdálenostech od ohniska mají stejnou velikost a tvar. V běžné „neteletické“ (endocentrické) optice je obraz tvořen také paprsky, které nejsou rovnoběžné s optickou osou. Výstup telecentrického zobrazovacího systému je zkrácen úzkou rozptylovou zobrazovací funkcí, kdy interferenční prstence jsou potlačeny. Ohnisko objektu potom rozpoznáme jako bod (voxel) extrémní intenzity podél optické dráhy paprsků. Telecentrická optika také umožňuje zarovnat rozsahy pozic ohnisek různých barev (vlnových délek) a získat tak obraz poskytující v podstatě stejnou informaci jako barevná kamera kombinovaná s apochromatickým objektivem.

Pokusnými měřeními s moderními gigapixelovými kamerami s malým pixelem jsme však zjistili, že optika mikroskopu může být ještě mnohem jednodušší než ta, kterou používáme v posledním testovacím typu mikroskopu FutureScope 2021, nebo je možné použít makroskopickou (zmenšovací) optiku a přesto je možné díky malému pixelu kamery docílit mikroskopického obrazu. Je též nutné používat objektivy designované na velké senzory kamer.

### 4.1.4 Mechanika

Mechanika mikroskopů je velice jednoduchá. Postupně jsme přešli od posunu podél optické dráhy objektivovou hlavicí (NanoScope 2011) k posunu stolkem (SuperScope 2019, FutureScope 2021). Důvodem je, že objektivová hlavice je na rozdíl od stolku vyrobeného z uhlíkového kompozitu velice těžká a je těžké dosáhnout přesného jemného, několika nanometrového posunu. Nové mikroskopy v odraženém

---

světla (Visible Truth UltraEasy 2024) jsou však navrženy a vyrobeny tak, že se podél optické osy posunuje sestava kamera-objektiv.

Posun podél optické dráhy byl v případě NanoScope 2011 zajištěn nejdříve piezomotorem dávajícím průměrný krok 119 nm. Později byl piezomotor odstraněn a krokování zajišťoval servomotor s průměrným krokem 134 nm. Přesná pozice pohybující se objektivové hlavičky byla snímána a řízena sondami Renishaw. SuperScope 2019 a FutureScope 2021 jsou vybaveny piezomotorem. SuperScope 2019 může dosáhnout průměrného kroku až 4 nm, což může sloužit pro testování limitů dosažení superrozlišení, nicméně pro praxi je takovýto krok zbytečně malý a nepoužitelný. FutureScope 2021 může dosáhnout kroku podél optické dráhy 20 nm.

Ostření bylo u NanoScope 2011 pouze softwarové, zatímco další dva mikroskopy jsou již vybaveny i manuálním ostřením mikrometrickým šroubem.

## 4.2 Vývoj řídicího softwaru

Vývoj řídicího softwaru popisovaných mikroskopů odpovídal danému stavu tehdejší techniky. Všechny tři řídicí softwary řídí mechanické pohyby piezo- nebo servomotorů, jak je popsáno v kapitole 4.1.4.

### 4.2.1 NanoScope

První software NanoScope relevantního mikroskopu byl řízen komplikovanou elektronikou. Hlavní nevýhodou tohoto systému bylo, že nebylo dosaženo plné synchronizace blikání světla, snímání a pohybu podél optické osy a získané snímky byly v sérii intenzitně nehomogenní. Software umožňoval nastavit časosběr, x-, y-, nebo z-sken a jejich kombinaci, nicméně vždy pouze s konstantním časovým nebo prostorovým krokem. Bylo možné nastavit hodnoty intenzit blikajícího světla a kamery a softwarově nastavit filtry a objektivy. Parametry nastavení měřicího protokolu bylo možné uložit do protokolu, zpětně načíst do software a včetně polohy stolku a objektivu pro daný snímek uložit jako metadata do obrázku (vyčítání metadat se provádí stisknutím klávesy F3). Další nevýhodou bylo, že software neobsahoval intenzitní histogram pro nastavení kamery a intenzity osvětlení. Kalibrační soubory jsou tvořeny manuálně, postupným vkládáním filtrů s měnícím se stupněm šedosti a vyhodnocovány softwarem VerCa (kap. 4.3.1).

### 4.2.2 SuperScope

Nevýhody softwaru NanoScope jsou již odstraněny u softwaru SuperScope [41, 42] relevantního mikroskopu. Senzor digitální kamery mikroskopu SuperScope 2019 má menší pixel, což umožňuje při menším celkovém zvětšení mikroskopu vidět ve stejném detailu větší zorné pole. Horizontální pohyb stolku tedy již není nutný. Součástí mikroskopu je řídicí jednotka s řídicí kartou s vlastními hodinami, která ovládá posun stolku se vzorkem podél osy z, rozsvícení, zhasnutí a intenzitu světla a dává pokyn kameře ke snímání. Pokud je nastavena správná pozice stolku (odečtena sondami Renishaw), rozsvítí se světlo a řídicí jednotka vyšle pokyn kameře ke snímání. Přerušováním světla se omezí expozice vzorku a minimalizuje se jeho světelné poškození. Lze nastavit měřicí protokol tak, že časosběr, z-sken i jejich kombinaci lze provést s proměnlivými časovými i prostorovými kroky. Dále je možné nastavit světlo a expozici kamery.

Získávání obrazových dat je řízeno počítačem Jetson AGX Xavier, aby bylo dosaženo rychlého analytického zpracování obrazu softwarovými nástroji uvedenými v kapitole 4.3. Informace o měření jsou

---

ukládány do souborů EXIF a txt/xml. Software SuperScope je dále vybaven funkcí automatického snímání bílého standardu difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon® a tvorby kalibračního souboru a umožňuje následnou kalibraci surových dat (kap. 4.3.1).

### 4.2.3 CAMEX

Řídící software CAMEX mikroskopu FutureScope 2021 je verzí softwaru SuperScope rozšířenou o analýzu obrazu Image Explorer (kap. 4.3.7), včetně vkládání měřítka, s pozměněným grafickým uživatelským rozhraním. U řídicího softwaru CAMEX instalovaného na mikroskopu FutureScope 2021 není nutné řešit synchronizaci světla s kamerou, protože osvětlení je kontinuální. Software CAMEX má k vizualizaci dat implementovaný algoritmus LIL (kap. 4.3.7).

## 4.3 Analýza signálu z kamerového senzoru

Hlavním zájmem našeho základního výzkumu bylo pomocí kompletní analýzy tvorby světelně mikroskopického obrazu získat odpověď na otázku, do jaké míry teoretický popis tvorby mikroskopického obrazu odpovídá pozorovaným jevům.

Kamerový senzor využíváme jako měřicí zařízení. Obrazem (též snímkem) v našem případě nerozumíme upravený signál s cílem vytvořit nějaký vjem, ale datovou sadu vzniklou interakcí fotonů se senzorem kamery a následně digitalizovanou, neboli neupravený kamerový signál. Pokud pojem „obraz“ spojujeme s nějakým adjektivem, např. „kalibrovaný“, znamená to, že na daném obraze byla provedena nějaká matematická operace.

Avšak většina digitálních kamer v mikroskopii upravuje původní signál tak, aby vznikl vizuálně „pěkný“ obrázek bez jakékoliv vědecké relevance. Příslušné algoritmy (např. vyvážení bílé nebo odstranění „nežádoucích“ intenzit obrazu) jsou ve většině případů aplikovány na každý snímek série zvlášť, což znemožňuje jakékoliv vzájemné porovnání snímků v sérii. Takové znehodnocení informace v obraze postupně brání správné manuální analýze snímků, algoritmicke analýze obrazu a správné extrakci znalostí jako je lokalizace elementárních objektů v pozorovaných materiálech. Na mikroskopických snímcích pořízených digitální kamerou mohou dokonce zcela zbytečně chybět celé objekty, čímž nemusí být dosaženo správného stanovení chemického složení a fyzikálního stavu sledovaného materiálu. Tyto nedostatky je třeba eliminovat.

Při zpracování obrovských datových sad získaných mikroskopy technicky popsány v kapitole 4.1 jsme nuceni řešit problémy velkých dat (Big Data Problems). Nevyhnutelným technickým krokem, jak vyřešit problémy velkých dat, je optimální algoritmicke všech operací. Každou takovou algoritmicke popsanou dále v textu jsme získali další informace základního charakteru o povaze a informačním obsahu obrazových dat. Algoritmicke má tedy pro nás nejen technický, ale hlavně vědecký význam.

Limitujícím faktorem vývoje navržených algoritmicke je výpočetní rychlost a kapacita daná výpočtem pixel po pixelu. Analytická zpracování obrazu uvedená dále vyžadují paralelizaci výpočtu. Softwarové nástroje jsou dále postupně vyvíjeny. Některé algoritmicke budou postupně implementovány jako součást řídicího softwaru digitální kamery s cílem zpracování obrazu urychlit.

Některé softwarové nástroje jsou obecně použitelné v jakýchkoliv mikroskopických technikách využívajících elektromagnetické záření a obecněji v jakékoli oblasti, kde je nezbytná objektivní analýza primárního signálu z digitální kamery.

---

### 4.3.1 Kalibrace optické dráhy

Analýza obrazu a její algoritmizace vyžadují co nejlepší kvalitu obrazových výstupů danou technickým řešením mikroskopu popsáním v předchozí kapitole 4.1. (Ne)homogenity obrazu se při daném uspořádání optiky mikroskopu ještě více projevují při mikroskopii vzorků nenulové tloušťky. Nejlepším takovým obrazovým výstupem je radiometricky korigovaná sada snímků s vysokým časovým a prostorovým rozlišením a bitovou hloubkou  $>8 \text{ bit} \cdot \text{px}^{-1}$ . Metodu lze charakterizovat jako simultánní radiometrickou kalibraci optické dráhy a digitální kamery s následnou korekcí nehomogenit v obraze přepočtem intenzity každého pixelu pomocí jeho individuální kalibrační křivky. Touto metodou získáme nejpřirozenější, nezkraslený obraz bez vad, jako jsou všechny typy vinětače (optická, mechanická, přirozená, pixelová) nebo například přítomnost prachových zrn v optickém systému. Kalibrační soubory (kalibrační křivky pro všechny pixely obrazu) je nutné změřit a spočítat pro každé technické nastavení mikroskopu (např. objektív, kameru nebo intenzitu světla) zvlášť.

Pokud takovýto fyzikálně-chemický (spektrální) přístup použijeme pro kalibraci primárního signálu kamerového pixelu, je obrazová analýza zjednodušena, protože je umožněna bez jakékoli sekundární počítačové korekce (kompenzace) barevných zkraslení obrazu. Analýzou histogramů makroskopického obrazu bylo zjištěno, že zatímco nekorigované histogramy odrážejí především aberace optické dráhy, korigované odrážejí skutečné rozdíly intenzit v reálné scéně. Histogram kalibrovaného obrazu je strukturovanější, obsahuje více píků, které jednotlivě odpovídají jednotlivým objektům v obraze.

Radiometrická kalibrace zvýší výkon každého běžného mikroskopu. Jejím výstupem je informace o celkových světelných energiích dopadajících na každý pixel senzoru kamery. To je navíc vhodné pro vzájemné porovnání kamerových systémů.

Prvním řešením radiometrické kalibrace bylo poloautomatické řešení VerCa. Výrazného zjednodušení kalibračního procesu došlo jeho plnou automatizací pomocí modulu v softwaru SuperScope/CAMEX.

**VerCa** VerCa je softwarový nástroj pro kalibraci souborů nezpracovaných obrazových dat pracující přes příkazový řádek Windows cmd. Samotná metoda je popsána v [39] a rozšířena o kvazispektrální analýzu v [34]. Metoda VerCa je založena na korelaci spekter světelné propustnosti sady filtrů s jejich snímky z kamery. Algoritmus vyžaduje na vstupu znalost spekter filtrů kamery a spektra zdroje světla.

Vstupem pro výpočet kalibračních křivek (intenzita pixelů vs. integrál fotonů dopadajících na kameru) je při transmisním zobrazování sada kalibračních surových obrazových dat spolu s korelovanými spektry světelné propustnosti pro sadu filtrů různých úrovní šedi o tloušťce několik nm. Při reflexním zobrazování bude optická dráha kalibrována bílým standardem difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon®. Při fluorescenčním zobrazování předpokládáme použití koncentračních řad roztoků emitujících světlo.

**Automatický kalibrační algoritmus** Plně automatizovaná metoda kalibrace, implementovaná do řídicího software SuperScope/CAMEX, využívá změny délky expozice kamery. Při kalibraci zobrazení v procházejícím světle neobsahuje optická dráha žádný kalibrační prvek, při kalibraci zobrazení v odraženém světle je na mikroskopický stolek umístěn bílý standard difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon®.

**Datové formáty HDF5** Řídicí softwary SuperScope a CAMEX pracují se standardními obrazovými formáty a formátem \*.mat. Specifickými, na zakázku vytvořenými datovými formáty [43] jsou obrazový formát H5I (zkr. **Hdf5 Image**) a formát kalibračních souborů HCLB (zkr. **Hdf5 CaLiBration**). Tyto formáty jsou založené na knihovně HDF5 [44], podporované softwary CAMEX a SuperScope a vhodné pro práci s daty ze SuperScopu a FutureScopu (např. výpočty kalibrací optických drah a korekcí snímků).

---

Jedná se o formáty

1. nekomprimované, ale
2. rychlé při zápisu i čtení,
3. umožňující načtení pouze části obrázku; velký obrázek lze nativně načíst po částech (bez předchozího nahrání celého obrázku do paměti),
4. nahrání metadat samostatně a
5. rozšíření o další informace při zachování kompatibility.

Formát H5I

1. může být rozšířen o další atributy snímku a metadata (údaje o snímku a jeho zpracování, např. o kalibraci, poloze podél optické dráhy a intenzitě osvětlení), která je třeba uložit do souboru,
2. ukládá histogram a náhled obrázku, které lze načíst samostatně, aniž by bylo nutné načítat celý soubor. To je například vhodné pro rychlé určení bitové hloubky obrazu v datových souborech (pokud není známa) v softwaru IIEP (kap. 4.3.2) nebo LIL (kap. 4.3.7).

Formát HCLB obsahuje

1. metadata s informacemi o podmínkách kalibrace (např. o použité kameře, optice, osvětlení a rozsahu expozic),
2. obrazová data a metadata jednotlivých kalibračních snímků,
3. spektrum kamery a spektrum osvětlení, dále vypočtené integrály pro vlastní kalibraci a
4. informace o vadných pixelech.

### 4.3.2 Informační přínos jednotlivých pixelů

Nejobecnější možný předpoklad o obrázku, a to bez ohledu na jeho původ, je, že je multifraktální. Ve správně kalibrovaném snímku (kap. 4.3.1) je multifraktalita způsobena kombinací tří fyzikálních procesů během vytváření obrazu:

1. interakcí světla se vzorkem,
2. při průchodu světla mikroskopem a
3. diskretizací získaného signálu na čipu kamery.

Zejména diskretizace signálu na kamerovém čipu má zásadní vliv na novou teoretickou interpretaci mikroskopického obrazu.

Za účelem nového popisu mikroskopického digitálního obrazu jsme vyvinuli principiálně novou informační analýzu, jak zkoumat informaci nesenou obrazovým bodem (pixelem) v multifraktálním datovém souboru. Výpočet používá jednoparametrovou Rényiho entropii s parametrem  $\alpha$  pro danou pravděpodobnostní distribuci  $P$

$$\mathcal{H}_\alpha(P) = \frac{1}{1-\alpha} \ln \left( \sum_{j=1}^k (p_j)^\alpha \right) \quad (1)$$

nebo Shannonovu entropii (analogii Gibbsovy-Boltzmannovy fyzikální entropie) při hodnotě parametru rovné 1

$$\mathcal{S} = \mathcal{H}_1(P) = \sum_{j=1}^k p_j \ln(p_j), \quad (2)$$

kde  $p_j$  je pravděpodobnost výskytu  $j$ -tého jevu (intenzity) v systému (obrazu).

Veličina *informační příspěvek bodu* (PIG, z angl. Point Information Gain) [27, 28, 45] je definována jako změna informace odstraněním pixelu určité intenzity z obrazu a charakterizuje statický obraz:

$$\Gamma_{\alpha}^{(i)} \equiv \Gamma_{\alpha}^{(i)}(P) = \mathcal{H}_{\alpha}(P^{(i)}) - \mathcal{H}_{\alpha}(P). \quad (3)$$

Podobně je definována veličina *divergentní příspěvek bodu* (PDG, z angl. Point Divergence Gain) [29] charakterizující dynamický obraz, a to jako změna informace při záměně pixelu na stejné pozici ve dvou po sobě jdoucích snímcích:

$$\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)} \equiv \Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}(P) = \mathcal{H}_{\alpha}(P^{(l \rightarrow m)}) - \mathcal{H}_{\alpha}(P), \quad (4)$$

V rovnicích (3)–(4) jsou

- $\mathcal{H}_{\alpha}(P)$  Rényiho entropie počítaná z pravděpodobnostního histogramu  $P$  původního obrazu,
- $\mathcal{H}_{\alpha}(P^{(i)})$  Rényiho entropie počítaná z pravděpodobnostního histogramu  $P^{(i)}$  stejného obrazu bez pixelu intenzity  $i$  a
- $\mathcal{H}_{\alpha}(P^{(l \rightarrow m)})$  Rényiho entropie počítaná z pravděpodobnostního histogramu  $P^{(l \rightarrow m)}$ , kdy pixel intenzity  $l$  původního obrazu byl zaměněn za pixel intenzity  $m$  následujícího obrazu.

Tímto informačním přístupem lze zkoumat seskupení pixelů na základě různých Rényiho koeficientů  $\alpha$  odrážejících multifraktalitu obrazu. Obě veličiny spojují podobné intenzity obrazu do shluků, čímž segmentují obraz na jednotlivé části se stejnými příznaky. Nalezená pravidla seskupování nám umožnila vyvinout algoritmy, které automaticky seskupují objekty v mikroskopickém obrazu. Nízké hodnoty  $\alpha$  umožňují extrahovat vzácné jevy z celkového rozdělení, zatímco vysoké  $\alpha$  dávají jednu hodnotu  $\Gamma_{\alpha}^{(i)}$  či  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  pro jevy podobných hodnot. Při  $\alpha \rightarrow \infty$  dokonce dosáhneme oddělení málo informativního pozadí od zbytku obrázku.

Výpočet  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  je zobecněním jednoduchého odečtení dvou po sobě jdoucích kalibrovaných (kap. 4.3.1) snímků v sérii posunutých podél optické dráhy mikroskopu (podle typu vzorku) o „malý“ krok a umožňuje lokalizovat 3D elektromagnetické centroidy (kap. 3). Aproximace výpočtu  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  prostým odečítáním může zpracování obrazu dále podstatně urychlit.

Z proměnných  $\Gamma_{\alpha}^{(i)}$  a  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  lze vyjádřit aditivní veličiny

- *entropie informačního příspěvku bodu*  $H_{\alpha}$  (PIE; z angl. Point Information Gain Entropy) jako součet všech hodnot  $\Gamma_{\alpha}^{(i)}$  v obraze,
- *hustota entropie informačního příspěvku bodu*  $\Xi_{\alpha}$  (PIED; z angl. Point Information Gain Entropy Density), kdy každá hodnota  $\Gamma_{\alpha}^{(i)}$  vyskytující se v obraze je přičtena pouze jednou,
- *entropie divergentního příspěvku bodu*  $I_{\alpha}$  (PDGE; z angl. Point Divergence Gain Entropy) jako součet všech absolutních hodnot  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  v obraze a
- *hustota entropie divergentního příspěvku bodu*  $P_{\alpha}$  (PDGED; z angl. Point Divergence Gain Entropy Density), kdy každá hodnota  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  vyskytující se v obraze je přičtena pouze jednou.

Spektra aditivních veličin (tj. entropie a hustoty entropie) nám umožňují jednoznačně reprezentovat obraz. Tato specifikace obrazu je užitečná pro statistické shlukování (klastrování) samotných snímků [28, 29]. Metoda výpočtu informačně-entropických veličin a relevantní klastrování snímků byly ověřovány na datových sadách chemických experimentů a matematických simulací modelového multifraktálního

---

systemu samoorganizující se Bělousovy-Žabotinského reakce v pracích [1,3,28] (simulace popsány v [4,5]).

Problémem mikroskopických snímků získaných digitálním fotoaparátem nebo kamerou je, že většina z nich vykazuje na objekt příliš málo pixelů, protože obecnou filozofií prodejců mikroskopů je dodávat k mikroskopům digitální kamery a zvětšení, kde výsledná velikost objektu promítaného na jeden pixel odpovídá Abbeho rozlišení, a tudíž velikosti větší než  $300 \times 300 \text{ nm}^2$ . I kdybychom plně přijali pravdivost Abbeho difrakčního limitu, přesto k nalezení maxima Airyho disku potřebujeme podle vzorovacího teorému (např. [46]) ke správné definici teoretické odezvy pozorovaného objektu bodů více. Velikost kamerového pixelu zvětšeného objektivem musí být tudíž menší než  $100 \times 100 \text{ nm}^2$ . Rozumných výsledků automatizované obrazové analýzy při detekci objemové odezvy pozorovaného objektu pomocí výpočtu  $\Omega_\alpha^{(l \rightarrow m)} = 0$  – nikoli však superrozlišení – lze ovšem dosáhnout i v nedostatečně navzorovaných souborech dat [31]. Množství informace ztracené nedostatečnou digitalizací signálu závisí na povaze vzorku (na jeho multifraktalitě a fyzikálně-chemických vlastnostech).

Obrazová analýza digitálních mikroskopických snímků metodou *informačního a divergentního příspěvku bodu* nám umožnila pochopit jejich strukturu a nově definovat pojmy *3D elektromagnetický centroid* a redefinovat pojmy *ohnisková rovina* a *ohnisková hloubka* [26]. To nám usnadnilo interpretaci jevů pozorovaných mikroskopem:

1. **Nalezení elementárních bodů objektu v ohnisku:** Metoda umožňuje najít zaostřené body (3D elektromagnetické centroidy) v z-skenu snímků prakticky z jakékoliv neskenovací světelné mikroskopie, ať již v jasném poli, tmavém poli, odraženém záření nebo fluorescenci, stejně jako u většiny ostatních typů mikroskopie využívajících elektromagnetické záření, jako je elektronová mikroskopie. Z nalezených ohniskových bodů lze vyhlazovacím interpolačním algoritmem [47] obraz rekonstruovat.
2. **(Semi)objektivní stanovení ohniskové hloubky:** Obraz řezu zaostřeného nebodového objektu (vzorku) je intenzitně nejstrukturovanější. Nalezení ohniskové roviny a ohniskové hloubky lze provést charakterizací každého jednotlivého obrázku v sérii jednou nebo více aditivními informačními veličinami nebo sadou hodnot (spektrum) veličin závislých na parametru  $\alpha$ . Tato charakterizace snímků je následována shlukovou analýzou hodnot veličin nebo vektorů spekter. Volba vhodné aditivní veličiny je do jisté míry závislá na typu pozorovaného objektu, rozsahu zkreslení rozptylovou funkcí, a tedy struktuře mikroskopických snímků. Zjištění rozsahu obrazové série s detekovanými 3D elektromagnetickými centroidy je stále do určité míry závislé na subjektivní analýze křivky *aditivní informační veličina vs. z-poloha* a na paralelních měřeních pomocí AFM. Pevnější základ pro objektivní zjištění všech nejtmašších/nejjasnějších odezev detekovatelných objektů v ohnisku, které způsobují difrakci, fluorescenci nebo odraz poskytla opět kalibrace obrazu (kap. 4.3.1) předcházející samotné analýze obrazové informace. Vzhledem k vyšší citlivosti upřednostňujeme k detekci vysoce strukturované ohniskové roviny v kalibrovaných snímcích klastrování  $\alpha$ -závislých spekter  $H_\alpha$  a  $P_\alpha$  před  $\Xi_\alpha$  a  $I_\alpha$ . Naše výpočetní experimenty ukázaly, že u správně naměřených dat je možné shlukovou analýzou získat stabilní řešení počtu jednoznačně určených skupin snímků.
3. **Měření dynamiky:** Pro měření v dynamických systémech lze k vyjádření časoprostorové změny využít veličinu *divergentní příspěvek bodu*  $\Omega_\alpha^{(l \rightarrow m)}$  a její entropii a hustotu entropie. Pokud se objekt v čase a prostoru nezmění, potom platí, že  $\Omega_\alpha^{(l \rightarrow m)} = 0$ . Naopak pro nejpohyblivější a časově nestálé objekty platí, že  $|\Omega_\alpha^{(l \rightarrow m)}| = \max(\Omega_\alpha)$ , kde  $\Omega_\alpha$  je množina všech hodnot  $\Omega_\alpha^{(l \rightarrow m)}$  v obraze.
4. **Kolokalizace ohniskových rovin:** Kolokalizace dvou až tří barevných obrazových kanálů snímků ze světelné mikroskopického z-skenu, ať již v jasném poli, fluorescenci nebo tmavém poli, je dů-

---

ležitým procesem pro správnou interpretaci mikroskopického pozorování. Opět je možné pro tyto účely použít výpočet  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  pro každý barevný kanál. Po odstranění pozadí odpovídající hodnotám  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)} = 0$  pro  $\alpha \geq 50 \approx \infty$  je možné najít pro každý kanál rozsah a ohniskovou rovinu jako minimum hodnoty aditivní veličiny  $\Omega_2^{(l \rightarrow m)}$  nebo maximum aditivní veličiny  $\Gamma_2$  podél z-skenu. Pokud data vyžadují další statistickou korekci, např. potlačení obrazového šumu, je možné dané veličiny počítat pro  $\alpha > 2$ . Pozice ohniskových rovin a rozsahů tak mohou být následně srovnány, čímž se koriguje achromatická aberace optické soustavy mikroskopu.

**Image Info Extractor Professional (IIEP)** IIEP v. 2.0.39 [27, 29] je softwarový nástroj sloužící k výpočtu informačně-entropických veličin *informační/divergentní příspěvek bodu (PI/DG)* a souvisejících entropií a hustot entropií z primárních videosignálů, a to barevných (RGB) i šedotónových. Software pracuje se všemi vstupními formáty obrázků: png, tif, tiff, jpg a jpeg. Všechny veličiny mohou být počítány

1. z histogramu intenzit celého snímku (globální metoda *Whole*) nebo
2. z histogramu intenzit pouze části snímku: z kříže (metoda *Cross*), obdélníku (metoda *Rectangle*) a elipsy (metoda *Ellipse*).

Software je vybaven dalšími funkcemi pro potlačení vad pozadí a obrazu během výpočtu:

- ignorování černého pozadí,
- odstranění černých kalibračních sloupců a řádků v obraze a
- odstranění vadných pixelů.

Každý barevný filtr Bayerovy masky se počítá zvlášť. Dva zelené pixely čtveřice Bayerovy masky lze uvažovat samostatně nebo zprůměrovat.

Výstupní PIG nebo PDG lze uložit jako

- obrázek RGB, přičemž pozitivní a negativní PDG jednoho obrázku jsou uloženy odděleně bez znaménka jako dva 8bitové snímky.
- matici *\*.mat* (MATLAB): primární výstup ve formátu s pohyblivou řádovou čárkou s dvojnásobnou přesností.

Výsledky pro každý barevný kanál obrazu lze uložit

- samostatně (kdy má každý barevný kanál čtvrtinový počet pixelů než původní primární obraz; zelený kanál je průměrovaný ze dvou pixelů Bayerovy masky) nebo
- ve formátu primárních obrazových dat (kdy jsou barevné kanály rozloženy jako vstupní Bayerova maska; pixely pro zelený filtr se neprůměrují).

Výstupní hodnoty entropií a hustot entropií se uloží do vektoru ve formátu *\*.mat*.

Pro spuštění IIEP je nezbytná grafická karta NVIDIA, jejíž požadavky závisí na velikosti obrazu. Pokud je NVIDIA k dispozici, používá se GPU pouze k výpočtu hodnot *Cross*. Hodnoty z celého obrazu *Whole* se počítají pouze na CPU.

### 4.3.3 Kvazispektrální analýza

Rekonstrukce transmisních, reflektančních nebo fluorescenčních (kvazi)spekter z digitálního mikroskopického RGB signálu [34] je založena na předpokladu plynulosti změny světelného spektra v prostoru, dokud není detekována hrana jako náhlá změna barvy. Výpočet kvazispekter dále zahrnuje výstupy radiometrické kalibrace (kap. 4.3.1). Tím jsou definovány oblasti identických spekter. V těchto oblastech určujeme spektra, která se počítají ze spektra světelného zdroje, spekter filtrů pixelů kamerových čipů a prostorového rozložení signálů. Jinými slovy, určujeme přenosové kvazispektrum pozorovaného objektu (např. orgány v cytoplazmě).

Podmínkou samotného měření je, aby se provádělo barevnou kamerou vybavenou Bayerovou maskou, kde se spektra jednotlivých filtrů čtveřice Bayerovy masky navzájem překrývají.

Vstupem algoritmu jsou

1. snímky bílého standardu difuzní odrazivosti (99 %) Spectralonu<sup>®</sup> v odraženém záření při různých expozičních kamery nebo procházející světlo tlumené buď sadou filtrů, nebo snímané při měnící se expoziční kamery,
2. spektra kamerových filtrů (R, G, G, B) a
3. spektrum zdroje záření.

Pro každou čtveřici pixelů Bayerovy masky se z kalibračních snímků vytvoří čtyři kalibrační křivky závislosti skutečně naměřených hodnot elektrické odezvy prvku kamerového senzoru (tj. intenzity obrazu) na naměřeném a vypočteném celkovém spektrálním zářivém toku  $Q_c$ :

$$Q_c = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} S(\lambda) \cdot F_c(\lambda) \cdot d\lambda, \quad (5)$$

kde  $S(\lambda)$  je světelné spektrum zdroje záření a  $F_c(\lambda)$  je spektrum (kvantová účinnost) kamerového filtru.

Dobu expozice  $t_e$  prodlužujeme a předpokládáme, že závislost světelného toku na čase je lineární, tj. profil světelného záření je v čase neměnný. Tím získáme kalibrační závislosti.

Naměřené hodnoty intenzit v obraze jsou snižené spektrálně závislou absorpcí světelného záření vzorkem. To vyjádříme pro každý pixel barevné kamery rozšířením integrálu (5):

$$I_c = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} t_e \cdot S(\lambda) \cdot F_c(\lambda) \cdot T(x, y, \lambda) \cdot d\lambda, \quad (6)$$

kde  $I_c$  je celkový spektrální zářivý tok po interakci světla se vzorkem a  $T(x, y, \lambda)$  je neznámé spektrum vzorku v bodě  $x, y$ .

Z předchozí rovnice (6) získáme pro každý pixel barevného obrazu a expozici čtyři rovnice s neznámou  $T(x, y, \lambda)$  odpovídající transmitančnímu, reflektančnímu, nebo fluorescenčnímu spektru vzorku, u něhož předpokládáme, že je pro všechny čtyři barevné kanály stejné. Existuje pouze omezené množství spekter vzorku, která najednou vyhovují řešení těchto čtyř rovnic. Optimalizací získáme iterativně první odhad spektra.

Abychom našli spektrum pro každý pixel, musíme vnést do výpočtu další předpoklad: přidáme informaci o okolí bodu. Předpokládáme, že uvnitř homogenního objektu je spektrum stejné, na rozhraní objektu se skokově mění. Detaily implementace jsou popsány rovnicemi (1)–(5) v [34].

Výstupem algoritmu je transmitanční, reflektanční, nebo fluorescenční spektrum o 32 (kvazi)spektrálních čarách. Správnost výstupu algoritmu pro výpočet (kvazi)spekter byla ověřována měřením transmitančních spekter barviv standardu IAM-9-C, která jsou deklarována Národním institutem pro standardy

---

a technologie USA (NIST). Správnost výstupu závisela na kvalitě barviva. Mikroskopicky homogennější barvy (např. C1, C2, C3) vykazovaly rozumné výsledky, kdy tvar spektra odpovídal standardu, intenzita však nikoliv. V současné době pracujeme na výběru, případně vývoji vhodné barevné reference a vylepšujeme algoritmus, aby jeho výstupy byly relevantnější.

Znalost kvazispekter lze využít k/ke

1. interpolaci obrazu v 32rozměrném prostoru, přičemž interpolované hodnoty jsou v technickém smyslu správnější než původní hodnoty počítané pro čtveřici pixelů kamerového senzoru, protože interpolace ve vysokorozměrném spektrálním prostoru kompenzuje geometrická omezení způsobená konstrukcí snímače kamery.
2. klastrování oblastí obrazu podle spekter a nikoliv podle intenzit.
3. vizualizaci, která je obráceným postupem analýzy, kdy se při znalosti spektra zpětně řeší rovnice (6). Vizualizaci je tak možné provádět pro různé světelné zdroje i pro jednotlivé vlnové délky.
4. vizualizaci podle jednotlivých spektrálních klastrů, a tedy fyzikálně chemických vlastností v daném místě objektu.

Výpočet (kvazi)spekter je implementován v softwaru QSP [48].

Kvazispektrální rekonstrukce primárních obrazových dat je v současné době rozšiřována do 3D prostoru tak, aby se mohla aplikovat na sadu mikroskopického z-skenu. Tato metoda by měla zajistit rozpoznání kvazi(bio)chemického složení mikroskopicky pozorovaných objektů neinvazivně a pravděpodobně lépe, než může poskytnout například fluorescenční značení. Rizikovou částí této metody je nedostupnost srovnávací metody především pro rozpoznání vnitrobuněčných objektů v případě živých buněk, protože například fluorescenční (imuno)markery výrazně mění spektrální, tvarové a pohybové charakteristiky organel.

#### 4.3.4 Profilometrie

Zobrazení objektů metrologickými telecentrickými objektivy [35, 36] postrádá perspektivu. V trojrozměrném zobrazení zkresleném rozptylovou funkcí nelze tudíž ohnisko najít jako pozici nejmenšího zobrazení objektu. Například zobrazení bodového objektu zkreslené rozptylovou funkcí nemá hyperboloidní charakter, ale spíše válcovitý. Ohniskovou rovinu bodového objektu je možné najít pouze nalezením intenzitního maxima/minima v trojrozměrném zobrazení objektu.

Algoritmus profilometrické vizualizace objektu v režimu světelného odrazu je právě založen na nalezení intenzitního extrému pro každý pixel zobrazení objektu v z-skenu elektromagnetického pole. Ve výsledném profilometrickém snímku je toto intenzitní maximum pro každý pixel zaznamenáno intenzitou odpovídající pozici hladiny (snímku) v z-skenu. Tím se získá výškový profil pozorovaného mikroskopického objektu.

#### 4.3.5 Segmentace mikroskopického obrazu buněk a organel

**Segmentace savčích buněk** Vhodná metoda segmentace může urychlit a zpřesnit výstupy fyzikálně-chemických měření uvnitř živé buňky. Segmentace neznačených savčích buněk z transmisní i reflexní mikroskopie je úkol relativně obtížný vzhledem k málo viditelným hranicím buněk v jejich obraze.

Analýzy jedné savčí buňky byly prováděny na z-skenech i časosběrných sériích z mikroskopu NanoScope 2011. Při trojrozměrné analýze jedné buňky byla buňka v první práci ze série (8-bitové po konverzi LIL 4.3.7) vyřiznutá ve skriptu MATLAB® ručním označením hranic buňky [40]. Později byla

---

segmentace zobrazení buněk objektivizována tvorbou kumulativní masky z odečtených tmavých intenzit v zelených kanálech po sobě jdoucích obrázků [28, 30].

Detailní buňky z časosběrných sérií byly segmentovány automaticky vytvořením kumulativní masky z odečtených po sobě jdoucích rozostřených obrázků [32] nebo ručně označenou elastickou maskou kopírující obrysy buňky v průběhu série [37].

Pro sérii z mikroskopu z velkého čipu FutureScope 2021, v nichž je možné zachytit stovky tkáňových buněk v jednom snímku, byly odvozeny dva efektivní algoritmy na bázi biologicky zaměřené konvoluční neuronové sítě (CNN, z angl. Convolutional Neural Network) U-Net. Algoritmy byly navrženy pro snímky běžné buněčné linie HeLa. Pro snímky v procházejícím světle byla vybrána hybridní síť Residual Attention U-Net [35], zatímco snímky v odraženém světle byly zpracovány hybridní metodou ResNet34-U-Net s kategoričnou segmentací schopnou rozlišit fyziologický stav buňky [36].

Nicméně jsme ověřili, že kalibrované datové sady získané na mikroskopu FutureScope 2021 v procházejícím i odraženém světle jsou natolik kontrastní, že detekce hranic jednotlivých objektů je možné v dostatečné kvalitě dosáhnout i bezmodelově, a to za použití jednoduchých intenzitně prahovacích metod (např. [49]) následovaných standardními morfologickými operacemi na binárním obrazu (např. [50]).

**Segmentace organel savčích buněk** První organely byly segmentovány ze z-skenu primárních dat pořízeném v procházejícím světle na videozesíleném mikroskopu NanoScope 2011 a následně komprimovaném na 8bitovou sérii algoritmem LIL [40]. K segmentaci byl použit výpočet  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  (kap. 4.3.2) a nalezení stabilních, nepohyblivých objektů odpovídajících hodnotám  $\Omega_4^{(l \rightarrow m)} = 0$ . Konverze datové série na  $8 \text{ bit} \cdot \text{px}^{-1}$  algoritmem LIL (kap. 4.3.7) totiž sloučila intenzitní hladiny ve snímcích natolik, že nedošlo k detekci jednotlivých elementárních objektů (3D elektromagnetických centroidů), ale byly separovány pouze jednotlivé zobrazení organel zkršené rozptylovou funkcí optické soustavy mikroskopu.

Samotné organely v průběhu jejich 3D mikroskopického zobrazení byly následně detekovány a segmentovány bezmodelovým přístupem [51–54]. V případě difrakce se jednalo o nalezení nejtmavší intenzitní obrazové izokontury zeleného kanálu. U analýzy autofluorescence jsme hledali nejsvětlejší izokonturu modrého či zeleného kanálu, které jsou společné pro všechny snímky v z-skenu. Výsledné zobrazení koreluje s předpokládanou velikostí a tvarem savčí organely (elipsoidní tvar, výška 2,8–5,6  $\mu\text{m}$  [55]) a měřením AFM. Použitím telecentrického objektivu je dále možné snížit množství interferenčních prstenců kolem pozorovaného objektu.

Při uchování původního primárního signálu o bitové hloubce  $12 \text{ bit} \cdot \text{px}^{-1}$  je již možné výpočtem  $\Omega_{\alpha}^{(l \rightarrow m)}$  přímo detekovat intenzity v obraze, které odpovídají pozorované organely [40].

Detekce a následná segmentace organel za účelem měření jejich trajektorií z časosběrného snímání v procházejícím světle na NanoScope 2011 [40] byla po LIL konverzi provedena výpočtem a nalezením hodnot obrazových intenzit odpovídajících  $\Gamma_4^{(l)} = 0$ .

### 4.3.6 Měření vnitrobuněčné dynamiky

Kvantitativní analýza jedné buňky je výchozím krokem k pochopení komplexních stochastických procesů buněčné signalizace a stavu a dalšího osudu celé buněčné populace, která je ve své podstatě morfologicky i fyziologicky heterogenní. Klíčovou otázkou je, jak buňky přesně přenášejí informaci, pokud čelí přirozenému či „vnesenému“ šumu a změnám v molekulárních procesech [56]. Měření vnitrobuněčné dynamiky lze potenciálně studovat například účinky toxických látek na buňky a získané poznatky použít k výběru vhodné buněčné populace jako biosenzoru cytotoxických látek [57, 58].

---

Požadavkem pro rychlý a spolehlivý výpočet a přesnost výsledků měření vnitrobuněčné dynamiky je, stejně jako v případě 3D zobrazení, vhodná časo-prostorová diskretizace (definovaná velikostí rastru obrazu a počtem snímků za časovou jednotku) a kvalita zobrazení zpracovávaných snímků (daná bitovou hloubkou primárních dat a jejich kontrastem). Pro počet pixelů v obrazu je nutné nalézt kompromis:

1. Při nízkém počtu pixelů v obrazu dochází zejména ke ztrátě detailů pozorovaných objektů, zatímco při vyšším počtu pixelů nastává posun v obraze přes více pixelů, což je nutné zohlednit při výpočtu.
2. Při nízké frekvenci snímání může nastat problém s lokalizací posunu pozorovaného objektu. Naopak příliš vysoká frekvence snímání může vést k zahlcení úložné či výpočetní kapacity zařízení.
3. Pro bitovou hloubku obrazu platí obdobná tvrzení. Nízká bitová hloubka může vést ke ztrátě detailů v obrazech, naopak při vysoké bitové hloubce nastává problém s ukládáním a zpracováním dat.

Pro vyhodnocení vnitrobuněčné dynamiky buňky z primárních snímků světelné mikroskopie v jasném poli (v těchto případech byl použit mikroskop NanoScope 2011) jsme navrhli dva fyzikálně podložené způsoby: přímé měření trajektorií organel [32] a měření celkového toku vnitrobuněčné hmoty [37].

Zlepšení výstupů měření je opět možné předchozí radiometrickou ([37], kap. 4.3.1) a, v případě mikroskopie na velkém čipu, také geometrickou kalibrací optické dráhy mikroskopu.

**Měření trajektorií** Algoritmus uvedený v [32] je založený na trasování těžiště zobrazení velkých silně světlolomných organel. Organely byly v sérii snímků buňky detekovány jako hodnoty  $\Gamma_4^{(i)} = 0$  v zeleném obrazovém kanálu. Takto byla datová série převedena na binární obraz. Trasování organel bylo usnadněno zpracováním vysokofrekvenčních dat, kdy binární zobrazení každé jednotlivé organely v následujícím snímku překrývalo její zobrazení v předchozím snímku série. Trajektorie pohybu každé organely byla přepočítána na rychlost pohybu a její horizontální a vertikální složku. Tyto hodnoty vektorů byly vyjádřeny jak v daném časovém okamžiku, tak jako hodnoty kumulativní, a to pro jednotlivé organely i celou buňku.

Tento algoritmus je v současnosti omezen na tvorbu trajektorie každé jednotlivé organely do té doby, dokud se její zobrazení překrývají v po sobě jdoucích snímcích.

**Stanovení lokální kvaziviskozity a kvazidifuze** Algoritmus popsáný v [37] je ve srovnání s algoritmem uvedeným v kap. 4.3.6 obecnější a komplexněji popisuje vnitrobuněčnou dynamiku. Umožňuje odhadnout mikroeologické a mikrofluidní parametry vnitrobuněčného toku hmoty. Výpočet toků hmoty je zjednodušen přepočtem primárního signálu Bayerovy masky kamery světelného mikroskopu na jednokanálový, šedotónový snímek.

Prvním krokem je detekce částic a jejich trasování v sekvenci snímků. Jako nejvhodnější metoda se pro tento účel prokázala metoda SURF (z angl. Speeded-Up Robust Features). Pomocí simulace náhodné procházky a výpočtu relativní chyby rychlosti jsou trajektorie částic odděleny na ty vykazující přímý pohyb od těch mající pohyb Brownův náhodný. Z přímého pohybu částic je rekonstruováno rychlostní pole toku hmoty a vypočítána mapa vnitrobuněčné (kvazi)viskozity. Z náhodného pohybu je vyjádřena mapa vnitrobuněčné (kvazi)difuze.

Současným problémem uvedeného algoritmu je, že poskytuje pouze koncový stav, nikoliv však celý dynamický časový vývoj (kvazi)viskozity a (kvazi)difuze v rámci obrazové sekvence.

---

### 4.3.7 Vizualizace metodou nejmenší informační ztráty

Datasey většiny digitálních kamer jsou poškozeny kompresí z 12/16/24 na  $8 \text{ bit} \cdot \text{px}^{-1}$ , kdy každý snímek série je komprimován jednotlivě a nezávisle na celé sérii. Důvodem je, že konverzní programy jsou navrženy tak, aby vytvářely co nejlépe vypadající snímky scénérií. To se dosahuje systematickým ignorováním detailů a vybraných intenzitních hladin v obraze. Takové datasey jsou potom pro vědeckou a technickou inspekci nepoužitelné. Správným přístupem k bitové kompresi je systematicky analyzovat celou původní datovou sadu počítačově a algoritmizovat většinu analytických kroků, zejména pokud se zabýváme datovými sadami o velikosti alespoň 100 GB. Vizualní kontrola je však v tomto případě stále nejstandardnějším a nejnevyhnutelnějším přístupem. Z tohoto důvodu jsme navrhli

1. 8bitový formát LIL (Least Information Loss) [39, 59], který zachovává maximum informace díky plně přeškálovanému primárnímu signálu obrazových intenzit v celé sérii snímků za podmínky vynechání těch intenzitních hladin, které nejsou obsazeny v celé datové sadě a
2. software Image Explorer [60] pro vizuální inspekci a intenzitní prahování  $>8$ -bitové datové sady.

**Konvertor LIL** Konvertor LIL (Least Information Loss) [39, 59] slouží k vizualizaci a porovnávání  $>8$ bitových (zejména 12bitových) primárních digitálních signálů získaných interakcí fotonů s maskou Bayerovy kamery.

Softwarový algoritmus ukládá maximum informace v jednotlivých snímcích časosběrné řady. Algoritmus sesbírá všechny hodnoty intenzit nalezené ve vícebitových sériích snímků, odstraní prázdné hladiny intenzit a přepočítá tento spojitý intenzitní histogram na bitovou hloubku  $8 \text{ bit} \cdot \text{px}^{-1}$ . Nová 8bitová série snímků tedy obsahuje nejméně sloučených intenzitních hladin z původní vícebitové série a v celé sérii zachovává kontinuitu intenzit.

Software umožňuje

1. pracovat s šedotónovými i RGB sériemi obrázků,
2. vybrat typ normalizace histogramu intenzity (normalizace pro každý barevný kanál zvlášť vs. normalizace společná pro všechny barevné kanály),
3. odstranit z obrázků řádky a sloupce kalibračních pixelů černé barvy (problém kamery Nanoscope 2011) a
4. odstranit vadné (pod- a přeexponované) pixely.

Nový RGB obraz je pak vytvořen neinterpolačním algoritmem, kde jsou červené a modré pixely jednotlivých čtveřic pixelů Bayerovy masky přeneseny přímo do relevantního barevného obrazového kanálu a dva zelené pixely Bayerovy masky jsou zprůměrovány. Výsledný rgb obraz má tedy čtvrtinový počet pixelů ve srovnání s původním primárním signálem raw.

**Image Explorer** Image Explorer IMEX [60] sloužil k nezkreslené a nejinformativnější 8bitové vizualizaci a intenzitnímu prahování vícerozměrných a vícebitových matic a podmatic různých datových formátů. Byl určen zejména k detailní analýze mikroskopických primárních RGB signálů, ale umožňoval pracovat i s jinými typy snímků.

Algoritmus Image Explorer byl později spojen se softwarem SuperScope do finálního softwaru CA-MEX (kap. 4.2.3).

---

## 5 VYVÍJENÉ APLIKACE METOD SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE

V této kapitole jsou představeny vybrané potenciální aplikace jednoduché světelné mikroskopie a relevantního softwaru v humánní a veterinární medicíně. Zaměřujeme se především na využití mikroskopie s velkým zorným polem. Při výběru vhodného objektivového zvětšení je obecně vždy nutné brát v úvahu účel použití, zejména typ snímaného vzorku. Případné medicínské interpretace snímků byly konzultovány s lékaři či jinými odborníky v dané oblasti.

Experimenty popsané v kapitolách 5.1–5.3 jsou pořízeny v odraženém světle na mikroskopu FutureScope 2021 se zvětšením 9,7 $\times$  s následným zpracováním kalibrovaného mikroskopického obrazu (kvazi)spektrální analýzou (kap. 4.3.3), případně profilometricky (kap. 4.3.4). Při kvazispektrální analýze je počet spektrálních klastrů ve většině případů 8192. Použita byla shluková analýza *k*-means s euklidovskou vzdáleností. Optimální stabilní počet spektrálních shluků nelze najít, protože je to výpočetně náročné. V současné době pracujeme na výběru vhodné shlukové analýzy pro zvýraznění struktur mikroskopického obrazu.

Všechny snímky v této kapitole jsou vizualizovány konverzí LIL (kap. 4.3.7). Velikost pixelu snímků se spektrálními klastry po konverzi LIL je 74 nm, velikost pixelu v barevných snímcích simulujících osvětlení LED je 25 nm. Vizualizací obrazových dat konverzí LIL bylo ve většině případů dosaženo vyvážení bílé. V některých případech (např. obr. 7) však v obraze dominuje zelená barva a barvy transformovaného primárního signálu neodpovídají realitě.

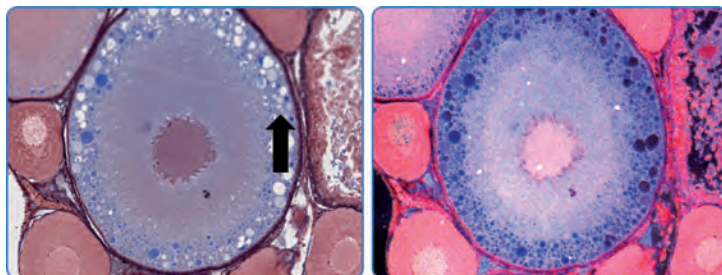
### 5.1 Histologické řezy

Světelná mikroskopie s velkým zorným polem a (kvazi)spektrální analýzou může nahradit skenery histologických mikroskopických preparátů. Takovýto způsob digitalizace histologických preparátů je na rozdíl od skenerů rychlejší, spolehlivější a reprodukovatelnější. Výhodou zpracování mikroskopického obrazu (kvazi)spektrální analýzou je zejména možnost takzvaného digitálního barvení primárně nebarvených histologických preparátů [34]. To však vyžaduje zapojení lidského experta i umělé inteligence při anotaci obrazových dat. Nevýhodou je, že barvy v mikroskopii v odraženém světle jsou ve srovnání s procházejícím světlem jiné, mohou být invertované, na což nejsou histologové standardně zvyklí. Obrazové výstupy barvených histologických preparátů z mikroskopu FutureScope 2021 slouží jako podklad pro komparaci při vývoji histologických metod analýzy nativních tkání.

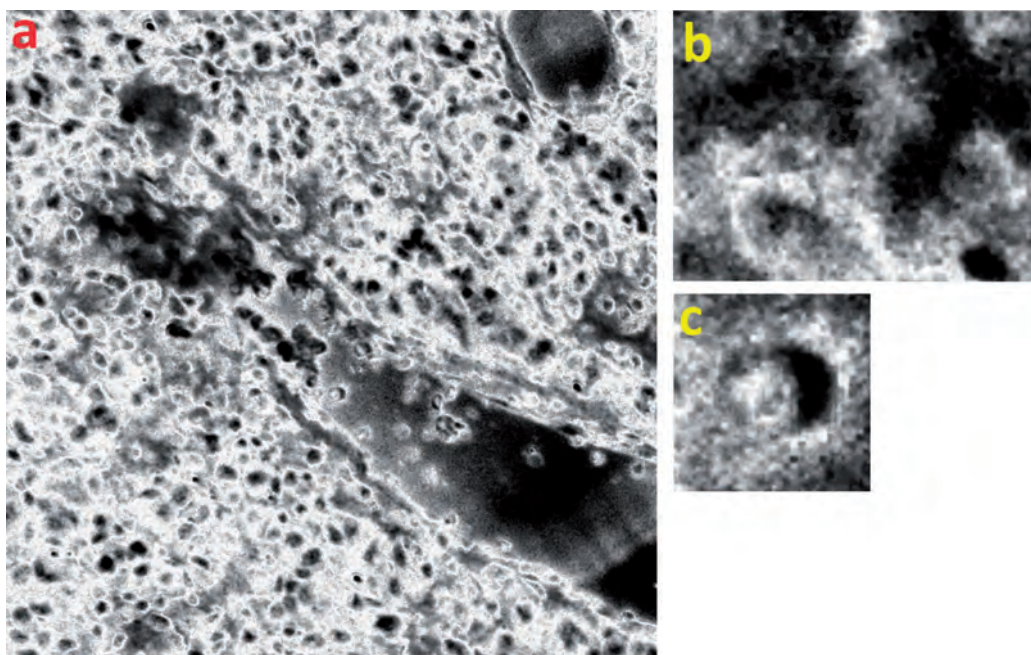
Kvalita datových výstupů barvených histologických řezů poskytnuté světelnou mikroskopii s navázanou vizualizací kvazispektrální analýzou byly porovnány se snímky z histologického skeneru (obr. 1). Na snímcích jsou vidět rozdíly v barvách histologického barvení. Na černém pozadí jsou preparáty v odraženém světle kontrastnější. Detail na obr. 1 ukazuje vady skenovaného obrazu, vzniklé skládáním jednotlivých dílčích skenů.

Příklad využití mikroskopu FutureScope 2021 s následnou vizualizací obrazových dat přístupem (kvazi)spektrální analýzy pro různě barvené histologické řezy lidských tkání je uveden na obr. 2–6.

Na obr. 3 je uprostřed znázorněna céva mozku obklopená metastázou melanomu barvená hematoxylinem-eosinem (zkr. HE). Buňky metastázy jsou shluklé a nepravidelné. Na detailu vnitřní buňky (obr. 4a) lze vidět buněčná rakovinná jádra. Jejich rozdílné zbarvení (červené vs. zelené) je pravděpodobně způsobeno nekvalitním zpracováním (krájením nebo barvením) preparátu. Detailní obr. 4b znázorňuje erythrocyt v cévě mozku. Na obr. 5 a 6 jsou snímky nekropsie plic s plicními alveoly po tukové embolii. Tkáň jsou septa mezi alveolami. Kapénky tuku v septech jsou obarveny olejovou červení. Červené body mimo septa jsou sraženiny barviva.



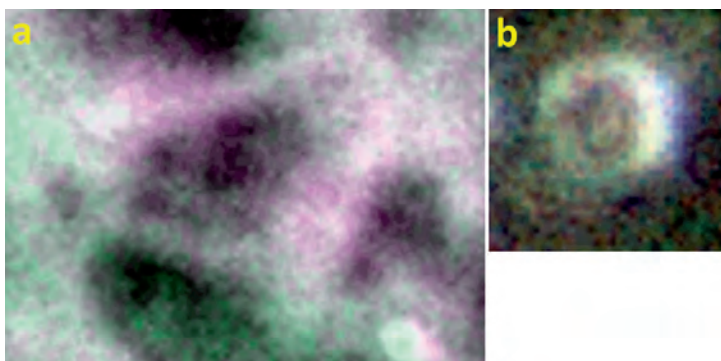
**Obr. 1:** Detail histologie rybích gonád (losos obecný, *Salmo salar*) získané skenerem Roche DP600 (vlevo) a mikroskopem FutureScope 2021 (vpravo). Šipka znázorňuje vady skenovaného obrazu. Barvení HE.



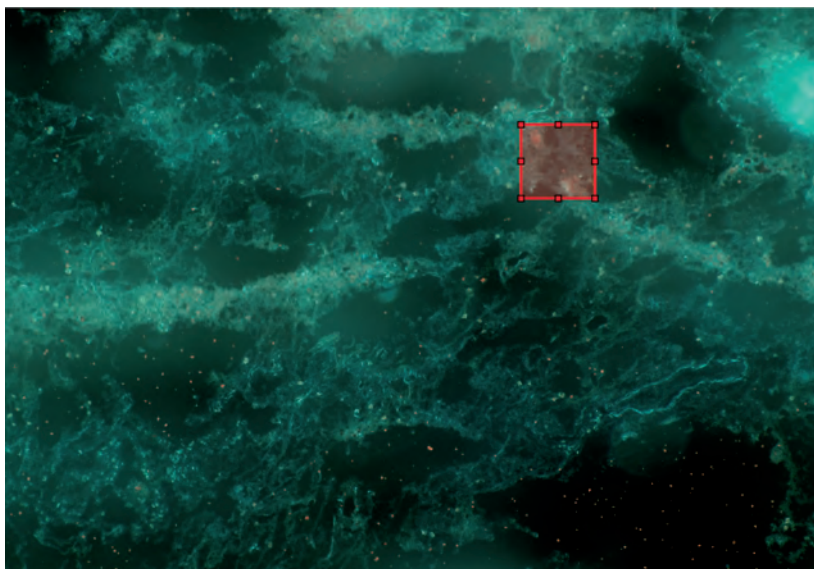
**Obr. 2:** Metastáza melanomu v mozku barvená HE. Vizualizace **a)** obr. 3, **b)** obr. 4a a **c)** obr. 4b klastrů spektrálně podobných objektů. Velikost zorného pole je **a)**  $270 \times 270 \mu\text{m}^2$ , **b)**  $23 \times 17 \mu\text{m}^2$  a **c)**  $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ . (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)



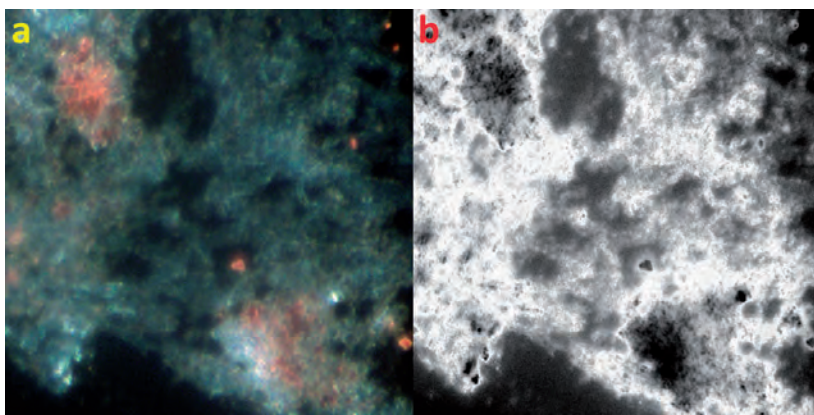
**Obr. 3:** Metastáza melanomu v mozku barvená HE. Červeně a žlutě jsou vyznačeny detaily na obr. 4. Vizualizace v LED osvětlení. Velikost zorného pole je  $270 \times 270 \mu\text{m}^2$ .



**Obr. 4:** Detaily obr. 3: buňka **a**) uvnitř a **b**) vně tkáně barvená HE. Vizualizace v LED osvětlení. Velikost zorného pole je **a**)  $23 \times 17 \mu\text{m}^2$  a **b**)  $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ .



**Obr. 5:** Plicní tuková embolie barvená olejovou červení. Červeně je vyznačen detail na obr. 6. Vizualizace v LED osvětlení. Velikost zorného pole je  $3,08 \times 1,92 \text{ mm}^2$ . (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)



**Obr. 6:** Plicní tuková embolie barvená olejovou červení (detail obr. 5). **a)** Vizualizace v LED osvětlení. **b)** Vizualizace klastrů spektrálně podobných objektů. Velikost zorného pole je  $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ .

## 5.2 Živé neznačené leukocyty a mesenchymální kmenové buňky

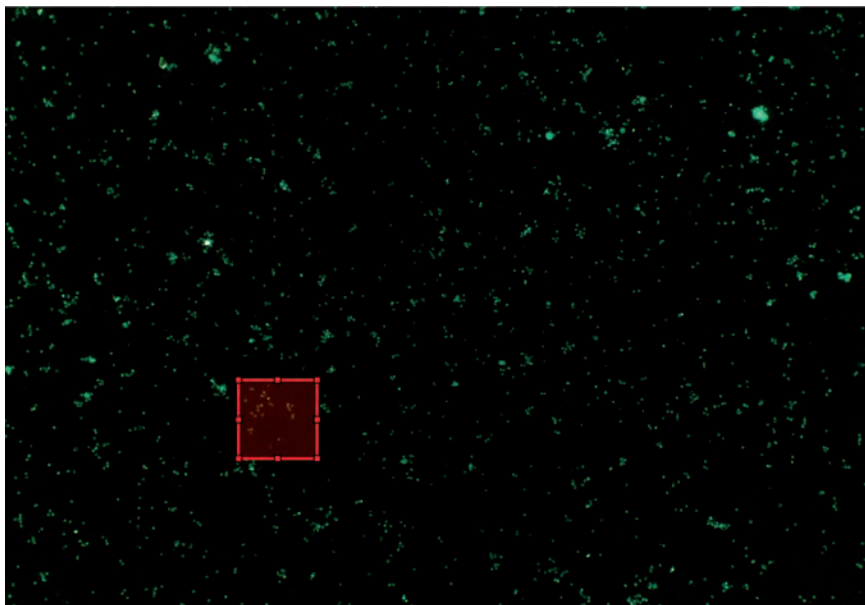
Světelná mikroskopie s velkým zorným polem ve spojení s (kvazi)spektrální analýzou obrazu skrývá také potenciál využití jako levnější alternativa k průtokové cytometrii. Hlavní výhodou této metody je

možnost analýzy nebarveného biologického materiálu, a tím urychlení příslušné analýzy a snížení pravděpodobnosti vnesení chyby měření vlivem špatné přípravy (barvením) vzorku. Příkladem je analýza lidských leukocytů. Obraz pořízený mikroskopem FutureScope 2021 (obr. 7) a interpolovaný metodou kvazispektrální analýzy je natolik detailní, že je možné v něm rozlišit jednotlivé typy leukocytů bez nutnosti barvení (obr. 8). Anotaci typů leukocytů lze zpřesnit použitím fluorescenčně značených protilátek.

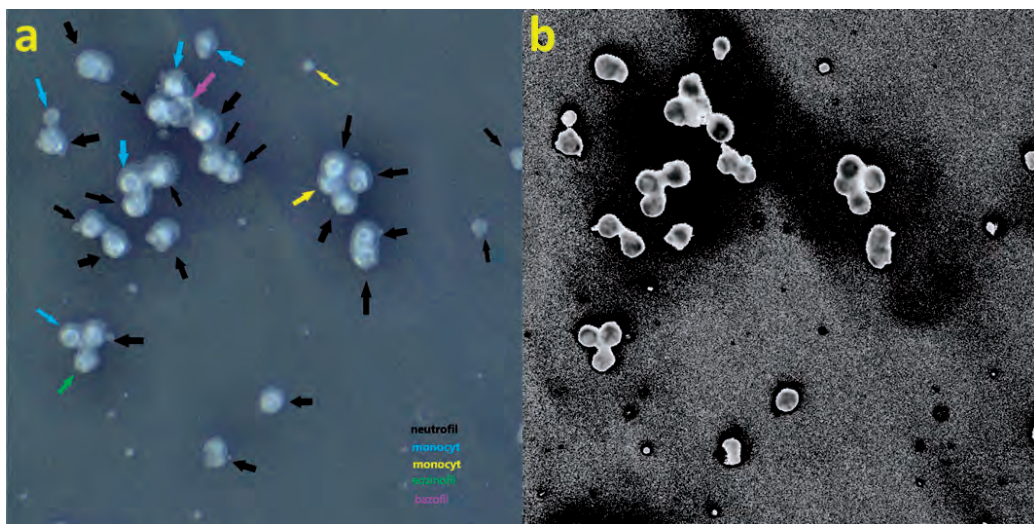
Současné metody průtokové cytometrie měří a vyhodnocují až  $10^5$  buněk. Snímek pořízený mikroskopem FutureScope 2021 (obr. 7) obsahuje přibližně 2000 leukocytů. Zvětšení statistického souboru leukocytů je možné snímáním celého sedimentu buněk podél os  $x$ - $y$ .

Podobně lze studovat i interakci a imunitní odezvu izolovaných T-lymfocytů. Příkladem je studium interakce T-lymfocytů s mesenchymálními kmenovými buňkami z lidské placenty. Mesenchymální kmenové buňky mají imunomodulační vlastnosti a ovlivňují funkce většiny imunitních efektorových buněk prostřednictvím přímého kontaktu s imunitními buňkami a lokálními faktory mikroprostředí, např. [61].

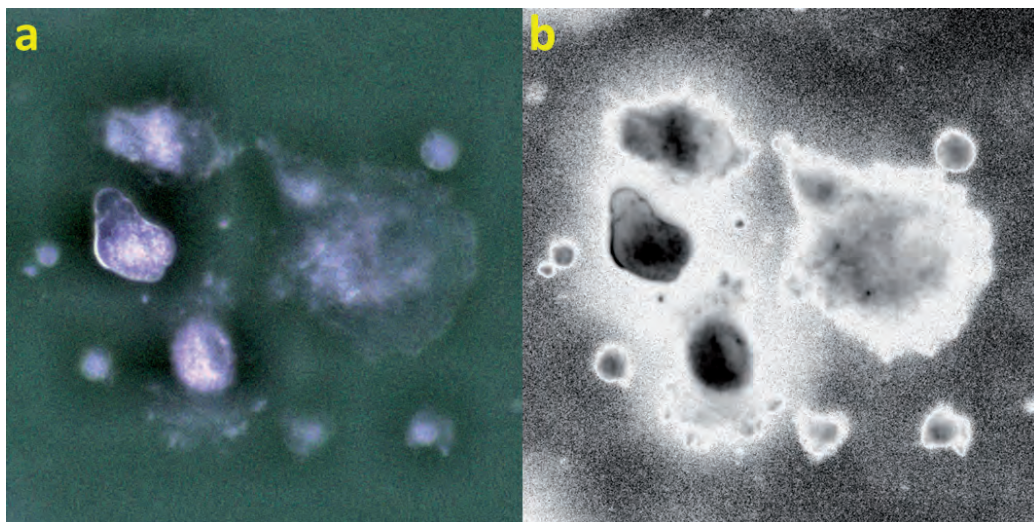
Studovali jsme interakci afinitně izolovaných T-lymfocytů aktivovaných S-proteinem viru SARS-CoV-2 s mesenchymálními kmenovými buňkami z placent dárkyň, které prodělaly onemocnění covid-19. Ve srovnání s kontrolou neaktivovaných T-lymfocytů jsme pozorovali jejich masivní vazbu. Snímek z mikroskopu FutureScope 2021 obsahuje přibližně 500 mesenchymálních kmenových placentárních buněk v různém stádiu buněčného cyklu (obr. 9). Přidáním T-lymfocytů k mesenchymálním buňkám dojde k navázání T-lymfocytů na povrch mesenchymálních buněk a jejich aktivaci. Navázáním a aktivací T-lymfocytů se zvýšila jejich světelná reflektance nebo fluorescenční emise. Laicky lze říci, že se buňky „rozsvítily“ (obr. 9). V simulovaném LED světle svítí aktivované T-lymfocyty žlutě, zatímco neaktivované jsou bílé.



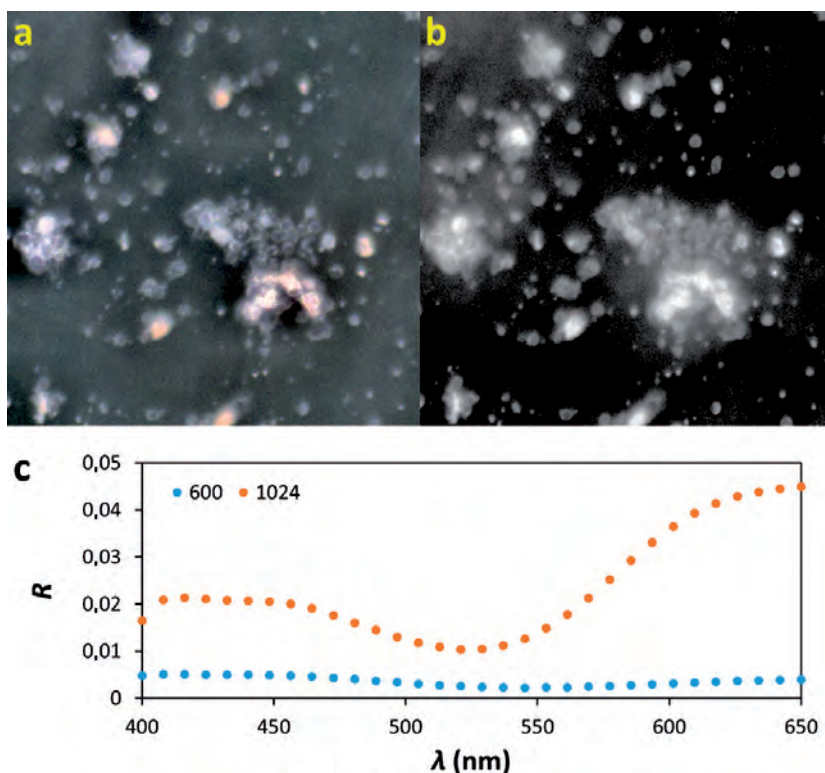
**Obr. 7:** Lidské leukocyty. Červeně je vyznačen detail na obr. 8. Vizualizace v LED osvětlení. Velikost zorného pole je  $3,08 \times 1,92 \text{ mm}^2$ .



**Obr. 8:** Lidské leukocyty (detail obr. 7). **a)** Vizualizace v LED osvětlení s možnou anotací. **b)** Odstíny šedi odpovídají spektrálním klastrům různého (bio)chemického složení. Velikost zorného pole je  $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ .



**Obr. 9:** Mesenchymální kmenové buňky z lidské placenty. **a)** Vizualizace v LED osvětlení. **b)** Odstíny šedi odpovídají spektrálním klastrům různého (bio)chemického složení. Velikost zorného pole je  $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ . (Spolupráce s Ústavem zdravotnických věd a biomedicíny Dunajské univerzity v Kremsu)



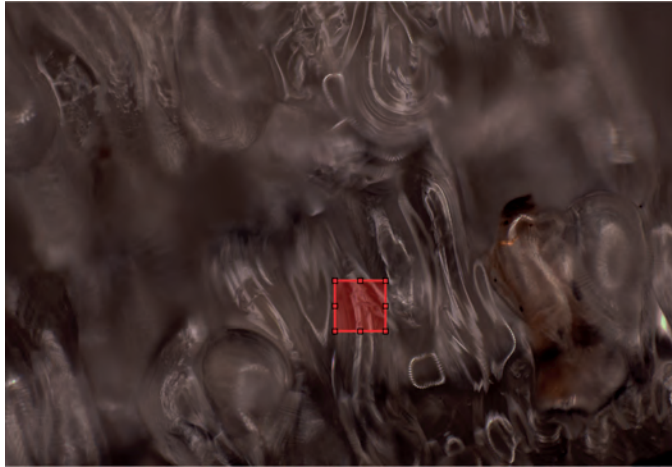
**Obr. 10:** Interakce lidských T-lymfocytů s mesenchymálními kmenovými buňkami z lidské placenty. **a)** Vizualizace v LED osvětlení. Velikost zorného pole je  $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ . **b)** Odstíny šedi odpovídají spektrálním klastrům různého (bio)chemického složení. **c)** Průměrná reflektanční spektra klastrů spekter: oranžový graf je spektrum vybrané oblasti uvnitř neaktivovaného T-lymfocyty (klastr 600), modrý graf je spektrum vybrané oblasti uvnitř aktivovaného T-lymfocyty (klastr 1024).

### 5.3 Skelety pro regenerativní medicínu

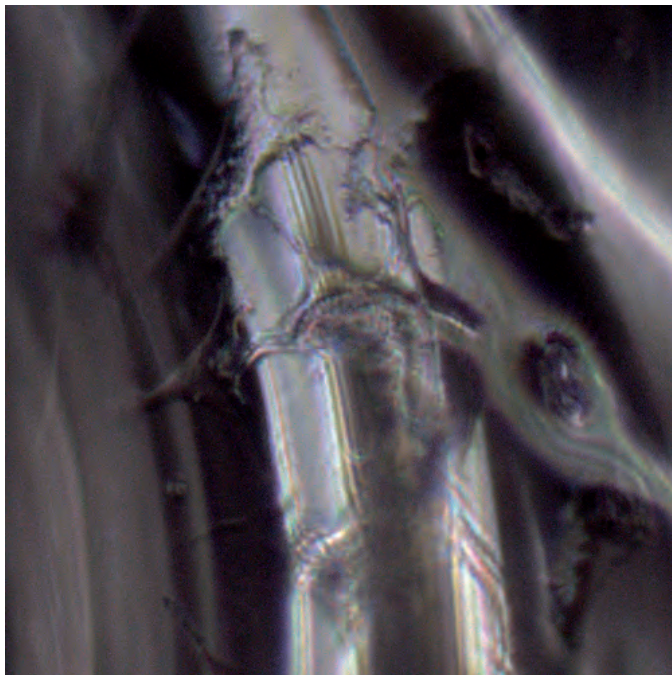
Nedostatek tkání a orgánů pro transplantace je možné řešit osídlením ať již přirozeného, nebo umělého skeletu buňkami. V souvislosti s tím je nutné hodnotit i biokompatibilitu takovýchto materiálů.

Častým materiálem pro přípravu umělých nanoskeletů je polykaprolakton a jeho kopolymery vzhledem k jeho biokompatibilitě a biodegradaci, např. [62]. K ověření biokompatibility nanoskeletu z polykaprolaktonu byly na mikroskopu FutureScope 2021 sledovány lidské buňky MG-63 vykazující morfolonii fibroblastů (obr. 11–12).

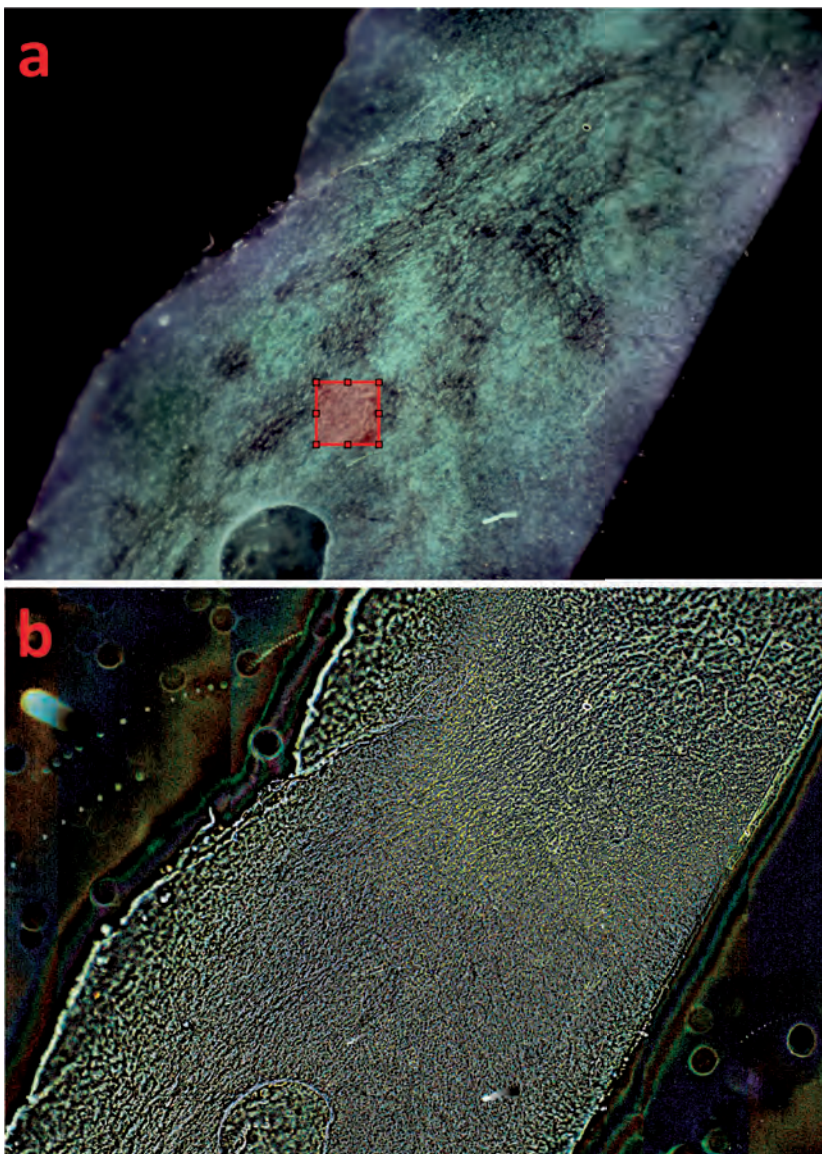
Přirozený decelularizovaný skelet je prostředím se zachovanou tkáňově specifickou mikroarchitekturou proteinů extracelulární matrix umožňující znovuosídlení, migraci, růst a diferenciaci nových buněk, např. [63]. V mnoha aplikacích regenerativní medicíny se vyšší desítky let používá lidská amniová membrána [64]. Na obr. 13–14 je použita profilometrie (kap. 4.3.4) ke zvýraznění struktury skeletu decelularizované placentární membrány.



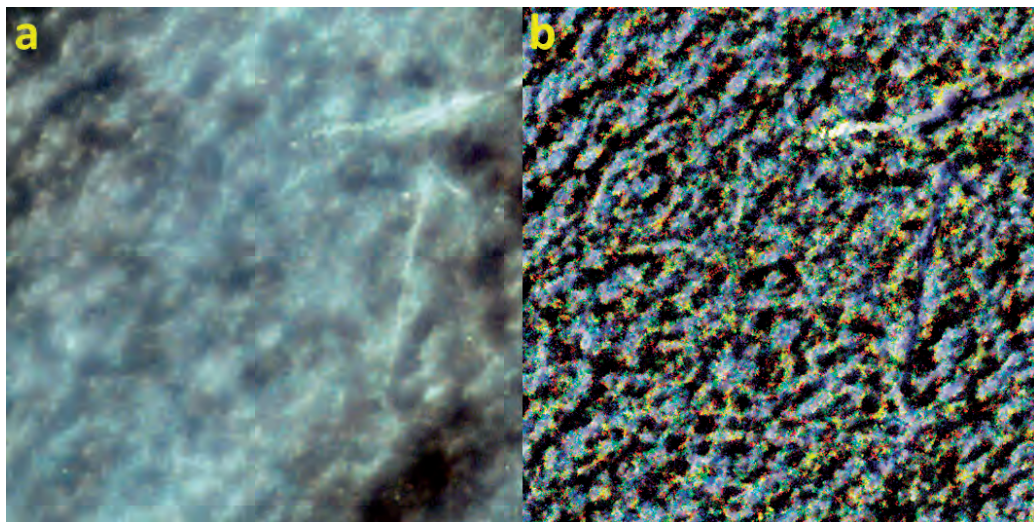
**Obr. 11:** Polykaprolaktonový nanoskelet s buňkami MG-63. Červeně je vyznačen detailní obr. 12. Velikost zorného pole je  $3,08 \times 1,92 \text{ mm}^2$ . (Spolupráce s CEITEC, Brno)



**Obr. 12:** Nanoskelet (nanoscaffold) z polykaprolaktonu s buňkami MG-63 (detail obr. 11). Velikost zorného pole je  $210 \times 210 \text{ }\mu\text{m}^2$ .



**Obr. 13:** **a)** Decelularizovaná placentární membrána. Červeně je vyznačen detail na obr. 14**a.** **b)** Profilometrie decelularizované placentární membrány. Velikost zorného pole je  $3,08 \times 1,92 \text{ mm}^2$ . (Spolupráce s Národním centrem tkání a buněk a.s. a PrimeCell Bioscience, a.s., Ostrava)



**Obr. 14:** Decelularizovaná placentární membrána. Detail snímku na obr. 13 s relevantní profilometrií. Velikost zorného pole je  $210 \times 210 \mu\text{m}^2$ .

## 6 ZÁVĚR

V primárním datovém souboru senzoru digitální kamery světelného mikroskopu je mnohem více informace, než se obvykle využívá a je extrahováno běžným vizualizačním softwarem.

My jsme postupným experimentálním vývojem zkonstruovali nejjednodušší možný světelný mikroskop bez úprav optické dráhy skládající se pouze z telecentrického objektivu a zdroje světla odrážejícího se od vzorku. Tímto způsobem jsme snížili počet aberací optické soustavy na minimum. Optický signál je detekován senzorem barevné digitální kamery s relativně velkým zorným polem a malým pixelem. Velký kamerový senzor umožňuje získání vynikajících statistik o pozorovaných vlastnostech vzorku.

Kombinací informačně-entropických, spektrofotometrických a jiných fyzikálně podložených výpočetních metod pixel po pixelu jsme získali sadu informací pro každý bod kamery. Místo obrázku máme soubor fyzikálních dat zcela nezávislý na měřicím systému (mikroskopu), kterým byl obrázek získán. Pro daný datový soubor lze použít více typů vizualizace a fyzikální analýzy. Tím jsme se přiblížili fyzikálním a informačním limitům světelné mikroskopie. Umělá inteligence, přestože je při zpracování obrazových dat představena, není striktně vyžadována a před jejím použitím je využito předchozího maximálního fyzikálního a informačního zpracování primárního souboru dat.

Experiment či měření jednoduchou světelnou mikroskopií vyžadují minimální přípravu vzorku. Vzorky totiž nemusí být upraveny: buňky, tkáň a další materiály mohou zůstat ve svých nativních stavech a nemusí být barveny či jinak složitě upravovány; materiály jsou běžně pouze povrchově upravovány. Většina praktických úkolů i z oblasti lékařství tak může být značně zjednodušena. Výsledky jsou srovnatelné se standardními výsledky získanými fluorescenční nebo elektronovou mikroskopií na upravených vzorcích, získaná informace je však přesnější.

Domníváme se, že poznatky odhalující zkresení reality aplikací existujících nástrojů mohou systematicky změnit přístup mikroskopické vědy po celém světě, adekvátně technickým možnostem 21. století.

---

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Renata Rychtáriková, Jan Urban a Dalibor Štys. Žampa's systems theory: a comprehensive theory of measurement in dynamic systems. *Acta Polytechnica*, 58(2):128–143, 2018.
- [2] Dalibor Štys, Jan Urban, Renata Rychtáriková, Anna Zhyrova a Petr Císař. Measurement in biological systems from the self-organisation point of view. In Francisco Ortuño a Ignacio Rojas, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, str. 431–443, Cham, 2015. Springer International Publishing.
- [3] Anna Zhyrova, Renata Rychtáriková a Dalibor Štys. Recognition of stages in the Belousov-Zhabotinsky reaction using information entropy: Implications to cell biology. In I. Rojas a F. Ortuño, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering, IWBBIO 2017, PT I*, svazek 10208 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 335–346, Cham, 2017. Springer International Publishing.
- [4] Dalibor Štys, Tomáš Náhlík, Anna Zhyrova, Renata Rychtáriková, Štěpán Papáček a Petr Císař. Model of the Belousov-Zhabotinsky reaction. In T. Kozubek, R. Blaheta, J. Šístek, M. Rozložník a M. Čermák, editoři, *High Performance Computing in Science and Engineering, HPCSE 2015*, svazek 9611 of *Lecture Notes in Computer Science*, str. 171–185, Cham, 2016. Springer International Publishing.
- [5] Dalibor Štys, Renata Rychtáriková, Anna Zhyrova, Kryštof M. Štys a Petr Jizba. Noisy hodgepodge machine and the observed mesoscopic behavior in the non-stirred Belousov-Zhabotinsky reaction: Optimal noise and hidden noise in the hodgepodge machine. *European Physical Journal-Special Topics*, 227(15-16):2361–2374, 2019.
- [6] Bernard R. A. Nijboer. The diffraction theory of optical aberrations: Part I: General discussion of the geometrical aberrations. *Physica*, 10(8):679–692, 1943.
- [7] Bernard R. A. Nijboer. The diffraction theory of optical aberrations: Part II: Diffraction pattern in the presence of small aberrations. *Physica*, 13(10):605–620, 1947.
- [8] K. Nienhuis a Bernard R. A. Nijboer. The diffraction theory of optical aberrations: Part III: General formulae for small aberrations; experimental verification of the theoretical results. *Physica*, 14(9):590–608, 1949.
- [9] Frits Zernike. How I discovered phase contrast, 1953. Nobel Prize lecture. Stockholm, Švédsko, 11. prosince 1953.
- [10] Joseph J. M. Braat a August J. E. M. Janssen. Derivation of various transfer functions of ideal or aberrated imaging systems from the three-dimensional transfer function. *Journal of the Optical Society of America A*, 32(6):1146–1159, 2015.
- [11] Joseph Braat a Peter Török. *Imaging Optics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2019.
- [12] Robert D. Guenther. *Modern Optics Simplified*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2019.
- [13] Ernst Abbe. Über einen neuen Beleuchtungsapparat am Mikroskop. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9:469–480, 1873.

- 
- [14] Geoffrey de Villiers a E. Roy Pike. *The Limits of Resolution*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 2016.
- [15] Yoshihiko Mizushima. Detectivity limit of very small objects by video-enhanced microscopy. *Applied Optics*, 27(12):2587–2594, 1988.
- [16] Irene K. Lichtscheidl a Ilse Foissner. Video microscopy of dynamic plant cell organelles: principles of the technique and practical application. *Journal of Microscopy*, 181(2):117–128, 1996.
- [17] Larry S. Barak a Watt Wetmore Webb. Fluorescent low density lipoprotein for observation of dynamics of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 90(3):595–604, 1981.
- [18] William E. Moerner a L. Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Physical Review Letters*, 62:2535–2538, 1989.
- [19] William E. Moerner. Single-molecule spectroscopy, imaging, and photocontrol: Foundations for super-resolution microscopy (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*, 54(28):8067–8093, 2015.
- [20] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz a Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [21] Eric Betzig. Single molecules, cells, and super-resolution optics (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*, 54(28):8034–8053, 2015.
- [22] Stephan W. Hell a Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11):780–782, 1994.
- [23] Stephan W. Hell. Nanoscopy with focused light (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*, 54(28):8054–8066, 2015.
- [24] Kirti Prakash, Benedict Diederich, Rainer Heintzmann a Lothar Schermelleh. Super-resolution microscopy: a brief history and new avenues. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 380(2220):1, 2022.
- [25] Sheng Liu, Philipp Hoess a Jonas Ries. Super-resolution microscopy for structural cell biology. *Annual Review of Biophysics*, 9(51):301–326, 2022.
- [26] Tomáš Náhlík. *Microscopy – point spread function, focus, resolution*. Ph.D. dizertace, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2016.
- [27] Renata Rychtáriková, Jan Korbel, Petr Macháček, Petr Císař, Jan Urban a Dalibor Štys. Point information gain and multidimensional data analysis. *Entropy*, 18(10), 2016.
- [28] Renata Rychtáriková. Clustering of multi-image sets using renyi information entropy. In F. Ortuño a I. Rojas, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO 2016)*, svazek 9656 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 517–526, Cham, 2016. Springer International Publishing.

- 
- [29] Renata Rychtáriková, Jan Korbel, Petr Macháček a Dalibor Štys. Point divergence gain and multi-dimensional data sequences analysis. *Entropy*, 20(2), 2018.
- [30] Renata Rychtáriková, Tomáš Náhlík, Kevin Shi, Daria Malakhova, Petr Macháček, Rebecca Smaha, Jan Urban a Dalibor Štys. Super-resolved 3-d imaging of live cells' organelles from bright-field photon transmission micrographs. *Ultramicroscopy*, 179:1–14, 2017.
- [31] Renata Rychtáriková, Georg Steiner, Michael B. Fischer a Dalibor Štys. Information limits of optical microscopy: Application to fluorescent labelled tissue section. In I. Rojas a F. Ortuño, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering, IWBBIO 2017, PT I*, svazek 10208 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 485–496, Cham, 2017. Springer International Publishing.
- [32] Renata Rychtáriková a Dalibor Štys. Observation of dynamics inside an unlabeled live cell using a bright-field photon microscopy: Evaluation of organelles' trajectories. In I. Rojas a F. Ortuño, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering, IWBBIO 2017, PT II*, svazek 10209 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 700–711, Cham, 2017. Springer International Publishing.
- [33] Russell E. Thompson, Daniel R. Larson a Watt W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(5):2775–2783, 2002.
- [34] Kirill Lonhus, Renata Rychtáriková, Ganna Platonova a Dalibor Štys. Quasi-spectral characterization of intracellular regions in bright-field light microscopy images. *Scientific Reports*, 10(1), 2020.
- [35] Ali Ghaznavi, Renata Rychtáriková, Mohammadmehdi Saberioon a Dalibor Štys. Cell segmentation from telecentric bright-field transmitted light microscopy images using a residual attention u-net: A case study on hela line. *Computers in Biology and Medicine*, 147:105805, 2022.
- [36] Ali Ghaznavi, Renata Rychtáriková, Petr Císař, Mohammad Mehdi Ziaei a Dalibor Štys. Symmetry breaking in the u-net: Hybrid deep-learning multi-class segmentation of hela cells in reflected light microscopy images. *Symmetry*, 16(2):227, 2024.
- [37] Kirill Lonhus, Renata Rychtáriková, Ali Ghaznavi a Dalibor Štys. Estimation of rheological parameters for unstained living cells. *European Physical Journal: Special Topics*, 230(4):1105–1112, 2021.
- [38] Petr Jizba a Jan Korbel. Multifractal diffusion entropy analysis: Optimal bin width of probability histograms. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, 413:438–458, 2014.
- [39] Ganna Platonova, Dalibor Štys, Pavel Souček, Kirill Lonhus, Jan Valenta a Renata Rychtáriková. Spectroscopic approach to correction and visualisation of bright-field light transmission microscopy biological data. *Photonics*, 8(8):333, 2021.
- [40] Renata Rychtarikova, Tomas Nahlik, Rebecca Smaha, Jan Urban, Dalibor Stys, Petr Cisar a Dalibor Stys. Multifractality in imaging: Application of information entropy for observation of inner dynamics inside of an unlabeled living cell in bright-field microscopy. In Ali Sanayei, Otto E. Röessler a Ivan Zelinka, editoři, *ISCS 2014: Interdisciplinary Symposium on Complex Systems*, str. 261–267, Cham, 2015. Springer International Publishing.

- 
- [41] Renata Rychtáriková a Tomáš Náhlík. *System Information Approach to Digital Light Microscopy*. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2023.
- [42] Renata Rychtáriková a Dalibor Štys. NanoTruth, 2019. Řídící software mikroskopu SuperScope.
- [43] Renata Rychtáriková a Tomáš Náhlík. *Systémově informační přístup k digitální světelné mikroskopii*. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2023.
- [44] The HDF Group®. The HDF5® library & file format, 2024. <https://www.hdfgroup.org/solutions/hdf5/> [Staženo 6. března 2024].
- [45] Jan Urban, Renata Rychtáriková, Petr Macháček, Dalibor Štys, Pavla Urbanova a Petr Císař. Optimization of computational burden of the point information gain. *Acta Polytechnica*, 59(6):593–600, 2019.
- [46] Henry Jacob Landau. Necessary density conditions for sampling and interpolation of certain entire functions. *Acta Mathematica*, 117:37–52, 1967.
- [47] Damien Garcia. Robust smoothing of gridded data in one and higher dimensions with missing values. *Computational Statistics & Data Analysis*, 54(4):1167–1178, 2010.
- [48] Kirill Lonhus, Renata Rychtáriková a Dalibor Štys. QSP, 2020. Quasi-spectral tool.
- [49] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9:62–66, 1979.
- [50] Mary L. Comer a Edward J. Delp. *Morphological operations*, str. 210–227. Springer US, Boston, MA, 1998.
- [51] Renata Rychtáriková. Multifractality in imaging: Application of information entropy for observation of inner dynamics inside of an unlabeled living cell in bright-field microscopy, 2014. Přednáška. Interdisciplinary Symposium on Complex Systems, Florencie, Itálie, 15.–18. září 2014.
- [52] Renata Rychtáriková. 3D Reconstruction of light-diffracting organelles of an unlabelled live cell from bright-field photon transmission microscopy – peeling PSFs, 2015. Přednáška. Microscopy New Zealand Conference 2015, Dunedin, Nový Zéland, 2.–4. února 2015.
- [53] Renata Rychtáriková, Tomáš Náhlík a Dalibor Štys. Analysis of living cell 3D inner structures from high-resolution bright-field microscopy, 2015. Přednáška. XIII Discussion in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, Česká republika, 19.–21. března 2015. Abstrakt dostupný v *Materials Structure*, 22(1), 23 (2015).
- [54] Tomáš Náhlík, Renata Rychtáriková a Dalibor Štys. Description of algorithm for analysis and 3D reconstruction of living cell inner structures from high-resolution bright-field microscopy images, 2015. Přednáška. XIII Discussion in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, Česká republika, 19.–21. března 2015. Abstrakt dostupný v *Materials Structure*, 22(1), 23 (2015).
- [55] Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz a Graham T. Johnson. Chapter 9 - nuclear structure and dynamics. In Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz a Graham T. Johnson, editoři, *Cell Biology (Third Edition)*, str. 143–160. Elsevier, 2017.

- 
- [56] Denise Bakstad, Antony Adamson, David G. Spiller a Michael R. H. White. Quantitative measurement of single cell dynamics. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(1):103–109, 2012.
- [57] Miroslav Slivoně. *Vliv běžných pesticidů na lidské buňky*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2020.
- [58] Jan Košek. *Studium dynamiky živých lidských buněk v odezvě na běžné kontaminanty vod s cílem vývoje citlivého specifického analytického postupu*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2023.
- [59] Dalibor Štys, Tomáš Náhlík, Petr Macháček, Renata Rychtáriková a Mohammadmehdi Saberioon. Least information loss (lil) conversion of digital images and lessons learned for scientific image inspection. In F. Ortuño a I. Rojas, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWB-BIO 2016)*, svazek 9656 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 527–536, Cham, 2016. Springer International Publishing.
- [60] Petr Císař, Tomáš Náhlík, Renata Rychtáriková a Petr Macháček. Visual exploration of principles of formation of microscopic image intensities using image explorer software. In F. Ortuño a I. Rojas, editoři, *Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWB-BIO 2016)*, svazek 9656 of *Lecture Notes in Bioinformatics*, str. 537–544, Cham, 2016. Springer International Publishing.
- [61] Na Song, Martijn Scholtemeijer a Khalid Shah. Mesenchymal stem cell immunomodulation: Mechanisms and therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9):653–664, 2020.
- [62] Bartłomiej Grobelski, Agnieszka Adamus Radosław A. Wach, Alicja K. Olejnik, Karolina Kowalska-Ludwicka, Marek Kolodziejczyk, Stanisław Bielecki, Janusz M. Rosiak a Zbigniew Pasieka. Biocompatibility of modified bionanocellulose and porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) biomaterials. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63(10):518–526, 2014.
- [63] Afarin Neishabouri, Alireza Soltani Khaboushan, Faezeh Daghigh, Abdol-Mohammad Kajbafzadeh a Masoumeh Majidi Zolbin. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: Evaluation, modification, and application methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 25(10):805299, 2020.
- [64] Adelheid Weidinger, Laura Poženel, Susanne Wolbank a Asmita Banerjee. Sub-regional differences of the human amniotic membrane and their potential impact on tissue regeneration application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 2021.

---

## 8 ABSTRACT

This habilitation thesis summarises the theoretical and practical approaches to developing simple hardware and relevant sophisticated software solutions for the microscopy of living, especially unlabeled cells, or whole human and animal tissues. The basic hardware solution consists of a simple optical path, which is, in the last stage, a telecentric lens, mounted on a large-chip and small-pixel camera. The camera collects the primary signal, which is subsequently spectroscopically calibrated. The resulted image is corrected for defects in the entire optical path of the microscope and camera chip. The corrected image can be further processed, whereby the most informative form of the processing is the innovative computation of the light spectrum for each image pixel. For each presented potential application, a compromise is sought between the overall magnification of the object by the optical system, the camera pixel's physical size, the data transfer rate, and the size of the stored data.