VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

KOHERENCÍ ŘÍZENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP VE VÝZKUMU ŽIVOTNÍHO CYKLU BUŇKY

COHERENCE-CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE IN CELL'S LIFE CYCLE RESEARCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR´S THESIS

AUTOR PRÁCE — JAN BARTONÍČEK
AUTHOR

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

BRNO 2011

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Jan Bartoníček

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901R043)**

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

Koherencí řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky

v anglickém jazyce:

Coherence-controlled holographic microscope in cell's life cycle research

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Digitální holografický mikroskop v transmisním módu je vhodným nástrojem pro pozorování transparentních biologických preparátu. Požijte zobrazení tímto mikroskopem pro záznam a analýzu životního cyklu buňky.

Cíle bakalářské práce:

Pozorujte životní cykly buněk v holografickém mikroskopu a analyzujte je využitím dynamických fázových diferencí nebo jinou navrženou metodou. Porovnejte fáze cyklu zobrazení v tomto mikroskopu s jinou mikroskopovou technikou.

Seznam odborné literatury:

[1] Dunn G. A.: Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time. Proceedings of the Royal Microscopical Society 33, 189-196 (1998).
[2] Ross K. F. A.: Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. Edward Arnold
Ltd., London (1967).
[3] Barer R.: Interference microscopy and mass determination. Nature 169, 366-367 (1952).
[4] Cuche E., Bevilacqua F., Depeursinge C.: Digital holography for quantitative phase-contrast
imaging. Opt. Lett. 24, 291-293 (1999).
[5] Dubois F., Joannes L., Legros J.-C.: Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. Appl. Opt. 38, 7085-7094 (1999).
[6] Indebetouw G., Klysubun P.: Imaging through scattering media with depth resolution by use of low-coherence gating in spatiotemporal digital holography. Opt. Lett. 25, 212-214 (2000).
[7] Dubois F., Yourassowsky C., Monnom O., Legros J.-C., Debeir O., Ham P. V., Kiss R., Decaestecker C.: Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. Journal of Biomedical Optics 11 (5), 054032 (2006).
[8] Janečková H.: Interferenční mikroskopie biologických vzorků. Diplomová práce, Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně (2006).

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2010/2011.

V Brně, dne 16.11.2010

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc. Ředitel ústavu	prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc. Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předmětem bakalářské práce je pozorování živých buněk v transmisním holografickém mikroskopu vyvinutém na ÚFI VUT a porovnání této zobrazovací metody s mikroskopem s fázovým kontrastem. Úvodní část je věnována základnímu popisu použitých zobrazovacích technik a biologii buňky. Následuje popis přípravy experimentů. V části věnující se analýze dat je popsána metoda dynamických fázových diferencí a navržena metoda sledování růstu. Obě metody byly použity pro analýzu experimentů popsaných v poslední části práce. Experimenty byly zaměřeny na získání časosběrných dat zachycujících buněčný cyklus a zejména mitosu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Transmisní holografický mikroskop, buněčný cyklus, mitosa, dynamické fázové diference, sledování růstu.

ABSTRACT

The subject of the bachelor thesis is live-cell imaging in a transmitted-light holographic microscope which was designed at the Institute of Physical Engineering BUT and comparing this imaging method with the phase-contrast microscopy. The first part is dedicated to a basic description of used imaging techniques and a cell biology. A description of an experiment preparation follows. In the part dedicated to a data analysis the method of dynamic phase differences is described and the method of growth monitoring is proposed. Both methods were used for the analysis of experiments which are described in the last part of this work. Experiments were focused on acquiring time-lapse data of a cell's cycle and particularly the mitosis.

KEYWORDS

Transmitted-light holographic microscope, cell cycle, mitosis, dynamic phase differences, growth monitoring.

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

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

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem, zpracoval jsem ji samostatně pod odborným vedením Ing. Hany Uhlířové, Ph.D. a s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Brně dne 27. května 2011 ……..……..

Jan Bartoníček

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval Ing. Haně Uhlířové, Ph.D. za vedení této práce, rady pro práci v optické laboratoři a její bezmeznou vstřícnost. Dále bych poděkoval MUDr. Pavlovi Veselému za jeho lekce při práci v biologické laboratoři a umožnění nahlédnutí do různých odvětví biologických věd. V neposlední řadě musím poděkovat Ing. Martinu Lošťákovi, Ing. Matěji Týčovi a Bc. Janě Čollákové za jejich pomoc při provádění experimentů. Dále děkuji své rodině za soustavnou podporu při studiu.

OBSAH

Úvod 10
1 Metody zobrazování živých buněk 11
1.1 Transmisní holografický mikroskop 11
1.2 Mikroskop s fázovým kontrastem 12
2 Popis buňky a buněčného cyklu 15
2.1 Složení buňky 15
2.1.1 Chemické složení 15
2.1.2 Buněčné komponenty 16
2.2 Buněčný cyklus 17
3 Příprava experimentu 20
3.1 Kultivace a manipulace s buňkami 20
3.2 Příprava vzorku pro pozorování 22
3.3 Pozorování v transmisním holografickém mikroskopu 23
4 Analýza dat 24
4.1 Význam změny fáze 24
4.2 Dynamické fázové diference 25
4.3 Sledování růstu 27
4.4 Výběr oblasti 29
5 Výsledky experimentů 31
5.1 Transmisní holografický mikroskop 31
5.1.1 Experiment 1 – buněčné cykly 32
5.1.2 Experiment 2 – dělení dvoujaderné buňky 46
5.1.3 Závěr 49
5.2 Fázový kontrast 50
Závěr 52

ÚVOD

Vynález mikroskopu a jeho využití v biologii znamenalo velký posun v poznání života na Zemi. Možnost pozorovat mikroskopické objekty vedlo k objevu, že všechny organismy se na elementární úrovni skládají z určitých malých jednotek, zvaných buňky. Pozorování dělení buněk navíc definitivně vedlo k zamítnutí tvrzení, že živé organismy mohou vznikat samovolně. Využití mikroskopie rovněž umožnilo porozumět procesům, které se v přírodě odehrávají, například dýchání, fotosyntéza, rozmnožování a mnoho dalších.

Snaha pozorovat stále menší a menší detaily buněk hnala rozvoj zobrazovacích metod kupředu. Například pomocí fluorescenčních sond můžeme pozorovat pouze jednotlivé organely. Využití částicové optiky v rastrovacím elektronovém mikroskopu zase umožňuje detailní studium povrchů buněk. Obě metody mají význam především z hlediska studia struktury buňky. Pro jejich realizaci je však většinou potřeba buňky pevně fixovat a významně tak zasáhnout do jejich života.

Pro sledování chování buňky nebo procesů, kterými během svého životního cyklu prochází, je potřeba použít takové metody, které představují minimální zásah do života buňky. Dále je tu problém, že mnoho druhů buněk jsou transparentní a v mikroskopu se světlým polem obtížně pozorovatelné. Z těchto hledisek se jako vhodným nástrojem pro dlouhodobá pozorování jeví interferenční metody zobrazování. K mikroskopům využívajícím interferenci dvou vln patří i transmisní holografický mikroskop vyvinutý na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně. Předchozí pozorování živých buněk prostřednictvím tohoto mikroskopu byla zaměřena na sledování reakcí buněk po určitém umělém zásahu, například přidáním toxické látky do jejich živného roztoku, a na sledování pohyblivosti různých druhů buněk.

Předmětem této práce je pokračovat v započatých výzkumech sledování živých buněk v transmisním holografickém mikroskopu a zaměřit se na sledování buněčného cyklu.

Úvodní část bakalářské práce stručně popisuje použité metody zobrazování. Mimo transmisní holografický mikroskop je zde popsán mikroskop s fázovým kontrastem, který byl během experimentů také použit. Další část se věnuje obecnému popisu buňky a buněčného cyklu. Další dvě kapitoly se již vztahují k experimentům. První z nich popisuje práci s buňkami a přípravu vzorků pro pozorování. Další se pak věnuje analýze nasbíraných dat. Poslední část popisuje samotné experimenty.

1 METODY ZOBRAZOVÁNÍ ŽIVÝCH BUNĚK

První technikou použitou pro zobrazování mikroskopických objektů byl světelný mikroskop vynalezený Robertem Hookem v 17. století v Anglii. Rozvoj využití mikroskopie v biologii nastal až v 19. století, kdy němečtí biologové Matthias Shleiden a Theodor Schwann publikovali své práce, v kterých se zabývali pozorováním rostlinných a živočišných tkání ve světelném mikroskopu. Ukázali, že všechny živé tkáně se skládají z buněk [5] (str. 2).

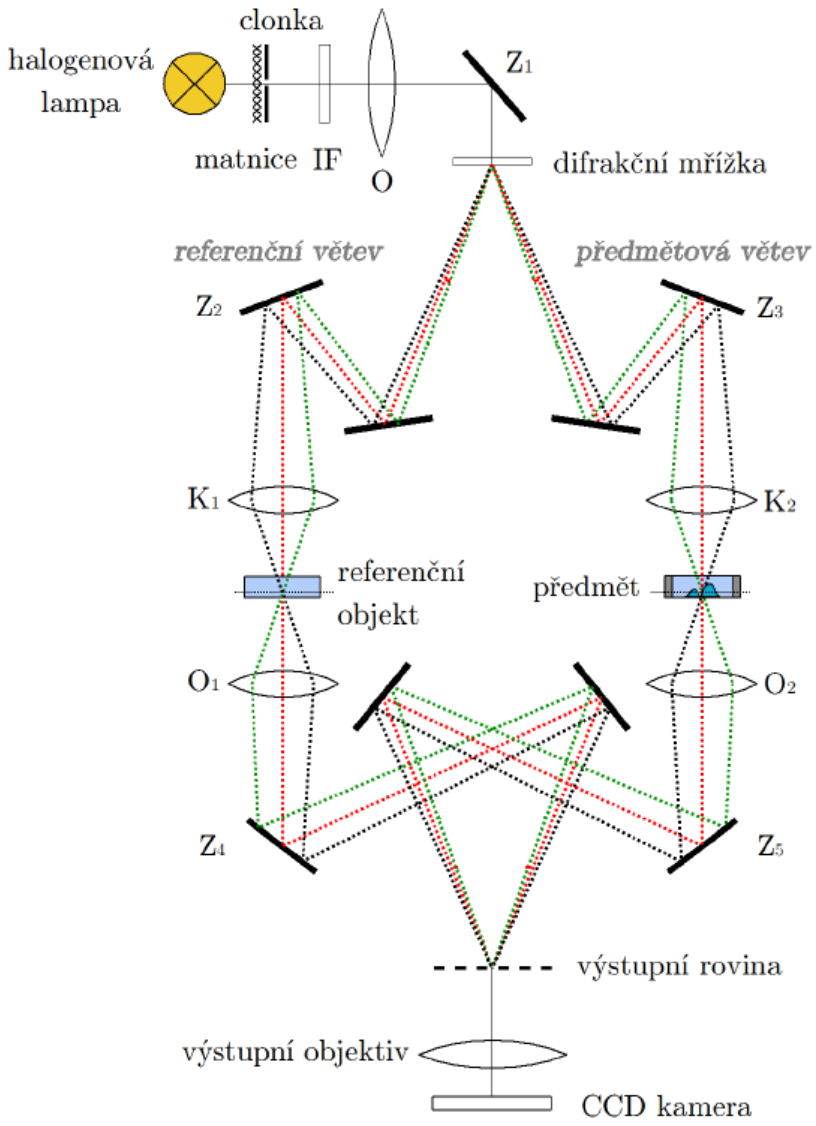
Jedním z problémů mikroskopu se světlým polem, s kterým se vědci od začátku potýkali, bylo pozorování transparentních objektů. Objekty můžeme rozdělit na dvě skupiny z hlediska jeho interakce se světlem – amplitudové a fázové [3] (str. 100). Amplituda světelné vlny procházející amplitudovým objektem se sníží a detektorem jsme pak schopni zaznamenat kontrast v intenzitě světla mezi objektem a okolním prostředím. Navíc snížení amplitudy procházejícího světla může záviset na vlnové délce a objekt se pak může jevit jako barevný. Naproti tomu fázový objekt mění pouze fázi procházejícího světla, což je ale fyzikální vlastnost, kterou detektor nezaregistruje. Ke generování kontrastu je tedy potřeba použít odlišnou techniku osvětlení, využití interference světelných vln nebo vlastnost objektu stáčet rovinu polarizovaného světla.

V následujícím textu jsou popsány dvě metody zobrazování využitelné především pro pozorování transparentních objektů, které byly použity v experimentální části této práce.

1.1 TRANSMISNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

Transmisní holografický mikroskop vyvinutý na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně je založen na principu Machova-Zehnderova interferometru [9]. Schéma jeho uspořádání je na Obrázku 1.1.

Světelný svazek jdoucí ze zdroje soustavou, tvořenou matnicí, clonou, interferenčním filtrem a osvětlovací čočkou, je rozdělen lineární difrakční mřížkou. Svazky +1. a -1. difrakčního řádu tvoří předmětovou a referenční větev. Po průchodu soustavou, tvořenou usměrňovacími zrcátky, objektivy a předmětem a referenčním objektem, oba svazky interferují ve výstupní rovině mikroskopu. Z prostorové frekvence interferenčních proužků, zaznamenané detektorem jako intenzitu interferogramu, jsme potom schopni rekonstruovat fázový rozdíl předmětové a referenční vlny a intenzitu zobrazení [1] (str. 25). Podrobný postup rekonstrukce zobrazení a problém navazování fází uvádí Janečková H. v [1] (str. 20-25).



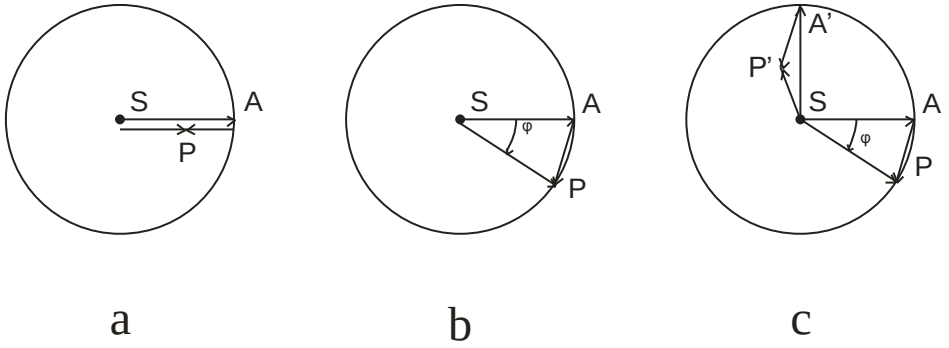
Obrázek 1.1: Schéma transmisního holografického mikroskopu, na němž byla prováděna pozorování. Symboly Z_1 – Z_5 označují zrcátka, IF interferenční filtr, O osvětlovací objektiv, K_1, K_2 kondenzory a O_1, O_2 objektivy [2] (str. 12).

1.2 MIKROSKOP S FÁZOVÝM KONTRASTEM

Mikroskop s fázovým kontrastem byl vynalezen Fritzem Zernikem v roce 1934 [3] (str. 100). Využívá rozdílné délky optické dráhy světla procházejícího objektem a okolním prostředím. To je způsobeno odlišným indexem lomu nebo odlišnou tloušťkou objektu. Pro vysvětlení principu generování kontrastu je výhodné použít vektorovou representaci světla.

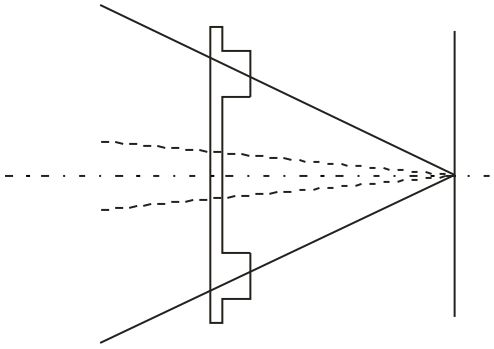
Průchodem světla přes daný objekt dochází k jeho difrakci. Pak nultý difrakční řád nazveme nedifraktovaným světlem a všechny vyšší řády nazveme difraktovaným. Výsledná světelná vlna prošlá objektem je dána součtem obou složek. Nultý difrakční řád odpovídá světlu, procházejícímu okolím objektu. Optický kontrast je tvořen rozdílem amplitud světla prošlého objektem (tedy interferencí difraktovaného a nedifraktovaného světla) a světla

prošlého pozadím (nedifraktovaného). V případě amplitudového objektu je difraktované světlo oproti nedifraktovanému posunuto o polovinu vlnové délky, jak ilustruje Obrázek 1.2 a, kde vektor SA reprezentuje nedifraktovanou složku a vektor AP difraktovanou. Vektor odpovídající výsledné světelné vlně je dán součtem těchto vektorů. Z obrázku vidíme, že amplituda výsledného světla je menší než amplituda nedifraktovaného a změna fáze je nulová. Objekt se tak bude jevit tmavší oproti okolnímu prostředí. V případě fázového objektu je difraktované světlo posunuto přibližně o čtvrtinu vlnové délky. Situaci znázorňuje Obrázek 1.2 b, kde význam vektorů je stejný jako v předešlém případě. Amplituda výsledného světla je téměř stejná jako u nedifraktovaného a fázový rozdíl mezi nimi je φ. Detektor nezaregistruje žádný kontrast v intenzitě světla mezi objektem a okolím. Obrázek 1.2 c znázorňuje, co se stane v případě fázového objektu, pokud posuneme o čtvrtinu vlnové délky i složku nedifraktovaného světla. Výsledná vlna daná součtem vektorů SA' a A'P' bude mít menší amplitudu, než nedifraktované světlo, čímž pro detektor objekt zviditelníme.



Obrázek 1.2: Vektorová representace světla prošlého a – amplitudovým objektem, b – fázovým objektem a c – fázovým objektem s posunem fáze nedifraktovaného světla odpovídající čtvrtině vlnové délky. Vektor SA odpovídá nedifraktované složce světla, vektor AP difraktované. Vektor SP je dán součtem těchto vektorů [3] (str. 102-103).

Na tomto principu je založen mikroskop s fázovým kontrastem. Použijeme-li šikmé osvětlení objektu, například pomocí prstencovité clony, jež propustí paprsky pouze prstencem, pak nedifraktované světlo bude vcházet do objektivu pod definovanými úhly. V oblasti mezi objektivem a výstupní rovinou můžeme tedy vymezit difraktované a nedifraktované paprsky. Nedifraktovanému světlu pak můžeme selektivně vložit do cesty další fázový objekt, který bude měnit o čtvrtinu vlnové délky jeho fázi jako na Obrázku 1.2 c. Tento objekt nazýváme fázovým kroužkem. Situaci a příklad fázového kroužku zjednodušeně znázorňuje Obrázek 1.3.



Obrázek 1.3: Ideální chod paprsků přes fázový kroužek v oblasti mezi objektivem a obrazovou rovinou. Plnou čárou jsou vyznačeny paprsky nedifraktovaného světla, přerušovanou čárou difraktovaného a čerchovanou čárou je vyznačena optická osa [3] (str. 105).

Smysl posouvání nedifraktovaného světla ve vektorové reprezentaci určuje, zda jde o mikroskop s pozitivním (fáze je posunuta proti směru hodinových ručiček) nebo negativním (ve směru hodinových ručiček) fázovým kontrastem.

Obrázek 1.3 ukazuje ideální situaci, kdy jsou svazky paprsků difraktovaného a nedifraktovaného světla úplně separovány. V reálném případě část difraktovaného světla prochází objektem téměř paralelně s nedifraktovaným [3] (str. 106). Oba svazky pak budou procházet stejnou oblastí fázového kroužku a dojde k jejich interferenci. V případě mikroskopu s pozitivním fázovým kontrastem pak ve výsledném obrazu vzniká světlá stopa. Tomuto artefaktu říkáme halo-efekt.

Mikroskop s fázovým kontrastem slouží jako vhodný nástroj pro pozorování transparentních objektů, jakým je například většina živočišných tkáňových buněk. Vůči buňkám jde o neinvazivní metodu, pro pozorování není potřeba buňky fixovat nebo jinak upravovat. Artefakt v podobě halo-efektu se může jevit jako problém při kvantitativním vyhodnocení, může však mít i pozitivní přínos v podobě zvýraznění kontrastu mezi objektem a pozadím.

2 POPIS BUŇKY A BUNĚČNÉHO CYKLU

Buňka je základní stavební jednotkou všech organismů. Můžeme na ni nahlížet jako na vodný roztok chemických sloučenin ohraničený membránou [5] (str. 1). Na nejnižší úrovni dělíme buňky na prokaryotní a eukaryotní. Skupina eukaryotních buněk se od prokaryotních odlišuje většími rozměry a složitější strukturou, která umožňuje jejich vyšší specializaci. Molekula DNA je u eukaryot uložena v jádře a má lineární strukturu. Z eukaryotních buněk jsou složeny všechny mnohobuněčné organismy [5] (str. 9). Prokaryotní buňky, které zahrnují dvě skupiny bakterií, jádro a ostatní organely postrádají a molekula DNA je kružnicová [7] (str. 196). Mohou tvořit organizovaná společenstva, ale nikdy ne složité mnohobuněčné organismy.

2.1 SLOŽENÍ BUŇKY

2.1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ([5], STR. 37-205)

Nejčastějšími látkami obsaženými v buňce jsou vedle vody, která tvoří 70% obsahu buňky [7] (str. 203), molekuly, jejichž základ tvoří uhlovodíkové řetězce spojené stabilními kovalentními vazbami. Tyto molekuly rozdělujeme do čtyř hlavních skupin – sacharidy, aminokyseliny, nukleotidy a mastné kyseliny.

Struktura *monosacharidu* se skládá z uhlovodíkového řetězce, 2 nebo více hydroxylových skupin a aldehydové, nebo ketonové skupiny. Prostřednictvím hydroxylových skupin se mohou molekuly monosacharidů spojovat a vytvářet polysacharidy. Sacharidy mají pro buňku velký význam jako zdroj energie z potravy. Glykolýzou (postupnou oxidací) totiž vzniká sloučenina pyruvátu, která je klíčová pro vznik dalších molekul obsahujících energeticky bohaté chemické vazby (např. ATP – adenosintrifosfát).

Základním stavebním kamenem *aminokyselin* je atom uhlíku, zvaný α-uhlík, na který je navázána aminoskupina, karboxylová skupina a postranní řetězec, tvořený uhlovodíkovým zbytkem, kterým se jednotlivé aminokyseliny odlišují. Aminokyseliny tvoří řetězce pomocí peptidové vazby. Jde o vazbu mezi aminoskupinou (N-konec) jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinou (C-konec) druhé aminokyseliny. Řetězce složené z mnoha takových podjednotek (více jak 100) nazýváme proteiny. Molekuly proteinů se odlišují pořadím aminokyselin v jejich řetězci a sekundární a terciární strukturou. Plní zásadní roli v životě buňky. Jejich obrovská variabilita, daná různým pořadím aminokyselin, jim přisuzuje mnoho rozličných funkcí. Možnost vytvářet trojrozměrné konformace umožňuje přiblížit se postranním řetězcům aminokyselin, které jsou jinak od sebe v rozvinutém řetězci značně vzdálené, a vytvořit tak vazebné místo, které může být vysoce selektivní pro určitou molekulu, tzv. ligand. Můžou se tak například vázat na cizí molekuly, které mohou pro buňku představovat nebezpečí v podobě infekce, a tím ji inaktivovat. Tuto skupinu proteinů nazýváme protilátky a jejich ligandy označujeme jako antigeny. V dalším případě mohou vytvořením vazby s určitou molekulou katalyzovat její reakci ve výsledný produkt. Jde o proteiny zvané enzymy a jejich ligandy nazýváme substráty.

Mastné kyseliny jsou tvořeny dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, na jehož konci se nachází karboxylová skupina. Podobně jako sacharidy mají význam zdroje energie, neboť jejich postupným odbouráváním vznikají sloučeniny potřebné pro vznik vysoce energetických vazeb. Lipidy jsou deriváty mastných kyselin, které obsahují hydrofobní konec v podobě

uhlovodíkového řetězce a hydrofilní konec, který představuje hydrofilní skupina navázaná na karboxylovou skupinu mastné kyseliny. Ve vodě může dojít ke spojení hydrofobních konců a vytvoření dvojné vrstvy lipidů, což je princip tvorby buněčných membrán.

Poslední hlavní třídou látek obsažených v buňce jsou *nukleotidy*. Jde o sloučeniny tvořené pentosou (pětiuhlíkatý cyklický monosacharid), fosfátovou skupinou a bází, což je cyklická sloučenina obsahující atomy dusíku. Rozeznáváme pět typů bází – adenin, guanin, cytosin, uracil a thymin. Přítomností fosfátových skupin spojených vysoce energetickými vazbami mají nukleotidy význam přenašečů energie. Příkladem je již zmíněný ATP. Podobně jako aminokyseliny vytvářejí i nukleotidy řetězce prostřednictvím fosfodiesterové vazby mezi fosfátovou skupinou a pentosou. Spojováním nukleotidů vznikají nukleové kyseliny. V případě, že pentosou je ribosa, jde o ribonukleovou kyselinu, označovanou jako RNA. V případě, že se na místě pětiuhlíkatého řetězce nachází deoxyribosa (od ribosy se odlišuje postavením jedné hydroxylové skupiny vůči rovině molekuly), mluvíme o deoxyribonukleové kyselině, označované jako DNA. Obě kyseliny mohou vytvářet pomocí vodíkových vazeb mezi bázemi dvoušroubovicovou strukturu. Pořadí párů bází v nukleové kyselině má význam genetické informace přenášené do tvorby proteinů (podrobněji [5], str. 211-240).

2.1.2 BUNĚČNÉ KOMPONENTY

Cytoplasma ([5], str. 513-542)

Cytoplasmou rozumíme vnitřní obsah buňky mimo jednotlivé organely. Z velké části je tvořena molekulami vody, dále obsahuje ribosomy, ribonukleové kyseliny, enzymy, ionty a další látky. V cytoplasmě se odehrávají důležité reakce, například syntéza proteinů a mastných kyselin, glykolýza, apod.

Dále se zde nacházejí dlouhá proteinová vlákna, která vytvářejí prostorovou síť, označovanou jako cytoskelet. Rozlišujeme tři druhy těchto vláken podle funkce, tloušťky a pružných vlastností.

Aktinová vlákna jsou nejužší (průměr 6-8 nm, [7], str. 204) a zabírají ze všech tří typů největší část buňky. Vznikají polymerací aktinového monomeru, který se nachází volně v cytoplazmě. Aktinové vlákno je nestabilní a depolymeruje velmi rychle. Tím je však umožněna rychlá změna jeho tvaru. Na aktinovém vlákně se nacházejí vazebná místa pro určité druhy proteinů, které mění jeho tvar, délku, vzájemné uspořádání a další vlastnosti. Umožňují také některým proteinům posouvat podél vláken organely. Aktinová vlákna mají také význam pro pohyb buňky po povrchu. Odpovědná jsou za to především vlákna soustředěná ve vrstvě pod plasmatickou membránou. Této vrstvě říkáme buněčný kortex. Polymerovaná vlákna vysouvají membránu na okraji buňky v podobě tenké listovité struktury nebo úzkých výběžků. Jejich funkcí je prozkoumávat okolí a nalézt vhodné místo pro uchycení. Jakmile se tak stane, dojde k vyloučení proteinů, které vytvoří kovalentní vazby s povrchem. Buňka se na daném místě přichytí a kontrakcí aktinových vláken s myosinovými uvnitř buňky se její zadní část přesune směrem dopředu.

Dalšími vlákny jsou *mikrotubuly*. Jsou nejtlustší a nejméně ohebné. Vlákno mikrotubulu je podobně nestabilní jako aktinové a je vytvářeno polymerací dimeru molekuly tubulinu do tvaru dutého válce z centrálního místa, zvaného centrosom, v kterém se nacházejí tubulinové prstence sloužící jako nukleační místa pro polymeraci vlákna. Podél mikrotubulových vláken dochází k transportu látek a přesouvání organel.

Oproti předchozím dvěma typům proteinových vláken vykazují *střední filamenta* vysokou pevnost a odolnost. Na spodku membrány kryjící jádro vytvářejí jadernou laminu, odkud

vybíhají do cytoplasmy směrem k plasmatické membráně. Brání mechanickému poškození buňky a zprostředkovávají spoje mezi sousedními buňkami.

Jádro ([7], str. 208)

V jádře buňky je uložena téměř veškerá genetická informace. Zároveň zde dochází i k její replikaci a expresi. V jádře se nachází chromatin, což je komplex RNA, DNA a proteinů. Jaderný obal tvoří dvě membrány přerušované póry, kde dochází k výměně látek s cytoplasmou. Vnitřní membránu pokrývají střední filamenta, vytvářející jadernou laminu. Na vnější membráně jsou pak přichyceny ribosomy, na kterých dochází k syntéze proteinů. Vnější membrána přechází postupně v endoplazmatické retikulum, kde dochází k syntéze lipidů a dalších proteinů a k jejich transportu. Součástí jádra je jadérko, kde se nachází DNA obsahující geny kódující ribosomální RNA.

Mitochondrie ([7], str. 210, [5], str. 407-442)

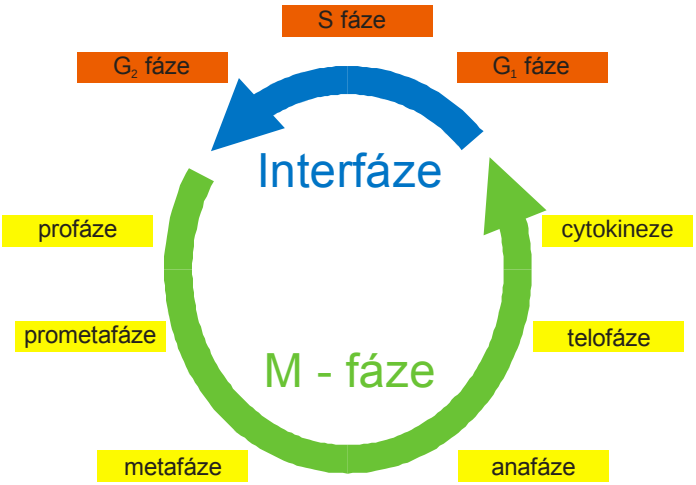
Mitochondrie jsou malé organely s dvojnou membránou, vlastní kružnicovou DNA a ribosomy kódujícími některé mitochondriální proteiny. Jsou podobné bakteriím a původně mohly existovat jako samostatné buňky a až s postupem času se vytvořil symbiotický vztah s eukaryoty. Hlavní funkcí mitochondrií je aerobní energetický metabolismus. Na vnitřním povrchu spodní membrány probíhá citrátový cyklus, při němž se uvolňuje energie pro syntézu molekul ATP, které jsou pak transportovány do místa spotřeby energie.

Plasmatická membrána ([5], str. 347-368)

Plasmatická membrána se skládá ze dvou vrstev molekul lipidů přiložených svými hydrofobními konci k sobě. Základní funkcí membrány je ochrana vnitřku buňky a transport látek. Dále se v membráně nacházejí proteiny mající význam receptorů, enzymů nebo zprostředkovávají transport látek.

2.2 BUNĚČNÝ CYKLUS ([5], STR. 547-590)

Pro zachování kontinuity života je klíčová přesná replikace genetické informace a její přenos na novou generaci. V případě buněk se jedná o zkopírování celého genomu (souboru genů) a jeho rozdělení mezi dvě dceřiné buňky. Mimo genom musí být rovněž replikovány i všechny ostatní buněčné komponenty a přesně roztříděny před samotným rozdělením původní buňky. Celý proces musí být pečlivě koordinován a veškerý sled těchto událostí, během kterého musí buňka zdvojnásobit svůj obsah a správně jej roztřídit, označujeme jako buněčný cyklus. Jeho schematické znázornění pro eukaryotní buňku je na Obrázku 2.1. Skládá se ze dvou hlavních částí – interfáze a M-fáze.



Obrázek. 2.1: Schéma buněčného cyklu eukaryotní buňky [5] (str. 54).

Interfáze je dále rozdělena do tří částí – fází G_1, S a G_2. Během fází G_1 a G_2 dochází k růstu buňky a replikaci organel obsažených v cytoplasmě. V S-fázi se replikuje DNA obsažená v jádře (podrobněji [5], str. 197-273). Obě růstové fáze slouží buňce navíc jako příprava pro fáze S a M, kdy se může buněčný cyklus pozastavit a buňka tak získá čas pro další růst a přesnou replikaci organel v cytoplazmě. Zdvojnásobí-li buňka počet všech organel a úspěšně zreplikuje svoji DNA, je fáze G_2 ukončena a cyklus přechází do konečné M-fáze, která se dále dělí do dalších šesti částí. Souhrnně zahrnuje dělení jádra, neboli mitosu, a rozdělení cytoplasmy.

Následující text se vztahuje pouze k eukaryotní buňce. První částí M-fáze je *profáze*. Během ní dochází ke kondenzaci chromatinu, který se tak zformuje do jednotlivých chromozomů, tvořených vždy dvěma sesterskými chromatidami, které obsahují již replikovanou DNA. Důvodem, proč tento proces probíhá, je snazší rozdělení chromozomů mezi dvě dceřiné buňky než v případě nekondenzovaného chromatinu. Sesterské chromatidy jsou mezi sebou spojené a přibližně uprostřed dochází k jejich zúžení v místě nazývaném centromera. Zde se v probíhající profázi vytváří na každé chromatidě proteinový komplex kinetochor, který bude mít později klíčový význam. Během přechodu z fáze G_2 do S [8] (str. 135) byly vytvořeny duplikáty centrosomu, které nyní představují póly pro formování vlákna mikrotubulů, jejichž spojením vznikne mitotické vřeténko, které má význam právě pro správné rozdělení genetické informace mezi dceřiné buňky, tedy vytvoření dvou identických jader.

Rozpadem jaderného obalu začíná *prometafáze*. Chromozomy se v tomto okamžiku dostávají do prostoru cytoplasmy k mitotickému vřeténku, na jehož vlákna se navážou prostřednictvím kinetochorů. Každá sesterská chromatida se prostřednictvím svého kinetochoru naváže směrem k jinému pólu vřeténka.

Následuje *metafáze*, během níž se chromozomy pohybují podél vřeténka, až se srovnají v rovině uprostřed mezi oběma póly vřeténka. Nazýváme ji ekvatoriální rovinou. Poté dochází k oddělení sesterských chromatid. Tento proces označujeme jako *anafázi A*. Vlákna vřeténka, na kterých jsou navázány chromozomy, jsou přitahována k pólům a na chromatidy tak působí opačné síly, které je od sebe oddělí. V *anafázi B* dochází poté ke vzdalování pólů vřeténka pomocí dalších mikrotubulových vláken.

Oddělené chromatidy jsou poté přibližovány k pólům vřeténka a dojde tak k jejich soustředění v jednom místě. Může tak začít *telofáze*, během které se kolem izolovaných a soustředěných chromatid tvoří jaderný obal a vzniká tak nové jádro. Tím je mitosa ukončena. Po mitose pokračuje dělení buňky oddělením cytoplasmy a všech organel, které jsou v ní obsažené. Tento proces nazýváme *cytokinezí*. U živočišných buněk začíná již na konci anafáze, kdy se začíná tvořit kontraktilní prstenec z aktinových a myosinových vláken v ekvatoriální rovině mitotického vřeténka na vnitřní straně cytoplasmatické membrány. Stahováním prstence se v membráně vytvoří rýha, která se dále prohlubuje a postupně rozděluje a izoluje od sebe dvě oblasti cytoplazmy. Ke konci se zformuje pouze úzký most spojující obě části, jehož přerušením dojde ke konečnému rozdělení na dvě dceřiné buňky.

3 PŘÍPRAVA EXPERIMENTU

Získání kvalitních snímků jakoukoli mikroskopickou technikou je klíčové pro následné zpracování. V případě transmisního holografického mikroskopu jde zejména o kvantifikaci fázových změn indukovaných objektem. Pozorování probíhající po delší dobu (například několik dní) a možnost porovnání jednotlivých experimentů mezi sebou ještě více zvyšují nároky na kvalitu snímků. Tyto náležitosti vyžadují jednak precizní nastavení mikroskopu a jeho osvětlení pro minimalizaci šumu v obrazu a také pečlivou přípravu vzorku pro samotné pozorování včetně veškerých procesů, které jemu předcházejí. V případě pozorování živých buněk jde zejména o jejich kultivaci, šetrné zacházení při jakékoli manipulaci a vhodné nástroje pro přípravu vzorku. Tato kapitola popisuje podrobněji jednotlivé kroky přípravy vzorku pro pozorování v transmisním holografickém mikroskopu a v mikroskopu s fázovým kontrastem.

3.1 KULTIVACE A MANIPULACE S BUŇKAMI

Při kultivaci a manipulaci s buňkami je nutné dbát na zvýšenou čistotu pracovního prostředí. Zabráníme tak případné kontaminaci pozorovaných buněk a vyvarujeme se vniku nečistot do vzorků určených pro pozorování.

Pro růst buněk používáme inkubátor Sanyo MCO-18AIC, který udržuje sterilní prostředí s nastavitelnou teplotou a koncentrací CO_2. Při manipulaci s buňkami je rovněž důležité pracovat v izolovaném sterilním prostředí, k čemuž slouží laminární flow-box MSC Advantage. Laminární proudění vzduchu zabraňuje vniku nečistot do vnitřního prostoru. Všechny nástroje a nádoby, které používáme, musí být sterilní.

Pro dlouhodobé skladování jsou buňky uchovány ve stavu hlubokého zamražení v kapalném dusíku. V procesu experimentů uchováváme buňky ve stavu, ve kterém jsou připraveny na okamžité nasazení do kultury. Proto je udržujeme ve zkumavkách ve formě suspenze v kultivačním médiu při teplotě kolem 5 °C. V těchto podmínkách vydrží buňky v dobrém stavu v závislosti na druhu řádově dny.

Uchování ve zkumavce ve formě suspenze má praktický význam, neboť v tomto stavu můžeme určit koncentraci buněk (např. pomocí Bürkerovy komůrky), tj. množství buněk připadající na jednotkový objem kultivačního média a můžeme tedy snadno odebrat objem s odpovídajícím požadovaným počtem buněk.

Kultivace

Po resuspendaci uchované suspenze odebereme pipetou objem média s požadovaným počtem buněk a naneseme jej na kultivační povrch. Kultivačním povrchem může být přímo krycí sklíčko, chceme-li hned provádět pozorování, nebo kultivační nádoba, pokud potřebujeme buňky pěstovat. Nádobu doplníme kultivačním médiem a vložíme do inkubátoru. Produktem probíhajícího metabolismu buněk jsou látky, které snižují pH roztoku. Pomocí vhodného indikátoru, který kultivační médium obsahuje, můžeme tento proces kontrolovat a v případě potřeby kultivační médium odsát a doplnit novým.

Jednoduchým kultivačním médiem je M1H. Tabulka 3.1 udává jeho složení. Pro pozorování je vhodné použít roztok M1H bez pH indikátoru a s přidáním pufrů stabilizujících pH roztoku. Tuto modifikaci označujeme jako F10.

Tabulka 3.1: Složení roztoku M1H o objemu 0,5 l [1] (str. 32) (nedává to přesně 0,5 l).

Látka	Množství v ml	Popis
H-MEMd	450	kultivační médium, směs aminokyselin a solí
ATB	2,5	antibiotika
glutamin	5	aminokyselina, meziprodukt v metabolismu dusíkatých látek
FTS	45	fetální telecí sérum (proteiny)
fenolová červeň		pH indikátor

Trypsinizace

Růst buněk kontrolujeme v mikroskopu s fázovým kontrastem. Zjistíme-li, že buňky vytvořily konfluentní porost (hustě pokrývají celý povrch kultivační nádoby), je třeba buňky ztrypsinizovat. Jde o proces, při kterém oddělíme buňky od povrchu a vytvoříme novou zásobní suspenzi. Složení roztoku pro trypsinizaci udává Tabulka 3.2. Z kultivační nádoby odsajeme médium a povrch 2x opláchneme roztokem PBS v množství 2x 2,5 ml pro Petriho misku o průměru 60 mm. Pro trypsinizaci 2x opláchneme povrch roztokem trypsinu v množství přibližně 2x 0,7 ml a koncentraci, kterou udává pro použité buňky Tabulka 3.4. Při druhém oplachu roztok v nádobě necháme, pohybem nádoby se ujistíme, že pokrývá celý povrch, a umístíme na 5 minut do inkubátoru. Probíhá proces oddělování buněk od povrchu, který kontrolujeme v mikroskopu s fázovým kontrastem. Zjistíme-li, že jsou všechny buňky oddělené a nevytvářejí velké shluky, přidáme do nádoby menší množství kultivačního média (pro výše uvedenou Petriho misku 2-4 ml v závislosti na druhu buňky) a pečlivě promísíme. Veškerý objem odsajeme a umístíme do zkumavky. Z nově vytvořené suspenze můžeme odebrat určité množství pro další pěstování nebo pozorování a celý proces tak znovu opakujeme. Zbylou suspenzi umístíme do ledničky pro případné pozdější použití.

Tabulka 3.2: Složení roztoku pro trypsinizaci (množství trypsinu a EDTA závisí na typu buňky) [1] (str. 31).

Látka	Popis
PBS	3% fyziologicý solný roztok
trypsin	enzym, štěpí proteiny
EDTA	syntetická aminokyselina, inaktivuje enzymy

Přehled buněk

Tabulka 3.3 udává typy v experimentech použitých buněk s jejich popisem. Tabulka 3.4 pak obsahuje doporučené údaje pro kultivaci.

Tabulka 3.3: Typy buněk [2] (str. 31).

Typ buňky	Popis
LF	lidské podkožní fibroblasty
A3	potkaní metastatické sarkomové buňky derivované z nemetastatické potkaní sarkomové linie K2

A3 caRho	modifikace A3 s expresí Rho (gen kódující fluorescenční sondu)
A3 MLC	modifikace A3 s overexpresí MLC (gen kódující fluorescenční sondu)

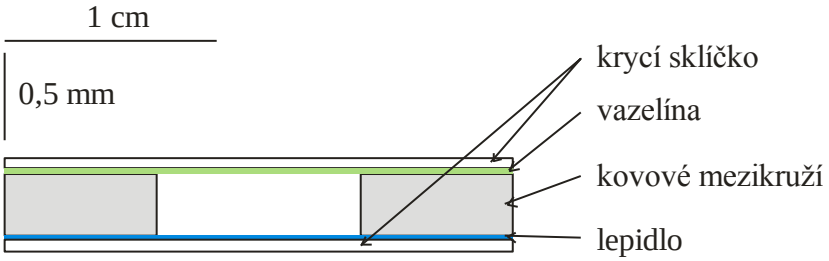
Tabulka 3.4: Údaje pro kultivaci jednotlivých druhů buněk.

Druh buňky	Médium	Tryp. roztok	Nasazení (Petriho miska s prům. 60 mm)
LF	M1H + 1%FCS	0,25% Tr	500 tis. – 1 mil.
A3 a modifikace	M1H	0,25% Tr	100 – 200 tis.

3.2 PŘÍPRAVA VZORKU PRO POZOROVÁNÍ

Pro časosběrné pozorování buněk v mikroskopu s fázovým kontrastem je možné použít přímo kultivační nádobu s krycím sklíčkem na dně. Vhodnou je například Petriho miska o průměru do 60 mm. Pro zabránění kontaminace je vhodné nádobu izolovat například parafinem. Příprava vzorku je tedy velmi jednoduchá a navíc umožňuje rychlou výměnu kultivačního média, provádíme-li dlouhodobá pozorování.

Pro pozorování v transmisním holografickém mikroskopu tyto kultivační nádoby použít nelze. Hlavní důvod představuje nutnost použití dvou objektů, jednoho s pozorovanými objekty a druhého jako referenčního. Optické dráhy obou větví by se měly v ideálním případě lišit pouze pozorovanými objekty, čehož bychom například v případě Petriho misek nedocílili. Ve všech experimentech v transmisním holografickém mikroskopu byly tedy použity stacionární komůrky, v kterých je objem média přesně určen výškou komůrky. Jednoduché schéma stacionární komůrky je na Obrázku 3.1.



Obrázek. 3.1: Schéma uzavřené stacionární komůrky. Rozměry vlevo nahoře určují měřítko v podélném a svislém směru.

Pro výrobu stacionární komůrky jsou potřeba dvě krycí sklíčka, kovové (nerezové) nebo silikonové mezikruží, lepidlo, vakuová vazelína, detergent, deionizovaná voda a alkohol [1]. Kovové mezikruží nejprve očistíme ve vodě s detergentem a poté vložíme na několik hodin do alkoholu. Poté k němu přilepíme krycí sklíčko o stejném vnějším průměru. Takto máme připravenou otevřenou komůrku pro nanesení buněk. Před nanesením ponoříme komůrku na 1 hodinu do alkoholu a necháme oschnout. Suspenzi s buňkami poté naneseme do prostoru komůrky umístěné v Petriho misce a doplníme kultivačním médiem. Uzavřenou misku s komůrkou vložíme do inkubátoru. Je-li mezikruží příliš tenké a množství média by bylo příliš brzy vyčerpáno, celou komůrku ponoříme do kultivačního média v Petriho misce a suspenzi s buňkami poté pipetou kápneme do prostoru nad komůrkou. Buňky klesnou na kultivační povrch a po několika minutách k němu přilnou. Komůrku potom můžeme

kontrolovat v mikroskopu s fázovým kontrastem a sledovat růst buněk. Budeme-li považovat hustotu buněk za dostatečnou pro potřeby pozorování, odsajeme veškeré médium, mezikruží osušíme a potřeme vakuovou vazelínou, která zajistí vzduchotěsný spoj. Komůrku po okraj doplníme pozorovacím roztokem a uzavřeme sterilním krycím sklíčkem. Referenční komůrku o stejných rozměrech připravíme podobným postupem s jediným rozdílem, že do prostoru komůrky naneseme pouze pozorovací roztok. S takto připravenou komůrkou můžeme hned započít s pozorováním, je však vhodné ji umístit na krátkou dobu do inkubátoru pro stabilizaci buněk.

3.3 POZOROVÁNÍ V TRANSMISNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU [2]

Během pozorování v mikroskopu je nutné udržovat teplotu prostředí na stálé hodnotě, která je pro životní cyklus buněk optimální, tedy 37 °C. Transmisní holografický mikroskop obsahuje dva topné systémy připojené k regulátorům elektrického proudu. První systém tvořený sérií rezistorů vyhřívá betonovou desku tvořící podstavec pro mikroskop. Nastavením regulátoru na 65 °C se teplota vzduchu uvnitř krytu mikroskopu ustálí přibližně na 35 °C. Druhý systém tvořený spirálou navinutou v duralové vložce vyhřívá přímo stolek se vzorkem. Tento regulátor nastavíme přímo na požadovaných 37 °C.

Před vložením obou objektů pro pozorování je nutné provést justáž a nastavení mikroskopu pro pozorování. Podrobný postup uvádí [2] (str. 13-15).

4 ANALÝZA DAT

Principem mikroskopu s fázovým kontrastem pro zobrazování transparentních objektů je zvýšení kontrastu obrazu ovlivněním posuvu fáze paprsků nedifraktovaných vůči parskům difraktovaným objektem. V případě transmisního holografického mikroskopu dochází ve výstupní rovině k interferenci světla z předmětové a referenční větve. Pozorujeme tedy interferogram, v němž je rozdíl fází světla mezi oběma větvemi transformován na změnu prostorové frekvence interferenčních proužků. Z interferogramu lze rekonstruovat rozložení intenzity a změnu fáze v zorném poli [1] (str. 20-25).

4.1 VÝZNAM ZMĚNY FÁZE

Všechny vztahy a odvození v následujícím odstavci jsou upraveny podle [3] (str. 100-107). Klíčovou veličinou pro vyhodnocení snímků z transmisního holografického mikroskopu je změna fáze světla procházejícího daným objektem vůči světlu procházejícímu referencí. Změna fáze světla je spojena s dalšími fyzikálními vlastnostmi objektu.

Fázový rozdíl světelných svazků jdoucích po různých drahách, označený jako φ, je dán vztahem

$$\varphi = \delta d \frac{2\pi}{\lambda}, \tag{4.1}$$

kde λ je vlnová délka procházecího světla a δd je rozdíl délek optických drah, který je určen vztahem

$$\delta d = d_0 - d_1, \tag{4.2}$$

kde d_0 a d_1 jsou délky optických drah světelných svazků jdoucích po dvou různých drahách. Na příkladu pozorování v transmisním holografickém mikroskopu odpovídá d_0 optické dráze v předmětové větvi a d_1 dráze v referenční větvi. Přítomnost objektů v předmětové větvi (například buněk) bude mít vliv na délku optické dráhy.

Délka optické dráhy pak souvisí s indexem lomu n prostředí, kterým světlo prochází, a tloušťkou objektu t podle vztahu

$$d = nt. \tag{4.3}$$

Rovnici (4.2) můžeme přepsat na

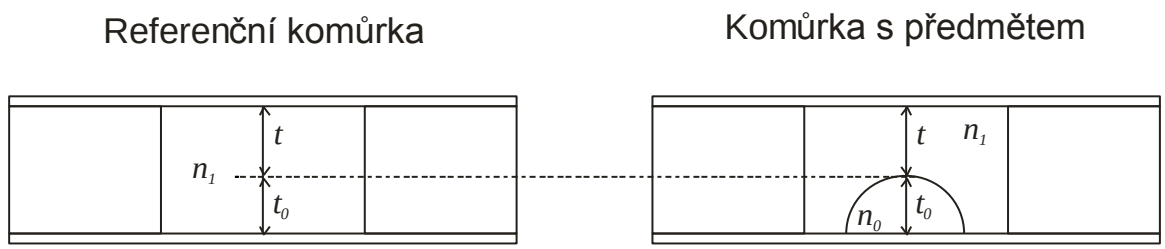
$$\delta d = (n_0 - n_1)t, \tag{4.4}$$

v případě že tloušťka obou objektů je stejná a liší se index lomu, nebo

$$\delta d = n(t_0 - t_1), \tag{4.5}$$

v případě, že je konstantní index lomu a rozdílná je tloušťka objektů [3] (str. 102). V případě transmisního holografického mikroskopu pozorujeme objekty ve stacionárních komůrkách popsaných v odstavci 3.2. Situaci znázorňuje Obrázek 4.1. V případě, že máme dvě identické komůrky, pak fázový rozdíl v daném bodě o tloušťce objektu (buňky) t_0 bude určen pouze

touto tloušťkou a rozdílem indexů lomu tohoto objektu a prostředí, které jej obklopuje. Je tedy zřejmé, že pro jeho výpočet použijeme vztah (4.4). Vyrobit identická krycí sklíčka a mezikruží pochopitelně nelze. Klínovitost sklíček nebo rozdílné výšky komůrek by však způsobily pouze náklon rekonstruované fáze nebo posun pozadí o určitou hodnotu. Oba faktory se dají kompenzovat následným zpracováním obrazu.



Obrázek 4.1: Schematické znázornění stacionárních komůrek použitých pro pozorování v transmisním holografickém mikroskopu.

Index lomu n_0 určitého roztoku, který se skládá z rozpouštědla a jedné rozpuštěné látky, můžeme vyjádřit pomocí vztahu

$$n_0 = n_r + \alpha C_{sh}, \tag{4.6}$$

kde n_r je index lomu rozpouštědla, C_{sh} je hmotnostní koncentrace dané rozpuštěné látky v jednotkách g/100 ml a α je specifický refraktivní přírůstek rozpuštěné látky k indexu lomu určitého rozpouštědla, zvýší-li se její koncentrace o 1 g v objemu 100 ml. Získali jsme tedy vztah, který dává do souvislosti koncentraci suché hmoty (rozpuštěné látky) a index lomu roztoku.

Objekt jako například živou buňku můžeme zjednodušeně pokládat za směs proteinů rozpuštěných ve vodě. K takovému zjednodušení nás opravňuje fakt, že vnitřek buňky vyplňuje z velké části cytoplasma, což je vodný roztok, obsahující celou řadu molekul, převážně však proteinů [5]. Index lomu vnitřního obsahu pak bude úměrný koncentraci proteinů podle vztahu (4.6), kde α je průměrnou hodnotou pro všechny proteiny.

Ze vztahů (4.4) a (4.6) plyne, že fázový rozdíl v daném bodě a čase závisí na vlnové délce λ, indexech lomu n_1 a n_r, tloušťce objektu t, specifickém refraktivním přírůstku α a koncentraci C_{sh}. Veličiny λ, n_1 a α považujeme za konstanty. Specifický refraktivní přírůstek α závisí na druhu rozpouštědla a rozpouštěné látky. Dále se mění i v závislosti na změnách pH, teplotě a vlnové délce osvětlení [3]. Neměnnost teploty a vlnové délky osvětlení můžeme snadno zajistit, vliv pH na změnu refraktivního přírůstku není výrazný [2] (str. 39-40). Jedinými proměnnými jsou pak pro daný druh rozpouštědla hmotnostní koncentrace C_{sh}, která vyjadřuje množství suché hmoty v jednotkovém objemu a výška buňky t.

4.2 DYNAMICKÉ FÁZOVÉ DIFERENCE (DPD)

Vztahy a odvození v následujícím odstavci jsou převzaty, případně upraveny z [2] (str. 41-46). Fázový rozdíl způsobený objektem oproti prostředí, které ho obklopuje, můžeme získat rekonstrukcí z interferogramu z transmisního holografického mikroskopu. Rovnici (4.1) můžeme potom s využitím vztahů (4.4) a (4.6) přepsat do tvaru

$$\varphi = \delta d \frac{2\pi}{\lambda} = (n_0 - n_1) t \frac{2\pi}{\lambda} = (n_r + \alpha C_{sh} - n_1) t \frac{2\pi}{\lambda}. \tag{4.7}$$

Za předpokladu, že veličiny α, λ, n_1 a n_r jsou konstantní v čase a prostoru, můžeme pro daný bod vztah (4.7) zjednodušit na

$$\varphi = AtC_{sh} + Bt, \tag{4.8}$$

kde A a B jsou konstanty. Pozorujeme-li buňku v čase, hmotnostní koncentrace i tloušťka buňky jsou funkce času i prostoru. Potom (4.8) přejde na

$$\varphi = \varphi(x, y, \tau) = At(x, y, \tau) C_{sh}(x, y, \tau) + Bt(x, y, \tau), \tag{4.9}$$

kde τ vyjadřuje čas a x a y jsou polohové souřadnice zorného pole.

Dynamické fázové diference (DPD) pak definujeme jako rozdíl hodnot fáze v jednom bodě v různém čase. Veličinu označme jako $\Delta\varphi$. Dále definujme $\Delta\varphi_{D1}$ jako fázovou diferenci mezi hodnotami fáze následujícími po sobě s odstupem určitého časového intervalu $\delta\tau$ pomocí vztahu

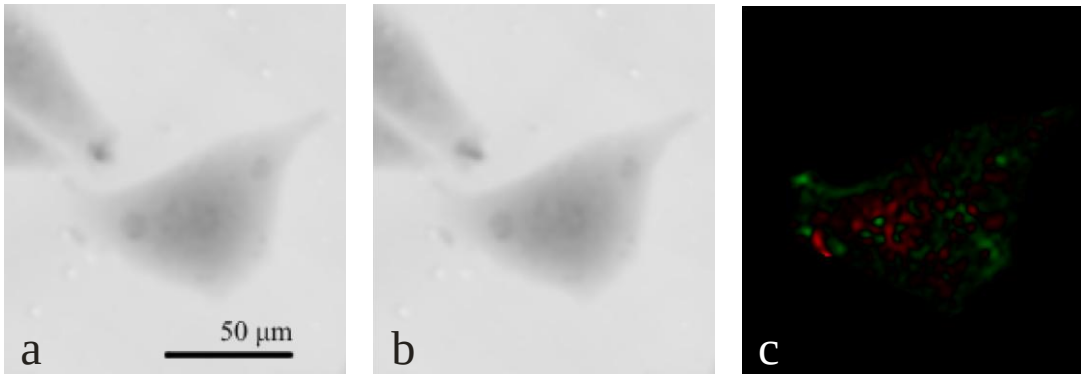
$$\Delta\varphi_{D1}(x, y, \tau) = \varphi(x, y, \tau + \delta\tau) - \varphi(x, y, \tau). \tag{4.10}$$

Tuto veličinu nazveme *postupnými DPD*. Nebo můžeme definovat $\Delta\varphi_{D2}$ jako

$$\Delta\varphi_{D2}(x, y, \tau) = \varphi(x, y, \tau) - \varphi(x, y, \tau_0), \tag{4.11}$$

kde τ_0 označuje určitý počáteční okamžik. Veličinu nazveme *DPD vzhledem k počátku*.

Jedním z praktických významů tohoto vyhodnocení je přehlednější vizualizace pohybu objektu, resp. jeho suché hmoty. Převedeme-li získanou rekonstrukci fáze do digitální podoby, pak její vizualizaci můžeme realizovat přiřazením odstínové škály dvou různých barev zvlášť pro kladné a zvlášť pro záporné přírůstky DPD. Vše ilustruje Obrázek 4.2.



Obrázek 4.2: Znázornění dynamických fázových diferencí (DPD) [2] (str. 45): a – rekonstrukce fáze snímku pořízeném v čase τ, b – v čase τ + 20 s, c – DPD mezi oběma snímky. Červená škála odpovídá místům s přírůstkem suché hmoty, zelená škála úbytkům suché hmoty. Měřítko je stejné pro všechny tři obrázky.

Na snímcích a a b se nejeví žádný rozdíl ve změně rekonstruované fáze, přestože jde o snímky pořízené v odstupu 20 s. Pomocí DPD v obrázku c však získáme mnohem přesnější informaci o změně rozložení suché hmoty.

Digitalizací obrazu převedeme spojité veličiny x a y, označující polohu bodu v zobrazení zorného pole, na diskrétní hodnoty i a j, určující polohu pixelu.

Nyní spočítejme úhrnnou změnu fáze v celém zorném poli. Definujme veličinu A_q pro daný snímek q z časosběrné série jako aritmetický průměr součtu všech kladných a součtu všech záporných hodnot veličiny $\Delta\varphi_{D1}$ přes všechna i a j pomocí vztahu

$$A_q = \frac{\sum_i \sum_j \Delta\varphi_{D1,q}(i,j) + \sum_i \sum_j \Delta\varphi'_{D1,q}(i,j)}{2} = \frac{\sum_i \sum_j \left[\varphi_{q+1}(i,j) - \varphi_q(i,j)\right] + \sum_i \sum_j \left[\varphi_q(i,j) - \varphi_{q+1}(i,j)\right]}{2}$$

$$\text{pro} \qquad \Delta\varphi_{D1,q}(i,j) > 0 \quad a \quad \Delta\varphi'_{D1,q}(i,j) > 0 . \tag{4.12}$$

Časový interval $\delta\tau$ je čas mezi pořízením snímku q a snímku q+1. Vydělením veličiny A_q konstantou A odvozenou pomocí vztahů (4.7) a (4.8) a vynásobením plošným elementem δS získáme veličinu $A_{W,q}$, která je rovna hmotě přemístěné mezi záznamem snímků q a q+1 na této ploše [2] (str. 45):

$$A_{W,q} = \frac{\delta S A_q}{A} = \frac{\lambda \delta S}{2\pi\alpha} A_q . \tag{4.13}$$

Hodnota δS označuje plochu objektu odpovídající jednomu pixelu zobrazení. Pro zaznamenání průběhu časosběrných experimentů stačí zaznamenávat pouze veličinu A_q. Při výpočtu veličiny A_q pomocí vztahu (4.12) je zřejmá disproporce pro různou velikost objektu. Znamená to, že sledujeme-li dva objekty zabírající v zorném poli různě velkou plochu a získáme-li stejnou hodnotu A_q, pak je zřejmé, že pohyblivost obou objektů bude odlišná. Je tedy vhodné zavést normovanou veličinu B_q danou tímto vztahem:

$$B_q = \frac{A_q}{\sum_i \sum_j \varphi_{q+1}(i,j)} . \tag{4.14}$$

4.3 SLEDOVÁNÍ RŮSTU

Hmotnostní koncentrace C_{sh} je definována vztahem

$$C_{sh} = \frac{m_B}{V} , \tag{4.15}$$

kde m_B je hmotnost rozpuštěné látky B v roztoku o objemu V [4]. Časovou závislost hmotnostní koncentrace vyjádříme úpravou vztahu (4.15) na

$$C_{sh}(\tau) = \frac{m_B(\tau)}{V(\tau)}. \tag{4.16}$$

V případě pozorování živých buněk je látkou *B* soubor všech substancí suché hmoty obsažené uvnitř buňky, z nichž majoritní část tvoří molekuly proteinů. V kapitole 2 bylo v části, věnující se životnímu cyklu buňky uvedeno, že pro úspěšné rozdělení na dvě dceřiné buňky musí mateřská buňka zdvojnásobit počet všech organel a tedy i svou celkovou hmotnost. Tento proces pak můžeme popsat časovou závislostí veličiny m_B a sledovat tak růst hmotnosti buňky. Ze vztahu (4.16) plyne, že hmotnost je úměrná součinu objemu a hmotnostní koncentraci. Koncentraci můžeme určit pomocí rovnice (4.7) z naměřené fáze, známe-li tloušťku objektu. Jde však o koncentraci v jednom bodě o souřadnicích *x, y*. V rovnici (4.16) tedy musíme zohlednit závislost na poloze bodu. Dostaneme tento vztah:

$$C_{sh}(x, y, \tau) = \frac{dm_B(x, y, \tau)}{dV(x, y, \tau)}, \tag{4.17}$$

kde dm_B je hmotnost suché hmoty v objemu *dV*, který vyjádříme jako

$$dV(x, y, \tau) = t(x, y, \tau)dS. \tag{4.18}$$

Dosadíme-li (4.17) s využitím (4.18) do (4.8), dostaneme

$$\varphi(x, y, \tau) = At(x, y, \tau)\frac{dm_B(x, y, \tau)}{t(x, y, \tau)dS} + Bt(x, y, \tau) = A\frac{dm_B(x, y, \tau)}{dS} + Bt(x, y, \tau). \tag{4.19}$$

Vynásobením pravé a levé strany rovnice (4.19) výrazem *dS* získáme

$$dS\varphi(x, y, \tau) = Adm_B(x, y, \tau) + BdSt(x, y, \tau) = Adm_B(x, y, \tau) + BdV(x, y, \tau). \tag{4.20}$$

Integrací levé strany rovnice (4.20) přes plochu S_B, na které se buňka rozprostírá, a pravé strany před příslušnou hmotnost a objem získáme po úpravě vztah pro výpočet celkové hmotnosti buňky m_B:

$$m_B(\tau) = \frac{M(\tau) - BV(\tau)}{A}, \tag{4.21}$$

kde *M* je součet hodnot fáze přes danou plochu a *V* je objem buňky. Pro digitální zobrazení fáze můžeme *M* převést na sumaci přes jednotlivé pixely:

$$M(\tau) = \int_{S_B} \varphi(x, y, \tau)dS \quad \rightarrow \quad \sum_i \sum_j \varphi(i, j, \tau) \qquad \text{pro} \qquad i, j \in S_B. \tag{4.22}$$

Pro snímek *q* (4.23) přejde na

$$M(\tau) \quad \rightarrow \quad M_q(\tau) = \sum_i \sum_j \varphi_q(i, j, \tau) \qquad \text{pro} \qquad i, j \in S_B. \tag{4.23}$$

Sledováním veličiny M_q v čase můžeme získat informaci o růstu buňky. Problém představuje určení objemu buňky, který se navíc s časem mění. Kultivační médium však

může být připraveno tak, že jeho složení přibližně odpovídá chemickému složení rozpouštědlu v buňce, tzn., převážně směs aminokyselin a solí ve vodě. Můžeme tedy předpokládát že indexy lomu n_0 a n_1 se sobě budou rovnat. Rovnice (4.7) pak přejde na tvar

$$\varphi = \alpha t \frac{2\pi}{\lambda} C_{sh} \tag{4.24}$$

a fázový rozdíl φ tak bude přímo úměrný plošné hustotě hmotnosti.

4.4 VÝBĚR OBLASTI

Pozorujeme-li v zorném poli samostatnou buňku, můžeme pro kvantifikaci obrazu použít veličiny B_q a M_q, definované (4.14) a (4.23), bez dalších úprav. Případy, kdy máme v zorném poli více buněk, jsou však častější. Sledujeme-li například buněčný cyklus v celé jeho délce, tzn. od mitosy do mitosy, nevyhneme se situaci, kdy na začátku budeme pozorovat dvě buňky. Pro sledování růstu je však potřeba vybrat oblast, v níž se nachází pouze jedna buňka. Hodnoty DPD je možné počítat zahrnutím celého pole. Sledovat pouze jednu buňku však může mít také velký význam, navíc výběrem libovolné oblasti můžeme sledovat změny fáze pouze v určité části buňky.

Získaný obraz v kterékoli zobrazovací technice může být digitalizací převeden do číselného maticového zápisu, kde jednotlivé prvky matice odpovídají hodnotám pixelů v daném zobrazení o stejné souřadnici. Číselné hodnoty pak nesou určitou informaci, na příkladu rekonstruované fáze v transmisním holografickém mikroskopu jde o hodnotu fáze pro daný pixel. Výběr oblasti můžeme provést následujícím postupem. Vezměme matici F, jejíž prvky f_{ij} definujeme jako

$$f_{ij} \equiv \varphi_{ij}, \tag{4.25}$$

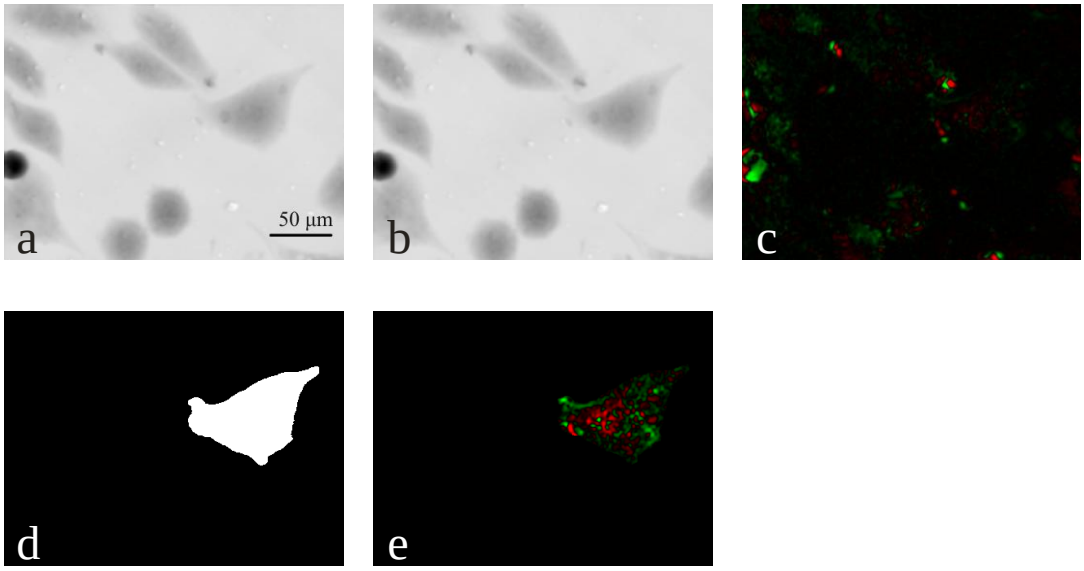
kde φ_{ij} je hodnota rekonstruované fáze v jednom pixelu o souřadnicích i, j. Mějme v zorném poli vybranou oblast Z a definujme prvky matice K takto:

$$k_{ij} = 1 \quad pro \quad \forall\, i, j \in Z \quad a \quad k_{ij} = 0 \quad pro \quad \forall\, i, j \notin Z\,. \tag{4.26}$$

Matice K představuje vybranou oblast vyjádřenou pomocí čísel 0 a 1, tedy masku. Vynásobením prvků matic F a K o stejné souřadnici i, j získáme prvky s_{ij} výsledné matice S:

$$s_{ij} = f_{ij} k_{ij}\,. \tag{4.27}$$

Matice S tak obsahuje hodnoty rekonstruované fáze uvnitř vybrané oblasti, ostatní prvky mají nulovou hodnotu. Masku můžeme nakreslit v grafickém editoru v černobílém kanálu, kde pixelům s bílou barvou poté přiřadíme hodnotu 1 a pixelům s černou barvou přiřadíme hodnotu 0. Postup ilustruje Obrázek 4.3.



Obrázek 4.3: Znázornění použití masky při výpočtu DPD: a – rekonstrukce fáze snímku pořízeném v čase τ, b – v čase $\tau + 20$ s, c – DPD mezi oběma snímky bez masky, d – maska s vybranou oblastí, e – DPD mezi oběma snímky s maskou. Měřítko je stejné pro všech pět obrázků. V obrázcích DPD byl pro názornost upraven kontrast.

5 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ

Experimenty byly zaměřeny na časosběrná pozorování živých buněk. Většina experimentů proběhla v optické laboratoři na ÚFI FSI VUT v Brně a v biologické laboratoři na Oddělení popálenin ve Fakultní nemocnici na Vinohradech v Praze. Pro pozorování bylo použito dvou zobrazovacích technik – transmisního holografického mikroskopu a mikroskopu s fázovým kontrastem. Cílem bylo pozorovat buněčný cyklus se zaměřením na mitosu a děje v buňce probíhající v souvislosti s ní. V případě transmisního holografického mikroskopu byly používány stacionární komůrky (popsané v odstavci 3.2), pro pozorování ve fázovém kontrastu kultivační nádoby.

Naměřená data časosběrných pozorování byla kvantitativně vyhodnocena metodami DPD a sledováním růstu, popsanými v kapitole 4. Pro kvantifikaci byla pomocí masky vždy vybrána oblast, zahrnují pouze jednotlivou buňku. Dále byl testován vliv sledování DPD pro různé oblasti v rámci jedné buňky.

5.1 TRANSMISNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP

Pro časosběrná pozorování živých buněk byl použit transmisní holografický mikroskop popsaný v odstavci 1.1. Před započetím každého experimentu proběhlo nastavení mikroskopu pro pozorování ([2], str. 15). Pokud nebylo docíleno dostatečného kontrastu interferenčních proužků v celém zorném poli, byla provedena celková justáž ([2], str. 13-14). Celková justáž byla provedena i po jakémkoli zásahu do konstrukce mikroskopu (například výměna objektivů, vyjmutí kamery pro čištění, apod.).

Pro konzistentní průběh pozorování je nutné dosáhnout ustálené teploty uvnitř plastového krytu, který izoluje mikroskop, a také stolku pro umístění vzorků. Ustálení teploty uvnitř krytu trvá několik hodin, nejlépe je začít s vyhříváním den před započetím experimentu. Ustálení teploty stolku netrvá déle jak hodinu.

Po úspěšné přípravě byly oba vzorky (předmětový a referenční) položeny na stolek a mikroskop byl opětovně nastaven pro pozorování. Rovněž byl upraven průměr clony pro regulaci osvětlení. Pomocí softwarového ovladače CCD kamery byl vždy nastaven zisk z kamery, expozice, průměrování snímků a časový interval mezi pořízením snímků. Po zaostření vnitřní plochy spodního sklíčka komůrky a nalezení vhodného objektu bylo započato pozorování.

Z interferogramu zaznamenaného CCD kamerou byla poté rekonstruována fáze postupem popsaným v [1] (str. 19-25) za pomoci softwaru vyvinutého na ÚFI FSI VUT v Brně. Rekonstruovanou fázi je poté potřeba navázat a vyrovnat pozadí [1] (str. 25). Teprve potom je zobrazení fáze připravené pro vyhodnocování.

Všechny experimenty byly provedeny s živými buňkami typu A3 a jejich modifikacemi a LF (viz Tabulka 3.3). U buněk typu LF se podařilo pouze jednou zachytit konec mitosy a počínající interfázi. U buněk A3 caRho byly nasnímány čtyři buněčné cykly v celé své délce, tzn. od mitosy do mitosy. Dále byl zaznamenán průběh přibližně 10-15 mitos s různou délkou končící, případně počínající interfáze. U jedné buňky typu A3 se podařilo zachytit dělení dvoujaderné buňky.

V následující části se nachází zpracovaní vybraných experimentů. U každého jsou vždy podrobně popsány podmínky pozorování. Uvedeny jsou některé sekvence pozorovaného dělení buněk pomocí rekonstruované fáze a DPD. Výše zmíněné zachycené buněčné cykly jsou zde kvalitativně i kvantitativně zpracovány. Grafy, popisné statistiky a testy hypotéz byly vypočteny ve zkušebních verzích programů STATISTICA 10 a Minitab 15.

5.1.1 EXPERIMENT 1 – BUNĚČNÉ CYKLY

Čtyři dny před započetím pozorování byly do stacionární komůrky nasazeny buňky typu A3 caRho. Buňky byly do komůrky o celkové ploše přibližně 220 mm^2 nasazeny s hustotou 10 buněk na 1 mm^2, což odpovídá přibližně 2000 buněk. V den experimentu došlo k výměně kultivačního média M1H, uzavření komůrky a uložení na dvě hodiny do inkubátoru. Po nastavení mikroskopu začalo snímání. Tabulka 5.1 udává veškeré vstupní parametry experimentu.

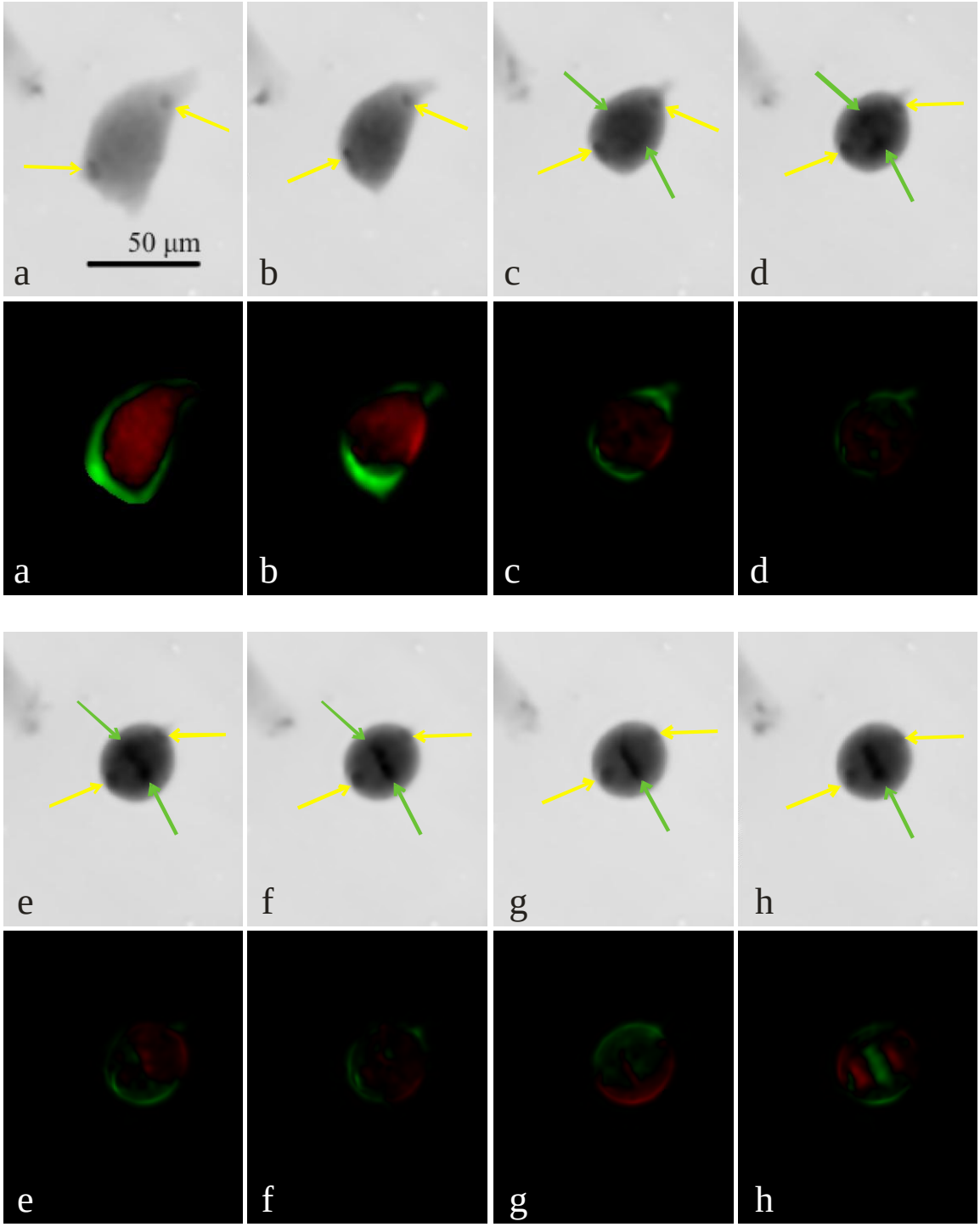
Tabulka 5.1: Vstupní parametry experimentu 1.

Nastavení mikroskopu	
Objektivy	10x/0,25
Průměr clony	4 mm
Nastavení parametrů kamery	
Zisk	1
Expozice	13 ms
Chlazení	7 °C
Průměrování	6 snímků
Nastavení snímání	
Interval	20 s
Celkový počet snímků	8501
Odpovídající doba	47 hod 13 min 20 s

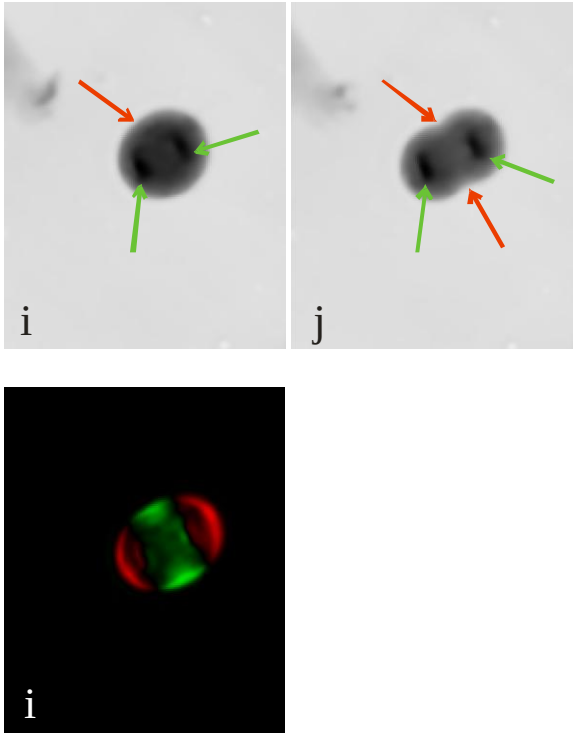
Jako vhodný objekt pro začátek pozorování byla vybrána osamocená buňka v konečné fázi dělení. Posuvným stolkem bylo docíleno, aby se buňka nacházela ve středu zorného pole. Po 24 hodinách již došlo k dalšímu dělení obou dceřiných buněk a zorné pole bylo přesunuto do výhodnějšího místa, aby se další objekty opět nacházely ve středu zorného pole. Tímto postupem se podařilo zachytit buněčné cykly čtyř buněk v celé délce, aniž by se přesunuly mimo zorné pole. Buňky A3 caRho jsou vhodným objektem pro dlouhá časosběrná pozorování, neboť jejich pohyblivost je za daných okolností řádově 10 μm za den.

Na Obrázku 5.1 je zobrazena sekvence snímků s intervalem 200 s zachycujících probíhající mitosu pomocí fáze a odpovídajících DPD.

Sekvence pravděpodobně zachycuje konec G_2 fáze a všech 6 fází mitosy – profázi, prometafázi, metafázi, anafázi, telofázi a začínající cytokinezi (viz odstavec 2.2). Snímek a zachycuje končící G_2 fázi. Na koncích buňky jsou jasně patrné centrosomy (žluté šipky), mezi nimiž se tvoří mitotické vřeténko. Mezi snímky b a c pravděpodobně proběhla prometafáze, tedy rozpad jaderného obalu, neboť na snímku c jsou již patrné chromatidy, které se vážou na mitotické vřeténko (zelené šipky). Mezi snímky e až h probíhá metafáze, na jejímž konci jsou chromatidy srovnány v ekvatoriální rovině. Na snímku i je zaznamenána telofáze a začínající cytokineze. Červenou šipkou je označen slabý náznak počínajícího rýhování cytoplazmy a formování kontraktilního prstence, který je na posledním snímku již jasně patrný. Cytokineze pak může trvat i několik hodin, kdy jsou buňky stále spojeny úzkým proužkem membrány.



Obrázek 5.1: Záznam mitosy buňky typu A3 caRho pomocí rekonstruované fáze a DPD. Měřítko uvedené na prvním snímku je společné pro všechny snímky. Žluté šipky označují centrosomy, zelené chromatidy a červené kontraktilní prstenec. V případě DPD jsou místa s přibytkem suché hmoty označena červenou škálou, místa s úbytkem zelenou škálou. Interval mezi snímky je 200 s (pokračování na další straně).

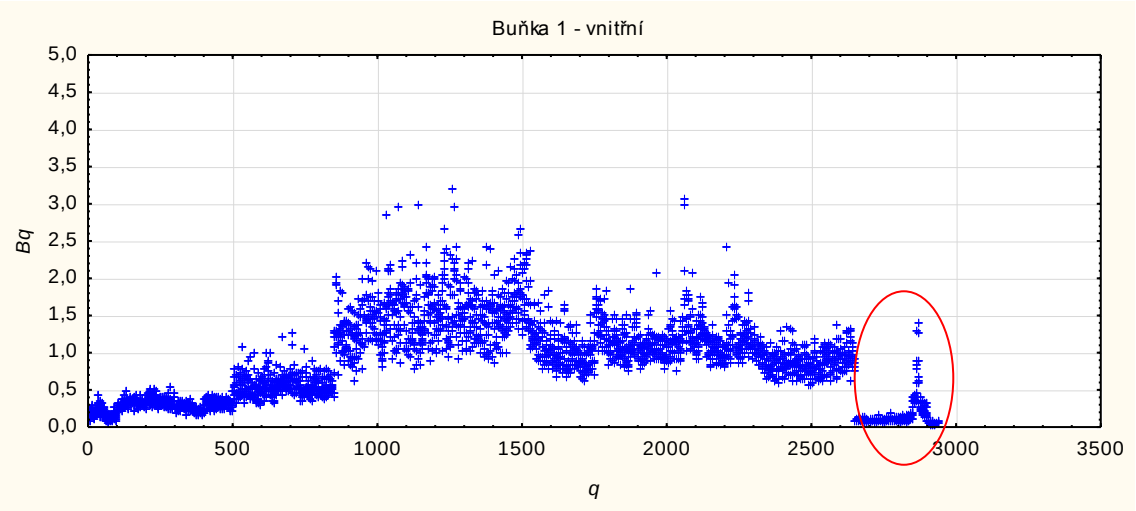


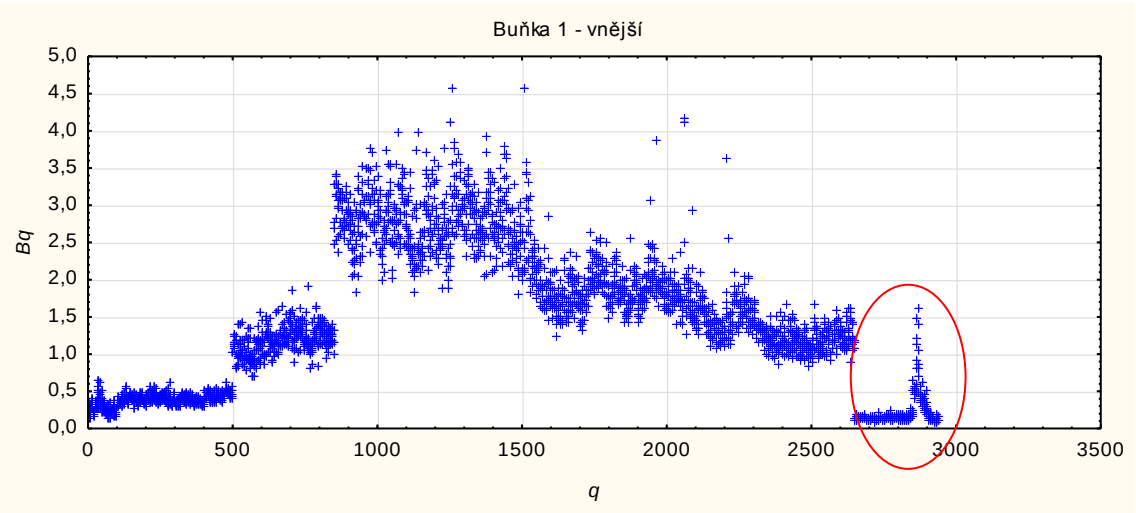
Obrázek 5.1 (pokračování z předchozí strany: Záznam mitosy buňky typu A3 caRho pomocí rekonstruované fáze a DPD. Měřítko uvedené na prvním snímku je společné pro všechny snímky. Žluté šipky označují centrosomy, zelené chromatidy a červené kontraktilní prstenec. V případě DPD jsou místa s přibytkem suché hmoty označena červenou škálou, místa s úbytkem zelenou škálou. Interval mezi snímky je 200 s.

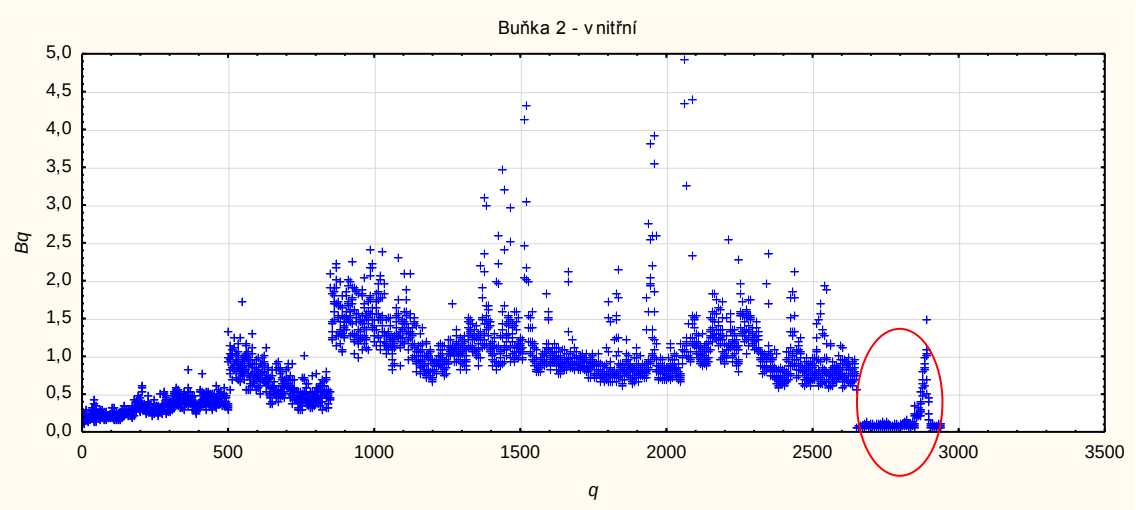
Po získání snímků byly selektovány jednotlivé buněčné cykly a bylo přistoupeno ke kvantitativnímu vyhodnocení v podobě DPD a sledování růstu.

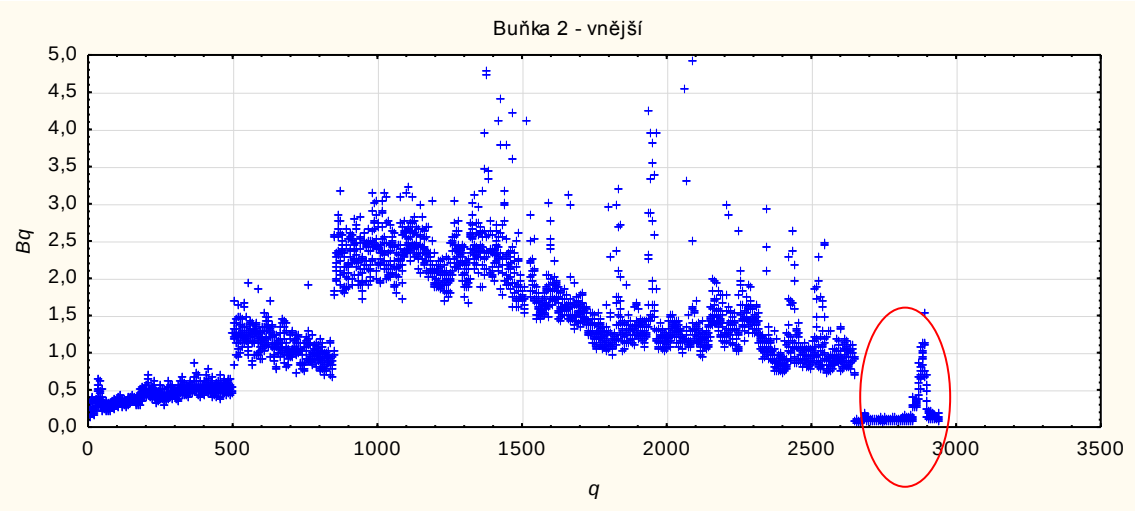
Dynamické fázové diference (DPD)

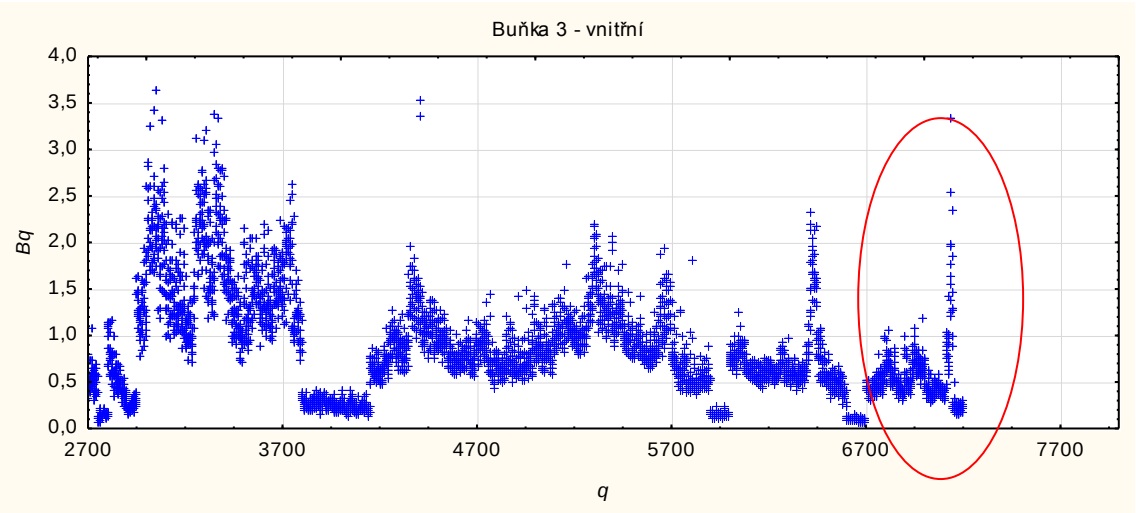
Prostřednictvím DPD pomocí výpočtu hodnot veličiny B_q (viz odstavec 4.2) byly vyhodnoceny všechny čtyři buněčné cykly. Jako počáteční a koncový snímek byl vždy vybrán okamžik s probíhající anafází, tedy oddělením sesterských chromatid. Změny fáze byly počítány vždy pro oblast zahrnující pouze pozorovanou buňku pomocí masky. Buňky se však během pozorování pohybují a po určitém počtu snímků musela být vytvořena maska nová, aby zahrnovala opět celou buňku a minimum svého okolí. Každá maska tak mohla být použita pro výpočet B_q pro 20-300 snímků v závislosti na pohyblivosti buňky v daném časovém úseku. Každý buněčný cyklus byl zpracován dvakrát, jednou s maskou zahrnující celou buňku a podruhé s maskou zahrnující vnitřní část buňky bez membrány a lamelových výběžků buňky, tedy v oblasti předpokládaných změn organel. Zpracované údaje jsou znázorněny v grafické podobě na Obrázku 5.2. Jednotlivé buněčné cykly jsou označeny čísly 1 – 4 a dále údajem *vnitřní* a *vnější*, označující použitou masku. Na vodorovné ose je pořadí snímků od začátku pozorování s časovým intervalem 20 s mezi jednotlivými snímky.

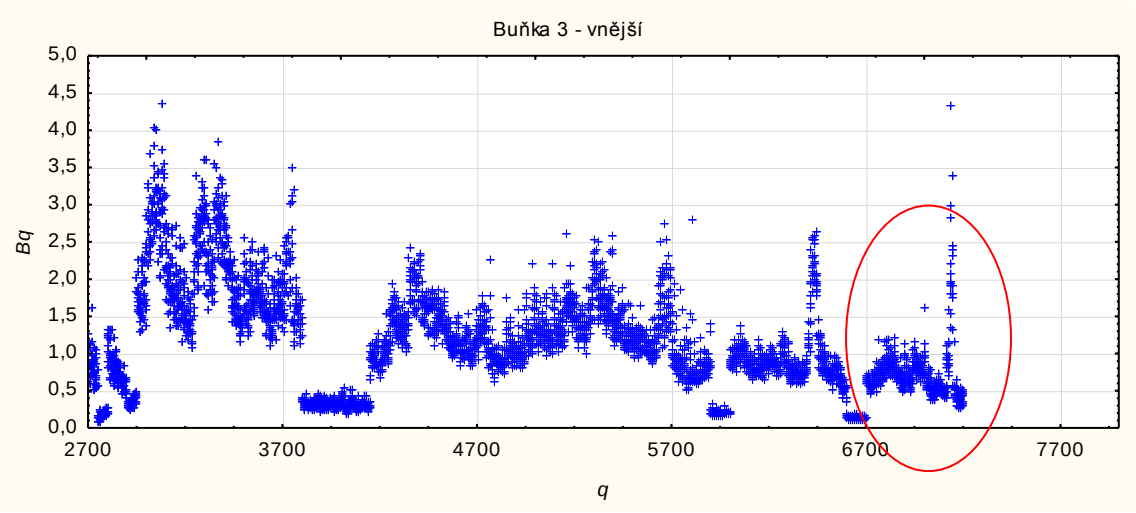

Buňka 1 - vnitřní
Bq
q
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500

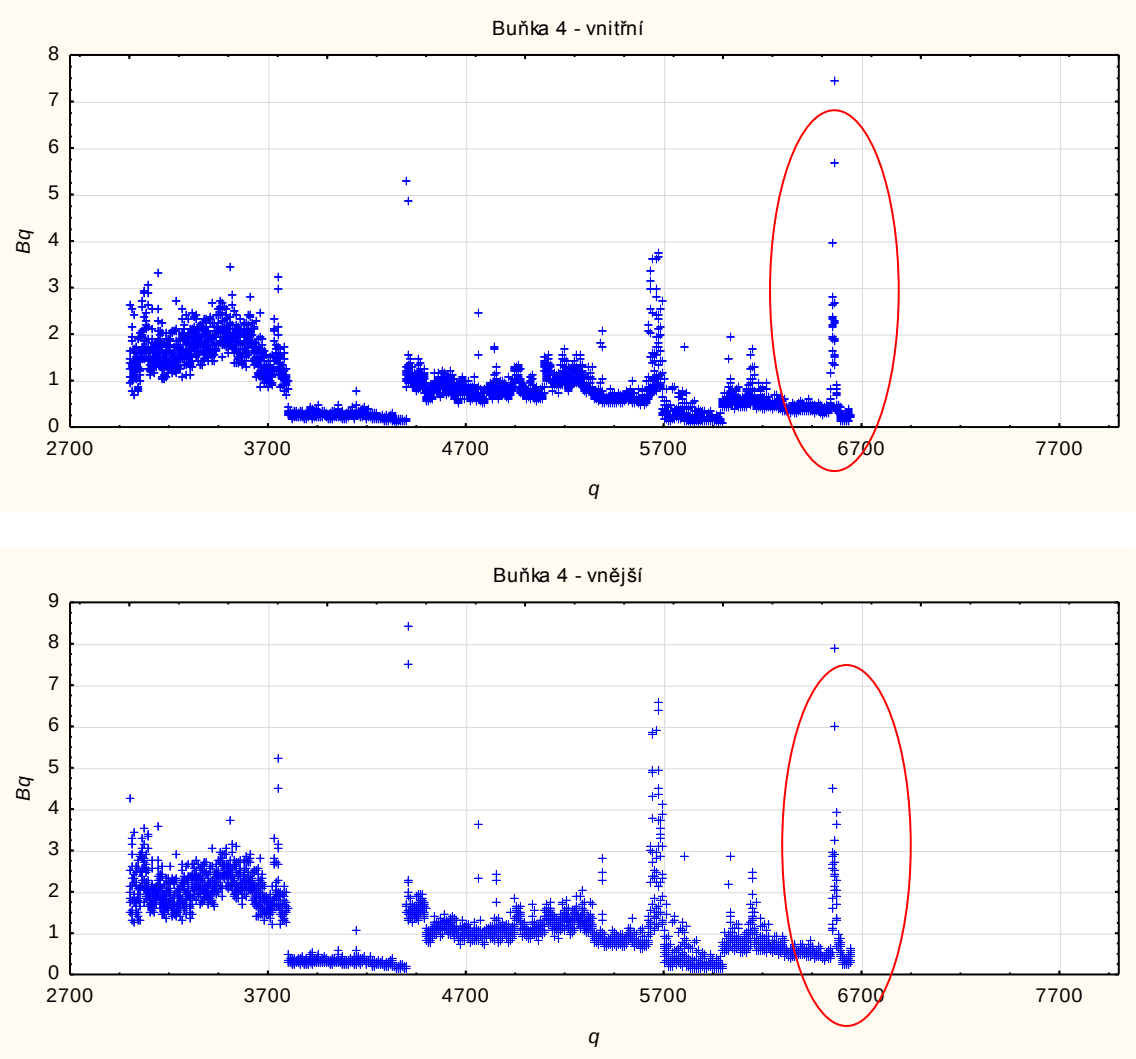

Buňka 1 - vnější
Bq
q
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500


Buňka 2 - vnitřní
Bq
q
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500


Buňka 2 - vnější
Bq
q
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500

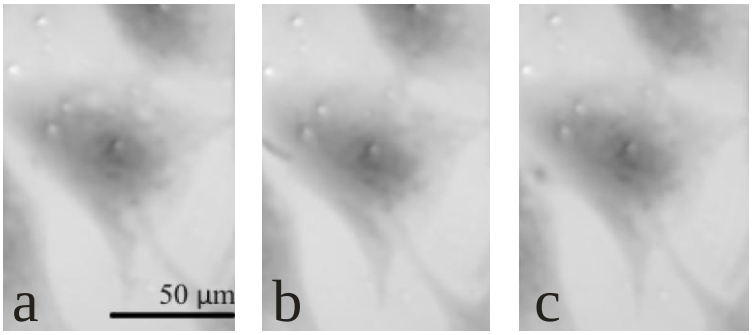

Buňka 3 - vnitřní
Bq
q
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
2700
3700
4700
5700
6700
7700


Buňka 3 - vnější
Bq
q
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
2700
3700
4700
5700
6700
7700



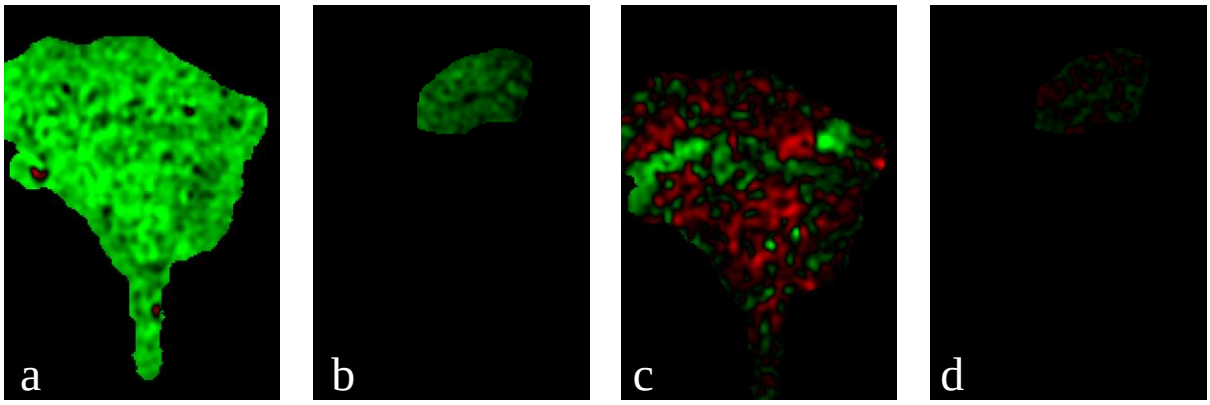
Obrázek 5.2: Časové průběhy B_q pro jednotlivé buněčné cykly a jednotlivé masky. Na vodorovné ose je pořadí snímků od začátku pozorování s časovým intervalem 20 s mezi jednotlivými snímky.

Výše uvedené průběhy DPD pro čtyři buňky vykazují minimálně jeden shodný rys, vyznačený v grafech červeně. Je jím určitá doba relaxace před samým koncem cyklu, kdy jsou přesuny hmoty vyjádřené veličinou B_q malé a rovněž rozptyl hodnot je malý (například pro buňku 1 jde přibližně o snímky 2600-2800). Pak však následuje lokální maximum hodnot spojené s přesunem suché hmoty ve velmi krátké době. Po srovnání se snímky se zobrazenou fází bylo zjištěno, že v tomto momentu se buňka smršťuje do kulatého tvaru a buňka přechází z interfáze do mitosy. Další nárůst hodnot u buňky 4 proběhl v úzkém intervalu kolem snímku s pořadovým číslem 5700. Zde však k žádným výrazným změnám pohybu nedošlo, ba téměř k žádným, jak ukazuje sekvence na Obrázku 5.3. Je zajímavé, že lokální maximum hodnot se vyskytuje nejen v průběhu DPD pro vnitřní oblast buňky 4, ale také u buňky 3, i když zde není tak výrazný.



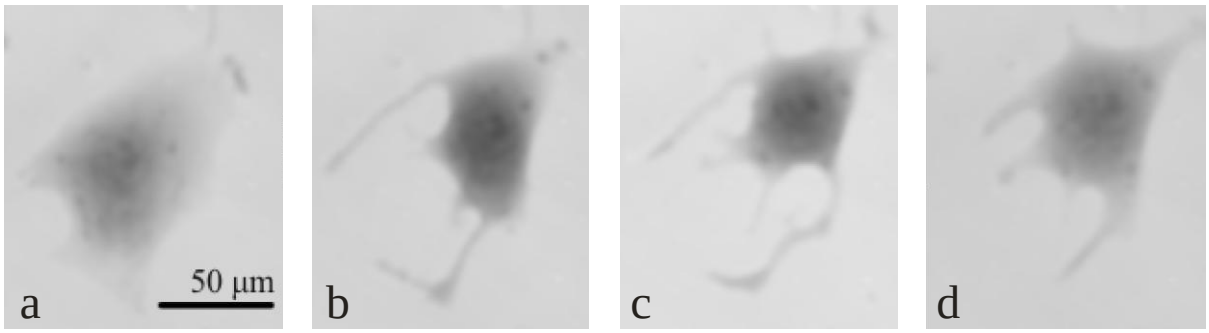
Obrázek 5.3: Rekonstruovaná fáze pro snímky: a - 5680, b - 5700, c - 5720, zahrnující buňku 4. Pohyb suché hmoty je minimální. Měřítko je společné pro všechny snímky.

Bylo proto přistoupeno k detailnějšímu prozkoumání vizaulizací DPD pro snímky 5600-5700. Některé snímky vykazovaly přesun suché hmoty rovnoměrně přes celou vybranou oblast. Příklad je uveden na Obrázku 5.4 a. Zelená barva vyjadřuje míru úbytku suché hmoty. To je však v rozporu s chováním buňky v tak krátkém časovém intervalu (20 s). Běžný průběh DPD je na Obrázku 5.4 c, kdy dochází k přesunu hmoty na krátké vzdálenosti, tedy v určitých místech buňky dochází k úbytku suché hmoty, v jiných zase k nárůstu. Jako možná příčina se jeví, že celé pozadí rekonstruované fáze je posunuto. Pro ověření byla maskou vybrána oblast, v které se během výše uvedené sekvence nevyskytuje žádný objekt. DPD odpovídající výše uvedeným snímkům, ale pro oblast zahrnující pouze pozadí, jsou na Obrázku 5.4 b, d. Vidíme, že v případě b došlo k rovnoměrné změně fáze pozadí (zelená plocha) na rozdíl od případu d (černá plocha odpovídající nulové změně fáze). Tento fakt je znepokujující, neboť nám do průběhů změn fáze vnáší chybu. Zdali jde o chybu měření nebo o chybu vnesenou do rekonstrukci fáze, by bylo vhodné ověřit dalšími experimenty.



Obrázek 5.4: a – DPD pro oblast s buňkou, b – DPD pro oblast s pozadím pro stejnou dvojici snímků jako v a, c – DPD pro oblast s buňkou pro jinou dvojici snímků než v a a b, d - DPD pro oblast s pozadím pro stejnou dvojici snímků jako v c. Kontrast snímků byl pro lepší názornost upraven pro všechny snímky stejně. Šířka každého obrázku odpovídá 100 µm.

Zato výrazná změna veličiny B_q buňky 3 kolem snímku 6500 má přímo pozorovatelnou souvislost s jejím přesunem a změnou tvaru, jak ilustruje Obrázek 5.5.



Obrázek 5.5: Rekonstruovaná fáze pro snímky: a - 6401, b - 6461, c - 6521, d – 6581, zahrnující buňku 3 s intervalem 20 minut (60 snímků). Pohyb suché hmoty je výrazný, spojený s lokálním maximem v grafu na Obrázku 5.2.

Nyní se podívejme podrobněji na souvislosti mezi jednotlivými soubory dat. Z letmého pohledu na grafy v rámci jedné dvojice pro vnější a vnitřní masku se může zdát, že průběhy DPD jsou na obou téměř totožné. Nabízí se tedy otázka, zdali sledováním diferencí pouze v konkrétní oblasti buňky získáme novou informaci.

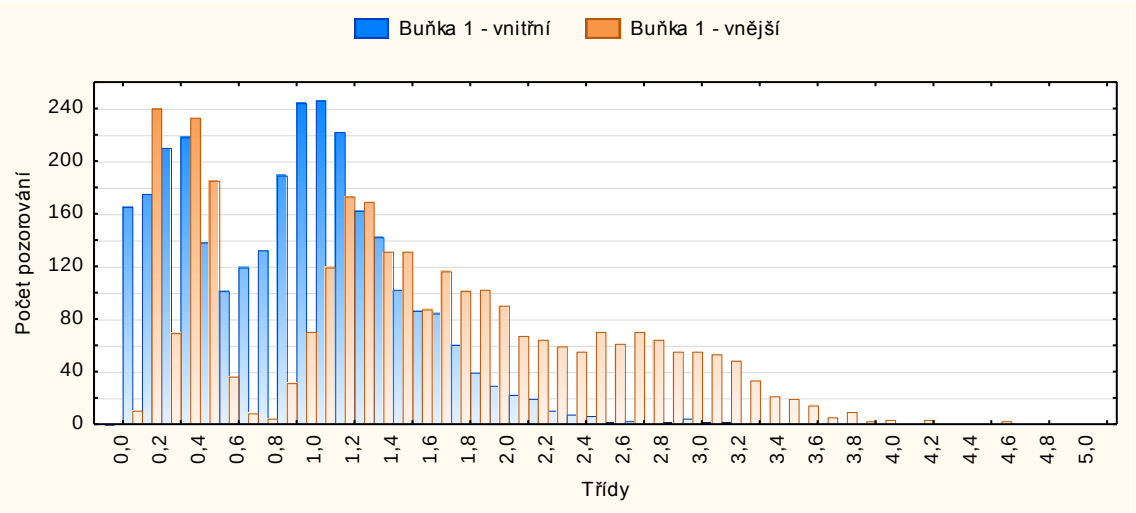
Pro porovnání jednotlivých souborů dat pomocí popisných statistik je důležité vědět, jestli mají naměřená data vlastnosti normálního rozdělení. Testujme hypotézu o normálním rozdělení pro jednotlivé soubory veličiny B_q. Pro prověření této hypotézy byl použit chí-kvadrát test a Kolmogorovův-Smirnovův test pro zvolenou hladinu významnosti α = 0,05. Jednotlivé hodnoty testových kritérií (χ^2, d) a p-hodnot jsou uvedeny v Tabulce 5.2.

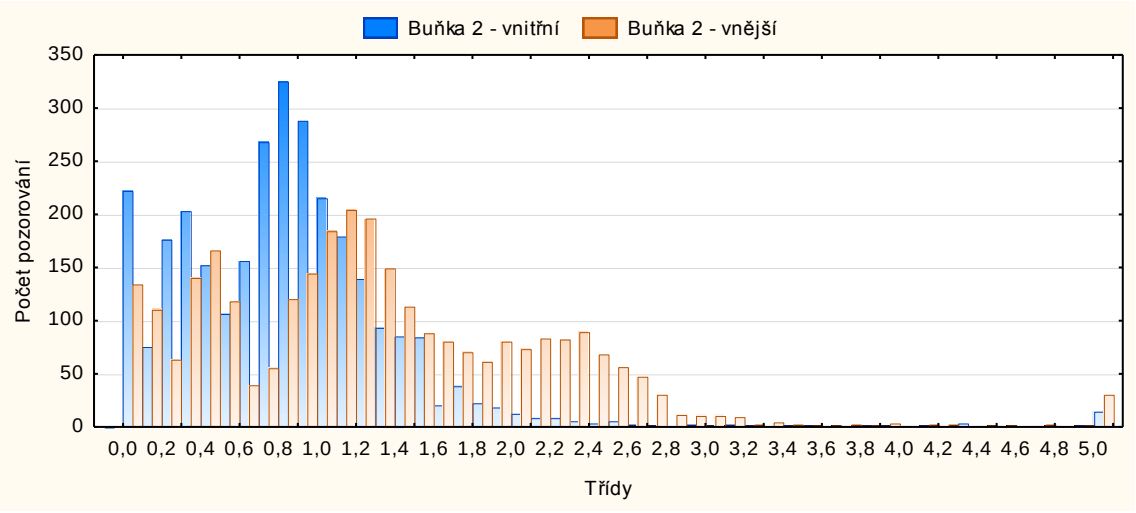
Tabulka 5.2: Testy hypotéz o normálním rozdělení hodnot veličiny B_q pro jednotlivé datové soubory.

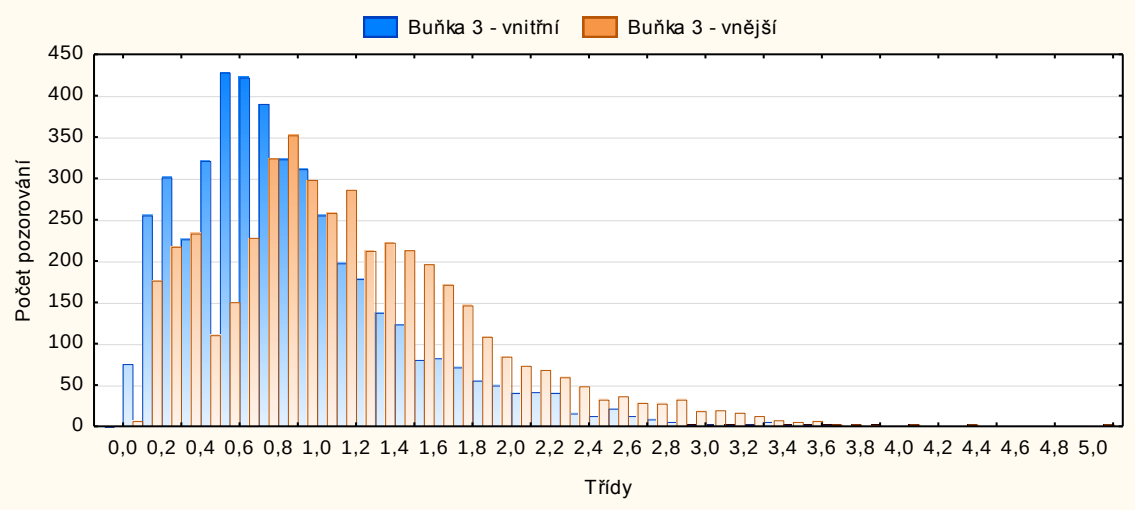
Datový soubor	Chí-kvadrát		Kolmogorov-Smirnov	
	χ^2	p-hodnota	d	p-hodnota
Buňka 1 – vnitřní	636,299	0,000	0,074	< 0,010
Buňka 1 – vnější	1338,207	0,000	0,102	< 0,010
Buňka 2 – vnitřní	-	-	0,148	< 0,010
Buňka 2 – vnější	-	-	0,157	< 0,010
Buňka 3 – vnitřní	1089,236	0,000	0,081	< 0,010
Buňka 3 – vnější	657,615	0,000	0,059	< 0,010
Buňka 4 – vnitřní	1066,744	0,000	0,092	< 0,010
Buňka 4 – vnější	698,219	0,000	0,086	< 0,010

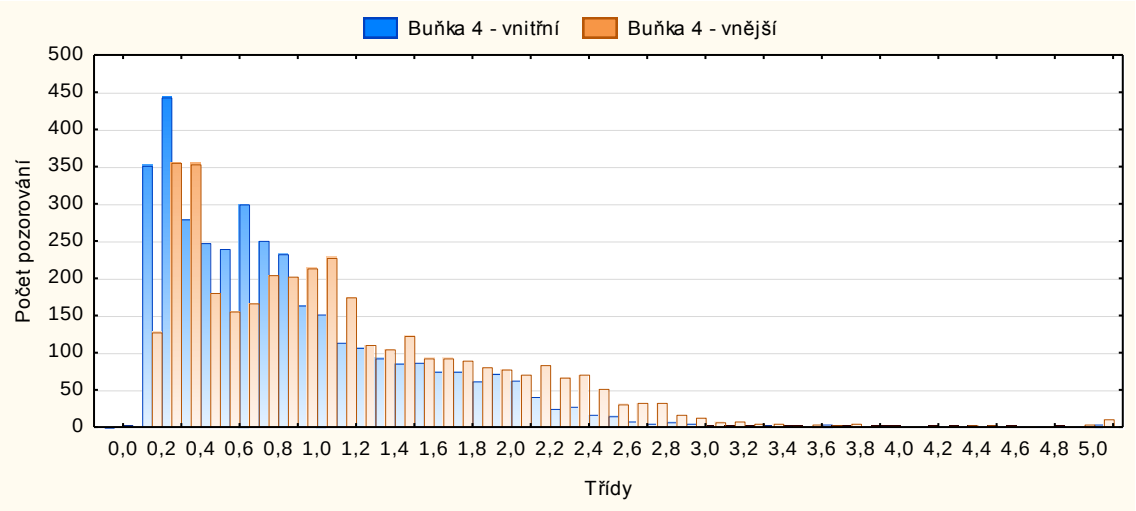
Na dané hladině významnosti α = 0,05 zamítáme hypotézu o normálním rozdělení pro všechny soubory dat. Při dalších výpočtech popisných statistik k tomuto faktu musíme přihlédnout a používat výpočty pro libovolné rozdělení.

Na Obrázku 5.6 jsou vykresleny histogramy četností veličiny B_q, vyjadřující normovanou pohyblivost suché hmoty. V každém grafu je vždy porovnána četnost pohybů suché hmoty pro celou buňku a pro její vnitřní oblast.


Buňka 1 - vnitřní
Buňka 1 - vnější
Počet pozorování
0
40
80
120
160
200
240
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 1,2 1,4 1,6 1,8 2,0 2,2 2,4 2,6 2,8 3,0 3,2 3,4 3,6 3,8 4,0 4,2 4,4 4,6 4,8 5,0
Třídy


Buňka 2 - vnitřní
Buňka 2 - vnější
Počet pozorování
0
50
100
150
200
250
300
350
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 1,2 1,4 1,6 1,8 2,0 2,2 2,4 2,6 2,8 3,0 3,2 3,4 3,6 3,8 4,0 4,2 4,4 4,6 4,8 5,0
Třídy


Buňka 3 - vnitřní
Buňka 3 - vnější
Počet pozorování
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 1,2 1,4 1,6 1,8 2,0 2,2 2,4 2,6 2,8 3,0 3,2 3,4 3,6 3,8 4,0 4,2 4,4 4,6 4,8 5,0
Třídy



Obrázek 5.6: Histogramy četností veličiny B_q pro jednotlivé cykly s porovnáním pro vnitřní a vnější masku.

Získali jsme tak kvalitativně odlišný údaj, než který lze vyčíst z Obrázku 5.2. Zatímco na Obrázku 5.2 je průběh B_q v čase, zde vidíme četnost, tedy k jak velkým přesunům suché hmoty dochází nejčastěji. Z grafů je možné vysledovat, že fázové diference v oblasti zahrnující celou buňku (oranžové sloupce) zasahují do vyšších hodnot a jejich zastoupení pro vyšší hodnoty B_q je větší v porovnání s vnitřní maskou. Domněnku ověříme testováním hypotéz H_0 o rovnosti rozptylů a středních hodnot. Tabulka 5.3 udává bodové (μ, σ^2) a intervalové (CI) odhady středních hodnot a rozptylů jednotlivých souborů dat s hladinou spolehlivosti 0,95. Tabulka 5.4 pak shrnuje testování hypotéz o rovnosti rozptylů a středních hodnot. Pro rozptyl byl použit Leveneův test, pro střední hodnotu T-test, pro oba případy na hladině významnosti α = 0,05. V tabulce je vždy uvedena příslušná hodnota t testového kritéria a p-hodnota.

Tabulka 5.3: Popisné statistiky veličiny B_q pro jednotlivé datové soubory. n – počet hodnot, μ – bodový odhad střední hodnoty s příslušným konfindenčním intervalem, σ^2 – bodový odhad rozptylu s příslušným konfindečním intervalem.

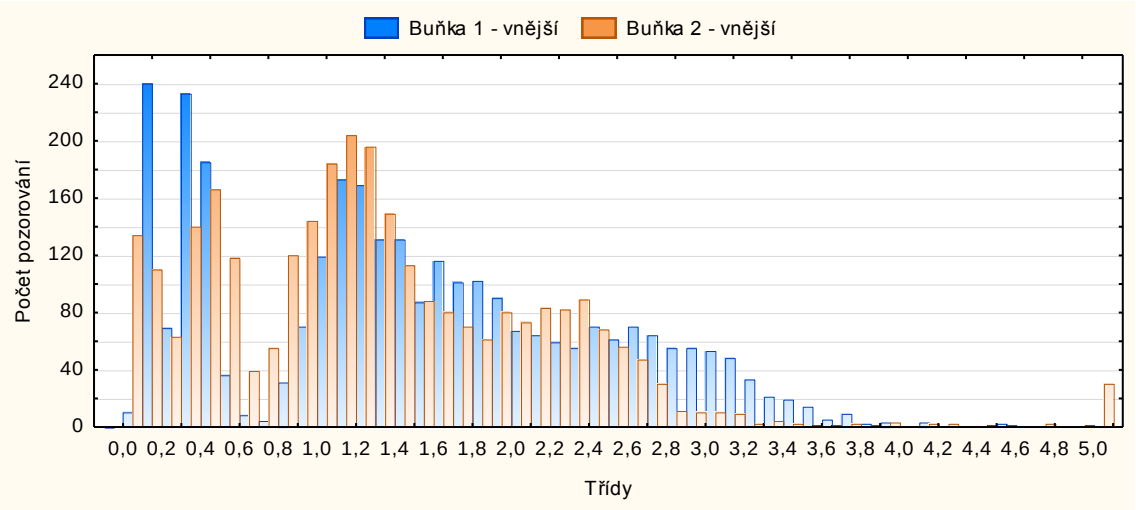
Datový soubor	n	μ	CI	σ^2	CI
Buňka 1 – vnitřní	2937	0,879	(0,860; 0,899)	0,292	(0,278; 0,307)
Buňka 1 – vnější	2937	1,482	(1,448; 1,516)	0,889	(0,854; 0,926)
Buňka 2 – vnitřní	2937	0,875	(0,845; 0,907)	0,703	(0,482; 1,121)
Buňka 2 – vnější	2937	1,359	(1,310; 1,408)	1,820	(1,180; 3,140)
Buňka 3 – vnitřní	4487	0,862	(0,846; 0,878)	0,300	(0,284; 0,317)
Buňka 3 – vnější	4487	1,160	(1,140; 1,180)	0,467	(0,443; 0,494)
Buňka 4 – vnitřní	3637	0,842	(0,822; 0,863)	0,402	(0,368; 0,441)
Buňka 4 – vnější	3637	1,010	(1,070; 1,122)	0,641	(0,582; 0,709)

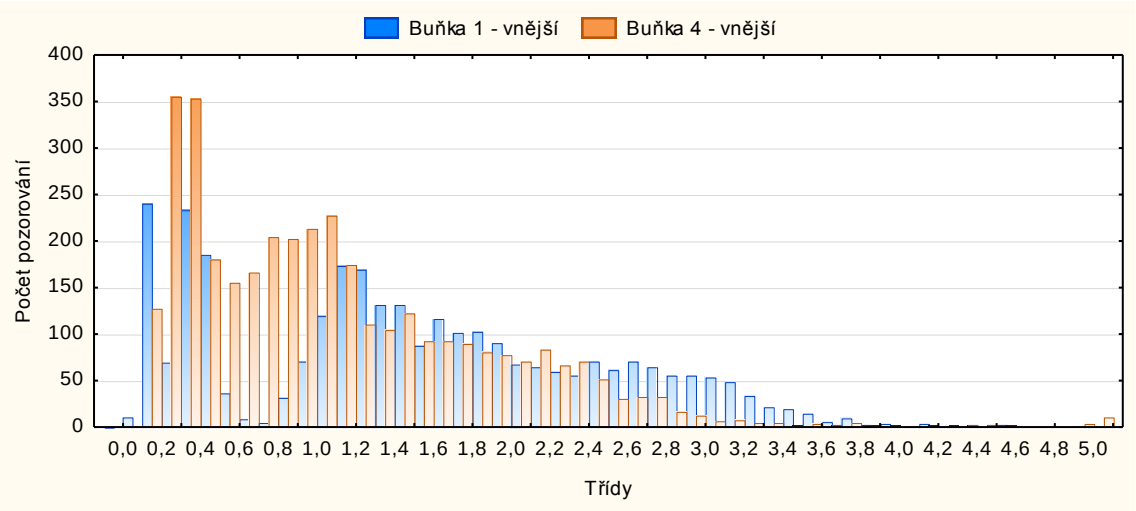
Tabulka 5.4: Testy hypotéz o rovnosti rozptylů (Leveneův test) a středních hodnot (T-test) hodnot B_q vnitřní a vnější masky pro jednotlivé buněčné cykly.

Porovnávané datové soubory		H_0: $\sigma^2 = \sigma_0^2$		H_0: $\mu = \mu_0$	
		t	*p*	*t*	*p*
Buňka 1 - vnitřní	Buňka 1 - vnější	813,81	0,000	-30,07	0,000
Buňka 2 - vnitřní	Buňka 2 - vnější	129,47	0,000	-16,53	0,000
Buňka 3 - vnitřní	Buňka 3 - vnější	173,44	0,000	-22,80	0,000
Buňka 4 - vnitřní	Buňka 4 - vnější	111,70	0,000	-14,96	0,000

Hypotézu o rovnosti rozptylů a hypotézu o rovnosti středních hodnot zamítáme na dané hladině významnosti α = 0,05 pro všechny porovnávané soubory. Ověřili jsme tak, že výpočtem B_q pro různé oblasti v rámci jedné buňky získáme odlišné údaje o pohyblivosti suché hmoty. V našem případě to tedy znamená, že hodnoty B_q pro oblast zahrnující celou buňku vyjadřují výrazněji smršťování buňky v důsledku probíhajících fází mitosy zatímco vymezením na vnitřní oblast buňky se omezíme na děje probíhající uvnitř buňky. Chceme-li tedy lépe zachytit fázové změny odehrávající se uvnitř buňky, je vhodné použít masku, která nepokrývá plasmatickou membránu a úzké lamelovité výběžky buňky.

Cyklus buněk 1, 2 a 3, 4 probíhal současně, tedy v rámci téhož zorného pole. Z grafů na Obrázku 5.2 lze vysledovat, že hodnoty veličiny B_q v rámci odpovídající dvojice buněk vykazují shodné rysy. Příčiny mohou být následující. Oba cykly probíhají synchronně a je možné, že buňky mezi sebou navzájem komunikují, nebo jsou shodně ovlivněny změnami vnějšího prostředí. Další variantou je možný vliv samotného zpracování obrazu. Na Obrázku 5.7 a v Tabulce 5.5 je porovnán průběh B_q buňky 1 s buňkami 2 a 4 stejným způsobem jako v předešlém případě.





Obrázek 5.7: Histogramy četností veličiny B_q pro jednotlivé cykly s porovnáním buňky 1 s buňkami 2 a 4.

Tabulka 5.5: Testy hypotéz o rovnosti rozptylů (Leveneův test) a středních hodnot (T-test) hodnot B_q buňky 1 s buňkou 2 a 4.

Porovnávané datové soubory		H_0: $\sigma^2 = \sigma_0^2$		H_0: $\mu = \mu_0$	
		t	*p*	*t*	*p*
Buňka 1 - vnější	Buňka 2 - vnější	7,42	0,006	4,06	0,000
Buňka 1 - vnější	Buňka 4 - vnější	163,14	0,000	17,66	0,000

Hypotézu H_0 o rovnosti rozptylů a hypotézu o rovnosti středních hodnot zamítáme na dané hladině významnosti α = 0,05 pro všechny porovnávané soubory. Z histogramů četností hodnot B_q je patrná větší shoda cyklu buňky 1 s buňkou 2 než s buňkou 4. Hypotéza o rovnosti rozptylů byla pro oba soubory zamítnuta, hodnota testového kritéria je však u prvního porovnávaného souboru menší (7,42 oproti 163,14). V případě cyklů 1 a 2 šlo o dceřiné buňky sledované od stejného okamžiku. Pokud se buňky nacházejí ve stejné fázi svého cyklu, je možné, že při paralelním snímání budou vykazovat i shodný průběh hodnot B_q, který pomocí transmisního holografického mikroskopu můžeme proměřit. Synchronní chování buněk 1 a 2 vykazuje i fakt, že začátek cytokineze obou dceřiných buněk (tedy následujícího dělení) proběhl v rozmezí asi 2 min.

DPD buněk 1 a 2 byly následně zpracovány rozdělením do segmentů po 500 snímcích s cílem najít případné shody v rámci jednoho segmentu. V Tabulce 5.6 jsou uvedeny výsledky testů hypotéz počítaných opět stejným způsobem jako v předešlých případech.

Tabulka 5.6: Testy hypotéz o rovnosti rozptylů (Leveneův test) a středních hodnot (T-test) hodnot B_q buněčných cyklů buňky 1 a 2 v rámci jednotlivých segmentů po 500 snímcích.

Porovnání cyklů buňky 1 a 2 pro dané segmenty	H_0: $\sigma^2 = \sigma_0^2$		H_0: $\mu = \mu_0$	
	t	*p*	*t*	*p*
0-500	43,74	0,000	-8,50	0,000
501-1000	11,76	0,001	4,67	0,000

1001-1500	0,08	0,781	11,79	0,000
1501-2000	14,57	0,000	0,29	0,770
2001-2500	4,00	0,046	1,21	0,225
2501-2940	1,73	0,189	2,45	0,014

Hypotézu o rovnosti rozptylů na hladině významnosti α = 0,05 nezamítáme pro 3. a 6. datový soubor, hypotézu o rovnosti středních hodnot nezamítáme pro 4. a 5. soubor, v ostatních případech hypotézy zamítáme. Největší shodu rozptylů (podle nejnižší hodnoty testového kritéria) vykazuje segment pro snímky 1001-1500. Detail průběhu a histogramu četností je na Obrázku 5.8.

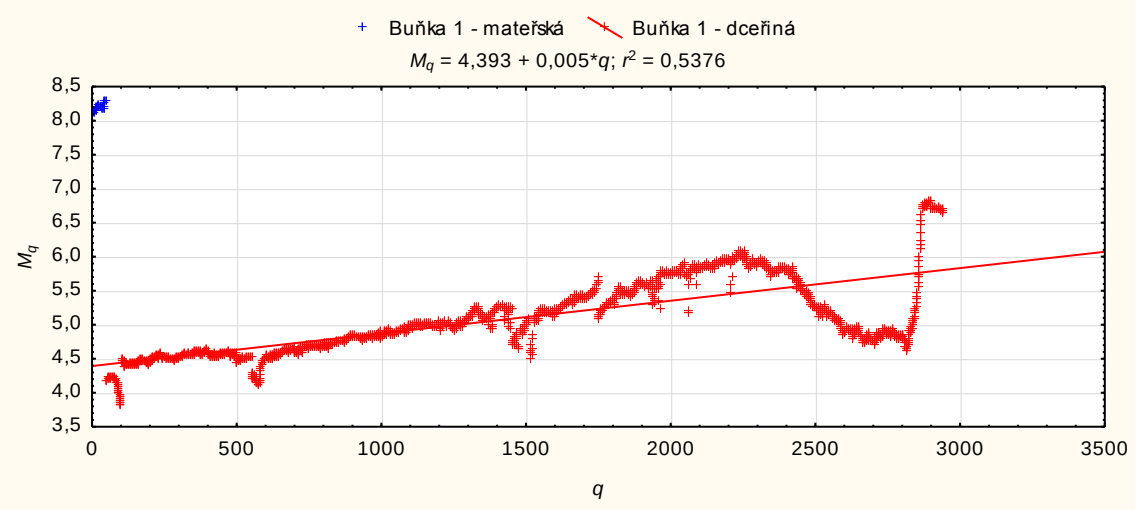
Obrázek 5.8: Časový průběh a histogram četností veličiny B_q snímků 1000-1500 pro buňky 1 a 2, v kterých se rozptyl hodnot B_q pro obě buňky nejvíce shodoval.

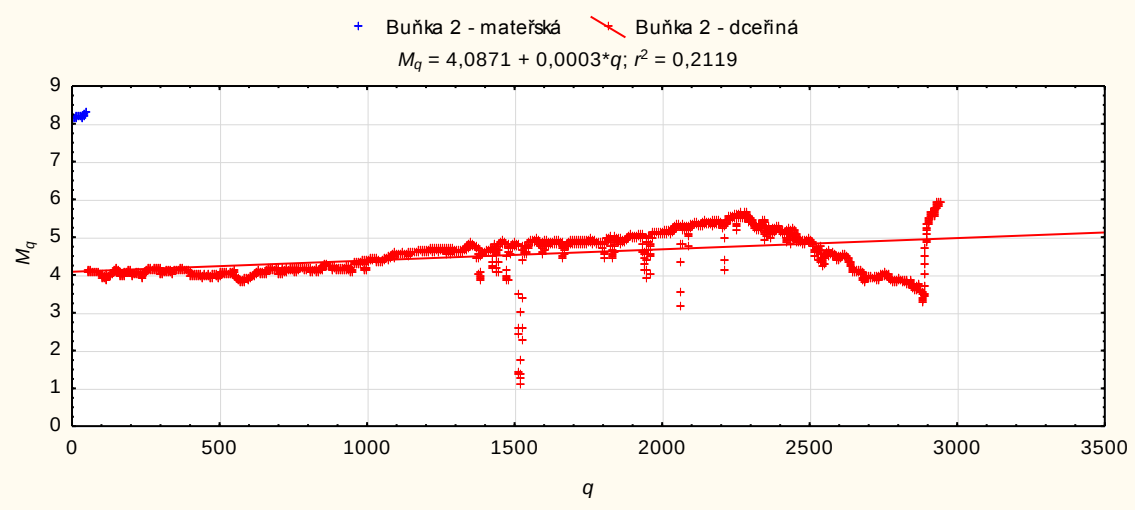
V rámci zvolených segmentů se u dvou shodují rozptyly hodnot B_q, z čehož je možné usuzovat, že zde dochází k podobným dějům u obou dceřiných buněk. Zároveň je tak částečně zodpovězena i druhá otázka, tedy zdali průběh veličiny B_q neovlivňuje nastavení mikroskopu,

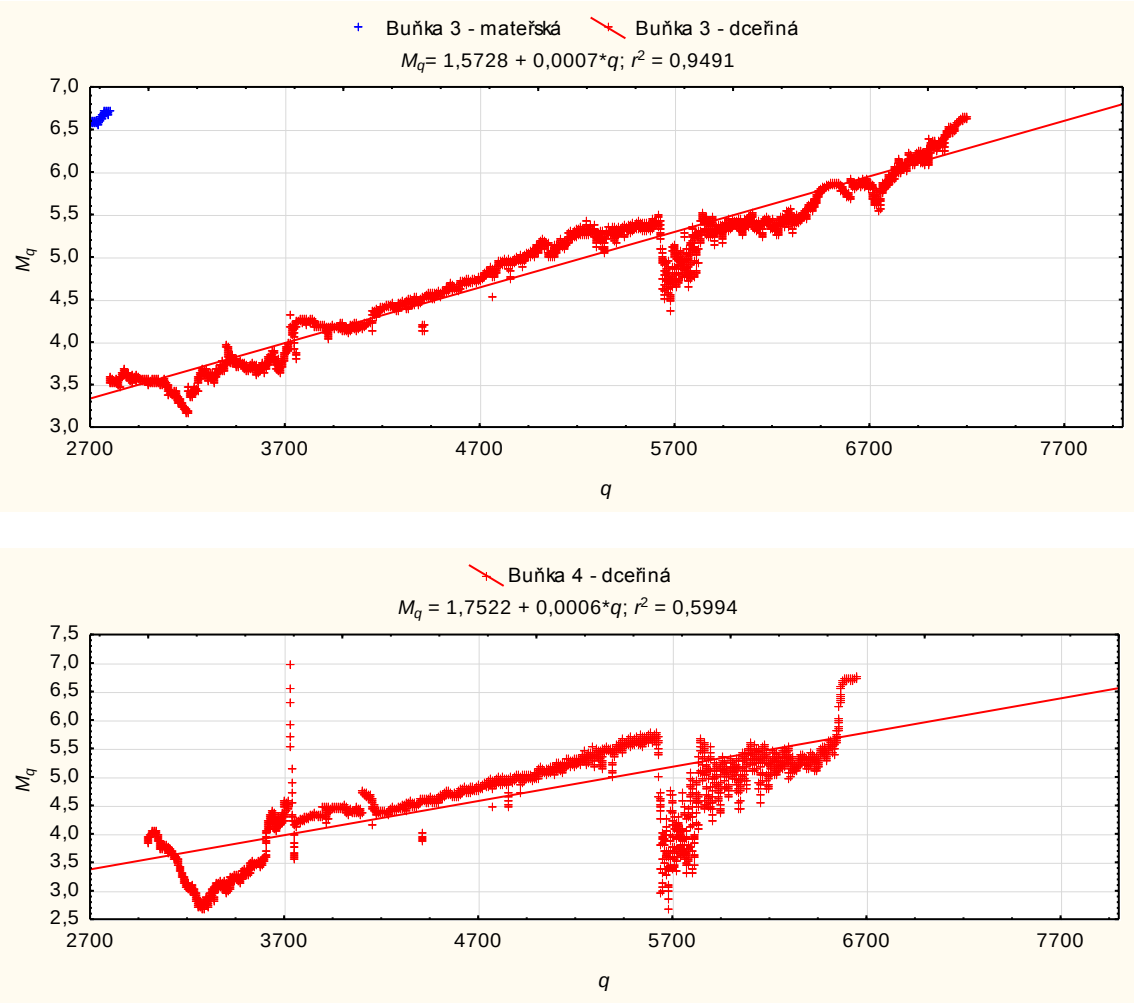
rekonstrukce fáze a následné zpracování obrazu. Očekávanou situací by byla shoda průběhů ve všech segmentech, což nebylo potvrzeno.

Sledování růstu

Podobně jako v případě DPD byly všechny čtyři buněčné cykly vyhodnoceny pomocí výpočtů veličiny M_q (viz odstavec 4.3), která souvisí se změnami hmotnosti a objemu buňky v závislosti na čase. Problém, zdali M_q je určeno hmotností i objemem buňky, je diskutován v odstavci 4.3. Pro výpočet byla použita pouze maska zahrnující celou buňku. Počáteční a koncový okamžik byl zvolen stejně jako v případě DPD. Obrázek 5.9 ukazuje získané průběhy pro všechny čtyři cykly. Vodorovná osa má stejný význam jako u grafů na Obrázku 5.2. Modře označené body zvýrazňují průběh M_q uvnitř plochy zahrnující ještě nerozdělenou, mateřskou buňku, červeně označené body pak již vyznačují průběh pro oblast zahrnující pouze samostatnou dceřinou buňku. Výjimku tvoří buňka 4, neboť malá část mateřské buňky se nacházela mimo zorné pole a nebylo tak možné pomocí masky vybrat oblast, která by zahrnovala celou buňku. V odpovídajícím grafu tedy není vyznačena. Průběh dceřiné buňky je proložen regresní přímkou. Veličina r^2 označuje koeficient determinace [6].







Obrázek 5.9: Časový průběh veličiny M_q pro jednotlivé buňky. Na vodorovné ose je pořadí snímků od začátku pozorování s časovým intervalem 20 s mezi jednotlivými snímky.

Rovnice (4.21) v odstavci 4.3 popisuje souvislost veličiny M_q s hmotností a objemem buňky. Podmínkou mitotického dělení je, aby buňka zdvojnásobila počet všech substancí v ní obsažených a tím tedy i přibližně zdvojnásobila svoji hmotnost [5]. Všechny zaznamenané průběhy M_q vykazují dva shodné rysy. Pro každou dceřinou buňku byl zaznamenán rostoucí trend a dále hodnoty M_q pro mateřskou buňku jsou dvojnásobné oproti hodnotám pro dceřiné buňky na začátku cyklu, což by odpovídalo rozdělení původní buňky na dvě s poloviční hmotností.

Problém může představovat fakt, že v průběhu cyklu mění buňka svůj objem nezávisle na změnách hmotnosti. Pokud M_q závisí i na objemu buňky, pak bez jeho znalosti v daném čase je interpretace změn celkové hmotnosti buňky z výše uvedených dat nemožná.

5.1.2 EXPERIMENT 2 – DĚLENÍ DVOUJADERNÉ BUŇKY

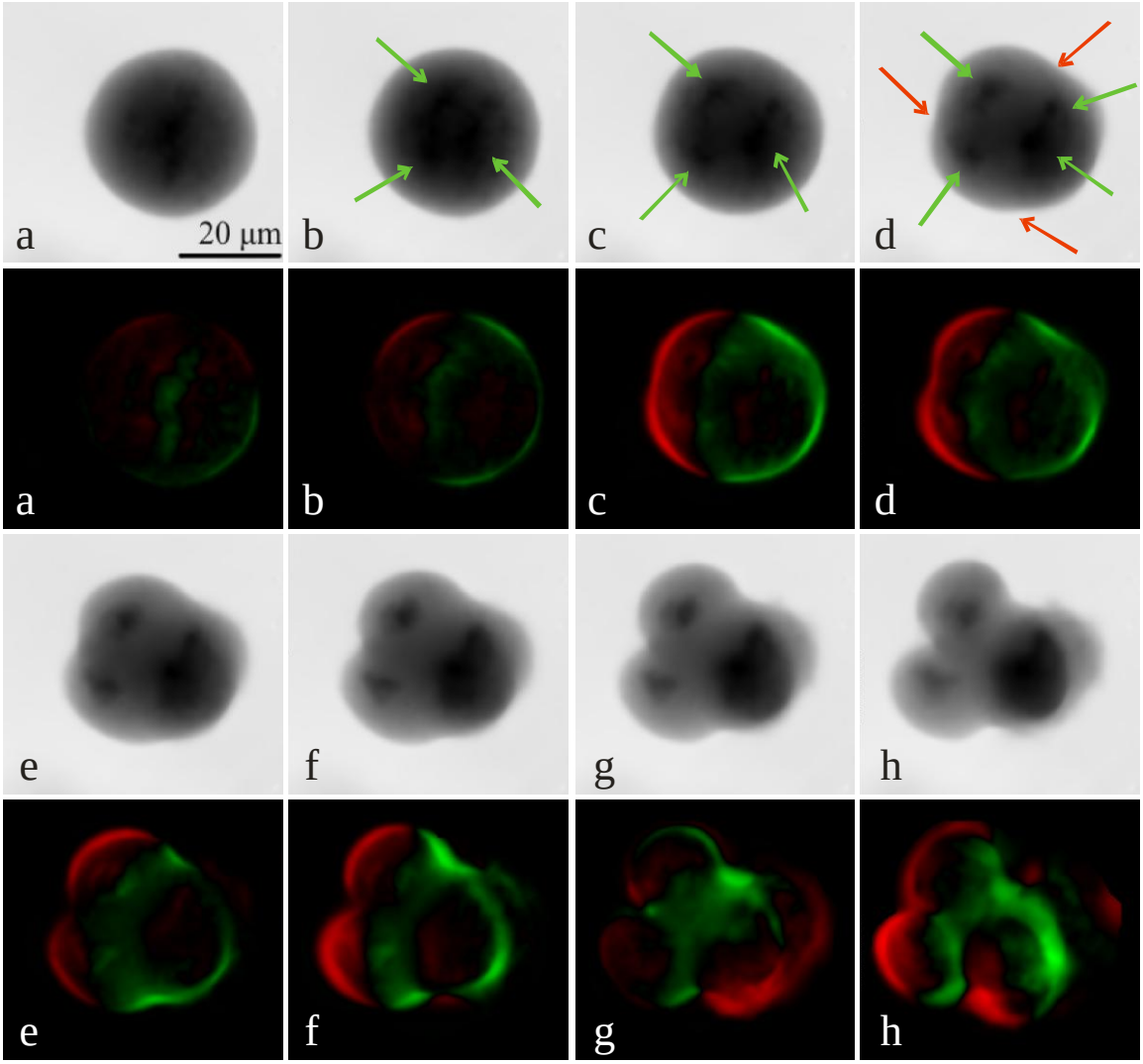
Pro tento experiment byly použity buňky typu A3. Ze suspenze staré tři dny byly do stacionární komůrky nasazeny s hustotou 20 buněk na 1 mm^2. Do komůrky bylo přidáno

kultivační médium M1H. Komůrka byla poté uzavřena a vložena na několik hodin do inkubátoru. Po nastavení mikroskopu bylo započato se snímáním. Vstupní parametry udává Tabulka 5.7.

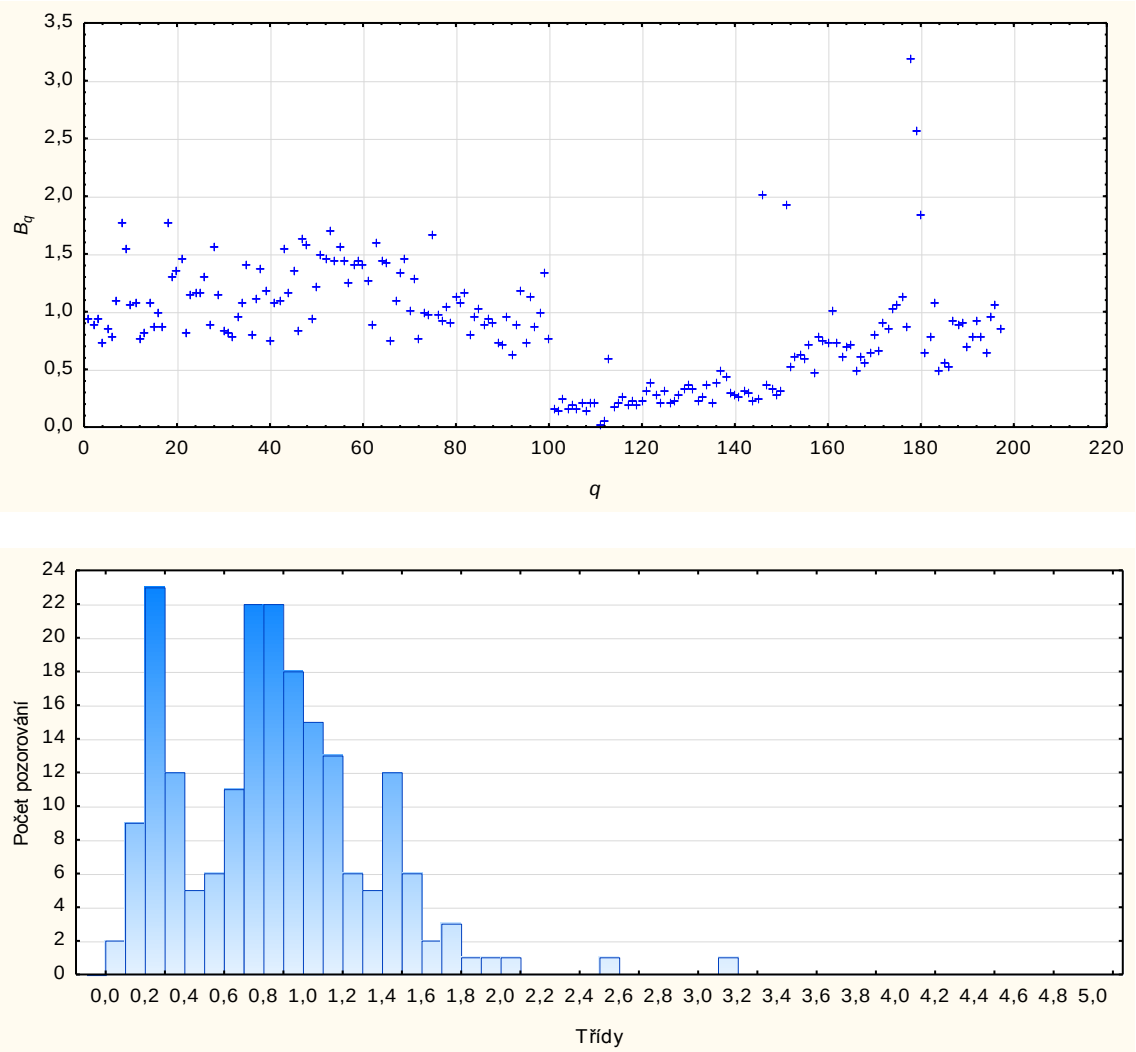
Tabulka 5.7: Vstupní parametry experimentu 2 (údaje týkající se nastavení kamery nebyly zapsány).

Nastavení mikroskopu	
Objektivy	20x/0,40
Průměr clony	4 mm
Nastavení parametrů kamery	
Zisk	
Expozice	
Chlazení	
Průměrování	
Nastavení snímání	
Interval	10 s
Celkový počet snímků	333
Odpovídající doba	55 min 30 s

Na Obrázku 5.10 je vyobrazena sekvence s rekonstruovanou fází a odpovídajícími DPD s intervalem 200 s (20 snímků). Na obrázku rekonstruované fáze 5.10 a je vidět seřazení sesterských chromatid v ekvatoriální rovině mitotického vřeténka. Seřazené chromatidy jsou pozorovatelné na rekonstruované fázi, ale DPD na snímku a jejich pozici zobrazují ještě lépe zeleným pruhem jdoucím přes střed buňky, neboť z tohoto místa se chromatidy posunuly směrem k pólům vřeténka a došlo zde tak k úbytku hmoty. Na obrázcích b - c během anafáze dochází k další separaci chromatid (zelené šipky), na obrázku d lze již rozpoznat čtyři skupiny chromatid, z čehož lze usuzovat, že jde o dvoujadernou buňku. Na obrázku d s probíhající telofází je také znát poloha kontraktilního prstence (červené šipky) na třech místech na místo obvyklých dvou. Na obrázku h vidíme zdánlivě tři separované buňky, jedna se však dělí do prostoru a překrývá buňku pod sebou, čemuž odpovídá i zvýšení plošné koncentrace suché hmoty. Obrázek 5.11 ukazuje časový průběh a histogram četností B_q. Z grafu pro časový průběh je zřejmé, že přibližně uprostřed vybrané sekvence došlo ke skokovému útlumu přesunů suché hmoty. Podíváme-li se na obrázky s rekonstruovanou fází, jde o dobu mezi snímky d a e, tedy předěl mezi telofází a cytokinezí. Během postupující cytokineze dochází opět k nárůstu hodnot B_q.



Obrázek 5.10: Záznam dělení dvoujaderné buňky typu A3 pomocí rekonstruované fáze a DPD. Měřítko uvedené na prvním snímku je společné pro všechny snímky. Zelené šipky označují chromatidy a červené kontraktilní prstenec. V případě DPD jsou místa s přibytkem suché hmoty označena červenou škálou, místa s úbytkem zelenou škálou. Interval mezi snímky je 200 s.



Obrázek 5.11: Časový průběh a histogram četností veličiny B_q pro dvoujadernou buňku typu A3.

5.1.3 ZÁVĚR

Pomocí transmisního holografického mikroskopu je možné sledovat jednotlivé fáze buněčného cyklu a kvantitativně je vyhodnocovat. K vyhodnocení může být použita metoda DPD a sledování růstu. Pro časosběrná pozorování více buněčných cyklů se ukázalo výhodnější použití objektivů 10x/0,25. Vyvarujeme se tak problému, že by se pohybující buňka dostala po krátké době mimo zorné pole. Pozorování lze tak provádět téměř bez obsluhy. Pro detailnější záznam krátkodobých dějů v buňce je vhodné použití objektivů 20x/0,40. Použitím objektivů s větším zvětšením bychom mohli být schopni zobrazit vnitřní strukturu buňky s více detaily. Zorné pole by však bylo malé a značně by zúžilo výběr pozorovaných objektů.

Vyhodnocení lze provést pouze pro určitou oblast zorného pole. Můžeme tak například vyhodnotit oblast zahrnující celou buňku, nebo její část. V experimentu 1 bylo statistickými

metodami prokázáno, že tím získáme odlišnou informaci o pohybech buněčné hmoty během buněčného cyklu.

Průběhy DPD vykazují shodné rysy pro záznamy celého buněčného cyklu i jednotlivých dějů. Časové závislosti DPD vykazují skokový charakter, kdy v určitých úsecích buněčného cyklu dochází k výraznějším přesunům suché hmoty, následované útlumem a po určité době opět k výraznějším přesunům (lokální maxima v grafech na Obrázku 5.2 zejména pro buňku 3). Dalším obecným rysem je, že průměrná aktivita některých buněk se mění po určitých časových intervalech, takže časová závislost vykazuje schodovitý charakter (grafy na Obrázku 5.2 pro buňky 1 a 2, Obrázek 5.11 pro buňku v experimentu 2). V experimentu 1 pro buňky 1 a 2 bylo dále poukázáno na fakt, že dvě různé buňky nacházející se ve shodném okamžiku od rozdělení mateřské buňky vykazují v určitých částech buněčného cyklu shodný průběh DPD. Jako možné vysvětlení se jeví, že se v buňce odehrávajíc shodné procesy.

Sledováním růstu byl zjištěn rostoucí trend veličiny M_q, která je úměrná celkové hmotnosti buňky (s případným vlivem změn objemu, pokud by index lomu média nebyl shodný s indexem lomu vnitřního obsahu buňky). Stanovený předpoklad o zdvojnásobení hmotnosti byl prokázán pouze u buňky 3 (třetí graf na Obrázku 5.9).

5.2 FÁZOVÝ KONTRAST

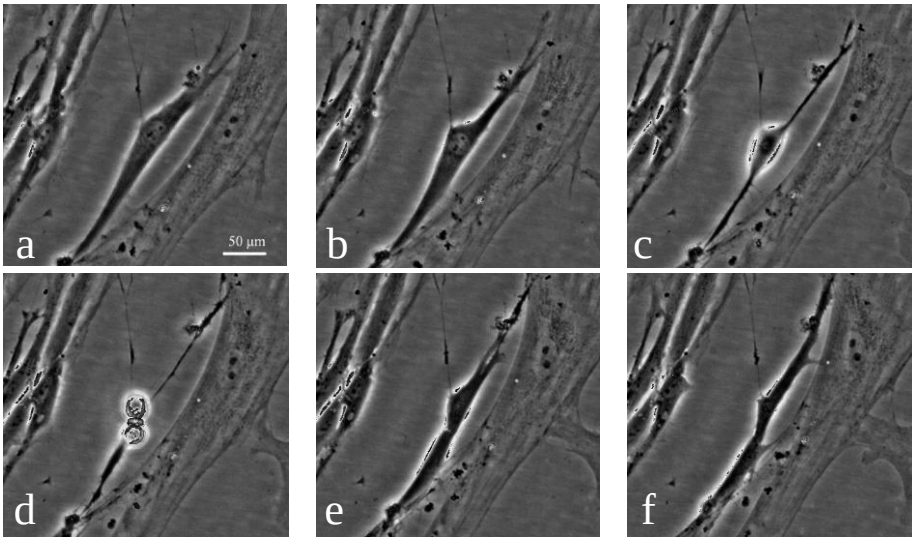
Experimenty s pozorováním buněk v Zernikově fázovém kontrastu byly provedeny na komerčním mikroskopu NIKON Diaphot 300 za účelem cvičení v laboratoři, pozorování dělení buěnk typu LF a porovnání získaných snímků s transmisním holografickým mikroskopem. Celkem byly provedeny dvě časosběrné série s buňkami typu LF. Buňky byly naneseny na krycí sklíčko položené na dno Petriho misky. Ta byla v případě jedné série doplněna médiem M1H, v případě druhé roztokem F10. Po uzavření byla Petriho miska položena na stolek mikroskopu a započalo snímání.

Rozložení intenzity v obrazu získaném fázovým kontrastem nezávisí lineárně na fázovém rozdílu mezi objektem a obklopujícím prostředím jako v případě rekonstrukce fáze v transmisním holografickém mikroskopu. Metodu DPD a sledování růstu zde nemůžeme pro kvantitativní vyhodnocení pořízených snímků použít.

Tabulka 5.9 udává vstupní parametry pozorování. Na Obrázku 5.12 je vyobrazena sekvence s probíhající mitosou.

Tabulka 5.9: Vstupní parametry experimentu s mikroskopem s fázovým kontrastem.

Nastavení mikroskopu	
Objektiv	10x/0,25
Filtr (maximální propustnost)	540 nm
Nastavení snímání	
Interval	5 s
Celkový počet snímků	997
Odpovídající doba	1 hod 5 s
Vlastnosti vzorku	
roztok v kultivační nádobě	F10



Obrázek 5.12: Dělení buňky typu LF v mikroskopu s fázovým kontrastem. Interval mezi snímky je 25 s. Měřítko je shodné pro všechny snímky.

Na snímku b v Obrázku 5.12 je zachycen přechod buňky, nacházející se uprostřed snímku, do M-fáze, na snímku probíhá, jedna z fází mitosy, snímky d-f zobrazují cytokinezi. Na snímu d je patrný výrazný halo-efekt, který znemožňuje detailněji pozorovat jednotlivé části M-fáze. Přítomnost těchto artefaktů a nelineární závislost intenzity světla obrazu na fázovém rozdílu mezi objektem a pozadím představuje hlavní rozdíl v porovnání s interferenčními zobrazovacími metodami, mezi něž patří i transmisní holografický mikroskop.

ZÁVĚR

V rámci své bakalářské práce jsem se věnoval experimentům s živými savčími buňkami zaměřených na pozorování buněčného cyklu a buněčného dělení a možnostem kvantitativního vyhodnocení získaných snímků. Rovněž jsem se seznámil s prací v biologické laboratoři a získal tak potřebný vhled do této problematiky.

Ve své práci shrnuji základní poznatky o eukaryotní buňce a buněčném cyklu, které jsou potřebné pro kvalitativní zhodnocení získaných pozorování, tedy bezpečně rozpoznat jednotlivé fáze buněčného cyklu.

Stěžejní část experimentální části tvořilo pozorování buněk v transmisním holografickém mikroskopu. V práci je podrobně uveden průběh experimentu včetně přípravy vzorku. Dále zde vysvětluji význam fázového rozdílu indukovaného pozorovaným objektem, na základě čehož je poté odvozena a z použité literatury převzata metoda kvantitativního vyhodnocení pomocí dynamických fázových diferencí, které sledují pohyby suché hmoty na základě časových změn rekonstruované fáze. Dále je zde navržena metoda sledování růstu buňky a popsán postup vyhodnocování snímků pro vybranou oblast v zorném poli.

Z provedených experimentů byly pro vyhodnocení vybrány dvě pozorování. Součástí prvního jsou nasnímané buněčné cykly čtyř buněk typu A3 caRho, druhé pozorování pak zachycuje dělení dvoujaderné buňky typu A3. V případě obou pozorování byl vždy sestaven časový průběh a histogram četností hodnot dynamických fázových diferencí pro oblast zahrnující celou buňku a v případě buněčných cyklů i vnitřní oblast buňky. Pro buněčné cykly byly dále sestaveny časové průběhy sledování růstu. Dělení dvoujaderné buňky a vybrané dělení v rámci buněčných cyklů bylo kvalitativně zpracováno s identifikací pozorovatelných organel buňky a jednotlivých fází buněčného dělení.

Pomocí transmisního holografického mikroskopu byl detailně zachycen průběh buněčného dělení s možností určit jednotlivé organely (centrosom, mitotické vřeténko, chromatidy, atd.) a pozorováním jejich změn identifikovat fáze buněčného dělení.

Časové průběhy dynamických fázových diferencí, vyjadřujících pohyb suché hmoty, pro jednotlivé buňky vykazovaly shodné rysy v podobě lokálního maxima hodnot v době dělení a střídání růstu a útlumu pohybu suché hmoty. Dále byly v případě zaznamenaných buněčných cyklů porovnány hodnoty dynamických fázových diferencí pro vnější a vnitřní oblast buňky, rovněž byly porovnány jednotlivé cykly mezi sebou a testovány případné shody. Bylo zjištěno, že sledováním diferencí pro oblast zahrnující vnitřek buňky získáme odlišné údaje, než když sledujeme oblast zahrnující celou buňku. Předpoklad, že buňka během svého cyklu musí zdvojnásobit svoji hmotnost, byl potvrzen sledováním růstu pouze u jedné buňky, u všech cyklů byl však zaznamenán rostoucí trend veličiny úměrné hmotnosti buňky.

Nakonec bylo pozorování buněčného cyklu v transmisním holografickém mikroskopu porovnáno s mikroskopem s fázovým kontrastem. Zjištěn byl významný artefakt v podobě halo-efektu, který se vyskytuje v místech s vysokou koncentrací suché hmoty, což zahrnuje případ, kdy se buňka dělí. Následkem je, že některé detaily buněčného dělení nejsme schopni pozorovat. Nelineární závislost intenzity získaného obrazu na změně fáze navíc znesnadňuje interpretaci kvantitativního významu fáze daného objektu (v souvislosti s koncentrací suché hmoty v případě buňky).

Transmisní holografický mikroskop je tedy vhodným nástrojem pro získání dlouhodobých pozorování živých buněk a umožňuje jejich kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení. Konzistenci získaných výsledků ve významu možnosti srovnání s jinými experimenty by bylo vhodné v další části výzkumu ověřit například pozorováním odlišných typů buněk. V případě, že by se výsledky shodovaly, mohly by tak být stanoveny určité vzorce chování různých druhů buněk.

LITERATURA

[1] Janečková H.: Interferenční mikroskopie biologických vzorků. Diplomová práce, Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně, 2006.

[2] Uhlířová H.: Mikroskopie časově proměnných biologických objektů. Dizertační práce, Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně, 2010.

[3] Wayne R.: Light and Video Microscopy. Academic Press, 2009.

[4] Kotlík B., Růžičková K.: Chemie v kostce 1. díl. Fragment, 1996. S. 96.

[5] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Základy buněčné biologie. Espero Publishing, 1998.

[6] Karpíšek Z.: Matematika IV. Pravděpodobnost a statistika. CERM, Brno 2007.

[7] Koolman J., Roehm K.H.: Color Atlas of Biochemistry. 2. vydání, Thieme, Stuttgart 2005

[8] Sugimoto K., Tone S.: Imaging of Mitotic Cell Division and Apoptotic Intra-Nuclear Processes in Multicolor In *Live Cell Imaging Methods and Protocols*. Humana Press, 2010. S. 135.

[9] Kolman P.: Koherencí řízený holografický mikroskop. Dizertační práce, Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT v Brně, 2010.