VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Analýza primárního signálu digitálního senzoru světelného mikroskopu pro získání struktur a fyzikálně-chemických vlastností biologických materiálů

Habilitační práce v oboru Fyzikální chemie

Ing. et Bc. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.

Brno 2024

Poděkování

Děkuji svým kolegům, spoluautorům uvedeným i neuvedeným na společných publikacích, za spolupráci.

Z celého srdce děkuji své rodině za podporu během studií i práce.

Velice děkuji Fakultě chemické VUT za umožnění habilitačního řízení.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu.

V Brně, 16. září 2024

Abstrakt

Tato habilitační práce shrnuje teoretické a praktické přístupy vývoje jednoduchého hardwarového a relevantního sofistikovaného softwarového řešení mikroskopie živých, zejména neznačených buněk, případně celých lidských i živočišných tkání. Základní hardwarové řešení je tvořeno jednoduchou optickou dráhou, v poslední fázi telecentrickým objektivem upevněným na kameru s velkým čipem a malým pixelem. Kamera sbírá primární signál, který je následně spektroskopicky kalibrován a výsledný obraz je korigován na vady celé optické dráhy mikroskopu a kamerového čipu. Zkorigovaný obraz může být dále zpracováván, přičemž nejinformativnějším zpracováním je námi vyvinutý výpočet světelného spektra pro každý obrazový pixel. Cílem je získat co největší statistický soubor. Pro každou představenou vyvíjenou aplikaci je hledán kompromis mezi celkovým zvětšením objektu optickou soustavou, fyzickou velikostí kamerového pixelu, rychlostí datového přenosu a velikostí uchovávaných dat.

Klíčová slova: mikroskopie v procházejícím světle, mikroskopie v odraženém světle, zobrazení buněk a tkání, systémový přístup, informační entropie, optická spektroskopie

Abstract

This habilitation thesis summarises the theoretical and practical approaches to developing simple hardware and relevant sophisticated software solutions for the microscopy of living, especially unlabeled cells, or whole human and animal tissues. The basic hardware solution consists of a simple optical path, which is, in the last stage, a telecentric lens, mounted on a large-chip and small-pixel camera. The camera collects the primary signal, which is subsequently spectroscopically calibrated. The resulted image is corrected for defects in the entire optical path of the microscope and camera chip. The corrected image can be further processed, whereby the most informative form of the processing is the innovative computation of the light spectrum for each image pixel. For each presented potential application, a compromise is sought between the overall magnification of the object by the optical system, the camera pixel's physical size, the data transfer rate, and the size of the stored data.

Keywords: transmitted light microscopy, reflected light microscopy, cell and tissue imaging, system approach, information entropy, optical spectroscopy

Title translation: Analysis of the primary signal of a digital light microscope sensor to retrieve the structures and physicochemical properties of biological materials

Obsah

1 Úvod **1**

2 Teoretická východiska vývoje světelného mikroskopu **3**

3 Konstrukce světelného mikroskopu **6**

3.1 Konstrukce hardwaru 7
Digitální kamera 10
Zdroj světla 10
Optika 11
Mechanika 12
3.2 Vývoj řídícího softwaru 13
3.2.1 NanoScope 13
3.2.2 SuperScope 14
3.2.3 CAMEX 15
3.3 Analýza signálu z kamerového senzoru 17
3.3.1 Kalibrace optické dráhy 17
3.3.2 Informační přínos jednotlivých pixelů 23
3.3.3 Kvazispektrální analýza 32
3.3.4 Profilometrie 34
3.3.5 Segmentace mikroskopického obrazu buněk a organel 36
3.3.6 Měření vnitrobuněčné dynamiky 37
3.3.7 Vizualizace metodou nejmenší informační ztráty 40

4 Vyvíjené aplikace metod světelné mikroskopie **42**

4.1 Histologické řezy 42
4.2 Živé neznačené leukocyty a mesenchymální kmenové buňky . . . 50
4.3 Skelety pro regenerativní medicínu 55

5 Závěr **62**

Literatura **63**

A Relevantní publikace **68**

A.1 Systémová teorie 68
A.1.1 Žampa's system theory: A comprehensive theory of measurement in dynamic systems 68
A.1.2 Measurement in biological systems from the self-organization point of view 85
A.2 Multifraktální modely samoorganizace 99
A.2.1 Recognition of stages in the Belousov-Zhabotinsky reaction using information entropy: Implications to cell biology 99
A.2.2 Model of the Belousov-Zhabotinsky reaction . 112
A.2.3 Noisy hodgepodge machine and the observed mesoscopic behavior in the non-stirred Belousov-Zhabotinsky reaction . 128
A.3 Teorie informace 143
A.3.1 Point Information Gain and multidimensional data analysis . 143
A.3.2 Clustering of multi-image sets using Rényi information entropy 160
A.3.3 Optimization of computational burden of the Point Information Gain 171
A.3.4 Point Divergence Gain and multidimensional data sequences analysis 180
A.4 Vizualizace vícebitových obrazových dat 198
A.4.1 Least Information Loss (LIL) conversion of digital images and lessons learned for scientific image inspection 198
A.4.2 Visual exploration of principles of formation of microscopic image intensities using Image Explorer software 209
A.5 Mikrospektrofotometrické metody 218
A.5.1 Spectroscopic approach to correction and visualisation of bright-field light transmission microscopy biological data 218
A.5.2 Quasi-spectral characterization of intracellular regions in bright-field light microscopy images 237
A.6 Analýza vnitrobuněčného prostoru 248

A.6.1 Multifractality in imaging: Application of information entropy for observation of inner dynamics inside of an unlabeled living cell in bright-field microscopy 248
A.6.2 Super-resolved 3-D imaging of live cells' organelles from bright-field photon transmission micrographs 256
A.6.3 Information limits of optical microscopy: Application to fluorescent labelled tissue section 271
A.6.4 Observation of dynamics inside an unlabeled live cell using a bright-field photon microscopy: Evaluation of Oraganelles' trajectiories 284
A.6.5 Estimation of rheological parameters for unstained living cells 297
A.7 Segmentace buněk z velkých obrazových dat 306
A.7.1 Cell segmentation from telecentric bright-field transmitted light microscopy images using a Residual Attention U-Net: A case study on HeLa line 306
A.7.2 Symmetry breaking in the U-Net: Hybrid deep-learning multi-class segmentation of HeLa cells in reflected light microscopy images 319
A.8 Řídící software 339
A.8.1 Řídící software SuperScope 339

Obrázky

3.1 Mikroskop pro analýzu jedné bu¬ky NanoScope 2011. 7
3.2 Mikroskop pro analýzu jedné bu¬ky SuperScope 2019. 8
3.3 Mikroskop pro analýzu stovek bun¥k FutureScope 2021. 8
3.4 Mikroskop Visible Truth UltraEasy 2024. 13
3.5 Schéma konstrukce optického mikroskopu v procházejícím sv¥tle (modrá), °ídící jednotky (£ervená) s následným zpracováním obrazu (ºlutá). 14
3.6 Nekalibrovaný digitální obraz. a) Histogramy £erveného (R), zeleného (G) a modrého (B) kanálu p·vodního 12bitového primárního signálu. b) Relevantní komprimovaný 8bitový obraz (LIL, kap. 3.3.7). (P°ejato z [1].) 19
3.7 Kalibrovaný makroskopický digitální obraz (akvárium s rybami obklopeno £ty°mi zrcadly). a) Histogramy £erveného (R), zeleného (G) a modrého (B) kanálu kalibrovaného 12bitového primárního signálu. b) Relevantní komprimovaný 8bitový obraz (LIL, kap. 3.3.7). (P°ejato z [1].) 20
3.8 Sedm klastr· (barevn¥ kódované) PCA modelu makroskopické digitální £asosb¥rné série B¥lousovy-šabotinského reakce snímané vysokorychlostní kamerou JAI SP-5000-USB. PCA Model byl po£ítán z 3 2 2 12 hodnot H a I ({R,G,B} {Whole, Cross} {H , I } {po£et }). (P°ejato z [2].) . . 26
3.9 Tká¬ rakoviny prostaty zna£ená 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI) ohnisková rovina. Obrazová data byla získána na konfokálním mikroskopu TissueFax-PLUS. Velikost voxelu v sérii je 328 328 100 nm^3. Bitová hloubka p·vodních snímk· je 13 bit cdotpx. 8Bitová vizualizace LIL (kap. 3.3.7). (Spolupráce s TissueGnostics GmbH, Víde¬, Ústavem zdravotnických v¥d a biomedicíny Dunajské univerzity v Kremsu a Léka°skou univerzitou ve Vídni.) 27
3.10 3D Elektromagnetické centroidy vzorku tkán¥ lidské prostaty. (pravý sloupec) Hodnoty $^{(I!\ m)}_{2} = 0$ pro auto uorescenci v £erveném kanálu kamery (RAF) a pro jádra obarvená 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Velikost zorného pole je 164 164 μm^2. (levý sloupec) Detail £erven¥ uoreskující organely.(ºlutá) Voxely $^{(I!\ m)}_{10} = 0$ pravd¥podobnostn¥ odpovídající rozptylové funkci objektu, (£erná) voxely $^{(I!\ m)}_{2} = 0$ pravd¥podobnostn¥ odpovídající detekovaný objekt. Znázorn¥n levý roh obrazové série, jejíº ohnisková rovina je na obr. 3.9. 28

3.11 Rekonstrukce mikroskopického obrazu rozsivek (Diatomeae) z bod· v ohnisku. a) P·vodní obrázek z £ipu 47Mpx kamery sv¥telného mikroskopu. b) Kalibrovaný obrázek, v n¥m° byly kompenzovány rozdíly v odezvách jednotlivých prvk· kamerového senzoru. c) Body v ohniskové rovin¥, fakticky voxely (3D pixely) 46 46 10 nm^3 zobrazené v intenzitách odpovídajících danému bodu. d) Pseudopovrch pokrývající intenzity v ohniskové rovin¥. P°iblí°ení k p°ípadu, kdy by byl objektem veden °ez tlou²´ky 10 nm a na n¥m by probíhaly v²echny pozorované jevy (nap°. rozptyl sv¥tla, absorpce sv¥tla nebo uorescence). Výpo£et proveden dle [3]. 29
3.12 Rekonstrukce mikroskopického obrazu z bod· v ohnisku detail obr. 3.11. 29
3.13 3D kolokalizace barevných obrazových kanál· tkán¥ rakoviny prostaty pomocí výpo£tu $^{(I!\ m)} = 0$ 2D projekce do roviny xy. Znázorn¥n levý roh obrazové série, její° ohnisková rovina je na obr. 3.9. 8Bitová vizualizace LIL (kap. 3.3.7). 30
3.14 Detail organely po 3D kolokalizaci barevných obrazových kanál· tkán¥ rakoviny prostaty získaný výpo£tem $^{(I!\ m)} = 0$ bo£ní pohled. Detail obr. 3.9. 31
3.15 Gra cké u°ivatelské rozhraní softwaru Image Info Extractor Professional. 31
3.16 Kalibra£ní sklí£ko IAM-9-C NIST pro sledování sv¥telné transmitance barev. Velikost jednotlivých barevných polí 150 µm. Vizualizace ve slune£ním zá°ení. (dole) Mikroskopicky homogenní barvivo C1 a mikroskopicky heterogenní barvivo C4. 34
3.17 Vypo£tená (modrá) a referen£ní NIST (£ervená) transmitan£ní spektra ve viditelné oblasti pro barevné °ady NIST A, B a C. 35
3.18 Vypo£tená (modrá) a referen£ní NIST (£ervená) transmitan£ní spektra ve viditelné oblasti pro barevnou °adu NIST D. 36
3.19 Detekce izokontour v zobrazení organely MG63 na obr. 3.20 horní °ádek Pro modelování tvaru organely je relevantní zelená izokontura intenzity 50. 38
3.20 Detekce organel bu¬ky MG63 v jejich zobrazení mikroskopem Nanoscope 2011 po LIL kompresi (kap. 3.3.7). 3D Analýza objekt· v P°íloze A.6.1 obr. 2. 38

4.1 Detail histologie rybích gonád (losos obecný, Salmo salar) získané skenerem Roche DP600 v (levo) a mikroskopem FutureScope 2021 (vpravo). ’ipka znázor¬uje vady skenovaného obrazu. Barvení hematoxylin-eosin. 43
4.2 Metastáza melanomu v mozku barvená hematoxylinem-eosinem. Vizualizace a) obr. 4.3, b) obr. 4.4a a c) obr. 4.4b klastr· spektráln¥ podobných objekt·. Velikost zorného pole je a) 270 270 μm^2, b) 23 17 μm^2 a c) 12 12 μm^2. (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol.) 44
4.3 Metastáza melanomu v mozku barvená hematoxylinem-eosinem. ƒerven¥ a °lut¥ jsou vyzna£eny detaily na obr. 4.4. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je 270 270 μm^2. 45

4.4 Detaily obr. 4.3: bu¬ka a) uvnit° a b) vn¥ tkán¥ barvená hematoxylinem-eosinem. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je a) 23 17 µm^2 a b) 12 12 µm^2. 46
4.5 Plicní tuková embolie barvená olejovou £ervení. ƒerven¥ je vyzna£en detail na obr. 4.6. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je 3; 08 1; 92 mm^2. (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol.) . 47
4.6 Plicní tuková embolie barvená olejovou £ervení (detail obr. 4.5).a) Vizualizace v LED osv¥tlení. b) Vizualizace klastr· spektráln¥ podobných objekt·. Velikost zorného pole je 250 250 µm^2. 49
4.7 Lidské leukocyty. ƒerven¥ je vyzna£en detail na obr. 4.8. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je3; 08 1; 92 mm^2. . 51
4.8 Lidské leukocyty (detail obr. 4.7). a) Vizualizace v LED osv¥tlení s mo°nou anotací. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo°ení. Velikost zorného pole je 250 250 µm^2. 53
4.9 Mesenchymální kmenové bu¬ky z lidské placenty. a) Vizualizace v LED osv¥tlení. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo°ení. Velikost zorného pole je250 250 µm^2. (Spolupráce s Ústavem zdravotnických v¥d a biomedicíny Dunajské univerzity v Kremsu.) 54
4.10 Interakce lidských T-lymfocyt· s mesenchymálními kmenovými bu¬kami z lidské placenty. a) Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je250 250 µm^2. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo°ení. c) Pr·m¥rná re ektan£ní spektra klastr· spekter: oran°ový graf je spektrum vybrané oblasti uvnit° neaktivovaného T-lymfocytu (klastr 600), modrý graf je spektrum vybrané oblasti uvnit° aktivovaného T-lymfocytu (klastr 1024). 55
4.11 Decelularizovaná placentární membrána. ƒerven¥ je vyzna£en detail na obr. 4.13a. Velikost zorného pole je 3; 08 1; 92 mm^2. (Spolupráce s Národním centrem tkání a bun¥k a.s. a PrimeCell Bioscience, a.s., Ostrava.) 57
4.12 Pro lometrie decelularizované placentární membrány. Velikost zorného pole je3; 08 1; 92 mm^2. . 58
4.13 Decelularizovaná placentární membrána. Detail snímku na obr. 4.11 s relevantní pro lometrií. Velikost zorného pole je 210 210 µm^2. 59
4.14 Polykaprolaktonový nanoskelet s bu¬kami MG-63. ƒerven¥ je vyzna£en detailní obr. 4.15. Velikost zorného pole je3; 08 1; 92 mm^2. (Spolupráce se St°edoevropským technologickým institutem CEITEC, Brno.) 60
4.15 Nanoskelet (nanosca old) z polykaprolaktonu s bu¬kami MG-63 (detail obr. 4.14). Velikost zorného pole je210 210 µm^2. . . . 61

Tabulky

3.1 Speci kace hardwaru testovacích mikroskop· ÚKS FROV JU. 9
3.2 Speci kace vysokorychlostí kamery Basler ACA2000-340kc. 10
3.3 •ídící software (•SW) testovacích mikroskop· ÚKS FROV JU. 16

Kapitola 1

Úvod

Kdyby to m¥lo n¥jakou praktickou hodnotu, my sami bychom to vynalezli uº dávno. Z nobelovské p°edná²ky Fritse Zernikeho (1953) citujícího vedoucího výzkumníka rmy Zeiss.

V sou£asné dob¥ ºijeme v nanoé°e, kdy je vyºadována znalost spektráln¥ rozli²ených informací o lokalizaci nanostrukturovaných objekt·. Pro zkoumání (sub)mikroskopických struktur je sv¥telná mikroskopie hlavní metodou jiº n¥kolik staletí a v p°ípad¥ ºivých bun¥k £asto nemá alternativu. Mikroskopie atomárních sil mapuje pouze bun¥£ný povrch a elektronmikroskopické metody vyºadují velké úpravy vzorku, p°i£emº zmrazení je tou úpravou, která vzorek modi kuje nejmén¥. Environmentální elektronová mikroskopie (ESEM) stále z·stává z°ídka se vyskytující m¥°icí a experimentální metodou.

Historické snímky získané sv¥telnou mikroskopií, ale kreslené ru£n¥ nebo získané klasickou lmovou fotogra í, obsahují p°ekvapivé mnoºství detail·, které v digitální sv¥telné mikroskopii nenajdeme, a´ je obraz jakkoli zv¥t²ený. Sv¥telná mikroskopie také skrývá potenciál ur£ení fyzikáln¥-chemických vlastností slou£enin pozorovaného objektu (nap°. tkán¥, bu¬ky £i organely) v prvku (pixelu nebo voxelu) diskretizovaného prostoru pozorovaného digitálním mikroskopem.

Cílem výzkumu a vývoje popsaného v této habilita£ní práci bylo analyzovat informaci poskytovanou digitální sv¥telnou mikroskopií aº na úrove¬ limit· sou£asné techniky a experimentální a teoretické fyziky. Sv¥tlo jako pole elektromagnetického zá°ení je zkoumáno na úrovni jednotlivých voxel·, jejichº velikost je limitována technickým nastavením experimentu, p°edev²ím velikostí pixelu digitální kamery a krokem podél optických °ez·. To je jediný zp·sob, jak identi kovat lokální (bio)chemické sloºení a molekulární interakce. Uºivatelé sv¥telné mikroskopie se tak mohou dostat k informacím, které moºná nebyli zvyklí hledat, ale které popisují skute£né vlastnosti objektu a mohou být praktické nebo alespo¬ zajímavé v p°ípad¥ v¥decké zvídavosti. Dostate£nou výpo£etní statistiku potom zajistí velké zorné pole kamery mikroskopu. Odhalení a pochopení t¥chto technických limit· ve sv¥telném mikroskopu

potom m·ºe vyústit ve zpochybn¥ní teoretických limit· interpretace sv¥teln¥ mikroskopického obrazu.

P°i vývoji sv¥telného mikroskopu pro biologické ú£ely jsme vycházeli z princip· teorie m¥°ení v ºivých dynamických systémech (P°ílohy A.1.1 A.1.2) a z m¥°ení a modelování primitivních samoorganizujících se multifraktálních systém· (P°ílohy A.2.1 A.2.3). V¥decký aspekt na²í práce spo£íval v metodologickém pouºití nejmodern¥j²ích existujících technologií (komponent nejvy²²í t°ídy), nebo´ jenom tak je moºno dosáhnout odborn¥ nejsprávn¥j²í interpretace informace poskytované mikroskopem. P°i vývoji analytického softwaru jsme vyuºívali fyzikáln¥-chemický p°ístup.

Znalosti technických limit· sv¥telné mikroskopie získané základním výzkumem jsme poté vyuºili p°i návrhu a stavb¥ jednotlivých mikroskop· pro vybrané biologické a potenciální medicínské aplikace.

Kapitola 2

Teoretická východiska vývoje sv¥telného mikroskopu

Pozorování vzork· sv¥telnou mikroskopií je omezeno fyzikálními vlastnostmi sv¥tla a konstruk£ními limity optické soustavy. Pokusy o úplný popis elektromagnetického pole podél optické dráhy mikroskopu sahají aº do 40. let 20. století [4 7]. Tyto Nijboerovy-Zernikeho integrály, které popisují zm¥nu elektromagnetického pole po pr·chodu optickou £o£kou, jsou vypo£itatelné pouze pro velmi idealizovaný objekt a velmi idealizovanou soustavu £o£ek. Reálné vzorky v²ak mají nenulovou tlou²´ku a jsou nehomogenní, stejn¥ jako reálnou mikroskopickou optiku nelze snadno aproximovat modelem tenké £o£ky.

Dle na²ich znalostí je nejkomplexn¥j²í popis elektromagnetického pole vznikajícího interakcí sv¥telného elektromagnetického pole s reálnými vzorky, tedy nehomogenními vzorky nenulové tlou²´ky, uveden v [8, 9]. Jedná se o nejlep²í aproximaci °e²ení inverzního problému (odhadu tvaru pozorovaného objektu z jeho rozptylové funkce) p°i mikroskopii reálných vzork· nenulové tlou²´ky. V tomto p°ípad¥ se také dle na²ich znalostí jedná o poslední limity v pochopení tvorby interferen£ního obrazce reálného (tj. nenulov¥ tlustého) vzorku.

Konstrukce soustav reálných optických £o£ek je zaloºena na r·zných implementacích princip· paprskové optiky, nap°. [10]. Tímto p°ístupem v²ak lze p°ekvapiv¥ dosáhnout dostate£n¥ detailního popisu tvorby obrazu. Principy paprskové optiky je t°eba také vzít v úvahu p°i analýze mikroskopického obrazu jakoºto interferen£ního obrazce.

Mikroskopický obraz je sv¥telný (elektromagnetický) interferen£ní obrazec, typicky analyzovaný v rovin¥ zvané ohnisková. Ohnisková rovina odpovídá rovin¥ extrémní intenzity elektromagnetického pole v pr·b¥hu vlnoplochy sv¥tla podél optické osy z optické soustavy [7, 8]. Schopnost rozli²it zaost°ené odezvy sv¥telného elektromagnetického pole s jednotlivými objekty v ohniskové rovin¥ se v b¥ºném jazyce nazývá rozli²ení.

Samotný pojem rozli²ení tak, jak je b¥ºn¥ uºivateli sv¥telné mikroskopie pouºíván, tedy ve smyslu Abbeho rozli²ení [11] vychází ze zjednodu²eného popisu interferen£ního obrazce [12] a je limitujícím faktorem p°i pokusech o získání více informace ze sv¥teln¥ mikroskopického obrazu. Abbeho difrak£ní

limit toti^{o} p°i b¥^{o}né sv¥telné mikroskopii teoreticky zneumo^{o}¬uje odli²it dva body bli^{o}²í ne^{o} p°ibli^{o}n¥ 250 nm.

Nicmén¥ ji^{o} od konce 60. let je známa mo^{o}nost pozorovat objekt o velikosti 25 nm ve sv¥tlém poli bez pokus· o jeho p°esnou lokalizaci metodou zvanou videozesílená mikroskopie [13, 14]. V 80. letech 20. století byly dále popsány metody sub-rozli²ené lokalizace uorescen£n¥ zna£ených objekt· ve z°ed¥ných vzorcích [15]. V tomto textu jsou tyto metody nazývány superlokaliza£ními.

Superrozli²ovací mikroskopie je sv¥telná mikroskopie umo^{o}¬ující pozorovat objekty s rozli²ením vy²²ím ne^{o} teoreticky odvozený Abbeho difrak£ní limit. Superrozli²ení ve uorescen£ní mikroskopii bylo ocen¥no Nobelovou cenou za chemii v roce 2014. Moerner [16, 17] studoval opticko-absorp£ní spektrum molekuly pentacenu v hostitelském krystalu. Supperrozli²ovací metoda PALM (z angl. Photoactivated Localization Microscopy, [18, 19]) je naopak ur£ena pro sledování dynamických proces· v ^{o}ivých bu¬kách a zalo^{o}ena na stochastické aktivaci uorescence a p°eru²ovaném rozsv¥cování jednotlivých fotoaktivovatelných molekul. Ty jsou pak zobrazeny a p·sobením sv¥tla zhá²eny. Molekuly, které sídlí ve stejném difrak£n¥ omezeném objemu a jinak by byly prostorov¥ nerozli²itelné, jsou takto £asov¥ odd¥leny. Mikroskopie STED (z angl. Stimulated Emission Depletion) [20, 21] vyu^{o}ívá osv¥tlení dv¥ma r·znými tvary laserového paprsku, kdy oby£ejný paprsek excituje uorofor, zatímco dal²í paprsek toroidního tvaru vypíná uorofory mimo ohniskovou rovinu. Typy a nové perspektivy superrozli²ovacích mikroskopických metod jsou detailn¥ji popsány nap°íklad v pracích [22, 23].

Sou£asné superrozli²ovací/superlokaliza£ní metody se v¥t²inou zabývají pouze analýzou ka^{o}dého optického °ezu s uorescen£ním signálem zaost°eného objektu zvlá²´. V reálných vzorcích nenulové tlou²´ky je v²ak nezbytné analyzovat vzájemné informace v celém ohniskovém rozsahu n¥kolika optických °ez·. Navíc na²e p°edb¥^{o}ná pozorování videozesílenou mikroskopií nazna£ují, ^{o}e tvar rozptylové funkce se li²í podle intenzity dopadajícího sv¥tla [24].

My jsme prokázali, ^{o}e superrozli²ení/superlokalizace lze dosáhnout i p°i pou^{o}ití b¥^{o}ného mikroskopu v re^{o}imu sv¥tlého pole (P°ílohy A.3.1, A.3.2, A.3.4, A.6.2 A.6.4). Tento p°ístup pro superrozli²ení/superlokalizaci je obecn¥j²í a p°evádí zdánliv¥ optický problém na problém informa£ní v¥dy, zalo^{o}ený na ltrování primárních digitáln¥ mikroskopických obrazových dat výpo£tem vyu^{o}ívajícím Rényiho entropii. P°ístup £ist¥ informa£ní v¥dy skýtá potenciál zm¥nit celý obor sv¥telné mikroskopie.

Toto na²e nové paradigma analýzy mikroskopického obrazu je v souladu s Nijboerovou-Zernikeho teorií: podél optické dráhy mikroskopu m·^{o}eme najít bod (nulové velikosti), který odpovídá intenzitnímu maximu odezvy sv¥tla na pozorovaný objekt. P°i digitálním zobrazování lze tento bod nulové velikosti promítnout na pixel kamery. Tomuto bodu °íkáme elektromagnetický centroid. Novým aspektem na²eho paradigmatu je, ^{o}e za ur£itého statistického p°edpokladu hledáme body/pixely stejné intenzity mezi dv¥ma po sob¥ jdoucími obrazy optických °ez·, £ím^{o} provedeme analýzu jednotlivých voxel·. Jinými slovy, provedeme experiment ov¥°ený jiným experimentem. Tyto objekty jsme

nazvali 3D elektromagnetické centroidy (informa£ní t¥ºi²t¥; srovnej s 2D centroidem ve uorescen£ním zobrazování po proloºení dat metodou nejmen²ích £tverc·, nap°. [25]), a lze je nalézt v difrak£ním, uorescen£ním i re exním zobrazení s ohledem na multifraktalitu obrazu. Za p°edpokladu, ºe se tyto body nacházejí na opa£ných stranách skute£né ohniskové roviny obrazu pozorovaného objektu, m·ºeme de novat ohniskovou rovinu odezvy pozorovaného objektu. Výrazn¥ jsme tak zjednodu²ili 3D mapu odezvy elektromagnetického pole p°i jeho interakci s pozorovaným objektem. Zkonstruovali jsme 3D model této odezvy, který lze porovnat s pozorováním mikroskopií atomárních sil (AFM; P°ílohy A.3.1, A.6.2) nebo elektronovou mikroskopií (P°íloha A.1.1). Lokalizace elektromagnetických centroid· je dosaºena s p°esností v rozsahu lokalizace super/sub-rozli²ení. Tato metoda je také pouºitelná pro nezna£ené vzorky odráºející sv¥tlo v£etn¥ plastových nanovlákených sca old· a ºivých bun¥k a tkání. Stanovení vlastností uvnit° prostorového prvku (voxelu) je prvním krokem ke stanovení spektra absorbovaného/difrak£ního/re ektan£ního/ uorescen£ního sv¥tla a následn¥ i chemického sloºení a fyzikálního stavu pozorovaného objektu (P°íloha A.5.2). Takto nov¥ de novaná pozice ohniskové vzdálenosti umoº¬uje ú£innou segmentaci obrazu (P°ílohy A.7.1 A.7.2) a m¥°ení vnitrobun¥£né dynamiky (P°ílohy A.6.4 A.6.5).

V kontextu tohoto fyzikáln¥-matematického p°ístupu dále p°iná²íme technické poºadavky na konstrukci mikroskopu pro dosaºení superrozli²ení (P°íloha A.6.2). Z hlediska multifraktality je v²ak na²e metoda obecná a nevyºaduje superrozli²enou diskretizaci elektromagnetického pole. Technicky se daná velikost voxelu promítá do rozloºení (histogramu) intenzit obrazu zm¥nou jeho multifraktality [26].

Komplexn¥ kombinujeme r·zné p°ístupy a technická °e²ení, která jednotliv¥ nemají k lep²ímu °e²ení inverzního problému odhadu tvaru objektu z jeho rozptylové funkce velký p°ínos. P°i konstrukci digitálního sv¥telného mikroskopu a relevantního softwaru vycházíme ze t°í základních teoretických p°edpoklad·:

1. Na°ed¥ní signálu pozorovaných objekt· pro ú£ely superrozli²ení a superlokalizace lze dosáhnout bez jakékoliv úpravy elektromagnetického pole mikroskopickou optikou. Posta£uje velmi jednoduchá optika. Jedinou úpravou je zm¥na polohy vzorku vzhledem k optice mikroskopu (proost°ení).
2. Zkoumaný jev (mikroskopické zobrazení) je výsledkem chování souboru foton· a lze jej analyzovat p°ístupem spojitého elektromagnetického pole, který zaji²´uje, ºe m·ºeme hledat maximum/minimum v £asoprostorovém rozloºení elektromagnetického pole.
3. Pozorovaný obraz má multifraktální charakter odráºející dané technické nastavení (velikost kamerového pixelu a kroku podél optické osy) a jako takový je t°eba ho zkoumat. Multifraktální charakter obrazu je zp·soben tím, ºe obraz obsahuje odezvy velkého mnoºství podobných objekt· zkreslených pr·chodem optickou soustavou podobným zp·sobem ve vztahu k jejich poloze v·£i optice mikroskopu a tento signál je diskretizován £ipem kamery.

Kapitola 3

Konstrukce sv¥telného mikroskopu

Námi zkonstruované mikroskopy jsou b¥ºné digitální sv¥telné mikroskopy s vázaným so stikovaným °ídícím a analytickým softwarem. Základem za°ízení je co nejjednodu²²í konstrukce mikroskopu, díky £emuº dochází k eliminaci optických i mechanických vad obvyklých u sloºit¥j²ích komer£ních za°ízení (mikroskop·). Na vývoji spolupracujeme s externími £eskými a rakouskými strojírenskými, hardwarovými a softwarovými rmami: Petr Tax-Optax, Praha; Pavel Tichovský, Nové Hrady; ImageCode-Petr Machá£ek, Brloh; Synchronics Engineering, Heidenreichstein a Martin Novák, Nové Hrady.

První mikroskopy byly konstruovány v transmisním osv¥tlení, nicmén¥ v pozd¥j²ím vývoji jsme se zam¥°ili na konstrukci mikroskop· v odraºeném sv¥tle.

V první fázi technického vývoje jsme se zam¥°ili na mikroskop ur£ený zejména pro detailní pozorování a analýzu jedné sav£í bu¬ky, zatímco nyní stavíme mikroskopy s velkým zorným polem, kde je moºné sledovat v jednom obraze aº stovky sav£ích bun¥k s rozli²ením pod Abbeho difrak£ním limitem, £ímº je pro vyhodnocování dynamiky biologického procesu zaji²t¥n velký statistický soubor.

Výb¥r konstruk£ních prvk· mikroskopu je vºdy pod°ízen dané aplikaci. Nicmén¥ lze z konstruk£ního hlediska vystopovat námi obecn¥ pouºívané konstruk£ní principy k tomu, aby byla zaji²t¥na maximální extrakce informace ze sv¥teln¥ mikroskopického obrazu:

1. Výb¥r jednoduché optiky. Obecn¥ se vyhýbáme optice, která poskytuje kompromisní nebo hezky vypadající (dez)informaci o objektu. Pokud aplikace nevyºaduje jinak, up°ednost¬ujeme optiku telecentrickou, u níº se zv¥t²ení nem¥ní s polohou podél optické osy. Hloubku ostrosti je poté nutno de novat s ohledem na informaci v sousedních pixelech kamerového systému. Hranici objektu lze nalézt, pokud je gradient intenzity dostate£n¥ strmý, aby mezi dv¥ma sousedními body na senzoru byla informace odli²ná. Tím získáme nejlokalizovan¥j²í obrazovou (interferen£ní) odezvu sv¥telné vlnoplochy na objekt.
2. Konstrukce mikroskopu s vysokým £asovým a prostorovým rozli-²ením , který dokáºe zachytit tyto lokalizované informace v jednom voxelu. To je zaji²t¥no malým (v °ádu aº jednotek nm), ale rychlým krokem z-

motoru, velikostí teoretického objektu promítaného na jeden pixel kamery (v °ádech n¥kolika málo desítek nm), sb¥rem primárního digitálního RGB kamerového signálu s vysokou bitovou hloubkou a vysokou intenzitou osv¥tlení vzorku.

3. Analýza informace aº na limit datové sady pomocí informa£n¥-entropických a spektroskopických p°ístup·.

Zatímco v¥t²ina metod superrozli²ené/superlokalizované mikroskopie je zaloºena na p°edpokladu detekce signálu odd¥lených objekt·, nap°. [18, 20, 25], my snímáme obraz tkán¥, bun¥k nebo materiálu kompletn¥ a komplexn¥ a výpo£etn¥ hledáme hranice signál· jednotlivých objekt· aº na úrove¬ velikosti jednoho obrazového bodu.

P°ístup k vývoji mikroskopu je p°itom primárn¥ zaloºen na experimentu. V kterémkoli ze základních krok· výzkumu a vývoje, a´ uº je to kalibrace kamery, detekce zaost°ených objekt·, shlukování na základ¥ entropie obrazu nebo výpo£et spektrálních vlastností objektu, spoléháme výhradn¥ na výsledky experimentálních m¥°ení. Ta sice mohou být podobná teoretickým o£ekáváním, ale obecn¥ spí²e nejsou.

3.1 Konstrukce hardwaru

V rámci základního výzkumu jsme postupn¥ sestrojili t°i pln¥ digitální sv¥telné mikroskopy (tab. 3.1):

- NanoScope 2011 (obr. 3.1, tab. 3.2, P°ílohy A.5.1 A.6.5),
- SuperScope 2019 (obr. 3.2, P°íloha A.8.1),
- FutureScope 2021 (obr. 3.3, P°ílohy A.7.1 A.7.2).

Obrázek 3.1: Mikroskop pro analýzu jedné bu¬ky NanoScope 2011.

Obrázek 3.2: Mikroskop pro analýzu jedné bu¬ky SuperScope 2019.

Obrázek 3.3: Mikroskop pro analýzu stovek bun¥k FutureScope 2021.

Mikroskopy byly postaveny na základ¥ výb¥ru ²pi£kových komponent dostupných na tehdej²ím trhu. Tyto komponenty byly vy°adovány proto, aby byly spln¥ny p°edpoklady multifraktality a vysokého pom¥ru signálu k ²umu v mikroskopickém obrazu. Tímto jsme získali co nej£ist²í a nejsnázeji interpretovatelný signál pozorovaného objektu.

Tabulka 3.1: Speci kace hardwaru testovacích mikroskop· ÚKS FROV JU.

	NanoScope 2011	SuperScope 2019	FutureScope 2021
Kamera	JAI se senzorem Kodak KAI-16000	Ximea MX500-CG-CM -X4G2-FL RGB	SVS Vistek hr120
Technologie senzoru	CCD	CMOS	CMOS
Velikost senzoru (mm^2)	36,35Ö27,62	36,1Ö24,0	29,18Ö20,19
Velikost pixelu (µm)	7,4	4,6	2,2
Po£et pixel·	4872Ö3248; z toho 16 pufrovacích sloupc·	7920Ö6004	13264Ö9176
Bitová hloubka (bit px ^{1})	12	12	8
Max. kvantová výt¥ºnost (%)	29,8; 38,4; 44,3	45,5; 54,8; 48,9	43; 49; 35
Max. vlnová délka ltr· (nm)	620; 540; 470	600; 510; 450	600; 515; 465
Rozsah expozice (ms)	0 293,6	0,11	0 60 000
LED	Luminus 360 (2 ks)	Luminus CFT-90 -WDS-X11-VB500	Schott TLS-BF (proch.) Schott VisiLED S80-25 (odraº.)
Max. sv¥telná ú£innost	3600 lm (3000K CTT)	4860 lm	200 klx/8000 cd m^2
Schéma p°eru²ovaného osv¥tlení	sv¥tlo 0,2261 s tma 0,0969 s	sv¥telný puls odpovídá spou²t¥ní uzáv¥rky kamery	ºádné
Optické ltry	IR 775 nm, UV 450 nm; polariza£ní; kontrastní	ºádné	ºádné
Projek£ní £o£ka	4Ö	ºádná	ºádná
Z-krokování			
Pohybující se za°ízení	objektivová hlavice	stolek	stolek
Min. krok (nm)	134	4	20
Snímání a ukládání obrazu			
Velikost snímku (MB)	24	95	119

Tabulka 3.2: Speci kace vysokorychlostí kamery Basler ACA2000-340kc.

Technologie senzoru	CMOS
Velikost senzoru (mm^2)	11,26Ö5,98
Velikost pixelu (µm)	5,5
Po£et pixel·	2046Ö1086
Max. frekvence snímání (Hz)	340
Bitová hloubka (bit px ^{1})	12
Max. kvantová výt¥ºnost (%)	46; 48; 44
Max. vlnová délka ltru (nm)	650; 530; 470
Rozsah expozice (ms)	0 293,6

Digitální kamera

Prvním klí£ovým bodem v návrhu je pouºití digitální kamery s vysokým po£tem pixel·. Vyuºíváme velkoformátové kamerové £ipy s pixely submikronové velikosti. Postupným vývojem p°echázíme ke stále v¥t²ím kamerovým £ip·m se zmen²ujícím se kamerovým pixelem.

NanoScope 2011 byl vybaven CCD £ipem o formátu full-frame s pixelem 7,4 µm. Tento senzor neobsahuje UV a IR ltr a neºádoucí sv¥telné intenzity musely být odstran¥ny pomocí p°íslu²ných optických ltr· mikroskopu. V²echny ostatní kamery jsou jiº CMOS, u SuperScope 2019 o formátu full-frame s velikostí pixelu 4,6 µm, u FutureScope 2021 o formátu kamerového senzoru APS-H s 2,2µm pixelem. Tím p°i pouºití objektivu zv¥t²ujícího 10 dosahujeme velikosti objektu promítaného na kamerový pixel 220 nm. Trh v²ak jiº nabízí kamerové senzory s velikostí pixel· 0,4Ö0,4 μm^2, coº vede u kamerového senzoru APS-H k po£tu pixelu obrazu 2,5 Gpx. Tato kamera Canon LI8020 je v sou£asné dob¥ pro vyuºití ve sv¥telné mikroskopii v sestav¥ FutureScope testována. NanoScope 2011 obsahuje téº pr·myslovou vysokorychlostní 2Mpx kameru pro £asosb¥rné snímání.

V²echny kamery byly p°eprogramovány tak, aby poskytovaly primární, pokud moºno 12bitový, signál. Výjimkou je 120Mpx kamera SVS Vistek mikroskopu FutureScope 2021 dávající 8bitový signál, která nahradila p·vodní 10-bitovou kameru Arducam AR1820HS. Nicmén¥ i kamera SVS Vistek je na trhu dostupná jako 10bitová.

V²echny kamery jsou barevné (RGB), jejich senzor je vybaven Bayerovou maskou. Z t¥chto primárních obrazových dat (raw) dále rekonstruujeme barevný (RGB) obraz bez interpolace obrazových bod· (kap. 3.3.7), £i je vyuºíváme k výpo£tu viditelného sv¥telného spektra kaºdého jednotlivého obrazového pixelu (kap. 3.3.3).

Rychlost snímání je limitována velikostí obrazu (po£tem pixel·) a p°ípadn¥ krokem podél osz £i x, y.

Zdroj sv¥tla

Preferovaným zdrojem viditelného zá°ení pro dosaºení videozesílení jsou supersvítivé intermitentní LED. Ty byly v páru pouºity u NanoScope 2011. Vzhledem k jednoduchému °ízení mikroskopu bylo schéma blikání LED nepravidelné. Intenzita zá°ení byla nastavována jako proud procházející elektrodou (0 5000 mA). U SuperScopu 2019 byla instalována jedna silná LED, jejíº intenzita je nastavována v procentech maximální hodnoty. P°eru²ované zá°ení je v tomto p°ípad¥ jiº naprogramováno tak, ºe sv¥telný puls odpovídá £asu spou²t¥ní kamerové uzáv¥rky po posunu mikroskopického stolku (obr. 3.5).

V sou£asné dob¥ je FutureScope 2021 vybaven jednoduchým, komer£n¥ dostupným typem kontinuálního LED sv¥tla, kde není dosaºeno videozesílení. Tento mikroskop je moºné pouºít jak v reºimu procházejícího sv¥telného zá°ení, tak v reºimu odraºeného zá°ení. V p°ípad¥ procházejícího zá°ení je pouºit prosv¥tlovací stolek Schott TLS-BF. Pro snímání v odraºeném sv¥tle, coº je v sou£asné dob¥ nej£ast¥j²í reºim, je pouºito kruhové sv¥tlo se sadou LED Schott VisiLED upevn¥né kolem objektivu. P°i snímání v reºimu odraºeného sv¥tla má obraz intenzitní histogram podobný obrazu získaného z uorescen£ního mikroskopu.

Vºdy byla nastavována nejvy²²í moºná sv¥telná intenzita, a tedy nejnizší moºný expozi£ní £as kamery, které je²t¥ nevedly k saturaci senzoru. Vzorek ºivých bun¥k tedy snímáme co nejrychleji pro eliminaci skokových zm¥n v obraze.

Optika

Optika mikroskopu byla postupn¥ zjednodu²ována, z klasických mikroskop· s nekone£nou optikou a 4 zv¥t²ující projek£ní £o£kou Mitutoyo (NanoScope 2011) p°es nekone£nou optiku, ale xovanou v pozici nejmen²ích optických vad (SuperScope 2019), aº po konstrukci kamera-adapta£ní nástavec-tubusový objektiv integrované dohromady (FutureScope 2021). Optická dráha je tak nakonec velice jednoduchá, bez vloºených optických prvk·.

P°i mikroskopickém m¥°ení NanoScopem 2011 a SuperScopem 2019 jsme vyuºívali v²echny typy b¥ºných optických objektiv·:

- achromatické (pro korekci jedné vlnové délky na otvorovou vadu a dvou vlnových délek na barevnou vadu),
- apochromatické (pro korekci t°í barevných vad a zaost°ení t¥chto t°í barev do jednoho bodu).

Výrazné zjednodu²ení optické soustavy mikroskopu nastalo s vyuºitím tubusových objektiv·. Tato sestava kamera-objektiv se pohybuje podél optické dráhy, zatímco stolek z·stává pevný nebo je moºné jej vynechat £i nahradit jinými mechanickými za°ízení vhodnými pro dané m¥°ení. Tubusové objektivy jsou ve v¥t²in¥ p°ípad· vybaveny m¥°icí telecentrickou optikou s pevnou vzdáleností.

Koncept telecentrické optiky je pro vysv¥tlení konceptu na²eho výzkumu nejzajímav¥j²í. Ta je pou°ívána u za°ízení FutureScope 2021. Telecentrickou optikou vybereme po interakci sv¥telného zá°ení se vzorkem p°evá°n¥ centrální sv¥telné paprsky rovnob¥°né s optickou osou. Tím získáme obraz postrádající perspektivu. Obrazy objektu ve v²ech vzdálenostech od ohniska mají stejnou velikost a tvar. V b¥°né netelecentrické (endocentrické) optice je obraz tvo°en také paprsky, které nejsou rovnob¥°né s optickou osou. Výstup telecentrického zobrazovacího systému je zkreslen úzkou rozptylovou zobrazovací funkcí, kdy interferen£ní prstence jsou potla£eny. Ohnisko objektu potom rozpoznáme jako bod (voxel) extrémní intenzity podél optické dráhy paprsk·. Telecentrická optika také umo°¬uje zarovnat rozsahy pozic ohnisek r·zných barev (vlnových délek) a získat tak obraz poskytující v podstat¥ stejnou informaci jako barevná kamera kombinovaná s apochromatickým objektivem.

Pokusnými m¥°eními s moderními gigapixelovými kamerami s malým pixelem jsme v²ak zjistili, °e optika mikroskopu m·°e být je²t¥ mnohem jednodu²²í ne° ta, kterou pou°íváme v posledním testovacím typu mikroskopu FutureScope 2021, nebo je mo°né pou°ít makroskopickou (zmen²ovací) optiku a p°esto je mo°né díky malému pixelu kamery docílit mikroskopického obrazu. Je té° nutné pou°ívat objektivy designované na velké senzory kamer.

Mechanika

Mechanika mikroskop· je velice jednoduchá. Postupn¥ jsme p°e²li od posunu podél optické dráhy objektivovou hlavicí (NanoScope 2011) k posunu stolkem (SuperScope 2019, FutureScope 2021). D·vodem je, °e objektivová hlavice je na rozdíl od stolku vyrobeného z uhlíkového kompozitu velice t¥°ká a je t¥°ké dosáhnout p°esného jemného, n¥kolika nanometrového posunu. Nové mikroskopy v odra°eném sv¥tle (Visible Truth UltraEasy 2024, obr. 3.4) jsou v²ak navr°eny a vyrobeny tak, °e se podél optické osy posunuje sestava kamera-objektiv.

Posun podél optické dráhy byl v p°ípad¥ NanoScope 2011 zaji²t¥n nejd°íve piezomotorem dávajícím pr·m¥rný krok 119 nm. Pozd¥ji byl piezomotor odstra-n¥n a krokování zaji²´oval servomotor s pr·m¥rným krokem 134 nm. P°esná pozice pohybující se objektivové hlavice byla snímána a °ízena sondami Re-nishaw. SuperScope 2019 a FutureScope 2021 jsou vybaveny piezomotorem. SuperScope 2019 m·°e dosáhnout pr·m¥rného kroku a° 4 nm, co° m·°e slou°it pro testování limit· dosa°ení superrozli²ení, nicmén¥ pro praxi je takovýto krok zbyte£n¥ malý a nepou°itelný. FutureScope 2021 m·°e dosáhnout kroku podél optické dráhy 20 nm.

Ost°ení bylo u NanoScope 2011 pouze softwarové, zatímco dal²í dva mikroskopy jsou ji° vybaveny i manuálním ost°ením mikrometrickým ²roubem.

Obrázek 3.4: Mikroskop Visible Truth UltraEasy 2024.

3.2 Vývoj °ídícího softwaru

Vývoj °ídícího softwaru popisovaných mikroskop· odpovídal danému stavu tehdej²í techniky. V²echny t°i °ídící softwary (tab. 3.3) °ídí mechanické pohyby piezo- nebo servomotor·, jak je popsáno v kapitole 3.1.

3.2.1 NanoScope

První software NanoScope relevantního mikroskopu byl °ízen komplikovanou elektronikou. Hlavní nevýhodou tohoto systému bylo, ºe nebylo dosaºeno plné synchronizace blikání sv¥tla, snímání a pohybu podél optické osy a získané snímky byly v sérii intenzitn¥ nehomogenní. Software umoº¬oval nastavit £asosb¥r, x-, y-, nebo z-sken a jejich kombinaci, nicmén¥ vºdy pouze s konstantním £asovým nebo prostorovým krokem. Bylo moºné nastavit hodnoty intenzit blikajícího sv¥tla a kamery a softwarov¥ nastavit ltry a objektivy. Parametry nastavení m¥°icího protokolu bylo moºné uloºit do protokolu, zp¥tn¥ na£íst

do software a v£etn¥ polohy stolku a objektivu pro daný snímek ulo$it jako metadata do obrázku (vy£ítání metadat se provádí stisknutím klávesy F3). Dal²í nevýhodou bylo, $e software neobsahoval intenzitní histogram pro nastavení kamery a intenzity osv¥tlení. Kalibra£ní soubory jsou tvo°eny manuáln¥, postupným vkládáním ltr· s m¥nícím se stupn¥m ²edosti a vyhodnocovány softwarem VerCa (kap. 3.3.1).

3.2.2 SuperScope

Nevýhody softwaru NanoScope jsou ji$ odstran¥ny u softwaru SuperScope (P°íloha A.8.1, [27], d°íve NanoTruth) relevantního mikroskopu. Senzor digitální kamery mikroskopu SuperScope 2019 má men²í pixel, co$ umo$¬uje p°i men²ím celkovém zv¥t²ení mikroskopu vid¥t ve stejném detailu v¥t²í zorné pole. Horizontální pohyb stolku tedy ji$ není nutný. Sou£ástí mikroskopu (obr. 3.5) je °ídící jednotka s °ídící kartou s vlastními hodinami, která ovládá posun stolku se vzorkem podél osy z, rozsvícení, zhasnutí a intenzitu sv¥tla a dává pokyn kame°e ke snímání. Pokud je nastavena správná pozice stolku (ode£tena sondami Renishaw), rozsvítí se sv¥tlo a °ídící jednotka vy²le pokyn kame°e ke snímání. P°eru²ováním sv¥tla se omezí expozice vzorku a minimalizuje se jeho sv¥telné po²kození. Lze nastavit m¥°ící protokol tak, $e £asosb¥r, z-sken i jejich kombinaci lze provést s prom¥nlivými £asovými i prostorovými kroky. Dále je mo$né nastavit sv¥tlo a expozici kamery.

Obrázek 3.5: Schéma konstrukce optického mikroskopu v procházejícím sv¥tle (modrá), °ídící jednotky (£ervená) s následným zpracováním obrazu (lutá).

Získávání obrazových dat je °ízeno po£íta£em Jetson AGX Xavier, aby bylo dosa$eno rychlého analytického zpracování obrazu softwarovými nástroji uvedenými v kapitole 3.3. Informace o m¥°ení jsou ukládány do soubor· EXIF

a txt/xml. Software SuperScope je dále vybaven funkcí automatického snímání bílého standardu difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon® a tvorby kalibra£ního souboru a umo°¬uje následnou kalibraci surových dat (kap. 3.3.1).

3.2.3 CAMEX

•ídící software CAMEX mikroskopu FutureScope 2021 je verzí softwaru SuperScope roz²í°enou o analýzu obrazu Image Explorer (kap. 3.3.7), v£etn¥ vkládání m¥°ítka, s pozm¥n¥ným gra ckým u°ivatelským rozhraním. U °ídícího softwaru CAMEX instalovaného na mikroskopu FutureScope 2021 není nutné °e²it synchronizaci sv¥tla s kamerou, proto°e osv¥tlení je kontinuální. Software CAMEX má k vizualizaci dat implementovaný algoritmus LIL (kap. 3.3.7).

Tabulka 3.3: •ídící software (•SW) testovacích mikroskop· ÚKS FROV JU.

•SW	•ízení mechanických pohyb·	Synchronizace sv¥tla, snímání a pohybu	Nastavení parametr· m¥°ení
NanoScope	x,y-posun stolku, z-posun objektivové hlavice piezo ! servo	komplikovaná elektronika	£asosb¥r, z,x,y-sken a jejich kombinace (vºdy pouze konstantní kroky); nastavení ltr· a objektiv·; nastavení sv¥tla (v mA) a kamery; uloºení/na£ítání m¥°icího protokolu; ukládání metadat
SuperScope	z-posun stolku piezo	°ídící karta s vlastními hodinami	£asosb¥r, z-sken a jejich kombinace (moºné prom¥nlivé kroky); nastavení obrazu pomocí histogramu; nastavení sv¥tla (v % max. hodnoty); nastavení expozice kamery; ukládání metadat do EXIF a txt/xml; vytvo°ení kalibra£ního souboru
CAMEX	z-posun stolkem piezo	kontinuální osv¥tlení bez synchronizace	viz SuperScope, pouze pozm¥n¥né GUI; analýza obrazu Image Explorer; vkládání m¥°ítka

3.3 Analýza signálu z kamerového senzoru

Hlavním zájmem na²eho základního výzkumu bylo pomocí kompletní analýzy tvorby sv¥teln¥ mikroskopického obrazu získat odpov¥¤ na otázku, do jaké míry teoretický popis tvorby mikroskopického obrazu odpovídá pozorovaným jev·m.

Kamerový senzor vyuºíváme jako m¥°icí za°ízení. Obrazem (téº snímkem) v na²em p°ípad¥ nerozumíme upravený signál s cílem vytvo°it n¥jaký vjem, ale datovou sadu vzniklou interakcí foton· se senzorem kamery a následn¥ digitalizovanou, neboli neupravený kamerový signál. Pokud pojem obraz spojujeme s n¥jakým adjektivem, nap°. kalibrovaný , znamená to, ºe na daném obraze byla provedena n¥jaká matematická operace.

Av²ak v¥t²ina digitálních kamer v mikroskopii upravuje p·vodní signál tak, aby vznikl vizuáln¥ p¥kný obrázek bez jakékoliv v¥decké relevance. P°íslu²né algoritmy (nap°. vyváºení bílé nebo odstran¥ní neºádoucích intenzit obrazu) jsou ve v¥t²in¥ p°ípad· aplikovány na kaºdý snímek série zvlá²´, coº znemoº¬uje jakékoliv vzájemné porovnání snímk· v sérii. Takové znehodnocení informace v obraze postupn¥ brání správné manuální analýze snímk·, algoritmizaci analýzy obrazu a správné extrakci znalostí jako je lokalizace elementárních objekt· v pozorovaných materiálech. Na mikroskopických snímcích po°ízených digitální kamerou mohou dokonce zcela zbyte£n¥ chyb¥t celé objekty, £íºmo nemusí být dosaºeno správného stanovení chemického sloºení a fyzikálního stavu sledovaného materiálu. Tyto nedostatky je t°eba eliminovat.

P°i zpracování obrovských datových sad získaných mikroskopy technicky popsanými v kapitole 3.1 jsme nuceni °e²it problémy velkých dat (Big Data Problems). Nevyhnutelným technickým krokem, jak vy°e²it problémy velkých dat, je optimální algoritmizace v²ech operací. Kaºdou takovou algoritmizací popsanou dále v textu jsme získali dal²í informace základního charakteru o povaze a informa£ním obsahu obrazových dat. Algoritmizace má tedy pro nás nejen technický, ale hlavn¥ v¥decký význam.

Limitujícím faktorem vývoje navrºených algoritm· je výpo£etní rychlost a kapacita daná výpo£tem pixel po pixelu. Analytická zpracování obrazu uvedená dále vyºadují paralelizaci výpo£tu. Softwarové nástroje jsou dále postupn¥ vyvíjeny. N¥které algoritmy budou postupn¥ implementovány jako sou£ást °ídícího softwaru digitální kamery s cílem zpracování obrazu urychlit.

N¥které softwarové nástroje jsou obecn¥ pouºitelné v jakýchkoliv mikroskopických technikách vyuºívajících elektromagnetické zá°ení a obecn¥ji v jakékoli oblasti, kde je nezbytná objektivní analýza primárního signálu z digitální kamery.

3.3.1 Kalibrace optické dráhy

Analýza obrazu a její algoritmizace vyºadují co nejlep²í kvalitu obrazových výstup· danou technickým °e²ením mikroskopu popsaným v p°edchozí kapitole 3.1. (Ne)homogenity obrazu se p°i daném uspo°ádání optiky mikroskopu

je²t¥ více projevují p°i mikroskopii vzork· nenulové tlou²´ky. Nejlep²ím takovým obrazovým výstupem je radiometricky korigovaná sada snímk· s vysokým £asovým a prostorovým rozli²ením a bitovou hloubkou >8 bit px ^{1}. Metodu lze charakterizovat jako simultánní radiometrickou kalibraci optické dráhy a digitální kamery s následnou korekcí nehomogenit v obraze p°epo£tem intenzity ka°dého pixelu pomocí jeho individuální kalibra£ní k°ivky. Touto metodou získáme nejp°irozen¥j²í, nezkreslený obraz bez vad, jako jsou v²echny typy vin¥tace (optická, mechanická, p°irozená, pixelová) nebo nap°íklad p°ítomnost prachových zrn v optickém systému. Kalibra£ní soubory (kalibra£ní k°ivky pro v²echny pixely obrazu) je nutné zm¥°it a spo£ítat pro ka°dé technické nastavení mikroskopu (nap°. objektiv, kameru nebo intenzitu sv¥tla) zvlá²´.

Pokud takovýto fyzikáln¥-chemický (spektrální) p°ístup pou°ijeme pro kalibraci primárního signálu kamerového pixelu, je obrazová analýza zjednodu²ena, proto°e je umo°n¥na bez jakékoli sekundární po£íta£ové korekce (kompenzace) barevných zkreslení obrazu. Analýzou histogram· makroskopického obrazu bylo zji²t¥no, °e zatímco nekorigované histogramy odrá°ejí p°edev²ím aberace optické dráhy, korigované odrá°ejí skute£né rozdíly intenzit v reálné scén¥. Histogram kalibrovaného obrazu je strukturovan¥j²í, obsahuje více pík·, které jednotliv¥ odpovídají jednotlivým objekt·m v obraze (obr. 3.6 3.7).

Radiometrická kalibrace zvý²í výkon ka°dého b¥°ného mikroskopu. Jejím výstupem je informace o celkových sv¥telných energiích dopadajících na ka°dý pixel senzoru kamery. To je navíc vhodné pro vzájemné porovnání kamerových systém·.

Prvním °e²ením radiometrické kalibrace bylo poloautomatické °e²ení VerCa. Výrazného zjednodu²ení kalibra£ního procesu do²lo jeho plnou automatizací pomocí modulu v softwaru SuperScope/CAMEX.

VerCa

VerCa je softwarový nástroj pro kalibraci soubor· nezpracovaných obrazových dat pracující p°es p°íkazový °ádek Windows cmd. Samotná metoda je popsána v P°íloze A.5.1 a roz²í°ena o kvazispektrální analýzu v P°íloze A.5.2. Metoda VerCa je zalo°ena na korelaci spekter sv¥telné propustnosti sady ltr· s jejich snímky z kamery. Algoritmus vy°aduje na vstupu znalost spekter ltr· kamery a spektra zdroje sv¥tla.

Vstupem pro výpo£et kalibra£ních k°ivek (intenzita pixel· vs. integrál foton· dopadajících na kameru) je p°i transmisním zobrazování sada kalibra£ních surových obrazových dat spolu s korelovanými spektry sv¥telné propustnosti pro sadu ltr· r·zných úrovní ²edi o tlou²´ce n¥kolik nm. P°i re exním zobrazování bude optická dráha kalibrována bílým standardem difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon®. P°i uorescen£ním zobrazování p°edpokládáme pou°ití koncentra£ních °ad roztok· emitujících sv¥tlo.

Obrázek 3.6: Nekalibrovaný digitální obraz. a) Histogramy £erveného (R), zeleného (G) a modrého (B) kanálu p·vodního 12bitového primárního signálu. b) Relevantní komprimovaný 8bitový obraz (LIL, kap. 3.3.7). (P°ejato z [1].)

Automatický kalibra£ní algoritmus

Pln¥ automatizovaná metoda kalibrace, implementovaná do °ídícího software SuperScope/CAMEX, vyuºívá zm¥ny délky expozice kamery. P°i kalibraci zobrazení v procházejícím sv¥tle neobsahuje optická dráha ºádný kalibra£ní prvek, p°i kalibraci zobrazení v odraºeném sv¥tle je na mikroskopický stolek umíst¥n bílý standard difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon®.

Text níºe p°edpokládá monochromatický snímek. Pro vícekanálové (nap°. RGGB) snímky je výpo£et analogický, kdy kaºdý kanál je povaºován za samostatný monochromatický snímek.

1. VYTVO•ENÍ KALIBRAƒNÍHO SOUBORU
   a. Zji²t¥ní rozsahu expozi£ních £as·. Dolní expozi£ní £as($expT_{low}$) je nejkrat²í expozi£ní £as, který kamera umoº¬uje nastavit. Horní

Obrázek 3.7: Kalibrovaný makroskopický digitální obraz (akvárium s rybami obklopeno £ty°mi zrcadly). a) Histogramy £erveného (R), zeleného (G) a modrého (B) kanálu kalibrovaného 12bitového primárního signálu. b) Relevantní komprimovaný 8bitový obraz (LIL, kap. 3.3.7). (P°ejato z [1].)

expozi£ní £as ($ExpT_{high}$) je takový nejkrat²í £as, p°i kterém je p°eexponováno 99% pixel· na snímku.

b. Podle u°ivatelem zadaného po£tu kalibra£ních snímk· (N) se ekvidistantn¥ stanoví expozi£ní £asy v intervalu $\langle ExpT_{low}; ExpT_{high} \rangle$, ozn. $\{ExpT_i\}$, kde $i \in \{1..N\}$.

c. Nasnímají se kalibra£ní snímky pro jednotlivé expozi£ní £asy $\{ExpT_i\}$. Snímky ozna£íme I_i pro $i \in \{1..N\}$.

d. Ka°dý snímek má rozm¥ry $H \times W$, kde H je vý²ka, W je ²í°ka. Pixel na i-tém snímku na pozici $[r, c]$ ozna£íme $P_i(r, c)$, kde $r \in \{1..H\}$ a $c \in \{1..W\}$. Ozna£ení (r, c) znamená (row, column), angl. (°ádka, sloupec).

e. Hodnoty pixel· na stejné pozici $(r; c)$ p°es v²echny kalibra£ní snímky se°azené od nejkrat²í expozice po nejdel²í by m¥ly r·st. Platí tedy $P_{i\ 1}(r; c) < P_i(r; c)$.

f. Hodnoty se°azených pixel· (viz bod 1e) nazývejme kalibra£ní k°ivkou. Kalibra£ní k°ivku na pozici $(r; c)$ ozna£íme $C(r; c) = f P_1(r; c)::$ $P_N(r; c)g$.

g. Vyhledají se vadné pixely. Jsou to takové pixely, u nich^o není spln¥na podmínka z bodu 1e. Mno^{o}inu vadných pixel· ozna£me Q a po£et vadných pixel· $\# Q$.

h. Pro ka^{o}dou pozici $(r; c)$ se vypo£te st°ední kalibra£ní k°ivka, $AvgC(r; c)$ (u vícekanálových snímku se vypo£te pro ka^{o}dý kanál zvlá²´). Platí:

$$AvgC(r; c) = \sum^{X} \frac{P_i(r; c)}{(N \quad \# Q)}; \tag{3.1}$$

kde $i\ 2\ f\ 1::N\ g$ a pozice$(r; c)$ v sob¥ nezahrnují pozice vadných pixel·.

i. Do výsledného kalibra£ního souboru se ulo^{o}í:
   - kalibra£ní snímky a jejich metadata (zejména expozi£ní £as);
   - polohy vadných pixel·;
   - pr·m¥rné kalibra£ní k°ivky;
   - spektrum ltr· kamerového senzoru;
   - spektrum osv¥tlení pou^{o}itého p°i kalibraci a expozi£ní £as, p°i kterém bylo spektrum sv¥tla m¥°eno.

2. VLASTNÍ KALIBRACE OBRÁZKU

a. Nejprve prob¥hne inicializace kalibra£ního souboru:
   (i) Vypo£tou se integrály, které se na²kálují na po^{o}adovanou bitovou hloubku, kterou mají mít kalibrované obrázky.
   (ii) Na£tou se polohy vadných pixel·.
   (iii) Pro ka^{o}dý vadný pixel se na£tou k°ivky okolních validních pixel· (v daném kanálu) a z nich se vypo£te pr·m¥rná k°ivka, kterou se nahradí daný vadný pixel.
   (iv) Pokud se v bod¥ 2(a)iii nepoda°í najít ^{o}ádný okolní validní pixel (neboli sousedi jsou také vadné pixely), nahradí se daný vadný pixel pr·m¥rnou globální kalibra£ní k°ivkou popsanou v bod¥ 1h.
   (v) Na£tou se kalibra£ní snímky (k°ivky) s opravenými vadnými pixely.

b. Samotná kalibrace pak u^o probíhá tak, ^{o}e pokud je hodnota pixelu snímku na pozici $(r; c)$ v rozmezí hodnot kalibra£ní k°ivky $C(r; c)$, vypo£te se odpovídající hodnota integrálu následovn¥:
   (i) V obraze pro ka^{o}dé sv¥telné spektrum jsou nalezeny a ignorovány nevalidní (záporné a nulové) pixely.

(ii) Ve zbývajících (validních) pixelech je na ka^{o}dém konci histogramu nalezen kvantil 0,05.

(iii) Pixely vy°azené v kroku 2(b)i jsou nahrazeny kvantilovými pixely de novanými v kroku 2(b)ii.

(iv) Generuje se lineárn¥ rozlo^{o}ený vektor vlnových délek.

(v) Nové spektrum S_i je interpolováno Akimovým algoritmem [28, 29].

(vi) Z vyhlazeného spektra $S_L(\ )$ se vypo£tou kalibra£ní sv¥telná spektra jako

$$S_i(\ ) = S_L(\ )\frac{ExpT_i}{ExpT_L}; \qquad (3.2)$$

kde $ExpT_L$ je doba expozice (integrace), p°i které bylo m¥°eno sv¥telné spektrum vláknovým spektrofotometrem, a £asové expozice $f ExpT_i g$ byly získány, jak je popsáno v kroku 1b, a je vlnová délka sv¥tla. Tímto zp·sobem získáme N sv¥telných spekter S_i, kde $i\ 2\ f\ 1::N\ g$.

(vii) Ka^{o}dé sv¥telné spektrum $S_i(\ )$ je vynásobeno p°íslu²ným (R, G, B) spektrem kvantové ú£innosti kamerového ltru. Takto získáme spektra propustnosti sv¥tla $T_i(\ )$.

(viii) Pro ka^{o}dé diskrétní sv¥telné spektrum $T_i(\ )$ jsou lichob¥^{o}níkovou metodou vypo£teny integrály ploch pod spektrem.

c. Pokud je hodnota pixelu men²í ne^{o} nejmen²í hodnota na kalibra£ní k°ivce, hodnota integrálu se vypo£te pro intenzitu vypo£tenou interpolací mezi 0 a nejni^{o2}í (první) hodnotou na kalibra£ní k°ivce.

d. Jestli^{o}e je hodnota pixelu v¥t²í ne^{o} nejvy²²í hodnota na kalibra£ní k°ivce, pou^{o}ije se hodnota integrálu odpovídající nejvy²²í (poslední) hodnot¥ intenzity na kalibra£ní k°ivce (neextrapoluje se).

Datové formáty HDF5

•ídící softwary SuperScope a CAMEX pracují se standardními obrazovými formáty a formátem *.mat. Speci ckými, na zakázku vytvo°enými datovými formáty [30] jsou obrazový formát H5I (zkr. H df5 I mage) a formát kalibra£ních soubor· HCLB (zkr. H df5 C aL i B ration). Tyto formáty jsou zalo^{o}ené na knihovn¥ HDF5 [31], podporované softwary CAMEX a SuperScope a vhodné pro práci s daty ze SuperScopu a FutureScopu (nap°. výpo£ty kalibrací optických drah a korekcí snímk·).

Jedná se o formáty

1. nekomprimované, ale
2. rychlé p°i zápisu i £tení,
3. umo^{o}¬ující na£tení pouze £ásti obrázku; velký obrázek lze nativn¥ na£íst po £ástech (bez p°edchozího nahrání celého obrázku do pam¥ti),
4. nahrání metadat samostatn¥ a

5. roz²í°ení o dal²í informace p°i zachování kompatibility.

Formát H5I

1. m·ºe být roz²í°en o dal²í atributy snímku a metadata (údaje o snímku a jeho zpracování, nap°. o kalibraci, poloze podél optické dráhy a intenzit¥ osv¥tlení), která je t°eba uloºit do souboru,
2. ukládá histogram a náhled obrázku, které lze na£íst samostatn¥, aniº by bylo nutné na£ítat celý soubor. To je nap°íklad vhodné pro rychlé ur£ení bitové hloubky obrazu v datových souborech (pokud není známa) v softwaru IIEP (kap. 3.3.2) nebo LIL (kap. 3.3.7).

Formát HCLB obsahuje

1. metadata s informacemi o podmínkách kalibrace (nap°. o pouºité kame°e, optice, osv¥tlení a rozsahu expozic),
2. obrazová data a metadata jednotlivých kalibra£ních snímk·,
3. spektrum kamery a spektrum osv¥tlení, dále vypo£tené integrály pro vlastní kalibraci a
4. informace o vadných pixelech.

3.3.2 Informa£ní p°ínos jednotlivých pixel·

Nejobecn¥j²í moºný p°edpoklad o obrázku, a to bez ohledu na jeho p·vod, je, ºe je multifraktální. Ve správn¥ kalibrovaném snímku (kap. 3.3.1) je multifraktalita zp·sobena kombinací t°í fyzikálních proces· b¥hem vytvá°ení obrazu:

1. interakcí sv¥tla se vzorkem,
2. p°i pr·chodu sv¥tla mikroskopem a
3. diskretizací získaného signálu na £ipu kamery.

Zejména diskretizace signálu na kamerovém £ipu má zásadní vliv na novou teoretickou interpretaci mikroskopického obrazu.

Za ú£elem nového popisu mikroskopického digitálního obrazu jsme vyvinuli principiáln¥ novou informa£ní analýzu, jak zkoumat informaci nesenou obrazovým bodem (pixelem) v multifraktálním datovém souboru. Výpo£et pouºívá jednoparametrovou Rényiho entropii s parametrem pro danou prav-d¥podobnostní distribuci P

$$H \quad (P) = \frac{1}{1} \ln @ \sum_{j=1}^{k} (p_j) \quad A \qquad (3.3)$$

nebo Shannonovu entropii (analogii Gibbsovy-Boltzmannovy fyzikální entropie) p°i hodnot¥ parametru rovné 1

$$S \;=\; H_1(P) = \sum_{j=1}^{k} p_j \ln(p_j); \qquad (3.4)$$

kde p_j je pravd¥podobnost výskytu j-tého jevu (intenzity) v systému (obrazu).

Veli£ina informa£ní p°ísp¥vek bodu (PIG, z angl. Point Information Gain; P°ílohy A.3.1 A.3.3) je de nována jako zm¥na informace odstran¥ním pixelu ur£ité intenzity z obrazu a charakterizuje statický obraz:

$$^{(i)} \qquad ^{(i)}(P) = H \quad P^{(i)} \quad H \ (P): \tag{3.5}$$

Podobn¥ je de nována veli£ina divergentní p°ísp¥vek bodu (PDG, z angl. Point Divergence Gain; P°íloha A.3.4) charakterizující dynamický obraz, a to jako zm¥na informace p°i zám¥n¥ pixelu na stejné pozici ve dvou po sob¥ jdoucích snímcích:

$$^{(l!\ m)} \qquad ^{(l!\ m)}(P) = H \quad P^{(l!\ m)} \quad H \ (P); \tag{3.6}$$

V rovnicích (3.5) (3.6) jsou

- $H\ (P)$ Rényiho entropie po£ítaná z pravd¥podobnostního histogramu P p·vodního obrazu,
- $H\ P^{(i)}$ Rényiho entropie po£ítaná z pravd¥podobnostního histogramu $P^{(i)}$ stejného obrazu bez pixelu intenzity i a
- $H\ P^{(l!\ m)}$ Rényiho entropie po£ítaná z pravd¥podobnostního histogramu $P^{(l!\ m)}$, kdy pixel intenzity l p·vodního obrazu byl zam¥n¥n za pixel intenzity m následujícího obrazu.

Tímto informa£ním p°ístupem lze zkoumat seskupení pixel· na základ¥ r·zných Rényiho koe cient· odráºejících multifraktalitu obrazu. Ob¥ veli£iny spojují podobné intenzity obrazu do shluk·, £ímº segmentují obraz na jednotlivé £ásti se stejnými p°íznaky. Nalezená pravidla seskupování nám umoºnila vyvinout algoritmy, které automaticky seskupují objekty v mikroskopickém obrazu. Nízké hodnoty umoº¬ují extrahovat vzácné jevy z celkového rozd¥lení, zatímco vysoké dávají jednu hodnotu $^{(i)}$ £i $^{(l!\ m)}$ pro jevy podobných hodnot. P°i $! 1$ dokonce dosáhneme odd¥lení málo informativního pozadí od zbytku obrázku.

Výpo£et $^{(l!\ m)}_2$ je zobecn¥ním jednoduchého ode£tení dvou po sob¥ jdoucích kalibrovaných (kap. 3.3.1) snímk· v sérii posunutých podél optické dráhy mikroskopu (podle typu vzorku) o malý krok a umoº¬uje lokalizovat 3D elektromagnetické centroidy (kap. 2). Aproximace výpo£tu $^{(l!\ m)}_2$ prostým ode£ítáním m·ºe zpracování obrazu dále podstatn¥ urychlit.

Z prom¥nných $^{(i)}$ a $^{(l!\ m)}$ lze vyjád°it aditivní veli£iny

- entropie informa£ního p°ísp¥vku bodu H (PIE; z angl. Point Information Gain Entropy) jako sou£et v²ech hodnot $^{(i)}$ v obraze,
- hustota entropie informa£ního p°ísp¥vku bodu (PIED; z angl. Point Information Gain Entropy Density), kdy kaºdá hodnota $^{(i)}$ vyskytující se v obraze je p°i£tena pouze jednou,
- entropie divergentního p°ísp¥vku bodu l (PDGE; z angl. Point Divergence Gain Entropy) jako sou£et v²ech absolutních hodnot $^{(l!\ m)}$ v obraze a

- hustota entropie divergentního p°ísp¥vku bodu (PDGED; z angl. Point Divergence Gain Entropy Density), kdy každá hodnota $(!\ m)$ vyskytující se v obraze je p°i£tena pouze jednou.

Spektra aditivních veli£in (tj. entropie a hustoty entropie) nám umo¾¬ují jednozna£n¥ reprezentovat obraz. Tato speci kace obrazu je u¾ite£ná pro statistické shlukování (klastrování) samotných snímk· (P°ílohy A.3.2 a A.3.4). Metoda výpo£tu informa£n¥-entropických veli£in a relevantní klastrování snímk· byly ov¥°ovány na datových sadách chemických experiment· a matematických simulací modelového multifraktálního systému samoorganizující se B¥lousovy-šabotinského reakce v pracích A.2.1, A.1.1 a A.3.2 (simulace popsány v P°ílohách A.2.2 A.2.3. Data nam¥°ená a kalibrovaná (kap. 3.3.1) p°i homogenním osv¥tlení vytvo°ila v p°ípad¥ B¥lousovy-šabotinského chemické reakce v prostoru prvních t°í hlavních komponent PCA (analýza hlavních komponent, z angl. Principal Component Analysis) dvojk°ivku po sob¥ jdoucích jednotlivých bod·, které odpovídají jednotlivým obrázk·m série. Roz²t¥pení na dvojk°ivku vzniká, pokud se na snímku v sérii objeví nová vlna. Obrazová série byla klastrována do sedmi klastr· (shluková analýza k-means s euklidovskou vzdáleností; obr. 3.8) dle vizuáln¥ pozorovaných stádií reakce.

Problémem mikroskopických snímk· získaných digitálním fotoaparátem nebo kamerou je, ¾e v¥t²ina z nich vykazuje na objekt p°íli² málo pixel·, proto¾e obecnou lozo í prodejc· mikroskop· je dodávat k mikroskop·m digitální kamery a zv¥t²ení, kde výsledná velikost objektu promítaného na jeden pixel odpovídá Abbeho rozli²ení, a tudí¾ velikosti v¥t²í ne¾ 300 300 nm^2. I kdybychom pln¥ p°ijali pravdivost Abbeho difrak£ního limitu, p°esto k nalezení maxima Airyho disku pot°ebujeme podle vzorkovacího teorému (nap°. [32]) ke správné de nici teoretické odezvy pozorovaného objektu bod· více. Velikost kamerového pixelu zv¥t²eného objektivem musí být tudí¾ men²í ne¾ 100 100 nm^2. Rozumných výsledk· automatizované obrazové analýzy p°i detekci objemové odezvy pozorovaného objektu pomocí výpo£tu $(!\ m) = 0$ nikoli v²ak superrozli²ení lze ov²em dosáhnout i v nedostate£n¥ navzorkovaných souborech dat (obr. 3.9 3.10). Mno¾ství informace ztracené nedostate£nou digitalizací signálu závisí na povaze vzorku (na jeho multifraktalit¥ a fyzikáln¥-chemických vlastnostech).

Obrazová analýza digitálních mikroskopických snímk· metodou informa£ního/divergentního p°ísp¥vku bodu nám umo¾nila pochopit jejich strukturu a nov¥ de novat pojmy 3D elektromagnetický centroid a rede novat pojmy ohnisková rovina a ohnisková hloubka [24]. To nám usnadnilo interpretaci jev· pozorovaných mikroskopem:

1. Nalezení elementárních bod· objektu v ohnisku: Metoda umo¾¬uje najít zaost°ené body (3D elektromagnetické centroidy) v z-skenu snímk· prakticky z jakékoliv neskenovací sv¥telné mikroskopie, a´ ji¾ v jasném poli, tmavém poli, odra¾eném zá°ení nebo uorescenci, stejn¥ jako u v¥t²iny ostatních typ· mikroskopie vyu¾ívajících elektromagnetické zá°ení, jako je

Obrázek 3.8: Sedm klastr· (barevn¥ kódované) PCA modelu makroskopické digitální £asosb¥rné série B¥lousovy-šabotinského reakce snímané vysokorychlostní kamerou JAI SP-5000-USB. PCA Model byl po£ítán z3 2 2 12 hodnot H a I ({R,G,B} {Whole, Cross} { H , I } {po£et }). (P°ejato z [2].)

elektronová mikroskopie. Z nalezených ohniskových bod· lze vyhlazovacím interpola£ním algoritmem [3] obraz rekonstruovat (obr. 3.11 3.12).

2. (Semi)objektivní stanovení ohniskové hloubky: Obraz °ezu zaost°eného nebodového objektu (vzorku) je intenzitn¥ nejstrukturovan¥j²í. Nalezení ohniskové roviny a ohniskové hloubky lze provést charakterizací ka°dého jednotlivého obrázku v sérii jednou nebo více aditivními informa£ními veli£inami nebo sadou hodnot (spektrem) veli£in závislých na parametru . Tato charakterizace snímk· je následována shlukovou analýzou hodnot veli£in nebo vektor· spekter. Volba vhodné aditivní veli£iny je do jisté míry závislá na typu pozorovaného objektu, rozsahu zkreslení rozptylovou funkcí, a tedy struktu°e mikroskopických snímk·. Zji²t¥ní rozsahu obrazové série s detekovanými 3D elektromagnetickými centroidy je stále do ur£ité míry závislé na subjektivní analýze k°ivky aditivní informa£ní veli£ina vs. z-polohaa na paralelních m¥°eních pomocí AFM. Pevn¥j²í základ pro objektivní zji²t¥ní v²ech nejtmav²ích/nejjasn¥j²ích odezev detekovatelných objekt· v ohnisku, které zp·sobují difrakci, uorescenci nebo odraz poskytla op¥t kalibrace obrazu (kap. 3.3.1) p°edcházející samotné analýze obrazové informace. Vzhledem k vy²²í citlivosti up°ednost¬ujeme

Obrázek 3.9: Tká¬ rakoviny prostaty zna£ená 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI) ohnisková rovina. Obrazová data byla získána na konfokálním mikroskopu TissueFax-PLUS. Velikost voxelu v sérii je 328 328 100 nm^3. Bitová hloubka p·vodních snímk· je 13 bit cdot px. 8Bitová vizualizace LIL (kap. 3.3.7). (Spolupráce s TissueGnostics GmbH, Víde¬, Ústavem zdravotnických v¥d a biomedicíny Dunajské univerzity v Kremsu a Léka°skou univerzitou ve Vídni).

k detekci vysoce strukturované ohniskové roviny v kalibrovaných snímcích klastrování -závislých spekter H a P p°ed a I . Na²e výpo£etní experimenty ukázaly, ºe u správn¥ nam¥°ených dat je moºné shlukovou analýzou získat stabilní °e²ení po£tu jednozna£n¥ ur£ených skupin snímk·.

3. M¥°ení dynamiky: Pro m¥°ení v dynamických systémech lze k vyjád°ení £asoprostorové zm¥ny vyuºít veli£inu divergentní p°ísp¥vek bodu $^{(l!\ m)}$ a její entropii a hustotu entropie. Pokud se objekt v £ase a prostoru nezm¥ní, potom platí, ºe $^{(l!\ m)} = 0$. Naopak pro nejpohybliv¥j²í a £asov¥ nestálé objekty platí, ºe $j\ ^{(l!\ m)}j = \max(\ )$, kde je mnoºina v²ech hodnot $^{(l!\ m)}$ v obraze.
4. Kolokalizace ohniskových rovin: Kolokalizace dvou aº t°í barevných obrazových kanál· snímk· ze sv¥teln¥ mikroskopického z-skenu, a´ jiº v jasném poli, uorescenci (obr. 3.13 3.14) nebo tmavém poli, je d·leºitým procesem pro správnou interpretaci mikroskopického pozorování. Op¥t je moºné pro tyto ú£ely pouºít výpo£et $^{(l!\ m)}$ pro kaºdý barevný kanál. Po odstran¥ní pozadí odpovídající hodnotám $^{(l!\ m)} = 0$ pro 50 1 je

Obrázek 3.10: 3D Elektromagnetické centroidy vzorku tkán¥ lidské prostaty. (pravý sloupec) Hodnoty $^{(I!\ m)}_{2} = 0$ pro auto uorescenci v £erveném kanálu kamery (RAF) a pro jádra obarvená 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Velikost zorného pole je 164 164 μm^2. (levý sloupec) Detail £erven¥ uoreskující organely. (ºlutá) Voxely $^{(I!\ m)}_{10} = 0$ pravd¥podobnostn¥ odpovídající rozptylové funkci objektu, (£erná) voxely $^{(I!\ m)}_{2} = 0$ pravd¥podobnostn¥ odpovídající detekovaný objekt. Znázorn¥n levý roh obrazové série, jejíº ohnisková rovina je na obr. 3.9.

moºné najít pro kaºdý kanál rozsah a ohniskovou rovinu jako minimum hodnoty aditivní veli£iny $^{(I!\ m)}_{2}$ nebo maximum aditivní veli£iny $_{2}$ podél z-skenu. Pokud data vyºadují dal²í statistickou korekci, nap°. potla£ení obrazového ²umu, je moºné dané veli£iny po£ítat pro > 2. Pozice ohniskových rovin a rozsah· tak mohou být následn¥ srovnány, £ímº se koriguje achromatická aberace optické soustavy mikroskopu.

Image Info Extractor Professional (IIEP)

IIEP v. 2.0.39 (P°ílohy A.3.1 a A.3.4, obr. 3.15) je softwarový nástroj slouºící k výpo£tu informa£n¥-entropických veli£ininforma£ní/divergentní p°isp¥vek bodu (PI/DG) a souvisejících entropií a hustot entropií z primárních videosignál·, a to barevných (RGB) i ²edotónových. Software pracuje se v²emi vstupními formáty obrázk·: png, tif, ti , jpg a jpeg. V²echny veli£iny mohou být po£ítány

1. z histogramu intenzit celého snímku (globální metoda Whole) nebo
2. z histogramu intenzit pouze £ásti snímku: z k°íºe (metoda Cross), obdélníku (metoda Rectangle) a elipsy (metoda Ellipse).

Obrázek 3.11: Rekonstrukce mikroskopického obrazu rozsivek (Diatomeae) z bodů v ohnisku. a) Původní obrázek z čipu 47Mpx kamery světelného mikroskopu. b) Kalibrovaný obrázek, v němž byly kompenzovány rozdíly v odezvách jednotlivých prvků kamerového senzoru. c) Body v ohniskové rovině, fakticky voxely (3D pixely) 46 46 10 nm^3 zobrazené v intenzitách odpovídajících danému bodu. d) Pseudopovrch pokrývající intenzity v ohniskové rovině. Přiblížení k případu, kdy by byl objektem veden řez tloušťky 10 nm a na něm by probíhaly všechny pozorované jevy (např. rozptyl světla, absorpce světla nebo fluorescence). Výpočet proveden dle [3].

Obrázek 3.12: Rekonstrukce mikroskopického obrazu z bodů v ohnisku – detail obr. 3.11.

Obrázek 3.13: 3D kolokalizace barevných obrazových kanál· tkán¥ rakoviny prostaty pomocí výpo£tu $^{(l!\ m)} = 0$ 2D projekce do roviny xy. Znázorn¥n levý roh obrazové série, jejíº ohnisková rovina je na obr. 3.9. 8Bitová vizualizace LIL (kap. 3.3.7).

Software je vybaven dal²ími funkcemi pro potla£ení vad pozadí a obrazu b¥hem výpo£tu:

- ignorování £erného pozadí,
- odstran¥ní £erných kalibra£ních sloupc· a °ádk· v obraze a
- odstran¥ní vadných pixel·.

Kaºdý barevný ltr Bayerovy masky se po£ítá zvlá²´. Dva zelené pixely £tve°ice Bayerovy masky lze uvaºovat samostatn¥ nebo zpr·m¥rovat.

Výstupní PIG nebo PDG lze uloºit jako

- obrázek RGB, p°i£emº pozitivní a negativní PDG jednoho obrázku jsou uloºeny odd¥len¥ bez znaménka jako dva 8bitové snímky.
- matici *.mat (MATLAB): primární výstup ve formátu s pohyblivou °ádovou £árkou s dvojnásobnou p°esností.

Výsledky pro kaºdý barevný kanál obrazu lze uloºit

- samostatn¥ (kdy má kaºdý barevný kanál £tvrtinový po£et pixel· neº p·vodní primární obraz; zelený kanál je pr·m¥rovaný ze dvou pixel· Bayerovy masky) nebo

Obrázek 3.14: Detail organely po 3D kolokalizaci barevných obrazových kanál· tkán¥ rakoviny prostaty získaný výpo£tem $^{(I!\ m)} = 0$ bo£ní pohled. Detail obr. 3.9.

Obrázek 3.15: Gra cké u^{o}ivatelské rozhraní softwaru Image Info Extractor Professional.

- ve formátu primárních obrazových dat (kdy jsou barevné kanály rozlo^{o}eny jako vstupní Bayerova maska; pixely pro zelený ltr se nepr·m¥rují).

Výstupní hodnoty entropií a hustot entropií se ulo^{o}í do vektoru ve formátu *.mat.

Pro spu^{2}t¥ní IIEP je nezbytná NVIDIA, její^{o} po^{o}adavky závisí na velikosti obrazu. Pokud je NVIDIA k dispozici, pou^{o}ívá se GPU pouze k výpo£tu hodnot Cross. Hodnoty z celého obrazuWhole se po£ítají pouze na CPU.

3.3.3 Kvazispektrální analýza

Rekonstrukce transmisních, re ektan£ních nebo uorescen£ních (kvazi)spekter z digitálního mikroskopického RGB signálu (P°íloha A.5.2) je zalo^{o}ena na p°edpokladu plynulosti zm¥ny sv¥telného spektra v prostoru, dokud není detekována hrana jako náhlá zm¥na barvy. Výpo£et kvazispekter dále zahrnuje výstupy radiometrické kalibrace (kap. 3.3.1). Tím jsou de novány oblasti identických spekter. V t¥chto oblastech ur£ujeme spektra, která se po£ítají ze spektra sv¥telného zdroje, spekter ltr· pixel· kamerových £ip· a prostorového rozlo^{o}ení signál·. Jinými slovy, ur£ujeme p°enosové kvazispektrum pozorovaného objektu (nap°. organely v cytoplazm¥).

Podmínkou samotného m¥°ení je, aby se provád¥lo barevnou kamerou vybavenou Bayerovou maskou, kde se spektra jednotlivých ltr· £tve°ice Bayerovy masky navzájem p°ekrývají.

Vstupem algoritmu jsou

1. snímky bílého standardu difuzní odrazivosti (99 %) Spectralon® v od-ra^{o}eném zá°ení p°i r·zných expozicích kamery nebo procházející sv¥tlo tlumené bu¤ sadou ltr·, nebo snímané p°i m¥nící se expozici kamery,
2. spektra kamerových ltr· (R, G, G, B) a
3. spektrum zdroje zá°ení.

Pro ka^{o}dou £tve°ici pixel· Bayerovy masky se z kalibra£ních snímk· vytvo°í £ty°i kalibra£ní k°ivky závislosti skute£n¥ nam¥°ených hodnot elektrické odezvy prvku kamerového senzoru (tj. intenzity obrazu) na nam¥°eném a vypo£teném celkovém spektrálním zá°ivém tokuQ$_c$:

$$Q_c = \int_{\min}^{\max} S(\ ) \ F_c(\ ) \ d\ ; \qquad (3.7)$$

kde S( ) je sv¥telné spektrum zdroje zá°ení aF$_c$( ) je spektrum (kvantová ú£innost) kamerového ltru.

Dobu expozicet$_e$ prodlu^{o}ujeme a p°edpokládáme, ^{o}e závislost sv¥telného toku na £ase je lineární, tj. pro l sv¥telného zá°ení je v £ase nem¥nný. Tím získáme kalibra£ní závislosti.

Nam¥°ené hodnoty intenzit v obraze jsou sní^{o}ené spektráln¥ závislou absorpcí sv¥telného zá°ení vzorkem. To vyjád°íme pro ka^{o}dý pixel barevné

kamery roz²í°ením integrálu (3.7):

$$I_c = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} t_e \; S(\lambda) \; F_c(\lambda) \; T(x;y;\lambda) \; d\lambda; \qquad (3.8)$$

kde I_c je celkový spektrální zá°ivý tok po interakci sv¥tla se vzorkem a $T(x;y;\lambda)$ je neznámé spektrum vzorku v bod¥ $x;y$.

Z p°edchozí rovnice(3.8) získáme pro ka^{o}dý pixel barevného obrazu a expozici £ty°i rovnice s neznámou $T(x;y;\lambda)$ odpovídající transmitan£nímu, re ektan£nímu, nebo uorescen£nímu spektru vzorku, u n¥ho^o p°edpokládáme, ^{o}e je pro v²echny £ty°i barevné kanály stejné. Existuje pouze omezené mno^{o}ství spekter vzorku, která najednou vyhovují °e²ení t¥chto £ty° rovnic. Optimalizací získáme iterativn¥ první odhad spektra.

Abychom na²li spektrum pro ka^{o}dý pixel, musíme vnést do výpo£tu dal²í p°edpoklad: p°idáme informaci o okolí bodu. P°edpokládáme, ^{o}e uvnit° homogenního objektu je spektrum stejné, na rozhraní objektu se skokov¥ m¥ní. Detaily implementace jsou popsány rovnicemi (1) (5) v P°íloze A.5.2.

Výstupem algoritmu je transmitan£ní, re ektan£ní, nebo uorescen£ní spektrum o 32 (kvazi)spektrálních £arách. Správnost výstupu algoritmu pro výpo£et (kvazi)spekter byla ov¥°ována m¥°ením transmitan£ních spekter barviv standardu IAM-9-C (obr. 3.16), která jsou deklarována Národním institutem pro standardy a technologie USA (NIST). Správnost výstupu závisela na kvalit¥ barviva (obr. 3.17 3.18). Mikroskopicky homogenn¥j²í barvy (nap°. C1, C2, C3) vykazovaly rozumné výsledky, kdy tvar spektra odpovídal standardu, intenzita v²ak nikoliv. V sou£asné dob¥ pracujeme na výb¥ru, p°ípadn¥ vývoji vhodné barevné reference a vylep²ujeme algoritmus, aby jeho výstupy byly relevantn¥j²í.

Znalost kvazispekter lze vyu^{o}ít k/ke

1. interpolaci obrazu v 32rozm¥rném prostoru, p°i£em^o interpolované hodnoty jsou v technickém smyslu správn¥j²í ne^o p·vodní hodnoty po£ítané pro £tve°ici pixel· kamerového senzoru, proto^{o}e interpolace ve vysokorozm¥rném spektrálním prostoru kompenzuje geometrická omezení zp·sobená konstrukcí sníma£e kamery.
2. klastrování oblastí obrazu podle spekter a nikoliv podle intenzit.
3. vizualizaci, která je obráceným postupem analýzy, kdy se p°i znalosti spektra zp¥tn¥ °e²í rovnice(3.8). Vizualizaci je tak mo^{o}né provád¥t pro r·zné sv¥telné zdroje i pro jednotlivé vlnové délky.
4. vizualizaci podle jednotlivých spektrálních klastr·, a tedy fyzikáln¥ chemických vlastností v daném míst¥ objektu.

Výpo£et (kvazi)spekter je implementován v softwaru QSP [33].

Kvazispektrální rekonstrukce primárních obrazových dat je v sou£asné dob¥ roz²i°ována do 3D prostoru tak, aby se mohla aplikovat na sadu mikroskopického z-skenu. Tato metoda by m¥la zajistit rozpoznání kvazi(bio)chemického slo^{o}ení mikroskopicky pozorovaných objekt· neinvazivn¥ a pravd¥podobn¥ lépe,

Obrázek 3.16: Kalibra£ní sklí£ko IAM-9-C NIST pro sledování sv¥telné transmitance barev. Velikost jednotlivých barevných polí 150µm. Vizualizace ve slune£ním zá°ení. (dole) Mikroskopicky homogenní barvivo C1 a mikroskopicky heterogenní barvivo C4.

neº m·ºe poskytnout nap°íklad uorescen£ní zna£ení. Rizikovou £ástí této metody je nedostupnost srovnávací metody p°edev²ím pro rozpoznání vnitrobun¥£ných objekt· v p°ípad¥ ºivých bun¥k, protoºe nap°íklad uorescen£ní (imuno)markery výrazn¥ m¥ní spektrální, tvarové a pohybové charakteristiky organel.

3.3.4 Pro lometrie

Zobrazení objekt· metrologickými telecentrickými objektivy (P°ílohy A.7.1 A.7.2) postrádá perspektivu. V trojrozm¥rném zobrazení zkresleném rozptylovou funkcí nelze tudíº ohnisko najít jako pozici nejmen²ího zobrazení objektu. Nap°íklad zobrazení bodového objektu zkreslené rozptylovou funkcí nemá hyperboloidní charakter, ale spí²e válcovitý. Ohniskovou rovinu bodového objektu je moºné najít pouze nalezením intenzitního maxima/minima v trojrozm¥rném zobrazení objektu.

Obrázek 3.17: Vypo£tená (modrá) a referen£ní NIST (£ervená) transmitan£ní spektra ve viditelné oblasti pro barevné °ady NIST A, B a C.

Obrázek 3.18: Vypo£tená (modrá) a referen£ní NIST (£ervená) transmitan£ní spektra ve viditelné oblasti pro barevnou °adu NIST D.

Algoritmus pro lometrické vizualizace objektu v reºimu sv¥telného odrazu je prám¥ zaloºen na nalezení intenzitního extrému pro kaºdý pixel zobrazení objektu v z-skenu elektromagnetického pole. Ve výsledném pro lometrickém snímku je toto intenzitní maximum pro kaºdý pixel zaznamenáno intenzitou odpovídající pozici hladiny (snímku) v z-skenu. Tím se získá výškový pro l pozorovaného mikroskopického objektu.

3.3.5 Segmentace mikroskopického obrazu bun¥k a organel

Segmentace sav£ích bun¥k

Vhodná metoda segmentace m·ºe urychlit a zp°esnit výstupy fyzikáln¥-chemických m¥°ení uvnit° ºivé bu¬ky. Segmentace nezna£ených sav£ích bun¥k z transmisní i re exní mikroskopie je úkol relativn¥ obtíºný vzhledem k málo viditelným hranicím bun¥k v jejich obraze.

Analýzy jedné sav£í bu¬ky byly provád¥ny na z-skenech i £asosb¥rných sériích z mikroskopu NanoScope 2011. P°i trojrozm¥rné analýze jedné bu¬ky byla bu¬ka v první práci ze série (8-bitové po konverzi LIL 3.3.7) vy°íznutá ve skriptu MATLAB ® ru£ním ozna£ením hranic bu¬ky (P°íloha A.6.1). Pozd¥ji byla segmentace zobrazení bun¥k objektivizována tvorbou kumulativní masky z ode£tených tmavých intenzit v zelených kanálech po sob¥ jdoucích obrázk· (P°ílohy A.3.2 a A.6.2).

Detailní bu¬ky z £asosb¥rných sérií byly segmentovány automaticky vytvo°ením kumulativní masky z ode£tených po sob¥ jdoucích rozost°ených obrázk· (P°íloha A.6.4) nebo ru£n¥ ozna£enou elastickou maskou kopírující obrysy bu¬ky v pr·b¥hu série (P°íloha A.6.5).

Pro série z mikroskopu z velkého £ipu FutureScope 2021, v nichº je moºné zachytit stovky tká¬ových bun¥k v jednom snímku, byly odvozeny dva efektivní algoritmy na bázi biologicky zam¥°ené konvolu£ní neuronové sít¥

(CNN, z angl. Convolutional Neural Network) U-Net. Algoritmy byly navr^{o}eny pro snímky b¥^{o}né bun¥£né linie HeLa. Pro snímky v procházejícím sv¥tle byla vybrána hybridní sí´ Residual Attention U-Net (P°íloha A.7.1), zatímco snímky v odra^{o}eném sv¥tle byly zpracovány hybridní metodou ResNet34-U-Net s kategorickou segmentací schopnou rozli²it fyziologický stav bu¬ky (P°íloha A.7.2).

Nicmén¥ jsme ov¥°ili, ^{o}e kalibrované datové sady získané na mikroskopu FutureScope 2021 v procházejícím i odra^{o}eném sv¥tle jsou natolik kontrastní, ^{o}e detekce hranic jednotlivých objekt· je mo^{o}né v dostate£né kvalit¥ dosáhnout i bezmodelov¥, a to za pou^{o}ití jednoduchých intenzitn¥ prahovacích metod (nap°. [34]) následovaných standardními morfologickými operacemi na binárním obrazu (nap°. [35]).

Segmentace organel sav£ích bun¥k

První organely byly segmentovány ze z-skenu primárních dat po°ízeném v procházejícím sv¥tle na videozesíleném mikroskopu NanoScope 2011 a následn¥ komprimovaném na 8bitovou sérii algoritmem LIL (P°íloha A.6.1). K segmentaci byl pou^{o}it výpo£et $^{(l!\ m)}$ (kap. 3.3.2) a nalezení stabilních, nepohyblivých objekt· odpovídajících hodnotám $^{(l!\ m)}_{4} = 0$. Konverze datové série na 8 bit px ^{1} algoritmem LIL (kap. 3.3.7) toti^{o} slou£ila intenzitní hladiny ve snímcích natolik, ^{o}e nedo²lo k detekci jednotlivých elementárních objekt· (3D elektromagnetických centroid·), ale byly separovány pouze jednotlivé zobrazení organel zkreslené rozptylovou funkcí optické soustavy mikroskopu.

Samotné organely v pr·b¥hu jejich 3D mikroskopického zobrazení byly následn¥ detekovány a segmentovány bezmodelovým p°ístupem [36]. V p°ípad¥ difrakce se jednalo o nalezení nejtmav²í intenzitní obrazové izokontury zeleného kanálu (obr. 3.19 3.20). U analýzy auto uorescence jsme hledali nejsv¥tlej²í izokonturu modrého £i zeleného kanálu, které jsou spole£né pro v²echny snímky v z-skenu. Výsledné zobrazení koreluje s p°edpokládanou velikostí a tvarem sav£í organely (elipsoidní tvar, vý²ka 2.8 5.6 µm [40]) a m¥°ením AFM. Pou^{o}itím telecentrického objektivu je dále mo^{o}né sní^{o}it mno^{o}ství interferen£ních prstenc· kolem pozorovaného objektu.

P°i uchování p·vodního primárního signálu o bitové hloubce 12 bit px ^{1} je ji^{o} mo^{o}né výpo£tem $^{(l!\ m)}$ p°ímo detekovat intenzity v obraze, které odpovídají pozorované organele (P°íloha A.6.1).

Detekce a následná segmentace organel za ú£elem m¥°ení jejich trajektorií z £asosb¥rného snímání v procházejícím sv¥tle na NanoScope 2011 (P°íloha A.6.1) byla po LIL konverzi provedena výpo£tem a nalezením hodnot obrazových intenzit odpovídajících $^{(i)}_{4} = 0$.

3.3.6 M¥°ení vnitrobun¥£né dynamiky

Kvantitativní analýza jedné bu¬ky je výchozím krokem k pochopení komplexních stochastických proces· bun¥£né signalizace a stavu a dal²ího osudu celé

Obrázek 3.19: Detekce izokontour v zobrazení organely MG63 na obr. 3.20 horní °ádek. Pro modelování tvaru organely je relevantní zelená izokontura intenzity 50.

Obrázek 3.20: Detekce organel bu¬ky MG63 v jejich zobrazení mikroskopem Nanoscope 2011 po LIL kompresi (kap. 3.3.7). 3D Analýza objekt· v P°íloze A.6.1 obr. 2.

bun¥£né populace, která je ve své podstat¥ morfologicky i fyziologicky heterogenní. Klí£ovou otázkou je, jak bu¬ky p°esn¥ p°ená²ejí informaci, pokud £elí p°irozenému £i vnesenému ²umu a zm¥nám v molekulárních procesech [41]. M¥°ením vnitrobun¥£né dynamiky lze potenciáln¥ studovat nap°íklad ú£inky toxických látek na bu¬ky a získané poznatky pouºít k výb¥ru vhodné bun¥£né populace jako biosenzoru cytotoxických látek [42, 43].

PoºadavkemÂ pro rychlý a spolehlivý výpo£et a p°esnost výsledk· m¥°ení vnitrobun¥£né dynamiky je, stejn¥ jako v p°ípad¥ 3D zobrazení, vhodná £asoprostorová diskretizace (de novaná velikostí rastru obrazu a po£tem snímk· za £asovou jednotku) a kvalita zobrazení zpracovávaných snímk· (daná bitovou hloubkou primárních dat a jejich kontrastem). Pro po£et pixel· v obrazu je nutné nalézt kompromis:

1. P°i nízkém po£tu pixel· v obrazu dochází zejména ke ztrát¥ detail· pozorovaných objekt·, zatímco p°i vy²²ím po£tu pixel· nastává posun v obraze p°es více pixel·, coº je nutné zohlednit p°i výpo£tu.
2. P°i nízké frekvenci snímání mºe nastat problém s lokalizací posunu pozorovaného objektu. Naopak p°íli² vysoká frekvence snímání mºe vést k zahlcení úloºné £i výpo£etní kapacity za°ízení.
3. Pro bitovou hloubku obrazu platí obdobná tvrzení. Nízká bitová hloubka mºe vést ke ztrát¥ detail· v obrazech, naopak p°i vysoké bitové hloubce nastává problém s ukládáním a zpracováním dat.

Pro vyhodnocení vnitrobun¥£né dynamiky bu¬ky z primárních snímk· sv¥telné mikroskopie v jasném poli (v t¥chto p°ípadech byl pouºit mikroskop NanoScope 2011) jsme navrhli dva fyzikáln¥ podloºené zp·soby: p°ímé m¥°ení trajektorií organel (P°íloha A.6.4) a m¥°ení celkového toku vnitrobun¥£né hmoty (P°íloha A.6.5).

Zlep²ení výstup· m¥°ení je op¥t moºné p°edchozí radiometrickou (P°íloha A.6.5, kap. 3.3.1) a, v p°ípad¥ mikroskopie na velkém £ipu, také geometrickou kalibrací optické dráhy mikroskopu.

M¥°ení trajektorií

Algoritmus uvedený v P°íloze A.6.4 je zaloºený na trasování t¥ºi²t¥ zobrazení velkých siln¥ sv¥tlolomných organel. Organely byly v sérii snímk· bu¬ky detekovány jako hodnoty $\overset{(i)}{4} = 0$ v zeleném obrazovém kanálu. Takto byla datová série p°evedena na binární obraz. Trasování organel bylo usnadn¥no zpracováním vysokofrekven£ních dat, kdy binární zobrazení kaºdé jednotlivé organely v následujícím snímku p°ekrývalo její zobrazení v p°edchozím snímku série. Trajektorie pohybu kaºdé organely byla p°epo£ítána na rychlost pohybu a její horizontální a vertikální sloºku. Tyto hodnoty vektor· byly vyjád°eny jak v daném £asovém okamºiku, tak jako hodnoty kumulativní, a to pro jednotlivé organely i celou bu¬ku.

Tento algoritmus je v sou£asnosti omezen na tvorbu trajektorie kaºdé jednotlivé organely do té doby, dokud se její zobrazení p°ekrývají v po sob¥ jdoucích snímcích.

Stanovení lokální kvaziviskozity a kvazidifuse

Algoritmus popsaný v P°íloze A.6.5 je ve srovnání s algoritmem uvedeným v kap. 3.3.6 obecn¥j²í a komplexn¥ji popisuje vnitrobun¥£nou dynamiku. Umo°-¬uje odhadnout mikroreologické a mikro uidní parametry vnitrobun¥£ného toku hmoty. Výpo£et tok· hmoty je zjednodu²en p°epo£tem primárního signálu Bayerovy masky kamery sv¥telného mikroskopu na jednokanálový, ²edotónový snímek.

Prvním krokem je detekce £ástic a jejich trasování v sekvenci snímk·. Jako nejvhodn¥j²í metoda se pro tento ú£el prokázala metoda SURF (z angl. Speeded-Up Robust Features). Pomocí simulace náhodné procházky a výpo£tu relativní chyby rychlosti jsou trajektorie £ástic odd¥leny na ty vykazující p°ímý pohyb od t¥ch mající pohyb Brown·v náhodný. Z p°ímého pohybu £ástic je rekonstruováno rychlostní pole toku hmoty a vypo£ítána mapa vnitrobun¥£né (kvazi)viskozity. Z náhodného pohybu je vyjád°ena mapa vnitrobun¥£né (kvazi)difuze.

Sou£asným problémem uvedeného algoritmu je, ºe poskytuje pouze koncový stav, nikoliv v²ak celý dynamický £asový vývoj (kvazi)viskozity a (kvazi)difuse v rámci obrazové sekvence.

3.3.7 Vizualizace metodou nejmen²í informa£ní ztráty

Datasety v¥t²iny digitálních kamer jsou po²kozeny kompresí z 12/16/24 na 8 bit px ^{1}, kdy kaºdý snímek série je komprimován jednotliv¥ a nezávisle na celé sérii. D·vodem je, ºe konverzní programy jsou navrºeny tak, aby vytvá°ely co nejlépe vypadající snímky scenérií. To se dosahuje systematickým ignorováním detail· a vybraných intenzitních hladin v obraze. Takové datasety jsou potom pro v¥deckou a technickou inspekci nepouºitelné. Správným p°ístupem k bitové kompresi je systematicky analyzovat celou p·vodní datovou sadu po£íta£ov¥ a algoritmizovat v¥t²inu analytických krok·, zejména pokud se zabýváme datovými sadami o velikosti alespo¬ 100 GB. Vizuální kontrola je v²ak v tomto p°ípad¥ stále nejstandardn¥j²ím a nejnevyhnuteln¥j²ím p°ístupem. Z tohoto d·vodu jsme navrhli

1. 8bitový formát LIL (Least Information Loss) (P°ílohy A.4.1 a A.5.1), který zachovává maximum informace díky pln¥ p°e²kálovanému primárnímu signálu obrazových intenzit v celé sérii snímk· za podmínky vynechání t¥ch intenzitních hladin, které nejsou obsazeny v celé datové sad¥ a
2. software Image Explorer (P°íloha A.4.2) pro vizuální inspekci a intenzitní prahování >8-bitové datové sady.

Konvertor LIL

Konvertor LIL (Least Information Loss) (P°ílohy A.4.1 a A.5.1) slouºí k vizualizaci a porovnávání >8bitových (zejména 12bitových) primárních digitálních signál· získaných interakcí foton· s maskou Bayerovy kamery.

Softwarový algoritmus ukládá maximum informace v jednotlivých snímcích £asosb¥rné °ady. Algoritmus sesbírá v²echny hodnoty intenzit nalezené ve vícebitových sériích snímk·, odstraní prázdné hladiny intenzit a p°epo£ítá tento spojitý intenzitní histogram na bitovou hloubku 8 bit px ^{1}. Nová 8bitová série snímk· tedy obsahuje nejmén¥ slou£ených intenzitních hladin z p·vodní vícebitové série a v celé sérii zachovává kontinuitu intenzit.

Software umo^{o}¬uje

1. pracovat s ²edotónovými i RGB sériemi obrázk·,
2. vybrat typ normalizace histogramu intenzity (normalizace pro ka^{o}dý barevný kanál zvlá²´ vs. normalizace spole£ná pro v²echny barevné kanály),
3. odstranit z obrázk· °ádky a sloupce kalibra£ních pixel· £erné barvy (problém kamery Nanoscope 2011) a
4. odstranit vadné (pod- a p°eexponované) pixely.

Nový RGB obraz je pak vytvo°en neinterpola£ním algoritmem, kde jsou £ervené a modré pixely jednotlivých £tve°ic pixel· Bayerovy masky p°eneseny p°ímo do relevantního barevného obrazového kanálu a dva zelené pixely Bayerovy masky jsou zpr·m¥rovány. Výsledný rgb obraz má tedy £tvrtinový po£et pixel· ve srovnání s p·vodním primárním signálem raw.

Image Explorer

Image Explorer IMEX (P°íloha A.4.2) slou^{o}il k nezkreslené a nejinformativn¥j²í 8bitové vizualizaci a intenzitnímu prahování vícerozm¥rných a vícebitových matic a podmatic r·zných datových formát·. Byl ur£en zejména k detailní analýze mikroskopických primárních RGB signál·, ale umo^{o}¬oval pracovat i s jinými typy snímk·.

Algoritmus Image Explorer byl pozd¥ji spojen se softwarem SuperScope do nálního softwaru CAMEX (kap. 3.2.3).

Kapitola 4

Vyvíjené aplikace metod sv¥telné mikroskopie

V této kapitole jsou p°edstaveny vybrané potenciální aplikace jednoduché sv¥telné mikroskopie a relevantního softwaru v humánní a veterinární medicín¥. Zam¥°ujeme se p°edev²ím na vyu°ití mikroskopie s velkým zorným polem. P°i výb¥ru vhodného objektivového zv¥t²ení je obecn¥ v°dy nutné brát v úvahu ú£el pou°ití, zejména typ snímaného vzorku. P°ípadné medicínské interpretace snímk· byly konzultovány s léka°i £i jinými odborníky v dané oblasti.

Experimenty popsané v kapitolách 4.1 4.3 jsou po°ízeny v odra°eném sv¥tle na mikroskopu FutureScope 2021 se zv¥t²ením 9,7s následným zpracováním kalibrovaného mikroskopického obrazu (kvazi)spektrální analýzou (kap. 3.3.3), p°ípadn¥ pro lometricky (kap. 3.3.4). P°i kvazispektrální analýze je po£et spektrálních klastr· ve v¥t²in¥ p°ípad· 8192. Pou°ita byla shluková analýza k-means s euklidovskou vzdáleností. Optimální stabilní po£et spektrálních shluk· nelze najít, proto°e je to výpo£etn¥ náro£né. V sou£asné dob¥ pracujeme na výb¥ru vhodné shlukové analýzy pro zvýrazn¥ní struktur mikroskopického obrazu.

V²echny snímky v této kapitole jsou vizualizovány konverzí LIL (kap. 3.3.7). Velikost pixelu snímk· se spektrálními klastry po konverzi LIL je 74 nm, velikost pixelu v barevných snímcích simulujících osv¥tlení LED je 25 nm. Vizualizací obrazových dat konverzí LIL bylo ve v¥t²in¥ p°ípad· dosa°eno vyvá°ení bílé. V n¥kterých p°ípadech (nap°. obr. 4.7) v²ak v obraze dominuje zelená barva a barvy transformovaného primárního signálu neodpovídají realit¥.

4.1 Histologické °ezy

Sv¥telná mikroskopie s velkým zorným polem a (kvazi)spektrální analýzou m·°e nahradit skenery histologických mikroskopických preparát·. Takovýto zp·sob digitalizace histologických preparát· je na rozdíl od skener· rychlej²í, spolehliv¥j²í a reprodukovateln¥j²í. Výhodou zpracování mikroskopického obrazu (kvazi)spektrální analýzou je zejména mo°nost takzvaného digitálního barvení primárn¥ nebarvených histologických preparát· (P°íloha A.5.2). To v²ak vy°aduje zapojení lidského experta i um¥lé inteligence p°i anotaci obra-

zových dat. Nevýhodou je, ºe barvy v mikroskopii v odraºeném sv¥tle jsou ve srovnání s procházejícím sv¥tlem jiné, mohou být invertované, na coº nejsou histologové standardn¥ zvyklí. Obrazové výstupy barvených histologických preparát· z mikroskopu FutureScope 2021 slouºí jako podklad pro komparaci p°i vývoji histologických metod analýzy nativních tkání.

Kvalita datových výstup· barvených histologických °ez· poskytnuté sv¥telnou mikroskopií s navázanou vizualizací kvazispektrální analýzou byly porovnány se snímky z histologického skeneru (obr. 4.1). Na snímcích jsou vid¥t rozdíly v barvách histologického barvení. Na £erném pozadí jsou preparáty v odraºeném sv¥tle kontrastn¥j²í. Detail na obr. 4.1 ukazuje vady skenovaného obrazu, vzniklé skládáním jednotlivých díl£ích sken·.

Obrázek 4.1: Detail histologie rybích gonád (losos obecný, *Salmo salar*) získané skenerem Roche DP600 (levo) a mikroskopem FutureScope 2021 (pravo). ’ipka znázor¬uje vady skenovaného obrazu. Barvení hematoxylin-eosin.

P°íklad vyuºití mikroskopu FutureScope 2021 s následnou vizualizací obrazových dat p°ístupem (kvazi)spektrální analýzy pro r·zn¥ barvené histologické °ezy lidských tkání je uveden na obr. 4.2 4.6.

Na obr. 4.3 je uprost°ed znázorn¥na céva mozku obklopená metastázou melanomu barvená hematoxylinem-eosinem. Bu¬ky metastázy jsou shluklé a nepravidelné. Na detailu vnit°ní bu¬ky (obr. 4.4a) lze vid¥t bun¥£ná rakovinná jádra. Jejich rozdílné zbarvení (£ervené vs. zelené) je pravd¥podobn¥ zp·sobeno nekvalitním zpracováním (krájením nebo barvením) preparátu. Detailní obr. 4.4b znázor¬uje erythrocyt v cév¥ mozku.

Na obr. 4.5 a 4.6 jsou snímky nekropsie plíce s plicními alveoly po tukové embolii. Tkán¥ jsou septa mezi alveolami. Kapénky tuku v septech jsou obarveny olejovou £ervení. *f* ervené body mimo septa jsou sraºeniny barviva.

Obrázek 4.2: Metastáza melanomu v mozku barvená hematoxylinem-eosinem. Vizualizace a) obr. 4.3, b) obr. 4.4a a c) obr. 4.4b klastr· spektráln¥ podobných objekt·. Velikost zorného pole je a) 270 270 μm^2, b) 23 17 μm^2 a c) 12 12 μm^2. (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol).

Obrázek 4.3: Metastáza melanomu v mozku barvená hematoxylinem-eosinem. ƒerven¥ a ºlut¥ jsou vyzna£eny detaily na obr. 4.4. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je270 270 μm^2.

Obrázek 4.4: Detaily obr. 4.3: bu¬ka a) uvnit° a b) vn¥ tkán¥ barvená hematoxylinem-eosinem. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole ja) 23 17 µm^2 a b) 12 12 µm^2.

Obrázek 4.5: Plicní tuková embolie barvená olejovou £erví. ƒerven¥ je vyzna£en detail na obr. 4.6. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je $3;08 \quad 1;92\,\mathrm{mm}^2$. (Spolupráce s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Moto).

Obrázek 4.6: Plicní tuková embolie barvená olejovou £ervení (detail obr. 4.5).a) Vizualizace v LED osv¥tlení. b) Vizualizace klastr· spektráln¥ podobných objekt·. Velikost zorného pole je250 250 µm^2.

4.2 šivé neznaˆené leukocyty a mesenchymální kmenové buˆky

Sv¥telná mikroskopie s velkým zorným polem ve spojení s (kvazi)spektrální analýzou obrazu skrývá také potenciál vyu°ití jako levn¥j²í alternativa k pr·tokové cytometrii. Hlavní výhodou této metody je mo°nost analýzy nebarveného biologického materiálu, a tím urychlení p°íslu²né analýzy a sní°ení pravd¥podobnosti vnesení chyby m¥°ení vlivem ²patné p°ípravy (barvením) vzorku. P°íkladem je analýza lidských leukocyt·. Obraz po°ízený mikroskopem FutureScope 2021 (obr. 4.7) a interpolovaný metodou kvazispektrální analýzy je natolik detailní, °e je mo°né v n¥m rozli²it jednotlivé typy leukocyt· bez nutnosti barvení (obr. 4.8). Anotaci typ· leukocyt· lze zp°esnit pou°itím uorescenˆn¥ znaˆených protilátek.

Souˆasné metody pr·tokové cytometrie m¥°í a vyhodnocují a° 10[5] bun¥k. Snímek po°ízený mikroskopem FutureScope 2021 (obr. 4.7) obsahuje p°ibli°n¥ 2000 leukocyt·. Zv¥t²ení statistického souboru leukocyt· je mo°né snímáním celého sedimentu bun¥k podél osy-x.

Podobn¥ lze studovat i interakci a imunitní odezvu izolovaných T-lymfocyt·. P°íkladem je studium interakce T-lymfocyt· s mesenchymálními kmenovými buˆkami z lidské placenty. Mesenchymální kmenové buˆky mají imunomodulaˆní vlastnosti a ovliv¬ují funkce v¥t²iny imunitních efektorových bun¥k prost°ednictvím p°ímého kontaktu s imunitními buˆkami a lokálními faktory mikroprost°edí, nap°. [44].

Studovali jsme interakci a nitn¥ izolovaných T-lymfocyt· aktivovaných S-proteinem viru SARS-CoV-2 s mesenchymálními kmenovými buˆkami z placent dárky¬, které prod¥laly onemocn¥ní covid-19. Ve srovnání s kontrolou neaktivovaných T-lymfocyt· jsme pozorovali jejich masivní vazbu. Snímek z mikroskopu FutureScope 2021 obsahuje p°ibli°n¥ 500 mesenchymálních kmenových placentárních bun¥k v r·zném stádiu bun¥ˆného cyklu (obr. 4.9). P°idáním T-lymfocyt· k mesenchymálním buˆkám dojde k navázání T-lymfocyt· na povrch mesenchymálních bun¥k a jejich aktivaci. Navázáním a aktivací T-lymfocyt· se zvý²ila jejich sv¥telná re ektance nebo uorescenˆní emise. Laicky lze °íci, °e se buˆky rozsvítily (obr. 4.9). V simulovaném LED sv¥tle svítí aktivované T-lymfocyty °lut¥, zatímco neaktivované jsou bílé.

Obrázek 4.7: Lidské leukocyty. ƒerven¥ je vyzna£en detail na obr. 4.8. Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je 1; 92 × 1; 08 mm^2.

Obrázek 4.8: Lidské leukocyty (detail obr. 4.7). a) Vizualizace v LED osv¥tlení s mo$nou anotací. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo$ení. Velikost zorného pole je 250 250 μm^2.

Obrázek 4.9: Mesenchymální kmenové bu¬ky z lidské placentya) Vizualizace v LED osv¥tlení. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo°ení. Velikost zorného pole je250 250 µm^2. (Spolupráce s Ústavem zdravotnických v¥d a biomedicíny Dunajské univerzity v Krems)u.

Obrázek 4.10: Interakce lidských T-lymfocyt· s mesenchymálními kmenovými bu¬kami z lidské placenty. a) Vizualizace v LED osv¥tlení. Velikost zorného pole je 250 250 µm^2. b) Odstíny ²edi odpovídají spektrálním klastr·m r·zného (bio)chemického slo^{o}ení.c) Pr·m¥rná re ektan£ní spektra klastr· spekter: oran^{o}ový graf je spektrum vybrané oblasti uvnit° neaktivovaného T-lymfocytu (klastr 600), modrý graf je spektrum vybrané oblasti uvnit° aktivovaného T-lymfocytu (klastr 1024).

4.3 Skelety pro regenerativní medicínu

Nedostatek tkání a orgán· pro transplantace je mo^{o}né °e²it osídlením a´ ji^o p°irozeného, nebo um¥lého skeletu bu¬kami. V souvislosti s tím je nutné hodnotit i biokompatibilitu takovýchto materiál·.

P°irozený decelularizovaný skelet je prost°edím se zachovanou tká¬ov¥ speci ckou mikroarchitekturou protein· extracelulární matrix umo^o¬ující zno-vuosídlení, migraci, r·st a diferenciaci nových bun¥k, nap°. [45]. V mnoha aplikacích regenerativní medicíny se vy²²í desítky let pou^{o}ívá lidská amni-ová membrána [46]. Na obr. 4.11 4.13 je pou^{o}ita pro lometrie (kap. 3.3.4) ke zvýrazn¥ní struktury skeletu decelularizované placentární membrány.

ƒastým materiálem pro p°ípravu um¥lých nanoskelet· je polykaprolakton a jeho kopolymery vzhledem k jeho biokompatibilit¥ a biodegradaci, nap°. [47]. K ov¥°ení biokompatibility nanoskeletu z polykaprolaktonu byly na mikroskopu FutureScope 2021 sledovány lidské bu¬ky MG-63 vykazující morfologii broblast· (obr. 4.14 4.15).

Obrázek 4.11: Decelularizovaná placentární membrána. Červeně je vyznačen detail na obr. 4.12. Velikost zorného pole je 3,08 1,92 mm^2. (Spolupráce s Národním centrem tkání a buněk a.s. a PrimeCell Bioscience, a.s., Ostrava).