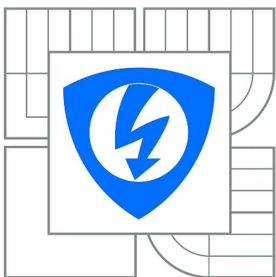


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNologiÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STANOVENÍ VIABILITY U KULTIVOVANÝCH BUNĚK POMOCÍ FLUORESCENCE

MEASUREMENT OF CULTIVATED CELLS' VIABILITY WITH FLUORESCENCE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

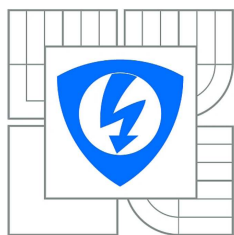
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVEL TICHÝ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2012



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Pavel Tichý
Ročník: 3

ID: 119751
Akademický rok: 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Stanovení viability u kultivovaných buněk pomocí fluorescence

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši zabývající se možnostmi a metodami měření viability živočišných buněk. Seznamte se také s podmínkami a způsoby kultivace živočišných buněk. 2) Zvolte dostupné metody měření viability kultivovaných živočišných buněk pomocí fluorescence. 3) Navrhněte postup kultivace a měření viability kultivovaných živočišných buněk alespoň dvěma možnými způsoby pomocí fluorescence. 4) Provádejte kultivaci živočišných buněk a realizujte měření viability zvolenými způsoby. 5) Porovnejte více způsobů měření viability buněk na kultivovaných živočišných buňkách. 6) Proveďte diskusi nad získanými výsledky.

DOPORUCENÁ LITERATURA:

[1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York 1993.
[2] ZAPLATÍLEK K., DONAR B. MATLAB tvorba uživatelských aplikací, BEN, Praha 2004.

Termín zadání: 6.2.2012

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Termín odevzdání: 25.5.2012

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 c. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku c.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možnostmi měření viability kultivovaných živočišných buněk pomocí jejich barvení flourescenčními indikátory. A to calceinem AM a ethidium homodimerem-1. Jsou zde také uvedeny podmínky a možnosti kultivace živočišných buněk. Dále jsou vytvořeny programy v Matlabu pro detekci viability zvolenými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Flourescenční mikroskopie, kultivace buněk, viabilita buněk, calcein AM, ethidium homodimer-1, intracelulární esterázová aktivita

ABSTRACT

This work is aimed to explain to possibilities of measuring viability of cultivated animal cells by staining cells with fluorescent probes. Fluorescent probes described in this work are calcein AM and ethidium homodimer-1. There are also mentioned conditions and possibilities of cell cultivation. Additionally there were created programs for cell's viability detection in Matlab.

KEYWORDS

Flourescence microscopy, cell cultivation, cell viability, calcein AM, ethidium homodimer-1, intracellular esterase activity,

Bibliografická citace:

TICHÝ, P. *Stanovení viability u kultivovaných buněk pomocí fluorescence*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 51 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou semestrální práci na téma Stanovení viability u kultivovaných buněk pomocí fluorescence jsem vypracoval(a) 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(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil(a) autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) 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 § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Poděkování

Děkuji vedoucímu semestrální práce Ing. Vratislavu Čmielovi, za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Kultivace živočišných buněk.....	8
3.	Kardiomyocyty.....	10
4.	Metody detekce viability.....	11
4.1.	Nefluorescenční.....	11
4.1.1.	Barvení trypanovou modří	11
4.1.2.	MTT test.....	11
4.2.	Fluorescenční	12
4.2.1.	Sondy založené na detekci integrity cytoplasmatické membrány.....	12
4.2.2.	Sondy založené na intracelulární aktivitě esteráz.....	13
4.2.3.	Sondy založené na transmembránovém potenciálu.....	14
4.2.4.	Sondy založené na intracelulárním pH.....	14
4.3.	LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit.....	14
4.3.1.	Princip metody	14
5.	Princip měření	16
5.1.	Fluorescence.....	16
5.2.	Fluorescenční mikroskop	17
5.3.	Použitá detekční jednotka.....	18
5.4.	Měření viability buněk pomocí barvení trypanovou modří	19
5.5.	Měření viability buněk pomocí barvení calceinem	20
5.5.1.	Použité filtry	20
5.6.	Měření viability pomocí kitu LIVE/DEAD®	21
5.6.1.	Použité filtry	22
5.7.	Schéma zpracování a vyhodnocení měření	23
6.	Postup měření.....	24
6.1.	Uskladnění a manipulace	24
6.2.	Příprava buněk.....	24
6.3.	Určení optimální koncentrace roztoků	24
6.4.	Aplikace reagensů na buňky	25
6.5.	Barvení trypanovou modří	25
7.	Vyhodnocení měření	26
7.1.	Detekce viability buněk pomocí trypanové modří	26
7.1.1.	Detekce všech buněk	27
7.1.2.	Detekce mrtvých buněk.....	30
7.2.	Detekce viability buněk pomocí calceinu	33
7.2.1.	Detekce všech buněk	33
7.2.2.	Detekce živých buněk	34
7.3.	Detekce viability buněk pomocí kitu LIVE/DEAD	36
7.4.	Použité matematické operace	37
7.5.	Grafické uživatelné prostředí (GUI)	41
7.6.	Výsledky.....	43
8.	Závěr.....	46
9.	Literatura	47

1. Úvod

Buněčné kultury patří mezi základní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu. Představují důležitý zdroj materiálu pro pokusy. Buněčné kultury mají v porovnání s laboratorním zvířetem nebo izolovaným orgánem zásadní výhody. Pokusy totiž probíhají na jediném typu buněk a jeho výsledky nejsou ovlivňovány jinými tkáněmi a buněčnými populacemi. Kultivované buňky jsou také velmi vhodné pro pokusy, při nichž dochází k jejich zničení. Existují však určitá omezení, některé typy buněk je obtížné kultivovat a kultivované buňky navíc rostou v kultivačním médiu, jehož složení je odlišné od složení vnitřního prostředí v organismu. Tyto in vitro kultivované buňky tedy mohou vykazovat odlišné vlastnosti, než buňky v organismu. Zdrojem živočišných buněk pro kultivaci je obvykle laboratorní zvíře (potkan, myš, králík atd.). Většina buněk je tzv. adherentních, to znamená, že rostou na vhodném povrchu. Aby buňky v laboratorních podmínkách přežily je třeba jim zajistit odpovídající podmínky a to vhodný povrch kultivační nádoby, kultivační médium, správnou teplotu (obvykle cca 37°C), atmosféru obsahující zvýšené množství CO₂ (cca 5%) a vysokou relativní vlhkost vzduchu (přes 90%). [1]

Viabilita buněk je jedním ze základních parametrů, které jsou při práci s buněčnými kulturami posuzovány. Testování viability a cytotoxicity je založeno na zjištění podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Stanovení viability buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí značení fluorescenčními sondami. Mezi tyto funkce patří např. intracelulární esterázová aktivita, integrita cytoplasmatické membrány, existence transmembránového potenciálu a intracelulární pH. Pro detekci buněk můžeme použít fluorescenční mikroskop nebo průtokový cytometr, který je ale použitelný jen pro volné buňky. [1] [2]

2. Kultivace živočišných buněk

Buňky pro založení buněčné kultury získáváme nejčastěji z pokusných zvířat. Buněčná kultura může vzniknout přímo z kousku tkáně kultivované za vhodných podmínek. Obvykle je ale nutné nejdříve izolovat jednotlivé buňky a to mechanickým rozvolněním tkáně nebo enzymatickým natrávením mezibuněčné matrix enzymy jako je např. trypsin. Takto získanou kulturu buněk označujeme jako primární kulturu. Buňky se namnoží a přenesou do nových kultivačních nádob. Tento proces se označuje jako pasáž a vzniká sekundární kultura.

Získané buňky obvykle zpravidla obsahují směs různých typů. Kulturu je proto nutné vyčistit. Použité metody mohou být různé, např. se využije toho, že zkoumané buňky mnohem rychleji přirůstají (adherují) na kultivační médium, médium také může být toxické pro ostatní typy buněk nebo lze využít centrifugaci, kdy se buňky rozdělí podle své hmotnosti. Méně husté buňky zůstávají na povrchu a hustší se propadají ke dnu. Velmi dobrou metodou je fluorescencí aktivované buněčné třídění (FACS), kdy se buňky obarví speciálními fluorescenčně značenými protilátkami proti vybraným antigenům. Buňky procházejí velmi tenkou kapilárou jedna po druhé a jsou ozařovány laserem, měříme odražené a prošlé světlo, tím určíme o jaký typ buňky se jedná, následně se buňky elektrostaticky vychýlí a jsou zachycovány v záchytných komůrkách.

Aby buňky v podmínkách *in vitro* přežily a dále se dělily je nutné, aby měly správné podmínky a to je např. hydrofilní povrch kultivační nádoby ke kterému mohou buňky přirůst. Některé typy buněk (např. krevní původu) naopak vyžadují kultivaci v suspenzi. V tomto případě je s kultivační nádobou neustále pohybováno. Velká většina buněk vyžaduje teplotu okolo 37°C a atmosféru s obsahem cca 5% CO₂ a vlhkost asi 90% a hodnotu pH přibližně 7,4. Kultivační médium vytváří tenkou vrstvu kapaliny nad buňkami a mělo by mít složení blízké složení extracelulární tekutiny. Toto médium obsahuje anorganické soli, pufrý, glukózu, vitamíny, růstové faktory a další potřebné látky. Směs solí obsahuje např. Earlov vyvážený roztok solí nebo Dulbeccův roztok solí pufovaný fosfáty (D-PBS). Do kultivačních médií může být také přidáno sérum, které doplňuje růstové faktory, inhibitory proteáz nebo napomáhá adhezi buněk. Používá se např. bovinní sérum nebo sérum získané z telecích zárodků. Sérum má také vliv na růst a diferenciaci buněk.

Buňky se v buněčné kultuře množí téměř exponenciálně a to až do chvíle, kdy se začnou navzájem těsně dotýkat. Krátce před tím, než kultura dosáhne tohoto stavu je vhodné buňky naředit a přemístit do nových nádob. Adherentní buňky je třeba oddělit od povrchu kultivační nádoby. Proto je nutné odstranit hořčíkové a vápenaté ionty opláchnutím buněk roztokem EDTA a krátké natrávení trypsinem.

Většinu buněk nelze kultivovat donekonečna. Po několika pasážích dojde k zestárnutí kultury a buňky se už nedělí. Někdy k zestárnutí nedojde a buňky se dělí neomezeně, tyto kultury se označují jako imortalizované. Tuto vlastnost mají obvykle kultury tvořené nádorovými buňkami. [1] [2] [3] [4]

Izolace kardiomyocytů

Kardiomyocyty byly získány z dospělých potkanů (*Rattus norvegicus*) metodou enzymatické disociace. Vyoperovaná srdce byla skrze aortu promývána po dobu 30s roztokem Tyrodu (0,9 mmol/l CaCl_2) při konstantním průtoku 5ml/min. Dále byla srdce promývána bezvápenatým roztokem Tyrodu obsahujícím kolagenázy a proteázy. Následně byly srdeční komory rozděleny na malé kousky. Kousky byly uchovány v roztoku Tyrodu a jemně promíchány. Po 30s bylo médium vyměněno za standardní roztok Tyrodu (0,9 mmol/l CaCl_2) a opět promíchány po dobu 10s.*

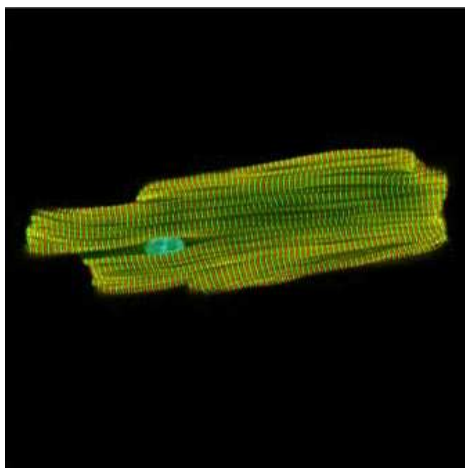
Kultivace kardiomyocytů

Primární neonatální potkanní kardiomyocyty byly získány z 2 - 5 dní starých potkanů. Potkani byly uspáni diethyl éterem a zabiti dekapitací. Srdce byla vyjmuta a disociována ve vyváženém roztoku solí obsahujícím 20mM HEPES, 120 mM NaCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 5.5 mM glukózy, 5,4 mM KCl a 0.8 mM MgSO_4 (pH 7,3–7,4). Kardiomyocyty byly izolovány natrávením trypsinem následně byly buňky umístěny do média sestávajícího z DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a média 199 (1:4) a přidavkem koňského séra (10%), séra z telecích zárodků (5%), penicilinu (100 $\mu\text{g/ml}$) a streptomycinu (100 $\mu\text{g/ml}$). Buňky byly nechány v kultivační nádobě po dobu 1,5 - 2 hodiny, aby se umožnila adheze ostatních typů buněk (srdeční fibroblasty). Neadhesivní buňky (kardiomyocyty) byly přeneseny, omyty a zcentrifugovány po dobu 10 min při 1200 min^{-1} . Suspenze buněk byla přenesena do kultivačních nádob pokrytých kolagenem v množství 50000 buněk na cm^2 . Buňky byly kultivovány po dobu 72 hodin při teplotě 37°C , koncentraci kyslíku 21% a koncentraci CO_2 5%. Pak bylo kultivační médium nahrazeno médiem obsahujícím DMEM, roztok 199 (1:4), penicilin (100 $\mu\text{g/ml}$) a streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$).*

* *Protokoly k izolaci a kultivaci kardiomyocytů byly laskavě poskytnuty Mgr. Skopalíkem z Masarykovy univerzity v Brně*

3. Kardiomyocyty

Kardiomyocyt je základní stavební jednotkou příčně pruhované svalové tkáně srdce. Kardiomyocyty jsou vyplněny paralelně uspořádanými myofibrilami, které se skládají z tenkých aktinových filament a tlustých myosinových filament. Jedná se o cylindrické buňky dlouhé cca 90 μm a široké cca 15 μm se specifickými mitochondriemi vyrábějícími velké množství energie aerobním metabolismem pro nepřetržitou práci srdce. [5]



Obr. 1: Snímek kardiomyocytu z konfokálního fluorescence mikroskopu [6]

Kardiomyocyty lze získávat přípravou z embryonálních kmenových buněk získané např. z myších embryí. Tyto buňky patří mezi pluripotentní kmenové buňky, pro něž je typická schopnost sebeobnovy a diferenciaci do všech tří zárodečných listů. Embryonální kmenové buňky musí být v průběhu kultivace stimulovány různými chemickými látkami, aby došlo k jejich diferenciaci v kardiomyocyty. Embryonální kmenové buňky se poprvé podařilo izolovat z pokusných myší v roce 1981 vědcům Martinovi a dále Evansovi a Kaufmanovi. Lidské embryonální kmenové buňky se podařilo izolovat až v roce 1998 týmu Jamese Thomsona. U myší se získávají embryonální kmenové buňky z 3,5 denního embrya a u lidí z 5. až 6. denního. [1]

4. Metody detekce viability

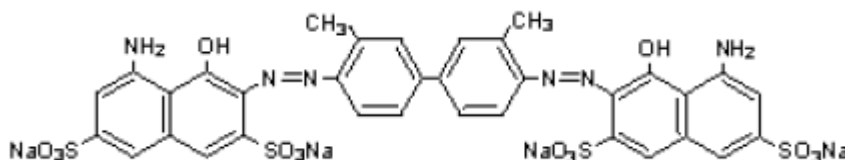
Metod detekce viability existuje celá řada. Zde jsou popsány jednak základní nefluorescenční a zejména pak metody využívající fluorescenci.

4.1. Nefluorescenční

Tyto metody využívají obarvení zkoumaných buněk vhodným indikátorem. Detekce viability může probíhat např. pomocí spektrofotometru.

4.1.1. Barvení trypanovou modří

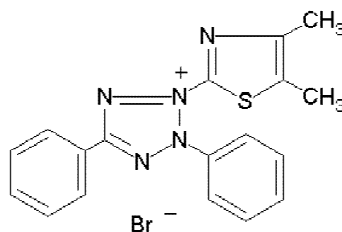
Jedná se o nejčastěji používanou metodu detekce viability buněk. Na buňky se aplikuje 0,4% roztok trypanové modři. Trypanová modř je z buněk aktivně transportována ven. Živé buňky tedy zůstávají bezbarvé, buňky s porušenou cytoplasmatickou membránou se zbarví do modra.



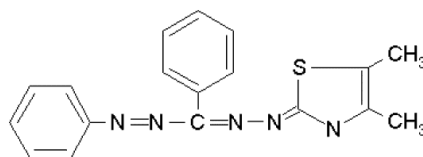
Obr.2: Strukturní vzorec trypanové modři [7]

4.1.2. MTT test

Tato metoda je založena na redukci žlutého MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan. K redukci MTT dochází na mitochondriálních membránách živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce cca 540 nm. Hodnota absorpance určuje procento živých buněk (čím vyšší, tím více živých buněk). Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky. Princip konverze byl popsán v roce 1954 Blackem a Speerem a metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk). [8]



Obr. 3: Vzorec MTT [9]



Obr. 4: Vzorec formazanu [9]

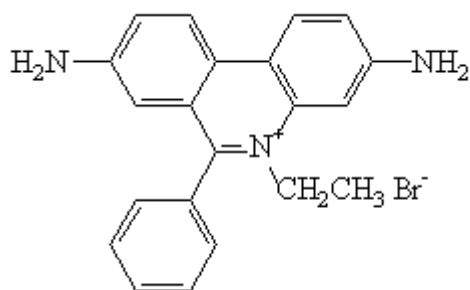
4.2. Fluorescenční

Fluorescenční metody detekce viability lze rozdělit do několika následujících skupin: nejčastějšími jsou měření intracelulární esterázové aktivity, sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu, dále může být využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH.

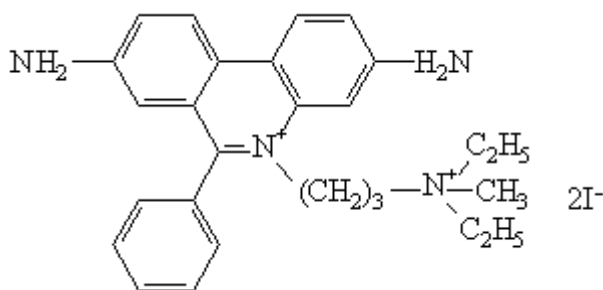
4.2.1. Sondy založené na detekci integrity cytoplasmatické membrány

Stanovení viability buněk pomocí detekce integrity cytoplasmatické membrány je založeno na použití látek, které za normálních okolností do buňky nepronikají nebo jsou rychle vylučovány ven z buněk. Je-li cytoplasmatická membrána porušená použitá látka se naváže na nukleové kyseliny a její fluorescence se zvýší nebo dojde k posunu spektra fluorescence. Buňky s porušenou cytoplasmatickou membránou nejsou považovány za životaschopné.

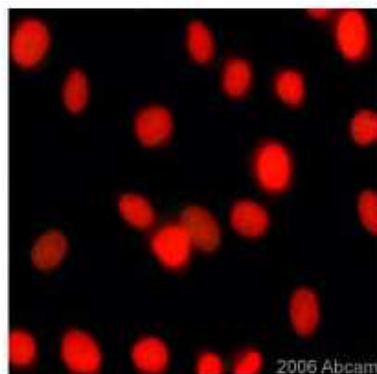
Typické fluorescenční sondy tohoto typu jsou ethidium bromid a propidium jodid. Propidium jodid je fenentrolinové interkalační činidlo, které se váže na nukleové kyseliny. Po jeho navázání se intenzita fluorescence zvýší a zároveň se posune její spektrum k červené. Ethidium bromid proniká do buněk, avšak živá buňka jej vytěsňuje ven. Ethidium bromid je vhodný k detekci menších poškození buněčných funkcí než propidium jodid. Možnou alternativou k těmto sondám jsou barviva SYTOX od firmy Molecular probes. U těchto sond dochází až k 500 násobnému zesílení fluorescence po vazbě na nukleové kyseliny. Proto jsou vhodná především pro bakterie, které obsahují méně nukleových kyselin, než živočišné buňky. Další vhodnou látkou je také ethidium homodimer, o kterém se zmíním později. [2]



Obr. 5: Vzorec ethidium bromidu [2]



Obr. 6: Vzorec propidium jodidu [2]

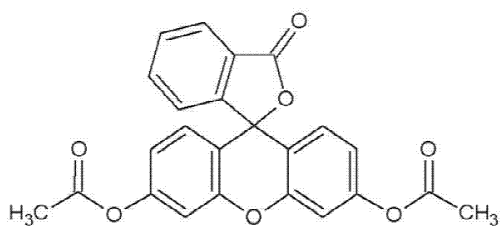


Obr. 7: Potkaní fibroblasty barvené propidium jodidem [10]

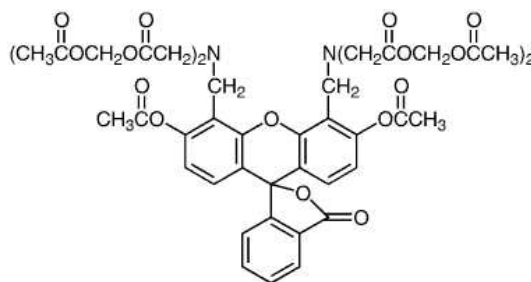
4.2.2. Sondy založené na intracelulární aktivitě esteráz

V tomto případě se využívají především lipofilní nefluorescenční látky schopné pronikat do buněk difuzí, následně jsou enzymaticky přeměněny na látky fluorescenční nesoucí náboj. Proto jsou tyto látky v buňkách zadržovány. Tyto sondy jsou navíc závislé na integritě cytoplasmatické membrány, protože je-li tato membrána porušena, jsou tyto látky vyplavovány ven z buňky.

Příkladem sond této kategorie je např. fluorescein diacetát (FDA), karboxylfluorescein diacetát (CFDA) nebo calcein AM. FDA rychle difunduje do buněk, ale vniklý fluorescein je špatně zadržován. CFDA pomaleji proniká do buněk, avšak po hydrolýze je v buňkách lépe zadržován. Calcein AM (AM znamená acetoxymethyl ester) je součástí komerčního kitu LIVE/DEAD od firmy Molecular Probes a bude dále popsán v této práci. [2]



Obr. 8: Vzorec fluorescein diacetátu [2]



Obr. 9: Vzorec calceinu AM [2]

4.2.3. Sondy založené na transmembránovém potenciálu

Transmembránový potenciál je udržován činností iontových pump a může tedy být považován za jeden ze znaků životaschopnosti buňky. Používáme tzv. distribuční sondy, jsou to lipofilní barviva, která mohou volně pronikat cytoplasmatickou membránou.

Existují kationické sondy, které se vychytávají v polarizovaných buňkách. Příkladem takové sondy může být rhodamin 123. Pak existují anionické sondy, které se hromadí v depolarizovaných buňkách, jako je např. bis-oxonol (BOX). Použití těchto sond pro měření viability je obtížné, protože koncentrace barviv v intracelulární tekutině je také ovlivněna propustností obalových vrstev, činností iontových kanálů, velikostí buněk atd. [2]

4.2.4. Sondy založené na intracelulárním pH

Hodnota intracelulárního pH je dalším ukazatelem viability buňky. Živá buňka má schopnost udržovat stálé intracelulární pH. Detekovat změnu intracelulárního pH je možné pomocí sond, jejichž excitační a emisní spektra se mění v závislosti na pH. Takovou sondou může být fluorescein, karboxylfluorescein nebo karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester (CFSA-SE). Tato metoda může být použita i pro bakterie. [2]

4.3. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit

LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit od firmy Molecular Probes představuje dvoubarevný fluorescenční test viability živočišných buněk založený na současné detekci živých a mrtvých buněk pomocí dvou fluorescenčních sond. Tyto sondy měří viabilitu na základě intracelulární esterázové aktivity a integrity cytoplasmatické membrány. Bylo zjištěno, že Calcein AM a Ethidium homodimer-1 jsou nejvhodnější indikátory pro toto použití.

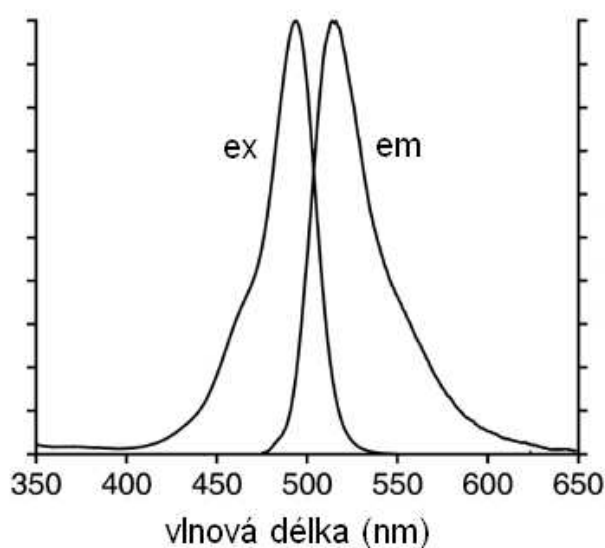
Tento kit je vhodný pro použití s fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovým cytometrem a jinými systémy založenými na detekci fluorescence. Tento kit je použitelný pro většinu eukariotických buněk, ne však pro bakterie nebo kvasinky. Tato metoda je spolehlivější a mnohem více citlivá než barvení trypanovou modří.

Spolehlivost LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity testu byla ověřena řadou laboratoří. Publikované výsledky zahrnují měření cytotoxického efektu faktoru nádorové nekrózy (TNF), β -amyloid proteinu, tetradotoxinu (TTX) vážícího se na sodíkové kanály a další. [11]

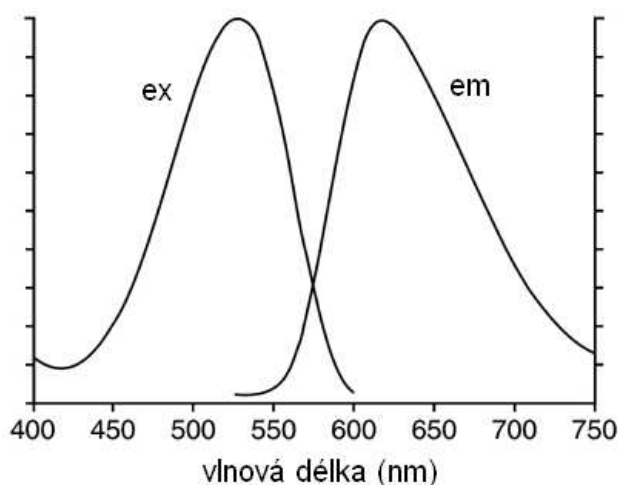
4.3.1. Princip metody

Živé buňky jsou charakterizovány přítomností intracelulární esterázové aktivity. Původně nefluorescenční calcein AM je enzymaticky rozštěpen na silně fluorescenční calcein.

Calcein je dobře zadržován v živých buňkách a vydává silnou flourescenci zelené barvy (cca 515 nm). Ethidium homodimer-1 (EthD-1) proniká do buněk s porušenou cytoplasmatickou membránou a jeho fluorescence se 40x zvýší po vazbě na nukleové kyseliny. Takto vázaný EthD-1 se projevuje jasně červenou flourescencí (cca 635 nm). EthD-1 je z živých buněk vylučován. Zjištění viability buňky záleží na fyzikálních a biochemických vlastnostech buňky. Cytotoxicita, která neovlivňuje integritu cytoplasmatické membrány nebo intracelulární esterázovou aktivitu nemusí být zjistitelná touto metodou. Flourescence pozadí je při použití této metody velmi nízká, protože tyto látky téměř nevykazují flourescenci dokud nedojde k reakci v buňkách. [11]



Obr. 10: Excitační a emisní spektrum calceinu AM [12]

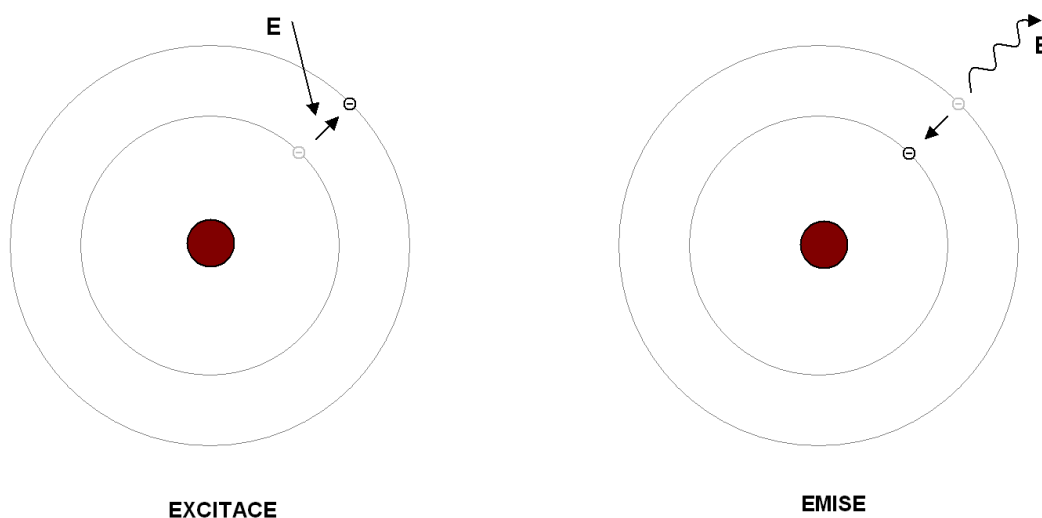


Obr. 11: Excitační a emisní spektrum EthD-1 vázaného na nukleové kyseliny [13]

5. Princip měření

5.1. Fluorescence

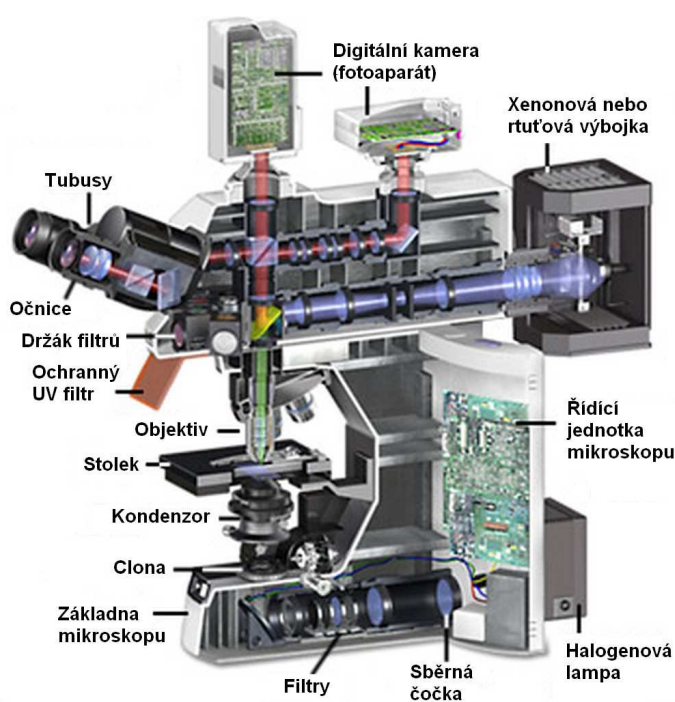
Atomy se nacházejí buď v základním energetickém stavu nebo ve stavu excitovaném. Základní energetický stav je charakterizován minimální hodnotou energie elektronů. Excitace znamená, že 1 nebo více elektronů dostávají na vyšší energetické hladiny. K tomu je potřeba, aby atom absorboval energii, která je rovna minimálně rozdílu mezi základní energetickým stavem a energií výsledného stavu. Extrémním případem excitace je ionizace, v tomto případě elektrony zcela opouští elektrostatické pole jádra atomu. Excitovaný atom se v excitovaném stavu nachází jen velmi krátkou dobu (10^{-8} - 10^{-5} s), poté elektrony obsazují nižší energetické hladiny. To je provázeno vznikem kvanta elektromagnetického záření. Na základě toho vznikají emisní spektra atomů a molekul. Některé excitované stavy mají vyšší pravděpodobnost a vzniká metastabilní stav. V metastabilním stavu mohou atomy existovat mnohonásobně delší dobu, minuty až hodiny. Elektromagnetické záření vznikající při přechodu atomů nebo molekul z excitovaného stavu do základního stavu se označuje jako luminiscence. Luminiscenci rozdělujeme na fluorescenci, pokud metastabilní stav trvá jen krátce a na fosforescenci, pokud metastabilní stav trvá déle. [14]



Obr. 12: Znárodnění excitace a emise

5.2. Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je modifikací klasického optického mikroskopu. Od něho se liší zejména použitím dalšího zdroje světla (xenonová nebo rtuťová výbojka), dichroickým zrcadlem a použitím excitačního a emisního (bariérového) filtru. Xenonové výbojky místo halogenové žárovky jako zdroje světla se používá z toho důvodu, že řada fluorescenčních indikátorů vyžaduje excitaci UV zářením. Mikroskopický obraz vzorku může být pozorován přímo očními nebo častěji zaznamenáván speciální CCD kamerou nebo digitálním fotoaparátem. Takto zaznamenaný obraz nebo videozáznam je obvykle dále zpracováván a vyhodnocován.

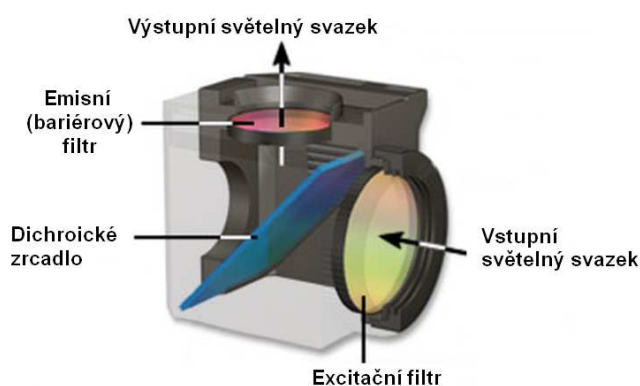


Obr. 13: Schéma fluorescenčního mikroskopu [15]



Obr. 14: Rtuťová výbojka pro fluorescenční mikroskopii

Světlo z xenonové výbojky prochází nejprve excitačním filtrem, který omezí spektrum světla jen na požadovaný rozsah vlnových délek. Následně se světlo odráží od dichroického zrcadla a přes objektiv ozáří vzorek. Dichroické zrcadlo je velmi přesný barevný filtr, který dokáže odrážet nebo propouštět světlo v závislosti na jeho vlnové délce. Ve vzorku dojde k excitaci fluorescenčního indikátoru a okamžitě dojde k emisi záření o delší vlnové délce. Toto emitované záření prochází dichroickým zrcadlem přímo a dále jsou z něj emisním (bariérovým) filtrem vyfiltrovány požadovaný rozsah vlnových délek. Takto vyfiltrovaný světelný svazek míří k CCD kameře nebo fotoaparátu, kde je nasnímán. Dichroické zrcadlo, excitační a emisní filtr dohromady tvoří tzv. fluorescenční kostku, která je základní součástí fluorescenčního mikroskopu.



Obr. 15: Fluorescenční kostka [15]

5.3. Použitá detekční jednotka

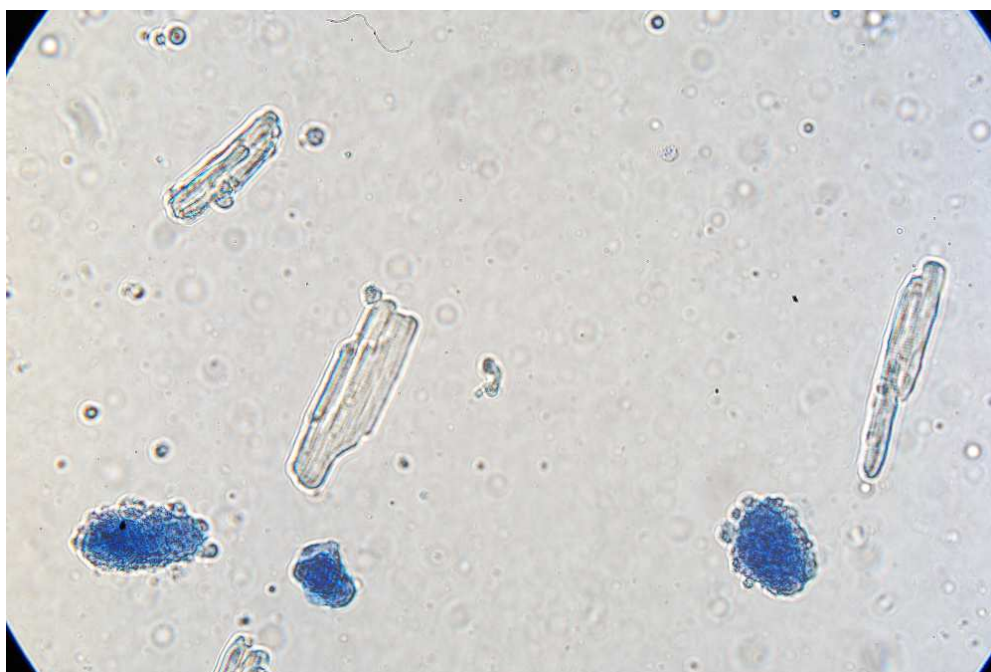
Ke snímání obrazu z fluorescenčního mikroskopu použijeme digitální fotoaparát Nikon D80. Tento fotoaparát je vybaven CCD senzorem o rozměrech 23,6mm × 15,8mm a rozlišení 10,2 megapixelů. Citlivost je nastavitelná v rozmezí ISO 100 až ISO1600. Snímky o rozměrech 3872 × 2592 pixelů jsou ukládány ve formátu JPEG na paměťovou kartu typu SD. Fluorescenční kamera je pro naše použití nevhodná, protože má malé rozlišení a snímá obraz jen v odstínech šedi. Použitý fotoaparát má oproti fluorescenční kameře nevýhodu v jeho nižší citlivosti a tedy v nutnosti používat delší časy expozice. To ale v našem případě nevadí, protože použité buňky se nehýbou a tzv. fotovybělování (photobleaching), tedy slábnutí fluorescence použitých fluorescenčních indikátorů v důsledku intenzivního ozařování je minimální. [16] [17]



Obr. 16: Nikon D80 [16]

5.4. Měření viability buněk pomocí barvení trypanovou modří

Detekce viability buněk za použití trypanové modři je základní a nejjednodušší používaná metoda. Je založena na skutečnosti, že tmavě modré barvivo trypanová modř je živými buňkami aktivně transportováno z jejich intracelulárního prostředí. Živé buňky jsou tedy nezbarvené a mrtvé sytě modré. Tato metoda patří k méně citlivým a lehce poškozené buňky obvykle zůstávají nezbarvené. Velkou výhodou tohoto způsobu barvení buněk je ale to, že k měření stačí běžný světelný mikroskop.



Obr. 17: Izolované potkaní kardiomyocyty barvené trypanovou modří

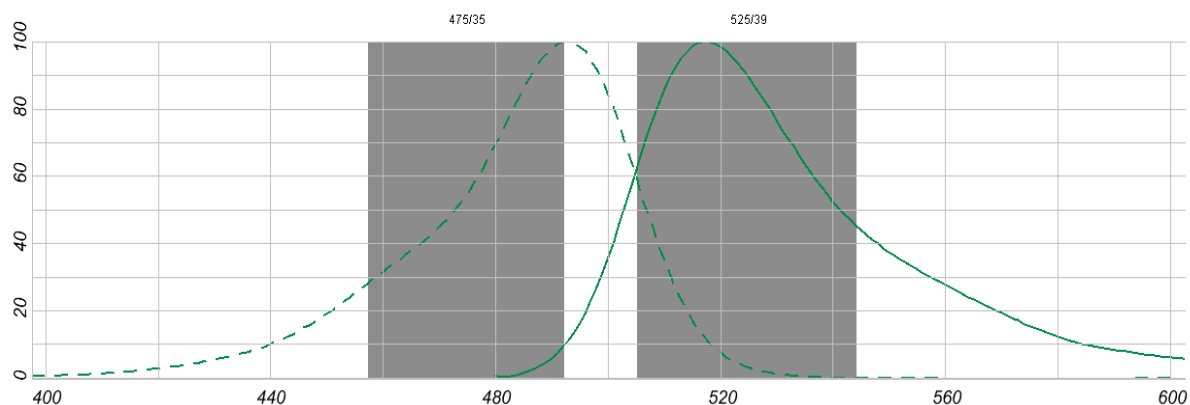
5.5. Měření viability buněk pomocí barvení calceinem

V tomto prvním případě použijeme k detekci viability buněk calcein AM. Calcein AM je fluorescenční sonda, která dobře proniká do buněk a v živých buňkách je navíc dobře zadržována. Po excitaci vydává jasně zelené světlo o vlnové délce cca 515nm. V mrtvých buňkách, které už nemají intracelulární esterázovou aktivitu calcein AM nebude rozštěpen na fluorescenční calcein a tyto buňky tedy nebudou v obraze viditelné. Abychom mohli detekovat, jak živé, tak i mrtvé buňky potřebujeme další snímek zkoumaných buněk, tentokrát nefluorescenční snímek ve světlém poli. Tento snímek zobrazí všechny buňky, bez ohledu na to, zda jsou živé nebo ne. Počet mrtvých buněk získáme jednoduše tím, že odečteme počet živých buněk (obarvených calceinem) od celkového počtu buněk ze snímku ve světlém poli. [11]

5.5.1. Použité filtry

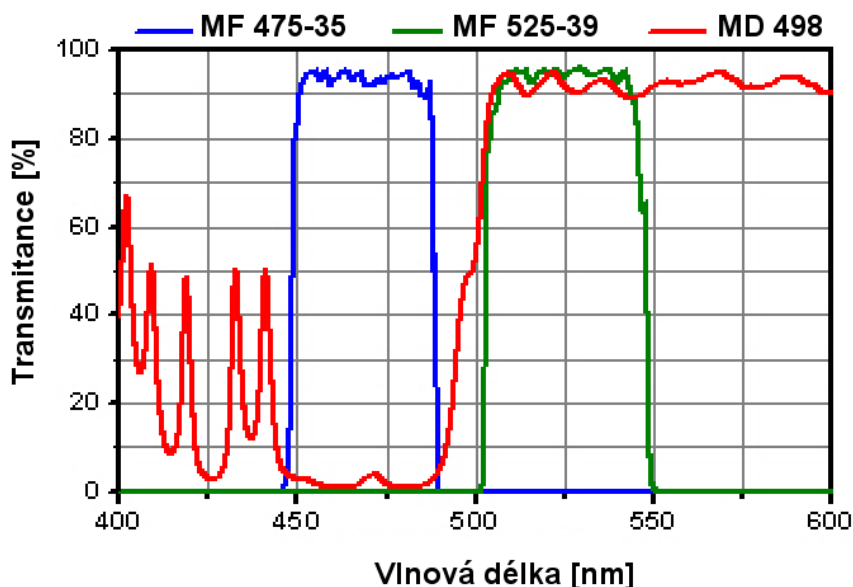
Použity budou filtry od firmy Thorlabs. V našem případě se jedná o sadu MDF-GFP, která je určena k pozorování vzorků barvených GFP (green fluorescent protein). Vlastnosti filtrů v této sadě jsou pro naše účely vhodné.

Sada sestává z těchto filtrů: excitačního filtru MF 475-35, dichroického zrcadla MD 498 a emisního filtru MF 525-39. První číslo v názvu filtru značí střední přenášenou vlnovou délku, číslo za pomlčkou pak šířku pásma. [18]



Obr. 18: Excitační a emisní spektra calceinu a filtry [19]

Na obrázku č.18 jsou zobrazena excitační spektra (čárkovaná čára) a emisní spektra calceinu a také přenášena pásma zvolených filtrů. První šedý pruh patří excitačnímu filtru a druhý filtru emisnímu.



Obr. 19: Spektra použitých filtrů [20]

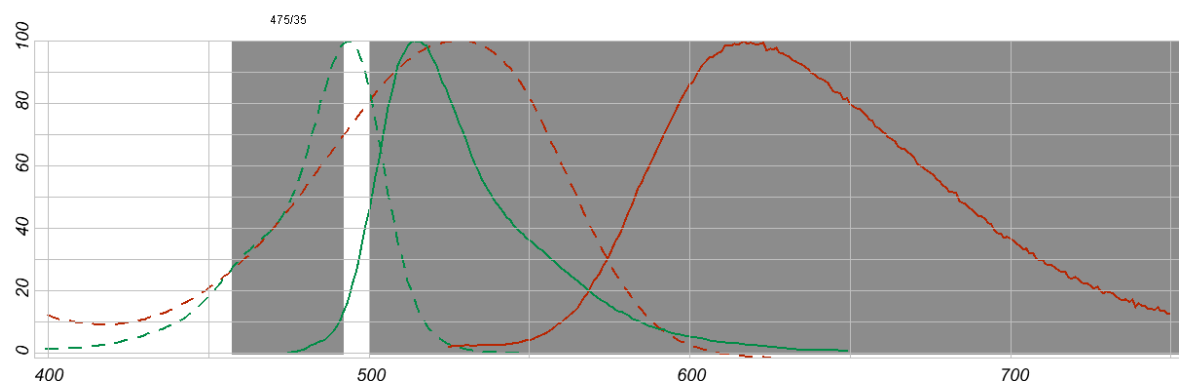
Excitační filtr MD 475-35 propouští vlnové délky v rozsahu 450 - 475 nm, tedy modrou část spektra. Na obrázku můžeme vidět, že dichroické zrcadlo MD 498 odráží světlo vlnových délek 450 - 490 nm a propouští vlnové délky 500 nm a vyšší. Emisní filtr MF 525-39 propouští světlo o vlnových délkách 505 - 590 nm.

5.6. Měření viability pomocí kitu LIVE/DEAD®

Zde budeme detekovat viabilitu buněk pomocí kitu LIVE/DEAD od firmy Molecular Probes. Tento kit obsahuje dvě fluorescenční sondy a to calcein AM, který byl použit v předchozím případě a ethidium homodimer-1 (EthD-1). EthD-1 je látka, která proniká do buněk s porušenou cytoplasmatickou membránou a po vazbě na nukleové kyseliny silně (až 40x) zvýší svou fluorescenci. EthD-1 vydává červené světlo o vlnové délce cca 635nm. Excitační spektra calceinu a EthD-1 se překrývají a je proto možné použít excitační filtr MF 475-35 jako v předchozím případě. Na rozdíl od barvení samotným calceinem, v tomto případě uvidíme živé (zelené) a mrtvé (červené) buňky v jednom obraze. Vyžaduje to však použít barevný fotoaparát pro zachycení obrazu. Při použití černobílé fluorescenční kamery by nebylo možné rozlišit mrtvé buňky od živých. Rozsah vlnových délek emitovaného světla je zde větší, než v předchozím případě. Z toho důvodu nepoužijeme emisní filtr. Snímány tedy budou vlnové délky delší než cca 500nm. [11]

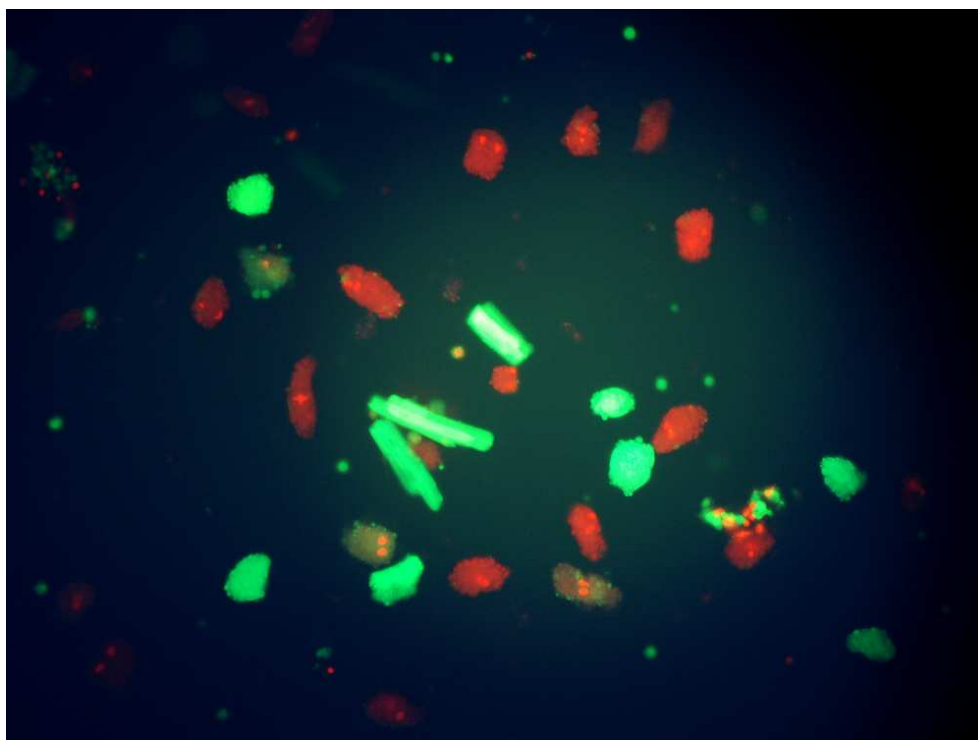
5.6.1. Použité filtry

Excitační filtr MF 475-35 a dichroické zrcadlo MD 498 použijeme stejné, jako při barvení samotných calceinem, protože excitační spektra calceinu a EthD-1 se částečně překrývají. Emisní filtr je potřeba použít takový, aby propouštěl vlnové délky 500 nm a delší.



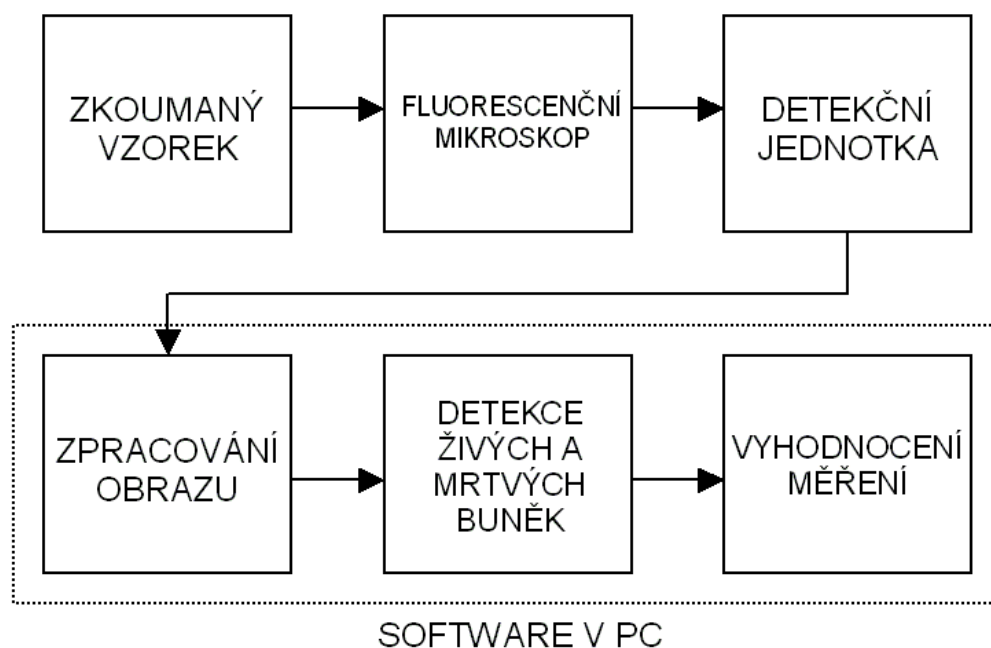
Obr. 20: Excitační a emisní spektra calceinu a EthD-1 a filtry [19]

Z obrázku č.20 je patrné překrývání excitačních spekter calceinu a EthD-1 (zelená čára patří calceinu, červená EthD-1). První šedý pruh zobrazuje pásmo přenášené emisním filtrem MF 475-35, druhý šedý pruh ukazuje rozsah vlnových délek, které by měly být propouštěny emisním filtrem. Použité dichroické zrcadlo propouští vlnové délky nad cca 500 nm.



Obr. 21: Izolované kardiomyocyty barvené kitem LIVE/DEAD

5.7. Schéma zpracování a vyhodnocení měření



Obr. 22: Schéma zpracování a vyhodnocení měření

Na obr. 22 je uvedeno jednoduché blokové schéma vlastního měření a vyhodnocení získaných výsledků. Obraz zkoumaných buněk je zobrazován fluorescenčním mikroskopem a snímán detekční jednotkou, v našem případě digitálním fotoaparátem Nikon D80. Získaný snímek zkoumaných buněk je nutné dále zpracovávat. Konkrétní postup závisí na použité metodě. Zejména je nutné obrázek oříznout a tím vybrat tzv. oblast zájmu, protože jas fluorescenčního snímku je nehomogenní (okraje obrazu jsou tmavé). Dále je nutné získat dva obrazy, jeden obsahující živé buňky a druhý obsahující buňky mrtvé. To je možné udělat např. tak, že si zobrazíme pouze zelený kanál, kde budou živé buňky barvené calceinem jasně světlé a pozadí mrtvé buňky tmavé a naopak obraz mrtvých buněk získáme zobrazením pouze červeného kanálu. V případě měření pouze za použití calceinu bude potřeba program modifikovat tak, aby z obrazu buněk ve světlém poli detekoval všechny buňky. V dalším kroku se zvýší jas a kontrast obrazu a provede se prahování pro oddělení buněk od pozadí. Následně na obraz aplikujeme matematické morfologické operace, jako je např. binární otevření, jehož účelem je odstranit z obrazu drobné objekty, které by byly jinak falešně detekovány jako buňky. U snímku buněk ve světlém poli je nutné použít funkci pro detekci hran. Posledním krokem je samotná detekce buněk z takto upravených obrazů a jejich spočítání. Výsledkem je tedy zjištění počtu živých a mrtvých buněk ve zkoumaném vzorku, respektive jejich procentuální zastoupení, které vypovídá o viabilitě buněk v celé buněčné kultuře. Bližší popis postupu vlastní detekce je popsán v kapitolách 7.1, 7.2 a 7.3.

6. Postup měření

Zde popsaný postup měření je určen pro kit LIVE/DEAD, v případě barvení samotným calceinem je postup stejný, jen se vynechá EthD-1.

6.1. Uskladnění a manipulace

Reagencie by měly být skladovány uzavřené, v suchu a tmě při teplotě -20°C a nižší. Nechte reagencie ohřát na pokojovou teplotu a centrifugujte je krátce před otevřením. Před opětovným zmrazením dobře uzavřete lahvičky. Calcein AM je náchylný k hydrolýze pokud je vystaven vlhkosti. Připravený vodný roztok Calceinu AM je třeba použít do 24 hodin od namíchání. EthD-1 je stabilní po dlouhou dobu. Neředěný roztok EthD-1 v DMSO může být skladován při teplotě -20°C nebo nižší nejméně 1 rok. [11]

6.2. Příprava buněk

Volné buňky je třeba nejdříve zcentrifugovat. Omyjte buňky před aplikací reagentů. Omytím je třeba odstranit esterázy a další nežádoucí látky z média, na kterém buňky kultivujeme. Esterázy by ovlivnily výsledek měření. Aplikujte na buňky cytotoxickou látku, jejíž cytotoxicitu chcete zjišťovat před barvením LIVE/DEAD. [11]

6.3. Určení optimální koncentrace roztoků

Optimální koncentrace roztoků kolísají v závislosti na použitém typu buněk. Nejlepších výsledků se dosáhne, když budeme nejprve barvit živé buňky calceinem a posléze nabarvíme mrtvé buňky EthD-1. Obecně je nejvhodnější použít nejnižší koncentraci, se kterou ještě dosáhneme dostatečně silné fluorescence.

1. Vyjměte LIVE/DEAD kit z mrazicího boxu a nechte reagencie ohřát na pokojovou teplotu.
2. Připravte si vzorky živých a mrtvých buněk na skleněných sklíčkách. Vzorek mrtvých buněk lze připravit např. zabitím živých buněk 0,1% roztokem saponinu po dobu 10min nebo 70% roztokem metanolu po dobu 30min atd.
3. Na vzorek mrtvých buněk aplikujeme roztok EthD-1 v takové koncentraci, aby se jádra buněk obarvila jasně červeně a zároveň tak, aby nedošlo k výraznému zabarvení cytoplasmy.
Vyzkoušejte koncentrace od $0,1\mu\text{mol/l}$ do $10\mu\text{mol/l}$.

4. Na vzorek mrtvých aplikujte calcein v koncentraci nezpůsobí výrazné obarvení cytoplasmy mrtvých buněk.
Vyzkoušejte koncentrace od 0,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 $\mu\text{mol/l}$.
5. Na vzorku živých buněk vyzkoušejte, zda koncentrace roztoku calceinu použitá v předchozím kroku způsobí dostatečnou fluorescence v živých buňkách.
Pokud ne, je třeba zvýšit koncentraci calceinu.
6. Koncentrace reagensů zjištěné v krocích 3 - 5 by měly být optimální pro zvolený typ buněk.

6.4. Aplikace reagensů na buňky

1. Přidejte na buňky 100 - 150 μl pracovního roztoku v koncentraci určené v předchozím kroku na povrch čtvercového krycího sklíčka, tak aby byly buňky zcela ponořeny v roztoku. Inkubace by měla probíhat v zakrytých petriho miskách, aby se zabránilo kontaminaci nebo vysychání vzorku.
2. Inkubujte buňky po dobu 30 - 45min při pokojové teplotě.
3. Následně přidejte 10 μl čerstvého pracovního roztoku LIVE/DEAD nebo fosfátového pufru (D-PBS) na čisté podložní sklíčko.
4. Pomocí pinzety otočte a vložte krycí sklíčko na podložní sklíčko. K omezení vysychání vzorku můžete utěsnit krycí sklíčko natřením okrajů sklíčka např. lakem na nehty.
5. Pozorujte obarvené buňky pod mikroskopem.

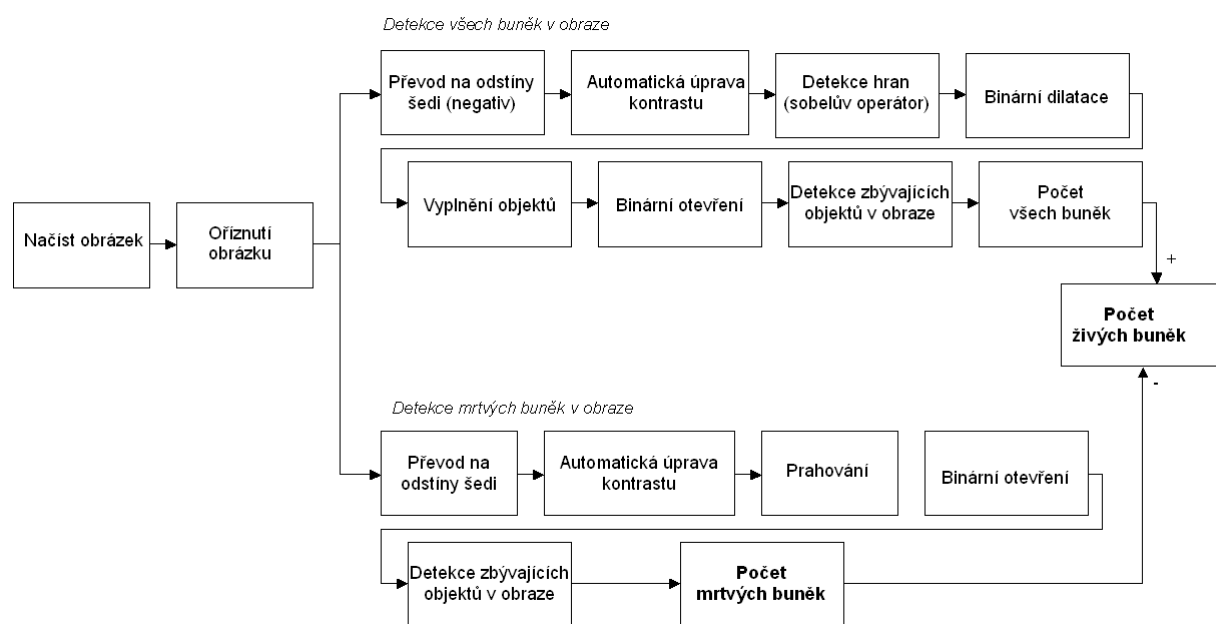
6.5. Barvení trypanovou modří

1. Napipetujte roztok zkoumaných buněk do zkumavky v případě, že pracujete s izolovanými buňkami.
2. Přidejte na buňky 0,4% roztok trypanové modři v poměru 1:5.
3. Dobře promíchejte.
4. Nechte v klidu inkubovat po dobu cca 5min. při pokojové teplotě.
5. Pozorujte buňky pod mikroskopem. [21]

7. Vyhodnocení měření

Vyhodnocení výsledků měření viability buněk získaných třemi výše popsanými metodami probíhá pomocí programu v Matlabu. V následujících podkapitolách je popsána struktura těchto programů a vysvětleny matematické operace používané v těchto programech.

7.1. Detekce viability buněk pomocí trypanové modři



Obr. 23: Principiální schéma detekce viability buněk pomocí trypanové modři

Prvním krokem je načtení obrázku zkoumaných buněk ve světlém poli a eventuální oříznutí obrázku pro odstranění nepoužitelných částí obrazu. Následuje zpracování obrazu, které musí proběhnout dvakrát. Nejprve detekujeme všechny buňky přítomné v obraze a následně jen buňky mrtvé.

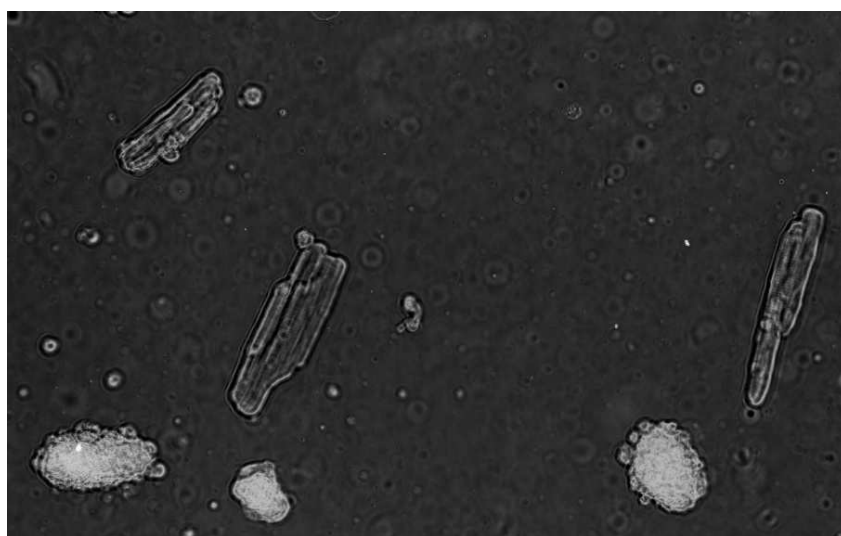
7.1.1. Detekce všech buněk

Převod barevného obrazu na odstíny šedi

K převodu původního barevného obrazu na šedotónový použijeme nejdříve funkci `imadjust`, která s vhodně nastavenými parametry převede obraz do negativu. K vlastnímu převodu obrazu do odstínů šedi je použita funkce `rgb2gray`.



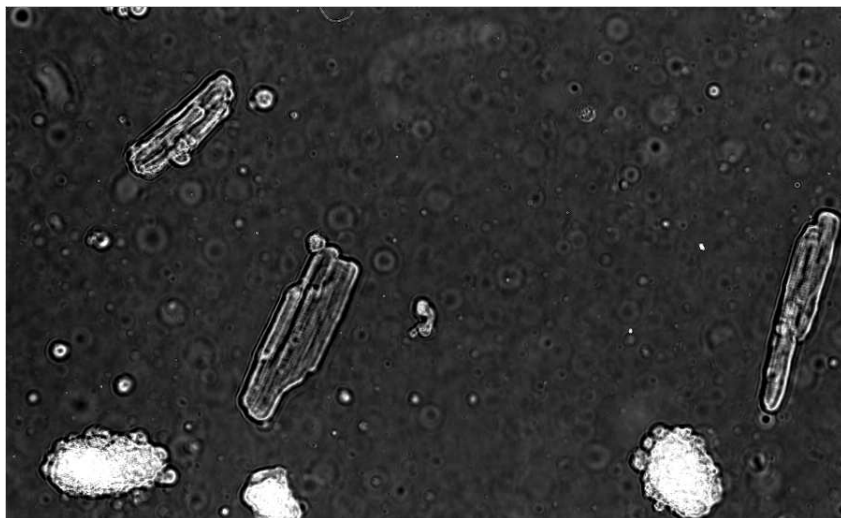
Obr. 24: Původní obrázek buněk ve světlém poli



Obr. 25: Šedotónový obrázek buněk v negativu

Automatická úprava kontrastu

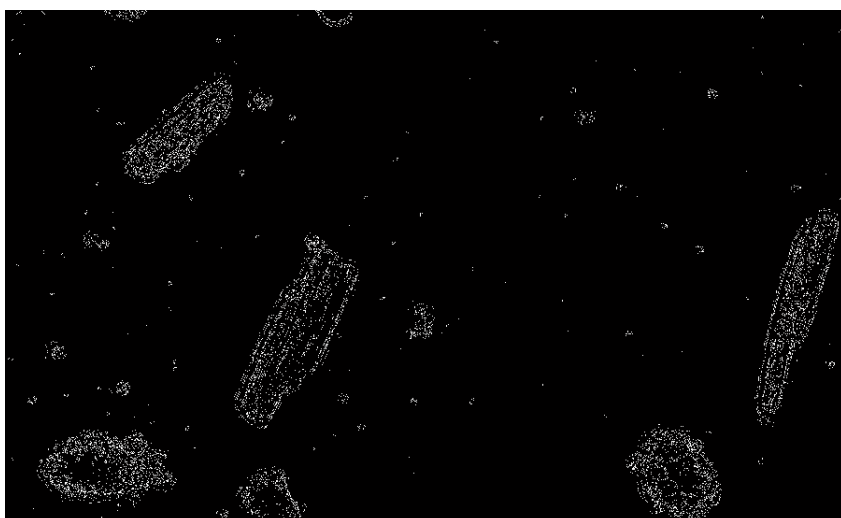
Využijeme funkce `imadjust`, která upraví kontrast výsledného obrázku tak, že nejtmaššímu 1% obrazu je přidělena černá barva a 1% nejsvětlejší části obrazu je přidělena bílá barva. Dojde tak k zvýšení kontrastu u málo kontrastních obrázků. Program se tak dokáže přizpůsobit různě exponovaným snímkům buněk.



Obr. 26: Šedotónový obrázek buněk po úpravě kontrastu

Detekce hran

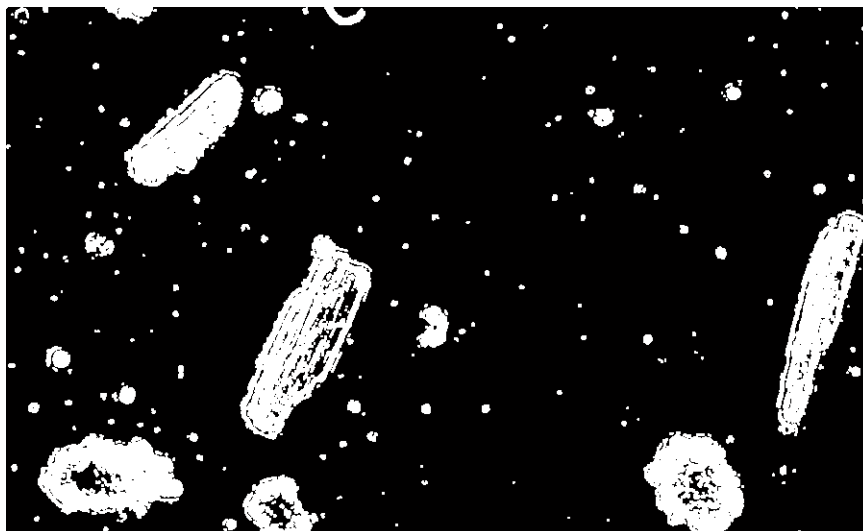
K detekci hran buněk je použita funkce `edge` a konkrétně se Sobelovým operátorem, který je popsán v další části práce. Výstupem je binární obraz hran buněk.



Obr. 27: Binární obrázek buněk po detekci hran

Binární dilatace

Funkce `imdilate` provede binární dilataci obrazu s použitím kruhového strukturního elementu s o daném průměru. Výsledkem je dilatovaný binární obraz buněk u kterého dojde ke ztlustění hran.



Obr. 28: Dilatovaný obraz buněk

Vyplnění objektů

Funkce `imfill` vyplní vnitřky objektů pro jejich lepší následnou detekci.

Binární otevření

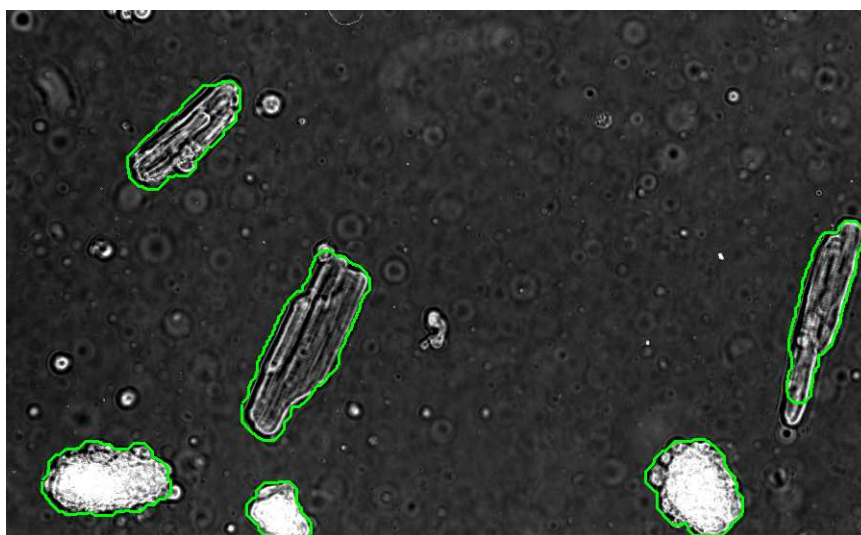
Zde se opět použije morfologická operace. Její se o binární otevření, jehož účelem je odstranění malých objektů z obrazu, které by byly falešně detekovány jako buňky.



Obr. 29: Obrázek buněk po odstranění malých objektů

Detekce zbývajících objektů v obraze

Funkce `bwboundaries` nalezne v obraze okraje zbývajících objektů a jejich obvod uloží do zvolené proměnné, počet buněk v obraze se rovná počtu hodnot v této proměnné.

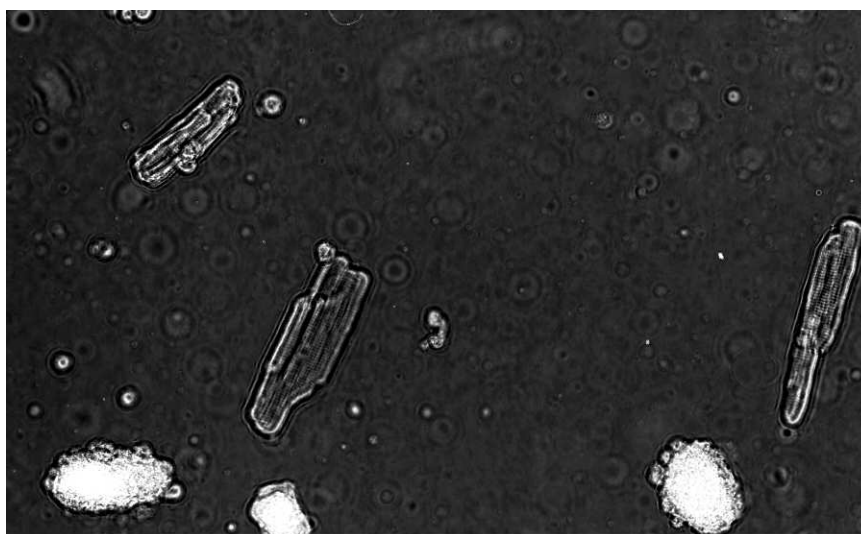


Obr. 30: Okraje všech buněk na pozadí obrázku v negativu

7.1.2. Detekce mrtvých buněk

Převod barevného obrazu na odstíny šedi

Nejprve zobrazíme červený kanál v negativu. Použít jen červený kanál je nejhodnější, protože tak získáme nejlepší kontrast mezi modrými mrtvými buňkami a šedivým pozadím. Následuje převod barevného obrázku do odstínů šedi. Opět použijeme funkce `imadjust` a `rgb2gray`.



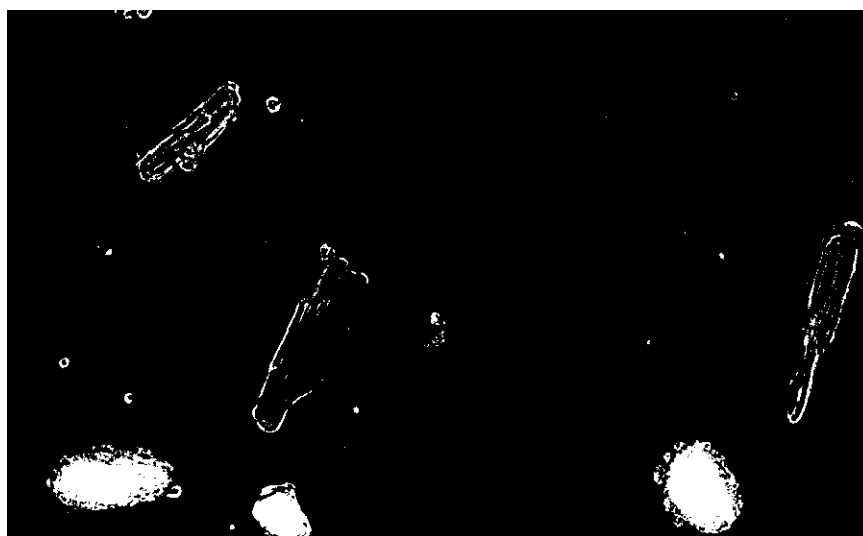
Obr. 31: Šedotónový obrázek buněk v negativu (jen červený kanál)

Automatická úprava kontrastu

Opět použijeme funkci `imadjust` k automatické úpravě kontrastu jako v předchozím případě.

Prahování

Funkce `im2bw` provádí převod šedotónového obrazu na binární černobílý se zvoleným prahem. Vstupní obraz má 256 odstínů šedi, hodnota prahu např. 0,6 tedy znamená, že části obrazu jejichž hodnota jasu je nižší než 154 budou černé, části obrazu s jasnem vyšším budou bílé. Prahování pomáhá odstranit nežádoucí informace v pozadí obrazu.



Obr. 32: Černobílý prahovaný obraz buněk

Binární otevření

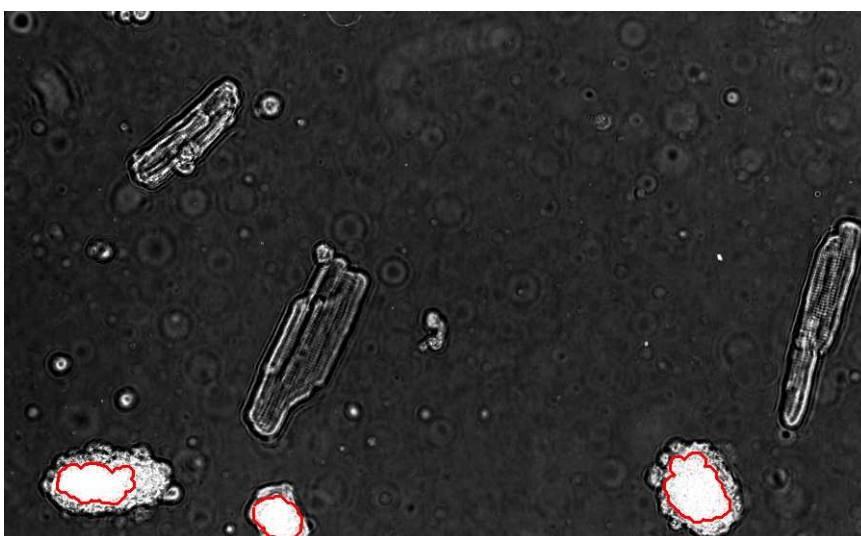
Opět použijeme funkci `imopen` realizující binární otevření k odstranění malých objektů z obrazu, které by byly jinak falešně detekovány jako buňky.



Obr. 33: Obrázek mrtvých buněk po odstranění malých objektů

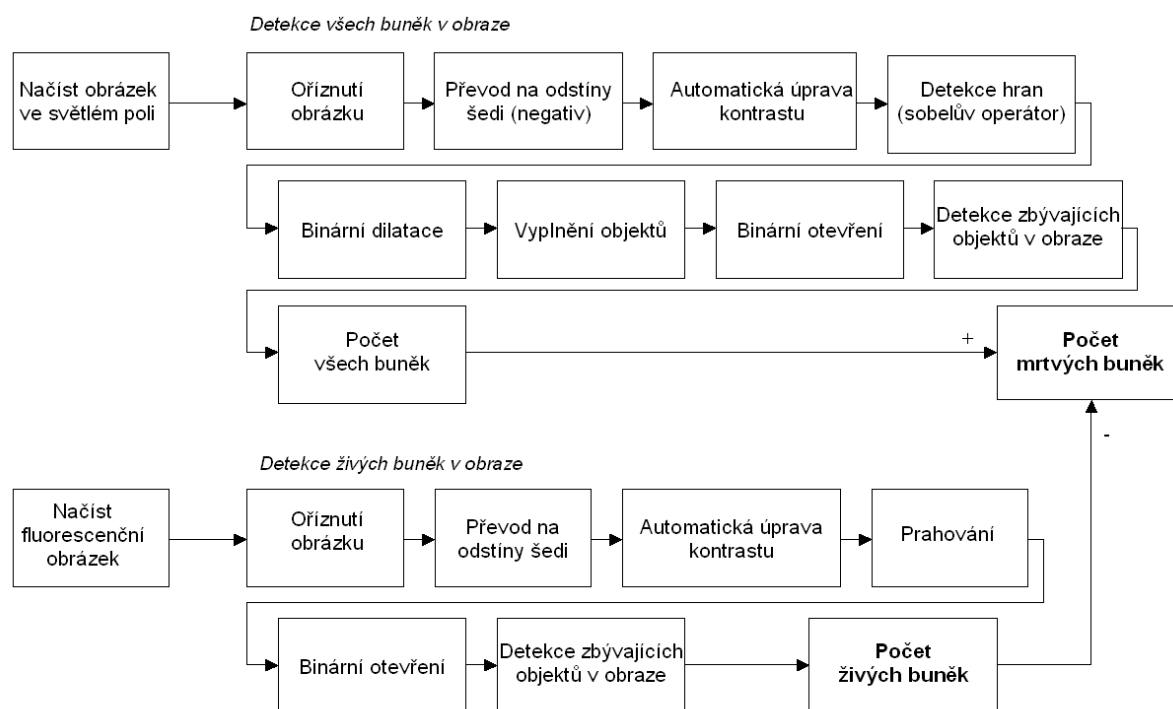
Detekce zbývajících objektů v obraze

Použije se opět funkce `bwboundaries`.



Obr. 34: Okraje mrtvých buněk na pozadí šedotónového obrazu v negativu

7.2. Detekce viability buněk pomocí calceinu



Obr. 35: Principiální schéma detekce viability buněk pomocí calceinu

Prvním krokem detekce je načtení dvou obrázků identických buněk, prvním je fluorescenční snímek buněk, kde jsou živé buňky zobrazeny zeleně. Dalším snímkem je obrázek buněk ve světlém poli. Oba snímky musí zobrazovat stejnou část vzorku a i zvětšení objektivu musí být stejné. Následuje oříznutí obrázku, protože fluorescenční podsvícení buněk není homogenní - zřetelně vidíme buňky jen ve středu obrazu.

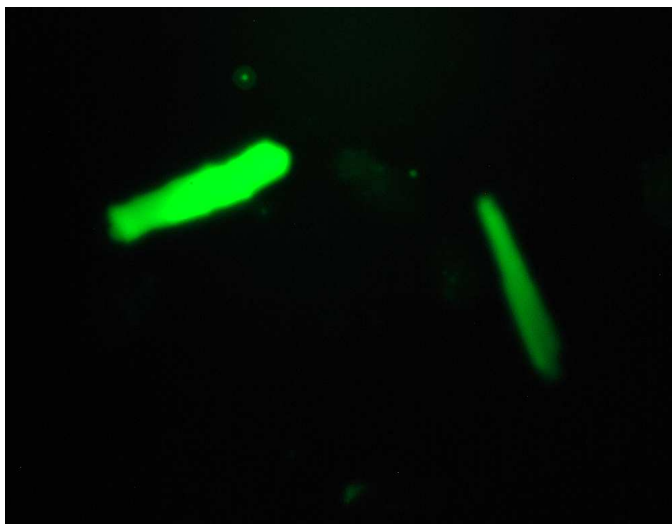
7.2.1. Detekce všech buněk

Postup je zcela identický jako v případě barvení buněk trypanovou modří a je popsán v kapitole 7.1.1.

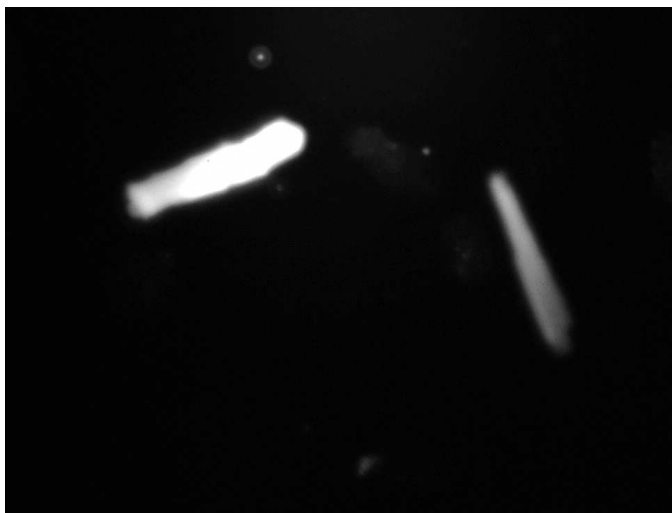
7.2.2. Detekce živých buněk

Převod barevného obrazu na odstíny šedi

Nejprve zobrazíme jen zelených kanál původního obrazu pomocí funkce `imadjust` s vhodně nastavenými parametry, následně jej převedeme na šedotónový pomocí funkce `rgb2gray`.



Obr. 36: Původní fluorescenční obrázek buněk



Obr. 37: Šedotónový obrázek buněk

Automatická úprava kontrastu a prahování

Stejný postup, jaký je popsán v kapitole 7.1.2.



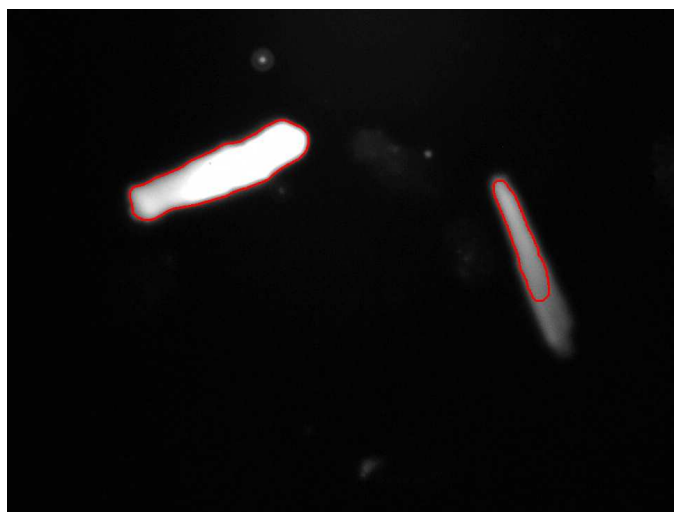
Obr. 38: Čerobílý prahovaný obrázek buněk

Binární otevření a detekce zbývajících objektů v obraze

Opět je nutné odstranit z obrázku malé objekty pomocí morfologické operace binární otevření a detekovat zbývající objekty funkcí `bwboundaries`.

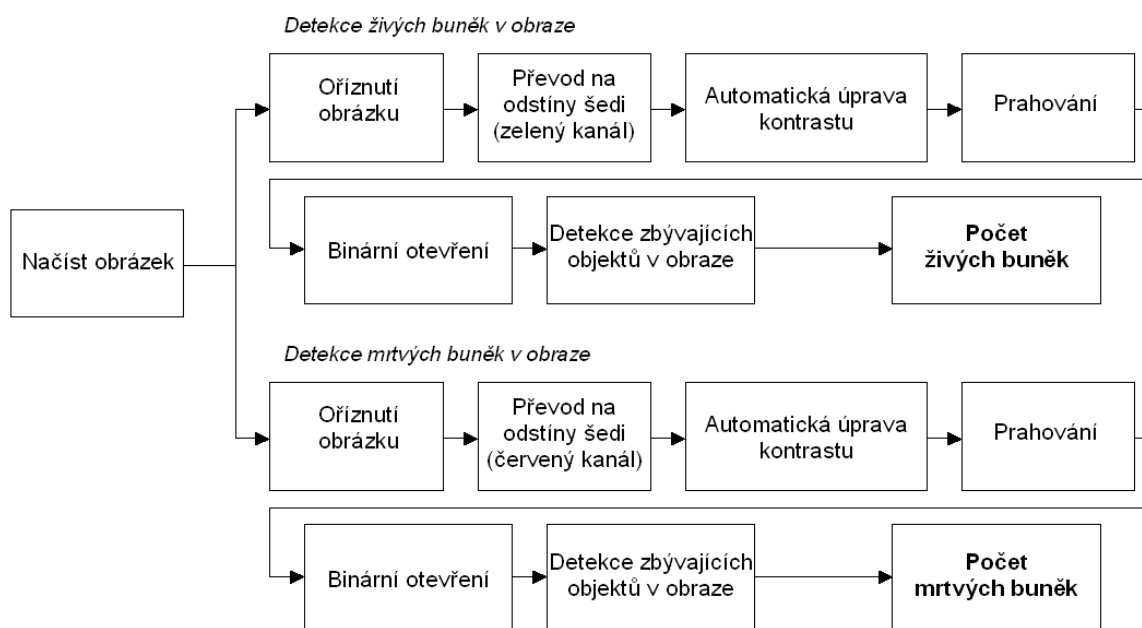


Obr. 39: Obraz buněk po odstranění malých objektů



Obr. 40: Detekované živé buňky

7.3. Detekce viability buněk pomocí kitu LIVE/DEAD



Obr. 41: Principiální schéma detekce viability buněk pomocí kitu LIVE/DEAD

Při detekci živých a mrtvých buněk barvených kitem LIVE/DEAD jsou využívány stejné postupy a funkce, které již byly popsány v kapitolách 7.2 a 7.3.

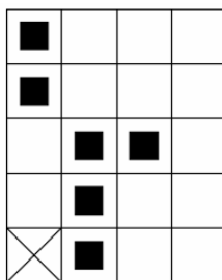
7.4. Použité matematické operace

Matematická morfologie

Matematická morfologie je zvláštním odvětvím matematiky, které se zabývá předzpracováním a segmentací obrazu. V matematické morfologii se využívá bodových množin a pro výpočty jsou použity nelineární operátory pracující s tvarem objektů. Matematická morfologie bývá nejčastěji aplikována na binární obrazy, ale může být zobecněna na obrazy s více úrovněmi šedi. Nejčastější využití morfologických operací nacházíme především při předzpracování obrazu (zjednodušování tvaru, filtrace šumu), zvýrazňování struktury objektů (vytváření kostry, ztenčování, ztlušťování, konvexní obal), segmentování objektů z pozadí a kvalitativním popisu objektů (plocha, hranice, atd.).

Obrazy v matematické morfologii představují bodové množiny, binární obraz je bodová množina $A \in E^2$, šedotónový obraz $A \in E^3$. E znamená Euklidovský prostor. Jednotlivé pixely obrazu jsou adresovány dvěma souřadnicemi (x, y) vzhledem k jejich počátku $(0,0)$.

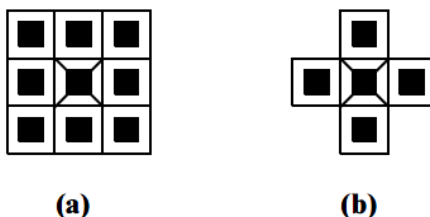
Jestliže tedy budeme binární obraz chápat jako bodovou množinu X , pak body tvořící objekt označíme číslem 1 a body tvořící pozadí číslem 0. Znázornění je na obr. 37. Křížek značí počátek $(0,0)$. [22]



obr. 42: Bodová množina $X \in E^2$ [22]

Morfologická transformace

Je dána relací mezi obrazem (bodovou množinou X) a typicky menší bodovou množinou B (strukturním elementem). Množina B má určen počátek souřadného systému O . Při aplikaci morfologické transformace $\Psi(X)$ na obraz X pak jakoby přikládáme postupně na každý bod množiny X strukturní element B právě tak, aby se překrýval s počátkem souřadnic O . [22]



obr. 43: Příklady strukturních elementů [22]

Binární dilatace

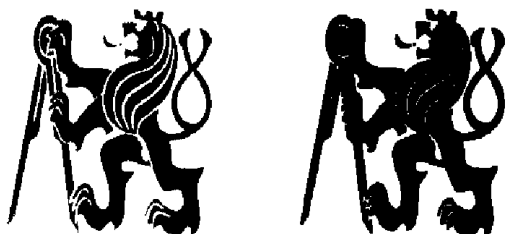
Jedná se o vektorový součet dvou množin X a E , tedy $(x, a) + (y, b) = (x + y) + (a + b)$. A je popsán rovnicí:

$$X \oplus B = \{p \in E^2 : p = x + b, x \in X, b \in B\} \quad (1)$$

Dilataci lze také vyjádřit jako sjednocené dvou posunutých množin, je to tzv. Minkowského součet.

$$X \oplus B = \bigcup_{b \in B} X_{-b} \quad (2)$$

Dilatace se používá k zaplnění malých děr a úzkých zálivů v objektech. Zvětší původní velikost objektu. [22]



Obr. 44: Původní a dilatovaný obraz vpravo [22]

Binární eroze

Skládá dvě množiny pomocí Minkovského rozdílu. Jde o duální morfologickou transformaci k dilataci. Je popsána rovnicí:

$$X \ominus B = \{p \in E^2 : p + b \in X \forall b \in B\} \quad (3)$$

Pro každý bod obrazu p se ověřuje, zda pro všechna možná $p + b$ leží výsledek v X . Pokud ano, je výsledek 1, jinak 0. Erozi můžeme vyjádřit jako průnik všech posunů obrazu X o vektory $-b \in B$:

$$X \ominus B = \bigcap_{b \in B} X_{-b} \quad (4)$$

Eroze se používá ke zjednodušení struktury, objektu menší, než je strukturní element vymizí. [22]



Obr. 45: Původní a erodovaný obraz vpravo [22]

Další morfologické operace jsou např. **otevření** a **uzavření**. Otevření představuje erozi následovanou dilatací:

$$X \circ B = (X \ominus B) \oplus B \quad (5)$$

Uzavření je dilatace následovaná erozí:

$$X \bullet B = (X \oplus B) \ominus B \quad (6)$$

Operace otevření a uzavření se používají k odstranění malých objektů z obrazu. Objekty větší než strukturní element zůstanou nezměněny. [22]

Prahování

Prahování je nejjednodušší způsob segmentace obrazu. Prahování je transformace vstupního šedotónového obrazu f podle prahu T na výsledný binární obraz g . Prahování je definováno vztahem:

$$g_{i,j} = 1 \text{ pro } f_{i,j} \geq T_0 \quad (7)$$

Za předpokladu, že objekty mají vyšší jas než pozadí nám, při správně zvolené hodnotě prahu hodnoty 1 představují objekt a hodnoty 0 pozadí. Pro správnou segmentaci je nutné správně určit hodnotu prahu. Ta může být nastavena ručně nebo automaticky určena z histogramu nebo můžeme použít jasově adaptivní práh. Prahování je rychlá a hardwarově nenáročná metoda segmentace obrazů. [22]

Detekce hran

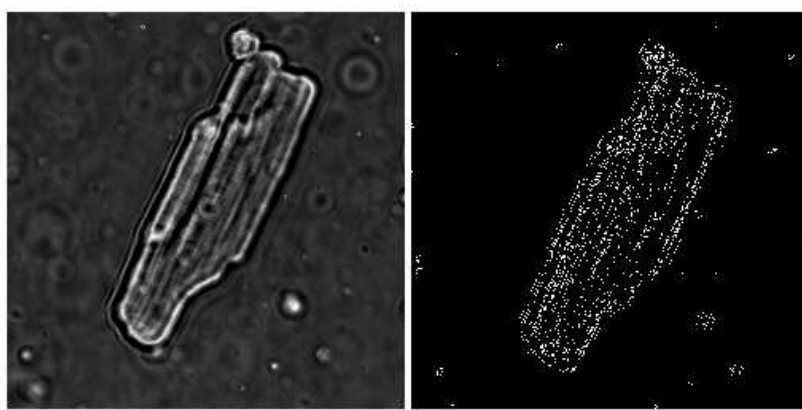
Hrana představuje místo v obraze, kde se prudce mění hodnota jasové funkce obrazu X . Principem gradientních metod je odhad hodnot gradientu jasové funkce pro daný obraz. Výpočet tohoto odhadu může být realizován jako dvojrozměrná diskretní konvoluce obrazu X a vhodné masky H :

$$Y = H * X \quad (8)$$

Existuje celá řada gradientních operátorů jako Robertsův operátor, Prewittův nebo Sobelův. Výsledkem této konvoluce je šedotónový obraz se zvýrazněnými hranami. Posledním krokem je prahování obrazu, kdy získáme binární obraz hran objektů. [22] [23]

$$R = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \quad P = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad S = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

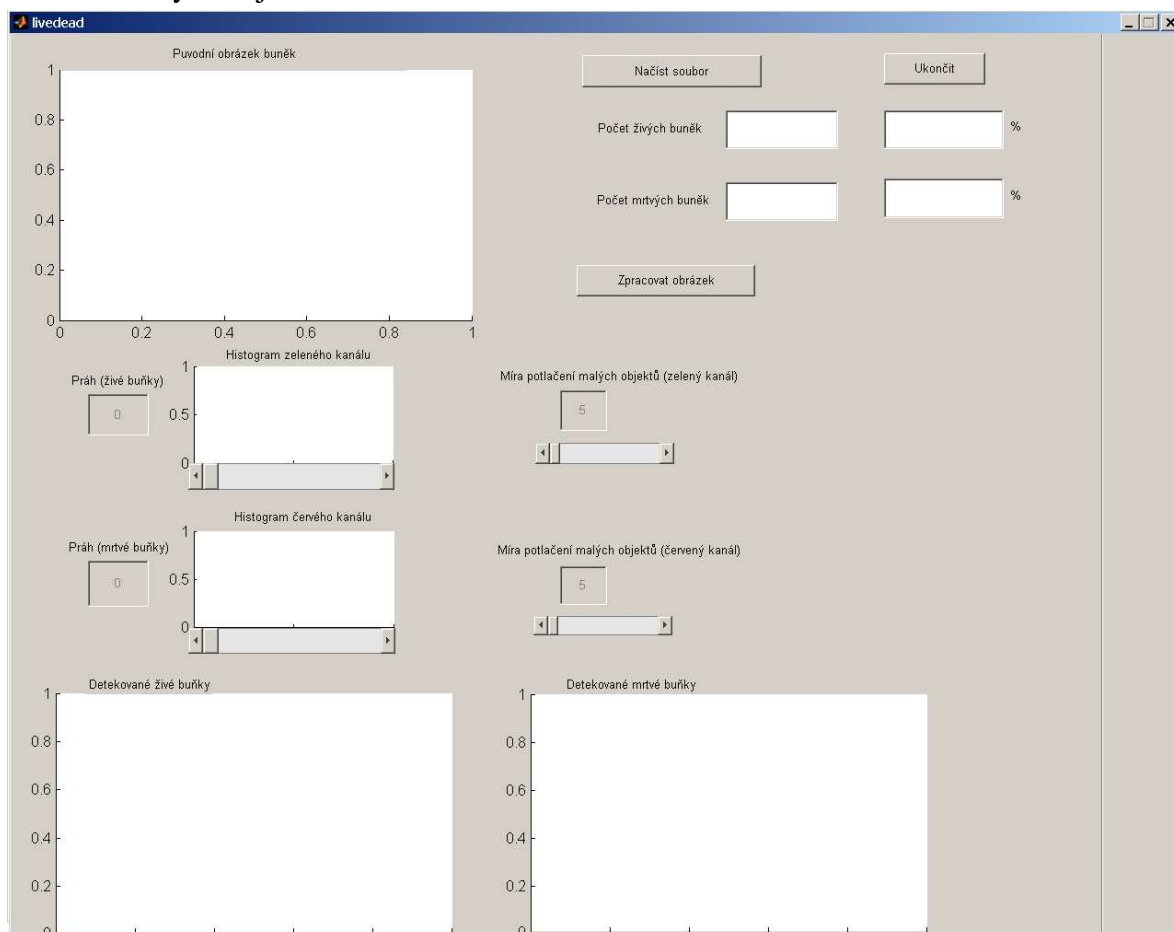
Obr. 46: Robertsův, Prewittův a Sobelův operátor [22]



Obr. 47: Původní obrázek buňky a obrázek hran buňky s použitím Sobelova operátoru

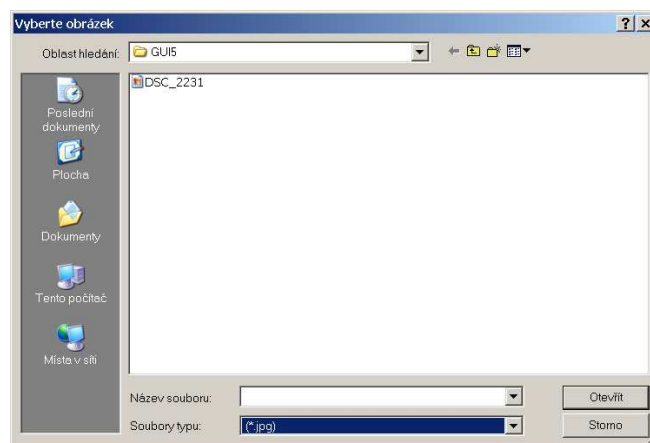
7.5. Grafické uživatelné prostředí (GUI)

Program pro měření viability pomocí barvení buněk kitem LIVE/DEAD má vytvořeno grafické uživatelské prostředí (GUI) v Matlabu, které umožňuje jednoduše měnit nastavení důležitých parametrů detekce jako je výběr oblasti zájmu, nastavení prahů a nastavení odstranění malých objektů.



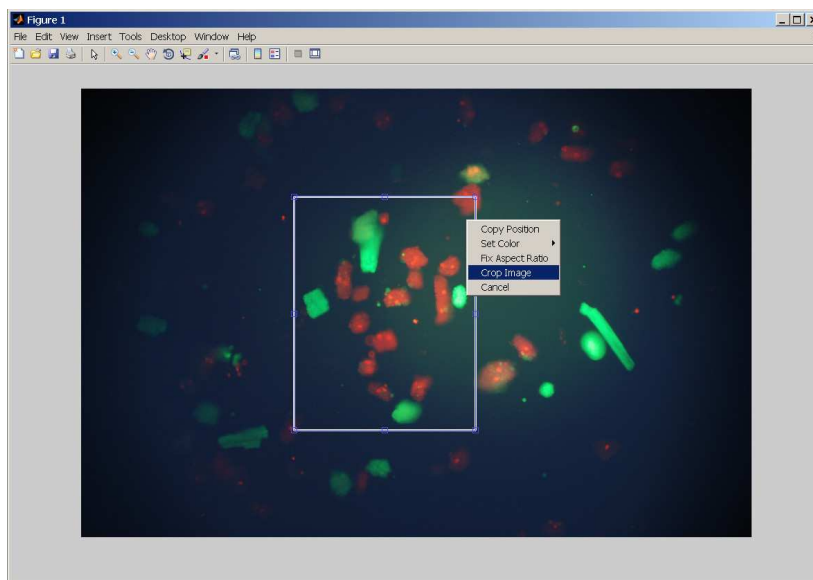
Obr. 48: Základní obrazovka uživatelského prostředí

Nejprve vybereme obrázek buněk, které chceme detekovat tlačítkem Načíst soubor. Pozn: snímky buněk musí být ve stejné složce jako vlastní program.



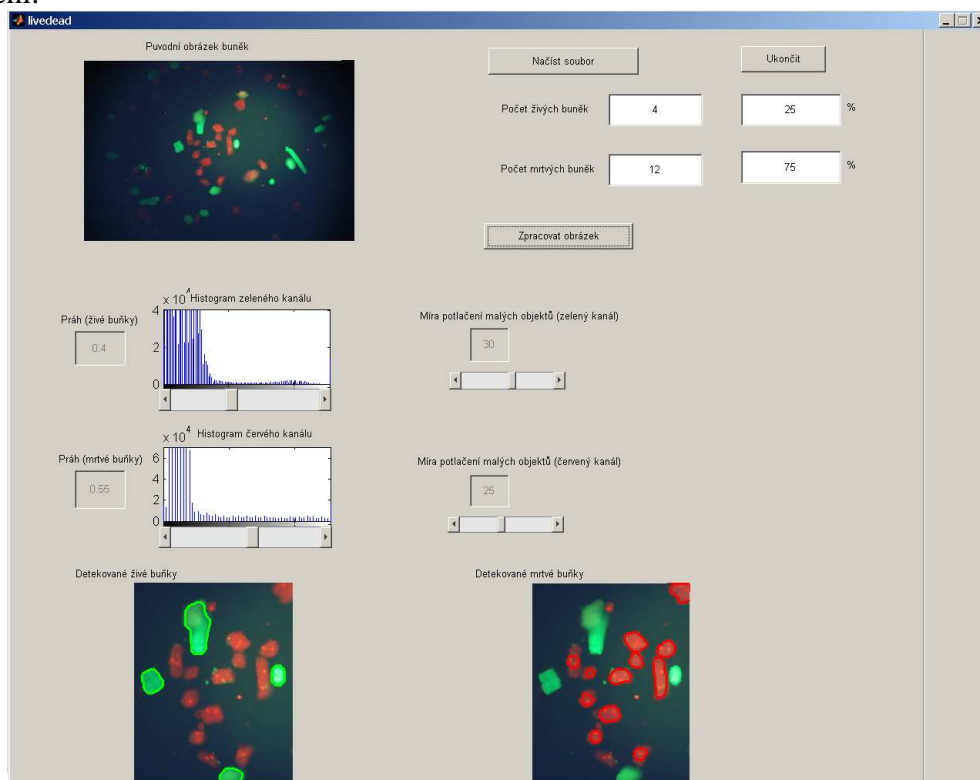
Obr. 49: Načtení souboru

Následně nastavíme prahy a míru potlačení malých objektů, tedy velikost pod níž budou malé objekty v obraze odstraněny. Nastavení těchto hodnot se bude lišit u konkrétních obrázků, např. z důvodu různého použitého zvětšení objektivu. Klikneme na Zpracovat obrázek a objeví se vyskakovací okno, kde provedeme výběr oblasti zájmu a klikneme na možnost Crop image.



Obr. 50: Výběr oblasti zájmu

Správnému nastavení prahů může napomoci zobrazení histogramů obou barevných kanálů. Výsledkem je tedy zobrazení mrtvých a živých buněk, jejich počtu, resp. procentuální vyjádření.

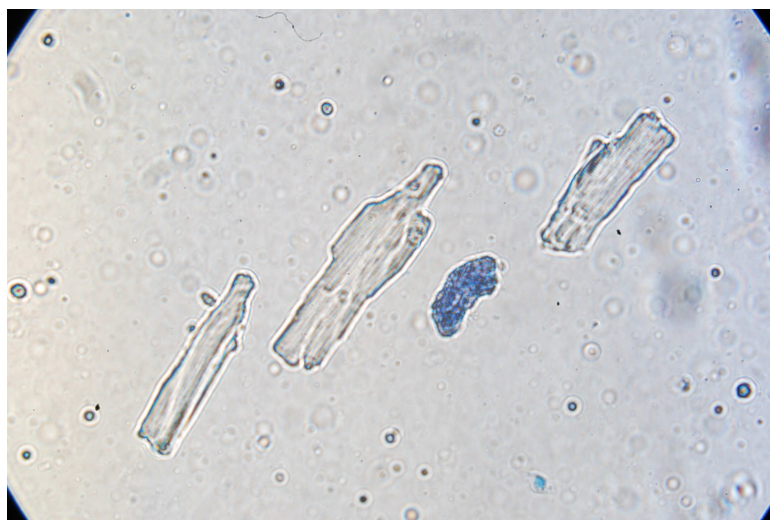


Obr. 51: Výsledek detekce

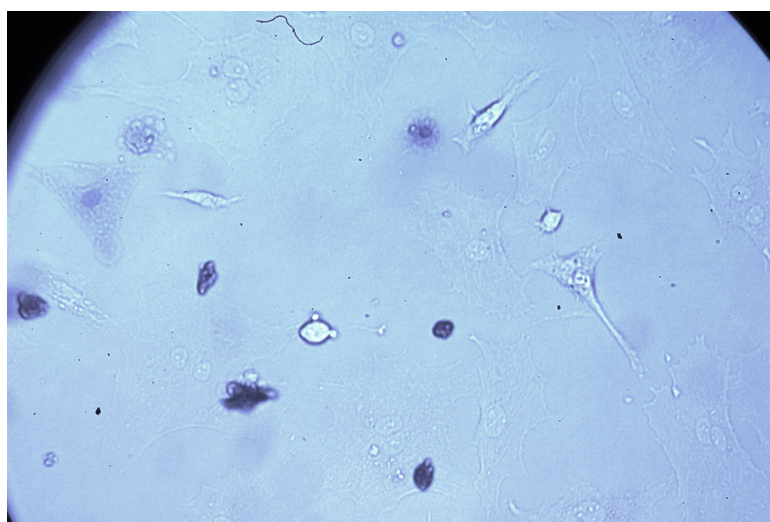
7.6. Výsledky

Trypanová modř

Obrázek č. 43 ukazuje izolované kardiomyocyty barvené trypanovou modří. Je vidět, že kontrast živých buněk vůči pozadí je přijatelně vysoký a kontrast mrtvých buněk je velmi dobrý. Naproti tomu obrázek č. 44 ukazuje stejnou metodu použitou na vzorek kultivovaných buněk, kde je kontrast mnohem nižší. V tomto případě by byla jejich detekce mnohem obtížnější. Použité ředění trypanové modři 1:5 (0,08%) doporučené výrobcem se ukázalo jako vhodné. [21]



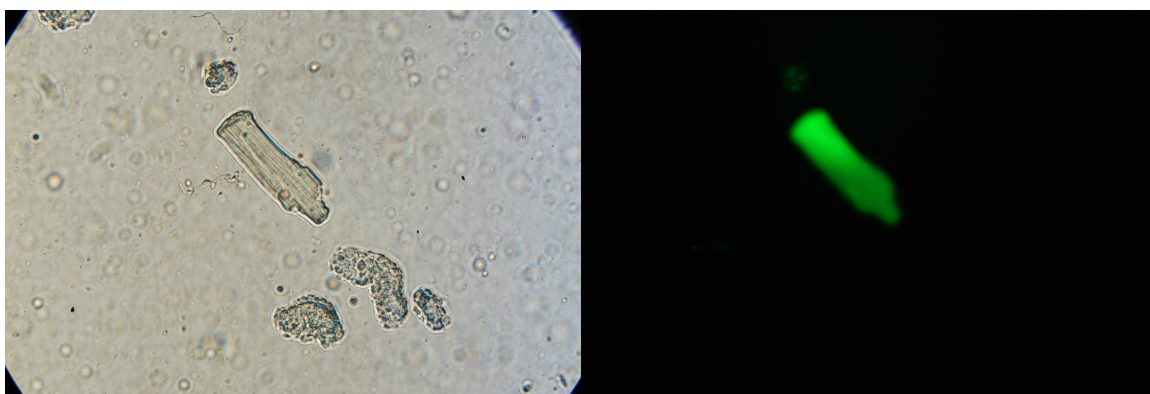
Obr. 52: Izolovaný kardiomyocyty barvené trypanovou modří



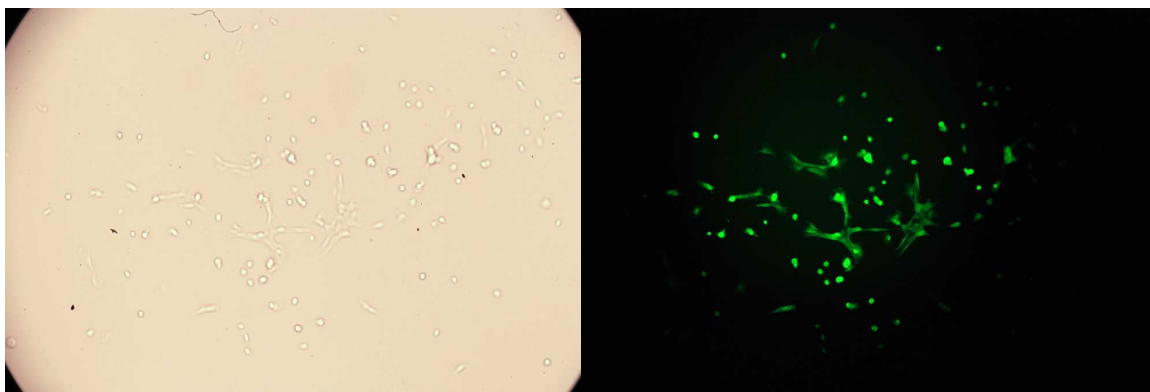
Obr. 53: Kultivované buňky barvené trypanovou modří

Calcein

Buňky byly barveny calceinem v ředění 1:1000. Nižší ředění (1:200) způsobovalo fluorescenci částečně i v mrtvých buňkách. Při zobrazení buněk ve světlém poli není zelená fluorescence živých buněk vůbec patrná, je zcela překryta světlem halogenové žárovky. Detekce buněk zobrazených ve světlém poli je úspěšná u použitých izolovaných kardiomyocytů ale obtížná u vzorku kultivovaných buněk. Živé buňky ve fluorescenčním zobrazení jsou dobře detekovatelné v obou případech.



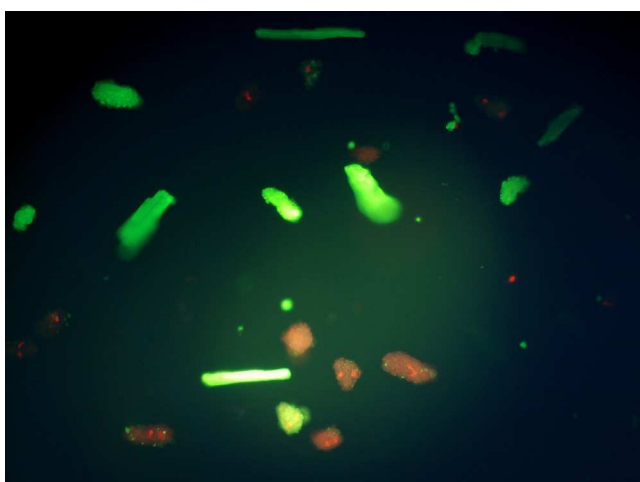
Obr. 54: Izolované kardiomyocyty barvené calceinem



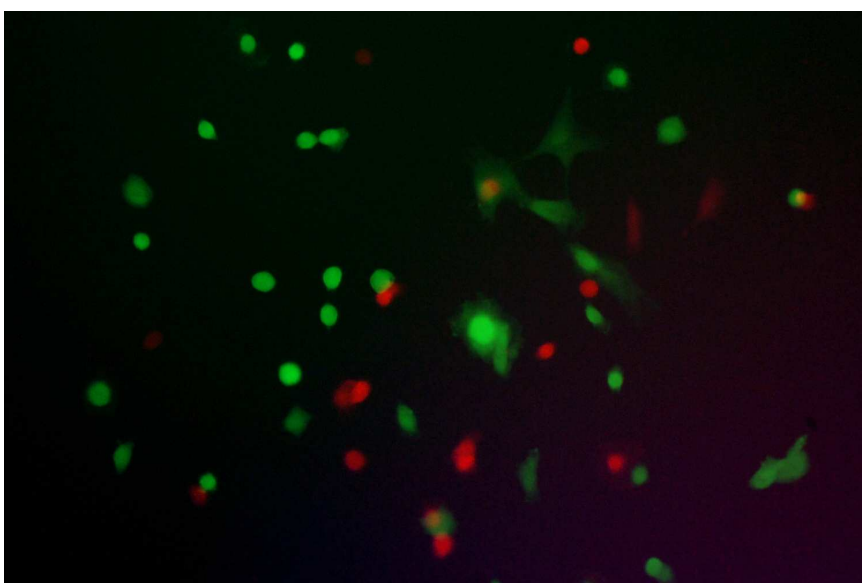
Obr. 55: Kultivované buňky barvené calceinem

Kit LIVE/DEAD

Jak ukazují následující obrázky, buňky barvené kitem LIVE/DEAD (calcein i ethidium homodimer-1) vykazují dobrý kontrast proti pozadí a jsou tedy nejlépe a nejjednodušeji detekovatelné. Problém nehomogeního jasu není vadou samotných barviv ale je způsoben použitým zobrazovacím systémem. Tato metoda se ukázala jako nejvhodnější, a to zejména pro kultivované buňky. Jako vhodné se ukázalo ředění calceinu 1:1000 a EthD-1 1:500. Pro nedostupnost vhodného emisního filtru s dostatečnou šířkou propustného pásma musel být obraz buněk snímán na dvakrát - nejprve s použitím filtru pro calcein (MF 525-39) a podruhé s filtrem propouštějícím červenou oblast (MF 630-69). Výsledné obrázky vznikly kompozicí obou snímků v grafickém programu.



Obr. 56: Izolované kardiomyocyty barvené kitem LIVE/DEAD



Obr. 57: Kultivované buňky barvené kitem LIVE/DEAD

8. Závěr

V této práci jsou popsány podmínky a možnosti kultivace živočišných buněk a uvedeny principy na nichž je možno měřit viabilitu těchto buněk pomocí fluorescence. Jsou to integrita cytoplasmatické membrány, aktivita intracelulárních esteráz, existence transmembránového potenciálu a stabilní hodnota pH. Dále jsou popsány fluorescenční indikátory využívající první dva tyto principy, a to calcein a ethidium homodimer-1. Dále byl vytvořen postup pro měření viability pomocí těchto indikátorů, popsán postup detekce viability a vytvořeny příslušné programy v Matlabu pro všechny tři použité způsoby barvení. Pro preferovanou metodu barvení využívající obou fluorescenčních indikátorů, bylo vytvořeno navíc i grafické uživatelské prostředí.

Při praktické realizaci měření se ukázalo, že všechny navržené metody jsou použitelné pro zkoumané izolované buňky, avšak detekce kultivovaných buněk ve světlém poli je velmi obtížná a přesahuje možnosti vytvořeného softwaru. Metoda využívající oba zmiňované fluorescenční indikátory se ukázala jako spolehlivější. Dalším vylepšením do budoucna by mohlo být např. použití mikroskopu s fázovým kontrastem pro lepší zobrazení buněk ve světlém poli nebo konfokálního fluorescenčního mikroskopu pro detekci barvených buněk, kde by se dosáhlo vyššího rozlišení a odpadl by problém s nehomogenním podsvícením. Výzvou by také bylo zdokonalit samotný postup detekce a více jej zautomatizovat.

9. Literatura

- [1] Vejražka, M [online]. 2011 [cit. 2011-10-15] *Buněčné kultury*
Dostupné z WWW: <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verzeprednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>
- [2] *Chemické listy* [online]. srpen 2011 [cit 2011-10-22] Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf>
- [3] NEČAS, Oldřich a kolektiv. OBECNÁ BIOLOGIE PRO LÉKAŘSKÉ FAKULTY dotisk 2003. Komenského 236, Jinočany: Nakladatelství H&H, 2000. 554s. ISBN 80-86022-46-3
- [4] Basic Cell Culture: A Practical Approach. J.M.Davis (ed.) 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford. 2002. ISBN 0-19-963853-5
- [5] WILHELM, Zdeněk a kolektiv. STRUČNÝ PŘEHLED FYZIOLOGIE PRO BAKALÁŘSKÉ STUDIJNÍ PROGRAMY. 3. vydání, 2005. MU Brno. ISBN-10: 80-210-2837-8
- [6] *Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK*, 2011, [cit. 2011-12-1] Confocal Imaging System
Dostupné z WWW: <<http://www.well.ox.ac.uk/zeiss-confocal>>
- [7] *RxList* [online]. 4. 8. 2009 [cit. 2011-10-20] VisionBlue (Trypan Blue) Drug Information Dostupné z WWW: <<http://www.rxlist.com/visionblue-drug.htm>>
- [8] *Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci* [online]. c2011 [cit 2011-10-20] MTT test Dostupné z WWW: <<http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>>

- [9] *Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta University Karlovy* [online].
[cit. 2011-10-20] Základní techniky práce s tkáňovými kulturami Dostupné z WWW:
<<http://chel.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>
- [10] *Abcam* [online]. 1998-2011 [cit 2011-10-22] Anti-beta Catenin antibody (ab2365)
Dostupné z WWW: <<http://www.abcam.com/beta-Catenin-antibody-ab2365.html>>
- [11] *Invitrogen* [online]. 21. 12. 2005 [cit 2011-10-26] LIVE/DEAD®
Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells Dostupné z WWW:
<<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>>
- [12] *Invitrogen* [online]. 2011 [cit 2011-10-26] Calcein, AM Dostupné z WWW:
<<http://probes.invitrogen.com/media/spectra/481ph9.jpg>>
- [13] *Invitrogen* [online]. 2011 [cit 2011-10-26] Ethidium homodimer-1 (EthD-1)
Dostupné z WWW: <<http://probes.invitrogen.com/media/spectra/1169dna.jpg>>
- [14] HRAZDIRA, I; MORNSTEIN, V. *LÉKAŘSKÁ BIOFYZIKA A PŘÍSTROJOVÁ
TECHNIKA*. dotisk 2004. Březova 18,637 00 Brno : Neptun, 2001. Excitace a
Ionizace, 380 s., ISBN 80-902896-1-4.
- [15] *Nikon MicroscopyU* [online]. 2000-2010 [cit 2011-10-29] Introduction to
Fluorescence Microscopy Dostupné z WWW:
<<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>>
- [16] *Nikon - Imaging Products* [online]. 2011 [cit 2011-11-10] Digital SLR
Cameras - D80 Dostupné z WWW: <<http://imaging.nikon.com/lineup/dslr/d80/>>
- [17] Ghauharali, Brakenhoff, 2000, [cit 2011-10-10] *Fluorescence photobleaching-based
image standardization for fluorescence microscopy*. Journal of Microscopy, 198:
str. 88–100. doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00683.x

- [18] *Thorlabs* [online]. 1999-2011 [cit 2011-11-1] Fluorescence Imaging Filters
Dostupné z WWW:
<http://www.thorlabs.de/NewGroupPage9.cfm?ObjectGroup_ID=2990&pn=MDF-GFP>
- [19] *Invitrogen* [online]. 2011 [cit 2011-11-3] Fluorescence SpectraViewer
Dostupné z WWW: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>>
- [20] *Thorlabs* [online]. 1999-2011 [cit 2011-11-1] MF525-39 - GFP Emission Filter
Dostupné z WWW: <<http://www.thorlabs.de/thorProduct.cfm?partNumber=MF525-39>>
- [21] *Invitrogen* [online]. 2011 [cit 2012-4-4] Viable Cell Counts Using Trypan Blue
Dostupné z WWW: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/appendix/Cell_Culture/-Viable%20Cell%20Counts%20Using%20Trypan%20Blue.pdf>
- [22] ŠONKA, M. ; HLAVÁČ, V.; BOYLE, R. *Image Processing, Analysis, and Machine Vision* . [s.l.] : Thomson Learning, 2007. 829 s. ISBN 049508252X.
- [23] Haškovec V., Mudrová M. [online] 2003 [cit 2012-4-15] Detekce hran v biomedicínských obrazech Dostupné z WWW: <http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/matlab03/haskovec.pdf>
- [24] DOŇAR Bohuslav, ZAPLATÍLEK Karel. *MATLAB Tvorba uživatelských aplikací* 1. vydání, 2004, BEN technická literatura, 216s., ISBN 80-7300-133-0

Seznam zkratk

AM	acetoxymethylester
EthD-1	ethidium homodimer-1
FACS	fluorescencí aktivované buněčné třídění
DMSO	di-methyl sulfoxid
D-PBS	Dulbeccův roztok solí pufovaný fosfáty
GFP	green fluorescent protein
MSC	mezenchymální kmenové buňky

Přílohy (1) - CD

Na CD jsou všechny programové součásti a soubory potřebné ke spuštění vytvořených programů. Programy byly vytvořeny v Matlabu verze R2008a. Pro správnou funkci programu je nutné mít nainstalován Image procesing toolbox. Je také nutné, aby program a příslušné obrázky byly v jedné složce. CD také obsahuje tu Bakalářskou práci v elektronické podobě ve formátu pdf.