

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 4. Biologie

Studium nitrobuněčné motility pomocí kvantitativního fázového zobrazování

Barbora Kuželová

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

STUDIUM NITROBUNĚČNÉ MOTILITY POMOCÍ
KVANTITATIVNÍHO FÁZOVÉHO ZOBRAZOVÁNÍ

STUDY OF INTRACELLULAR MOTILITY USING
QUANTITATIVE PHASE IMAGING

AUTOR Barbora Kuželová

ŠKOLA Gymnázium Brno, Křenová 304/36,
příspěvková organizace

KRAJ Jihomoravský

ŠKOLITEL Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

OBOR 4. Biologie

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma *Studium nitrobuněčné motility pomocí kvantitativního fázového zobrazování* jsem vypracovala samostatně pod vedením Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne: _____

Barbora Kuželová

Poděkování

Děkuji svému školiteli Ing. Zbyňku Dostálovi, Ph.D. za obětavou pomoc, podnětné připomínky a nekonečnou trpělivost, kterou mi během práce poskytoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Chmelíkové, Ph.D. za pomoc s kultivací buněk a MUDr. Pavlu Veselému, CSc. za cenné rady v oblasti biologie. Dále děkuji i PaedDr. Lence Ryšavé za její podporu, pochopení a trpělivost, které mi byly nesmírně cenné během práce na této studii.

Tato práce byla provedena za finanční podpory CEITEC VUT a výzkumných infrastruktur Czech-BioImaging a Euro-BioImaging.



Anotace

Studium nitrobuněčné motility v krátkých časových úsecích je klíčové pro hlubší porozumění buněčným procesům. Pro dosažení tohoto cíle je nutné stanovit optimální snímkový interval, který zajistí maximální rychlost získávání dat při zachování vysoké kvality a relevance snímků. V rámci výzkumu byly vybrány dvě buněčné linie, K2 a T15, které byly pasážovány a následně analyzovány. Pro zobrazování byl použit hiQPI mikroskop. Snímky získané při různých snímkových intervalech byly zpracovány metodou AID (Analytical Image Differencing). Na základě analýzy takto zpracovaných snímků byla sestavena statistika, která umožnila identifikovat nejvhodnější snímkový interval pro dané experimentální podmínky.

Klíčová slova

biologie živé buňky, kvantitativní fázové zobrazení, nitrobuněčná motilita, buněčná síla, snímkový rychlost

Annotation

The study of intracellular motility over short time intervals is crucial for a deeper understanding of cellular processes. To achieve this goal, it is necessary to determine the optimal imaging interval that ensures the maximum data acquisition speed while maintaining high quality and relevance of the images. For this research, two cell lines, K2 and T15, were selected, passaged, and subsequently analyzed. Imaging was performed using the hiQPI microscope. Images captured at different imaging intervals were processed using the AID (Analytical Image Differencing) method. Based on the analysis of these processed images, statistics were compiled to identify the most suitable imaging interval for the given experimental conditions.

Keywords

Cell Biology, Quantitative Phase Imaging, Intracellular Motility, Cellular Force, Frame Rate

Obsah

Úvod	1
1 Základní metody mikroskopie	3
1.1 Mikroskopie světlého pole	3
1.2 Mikroskopie temného pole	4
1.3 Zernikeho fázový kontrast	5
1.4 Diferenciální inferenční kontrast	6
1.5 Fluorescenční mikroskopie	8
2 Kvantitativní fázová mikroskopie	11
2.1 Kvantitativní fázový kontrast pro biologii živé buňky	11
2.2 Holografické mikroskopy	12
2.3 hiQPI (Holographic Incoherent-light-source Quantitative Phase Imaging)	13
3 Cíle a motivace práce	17
4 Výběr buněčné linie a příprava buněčných vzorků	19
4.1 Příprava buněčných kultur	20
5 Měření a zpracování dat	23
6 Diskuze	27
Závěr	35
Literatura	40
Seznam obrázků	42

Seznam tabulek	43
Seznam rovnic	45

Úvod

Mikroskopie je klíčovým nástrojem pro moderní vědu a technologii. Umožňuje pozorovat struktury a procesy na úrovni, která je pro lidské oko nedostupná, a poskytuje cenné informace, které jsou nezbytné pro pokrok v medicíně a dalších oborech. Detailní zkoumání buněk, tkání a mikroorganismů, je nezbytné pro včasnou detekci nemocí, jako jsou rakovina, infekce, autoimunitní poruchy nebo genetické vady. Obzvláště pak pozorování chování živých buněk v reálném čase je nezbytné při vývoji nových léčiv a jejich testování [1]. Sledováním buněčných reakcí na různé léky získáváme informace pro optimalizaci léčebných strategií a zajištění co největší efektivity s minimálními vedlejšími účinky.

Výzkumná skupina Experimentální Biofotoniky na CEITECu VUT se dlouhodobě zabývá reakcemi živých buněk na složení jejich živého prostředí s obsahem protinádorových léčiv a studiem jejich motility [2, 3, 4, 5]. V současnosti se zabývají spoluprací s Prof. RNDr. Janem Brábekem, Ph.D. na vývoji migrastatik [6, 7, 8], což jsou inhibitory snižující či přímo zastavující schopnost nádorových buněk proniknout skrz extracelulární tkáň a založit sekundární nádory - metastázy. Pojem migrastatik vznikl z myšlenky prof. RNDr. Jana Brábka, Ph.D. a výzkumného týmu českých vědců [6] z mezinárodního centra Biocev, jako pátý pilíř protirakovinné léčby.

Rakovinné onemocnění se vyznačuje abnormální buněčnou proliferací a potenciálem šířit se do dalších částí těla. Převládajícím znakem je nekontrolovatelný klonální růst, proti němuž se projevila chemoterapie a radioterapie jako účinné řešení. Nádory jsou však provázeny lokální invazí a metastazováním. Z tohoto důvodu je hlavní příčinou selhání léčby vytvoření nových mutací, které jsou proti těmto metodám rezistentní. Léčba by tedy měla být doplněna o inhibitory zastavující schopnost nádorových buněk proniknout skrz extracelulární tkáň a založit sekundární nádory. Těmito léčivy by mohly být tzv. migrastatika (z latinského „migrare“ a řeckého „statikos“). Buněčná invaze je ovlivňována různými extracelulárními podněty a zahrnuje mnoho signálních drah, které v konečném důsledku regulují kontraktilitu aktomyozinu a polymerizaci aktinu, což jsou dva základní mechanismy řídící buněčnou motilitu. Vzhledem k tomu, že signální dráhy regulující buněčnou invazi jsou vysoce redundantní, inhibice kterékoli z těchto drah může být překonána a povede k rezistenci, která vychází z jiného signálního okruhu obcházejícího inhibovanou dráhu. Migrastatika by se tedy měla zaměřit na základní mechanismy (buněčnou kontraktilitu a polymerizaci aktinu), aby účinně inhibovala buněčnou invazi.

Společný výzkum využívá jak základní metody mikroskopie, tak ty pokročilé, které jsou schopny kvantifikovat zaznamenaná obrazová data, měřit přesuny buněčné hmoty v prostoru a čase.

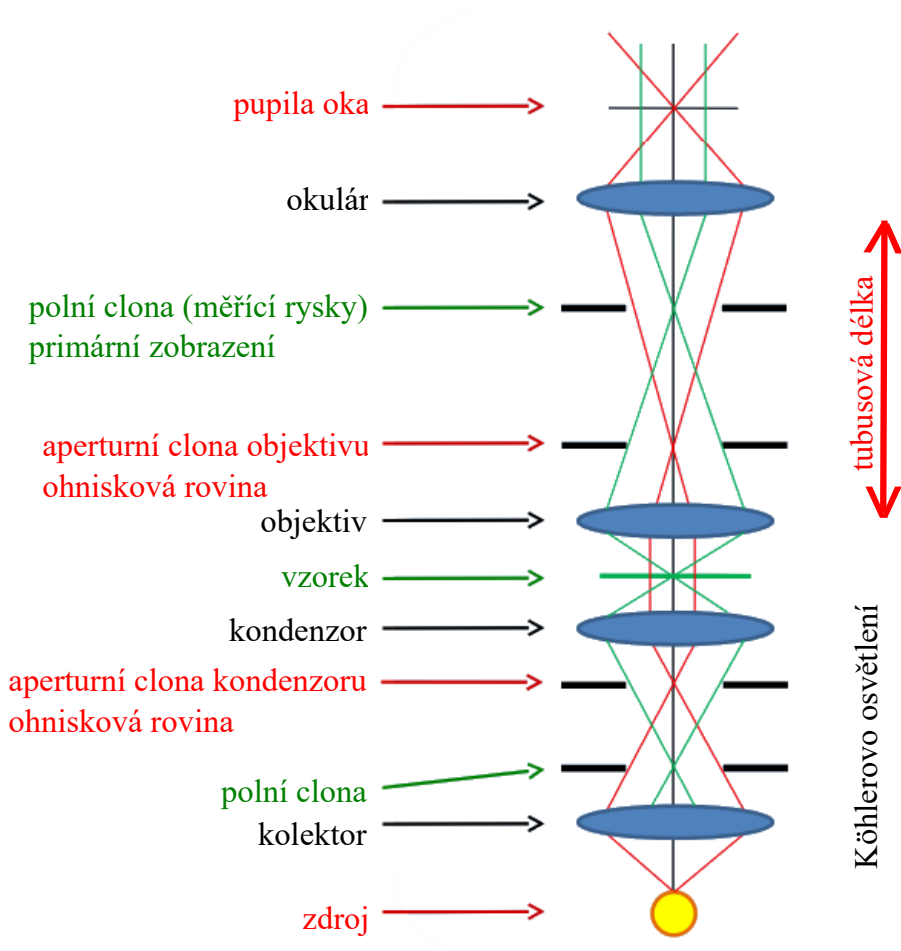
Cílem této práce je stanovit maximální snímkovací rychlost mikroskopu, v rámci které je ještě možno rozpoznat vnitřní motilitu rakovinné buňky.

1 Základní metody mikroskopie

Běžně se v mikroskopii využívá viditelného světla, tedy malé části spektra elektromagnetického záření v rozmezí přibližně 380 – 760 nm, které je schopno lidské oko zachytit pomocí tyčinek a čípků na sítnici. Pro snížení fototoxicity se využívá světlo o vlnové délce 650 nm. Buňka je z fyzikálního pohledu membránami ohraničený vodný roztok, v němž jsou rozpuštěny proteiny, cukry a lipidy [9]. Právě tyto látky se od vody liší vyšším indexem lomu. Je tak zpravidla ovlivněna fáze vlny, která buňkou prochází, přičemž amplituda této vlny je prakticky neovlivněna [10, 11]. Pro výzkum živých buněk bylo vyvinuto mnoho pozorovacích metod, z nichž každá má své výhody a nevýhody a je velmi důležité zvolit správnou metodu pro daný typ buněk.

1.1 Mikroskopie světlého pole

Metoda světlého pole je základní a také jedna z nejjednodušších metod zobrazení, viz obrázek 1.1. Tato metoda funguje na principu diaskopického osvětlení, kdy se pozorovaný objekt nachází mezi zdrojem světla a objektivem [12]. Nejčastěji se jako zdroj osvětlení využívá LED dioda, která vyzařuje polychromatické záření. Pomocí osvětlovací soustavy, která se skládá z kolektoru, polní clony, aperturní clony kondenzoru a kondenzoru (Köhlerovo osvětlení), se úzký svazek světla fokusuje na vzorek, který část jeho intenzity absorbuje v závislosti na optické hustotě preparátu a tím se amplitudově moduluje. Světlo následně prochází objektivem, který je umístěn blízko vzorku. Objektiv vytváří zvětšený obraz vzorku v ohniskové rovině okuláru. Ten jej společně s čočkou lidského oka promítá na sítnici. Obrovskou výhodou této metody je její jednoduchost. Výsledným obrazem je pak kontrastní objekt na světlém pozadí. Tato metoda není ovšem vhodná pro všechny typy buněk. Při této metodě se používají barvené a přirozeně pigmentované preparáty s vysokým kontrastem (např. rostlinná buňka obsahující chlorofyl). Mezi nejčastěji pozorované objekty tímto způsobem se řadí barvené tkáně z histologických vzorků.

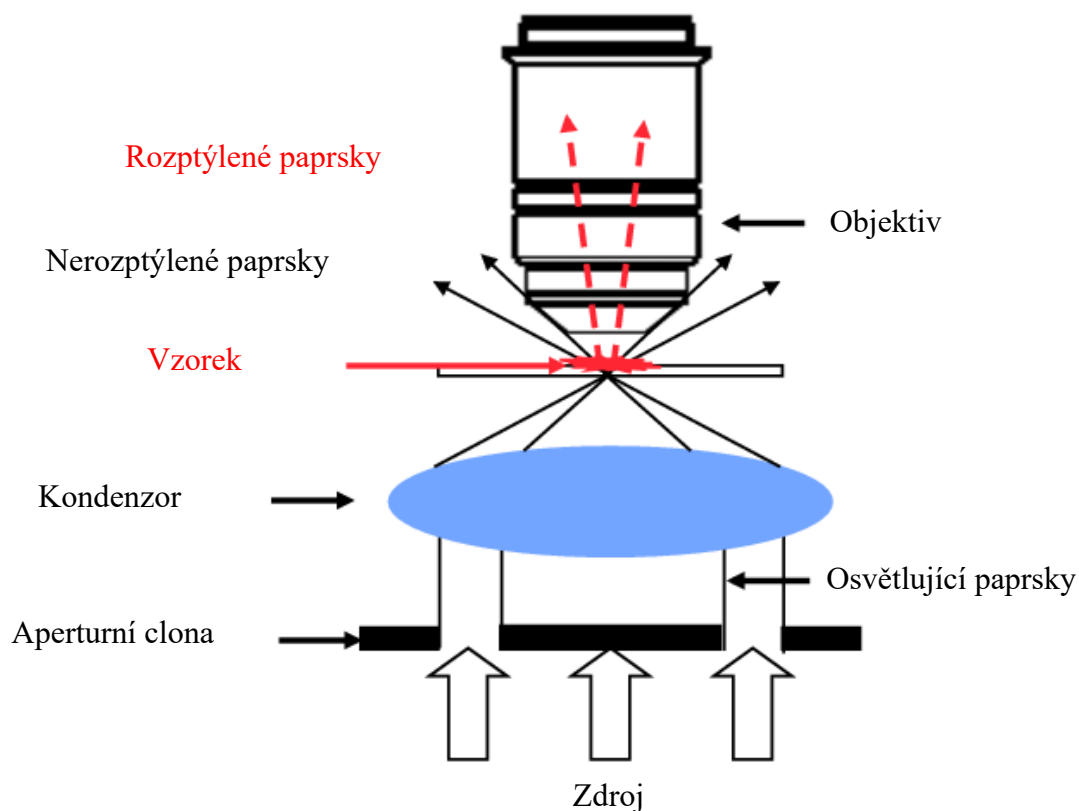


Obrázek 1.1: Optické uspořádání mikroskopu světlého pole.

1.2 Mikroskopie temného pole

Při zkoumání buněk technikou temného pole se zvýší kontrast transparentních buněk bez nutnosti jejich nabarvení. Nutnou podmínkou je, aby alespoň částečně rozptylovaly světlo, které jimi prochází. Zvýšení kontrastu docílíme pomocí vložení aperturní clony. Tato clona je umístěna do zadní ohniskové roviny kondenzoru a má tvar propustného mezikruží, viz obrázek 1.2. Aperturní clona odstíní centrální část světelného kuželu vycházejícího ze zdroje a ponechá jen ty osvětlující paprsky, které po průchodu kondenzorem dopadají pod velmi šikmým úhlem na vzorek a mívají optiku objektivu. Na jednotlivých strukturách vzorku dochází k rozptylu paprsků, které následně vstoupí do pupily objektivu a vytvoří obraz na kameře mikroskopu [13].

Při pozorování se vzorek jeví jako svítící na tmavém pozadí a je lépe pozorovatelný než při použití metody světlého pole. Většina paprsků však vzorkem projde bez rozptylu, a proto se na výsledném obrazu nepodílí. Nevýhodou této metody je malé množství informací o vnitřní struktuře vzorku a nízká intenzita světla, která vyžaduje zdroj s vysokým výkonem.



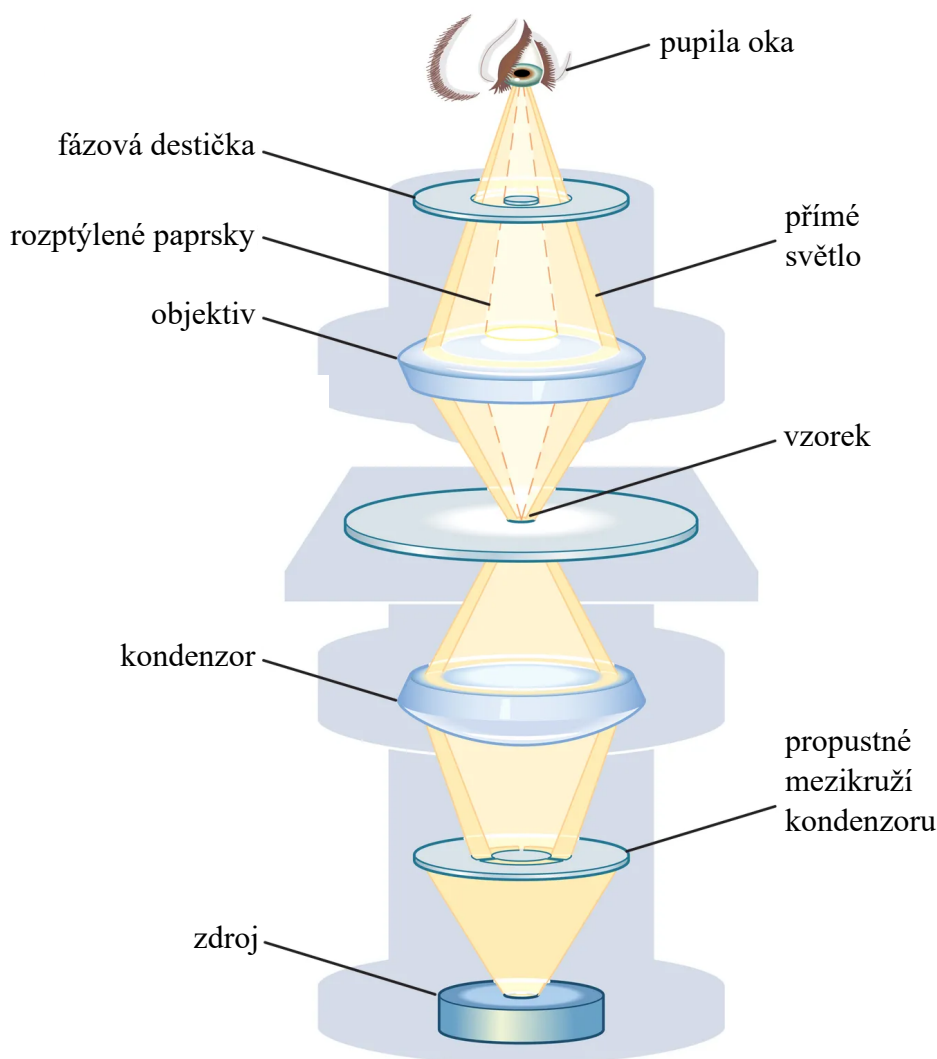
Obrázek 1.2: Optické uspořádání mikroskopu temného pole. Převzato a upraveno z [14].

1.3 Zernikeho fázový kontrast

Zernikeho fázový kontrast je mikroskopová metoda, která umožňuje zviditelnit živé, neobarvené struktury, které by jinak byly špatně viditelné, kvůli podobnosti jejich indexu lomu s okolním médiem [15, 16]. Tento kontrast vzniká díky interferenci světla, které prochází vzorkem bez rozptylu, a světla, které se na vzorku rozptýlí. Optická konstrukce metody vychází z metody světlého pole, viz obrázek 1.3. Před kondenzorem je umístěna clona ve tvaru propustného mezikruží, která propouští pouze okrajové paprsky a centrální část svazku odstíní. Na vzorku dochází k rozptylu části dopadajícího světla. Objektiv sbírá jak světlo rozptýlené, tak osvětlující nerozptýlené. Do zadní ohniskové roviny objektivu je vložena fázová destička ve tvaru mezikruží, která posouvá fázi nerozptýlených paprsků o $\pi/2$. Intenzita těchto paprsků je navíc snížena neutrálním filtrem, aby byla srovnatelná s intenzitou rozptýlených paprsků. Tím je zaručen dobrý kontrast interferenčního obrazu.

Výhodou této techniky je schopnost zobrazit živé buňky, tkáňové kultury nebo bakterie bez nutnosti barvení, což nejen šetří čas, ale zároveň minimalizuje možné narušení zdravého stavu vzorku. Tato vlastnost umožňuje přímé sledování biologických procesů v reálném čase. Nevýhodou metody je vznik halo efektu, který se objevuje na okrajích buněk v místech výrazných

fázových skoků a komplikuje přesné určení hranic. Získaný obraz pouze vizualizuje pozorovaný fázový objekt, bohužel bez možnosti měření fázového zpoždění, které buňka vnáší do procházející vlny. Jedná se tedy pouze o vizualizaci fázových změn, tedy jde o nekvantitativní fázový kontrast. Přesto zůstává jednou z nejefektivnějších metod pro pozorování struktur s indexem lomu podobným okolí, které by byly v mikroskopii světlého nebo tmavého pole jinak zcela neviditelné.



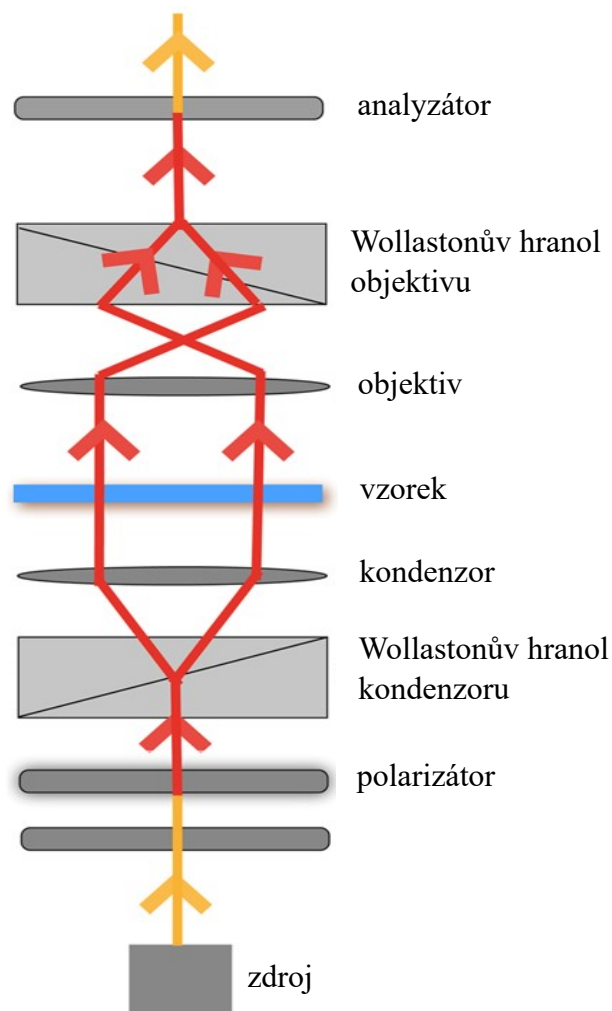
Obrázek 1.3: Optické uspořádání Zernikeho fázového kontrastu. Převzato a upraveno z [17].

1.4 Diferenciální interferenční kontrast

Diferenciální interferenční kontrast (DIC) slouží ke zvýšení kontrastu při pozorování průhledných fázových objektů, jako jsou například živé buňky. Metoda opět vychází z metody světlého pole. Zdrojem světla je běžné polychromatické světlo, které prochází polarizátorem, jenž fil-

truje světlo a polarizuje ho na světelné paprsky s jedním směrem polarizace. Každý světelný paprsek je následně rozdělen na dva paprsky pomocí optické komponenty zvané Wollastonův hranol. Tyto dva paprsky jsou vzájemně kolmo polarizovány, pohybují se velice blízko u sebe rovnoběžně tímž směrem a procházejí vzorkem [18], viz obrázek 1.4. Tyto paprsky následně dopadají na vzorek, kde dochází k jejich fázovému posunu v závislosti na indexu lomu a tloušťce vzorku. Po průchodu vzorkem jsou paprsky opět spojeny Wollastonovým hranolem a procházejí analyzátozem, který zajistí jejich shodnou polarizaci a umožní jejich vzájemnou interferenci a vytvoření kontrastu v obrazové rovině. Intenzita interferencí vzniklého obrazu závisí přímo úměrně na vzájemném fázovém posuvu paprsků.

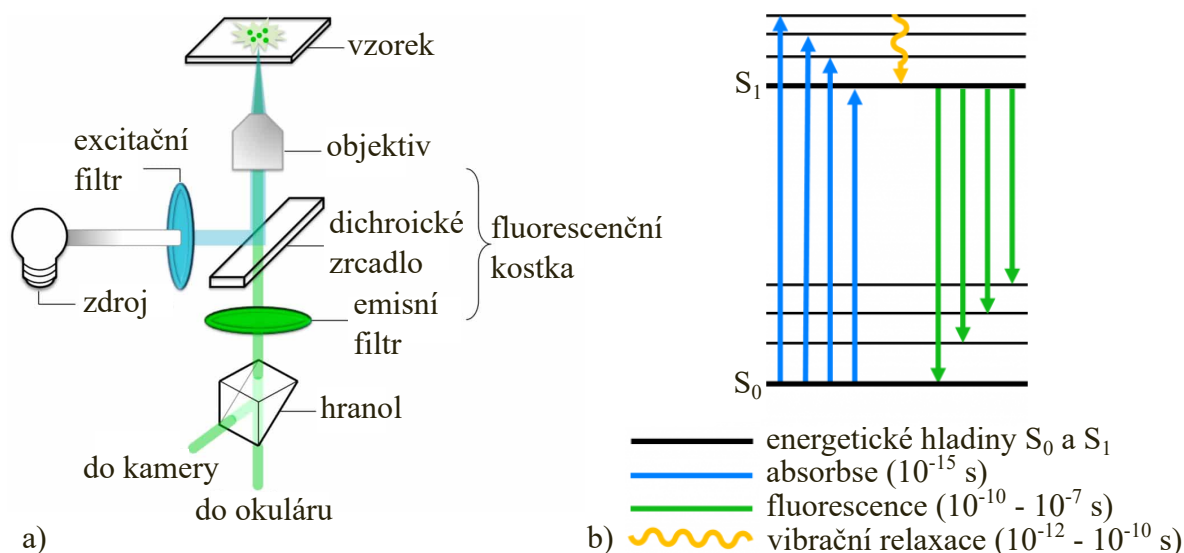
Nevýhodou je, že obraz vypadá jako šikmo osvětlený, což může komplikovat analýzu buněčných hranic u softwarové analýzy. Společným hendikepem DIC a Zernikeho fázového kontrastu je nekvantitativní obraz pozorovaného vzorku. Výhodou DIC je opět možnost pozorování živých, transparentních buněk a umožňuje vizualizace jemných struktur bez nutnosti použití barviv.



Obrázek 1.4: Optické uspořádání mikroskopu pro diferenciální interferenční kontrast. Převzato a upraveno z [19].

1.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je metoda zvýšení kontrastu živých buněk pomocí fluorescenčních barviv, která jsou biologicky upravena, aby se vážala na specifické buněčné struktury a tím je zvýraznila [20]. Při excitaci molekuly fluorescenčního barviva světlem specifických vlnových délek (excitační spektrum) dochází k absorpci energie, což vede k excitačnímu přechodu jeho elektronů ze základní hladiny S_0 na vyšší energetickou hladinu S_1 , viz modré šipky na obrázku 1.5b). Zpravidla je energie absorbovaného fotonu vyšší než je rozdíl energií mezi hladinami. Přbytek energie je převeden na jeden z vibračních stavů molekuly (tenké černé hladiny). Poté dochází k vibrační relaxaci (žlutá šipka), kdy se molekula fluorescenčního barviva zbavuje části získané energie (ztráta energie ve formě tepla). Následně elektrony klesnou zpět z hladiny S_1 do základní energetické hladiny S_0 a emituje se větší část energie ve formě světla, což je fluorescence. Tento proces je rychlý (poločas emise je méně než 10^{-8} s) a je charakterizován Stokesovým posunem, kde emisní spektrum světla má delší vlnové délky než excitační spektrum světla. Aparatura mikroskopu zahrnuje zpravidla epifluorescenční osvětlení, které umožňuje, aby objektiv nejen osvětloval vzorek excitačním zářením, ale zároveň sloužil ke sběru fluorescenčního emisního záření, viz obrázek 1.5a). Tento systém je vybaven fluorescenční kostkou, která obsahuje několik klíčových optických komponentů: excitační filtr, který vybírá světlo požadované vlnové délky pro excitaci fluorescenčního barviva, dichroické zrcadlo, které odráží excitační světlo a propouští světlo emisní, a emisní filtr, jenž zajišťuje, že na detektor nebo do okuláru dopadá pouze fluorescenční záření s požadovanou vlnovou délkou.



Obrázek 1.5: a) Epifluorescenční mikroskop. Převzato a upraveno z [21]. b) Jablonského diagram. Převzato a upraveno z [22].

Výhodou metody je zvýšená citlivost detekce. Moderní fluorescenční mikroskopy kombinované s pokročilými zobrazovacími technikami umožňují sledovat i jednotlivé obarvené molekuly

buňky, což je zásadní pro pochopení biochemických procesů. Nevýhodou je nutnost vlastního barvení buněk, které je může negativně ovlivnit, a nutnost použití různých fluorescenčních kostek pro různá barviva.

2 Kvantitativní fázová mikroskopie

2.1 Kvantitativní fázový kontrast pro biologii živé buňky

Kvantitativní fázová mikroskopie (QPM - Quantitative Phase Microscopy) je soubor mikroskopových technik pro neinvazivní zobrazování živých buněk a tkání. Tyto metody nevyžadují pro zobrazování metod imunochemie a umožňují monitorování buněk v reálném čase s minimální fototoxicitou. Dokáží také eliminovat nežádoucí artefakty, jako je například halo efekt, známý z již zmíněného Zernikeho fázového kontrastu. Díky své vysoké citlivosti jsou tyto metody schopny detekovat i velmi malé změny ve fázi světelné vlny, která prošla vzorkem. Výsledný zaznamenaný obraz je tedy fázový a kvantitativní. Označuje se anglickou zkratkou QPI (Quantitative Phase Image). Tyto kvantitativně měřené fázové změny jsou pro biologii živé buňky velmi důležité, neboť je lze velice jednoduše přepočítat na hmotu buňky $m(i, j)$:

$$m(i, j) = \frac{\phi(i, j)S}{\alpha k}, \quad (2.1)$$

kde $\phi(i, j)$ je naměřené fázové zpoždění, i, j jsou souřadnice pixelu QPI, S je plocha pixelu kamery, k je vlnové číslo použitého záření a α je biologická konstanta, která umožňuje přepočet fáze na hmotu buňky. Ta byla pro živočišné buňky stanovena experimentálně [10, 11]. Rozložení hmotnosti buněk lze kvantifikovat v jednotkách $\text{pg}/\mu\text{m}^2$. Samotné buňky mají různé tvary a velikosti v řádu desítek mikrometrů. Zvýšení celkové suché hmoty buňky může být považováno za měřítko jejího růstu [4]. Na rozdíl od běžného fázového kontrastu je QPI schopno poskytovat kvantitativní informace o rozložení hmoty v buňce a jeho změnách v čase. Za tímto účelem je v současnosti vyvíjen specializovaný software na zpracování QPI snímků s názvem AID (Analytical Image Differentiating) [23, 24].

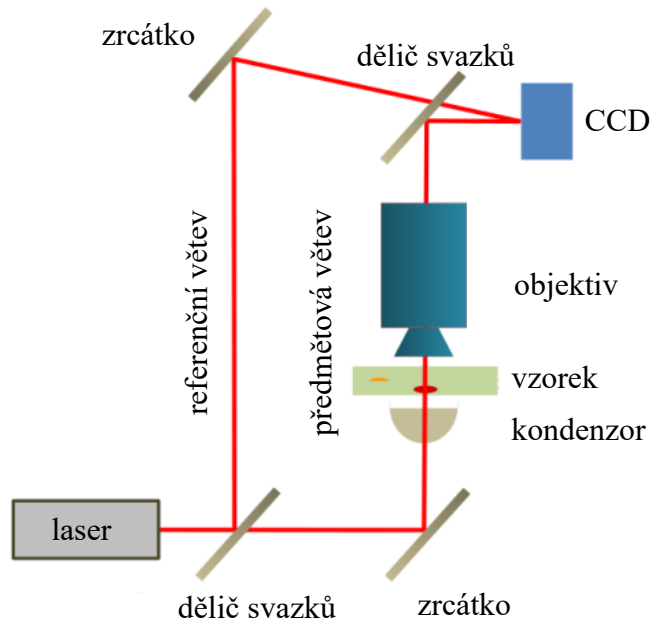
QPI se ukázala jako nepostradatelná metoda v biologickém výzkumu, poskytující vysoce kontrastní a neinvazivní zobrazení živých buněk a jejich tkání bez nutnosti barvení a umožňující zkoumání intracelulárního prostředí a dynamiky buňky. Metoda je vhodná pro screening buněk a tkání, *in vitro* studium buněčné migrace, sledování rakovinných buněk, testování léků, či identifikaci patologických změn, jako je apoptóza nebo nekróza. Dále umožňuje sledování distribuce suché hmoty v buňkách a chování buněk v 3D kolagenovém matrixu.

2.2 Holografické mikroskopy

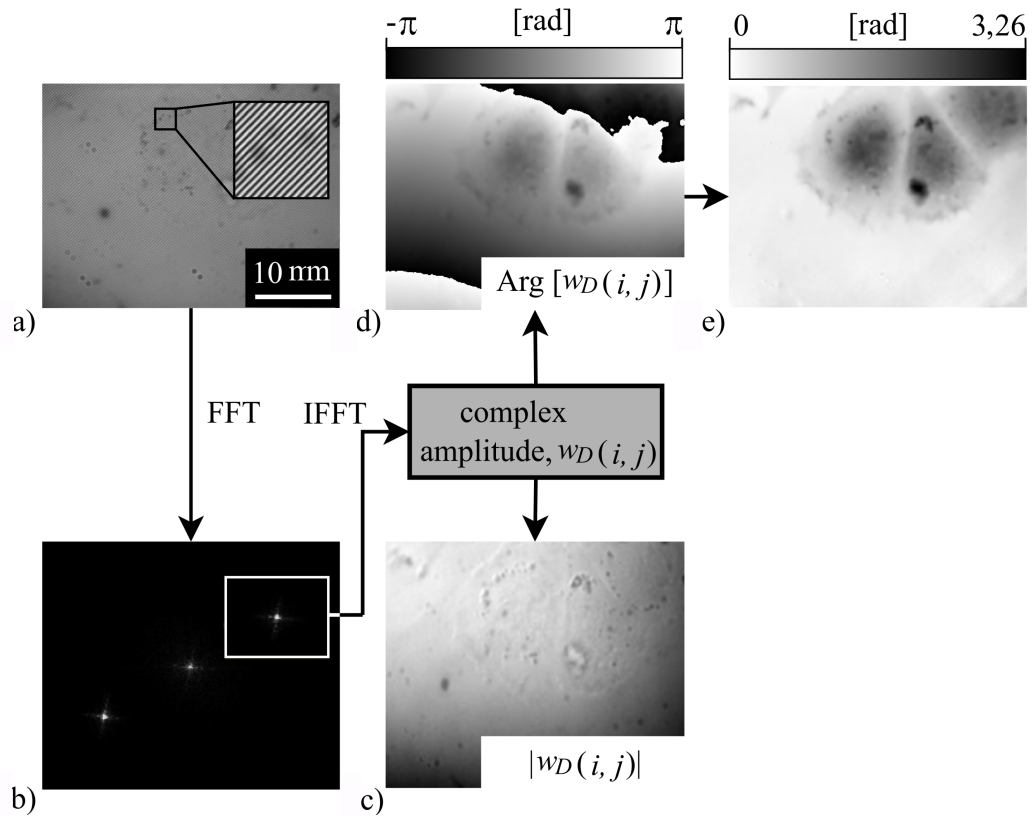
Holografické mikroskopy jsou v současnosti moderními přístroji pro záznam kvantitativního fázového kontrastu pozorovaného vzorku. Princip optické off-axis holografie je založen na tom, že koherentní světelný zdroj (laser) vyzařuje světelnou vlnu, která se rozdělí na děliči svazků do dvou optických větví mikroskopu. Tedy do předmětové a referenční větve, viz obrázek 2.6. Světelná objektová vlna o , která dopadá na pozorovaný vzorek, jím prochází. Fáze vlny je ovlivněna, zatímco změny v amplitudě jsou minimální. Tato vlna následně interferuje s referenční vlnou r , tedy vlnou procházející referenční větví mikroskopu. Ta není nijak ovlivněna. Interference i je zaznamenána na čip digitální kamery. Jelikož se jedná o interferenci dvou šikmo dopadajících vln, je interferogram přímo hologramem, plným záznamem obou vln a je popsán vztahem:

$$i = |o + r|^2 = or^* + o^*r + |o|^2 + |r|^2. \quad (2.2)$$

Aby bylo možné z hologramu získat QPI snímek, je nutno provést digitální rekonstrukci objektové vlny o pomocí rychlé Fourierovy transformace (FFT) [25]. Tím získáme spektrum prostorových frekvencí, viz obrázek 2.7b). Ve spektru jsou tři dílčí spektra. Středové spektrum, které odpovídá členům $|o|^2 + |r|^2$ z rovnice 2.2, a dvě boční spektra or^* a o^*r , která odpovídají deformacím interferenční struktury, zaznamenané kamerou. Při zpracování je vybráno spektrum or^* a zpětnou Fourierovou transformací je z něj spočtena komplexní amplituda objektové vlny o $w_D(i, j)$. Z ní je spočtena rekonstruovaná amplituda $|w_D(i, j)|$ a surová fáze objektové vlny $\text{Arg}[w_D(i, j)]$. Snímek surové fáze je navázán, aby byly odstraněny skoky fáze z $-\pi$ na $+\pi$ (hranice černé a bílé z obrázku 2.7c)). Následně je numericky vyrovnáno fázové pozadí snímku. Výsledkem je QPI snímek živé buňky, viz 2.7e).



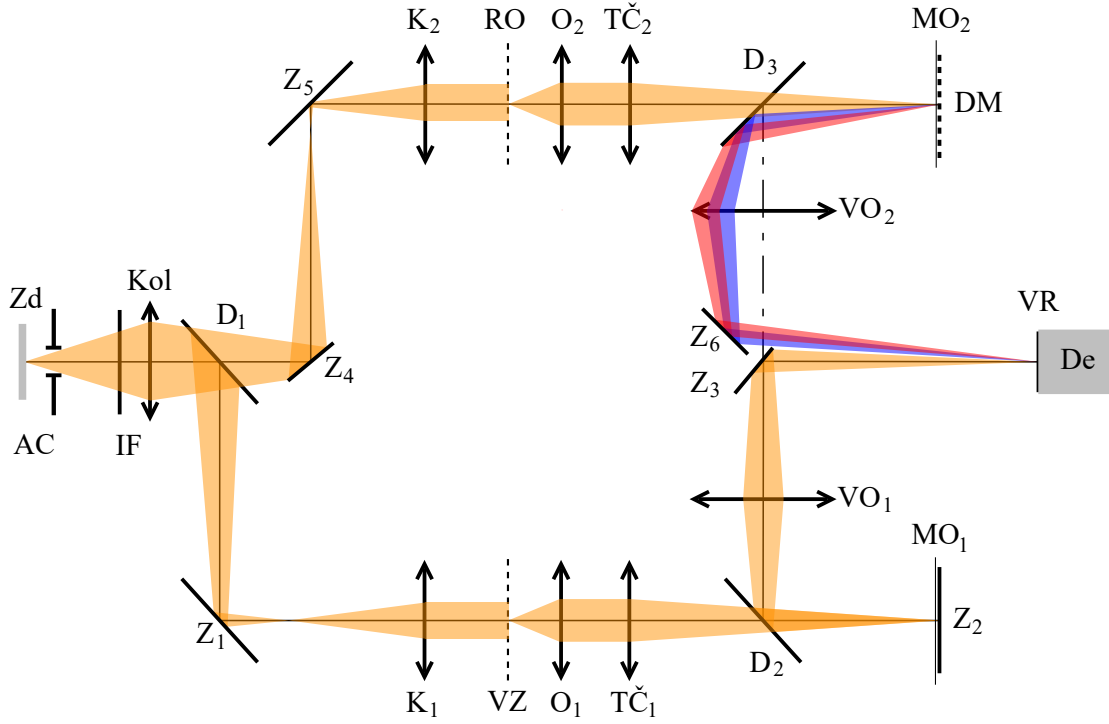
Obrázek 2.6: Optické uspořádání holografického mikroskopu.



Obrázek 2.7: Zpracování digitálního hologramu. a) Zaznamenaný hologram, b) spektrum prostorových frekvencí, c) surový fázový obraz, d) rekonstruovaná amplituda objektové vlny, e) QPI snímek.

2.3 hiQPI (Holographic Incoherent-light-source Quantitative Phase Imaging)

Optický systém je založen na holografické mikroskopii, která kombinuje off-axis holografii, plošný polychromatický zdroj s nízkou časovou a prostorovou koherencí a achromatický interferometr s difrakční mřížkou [26, 27], což umožňuje dosáhnout vysoké přesnosti měření hmoty buňky a to až $4,6 \text{ femtogramů}/\mu\text{m}^2$ [28]. Tento systém se skládá z osvětlovací a zobrazovací soustavy, na výstupu je opatřen digitální kamerou, viz obrázek 2.8. Je složen ze dvou totožných mikroskopů, které tvoří vzájemně oddělené větve interferometru Machova-Zehnderova typu. Oba mikroskopy mají společný osvětlovač a společný detektor. Každá větev je zajištěna kondenzorem K, objektivem O a tubusovou čočkou TČ, přičemž v referenční větvi je umístěna difrakční mřížka DM, která umožňuje difrakci světla a vytváření achromatické interferenční struktury. Vzorek VZ a referenční objekt RO jsou osvětleny Köhlerovým osvětlením, přičemž zdroj světla Zd je kolektorem Kol zobrazován do zadních ohniskových rovin kondenzorů K. Následně jsou vzorek VZ a referenční objekt RO zobrazovány objektivy O a tubusovými čočkami TČ do rovin meziobrazů MO, tedy do roviny difrakční mřížky DM a zrcadla Z_2 . Z těchto rovin jsou obrazy



Obrázek 2.8: Optické schéma hiQPI mikroskopu. Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížka, D₁ - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, De - CCD kamera (detektor).

vzorku a referenčního objektu zobrazeny pomocí výstupních objektivů VO do výstupní roviny, kde je umístěn digitální detektor De a analyzován pomocí softwaru. Díky preciznímu nastavení optických prvků je zajištěno vyladění shodných optických délek obou větví interferometru a je eliminován příčný posuv interferujících vln na detektoru [29]. Tím jsou zaručeny podmínky interference světla i pro plošný polychromatický zdroj s nízkou koherencí světla, například LED diodové pole.

Má-li být mikroskop achromatický, musí být docíleno toho, aby svazky různých vlnových délek λ vytvářely interferenční proužky o jedné nosné frekvenci f . To je zajištěno pomocí difrakční mřížky DM, která je umístěna v referenční větvi mikroskopu. Nosná frekvence f hologramu ve výstupní rovině je stejná vzhledem k frekvenci vrypů f_{DM} difrakční mřížky DM, protože hologram vzniká interferencí prvního a nultého difrakčního řádu mřížky [26, 27], jak je znázorněno v rovnici:

$$f = \sin\theta\lambda = f_{DM}, \quad (2.3)$$

kde θ je úhel, o který difrakční mřížka DM odkloní paprsek. Nosná frekvence hologramu f je tedy stejná pro všechny vlnové délky λ^1 a tím se stává mikroskop achromatickým.

Nevýhodou této metody jsou vysoké nároky na přesnost seřízení optických komponent,

¹Za předpokladu, že zvětšení výstupních objektivů je rovno jedné.

zejména při použití nekoherentního osvětlení. Pro dosažení optimálních výsledků je nutné pečlivé seřízení optických cest pomocí piezomotorů, což může být časově náročné a vyžaduje pokročilé znalosti a zkušenosti. Avšak pro běžné použití mikroskopu byly vyvinuty automatizované seřizovací metody [29]. Ty slouží jak k nastavení kontrastní interference při začátku měření, tak pro jeho udržování během experimentu.

Metoda hiQPI nabízí široké možnosti pro zobrazování a analýzu vzorků v různých oblastech, včetně biologie, kde je možné pozorovat živé buňky a sledovat jejich dynamiku bez nutnosti použití fluorescenčních barviv. Také umožňuje detekci buněčných membrán a vnitřních změn buněk díky kombinaci dodatečných zobrazovacích technik, jako fluorescence, DIC a zobrazování světelným polem. Proto byla metoda hiQPI a s ní vyvíjená metoda AID vybrána jako základ mé práce.

3 Cíle a motivace práce

V mikroskopii se buňky snímají v daných časových intervalech. Ty záleží na několika parametrech. Jsou to možnosti hardwaru, jako je přenosová rychlost kamery, rychlost pohybu mikroskopového stolku apod. Dalším důležitým parametrem je i návrh vlastního experimentu - kolik zorných polí se snímá, na kolika vzorcích apod. Pokud je při snímání nastavena nízká rychlost snímání (počet snímků za sekundu), objeví se pak kupříkladu dlouhé přeskoky buněk mezi jednotlivými snímky snímané sekvence. Buňky se na snímku stejného zorného pole často objevují a zase mizí, což může být způsobeno například jejich přisunutím do záběru kamery nebo naopak jejich odsunutím z něj. Je-li na druhou stranu snímkovácí rychlost vysoká, může dojít k tomu, že měřený pohyb buňky není mezi jednotlivými snímky znatelný a také roste množství dat, které je při experimentu nutno ukládat.

Metoda hiQPI je klíčová pro výzkum a analýzu buněk v různých oblastech biologie. Jako celosvětově jediná dovoluje velice přesná měření rozložení hmoty buňky. V kombinaci s metodou AID umožní zjistit a kvantitativně analyzovat přesuny hmoty v buňce. Cílem mé práce je prozkoumat a ověřit nejkratší smysluplný interval snímání jednoho zorného pole, který je kratší než 10 sekund, a který dovolí popis rozložení a časové chování intracelulární hmoty (cytoplazmy) buňky. Pro tyto potřeby bude analyzována velikost přesunu buněčné hmoty, síla, kterou při tom buňky generují a v neposlední řadě morfologie buňky.

Abych dosáhla cíle mé práce, je nutné provést tyto kroky:

- vybrat vhodné buněčné linie,
- stanovit metodiku pěstování buněk a přípravy vzorku,
- nasnímat data pomocí metody hiQPI,
- zpracování dat metodou AID,
- vyhodnotit chování buněk a stanovit vhodnou rychlost snímání.

4 Výběr buněčné linie a příprava buněčných vzorků

Při práci s živými buňkami je nutno chronologicky projít daným postupem, aby byly zaručeny jejich časově neměnné vlastnosti. Prvně se vychází z buněčné kultury, která vzniká odebráním buněk zvířete nebo rostliny a jejich následného růstu v příznivém umělém prostředí. Při tomto procesu jsou vybírány buňky stejného typu, například epitelové buňky dárcovské tkáně. Vzniká tak primární kultura, která obsahuje buňky izolované z tkáně, ve které buňky proliferují za vhodných podmínek, dokud neobsadí celý dostupný substrát (tj. dokud nedosáhnou konfluence). Po dosažení konfluence je nutné buňky subkultivovat (tj. pasážovat) jejich přenesením do nového nádoby s novým růstovým médiem, aby měly více místa a živin pro pokračování růstu. Vlastní pěstovatelná buněčná linie vzniká po první subkultivaci z primární kultury. Převažují buňky s nejvyšší růstovou kapacitou, což vede k určitému stupni genotypické a fenotypické uniformity v populaci. Buněčné linie mají omezenou životnost (tj. jsou konečné) a procesem pasážování mohou degenerovat. Pro dlouhodobé pěstování buněčných linií, jsou buňky z prvotních pasáží mrazeny a dlouhodobě skladovány jako zálohy. K vlastnímu pěstování buněčných linií, je třeba udržovat jejich řízené prostředí (správná teplota a koncentrace CO_2) a tím regulovat pH a osmotický tlak v kultuře. Dále musí mít dostatek kultivačního média, které poskytuje nezbytné živiny, antibiotika, růstové faktory a hormony pro růst buněk.

Kontaminace buněčných kontrastních populací je jedním z nejčastějších problémů při odpovědné interpretaci výsledků jakéhokoli testování. Vyskytuje se jak při přípravě buněčných kultur, tak i při manipulaci s nimi. Způsoby jakými lze buněčné kultury kontaminovat lze rozdělit do dvou skupin: chemicky (např. nečistoty v médiích, sérech a vodě, endotoxiny, změkčovadla a detergenty) a biologicky (např. bakterie, plísňe, kvasinky, viry, mykoplasmy a křížové kontaminace jinými buněčnými liniemi). I když je nemožné kontaminaci zcela eliminovat, je možné omezit její výskyt a závažnost dodržováním základních pravidel při práci ve sterilním prostředí. Případně i deklarovat jako odhalený problém.

Při experimentech jsem využila dvě buněčné linie K2 a T15 [30]. Tyto buněčné linie byly vybrány nejen kvůli rozdílnosti jejich původu a typu nádoru, ale také kvůli rozdílnému chování a biologickým vlastnostem, jako jsou motilita (pohyb buněk), rychlost migrace a další aspekty buněčné dynamiky. Tyto rozdíly jsou důležité při výběru vhodné linie pro konkrétní experimenty

a výzkumné aplikace. Tyto linie mají zásadní význam pro vývoj nových terapeutických strategií, a to jak v oblasti onkologie, tak v imunologických aplikacích.

Buněčná linie K2 byla původně izolována z plicní metastázy podkožního nádoru, který vznikl po podkožní aplikaci spontánně *in vitro* transformovaných LW-13 embryonálních fibroblastů potkana inbredního kmene Lewis. Díky jejich spontánní nádorové transformaci *in vitro* je možné tyto buňky zpětně transplantovat a využít je k testování migrace *in vitro* i metastazování *in vivo*.

T15 klonální linie byla odvozena z K2 kolonie, která byla *in vitro* selektována na základě rozptylu klonální kolonie (colony scattering). Srovnávací molekulární analýza původních ne-metastazujících K2 buněk a metastazujících T15 buněk odhalila molekulu 4.1B-C [30] jako supresor metastazování.

Obě tyto kontrastní buněčné populace slouží k primárnímu a orientačnímu posouzení potenciálu testovaných léčiv.

4.1 Příprava buněčných kultur

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích v médiu MEM (Minimum Essential Medium) obsahujícím 2 mM L-glutaminu, 1 mM pyruvátu sodného, 0,1 mM neesenciální aminokyseliny, 10% FBS (fetální bovinní sérum) a getamicin 10 µg/ml (antibiotikum). Médium bylo skladováno v lednici o teplotě -4°C . Prostředí kultivace zajišťoval sterilní inkubátor se stálou teplotou 37°C a úrovní CO_2 5%. V závislosti na rychlosti růstu a poměru přidaného média a buněk do nové buněčné linie byly buňky 2-3x týdně sterilně pasážovány v laminárním boxu. Po odsátí starého média byly buňky promyty 3 ml roztoku PBS (fyziologický roztok), který byl i se zbytkem média opět odsán. Následně byly buňky uvolněny z povrchu kultivační lahve přidáním 1 ml 0,25% trypsinu a inkubací po dobu 5 minut v inkubátoru. Po uvolnění a důkladném propláchnutí dna kultivační lahve pomocí 5 ml média byly buňky uvolněné do trypsinu a média přeneseny do zkumavky.

Pro určení správného poměru buněk a média v nové buněčné linii i vzorku, který byl následně snímkován je nutné stanovit přesný počet buněk ve vzorku. Pro určení koncentrace buněk byla využita Bürkerova komůrka, viz obrázek 4.9a), ve spojení se světelnou mikroskopií. Využita byla technika Zernikeho fázového kontrastu, která je důležitá pro zvýšení kontrastu obrazu počítaných buněk, protože při klasickém zobrazení ve světlém poli nejsou buňky kontrastní.



Obrázek 4.9: Bürkerova komůrka. a) Náhled na komůrku, b) počítací políčko.

Počítací komůrka je tvořena podložním sklem s několika počítacími políčky s přesně danou plochou a hloubkou, které jsou ohraničeny vyrytými sítěmi. Při počítání buněk bylo vloženo 15 μl buněčné suspenze mezi krycí sklíčko a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka byla vložena do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se přistoupilo k samotnému počítání buněk. Při počítání buněk pomocí počítacích komůrek se započítávají pouze ty, které se nacházejí uvnitř čtverce a buňky, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran. Tím se zabrání dvojímu počítání buněk, viz obrázek 4.9b).

Pro stanovení koncentrace buněk v 1 μl suspenze se používá výpočet:

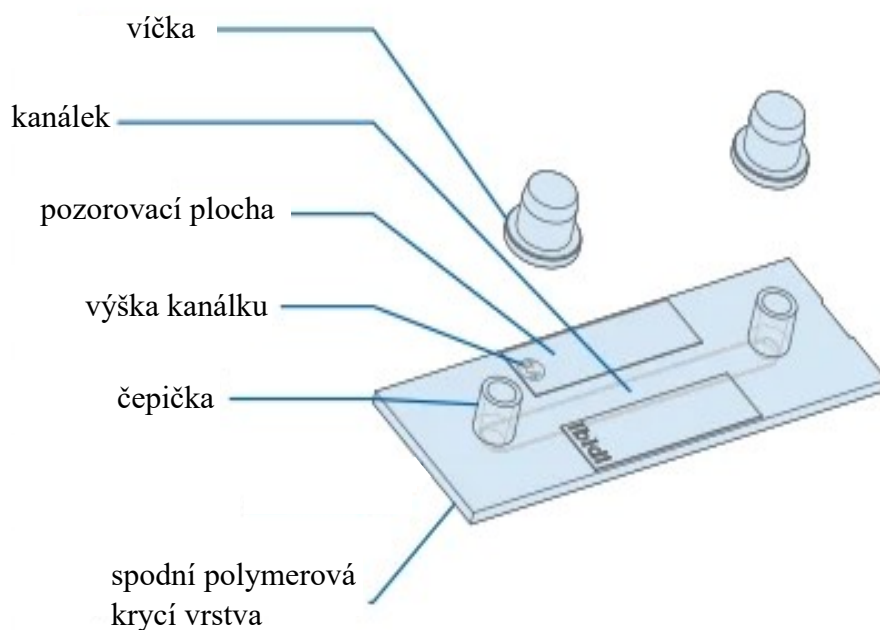
$$x = 10000 \frac{a}{n}, \quad (4.1)$$

kde x je koncentrace buněk v suspenzi, a je stanovený počet buněk a n je počet opakování (počet spočítaných čtverců).

Podle vypočítané koncentrace buněk v suspenzi je následně vypočítán objem buněčné suspenze tak, aby obsahovala požadovaný počet buněk. Do nové pasáže buněčné linie tak bylo nasazováno několik ml buněčné suspenze o koncentraci 12500 buněk. Kritickým ukazatelem je počet buněk na mm^2 kultivační plochy.

5 Měření a zpracování dat

Pro měření byly použity mikroskopové nosiče μ -Slide Lauer společnosti Ibidi [31], které se používají v buněčné biologii a mikrobiologii pro kultivaci buněk a analýzu jejich chování pod mikroskopem, viz obrázek 5.10. Při použití těchto sklíček se buňky často pozorují pod fluorescenčním mikroskopem nebo jinými pokročilými mikroskopovými technikami, které umožňují vizualizaci buněk v reálném čase. Měření různých parametrů buněk je tak možné provést pomocí těchto nosičů. Jsou tedy vhodné i pro studium buněčné motility. Optická kvalita polymerového krycího dna nosiče je srovnatelná se sklem a je ideální pro buněčnou kultivaci pod průtokem a pro mikroskopii s vysokým rozlišením. Do vzorku byla nasazována buněčná suspenze o koncentraci 25000 buněk. Tento objem byl přenesen do mikroskopového nosiče Ibidi μ -Slide a byl přidán takový objem média, aby celkový objem vzorku činil 200 μ l a aby byla zaplavena celá pozorovatelná plocha nosiče a zamezilo se vzniku vzduchových bublin ve dráze optického svazku pozorovacího mikroskopu. Pro zabránění vyschnutí vzorku během inkubace bylo do čepiček po obou stranách nosiče vloženo 60 μ l média. Následně byl nosič vložen do inkubátoru na 24 hodin. Během experimentů bylo využito naklonění mikroskopického nosiče po dobu kultivace v inkubátoru. Nosič byl pod malým úhlem vložen do inkubátoru čímž bylo docíleno menší koncentrace buněk na jedné straně nosiče. Pro úpravu koncentrace buněk byl v průběhu pasážování měněn poměr média a buněk v suspenzi přidáním většího množství média a menší koncentrace buněk. Menší koncentrace buněk ulehčila hledání vhodné buňky pro měření a pozorování, protože pro nejpresnější výsledky je potřeba najít buňku, v jejímž okolí zorného pole mikroskopu nejsou žádné další buňky.



Obrázek 5.10: Mikroskopový nosič Ibidi µ-Slide Lauer. Převzato a upraveno z [31].

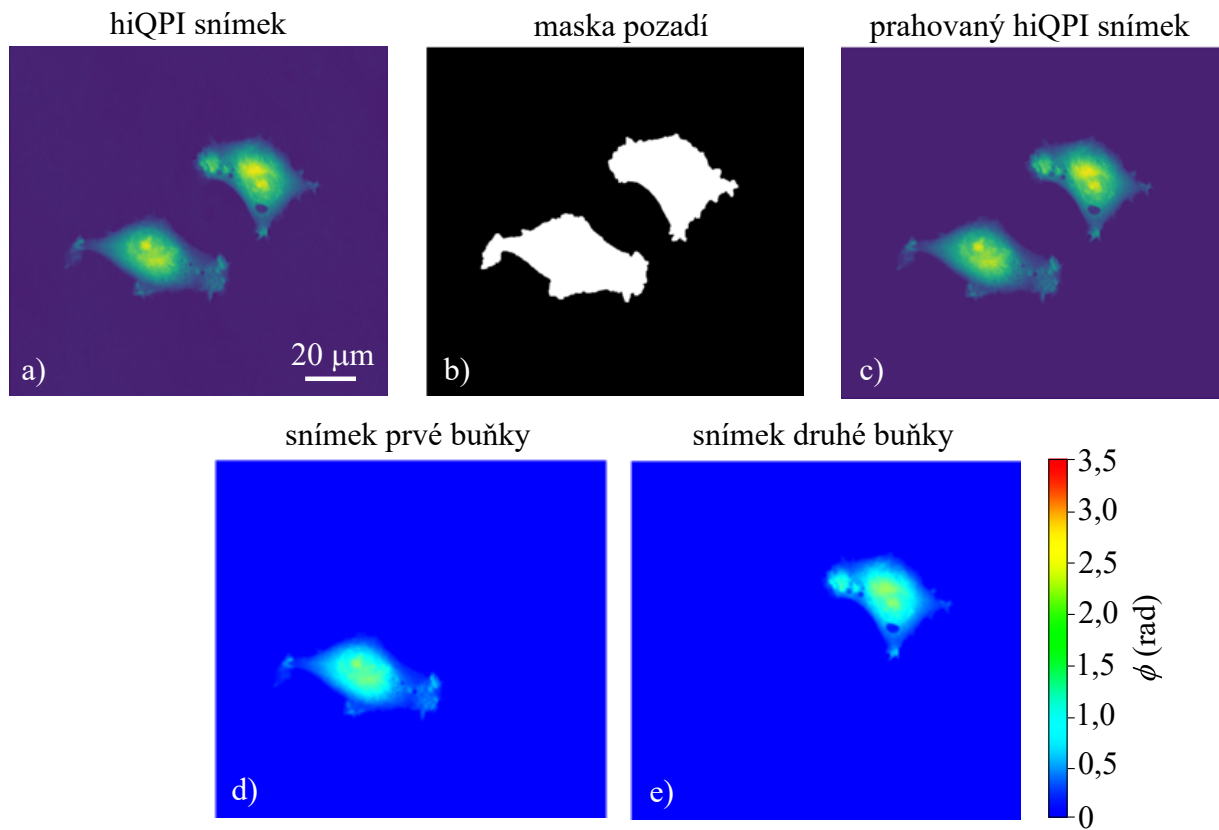
Po 24 hodinách byl nosič vložen do mikroskopu Q-Phase [32], což je inovativní typ mikroskopu využívající metodu hiQPI pro kvantitativní fázové zobrazování. Tento mikroskop vyrábí společnost Telight Brno, s.r.o.

Následovalo snímkování o různých časových intervalech ve stejném časovém úseku. Všechna měření probíhala po dobu 10 minut pro docílení co nejpresnějších měření. Zvolené intervaly snímkování byly 10 s, 5 s, 3 s, 2 s, 1 s, 0,50 s a 0,20 s. Reálně však byl nejkratší interval 0,26 s a nebo 0,28 s, vzhledem k technickým možnostem mikroskopu a jeho obslužného softwaru. Pozorování buněk snímkaných ve více časových intervalech umožnilo porovnat přesnost měření motility buněk a vyhodnotit tak nejvhodnější časovou frekvenci pro tato měření. Měření probíhala s oběma buněčnými liniemi K2 a T15. Celkově proběhla 4 měření buněčné linie K2 a 2 měření buněčné linie T15. Naměřeno bylo 6 buněk z každé linie a vyhodnocení dat proběhlo na nejvíce vhodném měření z obou buněčných linií, kdy buňka byla přisedlá na podložním sklíčku a nevykazovala známky přípravy na mitózu. Vhodnost snímků pro zpracovávání byla určována také podle faktorů jako motilita buňky po dobu měření nebo kvalita naladění mikroskopu po dobu měření. Při nastavení samotného experimentu byl zvolen objektiv značky NIKON se zvětšením 40x a numerickou aperturou 0,95, protože dovoluje nejvyšší možné rozlišení mikroskopu vzhledem k jeho vysoké numerické apertuře. Objektivy s menším zvětšením by neměly dostatečné rozlišení pro zaznamenání vnitřní motility buněk. Zdroj světla byl nastaven na vlnovou délku 660 nm s pološířkou spektra cca 10 nm a délku expozice nastavoval software mikroskopu SophiQ dle aktuálního naladění. Těsně před spuštěním měření bylo vzorkem posunuto tak, aby v zorném poli mikroskopu bylo pouze zorné pole bez buněk. Tento snímek byl

v programu SophiQ použit pro odečtení pozadí pod snímanými buňkami. Tímto krokem bylo docíleno přesnějších výsledků a zjednodušení následných kroků při zpracovávání pořízených snímků.

Následně probíhalo zpracovávání všech snímků pomocí skriptů, napsaných v jazyce Python. V prvním kroku zpracovávání byly snímky oříznuty tak, aby okolo buněk byla co nejmenší plocha pozadí. Tento krok byl zásadní pro další kroky zpracování. Velikost snímků výrazně ovlivňuje celkovou dobu dalšího zpracování a využití paměti počítače. Snímky byly i barevně škálovány a spojeny do animovaného gifu, aby byla zvýšena viditelnost buněk a jejich pohybu.

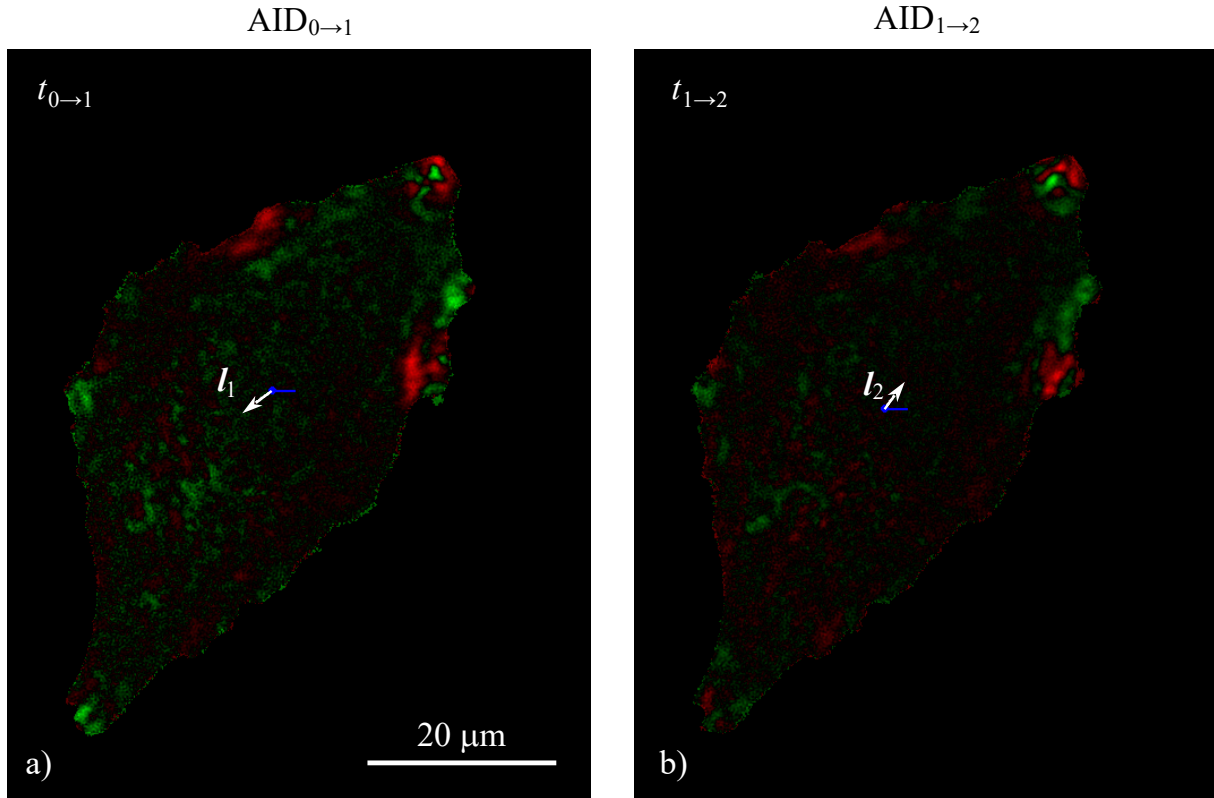
V druhém kroku byly buňky prahovány. Pozadí okolo buněk je v tomto kroku odstraněno a nahrazeno nulovými hodnotami, viz obrázek 5.11. Prahovací maska pozadí byla nastavena tak, aby neořezávala vlastní buňku. To umožní poslednímu kroku zpracování počítat pouze s vlastními daty buňky a ne i se šumem původního pozadí snímku. Bylo-li na snímku více buněk, byly separovány do vlastních snímků. Tím byla zajištěna maximální přesnost při zpracovávání ve třetím kroku.



Obrázek 5.11: Druhý krok zpracování. a) hiQPI snímek dvou buněk T15 pořízený mikroskopem, b) prahovací maska pozadí, c) buňky T15 s nulovým pozadím, d) a e) buňky separované do dvou hiQPI snímků.

V třetím kroku byly spočteny veličiny popisující chování buněk. K tomu bylo využito metody AID (Analytical Image Differencing) [23, 24], která je v současnosti v recenzním řízení pro

publikaci. Tato metoda odečítá po sobě jdoucí QPI snímky² a měří rozdíly hodnot v jednotlivých pixelech snímku. Jejím grafickým výstupem jsou zeleno-červeně barvené AID snímky, kde zelená barva reprezentuje přírůstek hmoty a červená úbytek hmoty, viz obrázek 5.12. Kromě toho dovolu je stanovit, kolik buněčné hmoty m se v daném okamžiku pohybuje, v jakém směrovém vektoru $\mathbf{l}$. Tato metoda je v současnosti rozvíjena pro měření buněčné síly $\mathbf{CF}$. Je-li známo množství přesunut é hmoty m a příslušný časový interval Δt , pak je možno stanovit vnitřní hybnost buňky. Z rozdílu dvou naměřených hybností, díky druhému Newtonovu zákonu, je možné stanovit sílu $\mathbf{CF}$, kterou buňka vytváří. Tato metoda bude v dohledné době publikována ve vysoko impaktovaném časopise (první kvantil oboru).



Obrázek 5.12: Příklad třetího kroku zpracování. Dva následující AID snímky spočtené ze tří hiQPI snímků. a) AID snímek počítaný ze snímků s indexy 1 a 0, b) AID snímek počítaný ze snímků s indexy 2 a 1. Modře je vyznačen kladný směr osy x a počátek souřadného systému, umístěný do váženého těžiště plochy úbytku hmoty (červená plocha). Bíle je zakreslen vektor $\mathbf{l}$, který míří do váženého těžiště plochy příbytku hmoty (zelená plocha).

²Lze použít hiQPI snímky z Q-phase mikroskopu i jiné QPI snímky z jiných holografických mikroskopů.

6 Diskuze

Pro podrobnou analýzu byly vybrána jedna buňka z každé linie. Výběr byl založen na tom, aby buňky byly v podobném stavu po celou dobu měření s různými časovými intervaly. To jest bez výrazného vnějšího pohybu, pouze s aktivitou přesunu hmoty na svém kraji. Právě takovéto buňky je možné porovnat z pohledu vnitřní motility. Zbylá naměřená data, vzhledem k velmi vysoké časové náročnosti, budou zpracovávána v budoucnu.

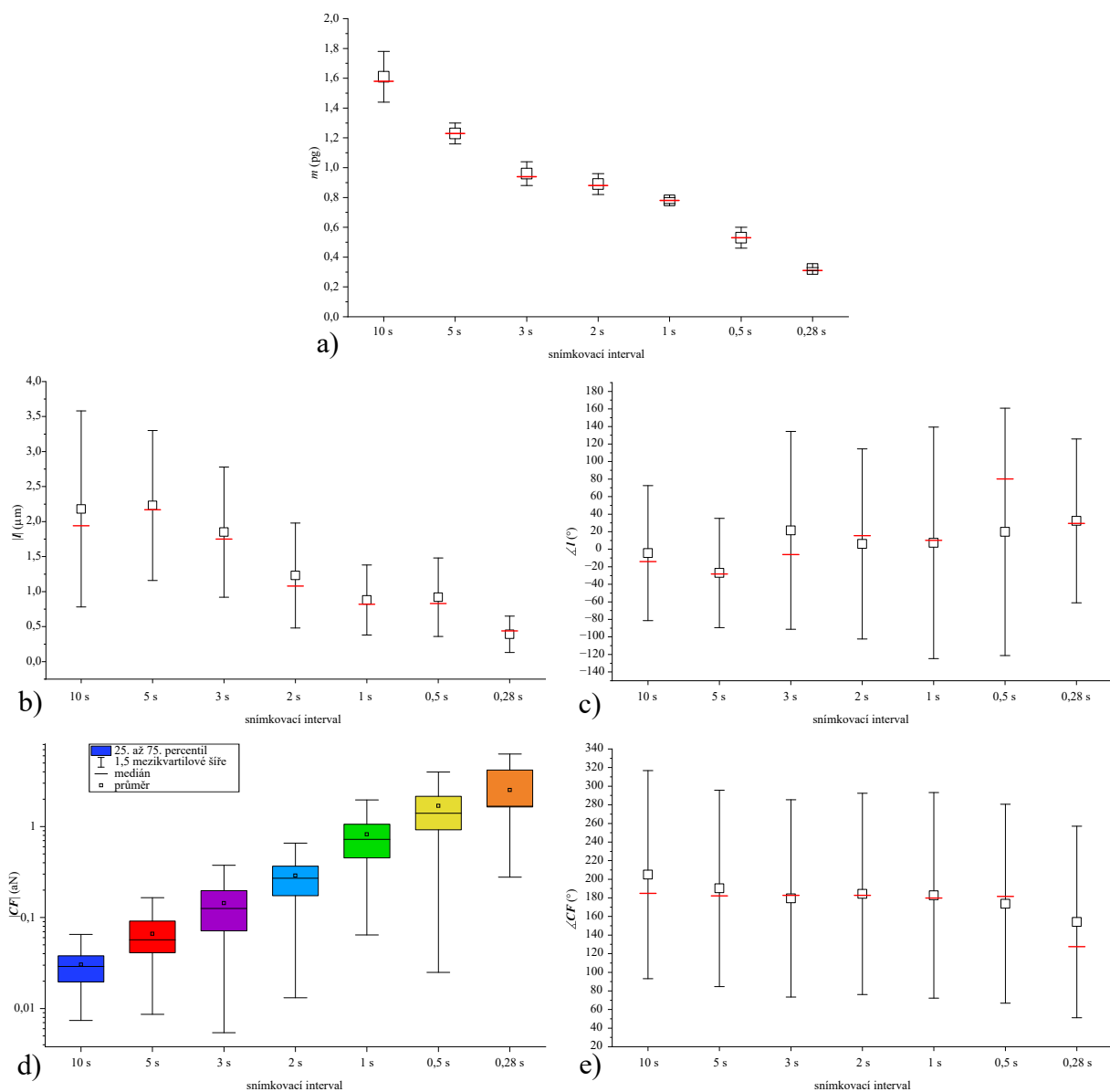
U obou buněk byly naměřeny téměř podobné výsledky. Pro stanovení závěrů je nutné porovnávat jak číselně naměřená data, tak i data obrazová. Číselná data pro buňku T15 jsou uvedena v tabulce 6.1 a reprezentována v grafu na obrázku 6.13. Obrazová data jednotlivých AID sérií jsou uvedena na obrázku 6.14. Číselná data pro buňku K2 jsou uvedena v tabulce 6.2 a reprezentována v grafu na obrázku 6.15. Obrazová data jednotlivých AID sérií jsou uvedena na obrázku 6.16.

Z grafů na obrázku 6.13 a z dat v tabulce 6.1 je patrné, že hodnota hmoty buňky m , která je během pořízení AID snímku v pohybu, klesá se snižujícím se snímkovacím intervalem. To je předem očekávaný a předpokládaný výsledek, který potvrzuje, že měření při jednotlivých časových intervalech odpovídá realitě. Velikost směrového vektoru $|\mathbf{l}|$ přemístění hmoty také klesá se snižujícím se snímkovacím intervalem. Úhel tohoto vektoru kolísá průměrnými hodnotami (i mediány) okolo přímky, přičemž příslušné směrodatné odchylky jsou o řád vyšší. To vypovídá o chaotickém pohybu buňky. Velikost buněčné síly $|\mathbf{CF}|$ je s klesajícím intervalem rostoucí. Tento trend odpovídá dříve provedeným měřením se simulovanou změnou snímkovací frekvence. Tato měření již dříve provedli MUDr. Pavel Veselý, CSc. a Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D. Společně je budeme publikovat, včetně mých závěrů a dat. Směr vektoru buněčné síly $\angle \mathbf{CF}$ je opět chaotický bez výrazného směru, podobně jako u směru vektoru $\angle \mathbf{l}$. Z naměřených sérií AID snímků (viz obrázek 6.14) bylo možné určit nejpřesnější a zároveň nejpřehlednější snímkovací interval, ve kterém je viditelná vnitřní motilita buňky a neobjevuje se šum. Všechny AID snímky se snímkovacím intervalem 0,5 s a 0,28 s jsou si velmi podobné. Čitelnost vnitřní motility buněk na těchto snímcích je velmi špatná a na snímcích převažuje spíše šum. Nelze tak pozorovat jemné pohyby uvnitř buňky. Pozorovatelné jsou pouze pohyby na hranicích buňky (zvýrazněno žlutou šipkou). U AID snímků se snímkovacími intervaly 10 s, 5 s, 3 s a 2 s je viditelná vnitřní motilita buňky, ale zároveň nejsou měření tak přesná kvůli nižším snímkovacím intervalům. Proto jsem dospěla k závěru, že nejpřesnější snímkovací interval pro pozorování vnitřní motility buňky

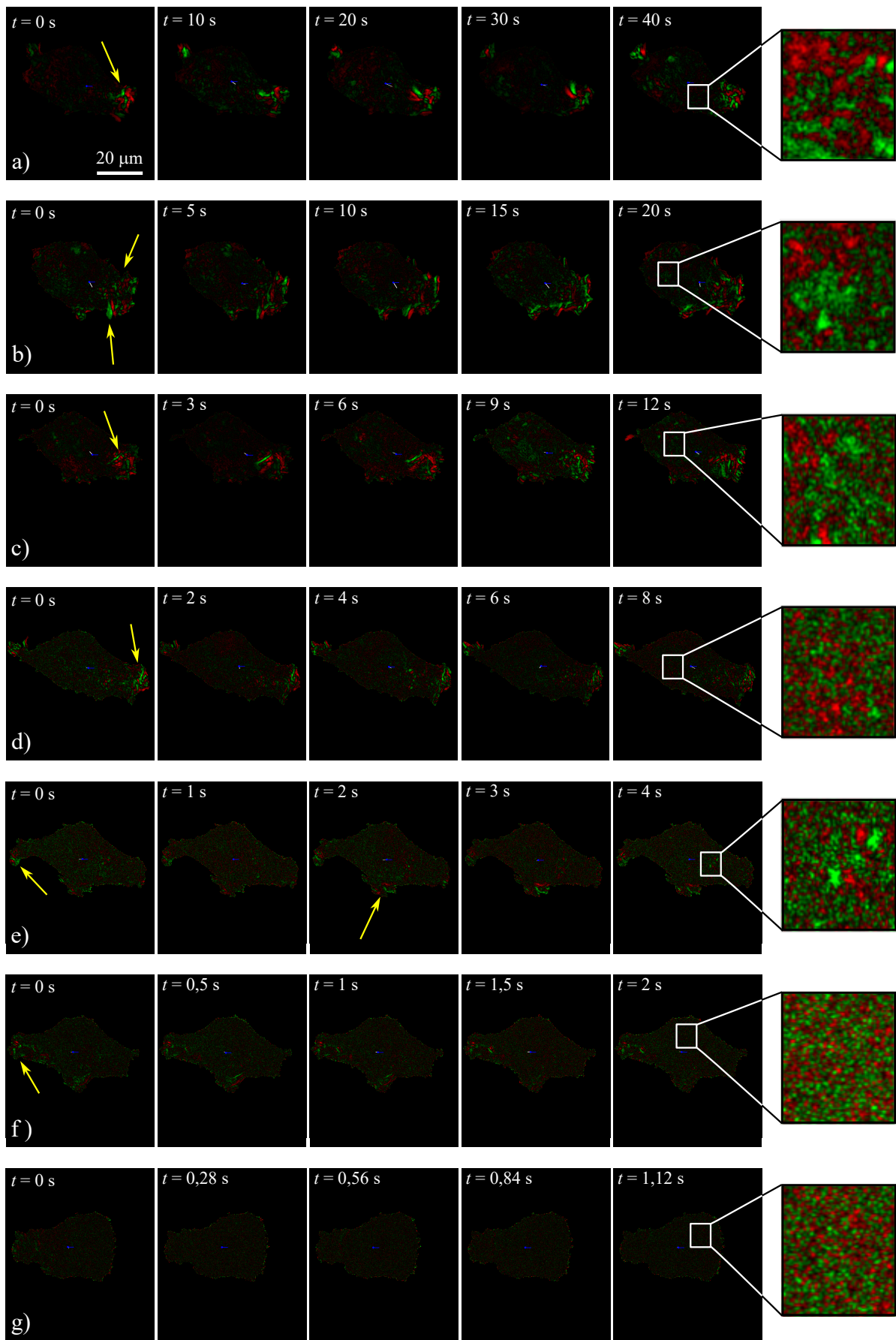
je interval 1 s, což potvrzuje dřívější domněnku MUDr. Pavla Veselého. Tento interval stále umožňuje pozorovat vnitřní motilitu buňky a zároveň je nejmenším snímkovacím intervalem, při kterém se neobjevil šum.

Tento závěr potvrzuje i měření druhé buňky, tedy buňky K2. Z grafů na obrázku 6.15 a z tabulky 6.2 lze opět pozorovat, že hodnota hmoty buňky m , která je během pořízení AID snímku v pohybu, klesá se snižujícím se snímkovacím intervalem. Tento předem očekávaný a předpokládaný výsledek opět potvrzuje, že měření při jednotlivých časových intervalech odpovídá realitě. Velikost směrového vektoru $|\mathbf{l}|$ přemístění hmoty opět klesá se snižujícím se snímkovacím intervalem. Úhel tohoto vektoru $\angle \mathbf{l}$ kolísá průměrnými hodnotami (i mediány) okolo přímky a příslušné směrodatné odchylky jsou také o řád větší. To vypovídá opět chaotickém pohybu buňky, tak jako v prvním případě. Velikost buněčné síly $|\mathbf{CF}|$ je s klesajícím intervalem opět rostoucí, ale dosahuje v porovnání s buňkou T15 skoro o řád vyšších hodnot. Buňka T15 generovala velikost buněčné síly 1,89 aN (medián série 0,28 s), buňka K2 generovala velikost buněčné síly 6,48 aN (medián série 0,26 s). Z naměřených sérií AID snímků (viz obrázek 6.16) bylo opět možné určit nejpřesnější a zároveň nejpřehlednější snímkovací interval, ve kterém je viditelná vnitřní motilita buňky a neobjevuje se šum. Všechny AID snímky se snímkovacím intervalem 0,5 s a 0,26 s jsou si velmi podobné. Čitelnost vnitřní motility buněk na těchto snímcích je opět velmi špatná a na snímcích převažuje šum. Nelze pozorovat přesné pohyby uvnitř buňky. Pozorovatelné jsou pouze pohyby na hranicích buňky (zvýrazněno žlutou šipkou). U AID snímků se snímkovacími intervaly 10 s, 5 s, 3 s a 2 s je opět dobře viditelná vnitřní motilita buňky. Proto jsem opět vyhodnotila, že nejpřesnější snímkovací interval pro pozorování vnitřní motility buňky je interval 1 s.

S ohledem na podobnost obou výsledků jsem dospěla k závěru, že ačkoliv jde o buněčné rakovinné linie různého původu, při velmi rychlém snímkování se buňky z fyzikálního hlediska chovají velice podobně a jsou pro metodu AID nerozlišitelné. Pokud tedy pohlížíme na buňku jako na celek, je hraničním intervalem snímkování 1 s.



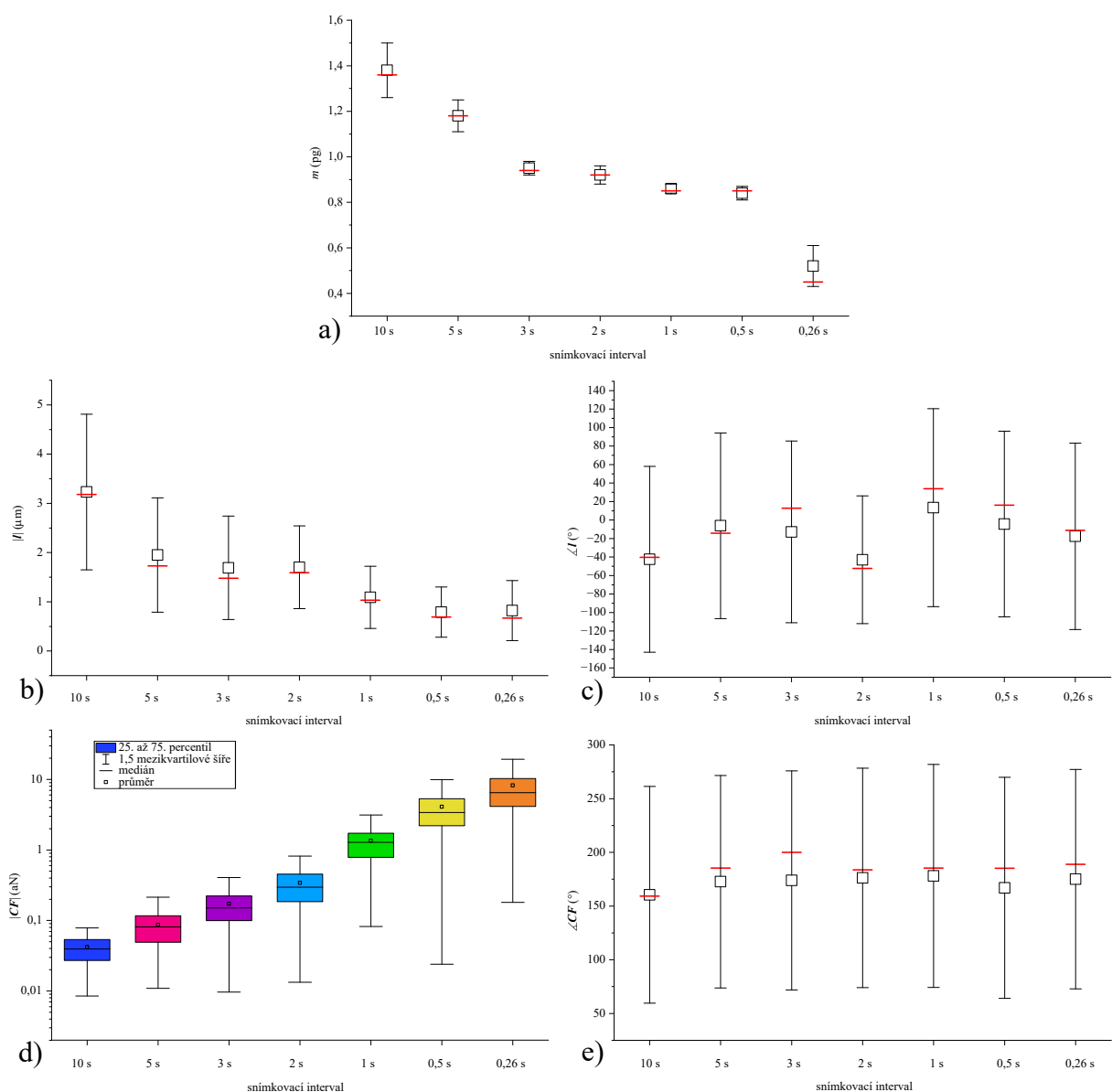
Obrázek 6.13: Grafy statistických výsledků měření pro buňku T15. a) Přesouvaná hmoty m buňky, b) velikost vektoru pohybu $|l|$ hmoty buňky, c) směr vektoru pohybu $\angle l$ hmoty buňky, d) velikost buněčné síly $|CF|$ buňky, e) směr síly buňky $\angle CF$. U grafů a) až c) a e) čtverec označuje aritmetický průměr, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky a červená linka vyznačuje medián.



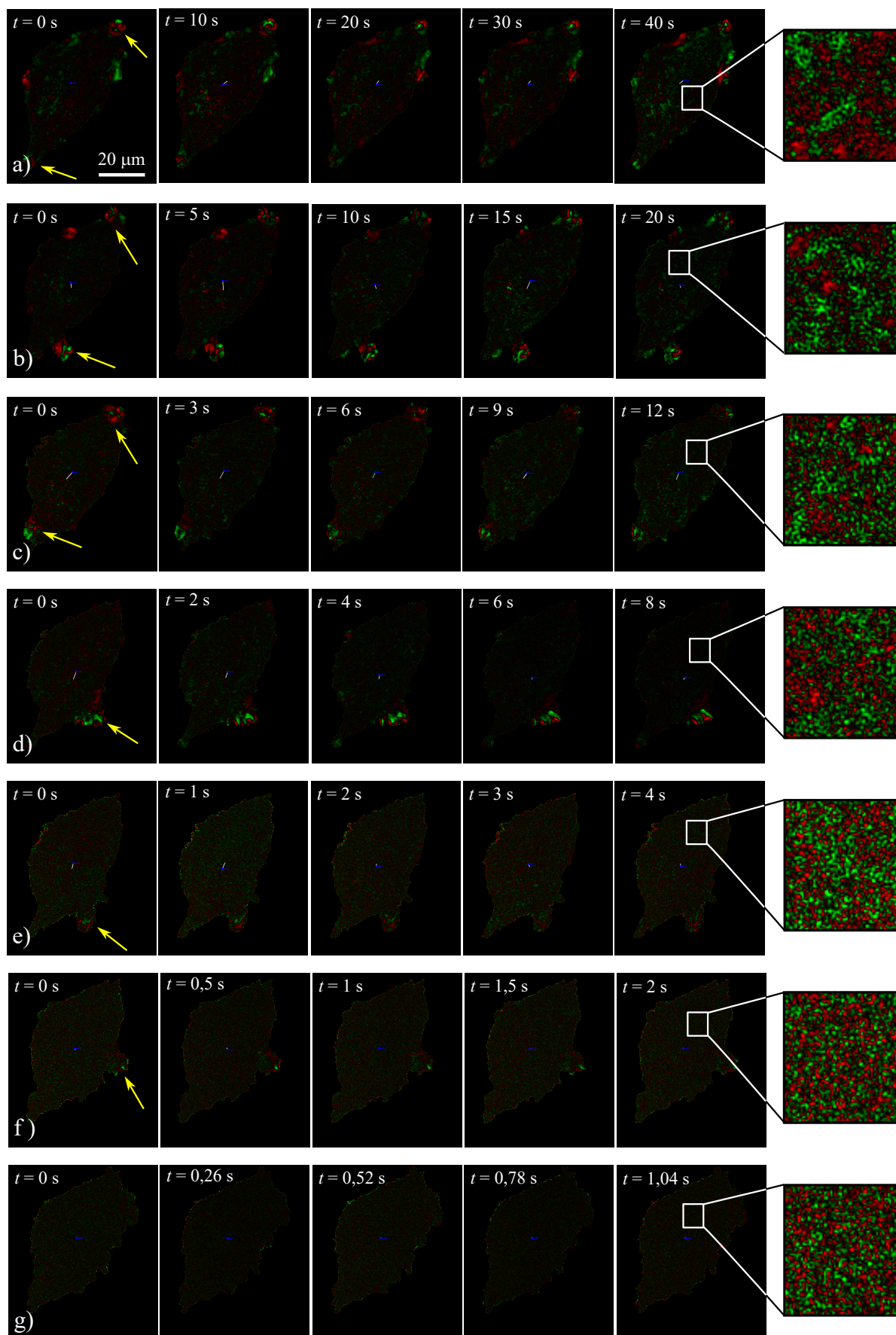
Obrázek 6.14: Série AID snímků buňky T15 pro různé snímkové intervaly. a) 10 s b) 5 s, c) 3 s, d) 2 s, e) 1 s, f) 0,5 s, g) 0,28 s. Žlutou šipkou jsou vyznačeny výrazné pohyby na hranici buňky. Ve výřezech je zvětšena vnitřní motilita buňky.

Tabulka 6.1: Tabulka statistických výsledků měření pro buňku T15.

snímkovací interval	stat. veličina	m (pg)	$ l $ (μm)	$\angle l$ ($^\circ$)	$ CF $ (aN)	$\angle CF$ ($^\circ$)
10 s	průměr	1,61	2,18	-4,43	0,03	204,98
	sm. odchylka	0,17	1,40	77,08	0,01	111,77
	medián	1,58	1,94	-14,08	0,03	184,82
5 s	průměr	1,23	2,23	-27,02	0,07	190,21
	sm. odchylka	0,07	1,07	62,31	0,04	105,57
	medián	1,23	2,17	-28,33	0,06	182,15
3 s	průměr	0,96	1,85	21,53	0,14	179,38
	sm. odchylka	0,08	0,93	112,91	0,10	105,97
	medián	0,94	1,75	-6,07	0,13	182,77
2 s	průměr	0,89	1,23	6,04	0,29	184,21
	sm. odchylka	0,07	0,75	108,42	0,17	108,16
	medián	0,88	1,08	15,54	0,27	182,68
1 s	průměr	0,78	0,88	7,18	0,82	182,71
	sm. odchylka	0,02	0,50	132,02	0,49	110,54
	medián	0,78	0,82	10,09	0,72	179,76
0,5 s	průměr	0,53	0,92	19,85	1,57	173,65
	sm. odchylka	0,07	0,56	141,01	0,96	106,92
	medián	0,53	0,83	80,08	1,38	181,56
0,28 s	průměr	0,32	0,39	32,28	2,51	154,11
	sm. odchylka	0,01	0,26	93,42	1,83	102,88
	medián	0,31	0,44	29,43	1,89	127,59



Obrázek 6.15: Grafy statistických výsledků měření pro buňku K2. a) Přesouvaná hmota m buňky, b) velikost vektoru pohybu $|l|$ hmoty buňky, c) směr vektoru pohybu $\angle l$ hmoty buňky, d) velikost buněčné síly $|CF|$ buňky, e) směr síly buňky $\angle CF$. U grafů a) až c) a e) čtverec označuje aritmetický průměr, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky a červená linka vyznačuje medián.



Obrázek 6.16: Série AID snímků buňky K2 pro různé snímkovací intervaly. a) 10 s b) 5 s, c) 3 s, d) 2 s, e) 1 s, f) 0,5 s, g) 0,26 s. Žlutou šipkou jsou vyznačeny výrazné pohyby na hranici buňky. Ve výřezech je zvětšena vnitřní motilita buňky.

Tabulka 6.2: Tabulka statistických výsledků měření pro buňku K2.

snímkovací interval	stat. veličina	m (pg)	$ l $ (μm)	$\angle l$ ($^\circ$)	$ CF $ (aN)	$\angle CF$ ($^\circ$)
10 s	průměr	1,38	3,23	−42,46	0,04	160,46
	sm. odchylka	0,12	1,58	100,40	0,02	100,89
	medián	1,36	3,18	−40,38	0,04	159,32
5 s	průměr	1,18	1,95	−6,20	0,09	172,69
	sm. odchylka	0,07	1,16	100,38	0,05	98,94
	medián	1,18	1,73	−14,29	0,08	185,40
3 s	průměr	0,95	1,69	−12,84	0,17	173,95
	sm. odchylka	0,03	1,05	98,26	0,10	101,99
	medián	0,94	1,48	12,89	0,15	199,95
2 s	průměr	0,92	1,70	−42,97	0,34	176,26
	sm. odchylka	0,04	0,84	69,06	0,22	102,13
	medián	0,92	1,59	−52,40	0,30	183,64
1 s	průměr	0,86	1,09	13,42	1,35	178,00
	sm. odchylka	0,02	0,63	107,05	0,77	103,79
	medián	0,85	1,03	33,95	1,28	185,40
0,5 s	průměr	0,84	0,79	−4,34	3,87	166,99
	sm. odchylka	0,03	0,51	100,44	2,35	102,90
	medián	0,85	0,69	16,01	3,27	185,25
0,26 s	průměr	0,52	0,82	−17,55	8,25	175,00
	sm. odchylka	0,09	0,61	100,78	6,79	102,14
	medián	0,45	0,67	−11,10	6,48	188,82

Závěr

V rámci své práce jsem se naučila spoustu nových znalostí a získala nové dovednosti. Seznámila jsem se s technikami mikroskopie, naučila jsem se pěstovat živé buňky, měřit je pomocí Q-Phase mikroskopu a zpracovávat získaná data. Výsledky mé práce mají potenciál pro urychlení biologického výzkumu chování nádorových buněk. Díky určení nejvhodnějšího snímkovacího intervalu se zefektivní proces měření buněk a tím lze urychlit i celý výzkum. Rychlost výzkumu je důležitá například při zkoumání nádorových onemocnění. Při těchto výzkumech je potřeba pozorovat motilitu buněk a dění v nich a to umožňuje snímkovací interval 1 s. Naměřená data pro tuto práci budou publikována ve vysoko impaktovaném časopise prvního kvantilu oboru (např. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*) ve složení autorů MUDr. Pavel Veselý, CSc., Barbora Kuželová, Richard Veselý a Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D. Získané výsledky představují klíčové potvrzení původního pracovního posouzení rozhodující délky snímání intervalu 1 s, přičemž při intervalu 0,5 s již dochází k výraznému projevu šumu. Tímto je umožněna detekce této hranice, která poskytuje možnost charakterizovat buňky a jejich reakce. Na tento opěrný bod naváže disertační práce Mgr. Anastázie Říhové, která je zaměřená na rychlé pohyby fokální adheze, jež byly patrné i při měřeních se snímáním intervalem kratším než 1 s. Práce se bude věnovat vztahu těchto pohybů k motilitě cytoplazmy a aktivitě rychlého intracelulárního pohybu (fast intracellular movement). To vše bude prezentováno prostřednictvím metody AID a metod jako refexní interferenční mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a optická rozptylová mikroskopie, které budou integrované v jednom přístroji, jako ukázka možností neinvazivní korelační mikroskopie bez nutnosti barvení buněk.

Literatura

1. LANG, Paul; YEOW, Karen; NICHOLS, Anthony; SCHEER, Alexander. Cellular Imaging in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. April 2006, vol. 5, no. 4, s. 343–356 [cit. 2024-12-18]. ISSN 1474-1784. Dostupné z DOI: [10.1038/nrd2008](https://doi.org/10.1038/nrd2008).
2. ČOLLÁKOVÁ, Jana; DOSTÁL, Zbyněk; KŘÍŽOVÁ, Aneta; SLABÝ, Tomáš; HENZLOVÁ, Michaela; ANTOŠ, Martin; LOŠŤÁK, Martin; KOLLÁROVÁ, Věra; VESELÝ, Pavel; CHMELÍK, Radim. Quantitative Phase Imaging in Turbid Media by Coherence-gated Off-axis Holographic Microscope. In: *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (2013), Paper DTu2A.4* [online]. Optica Publishing Group, April 2013, DTu2A.4 [cit. 2022-07-30]. Dostupné z DOI: [10.1364/DH.2013.DTu2A.4](https://doi.org/10.1364/DH.2013.DTu2A.4).
3. ČOLLÁKOVÁ, Jana; KŘÍŽOVÁ, Aneta; KOLLÁROVÁ, Věra; DOSTÁL, Zbyněk; SLABÁ, Michala; VESELÝ, Pavel; CHMELÍK, Radim. Coherence-Controlled Holographic Microscopy Enabled Recognition of Necrosis as the Mechanism of Cancer Cells Death after Exposure to Cytopathic Turbid Emulsion. *Journal of Biomedical Optics*. 2015, vol. 20, no. 11, s. 111213. ISSN 1560-2281. Dostupné z DOI: [10.1117/1.JBO.20.11.111213](https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.111213).
4. GÁL, Břetislav; VESELÝ, Miroslav; ČOLLÁKOVÁ, Jana; NEKULOVÁ, Marta; JÚZOVÁ, Veronika; CHMELÍK, Radim; VESELÝ, Pavel. Distinctive Behaviour of Live Biopsy-Derived Carcinoma Cells Unveiled Using Coherence-Controlled Holographic Microscopy. *PLOS ONE* [online]. 2017, vol. 12, no. 8, e0183399 [cit. 2022-07-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0183399](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183399).
5. KŘÍŽOVÁ, Aneta; ČOLLÁKOVÁ, Jana; DOSTÁL, Zbyněk; KVASNICA, Lukáš; UHLÍŘOVÁ, Hana; ZIKMUND, Tomáš; VESELÝ, Pavel; CHMELÍK, Radim. Dynamic Phase Differences Based on Quantitative Phase Imaging for the Objective Evaluation of Cell Behavior. *Journal of Biomedical Optics*. 2015, vol. 20, no. 11, s. 111214. ISSN 1560-2281. Dostupné z DOI: [10.1117/1.JBO.20.11.111214](https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.111214).
6. SOLOMON, Jonathan; RAŠKOVA, Magdalena; RÖSEL, Daniel; BRÁBEK, Jan; GILHENN, Hava. Are We Ready for Migrastatics? *Cells* [online]. August 2021, vol. 10, no. 8, s. 1845 [cit. 2024-12-18]. ISSN 2073-4409. Dostupné z DOI: [10.3390/cells10081845](https://doi.org/10.3390/cells10081845).

7. ŠURÁŇOVÁ, Markéta; ĎURIŠ, Miroslav; NETÍKOVÁ ŠTENGLOVÁ, Irena; BRÁBEK, Jan; HORÁK, Tomas; JUZOVÁ, Veronika; CHMELÍK, Radim; VESELÝ, Pavel. Primary Assessment of Medicines for Expected Migrastatic Potential with Holographic Incoherent Quantitative Phase Imaging. *Biomedical Optics Express* [online]. April 2023 [cit. 2023-04-26]. ISSN 2156-7085. Dostupné z DOI: [10.1364/B0E.488630](https://doi.org/10.1364/B0E.488630).
8. BRÁBEK, Jan; MIERKE, Claudia T.; RÖSEL, Daniel; VESELÝ, Pavel; FABRY, Ben. The Role of the Tissue Microenvironment in the Regulation of Cancer Cell Motility and Invasion. *Cell Communication and Signaling* [online]. Zář 2010, roč. 8, č. 1, s. 22 [cit. 2023-09-06]. ISSN 1478-811X. Dostupné z DOI: [10.1186/1478-811X-8-22](https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-22).
9. STAEHELIN, L. Andrew; CHOW, Christopher; LASKEY, Ronald A.; COOPER, John A.; BERNFIELD, Merton R.; STEIN, Wilfred D.; CUFFE, Michael; LODISH, Harvey F.; SLACK, Jonathan M.W.; ALBERTS, Bruce M. Cell. *Encyclopedia Britannica* [online]. December 2024 [cit. 2024-12-18].
10. DAVIDES, H. G.; WILKINS, M. H. F. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature Publishing Group* [online]. March 1952, vol. 169, no. 4300, s. 541–541 [cit. 2022-12-30]. ISSN 1476-4687. Dostupné z DOI: [10.1038/169541a0](https://doi.org/10.1038/169541a0).
11. DAVIDES, H. G.; WILKINS, M. H. F.; CHAYEN, J.; LA COUR, L. F. The Use of the Interference Microscope to Determine Dry Mass in Living Cells and as a Quantitative Cytochemical Method. *Journal of Cell Science* [online]. Zář 1954, roč. s3-95, č. 31, s. 271–304 [cit. 2022-07-30]. ISSN 0021-9533. Dostupné z DOI: [10.1242/jcs.s3-95.31.271](https://doi.org/10.1242/jcs.s3-95.31.271).
12. *EVIDENT Europe GmbH (Olympus)* [<https://www.olympus-lifescience.com/en/>]. [B.r.]. [cit. 2022-11-30].
13. DAVIDSON, Michael W.; ABRAMOWITZ, Mortimer. Optical Microscopy. In: *Encyclopedia of Imaging Science and Technology* [online]. John Wiley & Sons, Ltd, 2002 [cit. 2023-05-16]. ISBN 978-0-471-44339-1. Dostupné z DOI: [10.1002/0471443395.img074](https://doi.org/10.1002/0471443395.img074).
14. RIJAL, Nisha. *Dark-Field Microscopy: Principle and Uses • Microbe Online* [<https://microbeonline.com/dark-field-microscopy/>]. April 2020. [cit. 2025-01-13].
15. ZERNIKE, F. Phase Contrast, a New Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects. *Physica* [online]. Červenec 1942, roč. 9, č. 7, s. 686–698 [cit. 2023-09-26]. ISSN 0031-8914. Dostupné z DOI: [10.1016/S0031-8914\(42\)80035-X](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(42)80035-X).
16. ZERNIKE, F. Phase Contrast, a New Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects Part II. *Physica* [online]. Prosinec 1942, roč. 9, č. 10, s. 974–986 [cit. 2023-09-26]. ISSN 0031-8914. Dostupné z DOI: [10.1016/S0031-8914\(42\)80079-8](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(42)80079-8).
17. *Britannica, The Editors of Encyclopaedia. John Dollond* [<https://www.britannica.com/biography/John-Dollond>]. June 2023. [cit. 2023-09-26].

18. Georges NOMARSKI. *Interferential Polarizing Device for Study of Phase Objects*. Vynálezce: Georges NOMARSKI. Publ.: 1960-02. Patent US2924142A. [Cit. 2023-10-02].
19. *A Guide to Differential Interference Contrast (DIC)* [<https://www.scientifica.uk.com/learning-zone/differential-interference-contrast>]. [B.r.]. [cit. 2025-01-14].
20. GMBH, Carl Zeiss Microscopy. *Principles of Fluorescence and Fluorescence Microscopy*. Květen 2019. [online, cit. 2.3. 2023].
21. *Fluorescence Microscopy: An Easy Guide for Biologists* [<https://bitesizebio.com/33529/fluorescence-microscopy-the-magic-of-fluorophores-and-filters/>]. December 2022. [cit. 2025-01-16].
22. *What Is a Jablonski Diagram (Perrin-Jablonski Diagram)? - Edinburgh Instruments* [<https://www.edinst.com/resource/what-is-a-jablonski-diagram-perrin-jablonski-diagram/>]. [N.d.]. [cit. 2025-01-16].
23. DOSTÁL, Zbyněk; ŽÁKOVÁ, Veronika; VESELÝ, Pavel. *Dynamic Cell-Mass Movement Analyses Tool* [online]. Rochester, NY, March 2023 [cit. 2023-04-11]. No. 4344841.
24. DOSTÁL, Zbyněk; ŽÁKOVÁ, Veronika; VESELÝ, Pavel. *AID Repository* [<https://github.com/ZbynekDostal/AID>]. 2023. [cit. 2022-08-17].
25. KREIS, Thomas. Digital Holographic Interference-Phase Measurement Using the Fourier-transform Method. *JOSA A* [online]. June 1986, vol. 3, no. 6, s. 847–855 [cit. 2022-07-31]. ISSN 1520-8532. Dostupné z DOI: [10.1364/JOSAA.3.000847](https://doi.org/10.1364/JOSAA.3.000847).
26. SLABÝ, Tomáš; KOLMAN, Pavel; DOSTÁL, Zbyněk; ANTOŠ, Martin; LOŠTÁK, Martin; CHMELÍK, Radim. Off-Axis Setup Taking Full Advantage of Incoherent Illumination in Coherence-Controlled Holographic Microscope. *Opt. Express* [online]. June 2013, vol. 21, no. 12, s. 14747–14762 [cit. 2022-08-17]. ISSN 1094-4087. Dostupné z DOI: [10.1364/OE.21.014747](https://doi.org/10.1364/OE.21.014747).
27. Radim CHMELÍK; Pavel KOLMAN; Tomáš SLABÝ; Martin ANTOŠ; Zbyněk DOSTÁL. *Interferometric System with Spatial Carrier Frequency Capable of Imaging in Polychromatic Radiation*. Vynálezce: Radim CHMELÍK; Pavel KOLMAN; Tomáš SLABÝ; Martin ANTOŠ; Zbyněk DOSTÁL. Publ.: 2013-09. Patent US8526003B2. [Cit. 2023-03-05].
28. ZICHA, Daniel; CHMELIK, Radim. Chapter Nine - Testing Anti-Cancer Drugs with Holographic Incoherent-Light-Source Quantitative Phase Imaging. In: SHUKLA, Arun K. (ed.). *Methods in Enzymology* [online]. Academic Press, January 2023, vol. 679, s. 255–274 [cit. 2023-01-24]. Integrated Methods in Protein Biochemistry: Part B. Dostupné z DOI: [10.1016/bs.mie.2022.08.017](https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.08.017).

29. DOSTÁL, Zbyněk; SLABÝ, Tomáš; KVASNICA, Lukáš; LOŠŤÁK, Martin; KRÍŽOVÁ, Aneta; CHMELÍK, Radim. Automated Alignment Method for Coherence-Controlled Holographic Microscope. *Journal of Biomedical Optics* [online]. Říjen 2015, roč. 20, č. 11, s. 111215 [cit. 2022-06-18]. ISSN 1083-3668, ISSN 1560-2281. Dostupné z DOI: [10.1117/1.JBO.20.11.111215](https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.11.111215).
30. CAVANNA, Tamara; POKORNÁ, Eva; VESELÝ, Pavel; GRAY, Colin; ZICHA, Daniel. Evidence for Protein 4.1B Acting as a Metastasis Suppressor. *Journal of Cell Science* [online]. Únor 2007, roč. 120, č. 4, s. 606–616 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0021-9533. Dostupné z DOI: [10.1242/jcs.000273](https://doi.org/10.1242/jcs.000273).
31. *Ibidi* [<https://ibidi.com/>]. [N.d.]. [cit. 2025-01-14].
32. TELIGHT BRNO, S.R.O. *Q-Phase Microscope* [<https://telight.eu/products/telight-q-phase/>]. 2022. [cit. 2022-07-31]. [On-line; 28. ledna 2025].

Seznam obrázků

1.1	Optické uspořádání mikroskopu světlého pole.	4
1.2	Optické uspořádání mikroskopu temného pole. Převzato a upraveno z [14]. . . .	5
1.3	Optické uspořádání Zernikeho fázového kontrastu. Převzato a upraveno z [17]. .	6
1.4	Optické uspořádání mikroskopu pro diferenciální interferenční kontrast. Převzato a upraveno z [19].	7
1.5	a) Epifluorescenční mikroskop. Převzato a upraveno z [21]. b) Jablonského diagram. Převzato a upraveno z [22].	8
2.6	Optické uspořádání holografického mikroskopu.	12
2.7	Zpracování digitálního hologramu. a) Zaznamenaný hologram, b) spektrum prostorových frekvencí, c) surový fázový obraz, d) rekonstruovaná amplituda objektové vlny, e) QPI snímek.	13
2.8	Optické schéma hiQPI mikroskopu. Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížka, D ₁ - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, De - CCD kamera (detektor).	14
4.9	Bürkerova komůrka. a) Náhled na komůrku, b) počítačící políčko.	21
5.10	Mikroskopový nosič Ibidi μ -Slide Lauer. Převzato a upraveno z [31].	24
5.11	Druhý krok zpracování. a) hiQPI snímek dvou buněk T15 pořízený mikroskopem, b) prahovací maska pozadí, c) buňky T15 s nulovým pozadím, d) a e) buňky separované do dvou hiQPI snímků.	25
5.12	Příklad třetího kroku zpracování. Dva následující AID snímky spočtené ze tří hiQPI snímků. a) AID snímek počítaný ze snímků s indexy 1 a 0, b) AID snímek počítaný ze snímků s indexy 2 a 1. Modře je vyznačen kladný směr osy x a počátek souřadného systému, umístěný do váženého těžiště plochy úbytku hmoty (červená plocha). Bíle je zakreslen vektor $\mathbf{l}$, který míří do váženého těžiště plochy příbytku hmoty (zelená plocha).	26

- 6.13 Grafy statistických výsledků měření pro buňku T15. a) Přesouvaná hmota m buňky, b) velikost vektoru pohybu $|\mathbf{l}|$ hmoty buňky, c) směr vektoru pohybu $\angle \mathbf{l}$ hmoty buňky, d) velikost buněčné síly $|\mathbf{CF}|$ buňky, e) směr síly buňky $\angle \mathbf{CF}$. U grafů a) až c) a e) čtverec označuje aritmetický průměr, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky a červená linka vyznačuje medián. 29
- 6.14 Série AID snímků buňky T15 pro různé snímkové intervaly. a) 10 s b) 5 s, c) 3 s, d) 2 s, e) 1 s, f) 0,5 s, g) 0,28 s. Žlutou šipkou jsou vyznačeny výrazné pohyby na hranici buňky. Ve výřezech je zvětšena vnitřní motilita buňky. 30
- 6.15 Grafy statistických výsledků měření pro buňku K2. a) Přesouvaná hmota m buňky, b) velikost vektoru pohybu $|\mathbf{l}|$ hmoty buňky, c) směr vektoru pohybu $\angle \mathbf{l}$ hmoty buňky, d) velikost buněčné síly $|\mathbf{CF}|$ buňky, e) směr síly buňky $\angle \mathbf{CF}$. U grafů a) až c) a e) čtverec označuje aritmetický průměr, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky a červená linka vyznačuje medián. 32
- 6.16 Série AID snímků buňky K2 pro různé snímkové intervaly. a) 10 s b) 5 s, c) 3 s, d) 2 s, e) 1 s, f) 0,5 s, g) 0,26 s. Žlutou šipkou jsou vyznačeny výrazné pohyby na hranici buňky. Ve výřezech je zvětšena vnitřní motilita buňky. 33

Seznam tabulek

6.1	Tabulka statistických výsledků měření pro buňku T15.	31
6.2	Tabulka statistických výsledků měření pro buňku K2.	34

Seznam rovnic

- Rovnice (2.1): $m(i, j) = \frac{\phi(i, j)S}{\alpha k}$
- Rovnice (2.2): $i = |o + r|^2 = or^* + o^*r + |o|^2 + |r|^2$
- Rovnice (2.3): $f = \sin\theta\lambda = f_{\text{DM}}$
- Rovnice (4.1): $x = 10000\frac{a}{n}$