

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**VYSOCE PROPUSTNÝ SYSTÉM PRO ANALÝZU
ORGANOIDŮ V BIOMEDICÍNSKÝCH APLIKACÍCH**

HIGH-THROUGHPUT ORGANOID ANALYSIS PLATFORM FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vojtěch Roček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Oto Janoušek, Ph.D.

BRNO 2019

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské a ekologické inženýrství**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Vojtěch Roček

ID: 124851

Ročník: 2

Akademický rok: 2018/19

NÁZEV TÉMATU:

Vysoce propustný systém pro analýzu organoidů v biomedicínských aplikacích

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši možností analýzy organoidů neinvazivními optickými metodami (rgb analýza, fluorescence, luminiscence aj.). 2) Navrhněte přístrojovou sestavu (zobrazující techniky, metodiku, typy přípravy vzorku, požadovanou sterilitu, atd.) umožňující automatizované měření a analýzu vybraných optických markerů sférických organoidů s využitím jednotlivých prvků existující platformy algeascreen od firmy Photon Systems Instruments, s.r.o. 3) Navrhněte experiment pro ověření funkcionality navržené sestavy. Diskutujte nezbytnou modifikaci přístroje pro účely automatizované analýzy. 4) Sestavte navrženou konfiguraci. 5) Provedte sérii testů prototypu zařízení s příslušnými analýzami a vyhodnocením. 6) Provedte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Chen KG, Mallon BS, et al. (2018), Pluripotent Stem Cell Platforms for Drug Discovery. Trends in Molecular Medicine, 24: in press corrected proof.

[2] L.-B. Weiswald, D. Bellet, V. Dangles-Marie. Spherical Cancer Models in Tumor Biology, Neoplasia, 2015, 17:1-15.

[3] J. Drost, W.R. et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue, Nat. Protocols, 2016, 11:347-358.

Termín zadání: 4.2.2019

Termín odevzdání: 17.5.2019

Vedoucí práce: Ing. Oto Janoušek, Ph.D.

Konzultant: Ing. Martin Trtílek

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

UPOZORNĚNÍ:

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

Abstrakt

V posledních letech se dostává do popředí zájmu využití tzv. 3D kultur a organoidů jako modelových systémů pro translační a preklinický výzkum, zejména pro potřeby testování nových druhů léčiv. Standardní přístupy studia zahrnují jak invazivní přístupy biochemické či molekulárně biologické analýzy, tak i neinvazivní metody optické. Mezi základní optické metody, užívané ke studiu organoidů patří zejména různé mikroskopické techniky, které poskytují detailní informace o struktuře, ale jsou náročné časově i na experimentální vybavení. Pro rozsáhlejší studie by byl výhodný systém automatické analýzy, umožňující testování velkého počtu vzorků. Tato práce je zaměřena na vývoj zařízení pro vysoce propustnou automatickou analýzu organoidních struktur na bázi mikrotitračních destiček pro biomedicínské aplikace. Je provedena literární rešerše neinvazivních optických metod, vhodných pro analýzu 3D buněčných kultur a organoidů. Jsou diskutovány nutné úpravy existující platformy na fenotypizaci řas. Dále pak je navržen experiment za účelem otestování funkčnosti takto upraveného systému. Praktické využití v klinické praxi je otestováno navrženým experimentem reakce sferoidů na vybraná cytostatika. V diskuzi jsou rozebrány dosažené výsledky a poznatky celé práce jsou shrnuty v závěru.

Klíčová slova

Organoid, Vysoce propustný screening, Mikrotitrační destičky, Fenotypizace, FluorCam, mCherry

Abstract

Nowadays, the organoids structures has become more popular as suitable model systems for clinical research, particularly for development of new medication and drug screening. The standard study approaches include invazive biochemical or molecular-biology analysis as well as non-invasive optical approaches. Among optical methods, various microscopy techniques can give a very detailed information about the structure of organoids. However, the microscopy is time consuming as well as it puts a great demand on instrumentation. Therefore, the microscopy is not suitable for high content analysis of multiple samples. This work is focused on the development of the device and experimental technique for high-throughput screenings of organoids structures for biomedical applications based on microtitrate plates. Literatre search for non-invasive optical methods, suitable for analysis of organoid structures. The necessary ajustements of existing system for algae phenotypization are discussed. An experiment was made to test functionality of designed system. Practical use for clinical use is tested by the experiment of spheroids reaction to selected cytostatics. The results and findings are discussed in the conclusion.

Keywords

Organoid, High – throughput screening, Microtier plate, Phenotypization, FluorCam, mCherry

Bibliografická citace:

ROČEK, V. Vysoce propustný systém pro analýzu organoidů v biomedicínských aplikacích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2019. 61 s. Vedoucí diplomové práce byl Ing. Oto Janoušek Ph.D.

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Vysoce propustný systém pro analýzu organoidů v biomedicínských aplikacích jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

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

V Brně dne: **17.května 2019**

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Oto Janouškovi Ph.D., Ing. Martinovi Trtílkovi a RNDr. Zuzaně Benedikty Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále Mgr. Tereze Suchánkové Ph.D. za odbornou přípravu biologického materiálu a Mgr. Karlu Součkovi Ph.D., a doc. MVDr. Aleši Hamplovi CSc. za cenné rady ke zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne: **17.května 2019**

.....
podpis autora

Obsah

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	3
SEZNAM OBRÁZKŮ	4
ÚVOD	7
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. ORGANOIDNÍ STRUKTURY	9
1.2. METODY STUDIA ORGANOIDNÍCH STRUKTUR	10
1.2.1. SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE.....	11
1.2.2. MIKROSKOPIE S VYUŽITÍM FÁZOVÉHO KONTRASTU.....	13
1.2.3. FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	14
1.2.4. KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE.....	15
1.2.5. WIDE FIELD FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	18
1.3. TESTOVÁNÍ MODELOVÝCH PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV S VYUŽITÍM SFEROIDŮ NÁDOROVÝCH BUNĚK	19
2. MATERIÁLY, METODY A PŘÍSTROJOVÁ ZÁKLADNA.....	21
2.1. ZOBRAZOVÁNÍ OPTICKÝCH MARKERŮ FLUORESCENCE.....	21
2.2. METODIKA PŘÍPRAVY VZORKŮ	21
2.3. NÁVRH AUTOMATIZOVANÉHO SYSTÉMU	25
2.3.1. INKUBÁTOR MIKROTITRAČNÍCH DESTIČEK	26
2.3.2. ZOBRAZOVACÍ TECHNIKY.....	26
2.3.3. ROBOTICKÉ RAMENO	28
2.4. MODIFIKACE STÁVAJÍCÍ PLATFORMY ALGAESCREEN	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1. OVĚŘENÍ FUNKCIONALITY ZOBRAZOVACÍ SOUSTAVY.....	31
3.2. OPTIMALIZACE SYSTÉMU	33
3.2.1. SKENOVÁNÍ S POMOCÍ VYŠŠÍ ŘADY CCD KAMER TOMI-2	33
3.2.2. SKENOVÁNÍ S POMOCÍ EXPERIMENTÁLNÍ 12 MPX CCD KAMERY.....	36
3.3. LIMITACE MAKROSKOPICKÉHO ZOBRAZOVÁNÍ	39
3.3.1. CROSSTALK	39
3.3.2. VADY OBJEKTIVU.....	40
3.4. ŘEŠENÍ LIMITAČNÍCH VAD	41
3.4.1. CROSSTALK	41
3.4.2. VINĚTACE	42
3.5. HODNOCENÉ PARAMETRY VELIKOSTI SFEROIDŮ	43

3.6.	TEST ÚČINKU MODELOVÝCH CYTOSTATIK.....	45
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
4.1.	OPTIMALIZACE ZOBRAZOVACÍHO SYSTÉMU.....	51
4.2.	VYHODNOCENÉ MORFOLOGICKÉ PARAMETRY	52
4.3.	STANOVENÍ VELIKOSTI BUNĚK	53
4.4.	TEST ÚČINKU MODELOVÝCH CYTOSTATIK.....	54
5.	ZÁVĚR.....	56
6.	SEZNAM LITERATURY	57

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

hPSCs.....	Human Pluripotent Stem cells (Lidské pluripotentní kmenové buňky)
EBs.....	Embryoid Body (Embryo)
CLSM.....	Confocal laser scanning microscopy (Konfokální skenovací mikroskopie)
f	Ohnisková vzdálenost
SDCLSM	Spinning disc confocal laser scanning microscopy (Konfokální mikroskopie s rotujícím diskem)
OCM	Optical coherence microscopy (Optická koherenční mikroskopie)
MTP	Microtiter plates (mikrotitrační destičky)
PSI.....	Photon Systems Instruments
λ	vlnová délka [nm]
wt	wild type (nemutovaná forma)
px	pixel
FFC	Flat Field Correction
5FU	5-fluorouracil

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Stručný přehled výhod a nevýhod organoidních struktur [8]	10
Obrázek 2 - Schéma fluorescenčního mikroskopu [30]	15
Obrázek 3- Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu [33]	17
Obrázek 4 - Schéma konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem [35]	18
Obrázek 5 – Schéma rozdílu principů konfokální mikroskopie a wide field mikroskopie [37]	19
Obrázek 6 - Excitační a emisní spektra proteinu <i>mCherry</i> s vyznačeným excitačním (zelená čára) a emisním (modrá čára) maximem [46].....	22
Obrázek 7 – Pohled na spodní část MTP destičky Corning 3830 [48]	23
Obrázek 8 – Snímek světelného mikroskopu zachycující formování a růst organoidních struktur v závislosti na počtu počáteční koncentraci buněk. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.	24
Obrázek 9 – Schéma navrženého přístroje	25
Obrázek 10 – Prototyp inkubátoru mikrotitračních destiček	26
Obrázek 11 - Modul FluorCam snímající MTP v prototypu systému AlgaeScreen.	27
Obrázek 12 - Schéma, znázorňující invertovaný systém měření MTP v navrhovaném systému	28
Obrázek 13 - Robotická ruka Omron TM12, zajišťující manipulaci se vzorkem v systému AlgaeScreen [50].....	28
Obrázek 14 – Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-1, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 -/- (červený obdélník).....	31
Obrázek 15 - Organoidní struktury, snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-1. Jednotlivým organoidním strukturám odpovídá jen několik pixelů	33
Obrázek 16 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 -/- (červený obdélník).....	34

Obrázek 17 - Sférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2.....	34
Obrázek 18 - Asférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2.....	35
Obrázek 19 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery s rozlišením 12 Mpx, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 -/- (červený obdélník)	37
Obrázek 20 - Sférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím experimentální kamery s rozlišením 12 Mpx	37
Obrázek 21 - Asférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím experimentální kamery s rozlišením 12 Mpx	37
Obrázek 22 - Artefakty, výrazným způsobem ovlivňující analýzu organoidních struktur	39
Obrázek 23 - Obrazové artefakty, vzniklé odrazem LED panelů od den jamek MTP	40
Obrázek 24 - Obrázek znázorňující objektivovou vadu vinětací. Obrázek vlevo není touto vadou postižen, obrázek vpravo je postižen vinětací [52]	40
Obrázek 25 - Snímek destičky s organoidními strukturami s patrnou objektivovou vadou vinětací	41
Obrázek 26 - Obrázek detailu původní masky s čtvercovým profilem se zvýrazněnými artefakty v červených kroužcích (červený obdélník) a nově navržené masky s kruhovým profilem, nezahrnující artefakty do analýzy (modrý obdélník). 41	
Obrázek 27 – Pseudobarevný snímek MTP s fluorescenčním barvivem Basic Blue, pořízený experimentální kamerou s rozlišením 12Mpx	42
Obrázek 28 - Výsledný pseudobarevný snímek MTP s organoidními strukturami po korekci FFC	43
Obrázek 29 - Snímek organoidní struktury, která by mohla být na základě parametru konvexní obálky falešně vyhodnocena, jako sférická.....	44
Obrázek 30 - Grafické vyjádření morfologických parametrů délka a šířka.....	44

Obrázek 31 - Rozložení testovací MTP, znázorňující koncentrace protinádorového léčiva Gemcitabin. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.	45
Obrázek 32 – Rozložení testovací MTP, znázorňující koncentrace protinádorového léčiva 5-fluorouracil a kontrolních skupin. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.	46
Obrázek 33 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery s rozlišením 12 Mpx, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami s cytostatikem Gemcitabin (červený obdélník), kontrolní skupina (modrý obdélník) a s cytostatikem 5- fluorouracil (zelený obdélník)	46
Obrázek 34 - Pseudobarevný snímek, pořízený systémem ImageXpress Micro Automated Imaging System, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami s cytostatikem Gemcitabin (červený obdélník), kontrolní skupina (modrý obdélník) a s cytostatikem 5- fluorouracil (zelený obdélník). Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.	48
Obrázek 35 - Srovnání morfologie na buňkách typu DLD-1 BRCA2 +/- o stejné počáteční koncentraci buněk za použití kamery TOMI-1(modrý obdélník), TOMI2 (červený obdélník) a experimentální kamery s rozlišením 12Mpx (zelený obdélník)	51
Obrázek 36 - Obrázek, srovnávající informační výtěžek buněk linie DLD-1 z destičky snímané bez předřazené FFC (modrý čtverec) a s FFC, předřazenou analýze (červený obdélník)	52
Obrázek 37 - Snímek, zachycující shluk buněk, který se nezformoval do organoidní struktury a z analýzy byl vyloučen na základě stanovených morfologických parametrů	53
Obrázek 38 - Obrázek prázdné jamky v MTP, vzniklé z důvodu rozpadu sferoidu.	53

ÚVOD

Výzkum rakoviny v posledních desetiletích přinesl významný pokrok v diagnostice a léčbě. Nicméně rakovina reprezentuje stále jedno z nejčastějších onemocnění ve světovém měřítku. Nejpalčivějším problémem je vývoj efektivní terapie, minimalizace vedlejších účinků, zlepšení kvality života a délky přežití pacientů.

Konvenční metody testování antitumorálních preparátů zahrnují testy na dvoj-dimenzionálních (2D) buněčných kulturách, imobilizovaných buněčných liniích, které nedostatečně reprodukuje interakce mezi buňkami, heterogenní morfologii reálných tumorů a přirozené mikro prostředí. Navíc živočišné modely, které jsou často zavedené v rámci farmakologického testování, mohou poskytovat rozdílnou odpověď, nebo mít jiné vedlejší účinky při pokusech o aplikaci na lidský organismus. Organoidy, jako miniatury *in vivo* tkání a orgánů, by mohly nabídnout částečné překlenutí zmíněných problémů.

Organoidy jsou troj-dimenzionální (3D) struktury, které mohou být vytvořené takřka z jakýchkoliv buněk, tvořících solidní tkáň a orgány, např. z embryonálních kmenových buněk, indukovaných pluripotentních kmenových buněk, somatických buněk i rakovinných buněk. Organoidy vytvořené z tkání primárních tumorů by dokonce mohly sloužit jako pacient-specifický model pro testování a nastavování individuálních terapií na míru. Výsledky nejnovějších studií ukazují, že léčba testovaná na rakovinných organoidech/tumoroidech/sferoidech, věrně odráží odpověď gastrointestinálních nádorů a umožňuje předpovídat reakce pacienta na terapii [1-5].

Předpokladem využití *in vitro* organoidních struktur pro individuální terapie nebo vývoj léčiv vyžaduje směřování jak v technologii tkáňových kultur, tak metod zobrazování a dalších analýz organoidů ve směru vysoko-propustného screeningu (High-throughput Screening, HTS). Kultivace se přesouvá do mikrotitračních destiček (microtiterate plates, MTP) formátu minimálně 96 nebo 384 jamek. Objevily se také první platformy tzv. "orgán-na-čipu" [6]. Velký důraz se také klade na vývoj neinvazivních a rychlých mikroskopických metod a minimalizaci nežádoucích jevů v důsledku zdlouhavé světelné expozice při standardní fluorescenční nebo konfokální mikroskopii [7].

Cílem mé práce bylo otestovat potenciál testování sferoidů v 384 jamkové MTP s využitím komponent platformy AlgaeScreen firmy PSI, spol. s r.o., která byla původně navržena pro kultivaci a screening řas. Jelikož systém AlgaeScreen není zatím

standardním produktem, většina práce probíhala na úrovni testování prototypů a konceptů, přičemž důraz byl kladen zejména na možnosti a optimalizaci detekční metody, makroskopického zobrazování fluorescence na úrovni celé MTP.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Organoidní struktury

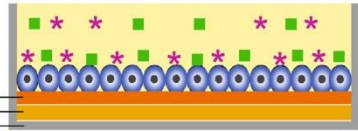
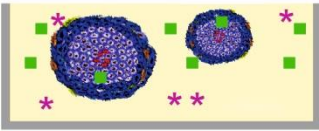
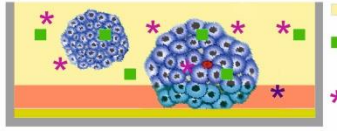
Sferoidem nazýváme 3D *in-vitro* tkáňovou kulturu, složenou z orgánově specifického typu buněk [8]. Tyto struktury obsahují populaci kmenových buněk, která je schopna samostatné obnovy. Za specifických podmínek pak tyto buňky diferencují a proliferují tak, že organoidní tkáň vykazuje prostorovou organizaci a funkcionalitu odpovídající původnímu orgánu.

Organoidy mohou být generovány jak ze vzorků tkání, obsahujících dospělé kmenové buňky, z jednotlivých dospělých kmenových buněk, tak i diferenciací pluripotentních kmenových buněk. Organoid je schopen růstu díky přítomnosti aktivní populace kmenových buněk. Různé tkáně vyžadují vlastní specifické kultivační podmínky, obecně jsou vhodné pluripotentní kmenové buňky nebo tkáňové specifické progenitorové buňky uloženy ve vhodné extracelulární matrix, kterou je nejčastěji Matrigel® [9]. Kultivace probíhá ve vhodném médiu, obsahujícím specifické růstové faktory, napodobující *in vivo* signály, potřebné pro udržení správných podmínek populace kmenových buněk. Při dodržení těchto podmínek kmenové buňky proliferují a samoorganizují se do 3D organoidních struktur, které mohou být uchovávány. Mezi nejběžněji používané tkáně pro kultivaci organoidů řadíme tkáně střev [10], pankreatu [11], ledvin [12], prostaty [13], plic [14], mozku [15] a sítnice [16].

Objevení postupů, které umožňují tvorbu a kultivaci organoidů, umožnilo zásadní pokrok ve výzkumu kmenových buněk za poslední dekádu [17]. Výzkum organoidních struktur, má významný potenciál jako nástroj pro studium široké škály předmětů, včetně vývojové biologie, patologie onemocnění a buněčné biologie. Tato technologie má také obrovský potenciál pro regenerativní medicínu, protože organoidy hypoteticky představují možnost pro autologní a alogenní buněčné terapie, nahrazení poškozené nebo nemocné tkáně populacemi kmenových buněk [8,17,18].

Významně se však modely organoidů uplatňují v translačním a preklinickém výzkumu, a to jednak pro potřeby vývoje léků, screeningu lékové toxicity, či rozvoji individuálních terapií [19]. Nejnovější studie ukazují, že výsledky testování léčiv na 2D buněčných kulturách mohou být přeneseny do *in vivo* chemoterapie jen omezeně. Jedním z problémů je vznik rezistence na terapeutikum, která dost možná pramení z prostorového uspořádání

buněk v tumoru, narozdíl od 2D buněčných monovrstev, kterým chybí původní heterogenita tumoru, histologická architektura a komplexní interakce mezi buňkami a extracelulární matrix [20]. Další výhody a nevýhody jsou shrnuty v obrazovém přehledu (viz Obrázek 1).

	2D monovrstvy	3D EBs	3D organoidy
Výhody	Jednoduché, robustní, vysoký buněčný výtěžek u hPSC růstu a diferenciaci	Blízké 3D <i>in vivo</i> prostředí tkání, vhodné pro studium 3D buněčných interakcí	Napodobují 3D <i>in vivo</i> prostředí lidských buněk a tkání
	Homogenní buňky, méně variabilní	Široce využívané pro diferenciaci 3 zárodečných vrstev	Mohou být získány z hPSCs, dospělých kmenových buněk, plodových a dospělých tkání
	Univerzální, vhodné pro diferenciaci, funkční testy, snímání s vysokým obrazovým výtěžkem a sledování kinetiky jednotlivých buněk	Více se v dospělosti diferencují než 2D vrstvy	Vysoká čistota, vysoká buněčná a genomová stabilita
	Uniformní chování po vystavení růstovým faktorům a chemickým sloučeninám	Škálovatelná produkce v bioreaktorech	Dlouhodobé dělení v <i>in vitro</i> organoidních kulturách
	Vhodné pro nízko/vysoko-propustné screenování lékové toxicity	Adaptabilní na různé suspenzní kultury	Mohou být využity pro fyziologicky relevantní funkční testy, modelování nemocí a testy lékové toxicity
	Nezbytné pro generace organoidů, založené na epitelální tkáni	Adaptabilní na mikrofluidní „orgány na čipu“	
Nevýhody			
	Neumožňuje 3D <i>in vivo</i> prostředí pro vývojový růst	Generují komplikované buněčné struktury	Neumožňují hostitelské prostředí pro rozvoj kmenových buněk
	Méně se v dospělosti diferencují v porovnání s EBs	Značná variabilita ve velikostech	Nenabízejí neurální, endokrinní a distální imunologické signály
	Nahromaděné mutace v 2D buněčných liniích mohou bránit jejich použití při modelování nemocí a screeningu léků	Vyšší buněčná heterogenita než 2D monovrstvy a organoidní systémy	Omezená schopnost propouštět léčiva
	Zavíjí na malých molekulách, zvyšujících účinnost jednotlivých buněk	Nevhodné pro snímání obrazů s vysokým obrazovým výtěžkem a testy lékové toxicity	Omezená využitelnost pro snímání obrazů s vysokým obrazovým výtěžkem a vysoko-propustný test lékové toxicity

Obrázek 1 - Stručný přehled výhod a nevýhod organoidních struktur [8]

1.2. Metody studia organoidních struktur

Organoidy lze analyzovat na základě velkého množství biologických, molekulárních, genetických nebo chemických testů. Další možností je využití metod optické analýzy. Některé metody studia biologických materiálů pak vyžadují pevnou fixaci vzorku, nebo sesbírání materiálu z velkého počtu buněk, což má za následek destrukci vzorku a limitaci dat na jediný časový okamžik analýzy. Tím se ztratí velké množství informací týkajících se prostorového rozložení, morfologie, heterogenity a časového vývoje. Z tohoto důvodu jsou preferované techniky analýzy, které zachovávají integritu vzorku, a to zejména metody optické.

Díky malé velikosti organoidů jimi světlo snadno prochází a je tedy využitelné pro měření všech buněk organoidu. Používané záření z viditelné části spektra je bez ionizační účinků a umožňuje tedy sledování organoidů v čase. Optické metody, využívající vysokého rozlišení, pak zprostředkovávají možnost buněčné analýzy, identifikace a kvantifikace

buněčné heterogenity a heterogenity chování na případné použité biologicky aktivní látky.

Vzhledem k rozměrům organoidních struktur (průměr 50–500 mikrometrů) se nejčastěji využívají mikroskopické techniky, a to jak světelná mikroskopie, nebo mikroskopie s fázovým kontrastem, tak fluorescenční a konfokální mikroskopie. Principy jednotlivých mikroskopických technik popisují detailněji v samostatných kapitolách. Každou z těchto metod lze úspěšně využít k získání různého druhu informací, jako nejlepší se tedy jeví použití kombinovaných přístupů a s tím spojený vysoký informační výtěžek a pestrá škála použitelnosti v praxi [20].

Nejčastěji používanou mikroskopickou metodou studia organoidů je fluorescenční mikroskopie. Důvodem je existence velkého množství exogenních fluoroforů, fluorescenčních barviv, široké škály fluorescenčních proteinů a také přítomnosti autofluorescenčních sloučenin (kolagen, metabolické koenzymy), které se přirozeně vyskytují v buňkách a které jsou často součástí některého z buněčných pochodů. Na příklad Walsh a kolektiv použili fluorescenčních vlastností kofaktorů FAD a NADH, což umožnilo hodnocení metabolismu buňky a zároveň vedlo k účinné detekci premaligních transformací v buňce [21,22].

Mezi další rutinně využívané metody patří konfokální fluorescenční mikroskopie, které umožňuje separovat signál z různých vrstev vzorku, a tak rekonstruovat 3D informaci. Wenzel a kolektiv identifikovali pomocí techniky mDSLM (multidirectional digital scanned light-sheet microscopy) 9 sloučenin z běžně dostupných knihoven léčiv, které specificky účinkovaly na buňky vnitřního jádra multicelulárních tumorových sféroidů, zatímco buňky vnější obálky nebo 2D buněčné kultury nebyly těmito léčivy ovlivněny [23].

Při analýze lze úspěšně kombinovat světelnou i fluorescenční mikroskopii. Jako příklad je uveden výzkum onemocnění cystické fibrózy, prováděný Dekkers a kolektivem. [24]

1.2.1.Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie představuje jednu z nejzákladnějších metod, používanou k optické analýze objektů. Principy světelné mikroskopie využívá přístroj, zvaný optický mikroskop, který za pomoci optických soustav zlepšuje rozlišovací schopnost oka až tisíckrát [25].

Mezi základní součásti patří světelný aparát, objektiv a okulár, které jsou mechanickou soustavou doplněny ve funkční celek optického mikroskopu.

Funkcí optického aparátu je zajištění co nejdokonalejšího osvětlení předmětové roviny mikroskopu. Hlavní funkcí je zajištění správného směru a intenzity k adekvátnímu prosvícení preparátu. Osvětlovací aparát je tvořen zdrojem světla, korektorovou clonou, polní (aperturní) clonou a kondenzorem s kondenzorovou clonou. Jako zdroj světla se nejčastěji používá halogenová lampa o výkonu 50-100 W, případně xenonová výbojka o výkonu 75-150 W. Úkolem korektorové clony je soustředit paprsky vycházející ze zdroje světla. Za touto korektorovou clonou je pak umístěna clona polní, která determinuje průměr světla jdoucího do kondenzoru. Mírou uzavření polní clony pak volíme určitý kompromis mezi kontrastem a hloubkou ostrosti na jedné straně a rozlišením detailů a barevného rozlišení na straně druhé. Kondenzor kondenzuje světlo v souměrném kuželu směrem k preparátu, kondenzorová clona pak upravuje úhel paprsků při vrcholu světelného kuželu. Při zcela otevřené kondenzorové cloně je úhel paprsků větší, obraz mikroskopu ztrácí barevnou hloubku a kontrast, je světlejší a s lepším rozlišením. Naopak při cloně zavřené je úhel paprsků menší, obraz nabývá barevnou hloubku a kontrast, zároveň se však stává méně zřetelným. Nejvyššího informačního výtěžku je dosaženo v případě, že je osvětleno pouze zorné pole objektivu [26,27].

Nejdůležitější součástí mikroskopu je objektiv, jeho kvalita značně determinuje zvětšení a výslednou kvalitu obrazu. Dále pak množství čoček, které v závislosti na své funkci mají potřebný tvar a optickou mohutnost. Tyto čočky jsou soustředěny do skupin v tripletech a dupletech, nebo jsou samostatné a pevně umístěné v objektivovém tubusu. Rozložení, počet a tvar čoček se liší v závislosti na typu objektivu a výrazně ovlivňuje všechny parametry objektivu. Celá soustava čoček pak dohromady funkčně tvoří čočku spojnou. Objektiv produkuje obraz zvětšený a převrácený. Základními parametry objektivu jsou numerická apertura objektivu, ohnisková vzdálenost objektivu, zvětšení objektivu a světelnost objektivu. Numerická apertura závisí na indexu lomu a aperturním úhlu a je dána vztahem (viz **$NA = n \cdot \sin(\alpha)$ (Rovnice 1)**), kde NA je hodnota numerické apertury, n je index lomu a α aperturní úhel. Numerická apertura je přímo úměrná rozlišovací mezi mikroskopu. Je tedy nejzásadnější charakteristikou objektivu.

$$NA = n \cdot \sin(\alpha) \text{ (Rovnice 1)[25]}$$

Ohnisková vzdálenost objektivu je určena vzdáleností předmětového ohniska objektivu od předmětové hlavní roviny. Ohnisková vzdálenost ovlivňuje zvětšení objektivu a tím i celkové zvětšení mikroskopu. Zvětšení objektivu je určeno ohniskovou vzdáleností objektivu, objektiv pak zajišťuje příčné zvětšení. Světelnost objektivu popisuje odpor, jež objektiv klade procházejícímu světlu. Světelnost je určena poměrem ohniskové vzdálenosti (f) k průměru kuželu světla, vycházejícího z kondenzorové clony. Ideální světelnost objektivu je $f:1$, prakticky nejlepší světelnost objektivu se pak pohybuje okolo hodnoty $f:1,4$ [25].

Primárně lze pomocí světelné mikroskopie pozorovat objekty amplitudové, jež při pozorování ve světlém poli absorbují světlo a tím mění jeho amplitudu. Takovou změnu amplitudy lidské oko zachytí jako změnu jasu (intenzity). Pokud těleso neabsorbuje světlo, není možné jejich pozorování za pomoci světelné mikroskopie. Taková tělesa nazýváme objekty fázové [25].

Zvýšené absorpce světla lze dosáhnout i barvením vzorku, takový postup se však pro analýzu organoidů nehodí, neboť zpravidla vede k usmrcení živého vzorku.

1.2.2. Mikroskopie s využitím fázového kontrastu

Oproti principům světelné mikroskopie, která umožňuje pozorování objektů amplitudových, mikroskopie s využitím fázového kontrastu umožňuje pozorování objektů fázových. Jako objekty fázové označujeme takové objekty, které se od svého okolí liší hlavně indexem lomu. Jelikož vzhledem ke svému okolí nejeví změnu absorpce světla, sledujeme u nich posun fáze světelné vlny. Takové objekty by principy světelné mikroskopie byly pozorovatelné pouze za pomoci speciálních barviv a s tím spojeným převodem na objekty amplitudové. Obarvení však vede k usmrcení pozorovaného objektu, což pro analýzu organoidů je jev nežádoucí. Vhodnější variantou je použití principů mikroskopie s využitím fázového kontrastu. Principem takové mikroskopie je přeměna fázové změny vlnění na změny intenzity světla. Obraz objektu v obrazovém ohnisku objektivu vzniká interferencí vlnění přímého, procházejícího objektem a vlnění difrakčního, posunutého na fázovém objektu. Výsledný obraz je však nepozorovatelný, jelikož rozdíly v indexu lomu předmětu a okolí jsou velice malé. Vlnění přímé a difrakční lze oddělit, což je nezbytnou podmínkou pro modulaci amplitudy a fáze světla přímého, a to bez ovlivnění světla difrakčního a naopak. Tohoto je docíleno umístěním tzv. fázové

desky (ve tvaru prstence), která posunuje fázi přímého světla při interferenci obou druhů vlnění. Výsledkem této interference je pak vznik kontrastního fázového obrazu. Nejvýraznější fázový kontrast vzniká při fázovém rozdílu $\frac{1}{4}$ vlnové délky použitého světla. V praxi pak rozlišujeme fázový kontrast pozitivní, kdy je fáze přímého vlnění posouvána vzhledem k vlnění difrakčnímu o $+\frac{1}{4} \lambda$ a fázový kontrast negativní, kdy je fáze vlnění posouvána o $\frac{1}{4} \lambda$ od vlnění difrakčního [28].

1.2.3. Fluorescenční mikroskopie

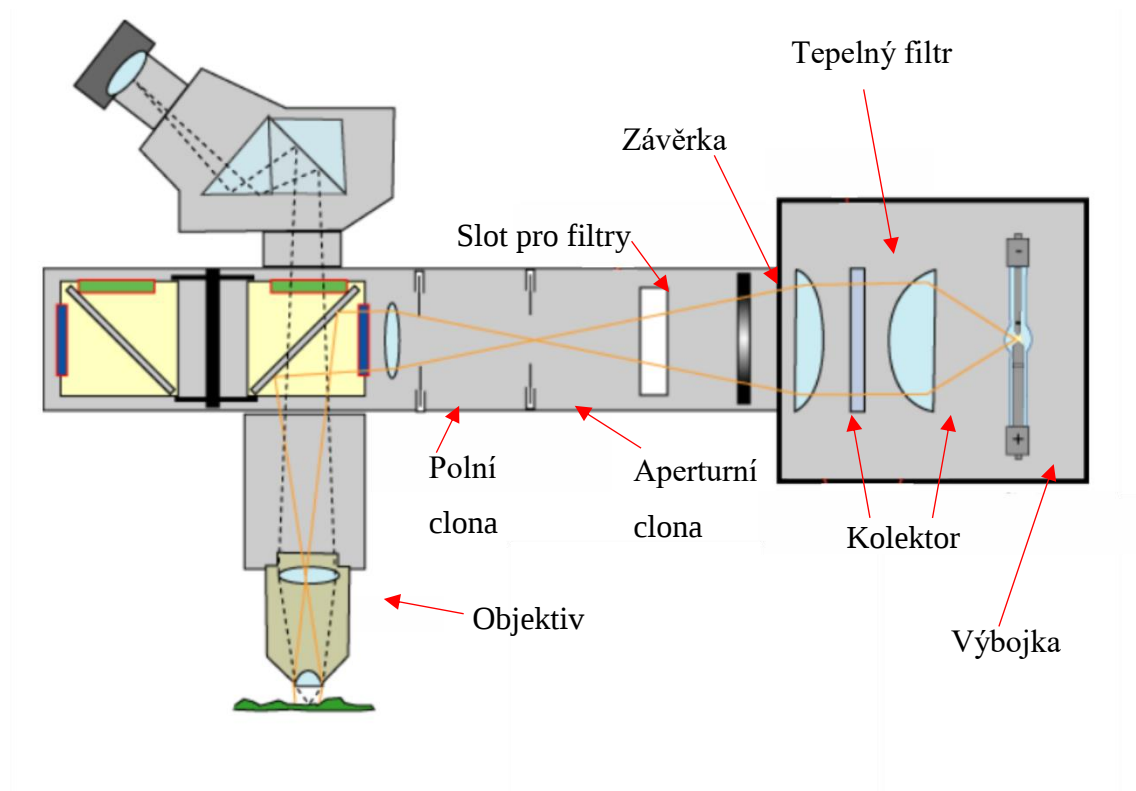
Fluorescenční mikroskopie je založena na zobrazení fluorescenční emise z molekuly fluoroforu po vybuzení excitačním světlem. Fluorofory mohou být přirozené součásti struktur (jako nukleové kyseliny, pigment, ...) nebo umělá barviva případně fluorescenční proteiny jako GFP. Základním předpokladem pro úspěšné použití fluorescenční mikroskopie je dobré oddělení excitujícího světla od fluorescenční emise, které lze odstranit použitím specifického tzv. emisního filtru před detektorem. Výsledkem jsou barevně zářící struktury v temném poli.

Jednou z hlavních výhod fluorescenční mikroskopie je její vysoká citlivost, fluoreskující molekuly jsou detekovatelné již při velmi malých koncentracích. To je umožněno vysokým kontrastem vůči pozadí. Typický fluorescenční obraz má podobu jasného (světlého) signálu na tmavém pozadí. Toho je dosaženo za pomoci dvojice filtrů pro oddělení excitačního a emisního spektra. Jedná se tedy o filtry excitační a emisní (viz Obrázek 6). Filtr excitační vymezuje rozsah vlnových délek záření, použitých pro excitaci, naopak filtr emisní vyděluje tu část spektra, jež představuje hlavně snímáný signál. Správnou kombinací těchto dvou filtrů dosahujeme minimalizace signálu pozadí a požadovaného vysokého kontrastu. S vysokou citlivostí úzce souvisí možnost použití výrazně nižších koncentrací detekčních činidel, a tedy šetrnějšího zacházení se zkoumaným vzorkem [29].

Vzhledem k existenci fotoaktivních látek v přírodě a snadné možnosti jejich genetické modifikace do živočišných buněk bez ovlivnění životaschopnosti buňky či organismu jsou metody fluorescenční mikroskopie vhodné k analýze organoidních systémů.

Jednou z nejčastěji používaných metod je analýza metodami fluorescenční mikroskopie, a to díky existenci velkého množství opticky aktivních látek přirozeně se vyskytujících uvnitř buněk, popřípadě účastnících se některého z buněčných pochodů. Kupříkladu

Walsh a kolektiv nejčastěji využívají fluorescenčních vlastností FAD a NADH, což umožňuje hodnocení metabolismu buňky a zároveň vede k účinné detekci premaligních transformací v buňce [21,22]. Při analýze lze úspěšně kombinovat světelnou i fluorescenční mikroskopii, jako například při výzkumu onemocnění cystické fibrózy, prováděném Dekkers a kolektivem [24].



Obrázek 2 - Schéma fluorescenčního mikroskopu [30]

1.2.4. Konfokální mikroskopie

Výhodou konfokální mikroskopie oproti předchozí metodě je potlačení signálu z rovin pod a nad zaostřením a s tím spojená možnost snímání optických řezů. Skládáním takových řezů pak lze pozorovaný objekt zrekonstruovat jako 3D model. Hlavní předností laseru je jeho specifická vlnová délka záření, kterou není potřeba dále filtrovat. Omezením ale je fakt, že vysoce intenzivní osvětlení vzorku přispívá k rychlejšímu vysvícení fluoroforů v místě snímání a v místě, kudy prochází paprsek k místu zaostření. Dle principu snímání rozdělujeme konfokální mikroskopii na laserovou řádkovací konfokální mikroskopii a konfokální mikroskopii s rotujícím diskem [31]. Vzhledem k možnosti rekonstrukce snímaných řezů do 3D modelů je konfokální mikroskopie jedna z vhodných technik k analýze organoidních struktur.

1.2.4.1. Laserová řádkovací konfokální mikroskopie

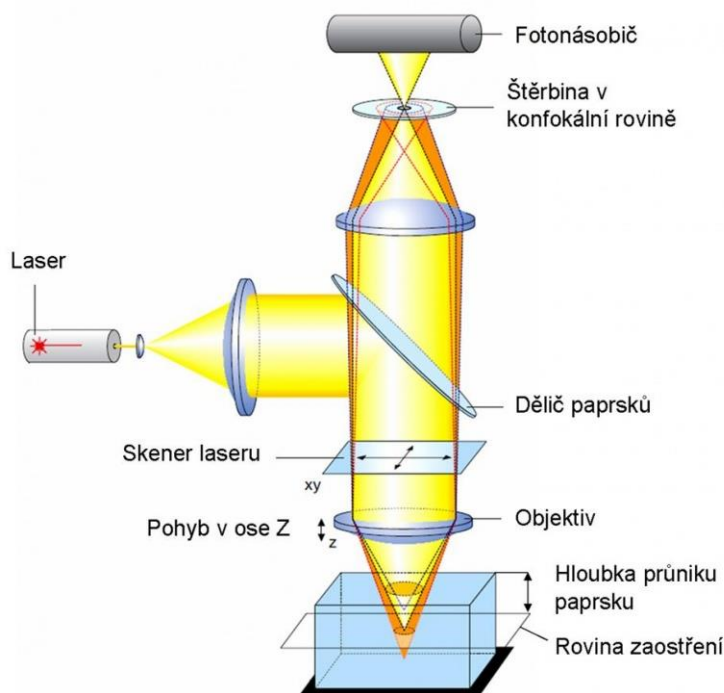
Základními komponenty laserové řádkovací konfokální mikroskopie (CLSM – Confocal laser scanning microscopy) jsou laser, dělič paprsku, skener, čočka objektivu, volič hloubky průniku paprsku a štěrbina v konfokální rovině.

Laser plní funkci zdroje záření, jeho paprsek prochází děličem paprsku, což je filtr s funkcí oddělení excitačního paprsku od emitovaného světla. Dále paprsek laseru prochází přes objektiv s velkou aperturou a je zaměřen na zkoumaný preparát (viz Obrázek 3). Obraz se při této metodě nevytváří celý najednou, ale je vytvářen bod po bodu, z důvodu skenování paprskem je vždy osvětlen pouze jeden bod. Signál odražený od preparátu prochází clonou se štěrbinou v konfokální rovině, kde dojde k odstranění mimoohniskových poloh a naskenovaný signál je snímán fotodetektorem s fotonásobičem. Výsledný obraz je pak zobrazen na monitoru. Laserový paprsek je rozkmitáván za pomoci svazku zrcadel, což umožňuje řádkování a tím vzniklý řez preparátem ve 2D rovině. Změnou hloubky průniku záření je umožněno snímání další 2D roviny. Rekonstrukcí takto vzniklých 2D řezů pak dostáváme 3D obraz zkoumaného preparátu [32].

Oproti tradiční světelné mikroskopii je zde za pomoci štěrbiny odfiltrován signál přicházející z oblastí mimo obrazovou rovinu zaostření. Pokud by takový signál odstraněn nebyl, světlo přicházející z jiných částí by se překrývalo se světlem tvořícím obraz a celý výsledný obraz by byl rozmazaný.

Nevýhodou konfokální mikroskopie je samotný zdroj světla laser. Soustředění intenzivního laserového paprsku na snímání bod je preparát dlouhodobě vystaven nepříznivým účinkům laseru. Nutnost snímání obrazu bod po bodu pak výrazně ovlivňuje časovou náročnost takové analýzy [33].

Konfokální mikroskopie je hojně používanou metodou studia organoidních struktur. Zde Devarasetty a kolektiv využili barvení organoidů za účelem zjištění jejich viability. K barvení byl použit LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (2 μ l/ml ethidium homodimer-1 a 0,5 μ l/ml kalcein acetoxymethyl) [34].



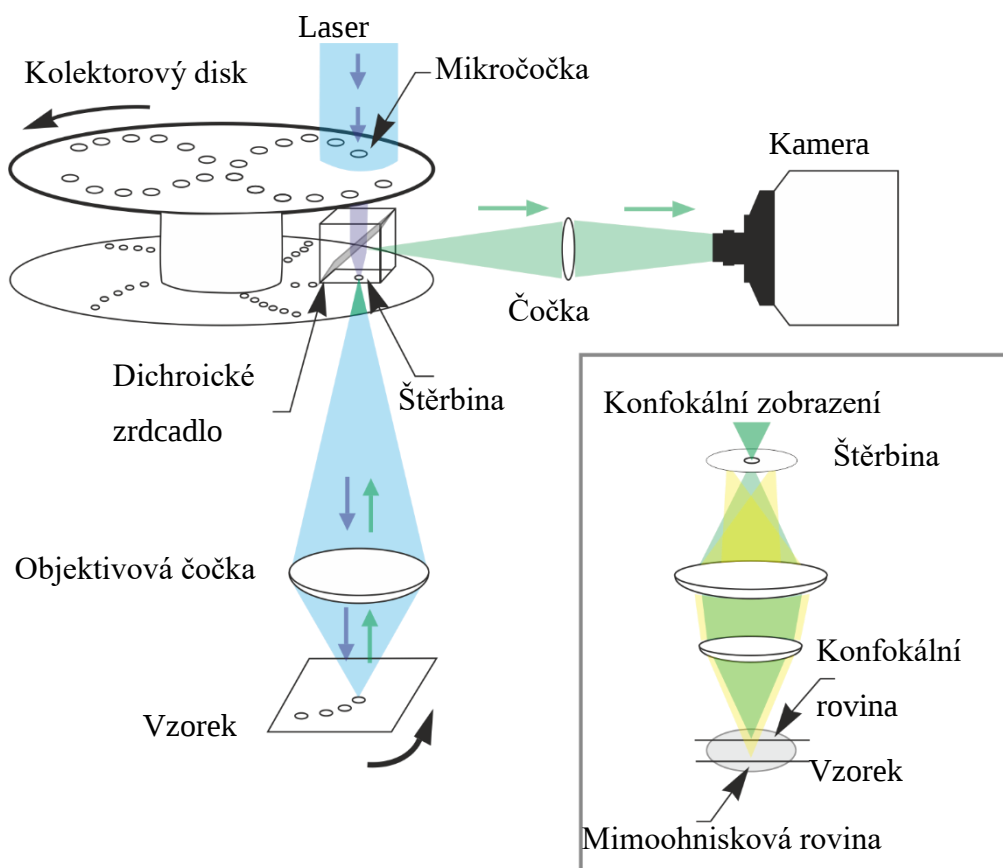
Obrázek 3- Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu [33]

1.2.4.2. Konfokální mikroskopie s rotujícím diskem

Stejně jako u CLSM, i zde je zdrojem světla laser. Rozdíl je však v dráze, kterou signál projde směrem od zdroje přes preparát až k výslednému zobrazení. U konfokální mikroskopie s rotujícím diskem (SDCLM – Spinning disc confocal laser scanning microscopy) je světlo zaměřováno na preparát přes rotující disk, na němž se nachází velké množství clonek. Díky tomuto faktu je možné snímání několika bodů najednou s tím spojené zrychlení celého procesu zobrazení. Každá mikročočka kolektorového disku má přidruženou díрку, která je bočně vyrovnána na druhém (štěrbinovém) disku a axiálně umístěna na ohniskové rovině mikročoček. Disky jsou upevněny na společné hřídeli, která je poháněna na vysokou rychlost elektrickým motorem. Dírky (a mikročočky) jsou uspořádány ve vzoru, který snímá zorné pole definované velikostí clony a zvětšením objektivem mikroskopu. Skenovací laserové paprsky pak excitují fluorescenční značení ve vzorku. Fluorescenční emise jsou nejvíce intenzivní v místě zaostření, tedy ohniskové rovině. Část tohoto světla se vrací podél excitační cesty, kde je přednostně vybrána stejnými "konfokálními" štěrbinami. Mezi oběma disky se nachází dichroické zrcadlo, které odráží záření emisní vlnové délky a odděluje laserové emise od jakéhokoli excitačního světla odraženého nebo rozptýleného z mikroskopické optiky. Geometrie

emisní cesty vede k konfokálnímu fluorescenčnímu signálu s extrémně nízkým hlukem na pozadí.

Tato metoda je vhodná pro sledování rychlých dějů v živých systémech. Nevýhodou takového systému je pak nižší rozlišovací schopnost [35].



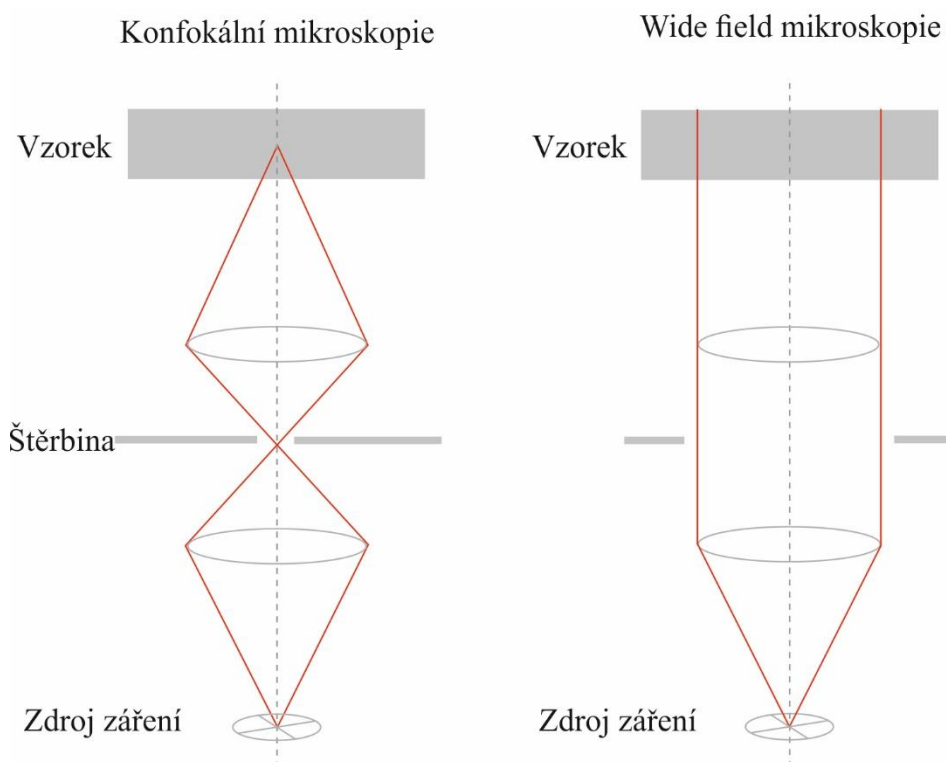
Obrázek 4 - Schéma konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem [35]

1.2.5. Wide field fluorescenční mikroskopie

Jedná se o zobrazovací techniku, při níž je celý zkoumaný vzorek osvětlen zářením o definované vlnové délce. Zde je patrný principiální rozdíl od konfokální mikroskopie, kde je excitační paprsek fokusován do definovaného bodu zkoumaného vzorku (viz Obrázek 5). Jako zdroj záření jsou nejčastěji použity halogenové či LED panely, a to s ohledem na požadovanou vlnovou délku, pro naše použití fluorescenčních technik pak LED panely [36].

Výhodou takové techniky je rychlé zobrazování obrázků s vysokým rozlišením, což lze prakticky využít např. u vzorků, vyžadujících pobyt ve stálém prostředí a dlouhodobá absence takového prostředí by na ně mohla mít destruktivní charakter. Wide field

techniky se vyznačují rychlostí skenování, tím pádem lze citlivé vzorky vyjmout z ideálního prostředí pouze na krátkou dobu, která pro ně není ohrožující.



Obrázek 5 – Schéma rozdílu principů konfokální mikroskopie a wide field mikroskopie [37]

1.3. Testování modelových protinádorových léčiv s využitím sferoidů nádorových buněk

I přes určité komplikace se sferoidy v současné době jeví být slibným modelem pro studium různých aspektů rakoviny a testování reakce nově vyvíjených preparátů na tyto typy rakovinného bujení. Na jedné straně se klade důraz na optimalizaci přípravy stabilně reprodukovatelných stabilních sferoidů a organoidů z tumorů různých orgánů, nebo konstrukce komplexních multi-orgánových systémů [6,38-40]. Na straně druhé se vývoj ubírá směrem optimalizace analytických a detekčních metod směrem ke komplexní, multidimenzionální fenotypizaci zkoumaných objektů (tzv. High-content Screening, HCT), minimalizovat nežádoucích vlivů měření a tím možností sledování živých 3D objektů v čase (4D), miniaturizaci a automatizaci [41].

Přínosná byla implementace organoidních kultur do velkoformátových mikrotitračních destiček (96, 384 nebo 1536 jamek), která posunula využití tohoto systému směrem k vysoce propustnému screeningu (HTS) léčiv.

Nově se také testují koncepty integrace mikrofluidních technologií, tzv. orgány-na-čipu. Jejich výhodou je precizní kontrola lokálního prostředí, možnosti dynamické stimulace buněk a vytvoření fyziologicky relevantního mikroprostředí [42].

2. MATERIÁLY, METODY A PŘÍSTROJOVÁ ZÁKLADNA

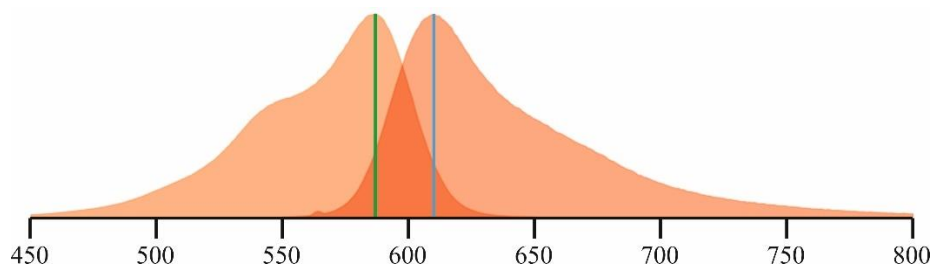
2.1. Zobrazování optických markerů fluorescence

Organoidní struktury kultivované v 384 jamkové MTP byly zobrazovány s využitím makroskopického fluorescenčního zobrazovacího systému na bázi zařízení FluorCam, které využívá 12 nebo 16 mm objektiv umožňující zobrazování celé MTP v jednom snímku. Výhodou této metody je rychlosti snímání a nedestruktivní charakter měření pro buněčné struktury.

Mezi další běžně využívané systémy, sloužící pro zobrazování optických markerů, patří ImageXpress Micro Automated Imaging System firmy Molecular Devices, využívaný na BFÚ AV ČR. Tento systém je vybaven laserovým automatickým zaostřováním, objektivu Nikon s 1 až 100násobným zvětšením a automatickým čtyřpolohovým měničem objektivů. Součástí tohoto systému je také pětipolohový měnič filtrů pro specifická fluorescenční a histochemická barviva a plně automatickým X-Y stolcem na vzorek schopným změny hloubky průniku záření s krokem 100 nm. K analýze pak tento systém používá software MetaXpress 5.1 [43,44].

2.2. Metodika přípravy vzorků

Jako vhodný experimentální model byly vybrány buněčné linie rakoviny tlustého střeva DLD-1 (DLD-1 wt) [45] a odvozený klon s delecí genu BRCA2 (DLD-1 BRCA2 -/-). Oba klony byly virovou transfekcí stabilně transfekovány plazmidem konstitutivně exprimujícím protein mCherry (rLV.EF1.mCherry-9, TaKaRa). Excitační maximum tohoto proteinu je na vlnové délce 587 nm, emisní maximum leží na hodnotě 610 nm (viz Obrázek 6).



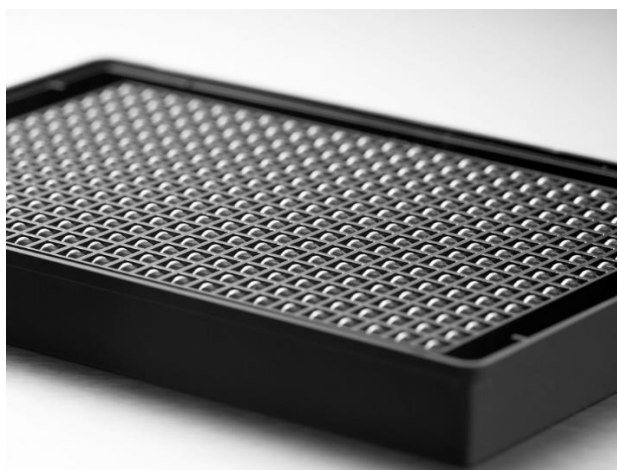
Obrázek 6 - Excitační a emisní spektra proteinu *mCherry* s vyznačeným excitačním (zelená čára) a emisním (modrá čára) maximem [46]

Destičky byly připravovány Mgr. Terezou Suchánkovou Ph.D. na Biofyzikálním ústavu AV ČR.

Při kultivaci těchto buněk je třeba se striktně držet předepsaného protokolu, sestávající z několika postupných bodů dle dodavatele [47]:

- 1) Odstranění a likvidace obsaženého růstového média.
- 2) Šetrný proplach buněčných vrstev s využitím roztoku Trypsinu-0,53mM EDTA (0,25 hmotnostních procent) odstranění všech stop séra, obsahujícího inhibitor trypsinu.
- 3) Přidání 2,0 až 3,0 ml Trypsin-EDTA roztoku do baňky a sledování buněk pod invertovaným mikroskopem až do rozptýlu buněk. Obvyklý čas tohoto procesu se pohybuje mezi 5 a 15 minutami. Pro eliminaci shlukování buněk je doporučeno minimalizovat nárazy či otřesy baňky. Pro usnadnění rozptýlu je vhodné buňky umístit do prostředí o teplotě 37°C.
- 4) Přidání 6,0 až 8,0 ml kompletního růstového média a odsátí buněk jemným pipetováním.
- 5) Přidání vhodných alikvot buněčné suspenze do nových kultivačních nádob-
- 6) Inkubace buněčných kultur prostředí o teplotě 37°C.

Takto připravené buňky byly nasazeny do mikrotitrační destičky Corning 3830 o 384 jamkách po 24 sloupcích a 16 řadách jamek (viz Obrázek 7).



Obrázek 7 – Pohled na spodní část MTP destičky Corning 3830 [48]

Každá jamka je tvořena černým tělem jamky a transparentním dnem konického tvaru, destička je opatřena transparentním víkem zabráňujícím kontaminaci a odparu. Kombinace transparentního dna a víka umožňuje fluorescenční (iluminace a zobrazení ze stejné strany) a RGB (reflektanční i transmisní měření) snímání. Víko a mikrotitrační destička na sebe naléhají, buňky v jamkách však nejsou víkem hermeticky uzavřeny, pro růst buněk je důležitá stálá atmosféra 5 % CO₂, 37 °C.

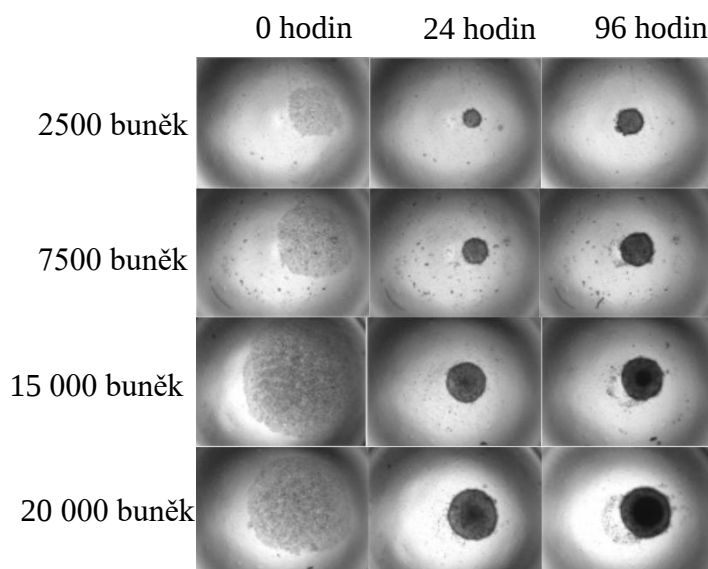
Destička byla rozdělena na 2 stejné oddíly, každý o 12 sloupcích a 16 řádách. Do takto připravené destičky byly nasazeny buňky dle diluční řady (viz Tabulka 1) s 40 µl živního média. Pro každou ze 4 koncentrací z každé buněčné linie bylo tedy k dispozici 48 replikátů. Po takovém postupu byla destička odstředěna na laboratorní centrifuze (200g RT, 10 min). Takto připravené destičky jsou vhodné pro testování funkčnosti systému a jeho zobrazovacích a analyzačních schopností.

Tabulka 1 – Počty buněk nasazených do mikrotitrační destičky pro obě buněčné linie.

	DLD-1 wt			DLD-1 BRCA 2/-		
řádek/sloupec	1	...	12	13	...	24
1	5000	...	5000	16000	...	16000
2	5000	...	5000	16000	...	16000
3	5000	...	5000	16000	...	16000
4	5000	...	5000	16000	...	16000
5	2500	...	2500	7500	...	7500
6	2500	...	2500	7500	...	7500

7	2500	...	2500	7500	...	7500
8	2500	...	2500	7500	...	7500
9	1000	...	1000	2500	...	2500
10	1000	...	1000	2500	...	2500
11	1000	...	1000	2500	...	2500
12	1000	...	1000	2500	...	2500
13	500	...	500	1000	...	1000
14	500	...	500	1000	...	1000
15	500	...	500	1000	...	1000
16	500	...	500	1000	...	1000

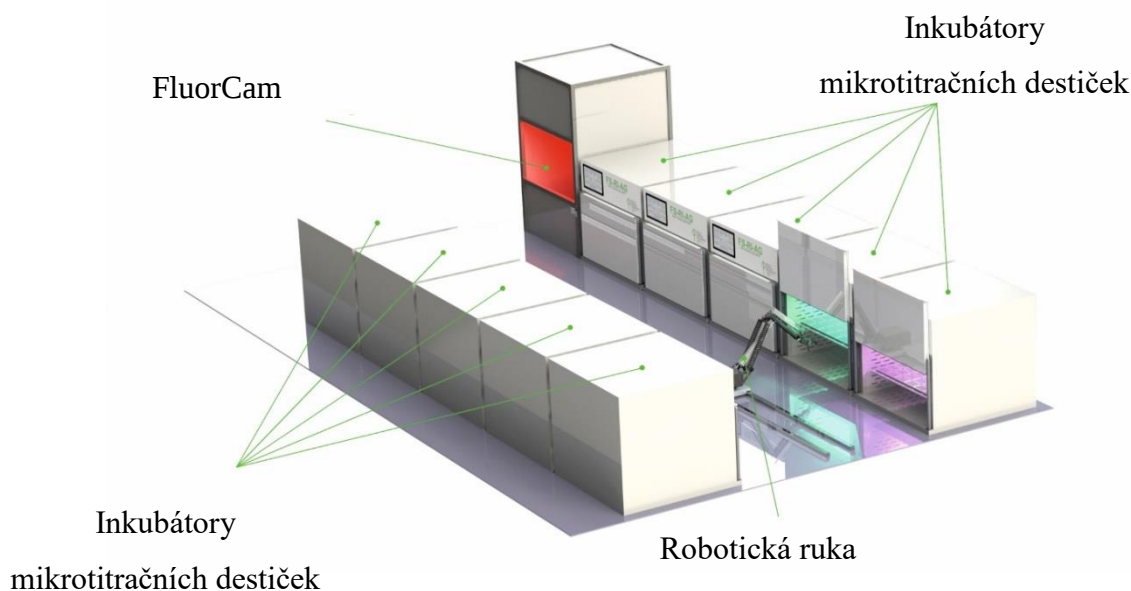
Po inokulaci byly mikrotitrační destičky přemístěny do růstové banky, kde je udržována stálá atmosféra, nutná pro správný růst a přežití vznikajících organoidních struktur. Pro každou koncentraci jsme tedy v ideálním případě po 3denní kultivaci získali 48 organoidních struktur. Samotný průběh růstu těchto struktur (viz Obrázek 8) byl kontrolován za pomoci konfokálního mikroskopu ImageXpress Micro Automated Imaging System od firmy Molecular Devices s využitím softwaru MetaXpress 5.1 pro analýzu viability na základě přítomnosti *mCherry* fluorescenčního signálu. 3 dny po této kultivaci je možné takto připravené destičky testovat na navržené konfiguraci přístroje.



Obrázek 8 – Snímek světelného mikroskopu zachycující formování a růst organoidních struktur v závislosti na počtu počáteční koncentraci buněk. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

2.3. Návrh automatizovaného systému

V současné době vyvíjený systém s komerčním názvem AlgaeScreen (viz Obrázek 9) reprezentuje robotizovanou platformu navrženou pro automatizované experimenty spojující kultivace v mikrotitračních destičkách (MTP) s rgb nebo fluorescenční analýzou. Komplexní řešení bude zahrnovat různé moduly pro kultivaci suspenzních vzorků řas, přípravu vzorků v MTP a neinvazivní měření založené na digitální analýze obrazu. Důraz je kladen na kapacitu systému, a to zejména zavedením automatizace a miniaturizace. Pro účely vysoce propustného systému je pak pro potřeby této práce kladen důraz hlavně na optimalizace optické metody.



Obrázek 9 – Schéma navrhovaného přístroje

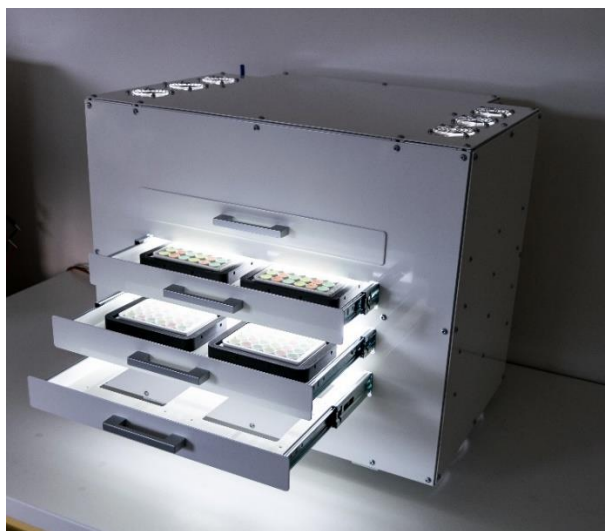
Systém Algaescreen je primárně určen pro analýzu suspenzních vzorků, kde obrazová analýza je myšlena jako analýza průměrného signálu z každé z jamek MTP. Navrhovaný systém je uzpůsoben pro analýzu signálu, ale i morfologie organoidů umístěných v jednotlivých jamkách MTP.

Základními součástmi prototypu systému AlgaeScreen jsou robotická ruka, inkubátor mikrotitračních destiček a modul makroskopického zobrazovacího systému FluorCam, vycházející ze stejnojmenného zařízení firmy Photon Systems Instruments s.r.o. Pro účely širšího využití lze tento systém doplnit například o modul automatické pipety a RGB, hyperspektrální kameru, dále pak o další inkubátory mikrotitračních destiček a systémů FluorCam. Pro analýzu organoidů byl implementován jeden fluorescenční modul.

2.3.1. Inkubátor mikrotitračních destiček

Pro správný růst organoidních struktur je kritickým parametrem udržení stálé a předem definované atmosféry. Pro účely vysoce propustného systému, sloužícímu k analýze organoidních struktur, byl testován a použit prototyp inkubátoru mikrotitračních destiček od firmy Photon Systems Instruments (viz Obrázek 10).

Toto zařízení je schopno kultivovat na požadované teplotě při udržení stálé vlhkosti a nastavené atmosféry. Součástí inkubátoru je regulovatelné LED osvětlení, které je regulovatelné u každé z polic odděleně. Díky možnosti nastavení všech těchto parametrů je zařízení využitelné v široké škále vědních oborů. Nastavení inkubátoru je možno provádět pomocí specializovaného softwaru, případně přes připojenou kontrolní jednotku. Díky možnosti propojení na počítač lze ve specializovaném softwaru monitorovat vnitřní podmínky a funkčnost celého inkubátoru.



Obrázek 10 – Prototyp inkubátoru mikrotitračních destiček

2.3.2. Zobrazovací techniky

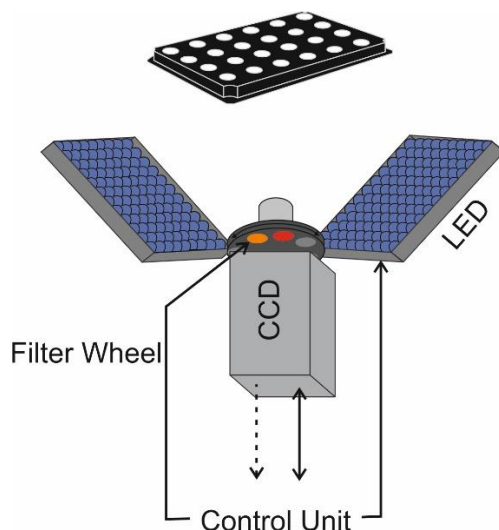
Jednotkou zajišťující obrazovou akvizici v systému AlgaeScreen je modul FluorCam firmy Photon Systems Instrument spol, s r.o. (viz Obrázek 11). FluorCam je makroskopický zobrazovací systém, pracující na principu fluorescence. Standardní verze přístroje FluorCam obsahuje několik synchronizovaných zdrojů osvětlení, citlivou CCD kameru a speciálně navrženou filtrační soustavu pro spektrální separaci detekovaných emisních záření. Verze systému tzv. Close FluorCam (uzavřená verze) je opticky izolovaný přístroj, který je vhodný hlavně pro měření statických fluorescenčních

signálů, u kterých by interference okolního záření znemožnila detekci fluorescence. Jako takový je tedy ideální volbou pro obrazovou akvizici MTP fluorescenčními metodami, tedy i jako součást vysoce propustného systému pro analýzu organoidních struktur.



Obrázek 11 - Modul FluorCam snímající MTP v prototypu systému AlgaeScreen

Pro pilotní testy byla použita verze přístroje Closed FluorCam obsahující CCD kameru typu TOMI-1 s rozlišením 720×560 pixelů s 12bitovým A/D převodníkem. Kamera je schopna snímat záření vlnových délek 400–1000 nm. Tento používaný typ kamery se vyznačuje vysokou senzitivitou a je schopna pracovat při vysokých teplotách až do 50 °C a vlhkosti vzduchu až 95 %, což je vzhledem k podmínkám, nutným pro kultivaci buněk, jeden z důležitých parametrů. CCD kamera snímá celou MTP jako celek (viz Obrázek 12), narozdíl od konvenčně používaných systému, kde jsou jednotlivé jamky skenovány postupně. Tento postup výrazně urychluje časovou náročnost akvizice obrazových dat, pohybujících se v hodnotách desítek minut na jednu MTP. [49]



Obrázek 12 - Schéma, znázorňující invertovaný systém měření MTP v navrhovaném systému

2.3.3. Robotické rameno

Pro manipulaci se vzorkem je v systému AlgaeScreen určeno robotické rameno Omron TM12 (viz Obrázek 13).



Obrázek 13 - Robotická ruka Omron TM12, zajišťující manipulaci se vzorkem v systému AlgaeScreen [50]

Toto robotické rameno je vhodným prostředkem pro automatizovanou manipulaci se vzorkem, díky velkému množství kloubů je dobře programovatelné a citlivé na pohyb v osách X, Y i Z. Potřebná modifikace této součásti platformy AlgaeScreen spočívala v instalaci citlivé ruky, nutné pro šetrnou manipulaci s MTP.

2.4. Modifikace stávající platformy Algaescreen

Optimalizace stávající platformy AlgaeScreen pro potřeby vysoce propustného screeningu organoidů byla provedena v několika krocích: (1) byla nahrazena použitá

kamera modulu FluorCam za kameru s vyšším rozlišením, (2) optimalizováním excitačních světelných LED panelů do optima použitého fluoroforu, (3) zařazením automatické kultivace do procesu analýzy a (4) implementace funkcí automatické analýzy organoidních struktur do stávající verze databázového softwaru PlantScreen™.

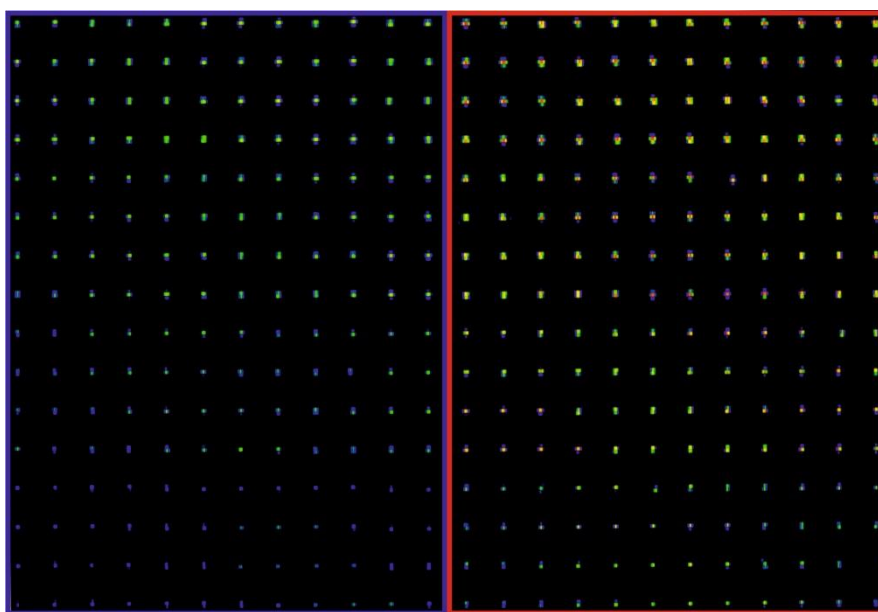
- (1) CCD s vyšším rozlišením: Pro zobrazovací modul FluorCam byl nutný přechod na vyšší řadu CCD kamer TOMI-2. Tato kamera se oproti kameře typu TOMI-1 vyznačuje vyšším rozlišením 1360×1024 pixelů a A/D převodníkem s 16bitovou hloubkou. Ostatní důležité parametry jsou shodné s již využívanou kamerou TOMI-1. Vyšší rozlišení kamery zvýšila počet pixelů na zobrazovaný objekt organoidu čtyřnásobně, čímž umožnilo i přesnější analýzu morfologie organoidů v MTP. Do slotu kamery pro filtry pak byl umístěn emisní filtr propouštějící vlnové délky hodnot 600–650 nm, což je v souladu s emisním spektrem proteinu *mCherry* (viz Obrázek 6).
- (2) Optimalizace excitačního světla: standardní verze FluorCamu využívá LED světelné panely s maximum vlnové délky 440 nm nebo 620 nm. Byla tedy nutná modifikace zabudovaných světelných LED panelů na vlnové délky blízké excitačnímu maximu proteinu *mCherry* (viz Obrázek 6). Dle excitačního spektra *mCherry* byla realizována modifikace na LED 530 nm, která je použitelná i pro organoidy modifikované YFP (Yellow Fluorescence Protein).
- (3) Automatická kultivace: Do výsledného řešení vysokopropustného zařízení pro analýzu organoidů byl zařazen automatický inkubátor MTP. Důvodem je eliminace případného mechanického poškození organoidů při manuálním přenosu z externího kultivačního zařízení nebo transportu. Výsledkem takové manipulace by mohlo být ovlivnění tvaru růstových křivek, jež jsou jedním z hlavních vyhodnocovacích faktorů pro analýzu organoidů. Manipulace MTP je řešena pomocí automatického robotického ramene.
- (4) Implementace softwarových analýz: Současné softwarové prostředí PlantScreen™ umožňuje ovládání platformy PlantScreen™, což je automatizované zařízení sloužící k fenotypizaci rostlin. Tento databázový software bude v budoucnu upraven na míru pro potřeby systému AlgaeScreen a naším úkolem bylo otestování a zavedení dalších funkcí na automatizovanou analýzu organoidů.

Prostředí PlantScreen™ sestává ze tří podřazených a kooperujících částí PlantScreen™Server, PlantScreen™Database, odpovídající za komunikaci celého systému s příslušnou SQL databází a PS Data Analyser, umožňující automatickou analýzu. Díky propojení se serverem lze kontrolovat funkčnost systému a kontrolovat výsledky obrazové analýzy. Jedná se o obsáhlý softwarový balíček ovládající veškeré mechanické části i obrazovou akvizici, poskytuje možnost poloautomatické obrazové analýzy a práci s databází. Zajišťuje automatické ovládání pohybu snímaných táců či květináčů a aktivaci jednotlivých modulů akvizice obrazu v závislosti na přednastaveném protokolu. Spolu s využitím přednastavených masek a vypočítaných prahů se jedná o ideální základní kámen zamýšleného automatického analyzátoru.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Ověření funkcionality zobrazovací soustavy

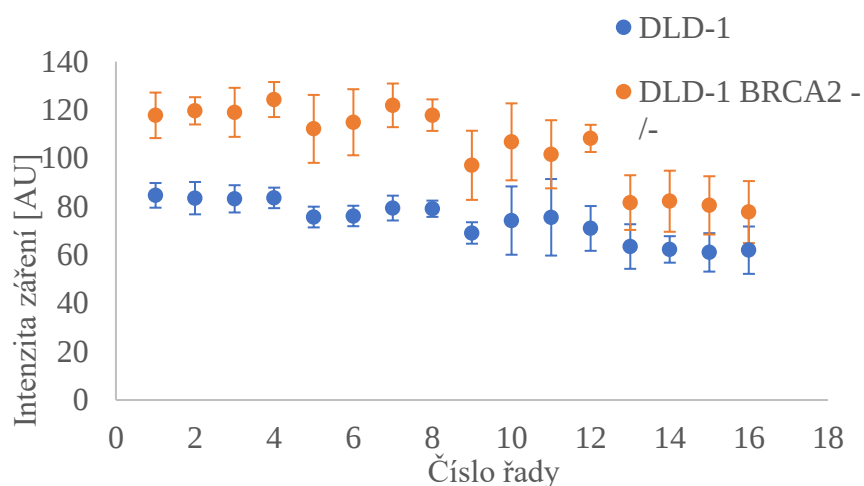
Pro ověření funkčnosti navrhovaného systému byly použity MTP, jejichž kultivace je popsána v předchozí kapitole. MTP byly měřeny v upravené verzi Closed FluorCam, obsahující kameru TOMI-1 a různé excitační LED panely 440 nm, 470 nm a 620nm v kombinaci s emisním filtrem 600-650 nm a 680-750 nm. Jako ideální kombinaci excitačního světla a emisního filtru jsme identifikovali LED 470 nm a emisní okno 600-650 nm, kde byl nejsilnější a nejkontrastnější signál (viz Obrázek 14).



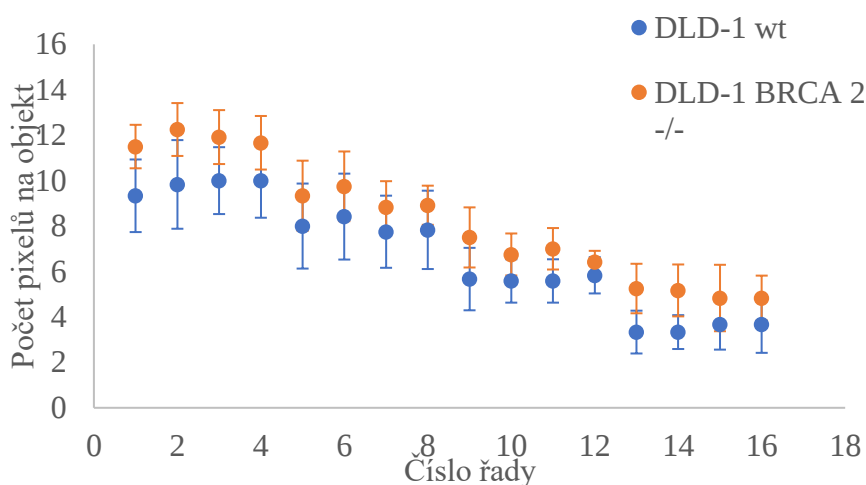
Obrázek 14 – Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-1, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 -/- (červený obdélník)

Fluorescenční snímky byly analyzovány pomocí softwarů FluorCam7 a Matlab. Manuálně byla vytvořena maska pro 384 jamkovou MTP a po její aplikaci došlo k odstranění pozadí prahováním a analyzovaný obraz obsahoval pouze příslušný fluorescenční signál ze svítících organoidů (viz Obrázek 14). Vzniklý obraz byl dále analyzován, pro jednotlivé objekty byly spočítány pixely a průměrná intenzita fluorescence přes plochu organoidu pro každou z 384 pozic. V sumárních grafech (viz Graf 1, Graf 2) jsou zprůměrované hodnoty pro každou z koncentrací (různé koncentrace buněk ve sferoidu) ve 12 sloupcích (technický replikát) kontrolního vzorku (wild type) a

stejným postupem i pro skupinu bez tumor supresorového genu BRCA 2. Pro každou z hodnot byla vypočítána směrodatná odchylka a výsledné hodnoty byly vyneseny do grafů.



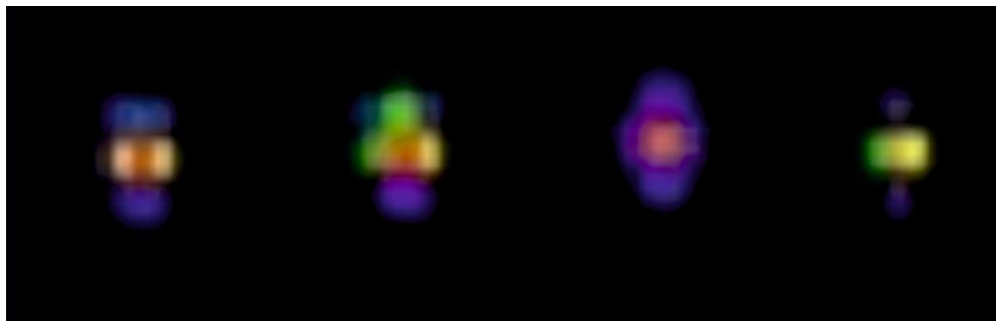
Graf 1 - Grafické vyjádření průměrné intenzity snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na kameře typu TOMI-1



Graf 2 - Grafické vyjádření průměrného počtu pixelů na objekt snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na kameře typu TOMI-1

Analýza za pomoci CCD kamery TOMI-1 však nedosahovala uspokojivých výsledků. Rozlišení kamery je příliš nízké, aby bylo schopno dobře reflektovat jemné změny mezi intenzitami a velikostmi jednotlivých kontrolních skupin, nelze také jednoznačně určit morfologické parametry (viz Obrázek 15), důležité pro stanovení viability. Z tohoto

důvodu jsem byl nucen systém upravit instalací kamery s vyšším typovým označením TOMI-2.

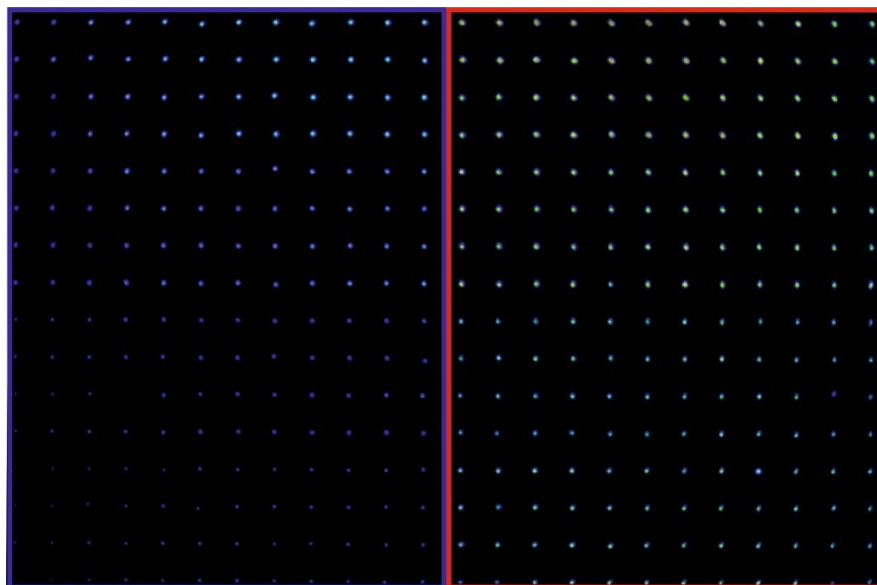


Obrázek 15 - Organoidní struktury, snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-1. Jednotlivým organoidním strukturám odpovídá jen několik pixelů

3.2. Optimalizace systému

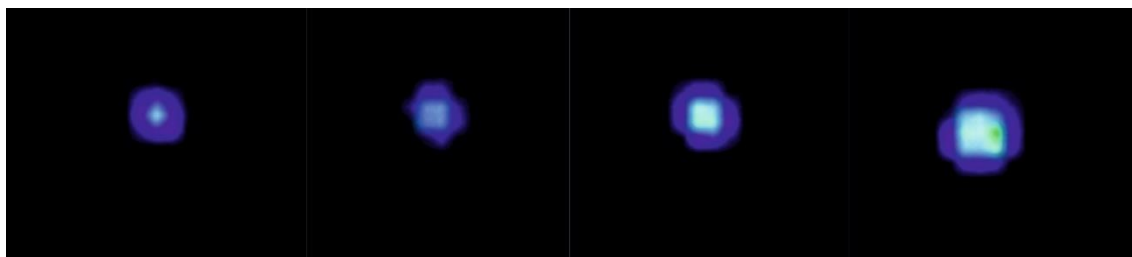
3.2.1. Skenování s pomocí vyšší řady CCD kamer TOMI-2

Vyšší řada kamer s typovým označením TOMI-2 se oproti původně použité kameře TOMI-1 (s rozlišením 720×560 px) vyznačuje vyšším rozlišením (1360×1024 px) a A/D převodníkem s 16bitovou hloubkou. Tato skutečnost nám umožňuje detailnější sledování malých objektů, mezi něž patří zkoumané organoidní struktury, což lze pozorovat na fluorescenčním obrázku (viz Obrázek 16). S tímto faktem se nám samozřejmě dostává možnosti mnohem přesnějších analýz založených na intenzitě signálu a ploše, kterou každá jednotlivá organoidní struktura zabírá.



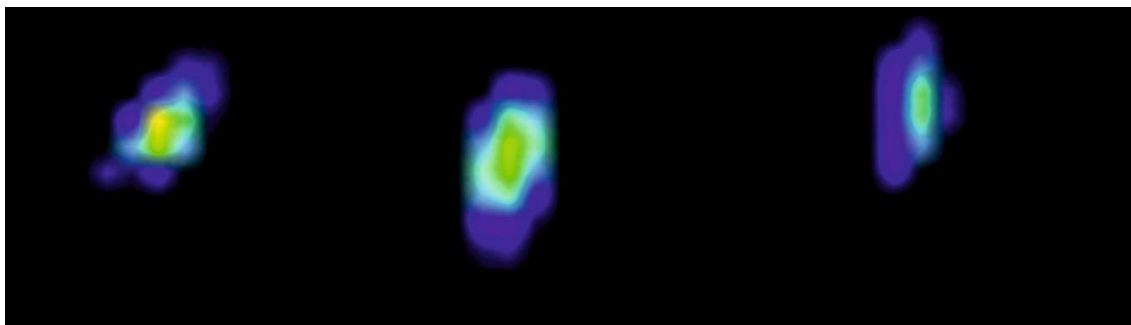
Obrázek 16 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 $-/-$ (červený obdélník)

Další výhodou tohoto typu kamery je také možnost přesnějších tvarových analýz organoidních struktur, které jsou dalším důležitým parametrem, jež je nutné vyhodnotit pro stanovení viability. Organoidní struktury by měly být, s danou tolerancí, sférické objekty (viz Obrázek 17).



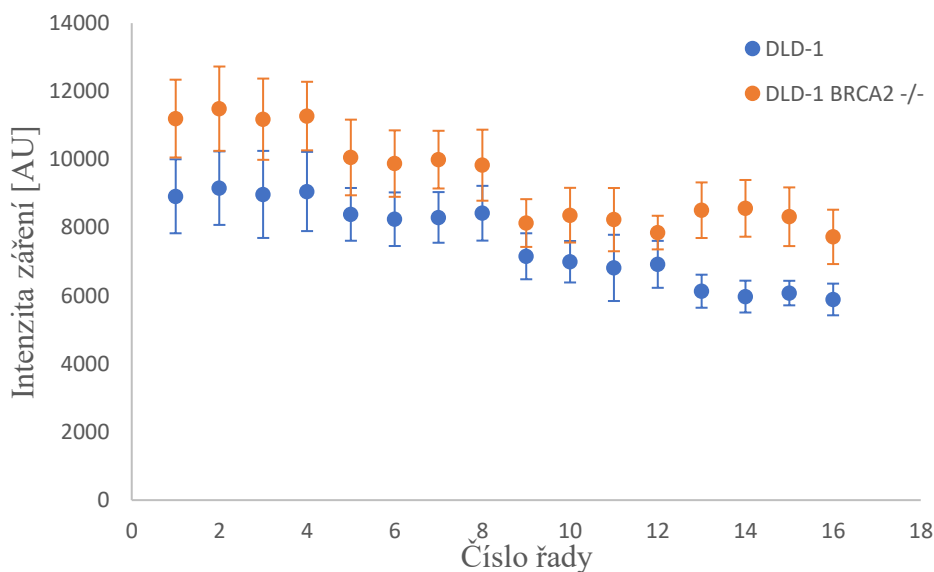
Obrázek 17 - Sfěrické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2

Jakékoliv větší odchylky od sférického tvaru jsou hodnoceny jako nežádoucí (viz Obrázek 18), proto je jedním z nutných parametrů analýzy organoidních struktur jejich sféricita.

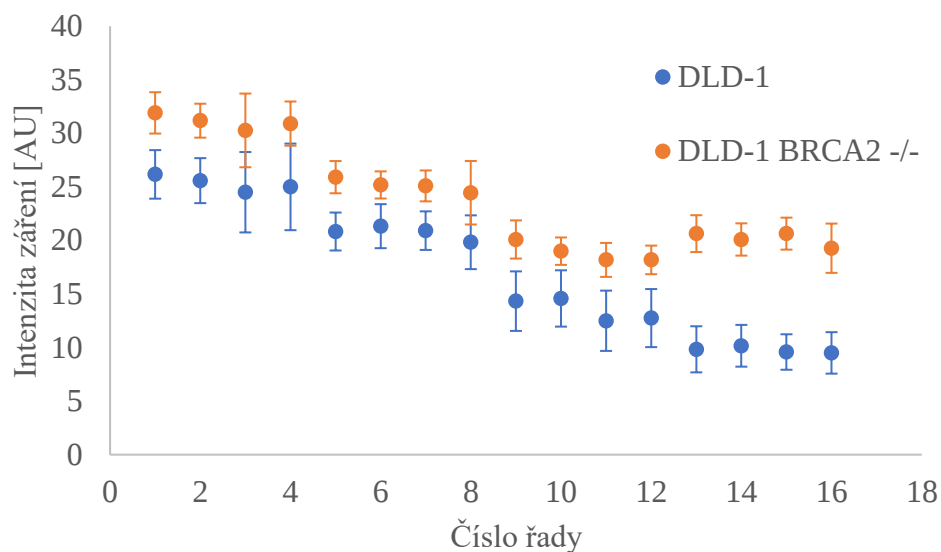


Obrázek 18 - Asférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím kamery typu TOMI-2

Stejně, jako u analýzy kamerou typu TOMI-1, byly za pomoci softwarů FluorCam7 a Matlab zanalyzovány nasnímané obrazy zprůměrováním počtu pixelů a intenzit fluorescence přes plochu organoidních struktur. Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafů (viz Graf 3, Graf 4). Z nich je patrná zlepšená schopnost detekce hranic organoidních struktur a z toho plynoucí vypočítaná intenzita přes plochu organoidu.



Graf 3 - Grafické vyjádření průměrné intenzity snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na kameře typu TOMI-2

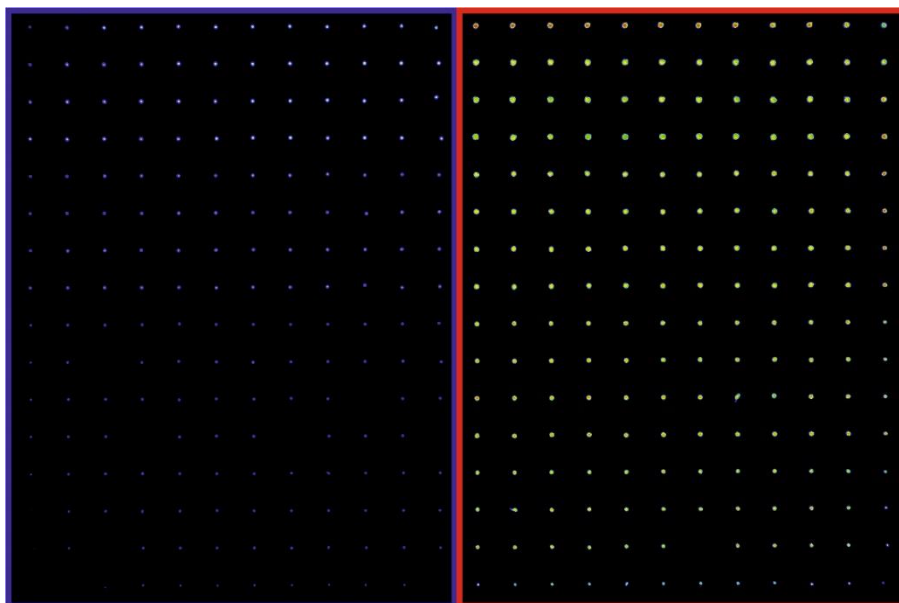


Graf 4 - Grafické vyjádření průměrného počtu pixelů na objekt snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na kameře typu TOMI-2

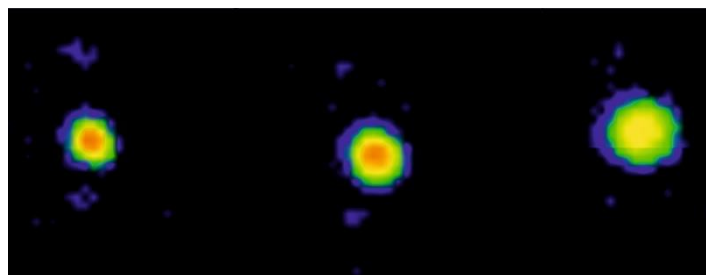
Pro možnosti přesnější morfologické analýzy a zpřesnění měření velikosti organoidů jsem ve skenovacím systému nahradil kameru typu TOMI-2 za experimentální kameru s rozlišením 12 Mpx.

3.2.2. Skenování s pomocí experimentální 12 Mpx CCD kamery

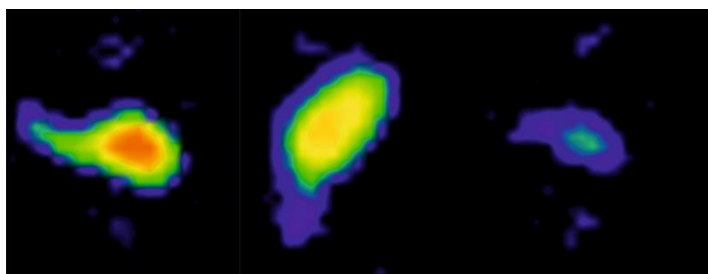
Nejlepších výsledků jsem dosáhl při použití experimentální kamery s rozlišením 12 Mpx (4112×3006 px). Díky svému vysokému rozlišení je ideálním nástrojem pro skenování organoidních struktur (viz Obrázek 19) a využití těchto scanů k následné obrazové analýze. Je schopna detailního snímání jemných struktur organoidů s důrazem na jejich morfologické vlastnosti, což nám umožňuje přesnou detekci jejich hranic.



Obrázek 19 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery s rozlišením 12 Mpx, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami v kontrolní skupině DLD-1 (modrý obdélník) a skupině DLD-1 s odstraněným tumor supresorovým genem BRCA2 -/- (červený obdélník)



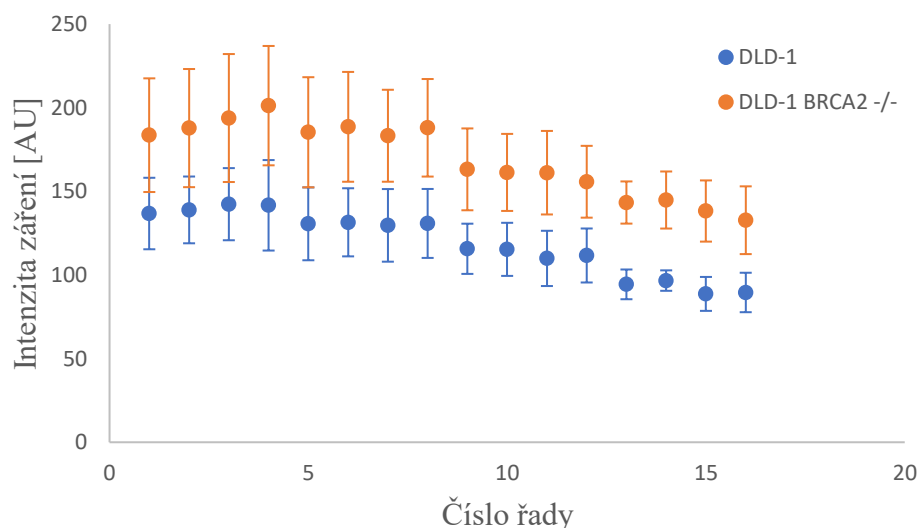
Obrázek 20 - Sfěrické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím experimentální kamery s rozlišením 12 Mpx



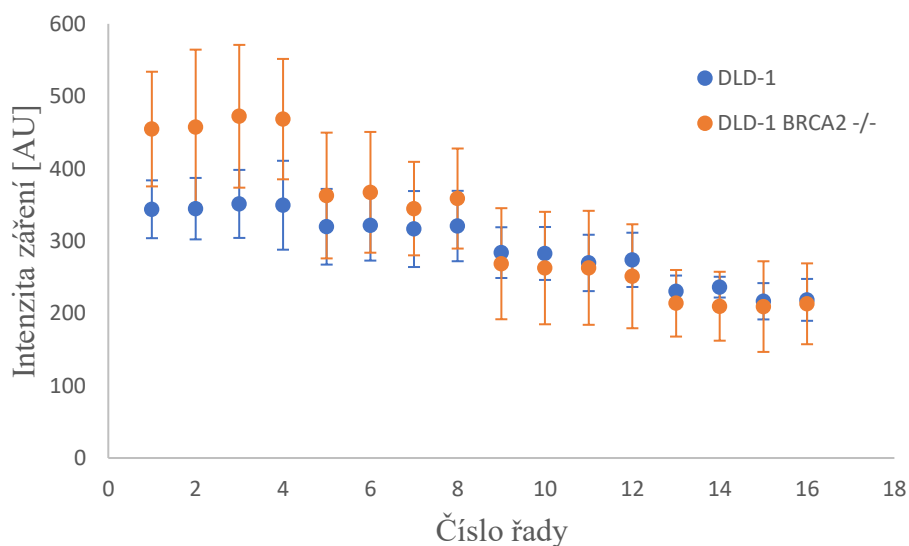
Obrázek 21 - Asférické organoidní struktury snímané přístrojem FluorCam s použitím experimentální kamery s rozlišením 12 Mpx

S experimentální kamerou jsem dosáhl nejlepších výsledků v porovnání s předchozími kamerami typu TOMI-1 a TOMI-2. Oproti předchozí použité kameře je mnohem

markantnější rozdíl v počtech pixelů a spočítaných intenzitách přes plochu mezi oběma buněčnými kmeny na testovací destičce (viz Graf 5, Graf 6). Dále pak je výrazně lépe pozorovatelná morfologie organoidních struktur (viz Obrázek 20, Obrázek 21) a s tím spojená zlepšená možnost snadně a správně analyzovat tyto objekty.



Graf 5 - Grafické vyjádření průměrné intenzity snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na experimentální kameře s rozlišením 12Mpx



Graf 6 - Grafické vyjádření průměrného počtu pixelů na objekt snímaného signálu v závislosti na diluční řadě u kontrolního vzorku DLD-1 wt a geneticky upravené skupiny DLD-1 BRCA2 -/-, měřené na experimentální kameře s rozlišením 12Mpx

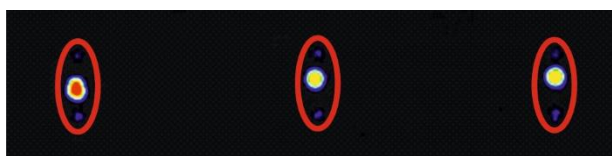
Komerčně využívaný systém ImageXpress Micro Automated Imaging System se vyznačuje CMOS kamerou o rozlišení 4,7 Mpx a prostorem pro uložení 5 filtrů, oproti tomu mnou navržený systém sestává z 12 Mpx kamery a otočným zásobníkem pro uložení filtrů až pro 7 filtrů. Tato sestava tak umožňuje využití k širšímu spektru měření bez nutnosti úpravy skenovacího aparátu, jako například obměny filtrů a zároveň je vhodný pro rychlý screening MTP.

3.3. Limitace makroskopického zobrazování

Při konstrukci a testování analyzačního systému jsem narazil na limitační prvky, které velkou měrou znemožňovaly úspěšnou detekci organoidních struktur a tím pádem i funkčnost celého systému. Jednou z těchto limitací jsou artefakty na snímcích projevující se jako párové objekty po stranách každé z organoidních struktur, druhou zásadní limitací pak byl vznik jedné z objektivových vad, tzv. vinětace. Obě tyto omezení se mi povedlo úspěšně odstranit, čímž byla umožněna funkčnost systému.

3.3.1. Crosstalk

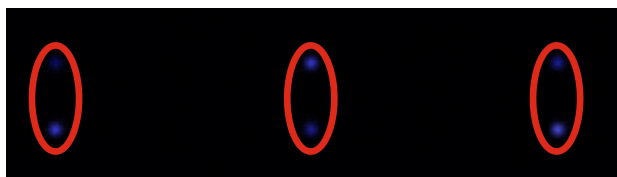
Při analýze organoidních struktur experimentální kamerou s rozlišením 12Mpx pravidelně docházelo ke vzniku falešně pozitivních oblastí ve všech jamkách MTP (viz Obrázek 22). Tento jev zavádí do analýzy zásadní problém, uměle je jím totiž navyšován počet pixelů organoidních struktur a jejich intenzita, která je počítána jako průměr z jednotlivých pixelů.



Obrázek 22 - Artefakty, výrazným způsobem ovlivňující analýzu organoidních struktur

Při bližším pohledu je patrná stálost intenzity těchto artefaktů v obraze, z čehož lze předpokládat hardwarovou příčinu tohoto problému. Pro ověření vzniku těchto jevů bylo nutné slícovat obraz prázdné destičky a destičky s organoidními strukturami. Ve slícovaném obraze je patrná shodná poloha artefaktů v měřené destičce s organoidními strukturami a v měřené prázdné destičce. Lze tedy tvrdit, že vznikající artefakty nejsou vázány na organoidní struktury. Z výsledku scanu (viz Obrázek 23) je zřetelně

pozorovatelná symetričnost v ose x dle středu jamky a orientace těchto artefaktů v ose y směrem k objektivu.

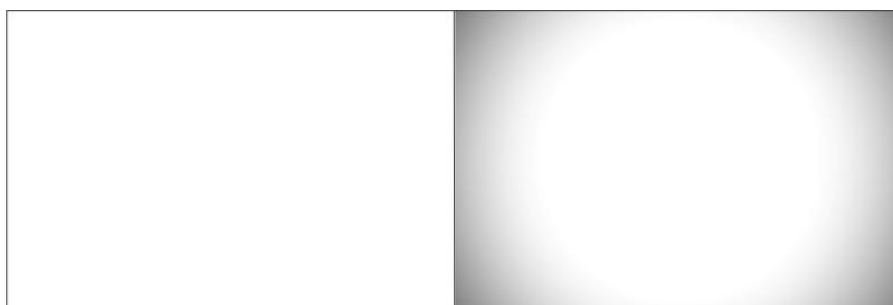


Obrázek 23 - Obrazové artefakty, vzniklé odrazem LED panelů od den jamek MTP

Díky těmto zjištěním jsem byl schopen určit, že tyto artefakty vznikají odrazem páru LED panelů od den MTP, na základě čehož bylo možné navrhnout efektivní postup eliminace těchto artefaktů.

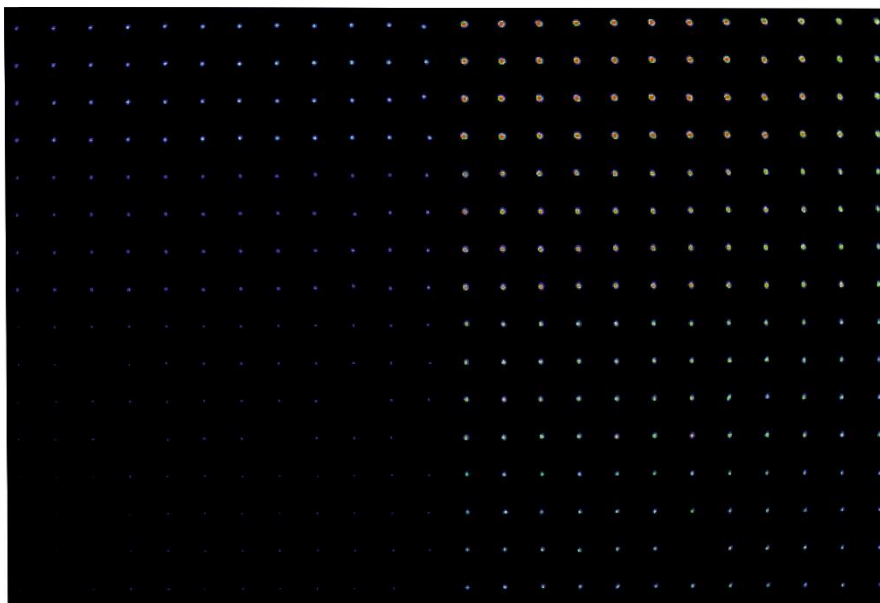
3.3.2. Vady objektivu

Druhým ze zásadních omezení je pak vada objektivu, zvaná vinětace. Tato vada je způsobena snahou o dosažení rozumně velkých a lehkých objektivů, čehož dosahujeme zmenšením čoček. Tento fakt má pak za následek úbytek světla uvnitř tubusu objektivu a projevuje se úbytkem intenzity v rohových částech snímku (viz Obrázek 24). [51,52]



Obrázek 24 - Obrázek znázorňující objektivovou vadu vinětaci. Obrázek vlevo není touto vadou postižen, obrázek vpravo je postižen vinětací [52]

V případě realizovaného systému měla za následek úbytek intenzity pixelů v rohových pozicích analyzované MTP. V důsledku pak došlo k výraznému znesnadnění detekce struktur metodami prahování, z toho plynoucí ovlivnění plochy těchto struktur a s tím spojeným úbytkem vypočítané intenzity jednotlivých organoidů. Pro správnou detekci a získání odpovídajících výsledků bylo nutné tuto objektivovou vadu korigovat, aby nebyly ovlivněny výsledky.



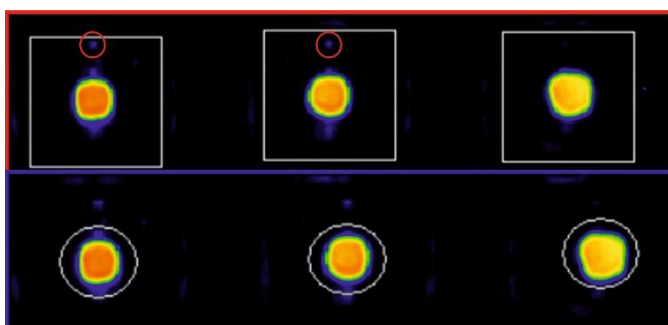
Obrázek 25 - Snímek destičky s organoidními strukturami s patrnou objektivovou vadou vinětací

3.4. Řešení limitačních vad

3.4.1. Crosstalk

Jelikož obě výše popsané vady výraznou měrou znesnadňovaly či úplně znemožňovaly správnou detekci organoidních struktur, bylo třeba obě tyto limitační vady odstranit.

K odstranění artefaktů vzniklých odrazem LED panelů od den jamek byla upravena z původního čtvercového profilu masky (viz Obrázek 26) na kruhový profil, který lépe reflektoval kruhový charakter organoidů (viz Obrázek 26).



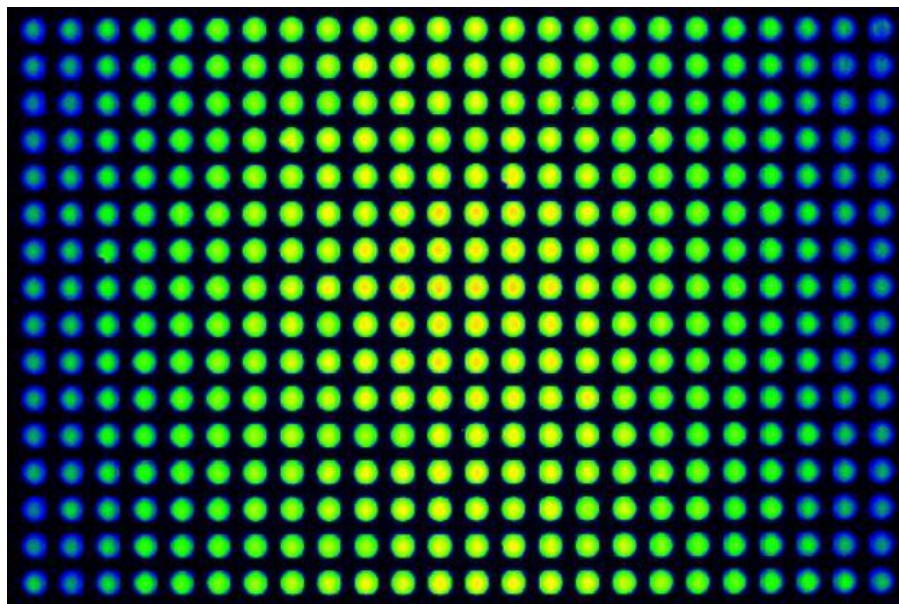
Obrázek 26 - Obrázek detailu původní masky s čtvercovým profilem se zvýrazněnými artefakty v červených kroužcích (červený obdélník) a nově navržené masky s kruhovým profilem, nezahrnující artefakty do analýzy (modrý obdélník)

Takto navržená maska eliminovala odrazové artefakty a následná analýza tedy probíhala bez vnějšího ovlivnění. Součástí softwaru FluorCam7 je možnost stanovení minimálního počtu pixelů, kterého musí detekovaný objekt dosáhnout, aby mohl být vyhodnocen jako organoidní struktura. Tento prvek pomáhá eliminovat případná rezidua crosstalku neodstraněná z analýzy kruhovými maskami. Samotná detekce pak funguje na určení lokálního minima z histogramu takové části obrazu, která je definována maskou.

3.4.2. Vinětace

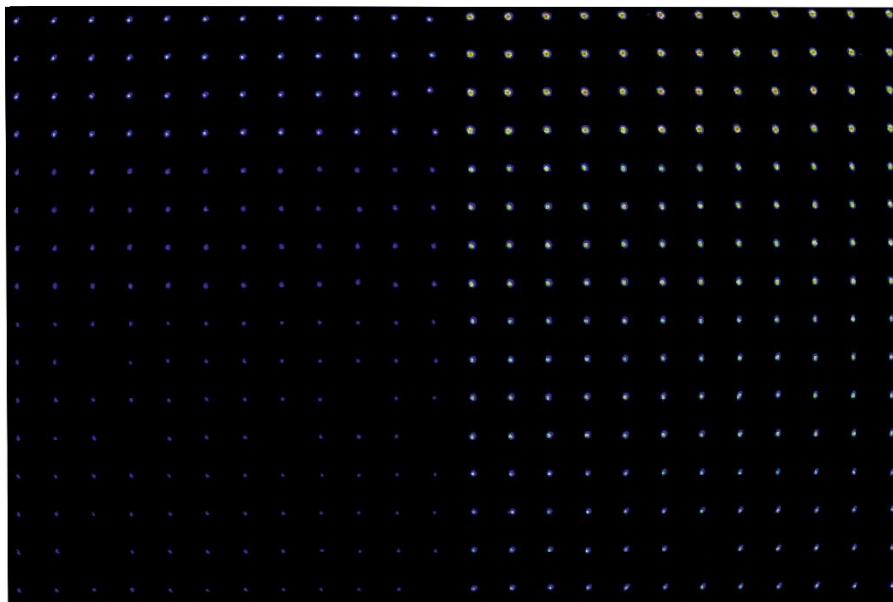
Běžně používaným postupem pro odstranění vinětace je zvýšení hodnoty clonky, což však pro naši aplikaci nebylo proveditelné. Clonka byla otevřena na nejvyšší možnou míru za účelem zisku co nejvyššího výtěžku.

Z tohoto důvodu jsem sáhl k odlišnému postupu odstranění této objektivové vady a tím je Flat Field Correction (FFC), spočívající v zohlednění míry útlumu signálu. Za stejného nastavení clonky a sensitivity kamery jsem kamerou s rozlišením 12 Mpx nasnímal destičku, kterou jsem naplnil fluorescenčním barvivem Basic Blue o koncentraci 100 mg/ml (viz Obrázek 27), jehož optické vlastnosti jsou podobné použitému fluorescenčnímu proteinu *mCherry*.



Obrázek 27 – Pseudobarevný snímek MTP s fluorescenčním barvivem Basic Blue, pořízený experimentální kamerou s rozlišením 12Mpx

Vzhledem ke stejné koncentraci a objemu fluorescenčního barviva v každé z jamek je jediným faktorem, ovlivňujícím úbytek intenzity záření objektivová vada vinětace. Analýzou tohoto měření jsem byl schopen určit míru útlumu intenzity směrem k rohům destičky a zavedením normalizace každého měření takto zanalyzovanou destičkou jsem byl schopen optickou vadu vinětaci úspěšně eliminovat (viz Obrázek 28).

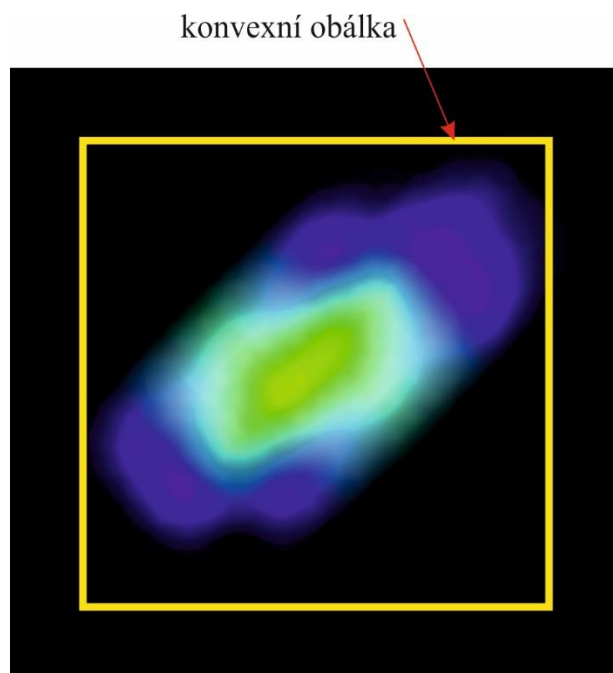


Obrázek 28 - Výsledný pseudobarevný snímek MTP s organoidními strukturami po korekci FFC

3.5. Hodnocené parametry velikosti sferoidů

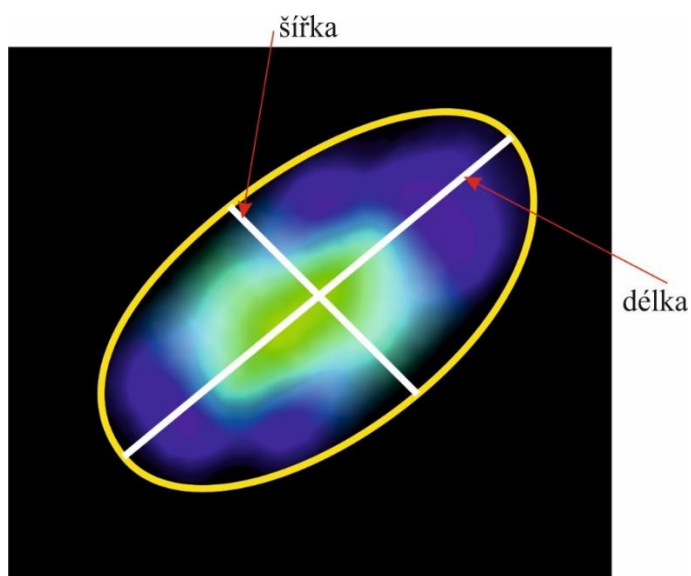
Vedlejší parametry hodnocení velikosti organoidů, jejíž vyhodnocování probíhalo v programovém prostředí Matlab, jsou konvexní obálka, délka a šířka organoidní struktury a z nich plynoucí excentricita organoidu. K analýze těchto parametrů byla použita funkce `regionprops`. Vstupem do této funkce je binární obraz, vzniklý prahováním nasnímané MTP, výstup je v datovém typu `struct`.

Parametr konvexní obálka je nejmenší možný obdélník, který je možný organoidní struktuře opsat a podmínkou jejího správného vytvoření je úspěšná detekce hran. Při vyhodnocení lze předpokládat, že čtverec lze opsat pouze kruhovitě struktuře. V extrémních případech (viz Obrázek 29) lze však čtvercem opsat i nesférickou strukturu. Z toho důvodu je nutné tuto metodu kombinovat s excentricitou organoidu.



Obrázek 29 - Snímek organoidní struktury, která by mohla být na základě parametru konvexní obálky falešně vyhodnocena, jako sférická

Délka a šířka jsou definovány jako hlavní (délka) a vedlejší (šířka) osa elipsy, opsané organoidní struktúře (viz Obrázek 30). Excentricita je pak vyjadřovaná jako rozdíl vzdálenosti mezi ohnisky elipsy a délkou její hlavní osy. Výsledná hodnota excentricity se pohybuje v rozmezí 0 až 1, přičemž při hodnotě 0 je analyzovaná struktura kruhová, pro hodnotu 1 se pak jedná o přímku.



Obrázek 30 - Grafické vyjádření morfologických parametrů délka a šířka

S nastavenou hodnotou tolerance lze tedy na základě excentricity a konvexní obálky vyloučit z analýzy takové struktury, které nejsou sférické.

3.6. Test účinku modelových cytostatik

Aby bylo možné realizovaný systém objektivně porovnat s komerčně dostupným automatickým mikroskopem, byl navržen experiment analyzující účinek modelových cytostatik na velikost a viabilitu nádorových sferoidů. Do MTP s 384 jamkami byly nasazeny buňky linie DLD-1 *mCherry* wt, přičemž do každé jamky bylo nasazeno 500 buněk. Po vytvoření sferoidů (3. den od kultivace) bylo do všech řádků 1.-16. sloupce přidáno protinádorové léčivo Gemcitabin (viz Obrázek 31). Toto cytostatikum s antimetabolickým účinkem je používáno k léčbě rozmanitých druhů karcinomů [53].

	GEMCITABINE (uM)															
A	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
B	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
C	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
D	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
E	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
F	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
G	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
H	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
I	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
J	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
K	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
L	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
M	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
N	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
O	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
P	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,02	0,012	0,006
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Obrázek 31 - Rozložení testovací MTP, znázorňující koncentrace protinádorového léčiva Gemcitabin. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

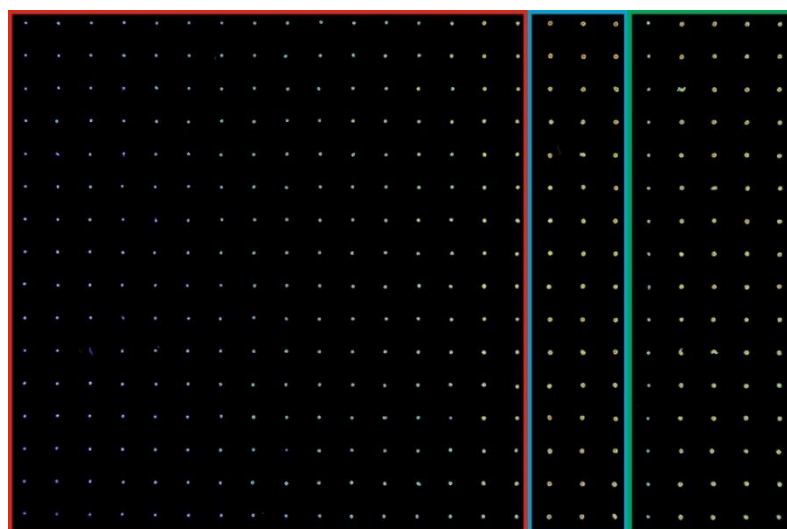
Následující 3 sloupce analyzované MTP nebyly ošetřeny žádným léčebným preparátem a sloužily jako kontrolní skupiny pro stanovení velikosti a viability. Zbývajících 5 sloupců bylo ošetřeno léčebným preparátem 5- fluorouracil (5FU) (viz Obrázek 32).

			5FU (μ M)					
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	A
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	B
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	C
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	D
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	E
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	F
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	G
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	H
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	I
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	J
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	K
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	L
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	M
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	N
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	O
ctrl	ctrl	ctrl	400	200	100	50	25	P
17	18	19	20	21	22	23	24	

Obrázek 32 – Rozložení testovací MTP, znázorňující koncentrace protinádorového léčiva 5-fluorouracil a kontrolních skupin. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

Tento preparát byl zvolen, jelikož se jedná o cytostatikum s antimetabolickým účinkem, běžně používané k léčbě karcinomu tlustého střeva [54].

S takto připravenou MTP byl 7. den od kultivace proveden test, znázorňující reakci sferoidních struktur na zvyšující se koncentraci protinádorových léčiv, který spočíval v analýze viability na mnou navrženém experimentálním systému (viz Obrázek 33).

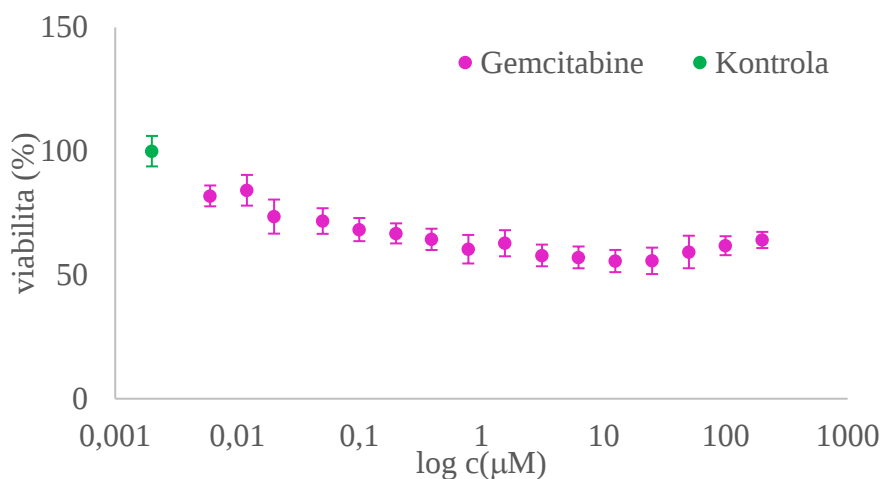


Obrázek 33 - Pseudobarevný snímek, pořízený přístrojem FluorCam s použitím kamery s rozlišením 12 Mpx, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami s cytostatikem Gencitabin (červený obdélník), kontrolní skupina (modrý obdélník) a s cytostatikem 5- fluorouracil (zelený obdélník)

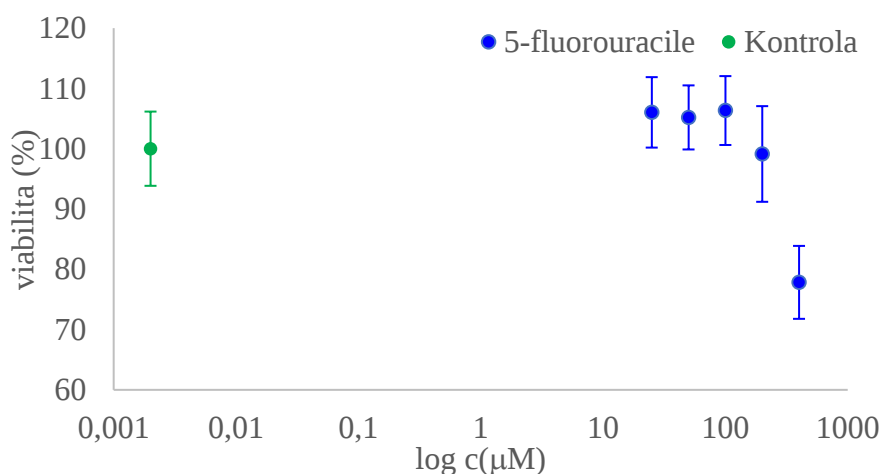
Výsledkem bylo měření hodnot intenzity fluorescenčního signálu skupin s léčebným preparátem ve srovnání s intenzitou fluorescenčního signálu u kontrolní skupiny. Dle

stejných parametrů byla stejná destička bezprostředně měřena na komerčním systému ImageXpress Micro Automated Imaging System od firmy Molecular Devices prováděným na BFÚ, AV ČR.

Viabilita byla posuzována vzhledem ke kontrolní skupině, a to na základě základního parametru, intenzity záření přes plochu organoidu (viz Graf 7, Graf 8).

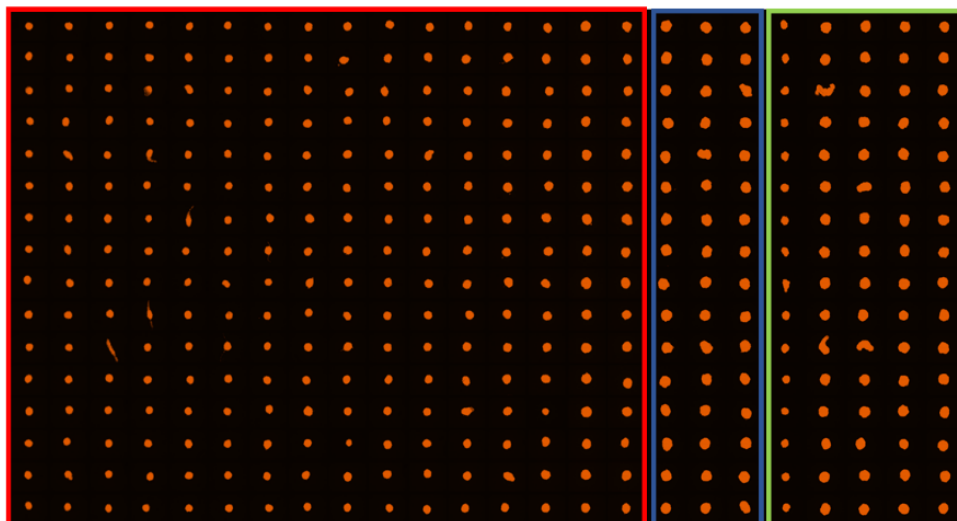


Graf 7 – Vliv koncentrace cytostatika Gemcitabine na viabilitu organoidních struktur ve srovnání s kontrolní skupinou



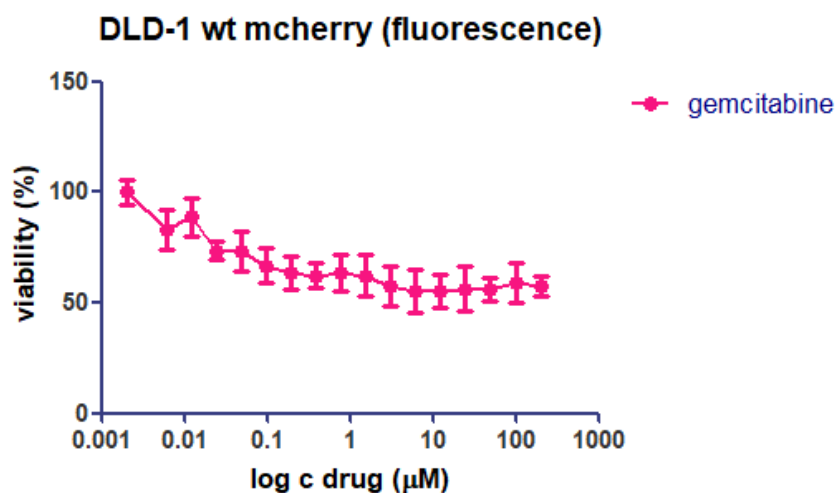
Graf 8 - Vliv koncentrace cytostatika 5-fluorouracil na viabilitu organoidních struktur ve srovnání s kontrolní skupinou

Stejná MTP byla v prostorách BFÚ AV ČR bezprostředně analyzována na komerčně využívaném systému ImageXpress Micro Automated Imaging System (viz Obrázek 34).

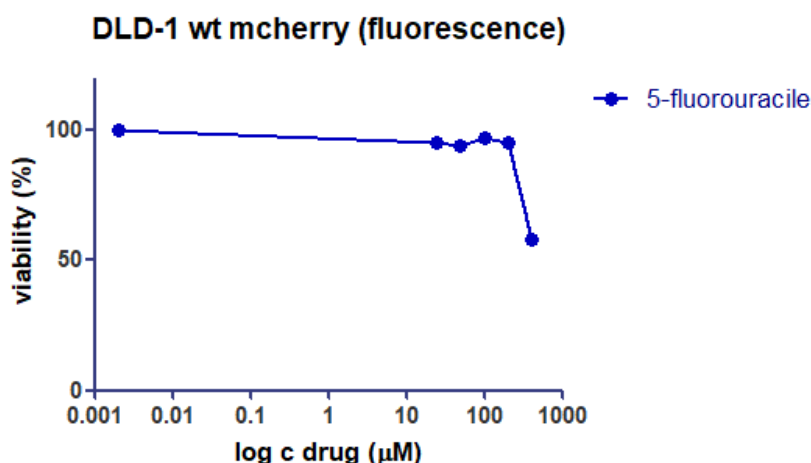


Obrázek 34 - Pseudobarevný snímek, pořízený systémem ImageXpress Micro Automated Imaging System, zobrazující mikrotitrační destičku s organoidními strukturami s cytostatikem Gemcitabin (červený obdélník), kontrolní skupina (modrý obdélník) a s cytostatikem 5- fluorouracil (zelený obdélník). Presentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

Naměřené výsledky byly zpracovány obdobným způsobem (viz Graf 9, Graf 10).



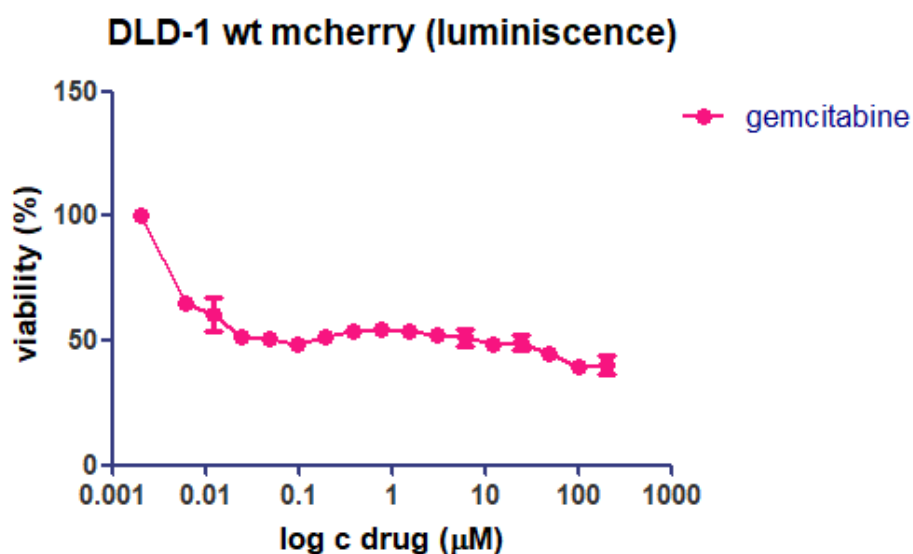
Graf 9 - Závislost intenzity fluorescence na koncentraci použitého léčiva Gemcitabine, vztažené ke kontrolnímu vzorku bez treatmentu, měřeno na systému ImageXpress Micro Automated Imaging System. Presentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.



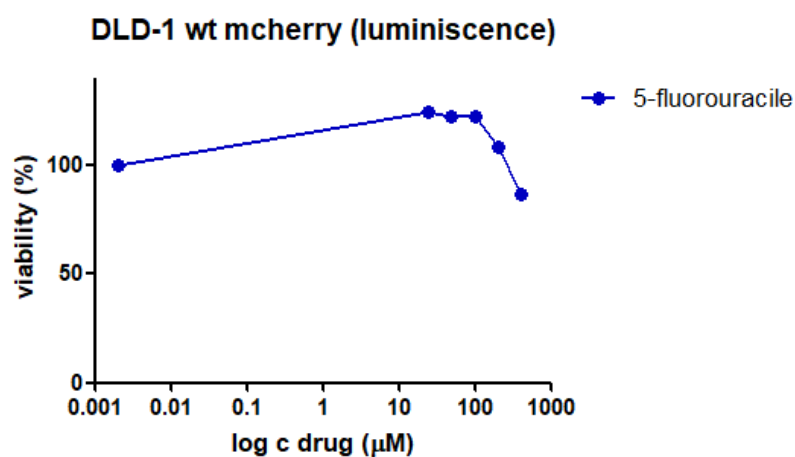
Graf 10 - Závislost intenzity fluorescence na koncentraci použitého léčiva 5-fluorouracil, vztažené ke kontrolnímu vzorku bez treatmentu, měřeno na systému ImageXpress Micro Automated Imaging System. Presentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

Na BFÚ AV ČR byl následně proveden doplňující test viability za pomoci luminiscenční metody s využitím CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kitu a vyhodnocena viabilita buněk vůči kontrolnímu vzorku (viz Graf 11, Graf 12). Tento doplňkový test je komplementární metodou obrazové analýzy a jeho cílem je zjištění počtu živých buněk v měřené kultuře. Samotný CellTiter-Glo® pracuje na principu kvantifikace přítomnosti ATP, jakožto indikátoru metabolicky aktivních buněk. Je navržen speciálně pro vícejamkové MTP, což z něj činí ideální prostředek pro automatické vysoce propustné screenování, sledování proliferace buněk a testy lékové toxicity. Detekční minimum tohoto přípravku pro 384 jamkovou MTP je 15 buněk na jednu jamku po uplynutí 10 minut od přidání reagentu. Výsledná luminiscence buněk je úměrná počtu viabilních buněk v kultuře [55].

Do každé jamky, obsahující 80 μl živného média, bylo přidáno 16 μl neředěného roztoku CellTiter-Glo® a inkubováno po dobu 5 minut za pokojové teploty na třepačce. Po kultivaci o dalších 25 minutách mimo třepačku byla měřena luminiscence na skeneru mikrotitračních destiček Infinite od firmy Tecan s integračním časem 0,25 sekund [56].



Graf 11 - Posouzení viability organoidních struktur s podaným léčivem Gemcitabin vůči kontrolnímu vzorku bez léčiva. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

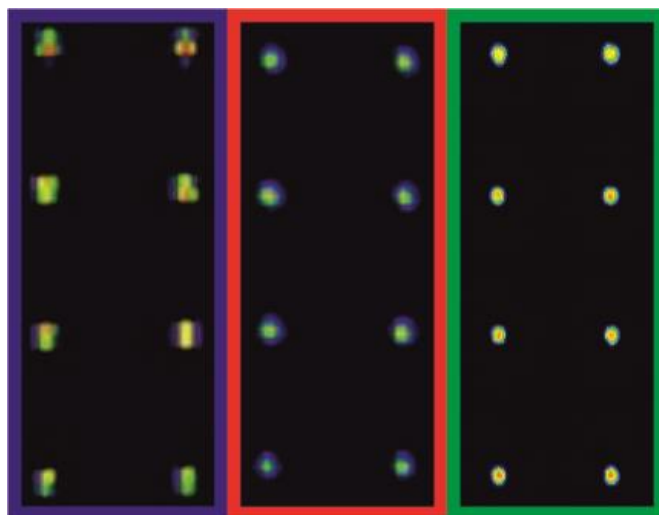


Graf 12 - Posouzení viability organoidních struktur s podaným léčivem 5-fluorouracil vůči kontrolnímu vzorku bez léčiva metodou. Prezentováno s laskavým svolením Dr. Terezy Suchánkové, Ph.D.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Optimalizace zobrazovacího systému

V průběhu mé diplomové práce bylo nutné reagovat na technické obtíže, hlavně pak na nedostatečné rozlišení používaného typu kamer pro přesnou morfologickou analýzu a analýzu viability organoidních struktur. Pro optimalizaci byla nutná změna kamery z kamery typu TOMI-1, postupně přes kameru typu TOMI-2 až k experimentální kameře s rozlišením 12 Mpx. Tyto změny byly nevyhnutelné hlavně za účelem dosažení přesnější morfologické analýzy, sloužící jako doplňující prostředek pro stanovení viability buněk. Porovnání morfologie struktur lze pozorovat na souhrnné fotce (viz Obrázek 35) organoidů, snímaných různými typy kamer.

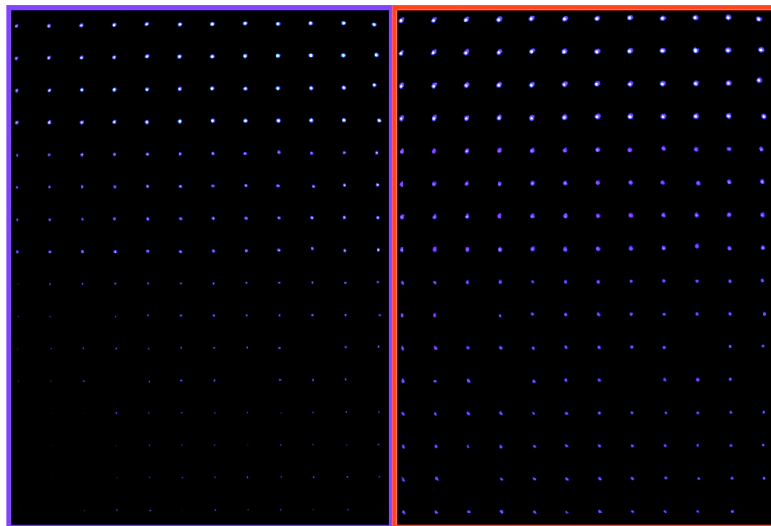


Obrázek 35 - Srovnání morfologie na buňkách typu DLD-1 BRCA2 -/- o stejné počáteční koncentraci buněk za použití kamery TOMI-1(modrý obdélník), TOMI2 (červený obdélník) a experimentální kamery s rozlišením 12Mpx (zelený obdélník)

Z toho snímku je patrné, že zvýšené rozlišení kamery přispívá k snadnějšímu rozlišení hran organoidní struktury. Změna kamery byla tedy základním předpokladem pro úspěšnou detekci a s ní spojenou správnou analýzu. Díky této modifikaci jsem byl schopen zpřesnit detekci hran organoidních struktur na základě prahování dle jasových hodnot a tím i zpřesnit dosažené výsledky.

Další bod optimalizace zobrazovacího systému spočíval v odstranění limitačních prvků, znemožňujících správnou detekci organoidních struktur, případně zavádějících do procesu zobrazení a analýzy nežádoucí zkreslení a obrazové artefakty. Prvním takovým jevem byl tzv. „crosstalk“, spočívající v odrazu excitačních světél v kónických dnech

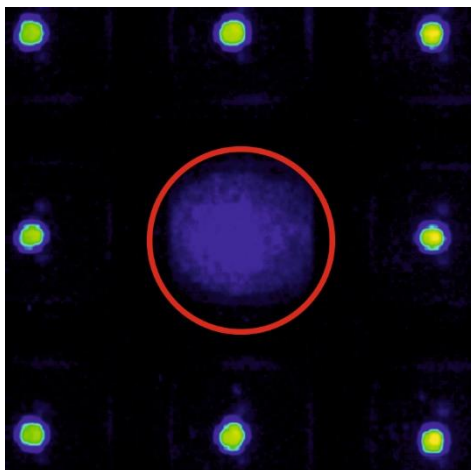
jamek MTP. Tento jev byl úspěšně potlačen úpravou použité masky. Druhý z limitačních jevů spočíval ve vzniku objektivové vady vinětaže. Pro potlačení této vady byla před proces analýzy zavedena korekce FFC. Úspěšnost potlačení reprezentuje obrazové srovnání MTP, měřené bez FFC a té samé MTP s aktivní FFC (viz Obrázek 36)



Obrázek 36 - Obrázek, srovnávající informační výtěžek buněk linie DLD-1 z destičky snímané bez předřazené FFC (modrý čtverec) a s FFC, předřazenou analýze (červený obdélník)

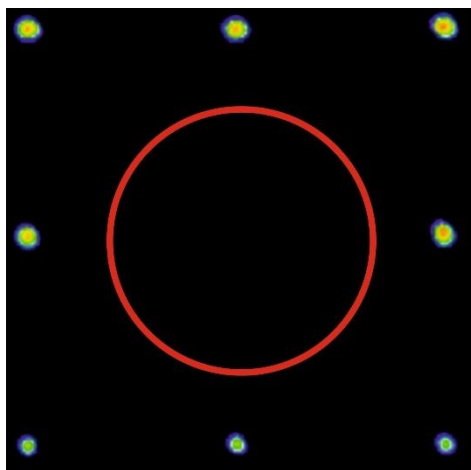
4.2. Vyhodnocené morfologické parametry

Z optimalizace zobrazovacího systému vychází vyhodnocování morfologických parametrů, sloužících jako doplňkový parametr pro určování viability organoidních struktur. Na základě v práci uvedených morfologických parametrů byly z analýzy vyjmuty takové struktury, které nesplňovaly předem dané požadavky na sfericitu objektu (viz Obrázek 21), organoidní struktura se u nich nevytvořila (viz Obrázek 37), případně došlo k jejímu rozpadu (viz Obrázek 38).



Obrázek 37 - Snímek, zachycující shluk buněk, který se nezformoval do organoidní struktury a z analýzy byl vyloučen na základě stanovených morfologických parametrů

Sferoidy, které splňovaly předem dané parametry, byly dále analyzovány s důrazem na hranovou detekci, díky čemuž bylo možné určit jejich velikost. Velikost sferoidu byla využita pro správný výpočet intenzity záření dané struktury, počítané jako intenzita přes plochu. Samotná intenzita záření je pak podmíněna vitalitou buněk, dojde-li k rozpadu sferoidu na jednotlivé buňky, tyto samy o sobě neexcitují světlo a příslušná jamka se na scanu objevuje jako prázdná (viz Obrázek 38).



Obrázek 38 - Obrázek prázdné jamky v MTP, vzniklé z důvodu rozpadu sferoidu

4.3. Stanovení velikosti buněk

Důležitým parametrem hodnocení navrhovaného systému je nepochybně rozlišovací schopnost takového systému. Na správně vyhodnocené morfologické parametry tak navazuje samotné stanovení velikosti sferoidů, které je základním parametrem hodnocení kvality a využitelnosti navrženého systému pro laboratorní praxi. Systém musí být

schopen rozlišovat detailní rozdíly ve velikosti jednotlivých analyzovaných struktur. Zhodnotíme-li graf, zobrazující měřený parametr počtu pixelů na analyzovaný objekt (viz Graf 6), pozorujeme jasné rozdělení do 4 skupin podobných hodnot pro každou z buněčných linií. Tento fakt je pak v souladu se 4 hodnotami denzity buněk pro každou buněčnou linii na počátku experimentu. S ohledem na způsob výpočtu intenzity signálu analyzovaného organoidu je pak průběh grafu, vyjadřujících hodnoty intenzit signálu na strukturu (viz Graf 5), také ve shodě s počátečními podmínkami počtu nasazených buněk v MTP. Zajištěním takových výsledků byla tedy potvrzena využitelnost takového systému pro široké spektrum aplikací, využívajících biologické materiály.

4.4. Test účinku modelových cytostatik

Viabilita byla v tomto testu vyhodnocována dvěma metodami, fluorescenční a luminiscenční, obě jako poměr intenzity záření sferoidů, na něž byl aplikován v určité koncentraci jeden z léčivých preparátů, vůči kontrolní skupině.

Z porovnání křivek viability pro léčivou látku Gemcitabin (viz Graf 7, Graf 9) jsou patrné obdobné výsledky pro měření na obou systémech. Obě křivky vykazují závislost intenzity záření měřených struktur na koncentracích použitého léčivého přípravku Gemcitabin. Porovnáme-li křivky viability pro léčivou látku 5-fluorouracil (viz Graf 8, Graf 10), nedosahujeme ani u jednoho ze systémů obdobné závislosti, jako u léčebného preparátu Gemcitabin. Tento jev může být způsoben hlavně specificitou komunikace buněk v rámci sferoidu, látky Gemcitabin a 5-fluorouracil mají také odlišný mechanismus účinku. U nejvyšší koncentrace však pozorujeme markantní úbytek intenzity fluorescence v porovnání s kontrolní skupinou, můžeme tedy tvrdit, že na tuto cytostatickou látku buňky dané linie reagují.

Zaměříme-li se na luminiscenční metodu, je patrný pokles vyhodnocené viability sferoidů s aplikovaným léčebným preparátem Gemcitabin oproti viabilitě těchto sferoidů, vyhodnocené metodou fluorescenční pro stejnou MTP. Zatímco u metody fluorescenční se viabilita drží nad 50 % v porovnání s kontrolním vzorkem, u metody luminiscenční se nad touto hodnotou vyskytují pouze ty struktury, ošetřené léčebným preparátem Gemcitabine o koncentracích nižších než 12 nM. Pro sferoidy, na něž by aplikován léčebný preparát 5-fluorouracil, se u fluorescenční metody viabilita výrazně neliší od viability kontrolní skupiny, s výjimkou nejvyšší koncentrace léčiva 400 μ M, kde klesá na

hodnotu blízkou 50 %. U luminiscenční metody je patrný nárůst viability těchto sferoidů nad hodnotu 100 %, vztaženou k viabilitě kontrolního vzorku. U struktur, ošetřených 5FU léčebným preparátem o koncentraci 200 μ M, se dostává na přibližně stejnou hodnotu s viabilitou kontrolního vzorku, u vyšší koncentrace pak klesá pod hodnotu viability kontrolního vzorku.

Z obdobných průběhů těchto křivek tedy můžeme tvrdit, že námi navrhovaný systém je dostačující, dosahuje kvalitativně srovnatelné kvality analýzy jako komerčně využívaný systém ImageXpress Micro Automated Imaging System, jeho nespornou výhodou je však markantně kratší čas, potřebný k screenu každé MTP a její analýze.

5. ZÁVĚR

Cílem mé práce byl návrh vysoce propustného automatizovaného systému, sloužícího pro biomedicínské aplikace. Úvodní kapitola pojednává o základní problematice a využitelnosti biologických modelů v praxi. Následující kapitola obsahuje literární rešerši optických metod analýzy organoidních struktur. Dále nastiňuje úskalí metod, používaných pro optickou analýzu. Návrh systému, detailní popis jeho nejdůležitějších součástí a nutné modifikace existující platformy AlgaeScreen jsou uvedeny v kapitole 2. Experimentální kapitola pak obsahuje popis experimentu, navrženého pro ověření funkcionality tohoto systému (testovací experiment) a popis limitací, které se během tohoto testování prototypu objevily, součástí této je také popis řešení těchto omezení. Získané výsledky jsou vyhodnoceny v diskuzi. Závěrečným doplňujícím experimentem byl test reakcí sferoidních struktur na běžně používaná léčiva, jako příklad využitelnosti pro jednu z mnoha biomedicínských aplikací. Výsledky testu reakcí na běžně používaná léčiva byly v diskuzi srovnány s výsledky stejného testu, poskytnutými BFÚ AV ČR, měřeními na komerčně využívaném systému ImageXpress Micro Automated Imaging System společnosti Molecular Devices. Na základě těchto testů byly oba systémy srovnány a diskutovány přednosti a omezení mnou navrhovaného systému.

Na testovaném zařízení byly postupně scanovány MTP, připravené za podmínek, popsanych v odpovídající části práce. Scanováním a analýzou těchto destiček byla prokázána vhodnost navržené soustavy pro screenování MTP, kde dosažené výsledky jasně potvrzují rozlišovací schopnost systému a jeho vyhodnocovací kapacitu. Výsledný test léčiv všechna tato tvrzení podtrhuje a prokazatelně tím deklaruje využitelnost tohoto systému v praxi.

Tento systém by pro širší uplatnění bylo možné doplnit o druhou akviziční jednotku FluorCam se stejným přístrojovým vybavením, jako je jednotka současná, taková modifikace by přispěla k rychlejšímu průběhu analýz jednotlivých MTP díky současnému scanování více MTP najednou. Jinou možností by bylo přidání další jednotky s LED panely odlišných vlnových délek či modifikovaným osazením filtrů v otočném zásobníku za účelem možnosti analýz obsáhlejšího počtu opticky aktivních látek.

6. SEZNAM LITERATURY

- [1] XU, H. et al. Organoid technology and applications in cancer research 2018, sv. 11, č. 1, s. 116. ISSN 1756-8722.
- [2] DROST, J. a CLEVERS, H. Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer*, 2018, sv. 18, č. 7, s. 407-418. ISSN 1474-1768.
- [3] ABERLE, M. R. et al. Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer. *The British journal of surgery*, 2018, sv. 105, č. 2, s. e48-e60. ISSN 1365-2168 0007-1323.
- [4] XU, H. et al. Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. *Experimental hematology & oncology*, 2018, sv. 7, s. 30-30. ISSN 2162-3619.
- [5] BURKHART, R. A. et al. Testing Susceptibility of Patient-Derived Organoid Cultures to Therapies: Pharmacotyping. *Methods Mol Biol*, 2018, sv. 1787, s. 253-261. ISSN 1064-3745.
- [6] MIRANDA, C. C. et al. Towards Multi-Organoid Systems for Drug Screening Applications. *Bioengineering (Basel)*, 2018, sv. 5, č. 3. ISSN 2306-5354 (Print) 2306-5354.
- [7] RIOS, A. C. a CLEVERS, H. Imaging organoids: a bright future ahead. *Nat Methods*, 2018, sv. 15, č. 1, s. 24-26. ISSN 1548-7091.
- [8] CHEN, K. G. et al. Pluripotent Stem Cell Platforms for Drug Discovery. *Trends Mol Med*, 2018, sv. 24, č. 9, s. 805-820. ISSN 1471-4914.
- [9] LAPERROUSAZ, B. et al. Direct transfection of clonal organoids in Matrigel microbeads: a promising approach toward organoid-based genetic screens. *Nucleic acids research*, 2018, sv. 46, č. 12, s. e70-e70. ISSN 1362-4962 0305-1048.
- [10] CRESPO, M. et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nature Medicine*, 2017, sv. 23, č. 7, s. 878-884. ISSN 1546-170X 1078-8956.
- [11] MOREIRA, L. et al. Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cellular and*

- molecular gastroenterology and hepatology*, 2017, sv. 5, č. 3, s. 289-298. ISSN 2352-345X.
- [12] PHIPSON, B. et al. Evaluation of variability in human kidney organoids. *Nature Methods*, 2019, sv. 16, č. 1, s. 79-87. ISSN 1548-7105.
 - [13] AU - MCCRAY, T. et al. Handling and Assessment of Human Primary Prostate Organoid Culture. *JoVE*, 2019, č. 143, s. e59051. ISSN 1940-087X.
 - [14] MILLER, A. J. et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols*, 2019, sv. 14, č. 2, s. 518-540. ISSN 1750-2799.
 - [15] WANG, H. Modeling Neurological Diseases With Human Brain Organoids. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 2018, sv. 10, s. 15-15. ISSN 1663-3563.
 - [16] CAPOWSKI, E. E. et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines 2019, sv. 146, č. 1. ISSN 0950-1991.
 - [17] Organoid research. [online]. [cit. 10.10. 2018]. Dostupné z: <<https://www.stemcell.com/technical-resources/area-of-interest/organoid-research.html#more>>.
 - [18] An update on organoid research. *Nature Cell Biology*, 2018, sv. 20, č. 6, s. 633-633. ISSN 1476-4679.
 - [19] LEE, S. H. et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*, 2018, sv. 173, č. 2, s. 515-528.e517. ISSN 1097-4172 0092-8674.
 - [20] WALSH, A. J. et al. Functional Optical Imaging of Primary Human Tumor Organoids: Development of a Personalized Drug Screen. *J Nucl Med*, 2017, sv. 58, č. 9, s. 1367-1372. ISSN 0161-5505.
 - [21] WALSH, A. J. et al. Optical Imaging of Drug-Induced Metabolism Changes in Murine and Human Pancreatic Cancer Organoids Reveals Heterogeneous Drug Response. *Pancreas*, 2016, sv. 45, č. 6, s. 863-869. ISSN 0885-3177.
 - [22] WALSH, A. J. et al. Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer. *Cancer research*, 2014, sv. 74, č. 18, s. 5184-5194. ISSN 1538-7445 0008-5472.

- [23] WENZEL, C. et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res*, 2014, sv. 323, č. 1, s. 131-143. ISSN 0014-4827.
- [24] F DEKKERS, J. et al. *A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids*. 2013. s.
- [25] NAVRÁTIL LEOŠ, R. J., ET AL. *Medicínská biofyzika I (dostisk 2013)*. Grada Publisher, 2005. s. ISBN 978-80-247-1152-2.
- [26] [online]. 21.11. [cit. 21.11. 2018]. Dostupné z:
<<http://www.microbehunter.com/the-condenser-aperture-diaphragm/>>.
- [27] M., R. J. V. Encyklopedie fyziky. [online]. [cit. 15.3. 2019]. Dostupné z:
<<http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/501-princip-cinnosti-mikroskopu>>.
- [28] Fázový kontrast. [online]. [cit. 15.10. 2018]. Dostupné z:
<http://www.sci.muni.cz/kfar/html/fazovy_kontrast.pdf>.
- [29] RICE, G. Fluorescent Microscopy. [online]. [cit. 17.10. 2018]. Dostupné z:
<https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluomic.html>.
- [30] Fluorescenční mikroskopie. [online]. [cit. 11.10. 2018]. Dostupné z:
<<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>>.
- [31] Konfokální mikroskopie. [online]. [cit. 15.10. 2018]. Dostupné z:
<<http://www.lao.cz/aplikace-79/zobrazovaci-metody-145/konfokalni-mikroskopie-146>>.
- [32] PAUL, C. What is Confocal Laser Scanning Microscopy. [online]. [cit. 13.11. 2018]. Dostupné z: <<https://bitesizebio.com/19958/what-is-confocal-laser-scanning-microscopy/>>.
- [33] Konfokální laserová řádkovací mikroskopie. [online]. [cit. 20.10. 2018]. Dostupné z: <<http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>>.
- [34] DEVARASETTY, M. et al. Optical Tracking and Digital Quantification of Beating Behavior in Bioengineered Human Cardiac Organoids. *Biosensors*, 2017, sv. 7, č. 3, s. 24. ISSN 2079-6374.

- [35] Spinning Disc Confocal. [online]. [cit. 20.11. 2018]. Dostupné z: <<https://andor.oxinst.com/learning/view/article/spinning-disk-confocal>>.
- [36] Learn & Share: Widefield Microscopy? [online]. [cit. 05.05 2019]. Dostupné z: <<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/topics/what-is-widefield-microscopy/>>.
- [37] WILSON, M. [online]. [cit. 7.5. 2019]. Dostupné z: <<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/introduction-to-widefield-microscopy/>>.
- [38] FORSYTHE, S. et al. Development of a Colorectal Cancer 3D Micro-tumor Construct Platform From Cell Lines and Patient Tumor Biospecimens for Standard-of-Care and Experimental Drug Screening 2019. ISSN 0090-6964.
- [39] PINGITORE, P. et al. Human Multilineage 3D Spheroids as a Model of Liver Steatosis and Fibrosis 2019, sv. 20, č. 7. ISSN 1422-0067.
- [40] KONDO, J. et al. High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids 2019, sv. 110, č. 1, s. 345-355. ISSN 1347-9032.
- [41] CZERNIECKI, S. M. et al. High-Throughput Screening Enhances Kidney Organoid Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells and Enables Automated Multidimensional Phenotyping. *Cell Stem Cell*, 2018, sv. 22, č. 6, s. 929-940.e924. ISSN 1875-9777.
- [42] SUN, W. et al. Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling 2019, sv. 8, č. 4, s. e1801363. ISSN 2192-2640.
- [43] DEVICES, M. *ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System* [online]. Molecular Devices, 2013 [cit. 03.05. 2019].
- [44] ŠIMEČKOVÁ, Š. et al. High Skp2 expression is associated with a mesenchymal phenotype and increased tumorigenic potential of prostate cancer cells. *Scientific Reports*, 2019, sv. 9, č. 1, s. 5695. ISSN 2045-2322.
- [45] HUCL, T. et al. A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to BRCA2. *Cancer research*, 2008, sv. 68, č. 13, s. 5023-5030. ISSN 1538-7445 0008-5472.
- [46] [online]. [cit. 2018 11.10.]. Dostupné z: <<https://www.fpbases.org/protein/mcherry/>>.

- [47] DLD-1 (ATCC® CCL-221™). [online]. [cit. 05.05. 2019]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-221.aspx#culturemethod>.
- [48] Corning® 384-well Black/Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment Spheroid Microplate, Bulk Packed 10 per Bag, with Lid, Sterile. [online]. [cit. 20.12. 2018]. Dostupné z: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Microplates/Assay-Microplates/384-Well-Microplates/Corning%C2%AE-384-well-Spheroid-Microplates/p/3830>.
- [49] *FluorCam Instruction Manual*. 2012. 13-22 s.
- [50] TM Series. [online]. [cit. 07.05. 2019]. Dostupné z: <http://www.ia.omron.com/products/family/3739/lineup.html>.
- [51] SKOŘEPA, J. Když se řekne vinětace... [online]. [cit. 07.05. 2019]. Dostupné z: <https://www.fotofiltry.eu/clanky/kdyz-se-rekne-vinetace-97.html>.
- [52] KOVALČÍK, V. K čemu je dobrá vinětace? [online]. [cit. 07.05. 2019]. Dostupné z: <https://www.milujemefotografii.cz/k-cemu-je-dobra-vinetace>.
- [53] PLUNKETT, W. et al. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Seminars in oncology*, 1995, sv. 22, č. 4 Suppl 11, s. 3-10. ISSN 0093-7754.
- [54] LONGLEY, D. B. et al. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 2003, sv. 3, č. 5, s. 330-338. ISSN 1474-1768.
- [55] CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. [online]. [cit. 09.05. 2019]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570.
- [56] Report KOLÁŘOVÁ, H. *Mre11i_170608_Kolarova_3D mCherry DLD-1_Pilot study1_Results: Establishment and analysis of 3D tumor spheroid-based assays for drug evaluation*.
- [57] ZEH, H. J., 3RD a LOTZE, M. T. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother*, 2005, sv. 28, č. 1, s. 1-9. ISSN 1524-9557 (Print)1524-9557.