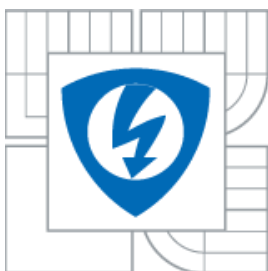




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ VIABILITY BUNĚK

CELL VIABILITY MEASUREMENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVEL PELC

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Pavel Pelc
Ročník: 3

ID: 137241
Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Měření viability buněk

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s fluorescenčními metodami pro měření viability buněk. Prostudujte základní metody zobrazování používané v konfokální mikroskopii. Sestavte literární rešerši v této oblasti. 2) Zaměřte se na metody v konfokální mikroskopii využívající fluorescenční barviva pro stanovení viability v buněk. 3) Navrhněte metodu pro optické vyhodnocení viability buněk s pomocí kitu LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X s možností třídění buněk na živé a mrtvé v obraze. 4) Realizujte měření viability na základě navrženého postupu a získajte sadu snímků na dvou odlišných buněčných strukturách. 5) Metodou obrazové analýzy proveďte statistické a prostorové třídění živých a mrtvých buněk. 6) Proveďte diskusi a zhodnocení výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] PAWLEY, J.: Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3rd ed. Springer, 2006. ISBN-13: 978-0387259215.

[2] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer, 2006. ISBN-13: 978-0387312781

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmíel
Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá viabilitou buněk. Popisuje princip fluorescence, fluorescenční metody, fluorescenční mikroskopii a metodu barvení buněk pomocí speciálního kitu obsahující barviva calcein AM a ethidium homodimer. Dále je zde popsán program pro analýzu a vyhodnocení viability na dvou odlišných buněčných kulturách.

KLÍČOVÁ SLOVA

Viabilita buněk, fluorescence, fluorescenční mikroskopie, calcein AM, ethidium homodimer

ABSTRACT

This work discusses the viability of cells. It describes the principle of fluorescence, fluorescent methods, fluorescent microscopy and the method of dyeing of the cells with a special kit that contains calcein AM and ethidium homodimer dyes. Further it describes the program for analysis and evaluation of viability on two different cellular cultures.

KEYWORDS

Cell viability, fluorescence, fluorescence microscopy, calcein AM, ethidium homodimer

Bibliografická citace:

PELC, P. Měření viability buněk. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Měření viability buněk jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

podpis autora

Poděkování

Děkuji panu Ing. Vratislavu Čmielovi za odborné vedení, cenné rady a doporučení při tvorbě této bakalářské práce.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Obsah

1	Úvod	8
2	Viabilita buněk	8
3	Fluorescence	9
3.1	Princip fluorescence	10
3.2	Fluorescenční metody	11
3.3	Rozdělení fluoroforů	12
3.3.1	Fluorescenční značky	12
3.3.2	Fluorescenční sondy	12
3.3.3	Fluorescenční indikátory	13
4	Fluorescenční metody pro zjišťování viability buněk	13
4.1	Testy viability využívající aktivity esteráz	13
4.2	Testy viability na základě neporušenosti plazmatické membrány	14
4.3	Testy viability založené na oxidaci a redukci	14
4.4	Testy viability založené na transmembránových potenciometrických barvivech	14
4.5	Testy viability založené na buněčném pH	15
5	Mikroskopie	15
5.1	Fluorescenční mikroskop	15
5.2	Konfokální mikroskop	16
5.2.1	LSCM	17
5.2.2	TSCM	17
5.3	Srovnání fluorescenční a konfokální mikroskopie	18
5.4	Laserový rastrovací konfokální mikroskop LEICA TCS SP8	18
6	Fluorescenční barviva pro testování viability buněk	19
6.1	LIVE/DEAD BacLight kit	19
6.2	LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*	19
7	Návrh metody pro optické vyhodnocení viability buněk	21
7.1	Typ zkoumaných buněk	21
7.1.1	Krevní buňky	21
7.1.2	Fibroblasty	22
7.2	Příprava buněk	22
7.3	Metoda barvení buněk	23

7.3.1	Snímky krevních buněk.....	23
7.3.2	Snímky fibroblastů.....	25
7.4	Obrazová analýza	26
7.4.1	LabVIEW	26
7.4.2	Návrh metody	26
7.4.3	Popis blokového schématu	27
8	Realizace programu pro vlastní analýzu buněk	28
8.1	Části programu	28
8.1.1	Načtení obrazu.....	28
8.1.2	Úprava kontrastu a jasu.....	29
8.1.3	Výběr oblasti zájmu	29
8.1.4	Rozdělení barevných spekter.....	30
8.1.5	Prahování.....	31
8.1.6	Vyplnění děr	32
8.1.7	Odstranění malých objektů.....	33
8.1.8	Eliminace částic dotýkajících se okraje snímku	34
8.1.9	Počítání a zvýraznění objektů v obraze.....	35
8.1.10	Zobrazení výsledku.....	35
8.2	Uživatelské prostředí programu	37
8.3	Návod pro práci s programem.....	38
9	Třídění živých a mrtvých buněk	39
9.1	Analýza krevních buněk	39
9.2	Analýza fibroblastů	41
10	Porovnání obou buněčných kultur a zhodnocení.....	43
10.1	Průměrný počet buněk v testovaných snímcích	44
10.2	Vliv různého nastavení prahu na výsledek.....	45
10.3	Porovnání viability obou buněčných kultur	46
11	Závěr	47
12	Seznam použité literatury.....	48
13	Seznam obrázků.....	50
14	Seznam pojmů	51

1 Úvod

Tato bakalářská práce je zaměřena na měření viability buněk. Snaží se přiblížit a popsat termín viabilita, princip fluorescence, její hlavní charakteristiky a základní fluorescenční metody. Jsou zde popsány základní typy fluorescenčních mikroskopů s důrazem na rastrovací konfokální mikroskop, který byl použit pro získání sady snímků krevních buněk a fibroblastů. Pro posouzení viability jsou nezbytná speciální fluorescenční barviva. V této práci je krátce popsána metoda barvení buněk a princip zobrazení pomocí fluorescenčních barviv calceinu AM a ethidia homodimeru. Na základě navržené metody pro optické vyhodnocení viability byl realizován v prostředí LabVIEW program, jehož jednotlivé funkce jsou zde popsány a vysvětleny. S využitím vytvořeného programu byly získané snímky krevních buněk a fibroblastů podrobeny měření, roztrženy na živé a mrtvé a následně vyhodnoceny.

2 Viabilita buněk

Viabilita je definována jako schopnost buněk se množit a vykazovat metabolickou aktivitu v daných podmínkách. Jedním slovem ji můžeme vyjádřit jako životaschopnost. Je to jeden ze základních parametrů, které jsou při práci s buněčnými kulturami posuzovány. Testování životaschopnosti a cytotoxicity je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. K určování životaschopnosti se nejčastěji používají fluorescenční a kalorimetrické testy, další možností jsou testy využívající radionuklidy nebo metody působení barviv.

Pro použití světelné mikroskopie se nejčastěji používá klasické barvivo methylenová modř, naopak u fluorescenční mikroskopie využíváme značení buněk citlivými a často velmi selektivními barvivy. Mezi tato barviva patří zejména DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), akridinová oranž, propidium jodid (PI), hexidium jodid, SYTO®9. Všechna tato uvedená barviva vykazují fluorescenci, a to na různých vlnových délkách. Tato metoda je založená na selektivní propustnosti plazmatické membrány za předpokladu plně zachované funkční aktivity buňky. Membrány živých buněk mají schopnost zabránit pronikání barviva do cytoplazmy, naopak membrány mrtvých buněk nejsou schopné tomuto procesu zabránit. Rozdíly v zabarvení buněk se projeví také tím, že barvivo, které projde membránou do buňky, je chemicky změněno metabolickými procesy v cytoplazmě a ztratí schopnost fluorescence. Určení životaschopnosti buněk spočívá ve vyhodnocení počtu různě zbarvených buněk.

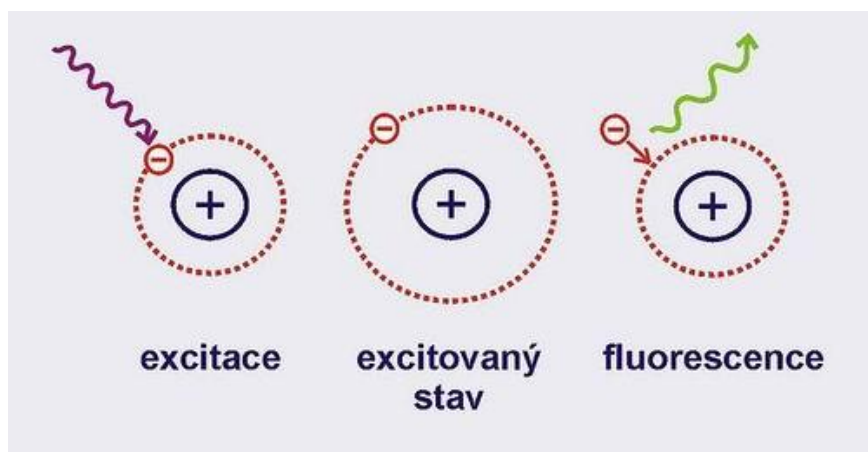
V dnešní době se začínají stále více používat směsi různých barviv, které se označují jako kity. Tyto kity dokáží během několika minut kvantitativně rozlišit živé a mrtvé buňky. Nejčastěji se používají pro rozlišení dvou bakteriálních druhů. Příkladem kitu využívající se k posuzování životaschopnosti bakteriálních buněk je kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kits. Obsahuje dvě fluorescenční barviva - SYTO® 9 a PI. Barvivo SYTO® 9

vstupuje do buňky neporušenými membránami, zatímco druhé barvivo PI prostupuje pouze poškozenými membránami bakteriálních buněk.

Dalším možným způsobem určování životaschopnosti je detekce funkčního metabolismu buněk. U této metody se zabýváme zjišťováním přítomnosti produktu metabolismu, který má jiné vlastnosti než substrát, z něhož vzniká. Principem těchto testů je tedy schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je možno následně detekovat či kvantifikovat například měřením fluorescence. [1] , [2]

3 Fluorescence

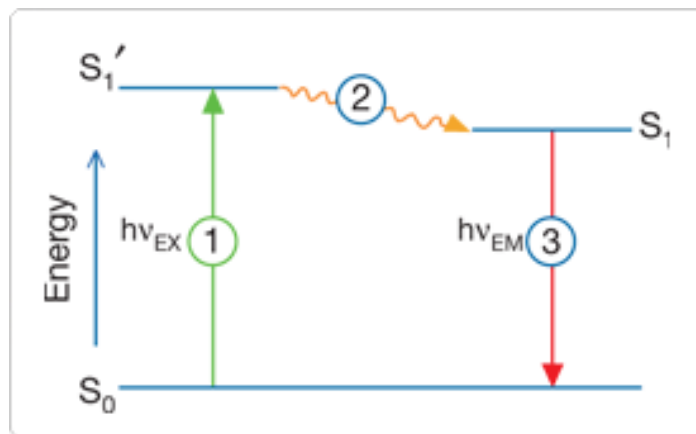
Při základním popisu fluorescence vycházíme z předpokladu, že atomy se nachází buď s minimální hodnotou energie elektronů v základním energetickém stavu, nebo ve stavech excitovaných, kdy jeden nebo více elektronů obsazují vyšší energetické hladiny. K excitaci dochází, jestliže atomu dodáme energii. Pokud některý elektron z vyšší energetické hladiny obsadí skokem volný energetický stav, dochází k návratu atomu ze stavu excitovaného do stavu základního. Atom při tomto procesu vyzáří kvantum elektromagnetického záření. Elektromagnetické záření vznikající při přechodu z metastabilního do základního stavu je označováno jako luminiscence. Trvá-li metastabilní stav krátce, hovoříme obvykle o fluorescenci, trvá-li delší dobu, hovoříme o fosforescenci. [3]



Obr. 1: Excitace a fluorescence. [21]

3.1 Princip fluorescence

Fluorescence je nejčastěji charakteristická pro fluorescenční barviva nebo fluorofory, které obsahují aromatické uhlovodíky nebo heterocykly. Je to proces skládající se ze tří základních stupňů, které popisuje Jablonského diagram [Obr. 2].



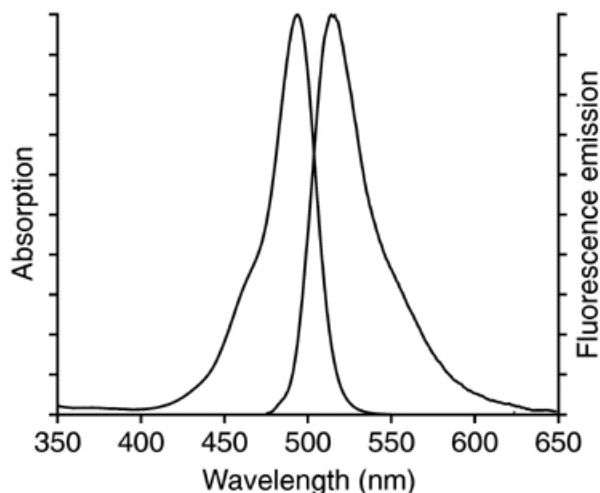
Obr. 2: Princip fluorescence. [8]

První stupeň - buzení. Fluorofor je nejprve ozářen elektromagnetickým zářením z externího zdroje o určité vlnové délce. Zdrojem záření nejčastěji bývá žárovka nebo laser. Po vstřebání fotonu o energii $h\nu_{\text{EX}}$ se atomy fluoroforu dostanou do excitovaného stavu S_1 .

Druhý stupeň – excitovaný stav. Excitovaný stav trvá určitou dobu, nejčastěji 1-10 nanosekund. Během této doby fluorofor prochází mnoha konformačními změnami, a také interaguje s jeho molekulovým prostředím. Část absorbované energie předá molekula ve formě tepelné energie svému okolí (na diagramu znázorněno vlnovkou).

Třetí stupeň – emise. Zbylá energie $h\nu_{\text{EM}}$ je vyzářena formou fluorescenčního fotonu a fluorofor se vrací do svého základního stavu S_0 . Vzhledem ke ztrátě energie během excitovaného stavu je energie tohoto fotonu nižší, ale s delší vlnovou délkou než u budícího fotonu. Rozdíl v energii nebo vlnové délce ($h\nu_{\text{EX}} - h\nu_{\text{EM}}$) se nazývá Stokesův posun. Stokesův posun má zásadní význam pro citlivost fluorescenčních technik. [8]

Excitace a emise hrají důležitou roli u fluorescenčních barviv, pro každé barvivo je charakteristické určité excitační a emisní spektrum. Na Obr. 3 je ukázka excitačního a emisního spektra calceinu AM, který se projevuje silně zelenou fluorescencí kolem 515 nm.



Obr. 3: Excitační a emisní spektrum Calceinu AM (při pH 9,0). [22]

Mezi hlavní charakteristiky fluorescence patří:

1. **intenzita** – charakterizuje počet fotonů, které procházejí v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
2. **spektrální složení** – je spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
3. **polarizace** – je směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
4. **dobu dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
5. **koherenční vlastnosti** – jsou vztahy mezi fázemi světelných vln [4]

3.2 Fluorescenční metody

Fluorescenční metody používáme především tehdy, když potřebujeme zviditelnit určité látky a struktury v buňce. Některé fluorofory (DAPI, ethidium bromid, propidium jodid) se sami o sobě vážou na určité molekuly, jejich použití nazýváme přímá fluorescence. Pro většinu struktur v buňce ovšem neexistuje fluorofor, který by se na ně specificky vázal. V takovém případě se používají speciální protilátky s navázanými fluorofory, které se specificky vážou na téměř jakýkoli druh molekuly. Tato metoda se nazývá přímá imunofluorescence. Protože máme k dispozici celé barevné spektrum fluoroforů, můžeme zviditelnit více různých struktur v téže buňce a sledovat tak jejich vzájemnou lokalizaci. [7]

3.3 Rozdělení fluoroforů

Fluorofory jsou látky, jejichž podstatou je absorpce světla určité vlnové délky a následná schopnost emitovat světlo o delší vlnové délce. Můžeme je rozdělit do dvou základních tříd, na vnitřní fluorofory schopné vlastní fluorescence, které se v přírodě vyskytují přirozeně a na vnější fluorofory, které jsou přidávány ke vzorkům.

Vlastní fluorescence buněk je dána především proteiny, pro které je charakteristická schopnost fluoreskovat v ultrafialové oblasti spektra. Mezi hlavní proteinové fluorofory patří aromatické aminokyseliny tryptofan (Try), tyrozin (Tyr) a fenylalanin (Phe). Jejich absorpční pás leží mezi 240 a 300 nm. Vlastní fluorescenci můžeme dále nalézt u cytochromů, hemoglobinu, myoglobinu a chlorofylu, kde probíhá ve viditelné oblasti spektra.

Nevlastní fluorescence jsou schopné vnější fluorofory, které se přidávají ke studovanému vzorku. Pokud se ke studovanému vzorku vážou kovalentně, nazývají se fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentně, jedná se fluorescenční sondy. [6]

3.3.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky se nejčastěji používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. K nejznámějším fluorescenčním značkám patří fluoresceinizothiokynát (FITC) a tetrametylrhodaminizothiokyanát (TRITC), které se používají v imunofluorescenčních metodách.

3.3.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy mají časté využití v analytické chemii, biologii a medicíně. Používají se ve fluorescenční spektroskopii, fluorescenční mikroskopii jako sondy pro polaritu prostředí nebo jako membránové sondy. V dnešní době jsou známy tisíce sond. Testování viability a cytotoxicity je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci.

Jako důležitá sonda životnosti buněk slouží především díky svému vysokému zachytu v živých buňkách a silné fluorescenci calcein AM. Podobným typem takových sond jsou ethidium bromid a propidium jodid - barviva pro nukleové kyseliny, která neprostupují membránou živých buněk. Mezi sondy životnosti dále řadíme takové sondy, které jsou aktivními buňkami oxidovány nebo redukovány, sondy citlivé na transmembránový potenciál, pH nebo Ca^{2+} .

3.3.3 Fluorescenční indikátory

Mezi fluorescenční indikátory řadíme takové fluorofory, které jsou spektrálně citlivé na určité látky. Tyto indikátory vykazují spektrální posuv v závislosti na přítomnosti určité látky, nebo vykazují zvýšení intenzity fluorescence bez spektrálního posuvu v přítomnosti dané látky. Příkladem může být například Fura-2, což je indikátor vykazující spektrální posuv v přítomnosti Ca^{2+} a Calcium green naopak vykazuje zvýšenou intenzitu fluorescence bez spektrálního posuvu v přítomnosti Ca^{2+} . [6]

4 Fluorescenční metody pro zjišťování viability buněk

Testy buněčné životaschopnosti založené na fluorescenčních metodách nabízejí mnoho výhod oproti tradičním kalorimetrickým testům. Mezi tyto fluorescenční metody řadíme zjišťování viability na fluorescenčním mikroskopu, fluorimetru nebo průtokovém cytometru.

4.1 Testy viability využívající aktivity esteráz

Do této skupiny patří fluorogenní esterázové substráty, calcein AM a různé fluorescenční diacetátové deriváty, které jsou pasivně vloženy do buněk a slouží zde jako sondy, jež měří jak enzymatickou aktivitu, tak membránovou integritu. Jako elektricky neutrální či téměř neutrální molekuly se tyto sondy volně difundují do většiny buněk. Jakmile se dostanou dovnitř buňky, jsou tyto nefluorescenční sondy přeměněny nespecifickými intracelulárními esterázami na fluorescenční produkty nesoucí elektrický náboj. Díky tomu jsou zadržovány buňkami s neporušenými plazmatickými membránami.

Při výběru vhodné sondy je důležité dbát na schopnost průniku do buněk a následné zadržování v intracelulárním prostoru. Jako užitečná fluorescenční sonda se často využívá calcein AM. Vystupuje jako první ukazatel životaschopnosti buněk v důsledku své vynikající schopnosti zadržovat se v buňce a relativní necitlivosti jeho fluorescence na pH. Dříve se také často využíval fluorescein diacetát (FDA), avšak jeho nevýhodou je rychlý únik z buněk, a proto se od něj už dnes upouští. V dnešní době se často využívá diacetát carboxyfluorescein (CFDA), který byl původně použit k měření intracelulárního pH, ale brzy byl upraven pro použití jako ukazatel viability buněk. Výhodou CFDA je jeho schopnost dobře se zadržovat v buňce po hydrolyze. [9] , [10]

4.2 Testy viability na základě neporušenosti plazmatické membrány

Tyto testy jsou založeny na schopnosti neporušené plazmatické membrány nepropouštět určitá barviva do nitra buňky. V případě poškození plazmatické membrány se tato barviva navážou na vnitřní strukturu buňky a dojde k zesílení fluorescence. Většina těchto barviv se v buňce váže na nukleové kyseliny, a proto je lze použít u většiny typů buněk. Příkladem je barvivo SYTOX Green, což je vysoce afinitní sonda, která snadno proniká do eukaryotických buněk, a to jak gram-pozitivních, tak gram-negativních bakterií s oslabenými plazmatickými membránami. Plazmatické membrány živých buněk toto barvivo zcela vyloučí. Po krátké inkubaci barviva SYTOX s nukleovými kyselinami začnou mrtvé bakterie jasně zeleně fluoreskovat v části spektra kolem 488 nm. Dalším barvivem, které bývá touto metodou využíváno, je například propidium bromid. [9] , [10]

4.3 Testy viability založené na oxidaci a redukcii

U buněk aerobních organismů jsou zastoupeny reaktivní formy kyslíku (ROS) v určitém kontrolovaném poměru. Příkladem reaktivních forem kyslíku jsou kyslíkové ionty a peroxidy. ROS forma je přírodní vedlejší produkt normálního metabolismu kyslíku v buňce a hraje významnou roli v buněčné signalizaci. Za podmínek oxidativního stresu je ROS produkce výrazně vzrostlá, což vede k následné změně membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Oxidační poškození těchto molekul je spojeno se stárnutím a s různými patologickými příhodami. Metabolicky aktivní buňky mohou oxidovat nebo redukovat sondy, díky kterým můžeme hodnotit míru životaschopnosti a celkové buněčné zdraví. Jako příklad lze uvést dluorescein, rhodamin a další barvy, které mohou být chemicky změněny na bezbarvé nefluorescenční LEUCO barviva. Tyto "dihydro" deriváty se snadno oxidují zpět na mateřská barviva za pomoci některé z forem reaktivních kyslíkových radikálů. [9]

4.4 Testy viability založené na transmembránových potenciometrických barvivech

Životaschopné buňky obsahují soubor iontových pump a kanálů, které udržují intracelulární koncentraci iontů a transmembránový potenciál. Aktivní údržba iontového gradientu končí, když buňka umírá. Pro zjišťování transmembránového potenciálu existuje celá řada sond. Jedná se o distribuční sondy, které volně procházejí plazmatickou membránou do buněk a hromadí se v nich v závislosti na jejich náboji. Příkladem může být kationická sonda rhodamin 123, která se používá pro posouzení životaschopnosti lymfocytů. Další potenciálně citlivá barviva, jež se ukázala jako užitečná pro posuzování životaschopnosti, jsou

pro rychlou odezvu barvivo styryl a pro pomalou reakci oxono. Využití potenciometrických sond k detekci viability je poměrně komplikované, neboť koncentrace barviva je v intracelulárním prostoru ovlivněna nejen velikostí membránového potenciálu, ale také velikostí buněk, přítomností vazebných míst a činností transmembránových pump. [9] , [10]

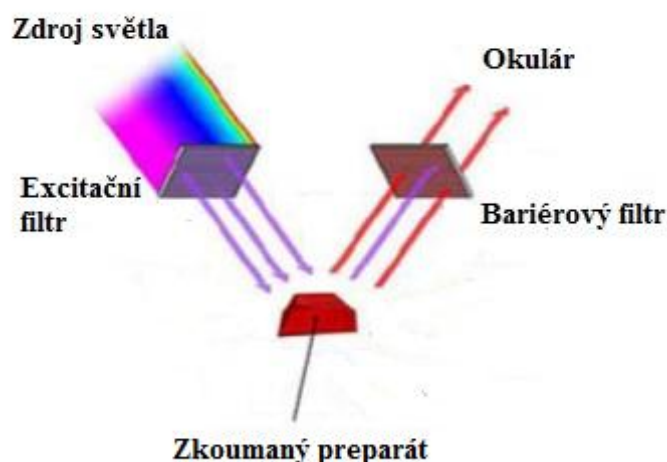
4.5 Testy viability založené na buněčném pH

Všechny živé buňky udržují vnitřní prostředí o stálé hodnotě pH. K měření intracelulárního pH se využívají speciální fluorescenční sondy, které mají pH-dependentní excitační a emisní spektrum. V určitém rozmezí hodnot pH dochází k posunu jednotlivých maxim, nebo ke změně intenzity. Tyto metody se používají minimálně, ukázkou sond využívajících tuto metodu jsou fluorescein nebo karboxyfluorescein. [10]

5 Mikroskopie

5.1 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie je velmi cenným nástrojem pro studium buněk a buněčných částí mikroorganismů. Tento mikroskop je velmi podobný klasickému optickému mikroskopu, jeho odlišností je pouze doplnění o velice silný zdroj světla a dva typy filtrů. Použitím vhodných fluoroforů je možné rozlišit jednotlivé buněčné prvky a také rozlišit živé a mrtvé buňky. Fluorescenční mikroskopy využívají schopnost některých látek absorbovat světlo o určité vlnové délce a toto světlo následně emitovat jako viditelné světlo o delší vlnové délce. Většinou se využívá dlouhovlnného ultrafialového záření a přilehlé oblasti viditelného spektra emitovaného halogenovými lampami. Ultrafialovému světlu musí být přizpůsobena optika kondenzoru, zbytek optického systému je stejný jako u běžného optického mikroskopu. Přidány jsou pouze dva filtry - bariérový chránící lidský zrak před zbytkovým UV zářením, který je umístěn mezi okem a vzorkem, a excitační filtr, který je umístěn mezi zdrojem světla a vzorkem a umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách.



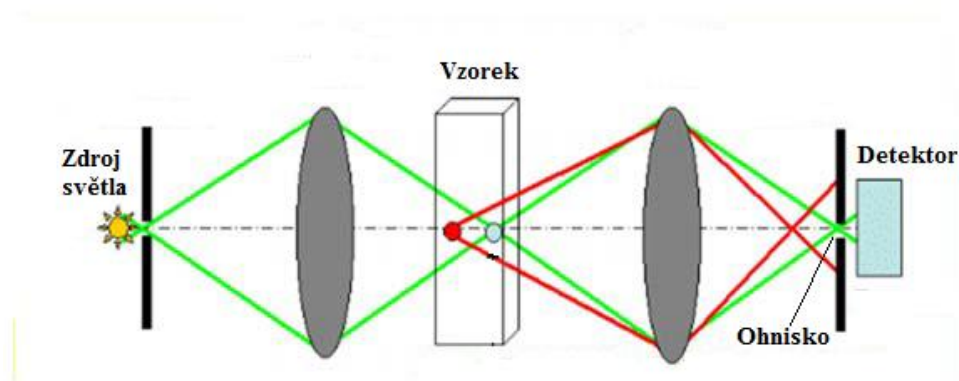
Obr. 4: Excitační a bariérový filtr. [13]

Fluorescenční mikroskopie je dnes nejpoužívanější metodou pro detekci specifických molekul, jako jsou proteiny, lipidy nebo polysacharidy bez nutnosti jejich zničení. Nevýhodou této mikroskopie je fakt, že okem, popřípadě kamerou při sebelepším zaostření, detekujeme též část světelného signálu pod a nad rovinou ostrosti. [3] , [11] , [12]

5.2 Konfokální mikroskop

Pro pozorování živých buněk se často používá modifikace fluorescenčního mikroskopu zvaná konfokální mikroskopie. Základní rozdíl mezi fluorescenčním a konfokálním mikroskopem je rozlišovací schopnost. Nevýhodou této metody je to, že pro získání silných signálů potřebujeme mimořádně silný zdroj světla typu laser. Dále je potřeba speciální technologie pro detekce fotonů z roviny ostrosti. Tyto fakta se odrážejí na ceně přístroje, která je několikanásobně vyšší než u klasického fluorescenčního mikroskopu. [12]

Světlo z fokálního bodu čočky objektivu dává ostrý obraz, naopak světlo z jiného bodu je také zobrazeno čočkami mikroskopu, ale jeho obraz není v tomto případě ostrý. Konfokální mikroskop používá takzvaný "pinhole", což je bodová clonka, která odfiltruje neostrý signál. Pinhole je konjugován s fokálním bodem čočky. Pokud je pinhole menší, ztrácíme užitečné světlo, pokud je větší, proniká více světla mimo ohnisko. Z uspořádání mikroskopu vyplývá, že v jednom kroku získáváme informaci pouze o jednom bodu, a proto pro získání obrazu z celé roviny je nutné vytvořit sérii snímků. [13]



Obr. 5: Bodové ohnisko konfokálního mikroskopu. [13]

Podle mechanismu rastrování rozlišujeme dva základní typy konfokálních mikroskopů.

5.2.1 LSCM

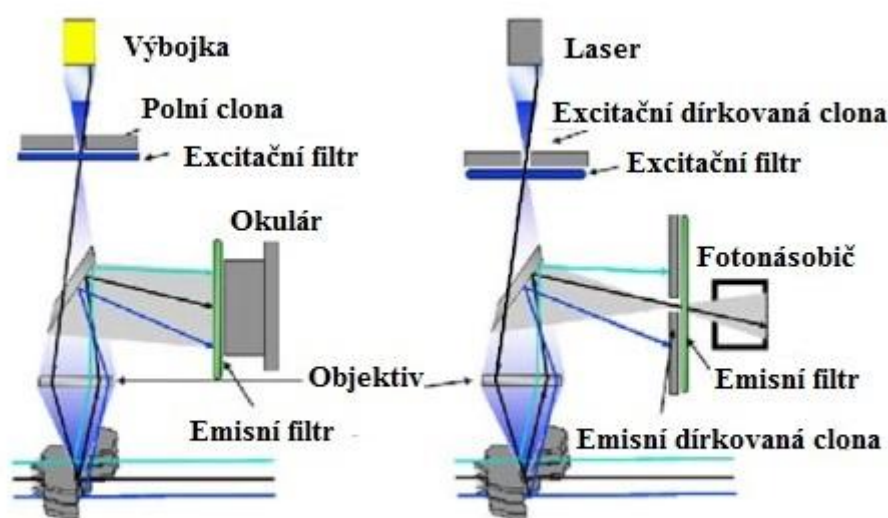
LSCM (Laser Scanning Confocal Microscope) = Laserový rastrovací konfokální mikroskop. Tento typ obsahuje skenovací zařízení, které zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku. Obraz celé zaostřené roviny je pak získán rastrováním bod po bodu pomocí objektivu, který se posouvá nad vzorkem. Osvětlení je realizováno bodovým zdrojem světla, většinou laserovým paprskem fokusovaným na clonku. Dále obsahuje excitační filtr, dichroické zrcátko, emisní filtr a detektor, což je fotonásobič s připojeným počítačem. Při analýze obrazu je zobrazen pouze jeden bod ze vzorku. Skenováním bod po bodu je naskenován celý vzorek v různých optických rovinách. Toto skenování je řízeno počítačem, který sestaví velmi čistý 3D obraz, který umožní zobrazení vzorku z libovolné strany. Laserového skenování konfokální mikroskop (LSCM) je v současné době nejpoužívanější pro biomedicínské výzkumné aplikace. [13] , [14]

5.2.2 TSCM

TSCM (Tandem Scanning Confocal Microscope) = mikroskop s rotujícím diskem. Tento typ obsahuje místo skenujícího zařízení rotující Nipkowův kotouč, který je tvořen mnoha navzájem oddělenými clonkami. Vzorek je většinou pozorován v reálném čase okulárem nebo chlazenou CCD kamerou. [13]

5.3 Srovnání fluorescenční a konfokální mikroskopie

Fluorescenční mikroskop předpokládá nekonečně malou tloušťku vzorku, při zkoumání silných vzorků je kvalita zobrazení nepříznivě ovlivňována překrýváním obrazu roviny, do níž je mikroskop právě zaostřen. Naopak konfokální mikroskop má vyšší rozlišovací schopnost danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu, přítomnost pinhole eliminuje neostrý signál. Dále umožňuje tomografické 3D rekonstrukce obrazu. Nevýhodou je 5x až 10x vyšší pořizovací cena a nutnost použití silného zdroje světla typu laseru a speciální technologii detekce fotonů. U fluorescenčního mikroskopu je jako zdroj světla použita rtuťová výbojka, výhodou je podstatně nižší pořizovací cena. [12]



Obr. 6: Fluorescenční a konfokální mikroskop. [13]

5.4 Laserový rastrovací konfokální mikroskop LEICA TCS SP8

Mikroskop Leica TCS SP8 je konfokální mikroskop, který byl navržen pro vysokou rychlost a optimální účinnost fotonu. Všechny jeho optické komponenty jsou sladěny tak, aby vedly ke správnému kontrastu obrazu a k zobrazení životaschopných buněk ve sledovaném vzorku. K detekci je použit citlivý vysokorychlostní snímací systém, který umožňuje vytvořit až 428 snímků za sekundu a velké zorné pole, což umožňuje využití i u nejnáročnějších vzorků.

Konfokální mikroskop Leica je vybaven FOV skenerem (Field Of View - Zorné pole), který umožní zobrazit všechny exempláře v jednom záběru a Tandemovým skenerem (FOV kombinovaný s rezonančním skenerem), který je vhodný pro vysokorychlostní FRAP experimenty s rozpustnými proteiny. Dále je vybaven plynovým laserem, což je

monochromatický zdroj světla ideální pro spektrální separaci, tuhým laserem a bílým laserem, který umožní komplexní spektroskopické zobrazení. Přístroj je vybaven CS2 a IRAPO objektivy a skenovací optiku specializovanou na konkrétní aplikace.

Kombinace vysoce výkonné optiky, rychlého konfokálního skeneru a nejcitlivějšího detekčního systému se Leica TCS SP8 řadí ke špičkám na trhu. TCS SP8 má k dispozici různé volitelné příslušenství, které umožňuje široké spektrum zobrazovacích aplikací pro různé potřeby výzkumu. [15]

6 Fluorescenční barviva pro testování viability buněk

Jak již bylo zmíněno výše, ke stanovení podílu živých a mrtvých buněk slouží celá řada specifických barviv. Kromě často používaných fluorogenních substrátových esteráz, jako fluorescein diacetát (FDA) nebo calcein AM, barviv pro nukleové kyseliny - SYTOX Green nebo TOTO a dalších fluorescenčních sond, ať už založených na transmembránovém potenciálu, pH, Ca^{2+} nebo oxidaci a redukci, existují také ještě celé sady pro testování viability.

6.1 LIVE/DEAD BacLight kit

Příkladem takové sady může být kit LIVE/DEAD, který je schopen jednoduše rozeznat živé a mrtvé buňky. Sada je založena na kombinaci dvou fluorescenčních barviv s odlišnou schopností průniku do cytoplasmatické membrány v závislosti na její neporušenosti. Obě tyto fluorescenční barviva mají specifickou vazbu na DNA. Příkladem konkrétního kitu je například LIVE/DEAD BacLight kit, který obsahuje fluorescenční barviva SYTO 9 a propidium jodid. Fluorochrom SYTO9 má zelenou fluorescenci a prochází jak porušenými tak i neporušenými membránami všech bakteriálních buněk. Naopak Propidium jodid - PI, pro který je charakteristická červená fluorescence, se dostane jen do mikroorganismů s porušenou membránou. Při kombinaci obou těchto fluorochromů pak buňky s neporušenou membránou fluoreskují zeleně a označujeme je tedy za živé, naopak mikroorganismy s porušenou membránou, které fluoreskují červeně, považujeme za mrtvé. [16]

6.2 LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*

Dalším kitem je například LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*, což je kit určený pro hodnocení savčích buněk. Základem tohoto kitu jsou dvě

fluorescenční barviva calcein AM a ethidium homodimer (EthD-1). Princip tohoto kitu je velmi podobný předchozímu kitu. Calcein AM je barvivo, které za standardních podmínek nefluoreskuje, vlivem všudypřítomných intracelulárních esteráz, však dochází k jeho rozštěpení na zeleně fluoreskující calcein, který je v živých buňkách dobře zadržován. Naopak ethidium homodimer, pro který je charakteristická červená fluorescence, prochází pouze poškozenou membránou mrtvých buněk a po vazbě na DNA se jeho fluorescence ještě několikanásobně zvýší. Tento typ je vhodný pro použití u většiny eukaryontních buněk, nepoužívá se však u bakterií nebo kvasinek.

Relativní počet živých a mrtvých buněk můžeme vyjádřit v procentech z celkového počtu buněk. Mrtvé buňky se vyznačuje intenzivní fluorescencí při 600 nm a slabou fluorescencí kolem 530 nm.

Procento živých buněk lze vypočítat z fluorescence jako:

$$(1) \quad \% \text{ Živých buněk} = \frac{F(530)_{sam} - F(530)_{min}}{F(530)_{max} - F(530)_{min}} \times 100\%$$

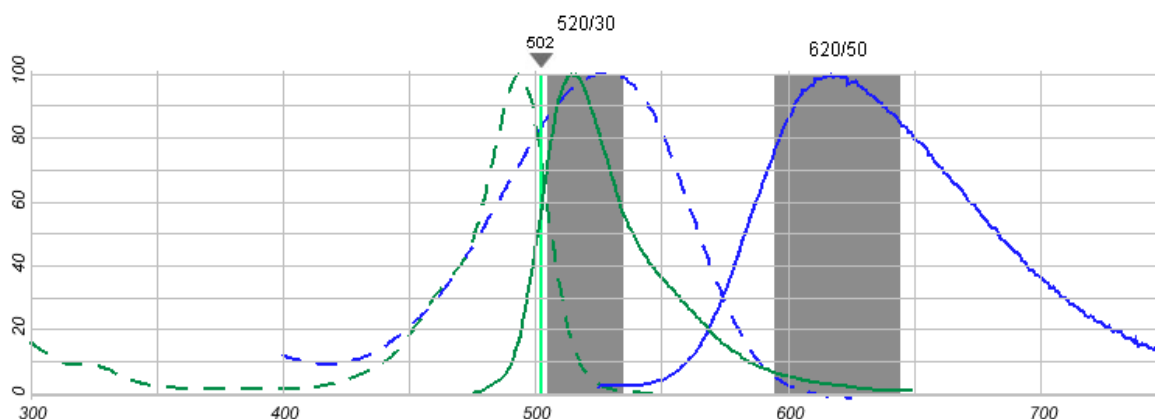
Procento mrtvých buněk lze vypočítat z fluorescence jako:

$$(2) \quad \% \text{ Mrtvých buněk} = \frac{F(645)_{sam} - F(645)_{min}}{F(645)_{max} - F(645)_{min}} \times 100\%$$

- $F(530)_{sam}$ je fluorescence na 530 nm v experimentálním buněčném vzorku označeném barvivem EthD-1 a calceinem AM.
- $F(530)_{min}$ je fluorescence na 530 nm, kde jsou všechny nebo téměř všechny buňky živé a jsou označeny pouze barvivem EthD-1.
- $F(530)_{max}$ je fluorescence na 530 nm, kde jsou všechny nebo téměř všechny buňky živé a jsou označeny pouze barvivem calcein AM.
- $F(645)_{sam}$ je fluorescence na 645 nm v experimentálním buněčném vzorku označeném barvivem EthD-1 a calceinem AM.
- $F(645)_{min}$ je fluorescence na 645 nm, kde jsou všechny buňky mrtvé a jsou označeny pouze barvivem calcein AM.
- $F(645)_{max}$ je fluorescence na 645 nm, kde jsou všechny buňky mrtvé a jsou označeny pouze barvivem EthD-1.

[5], [17]

Na obrázku níže [Obr. 7] můžeme vidět excitační (přerušovaná křivka) a emisní spektra obou použitých barviv. Calcein je zobrazen zelenou křivkou, naopak modrou křivkou je zobrazen ethidium homodimer.



Obr. 7: Excitační a emisní spektra použitých barviv. [23]

7 Návrh metody pro optické vyhodnocení viability buněk

7.1 Typ zkoumaných buněk

K měření viability pomocí kitu LIVE/DEAD jsem měl k dispozici dva typy buněk. Prvním typem byly krevní buňky z velmi čerstvého vzorku, druhým typem buněk byly fibroblasty, které měly obsahovat více mrtvých buněk.

7.1.1 Krevní buňky

Všechny krevní buňky se tvoří z nediferencovaných krevních buněk kostní dřeně. Následným dělením kmenových buněk vznikne celá řada zralých krevních buněk, které mají vlastní specifickou funkci. Základní dělení buněk je na erytrocyty, trombocyty a leukocyty, dělících se na granulocyty a agranulocyty:

Neutrofilní granulocyty jsou zralé buňky, na rozdíl od nezralých neutrofilních granulocytů mají málo endoplazmatického retikula, malý počet mitochondrií a relativně malý Golgiho aparát. Obsahují většinou 500-1000 specifických granúl, často ve tvaru podobném rýži. Neutrofilní granulocyty slouží k fagocytóze cizorodých látek a dále se často uplatňují při zánětlivých reakcích.

Eozinofilní granulocyty jsou bílé krvinky, které obsahují kolem 200 zrn. Uvnitř zrn je enzymatická výbava eozinofilu a jeden, nebo více krystalků. Počet eozinofilních granulocytů stoupá při alergických reakcích.

Bazofilní granulocyty jsou leukocyty, jejichž zrna mají jemné vrstevnaté uspořádání. Vznikají patrně z Golgiho aparátu. Díky tomu, že obsahují heparin a histamin, mají antikoagulační účinky. Působí protisrážlivě a pomáhají rozšířit cévy.

Lymfocyty mají jádro s jadérkem, které je viditelné u zralých forem jen po speciálním barvení. Mitochondrie jsou u nich ojedinělé. Podílí se na produkci protilátek a buněčné imunitě uchovávají informace o antigenech.

Monocyty jsou bílé krvinky, které mají jádro méně členěné než ostatní krevní buňky. Jejich cytoplazma obsahuje více mitochondrií a jemná azurofilní granula. Mají schopnost fagocytózy.

Neúplné buňky jsou buněčné útvary ohraničené cytoplazmatickou membránou, které nemají jádro a chybí v nich některé orgány přítomné v nezralých vývojových stádiích. Mezi neúplné buňky řadíme erytrocyty a krevní destičky. Erytrocyty jsou bezjaderné buňky, které obsahují hemoglobin. Jejich hlavní funkcí je přenos kyslíku a oxidu uhličitého. Hlavní význam krevních destiček je funkce při zástavě krvácení. [18]

7.1.2 Fibroblasty

Fibroblasty byly poprvé popsány na konci 19. století. Jsou to buňky vazivové tkáně a tvoří jednu z hlavních složek buněčného tkáňového mikroprostředí. Jejich základním úkolem je udržování homeostázy a celistvosti zdravých buněk. Dále se aktivně podílí při procesech tkáňové reparace, při procesech hojení a jizvení tkáně. Fibroblasty jsou štíhlé buňky hvězdčovitěho tvaru s charakteristickými uniformními jádry a jemným chromatinem. [20]

7.2 Příprava buněk

Měřené buňky byly odebrány z krve pacientů ve Fakultní nemocnici v Brně. Krev po odběru podléhá rychlé koagulaci, a proto je nutné použít vhodného antikoagulačního činidla. K získaným vzorkům se přidávají látky jako heparin, citrát, EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid), ACD (Acid Citrate Dextrose) nebo oxalát. Každá z těchto látek má odlišný mechanismus působení, je tedy důležité určit, která z nich je pro konkrétní výzkum nejvhodnější. Pro kultivované buňky je typické, že se s narůstajícím časem rapidně mění procentuální zastoupení jednotlivých typů buněk uvnitř kultury. Po odběru krve

je proto nutné co nejdříve vyseparovat ze získaného vzorku jen tu část buněk, která je pro daný výzkum potřebná. Tímto se zabrání nežádoucímu nárůstu populace nepotřebných buněk. K separaci jednotlivých typů krevních buněk se používá řada metod. Mezi nejčastější řadíme například separace pomocí média využívajícího hustotní gradient, centrifugaci nebo další metody využívající rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti separovaných buněk. Zde patří metody založené na rozdílné velikosti buněk, rozdílné reakci na změnu osmotického tlaku nebo schopnost monocytů a makrofágů přilnout na povrch plastů.

V případě fibroblastů je nejjednodušší odběr kožních buněk. Tkáň se lokálně znecitliví a vydezinfikuje etanolem. Po odpaření etanolu se odebere podkožní tkáň zasahující až do šráry. K tomu, aby bylo možné fibroblasty dostatečně kultivovat, je zapotřebí odebrat minimálně 5x3x2 mm tkáně. Z odebrané tkáně se v laboratoři izolují konkrétní fibroblasty. [19]

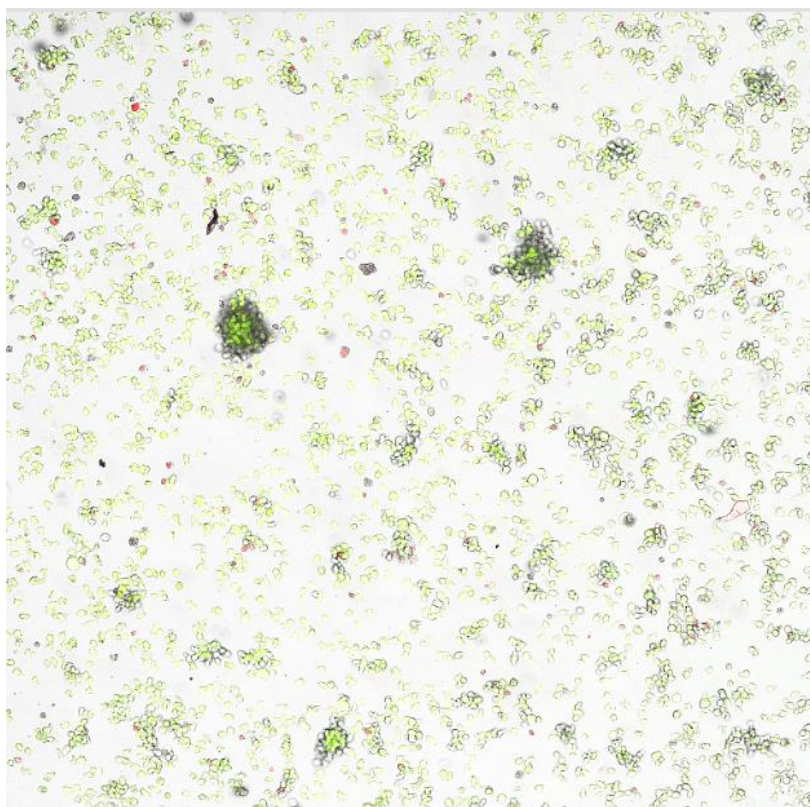
7.3 Metoda barvení buněk

K barvení buněk byl použit komerčně dostupný kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. Tento kit je tvořen dvěma různými barviv, calceinem AM a ethidium homodimerem. Výhodou použitého kitu oproti alternativním metodám je vyšší rychlost, citlivost, bezpečnost a nižší nákladnost. Do zkumavky obsahující zhruba 0,5 ml buněk se postupně přidá 1,5 µl calceinu AM a 1,5 µl ethidium homodimeru. Zbytek zkumavky se doplní fyziologickým roztokem. K tomu, aby se použítá barviva správně navázala, je nutné nechat zkumavku 30 – 45 minut inkubovat.

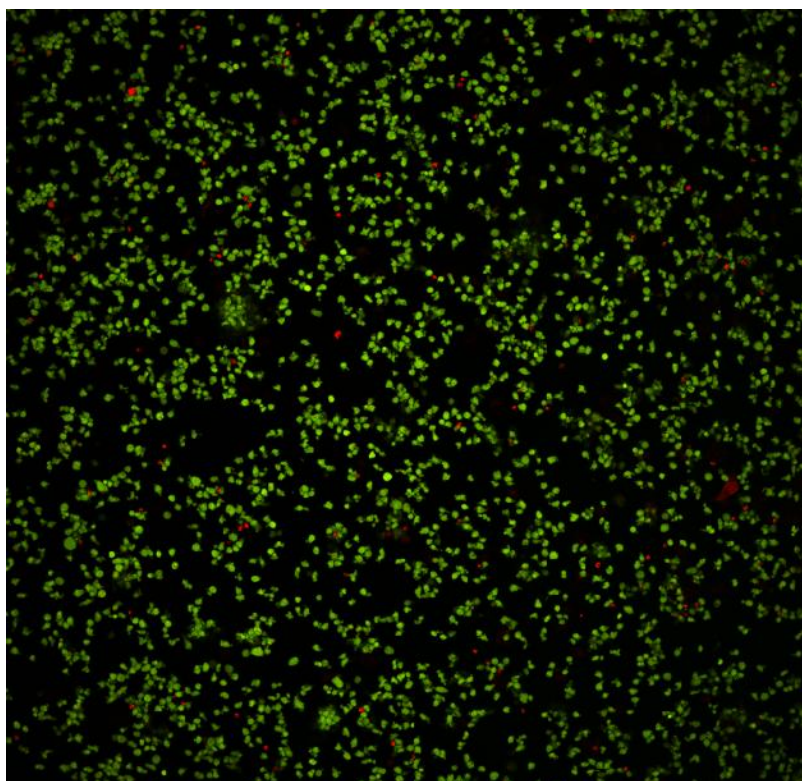
Po inkubaci je možné testovaný vzorek umístit na průhledné sklíčko a začít snímat mikroskopem. Vzhledem k tomu, že barvivo podléhá fluorescenci až po interakci s buněčnou strukturou, je úroveň pozadí snímku nízká. Při přípravě preparátu je důležité zvolit vhodnou koncentraci obou barviv. Doporučuje se používat spíše nižší koncentrace, aby nedošlo k přebarvení živých buněk na mrtvé nebo naopak. Správná koncentrace se liší v závislosti na zkoumaném typu buňky, a proto je vhodné připravit si více preparátů o různých koncentracích a zkušebním snímkem vybrat ten s nejvhodnější koncentrací. [5] , [17]

7.3.1 Snímky krevních buněk

Na následujících snímcích jsou zobrazeny krevní buňky po barvení kitem, které byly pořízené konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8. První snímek zobrazuje fluoreskující buňky současně s průchozím světlem, na druhém snímku je zobrazena pouze samostatná fluorescence živých a mrtvých buněk.



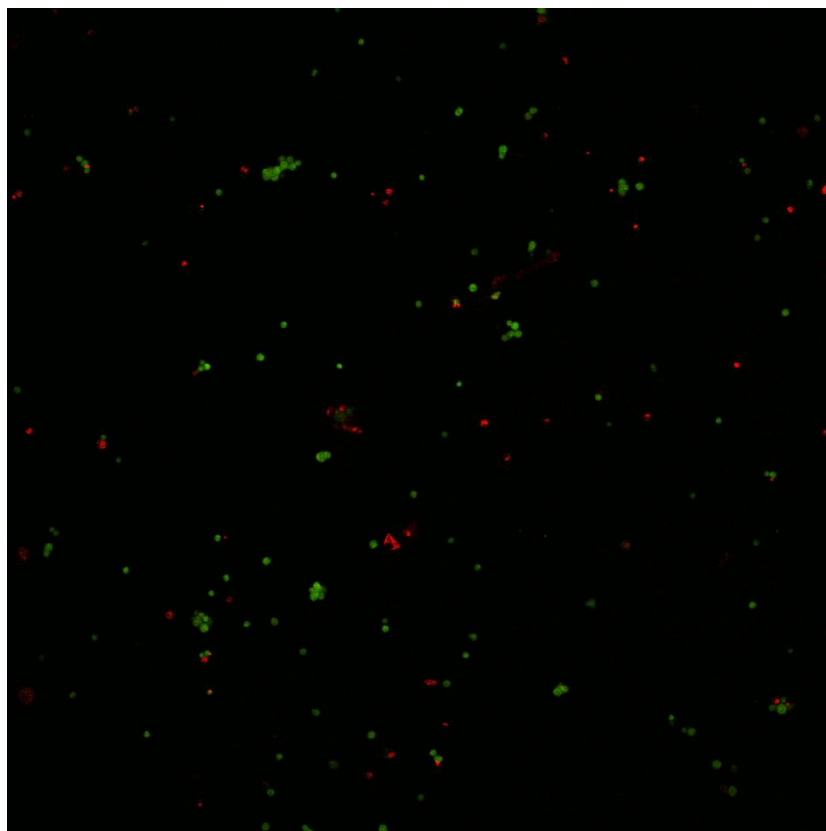
Obr. 8: Snímek zobrazující současně fluorescenci a průchozí světlo (Na tomto snímku jsou zobrazeny fluoreskující i nefluoreskující buňky a zároveň jejich struktura). Snímek byl pořízen mikroskopem Leica TCS SP8.



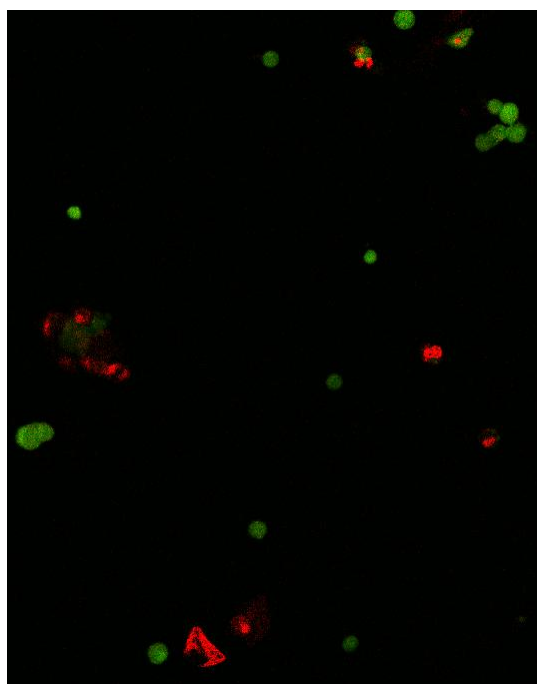
Obr. 9: Obarvené buňky s fluorescencí. Snímek byl pořízen mikroskopem Leica TCS SP8.

7.3.2 Snímky fibroblastů

Na snímcích níže je zobrazena fluorescence obarvených buněk fibroblastů. První snímek zobrazuje celé zorné pole mikroskopu, druhý snímek se zaměřuje na detail.



Obr. 10: Obarvené buňky s fluorescencí. Snímek byl pořízen mikroskopem Leica TCS SP8.



Obr. 11: Detail fluorescence fibroblastů. Snímek byl pořízen mikroskopem Leica TCS SP8.

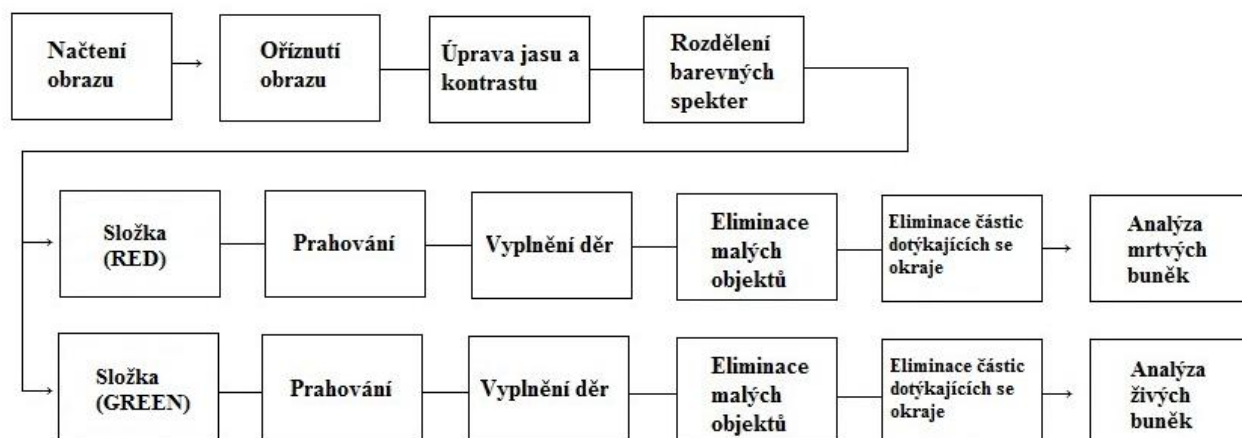
7.4 Obrazová analýza

Ze získaných snímků je nutné stanovit viabilitu, tedy statisticky určit zastoupení živých a mrtvých buněk. Navržený program by měl počítat buňky v obraze jako jednotlivé objekty v prostoru a zobrazit jejich počet.

7.4.1 LabVIEW

K realizaci programu pro obrazovou analýzu nasnímaných vzorků jsem zvolil grafické programovací prostředí LabVIEW. Hlavní výhodou tohoto programu je, že umožňuje nahradit celou řadu hardwarových přístrojů pomocí jejich virtuální realizace. Celé prostředí je řešeno graficky, a proto není nutné ovládat speciální programovací jazyk. Při práci uživatel spojuje jednotlivé specifické funkční bloky postupně za sebe, podobně jako při tvorbě diagramu. Pro realizaci programu určeného na obrazové zpracování je nutné standardní verzi LabVIEW dovybavit speciálními moduly pro obrazové zpracování IMAQ a VISION.

7.4.2 Návrh metody



Obr. 12: Návrh principu metody stanovení viability.

7.4.3 Popis blokového schématu

Načtení obrazu – prvním krokem je načtení snímku z konfokálního mikroskopu do počítače. Tedy vstupní analogový signál je převeden do diskrétní podoby a ve formě digitálního obrazu uložen.

Oříznutí obrazu – následuje výběr optimální části snímku, kdy se vyřízne vybraná část. Tímto si zvolíme tu část obrazu, která nás bude zajímat a nepotřebná část snímku je odstraněna.

Úprava jasů a kontrastu – v této části se snažíme najít co možná nejvhodnější zobrazení snímku pro následné vyhodnocení. Tímto předzpracováním chceme docílit zvýraznění, nebo potlačení určitých rysů v obraze, které budou dále důležité.

Rozdělení barevných spekter – načtený obraz je ve formátu RGB. Pro detekci viability nás zajímají dva kanály Red a Green. Červená složka slouží pro detekci mrtvých buněk, naopak zelená složka je určena pro detekci buněk živých. Následně se obě složky vyhodnocují zvlášť.

Prahování – prahováním se snažíme odstranit nežádoucí části z obrazu. Nastavením určitého prahu si zvolíme, které body mají být viditelné, a které naopak být viditelné nemají. Body, mající jas vyšší než je hodnota nastaveného prahu, jsou zachovány, a body, jejichž jas je nižší než hodnota prahu, jsou dále brány jako pozadí.

Vyplnění děr – při zpracovávání obrazu se některé buňky začnou jevit jako porušené, případně se v nich objevují díry. Je tedy nutné vhodným algoritmem tyto díry zacelit. Nejčastěji se k této operaci používá metoda dilatace.

Eliminace malých objektů – na pozadí se občas můžou objevit menší objekty, které by mohly být mylně detekovány jako buňky. K této operaci se obvykle používá metoda eroze, kdy jsou objekty v obraze postupně narušovány. Větší struktury budou zachovány a malé objekty jsou poté zcela odstraněny.

Odstranění částic dotýkajících se okraje – pokud chceme eliminovat částice, které se dotýkají okraje, je možné použít tuto funkci. Buňky dotýkající se okraje nebudou již dále zpracovávány.

Analýza buněk – pro spočítání počtů buněk v jednotlivých kanálech je potřeba zvolit vhodnou funkci v LabVIEW, která tuto operaci vykoná. Sečtením obou kanálů získáme celkový počet buněk v nasnímaném obraze.

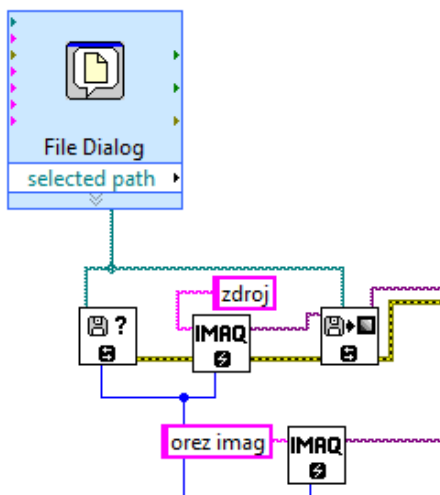
8 Realizace programu pro vlastní analýzu buněk

8.1 Části programu

Níže jsou popsány jednotlivé části programu postupně tak, jak dochází ke zpracovávání konkrétního snímku. Vždy je nejprve popsána část v Block diagramu a následně jsou zobrazeny ukázky činnosti jednotlivých funkcí ve Front panelu.

8.1.1 Načtení obrazu

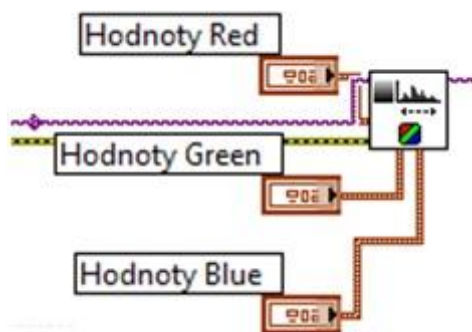
Počáteční částí programu je funkce pro načítání snímků, které byly pořízeny na konfokálním mikroskopu. Tato část je tvořena blokem **File dialog**, který po spuštění programu otevře dialogové okno pro výběr souborů (snímků), s nimiž chceme pracovat. Dále je zde zastoupen blok **GetFileInfo**, který získá informace o souborech ve formátu BMP, TIFF, JPEG, JPEG2000, PNG a AIPD. Následuje blok **IMAQ Create** sloužící jako dočasná paměť pro snímek a blok **ReadFile**, který umožní přečtení a následné převedení všech pixelů pro další práci se snímkem.



Obr. 13: Schéma pro načtení obrazových snímků z disku (LabVIEW).

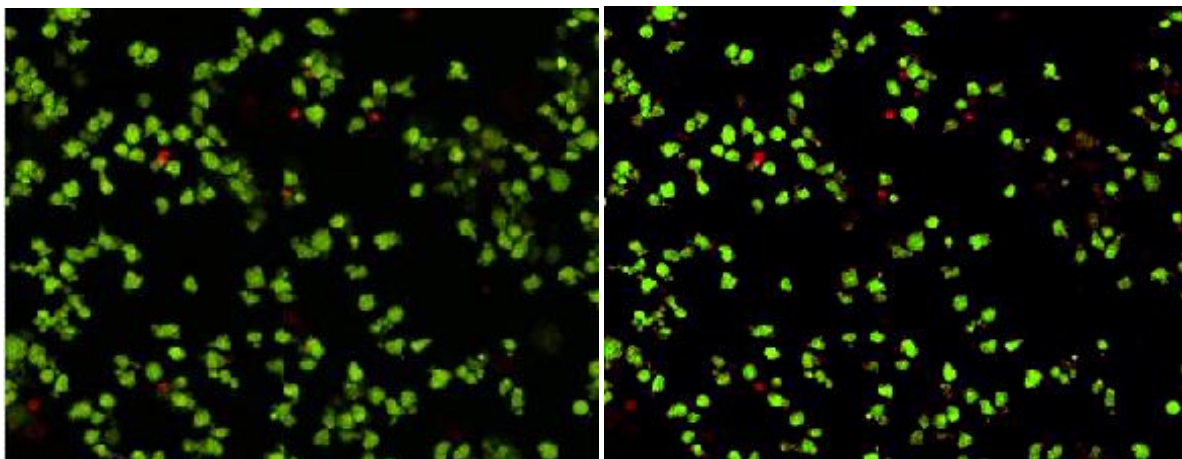
8.1.2 Úprava kontrastu a jasu

Pro úpravu kontrastu a jasu slouží blok **ColorBCGLookup**, který umožňuje změnu kontrastu, jasu a gama korekce pro jednotlivé barevné složky zvlášť. V mém programu není tento blok v cyklu, a proto je nutné nastavit parametry ještě před spuštěním. Pro mé snímky obarvené kitem Live/Dead je tato realizace mimo cyklus plně dostačující.



Obr. 14: Úsek pro úpravu kontrastu a jasu (LabVIEW).

Na obrázku 15 je ukázka originálního načteného snímku a příklad změny jasu a kontrastu po použití funkce ColorBCGLookup.



Obr. 15: Příklad aplikace ColorBCGLookup pro změnu kontrastu a jasu na snímku krevních buněk.

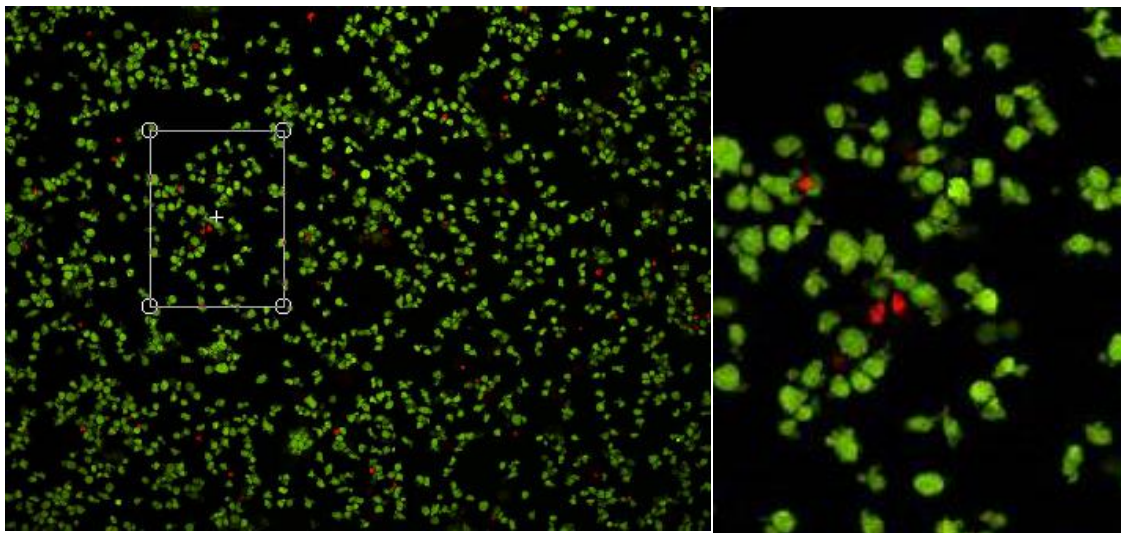
8.1.3 Výběr oblasti zájmu

Abychom mohli ze snímku vybrat oblast zájmu, ve které nás zajímá počet živých a mrtvých buněk, použil jsem blok IMAQ Extract, který umožňuje vyjmutí potřebné části snímku. V programu má uživatel na výběr obdélník libovolné velikosti dle vlastní potřeby.



Obr. 16: Funkce pro výběr oblasti zájmu (LabVIEW).

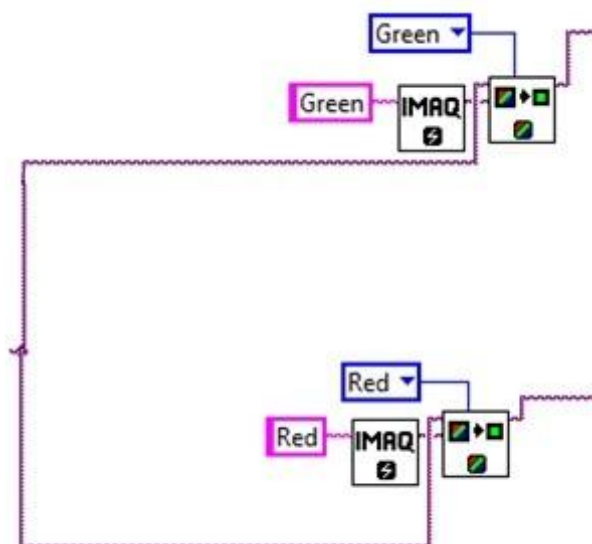
Obdélník, který je na obrázku 17, je možné různě posouvat po snímku a libovolně měnit jeho velikost. Tímto se vybere oblast zájmu, s níž program dále pracuje.



Obr. 17: Ukázka výběru oblasti zájmu na snímku krevních buněk.

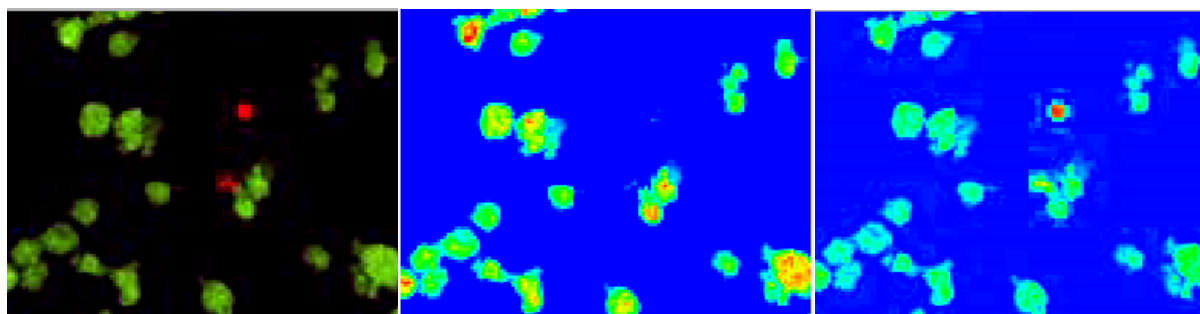
8.1.4 Rozdělení barevných spekter

V následující části je obraz rozdělen do dvou kanálů. V obou kanálech je obraz převeden pomocí bloků **ExtractSingleColorPlane** z původního 32 bitového RGB obrazu do 8 bitového obrazu odpovídající barevné roviny. V prvním kanále je z původního snímku vybraná zelená rovina, naopak ve druhém kanále je vybrána červená rovina obrazu. Dále je každý kanál zpracováván samostatně. Kanál green slouží pro analýzu živých buněk, kanál red pro analýzu buněk mrtvých, což naznačuje obrázek 19.



Obr. 18: Schéma rozdělení barevných spekter a funkce pro převedení do odstínu šedi (LabVIEW).

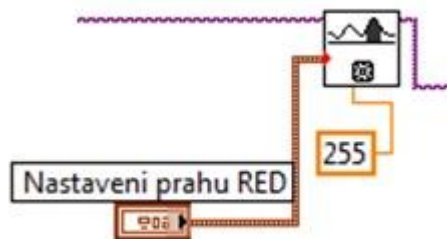
Obrázek 19 zobrazuje rozdělení původního snímku krevních buněk do dvou barevných kanálů. Je zde patrné, že v zelené rovině obrazu nejsou mrtvé (červené) buňky viditelné a živé buňky mají vyšší kontrast. V červené rovině je tomu opačně.



Obr. 19: Původní snímek krevních buněk, zelená složka (vlevo) a červená složka (vpravo).

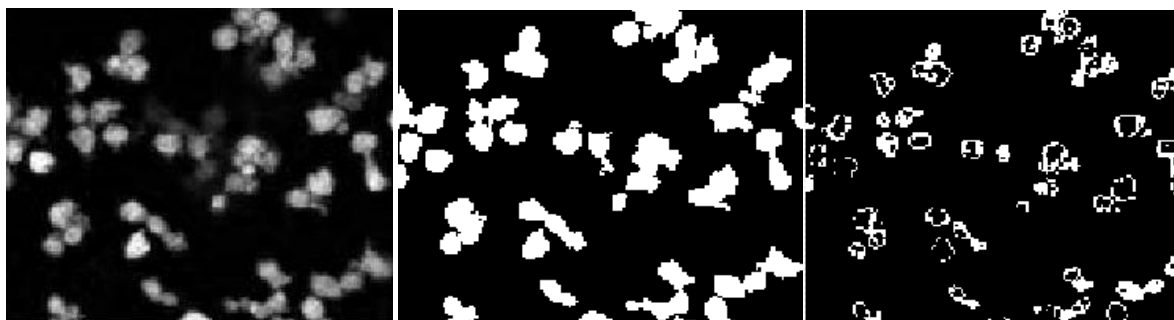
8.1.5 Prahování

Prahování je jednou z nejdůležitějších částí tohoto programu. Uživatel si pomoci posuvníku nastavuje určitou hodnotu prahu, a tím stanovuje, které body mají být zachovány, a které potlačeny. Tento úkol zde plní funkce **IMAQ Threshold** přiřazující hodnotu jedna všem bodům, jež se vejdu do prahu. Ostatní body budou brány jako pozadí a z obrazu vymizí. Po této operaci tedy vznikne binární obraz s hodnotami 0 a 1. Správné nastavení prahu je žádoucí pro přesné označení buněk a následnou analýzu.



Obr. 20: Funkce pro prahování obrazu (LabVIEW).

Na obrázku 21 je ukázka prahování na snímku krevních buněk. Je patrné, že tato operace má zásadní význam pro další zpracování, neboť nesprávným nastavením prahu mohou některé menší objekty zcela vymizet.



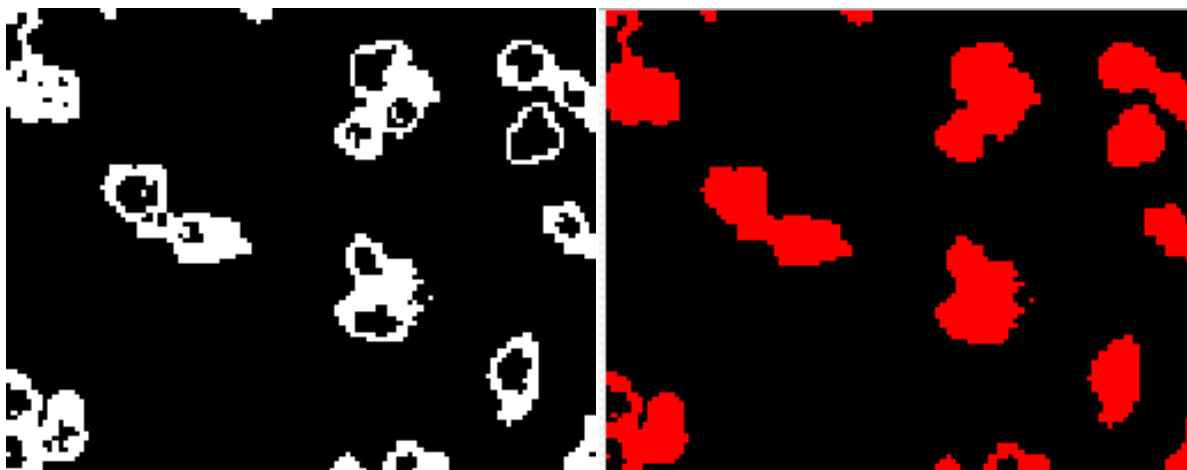
Obr. 21: Příklad původního obrazu (vlevo) a různé stupně nastavení prahu.

8.1.6 Vyplnění děr

Po operaci prahování se uvnitř některých objektů (buněk) vytvoří díry a trhliny, které mohly vzniknout při nastavování určitého stupně prahu. Bylo proto vhodné použít blok **IMAQ FillHole**, který vyplní prázdný prostor pixely s hodnotou jedna. Na obrázku 23 je ukázka snímku před a po aplikování funkce vyplnění děr.



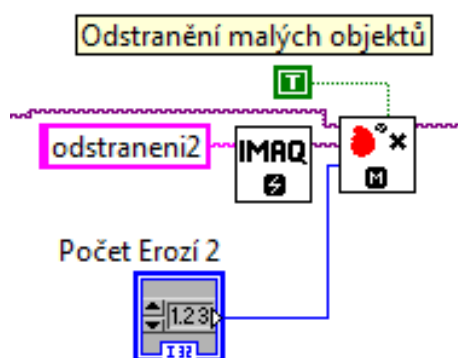
Obr. 22: Funkce FillHole pro vyplnění děr (LabVIEW).



Obr. 23: Příklad funkce pro vyplnění děr na snímku krevních buněk.

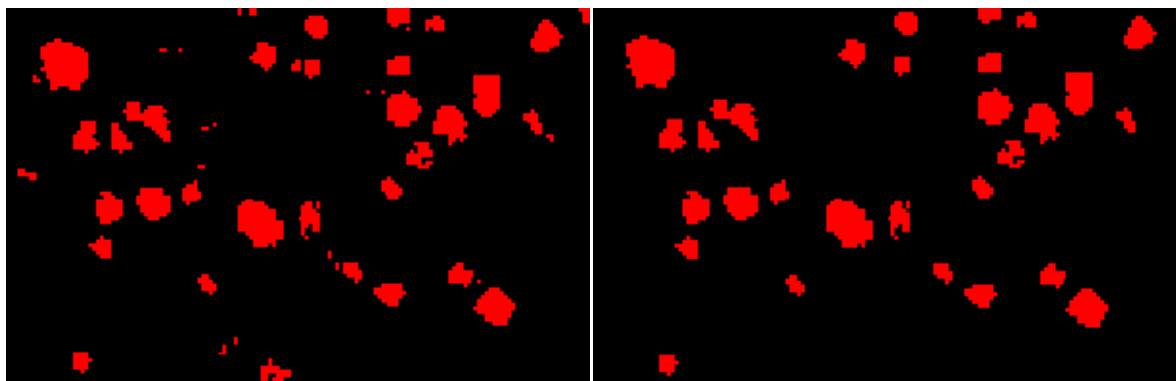
8.1.7 Odstranění malých objektů

V nasnímaném obraze se mohou objevovat malé částice, které zde zbyly z pozadí po operaci prahování. Pokud by tyto částice zůstaly v obraze zachovány, byly by ve výsledku mylně započítány jako buňky. Je tedy nutné je eliminovat. V programu LabVIEW tuto úlohu plní blok **RemoveParticle**, jenž eliminuje částice pomocí morfologické operace eroze. Stupeň eroze si může uživatel sám nastavovat dle potřeby.



Obr. 24: Schéma zapojení funkce pro odstranění malých objektů v obraze (LabVIEW).

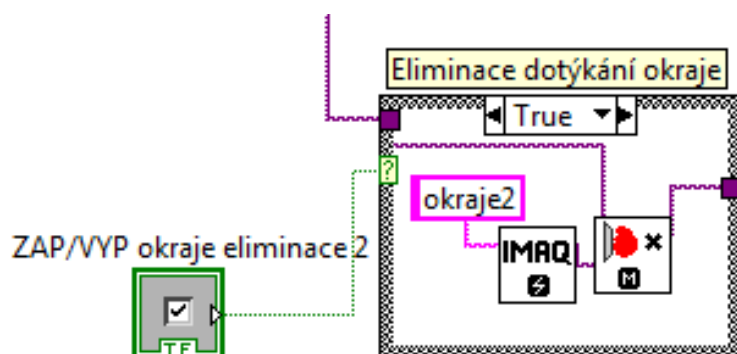
Na obrázku 25 je ukázka odstranění malých objektů pro stupeň eroze 1. Pokud by byl nastaven vyšší stupeň eroze, mohlo by dojít k mylnému odstranění větších objektů (buněk). Je proto vhodné nejprve vyzkoušet různé stupně eroze, aby nedocházelo ke zkreslení.



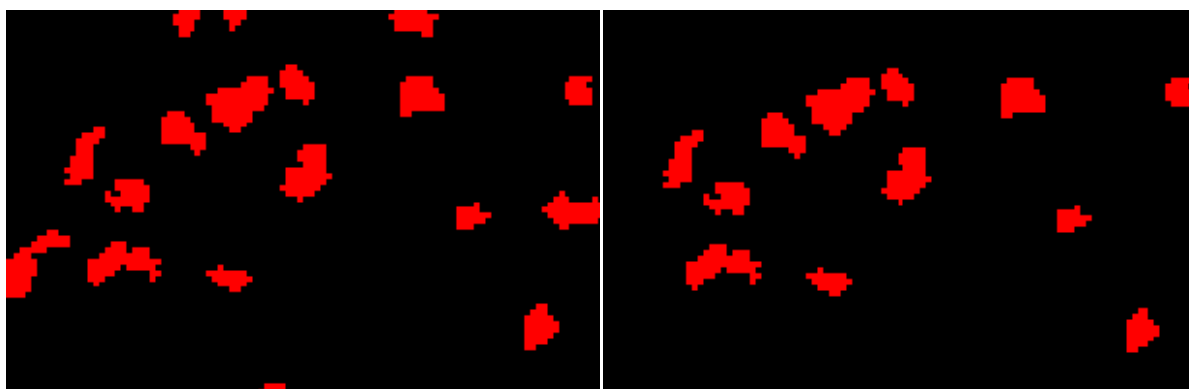
Obr. 25: Příklad odstranění malých objektů na snímku krevních buněk pro stupeň eroze 1.

8.1.8 Eliminace částic dotýkajících se okraje snímku

Další možností, kterou uživatel pro práci s pořízenými snímky může využít, je možnost odstranění částic, dotýkajících se okraje. Pro tuto funkci je použit blok **RejectBorder**. Operace je v cyklu **Case**, aby bylo možné funkci libovolně zapínat a vypínat. Ukázka této operace je patrná na obrázku 27.



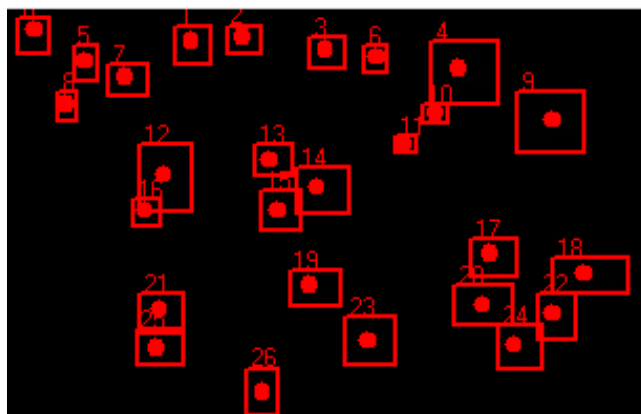
Obr. 26: Schéma pro odstranění částic dotýkajících se okraje (LabVIEW).



Obr. 27: Příklad odstranění částic dotýkajících se okraje na snímku krevních buněk.

8.1.9 Počítání a zvýraznění objektů v obraze

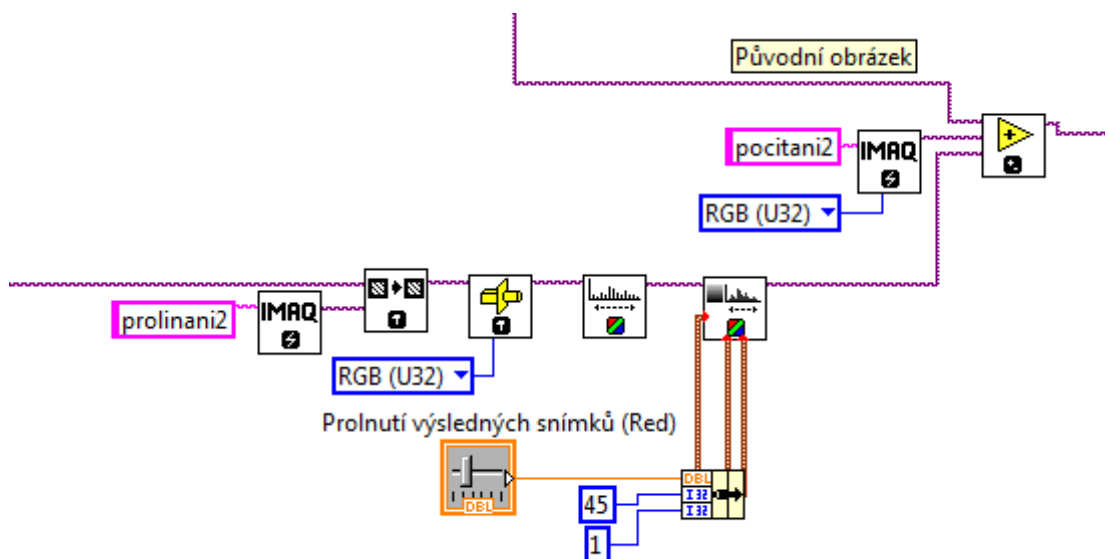
Pro spočítání objektů ve zvoleném snímku slouží blok pro analýzu **Particle Analysis**, který jednoduše zjistí počet částic v obraze a přivede ho na výstup. Další funkcí, jež je využita pro analýzu, je blok **Count Objects**, který lokalizuje, měří a vyznačí obdélníkem hledané objekty. Takto označené objekty jsou v obraze přehlednější.



Obr. 28: Příklad použití funkce Count Objects na snímku krevních buněk.

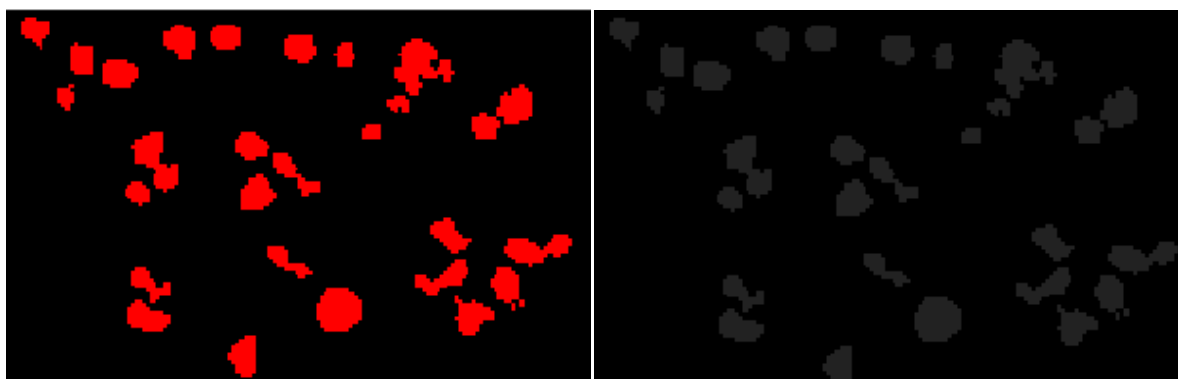
8.1.10 Zobrazení výsledku

Zobrazení výsledného snímku je asi nejsložitější částí programu. Bylo totiž nutné překrýt původní načtený obrázek se snímkem analyzovaných buněk, který nese informaci o počtu a poloze detekovaných buněk. Původní snímek je ve formátu RGB jako 32bitový, kdežto snímek analyzovaných buněk je 8bitový.



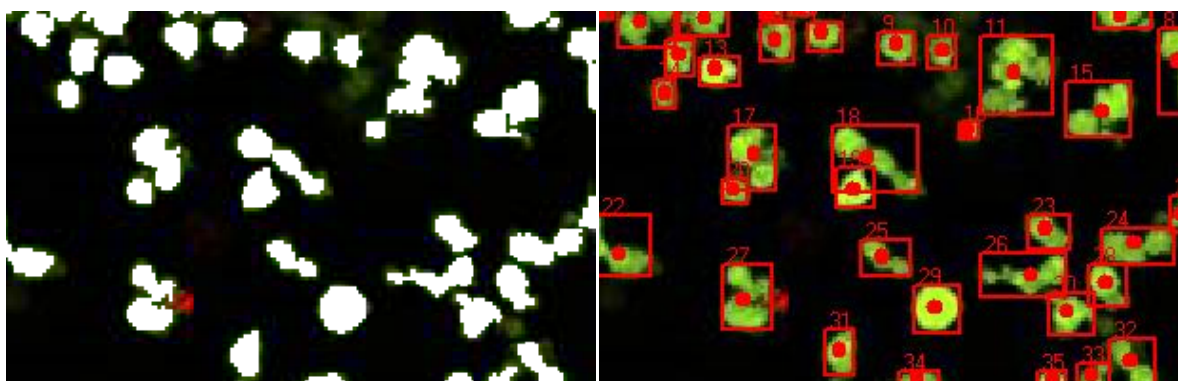
Obr. 29: Schéma prolínání analyzovaného snímku s pozadím a následné sečtení s původním obrázkem (LabVIEW).

Nejprve se analyzovaný snímek buněk pomocí bloku **Cast Image** převede z 8bitového binárního snímku do 32bitového RGB obrazu. Pro vyrovnání jasové roviny obrazu je pak zapojen blok **ColorEqualize**. Následuje blok **ColorBCGLookup**, který je zapojen pomocí funkce **Bundle** tak, aby bylo možné postupně prolínat analyzovaný snímek s pozadím pomocí posuvníku. [24]



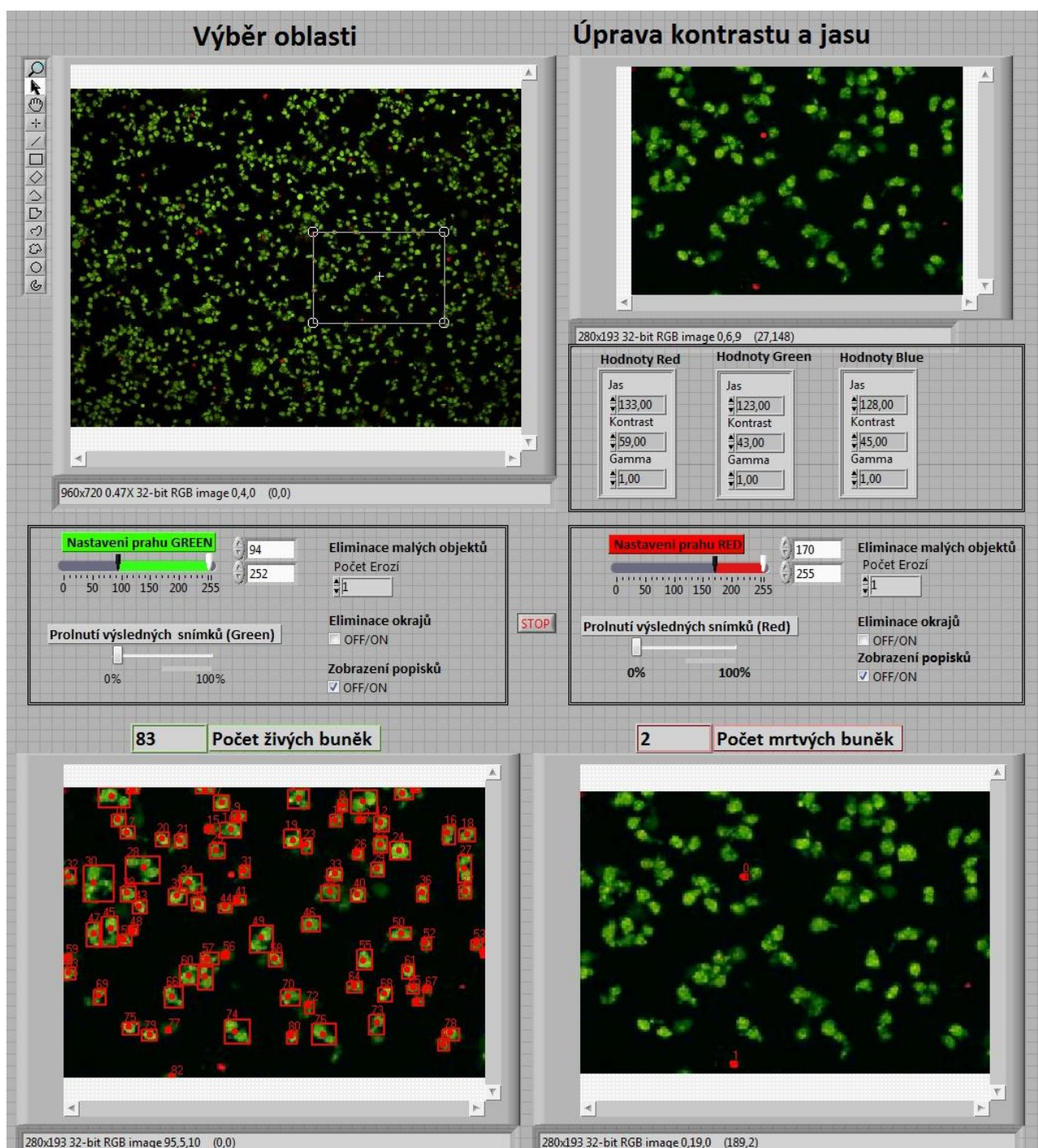
Obr. 30: Příklad postupného prolínání buněk z pozadí pomocí posuvníku.

Dále je tento snímek, který je možné prolínat s pozadím, spojen s originálním načteným snímkem buněk pomocí funkce **Add**. Takto spojené snímky jsou pomocí funkce **Copy Overlay** překryty s analyzovaným snímkem buněk, který nese informace o poloze rámečků vyznačujících buňky. Tato část je opět v cyklu **Case** a uživatel si může libovolně zapnout či vypnout ohraničení buněk rámečky.



Obr. 31: Sečtení analyzovaného snímku s původním obrázkem bez rámečků (100% prolnutí) vlevo a s rámečky (0% prolnutí) vpravo na snímku krevních buněk.

8.2 Uživatelské prostředí programu



Obr. 32: Uživatelské prostředí programu pro vlastní analýzu buněk.

V levém horním rohu uživatelského prostředí se nachází okno pro výběr oblasti, kde je možné vybrat libovolnou část snímku pomocí obdélníku. V okně pro úpravu kontrastu a jasu se zobrazuje vybraná část obdélníku s hodnotami jasu a kontrastu, které byly předem nastaveny v tabulce pod oknem. Ve spodní části rozhraní je možné nastavovat parametry pro

živé a mrtvé buňky zvlášť. Levá část, která je popsána zelenou barvou, slouží k vyhodnocení živých buněk z obrazu, naopak pravá spodní část slouží k vyhodnocení buněk mrtvých.

Uživatel má tedy nejprve možnost vybrat si objekt zájmu, libovolně upravit jas a kontrast pro různé složky RGB obrazu. Dále může pracovat pro oba kanály (živá a mrtvá složka) odděleně. Zde si může nastavit hodnotu prahu, kterou může volit v rozsahu 0 až 255. Pro lepší orientaci a vhodné nastavení prahu je žádoucí nastavit posuvník pro prolnutí výsledného snímku na hodnotu kolem 90 %. Dále je možné nastavovat počet erozí, sloužících pro eliminaci malých částic, které by mohly být omylem detekovány jako buňky. Uživatel má také možnost vypnout zobrazení buněk, jež se dotýkají okraje snímku. Počet buněk, ať už živých nebo mrtvých, se zobrazuje v samostatném okénku nad zobrazením výsledného snímku. Pro lepší orientaci je také možné zapnout nebo vypnout zobrazení detekovaných buněk ve snímku.

8.3 Návod pro práci s programem

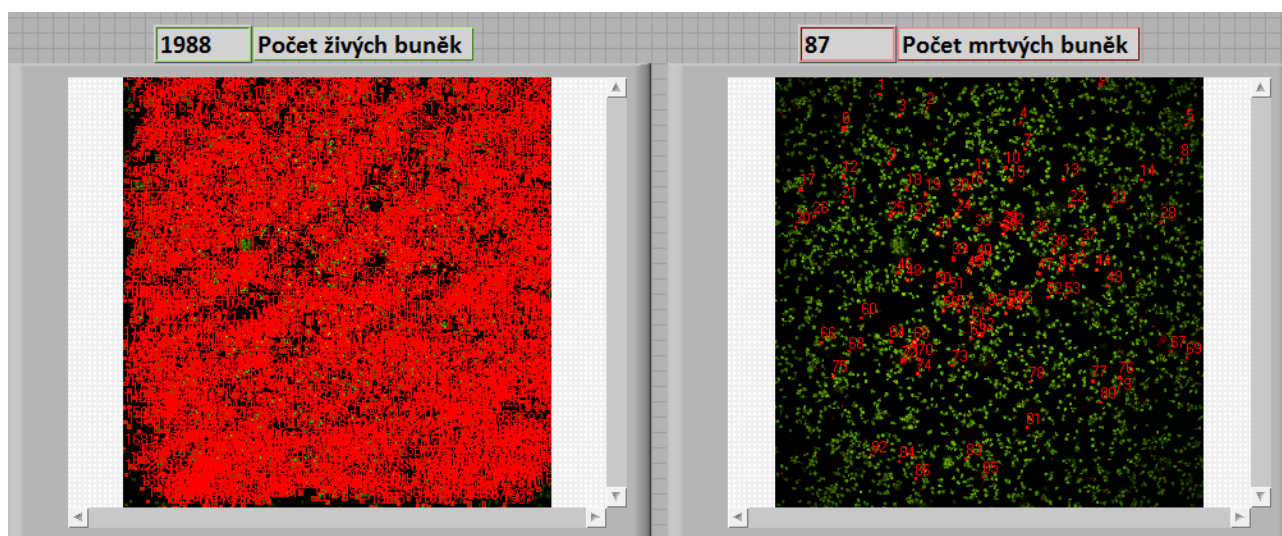
- 1) Po spuštění programu se zobrazí okno pro výběr obrázků ze souboru. Nejprve je nutné načíst snímek, se kterým chceme dále pracovat.
- 2) V okně „Výběr oblastí“ je nutné vybrat oblast zájmu, kterou potřebujeme pro analýzu.
- 3) Pokud je potřeba, je zde možnost upravit kontrast, jas a gamma korekci. Tyto parametry se musí zadat ještě před spuštěním programu.
- 4) Nastavení prahu pro složku Green je nejlepší zvolit v rozsahu kolem 70 až 170, pro Red složku se nejlépe jeví rozsah 170 až 250 (parametry se mohou lišit v závislosti na analyzovaném obraze).
- 5) Vhodným nastavením prahu a prolnutí výsledných snímků se snažíme, aby program označil správné buňky v patřičném kanále.
- 6) Pokud vidíme, že program detekuje chybně i malé objekty, nebo naopak nedetekuje větší objekty, je nutné upravit počet erozí. Vhodné nastavení počtu erozí je 1-2 (parametry se mohou lišit v závislosti na analyzovaném obraze).
- 7) Pokud nechceme pracovat s buňkami, které se dotýkají okraje, je možné je příslušným tlačítkem vypnout.
- 8) Na závěr je možné zobrazit popisky a ohraničení detekovaných buněk. Zapnutí této funkce je přehlednější spíše pro snímky s menším počtem buněk.

9 Třídění živých a mrtvých buněk

V této kapitole jsou snímky krevních buněk a fibroblastů podrobeny analýze a pomocí vytvořeného programu roztrženy na živé a mrtvé. Na každém obrázku níže je v levé části zobrazen počet a prostorová orientace živých buněk, v pravé části je zobrazen počet a prostorová orientace mrtvých buněk.

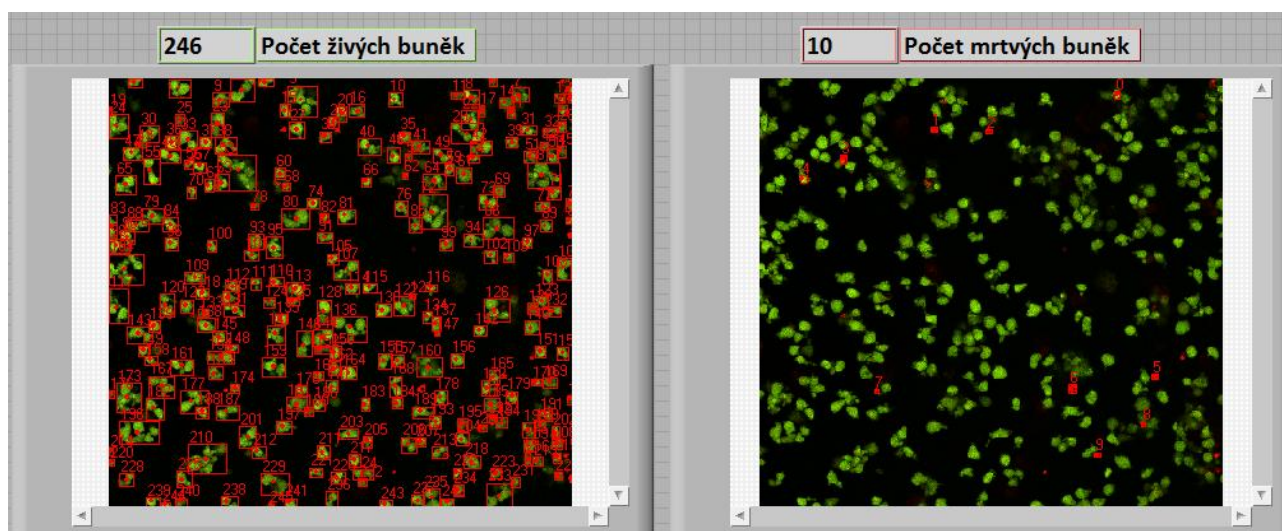
9.1 Analýza krevních buněk

Z celkového počtu 2075 buněk je na tomto snímku **95,81%** živých a **4,19%** mrtvých.



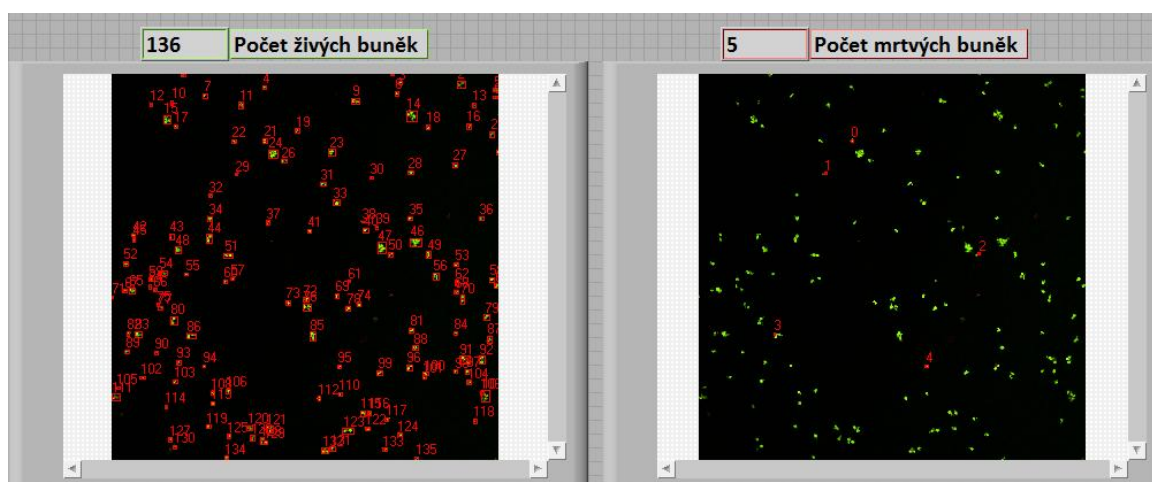
Obr. 33: Snímek č. 1 krevních buněk.

Z celkového počtu 256 buněk je na tomto snímku **96,09 %** živých a **3,91 %** mrtvých.



Obr. 34: Vybraná část snímku č. 1 krevních buněk.

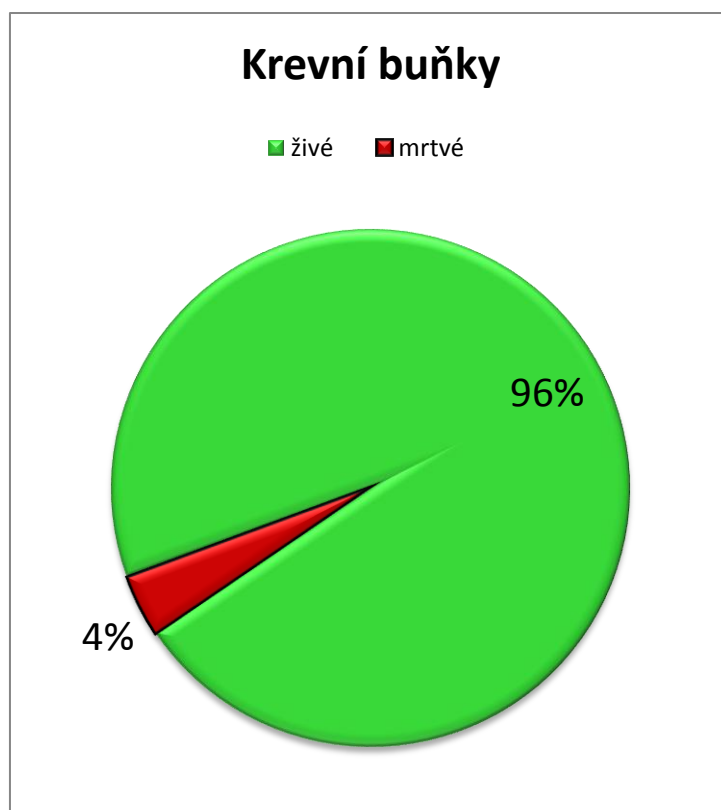
Z celkového počtu **141** buněk je na tomto snímku **96,45 %** živých a **3,55 %** mrtvých.



Obr. 35: Snímek č. 2 krevních buněk.

Při analýze krevních buněk byl nejprve zobrazen počet živých a mrtvých buněk z prvního snímku (obr. 33). Tento snímek obsahuje 2075 buněk, z toho 1988 (95,81%) tvoří buňky živé a 87 (4,19%) buněk tvoří buňky mrtvé. Na obrázku 34 je zachycena náhodně vybraná část prvního snímku, která dosahuje velmi podobného poměru živých a mrtvých buněk (96,09% živých a 3,91% mrtvých). Pro přesnější vyhodnocení viability byl vystaven analýze i druhý vzorek krevních buněk, který je na obrázku 35. Při porovnání prvního a druhého snímku je na druhém snímku patrná menší hustota buněk. Protože se jednalo o stejný typ vzorku, ale nově obarvený, je procento zastoupených živých a mrtvých buněk opět srovnatelné (96,45% živých a 3,55% mrtvých buněk).

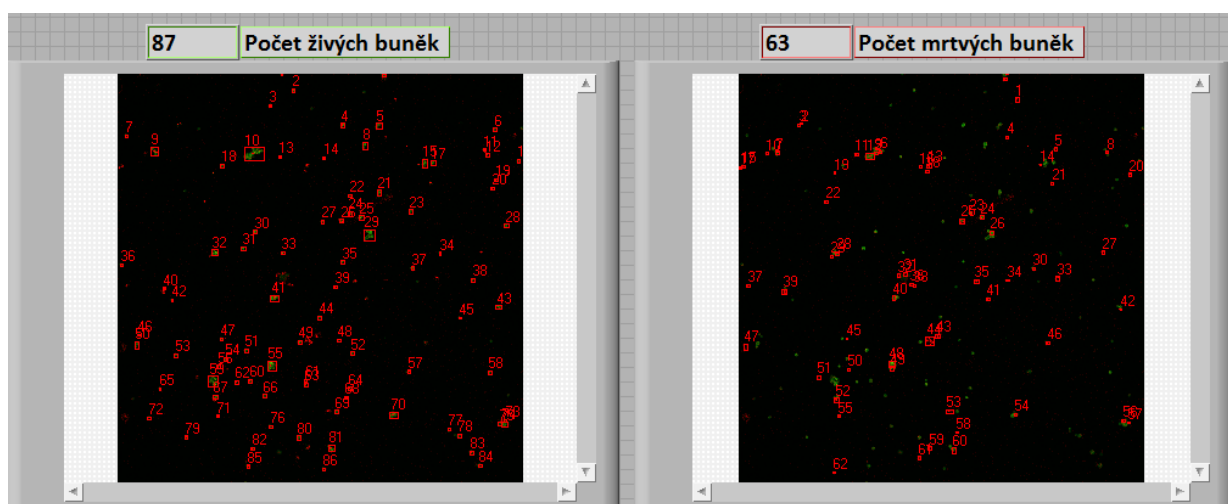
Pro testovaný vzorek krevních buněk, který jsem měl k dispozici, je průměrná hodnota živých buněk **96,12 %** a mrtvých buněk **3,88 %**.



Graf 1: Analýza krevních buněk.

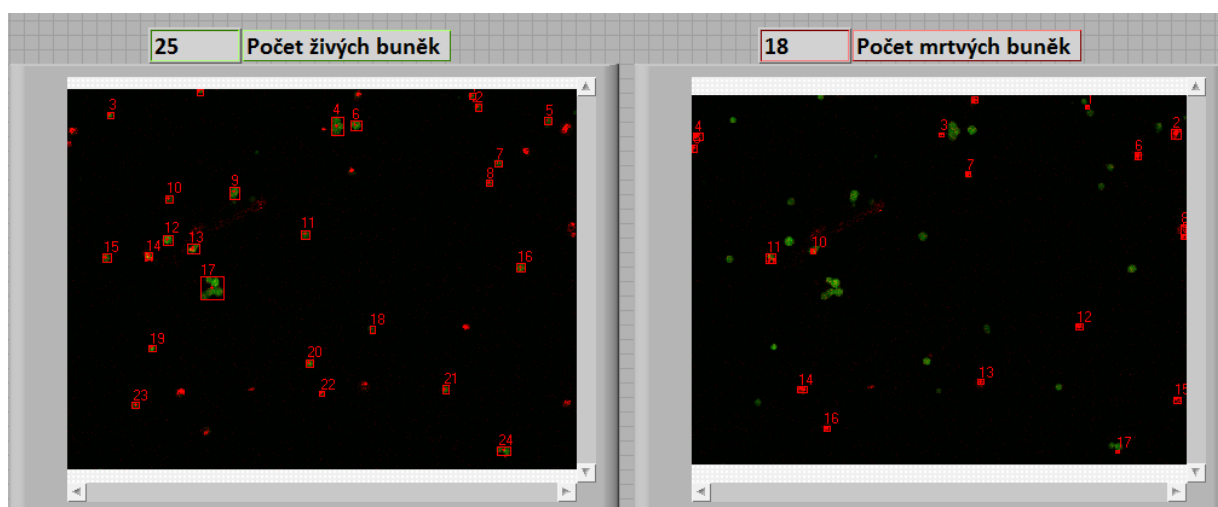
9.2 Analýza fibroblastů

Z celkového počtu 150 buněk je na tomto snímku 58 % živých a 42 % mrtvých.



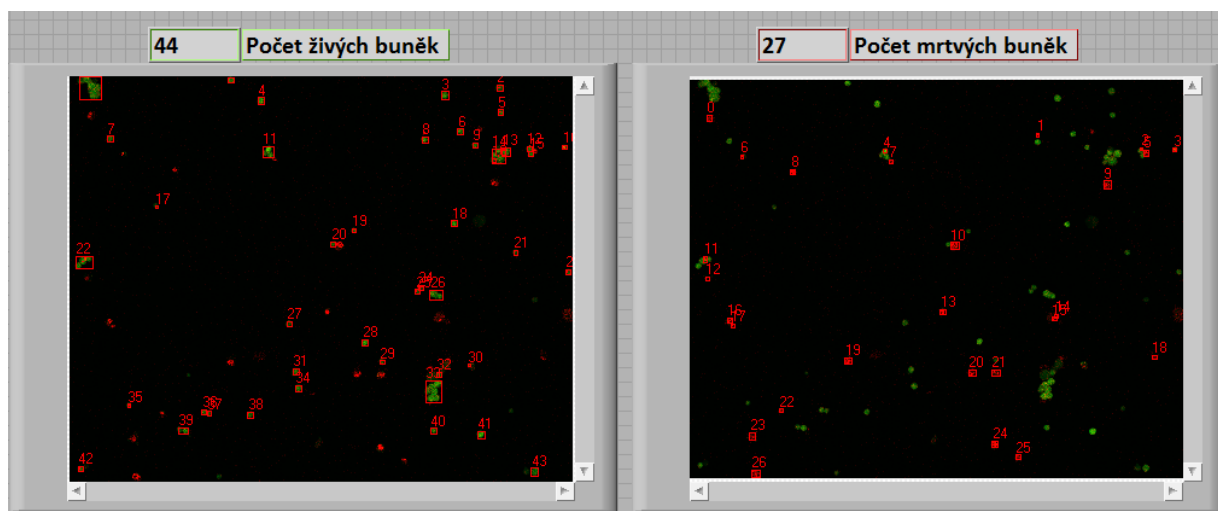
Obr. 36: Snímek č. 1 fibroblastů.

Z celkového počtu **43** buněk je na tomto snímku **58,1 %** živých a **41,9 %** mrtvých.



Obr. 37: Vybraná část snímku č. 1 fibroblastů.

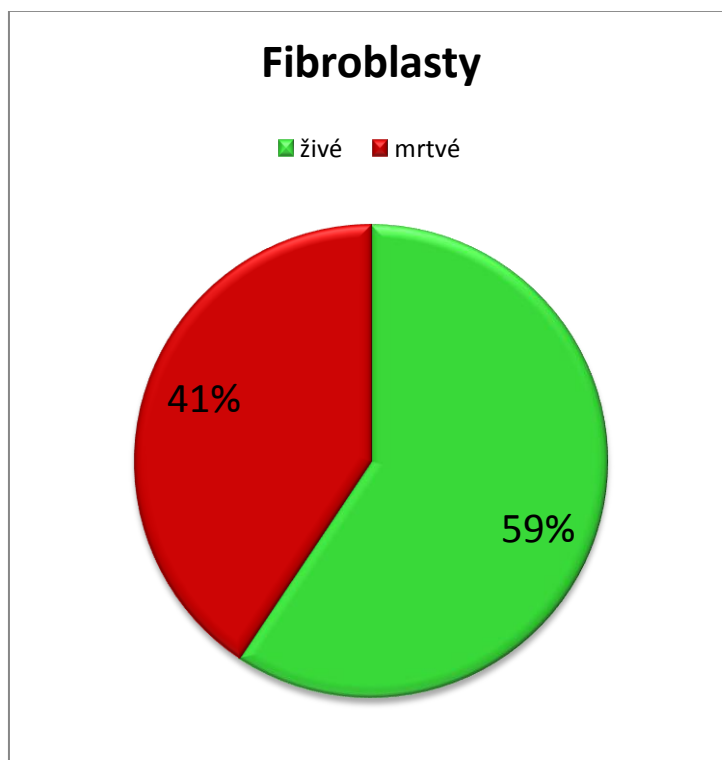
Z celkového počtu **71** buněk je na tomto snímku **62 %** živých a **38 %** mrtvých.



Obr. 38: Snímek č. 2 fibroblastů.

Pro analýzu fibroblastů byly zvoleny opět dva různé vzorky stejných buněk. Na obrázku 36 je první snímek fibroblastů, který z celkového počtu 150 buněk obsahuje 87 (58 %) živých a 63 (42 %) mrtvých buněk. Náhodně vybraná část tohoto prvního snímku dosahuje téměř identických parametrů (58,1 % živých a 41,9 % mrtvých buněk). Druhý snímek, jenž je na obrázku 38, zobrazuje téže fibroblasty odebrány ze stejného místa, ale nově obarvené. Ze 71 buněk, zde bylo v době měření 44 (62 %) živých a 27 (38 %) mrtvých.

Odebrané fibroblasty, které byly podrobeny třídění na živé a mrtvé, obsahují průměrně **59,37 %** živých buněk a **40,63 %** buněk mrtvých.

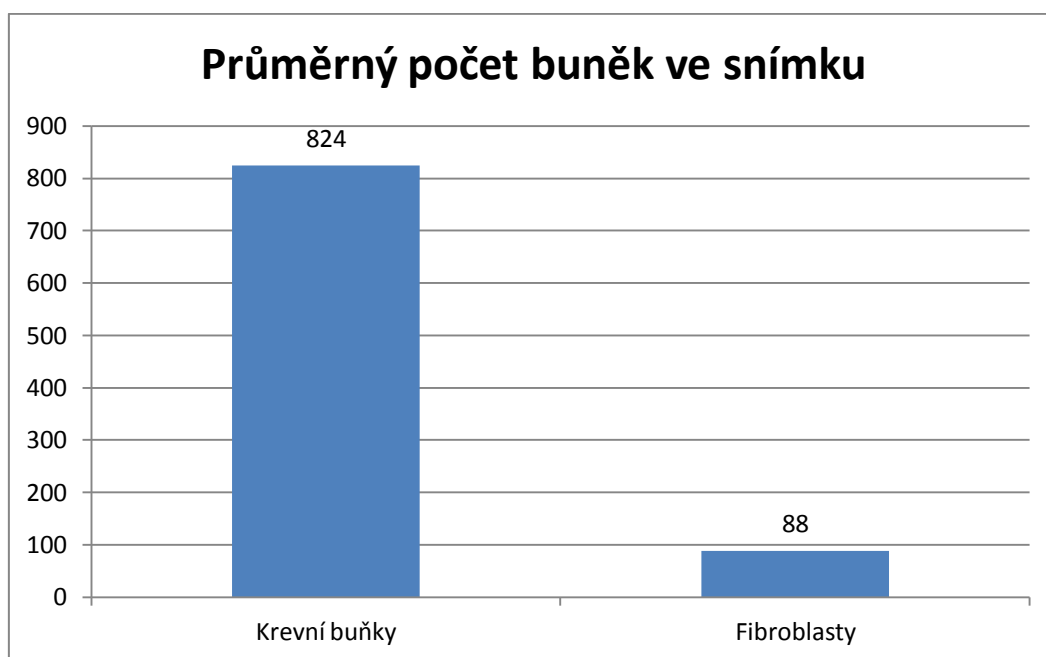


Graf 2: Analýza fibroblastů.

10 Porovnání obou buněčných kultur a zhodnocení

Tato část se zaměřuje na porovnání naměřených výsledků obou typů buněk. Nejprve je posouzen průměrný počet buněk obsažený v jednom snímku. Dále je ukázka a popis, jak rozdílný vliv má správné nastavení prahu při analýze na odlišných typech buněk. Na závěr této kapitoly je vyhodnocení a porovnání viability obou kultur, tedy zastoupení živých a mrtvých buněk.

10.1 Průměrný počet buněk v testovaných snímcích



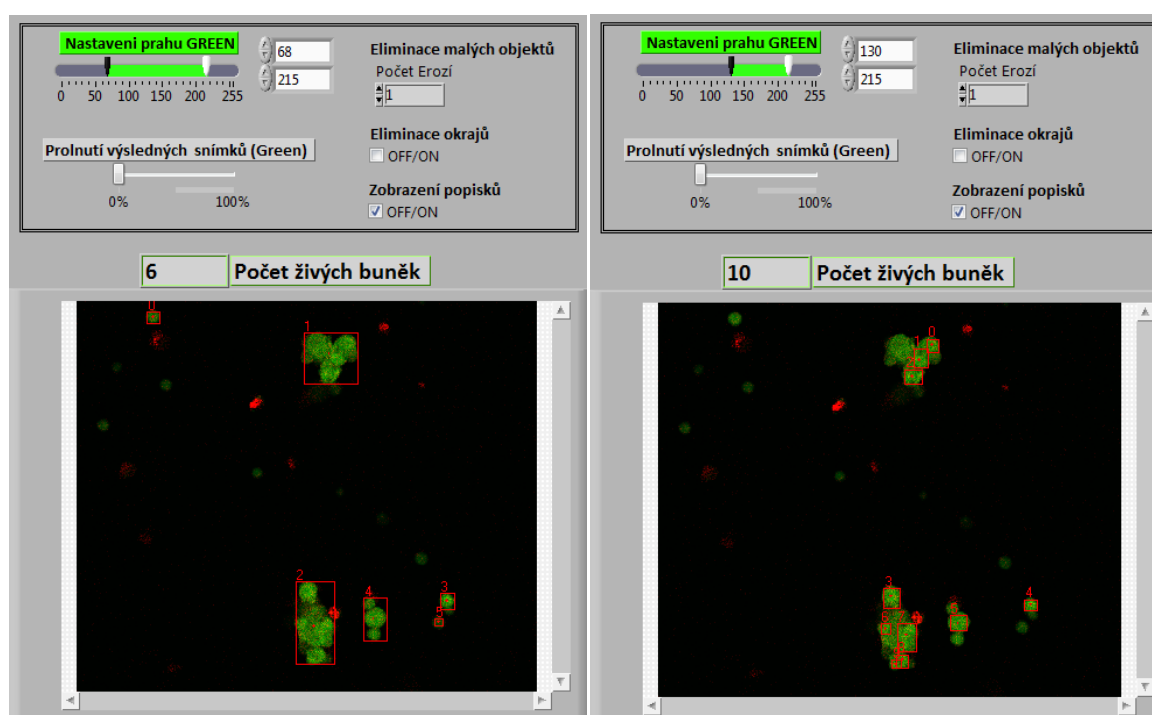
Graf 3: Porovnání počtu buněk ve snímku.

Hustota buněk ve snímku závisí na tom, jak moc koncentrovaný vzorek buněk se podařilo kultivovat. Oba typy buněk, které mi byly poskytnuty z Fakultní nemocnice, byly kultivovány v takových koncentracích, jak zobrazuje graf 3. Tato závislost vyšla pouze pro buněčné kultury, které jsem měl k dispozici. Neznamená to tedy, že krevní buňky jsou vždy koncentrovanější než fibroblasty. Pokud bych měl jinak kultivované vzorky obou buněk, mohl by graf vypadat opačně.

Při pohledu na oba typy buněk zobrazených v grafu 3 je jasné patrné, že krevní buňky jsou na snímcích zastoupeny četněji. Průměrný počet krevních buněk připadajících na jeden snímek je 824, kdežto u fibroblastů je to pouhých 88 buněk. Pro analýzu výše popsaným programem se snadněji jeví určit zastoupení živých a mrtvých buněk u méně koncentrovaného vzorku, neboť je přehlednější. U koncentrovanějšího vzorku dochází vlivem velkého počtu buněk k vzájemnému dotyku a překrývání buněk, což snižuje přesnost při nastavování parametrů.

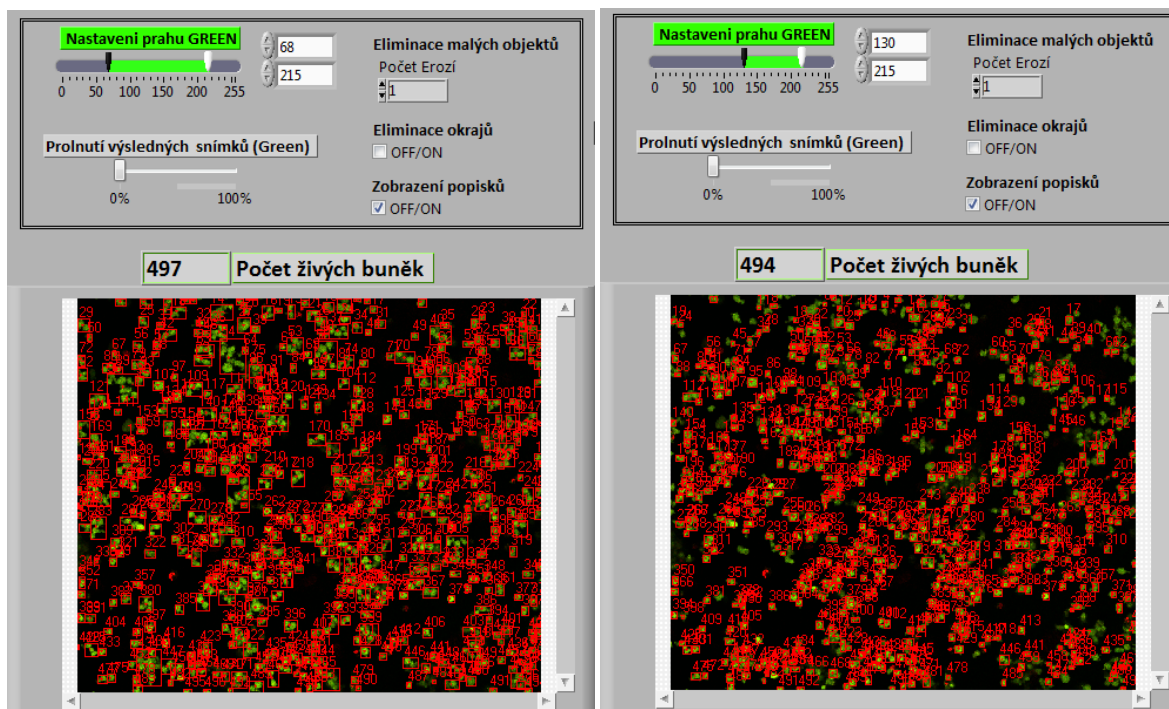
10.2 Vliv různého nastavení prahu na výsledek

Fibroblasty, které jsou z méně koncentrovaného vzorku, jsou prostorově dost volné, ale ve snímcích mají tendenci tvořit shluky buněk. Pro detekci těchto buněk je nutné dbát zvýšené opatrnosti při nastavení hranice prahu. Na obrázku 39 je ukázka různého nastavení prahování pro vzorek fibroblastů. Při nastavení širšího prahu (vlevo) program detekuje shluk buněk jako jeden objekt, a tedy ho ve výsledku počítá jako jedinou buňku. Při nastavení užšího prahu (vpravo) sice dojde k částečnému rozdělení shluku, avšak na úkor potlačení ostatních buněk mimo toto seskupení. Pro tento typ buněk je tedy důležité věnovat značnou pozornost vhodnému nastavení, aby nedošlo k nepřesnému vyhodnocení.



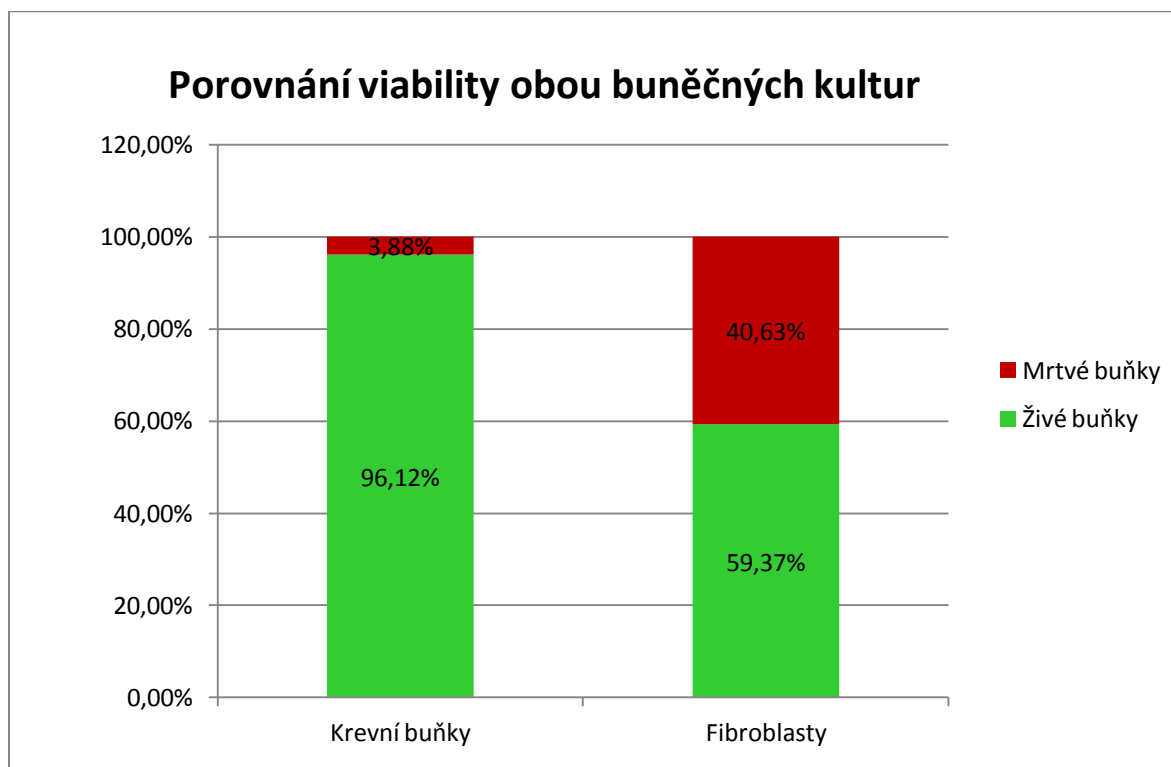
Obr. 39: Různé nastavení prahu pro fibroblasty.

Krevní buňky, které jsou v obraze podstatně koncentrovanější, jasně svítí, ale shluky tvoří v menší míře než fibroblasty. Je proto snadnější je od sebe odlišit. Na obrázku 40 jsou nastaveny stejné hodnoty prahování jako pro snímek fibroblastů výše. Pro krevní buňky se ovšem vliv shluku ve výsledku v podstatě neprojeví (obr. 40) a pro širší práh (vlevo) a užší práh (vpravo) dosahuje výsledný počet detekovaných buněk téměř totožných hodnot.



Obr. 40: Různé nastavení prahu pro krevní buňky.

10.3 Porovnání viability obou buněčných kultur



Graf 4: Porovnání viability buněčných kultur.

V grafu 4 jsou zobrazeny průměrné hodnoty zastoupení živých a mrtvých buněk zvlášť pro krevní buňky a fibroblasty. Krevní buňky obsahují 96,12 % živých a 3,88 % mrtvých buněk. Pro vzorek fibroblastů je podíl zastoupených mrtvých buněk vyšší a dosahuje 40,63 %, podíl živých buněk je zde 59,37 %.

Téměř zanedbatelné množství mrtvých krevních buněk je způsobeno tím, že měření probíhalo na čerstvě odebraném vzorku, a proto byla většina buněk v době měření stále životaschopná. U vzorku fibroblastů se nepodařilo tak rychle přemístit buňky k měření na mikroskopu, a tak je procento zastoupených mrtvých buněk vyšší.

Z porovnání těchto dvou odlišných a různě starých vzorků můžeme usoudit, že viabilita buněk s rostoucím časem po odebrání velmi rychle klesá. Pokud tedy potřebujeme životaschopné buňky, je nezbytné vzorky odebrat ideálně hned před potřebným testem či měřením. Dále musíme vzít v potaz typ buněk, protože schopnost přežít se u různých typů liší. Měřené krevní buňky a fibroblasty měly podle mého měření téměř stejnou schopnost přežít, protože se u fibroblastů projevila ztráta životaschopnosti závislá na stáří vzorku.

Viabilitu buněk lze vypočítat různými metodami, jako například výpočtem z fluorescence, která je uvedena zhruba v polovině této práce. Já jsem se však dle zadání zaměřil na prostorové vyhodnocení viability, kdy jsou buňky brány jako objekty v obraze a procento živých a mrtvých je vypočítáno zvlášť z celkového počtu buněk.

11 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit se se základními principy fluorescenčních metod pro zjišťování životaschopnosti buněk, dále prostudovat metody zobrazování používaných v konfokální mikroskopii, zaměřit se na fluorescenční barviva pro stanovení viability buněk, navrhnout metodu pro optické vyhodnocení a realizovat měření.

Nejprve jsem se snažil popsat základní principy fluorescence a její hlavní charakteristiky, seznámit se s typy fluoroforů a se základními metodami pro zjišťování viability. Poté jsem se pokusil krátce popsat základní vlastnosti fluorescenční a konfokální mikroskopie, a také se blíže seznámit s konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8, na kterém jsem realizoval vlastní měření. Z metod pro zjišťování viability jsem se zaměřil hlavně na metodu barvení buněk pomocí kitu LIVE/DEAD, což je směs dvou fluorescenčních barviv calceinu AM a ethidia homodimeru. Vlastní měření pomocí kitu jsem provedl na dvou odlišných buněčných kulturách, na krevních buňkách a fibroblastech. Součástí této práce je krátký popis zkoumaných buněk, metoda jejich přípravy a barvení. Pro vyhodnocení buněk bylo nejprve

potřeba navrhnout možnou metodu, jak snímky analyzovat a vyhodnotit. Podle navrženého schématu jsem následně v prostředí LabVIEW realizoval program pro vyhodnocení mého měření. Tento program umožňuje vybrat oblast nahraného snímku, kterou je potřeba vyhodnotit, a následně po nastavení příslušných parametrů zvlášť zobrazí umístění a počet živých a mrtvých buněk. Program počítá buňky v obraze jako jednotlivé objekty v prostoru, následně se vypočítá počet živých a mrtvých buněk ve snímku, které se určí jako viabilita. Jelikož fibroblasty tvoří na mých snímcích shluky, byl problém pro tento typ buněk správně nastavit hodnotu prahu, a proto se touto metodu fibroblasty analyzují hůře než krevní buňky. Pro navržený program byly použity základní algoritmy, které odpovídají základním znalostem nabytým pouze během studia a dalším studiem literatury. Program při analýze buněčných shluků jeví mírné nedostatky, kterým by se dalo předejít vývojem pokročilejších algoritmů přizpůsobených na určitý typ buněk.

Vyhodnocením obou odlišných buněčných kultur jsem došel k předpokládanému závěru, který potvrdil úbytek živých buněk ve vzorku v závislosti na době měření po odběru. Ve starším vzorku fibroblastů se nacházel větší procentuální podíl zastoupených mrtvých buněk, než ve vzorku krevních buněk, které jsem vyhodnocoval hned po odebrání.

12 Seznam použité literatury

[1] Cvičení z buněčné biologie: Testy životaschopnosti buněk. [online]. 2010 [cit. 2012-10-04]. Dostupné z: <http://rustreg.upol.cz/vyuka/bubcv/BUBCV7.pdf>

[2] Posouzení životaschopnosti mikrobiálních buněk fluorescenční mikroskopií. VESELÁ, Mária. *Chempoint* [online]. [cit. 2012-10-04]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/posouzeni-zivotaschopnosti-mikrobianich-bunek-fluorescencni-mikroskopii>

[3] HRAZDIRA, Ivo, Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Neptun, 2006. ISBN 80-902896-1-4

[4] Principy fluorescenční spektroskopie [online]. [cit. 2012-10-25]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>

[5] Determination of Mammalian Cell Viability on the Tali® Image-Based Cytometer. *LifeTechnologies* [online]. [cit. 2012-10-25]. Dostupné z: <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Cellular-Imaging/imaging-cytometry/Tali-Image-Cytometer/Applications-Tali-Image-Cytometer/LIVE-DEAD-Viability-Cytotoxicity-Kit.html>

[6] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. Psychiatrická klinika. 1. lékařská fakulta UK [online]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>

- [7] Fluorescenční mikroskopie [online]. [cit. 2012-10-26]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>
- [8] Fluorescence Fundamentals. *Life Technologies* [online]. [cit. 2012-10-26]. Dostupné z <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html>
- [9] Viability and Cytotoxicity Assay Reagents. *Life Technologies* [online]. [cit. 2012-10-26]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Assays-for-Cell-Viability-Proliferation-and-Function/Viability-and-Cytotoxicity-Assay-Reagents.html>
- [10] Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZUCH. *Chemické listy* [online]. [cit. 2012-10-26]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [11] Fluorescenční mikroskopie. VESELÁ, Mária. *Chempoint* [online]. [cit. 2012-10-27]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>
- [12] ČERNÝ, Jan. *Fluorescenční mikroskopie*. Oddělení vývojové biologie, Katedra fyziologie živočichů. Přírodovědecká fakulta UK v Praze [online]. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>
- [13] SEHA DOVÁ, Hana. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie*. Biologické centrum AVČR, České Budějovice [online]. Dostupné z: <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [14] Confocal Microscopy. PADDOCK, Stephen W., Thomas J. FELLERS a Michael W. DAVIDSON. *Nikon MicroscopyU* [online]. Dostupné z: <http://microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>
- [15] Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8. *Leica Microsystems* [online]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/details/product/leica-tcs-sp8/>
- [16] Metody detekce životaschopnosti a aktivity mikrobiálního společenstva [online]. [cit. 2012-11-02]. Dostupné z: <http://ekologie.upol.cz/ku/miev/AKTIVITApracovnitext.pdf>
- [17] Invitrogen [online]. LIVE/DEAD ® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells. [cit. 2012-11-05]. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>
- [18] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Fyziologie a patologie krevní buňky. Lékařská fakulta UK, Hradec Králové [online]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/uk/ke-stazeni/pecka-lh-2.pdf>
- [19] POSPÍŠILOVÁ, Jana. *Příprava primárních kultur krevních buněk*. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie [online]. [cit. 2012-11-11]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/78178/prif_b/J_P_bakalarska_prace_def.pdf

- [20] BRYCHTOVÁ, S., BEZDĚKOVÁ, M., BRYCHTA T. *Fibroblasty – buňky známé či neznámé?* Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie. Lékařská Fakulta UP, Olomouc [online]. Dostupné z: <http://www.cspatologie.cz/docs/51-abstraktCZ.pdf>
- [21] Fluorescenční barvivo. *Lékařská fakulta Olomouc: Ústav biologie* [online]. [cit. 2013-05-09]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescencni%20barvivo.htm>
- [22] Molecular probes. *Invitrogen* [online]. [cit. 2012-10-28]. Dostupné z: <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/481ph9.jpg>
- [23] Fluorescence SpectraViewer. *Invitrogen* [online]. [cit. 2012-11-11]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>
- [24] PAVLIŠTA, Libor. *Programové vybavení pro práci s mikroskopickým obrazem* [online]. 2011/2012 [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: http://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=49152. Diplomová práce. VUT Brno.
- [25] Region Of Interest Frequently Asked Questions. *National Instruments* [online]. [cit. 2013-03-12]. Dostupné z: <http://digital.ni.com/public.nsf/allkb/82C6023BCC87F5CA86256F38006D2C98>

13 Seznam obrázků

Obr. 1: Excitace a fluorescence.....	9
Obr. 2: Princip fluorescence	10
Obr. 3: Excitační a emisní spektrum Calceinu AM (při pH 9,0)	11
Obr. 4: Excitační a bariérový filtr	16
Obr. 5: Bodové ohnisko konfokálního mikroskopu	17
Obr. 6: Fluorescenční a konfokální mikroskop.....	18
Obr. 7: Excitační a emisní spektra použitých barviv.....	21
Obr. 8: Snímek zobrazující současně fluorescenci a průchozí světlo.	24
Obr. 9: Obarvené buňky s fluorescencí.	24
Obr. 10: Obarvené buňky s fluorescencí.	25
Obr. 11: Detail fluorescence fibroblastů.....	25
Obr. 12: Návrh principu metody stanovení viability.....	26
Obr. 13: Schéma pro načtení obrazových snímků z disku (LabVIEW).	28
Obr. 14: Úsek pro úpravu kontrastu a jasu (LabVIEW).	29
Obr. 15: Příklad aplikace ColorBCGLookup pro změnu kontrastu a jasu na snímku krevních buněk.	29
Obr. 16: Funkce pro výběr oblasti zájmu (LabVIEW).	30
Obr. 17: Ukázka výběru oblasti zájmu na snímku krevních buněk.....	30

Obr. 18: Schéma rozdělení barevných spekter a funkce pro převedení do odstínu šedi (LabVIEW).	31
Obr. 19: Původní snímek krevních buněk, zelená složka a červená složka.....	31
Obr. 20: Funkce pro prahování obrazu (LabVIEW).	32
Obr. 21: Příklad původního obrazu a různé stupně nastavení prahu.	32
Obr. 22: Funkce FillHole pro vyplnění děr (LabVIEW).	32
Obr. 23: Příklad funkce pro vyplnění děr na snímku krevních buněk.....	33
Obr. 24: Schéma zapojení funkce pro odstranění malých objektů v obraze (LabVIEW).	33
Obr. 25: Příklad odstranění malých objektů na snímku krevních buněk pro stupeň eroze 1. ..	34
Obr. 26: Schéma pro odstranění částic dotýkajících se okraje (LabVIEW).	34
Obr. 27: Příklad odstranění částic dotýkajících se okraje na snímku krevních buněk.	34
Obr. 28: Příklad použití funkce Count Objects na snímku krevních buněk.	35
Obr. 29: Schéma prolínání analyzovaného snímku s pozadím a následné sečtení s původním obrázkem (LabVIEW).	35
Obr. 30: Příklad postupného prolínání buněk z pozadí pomocí posuvníku.	36
Obr. 31: Sečtení analyzovaného snímku s původním obrázkem bez rámečků a s rámečky na snímku krevních buněk.	36
Obr. 32: Uživatelské prostředí programu pro vlastní analýzu buněk.	37
Obr. 33: Snímek č. 1 krevních buněk.	39
Obr. 34: Vybraná část snímku č. 1 krevních buněk.	39
Obr. 35: Snímek č. 2 krevních buněk.	40
Obr. 36: Snímek č. 1 fibroblastů.	41
Obr. 37: Vybraná část snímku č. 1 fibroblastů.....	42
Obr. 38: Snímek č. 2 fibroblastů.	42
Obr. 39: Různé nastavení prahu pro fibroblasty.	45
Obr. 40: Různé nastavení prahu pro krevní buňky.	46

14 Seznam pojmů

PI – proprium jodid

FDA – fluorescein diacetát

CFDA – diacetát carboxy fluorescein

ROS – reaktivní forma kyslíku

LSCM – laserový rastrovací konfokální mikroskop

TSCM – mikroskop s rotujícím diskem

FOV – zorné pole

EthD-1 – ethidium homodimer-1

AM - acetoxymethylester