VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

METODIKA POZOROVÁNÍ DICTYOSTELIA DISCOIDEA V TRANSMISNÍM DIGITÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU

METHODOLOGY OF DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM IMAGING WITH THE TRANSMISSION DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
ANETA JEBÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
Ing. HANA UHLÍŘOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010

Abstrakt
Předmětem bakalářské práce bylo zobrazit *Dictyostelium discoideum* transmisním digitálním holografickým mikroskopem a porovnat toto zobrazení s běžně používanou mikroskopickou technikou.

Práce je rozdělena na část teoretickou a experimentální. V teoretické části je popsáno uspořádání transmisního digitálního holografického mikroskopu, základní postup práce s tímto mikroskopem a fyzikální podstata zobrazování mikroskopem. Dále je vysvětlen průběh rekonstrukce obrazu a numerického zpracování fáze. Na konci této části je uveden biologický popis pozorovaných buněk *Dictyostelia discoidea*.

V experimentální části je popsána kultivace a příprava buněk *Dictyostelia discoidea* pro pozorování a postup provedených pozorování. Buňky *Dictyostelia discoidea* byly zobrazeny v několika experimentech metodou klasického fázového kontrastu. Transmisním digitálním holografickým mikroskopem byly buňky pozorovány ve dvou prostředích. Získaná data byla zpracována metodou Dynamických fázových diferencí a vyhodnocena.

Summary
The task of this bachelor's thesis was to image *Dictyostelium discoideum* with a transmission digital holographic microscope and compare this imaging with a commonly used microscopy technique.

This bachelor's thesis is structured into a theoretical part and an experimental part. The theoretical part describes the setting of the transmission digital holographic microscope, basic operation and physical principles of imaging with this microscope. Further the process of image reconstruction and numerical process of phase reconstruction is illustrated. At the end of this part, basic biological characteristics of observed cells of *Dictyostelium discoideum* are introduced.

The experimental part describes the cultivation and preparation of *Dictyostelium discoideum* for the observations, and further the process of performed experiments. The cells of *Dictyostelium discoideum* have been imaged in couple experiments by a method of the classical phase contrast. By the transmission digital holographic microscope the cells of *Dictyostelium discoideum* have been imaged in two mediums. Images captured by the transmission digital holographic microscope were processed by a method of Dynamic phase differences and analysed.

klíčová slova
transmisní digitální holografický mikroskop, Dictyostelium discoideum, fázový kontrast, zpracování obrazu, optická mikroskopie, dynamické fázové diference

key words
transmission digital holographic microscope, Dictyostelium discoideum, phase contrast, image processing, optical microscopy, dynamic phase differences

JEBÁČKOVÁ, A.: *Metodika pozorování Dictyostelia discoidea v transmisním digitálním holografickém mikroskopu*, Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Vedoucí bakalářské práce Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala v celém rozsahu samostatně pod vedením Ing. Hany Uhlířové, Ph.D. a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Aneta Jebáčková

Ráda bych poděkovala Ing. Haně Uhlířové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a přátelskou atmosféru na pracovišti.
Děkuji také RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za poskytnuté vzorky, pomoc a možnost pracovat v Laboratoři molekulární genetiky.
Můj srdečný dík patří rodičům a příteli za velkou podporu během studia.

Obsah

1 Úvod a cíle práce **8**
1.1 Historický vývoj holografické mikroskopie 8

2 Transmisní digitální holografický mikroskop (DHM) **9**
2.1 Uspořádání transmisního DHM 9
2.2 Práce s transmisním DHM 11

3 Fyzikální podstata zobrazení transmisním DHM **11**
3.1 Průběh vlnoplochy mikroskopem 11
3.2 Holografická podmínka 13
3.3 Zobrazení fázových objektů 14

4 Rekonstrukce obrazu **15**
4.1 Výpočet nosné frekvence a navázání fáze 15
4.2 Vyrovnání pozadí fázového zobrazení 16
4.3 Srovnání obrázků na stejnou hodnotu fáze pozadí 16

5 Numerické zpracování fáze **17**

6 Dictyostelium discoideum (DD) **18**
6.1 Přírodopisné zařazení 18
6.2 Výskyt DD 18
6.3 Životní cyklus DD 18
6.4 Oblast použití DD 19
6.5 Pozorování životního cyklu DD na Petriho misce 20

7 Kultivace a příprava buněk DD pro pozorování **20**
7.1 Výměna media 21
7.2 Příprava buněk DD na pozorování 21

8 Zobrazení buněk DD metodou klasického fázového kontrastu **22**
8.1 Metoda klasického fázového kontrastu 22
8.2 Experimenty pozorované mikroskopem s klasickým fázovým kontrastem 23
8.2.1 Chemotaxe pod agarózou 23
8.2.2 Pozorování buněk DD 24
8.2.3 Natáčení buněk DD 25

9 Zobrazení buněk DD transmisním DHM **27**
9.1 Příprava a převoz buněk 27
9.2 Biologické pracoviště v Laboratoři optické mikroskopie 27
9.3 První série pozorování 27
9.4 Druhá série pozorování 28
9.5 Třetí série pozorování 28
9.6 Vyhodnocení naměřených dat 31

10 Závěr **32**

Slovník biologických pojmů **33**

Literatura **34**

1 Úvod a cíle práce

Na Ústavu fyzikálního inženýrství Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně byl sestrojen transmisní digitální holografický mikroskop, který je vhodný pro zobrazování transparentních fázových objektů. Takové objekty se vyskytují převážně v biologii a patří mezi ně rakovinné buňky, se kterými jsou v současné době na mikroskopu prováděny experimenty, i *Dictyostelium discoideum*.

Dictyostelium discoideum je améba používaná jako modelový organismus v různých vědních odvětvích. Přežívá za pokojové teploty a její kultivace je nenáročná. Díky tomu lze její kultivaci a pozorování zavést i v podmínkách Laboratoře optické mikroskopie na ÚFI.

Úkolem této bakalářské práce bylo zobrazení buněk *Dictyostelia discoidea* transmisním digitálním holografickým mikroskopem a porovnání tohoto zobrazení s některou z běžně užívaných zobrazovacích metod. K dalším úkolům patřilo popsání metodiky kultivace a přípravy *Dictyostelia discodeina* pro pozorování, nalezení vhodného nastavení parametrů mikroskopu pro dané pozorování, použití vhodného zpracování obrazu a vyhodnocení experimentálních dat.

1.1 Historický vývoj holografické mikroskopie

Holografii objevil maďarský fyzik Dennis Gabor v roce 1948, když se snažil docílit vyššího zvětšení elektronového mikroskopu rekonstrukcí hologramu pomocí větší vlnové délky záření, než byla vlnová délka záření, s nímž byl hologram zaznamenán. Vyššího zvětšení elektronového mikroskopu nebylo však v těchto experimentech dosaženo. Ukázalo se, že změna vlnové délky způsobuje aberace, které zhoršují výsledné rozlišení natolik, že zcela potlačují efekt vyššího zvětšení.

Holografie se ale začala rozvíjet jako metoda optická. Hologram je způsob záznamu obrazu, který nám umožňuje kompletně zaznamenat obrazovou vlnu. Počáteční experimenty s využitím holografie ve světelné mikroskopii se týkaly zejména možnosti záznamu bez použití čoček a zvětšení obrazu využitím rozdílných geometrií záznamového a rekonstrukčního svazku. To však opět vedlo k vadám zobrazení. První světelný holografický mikroskop, který byl podobný těm současným, tzv. hybridní holografický mikroskop, využíval mikroskopového objektivu a holograficky zaznamenával zobrazení vznikající v jeho obrazové rovině. Bylo možné u něj využívat obvyklých technik mikroskopického zobrazení (např. zobrazení v temném poli). Byla zaznamenávána fáze zobrazení a byla také možná holografická rekonstrukce na trojrozměrné oblasti. Rozlišení holografického mikroskopu zaznamenávajícího obraz zvětšený objektivem bylo prokazatelně vyšší, než při holografickém záznamu bez použití objektivu.

Holografického záznamu mikroskopického obrazu bylo dosaženo již v šedesátých letech dvacátého století. Tato technika se však nerozšířila prakticky, protože nebyla dostupná vhodná detekční zařízení a dostatečně výkonné počítače pro okamžitý záznam a zpracování holografického záznamu do uživatelsky interpretovatelné podoby.

Prakticky využitelný holografický mikroskop proto musí být kromě optické soustavy vybaven také digitálním detekčním systémem a on-line připojeným počítačem, který zpracovává holografický záznam a poskytuje uživateli výsledné zobrazení téměř v reálném čase. Takovéto sestavy jsou v současnosti komerčně nabízeny (např. Lyncée Tec, http://www.lynceetec.com) [1].

2 Transmisní digitální holografický mikroskop (DHM)

Digitální holografická mikroskopie je neinvazivní metoda kvantitativního zobrazení fáze.

Výhody holografické mikroskopie vyplývají z úplného záznamu obrazové vlny. Hologram, který je vytvářen mikroskopem, je numericky zpracován a lze z něj dále rekonstruovat nejen obvykle pozorovanou intenzitu vlny, ale také její obrazovou fázi.

Zviditelnění fáze vzniká bez jakéhokoli invazivního zásahu do pozorovaného vzorku. Proto je tato metoda vhodnější například pro pozorování živých buněk ve srovnání s fluorescenčním barvením, které obvykle působí toxicky [1]. Na rozdíl od klasického (Zernikova) fázového kontrastu či diferenciálního interferenčního kontrastu vypovídá kvantitativní vyjádření fázového kontrastu z holografického mikroskopu o skutečném rozložení suché hmoty v buňce [2].

Transmisní digitální holografický mikroskop (dále jen transmisní DHM), který byl v této práci použit pro pozorování buněk *Dictyostelia discoidea* (dále jen DD), byl sestaven v Laboratoři optické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně, kde se dále pracuje na jeho vývoji, jak konstrukčním, tak i softwarovém. Tento transmisní DHM umožňuje použití libovolně nízké koherence osvětlení (prostorové i časové) ve spojení s mimoosovou holografií a v laboratoři je aplikován především pro studium dynamiky reakcí živých buněk na různé podněty.

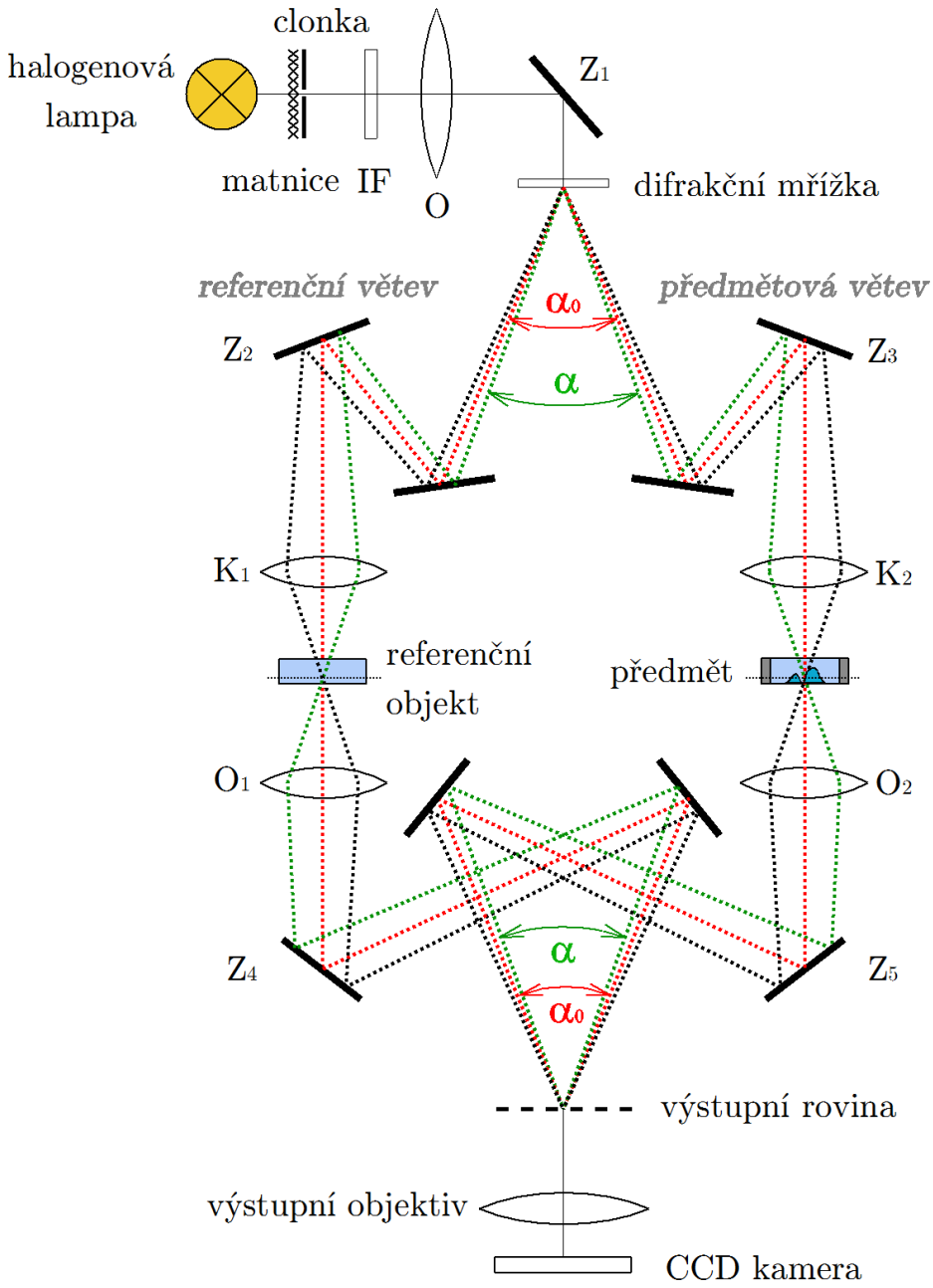
Nízkokoherentní zdroje osvětlení mají oproti koherentním zdrojům dvě výhody. Jednak jsou potlačeny nežádoucí interference v systému, takže výsledný obraz není znehodnocen koherenčním šumem, a jednak má zobrazení konfokální charakter, tzn. vytváří se optické řezy.

V mimoosové holografii svírají osy předmětové a referenční větve ve výstupní rovině nenulový úhel a vznikají interferenční proužky. Tento typ interferometrie při splnění holografické podmínky umožňuje rekonstrukci obrazové vlny z jediného hologramu. Při osové holografii jsou osy předmětové a referenční větve rovnoběžné a vzniká interferenční proužek nekonečné šířky [3].

Transmisní DHM jsou využívány v některých výzkumných laboratořích, v běžné biomedicínské praxi se zatím nevyužívají.

2.1 Uspořádání transmisního DHM

Optické schéma mikroskopu je odvozeno od reflexní verze digitálního holografického mikroskopu publikovaného pod názvem „Parallel-mode confocal microscope“ [4]. Osvětlovací soustava se skládá ze zdroje, matnice, vyměnitelných clonek, interferenčního filtru a čočky. Jako zdroj slouží halogenová lampa, která poskytuje bílé světlo. Ke zkoumání biologických objektů se však více hodí červené světlo, které je buňkami málo rozptylováno. Proto je používán interferenční filtr s maximální propustností na vlnové délce 650 nm, který zároveň usnadňuje následné dosažení interference. Čočka (O) zobrazí zdroj do zadní ohniskové roviny kondenzorů K_1 a K_2, tím je zajištěno rovnoměrné osvětlení předmětu. Děličem svazku světla je lineární fázová difrakční mřížka, na níž svazek difraktuje a zrcátky se vybírá $+1.$ a $-1.$ difrakční řád tvořící svazky referenční a předmětové větve. Prostorová frekvence difrakční mřížky ($f = 70\,\mathrm{mm}^{-1}$) byla zvolena tak, aby difrakční a interferenční úhly svazků byly malé, ale aby zároveň byla splněna holografická podmínka. Svazek předmětové větve je z difrakční mřížky zrcátky směrován do kondenzoru K_2. Pak prochází přes předmět (komůrku s buňkami a živným mediem), na který je zaostřen objektiv O_2. Tento objektiv zobrazí předmět do výstupní roviny, kde se protínají



Obrázek 1: Schéma transmisního DHM, převzato z [3]

svazky z obou větví a interferují. Jelikož se jedná o prostorově nekoherentní zdroj, ve výstupní rovině interferuje světlo pocházející pouze ze stejného bodu zdroje. Tím vzniká hologram s interferenčními proužky s nosnou prostorovou frekvencí. Referenční větev má stejnou konstrukci až na to, že mezi kondenzorem K_1 a objektivem O_1 není předmět, ale pouze referenční objekt (komůrka pouze s mediem). Rozdíl optických drah svazků je tedy v ideálním případě způsoben pouze průchodem světla buňkami. Za výstupní rovinou je umístěn výstupní objektiv, který zobrazuje hologram na čip CCD kamery. Jeho funkcí je zvětšit interferenční obrazec, aby bylo splněno kritérium prostorové vzorkovací frekvence kamery. Zobrazení tohoto mikroskopu umožňuje rekonstrukci fáze i intenzity, přičemž fázi lze zaznamenávat s vysokou vzorkovací frekvencí, omezenou pouze hardwarem záznamového a rekonstrukčního zařízení, a sledovat tak dynamické děje v buňce [3].

2.2 Práce s transmisním DHM

Před samotným pozorováním je nutné na mikroskopu nastavit interferenci předmětové a referenční vlny. To se provádí obvykle ve dvou krocích.

Nejprve je zaostřena v obou větvích mikroskopu difrakční mřížka bez preparátu. Na difrakční mřížce se vyskytují různé nečistoty, takže je výhodné, kvůli lepšímu posouzení ostrosti obrazu, zaostřovat buď na ně, nebo na hranu difrakční mřížky. Předmětová i referenční větev jsou zaostřovány zvlášť. Světelný svazek procházející předmětovou větví je zastíněn a je zaostřena referenční větev a naopak. Poté jsou oba obrazy složeny na sebe a přizpůsobením optické délky předmětové větve je dosaženo interference.

Následně je do předmětové větve vložena komůrka s pozorovaným vzorkem a do referenční větve stejná komůrka se stejnou tekutinou, ale bez vzorku. Opět je zaostřena každá větev zvlášť na difrakční mřížku a obrazy jsou složeny. Pomocí šroubu ke změně optické délky je nastaven maximální kontrast interferenčních proužků. Pak je vertikálním pohybem stolku zaostřeno na rovinu s buňkami. Pokud zaostřená mřížka působí ve výsledném zobrazení rušivě, je možné ji rozostřit. Tím však dojde k vzájemnému posuvu obrazů v obou větvích, které jsou poté posuvem obrazu v předmětové větvi opět složeny na sebe a je tak zajištěno, aby ve vybraném zorném poli byl nejvyšší kontrast interferenčních proužků. Nakonec jsou nastaveny parametry snímání obrazu a je zahájeno pozorování. Příslušný softwarový modul, jehož autorem je Ing. Lukáš Kvasnica zobrazuje podle volby hologram, obraz amplitudy, fáze, navázané fáze a průběhu intenzity a fáze v čase. Na disk se pak dle výběru ukládají hologramy, obrazy fáze a intenzity, k rekonstrukci obrazu však stačí pouze hologramy.

3 Fyzikální podstata zobrazení transmisním DHM

Základní princip holografie spočívá v interferenci svazku modulovaného pozorovaným předmětem (z předmětové větve) a svazku nemodulovaného (z referenční větve). Vzniklé interferenční pole je zaznamenáváno na detektor (fotografická deska, CCD senzor apod.) a získaný hologram je trvalým záznamem vyšetřovaného vlnového pole. Z tohoto hologramu je možné vyšetřované pole kdykoliv zrekonstruovat a dále analyzovat.

3.1 Průběh vlnoplochy mikroskopem

Z nekoherentního světelného zdroje vychází jeden světelný svazek, který se na difrakční mřížce rozdělí na dva svazky, svazek předmětové a referenční větve. Průběh vlnoplochy je v obou větvích stejný, proto se zde budu zabývat pouze průběhem v referenční větvi.

Každý bod zdroje se zobrazí do ohniskové roviny kondenzoru. Kulová vlna vycházející z obrazu bodu zdroje je kondenzorem transformována na rovinnou vlnu popsanou vztahem:

$$u\left(\vec{r},t\right) = u\left(\vec{r}\right)\exp\left(-\mathrm{i}\omega t\right), \tag{1}$$

kde $u\left(\vec{r}\right)$ je komplexní amplituda, která vyjadřuje prostorovou závislost vlny a člen $\exp\left(-\mathrm{i}\omega t\right)$ vyjadřuje závislost časovou.

Úhlová frekvence vlny ω se při průchodu objektivy nemění, proto uvažujeme dále jen komplexní amplitudu

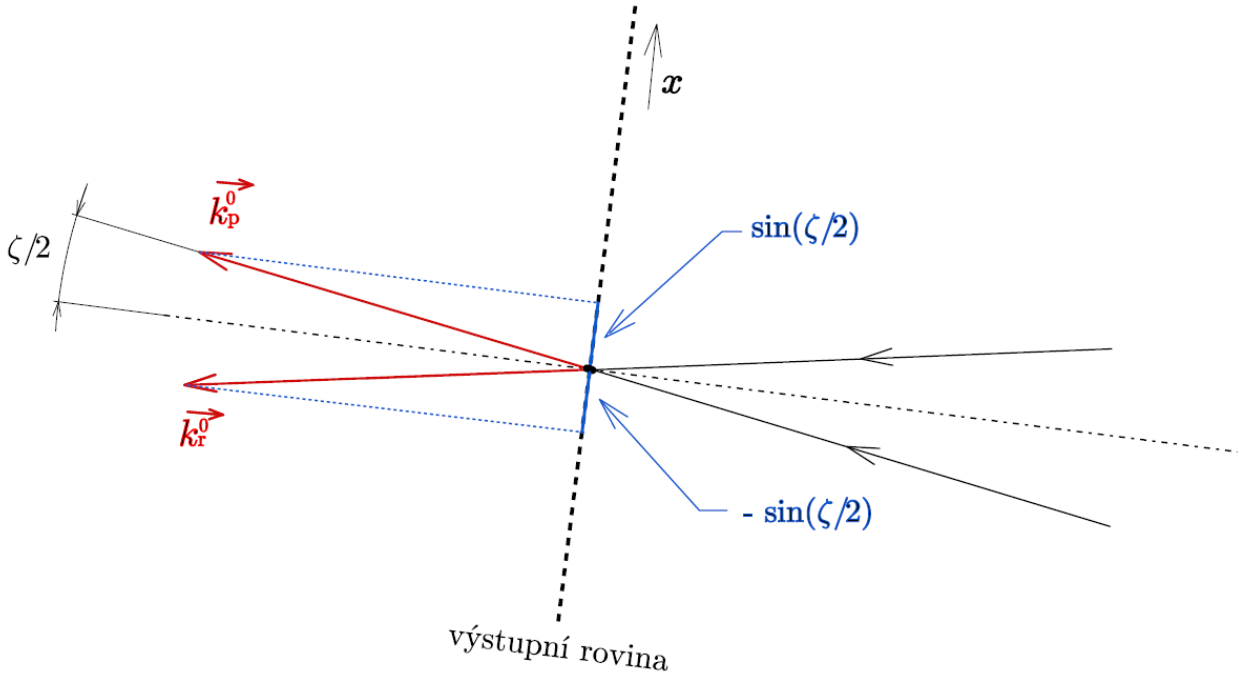
$$u\left(\vec{r}\right) = a\exp\left(-\mathrm{i}\vec{k}\cdot\vec{r}\right) = a\ \exp\left(-\mathrm{i}\frac{2\pi}{\lambda}\vec{k^0}\cdot\vec{r}\right), \tag{2}$$

kde a je amplituda, $\vec{k}$ je vlnový vektor, $\vec{r}$ je polohový vektor a $\vec{k^0}$ je jednotkový vlnový vektor.

Tato rovinná vlna je dále transformována objektivem na vlnu kulovou. Vzhledem k velké vzdálenosti mezi obrazovou ohniskovou rovinou kondenzoru a výstupní rovinou a malým rozměrům zorného pole, je poloměr křivosti vlnoplochy velký a vlnu lze ve výstupní rovině považovat za rovinnou.

Součin jednotkového vlnového vektoru $\vec{k^0}$ vlny ve výstupní rovině a polohového vektoru $\vec{r}$ vyjádříme jako průmět $\vec{k^0}$ do osy x (viz obr. 2). Osa x je průsečnicí výstupní roviny a roviny, která je tvořená vlnovými vektory referenční a předmětové vlny,

$$u\left(x\right) = a \exp\left[-\mathrm{i}2\pi \frac{\sin\left(\zeta/2\right)}{\lambda} x\right]. \tag{3}$$



Obrázek 2: Osy svazků v předmětové a výstupní rovině, převzato z [5]

Interferenční obrazec odpovídá interferenci dvou rovinných vln, které mezi sebou svírají úhel ζ. Podíl $\frac{\sin\zeta/2}{\lambda}$ v rovnici (3) označíme jako κ, přičemž 2κ je pak nosná frekvence interferenčních proužků. Pomocí této frekvence budeme později rekonstruovat zobrazení.

Intenzita interferenčního obrazce ve výstupní rovině je dána jako kvadrát modulu součtu amplitud referenční u_r a předmětové u_p vlny,

$$I(x,y) = \left|u_p(x,y) + u_r(x)\right|^2. \tag{4}$$

Vyjádříme-li $u_p(x,y)$ a $u_r(x)$ pomocí vlnových rovnic (2) a upravíme, dostaneme pro intenzitu interferenčního obrazce závislost

$$I(x,y) = |a_p(x,y)|^2 + |a_r|^2 + a_p(x,y)a_r^* \exp(\mathrm{i}4\pi\kappa x) + a_r a_p^*(x,y)\exp(-\mathrm{i}4\pi\kappa x), \tag{5}$$

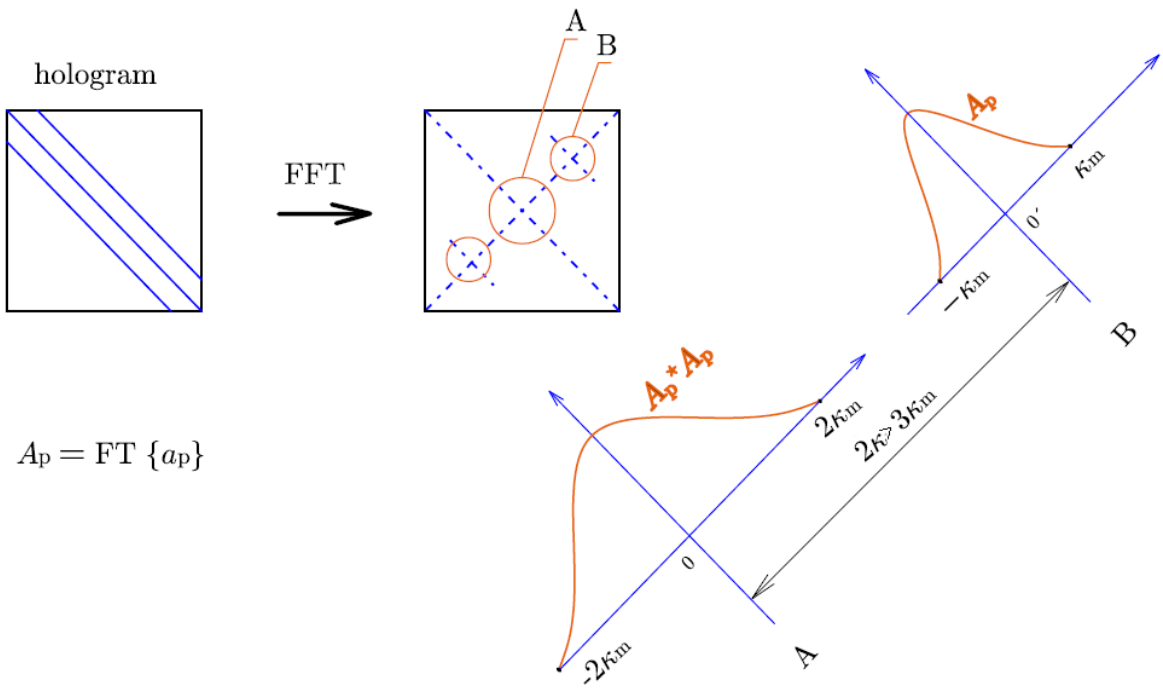
kde * označuje komplexně sdruženou funkci. První člen v rovnici (5) vyjadřuje intenzitu svazku v předmětové větvi a druhý člen intenzitu svazku v referenční větvi ve výstupní

rovině. Třetí a čtvrtý člen nesou informace o tvaru předmětové vlny při známém tvaru vlny referenční. Pro rekonstrukci je třeba odseparovat jeden z těchto členů od ostatních. To realizujeme v prostoru prostorových frekvencí pomocí Fourierových transformací.

Detailnější popis průběhu vlnoplochy mikroskopem a následných Fourierových transformací lze nalézt v [5].

3.2 Holografická podmínka

Aby bylo možné odseparovat komplexní amplitudu zobrazení ve frekvenčním prostoru, musí platit holografická podmínka.



Obrázek 3: Holografická podmínka, převzato z [5]

Na obr. 3 je A_p Fourierovským obrazem komplexní amplitudy a_p. Nenulová oblast funkce A_p je ohraničena frekvencí, kterou jsou schopny přenést objektivy. Šířka této oblasti je známá pro daný objektiv a vlnovou délku světla a označuje se $2\kappa_m$. Symetricky kolem bodu [0,0], který je umístěn ve středu spektra prostorových frekvencí je umístěna autokorelace funkce A_p. Její šířka je dvojnásobná ($4\kappa_m$). Středy funkce A_p a její autokorelace jsou od sebe vzdáleny o prostorovou frekvenci interferenčních proužků 2κ. Aby bylo možné funkci A_p od její autokorelace separovat, nesmí se tyto funkce překrývat. Tedy prostorová frekvence interferenčních proužků musí být alespoň $3\times$ větší než maximální prostorová frekvence, kterou přenese objektiv: $2\kappa > 3\kappa_m$ [5].

3.3 Zobrazení fázových objektů

Objekty, které je možné pozorovat, lze zjednodušeně rozdělit na amplitudové a fázové. Amplitudové objekty mění amplitudu světla, které jimi prochází, zatímco fázové objekty mění jeho fázi. Detektory (oko, kamera, fotografická deska) jsou citlivé vůči změnám intenzity světla I (tedy kvadrátu modulu amplitudy A, $I = |A|^2$). To způsobí, že amplitudové objekty mají jakýsi přirozený kontrast, ale fázové ne.

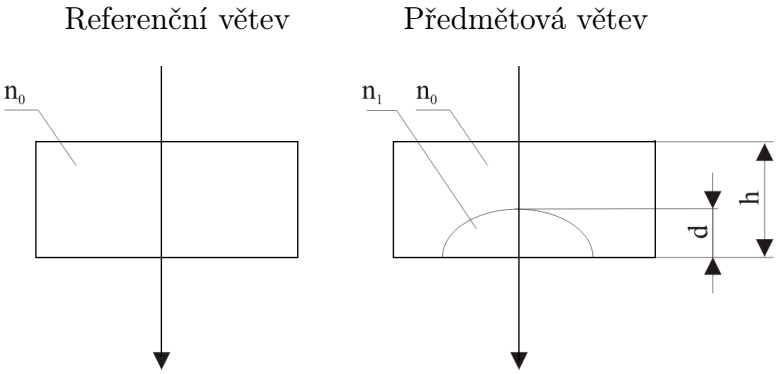
K zobrazení fázových objektů se využívá interference, tedy jevu, který potvrzuje vlnovou podstatu světla a závisí na jeho fázi.

Transmisní DHM umožňuje jednak zobrazit transparentní preparáty a jednak změřit rozdíl optické dráhy indukovaný vzorkem, tj. rozdíl optických drah mezi předmětovou a referenční větví.

Fáze je přímo úměrná rozdílu délky optických drah mezi předmětovou a referenční větví. Optická dráha je pak přímo úměrná indexu lomu, který je tím větší, čím více suché hmoty se vyskytuje v daném místě preparátu. V místech, kde se mění index lomu (množství suché hmoty) nebo výška objektu, dochází i ke změně fáze.

$$\Delta\phi = \phi_p - \phi_r = \frac{2\pi}{\lambda}\left[n_0\left(h-d\right)+n_1 d\right] - \frac{2\pi}{\lambda}n_0 h = \frac{2\pi}{\lambda}d(n_1-n_0) = \frac{2\pi}{\lambda}d\Delta n \qquad (6)$$

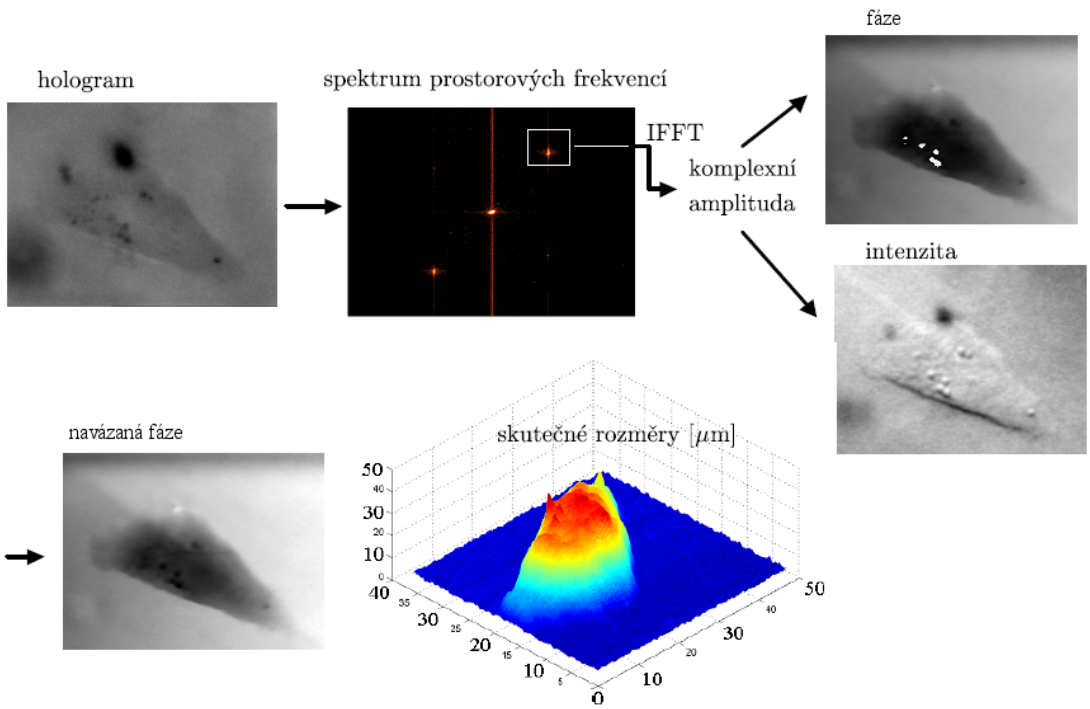
kde $\Delta\phi$ je rozdíl fáze předmětové a referenční vlny, ϕ_p fáze předmětové vlny, ϕ_r fáze referenční vlny, λ je vlnová délka světla, Δn je rozdíl indexů lomu v předmětové a v referenční větvi, d je vzdálenost, kterou urazí paprsek v buňce, h je šířka komůrky.



Obrázek 4: Znázornění optických drah v referenční a předmětové větvi mikroskopu

4 Rekonstrukce obrazu

Z holografického zobrazení lze pomocí počítače a numerických metod zrekonstruovat celou předmětovou vlnu, tedy její intenzitu a fázi. Rekonstrukce obrazu probíhá v několika krocích, které jsou popsány v následujících odstavcích.



Obrázek 5: Schéma rekonstrukce zobrazení, převzato z [5]

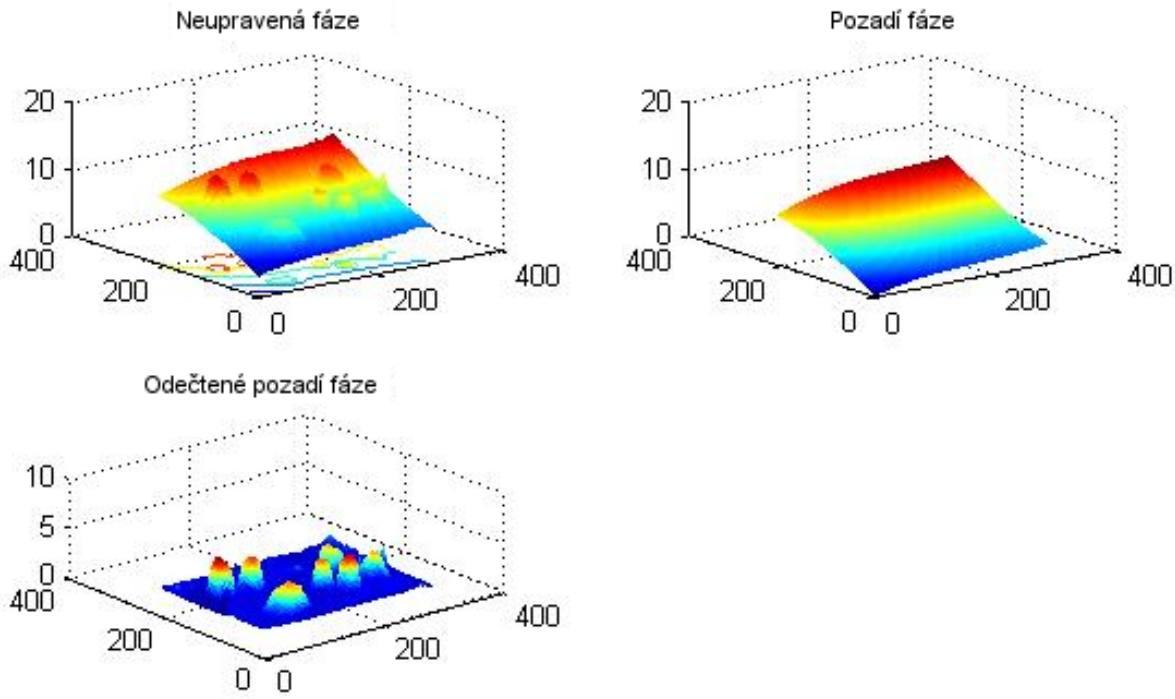
4.1 Výpočet nosné frekvence a navázání fáze

Nejprve se ze zaznamenané intenzity pomocí rychlé diskrétní Fourierovy transformace získá spektrum prostorových frekvencí. Pokud je splněna holografická podmínka, pak jsou patrné tři oblasti, kde prostřední oblast odpovídá součtu autokorelací Fourierových transformací prvních dvou členů rovnice (5). Fourierovy transformace třetího a čtvrtého členu jsou umístěny symetricky kolem autokorelačního obrazce a jsou od něj vzdáleny o prostorovou nosnou frekvenci interferenčních proužků. Vybere se oblast kolem třetího členu a změnou souřadného systému je zajištěno její posunutí do středu souřadného systému. Pak se provede inverzní rychlá Fourierova transformace a získá se tak komplexní amplituda zobrazení vzorku. Z ní je možné vypočítat fázi a intenzitu předmětové vlny. Úhel komplexního čísla odpovídá fázi předmětové a referenční vlny a kvadrát modulu určuje intenzitu zobrazení. Pokud se ve fázovém obrazci objeví skoky fází, je nutné je odstranit a fázi navázat. To se provádí tak, že pokud je fáze ve dvou sousedních pixelech vetší než 2π nebo menší než -2π, je od hodnoty fáze odečtena nebo k ní přičtena korekční hodnota k [5].

4.2 Vyrovnání pozadí fázového zobrazení

Obrázek navázané fáze je zřejmě vlivem různých optických vad deformován a je nutné tento jev eliminovat. Proto je pozadí obrázku vyrovnáváno.

V poslední verzi programu pro vyrovnávání pozadí obrázků (autor Ing. Tomáš Zikmund) označí uživatel v prvním obrázku série místa, kde se nenachází pozorovaný objekt. Program pak pracuje pouze s označenou oblastí, okolím pozorovaného objektu. Pomocí metody nejmenších čtverců určí nejvhodnější kubickou plochu, kterou lze vybraná místa obrázku dobře proložit a extrapoluje ji i do označených oblastí (viz obr. 6). Vznikne tak obrázek deformace pozadí bez pozorovaného objektu. Tato deformace pozadí se počítá pro každý obrázek zvlášť a je pak odečtena od obrázků fáze a jednotlivé obrázky fáze jsou tedy narovnány.



Obrázek 6: Postup odečtení pozadí fáze

4.3 Srovnání obrázků na stejnou hodnotu fáze pozadí

Protože z měření jsou získávány vlivem navazování fáze obrázky různě posunuté v ose z, je vhodné je pro další práci s nimi srovnat tak, aby pozadí všech obrázků měla stejnou hodnotu fáze.

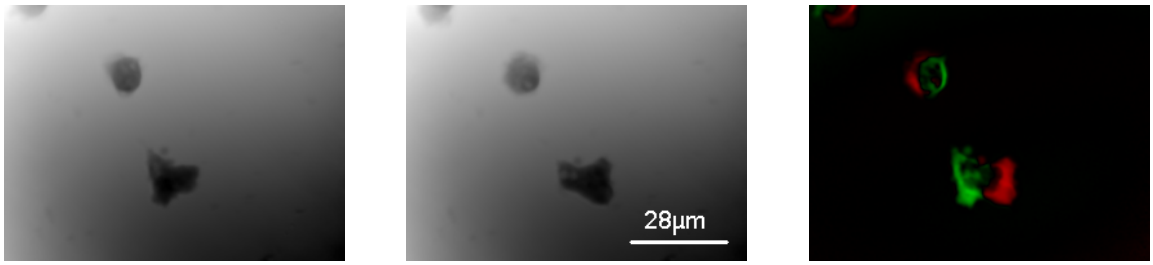
V každém obrázku zvlášť se vyhledá nejčetnější hodnota pozadí a ta se nastaví na nulovou hodnotu ve fázi. Pro eliminaci záporných hodnot fáze je nakonec přičtena ke každému snímku minimální velikost hodnoty fáze všech snímků.

5 Numerické zpracování fáze

Pro vyhodnocení kvantitativních změn rozmístění buněčné hmoty během experimentu byla používána metoda Dynamických fázových diferencí [3]. Metoda zpracovává holograficky zrekonstruované zobrazení fáze při časosběrných pozorováních tak, že od obrázku fáze odečte předcházející obrázek fáze a výsledek uloží do jiného obrázku v časosběrné sérii pozorování. Získají se tak kladné a záporné hodnoty fáze. Kladné hodnoty odpovídají místům, kde v obrázku fáze oproti minulému obrázku přibyla a zobrazí se červenou barvou, záporné hodnoty jsou v místech, kde fáze ubylo a zobrazí se zelenou barvou. Jas barvy odpovídá velikosti změny fáze. Získaný obrázek vypovídá o změně rozmístění suché hmoty v buňce v průběhu pozorování.

Z každé série obrázků se vykreslí graf závislosti změny rozmístění suché hmoty v buňce na čase. Hodnoty změny jsou v grafu určeny jako relativní, tedy hodnota změny suché hmoty v obrázku dělená celkovou hodnotou suché hmoty v obrázku, a proto lze jednotlivé grafy mezi sebou porovnávat. Pokud je z grafu vypočtena například střední hodnota, je možné zhodnotit pohyblivost buněk v jednotlivých měřeních.

Metodu Dynamických fázových diferencí lze pro vyhodnocování dat používat s různým krokem diference. Ukázalo se, že kratší diferenční krok je vhodný ke zviditelnění drobného pohybu hmoty uvnitř buněk. Delší diferenční krok je naopak lepší k zobrazení pohybu hmoty jako celku.



(a) (b) (c)

Obrázek 7: Fáze buňky DD před vyrovnáním pozadí v čase (a) t, (b) t+20 s, (c) Dynamické fázové diference

6 Dictyostelium discoideum (DD)

6.1 Přírodopisné zařazení

Dictyostelium discoideum (DD), často popisované jako „společenská améba“, bylo prvně popsáno v polovině 19. století a zpočátku klasifikováno jako druh houby. Následná fylogenetická analýza* (výrazy označené hvězdičkou jsou vysvětleny ve slovníku biologických pojmů na konci práce) vedla však k jeho zařazení společně s několika dalšími druhy do nové monofyletické skupiny* nazývané Amoebozoa, která je odlišná od zvířat, hub, rostlin i jednobuněčných organismů [7].

Doména: Eucaryota (eukaryota)
Říše: Amoebozoa (měňavkovci)
Oddělení: Mycetozoa (hlenky)
Třída: Dictyosteliomycetes (diktyostelidy)
Řád: Dictyosteliales
Čeleď: Dictyosteliaceae
Rod: Dictyostelium
Binomické jméno: Dictyostelium discoideum

6.2 Výskyt DD

V přírodě se vyskytují v půdě listnatých lesů a v tlejícím listí. Za laboratorních podmínek jsou pěstovány na agaróze* s bakteriemi nebo v kapalném živném médiu [8].

6.3 Životní cyklus DD

DD je jednobuněčný mikroorganismus měňavkovitého tvaru o velikosti asi 10 μm. Pohybuje se pomocí panožek. Živí se bakteriemi, které konzumuje fagocytózou* a množí se binárním dělením každých 8-10 hodin.

Pokud se z okolí buněk DD vyčerpá veškerá potrava, mají buňky DD dvě možnosti jak přežít. Buď pohlavním způsobem vytvoří mnohobuněčné makrocysty, nebo nepohlavně vytvoří plodnice nesoucí spory. Pro pozorování je vhodný především nepohlavní způsob rozmnožování, který je dále popsán.

Při vyhladovění buňky DD získávají schopnost syntetizovat a rozpoznávat cyklický adenosinmonofosfát (cAMP*), odpovídat na jeho signály a odbourávat ho. Některé hladovějící buňky DD začnou v určitých intervalech produkovat cAMP, který se difúzí šíří do okolí. Sousední buňky DD detekují cAMP tak, že se cAMP naváže na povrchové receptory. Tyto buňky DD pak jednak začnou syntetizovat další cAMP a jednak začnou vykonávat chemotaktický* pohyb směrem ke zdroji cAMP. Je zajímavé, že buňky DD dokážou změnu v koncentraci cAMP vůbec rozeznat, neboť změny jsou velmi malé. Na vzdálenosti rovné velikosti buňky činí změna koncentrace přibližně dvě procenta.

Periodickým opakováním těchto dějů se buňky DD nakonec shluknou do agregačních center, které jsou tvořeny útvary až o 100 000 buněk. Po seskupení vzniká několik buněčných typů, které se prostorově organizují ve vývojové struktury (volný agregát, těsný agregát, prst, slimáček, viz obr. 8).

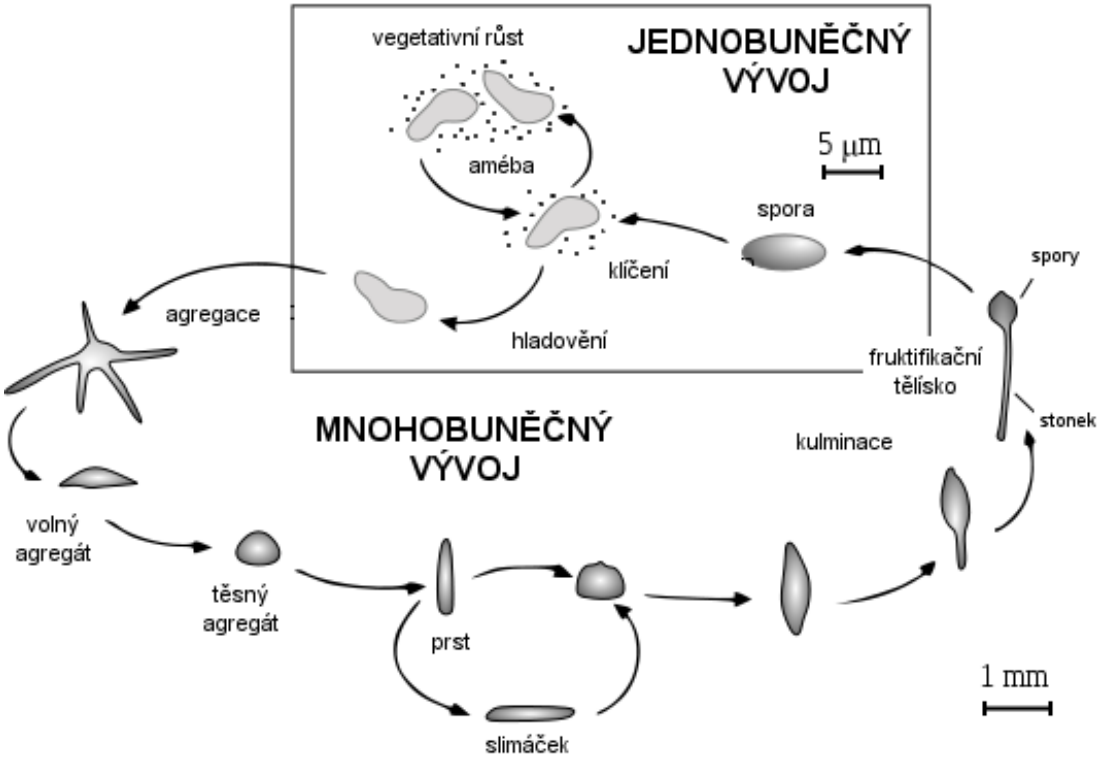
Relativně plochý volný agregát se přemění na těsný agregát hemisférického tvaru. Na něm se nejprve objeví špička, která se poté prodlužeje a nabývá tvaru prstu. Ve fázi

prstu se vyskytuje několik typů buněk. Například přední část prstu je složena z předstonkových buněk a v zadní části se pak vyskytují předsporové buňky. Po fázi prstu může podle okolních podmínek nastat buď přímá kulminace v místě shluku a nebo přechodná fáze pohybujících se slimáčků s pozdější kulminací na jiném místě. Slimáčci reagují na světlo a teplotu a jejich pohyb je dosažen koordinací pohybu jednotlivých buněk. Svými předními buňkami produkuje slimáček celulózní pochvu, podél které se pak ostatní buňky posunují. Část této pochvy pak zůstává za slimáčkem jako stopa jeho pohybu.

Organizovaná kulminace vyžaduje koordinaci buněčného pohybu a závěrečné diferenciace každého buněčného typu. Předstonkové buňky ze špičky tvoří stonkovitou trubku, která roste svrchu dolů, aby zvedla plodnici obsahující spory vzniklé z předsporových buněk ze substrátu. To pomáhá rozptýlení spor, které dokážou ve vrcholu plodnice přečkat nepříznivé podmínky.

Za příznivých podmínek spory naklíčí a je zahájen buněčný vývoj. Buňky DD se množí, živí a volně pohybují dokud se opět nevyčerpá potrava v jejich okolí a celý životní cyklus se nezačne opakovat.

V laboratoři mohou být buňky DD pěstovány v mediu zbaveném živých organismů, které dovoluje pěstovat velké množství buněk [7],[8].



Obrázek 8: Životní cyklus DD, převzato z [8]

6.4 Oblast použití DD

DD se běžně používá jako modelový organismus v molekulární biologii, genetice, chemii i fyzice. Je užíváno ke studiu buněčné diferenciace, chemotaxe a programované buněčné smrti, což jsou všechno normální buněčné procesy. DD se také využívá ke studiu dalších vývojových aspektů, např. fagocytózy, cytokineze*, pohyblivosti buněk, tvorby struktur,

signálních transdukčních drah*, mezibuněčné komunikace, vývoje mnohobuněčného organismu z jednotlivých buněk. DD je blízce příbuzné vyšším mnohobuněčným organismům, proto při pochopení pochodů odehrávajících se u DD je možné lépe porozumět i pochodům objevujícím se u vyšších organismů. Výhodou studia DD je jeho jednoduchá stavba, krátká reprodukční doba, a tedy možnost připravit velké množství buněk DD v krátkém čase, dále relativně jednoduchý genetický kód, a tudíž možnost snadno popsat genom a připravit různé mutanty [8].

6.5 Pozorování životního cyklu DD na Petriho misce

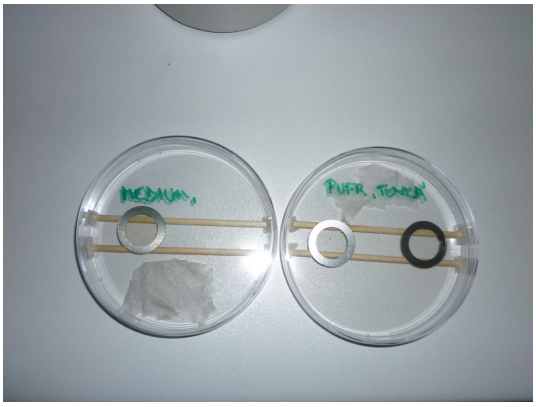
Na Petriho misce byla vytvořena souvislá vrstva potravy (bakterie) a doprostřed misky byly dány buňky DD. Buňky DD začaly pomocí fagocytózy požírat bakterie, rozmnožovat se a zvětšovat svoje území (kruhový útvar, kde byly bakterie již zkonzumovány a zůstaly zde pouze DD). Protože DD uvnitř kruhového útvaru neměly dostatek potravy, vyhladověly a začaly vývojový cyklus, při němž se výše popsaným způsobem tvoří plodnice nesoucí spory.

K vyhladovění jednotlivých DD docházelo postupně s časovým odstupem (nejdříve vyhladověly buňky uprostřed misky, pak v oblasti se zvětšujícím se poloměrem), a proto bylo možné na jednom preparátu pozorovat několik vývojových stupňů najednou.

7 Kultivace a příprava buněk DD pro pozorování

Buňky DD byly uchovávány ve sterilních lahvičkách uzavřených prodyšným víčkem s filtrem, jejichž tvar je zachycen na obr. 9a. Lahvičky byly doplněny živným mediem. Objem lahvičky byl 50 ml. Lahvičky byly uchovávány s kultivačním povrchem vodorovně na temném místě se stálou teplotou v rozmezí 19 – 22 °C. Ideální teplota pro skladování je 21 °C. Buňky DD tvoří na dně lahvičky sedlinu. Tato sedlina je dobře patrná i pouhým okem, pozoruje-li se kultivační povrch proti světlu. Protože se jedná o geneticky modifikovaný organismus, je nutné buňky DD po použití zničit v alkoholu nebo savu.

Obrázek 9: (a) Kultivační lahvička



(b) Komůrky připravené na pozorování

7.1 Výměna media

Protřepáním lahvičky a výměnou media bylo zajišťováno obnovení populace buněk DD. Výměna media byla prováděna ve flowboxu, který zajišťoval čistotu pracovního prostředí. Lahvička byla protřepána, tzn. ze spodu bylo uhozeno do lahvičky, aby se část buněk uvolnila z kultivačního povrchu lahvičky. To, že se buňky DD uvolnily z kultivačního povrchu bylo možné poznat podle toho, že se medium zakalilo. Poté bylo odsáto staré medium i s částí buněk DD a do lahvičky bylo dáno stejné množství nového media, obvykle $8-10$ ml na lahvičku. Zbylé buňky měly dostatek živin v podobě nového media a rychleji se množily. Medium je nutné buňkám měnit v intervalu $4-7$ dnů. Takto je možné buňky DD uchovávat až 2 měsíce.

7.2 Příprava buněk DD na pozorování

Buňky DD byly pozorovány v mediu a v pufru. Pufr je sloučenina slabé kyseliny a slabé zásady, která zachovává téměř stabilní pH. K buňkám DD byl dáván proto, že neobsahuje živiny a buňky DD v něm hladoví. Vyhladovělé buňky DD jsou citlivější k vnějším podnětům, např. ke změně koncentrace cAMP, a jsou pohyblivější [9].

Pro pozorování v transmisním DHM byly používány stacionární pozorovací komůrky, které byly vyrobeny tak, aby vyhovovaly podmínkám živých buněk a podmínkám zobrazení objektivy. Maximální velikost komůrek byla omezena geometrií mikroskopu. Pevnou část komůrky tvořilo krycí sklíčko o průměru 22 mm a tloušťce 0,17 mm. Toto sklíčko bylo připevněno silikonem k nerezovému mezikruží s vnějším průměrem 22 mm, vnitřním průměrem 15 mm a tloušťkou 0,5 mm nebo 0,3 mm. Tyto rozměry vymezovaly životní prostor buněk. Použitý silikon vyhovoval podmínkám netoxičnosti a byl odolný vůči alkoholu a vyživovacímu médiu buněk. Pro pozorování byla komůrka uzavřena dalším krycím sklíčkem o stejných rozměrech, které bylo k pevné části připojeno vakuovou vazelínou a které bránilo vysychání komůrky při pozorování.

Buňky DD bylo na pozorování potřeba připravit den dopředu. Příprava probíhala takto: Mikroskopem s klasickým fázovým kontrastem byl zkontrolován stav buněk DD a byla vybrána vhodná lahvička s buňkami DD. Mrtvé buňky DD částečně plavou, jsou zakulaceného tvaru a na okrajích buněk DD se tvoří výrazné halo. Buňky DD vhodné pro pozorování jsou přisedlé ke kultivačnímu povrchu a mají dobře zřetelný okraj. Pipetou bylo odsáto medium s odumřelými buňkami a bylo nahrazeno novým mediem nebo pufrem.

Těsně před pozorováním bylo medium (pufr) opět odsáto a nahrazeno cca 3 ml nového media (pufru), kterým byly buňky DD několikrát spláchnuty z kultivačního povrchu. To znamená, že z lahvičky bylo opakovaně pipetováno určité množství media (pufru), které bylo vstřikováno zpět do lahvičky po kultivačním povrchu tak, aby se buňky DD uvolnily z kultivačního povrchu do media (pufru). Do připravených komůrek s okraji potřenými vazelínou, bylo pipetováno 150 μl buněk DD v mediu nebo pufru, do komůrky pro referenční větev mikroskopu bylo dáno stejné množství media (pufru). Buňky DD byly nechány přibližně 20 minut, aby přisedly k povrchu komůrky, pak byly pozorovány.

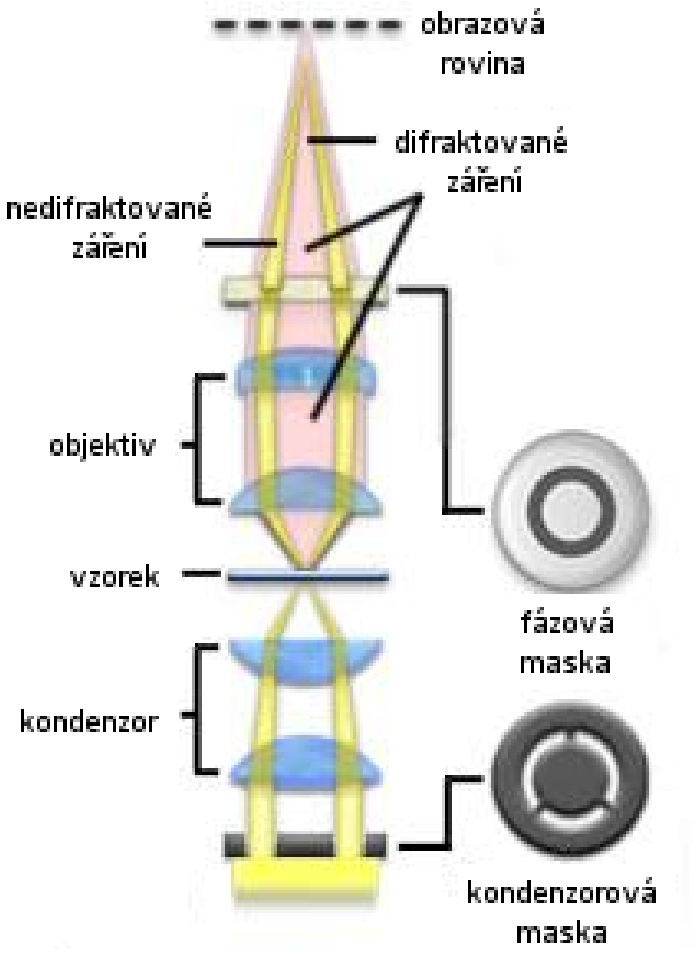
8 Zobrazení buněk DD metodou klasického fázového kontrastu

8.1 Metoda klasického fázového kontrastu

Tuto metodu pro zlepšení pozorování průhledných, zejména biologických vzorků objevil Frits Zernike v roce 1934.

K zviditelnění změny fáze dochází pomocí interference záření difraktovaného vzorkem s vhodně fázově posunutým nedifraktovaným zářením. Obvyklá konstrukce mikroskopu ke zviditelnění fázového kontrastu (viz obr. 10) se skládá z clony ve tvaru mezikruží umístěné v ohniskové rovině kondenzoru. V ohniskové rovině objektivu je pak umístěna fázová clona ve tvaru mezikruží, na které dochází k fázovému posunu mezi předmětem difraktovanými a nedifraktovanými paprsky tak, aby jejich vzájemný fázový posuv byl $\lambda/2$ a tím bylo dosaženo maximálního kontrastu intenzity.

Nevýhodou tohoto zobrazení ovšem je, že v důsledku prstencové aperturní clony dochází v místech s větším gradientem optické tloušťky, tj. především na okrajích pozorovaných předmětů, ke vzniku prstencového halo efektu [10].



Obrázek 10: Schéma mikroskopu pro klasický fázový kontrast, převzato z [11]

8.2 Experimenty pozorované mikroskopem s klasickým fázovým kontrastem

Mým školitelem na stáži v Laboratoři katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity byl RNDr. Daniel Rösel, Ph.D. Seznámila jsem se zde se základní problematikou DD, jejich uchováváním, přípravou k pozorování a se základními principy a pravidly práce s biologickým materiálem. V době mé stáže byla provedena tato pozorování:

- chemotaxe pod agarózou,
- pozorování buněk DD,
- natáčení buněk DD.

8.2.1 Chemotaxe pod agarózou

Chemotaxe pod agarózou je experiment, při kterém lze pozorovat v Petriho misce reakci buněk DD na cAMP. Agaróza je gelovitá hmota, často používaná při mikrobiologických experimentech právě proto, že je podobná přirozenému životnímu prostředí buněk. V odborné praxi lze pozorovat různě modifikované DD, zkoumat rychlost jejich pohybu, vytrvalost a četnost buněk DD v daných vzdálenostech [9].

Postup experimentu:

Příprava misek: K 0,25 g agarózy bylo přidáno 50 ml pufru a vzniklá směs byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí agarózy bylo do každé Petriho misky o průměru 6 cm dáno vždy 8 ml agarózy. Bylo připraveno 6 misek. Pak byl do zbylé agarózy přidán kofein a byly nachystány další 3 misky. Kofein ruší vzájemnou signalizaci pomocí cAMP mezi buňkami DD a buňky DD se pak pohybují pouze v reakci na chemoatraktant. Všechny misky byly dány asi na 30 minut do lednice, aby gel lépe ztuhl. Po ztuhnutí gelu byly uprostřed každé misky vyříznuty tupou punkční jehlou 3 jamky o poloměru asi 1,5 mm v řadě za sebou v rozestupu asi 5 mm a misky byly vráceny na chvíli do lednice, aby i jamky zatuhly. Před samotným pozorováním byly misky vytemperovány na 21°C a z jamek byla odsáta přebytečná agaróza.

Příprava buněk: Den předem byla připravena část buněk DD do media, část do pufru, a část jich byla dána do pufru a na třepačku. V běžném výzkumu se standardně používají buňky kultivované v třepané kultuře na doporučenou hustotu mezi $1{,}5 - 5 \times 10^6\,\mathrm{ml}^{-1}$. Pokud se nechají buňky DD třepat přes noc, buňky DD hladoví, idukují se vývojové geny a tím i vnímavost k cAMP. Protože však v naší laboratoři na VUT třepačku nemáme, byl experiment proveden i s netřepanými buňkami DD. Jejich hustota pak byla určena pod mikroskopem v počítací komůrce. Hustota našich buněk DD byla o něco nižší než doporučená.

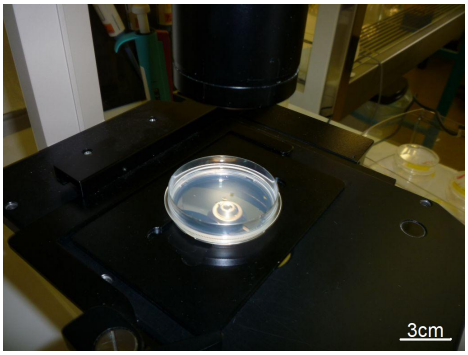
Vysetí do jamek: Do krajních jamek bylo dáno 10 μl suspenze buněk DD. Byly použity uvedené tři druhy buněk DD tak, že každý druh byl dán vždy do dvou normálně připravených misek a do jedné misky s kofeinem. Do centrální jamky bylo dáno 10 μl 1 μM cAMP k buňkám DD ze třepačky a z pufru. K buňkám DD z media bylo dáno 10 μl 1 mM folátu (kyseliny listové), což je bakteriální produkt, který buňkám DD signalizuje přítomnost potravy v podobě bakterií.

Parametry pozorování:

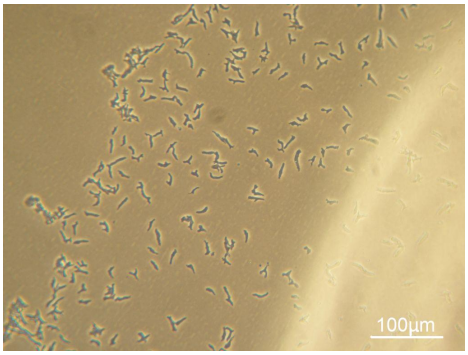
- mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CK2,
- objektiv Olympus LWD C 20×/0,40, Pl,
- fotoaparát Olympus Sp-350.

Pozorování a výsledek experimentu: Nachystané misky byly ponechány v klidu asi 3 hodiny, aby buňky DD mohly reagovat na cAMP nebo folát, a poté byly pozorovány pod mikroskopem. Pozorovaná chemotaxe byla nejlépe vidět na buňkách DD z pufru pod agarózou, do které jsme přidali kofein. I u ostatních buněk DD, které přes noc hladověly v pufru, byla chemotaxe dobře zřetelná. Některé buňky DD se díky chemotaxi za 3 hodiny posunuly až o několik stovek mikrometrů (viz obr. 11b). Naopak u buněk DD ze třepačky a z media byla chemotaxe velmi slabá.

Z experimentu plyne, že pro chemotaktický pohyb buněk DD není nutné buňky DD speciálně pěstovat v třepané kultuře. Takový experiment by proto mohl být realizován i v podmínkách naší laboratoře. Vzhledem k omezení velikosti pozorovacích komůrek geometrií transmisního DHM však nemohl být realizován.



(a)



(b)

Obrázek 11: (a) Celkový pohled na Petriho misku s agarózou a DD, (b) Chemotaxe pod agarózou (buňky DD a okraj vyříznuté jamky)

8.2.2 Pozorování buněk DD

Při tomto experimentu byly testovány podmínky, při kterých budou buňky DD pozorovány v laboratoři na VUT.

Parametry pozorování:

- mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CK2,
- objektiv Olympus LWD C 20×/0,40, Pl,
- fotoaparát Olympus Sp-350.

Příprava komůrek a krycích sklíček: Komůrky i krycí sklíčka byly nejprve odmastěny jarem, opláchnuty vodou, destilovanou vodou a alkoholem a poté byly ponořeny do alkoholu (min 70%) alespoň na 10 minut. Nakonec byly jednotlivé komůrky a sklíčka nechány oschnout ve flowboxu.

Příprava buněk: Byly vyzkoušeny tři komůrky. Pro lepší manipulaci s komůrkami byly vyrobeny do větší Petriho misky kolejničky a přidán do ní navlhčený ubrousek, aby byla v uzavřené misce vyšší vlhkost a komůrky nevysychaly, viz obr. 9b.
Do komůrek byly dány buňky DD takto:
- do první komůrky 300 μl suspenze buněk DD v mediu
- do druhé 100 μl suspenze buněk DD v mediu a 200 μl čistého media
- do třetí (menší komůrky) 150 μl suspenze buněk DD v mediu

Komůrky byly ponechány cca 0,5 hodiny v klidu, aby buňky DD vytvořily sedlinu na dně komůrky. Poté bylo pipetou odsáto medium a komůrky byly propláchnuty pufrem, do všech komůrek bylo dáno 150 μl pufru a komůrky byly přiklopeny krycími sklíčky.

Pozorování a výsledek experimentu: Ve všech připravených komůrkách byly buňky DD dobře viditelné, bylo zjištěno, že buňky DD takto lze pozorovat a při opatrné manipulaci s komůrkami není nutné ke komůrce krycí sklíčko nijak lepit nebo jinak připevňovat.

8.2.3 Natáčení buněk DD

Buňky DD byly natáčeny v místnosti klimatizované na 21 °C. Cílem experimentu bylo ověřit pohyblivost buněk DD v pozorovacích komůrkách pro transmisní DHM.

Parametry pozorování:

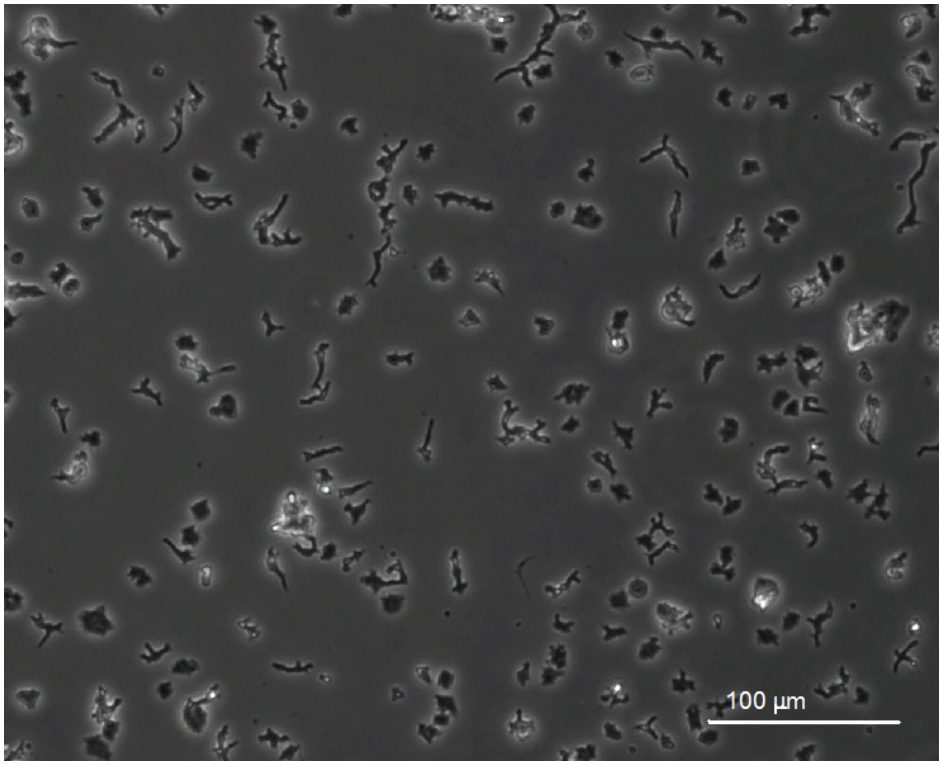
- invertovaný mikroskop Nikon ECLIPSE TE 2000-S,
- objektiv Nikon ELWD Plan Fluor 20 × 0,45,
- kamera VDS Vosskuhler, CCD1300QB,
- 1280 × 1024 aktivních pixelů,
- velikost pixelu 6,45 μm × 6,45 μm.

Příprava buněk DD: Z předešlého dne byly buňky DD připravené v mediu a v pufru. Z lahviček bylo odsáto medium i pufr (vždy asi 8 ml) a bylo pipetováno 3 ml nového media a pufru. Buňky DD byly několikrát spláchnuty a setřepány z kultivačního povrchu lahvičky. Do komůrek bylo dáno vždy 150 μl buněk DD s mediem nebo pufrem. Buňky DD byly ponechány cca 0,5 hodiny sednout, poté byly komůrky přikryty sklíčkem a pozorovány pod mikroskopem. Byla použita vždy jedna komůrku o tloušťce 0,5 mm a jedna o tloušťce 0,3 mm s buňkami DD v mediu a v pufru.

Průběh pozorování: První dvě pozorování byla snímkována po 30 s, celkový čas pozorování byl asi 20 minut. Snímky byly zpracovány do videí. Ukázalo se, že na těchto videích působí pohyb buněk DD velmi trhaně. Buňky DD v pufru jsou patrně o něco pohyblivější než v mediu. Protože k buňkám DD nebyl přidán žádný atraktant, byl pohyb buněk DD chaotický, avšak pro naše pozorování dostačující.

Následně byl snímkovací interval zkrácen na 15 s, celkový čas pozorování byl opět přibližně 20 minut a snímky byly zpracovány do videí. Tento interval snímkování byl

dostačující pro záznam spojitého pohybu buněk DD. Při pozorování v pufru bylo v zorném poli obsaženo poměrně málo buněk DD. V mediu byl počet buněk DD v zorném poli přibližně stejný jako při prvních pozorováních.
Zhodnocení pozorování: Buňky DD na videích tvořily náhodně různé shluky, ve kterých se občas i společně pohybovaly. Pohyb buněk DD byl dostatečně intenzivní a buňky DD vytvářely při pohybu zajímavé tvary, což je důležité pro další pozorování buněk DD transmisním DHM.



Obrázek 12: Buňky DD v pufru zobrazené mikroskopem Nikon ECLIPSE TE 2000-S

9 Zobrazení buněk DD transmisním DHM

9.1 Příprava a převoz buněk

Buňky DD byly připraveny v Laboratoři katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity v Praze a v polystyrenovém boxu byly ve dvou lahvičkách určených pro kultivaci buněk převezeny do Brna.

9.2 Biologické pracoviště v Laboratoři optické mikroskopie

V Laboratoři optické mikroskopie je zbudováno provizorní biologické pracoviště, které je od okolní laboratoře odděleno kvůli zatemnění závěsem. Na pracovišti jsem používala laminární flow-box Advantage pro přípravy a manipulaci s buňkami ve sterilním prostředí, mikroskop Meopta s klasickým fázovým kontrastem pro kontrolu stavu buněk, polystyrénový box pro zajištění konstantní teploty při uchovávání buněk, transmisní DHM, počítačovou jednotku a drobné manipulační zařízení pro přípravu buněk (pipety, Petriho misky, pinzety, atd).

Parametry pozorování:

- transmisní DHM,
- objektivy Nikon Plan Fluor, 20×/0,4,
- kamera SONY ICX285AL: velikost čipu 2/3”,
- 1376×1038 aktivních pixelů, 10,2 mm×8,3 mm,
- velikost pixelu 6,45 μm×6,45 μm.

9.3 První série pozorování

Buňky DD byly pro pozorování připraveny způsobem popsaným v odstavci 7.2. Buňky DD byly pozorovány v komůrkách o tloušťce 0,5 mm, přičemž krycí sklíčko bylo na komůrce pouze položeno.

Při těchto pozorováních bylo úkolem získat zobrazení se stejnými parametry jako při pozorování mikroskopem s klasickým fázovým kontrastem. Proto byl zpočátku zvolen snímkovací interval 15 s. Tento interval byl příliš dlouhý zvláště pro pozorování buněk DD v pufru, které projevovaly aktivní pohyb. Snímkování bylo proto zkráceno na interval 5 s.

Dále bylo pozorováno, že pokud je na komůrce sklíčko pouze položeno, dochází v důsledku proudění vzduchu v místnosti k vysychání komůrky, a tím ke ztrátě kontrastní interference. Proto bylo krycí sklíčko v dalších experimentech ke komůrce lepeno vazelínou.

Při přípravě experimentu je nutné rychlé nastavení mikroskopu a kontrastní interference, neboť buňky DD přežijí v uzavřené komůrce pouze asi 2 hodiny. Pozorování však může začít nejdříve 20 minut po připravení buněk DD do pozorovacích komůrek, protože buňky DD musí nejprve přisednout k povrchu komůrky. Odumřelé buňky DD nejsou přisedlé, mají kulovitý tvar a pohybují se pouze jako celky patrně v důsledku Brownova pohybu.

Na zrekonstruovaných videích z těchto pozorování byly buňky DD v pufru velmi protáhlého tvaru a pohybovaly se pomocí panožek. Buňky DD v mediu měly tvar mnohem méně protažený a panožky tvořily jen zřídka.

9.4 Druhá série pozorování

Při těchto pozorováních byl snímkovací interval zkrácen na 1 s. Úkolem bylo nasnímat dostatečné množství kvalitních snímků, aby snímky mohly být zpracovány do delších videí a metodou Dynamických fázových diferencí.

Buňky DD byly pozorovány v komůrkách o šířce 0,5 mm, krycí sklíčko bylo na komůrce přilepeno vazelínou.

Při pozorování buněk DD v pufru se buňky DD hodně shlukovaly, shluky buněk DD byly vidět i pouhým okem na dně kultivační lahvičky. Ve zrekonstruovaných videích byly buňky DD opět protáhlého tvaru (viz obr. 13 a obr. 15) a projevovaly aktivní pohyb. Z některých videí je dobře patrný základní mechanizmus pohybu buněk DD pomocí panožek.

Při pozorování buněk DD v mediu bylo v zorném poli vždy poměrně velké množství buněk DD neprotaženého tvaru (viz obr. 14 a obr. 16). Aktivní pohyb pomocí panožek není v rekonstruovaných videích zřejmý.

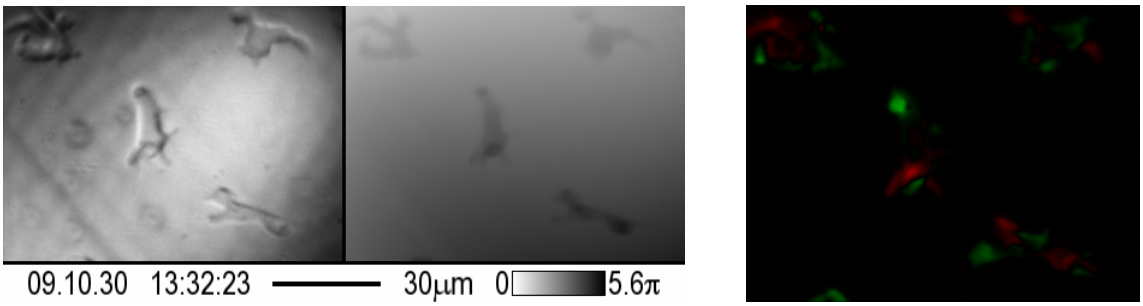
9.5 Třetí série pozorování

Dále jsem se rozhodla napozorovat buňky DD v ještě kratších časových intervalech a soustředit se především na mechanizmus pohybu buňky DD a tvorbu panožek.

Interval snímkování byl zkrácen, použité objektivy zůstaly stejné. Buňky DD byly pozorovány v komůrkách o tloušťce 0,5 mm, krycí sklíčko bylo na komůrce přilepeno vazelínou. Snímkování bylo nastaveno na interval 0,6 s a 0,2 s.

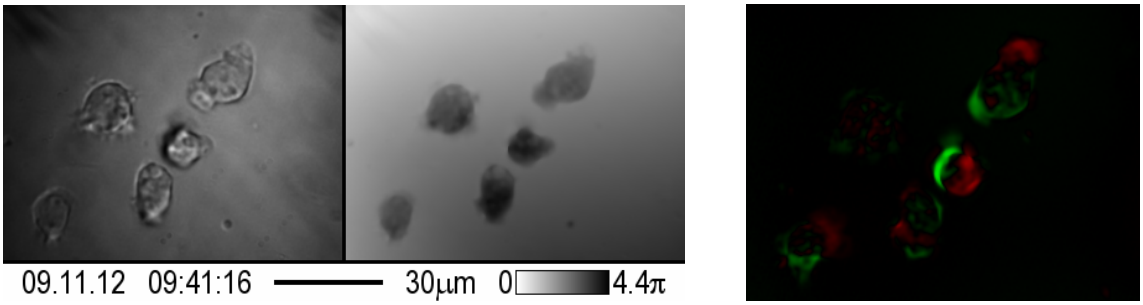
Na videích rekonstruovaných z obrázků snímkovaných v intervalech kratších než 1 s nebyl u buněk v mediu patrný aktivní pohyb a videa byla spíše statická. Při zpracování obrázků buněk v mediu i v pufru metodou postupných fázových diferencí se objevilo velké množství šumu a samotné zvýraznění buněčného pohybu v tomto zpracování téměř zaniklo. Metoda nebyla schopná odlišit malé změny probíhající v buňce DD od změn v okolí a použitý interval snímkování se tedy projevil jako nevhodný pro toto pozorování.

Ze snímků napozorovaných ve třetí sérii byly proto vybrány jen některé snímky tak, aby byl sjednocen snímkovací interval na 1 s a vzniklé série byly zpracovány.



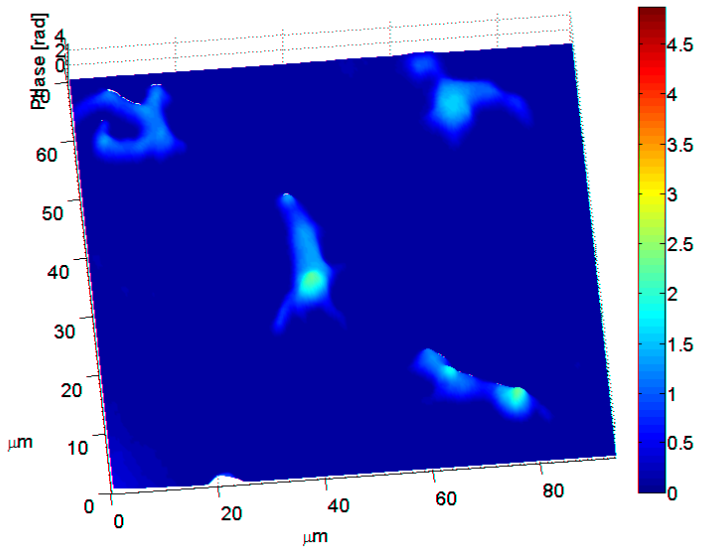
(a) (b)

Obrázek 13: (a) Zobrazení intenzity a navázané fáze buněk DD v pufru (b) Dynamické fázové diference buněk DD v pufru

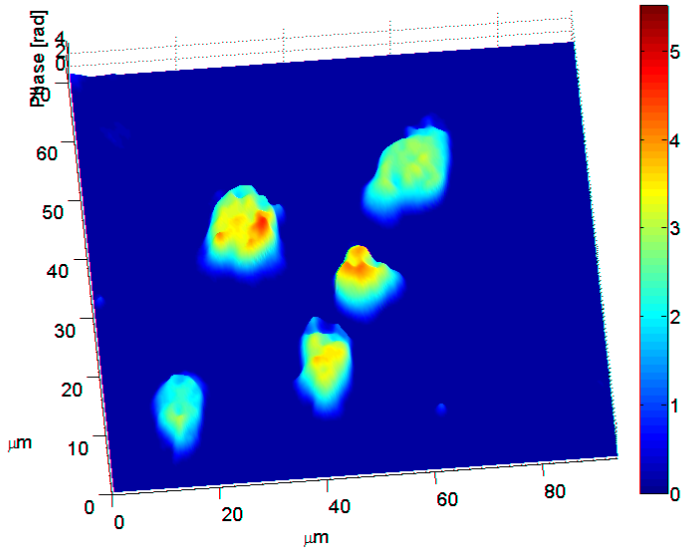


(a) (b)

Obrázek 14: (a) Zobrazení intenzity a navázané fáze buněk DD v mediu (b) Dynamické fázové diference buněk DD v mediu



Obrázek 15: 3D vizualizace navázané fáze buněk DD v pufru



Obrázek 16: 3D vizualizace navázané fáze buněk DD v mediu

9.6 Vyhodnocení naměřených dat

Z druhé a třetí série pozorování bylo získáno 11 souborů obrázků snímkovaných po 1 s buněk DD v mediu a 22 souborů obrázků snímkovaných po 1 s buněk DD v pufru. Snímkovací interval 1 s je dostatečný k dobrému zachycení pohybu buňky a při dalších zpracováních nezaniká pohyb buňky v šumu. Obrázky byly zpracovány výše popsaným způsobem ve videa zobrazující 3D podobu buněk DD, kde třetím rozměrem je fáze. Dále byly snímky zpracovány metodou Dynamických fázových diferencí s diferenčním krokem 1, který odpovídá časovému intervalu 1 s, a s diferenčním krokem 20, časovým intervalem 20 s. V každém souboru byla vypočtena hodnota označená B, což je střední hodnota velikosti změny rozložení fáze buňky DD vztažená k celkové fázi v obrázku. Dále byla určena průměrná hodnota B pro medium a pufr v obou diferenčních krocích, která charakterizuje průměrnou relativní pohyblivost buněk DD ve smyslu přesunů jejich suché hmoty. Tyto průměrné hodnoty B jsou uvedeny v následující tabulce.

prostředí	diferenční krok 1	diferenční krok 20
medium	0,019	0,034
pufr	0,027	0,051

Tabulka 1: Průměrné hodnoty B

V měřeních se tedy podařilo prokázat, že buňky DD jsou v pufru pohyblivější než v mediu. Hodnota změny rozložení hmoty v buňce DD s diferenčním krokem 1 přitom odpovídá spíše drobným změnám uvnitř buňky DD a hodnata s diferenčním krokem 20 více vypovídá o celkovém pohybu buněk DD.

Ze zpracovaných videí je zřejmé, že buňky DD mají v pufru protáhlejší tvar a tvoří více panožky než buňky DD v mediu. Pohyb buňek DD je v mediu i pufru spíše chaotický. Pokud se buňka DD pohybuje jedním směrem, dokáže za několik minut urazit i desítky μm. Při pozorování pohyblivějších buněk v pufru je však nevýhodou malý rozměr zorného pole transmisního DHM. V provedených měřeních se nepodařilo najít statisticky významnou závislost mezi rozložením hmoty uvnitř buňky DD v okamžiku tvorby panožky a pohybem buňky ve směru této panožky.

10 Závěr

V rámci bakalářské práce jsem si nejdříve osvojila techniku kultivace buněk DD a jejich přípravy pro pozorování metodou klasického fázového kontrastu v Laboratoři katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Karlovy univerzity.

Poté jsem zavedla kultivaci a pozorování buněk DD v Laboratoři optické mikroskopie na ÚFI FSI VUT v Brně.

Při pozorování buněk DD v transmisním DHM jsem stanovila vhodné parametry pozorování. Zpracovaním pozorování v transmisním DHM metodou Dynamických fázových diferencí a jejím vyhodnocením jsem potvrdila předpoklad, že buňky DD jsou pohyblivější v pufru než v mediu.

Úspěšně jsem tak rozšířila oblast použití transmisního DHM o novou aplikaci, kterou je výzkum dynamiky pohybu buněk DD.

Další práce bude směřována k podrobnějšímu výzkumu mechanizmu pohybu buněk DD pomocí panožek, případně k výzkumu samouspořádávání buněk DD na různých nanostrukturách.

Slovník biologických pojmů

Fylogenetická analýza - srovnáváním nukleotidových sekvencí DNA se snaží najít vývojové vztahy mezi organismy, vychází z předpokladu, že druhy, které jsou si genově navzájem nejbližší, jsou si evolučně nejpříbuznější [12]

Monofyletická skupina - skupina zahrnující svého společného předka a všechny jeho potomky [13]

Agaróza - připravuje se z agaru, což je přírodní polysacharid s vysokou gelující schopností, který se vyrábí z červených mořských řas, používá se jako živné médium pro kultivaci mikroorganismů a rostlin [14]

Fagocytóza - způsob přijímání potravy, obklopení potravy panožkami, které se posléze svými konci spojí [15]

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát, zde používaný jako chemoatraktant, tj. chemická látka, na kterou buňky reagují svým pohybem [16]

Chemotaxe - pohyb organismu či buňky ve směru chemického gradientu [17]

Cytokineze - děj, při kterém se mateřská buňka fyzicky rozdělí na dvě dceřinné buňky [18]

Signální transdukční dráhy - zajišťují převod signálu z vnějšku buňky do nitra buňky [19]

Literatura

Reference

[1] CHMELÍK, R.: Digitální holografická mikroskopie. *Sborník přednášek Aplikovaná optika a mikroskopie 2008*, 2008, s. 24-34.

[2] BARER, J. and JOSEPH, S: Refractometry of living cells. Part I. Basic Principles. *Qaurterly Journal of Microscopical Science* 95, 1954, s. 399-423.

[3] UHLÍŘOVÁ, H.: *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů.* [Dizertační práce] Brno: VUT, FSI, 2009. 72 s.

[4] CHMELÍK, R. and HARNA, Z.: Parallel-mode confocal microscope.*Opt. Eng.* 38, 1999, s. 1635-1639.

[5] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskpie biologických vzorků.* [Diplomová práce] Brno, VUT, FSI, 2006. 54 s.

[6] MIKŠ, A. *Zobrazovací metody v optické mikroskopii* Dostupné z WWW: http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/mikroskopicke-metody/

[7] ESCALANTE, R. and VICENTE, J. J.: Dictyostelium discoideum: a model systeme for differentiation and patterning. *Int. J. Dev. Biol.* 8, 2000, s. 819-835. Dostupný také z WWW: http://www.ijdb.ehu.es/web/contents.php?vol=44issue=8

[8] Dictyostelium discoideum *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-03-18]. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/Dictyostelium discoideum.

[9] MAHDEO, DC. and PARENT,CA. Signal relay during the life cycle of Dictyostelium. *Curr Top Dev Biol.* 73, 2006, s.115-140.

[10] HOŠEK, J.: Přehled klasických a moderních mikroskopických metod. *Sborník přednášek Aplikovaná optika a mikroskopie 2008,* 2008, s. 12-23.

[11] http://www.microscopyu.com/print/articles/phasecontrast/phasemicroscopy-print.html.

[12] ŠMARDA, J.: *Genetika pro gymnázia.* 2003. 144 s.

[13] Monofyletismus *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Monofyletismus.

[14] Agarose *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose.

[15] SMRŽ, J; HORÁČEK, I. a ŠVÁTORA, M.: *Biologie živočichů pro gymnázia.* 2004. 208 s.

[16] CAMP *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/CAMP.

[17] Chemotaxe *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Chemotaxe.

[18] Cytokineze *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Cytokineze.

[19] Signal transduction *In Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/Signal transduction.