



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

PRŮTOKOVÉ KOMŮRKY PRO MIKROSKOPII ŽIVÝCH BUNĚK

FLOW-CHAMBERS FOR MICROSCOPY OF LIVING CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JANA ČOLLÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

ING. MARTIN ANTOŠ, PH.D.

BRNO 2011

Abstrakt

Byla navržena a zkonstruována průtoková komůrka pro dlouhodobé pozorování živých buněk v transmisním, koherencí řízeném holografickém mikroskopu (CCHM), který byl vyvinut v Laboratoři experimentální biofotoniky na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně.

CCHM umožňuje vyhodnocovat dynamické změny uvnitř živé buňky díky kvantitativní informaci o fázovém posuvu pro každý obrazový bod. Aby se experimentálně prokázaly výhody CCHM, je důležité dlouhodobě udržovat optimální kultivační podmínky přidáváním čerstvého kultivačního média pro pozorované buňky přímo v mikroskopu. Průtoková komůrka umožňuje jak výměnu kultivačního média, tak aplikaci biologických činidel bez nutnosti vyjmutí komůrky z mikroskopu, jak je tomu u stacionárních komůrek. Můžeme tak sledovat životní projevy před aplikací činidel a reakci buněk po aplikaci.

Na základě publikací s řešenými návrhy průtokových komůrek, uvedených v předložené diplomové práci, byl realizován originální průtokový systém s příslušenstvím, vyhovující konstrukčnímu řešení CCHM. Byly rovněž diskutovány vlastnosti proudění a proces výměny kapalin v průtokové komůrce a na základě provedených simulací byl modifikován tvar vnitřního prostoru komůrky. Funkčnost a použitelnost průtokové komůrky byla experimentálně prokázána v CCHM i v jiných mikroskopech. V navržených průtokových komůrkách byly úspěšně pozorovány reakce nádorových a epitelálních buněk na změnu prostředí z kultivačního média na fyziologický roztok.

Klíčová slova

Koherencí řízený holografický mikroskop, zobrazování živých buněk, průtoková komůrka.

Summary

The perfusion chamber for long term observing of live cells by the means the Coherence-Controlled Holographic Microscope (CCHM) was designed. CCHM was built and designed at the Laboratory of the optical microscopy at the Institute of Physical Engineering, Brno University of Technology.

CCHM can quantitatively evaluate dynamical changes inside live cells thanks to the quantitative information about phase shift in each pixel of the image. In order to demonstrate advantages of CCHM experimentally, it is important to keep the live cells in the good conditions. This is made by adding the fresh cultivation medium for studied cells directly in the microscope.

In contrast to the stationary chamber the perfusion chamber allows both the cultivation medium exchange and the application of biological reagents without the necessity of removing the chamber from the microscope. Therefore we can study the vital signs of cells before and after the application of reagents.

An original perfusion system with accessories compatible with CCHM was designed. The design is based on the previously published perfusion system solutions that are referred to in this thesis. The flow characteristics and medium exchange process was discussed and a modification of the internal geometry, based on numerical simulations, was introduced. The applicability of this perfusion chamber has been proven for the CCHM and even for different types of microscopes. The reactions of tumor and epithelial cells during the change of the environment from the cultivation medium to the physiologically solution were studied.

Keywords

Coherence-controlled holographic microscope, live cell imaging, perfusion chamber.

ČOLLÁKOVÁ, J. *Průtokové komůrky pro mikroskopii živých buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství, 2011. 49s. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Antoš, Ph.D.

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

Jana Čolláková

Děkuji Ing. Martinu Antošovi, Ph.D. za vedení diplomové práce a velkou trpělivost. MUDr. Pavlu Veselému, Csc. děkuji za cenné rady v biologické části práce a Ing. Aleši Kubisovi za pomoc se simulacemi. Děkuji Ing. Haně Uhlířové, Ph.D, doc. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D., Ing. Martinu Lošťákovi, Ing. Zbyňku Dostálovi, Ing. Michale Henzlové, Ing. Tomáši Slabému, Ing. Matěji Týčovi, Ing. Lud'ku Lovicarovi, Ph.D., Janu Bartoníčkoví za velkou podporu a motivaci.

Obsah

1 Úvod.....	8
1.1 Transmisní CCHM	8
1.2 Pěstování buněčných kultur	9
1.3 Pozorovací komůrky.....	10
1.3.1 Stacionární komůrky.....	10
1.3.2 Průtokové komůrky.....	11
1.4 Historický vývoj průtokových komůrek	12
1.4.1 Přehled návrhů průtokových komůrek.....	13
1.5 Základní typy průtokových komůrek.....	15
1.5.3 Rozdělení komůrek podle tvaru vnitřního prostoru.....	16
1.5.4 Komerčně dostupné komůrky.....	17
2 Vlastní návrh průtokové komůrky	20
2.1 Základní požadavky.....	20
2.2 Návrh a konstrukce.....	20
2.2.1 Tělo.....	22
2.2.2 Odlévací forma.....	22
2.3 Průtokový systém.....	24
2.3.1 Nosič komůrky.....	25
3 Hlavní parametry průtokového systému.....	27
3.1 Průtoková rychlost	27
3.2 Simulace proudění kapaliny komůrkou.....	28
3.2.1 Vstupní data.....	28
3.2.2 Vyhodnocení výsledků.....	29
3.2.3 Jádro 2.....	31
3.2.4 Jádro 3.....	32
3.2.5 Změna průtokové rychlosti	33
3.2.6 Zhodnocení simulací.....	33
3.3 Intenzita zobrazení během průtoku kapaliny.....	33
3.4 Výměna kapalin.....	34
4 Experimenty s živými buňkami	36
4.1 Uživatelský software.....	36
4.2 Typy použitých buněk.....	36
4.3 Příprava buněk.....	37
4.4 Příprava průtokové komůrky.....	37
4.5 Dlouhodobá kultivace buněk RsK4.....	37
4.6 Okamžité a dlouhodobé reakce buněk HaCaT.....	38
4.7 Vícefázová reakce buněk RsK4.....	41
4.8 Zobrazení buněk A3Rho(Ca) pomocí DIC.....	43
5 Závěr.....	45
6 Literatura.....	46

1 Úvod

Pozorování buněk a buněčných tkání různými mikroskopovými metodami není sice v oblasti biologického výzkumu novinkou, nicméně jedná se o nosné téma, nepřestávající přinášet nové poznatky. Buňka, jako průhledný a bezbarvý prostorový objekt málo rozptylující světlo, je v běžném transmisním mikroskopu málo kontrastní v porovnání s pozadím světlého pole.

Zvýšení kontrastu obrazu buňky dosáhneme různými technikami barvení, například barvením tenkých plátků buňky. Nejdříve se musí buňky fixovat, to znamená šetrně chemicky usmrtit se zachováním tvaru a vnitřního uspořádání. Určité složky buněčných organel obarvením absorbují více světla a stávají se tak kontrastnější. Další možností je barvení fluorescenčním barvivem, jímž lze získat přehled o rozmístění určitých molekul, na které se barviva váží. Světlo emitované barvivem při excitaci ale přichází ze všech rovin buňky a přispívá k rozmazání obrazu. Navíc se fluorescenční barviva osvětlením postupně vybělují. Nevýhodou většiny barvicích technik je usmrcení studované buňky.

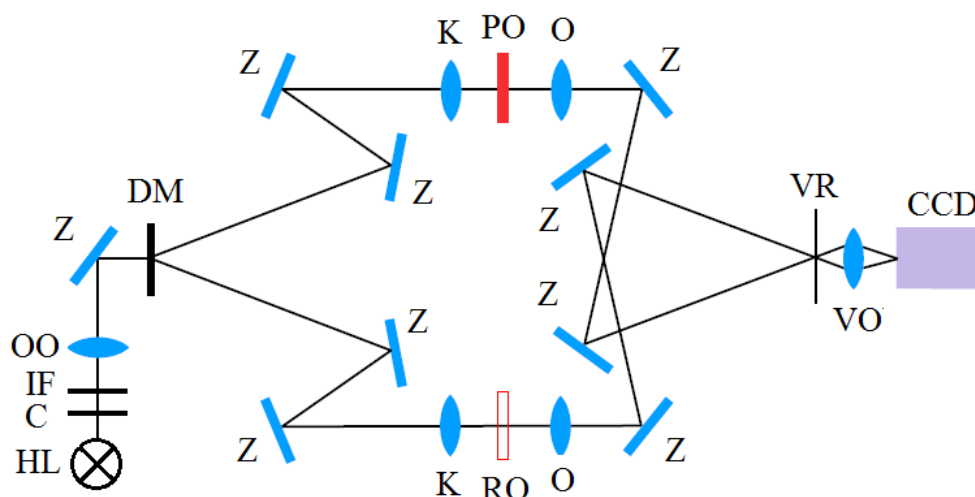
V mikroskopii buněk existují i neinvazivní metody, které využívají skutečnosti, že se médium a buňky a jednotlivé složky buněk od sebe navzájem liší indexem lomu. Používají se například metody fázového kontrastu a diferenciálního interferenčního kontrastu. Tyto metody sice účinně převádějí fázové rozdíly na intenzitu světla, avšak neumožňují hodnoty fázových rozdílů měřit.

Pro pozorování fázových vzorků byl v Laboratoři experimentální biofotoniky na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně navržen a zkonstruován transmisní koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM z anglického názvu coherence-controlled holographic microscope) [1]. Z CCHM získáváme pro každý obrazový bod kvantitativní informaci o fázovém zpoždění, které je přímo úměrné plošné hustotě suché hmoty buňky. Změny rozložení suché hmoty jsou v relaci s ději, kterými buňka prochází během buněčného cyklu, jako je růst, pohyb a dělení. Výhoda CCHM tkví ve sledování dynamických změn uvnitř živé buňky na definovanou zátěž v podobě biologických činidel a vyhodnocování reakce na tento podnět.

Předložená práce se zabývá návrhem a konstrukcí průtokové komůrky pro dlouhodobé pozorování živých buněk v CCHM. Průtoková komůrka by měla být schopna udržovat optimální kultivační podmínky pro buňky přímo v mikroskopu a plně využívat výhod CCHM ke kvantitativnímu vyhodnocování změn uvnitř buňky za časový interval.

1.1 Transmisní CCHM

CCHM patří do skupiny holografických mikroskopů, které jsou typické tím, že interferují světelné svazky ze dvou opticky ekvivalentních větví: předmětové a referenční (obrázek 1). CCHM používá nekoherentní zdroj světla, čímž se získá hloubkově diskriminované zobrazení vzorku. K interferenci přispívají paprsky jen z úzké části vzorku, proto říkáme, že CCHM má charakter konfokálního zobrazení. Zdrojem světla je halogenová lampa HL. Velikost plošného zdroje je určena průměrem clony C. Paprsky procházející interferenčním filtrem IF, s maximem propustnosti na vlnové délce 650 nm a pološířkou maxima propustnosti 10 nm, a dopadají na transmisní difrakční mřížku DM s prostorovou frekvencí 70 mm^{-1} . První řády difraktovaného světla se vybírají do předmětové a referenční větve. Zdroj je osvětlovacím objektivem OO zobrazen do ohniskové roviny kondenzoru K. Jedná se o Köhlerovo osvětlení, kondenzory K tedy zajišťují rovnoměrné osvětlení pozorovaného objektu PO a referenčního objektu RO. Objektivy O zobrazují oba objekty do výstupní roviny VR, kde světlo z obou větví interferuje a výstupním objektivem VO je vzniklý hologram zobrazen na čip CCD kamery ([2], kap. 2).



Obrázek 1: Schéma optické soustavy transmisního CCHM: HL – halogenová lampa, C – clona, IF – interferenční filtr, OO – osvětlovací objektiv, Z – zrcátko, DM – difrakční mřížka, K – kondenzor, PO – pozorovaný objekt, RO – referenční objekt, O – objektiv, VO – výstupní objektiv, CCD – kamera. (převzato z [1], str. 12).

Do předmětové větve se vkládá pozorovací komůrka s médiem a buňkami a do referenční větve jen identická komůrka pouze s médiem. Rozdíl optických drah v ideálním případě tvoří pouze pozorované buňky. CCHM je zkonstruován tak, aby vyhovoval pozorování buněk, kultivovaných in vitro, uchycených a rozprostřených na dně pozorovací komůrky. Pozorování zdravých živých buněk vyžaduje pečlivou přípravu. V následující části jsou popsány podmínky kultivace buněčných kultur.

1.2 Pěstování buněčných kultur

Buňky odebrané z mnohobuněčných organismů mohou dále přežívat v kultivačním médiu a být pozorovány mikroskopem. Pěstují se ve speciálních nádobách (in vitro), nejčastěji adheované na dně nádoby, ve kterých je snaha co nejlépe napodobit fyziologické podmínky přirozeného prostředí. Nesprávná kultivace nebo manipulace může vážně změnit metabolismus a strukturu buněk, což vede k mylným výsledkům nebo dokonce ke klamným závěrům. Aby se zajistily dobře definované a stabilní kultivační podmínky, je důležité udržování teploty, vlhkosti (přes 90%) a dodávání speciálního vyživovacího média se správným pH a osmolaritou. Také je důležitá sterilita prostředí a zabránění bakteriální nebo chemické kontaminace. Některé typy buněk jsou méně náročné na kultivaci, protože požadavky na udržování specifické hodnoty teploty (např. hmyzí buňky) nebo složení média (např. bakteriální buňky) není tak zásadní. Tato část práce nastiňuje důležité body pro uchování zdravých savčích buněk, které jsou velmi citlivé na všechny změny níže uvedených parametrů ([3], kap. 12).

Kultivační médium je vhodnou směsí aminokyselin, anorganických iontů, vitamínů, živin a růstových faktorů. Správná hodnota pH kultivačního média 7,4 je zásadní pro dlouhotrvající životaschopnost buněk. Hodnota pH se kumulací metabolického odpadu mění a je často udržována uhličitanovým pufrům, který vyžaduje správnou koncentraci CO_2 buď přímo v médiu, nebo v okolní atmosféře. Jako acidobazický indikátor se do média přidává fenolová červeň a podle zbarvení do žluta se pozná, kdy je potřeba médium vyměnit.

V experimentech, popsaných v kapitole 4, je použito médium s označením M1H (standartní kultivační médium doplněné živočišným sérem). Je směsí aminokyselin a solí (90%), glutaminu (1%), fetálního telecího séra (9%) s občasným přidáním antibiotik proti bakteriální kontaminaci. Médium M1H vyžaduje 3,5% koncentraci CO₂ ([4], str. 32).

Správná osmolarita kultivačního média je nezbytná pro zdravé a dlouhé přežití většiny eukaryotických buněk. Při práci s velmi malým objemem, vystaveným suché pokojové atmosféře, může být osmolarita média snadno změněna vypařováním, a tedy zvýšenou iontovou koncentrací. Zabránit tomuto jevu lze uzavřením kultivační nádoby nebo častým dodáváním čerstvého média.

Savčí buňky mají optimální růstovou teplotu 37°C. Snížení teploty na 27°C, má za následek změnu ve struktuře buněčné membrány, což má dopad na enzymatickou aktivitu a životaschopnost buněk. Zvýšení teploty na 40°C může vážně narušit buněčné procesy endocytózy. I když má buňka pozoruhodnou schopnost kompenzovat mírné teplotní změny, pokud je experiment prováděn mimo optimální teplotu, nemusí experiment vypovídat o pravděpodobné fyziologické události, ale spíše o teplotně vyvolané reakci.

Dnes jsou laboratoře dobře vybaveny pro pěstování buněčných kultur, používající teplotně kontrolované a správně zaplynované inkubátory s optimální vlhkostí a koncentrací CO₂. Manipulace s buněčnou kulturou mimo inkubátor však snadno naruší tyto příhodné podmínky. Každou změnou uvedených podmínek prostředí jsou buňky stresovány a dochází ke změnám v buněčném metabolismu, např. syntéza stresových proteinů a pozastavení vývoje v buněčném cyklu. Po odstranění stresových faktorů a vložení zpátky do inkubátoru se dokáží buňky, po určité době, opět dostat do normálního stavu. Krátkodobé pozorování buněčných kultur není proto až tak složitou záležitostí, ale při delším pozorování už jejich správný stav nelze zaručit. Dlouhodobý nepříznivý stresový vývoj může vést až k nekróze. Méně stresující prostředí se nemusí projevit na buňkách okamžitým efektem, ale až po určitém čase lze poznat, že buňky započaly proces apoptózy, tj. řízené sebedestrukce. Doba trvání časového úseku do doby, kdy je možné rozpoznat apoptózu, se liší podle typu buněk a metody detekce apoptózy. Předtím, než lze počátek apoptózy detekovat, může pozorování zdánlivě 'normálních' buněk vést ke špatnému vyhodnocení. Je proto důležité minimalizovat stresové faktory během dlouhodobého procesu pozorování v mikroskopu.

1.3 Pozorovací komůrky

Pozorování živých buněk vyžaduje nádobku, která by zajišťovala vhodné životní podmínky buněk a zároveň by vyhovovala podmínkám pro pozorování v mikroskopu. Pozorovací kultivační komůrky se obecně dělí do dvou základních skupin: otevřené a uzavřené (viz [3], [5]). Výběr mezi otevřenou a uzavřenou kultivační komůrkou závisí na charakteru výzkumu.

Pokud výzkum vyžaduje fyzickou manipulaci s buňkami nebo mikroinjekci, používají se otevřené komůrkové systémy, umožňující přímý přístup ke vzorku. Jsou podobné Petriho miskám. Během experimentu jsou ovlivňovány okolní atmosférou, a proto nejsou vhodné pro dlouhodobé pozorování. Naopak uzavřené komůrky chrání kultivační médium před odpařováním a zajišťují stálost prostředí, charakterizovanou pH, koncentrací CO₂ a neporušenou osmolaritou. Poskytují tak kvalitnější ochranu před působením negativních vlivů okolního prostředí, avšak na úkor snadného přístupu k buňkám.

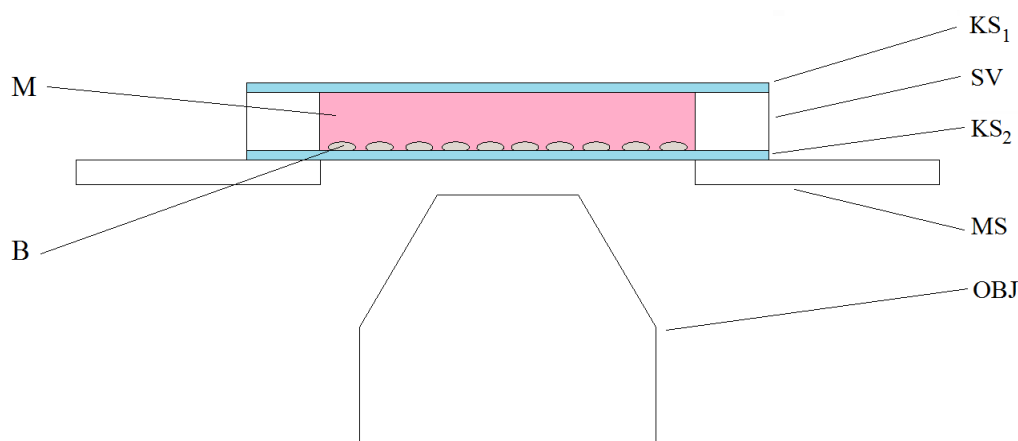
1.3.1 Stacionární komůrky

Buňky lze uzavřít mezi dvě krycí sklička (KS₁, KS₂ – viz obrázek 2), oddělené separační vložkou SV (obrázek 2). Separační vložka vymezuje buňkám životní prostor a brání působení

tlaku krycích sklíček. Musí být z chemicky inertního a sterilizovatelného materiálu, například z pryže nebo teflonu.

Díky nedokonalému přilnutí okrajů sklíčka k separační vložce dochází k vypařování média, což vede ke zvýšení iontové koncentrace a změně pH. Zvýšení adheze kontaktních ploch může být zajištěno jedním z mnoha těsnících prostředků: silikonovým tmelem, vakuovou vazelinou, nebo prostředkem známým jako Valap (směs vazelíny, lanolinu a parafínu) k zajištění vodotěsného spoje [5]. Nevýhodou je obtížnost výměny kultivačního média bez narušování sterility prostředí opětovným otevíráním a uzavíráním komůrky.

V Laboratoři experimentální biofotoniky se stacionární komůrky úspěšně používají ([2], kap. 3). Dolní sklíčko je silikonem permanentně přilepeno ke kruhové nerezové vložce. Horní odnímatelné sklíčko se utěšňuje vakuovou vazelinou. Požadovaná teplota v komůrce je zajištěna vyhříváním mikroskopového stolku a komory, ve které je celý mikroskop uložen.



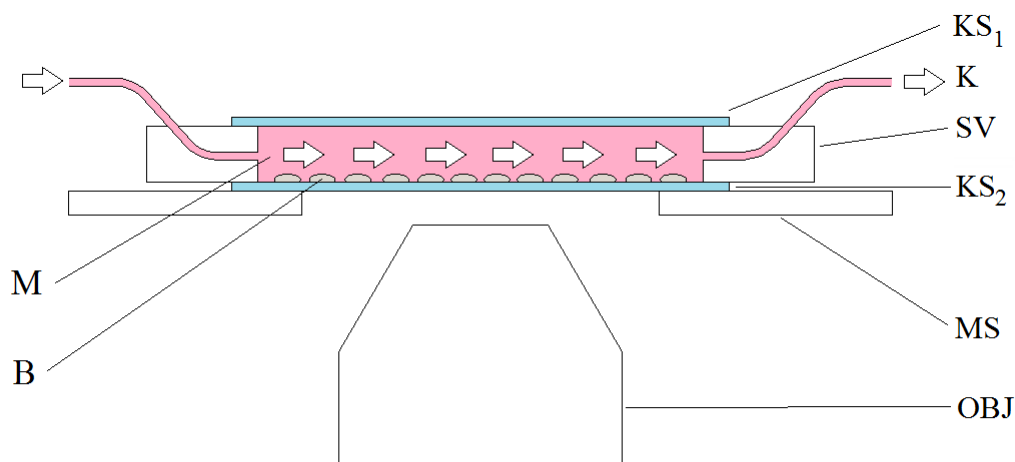
Obrázek 2: Schéma stacionární komůrky.: M – kultivační médium, B – buňka, KS₁, KS₂ – krycí sklíčka, SV – separační vložka, MS – mikroskopový stůlek, OBJ – objektiv.

1.3.2 Průtokové komůrky

Většina uzavřených komůrek disponuje kanálky (viz obrázek 3), kterými je umožněn odtok starého kultivačního média a přítok nového. Použití průtokových systémů má několik potenciálních výhod pro pozorování buněčných procesů:

- Přítokem čerstvého média se udržuje optimální pH kultivačního prostředí.
- Průtokový systém poskytuje možnost výměny média s jiným složením a vyhodnocení reakce buněk na změnu prostředí. Mohou se plynule přidávat jak živiny, tak různá chemická činidla, indikátory nebo barviva.
- Rychlost průtoku může být kontrolována, což umožňuje ovlivnění rychlosti reakce buněk na biologicky aktivní látky.
- Postupnou reakci lze realizovat přidáváním odlišných látek v různých časech za sebou.
- Vzorek může být v okamžiku určitého buněčného stadia fixován, a tak umožní studii požadovaného stavu buňky po delší dobu.
- Bez potřeby vyjmutí z mikroskopu lze po celou dobu pozorování sledovat stejnou buňku bez přerušení pozorovací sekvence.

Existuje řada návrhů průtokových komůrek od jednoduchých [6], [7], snadno vyrobitelných, až ke komplikovaným [8], [9] usnadňující kultivaci přímo v mikroskopu. Historickým vývojem průtokových komůrek a různými typy konstrukčního řešení se zabývá následující část 1.4.



Obrázek 3: Schéma průtokové komůrky: M – kultivační médium, B – buňka, KS₁, KS₂ – krycí sklička, K – kanálek, SV – separační vložka, MS – mikroskopový stůl, OBJ – objektiv. Průtokové komůrky umožňují výměnu kapalného prostředí pomocí přítokového a odtokového kanálku ve směru šipek.

1.4 Historický vývoj průtokových komůrek

Informace o historickém vývoji byly čerpány z publikací [3], [5], [10], [11], [12] a jsou shrnuty v následující části.

První pokusy o udržování živých buněčných kultur, separovaných od jejich originálního prostředí, byly provedeny koncem 19. století. V roce 1885 Wilhelm Roux [13] dokázal po určitou dobu udržet živé explantované kuřecí embryonální buňky v uměle připraveném médiu. V roce 1907 Ross Harrison [14] pozoroval růst nervových vláken ve tkáni žabího embrya, uzavřených do komůrky s lymfou. Nová metoda pro kultivaci živých tkání v umělých laboratorních podmínkách in vitro postupně ukázala, že mnoho různých druhů buněčných tkání může přežít a dále růst po nějaký čas mimo živý organismus. Od prvních pokusů kultivace in vitro přirozeně vyplynula potřeba konstruovat kultivační komůrky takovým způsobem, aby výživové médium mohlo být vyměněno nebo kontinuálně protékat bez narušení vzorku. Historický vývoj průtokových komůrek lze sledovat z četných biologických publikací, jejíž hlavní kroky shrnuje tabulka 1.

První průtokovou komůrku po Harrisonově úspěchu popsal Burrows [15] v roce 1912. Použil korkový materiál mezi krycím a podložním sklíčkem a bavlněný knot pro správné proudění média. Účelem komůrky bylo testování chemického složení kultivačního média, koncentrace solí a živočišných extraktů, aby se co nejlépe nahradilo prostředí v těle živého organismu. Testovaná média se přidávala bez jakéhokoli přerušení pozorování. Bylo pozorováno ovlivnění buněčného růstu ptačí embryonální tkáně. Podobný aparát v celoskleněné verzi popsal Romeise v tomtéž roce [16].

Po zavedení nové metody mikroskopového pozorování s fázovým kontrastem [17] se v 50. a 60. letech 20. století začaly tvořit sofistikovanější průtokové komůrky s lépe

definovanou optickou dráhou pro pozorování s vysokým rozlišením [18]. Nejlepším řešením bylo planparalelní uložení tenkých skleněných krycích sklíček nad sebou, oddělených separační vložkou. Poskytovaly optimální optické podmínky pro mikroskopii buněk rostoucích na vnitřní straně spodního sklíčka.

Jednodušší typy komůrek vyrobené z jedné až několika vrstev plexiskla [7], [19] měly problém se sterilizací (při vysokých teplotách se prohýbaly) a vykazovaly toxicitu pro některé typy buněk [11]. Byly nepoužitelné pro intenzivní denní používání díky mechanické nestabilitě a nestálým lepeným spojmům [20].

Konstrukčně komplexnější komůrky s vnější oporou sklíček většinou z nerezové oceli měly sice vyšší mechanickou odolnost, přesto byly nepraktické a časově náročné na montáž a manipulaci [11]. Byly založeny na vrstvení dvou krycích sklíček, oddělené například pryžovým o-kroužkem mezi dvěma kovovými destičkami [18]. Mnoho průtokových komůrek bylo následně konstruováno modifikací tohoto základního designu (popsáno v části 1.5) [21], [22], [23], [24]. Nerovnoměrné tlakové zatížení krycích sklíček vedlo k jejich častému praskání, což bylo jejich značnou nevýhodou. Rovněž zavádění přítokových jehel přes pryžové těsnění způsobovalo nežádoucí deformace krycích sklíček [20], [25].

Využití kinematografického snímání [26] umožnilo vědcům provádět od 70. let 20. století systematické studie chování živých buněk a jejich vnitrobuněčných procesů při prodlužování časových úseků pozorování.

Při návrhu komůrek bylo snahou konstruktérů zajistit těsnost komůrky, paralelitu krycích sklíček bez jejich prohýbání, minimalizovat tloušťku komůrky vzhledem k velikosti pracovní vzdálenosti objektivů a zároveň dosáhnout velké pozorovací oblasti. Vhodnou volbou tvaru vnitřního prostoru komůrky a velikosti rychlosti průtoku kapaliny komůrkou se konstruktéři snažili vyřešit problém mrtvých objemů způsobující špatnou výměnu kapalin (viz část 1.5.3). Každý nový návrh se snažil vyřešit nedostatek předchozích za cenu jiných nedokonalostí. Rovněž snahy o navržení univerzální komůrky se neobešly bez určitých kompromisů [27].

1.4.1 Přehled návrhů průtokových komůrek

Tabulka 1 tvoří přehled vlastností některých uzavřených průtokových komůrek, vytvořených do roku 2000. Je přihlíženo k tvaru vnitřního prostoru komůrky, celkové tloušťce, vnitřnímu objemu, typu těsnění, materiálu a rychlosti průtoku média. Všechny návrhy používají dvě krycí sklíčka nebo jedno podložní a jedno krycí sklíčko, oddělené těsnícím materiálem, vymezující vnitřní prostor komůrky.

Autor	Rok	Tvar	VPP [mm ²]	VH [mm]	CT [mm]	Objem [ml]	Lepení/těsnění	Materiál	Průtok [ml.min ⁻¹]	O/Z	Motivace návrhu/účel použití
Burrows [15]	1912	□	-	-	-	-	parafin	korek	-	Z	tkáň pěstovaná na bavlněném knotu
Toy [7]	1958	○/□	284/412	1	3	0,28	pryskyřice	plexisklo	-	Z	2 typy tvaru, hadičky přiváděny shora, FK
Sykes [18]	1959	○	284	> 3,6	6,5	0,7	silikon (o)	NO	(IP)	Z	FK
Poyton [20]	1970	□	400	> 1	4,1	> 0,63	pryž (o)	NO	-	Z	laminární proudění
Dvorak [22]	1971	○	630	0,5	8,9	0,45	teflon (o)	NO	0,17	Z	kultivace mnohobuněčných organismů
Spring [9]	1978	○	1,8	0,075	1,1	-	teflon(o), plast	NO	-	Z	měření mezibuněčného prostoru
Pearce [28]	1981	□	484 (?)	-	-	0,4	silikon	NO	0,4	Z	vícekanálový přívod pro laminární proudění
Berg [29]	1984	□	58	0,4	4	0,05	vakuová vazelína	NO	3	Z	pro objektivy s krátkou pracovní vzdáleností
Strange [30]	1986	○	65	1,2	2,5	0,08	silikon	plexisklo	10	O	manipulace s pipetami
Finch [23]	1988	○/□	380	0,2	4	0,005	cement, teflon	NO	0,01- 0,5	Z	malá CT s velkým VPP
Braga [27]	1989	○	283	0,5	3	0,21	teflon, silikonová vazelína	NO	(PP)	Z	univerzální pro různé experimenty
Ince [8]	1990	○	314(?)	-	-	2	silikon (o)	teflon,NO	1	Z	kontrola teploty, pH, CO ₂ uvnitř komůrky
Pentz [24]	1992	○	660/800	0,225-1,2	5,5	0,15-1	silikon (o)	NO	0,01-0,5 (IP)	O/Z	kombinace O/Z, měnitelný vnitřní objem
Kaplan [10]	1996	□	200	1	-	0,5	silikon	NO, plexisklo, teflon	120-480	Z	záměrně turbulentní proudění
Freyberg [31]	1998	○	175 (?)	0,5	3 (?)	0,056	silikon	polykarbonát, hliník	0,01-0,36 (PP)	Z	s membránou pro buňky v suspenzi
Reider [12]	1998	□	232	0,25	4,93	0,25	valap	NO	60	Z	vzpřímený a invertovaný mikroskop
Hing [11]	2000	○	380	0,6	5 (?)	0,245	teflon, silikon	NO	0,008	Z	jednoduchá, levná

Autor uvedeno první jméno autora publikace, popisující průtokovou komůrku

Rok rok vydání publikace,

Tvar tvar pozorovací plochy: ○ - kruhový, □ - čtvercový, □ - obdélníkový, ○ - oválný

VPP velikost pozorovací plochy komůrky s buněčným vzorkem,

VH hloubka vnitřního prostoru komůrky,

CT celková tloušťka smontované komůrky,

Objem celkový objem vnitřního prostoru komůrky,

Lepení/těsnění materiál, použitý k utěsnění částí komůrky, hlavně prostoru mezi sklíčky, (o) znamená těsnění ve tvaru o-kroužku,

Materiál materiál podpurných a montážních částí, NO – nerezová ocel

Průtok průtok kapaliny komůrkou, v některých případech neuvedeno, či jen informace o použití peristaltické (PP) nebo injekční (IP) pumpy,

O/Z údaj, zda šlo o otevřený či uzavřený typ komůrky,

Specializace hlavní cíl, pro který byla komůrka vytvořena, FK – konstrukce komůrky řešena pro pozorování fázovým kontrastem,

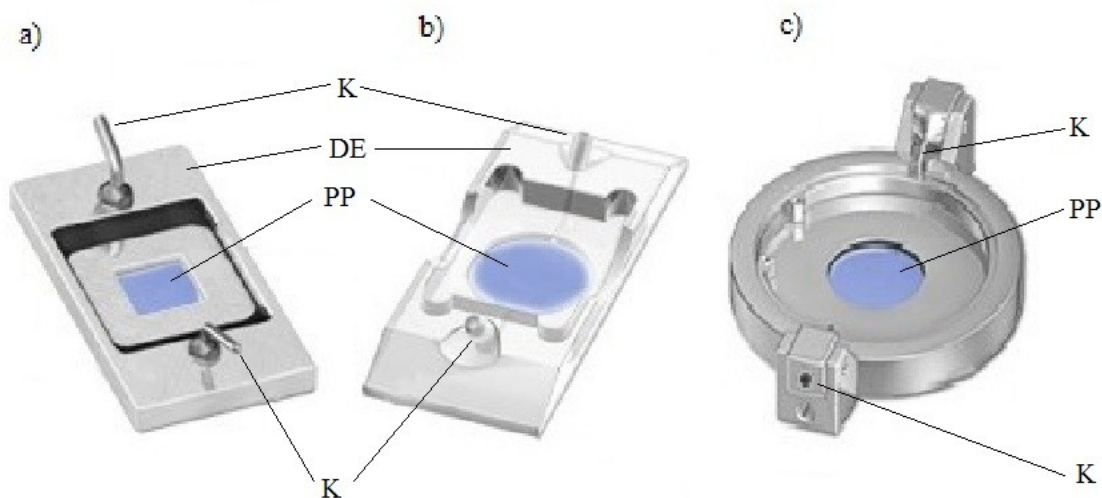
(?) odvozené údaje z jiných parametrů.

Tabulka 1: Přehled návrhů průtokových komůrek.

1.5 Základní typy průtokových komůrek

Návrhy průtokových komůrek a jejich modifikace lze z hlediska konstrukce rozdělit do dvou skupin [3], [5], [12].

První skupina komůrek vychází z obdélníkové destičky (obrázek 4a, 4b), která slouží jako opora pro krycí sklíčka a přítokové kanálky. Vyrábí z nerezové oceli [6] [12], [26], [29], případně plexiskla [18]. Mají obdélníkový nebo kruhový otvor. Dvě krycí sklíčka jsou z obou stran otvoru paralelně přilepena k destičce těsnicím prostředkem (Valap [12], oboustranná lepicí páska [6]). Jsou náchylné k prosakování, pokud nejsou náležitě smontovány. Komůrky na obrázku 4a a 4b reprezentují návrhy tohoto typu. Odvozené konfigurace byly navrženy v mnoha laboratořích a jsou komerčně dostupné [32].

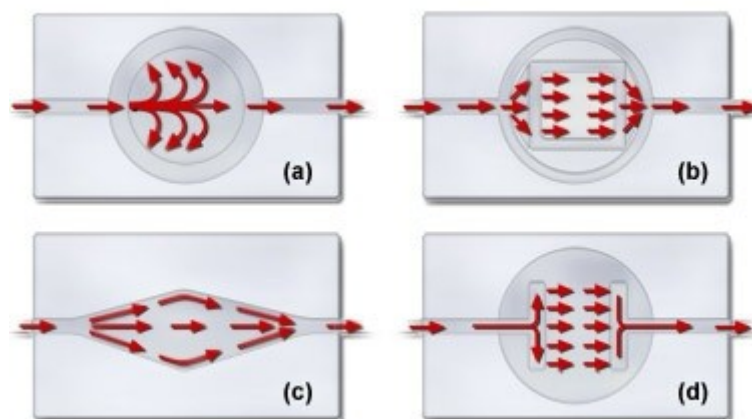


Obrázek 4: Schéma návrhů průtokových komůrek: první typ průtokové komůrky a) z nerezové oceli [12], b) z plexiskla [19], c) druhý typ průtokové komůrky [22], K – kanálek, DE – podpůrná destička, PP – pozorovací plocha. (převzato z [5]).

V druhém, běžnějším typu průtokových komůrek, jsou na sebe vrstveny opory krycích sklíček, krycí sklíčka a těsnící distanční vložky (obrázek 4c a obrázek 9 – v rozložené formě). Opory sklíček, většinou kruhové [8], [18], [22], nebo obdélníkové kovové destičky [11], [20] [23], [28] s otvorem pro zorné pole, jsou sepnuty nebo sešroubovány dohromady. Mezi destičky jsou vložena dvě krycí sklíčka oddělená distanční vložkou. Kruhová průtoková komůrka na obrázku 4c je známa pod pojmem Dvorak-Stotler podle původního návrhu z roku 1971 [22]. Tento typ je sice složitější na montáž, ale univerzální pro experimenty, díky zaměnitelné distanční vložce s jiným tvarem a tloušťkou. Umožňuje tak konstrukci s požadovaným objemem a průtokovou charakteristikou. Používá se i dnes v komerčně dostupné verzi (viz Bioptechs, část 1.5.4).

1.5.3 Rozdělení komůrek podle tvaru vnitřního prostoru

Mezi nejdůležitější vlastnosti průtokových komůrek patří charakter proudění kapaliny uvnitř komůrky. Laminárním prouděním může být kapalina v komůrce vyměněna rychle a účinně s relativně malým promícháním. Při turbulentním proudění dochází k promíchávání s novou kapalinou a nelze tedy snímat reakci buněk na definované prostředí s přesnou molární koncentrací. Kinematika kapaliny je závislá na tvaru vnitřního prostoru komůrky. Obecně platí, že čím menší je poměr velikosti šířky a délky vnitřního prostoru, tím lepší prokazuje komůrka průtokovou charakteristiku. Obrázek 5 porovnává kinematiku proudění kapaliny ve čtyřech typech komůrek s rozdílným tvarem vnitřního prostoru.

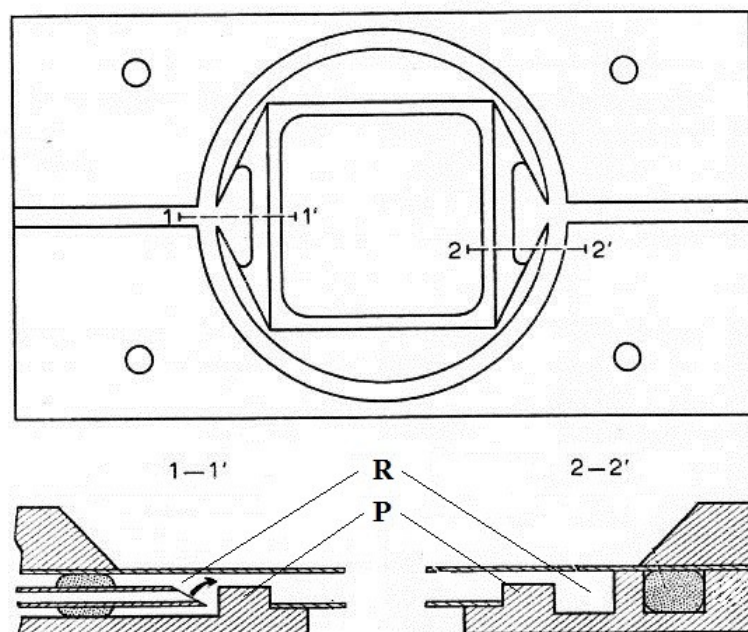


Obrázek 5: Schéma typů komůrek s různými tvary vnitřního prostoru: a) kruhový tvar, b) s rezervoárem c) kosočtvercový tvar, d) s mikrokanálky. (převzato od [5]).

V prostoru s kruhovým půdorysem na obrázku 5a, který se vyznačuje prudkým rozšířením prostoru na konci přítokové hadičky, se proudnice rozptýlí a před odplavením dojde k promíchání s předchozí kapalinou. Kruhový tvar je vhodný jen pro malé rychlosti průtoku, protože při vyšších rychlostech se tvoří víry [5]. Pomalý průtok je výhodou jak pro adhezi buněk na pevném podkladě, tak pro stabilitu optické dráhy, ale méně vhodný pro snímání rychlých reakcí na změnu prostředí v časovém rozsahu milisekund až sekund díky pomalé výměně kapalin a ředění nové kapaliny s přesnou koncentrací látek.

Předchozí kruhové průtokové komůrky (viz tabulku 1) byly navrhovány především pro laminární proudění s malou průtokovou rychlostí do $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [9], [27]. Průtokové komůrky s rychlým prouděním mají mrtvé objemy neboli nerozmíchané vrstvy, které limitují minimální čas potřebný k efektní výměně kapalin v celém vnitřním prostoru komůrky. Objevil se i návrh, který záměrně pracoval s rychlostmi nad laminární oblastí proudění pro pozorování rychlých reakcí buněk na přidané činidlo. Eliminace mrtvých objemů bylo dosaženo řízenou regulací proudění mezi dvěma vtoky a výtoky [10].

Zajímavé řešení představuje komůrka na obrázku 5b [20] a obrázku 6. Kapalina vtéká přítokovým kanálkem do rezervoáru R, přetéká přes přepad P a zajišťuje tak rovnoměrné proudění přes pozorovanou plochu.



Obrázek 6: Schéma typu průtokové komůrky s rezervoárem: R – rezervoár, P – přepad. (převzato z [20]).

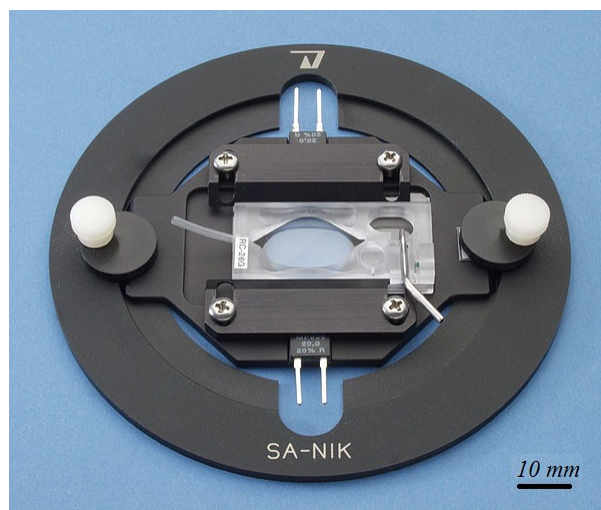
Vnitřní prostor komůrky s půdorysem ve tvaru kosočtverce (obrázek 5c) vykazuje podle výrobce Warner Instruments [33] perfektní průtokové vlastnosti. Uzavřenou komůrku s postupně rozšiřujícím se profilem využívá ve výrobní sérii RC-20 s doporučenou průtokovou rychlostí $0,5-5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Výrobce tvrdí, že tento typ komůrky zabezpečuje stálé laminární proudění s malým promícháváním vyměňujících se kapalin.

Čtvrtý typ komůrky (obrázek 5d) využívá mikrokanálků k usměrnění proudnic kapaliny a získání téměř laminárního proudění přes pozorovanou oblast s buňkami. Komůrka je komerčně dostupná od firmy Bioptechs (část 1.5.4). Výrobce neuvádí průtokovou rychlost, ale doporučuje k systému peristaltickou pumpu s rozsahem $0,3 - 1,25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

1.5.4 Komerčně dostupné komůrky

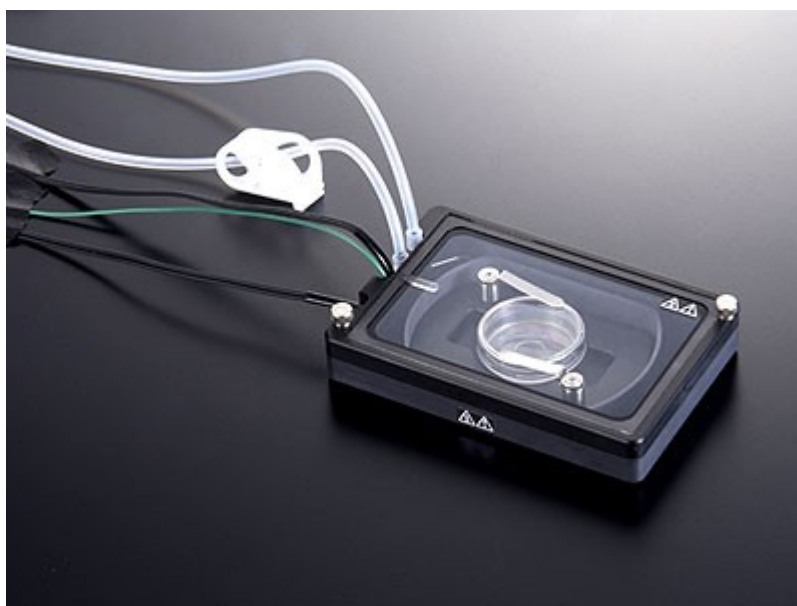
Komerčně dostupné široké spektrum průtokových komůrek pro živé buňky, od jednoduchých řešení až po komplexní systémy, umožňují kontrolu všech požadavků kultivačního prostředí jako v inkubátoru. Nejdůležitějším aspektem všech moderních kultivačních komůrkových systémů je schopnost garantovat zdraví buněčné kultury a růst v normálním časovém úseku. Tato část uvádí příklady nejběžnějších typů komůrkových systémů.

Již zmíněná firma Warner Instruments [33] se specializací na buněčný výzkum nabízí celé průtokové systémy od průtokových komůrek, nástavců na mikroskopový stůl, vyhřívání, až po senzory kontrolující kultivační prostředí. Průtokové komůrky (obrázek 7) se většinou skládají z malé plastové obdélníkové základny, vložené do kovového nástavce pro kontrolu teploty. Jsou dobře použitelné v konfokální mikroskopii. Výrobce nabízí adaptéry na mikroskopové stolky pro většinu výrobců mikroskopů (Nikon, Leica, ...).



Obrázek 7: Průtoková komůrka od výrobce Warner Instruments: plastová základna v kovovém nástavci (převzato z [33]).

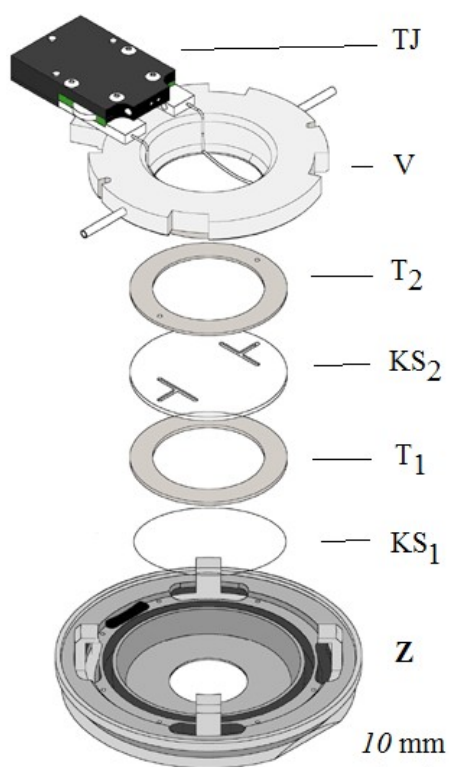
Zařízení od firmy Tokai Hit (obrázek 8) je nádoba, do níž se komůrka se vzorkem vkládá, a která nejlépe napodobuje inkubátor na mikroskopovém stolku. Tento mikroinkubátor je důkladně vyhříváný a zaplňován CO_2 . Vysoké vlhkosti dosahuje vypařováním vody z nádržky. Horní stranu mikroinkubátoru uzavírá vyhřívané sklo (zabránění kondenzaci vody), dolní stranu utěšňuje vložená komůrka. Vyrábí se více modifikací pro nejběžnější značky mikroskopů [34].



Obrázek 8: Inkubační systém Tokai Hit (převzato z [34]).

Často používaný [35], [36] a lépe hodnocený [3] průtokový systém je komůrka FCS-2 od firmy Biophtechs [37] (obrázek 9). Jak už bylo zmíněno v části 1.5.3, využívá mikrokanálky pro rovnoměrné proudění kapaliny komůrkou. Skládá se ze základny Z s bajonetovým spojem, krycího sklíčka KS_1 s buněčným vzorkem, hlavního těsnění T_1 , krycího sklíčka s mikrokanálky KS_2 , horního těsnění T_2 , víka V s vtokovými kanálky a topné jednotky TJ. Umožňuje výběr vnitřního objemu a charakteristiku proudění kapaliny použitým tvarem a tloušťkou hlavního těsnění. Může se tak přizpůsobit různým typům experimentů.

Konstrukce i vnější rozměry jsou kompatibilní s většinou mikroskopů a pro všechny metody optické mikroskopie. Potenciální problém je relativně velký mrtvý objem v průtokové komůrce. Výrobce uvádí závislost velikosti mrtvého objemu na průměru vtokových kanálků.



Obrázek 9: Rozložené schéma průtokové komůrky FCS-2 od firmy Bioptechs: Z – základna, KS₁, KS₂ – krycí sklíčka, T₁, T₂ – těsnění, V – víko, TJ – topná jednotka. (převzato z [37]).

2 Vlastní návrh průtokové komůrky

Experimenty v CCHM nás vedly k návrhu specifického komůrkového systému. Realizace vlastní komůrky byla zapříčiněna jednak finanční náročností komerčně dostupných průtokových systémů, jednak těžkou adaptovatelností průtokových systémů pro CCHM se specifickou konstrukcí. Tato kapitola je věnována návrhu a konstrukci vlastní průtokové komůrky a potřebného příslušenství, odlévací formy a nosiče komůrky, vyhovující konstrukčním rozměrům CCHM.

2.1 Základní požadavky

Komůrkový systém musí splňovat následující požadavky:

- uzavřený systém, který umožní dlouhodobé pozorování dynamického chování buněk, zabránění odpařování média a zajistí sterilní prostředí pro buňky,
- systém umožňující spojitý a rychlý průplach bez přerušování pozorovací sekvence,
- tvar rozměrově vyhovující konstrukčnímu řešení DHM mikroskopu s ohledem na zobrazovací vlastnosti objektivů,
- snadné čištění a sterilizace pro opakované použití,
- konstrukce z biologicky inertních, netoxických materiálů,
- úsporná výroba,
- snadná montáž.

Při návrhu průtokové komůrky, která dovolí prodloužit pozorování buněčné dynamiky mikroskopem, se musí zvážit následující parametry geometrie komůrky.

Základní parametry komůrky ovlivňují kvalitu zobrazení mikroskopem. Tlustá stěna skleněné nebo plastické Petriho misky je pro pozorování v mikroskopu s vysokým rozlišením nepoužitelná. Vhodnější je nádobka s tenkými krycími sklíčky, jejíž paralelní plochy mají pevnou geometrickou tloušťku nepřevyšující pracovní vzdálenost objektivů.

Sklíčka by měla být uložena bez napětí s dostatečně velikou podpůrnou oblastí k omezení prohýbání či praskání. Příliš velká podpůrná oblast však omezuje velikost pozorovací oblasti a vnitřního objemu komůrky. Objem média by měl být dostatečný k udržování optimálního prostředí pro dlouhodobou kultivaci buněčné kultury v komůrce, aniž by se muselo médium vyměňovat častěji než po 24 hodinách.

Při návrhu průtokové komůrky se musí zvážit pozice vtokového a výtokového otvoru, aby umístění hadičkového vedení kapaliny nelimitovalo použití v různých typech mikroskopů. Komůrky s bočními přírady, které má většina komůrek vrstveného typu (část 1.5), nepřekážejí při výměně objektivů v revolveru a mohou být použity v normálním nebo invertovaném mikroskopu. Komůrky, jež mají vtokové a výtokové otvory situovány na vrcholu komůrky [7], [12], se mohou potýkat s problémy umístění v mikroskopu.

2.2 Návrh a konstrukce

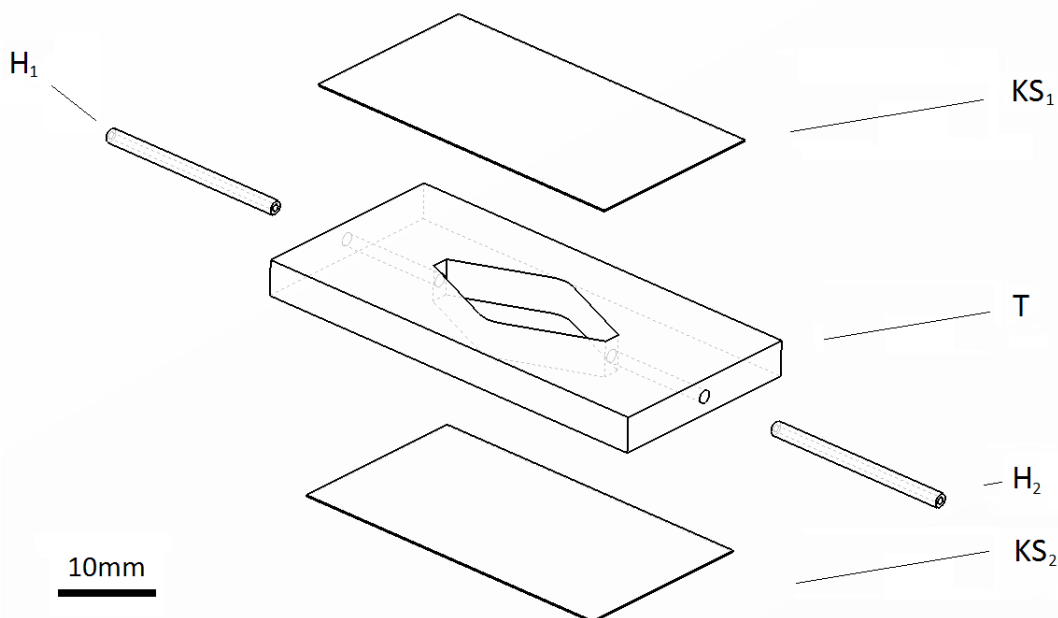
Navržená komůrka (obrázek 10) se skládá ze silikonového těla T o rozměrech $24 \times 50 \times 4,2 \text{ mm}^3$ a dvou krycích sklíček KS_1 a KS_2 $22 \times 44 \times 0,17 \text{ mm}^3$, které vymezují vnitřní prostor komůrky obsahující pozorované buňky a médium. Silikonové tělo má funkci opory sklíček a vedení kapaliny komůrkou. Sklíčka nejsou k tělu přilepena. Pórovitost materiálu silikonového těla je tak malá, že krycí sklíčka drží pouze adhezí a vytvářejí dostatečně pevný spoj pro dané rychlosti proudění kapaliny. Není potřeba žádné těsnění nebo lepení, které by narušovalo planparallelitu komůrky.

Průtok kapaliny komůrkou je zajištěn ze strany přivedenými teflonovými hadičkami H_1 a H_2 s vnitřním průměrem 0,8 mm a délkou 30 mm. Teflonové hadičky o vnějším průměru 1,6 mm jsou zasunuty do bočních protilehlých otvorů silikonového těla o stejném průměru. Vnitřní průměr hadiček by měl být co největší pro lepší kinematiku proudění kapaliny, ale omezuje jej tloušťka komůrky. Pružný silikonový materiál těla potřebuje určitou tloušťku, aby nedocházelo k borcení stěny a špatnému těsnění. Teflonové hadičky tvoří přechodový člen mezi silikonovým tělem a silikonovými hadičkami, které jsou na teflonové hadičky nalisovány (viz část 2.3).

Celková tloušťka komůrky 4,54 mm je omezena pracovní vzdáleností použitých objektivů. V CCHM s používají ve funkci kondenzorů hlavně objektivy PL L 20x/0,40 s dlouhou pracovní vzdáleností $WD = 7,5$ mm (working distance) a objektivy PL 20x/0,40 ($WD = 0,5$ mm), nebo dva páry objektivů 10x/0,25 ($WD = 7,5$ mm).

Otvorová vada způsobená průchodem světla určitou tloušťkou média s buňkou je částečně eliminována při rekonstrukci hologramu. Díky konfokálnímu charakteru zobrazování holografickým mikroskopem lze zobrazit požadovanou rovinu s buňkami bez rozptýlu z jiných osových výšek komůrky.

Vnitřní prostor komůrky ve tvaru kosočtverce (tvar půdorysu - viz obrázek 12) byl vybrán na základě komerčního výrobce průtokových komůrek Warner Instruments (část 1.5.3) s předpokladem správného laminárního proudění, jak lze vidět na obrázku 5c. Vzhledem k typu konstrukce námi navržené komůrky nelze používat peristaltickou pumpu k čerpání kapaliny do komůrky jako v případě komůrek od Warner Instruments dosažení nízkých průtokových rychlostí. Průtoková komůrka je v našem případě proplachována gravitačním spádem, dosahujícím objemového průtoku $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, a projevujícím se jinou charakteristikou rychlostního profilu, než je uvedeno ve článku [38] při vyhodnocování komůrky RC-30 HV od firmy Warner Instruments, kde je uveden objemový průtok $1,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. O kinematice průtoku kapaliny vyrobenou průtokovou komůrkou pojednává část 3.2 této práce.



Obrázek 10: Rozložené schéma sestavy navržené průtokové komůrky: T – tělo, H_1 , H_2 – teflonová hadička, KS_1 , KS_2 – krycí sklíčko.

2.2.1 Tělo

Pro výrobu těla komůrky byl zvolen čirý silikonový elastomer Sylgard 184. Protože před vytvrzením snadno zatéká i do drobných struktur, používá se pro zalévání plošných spojů a solárních článků jako pružný zapouzdřovací přípravek.

Středně viskózní báze elastomeru se ve skleněné nádobce smíchá s vytvrzujícím činidlem v poměru 10:1. Mícháním se ve hmotě vytvoří vzduchové bubliny, které po zatuhnutí způsobují nežádoucí kavity na stěnách silikonového těla. K zajištění hladkosti stěn vnitřního pracovního prostoru a styčných nasávacích ploch těla je bezpodmínečně nutné odstranit vzduchové bubliny z hmoty. Odstraňují se podtlakem vytvořeným odčerpáním vzduchu v nádobce vodní vývěvou. Bubliny se podtlakem zvětší a otevřením nádoby vlivem změny tlaku popraskají.

Získaná směs se odlévá do námi vyrobené formy, popsané v části 2.2.2. Směs se vytvrdí po 48 hodinách při pokojové teplotě 25°C. Při zvýšené teplotě se zkracuje doba vytvrzení. V našem případě vkládáme formu se směsí do pece a vytvrzujeme 3 hodiny při 50°C. Teplota je omezena teplotou tání lepidla (100°C), použitého při výrobě odlévací formy. Vytvrzením silikonové směsi v peci vzniká odlitek. Při vytvrzování za zvýšené teploty nedocházelo k nežádoucímu smrštění hmoty.

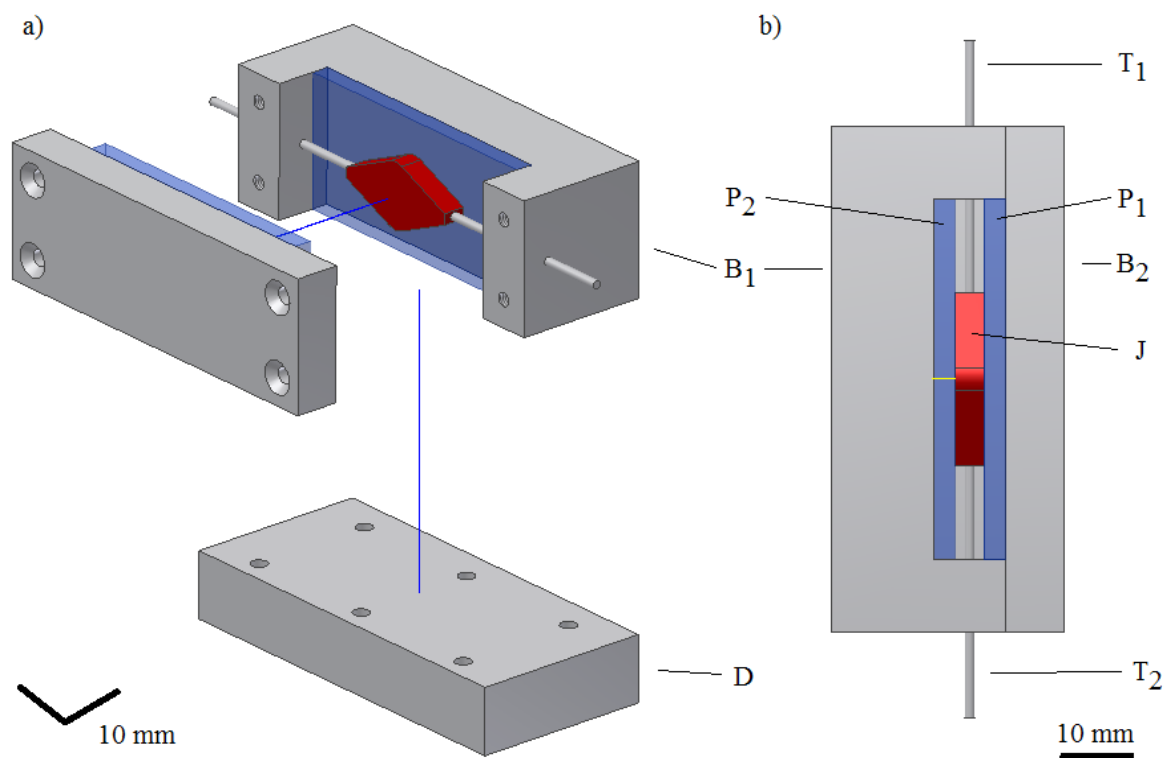
2.2.2 Odlévací forma

Odlévací forma se skládá ze šesti částí (obrázek 11) udělujících důležitým plochám odlitku správný tvar a vlastnosti.

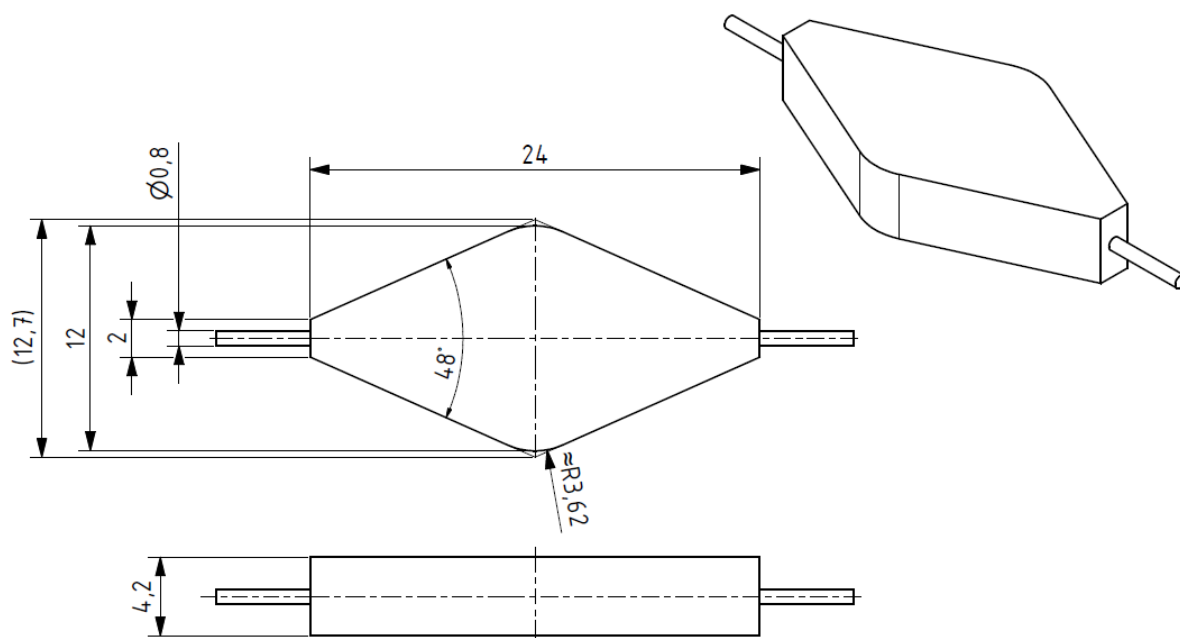
Bočnice B_1 a B_2 jsou hlavními částmi, které zajišťují planparalelitu a hladkost odlitku. První bočnice B_1 z hliníkové slitiny AlCuMgPb (EN AW-2030) má tvar písmene U s vnějšími rozměry 70 x 24 x 24 mm³. Druhá bočnice B_2 je přišroubována čtyřmi šrouby M3 k dosedacím plochám bočnice B_1 . Je vyrobena ze slitiny AlMgSi0,5 (EN AW-6060) a má rozměr 70 x 24 x 8 mm³. Na obě bočnice jsou lepidlem na bázi vosku a pryskyřice přilepeny podložky (P_1 , P_2) z plaveného skla (Float, EN 572-2) o rozměrech 50 x 24 x 3 mm³. Vlastnost elastomeru přesného kopírování povrchu je využita k získání hladké plochy na rozhraní se sklem. Skleněnými podložkami je tak zajištěna dokonalá hladkost horní a dolní plochy silikonového těla a umožňuje přisátí krycích sklíček. Třetí část D tvoří dno odlévací formy s rozměry 70x 32 x 12 mm³. Dno bylo vyrobeno ze stejného materiálu jako bočnice B_1 . Povrchy bočnic a dna odlévací formy byly upraveny elektrolytickou oxidací (elox).

Vnitřní prostor odlitku vymezuje jádro J (obrázek 12). Z důvodu zamezení difuze toxických látek do silikonového těla komůrky byl zvolen k výrobě jádra polyamid PA 6 s obchodním označením Ertalon 6 SA (firma Tribon), který je chemicky inertní do teplot 100°C. Vtokové kanálky do vnitřního prostoru těla jsou formovány tyčemi T_1 a T_2 z nerezové oceli o průměru 1,5 mm, vedené ze strany formy do jádra.

Nevytvrzená silikonová hmota se vlévá do formy shora. Forma se musí před každým odléváním vyčistit acetonem od nečistot a zbytků zaschlého silikonu z předešlého odlévání. Jednotlivé části formy musí být dostatečně pevně sešroubovány, aby se silikonová hmota nedostala mezi ertalonové jádro a skleněné plochy. Přílišné utažení šroubů však může způsobit praskání skel.



Obrázek 11: Trojrozměrný model vlastního návrhu odlévací formy:
a) rozložený tvar: b) složený tvar (pohled shora): B₁, B₂ – bočnice, D – dno,
J – jádro, T₁, T₂ – tyče z nerezové oceli, P₁, P₂ – skleněné podložky.



Obrázek 12: Návrh jádra 1 navržené průtokové komůrky.

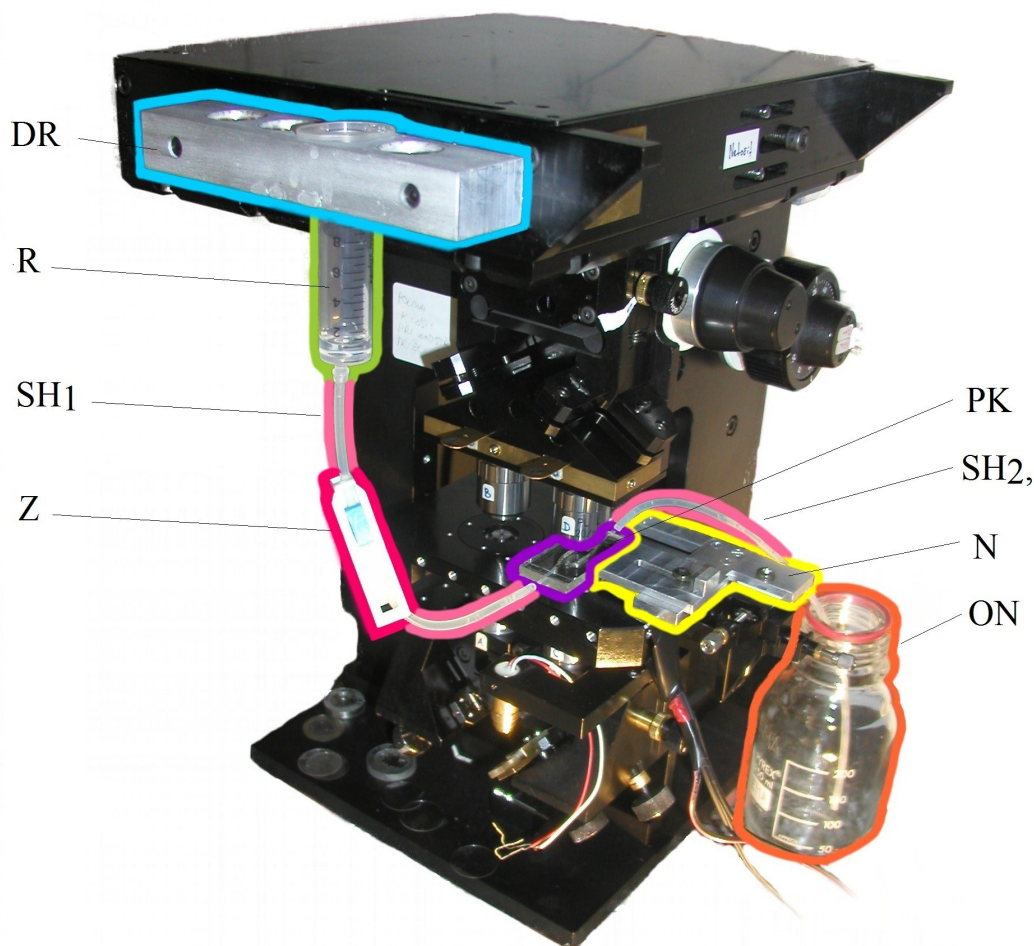
2.3 Průtokový systém

Průtokový systém (obrázek 13) zahrnuje průtokovou komůrku a další části potřebné k výměně kapaliny. Kapalina je do komůrky přiváděna silikonovými hadičkami SH₁ a SH₂ propojujícími komůrku s rezervoárem R a odpadní nádobkou ON. Silikonové hadičky s vnitřním průměrem 1,5 mm jsou nalisovány na teflonové hadičky.

Rezervoár v podobě otevřené injekční stříkačky bez tlačného pístu je uchycen v držáku DR, připevněném přímo k mikroskopu. Injekční stříkačka má vyznačenou mililitrovou stupnici s rozsahem 12 ml pro odměření daného množství protékající kapaliny.

Uchycení komůrky na mikroskopovém stolku zajišťuje nosič N. Průtok kapaliny se reguluje zaškrcovadlem Z. Systém je rozebíratelný, všechny komponenty lze dezinfikovat a znovu použít v dalším experimentu. Celý systém se nachází ve vyhřívané komoře mikroskopu pro zajištění stálé teploty kapalin a všech komponent systému.

Průběh výměny kapalin v průtokovém systému probíhá následovně: Komůrka a hadičky jsou zaplaveny původní kapalinou. Při experimentech se rezervoár naplní kapalinou o požadovaném objemu, uvolní se zaškrcovadlo a kapalina proteče gravitačním spádem komůrkou do odpadní nádoby. Hadička se opět zaškrtní, a to dříve, než hladina dosáhne dna stříkačky, aby se předešlo zavzdušnění a ulpění vzduchových bublin v komůrce.



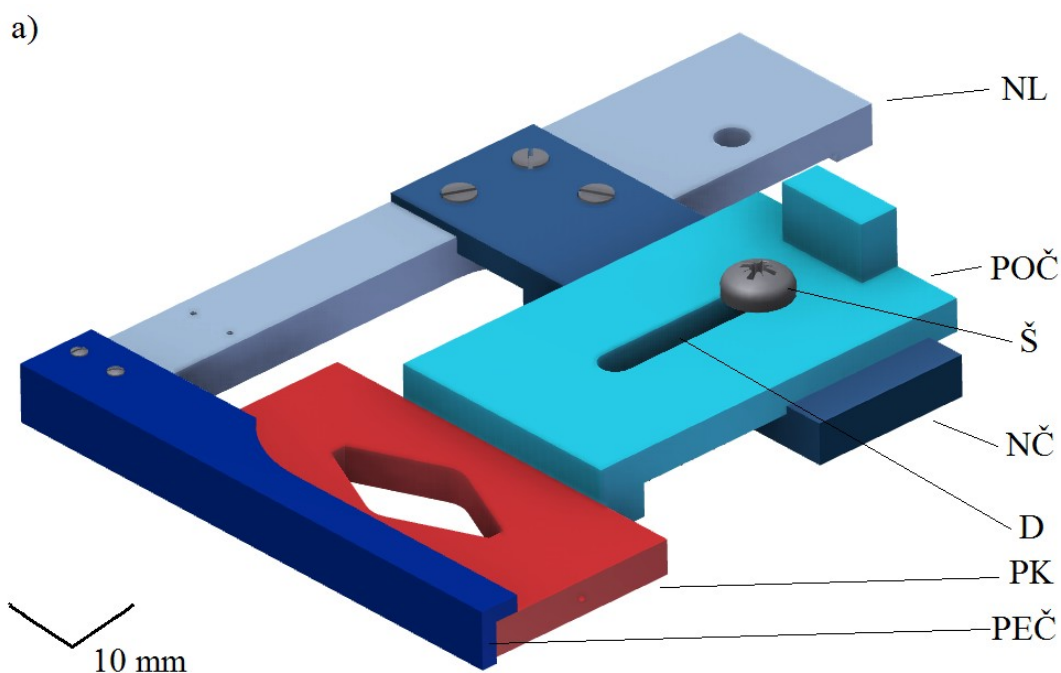
Obrázek 13: Průtokový systém v transmisním CCHM: DR – držák, R – rezervoár, SH₁, SH₂ – silikonové hadičky, Z – zaškrcovadlo, PK – průtoková komůrka, N – nosič, ON – odpadní nádoba.

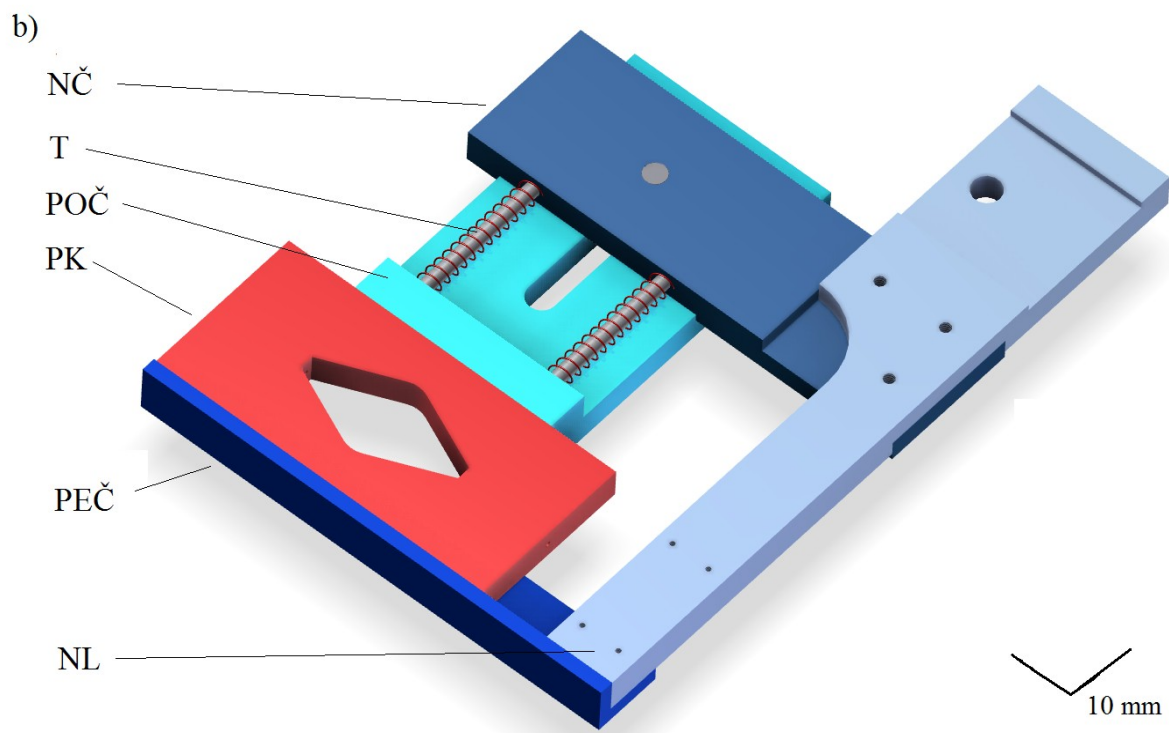
2.3.1 Nosič komůrky

Nosič (obrázek 14) zajišťuje mechanické uchycení komůrky na mikroskopový stolek v požadované poloze. Návrh nosiče byl přizpůsoben konstrukčnímu řešení mikroskopového stolku transmisního holografického mikroskopu. Dobrá tepelná vodivost duralového materiálu, ze kterého je nosič vyroben, pomáhá udržet na vyhřívaném stolku správnou teplotu buněčného vzorku.

Rozměry nosiče byly zvoleny tak, aby se střed komůrky nacházel v zorném poli objektivu. Mikromanipulátor od firmy Thorlabs se dvěma šrouby M3x0,25 a rozsahem 12,7 mm zajišťuje dostatečný posuv komůrky na mikroskopovém stolku v osách (x, y) kolmých na optickou osu z . Celý stolek i s mikromanipulátorem se pohybuje v ose z pro ostření do roviny vzorku.

Nosná lišta NL je položena na stolek a připevněna k mikromanipulátoru. K nosné liště je připevněna pevná čelist PEČ a nosič pohyblivé čelisti NČ. Pohyblivá čelist POČ je opatřena dvěma vodícími tyčemi T, které jsou zalícovány do otvorů nosiče pohyblivé čelisti. Přítlačná síla pohyblivé čelisti je realizována tlačnými pružinami nasazenými na vodících tyčích. Rozsah pohybu posuvu pohyblivé čelisti je vymezen délkou drážky D a polohou dorazového šroubu Š. Přitlačení komůrky pohyblivou čelistí k protilehlé pevné čelisti zajišťuje stabilizaci vzorku bez deformace pružného silikonového těla komůrky. Komůrka je uchycena tak, aby její spodní plocha byla stále přiložena ke stolku, a byla tak definována stejná rovina s referenční komůrkou. Uchycení v referenční větvi mikroskopu vyrobeno nebylo, protože manipulace s referenční komůrkou není zapotřebí.





Obrázek 14: Trojrozměrný model navrženého nosiče průtokové komůrky:
a) horní pohled, b) dolní pohled: NL – nosná lišta, PEČ – pevná čelist,
NČ – nosič pohyblivé čelisti, POČ – pohyblivá čelist, T – vodící tyče,
D – drážka, Š – dorazový šroub, PK – průtoková komůrka.

3 Hlavní parametry průtokového systému

K používání průtokové komůrky, navržené v kapitole 2, v experimentech s živými buňkami je nutné definovat její základní parametry. Uživatel by měl vědět, jakým minimálním množstvím nové kapaliny a jak dlouho komůrku proplachovat, aby se zajistila úplná výměna kapalin. Způsob protékání kapaliny komůrkou ovlivňuje kvalitu holografického zobrazení buněčného vzorku. V následujících částech práce jsou popsány provedené simulace proudění v komůrce a jsou provedena experimentální měření, která ověřují chování průtokové komůrky v mikroskopu.

Z důvodu nedostatku speciálního kultivačního média je používána v těchto experimentálních měřeních destilovaná voda. Vzhledem k hodnotě kinematické viskozity kultivačního média $(1,037 \pm 0,07) \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, nemá použití destilované vody zásadní vliv na vypovídací hodnotu provedených experimentů.

3.1 Průtoková rychlost

Výměna kapalin v průtokové komůrce, jak už bylo popsáno v části 2.3, je provedena jednorázovým naplněním a vypuštěním rezervoáru. To znamená, že hladina v rezervoáru nemá konstantní výšku během průtoku kapaliny komůrkou. Teoretická výtoková rychlost v je závislá na výšce hladiny h vztahem [39, str. 80]

$$v = \sqrt{2gh} \quad , \quad (1)$$

kde g je tíhové zrychlení. Během výměny kapaliny se tedy mění výtoková rychlost v závislosti na klesající hladině.

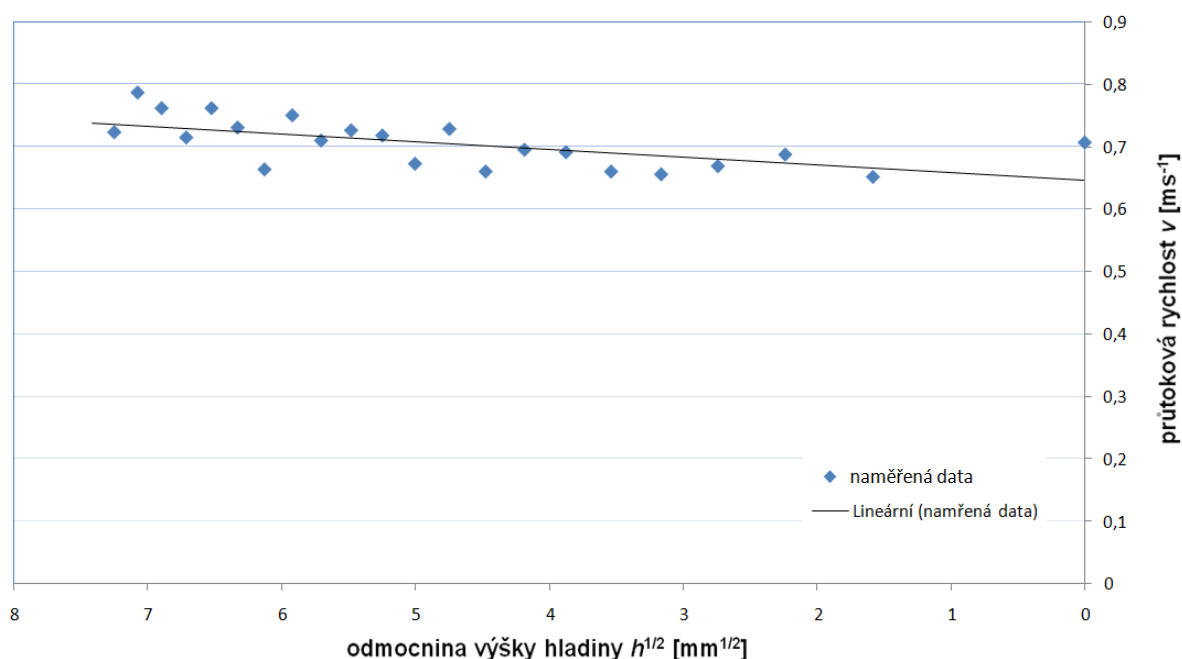
Bylo provedeno měření výtokové rychlosti v závislosti na výšce hladiny při vyprazdňování rezervoáru o celkovém objemu $V = 11 \text{ ml}$. Výška hladiny se měnila z hodnoty 185 mm na hodnotu 135 mm a její odečet se prováděl s krokem $\Delta h = 2,5 \text{ mm}$, což odpovídalo změně objemu $\Delta V = 0,5 \text{ ml}$. Výtoková rychlost v ve výtokovém kanálku byla vypočtena dle vztahu

$$v = \frac{\Delta V}{tS} \quad , \quad (2)$$

kde S je průřez výtokového kanálku o vnitřním průměru 0,8 mm a t je doba výtoky daného množství kapaliny, pro kterou je předpokládána konstantní rychlost výtoky. V grafu na obrázku 15 lze vidět závislost průměrné hodnoty velikostí výtokové rychlosti na odmocnině výšky hladiny kapaliny v rezervoáru. Výsledné hodnoty výtokových rychlostí byly metodou nejmenších čtverců proloženy lineární funkcí

$$v = 0,012 \sqrt{h} + 0,646 \quad .$$

Výtoková rychlost při postupném vyprazdňování rezervoáru se měnila v rozsahu $0,74 - 0,65 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Vzhledem k nevýznamné změně výtokové rychlosti uvažujeme pro další výpočty střední výtokovou rychlost $v_{\text{stř}} = 0,7 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, čemuž pro daný průřez výtokového kanálku odpovídá objemový průtok $Q = 30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Neuvažujeme-li ztráty při proudění kapaliny, můžeme považovat ve vstupním kanálku do vnitřního prostoru komůrky stejnou rychlost na základě rovnice kontinuity.



Obrázek 15: Závislost průtokové rychlosti v na odmocnině z výšky hladiny h kapaliny v rezervoáru.

3.2 Simulace proudění kapaliny komůrkou

Cílem této části je popsat a numericky modelovat proudění kapaliny v komůrce a případně modifikovat měnitelné parametry pro zlepšení charakteristik proudění. V experimentech s buněčnými vzorky je vyžadována vysoce kontrolovaná výměna kapalin, zvláště jsou-li do přítokové kapaliny přidána činidla v přesné koncentraci. Kapaliny musí být vyměněny rychle a efektivně s relativně malým promícháním. Pro simulaci proudění uvnitř komůrky byl použit program Ansys Fluent 6.3 s trojrozměrným laminárním modelem doplněný programem Gambit na tvorbu výpočetní sítě. K provedení výpočtů simulace je nutné definovat fyzikální vlastnosti proudící kapaliny, zadat počáteční a okrajové podmínky a vytvořit požadovanou geometrii.

3.2.1 Vstupní data

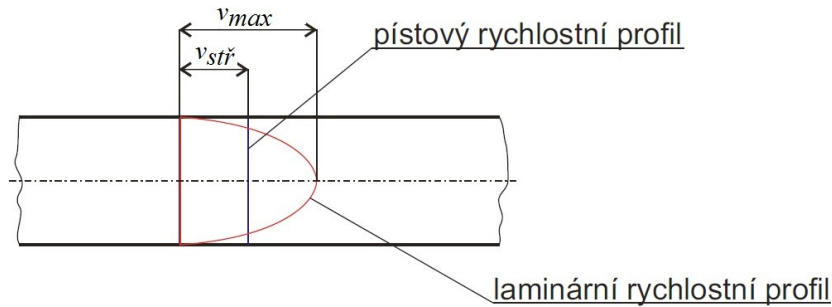
Jako vhodná kapalina pro simulaci tvaru proudnic v komůrce byla zvolena newtonská kapalina o hustotě $\rho = 1020 \text{ kg.m}^3$ a kinematické viskozitě $\nu = 1.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. Střední průřezová rychlost kapaliny ve výstupním kanálku je $v_{stř} = 0,7 \text{ m.s}^{-1}$. V závislosti na této rychlosti bylo spočteno Reynoldsovo číslo

$$Re = \frac{v_{stř} d}{\nu} \quad (3)$$

Hodnota $Re = 560$ dokazuje, že ve vstupním kanálku s vnitřním průměrem $d=0,8 \text{ mm}$, dochází ke vzniku laminárního proudění.

V programu Gambit jsou zadány souřadnice bodů, které propojením vytvoří trojrozměrnou geometrii požadovaného tvaru. Vstupní kanálek byl modelován s délkou 100 mm a výstupní kanálek byl dlouhý 50 mm . Dále jsou zadány okrajové podmínky vstupující do výpočtu. Rychlosti na povrchu stěny jsou považovány za nulové ($v_x, v_y, v_z = 0$);

předpokládá se, že kapalina na povrchu stěny ulpívá. Vstupní pístový rychlostní profil o hodnotě $v_{stř}$ se ve vstupním kanálku změní na profil laminární o stejné střední hodnotě, ale o maximální hodnotě v ose potrubí $v_{max} = 2 \cdot v_{stř}$ (obrázek 16).



Obrázek 16: Schéma rychlostního profilu ve vstupním kanálku.

Numerické jádro programu Ansys Fluent používá Navier-Stokesovy rovnice [40]:

$$\frac{\partial v_x}{\partial t} + \frac{\partial v_x}{\partial x} v_x + \frac{\partial v_x}{\partial y} v_y + \frac{\partial v_x}{\partial z} v_z = G_x - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x} + \nu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right), \quad (4)$$

$$\frac{\partial v_y}{\partial t} + \frac{\partial v_y}{\partial x} v_x + \frac{\partial v_y}{\partial y} v_y + \frac{\partial v_y}{\partial z} v_z = G_y - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial y} + \nu \left(\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \right), \quad (5)$$

$$\frac{\partial v_z}{\partial t} + \frac{\partial v_z}{\partial x} v_x + \frac{\partial v_z}{\partial y} v_y + \frac{\partial v_z}{\partial z} v_z = G_z - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial z} + \nu \left(\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \quad (6)$$

a rovnici kontinuity

$$\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0, \quad (7)$$

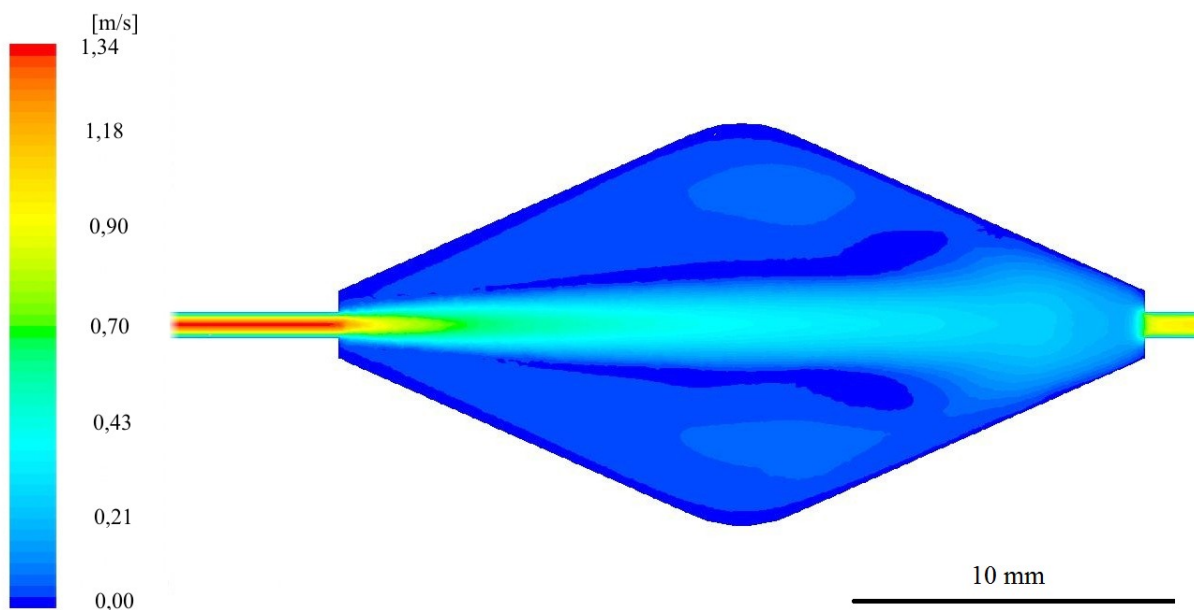
kde v kartézských souřadnicích x, y, z jsou vektory rychlosti, G jsou komponenty gravitační síly, p jsou aktuální hodnoty tlaku a ρ hustota kapaliny. Členy na levé straně rovnic (4-6) zobrazují postupně nestacionární a lokální zrychlení související s vnitřním tvarem kanálku. Členy na pravé straně zobrazují vliv vnějších sil (v našem případě pouze gravitačních), tlakových sil a viskózních sil. Protože nás zajímá ustálený stav proudění, především tvar proudnic a vznik vírů, nestacionární člen v Navier-Stokesově rovnici neuvažujeme. Program Fluent řeší tyto rovnice metodou konečných objemů.

3.2.2 Vyhodnocení výsledků

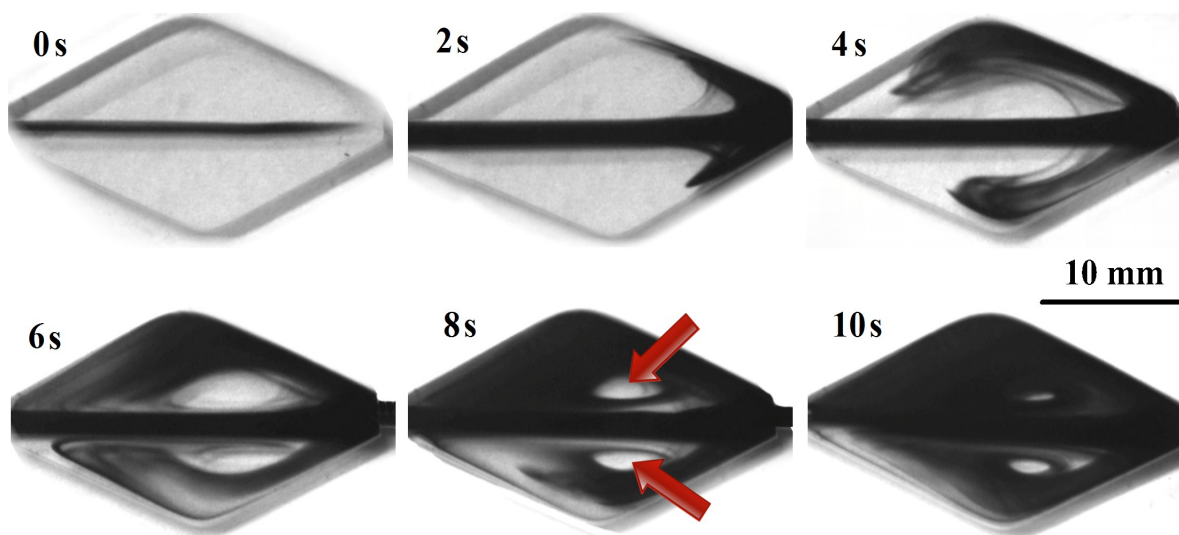
U ideálně navržené komůrky by mělo dojít k rozšíření proudnic za hranou vstupního kanálku postupně na celý průřez komůrky, aniž by vzniklo zpětné proudění. To je ovšem v praxi nedosažitelné. Při proudění kapaliny oblasti malého průřezu do oblasti velkého průřezu během krátké vzdálenosti dochází ke vzniku úplavů, v nichž kapalina víří.

Výsledné tvary rychlostních polí simulace jsou na obrázku 17, kde jsou barevnou škálou znázorněny oblasti s přibližně konstantní rychlostí proudění. U původního návrhu, který má přechod z kanálku do komůrky řešen skokově, dochází ke vzniku míst, v nichž kapalina cirkuluje s velmi malou rychlostí (modrá barva).

Ke zviditelnění charakteristiky průtoku kapaliny v komůrce byl kamerou nasnímán přítok obarvené vody do komůrky s čistou vodou. Vybrané snímky na obrázku 18 znázorňují fáze přítoku obarvené vody během prvních 10 s. Oblasti, kde se kapalina víří a zaplaví se jako poslední, souhlasí s rozložením rychlostních polí simulace. Tyto oblasti mají za následek špatný celkový průplach komůrky.



Obrázek 17: Simulace toku kapaliny průtokovou komůrkou s jádrem, vygenerovaná programem Fluent. Oblasti s malou rychlostí proudění kapaliny je vyznačena modrou barvou, s velkou rychlostí červenou barvou.

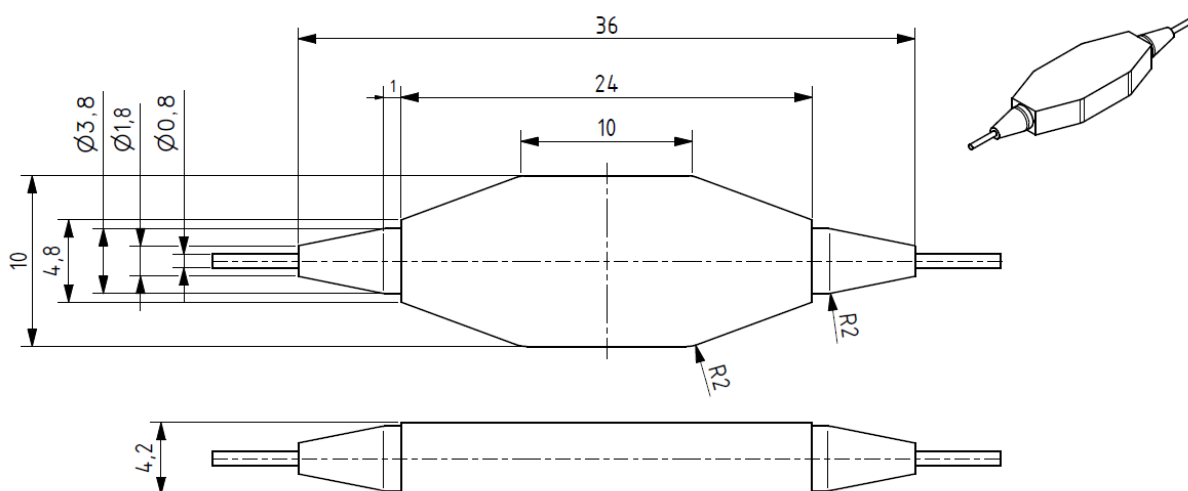


Obrázek 18: Experimentální pozorování fáze přítoku obarvené vody do komůrky. Na snímcích jsou patrná místa s malou rychlostí pohybu kapaliny – označeny šipkami.

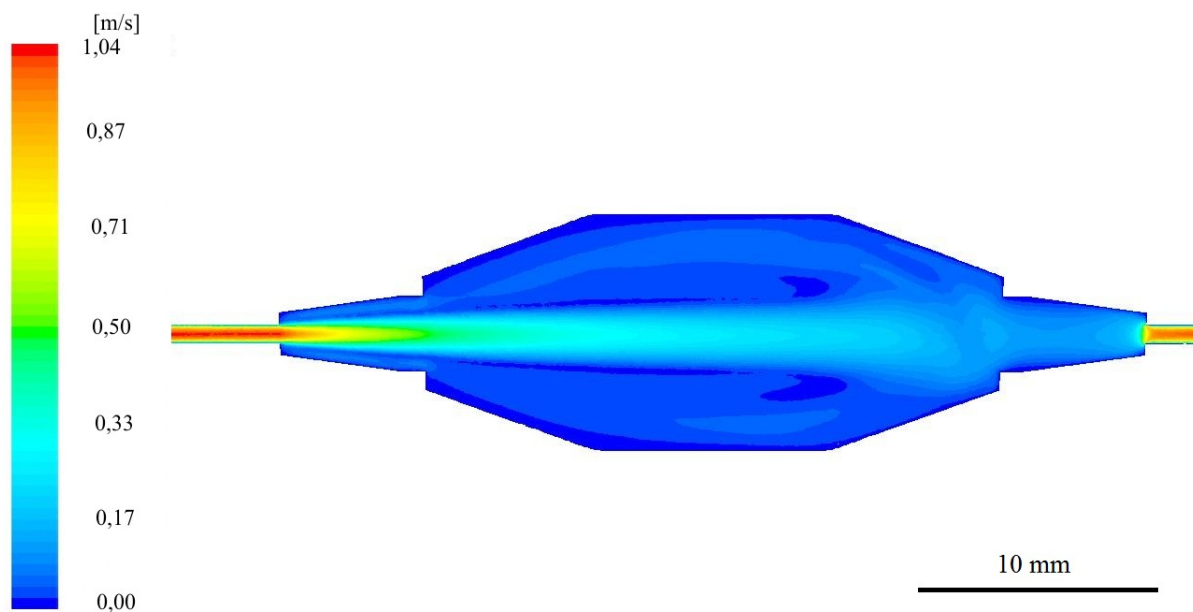
3.2.3 Jádru 2

Byly provedeny modifikace tvaru vnitřního prostoru průtokové komůrky k dosažení lepší charakteristiky proudění kapaliny. U druhého návrhu (obrázek 19) byl použit kuželový přechodový člen mezi kanálky a vnitřním prostorem komůrky. Postupné rozšiřování průměru přítokového kanálku směrem dovnitř komůrky má za následek lepší rozšíření proudnic uvnitř komůrky. Na výstupu komůrky je díky kuželovému přechodovému členu dosaženo vyšší hodnoty hltnosti výtokového kanálku. Porovnáním obrázků 17 a 20 je patrné, že rozšíření kanálku mělo vliv na snížení vtokové rychlosti do vnitřního prostoru komůrky.

Také byl modifikován tvar vnitřního prostoru komůrky sražením hran původního tvaru jádra odlévací formy. Rozměry modifikovaného jádra 2 jsou uvedeny na obrázku 19. U tohoto návrhu docházelo také ke vzniku zpětného proudění a oblastí cirkulace kapaliny malou rychlostí, ale jsou znatelně menší, jak lze vidět na obrázku 20 výsledné simulace.



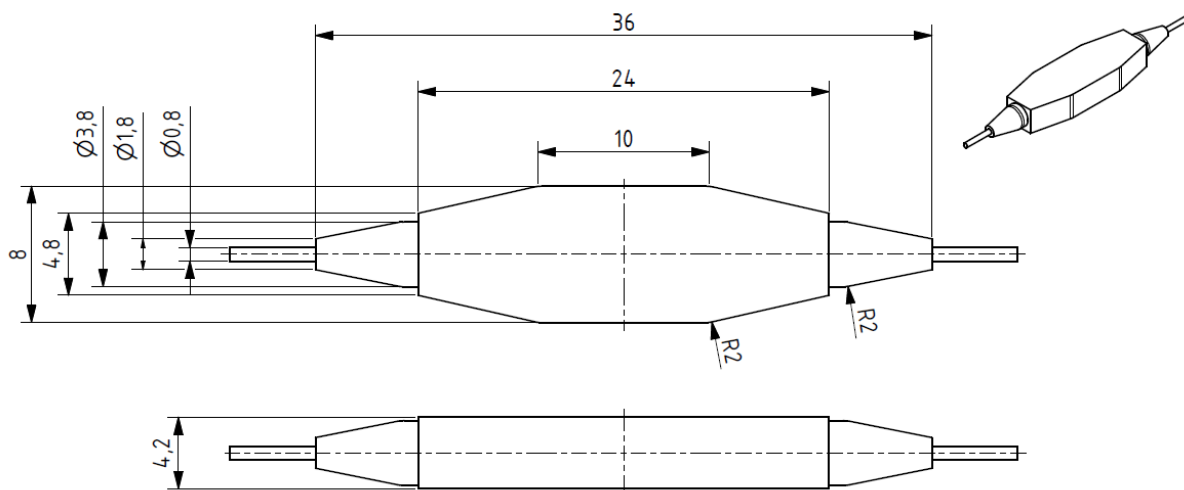
Obrázek 19: Nákres modifikovaného jádra 2 průtokové komůrky.



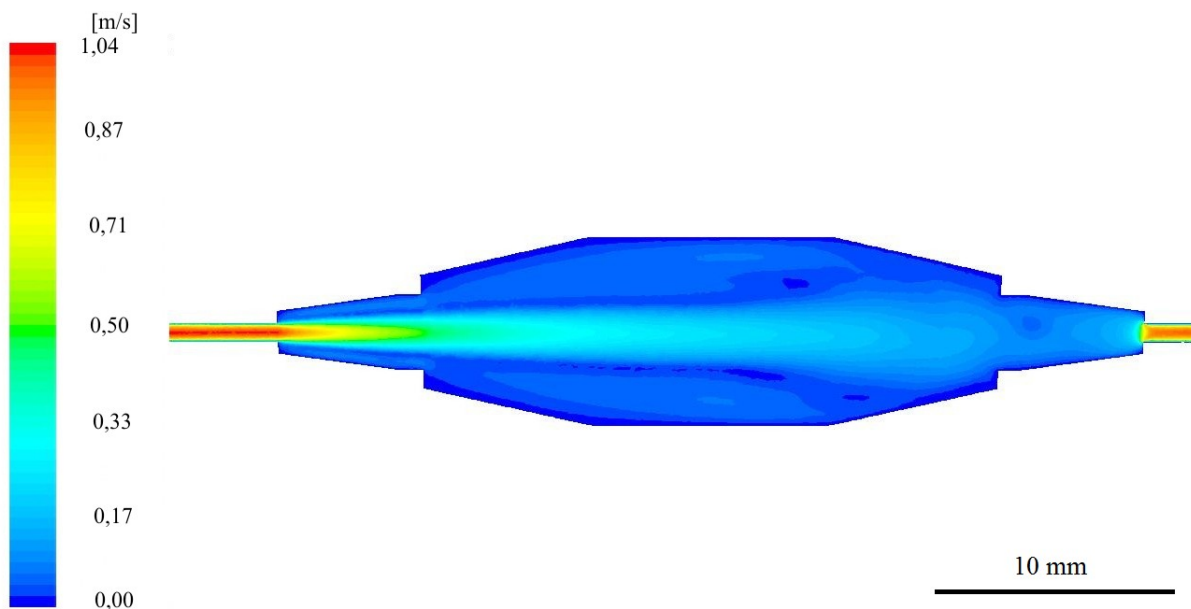
Obrázek 20: Simulace proudění kapaliny průtokovou komůrkou s modifikovaným jádrem 2, vygenerovaná programem Fluent. Oblasti s malou rychlostí proudění kapaliny je vyznačena modrou barvou, s velkou rychlostí červenou barvou.

3.2.4 Jádro 3

Třetí návrh vznikl dalším zúžením již modifikovaného tvaru druhého návrhu jádra odlévací formy (obrázek 21). Zmenšení šířky u třetího jádra na hodnotu 8 mm pomohlo k výraznějšímu zmenšení míst cirkulace kapaliny malou rychlostí (obrázek 22). Zpětné proudění se podařilo snížit jen částečně. Další zmenšení oblastí cirkulace by znamenalo zmenšení pozorovací plochy a objemu komůrky. Proto byla druhá modifikace zvolena jako vhodný kompromis mezi průtokovými charakteristikami a velikostí vnitřního prostoru průtokové komůrky.



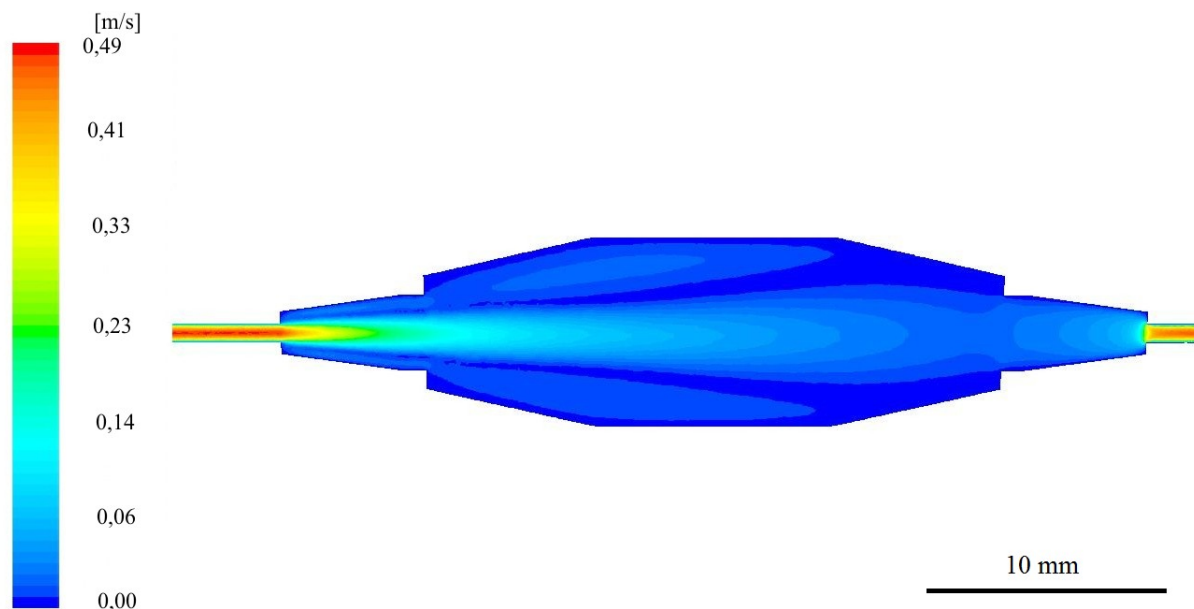
Obrázek 21: Nákres modifikovaného jádra 3 průtokové komůrky.



Obrázek 22: Simulace proudění kapaliny průtokovou komůrkou s modifikovaným jádrem 3, vygenerovaná programem Fluent. Oblasti s malou rychlostí proudění kapaliny je vyznačena modrou barvou, s velkou rychlostí červenou barvou.

3.2.5 Změna průtokové rychlosti

Testovali jsme možnost zlepšení charakteristiky proudění kapaliny průtokovou komůrkou snížením střední průřezové rychlosti kapaliny z původní hodnoty $0,7 \text{ m.s}^{-1}$ na $0,3 \text{ m.s}^{-1}$. Na obrázku 23 lze vidět výslednou simulaci rozložení rychlostních polí při této snížené rychlosti. Jsou patrné velké oblasti s téměř nulovou rychlostí proudění kapaliny (tmavě modrá barva). Kinematika proudění kapaliny průtokovou komůrkou se snížením střední průřezové rychlosti kapaliny nevedla k lepším výsledkům.



Obrázek 23: Simulace proudění kapaliny průtokovou komůrkou s modifikovaným jádrem 3 s rychlostí $v_{\text{stř}} = 0,3 \text{ m.s}^{-1}$, vygenerovaná programem Fluent. Oblasti s malou rychlostí proudění kapaliny je vyznačena modrou barvou, s velkou rychlostí červenou barvou.

3.2.6 Zhodnocení simulací

Analýzou výsledných simulací průtoku kapaliny komůrkou bylo ověřeno, že u žádného návrhu tvaru vnitřního prostoru nedochází k ideálnímu rozšíření proudnic z přívodní trubičky na vnitřní objem komůrky. Ve vnitřním prostoru komůrky dochází vždy ke vzniku oblastí zpětného proudění a vírů, protože hltnost výstupního kanálku je velmi malá. Oblasti vírů s nízkou rychlostí proudění byly znatelně eliminovány modifikací tvaru jádra. Modifikací došlo ke změně celkového objemu vnitřního prostoru komůrky z původní hodnoty $V_1 = 740 \text{ } \mu\text{l}$ na $V_2 = 940 \text{ } \mu\text{l}$ a $V_3 = 800 \text{ } \mu\text{l}$. V dalším popisu parametrů a v experimentech bude použita výhradně komůrka 3 s modifikovaným tvarem vnitřního prostoru.

3.3 Intenzita zobrazení během průtoku kapaliny

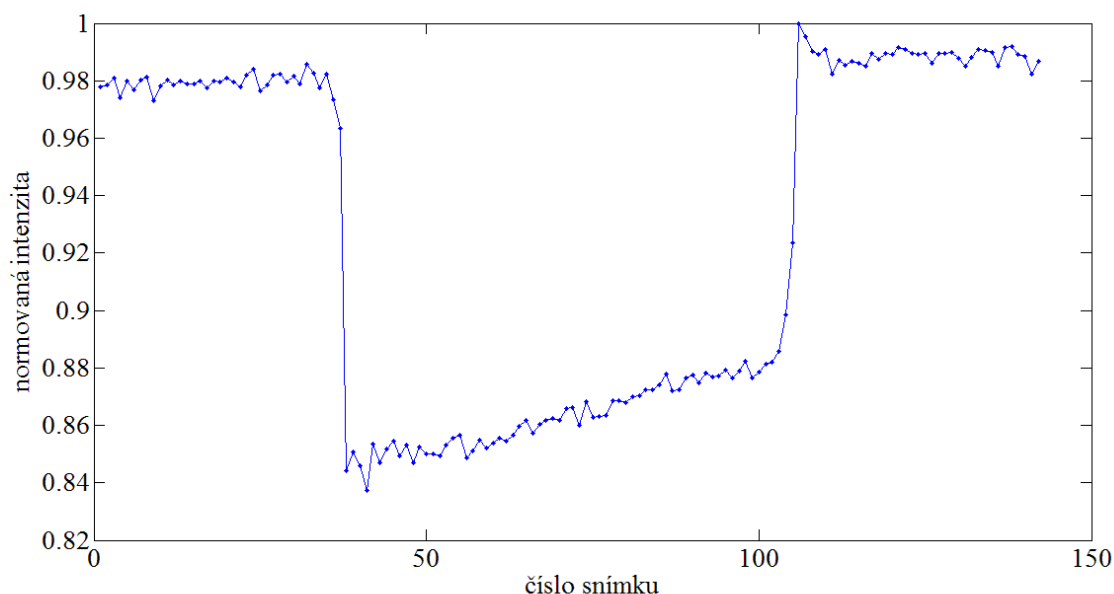
Při zahájení a ukončení průtoku kapaliny vlivem změny hydrostatického tlaku (rázová vlna přitékající kapaliny) se může sklíčko prohnout. Vzorek se vychýlí ze zaostřené roviny, čímž naruší interferenci referenčního a předmětového svazku, což může negativně ovlivnit experiment při snímkování a analýze rychlé reakce buněčného vzorku. Pohyb sklíčka je však

vratný. Vzorek se vrátí do původní roviny pozorování téměř okamžitě po zastavení průtoku a manuální zaostření je potřeba jen zřídka.

Výměna kapalin může být provedena buď gravitačním spádem, nebo rychlým nasátím kapaliny z odpadní hadičky. Výměna nasáváním sice umožňuje rychlejší výměnu kapaliny ($Q \sim 60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), ale není příliš spolehlivou metodou. Adherovaná buňka se vlivem většího podtlaku může odtrhnout od sklíčka a odsát spolu s kapalinou, čímž je zmařen celý experiment.

Ke znázornění vlastností zobrazení během průplachu komůrky gravitačním spádem byl proveden experiment. CCD kamera zaznamenávala hologram komůrky s protékající vodou s časovým intervalem 0,5 s a následně byla rekonstruována obrazová intenzita ([2], kap. 7). Průměrná hodnota intenzity v pixelech z vybrané oblasti snímků rekonstruované intenzity byla vynesena do grafu. V grafu na obrázku 24 lze rozpoznat časový úsek průplachu poklesem a nestálostí hodnoty intenzity. Manipulací s hadičkami při odškrcení došlo na počátku a na konci průplachu k otřesům, které vedly k většímu narušení interference. Po ukončení průtoku a zaškrvení hadičky se intenzita opět ustálila na konstantní hodnotě přibližně stejné jako před průplachem. To svědčí o tom, že interference nebyla narušena trvale a tudíž, že průplach nikterak neovlivnil optickou dráhu v předmětové větvi. Snímání tedy může pokračovat bez dalších úprav nastavení mikroskopu po proplachování.

Při menších rychlostech průtoku cca $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ je možné časosběrné snímkování během průtoku kapaliny bez větších problémů s rekonstrukcí obrazu, hodnota intenzity se prakticky nezmění. Tento fakt byl prokázán v experimentu s buněčným vzorkem (viz část 4.6), kdy byl vzorek během průtoku fyziologického roztoku rychlostí $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ snímán po dobu 2 hodin.



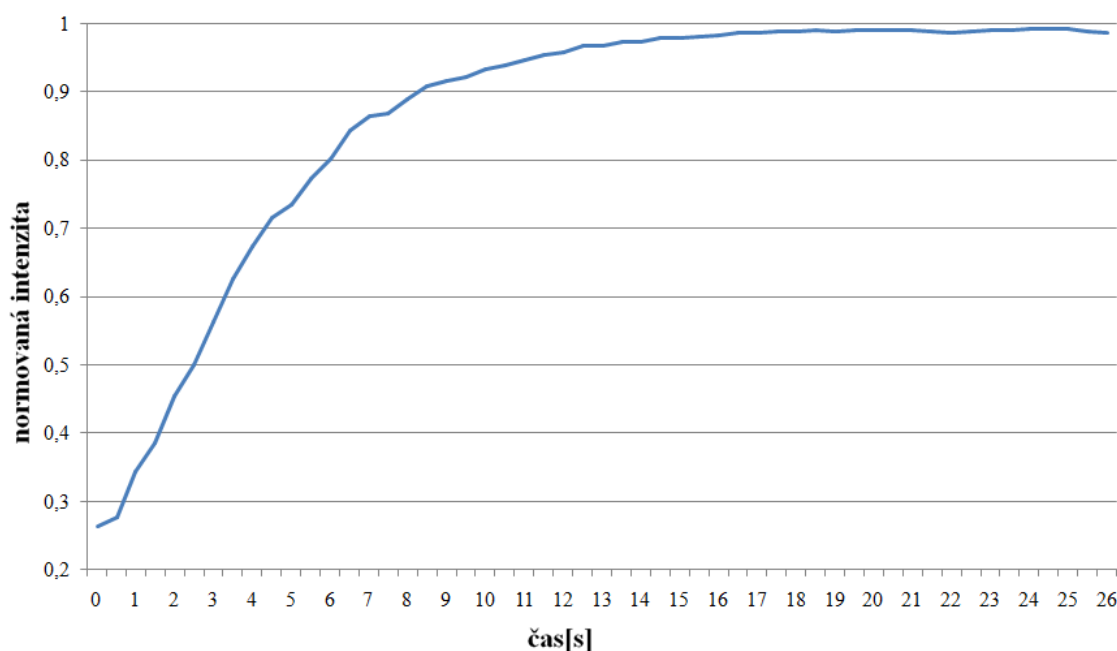
Obrázek 24: Graf změny intenzity během průtoku kapaliny komůrkou. Interval mezi snímky je 0,5 s. Objektivy 20x/0,4.

3.4 Výměna kapalin

Ke zjištění minimálního množství kapaliny, které postačuje k efektivní výměně kapalin v komůrce, byla v CCHM snímána intenzita procházejícího světla halogenové lampy při výměně obarvené destilované vody vodou neobarvenou. Bylo využito zobrazení pouze

v předmětové větvi. Intenzita byla ovlivňována kapalinou s barvivem o určité koncentraci a jejím vyplachováním za měřený časový interval.

Do mikroskopu byl vložen komůrkový systém. Komůrka byla nejprve zaplavena čistou vodou a byl pořízen referenční snímek intenzity procházejícího záření. Poté se komůrka zaplavila kapalinou s rozpuštěným potravinářským barvivem. Obarvená voda měla funkci absorpčního filtru projevujícího se zeslabením intenzity záření. Rezervoár se opět naplnil čistou vodou a započalo odplavování obarvené vody gravitačním spádem. Průběh odplavování obarvené vody byl snímán CCD kamerou s intervalem snímkování 0,5 s. Byla snímána intenzita pouze v předmětové větvi mikroskopu, intenzita záření se vyhodnocovala přímo ze snímků kamery, nikoli z hologramu. Hodnoty intenzity záření byly získány z průměrných hodnot pixelů z vybrané oblasti snímků a průměrem hodnot z pěti měření. Vzhledem k tomu, že mikroskopový stolek CCHM není motorizovaný, nemůžeme definovat polohu snímání oblasti v komůrce. Byla snaha o umístění zorného pole objektivu doprostřed pozorovací oblasti průtokové komůrky. Byl vyhodnocen graf závislosti intenzity záření, normované k referenční počáteční hodnotě, na čase. Ve výsledném grafu na obrázku 25 lze vidět rostoucí normované hodnoty intenzity procházejícího světla při postupném odplavování obarvené vody a ustalování na maximální hodnotě, která odpovídá kompletnímu odplavení vody. Intenzita vzroste na $98 \pm 1,9\%$ původní referenční hodnoty za 16 s po průtoku 8 ml nové kapaliny.



Obrázek 25: Graf průběhu intenzity zobrazení při odplavování obarvené vody ovlivňující propustnost pozorovací oblasti průtokové komůrky.

4 Experimenty s živými buňkami

V této části jsou popsány provedené experimenty, kterými byla ověřena použitelnost, funkčnost a univerzálnost navržené průtokové komůrky. Experimenty se prováděly převážně v Laboratoři experimentální biofotoniky Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně. K pěstování a manipulaci s buněčnými vzorky byl použit laminární pracovní box vybavený vývěvou a plynovým kahanem, CO₂ inkubátor, inverzní mikroskop pro inspekci a dokumentaci stavu buněk metodou fázového kontrastu, lednice pro skladování suspenzí a kultivačních roztoků, pinzety, pipety, Petriho misky a kultivační nádobky. Pozorovali jsme buněčné vzorky transmisním CCHM. Zaměřili jsme se na rozdílnou reakci při ustáleném prostředí a při kontinuálním proplachování průtokové komůrky fyziologickým roztokem. Navíc jsme vyzkoušeli průtokovou komůrku v invertovaném mikroskopu Nikon Ti s konfokální hlavou A1R, nacházející se v Biotechnologickém inkubátoru INBIT v kampusu Masarykovy univerzity v Brně.

4.1 Uživatelský software

Matematický aparát k vyhodnocování získaných snímků digitálním holografickým mikroskopem, popsáný v disertační práci Ing. Hany Uhlířové, Ph.D. ([2], kap. 7), je obsažen v programu wxIDE, který byl vytvořen dále upravován Ing. Lukášem Kvasnicou v Laboratoři experimentální biofotoniky společně s vývojem CCHM. Program WxIDE je uživatelský software, umožňující rekonstrukci intenzity a fáze ze získaného digitálního hologramu jak v reálném čase při snímání obrazu vzorku, tak i při pozdějším zpracování a následným vyhodnocení získaných snímků.

Zpracováním obrazu rozumíme navázání fáze v místech fázového skoku ([2], kap. 7)] a vyrovnání pozadí obrazu, modulované aberacemi mikroskopu, v každém snímku. Pozadí získáme manuálním výběrem oblastí okolí buňky v obrázku rekonstruované fáze, proložením těchto oblastí polynomem třetího stupně a odečtením fázového průběhu, který je dán tímto polynomem, od naměřených hodnot fáze [41].

Vyhodnocení snímků se provádí metodou dynamických fázových diferencí (DPD, [2], kap. 7). Odečtením kvantitativních hodnot fáze dvou snímků buňky v různých časech a specifickým barevným kódováním obrazu získáme odlišení záporných a kladných hodnot výsledné fáze, které vypovídá o úbytcích nebo přírůstcích suché hmoty buňky. Změnou rozmístění hmoty v buňce vyhodnocujeme životní projevy a reakce buňky v daném časovém intervalu.

4.2 Typy použitých buněk

V experimentech byly použity následující kontinuální buněčné linie, poskytnuté MUDr. Pavlem Veselým, CSc., z Laboratoře buněčné biologie a kultivace keratinocytů Kliniky popáleninové medicíny Fakultní nemocnice Královské Vinohrady:

- HaCaT lidské keratinocyty (kožní) spontánně transformované in vitro,
- RsK4 nádorové buňky, dvakrát transformované fibroblasty z embrya krysy,
- A3Rho(Ca) krysí nádorové buňky s GFP transfekcí (green fluorescent protein), tzn. buňky, které mají ve svém genomu uměle zabudovaný zelený fluorescenční protein, zeleně fluoreskují ($\lambda=509$ nm) při ozáření modrým světlem ($\lambda=395$ nm).

Výše uvedené nádorové buňky mají schopnost nekontrolovaného buněčného dělení

a nepodléhají stárnutí, zatímco ostatní buňky se musí geneticky transformovat, čili immortalizovat. Pokud se neporuší kultivační podmínky, buněčné linie lze udržovat po neomezenou dobu, což je velkou výhodou. Jednotlivé experimenty (viz část 4.4, 4.5, 4.6, 4.7) byly provedeny na více typech buněk pro srovnání jejich reakce.

4.3 Příprava buněk

Údržba buněčné linie spočívá v kontrole stavu buněk v kultivační nádobce (lahvičce nebo Petriho misce), pravidelné výměně média a pasáže již hustě narostlých buněk. Pasáž je proces enzymatického (trypsinem) nebo mechanického (škrabkou) uvolnění buněk ze dna nádoby a přenosem (nasazením) jejich části do nové kultivační nádoby. Zbylé buňky se mohou uchovat ve formě suspenze v lednici pro další manipulaci po dobu přibližně pěti dnů.

Čerstvá buněčná suspenze obsahuje uvolněné izolované buňky bez shluků a je tudíž vhodná pro určení její hustoty (např. pomocí Bürkerovy komůrky). Pro přípravu suspenze je vhodné zpracovávat subkonfluentní porost buněk, tedy pracovat v okamžiku, kdy ještě není obsazen veškerý kultivační povrch.

Příprava buněčné suspenze trypsinací: Z kultivační nádoby se odsaje médium. Přidá se 5 ml 0,25% roztoku trypsinu v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS – phosphate buffered saline) přibližně na 1 minutu (závisí na druhu buněk) a odsaje se. Proces se opakuje k lepšímu odstranění proteinů z nádoby, které inhibují účinky trypsinu rozvolňující buňky. Při druhém opláchnutí roztokem se nadbytek roztoku odsaje tak, že porost zůstane vlhký a vloží se do inkubátoru na 5 minut. V inkubátoru se buňky rozvolní. Poté se přidá 5 ml média M1H a pipetou se buňky resuspendují. V tomto okamžiku je suspenze připravena k uchování, určení její hustoty či dalšímu nasazení pro kultivaci. Nasazení znamená vložení části suspenze s novým kultivačním médiem do nové kultivační nádoby. Nádobku s čerstvě nasazenými buňkami je třeba před pozorováním vložit do inkubátoru na dobu 48 hodin kvůli regeneraci proteinů buněčné membrány. Hustota nasazení buněk se řídí typem experimentu. Vyjadřuje se počtem buněk na jednotku kultivační plochy. Kultivační plocha jádra 3 je 170 mm². Pro naše účely je optimální hustota nasazení buněk 25 na 1 mm². Při této hustotě jsou buňky po dvoudenní kultivaci vhodné pro pozorování v CCHM díky optimálnímu rozmístění buněk, kdy se v zorném poli nachází zdravá buňka a kolem ní je dostatek plochy pozadí pro pozdější softwarové vyrovnání pozadí snímků.

4.4 Příprava průtokové komůrky

Silikonové tělo, hadičky a krycí sklíčka se před použitím odmastí vodou s detergentem a postupně se opláchnou čistou vodou, deionizovanou vodou a 96% etanolem. Následně se v laminárním boxu ponoří do 96% etanolu minimálně na 10 minut. Další operace se provádějí se sterilními pinzetami. Na silikonové tělo se přisaje jedno krycí sklíčko, aby vznikla otevřená miska. K tělu se připojí teflonové a silikonové hadičky. Otevřená komůrka se vloží do sterilní Petriho misky, vnitřní prostor silikonového těla se naplní kultivačním médiem a buněčnou suspenzí. Uzavřená Petriho miska se vloží na dva dny do inkubátoru. Živé buňky klesnou na dno, přichytí se a porostou plochu dna. Po vyjmutí z inkubátoru se odsaje médium, komůrka se uzavře přisátím druhého krycího sklíčka a naplní se médiem F10, což je čiré médium bez fenolové červeně. Konce hadiček se připojí k zásobníku a k odpadní nádobce. Komůrka se vloží do mikroskopu tak, aby buňky zůstaly na spodním krycím sklíčku k pozorování invertovaným mikroskopem.

4.5 Dlouhodobá kultivace buněk RsK4

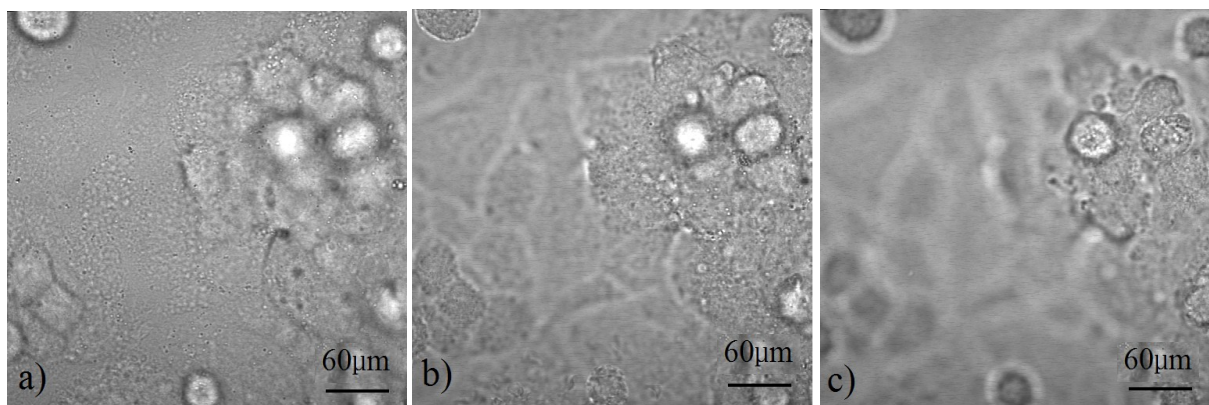
Cílem experimentu bylo prokázat celkovou biologickou inertnost průtokové pozorovací

komůrky vůči živým buňkám a možnost jejich dlouhodobé kultivace a pozorování bez negativního ovlivnění jejich normálního růstu.

Do komůrky s kultivačním médiem M1H byly ze suspenze nasazeny nádorové buňky typu RsK4 o hustotě buněk 25 na 1 mm². Po dobu čtrnácti dní byla komůrka s buňkami umístěna v inkubátoru s pravidelnou výměnou média a kontrolou jejich stavu mikroskopem. Buňky se přichytily a rozprostřely na dně komůrky a do čtyř dnů porostly celý její povrch. Nekontrolovaný růst pokračoval, až vzniklo více vrstev buněčné kultury. Byl pozorován normální vývoj bez toxického ovlivnění materiálem komůrky nebo její manipulací.

Protože holografický mikroskop není vhodný k pozorování husté vrstvy buněk bez plochy s pozadím ([2], kap. 7), byly čtrnáctý den kultivace pořízeny snímky mikroskopem Nikon Ti. Metodou Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC – differential interference contrast; [42], str. 80) bylo nasnímáno 23 snímků s postupným zaostřením v různých výškách buněčného vzorku v rozsahu $\Delta z = 30 \mu\text{m}$. Parametry experimentu: objektiv Nikon S Plan Fluor ELWD 40x DIC N1, NA = 0,6, $\lambda = 641,6 \text{ nm}$.

Na obrázku 26 lze vidět snímky narostlých buněk ve výškách: a) $z = 0 \mu\text{m}$, b) $z = 14,85 \mu\text{m}$, a c) $z = 29,70 \mu\text{m}$. Hodnoty výšek z byly odečteny v programu Nis Elements, jedná se o ovládací program pro mikroskopy Nikon. Metoda DIC zviditelňuje gradienty optické dráhy a na rozdíl od fázového kontrastu se na snímcích neprojevuje „halo“ efekt. V rovině nejbližší k objektivu (obrázek 26a – levá oblast) tvoří hustě porostlé buňky homogenní vrstvu. Postupným přeostršováním do vyšší roviny se dostaneme až na nejsvrchnější vrstvu buněk (obrázek 26c – pravá oblast).



Obrázek 26: Buňky RsK4 po čtrnácti dnech kultivace v rovinách zaostření: a) $z = 0 \mu\text{m}$, b) $z = 14,85 \mu\text{m}$, a c) $z = 29,70 \mu\text{m}$.

Experiment prokázal použitelnost komůrky pro dlouhodobou kultivaci a pozorování živých buněk, čímž byla ověřena netoxičnost použitých materiálů. Životaschopnost buněčné kultury nebyla ovlivněna. Buňky, které byly z hlediska výživy optimálně udržovány, pokračovaly v proliferaci (buněčném dělení) po celou dobu kultivace.

4.6 Okamžité a dlouhodobé reakce buněk HaCaT

V tomto experimentu byly použity průtokové komůrky pro pozorování a vyhodnocení jednorázového a opakovaného působení látky na buňky. Konkrétně byl na epiteliální buňky typu HaCaT aplikován fyziologický roztok. Oblastí zájmu bylo nasnímat a vyhodnotit reakci buněk na změnu prostředí.

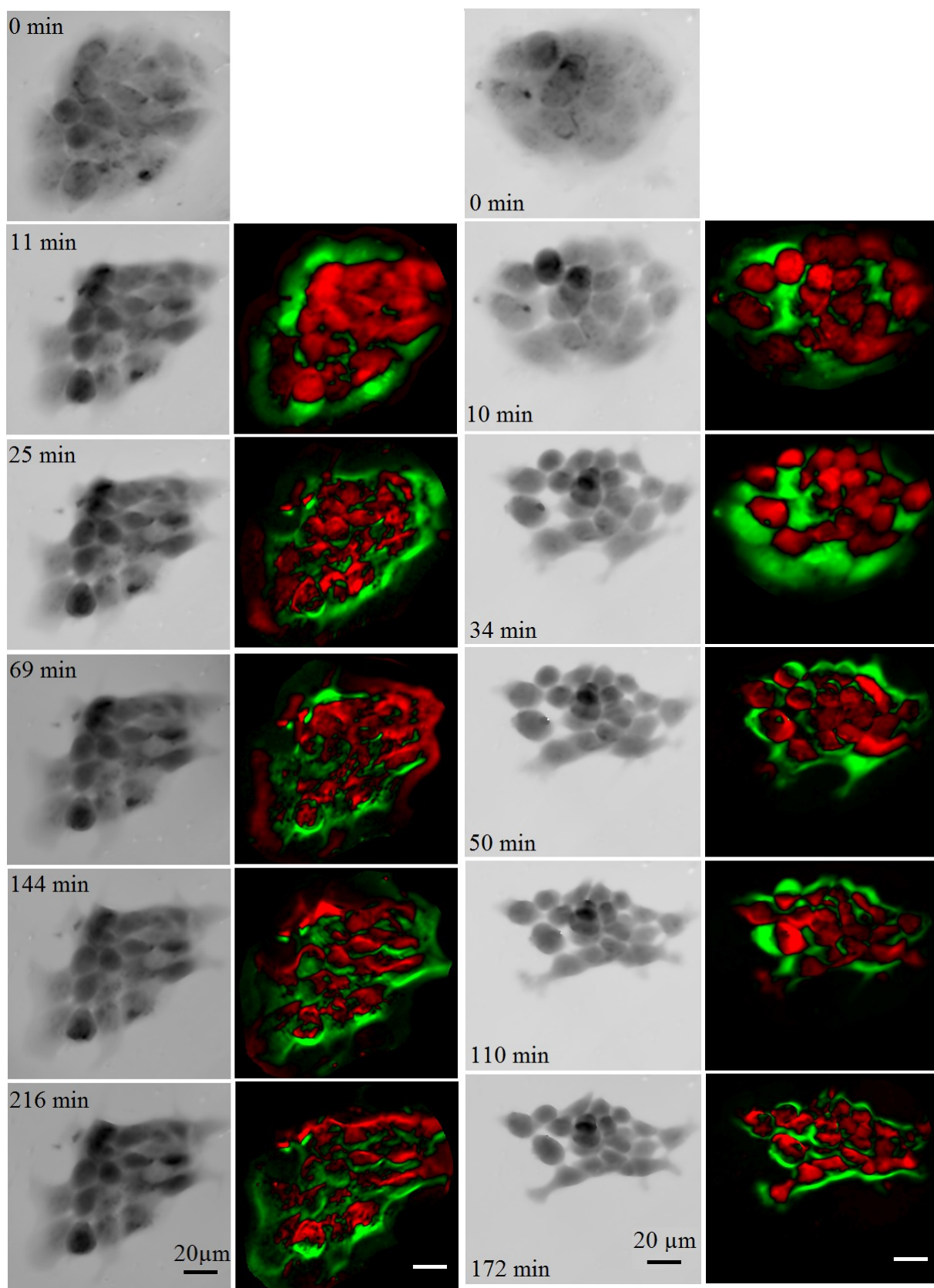
Do dvou komůrek byly nasazeny buňky typu HaCaT (postup popsán v kapitole 4.3). Po dvou dnech kultivace v inkubátoru byly komůrky postupně vloženy do mikroskopu

a v každé byly nasnímány části životního cyklu zdravé kolonie buněk (obrázek 27, čas 0 minut). Obě komůrky byly poté samospádem propláchnuty 50 ml fyziologického roztoku. Od tohoto okamžiku experiment pokračoval u každé komůrky rozdílným způsobem.

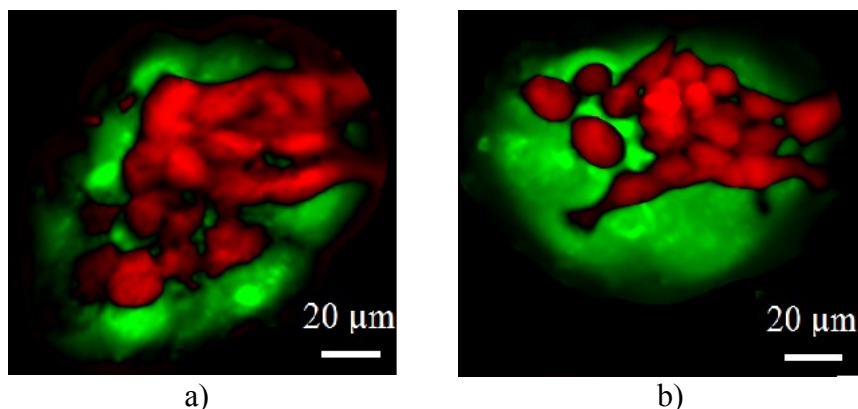
V prvním případě se silikonové hadičky zaškrtily a byla pozorována dlouhodobá reakce na stálé prostředí fyziologického roztoku po dobu tří hodin. V druhé komůrce, po propláchnutí 50 ml fyziologického roztoku, se pokračovalo v promývání fyziologickým roztokem. Přítoková hadička byla přiškrcena k dosažení průtokové rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a další 3 hodiny byla snímkována reakce na protékající fyziologický roztok.

Buňky HaCaT mají tendenci se shlukovat, vytvářet ostrůvky či kolonie během růstu, až pokryjí celou plochu dna komůrky. Fyziologický roztok je isotonický 0,9% vodný roztok NaCl s pH 7. Nepůsobí na buňky škodlivě, ale neobsahuje nutriční látky, které buňka potřebuje. Série snímků fáze na obrázku 27 demonstruje postupný průběh reakce na fyziologický roztok v časovém intervalu. Pro lepší znázornění přesunu hmoty jsou hodnoty fáze každého dalšího snímku odečteny od předchozího snímku metodou DPD.

V levém sloupci na obrázku 27a je případ ustáleného prostředí fyziologického roztoku a ve sloupci 27b jsou snímky plynule proplachovaných buněk. Probíhá smrštění hmoty buněk, což je typická reakce buněk na nepříznivé prostředí. V ustáleném prostředí v prvním případě se buňkám daří relativně lépe, mají možnost vytvořit si své mikroprostředí, zatímco při stálém průplachu tuto možnost nemají. Na obrázku 28 je pomocí DPD vyhodnocen celkový přesun hmoty buněk odečtením prvního a posledního snímku fáze z obou pozorování. Lze si povšimnout, že v případě kontinuálního průplachu fyziologickým roztokem se buňky stáhly více oproti původní hodnotě, než tomu bylo v prvním případě. Navíc, při stálém průplachu fyziologickým roztokem došlo k rozvolnění mezibuněčných kontaktů kolonie buněk, což svědčí o daleko výraznějším zásahu do přežívání buněk.



a) b)
 Obrázek 27: Buňky typu HaCaT, postupná reakce na fyziologický roztok, fáze – vlevo, DPD – vpravo: a) stálé prostředí, b) s průplachem. Zelená – úbytek suché hmoty buňky, červená – přírůstek suché hmoty buňky. Objektivy 10x/0,25.



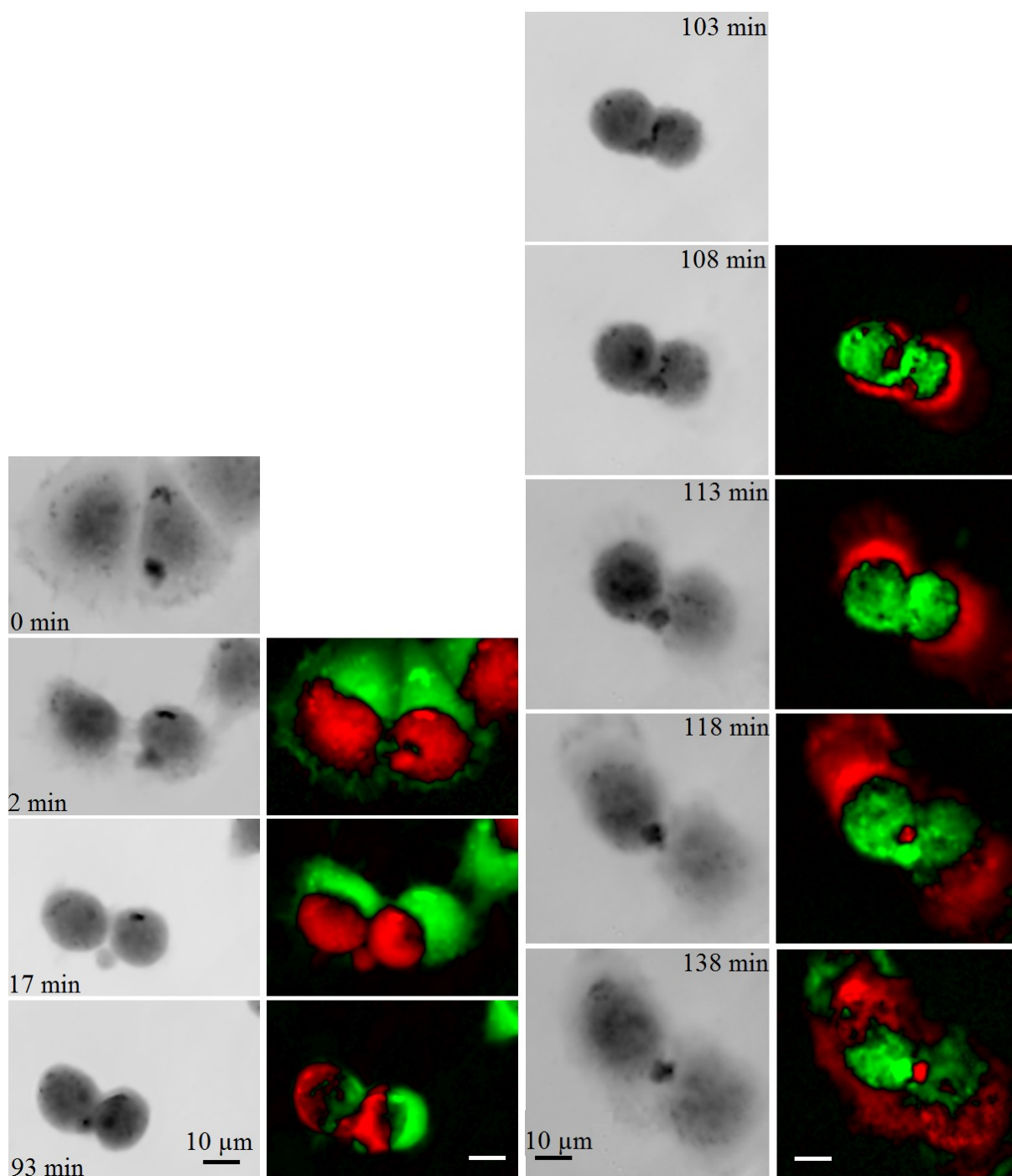
Obrázek 28: Buňky typu HaCaT, DPD vzhledem k počátku: a) stálé prostředí, b) s průplachem. Objektivy 10x/0,25. Zelená – úbytek suché hmoty buňky, červená – přírůstek suché hmoty buňky.

4.7 Vícefázová reakce buněk *RsK4*

Experiment byl proveden podobně jako s buňkami HACAT v části 4.5, ale v tomto případě byla navíc sledována rekonvalescenční schopnost buněk. Po dvoudenní kultivaci buněk typu *RsK4* v inkubátoru byla komůrka vložena do mikroskopu a nasnímal se životní projevy buněk před a po propláchnutí 50 ml fyziologického roztoku. Po půl druhé hodině snímání dlouhodobé reakce v intervalech 5 s se fyziologický roztok opět průplachem komůrky vyměnil za médium F10.

Na snímcích obrázku 29a je možné vidět reakci buněk *RsK4* na prostředí s fyziologickým roztokem. Na prvním snímku v čase 0 minut je dvojice rozprostřených buněk v prostředí kultivačního média F10 těsně před aplikací fyziologického roztoku. Další snímky v levém sloupci ukazují smrštění hmoty dvojice buněk. Přesuny hmoty jsou opět zvýrazněny postupným vyhodnocením DPD. Na obrázku 29b lze vidět opětovné rozprostření buněk po výměně fyziologického roztoku za médium. Jedná se o stejnou dvojici buněk, jen s jiným výběrem oblasti při zpracovávání rekonstruované fáze.

Experiment poukázal na možnost použití komůrky pro vícefázové reakce buněk. Okolní prostředí lze střídavě měnit. To vede k možnosti aplikace různých stimulačních látek a vyhodnocení jejich vlivu na jednu a tutéž buňku.



Obrázek 29: Buňky typu RsK4, a) postupná reakce na fyziologický roztok, b) postupná reakce po obnovení prostředí kultivačním médiem F10; fáze – vlevo, DPD – vpravo; Zelená – úbytek suché hmoty buňky, červená – přírůstek suché hmoty buňky. Objektivy 20x/0,4.

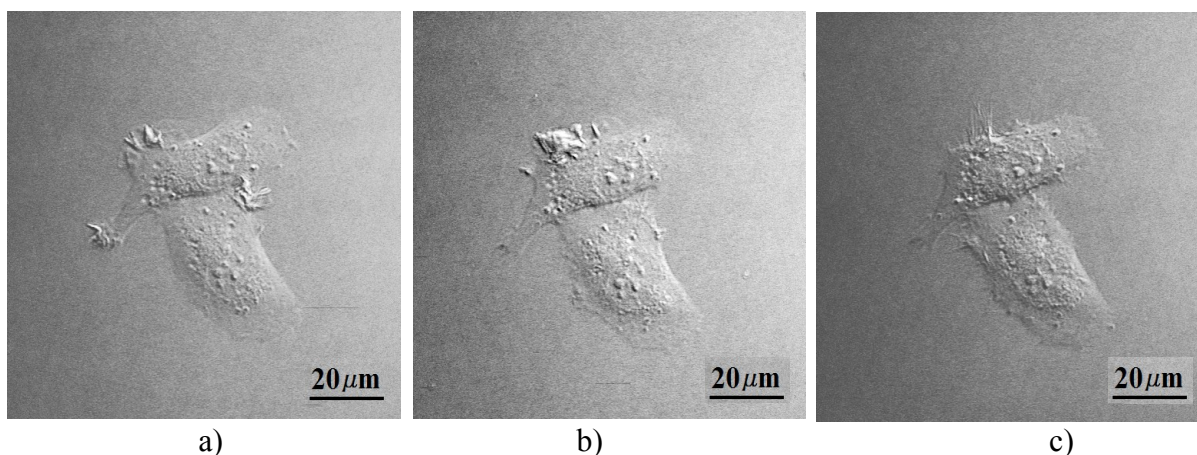
4.8 Zobrazení buněk A3Rho(Ca) pomocí DIC

Cílem experimentu bylo prokázat použitelnost komůrky ke sledování reakcí buněk v jiném typu mikroskopu, tedy víceúčelové použití komůrky v kombinaci s jinými metodami zobrazení než digitálním holografickým mikroskopem. V části 4.5 již bylo prokázáno zobrazení diferenciálním interferenčním kontrastem. V této části je úkolem nasnímat mikroskopem Nikon Ti dynamické procesy buňky.

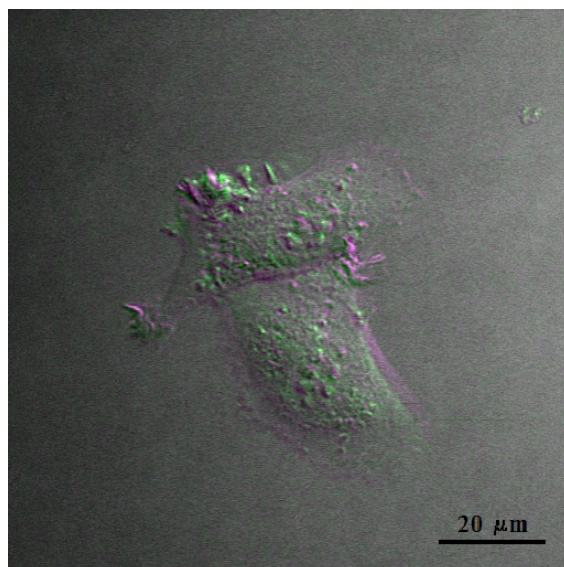
Plánem bylo zopakovat experiment s fyziologickým roztokem, popsaném v části 4.6. Příprava a nasazení buněk proběhlo stejně jako v ostatních experimentech (část 4.3). Průtoková komůrka s buňkami typu A3Rho(Ca) byla vložena do mikroinkubátoru Tokai Hit (popsaný v části 1.5.4) pro teplotní stabilitu vzorku. Mikroinkubátor byl umístěn na mikroskopový stolek.

Bylo provedeno snímkování s intervalem 5 s metodou DIC. Mikroskop disponuje systémem Perfect Focus [43], který udržuje nastavenou rovinu zaostření i při mírné změně polohy komůrky ve směru optické osy během proplachování (viz část 3.3). Díky nedostatečné modifikaci průtokového systému pro konstrukční řešení mikroskopu Nikon Ti se podařilo nasnímat jen časový úsek necelých jedenácti minut reakce na fyziologický roztok. Pro účely demonstrace pozorování a vyhodnocení dynamické reakce buněk v mikroskopu Nikon Ti byl časový úsek dostačující.

Zpracování získaných snímků bylo odlišné. Ke zvýraznění pohybu buněk nebylo možné použít program WxIDE, protože se nepracuje s informacemi o fázi, ale jen se snímky intenzity. Snímky byly zpracovány metodou sčítání barevných kanálů snímků z různých časů pozorování. Na obrázku 31 lze vidět tři vybrané snímky ze: a) začátku (0 minut), b) středu (5,6 minut) a c) konce (10,3 minut) měřeného intervalu. Změny tvaru buněk jsou na snímcích málo patrné. Snímky byly rozděleny na RGB kanály. Z každého byl vybrán jeden jiný barevný kanál a získané tři kanály se sečetly v jeden barevný snímek (a – červený, b – modrý, c – zelený kanál). Výsledek je vidět na obrázku 31. Barvy stejné intenzity z kanálů se sečetly do původního odstínu šedé. Fialová barva na okrajích buněk je výsledkem chybějící zelené složky. To znamená, že se buňka musela během snímání smrštit. Výsledkem jsou tak barevně zvýrazněné oblasti změny tvaru buněk. Parametry experimentu: objektiv Plan Apo VC 60x WI DIC N2, NA = 1,2, $\lambda = 641,6$ nm.



a) b) c)
Obrázek 30: Buňky typu A3Rho(CA), metoda DIC, postupná reakce na fyziologický roztok: a) $t = 0$ minut), b) $t = 5,6$ minut) a c) $t = 10,3$ minut. Objektiv 60x/1,2.



Obrázek 31: Buňky typu A3Rho(CA), součet barevných kanálů jednotlivých snímků: fialová – úbytek suché hmoty, zelená – přírůstek suché hmoty.

Průtoková komůrka je vhodná k pozorování i v jiných typech mikroskopů a jinými metodami optického zobrazování. Nebyl ani problém kompatibility průtokové komůrky s mikroinkubátorem, komůrka rozměrově vyhovovala standardnímu nastavení pro biologické vzorky.

5 Závěr

Navrhla jsem a zkonstruovala průtokové komůrky pro účely systematického pozorování buněk a buněčných tkání transmisním koherencí řízeným holografickým mikroskopem (CCHM). Provedla jsem podrobnou studii předchozích návrhů pozorovacích komůrek, na jejichž základě jsem stanovila kritéria pro konstrukci průtokové komůrky. Průtokovou komůrku tvoří silikonové tělo a dvě krycí sklička, paralelně přisátá k protilehlým plochám silikonového těla. Průtoková komůrka, společně se silikonovými a teflonovými hadičkami, rezervoárem a odpadní nádobkou, tvoří průtokový systém, splňující podmínky netoxičnosti a sterility pro kultivaci buněk. Díky přívodním kanálkům je možné řízeným průtokem dodávat do průtokové komůrky čerstvé médium a udržovat optimální kultivační prostředí, bez nutnosti vyjmutí komůrky z mikroskopu. Mohou se plynule přidávat jak živiny, tak různá biologická činidla. Výhodou průtokové komůrky je snadná montáž a opakovatelné použití v experimentech po sterilizaci všech částí.

Experimentálně byla prokázána jak bezproblémová dlouhodobá kultivace buněk, tak kontinuální pozorování v CCHM a vyhodnocování reakcí vybraných buněk před a po změně prostředí v průtokové komůrce.

V rámci řešení zadaných cílů diplomové práce jsem se zúčastnila týdenního kurzu v Laboratoři buněčné biologie a kultivací ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze, kde jsem se pod vedením MUDr. Pavla Veselého, CSc. seznámila s problematikou buněčné kultivace. Na pracovišti Biotechnologického inkubátoru INBIT v kampusu Masarykovy univerzity v Brně jsem s asistencí Ing. Ondřeje Sedláka provedla sérii experimentů s navrženou průtokovou komůrkou mikroskopem Nikon Ti. Nad rámec diplomové práce byla ověřena funkčnost průtokové komůrky i v mikroskopu Nikon Ti při užití techniky diferenciálního interferenčního kontrastu.

Konstrukce průtokového systému umožňuje využít potenciálu CCHM, který tkví ve sledování dynamických změn živé buňky na definovaná činidla a vyhodnocování reakce na tyto podněty. Srovnáním reakcí se lze pokusit definovat poplašnou reakci buňky a odhalení možného schématu, vedoucího ke schopnosti předvídání dalších projevů buňky. V případě potvrzení stereotypního chování určitých typů buněk na definované podněty, by bylo možné matematické vyjádření tohoto chování buněk, což by znamenalo velký přínos v biologii.

6 Literatura

- [1] KOLMAN, P. *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [2] UHLÍŘOVÁ, H. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [3] HIBBS, A. R. *Confocal Microscopy for Biologists*. 1st edition, Springer, 2004. 474 p. ISBN: 0306484684.
- [4] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 51 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [5] Culture Chambers for Live-Cell Imaging. © 2000-2010. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL: <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/culturechambers.html>
- [6] EIJGENSTEIN, L. H., PROP, F. J. A. A simple versatile large-surface tissue culture chamber for phase contrast photography and microcinematography. *Experimental Cell Research* 60, 1970. 464-466.
- [7] TOY, B. L., BARDAWIL, W. A. A simple plastic perfusion chamber for continuous maintenance and cinematography of tissue cultures. *Experimental Cell Research* 14, 1958. 97-103.
- [8] INCE, C., BEEKMAN, R. E., VERSCHRANGEN, G. A micro-perfusion chamber for single-cell fluorescence measurements. *Journal of Immunological Methods* 128, 1990. 227-234.
- [9] SPRING, K. R., HOPE, A. Size and shape of the lateral intercellular spaces in a living epithelium. *Science* 200, 1978. 54-58.
- [10] KAPLAN, D., BUNGAY, P., SULLIVAN, J., ZIMMERBERG, J. A rapid-flow perfusion chamber for high-resolution microscopy. *Journal of Microscopy* 181, 1996. 286-297.
- [11] HING, W.A., POOLE, C.A., JENSEN, C.G. and WATSON, M. An integrated environmental perfusion chamber and heating system for long-term, high resolution imaging of living cells. *Journal of Microscopy* 199, 2000, 90-95.
- [12] REIDER, C. L., COLE, R. W. Perfusion Chambers for High-Resolution Video Light Microscopic Studies of Vertebrate Cell Monolayers: Some Considerations and a Design. *Methods in Cell Biology* 56, 1998. 253-275.
- [13] HAMBURGER, V., Wilhelm Roux: Visionary with a Blind Spot. *Journal of the*

History of Biology 30, 1997. 229–238. Poslední aktualizace 15. 5. 2011.
 URL < <http://www.springerlink.com/content/qn5185g171722174/fulltext.pdf>>

- [14] NICHOLAS, J.S. Ross Granville Harrison. *National Academy of Science, Washington D.C.* 162. 1961. Poslední aktualizace 15. 5. 2011.
 URL <<http://books.nap.edu/html/biomems/rharrison.pdf>>
- [15] BURROWS, M. T. A method of furnishing a continuous supply of new medium to a tissue culture in vitro. *Anatomy Recall* 6, 1912. 141-144.
- [16] ROMEIS, B. Ein verbesserter Kulturapparat für Explantate. *Zeits für Wissenschaftliche Mikroskopie*. 29, 1912. 530-534.
- [17] ZERNIKE, F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* 9, 1942. 686-698.
- [18] SYKES, J. A., MOORE, E. B. A new chamber for tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 100, 1959. 125-127.
- [19] CHRISTIANSEN, G. S., DANES, B., ALLEN, L., LEINFELDER, P. J. A culture chamber for the continuous biochemical and morphological study of living cells in tissue culture. *Experimental Cell Research* 5, 1953. 10-15.
- [20] POYTON, R. O., BRANTON, D. A multipurpose microperfusion chamber. *Experimental Cell Research* 60, 1970. 109-114.
- [21] ROBERTS, D. C., TREVAN, D. J. A versatile microscope chamber for the study of the effects of environmental changes on living cells. *Royal Microscopical Society* 79, 1961. 361-366.
- [22] DVORAK, J. A., STOTLER, W. F. A controlled environment culture system for high resolution light microscopy. *Experimental Cell Research* 68, 1971. 144-148.
- [23] FINCH, S. A. E., STIER, A. A perfusion chamber for high-resolution light microscopy of cultured cells. *Journal of Microscopy* 151, 1988. 71-75.
- [24] PENTZ, S., HÖRLER, H. A variable cell culture chamber for 'open' and 'closed' cultivation, perfusion and high microscopic resolution of living cells. *Journal of Microscopy* 167, 1992. 97-103.
- [25] ROSE, G. A separate and multipurpose tissue culture chamber. *Texas Reports on Biology & Medicine* 12, 1954. 1075-1081.
- [26] BAJER, A. S. Time-lapse microcinematography in cell biology. *Journal of Theoretical Physics* 3, 1969. 217-267.
- [27] BRAGA, P.C. Versatile perfusion chamber for high-magnification microscopy. *Journal of Pharmacological Methods* 22, 1989. 1-6.
- [28] PEARCE, B. R., CURRIE, D. N., DUTTON, G. R., HUSSEY, R. E. G., BEALE, R.,

- PIGOTT, R. A simple perfusion chamber for studying neurotransmitter release from cells maintained in monolayer culture. *Journal of Neuroscience Methods* 3, 1981. 255- 59.
- [29] BERG, H. C., BLOCK, S. M. A miniature flow cell designed for rapid exchange of media under high-power microscope objectives. *Journal of General Microbiology* 130, 1984. 1915-1920.
- [30] STRANGE, K., SPRING, K. R. Methods for imaging renal tubule cells. *Kidney International* 30, 1986. 192-200.
- [31] FREYBERG, M. A., FRIEDL, P. The use of a conventional tissue culture plate as an optically accessible perfusion chamber for in situ assays and for long-term cultivation of mammalian cells. *Cytotechnology* 26, 1998. 49-58.
- [32] AutoMate Scientific, Inc. © 2006-2010. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL: <http://www.autom8.com/siskiyou_chamber.html>
- [33] Closed Bath Imaging Chamber. Warner Instruments. © 1998 – 2011. Poslední aktualizace 20. 3. 2011. URL: <<http://www.warneronline.com>>
- [34] Incubation System for Microscopes. Tokai Hit Co., Ltd. Poslední aktualizace 20. 3. 2011. URL: <<http://www.tokaihit.com>>
- [35] GREGG, J. L., MCGUIRE, K. M., FOCHT, D. C., MODEL, M. A. Measurement of the thickness and volume of adherent cells using transmission-through-dye microscopy. *European Journal of Physiology* 460, 2010. 1097-1104.
- [36] ROSSI, A. H., SALMON, W. C., CHUA, M., DAVIS, C. W. (2007). Calcium signaling in human airway goblet cells following purinergic activation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292: L92–L98, 2007.
- [37] Live Cell Microscopy Environmental Control Systems. © 2005 Biopetechs Inc. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL: <<http://www.biopetechs.com/Products/FCS2/fcs2.html>>
- [38] ANDERSON, E. J., FALLS, T. D., SORKIN, M. A., TATE, M. L. K. The imperative for controlled mechanical stresses in unraveling cellular mechanisms of mechanotransduction. *BioMedical Engineering OnLine* 5: 27, 2006. doi:10.1186/1475-925X-5-27. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL: <<http://www.biomedical-engineering-online.com/content/5/1/27>>
- [39] ŠOB, F. *Hydromechanika*. 1. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2002. 238 s. ISBN 80-214-2037-5.
- [40] KOZUBKOVÁ, M.. *Modelování proudění tekutin, FLUENT, CFX*. 1. vydání. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Katedra hydromechaniky a hydraulických zařízení. 2008. 153 s. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL: <<http://www.338.vsb.cz/PDF/Kozubkova-Fluent.pdf>>
- [41] ZIKMUND, T., KVASNICA, L., UHLÍŘOVÁ, H., LOVICAR, L., CHMELÍK, R.

Dynamical deformation compensation of phase in digital holographic microscopy.
In Proceedings of SPIE, Volume 7746. SPIE, 2010. s. 77460K- 1 (77460K-7 s.).
ISBN: 978- 80- 554-0238- 3.

- [42] TKACZYK, T. S.: *Field Guide to Microscopy*. Bellingham: SPIE, 2010. s66-71, 80- 81. ISBN: 9780819472765.
- [43] Nikon Perfect Focus system. © 2000-2010. Poslední aktualizace 15. 5. 2011. URL:
<<http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/focusdrift/perfectfocus/index.html>>