



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**VÝVOJ BIOFYZIKÁLNÍ INTERPRETACE DAT
KVANTITATIVNÍHO FÁZOVÉHO ZOBRAZOVÁNÍ**

DEVELOPMENT OF BIOPHYSICAL INTERPRETATION OF QUANTITATIVE PHASE IMAGE DATA

ZKRÁCENÁ VERZE DIZERTAČNÍ PRÁCE

SHORT VERSION OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Aneta Křížová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

BRNO 2018

Abstrakt

Doktorská práce se zabývá biofyzikální interpretací dat kvantitativního fázového zobrazování (QPI – quantitative phase imaging) získaného pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM – coherence-controlled holographic microscope). V práci jsou nejprve popsány metody vyhodnocující informace z QPI jako analýza tvarových a dynamických charakteristik segmentovaných objektů a také vyhodnocování samotné fázové informace. Dále je navržena metoda dynamických fázových diferencí (DPD – dynamic phase differences), která umožňuje detailněji sledovat přesuny hmoty uvnitř buněk. Všechny uvedené metody jsou pak využity v biologických aplikacích. V rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí jsou informace z QPI porovnány s daty z průtokové cytometrie a s výhodou je využita kombinace QPI a fluorescenční mikroskopie. Metoda DPD je pak využita při studiu přesunů hmoty uvnitř buňky při osmotických jevech. Zjednodušená metoda DPD je aplikována při výzkumu mechanismu pohybu nádorových buněk v kolagenových gelech.

Abstract

This doctoral thesis deals with biophysical interpretation of quantitative phase imaging (QPI) gained with coherence-controlled holographic microscope (CCHM). In the first part methods evaluating information from QPI such as analysis of shape and dynamical characteristics of segmented objects as well as evaluation of the phase information itself are described. In addition, a method of dynamic phase differences (DPD) is designed to allow more detailed monitoring of cell mass translocations. All of these methods are used in biological applications. In an extensive study of various types of cell death, QPI information is compared with flow cytometry data, and preferably a combination of QPI and fluorescence microscopy is used. The DPD method is used to study mass translocations inside the cell during osmotic events. The simplified DPD method is applied to investigate the mechanism of tumor cell movement in collagen gels.

Klíčová slova

Koherencí řízený holografický mikroskop, kvantitativní fázové zobrazování, dynamické fázové diference, buněčná smrt, osmotické jevy, zobrazování ve 3D prostředích, dynamika buněk, kolagenové gely, filtrace prostorových frekvencí.

Keywords

Coherence-controlled holographic microscope, quantitative phase imaging, dynamic phase differences, cell death, osmotic challenge, imaging in 3D environments, cell dynamics, collagen gels, spatial frequencies filtration.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Kvantitativní fázové zobrazování (QPI) živých buněk.....	2
1.2	Koherenci řízený holografický mikroskop (CCHM).....	2
2	Metody biofyzikální interpretace QPI.....	3
2.1	Modelový experiment	3
2.2	Segmentace	4
2.3	Vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik.....	4
2.4	Vyhodnocování fázové informace	6
2.4.1	Vztah QPI a suché hmoty buňky	7
2.5	Metoda dynamických fázových diferencí (DPD)	8
3	Zobrazování pomocí CCHM ve 3D prostředích	9
3.1	Závislost zobrazení na stupni prostorové koherence osvětlení.....	9
3.2	Zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření	10
3.2.1	Numerický model	10
3.2.2	Experiment.....	11
3.2.3	Filtrace prostorových frekvencí.....	12
4	Aplikace metod při analýzách buněčných smrtí	15
4.1	Porovnání metody QPI a FC	15
4.2	Mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu.....	16
5	Aplikace metody DPD při sledování osmotických jevů	18
6	Aplikace metod ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech	21
7	Závěr.....	24
	Seznam použité literatury	25
	Životopis.....	28

1 Úvod

Předložená doktorská práce se zabývá pokročilými metodami vyhodnocujícími kvantitativní fázové zobrazení (QPI – quantitative phase imaging), které je vytvářeno koherencí řízeným holografickým mikroskopem (CCHM – coherence-controlled holographic microscope) a aplikacemi těchto metod ve výzkumu živých buněk.

Cílem práce bylo vybrat a navrhnout vhodné biofyzikální metody interpretace QPI získaného pomocí CCHM a následně tyto metody využít v biologických aplikacích.

Práce je rozdělena do několika kapitol. Nejprve se v kapitole 2 věnuje výběru a vývoji metod vyhodnocujících QPI, v kapitole 3 se zabývá zobrazováním vzorku ve 3D prostředí a v následujících kapitolách 4, 5, 6 jsou uvedeny konkrétní publikované výsledky jednotlivých metod interpretace QPI v biologickém výzkumu.

CCHM poskytuje kvalitní QPI, který zachycuje fázové objekty s velmi vysokým kontrastem. QPI pořízený pomocí CCHM není, v porovnání s metodami používajícími jako zdroj osvětlení laser, rušen parazitními interferencemi ani koherenční zrnitostí a dosahuje až dvakrát lepšího rozlišení [1, 2]. Přirozený vysoký kontrast zobrazovaných fázových objektů je výhodný především v biologii, kde odpadá nutnost složité přípravy vzorků zahrnující jejich barvení, které může být pro daný vzorek toxické. Kontrastní zobrazení živých buněk navíc umožňuje jejich jednodušší segmentaci a následné sledování a vyhodnocování nejrůznějších tvarových a dynamických charakteristik a jejich změn v čase.

Výhodou QPI je také možnost kvantitativní interpretace získaných dat, která není možná u klasických metod zviditelnění fáze, jako je Zernikův fázový kontrast nebo Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC – differential interference contrast). Protože je fázový signál v QPI přímo úměrný plošné hustotě suché hmoty pozorovaného objektu [3, 4], umožňuje nám jeho vyhodnocení v podstatě pozorované buňky vážit. Pro vyhodnocení biologických dějů může být přínosné také vyhodnocování změn rozložení suché hmoty v buňce. Pro tento způsob vyhodnocování je v práci navržena metoda dynamických fázových diferencí (DPD – dynamic phase differences).

Poněkud uvážlivější přístup vyhodnocování obrazu je třeba zvolit, zobrazujeme-li vzorek umístěný ve 3D prostředí. Proto jsou v kapitole 3 zabývající se touto problematikou nejprve zmíněny podmínky pro dobré zobrazení a teoreticky jsou pak rozebrány vlastnosti zobrazení ve 3D prostředích. Tyto vlastnosti jsou dále demonstrovány na modelovém a reálném zobrazení buňky. Vzhledem k rezervám reálného zobrazení oproti modelové situaci je uvážena možnost použití metod dekonvoluční mikroskopie k dodatečnému zlepšení obrazu.

Při rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí pomocí CCHM, uvedené v kapitole 4, jsou vyhodnocovány časové záznamy změny tvarových a dynamických charakteristik, stejně jako samotné fázové informace. Data získaná z QPI jsou porovnána s daty získanými pomocí průtokové cytometrie. Výsledky vyhodnocovaných tvarových a dynamických charakteristik jsou společně s vysokou kvalitou záznamů QPI jednotlivých dějů přínosem pro studium a rozlišování jednotlivých typů buněčných smrtí.

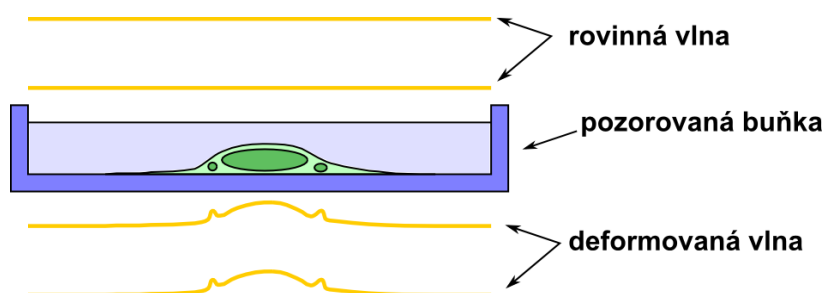
V kapitole 5 jsou shrnuty výsledky aplikace metody DPD ke studiu osmotických jevů. Na tomto experimentu je prokázáno, že navržená metoda DPD umožňuje detailní sledování změn rozložení hmoty buňky, které není dobře identifikovatelné ze samotného QPI.

Kapitola 6 se zabývá výzkumem dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech, tedy v částečně rozptýlném 3D prostředí. CCHM umožňuje buňky v tomto prostředí dobře zobrazit a detailně monitorovat jejich pohyb v čase. Pomocí zjednodušené metody DPD jsou navíc názorně prezentovány změny rozložení hmoty při různých typech pohybu buněk.

1.1 Kvantitativní fázové zobrazování (QPI) živých buněk

QPI je neinvazivní zobrazovací technika, která využívá fyzikálních vlastností živých buněk k vytvoření kontrastního zobrazení. QPI nepoužívá žádná barviva ani značení, která by mohla ovlivnit výsledky pozorování. Na rozdíl od tradičních neinvazivních technik, jako je Zernikův fázový kontrast nebo DIC, získáváme pomocí QPI přímo velikost fázového posuvu způsobeného buňkou.

Fázový posuv je určen odchylnou optické dráhy způsobenou buňkou v daném místě, která je zjednodušeně popsána součinem integrálního indexu lomu a výšky buňky v daném místě [5]. Graficky lze fázový posuv znázornit jako deformaci vlnoplochy rovinné vlny při interakci se zobrazovanou buňkou, což je schematicky znázorněno na obr. 1.



Obr. 1: Schéma znázorňující interakci rovinné vlny s pozorovanou buňkou. Tmavě zelené oblasti uvnitř buňky mají vyšší index lomu než světle zelená oblast, výsledný fázový posuv je dán deformací rovinné vlny po průchodu vzorkem.

Pokud ve výsledném zobrazení reprezentujeme hodnoty obrazové fáze stupni šedé, jsou buňky v QPI zachyceny jako světlé oblasti se silným signálem na téměř nulovém tmavém pozadí. Buňky jsou uprostřed obvykle silnější a dávají zde vyšší fázový signál (větší fázový posuv) než na tenkých okrajích, kde je signál nižší a bez nežádoucích artefaktů, jako je například halo efekt známý ze Zernikova fázového kontrastu [6]. Z tohoto pohledu jsou data získaná z QPI podobná datům z fluorescenční mikroskopie, a proto na ně mohou být použity podobné vyhodnocovací postupy [7].

Pro tištěnou prezentaci dat z QPI je však vhodnější invertované zobrazení. Proto jsou na obrázcích této práce buňky zachyceny jako tmavé objekty na světlém pozadí.

1.2 Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM)

Experimentální část této práce byla prováděna na prototypu multimodálního holografického mikroskopu (MHM) Q-PHASE, který je založen na koncepci CCHM [1,8] a umožňuje jej spojit s dalšími zobrazovacími technikami, například s fluorescenční mikroskopií. MHM Q-PHASE byl vyvíjen v rámci stejnojmenného projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR. Na projektu se podílela firma Tescan Brno, s. r. o., Vysoké učení technické v Brně a Ústav molekulární genetiky AV ČR. Důraz byl kladen především na motorizaci a uživatelskou přístupnost celého přístroje, proto byl vyvinut ovládací program s automatickými justážními procedurami. Do stávajícího ovládacího programu jsou postupně implementovány také nástroje pro vyhodnocování získaných dat, vyvíjené mimo jiné i na základě poznatků této dizertační práce. Podrobnému popisu uspořádání a základních vlastností mikroskopu se věnují jiné práce, například [1, 9, 10].

2 Metody biofyzikální interpretace QPI

Pro pozorování a vyhodnocování chování živých nebarvených buněk *in vitro* se často používají metody jako Zernikův fázový kontrast nebo DIC. Obě tyto metody používají speciálních optických sestav, které převádějí změny ve fázi světla na zaznamenané změny amplitudy světla. Kontrast ve snímcích z těchto metod je obvykle nižší než ve snímcích z QPI a má pouze kvalitativní význam. Hodnoty signálu v jednotlivých pixelech tedy nelze interpretovat v přímé závislosti na jakékoli fyzikální charakteristice pozorovaného objektu.

Hodnoty signálu QPI mají přímou souvislost s plošnou hustotou suché hmoty buňky (podrobněji v části 2.4.1) a díky jednoznačnému a vysokému kontrastu mezi pozorovanými objekty a pozadím jsou snímky jednodušeji segmentovatelné. QPI tedy umožňuje studovat jednotlivé buňky, jejich fenotypy a heterogenitu i vývoj v čase robustněji. V porovnání se zkoumáním pouze průměrných hodnot celých populací buněk má studium charakteristik jednotlivých buněk možnost citlivěji rozlišovat a lépe tak porozumět různým biologickým dějům [11].

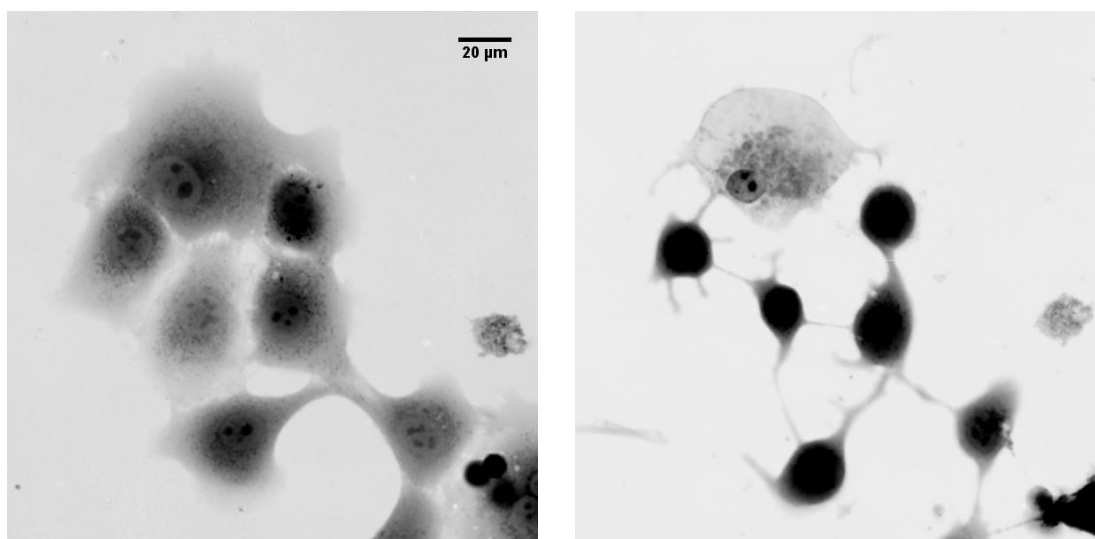
Správná segmentace je základním předpokladem pro správné vyhodnocení jak tvarových, tak dynamických charakteristik jednotlivých buněk a má tedy vliv na následnou biologickou interpretaci získaných dat. Výběr vyhodnocovaných tvarových, fázových a dynamických charakteristik probíhal na základě testování parametrů měřených ve volně dostupných softwarcích (ImageJ, CellProfiler) a dle požadavků kolegů biologů pro testované biologické aplikace.

Vybraná segmentační metoda a vyhodnocované tvarové, fázové i dynamické charakteristiky QPI byly následně začleněny přímo do ovládacího programu mikroskopu MHM Q-PHASE, na jehož testování jsem se osobně podílela.

2.1 Modelový experiment

Jako modelový experiment byla použita data z prvních šesti hodin měření životních cyklů buněk, která vzhledem k poruše vytápění boxu mikroskopu nebylo možné použít k původnímu záměru. Vlivem zvýšení teploty došlo k výrazným morfologickým změnám buněk a jejich následné smrti. Pro experiment byly použity buňky označované jako NMuMG/Fucci2, které byly kultivovány ve standardním médiu DMEM za teploty 37 °C a při 5 % CO₂.

Počáteční a koncový stav buněk modelového experimentu ukazuje obr. 2.

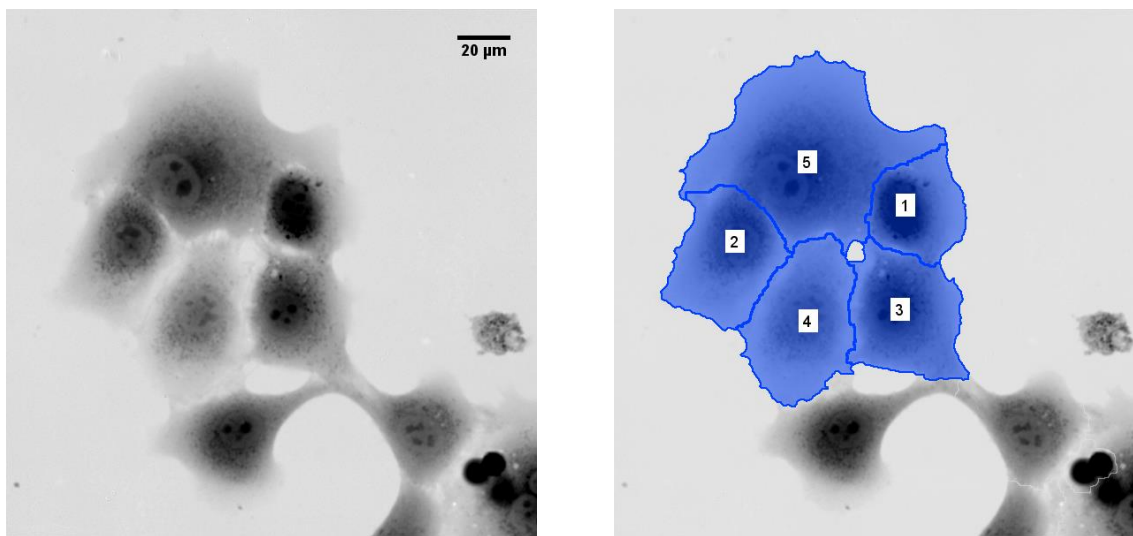


Obr. 2: Počáteční a koncový stav buněk modelového experimentu (časový rozdíl mezi snímky je 6 hodin), pro které byly vyhodnocovány tvarové a dynamické charakteristiky. Objektivy 20×/0,5, invertované zobrazení fáze (tmavší odstíny šedé odpovídají větším fázovým posuvům).

2.2 Segmentace

Segmentace je klíčovým krokem při vyhodnocování QPI živých buněk. QPI získané pomocí CCHM poskytuje po nutných procesech navazování a kompenzace fáze, popsaných v [12, 13, 14], již zobrazení vhodné pro samotnou segmentaci. Živé buňky, v klasických metodách mikroskopie nekонтastní fázové objekty, jsou v QPI zachyceny ve velmi dobrém kontrastu, kdy hodnoty fázového posuvu fluktuují kolem nuly odpovídají pozadí a vyšší hodnoty potom sledovaným živým buňkám. Rozdělení hodnot signálu v zobrazení je tedy bimodální a umožňuje použití jednoduchých segmentačních metod, jako jsou prahování nebo watershed [15, 16, 17].

V této práci byla pro segmentaci využívána metoda watershed [17]. Ukázka segmentace shluku buněk modelového experimentu touto metodou je na obr. 3.



Obr. 3: Ukázka segmentace shluku buněk v modelovém experimentu metodou watershed, hranice mezi buňkou a pozadím je $0,04 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$, objektivy $20\times/0,5$, invertované zobrazení.

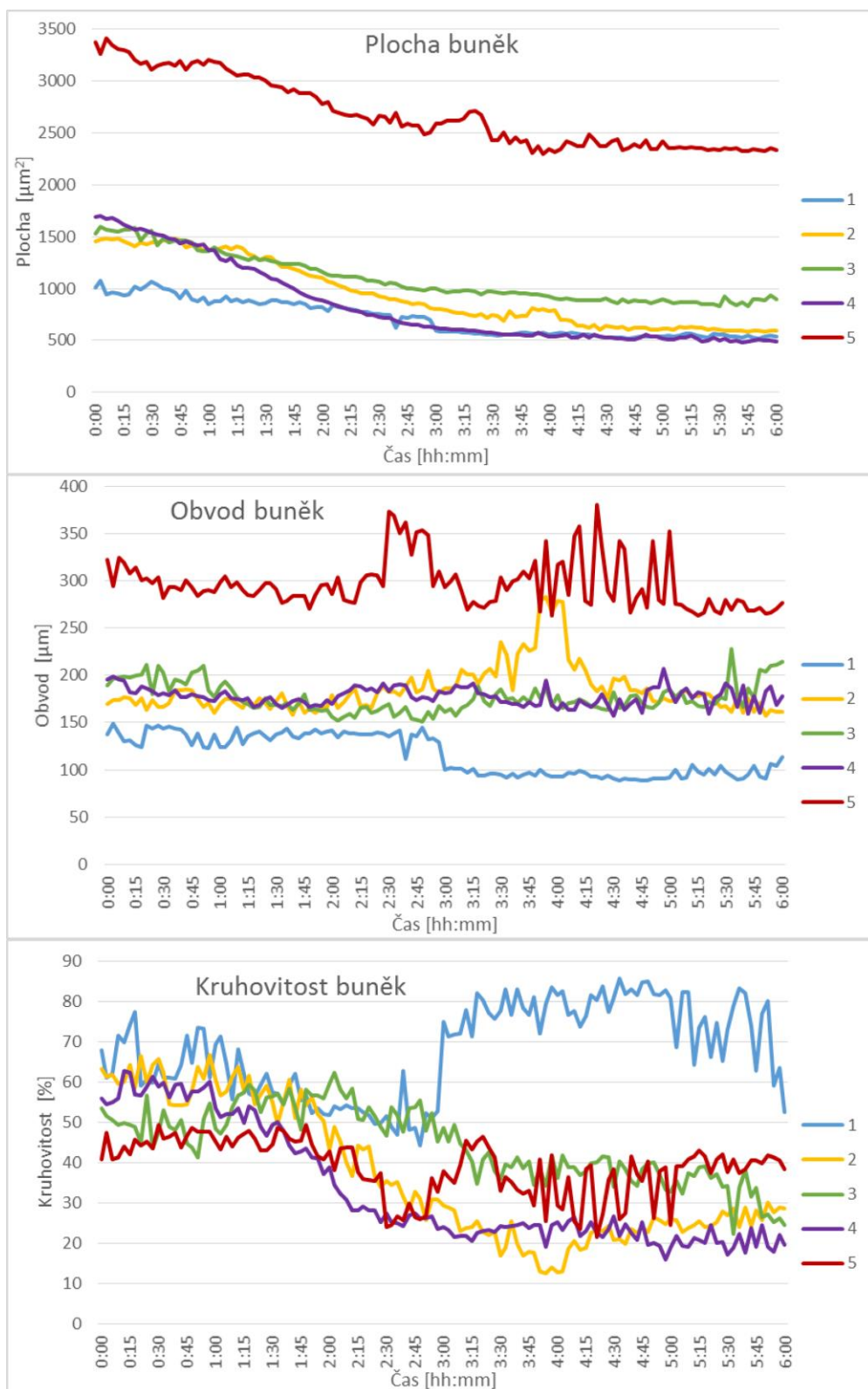
2.3 Vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik

V současné době lze pomocí ovládacího softwaru MHM Q-PHASE analyzovat tyto vybrané

- **tvarové charakteristiky:**
 - plocha buňky S – plocha projekce buňky do obrazové roviny,
 - obvod buňky o – obvod projekce buňky do obrazové roviny,
 - kruhovitost buňky C – určuje odchylku tvaru projekce buňky od kruhového tvaru v závislosti na ploše buňky a obvodu buňky podle vztahu $C = 4\pi S/o^2$, hodnotě $C = 1$ odpovídá kruh,
- **dynamické charakteristiky:**
 - trajektorie buňky – geometrická čára, kterou při pohybu opisuje projekce těžiště buňky, jehož poloha je vypočtena s využitím naměřené distribuce suché hmoty buňky,
 - celková uražená vzdálenost buňkou – délka trajektorie buňky,
 - směrovost pohybu buňky – poměr vzdálenosti počátečního a koncového bodu trajektorie buňky a celkové uražené vzdálenosti udávaný v procentech.

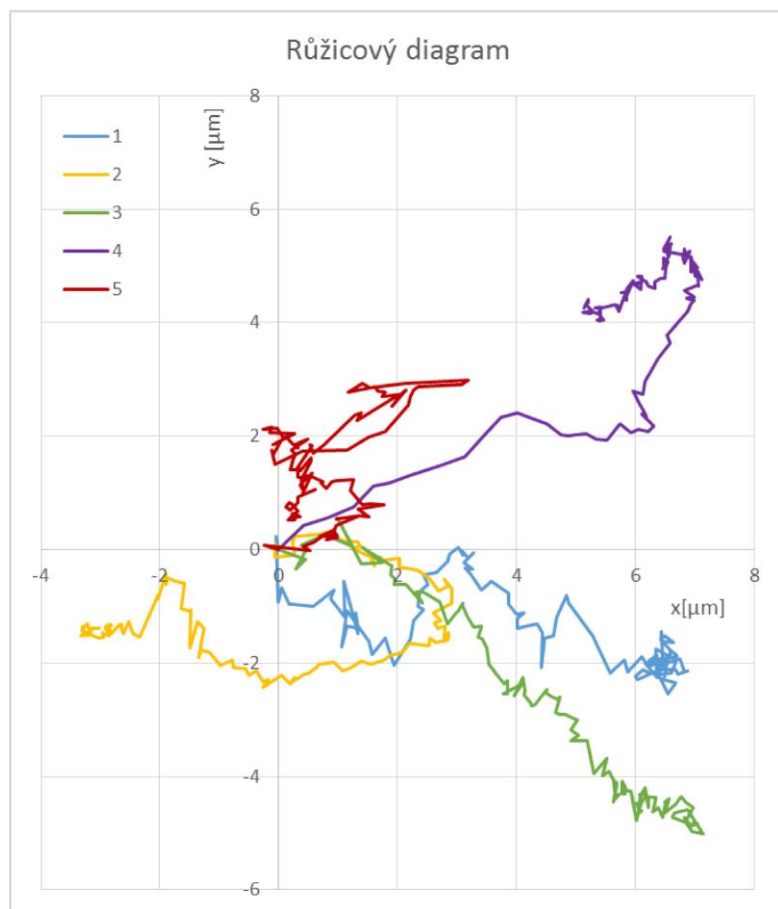
Průběh vyhodnocovaných tvarových charakteristik vybraných buněk modelového experimentu (obr. 3) ukazuje obr. 4, dynamické charakteristiky jsou zachyceny na obr. 5.

Z grafů na obr. 4 je zřejmé, že během modelového experimentu (viz. část 2.1) se plocha všech buněk zmenšila, zatímco hodnota jejich obvodu zůstala téměř nezměněna. To znamená, že tvar buněk se stal členitějším a naznačuje to také určitou degeneraci buněk. Parametr kruhovitost vykazuje zvýšení u buňky 1, která se oproti ostatním výrazně zakulatila.



Obr. 4: Průběh tvarových charakteristik vybraných buněk modelového experimentu.

Trajektorie buněk znázorňuje růžicový diagram na obr. 5. Ukazuje, že všechny buňky se během experimentu pohybovaly velmi málo, jen o několik μm . Hodnoty celkové uražené vzdálenosti jednotlivých buněk a směrnosti jejich pohybu jsou uvedeny v tabulce. Největší směrnost vykazovala buňka 3, nejmenší buňka 5, která se první polovinu experimentu pohybovala jedním směrem a druhou polovinu směrem opačným.



Buňka	Celková uražená vzdálenost [μm]	Směrnost pohybu [%]
1	29,7	23
2	20,7	17
3	24,1	35
4	21,8	31
5	25,6	2

Obr. 5: Trajektorie pohybu vybraných buněk modelového experimentu v podobě růžicového diagramu a tabulka hodnot celkové uražené vzdálenosti a směrnosti pohybu těchto buněk.

2.4 Vyhodnocování fázové informace

V metodách nazývaných společně QPI nebo kvantitativní fázová mikroskopie je fázový posuv způsobený pozorovaným vzorkem přesně měřen.

Fázový posuv koresponduje s optickým dráhovým rozdílem, který je určen indexem lomu buňky a výškou buňky [18], vliv těchto parametrů však nelze jednoduše zkoumat samostatně. Pro odlišení příspěvku indexu lomu buňky a výšky buňky byly vyvinuty různé metody [5, 19, 20, 21]. Vztah mezi fázovým posuvem a plošnou hustotou suché hmoty buňky v daném místě je však přímočarý a odlišení příspěvku indexu lomu a výšky buňky pro přepočítání fázového posuvu na suchou hmotu buňky není třeba. Schéma znázorňující fázový posuv (nebo také deformaci vlnoplochy) je znázorněno na obr. 1.

2.4.1 Vztah QPI a suché hmoty buňky

Suchá hmota buňky je tvořena jejím bezvodým obsahem a byla definována jako hmotnost buňky po odpaření vody. Suchá hmota buňky je tvořena biomolekulami proteinů, lipidů, nukleových kyselin a sacharidů [4].

Hodnota specifického refrakčního přírůstku, která je definována jako poměr změny indexu lomu a změny koncentrace, je pro většinu biomolekul velmi podobná. Proto je možné hodnoty specifického refrakčního přírůstku nahradit jedinou průměrnou hodnotou a z ní vycházet při přepočtu fázového posuvu způsobeného buňkou na její hmotu [18]. Přírůstek indexu lomu pak odpovídá přírůstku suché hmoty buňky. Index lomu je tedy přímo úměrný suché hmotě buňky a konstanta úměrnosti α je nazývána specifický refrakční přírůstek [22].

Celková suchá hmota buňky je pak dána integrálem přes plochu buňky [23]:

$$m = \iint \left[\frac{OPD}{(100-\alpha)} \right] dA,$$

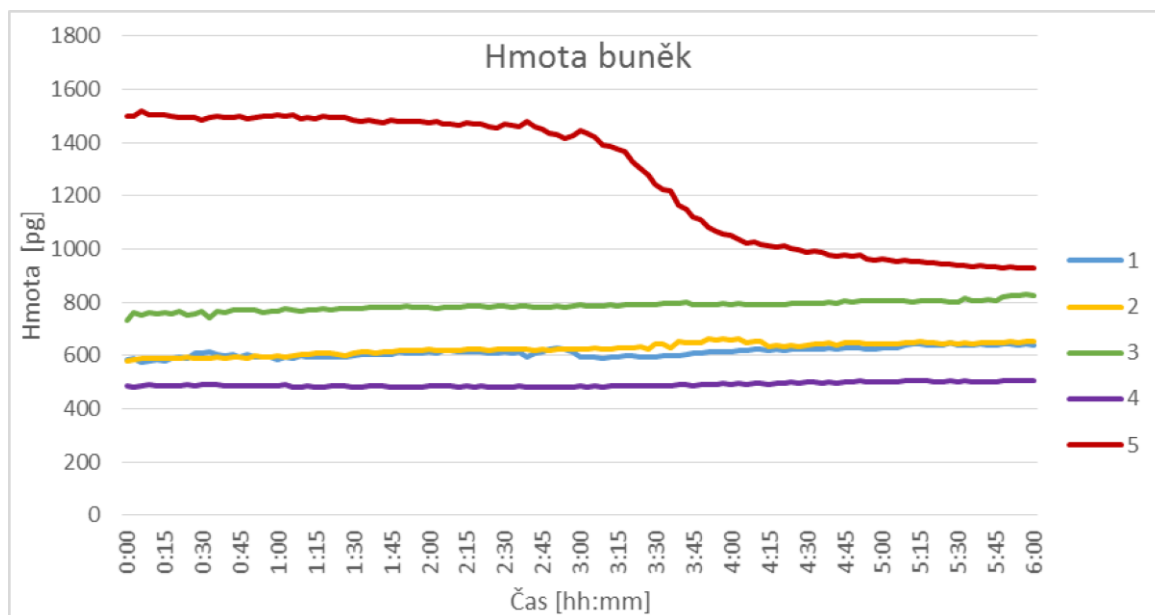
kde m je celková suchá hmota buňky v pg, OPD je optický dráhový rozdíl měřený v μm , α je specifický refrakční přírůstek v $\mu\text{m}^3/\text{pg}$ a A je plocha buňky v μm^2 . Uvedený vztah platí pro živé buňky ve vodných médiích.

Hodnota průměrného specifického refrakčního přírůstku je obvykle aproximována hodnotou:

$$\alpha = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}.$$

Použití celkové suché hmoty buňky je oprávněně především při měření a porovnávání hmoty buněk mezi jednotlivými populacemi nebo při zkoumání časového vývoje hmoty buněk, kdy je důležitější relativní poměr, či změna hmoty a ne její absolutní hodnota. Interpretace fázového posuvu jako suché hmoty buňky je často používána v biologických aplikacích QPI a lze ji najít například v [22, 23, 24, 25, 26]. V dalším textu budeme suchou hmotu buňky označovat zkráceně jako hmotu buňky.

Na obr. 6 je ukázka vývoje hmoty buněk v modelovém experimentu, kde vzhledem k prasknutí a vylití obsahu buňky 5 do jejího okolí hmota buňky výrazně poklesla. Hmota ostatních buněk navzdory nepříznivým kultivačním podmínkám modelového experimentu dokonce po celou dobu pozorování mírně rostla.



Obr. 6: Vývoj hmoty vybraných buněk během modelového experimentu.

2.5 Metoda dynamických fázových diferencí (DPD)

Základy metody DPD byly navrženy již v práci dr. Hany Uhlířové [27] a dále pak rozšířeny v mojí diplomové práci [28]. V rámci mého doktorského studia jsme metodu dále optimalizovali, především jsme specifikovali vstupní data metody a stanovili limit nejmenší možné detekovatelné změny daný šumem v časové sekvenci obrázků. Metodu jsme použili při studiu osmotických jevů a získané výsledky jsme publikovali [29].

Pokročilý výpočet zahrnuje segmentaci buňky a pozadí a díky tomu umožňuje také zviditelnění hranic buňky a rozšíření barevného kódování DPD o barvy pro oblast opuštěnou a nově zabranou buňkou.

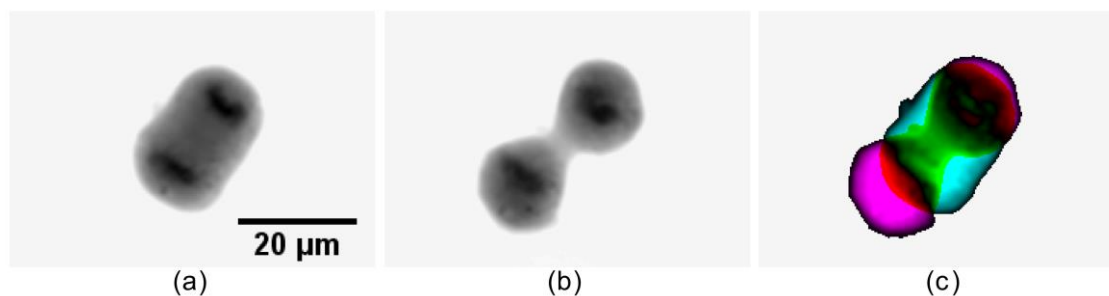
Předpokládáme časovou sekvenci o N snímcích kompenzované fáze se segmentovanou buňkou a pozadím, potom hodnoty DPD jsou dány rovnicí (maticový výpočet):

$$DPD_{i+k} = \varphi_{i+k} - \varphi_i,$$

kde φ_i je fázový snímek i , k je krok výpočtu. DPD_{i+k} lze počítat s libovolným krokem k , pokud je krok k menší než počet snímků N v sekvenci.

V obrazové reprezentaci jsou záporné hodnoty DPD znázorněny zelenou barvou a představují úbytek suché hmoty buňky v daném místě. Kladné hodnoty DPD jsou znázorněny červenou barvou a představují přírůstek suché hmoty v daném místě. Intenzita barvy odpovídá velikosti změny. Pozadí je znázorněno bílou barvou. Aby bylo možné rozeznat opuštěnou oblast a oblast nově zabranou buňkou, byla do základního barevného kódu DPD přidána další barva – modrá. Modrá barva je přiřazena těm místům, kde právě jeden z fázových snímků φ_i , φ_{i+k} má nulové hodnoty. V těchto místech je vždy také už červená nebo zelená barva, v RGB zobrazování se tedy opuštěná oblast zobrazí v tyrkysové barvě (modrá a zelená) a nově zabraná oblast se zobrazí ve fialové barvě (červená a modrá).

Příkladem biologické situace, k jejímuž vyhodnocení může být metoda DPD využita, je mitóza. Pro ilustraci metody DPD je zde uveden obrázek s velkým časovým krokem mezi odčítanými snímky, takže rozdíl mezi oběma obrazy je pro větší názornost patrný i okem.



Obr. 7: Dělení buňky znázorněné metodou DPD s krokem 240 s, objektivy 20×/0,40. QPI buňky v (a) anafázi a (b) cytokinezi; (c) DPD reprezentace přesunu hmoty během přeměny buňky z (a) do (b).

Na snímcích v obr. 7 lze vidět přechod buňky od anafáze (a) do cytokineze (b) v QPI. V anafázi dochází k rozdělení chromozomů a buňka má prodloužený tvar. V cytokinezi je buňka ještě více prodloužena, tvoří se krček a obnovuje se zde buněčná membrána. Na obr. 15(c) je tato změna zachycena metodou DPD. Nově obsazené oblasti buňky jsou vykresleny fialově, oblasti s přírůstkem hmoty červeně, opuštěné oblasti v okolí krčku jsou zachyceny tyrkysovou barvou a oblasti s úbytkem hmoty zelenou barvou. V experimentech uvedených v části 5 je pro metodu DPD zvolen kratší interval mezi dvěma fázovými snímky a význam metody je zřetelnější. V části 6 je pak uvedena aplikace zjednodušené verze metody DPD pro analýzu dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech.

3 Zobrazování pomocí CCHM ve 3D prostředích

Současným trendem v moderní biologii je nejen změna přístupu od fixovaných vzorků a různých tkáňových řezů přímo k *in vivo* analýze, ale v případě *in vitro* studií také přechod od 2D kultivací ke kultivacím v komplexnějších 3D prostředích [30]. Kritériím detekce roviny zaostrění v transmisní digitální holografické mikroskopii pro amplitudové i fázové objekty se věnuje článek [31].

3.1 Závislost zobrazení na stupni prostorové koherence osvětlení

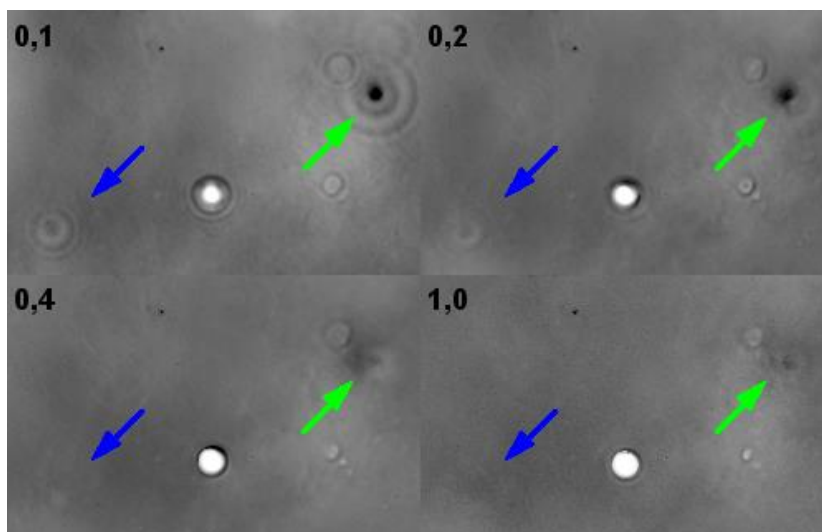
V CCHM s procházejícím světlem nelze navodit vznik optických řezů obdobných konfokální mikroskopii. Lze však uvažovat vznik zobecněných optických řezů. Za tloušťku zobecněného optického řezu je přitom považován dvojnásobek osové polohy z_s 2D objektu, v níž je zcela utlumen přenos některé prostorové frekvence [32].

V článku [32] je odvozena závislost tloušťky zobecněného optického řezu z_s^* na faktoru částečné koherence

$$\sigma = NA_s/NA,$$

kde NA_s je numerická apertura osvětlení a NA je numerická apertura objektivu.

Vliv faktoru částečné koherence σ na zobrazení rozostřených objektů jsme testovali na vzorku polystyrenových kuliček o průměru $(5,0 \pm 0,3) \mu\text{m}$ (Duke Standards™), které byly přimíchány do kolagenového gelu místo suspenze buněk. Index lomu polystyrenových kuliček podle specifikace výrobce je 1,59. Index lomu kolagenového gelu 1,34 jsme změřili na Abbeově refraktometru. Prostorová koherence osvětlení byla regulována pomocí aperturní clony měnící hodnotu apertury osvětlení NA_s . Experimentální QPI takto připraveného vzorku pro σ rovné 0,1; 0,2; 0,4; a 1,0 jsou na obr. 8. Šípkami je vyznačena rozostřená kulička (zelená šipka) a jiný drobný objekt (modrá šipka), které jsou dobře viditelné pro $\sigma = 0,1$, tedy pro nejširší optický řez. Pro vyšší σ se tyto objekty postupně stávají méně viditelnými.



Obr. 8: QPI polystyrenových kuliček v kolagenu pro různé faktory částečné koherence σ . Šípkami je vyznačena rozostřená kulička (zelená šipka) a jiný drobný objekt (modrá šipka), které jsou dobře viditelné pro σ rovné 0,1, tedy pro nejširší optický řez, zatímco pro vyšší σ se tyto struktury postupně stávají méně viditelnými.

Z teorie odvozené v [32] vyplývá, že rostoucí hloubka optického řezu se projeví až při nižším faktoru částečné koherence σ . To potvrdily i experimentální výsledky.

3.2 Zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření

Studium zobrazování vzorku v různých rovinách zaostření přispívá jednak k lepšímu porozumění celému zobrazovacímu procesu a jednak následně umožňuje využít získaná data pro 3D zobrazování.

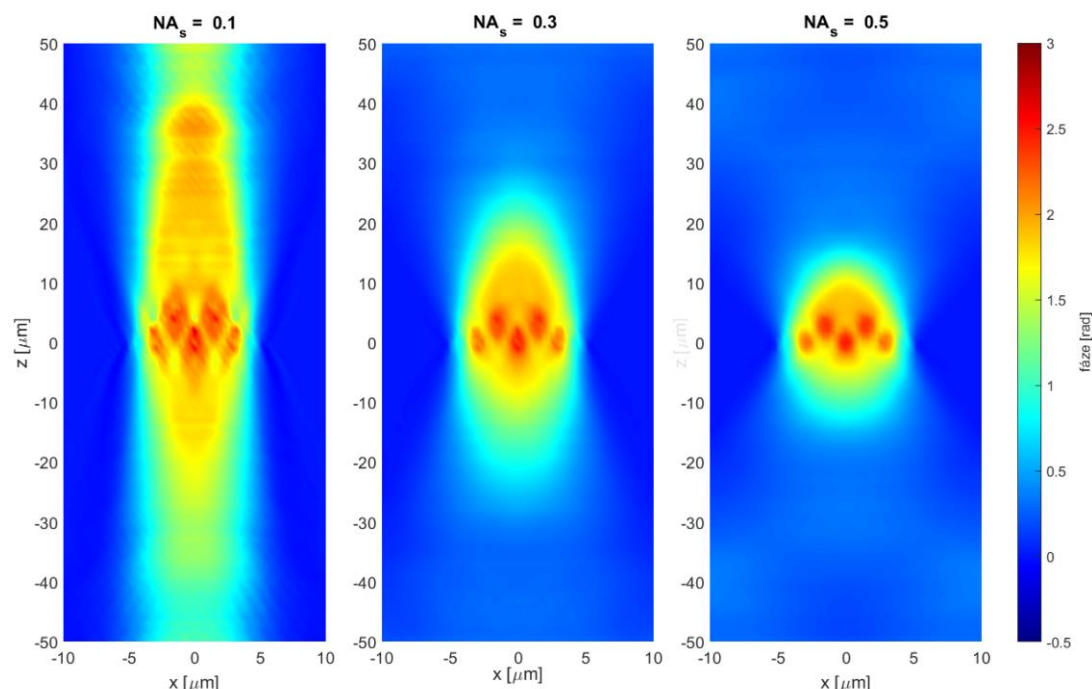
V následujících odstavcích je posuzována možnost docílení 3D zobrazení při použití CCHM pomocí omezení prostorové koherence osvětlení a pomocí dodatečné filtrace prostorových frekvencí. Obě metody jsou hodnoceny pomocí numerického modelování a metoda dodatečné filtrace prostorových frekvencí i experimentálně.

3.2.1 Numerický model

Objemovými vzorky, které nelze považovat za slabě rozptylující, jsou také živé buňky. Je proto třeba je buď aproximovat 2D funkcí propustnosti, nebo rozptyl světla modelovat pomocí přesnějšího přístupu. Toto numerické modelování, s nímž jsme porovnávali výsledky testovacích experimentů, provedl na základě teoretických výpočtů prof. Radima Chmelíka v Rytovově aproximaci [32] prof. Jiří Petráček v programu Matlab.

Použitý model buňky lze popsat jako polokouli o poloměru $5\ \mu\text{m}$ (tělo buňky), ve které je umístěno 5 menších kuliček. Hodnota indexu lomu těla buňky byla nastavena na 1,37 a hodnota indexu lomu menších kulových struktur uvnitř těla buňky na 1,41. Indexy lomu tak odpovídají běžně udávaným hodnotám pro cytoplazmu buňky (1,37) [33, 34] a hmotnější kulové struktury v modelu odpovídají hodnotám udávaným například pro mitochondrie buněk (1,41) [33, 34].

Zobrazení bylo modelováno pro osvětlení vlnovou délkou $650\ \text{nm}$, pro různé hodnoty numerické apertury osvětlení NA_S a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$.



Obr. 9: Numericky vypočtené zobrazení buňky pro různé hodnoty numerické apertury osvětlení NA_S a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$. S rostoucí NA_S , tedy i s rostoucím faktorem částečné koherence σ , klesá šířka zobecněného optického řezu. Jinými slovy, oblast ve směru osy z , v níž se zobrazení modelové buňky významně projevuje, je menší pro větší NA_S .

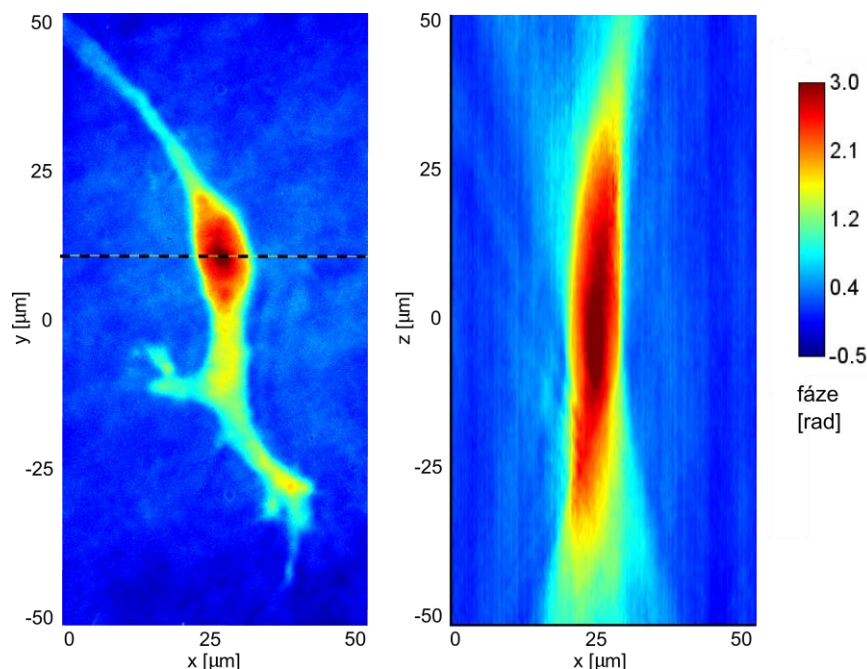
Ze zobrazení získaných modelováním (obr. 9) je zřejmý podstatný vliv parametru NA_S , který charakterizuje prostorovou koherenci osvětlení, na to, v jaké vzdálenosti od roviny zaostření je buňka ještě zobrazována. S rostoucí NA_S , tedy i s rostoucím faktorem částečné koherence σ , viditelně klesá šířka zobecněného optického řezu. Oblast ve směru osy z , ve které se zobrazení buňky významně projevuje, je menší pro větší hodnoty NA_S . Prodlužování zobrazení předmětu v ose z s klesající NA_S je typickým znakem zobrazování v širokém poli oproti zobrazování konfokálnímu. Čím větší osvětlovací aperturu NA_S tedy použijeme, tím více přibližujeme charakter zobrazování CCHM konfokálnímu.

3.2.2 Experiment

Pro reálný experiment byla použita buněčná linie HT1080. Buňky byly kultivovány ve standardních kultivačních podmínkách (37 °C a 5 % CO₂) v mediu DMEM obohaceném o 10 % FBS a 0,1 % ciprofloxacin. Buňky byly poté připraveny na koncentraci 1×10^6 buněk/ml v mediu DMEM bez fenolové červeně a s 10 % FBS. Pufrovaný roztok byl smíchán s vodou pro tkáňové kultury a roztokem 1 mg/ml bovinního kolagenu. Buněčná suspenze byla přidávána v poměru 1:10. Směs byla umístěna do komůrek μ -Slide Angiogenesis (Ibidi) a tuhnutí gelu probíhalo při 37 °C. Po ztuhnutí gelu byly připravené vzorky doplněny médiem a přikryty krycím sklíčkem.

Následně byla v mikroskopu vybrána buňka vhodná pro testovací zobrazení. Preferovali jsme buňku protáhlého tvaru, ležící v jedné rovině a menší než zorné pole. Vybraná buňka byla zobrazena v rozsahu ± 50 μ m od předpokládané roviny zaostření s krokem 1 μ m mezi jednotlivými snímky. Pro zobrazení byly použity objektivy Nikon Plan Apo 40 \times /0,95 a aperturní clona byla zcela otevřená, využívala se tedy celá numerická apertura kondenzorů, která je nominálně rovna $NA_S = 0,52$.

Ukázka zobrazení buňky z předpokládané roviny zaostření $z = 0$ a řez snímky z různých rozostření dle naznačené linie je na obr. 10.



Obr. 10: Zobrazení buňky v kolagenovém gelu s numerickou aperturou osvětlení $NA_S = 0,52$ a numerickou aperturu objektivu $NA = 0,9$ v předpokládané rovině zaostření $z = 0$ a řez x - z dle zobrazené linie.

Výsledky z numerické simulace zobrazení a reálného experimentu jsou na obr. 9 a obr. 10 zachyceny ve stejné barevné škále a stejném rozsahu. Je tedy možné je dobře porovnat.

Můžeme předpokládat, že reálně zobrazovaná buňka má v ose z v místě řezu stejný rozměr jako v ose x , přibližně $12\ \mu\text{m}$, a je tedy dvakrát tlustší než modelová buňka. Dvakrát větší by proto měla být i mezní vzdálenost, ve které se zobrazení buňky významně projevuje. Pro numerickou simulaci takovéto buňky a použité hodnoty NA a NA_S by se zobrazení mělo významně projevovat v rozsahu $\pm 35\ \mu\text{m}$. Hranice reálně zobrazované buňky v ose z by na zobrazeném rozsahu $\pm 50\ \mu\text{m}$ tedy měly být jasně zřetelné. Tak tomu ale není a reálná situace neodpovídá numerické simulaci se stejnými parametry NA a NA_S . Příčinou tohoto nesouladu je patrně skutečnost, že kondenzory použité v CCHM, které určují velikost NA_S , nejsou opticky ekvivalentní, a proto je efektivní NA_S nižší než udávaná hodnota 0,52.

Experimentálně jsme ověřili, že při otevírání aperturní clony holografický signál neroste od hodnoty $NA_S = 0,3$. Efektivní numerická apertura osvětlení nemůže být tedy větší než tato experimentálně získaná hodnota. V tomto případě by se numericky simulované zobrazení odpovídající reálně zobrazované buňce významně projevovalo až do vzdálenosti $\pm 65\ \mu\text{m}$, hranice buňky v ose z by tedy byly mimo zobrazovaný rozsah. Pro hodnotu $NA_S = 0,3$ jsou si již numericky simulované a experimentální zobrazení bližší.

Pro další přiblížení experimentálního zobrazení numerické simulaci byla vyzkoušena metoda filtrace prostorových frekvencí.

3.2.3 Filtrace prostorových frekvencí

Podle teorie odvozené v článcích [2, 32] se při zobrazování pomocí CCHM s faktorem časťčné koherence $\sigma \geq 1/3$ při rozostřování nejrychleji tlumí střední normovaná prostorová frekvence Q^* .

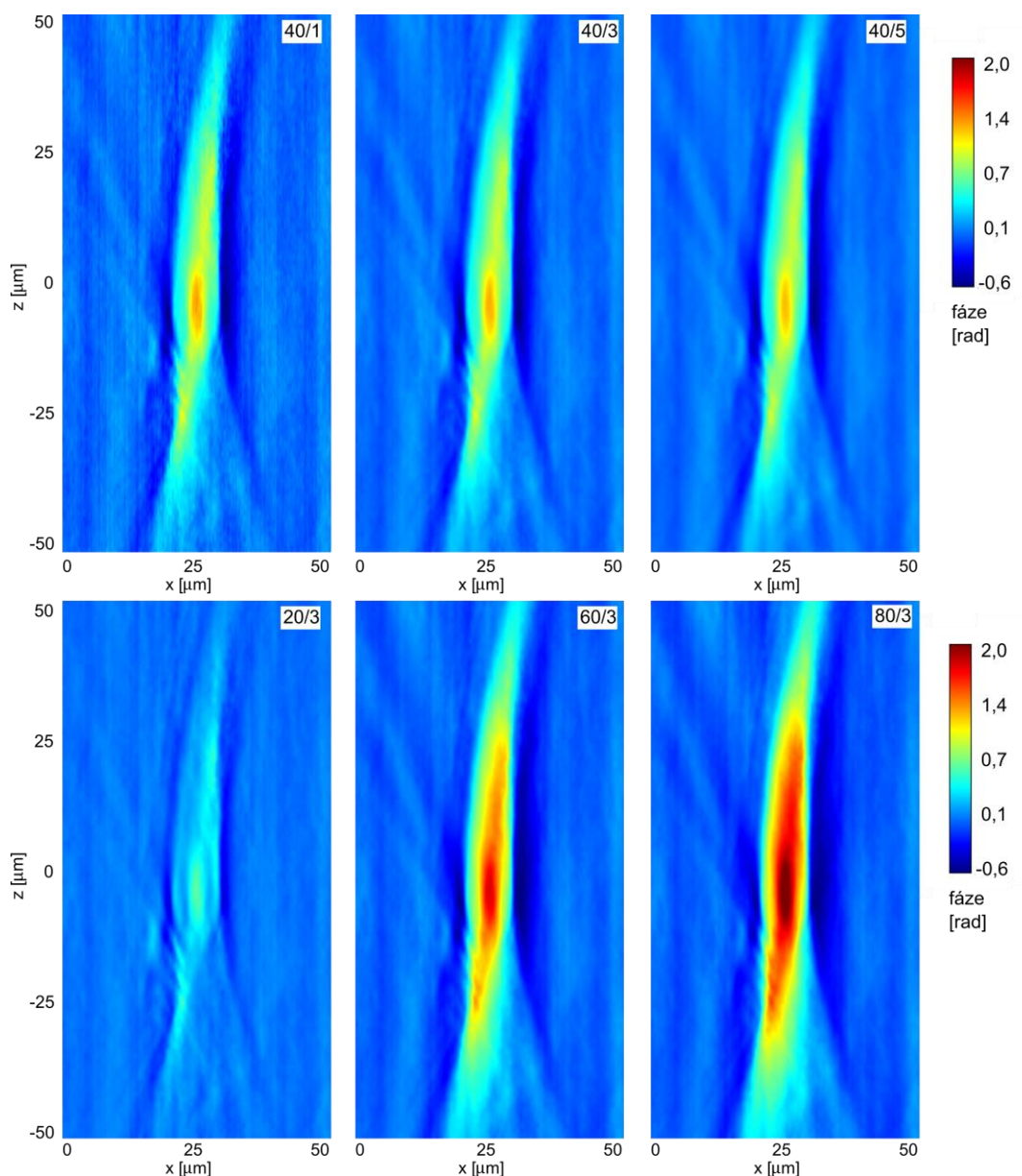
Pro zobrazení získané pomocí CCHM by podle této teorie mělo být pro ztenčení zobecněného optického řezu vhodné zesílení normované nejrychleji tlumené frekvence Q^* a potlačení frekvencí nižších a vyšších. Tato teorie byla aplikována jak na numerický model zobrazení buňky pomocí CCHM (výsledky nejsou prezentovány ve zkrácené verzi práce), tak přímo na experimentální zobrazení buňky v CCHM.

V našem případě byla filtrace prostorových frekvencí prováděna v programu ImageJ pomocí funkce *Bandpass filter* [35]. Na experimentálních datech probíhala filtrace pro každý snímek x - y fázového signálu zvlášť a z filtrovaných snímků byl pak vytvořen výsledný řez x - z fázového signálu.

Použitím funkce *Bandpass filter* je nejprve provedena Fourierova transformace snímku a na tu je následně aplikován pásmový filtr. Pomocí zpětné Fourierovy transformace jsou zpět získány filtrované snímky. Hranice propustnosti pásmového filtru jsou v programu ImageJ zadávány jako rozměry struktur, které mají být filtrovány, v pixelech. Filtry v této práci označuji jako A/B, kde parametr A označuje nejmenší velikost filtrovaných velkých struktur a parametr B největší velikost filtrovaných malých struktur. Hranice propustnosti použitého pásmového filtru nejsou ostré.

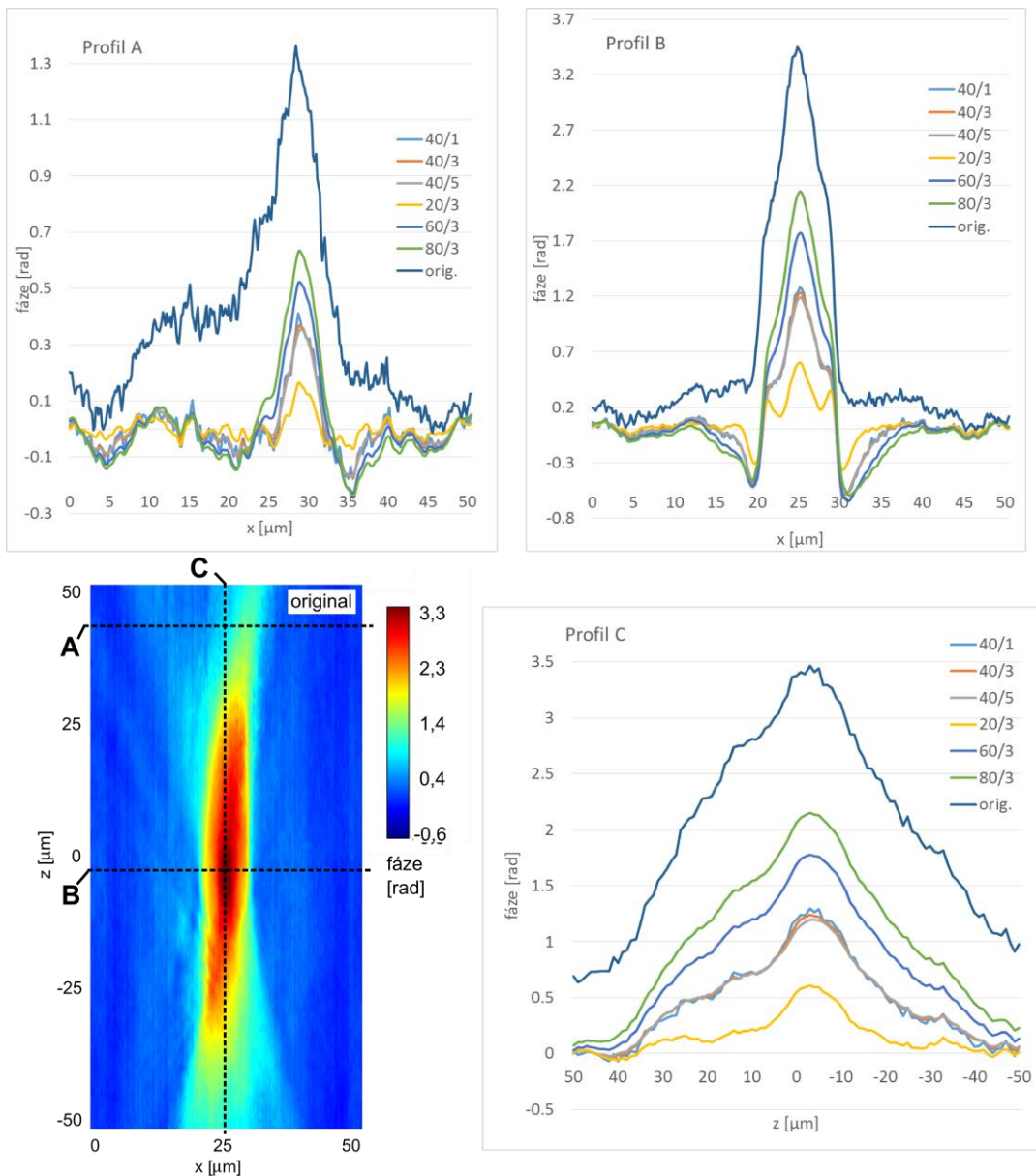
Výsledky filtrace experimentálních dat pásmovým filtrem s různými parametry A/B jsou zachyceny na obr. 11. Porovnání s původními experimentálními daty je pak na obr. 12.

Stejně jako u numerické simulace zobrazení buňky omezuje provedená filtrace prostorových frekvencí rozsah hodnot filtrovaných snímků, proto jsou filtrované snímky kvůli kontrastu zobrazeny v užším rozsahu hodnot. Výsledky filtrace experimentálních dat jsou taktéž hodnoceny pomocí fázových profilů podél naznačených linií A, B a C.



Obr. 11: Výsledky filtrace prostorových frekvencí pásmovým filtrem s různými parametry A/B na experimentálních datech.

Fázové profily filtrovaných dat podél linie A vykazují zúžení především v oblasti levého okraje buňky, kde potlačují původní rozostřené zobrazení. U pravého okraje buňky lze u filtrů 60/3 a 80/3 pozorovat propad do záporných hodnot a vznik nežádoucího artefaktu. Filtry 40/1, 40/3 a 40/5 dávají velmi podobné výsledky. U profilu podél linie B lze u všech filtrů pozorovat mírné zúžení profilu buňky. Výrazný je však také propad do záporných hodnot při vnějších okrajích buňky. U filtru 20/3 navíc vznikají u okrajů buňky falešné struktury. Vyhodnocení profilu podél linie C ukazuje v případě filtrovaných dat pokles hodnot fáze k nulovým hodnotám. Hranice buňky jsou ostřejší, zúžení zobecněného optického řezu však dosaženo nebylo.



Obr. 12: Porovnání s původními daty. Grafy porovnávají fázové profily podél naznačených linií filtrovaných a původních dat.

Pomocí filtrace prostorových frekvencí na experimentálních datech se podařilo částečně eliminovat rozostřené zobrazení v rovinách vzdálenějších od roviny zaostření. Nevýhodou je však vznik artefaktu, který je podobný halo efektu známému u Zernikova fázového kontrastu, či vznik falešných struktur při okrajích buňky. Filtrace prostorových frekvencí oproti očekáváním vycházejícím z teorie zobrazení pomocí CCHM nezúžila šířku vznikajícího zobecněného optického řezu.

4 Aplikace metod při analýzách buněčných smrtí

Typy buněčných smrtí jsou obvykle určovány pomocí průtokové cytometrie (FC – flow cytometry), kde však absence analýzy morfologie buněk vede k chybám v určení typů buněčné smrti především v důsledku podhodnocení onkózy. Onkóza přitom vykazuje potenciální reverzibilitu, a proto je její správné určení jedním z mnoha hlavních úkolů moderní medicíny [36]. QPI umožňuje kontrastně vizualizovat změny v morfologii buněk v čase, a tyto změny mohou být i kvantitativně vyhodnocovány, měřeny. Přepoččet fázového posuvu na suchou hmotu buňky navíc umožňuje usuzovat na viabilitu pozorovaných buněk. S těmito nově získanými informacemi je možné zpřesnit identifikaci různých typů buněčných smrtí a získané výsledky pak dále využít v navazujícím výzkumu léčby nádorů a rezistence k terapii.

Výzkumem typů buněčných smrtí pomocí QPI se zabývají publikace [37, 38], které byly připraveny ve spolupráci s dr. Janem Balvanem z Masaříkovy laboratoře výzkumu rakoviny Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Všechny prezentované výsledky QPI jsme měřili na MHM Q-PHASE instalovaném v Laboratoři experimentální biofotoniky na VUT v Brně. Ve všech experimentech zmiňovaných v této kapitole byly použity buňky PC-3. Buňky byly kultivovány v Ham's F12 mediu doplněném o penicilin (100 U/ml) a 7 % FBS za teploty 37 °C a při 5 % CO₂. Před samotným pozorováním byly pak buňky ovlivněny roztokem plumbaginu (2 μM) v dimethylsulfoxidu (DMSO).

4.1 Porovnání metody QPI a FC

V prvně zmíněném článku [37] jsme provedli porovnání metod QPI a FC pro identifikaci různých typů buněčných smrtí indukovaných působením látky plumbagin.

Pomocí časového pozorování v QPI byly identifikovány tři populace buněk:

- buňky viabilní, beze změny plochy (označené modrou barvou);
- buňky apoptotické, se zmenšenou plochou (označené zelenou barvou);
- buňky nekrotické a onkotické, se zvětšenou plochou (označené červenou barvou).

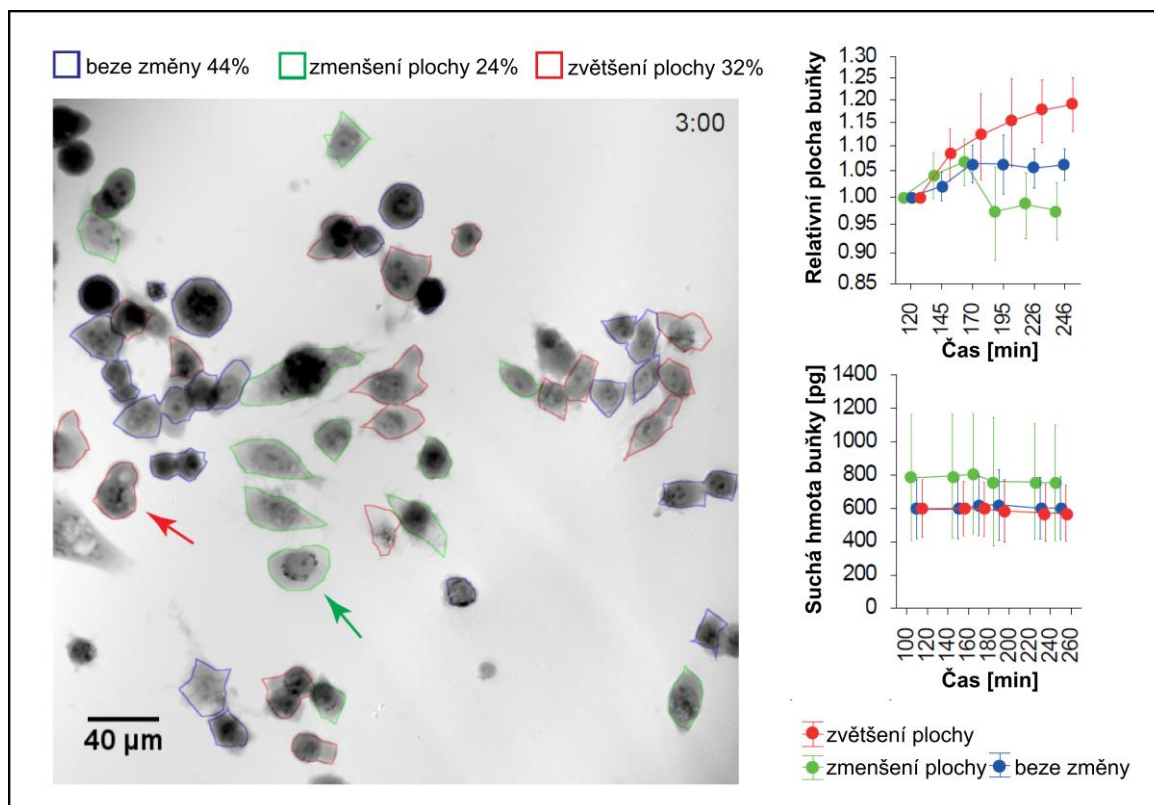
Celková suchá hmota buněk u všech populací zůstala během experimentu neměnná, což při zohlednění délky experimentu a nepřívětivého prostředí ovlivněného látkou plumbagin odpovídá biologickým předpokladům. Snímek z průběhu pozorování s buňkami rozříděnými dle změny plochy a s grafy vývoje plochy buněk a celkové suché hmoty buněk je na obr. 13.

Pro identifikaci různých typů buněčných smrtí pomocí FC jsme použili barvení Annexin V/Propidium jodid. FC třídí buňky do populací podle positivity jednotlivých barviv, buňky byly rozděleny na:

- buňky viabilní – negativní na Annexin V i Propidium jodid;
- buňky pozdně apoptotické a nekrotické – pozitivní na Annexin V i Propidium jodid;
- buňky apoptotické (ale pravděpodobně se v této populaci může vyskytovat i větší počet onkotických buněk) – pozitivní pouze na Annexin V;
- fragmenty nebo poškozené buňky – populace pozitivní pouze na Propidium jodid.

Třídění do jednotlivých populací je tedy odlišné a při třídění nemohou být uvažovány tvarové charakteristiky buněk. Problémem je také smíšená populace apoptotických a onkotických buněk, pozitivní pouze na Annexin V. Pro podrobnější vyhodnocení výsledků z FC lze využít tzv. backgating, při kterém jednotlivé populace rozříděné podle positivity na fluorescenční barvení zobrazíme v rozptylovém diagramu dávajícího do souvislosti boční rozptyl (SSC – side scatter) a přímý rozptyl (FSC – forward scatter). Přímý rozptyl dává informaci o velikosti buňky, menší buňky mají nižší FSC a větší buňky mají vyšší FSC. Při tomto vyhodnocení byly

identifikovány dvě populace buněk pozitivních pouze na Annexin V, kde buňky s nižším FSC (menší) byly identifikovány jako apoptotické a buňky s vyšším FSC (větší) byly identifikovány jako onkotické.



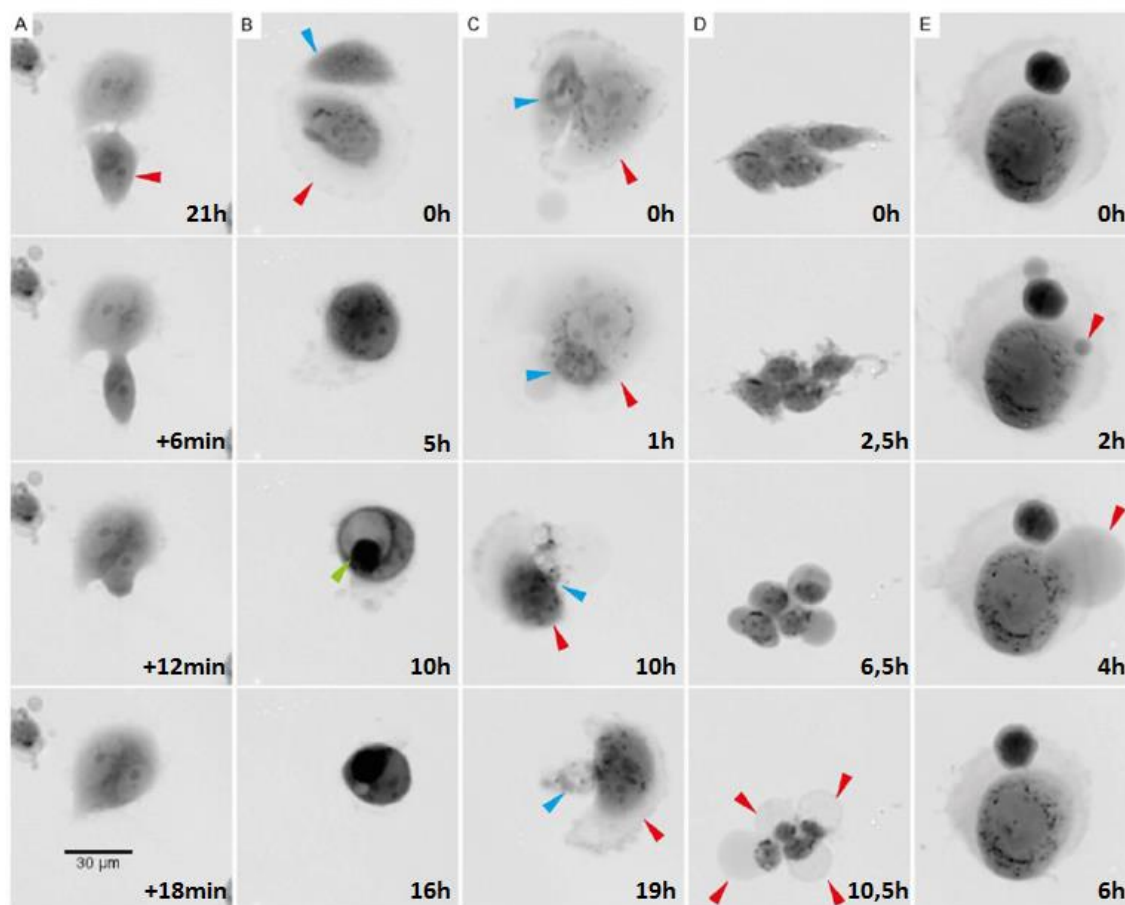
Obr. 13: Výsledky identifikace různých typů buněčné smrti z QPI. Z časového QPI byla vyhodnocena změna plochy a celková suchá hmota jednotlivých buněk. Podle změny plochy byly buňky rozříděny do tří populací: buňky, které svoji plochu nezměnily, 44 %, označené modrou barvou; buňky, které svoji plochu zmenšily, 24 %, označené zelenou barvou; a buňky, které svoji plochu zvětšily, 32 %, označené červenou barvou.

Výsledky získané z časového pozorování v QPI byly porovnávány s výsledky FC. Při porovnání QPI s FC zohledňující pouze barvení buněk se výsledky obou metod lišily. FC totiž výrazně nadhodnocuje populaci apoptotických buněk. Při porovnání QPI s FC po aplikaci backgroundu, který umožnil oddělit populaci onkotických buněk od apoptotických, byla shoda mezi oběma metodami lepší.

Výsledky získané z QPI jsou považovány za významné především proto, že zohledňují morfologické znaky různých typů buněčných smrtí a QPI tak může být považováno za vhodný nástroj k identifikaci právě různých typů buněčných smrtí.

4.2 Mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu

V druhém článku [38] jsme studovali mechanismy resistance buněk vůči oxidativnímu stresu. V QPI bylo provedeno několik pozorování, v kterých se podařilo tyto mechanismy dobře zaznamenat a videa z QPI tak byla podstatnou částí experimentálního materiálu článku. Obsahem článku je především biologický rozbor pozorovaných situací a ověřování souvislosti pomocí dalších metod (FC, měření viability buněk, zobrazování transmisním elektronovým mikroskopem, ...). Pro ilustraci přínosu QPI je zde uveden obr. 14 s charakteristickými znaky jednotlivých mechanismů resistance buněk vůči oxidativnímu stresu.



Obr. 14: QPI mechanismů resistance buněk vůči oxidativnímu stresu. (A) entóza, pohlcená buňka (červená šipka) byla před samotným pohlcením aktivnější, obě buňky byly viabilní po delší dobu než ostatní buňky; (B) pohlcení buňky s kanibalismem, pohlcovaná buňka (modrá šipka) je postupně trávena pohlcující buňkou (červená šipka), vzniká charakteristická struktura označovaná jako „birdeye“ (zelená šipka); (C) kanibalismus bez pohlcení buňky, umírající buňka (modrá šipka) byla napadena a využita kanibalizující buňkou (červená šipka); (D) onkóza, onkotické buňky tvořící typické cytoplazmatické bleby, obvykle vedoucí k nekróze (červené šipky); (E) reverzní onkóza, na počátku vytvořený cytoplazmatický bleb (červená šipka) byl absorbován a buňka zůstala viabilní.

Při vyhodnocování dat nasbíraných pro tento článek byla započata práce na metodice pro identifikaci různých typů buněčné smrti na základě změn tvarových charakteristik a vývoje suché hmoty a souvisejících charakteristik jednotlivých buněk. První výsledky, porovnání typických průběhů křivek apoptózy a onkózy, byly představeny na mezinárodní konferenci [39].

V Masaříkově laboratoři výzkumu rakoviny LF MU je v současnosti instalován jeden z prototypů mikroskopu Q-PHASE, který je intenzivně používán právě k výzkumu buněčných smrtí. Výsledky výzkumu lze najít například v publikaci [40].

5 Aplikace metody DPD při sledování osmotických jevů

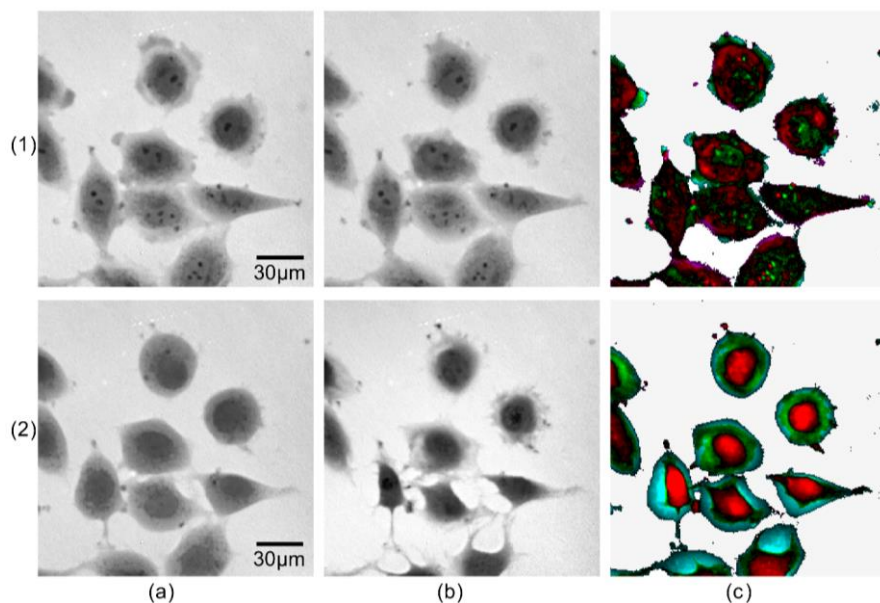
Osmotické jevy byly jako aplikace metody dynamických fázových diferencí vybrány proto, že pomocí změny okolního prostředí buněk můžeme indukovat přesuny hmoty uvnitř buněk. Zároveň se jedná o dostatečně rychlé procesy, takže můžeme vyloučit ostatní změny hmoty, způsobené například růstem nebo strádáním buněk.

Pro naše experimenty byla zvolena buněčná linie LW13K2 [41]. Buňky byly kultivovány ve standardním médiu M1H při 37 °C a 3,5 % CO₂. Pro pozorování v mikroskopu byly buňky nasazeny do průtokových komůrek μ -Slide I (Ibidi). Před samotným pozorováním bylo standardní médium M1H vyměněno za médium F10, které je pro pozorování v našem mikroskopu vhodnější a neobsahuje žádná barviva, která by ovlivňovala index lomu média. Pro hypoosmotický šok bylo toto médium ředěno vodou pro tkáňové kultury v poměru 1:9.

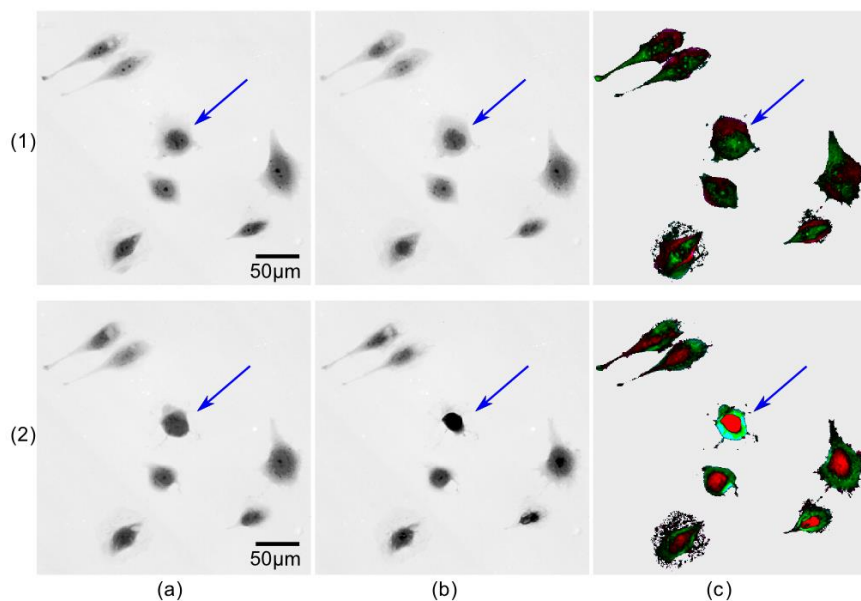
V prvním experimentu bylo během hypoosmotického šoku pozorováno roztahování buněk především v laterálním směru. V první fázi experimentu, tedy při změně prostředí z izotonického na hypotonické nebyly v zobrazení QPI patrné velké změny. Pomocí metody DPD však byly odhaleny výrazné přesuny suché hmoty buňky směrem k jejím okrajům. Při reverzním procesu, tedy změně z hypotonického prostředí na izotonické byl pozorovaný děj výrazně dynamičtější a na jeho konci zaujímaly buňky dokonce menší oblast než na počátku experimentu. Přesuny suché hmoty byly patrné tedy i ze samotného QPI, metoda DPD je však umožnila lépe identifikovat. Metoda DPD byla použita s časovým intervalem 60 s a výsledky jsou zachyceny na obr. 15. V DPD je pro roztažení buňky charakteristická oblast přírůstků suché hmoty při okrajích buněk (červená barva) a úbytků suché hmoty uprostřed buněk (zelená barva). Reverzní smrštění buněk je v DPD charakterizováno úbytky suché hmoty při okrajích buněk (zelené, případně tyrkysové oblasti, pokud buňka zmenšila svoji plochu) a přírůstky suché hmoty uprostřed buněk (červená barva).

Ve druhém experimentu se podařilo identifikovat jednu buňku, která na hypoosmotický šok reagovala intenzivněji než ostatní buňky v zorném poli. Situaci zachycuje obr. 16, kde je buňka vykazující intenzivnější reakci na hypoosmotický šok označena šipkou. QPI snímky a znázornění metodou DPD při změně z izotonického na hypotonické médium je zachyceno v horní části obrázku. Spodní část pak zachycuje reverzní děj, tedy změnu z hypotonického prostředí na izotonické. Ve snímcích z QPI nejsou změny způsobené hypoosmotickým šokem téměř patrné (u neoznačených buněk). Metoda DPD však přesuny suché hmoty uvnitř buněk jasně zviditelňuje. Význam barevného kódování je stejný jako v předchozím obrázku.

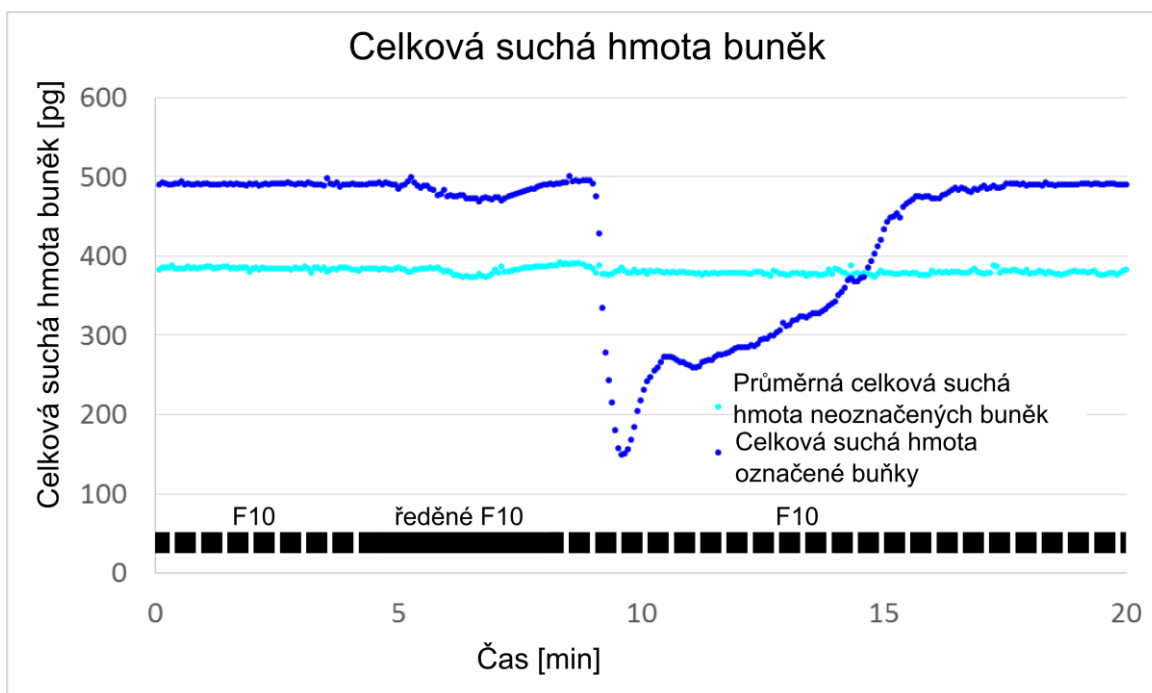
Protože provedené experimenty byly velmi krátké, byly tak vyloučeny ostatní vlivy na přesuny nebo změny obsahu suché hmoty v jednotlivých buňkách. Celková suchá hmota dané buňky by tedy měla zůstat zachována. Pro ověření tohoto biologického předpokladu byla celková suchá hmota jednotlivých buněk v každém okamžiku experimentu vynesena do grafu. Z tohoto grafu na obr. 17 bylo zjištěno, že biologický předpoklad splňují všechny buňky až na jedinou, která vykazovala intenzivnější reakci na hypoosmotický šok (buňka označená šipkou v obr. 16). U této buňky pozorujeme pokles celkové suché hmoty, který následuje po vystavení buňky hypoosmotickému šoku.



Obr. 15: Buňky LW13K2 vystavené hypoosmotickému šoku, objektivy 10×/0,3. První řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich roztahování, (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, roztažení buněk je charakterizováno přírůstkem suché hmoty kolem okrajů buněk (červená barva) a úbytky suché hmoty uvnitř buněk (zelená barva). Druhý řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich smršťování, (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, smrštění buněk je charakterizováno přírůstkem suché hmoty v jejich středech (červená barva) a úbytky suché hmoty na okrajích buněk (zelená barva).



Obr. 16: Buňky LW13K2 vystavené hypoosmotickému šoku, objektivy 10×/0,3. První řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich roztahování, čas 5,5 min a 6,5 min (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, roztažení buněk je charakterizováno přírůstkem suché hmoty kolem okrajů buněk (červená barva) a úbytky suché hmoty uvnitř buněk (zelená barva). Druhý řádek: (a), (b) QPI buněk během jejich smršťování, čas 8,5 min a 9,5 min (c) zobrazení metodou DPD s krokem 60 s, smrštění buněk je charakterizováno přírůstkem suché hmoty v jejich středech (červená barva) a úbytky suché hmoty na okrajích buněk (zelená barva). Buňka vykazující intenzivnější reakci na hypoosmotický šok je označena šipkou.



Obr. 17: Závislost suché hmoty buňky na čase během hypoosmotického šoku. Vyhodnocované buňky jsou zobrazeny na obr. 16. Tmavě modrá křivka znázorňuje vývoj měřené suché hmoty označené buňky s intenzivnější reakcí. Světle modrá křivka znázorňuje vývoj průměrné hodnoty suché hmoty ostatních buněk.

Časovou změnu QPI této buňky vizualizovanou pomocí DPD (obr. 16) a časovou závislost její suché hmoty (obr. 17) lze interpretovat následujícím způsobem. Nejprve došlo k roztažení buňky v laterálním směru, při následném smrštění však buňka výrazně zmenšila zaujímanou plochu a její suchá hmota byla přesunuta do axiálního směru. Protože je přesnost měření fázového posuvu a tedy i suché hmoty buňky ovlivněna hloubkou ostrosti systému a protože se část buňky axiálně přesunula do oblasti, ve které nemůže být přesně měřena, byl v grafu závislosti suché hmoty na čase zaznamenán pokles. Hloubka ostrosti pro použitou sestavu s objektivou Nikon Plan 10×/0,3 a vlnovou délkou 650 nm činí přibližně 7 μm . Vliv koherenční délky systému na měřený fázový posuv není uvažován, protože koherenční délka systému s filtrem 650 nm/10 nm je větší než hloubka ostrosti použitých objektivů. Hloubkou ostrosti nebo také tloušťkou optického řezu v CCHM se podrobněji zabývá část 3.1. S postupem času však buňka opět přisedala ke kultivačnímu povrchu a její suchá hmota se tak opět posunula do korektně měřitelné oblasti. Toto je zachyceno v grafu na obr. 17 jako zpětný nárůst měřené suché hmoty buňky na počáteční hodnotu.

Můžeme tedy říct, že přesnost měřeného signálu závisí na hloubce ostrosti systému i na lokalizaci měřeného objektu v rámci této hloubky ostrosti. Pokud se buňka výrazně roztáhne i v axiálním směru, může se její část nalézat v oblasti mimo hloubku ostrosti systému a fázový posuv tak nemůže být přesně měřen. Pokud však roztažení buňky nastává v laterálním směru, celá buňka zůstává v rámci oblasti hloubky ostrosti systému a fázový posuv je měřen správně.

Výše uvedené experimenty demonstrují skutečnost, že metoda DPD umožňuje vizuálně rozlišit a identifikovat přesuny suché hmoty v buňce s vyšší citlivostí, než by bylo možné při přímém pozorování. Tím se podstatně rozšiřují možnosti QPI.

6 Aplikace metod ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech

Při studiu nádorových buněk je jednou ze základních zkoumaných vlastností jejich schopnost tvořit metastázy. Tato schopnost je dána mírou invazivity nádorových buněk. Běžně se invazivita studuje v *in vitro* systémech, kde jsou buňky kultivovány v kolagenových gelech [42] a pomocí zobrazení v Hoffmanově modulačním kontrastu se hodnotí statická morfologie buněk nebo hloubka kolagenového gelu, do které se nádorovým buňkám podařilo proniknout [43]. Detailní znalosti o dynamice pohybu buněk ve 3D prostředích a o interakcích mezi buňkou a okolím stále chybějí a jsou předmětem zájmu současného výzkumu. QPI však zatím pro tyto účely používáno nebylo.

V této práci byl nejprve proveden pilotní experiment zobrazování buněk v kolagenových gelech, který prokázal vhodnost použití QPI pro takováto měření. S výhodou byla použita nelineární filtrace obrazu pomocí metody adaptivní kontroly kontrastu ACC (Adaptive Contrast Control © software by SOFO), která umožňuje současně zvýraznit jak zobrazená kolagenová vlákna, tak struktury uvnitř zobrazených buněk.

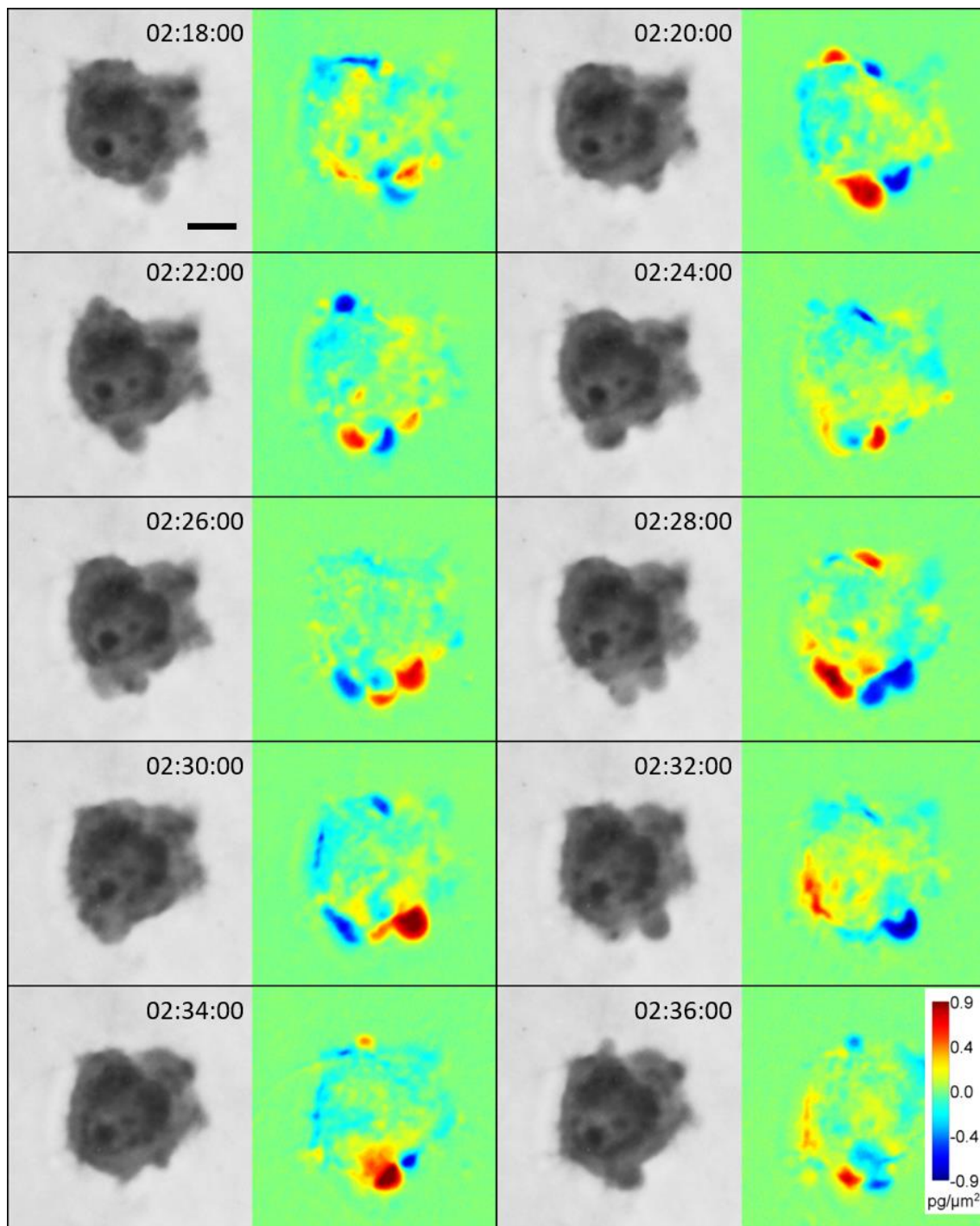
Ve výzkumu invazivity buněk v kolagenových gelech pak pokračoval především dr. Ondřej Tolde a dr. Aneta Gandalovičová z Laboratoře invazivity nádorových buněk Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Na jimi získaná data jsem úspěšně aplikovala metodu Dynamic-kych fázových diferencí a výsledky jsou publikovány v článku [44].

Provedené experimenty byly zaměřené na studium znaků mezenchymální a améboidní invazivity rakovinných buněk v kolagenových gelech. Na data QPI získaná pomocí prototypu MHM Q-PHASE jsem pro analýzu přesunů hmoty u různých charakteristických dějů použila metodu DPD. Protože se však jednalo o experimenty v kolagenových gelech, kde je obtížnější určit přesné hranice buněk a kde hodnoty pozadí nefluktují vlivem kolagenu pouze okolo nulové hodnoty, byla použita zjednodušená verze metody DPD. Tato zjednodušená verze DPD znázorňuje v použité barevné škále pouze rozdíly mezi dvěma po sobě jdoucími snímky. Lze tak rozlišit, v kterých místech buňky hmota přibyla a v kterých ubyla. Nejsou však rozlišena místa, která buňka opustila nebo nově obsadila, a také nejsou odlišeny hodnoty způsobené šumem. V použitých časových intervalech nemá toto omezení pro biologickou interpretaci dat ale nijak zásadní význam.

Pro experimenty byly použity buněčné linie HT1080 a HT1080 s konstitutivně aktivním RhoA (RHoA G14V). Obě linie byly kultivovány ve standardních kultivačních podmínkách (37 °C a 5 % CO₂) v mediu DMEM obohaceném o 10 % FBS a 0,1 % ciprofloxacin. Buňky byly poté připraveny na koncentraci 1 x 10⁶ buněk/ml v mediu DMEM bez fenolové červeně a s 10 % FBS. Buněčná suspenze byla přidávána do připraveného kolagenu v poměru 1:10. Pro analýzu mezenchymální invazivity byl použit roztok 1 mg/ml bovinního kolagenu, který tvořil jasně viditelná silná vlákna. Roztok 1 mg/ml krysího kolagenu byl použit pro analýzu améboidní invazivity. Směs byla umístěna buď do komůrek μ -Slide Angiogenesis (Ibidi) nebo do misek (Mattek). Tuhnutí gelu probíhalo při 37 °C. Po ztuhnutí gelu byly připravené vzorky doplněny médiem a přikryty krycím sklíčkem nebo víčkem, aby bylo zabráněno tvorbě menisku, který by mohl narušit interferenci a kvalitu QPI.

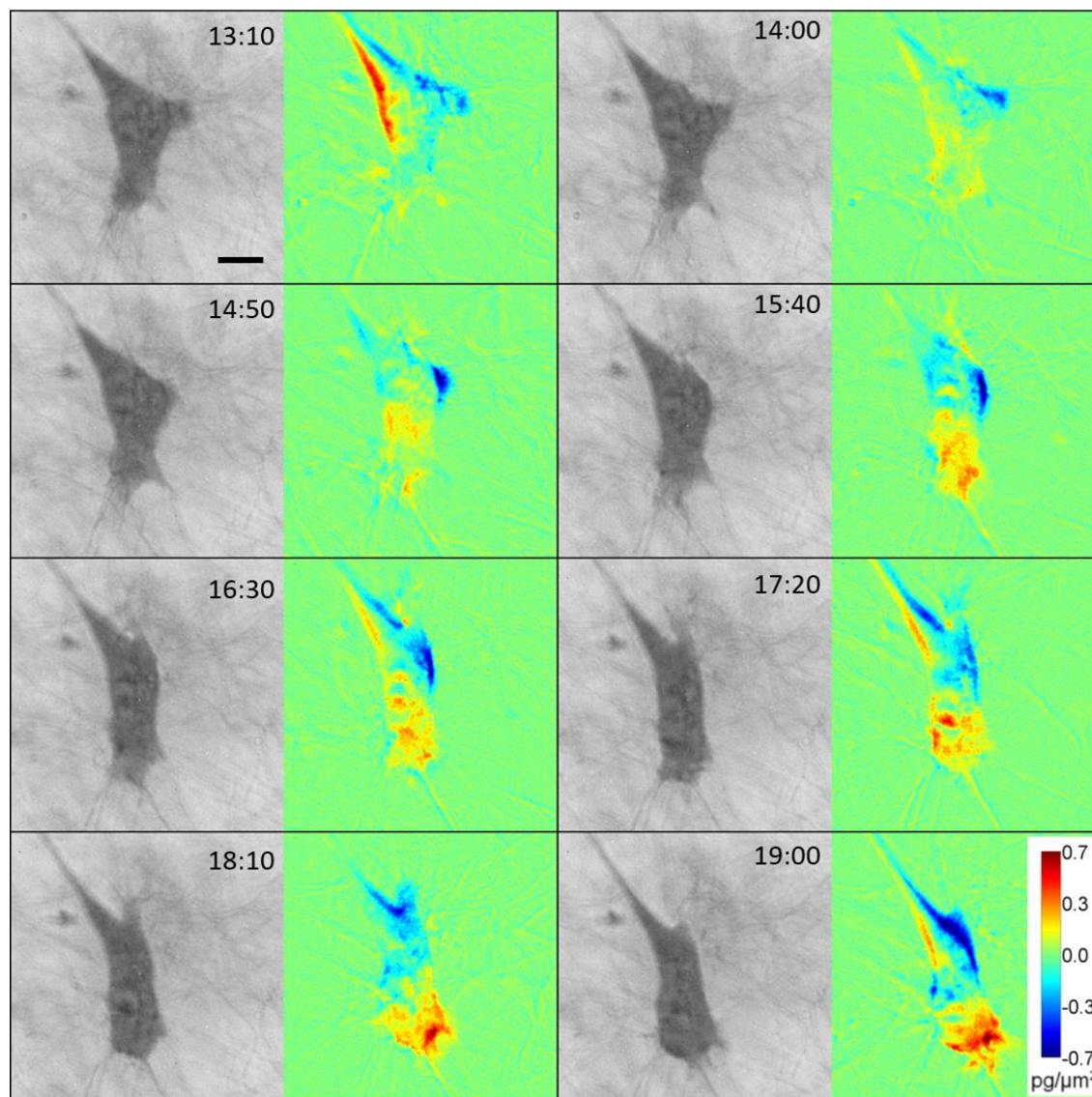
Pro pozorování na MHM Q-PHASE byly použity objektivy Nikon Plan 10×/0,3, Nikon Plan Fluor 20×/0,5 a Nikon Plan Apo 40×/0,95. Prezentované fázové obrázky byly navíc pro lepší kontrast při tisku upraveny pomocí nelineární filtrace v programu ACC. Pro DPD byla použita barevná škála, kde modrá barva znázorňuje úbytky hmoty a červená barva znázorňuje přírůstky hmoty v daném místě buňky. Malé rozdíly jsou zachyceny jako malé hodnoty v okolí nuly v odstínech zelené barvy.

Invazivita améboidních buněk závisí především na dynamických deformacích těla buňky díky zvýšenému vnitrobuněčnému tlaku a následné formaci membránových blebů. MHM Q-PHASE umožnil sledovat tyto dynamické změny a zároveň analyzovat přesuny hmoty uvnitř buňky nebo přímo měřit hustotu suché hmoty uvnitř blebů. Pozorování ukázala, že intenzita vznikání blebu není konstantní. Zvýšená tvorba blebů nastává v případech, kdy je buňka sevřená v ECM a nemůže se přesunout. Pomocí metody DPD bylo pozorováno, že rozložení hmoty buňky není v této situaci nijak polarizováno a že bleby se tvoří především ve směru nastávajícího pohybu buňky. Ukázka takové situace je zachycena na obr. 18.



Obr. 18: Tvorba dynamických blebů pozorovaná na améboidní buňce. QPI je zachyceno v odstínech šedi, DPD ukazují dynamiku tvorby blebů a nepolarizované rozložení hmoty. Měřítka 10 μm .

Migrace mezenchymálních buněk je založena na proteolytické aktivitě na vedoucím okraji buňky, tvorbě pseudopodií a následném přesunu hmoty do tohoto pseudopodia. Rozložení hmoty buňky je při jejím pohybu značně polarizováno a přesuny hmoty jasně určují směr pohybu buňky. Migrace mezenchymální buňky je zachycena na obr. 19.



Obr. 19: Analýza rozložení hmoty mezenchymální buňky během její migrace. QPI jsou zobrazeny v odstínech šedi, DPD zachycují polarizované rozložení hmoty buňky a výrazný přesun hmoty buňky ve směru jejího pohybu. Měřítko 10 μm .

Použití zjednodušené metody DPD pro výzkum dynamiky nádorových buněk ve 3D prostředích ukázalo výhody tohoto způsobu vizualizace dat. Zřetelně tak mohly být zobrazeny rozdíly mezi různými druhy pohybu améboidních buněk ve 3D prostředích i rozdíly mezi pohybem améboidních a mezenchymálních buněk. Ucelené výsledky z těchto měření jsou publikovány v článku [44].

7 Závěr

Ve své doktorské práci jsem se zabývala pokročilými metodami vyhodnocujícími QPI vytvářené pomocí CCHM a aplikacemi těchto metod ve výzkumu živých buněk.

Experimenty jsem prováděla na prototypu MHM Q-PHASE, který je založen na principu CCHM a na jehož vývoji jsem se v rámci projektu *Multimodální holografický mikroskop (FR-TI4/660)* podílela. Výhodou tohoto mikroskopu je jeho automatizace a možnost kombinace QPI s fluorescenční mikroskopií.

V práci jsem se nejdříve v kapitole 2 věnovala výběru a vývoji metod vyhodnocujících QPI. Byly vybrány základní parametry popisující tvarové a dynamické charakteristiky buněk a vyhodnocování těchto parametrů bylo implementováno přímo do ovládacího programu mikroskopu. Stejně tak bylo do ovládacího programu přidáno i vyhodnocování fázové informace tzv. vážení buněk, které je výhodou metod QPI oproti ostatním mikroskopickým metodám. Pro vyhodnocování změn rozložení hmoty v čase jsme navrhli metodu DPD. V kapitole 3 jsem se pak zabývala vlastnostmi zobrazování vzorku ve 3D prostředí a možností zúžení zobecněného optického řezu pomocí filtrace prostorových frekvencí.

Popsané metody jsem použila k vyhodnocení dat v jednotlivých biologických aplikacích.

V rozsáhlé studii různých typů buněčných smrtí, kde bylo provedeno několik dlouhodobých časosběrných pozorování, bylo plně využito vyhodnocování tvarových a dynamických charakteristik. Podstatnou informaci o typu buněčné smrti poskytlo také sledování hmoty jednotlivých buněk v čase. V této studii byla také využita možnost kombinace QPI a fluorescenční mikroskopie.

Při studiu osmotických jevů byla využita metoda DPD, která u těchto velmi dynamických dějů umožnila sledování změn rozložení hmoty uvnitř jednotlivých buněk.

Při výzkumu dynamiky nádorových buněk v kolagenových gelech byly využity jednak znalosti o vlastnostech zobrazování pomocí CCHM v 3D prostředích a jednak se podařilo aplikovat i zjednodušenou metodu DPD. Ta umožnila dobře zobrazit rozdíly při jednotlivých typech pohybu buněk.

Výsledky práce byly publikovány v odborných časopisech [29, 37, 38, 44] a prezentovány na mezinárodních konferencích [39].

Seznam použité literatury

1. Slabý, T., Kolman, P., Dostál, Z., Antoš, M., Lošťák, M. and Chmelík, R. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, 2013, 21(12), 14747-14762.
2. Chmelík, R., Slaba, M., Kollarova, V., Slaby, T., Lostak, M., Collakova, J. and Dostal, Z. The role of coherence in image formation in holographic microscopy. *Progress in Optics*, 2014, 59, 267-335.
3. Davies, H.G. and Wilkins, M.H.F. Interference microscopy and mass determination. *Nature*, 1952, 169, 541.
4. Barer, R. Interference microscopy and mass determination. *Nature*, 1952, 169, 366-367.
5. Rappaz, B., Marquet, P., Cuche, E., Emery, Y., Depeursinge, C. and Magistretti, P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*, 2005, 13(23), 9361-9373.
6. Pastorek, L., Venit, T. and Hozák, P. Holography microscopy as an artifact-free alternative to phase-contrast. *Histochemistry and cell biology*, 2018, 149(2), 179-186.
7. Rappaz, B., Breton, B., Shaffer, E. and Turcatti, G. Digital holographic microscopy. A quantitative label-free microscopy technique for phenotypic screening. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2014, 17(1), 80-88.
8. Kolman, P. and Chmelík, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*, 2010, 18(21), 21990-22003.
9. Kolman, P. Koherenci řízený holografický mikroskop. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 72 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
10. Slabý, T. Koherenci řízený holografický mikroskop nové generace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 91 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
11. Kasprowicz, R., Suman, R. and O'Toole, P. Characterising live cell behaviour: Traditional label-free and quantitative phase imaging approaches. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2017, 84, 89-95.
12. Strand, J., Taxt, T. and Jain, A.K., Two-dimensional phase unwrapping using a block least-squares method. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1999, 8(3), 375-386.
13. Goldstein, R., Zebker, H. and Werner, C., Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping. *Radio Science*, 1988, 23(4), 713-720.
14. Zikmund, T., Kvasnica, L., Týč, M., Křížová, A., Čolláková, J. and Chmelík, R., Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*, 2014, 256(2), 117-125.
15. Sezgin, M. and Sankur, B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic imaging*, 2004, 13(1), 146-166.
16. Bengtsson, E., Wahlby, C. and Lindblad, J. Robust cell image segmentation methods. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2004, 14(2), 157-167.
17. Parvati, K., Rao, P. and Mariya Das, M. Image segmentation using gray-scale morphology and marker-controlled watershed transformation. *Discrete Dynamics in Nature and Society*, 2008, 2008.
18. Zangle, T. A. and Teitell, M. A. Live-cell mass profiling: an emerging approach in quantitative biophysics. *Nature methods*, 2014, 11(12), 1221-1228.

19. Charrière, F., Pavillon, N., Colomb, T., Depeursinge, C., Heger, T.J., Mitchell, E.A., Marquet, P. and Rappaz, B. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba. *Optics Express*, 2006, 14(16), 7005-7013.
20. Rappaz, B., Charrière, F., Depeursinge, C., Magistretti, P.J. and Marquet, P. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium. *Optics Letters*, 2008, 33(7), 744-746.
21. Kemper, B., Carl, D., Schnekenburger, J., Bredebusch, I., Schäfer, M., Domschke, W. and von Bally, G. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2006, 11(3), 034005-034005.
22. Wayne, R.O. *Light and video microscopy*. Academic Press, 2013.
23. Dunn, G.A. and Zicha, D. Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour. In *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1992, 47, 91-106.
24. Rappaz, B., Cano, E., Colomb, T., Kühn, J., Depeursinge, C., Simanis, V., Magistretti, P.J. and Marquet, P. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2009, 14(3), 034049-034049.
25. Popescu, G., Park, Y., Lue, N., Best-Popescu, C., Deflores, L., Dasari, R.R., Feld, M.S. and Badizadegan, K. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008, 295(2), C538-C544.
26. Girshovitz, P. and Shaked, N.T. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(8), 1757-1773.
27. Uhlířová, H. Mikroskopie časově proměnných biologických objektů, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 61 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
28. Křížová, A. Koherenční řízený holografický mikroskop ve výzkumu životního cyklu buňky. Diplomová práce, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 59 s. Vedoucí Ing. Hana Uhlířová, Ph.D.
29. Krizova, A., Collakova, J., Dostal, Z., Kvasnica, L., Uhlířova, H., Zikmund, T., Vesely, P. and Chmelik, R. Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior. *Journal of biomedical optics*, 2015, 20(11), 111214-111214.
30. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. and Yamada, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001, 294(5547), 1708-1712.
31. Dubois, F., Schockaert, C., Callens, N. and Yourassowsky, C. Focus plane detection criteria in digital holography microscopy by amplitude analysis. *Optics Express*, 2006, 14(13), 5895-5908.
32. Chmelík, R., Petráček, J., Slabá, M., Kollárová, V., Slabý, T., Čolláková, J., Komrská, J., Dostál, Z., Veselý, P. Holographic microscopy in low coherence. In *Quantitative phase imaging II*, 2016, 9718, 971806.
33. Dunn, A. and Richards-Kortum, R. Three-dimensional computation of light scattering from cells. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 1996, 2(4), 898-905.
34. Zhang, Q., Zhong, L., Tang, P., Yuan, Y., Liu, S., Tian, J. and Lu, X. Quantitative refractive index distribution of single cell by combining phase-shifting interferometry and AFM imaging. *Scientific reports*, 2017, 7(1), 2532.

35. FFT Filter. *RSB Home Page* [online]. Dostupné z: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fft-filter.html>
36. Trump, B.E., Berezsky, I.K., Chang, S.H. and Phelps, P.C., The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*, 1997, 25(1), 82-88.
37. Balvan, J., Krizova, A., Gumulec, J., Raudenska, M., Sladek, Z., Sedlackova, M., Babula, P., Sztalmachova, M., Kizek, R., Chmelik, R. and Masarik, M. Multimodal holographic microscopy: distinction between apoptosis and oncosis. *PloS one*, 2015, 10(5), e0121674.
38. Balvan, J., Gumulec, J., Raudenska, M., Krizova, A., Stepka, P., Babula, P., Kizek, R., Adam, V. and Masarik, M. Oxidative stress resistance in metastatic prostate cancer: Renewal by self-eating. *PloS one*, 2015, 10(12), e0145016.
39. Krizova, A., Balvan, J., Gumulec, J., Slaby, T., Masarik, M., Chmelik, R., Cell death type identification by quantitative phase imaging. In *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26.
40. Vicar, T., Gumulec, J., Balvan, J., Hracho, M. and Kolar, R. Label-Free Nuclear Staining Reconstruction in Quantitative Phase Images Using Deep Learning. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2018*, 2019, 239-242.
41. Veselý, P., Melezinkova, H., Krenova, D., Kren, V., Matouskova, E. and Chaloupkova, A. Spontaneously metastasizing rat sarcomas LW13K2 and RPS: assessment by the immunogenetic test of malignancy, in vitro behaviour and karyology. *Folia biologica*, 1988, 35(1), 1-12.
42. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. and Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and drug development technologies*, 2014, 12(4), 207-218.
43. Paňková, D., Jobe, N., Kratochvílová, M., Buccione, R., Brábek, J. and Rösel, D. NG2-mediated Rho activation promotes amoeboid invasiveness of cancer cells. *European Journal of Cell Biology*, 2012, 91(11), 969-977.
44. Tolde, O., Gandalovičová, A., Křížová, A., Veselý, P., Chmelík, R., Rosel, D., and Brábek, J. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. *Scientific Reports*, 2018, 8(1), 12020.
45. McGregor, A. L., Hsia, C.-R. and Lammerding, J., Squish and squeeze - the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016, 40, 32-40.

Životopis

- Jméno:** Ing. Aneta Křížová
- Bydliště:** 9. května 842, 664 71 Veverská Bítýška
- Kontakt:** aneta.krizova@ceitec.vutbr.cz
- Datum narození:** 5.8. 1987
- Vzdělání:** 2012-dosud doktorské studium na FSI, VUT v Brně
obor: Fyzikální a materiálové inženýrství
2010-2012 magisterské studium na FSI, VUT v Brně
obor: Fyzikální inženýrství
- Zahraniční stáže:** 1.3.2011 -1.9.2011 Velká Británie, The University of Kent
School of Physical Sciences, Applied Optics Group
- Profesní zkušenosti:** 2016-dosud mateřská a rodičovská dovolená
2012-2016 TESCOAN Brno, s.r.o.
Aplikační specialista pro světelnou mikroskopii
- Projekty:** Multimodální holografický mikroskop (FR-TI4/660), Ministerstvo průmyslu a obchodu České republiky.

▪ Seznam vlastních publikací

1. Tolde, O., Gandalovičová, A., **Křížová, A.**, Veselý, P., Chmelík, R., Rosel, D., and Brábek, J. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. *Scientific Reports*, 2018, 8(1), 12020.
2. Babočky, J., **Krizova, A.**, Strbkova, L., Kejik, L., Ligmajer, F., Hrton, M., et al., Quantitative 3D phase imaging of plasmonic metasurfaces, *ACS Photonics*, 2017, 4(6), 1389.
3. Lostak, M., Collakova, J., Slaby, T., **Krizova, A.**, Vesely, P., and Chmelik, R. Coherence-controlled holographic microscopy for live-cell quantitative phase imaging in turbid media. In *Quantitative Phase Imaging II*, 2016, 9718, 97181Y.
4. Dostal, Z., Slaby, T., Kvasnica, L., Lostak, M., **Krizova, A.**, and Chmelik, R. Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11), 111215.
5. **Krizova, A.**, Balvan, J., Gumulec, J., Slaby, T., Kostal, V., Chmelik, R., and Masarik, M. Cell death type identification by quantitative phase imaging. In *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26.
6. Collakova, J., **Krizova, A.**, Kollarova, V., Dostal, Z., Slaba, M., Vesely, P., and Chmelik, R. Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion. *Journal of biomedical optics*, 2015, 20(11), 111213.
7. Slabý, T., **Křížová, A.**, Lošťák, M., Čolláková, J., Jůzová, V., Veselý, P., and Chmelík, R. Coherence-controlled holographic microscopy for live-cell quantitative phase imaging. In *Quantitative Phase Imaging*, 2015, 9336, 93360K.

8. **Krizova, A.**, Collakova, J., Dostal, Z., Kvasnica, L., Uhlirova, H., Zikmund, T., et al., Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior, *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11), 111214.
9. Balvan, J., Gumulec, J., Raudenska, M., **Krizova, A.**, Stepka, P., Babula, P., et al., Oxidative stress resistance in metastatic prostate cancer: Renewal by self-eating, *PLoS one*, 2015, 10(12) e0145016.
10. Balvan, J., **Krizova, A.**, Gumulec, J., Raudenska, M., Sladek, Z., Sedlackova, M., et al. Multimodal holographic microscopy: distinction between apoptosis and oncosis, *PloS one*, 2015, 10(5), e0121674.
11. Slaby, T., Kolman, P., Dostal, Z., Antos, M., Lostak, M., **Krizova, A.**, et al. Coherence-Controlled Holographic Microscopy for Coherence-Gated Quantitative Phase Imaging. In *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*, 2014, DM4B-3.
12. Zikmund, T., Kvasnica, L., Týč, M., **Křížová, A.**, Čolláková, J. and Chmelík, R., Sequential processing of quantitative phase images for the study of cell behaviour in real-time digital holographic microscopy. *Journal of Microscopy*, 2014, 256(2), 117.
13. Collakova, J., **Krizova, A.**, Dostal, Z., Kvasnica, L., Slaby, T., Zikmund, T., et al. Dynamics of cell behavior by Coherence Controlled Holographic Microscope (CCHM). In *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24.
14. Antoš, M., Čolláková, J., Veselý, P., Chmelík, R., and **Křížová, A.** System for coherence-controlled holographic microscopy of living cells. In *18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*, 2012, 8697, 869712.