



**CZECH BIOIMAGING**

Zobrazujeme principy života

# Mikroskopie je hybnou silou v dnešním biomedicínském výzkumu

Michaela Žůrková a Pavel Hozák

Chceme-li o věci vědět více, podíváme se na ni zblízka. To nám ale už dlouho nestačí. My chceme vědět ještě více. Proto bylo třeba prolomit hranice toho, co takový pohled zblízka znamená. První složitější mikroskop sestrojili holanďáci bratři Janssenové na konci šestnáctého století. Od té doby se mikroskop, za nemalé pomoci geniálních vědců, naučil mnohem více, než bylo tehdejší omezené zvětšení bakterie, prvoka, krvinky nebo spermie. Dnešní mikroskopy dokážou například trojrozměrně zobrazovat objekty, snímat živé objekty a časově experimenty. Existuje pokročilá světelná mikroskopie, elektronová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a mnoho dalších variant. Nové druhy mikroskopů jsou stále častěji spojeny s rostoucími technickými nároky. Už dávno nestačí položit vzorek na větší sklíčko, seshora přiložit druhé sklíčko a podívat se na vzorek přes čočku mikroskopu. Proto potřebujeme odborníky, kteří nám pomohou s mikroskopem zacházet, zařídí jeho nastavení k práci, případně pomohou připravit vzorky.

Někdy potřebujeme sledovat pochody *in vivo*, tedy v živých buňkách a organismech. Pro zkoumání nemocí a procesů potřebujeme zobrazovat i celé lidské tělo. K tomu slouží počítačová tomografie (CT; *computed tomography*), magnetická rezonance (MRI; *magnetic resonance imaging*), vysokofrekvenční ultrazvuk a další techniky.

## Co je Czech-BioImaging a jak pomáhá vědě v České republice

Někdy také potřebujeme poradit, jakým způsobem se na svůj vzorek či objekt máme vůbec dívat. Kde hledat odborníka, který nám poradí? V České republice od roku 2016 nabízí profesionální řešení Czech-BioImaging – národní infrastruktura pro biologické a medicínské zobrazování.

Czech-BioImaging spojuje špičkové

výzkumné ústavy Akademie věd ČR s předními českými univerzitami. Do infrastruktury je zapojeno čtrnáct odborných pracovišť ze čtyř regionů ČR. Tvoří tak technicky velmi silnou a soudržnou síť vědeckých pracovišť, která je navíc geograficky dobře rozložena do několika regionů tak, aby co nejlépe pokrývala hlavní centra biomedicínského výzkumu v České republice (*více na zadní straně obálky a na www.czech-bioimaging.cz*). Czech-BioImaging úzce spolupracuje s panevropskou infrastrukturou



prof. Pavel Hozák, ředitel výzkumné infrastruktury Czech-BioImaging

pro biologické a medicínské zobrazování Euro-BioImaging, které propojuje vědecká pracoviště po celé Evropě.

Czech-BioImaging se skládá z pražského Ústavu molekulární genetiky AV ČR (ÚMG), Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV), jehož zobrazovací pracoviště je provozované Univerzitou Karlovou, Fyziologického ústavu AV ČR (FGÚ) a Ústavu experimentální botaniky AV ČR (ÚEB). V Brně sestává z Masarykovy univerzity, z níž se do infrastruktury Czech-BioImaging zapojily dvě její součásti: Středoevropský technologický institut MU (CEITEC MU) a Fakulta informatiky (FI MU), a dále Ústavu strojové techniky

AV ČR (ÚPT) a Vysokého učení technického v Brně (VUT). Infrastruktura Czech-BioImaging je dále tvořena zobrazovacími pracovišti Biologického centra AV ČR (BC) v Českých Budějovicích, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (1. LF UK) a Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (UPOL), která poskytuje unikátní zobrazovací technologie a expertizu v rámci ČR a geograficky doplňují národní potřeby biomedicínského zobrazování.

## Jak se zapojit a co je princip otevřeného přístupu

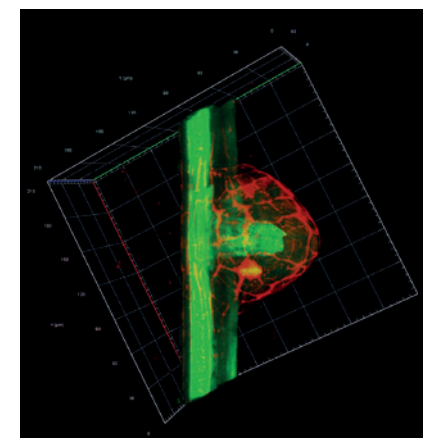
Zapojit se do infrastruktury Czech-BioImaging je snadné. Stačí vyplnit vyhledávač na stránkách Czech-BioImaging ([www.czech-bioimaging.cz](http://www.czech-bioimaging.cz)), který nám poradí, jaký přístroj bychom měli použít. Jestliže si nejste jisti, které pracoviště potřebujete navštívit, můžete kontaktovat pracovníky Czech-BioImaging na [info@czech-bioimaging.cz](mailto:info@czech-bioimaging.cz) a poradit se. Poté vyplňte jednoduchý online formulář, kde nastíníte obsah svého projektu a poté už jen počkáte na odpověď vedoucího daného pracoviště, který vám s vaším vzorkem poradí.

Czech-BioImaging zajišťuje stálý a udržitelný přístup k nejmodernějším zobrazovacím technologiím a analýze dat pro celou národní badatelskou komunitu, s možností přístupu i pro komunitu mezinárodní. Pokrývá všechny úrovně biomedicínského zobrazování – od zobrazování molekul a jejich interakcí a struktury a procesů v buňkách a tkáních až po zobrazování orgánů nebo celých organismů ve zdravém i patologickém stavu. Dostupnost těchto technologií pro vědeckou komunitu je nezbytným předpokladem pro udržení konkurenceschopnosti biologických a lékařských věd v ČR a poznávání dějů v živých buňkách a tkáních a obecně toho, jak fungují živé organismy.

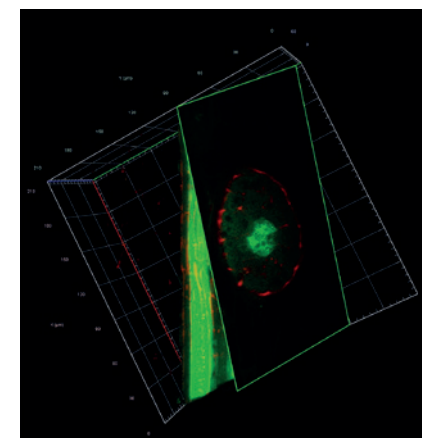
# Řežeme buňky a tkáně bez skalpelu

Milan Ešner, Barbora Radochová

Živé organismy jsou trojrozměrné (3D) objekty, a pro jejich studium je tedy nutné mít možnost je v trojrozměrném stavu pozorovat. Pro pozorování jejich 3D struktury se dříve musely vyrábět tzv. sériové řezy. To znamenalo vzorek umístit do speciálního média, a pak jej fyzicky nakrájet mikrotomem (speciální přístroj s kovovým nožem). Bylo důležité žádný řez neztratit a mít je srovnané hezky za sebou. Kamerou nasnímané obrázky jednotlivých řezů bylo možno v počítači zpětně poskládat dohromady a získat tak představu o původním 3D uspořádání preparátu. Nové mikroskopické metody nám tuto práci významně usnadnily – místo fyzického řezání nyní můžeme buňky řezat jen opticky a lze to dokonce provádět i u živých organismů.



Obr. 1 – Na obrázcích můžeme vidět pučící kořínek huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*). Červeně je fluorescenčním proteinem mCherry označena buněčná stěna, zeleně je dalším fluorescenčním proteinem mTurquoise označen cévní svazek, který rozvádí živiny po celém rostlině. Výsledný 3D obraz je poskládan z několika samostatných obrázků – optických řezů preparátem.



## Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop má proti mikroskopu klasickému obrovskou výhodu a to, že dokáže vytvářet optické řezy. Srdcem konfokálního mikroskopu je tzv. konfokální šterbina, která odstraňuje světlo pocházející mimo rovinu ostrosti pozorovaného preparátu. Tím získáme obrázky s vysokým kontrastem i u silnějších preparátů, kde by klasický mikroskop narazil. Laserový paprsek, který se používá jako zdroj světla, dokáže preparát doslova prořezat, aniž by ho tím nějak poškodil. Preparát k tomu musí být

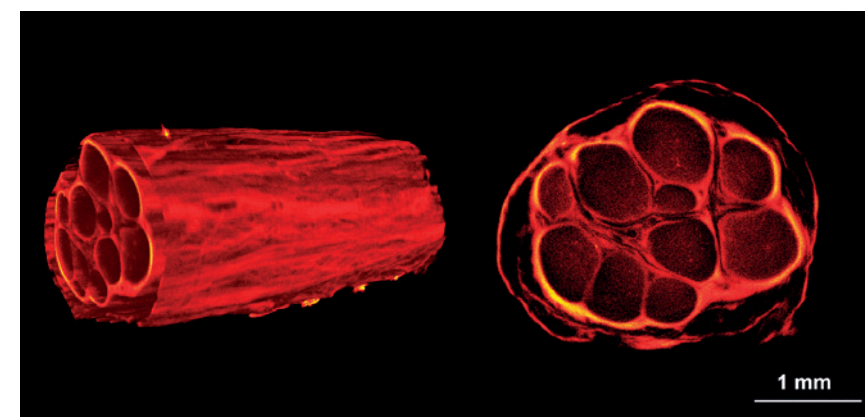
vhodně fluorescenčně označen, například speciálními barvami, protilátkami, nebo přímo fluorescenčními proteiny (*viz obrázek 1*).

## Optická projekční tomografie

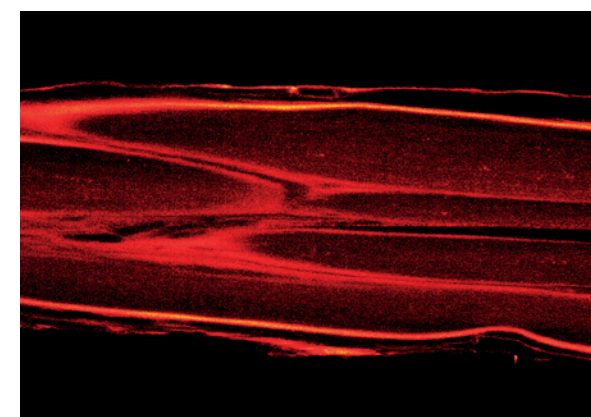
Pokud chceme pozorovat trojrozměrnou stavbu větších vzorků (1–10 mm) a stačí nám menší detaily, můžeme využít výhod optické projekční tomografie. V názvu metody je již skryt její princip – vzorky se

osvětlují světlem z viditelné části spektra (vlnová délka 400–700 nm) a kamerou se snímají projekce vzorku, který se otáčí kolem své svislé osy. Na rozdíl od konfokální mikroskopie, při které přímo získáváme optické řezy vzorkem, je zde třeba optické řezy vypočítat z projekcí pomocí speciálního algoritmu. Získáme tak například představu o uspořádání nervových svazků v periferním nervu (*viz obrázek 2*).

Obrázky:  
Markéta Šámalová, Barbora Radochová



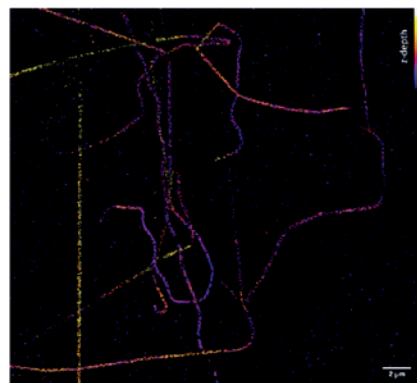
Obr. 2 – 3D vizualizace a optický řez loketním nervem (*n. ulnaris*) člověka. Vzorek byl odvodněn a zprůhledněn směsí benzylalkoholu s benzylbenzoátem. Vzorek nebyl barven, jde o přirozeně emitovanou fluorescenci – tzv. autofluorescenci.



# Od organel až k molekulám: super-rezoluční mikroskopie

Aleš Benda

Ani sebelepší optická čočka neumožňuje přímo vidět detaily buněk menší než přibližně 200–300 nm. Difrakce světla rozmýje signál z libovolně malého objektu natolik, že pokud jsou dva objekty u sebe blíže než přibližně polovina vlnové délky použitého viditelného světla, jejich difrakční obrazce se téměř kompletně překrývají a pozorovatel není schopen říci, jestli vidí pouze jeden objekt, nebo více. Až na přelomu tisíciletí se podařilo tuto fyzikální bariéru obejít cestou super-rezoluční mikroskopie. Odměnou byla Nobelova cena za chemii v roce 2014.



Super-resoluční obrázek trubic vystřelených spórmi. Obrázek byl získán pomocí metody dSTORM ve spolupráci s Markétou Petřou, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova.

Souvislost chemie s mikroskopií pochopíme z principů fungování super-rezoluční mikroskopie. Základem je fluorescenční molekula a naše schopnost ji přepínat ze svítivého do nesvítivého stavu a zpět. Dalo by se říci molekulární manipulace, která je umožněna speciální chemickou strukturou a vlastnostmi na míru syntetizovaných organických molekul či geneticky upravených fluorescenčních proteinů. Tento základní princip je využíván desítkami různých super-rezolučních postupů, kdy každý je vhodný pro jiný typ vzorku. Mezi komerční široce využívaná řešení se dostaly zejména tři mikroskopické metody využívající strukturovaného osvětlení (SIM), stimulované deplece emise (STED) nebo lokalizace jednotlivých molekul (SMLM).

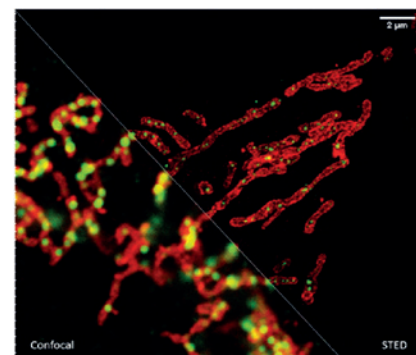
Při strukturovaném osvětlení (SIM; *Structured Illumination Microscopy*) se místo tradičního homogenního osvětlení vzorku využívá nasvícení pravidelným co nejmenším vzorem. Pohybem a rotací excitačního vzoru se střídavě zobrazují různé části vzorku a analýzou takto získané sekvence obrazů lze získat výsledný obraz s až dvakrát větším rozlišením než při běžném zobrazení na kameru. SIM má výhodu ve své rychlosti, použitelnosti pro téměř libovolný typ fluorescenčního značení, vícebarevnosti, střední dávce použitého světla a tím i rozumné kompatibilitě s pozorováním živých buněk.

Potřebujeme-li se podívat na buněčné struktury menší než 100 nm, můžeme využít mikroskopie stimulované deplece emise (STED; *Stimulated Emission Depletion*). Tato metoda je založena na klasickém laserovém konfokálním skenovacím mikroskopu a využití velmi silného pulsního laseru barevně odpovídajícího červené části emisního spektra použité barvy. Tento laser je schopen stimulovat emisi v excitovaných molekulách a tím je přepnout zpět do základního stavu, čímž zabrání jejich spontánní fluorescenci. Vysokého rozlišení se dosáhne tím, že se depleční laser (775 nm) překrývá s excitačními lasery (např. 561 nm a 640 nm) s jedním důležitým rozdílem – v centru nemá maximum, ale naopak nulovou intenzitu. K efektivní stimulované emisi tedy dojde zejména na krajích původního konfokálního objemu a fluorescenční signál se tak deteguje pouze z výrazně zmenšeného objemu. Tím se dosáhne rozlišení až 30 nm ve snímané rovině pro 2D nastavení, případně izotropických 120 nm ve všech osách pro 3D nastavení. Jedná se o čistě optický jev, bez nutnosti matematických triků s daty, a tím i s minimálním rizikem artefaktů. Metoda výborně funguje pro dvě barvy, kdy díky sdílené depleci jsou dvoubarevné obrázky vždy perfektně překryty. Silný depleční laser však způsobuje rychlou fotodestrukci, a metoda tak vyžaduje velmi stabilní organické barvy. STED není příliš kompatibilní s fluorescenčními

proteiny v živých buňkách či s tří- a vícebarevným snímáním.

Jak ale dosáhnout rozlišení na úrovni desítky nanometrů a lepší, které potřebujeme například k určení uspořádání jednotlivých proteinů ve velkých proteinových komplexech? Poměrně snadno. Pokud víme, že v daném místě a čase snímáme pouze jednu jedinou molekulu, tak ačkoliv kamera nám zobrazí rozmýtený difrakční obrazec, fluorescenční molekula se nachází přesně uprostřed. Přesnost lokalizace molekuly pak závisí na její svítivosti a kvalitě mikroskopu – a dostává se až k nanometrům! Metoda lokalizace jednotlivých molekul (SMLM, *Single Molecule Localization Microscopy*) spočívá v náhodném přepínání molekul ze svítivého do temného stavu tak, aby v daném místě a čase svítily statisticky vždy maximálně jedna. Tedy když kvůli difrakci nedokážeme emisi jednotlivých molekul rozlišit v prostoru, rozlišíme ji v čase. Komerční SMLM mikroskopy dokáží získat mapu lokalizací s přesností typicky kolem 10–20 nm v rovině ostrožní xy a 30–50 nm v ose z. Rozlišení obrázku však není většinou limitováno lokalizační přesností, ale kvalitou použitého vzorku, zejména jak hustě a kvalitně se podařilo vzorek označit.

Nejste si jisti, která super-rezoluční metoda je to pravá pro váš vzorek? Nevadí, v rámci infrastruktury Czech-BioImaging si můžete vyzkoušet všechny tři!



Super-resoluční obrázek mitochondrií (červeně) a nukleoidů (zeleně). Super-resoluční obrázek byl získán metodou STED ve spolupráci s Jaromírou Kovářovou, Biotechnologický ústav Akademie věd ČR

# Jak lze elegantně vylepšit prostorové rozlišení pomocí matematického zpracování obrazu

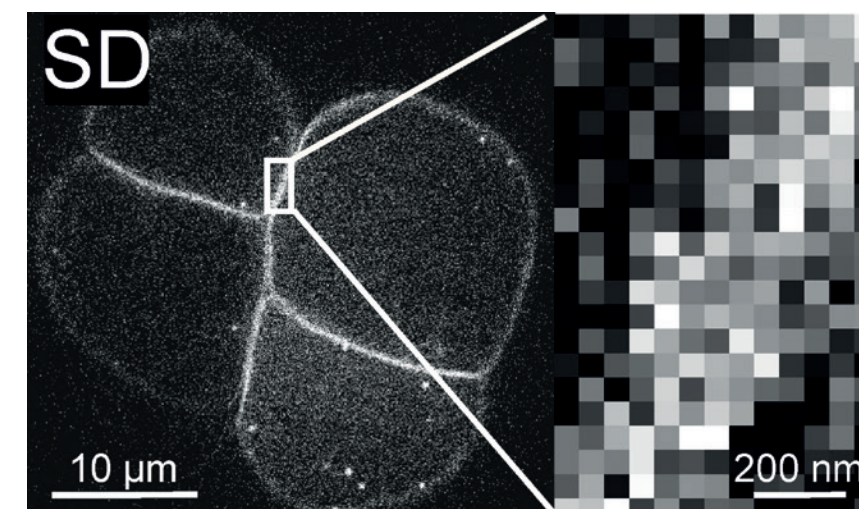
Jan Petrášek

Moderní mikroskopy nabízejí stále více technických řešení, která umožňují vylepšit jejich prostorové rozlišení, tj. jejich schopnost rozpoznat dva velmi malé mikroskopické body jako dva dobře izolované objekty. Lidskému oku je pak k dispozici

získat a do počítače uložit jednotlivé záblesky fluorescence, které pocházejí přímo z jedné studované molekuly. Citlivost je běžně na úrovni jednotlivých fotonů. Takových obrazů je ale nutné nasnímat s frekvencí až 100 obrazů za sekundu co

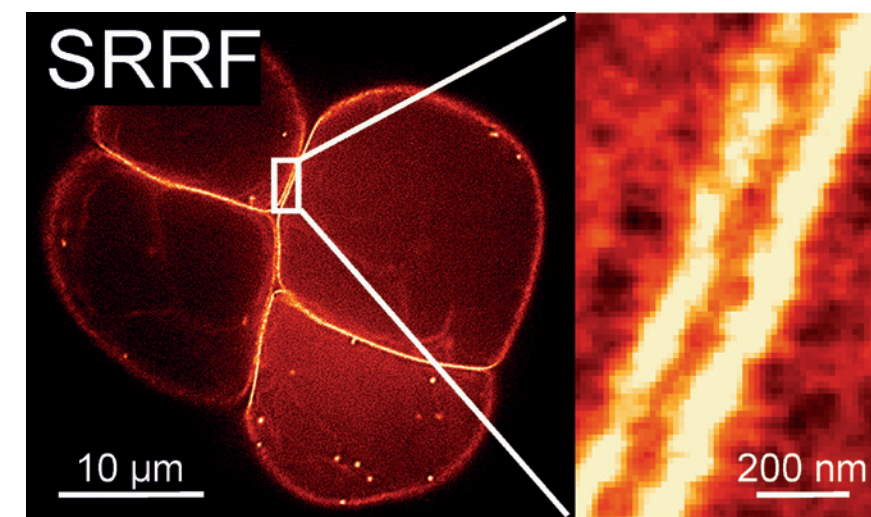
Tohoto principu využívají matematické postupy, které tak zvládnou efektivně extrahovat ve vyšším prostorovém rozlišení z dané série pouze informaci pocházející přímo ze studované molekuly.

Pěkným příkladem využití jedné z těchto metod, tzv. SRRF (*Super-Resolution Radial Fluctuations*), je studium rozložení přenašečů rostlinného hormonu auxinu v buňkách. Jeden ze série takto nasnímaných obrázků (*nahoře*) ukazuje snímek z konfokálního mikroskopu na principu rotujícího kotouče, tzv. spinning disku (SD). Detail zachycuje rozhraní dvou buněk, kde není patrná žádná struktura, vidět jsou pouze jednotlivé obrazové body. Takový obraz je pro analýzu distribuce molekul ale jen zdánlivě bezcenný. Po aplikaci algoritmu SRRF (*dole*) se totiž zobrazí velice pěkně rozhraní obou buněk, patrné jsou obě přilehlé plazmatické membrány a prostor mezi nimi. Popsaná metoda je nejen rychlá, ale i levná a dokáže vylepšit prostorové rozlišení obrazů na úroveň, která je dosahována náročnými a drahými instrumentálními metodami. Proto je o ni nyní mezi biology velký zájem.



mikroskopický obraz rozložení jednotlivých struktur buněk, ba dokonce jednotlivých molekul či atomů. Toto vše navíc přímo v živém stavu umožňujícím se přímo dozvídat detaily o fungování jednotlivých buněk či molekul. Důležité je, že spolu s tímto technologickým pokrokem se též rozvíjejí metody využívající pro vylepšení prostorového rozlišení matematických postupů. Příkladem jejich elegantního využití ve fluorescenční mikroskopii jsou metody využívající toho, že světélkující proteiny používané biologi pro označování studovaných molekul lze aktivovat i pomocí velice nízkých dávek fluorescenčního světla. Takto velice nízké dávky světla, např. pocházejícího z laseru či fluorescenční výbojky, prakticky neovlivňují studovaný materiál a můžeme je směle označit za nedestruktivní. Pomocí velice citlivých kamer, které se mimo jiné též využívají v astronomii pro studium exoplanet, lze

možná nejvíce, ideálně stovky až tisíce. Světlo pocházející z naší studované molekuly se šíří optickou drahou mikroskopu symetricky, což ale neplatí pro pozadí.



# Elektronová mikroskopie – okno do nanosvěta

Jana Nebesářová, Jiří Týč

Žijeme v moři neviditelných předmětů, které nás ovlivňují a působí na nás. Příkladem mohou být viry, které jsou považovány za nejmenší organismy. Některé z nich mohou napadat člověka a působit mu zdra-

voťní obtíže, jako je třeba klíšťová encefalitida. Jejich velikost se pohybuje v intervalu od 16 do 300 nm (jeden nm je miliontina milimetru nebo jinak  $10^{-9}$  m), jsou tedy pro lidské oko zcela neviditelné. K tomu, aby-

chom mohli studovat jejich strukturu nebo životní cyklus, potřebujeme velmi výkonné mikroskopy s dostatečnou rozlišovací schopností. Tu jsou schopny poskytnout pouze elektronové mikroskopy.

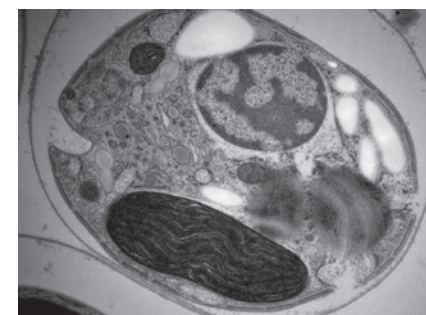
## Prozařovací (transmisní) elektronová mikroskopie (TEM)

Prozařovací (transmisní) elektronová mikroskopie je metoda, která nám umožňuje vidět nejjemnější detaily vnitřního uspořádání buněk, bakterií, virů, ale i složek, z nichž se skládají, např. biologických makromolekul, jako jsou bílkoviny a nukle-

ním prohlížením vzorek zbavit veškeré vody a připravit jej v tenké vrstvě s tloušťkou pod 100 nm, což odpovídá zhruba jedné tisícině tloušťky archu běžného kancelářského papíru. Přičteme-li k tomu vliv rozkladných procesů u biologického materiálu, které probíhají velmi rychle, musíme téměř všechny biologické objekty upravit, fixovat, odvodňovat,

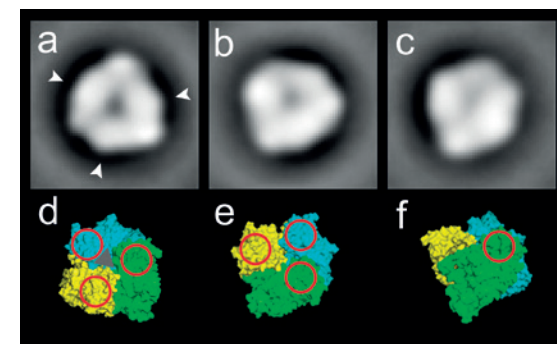
zalévat do pryskyřice a nakonec krájet do podoby ultratenkých řezů s tloušťkou mezi 50-70 nm. Další, modernější možností, která umožňuje zobrazit detailní buněčnou strukturu blíže živému stavu, je zmrazit vodu ve vzorku tak, aby vznikl amorfní nekystalický led. Krystaly by totiž zničily ultrastrukturu vzorku. Led zároveň vzorek zpevní tak že jej lze ve zmrazeném stavu nakrájet do podoby ultratenkých kryo-řezů s požadovanou tloušťkou. Pro použití této metody musí být TEM vybaven chlazeným držákem vzorků, umožňujícím udržovat teplotu hluboko pod nulou, blízko teplotě kapalného dusíku. Výstupem z TEM je snímek pozorované oblasti v buňce nebo struktura daného makromolekulárního komplexu, které jsou zaznamenány digitálně pomocí speciálních kamer.

Dnešní TEM nabízí kromě běžného pozorování připravených vzorků i řadu technicky náročnějších metod, které umožňují najít v buněčné struktuře např. vybranou bílkovinu (imunolokalizace), zkoumat její prostorovou strukturu (jednočásticová analýza) nebo vytvořit třírozměrné zobrazení pozorované oblasti (elektronová tomografie). Pokud je mikroskop vybaven vhodným příslušenstvím, může nám poskytnout informace i o prvkovém složení našeho vzorku (EELS, EDX).

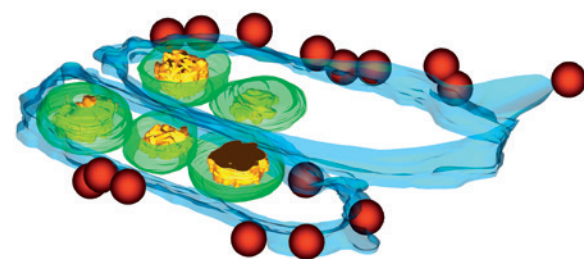


**Obr. 1** – Vnitřní struktura řasy *Chromera velia* zobrazená v transmisním elektronovém mikroskopu připomíná smějíci se rybičku. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).

ové kyseliny. Tyto informace nám prostředkovává paprsek urychlených elektronů, které se vysokou rychlostí prohánějí elektronově optickým systémem TEM a procházejí připraveným vzorkem. Výsledkem je zobrazení místa na vzorku, kterým urychlené elektrony prošly, na obrazovce monitoru či pozorovacím stínítku mikroskopu ve velikém zvětšení a rozlišení, které může dosáhnout až desetin nm. Zobrazení biologických vzorků však není úplně jednoduché a je potřeba překonat několik zásadních překážek. Aby se urychlené elektrony mohly rozptýlit pouze na atomech tvořících vzorek, musí být vnitřní prostor TEM vyčerpán na poměrně vysokou hodnotu vakua a navíc musí být vzorek dostatečně tenký, aby jím mohly elektrony projít. V praxi to znamená, že musíme před vlast-



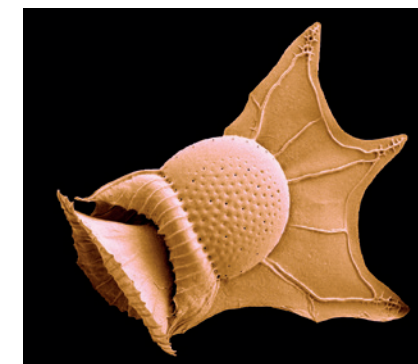
**Obr. 3** – Model struktury proteinového komplexu SMO izolovaného ze sírné bakterie *Chlorobaculum tepidum*. Vizualizace pomocí metody jednočásticové analýzy v transmisním elektronovém mikroskopu s vysokým rozlišením. Částice po analýze jednotlivých projekcí nahoře, rentgenová analýza dole. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).



**Obr. 2** – Trojrozměrný model endoplazmatického retikula neuronu, ve kterém se množí viry klíšťové encefalitidy. Model byl vytvořen pomocí elektronové tomografie. Viry žluté, virové váčky zelené, endoplazmatické retikulum modře a cytoplasmatické ribosomy červeně. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).

## Řádkovací (rastrovací, skenovací) elektronová mikroskopie (SEM)

Tato mikroskopická metoda byla v nedávné minulosti určena především pro pozorování povrchové struktury vzorků ve velkém zvětšení a rozlišení. Pro velkou hloubku ostrosti umožňující získat zaostřený snímek i tak složitých objektů, jakými jsou například zástupci hmyzí říše, je v biologickém výzkumu velmi oblíbená. V sou-



**Obr. 1** – I kdýž objekt na obrázku připomíná helmici římského bojovníka, jedná se o jednobuněčný organismus patřící mezi mořské obrněnky, který se nazývá *Ornithocheirus Magnificus*. Velikost tohoto organismu je pod 100  $\mu$ m a určitě budete souhlasit se slovy jejího objevitele, který ji popsal jako jednu z nejužasnějších a nejpodivnějších zvířecích forem. (Počítačově kolorovaný snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu, Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice)

časnosti zažívá skenovací elektronová mikroskopie prudký rozvoj a současné přístroje nabízejí pro biologické objekty velké množství speciálních aplikací.

Tvorba obrazu v SEM je založena na vychylování paprsku primárních elektronů tak, že skenuje vybranou oblast povrchu preparátu. Zároveň se detegují signály uvolňované z povrchu preparátu při průběhu paprsku urychlených elektronů a jejich intenzita je podkladem k vytvoření obrazu na monitoru mikroskopu. Čím menší je průměr dopadajícího svazku elektronů a plocha, kterou skenujeme, tím větší rozlišení bude mít výsledný obraz z mikroskopu.

Signály, které jsou detegovány v SEM, nesou informace o vzorku. Sekundární elektrony nám umožňují dokonale vidět povrchovou strukturu preparátu, zpětně odražené elektrony prozradí, zda je vzorek složen z lehkých či těžkých prvků, a rentgenové záření dokáže dokonce tyto prvky identifikovat.

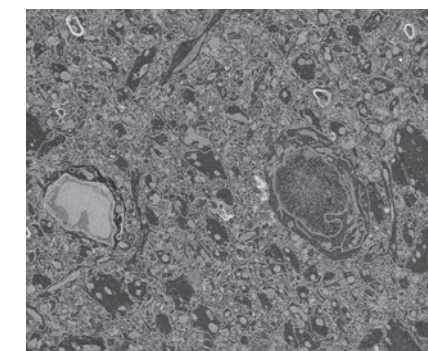
Stejně jako v případě TEM musí být i vnitřní prostor SEM vyčerpán na vysoké

hodnoty vakua. To znamená, že i v tomto případě by preparáty měly být bezvodé. Proto pro pozorování v SEM biologické vzorky musíme zafixovat, odvodnit a vysušit. Poté je nalepíme na vhodnou vodivou podložku a na jejich povrch naprášíme tenkou vrstvu dobře vodivého kovu, která zabrání nabíjení povrchu preparátu při jeho ozařování elektrony paprskem a zvýší kontrast. Pokud nemůžeme vodu ze vzorku odstranit, můžeme použít postup zmrazení preparátu a jeho prohlížení ve zmrazeném stavu v kryo SEM. Další možností je použít SEM, který je schopný pracovat v režimu nízkého vakua, kdy je dokonce možné prohlížet i zcela zavodněný vzorek (environmentální SEM).

Současné řádkovací elektronové mikroskopy umožňují i uspořádání, při kterém je paprsek elektronů vychylován stejně jako ve standardním SEM, ale k tvorbě obrazu se používají elektrony, které prošly vzorkem (skenovací transmisní elektronový mikroskop STEM). V tomto případě vzorky musí mít podobu ultratenkých řezů a SEM musí být vybaven detektorem prošlých elektronů.

Nejmodernější technologie již umožňuje i trojrozměrné zobrazování. Pokud nás zajímá vnitřní uspořádání našeho vzorku, který má vhodnou velikost, můžeme použít několik metod, které jsou založeny na odkrojení tenkého řezu (metoda SBF SEM) či odprášení tenké vrstvy z povrchu vzorku pomocí

koncentrovaného svazku iontů (metoda FIB SEM) a nasnímání obrazu nově odhaleného povrchu pomocí SEM. Vzorek je takto postupně odkrájen či jeho část odprášena v komoře mikroskopu a v průběhu tohoto automatizovaného procesu je získána série snímků, které jsou podkladem pro 3D rekonstrukci odkrájeného či odprášeného objektu. Pro 3D analýzy je třeba vzorky připravit podobným způsobem jako pro TEM, tedy zpevnit je zalitím do pryskyřice, a potom odhalit oblast vzorku, která nás zajímá, odřezáním přebytečné pryskyřice a vzorku v ultramikrotomu.



**Obr. 3** – Ultrastruktura mozkové tkáně myši, která je zobrazena ve skenovacím elektronovém mikroskopu Apreo VS pomocí zpětně odražených elektronů. V tomto zobrazovacím módu jsou velmi dobře viditelné struktury obsahující atomy těžkých kovů, např. osmia, které se do vzorku přidávají během přípravy. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).



**Obr. 2** – Vysoce rozlišující skenovací mikroskop Apreo (Thermo Fischer Scientific), který je vybaven pro 3D rekonstrukce systémem VolumeScope, je instalován v Laboratoři elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice.

# Hledáme molekuly v kupce sena

Vlada Filimoněnko

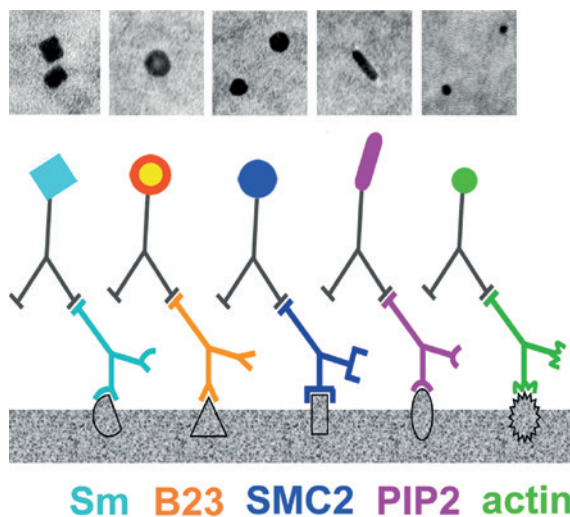
V každé buňce je obrovské množství molekul. Biologické molekuly – makromolekuly – se rozdělují na několik velkých skupin. Lipidy tvoří vnější a vnitřní membrány, DNA v buněčném jádře nese genetickou informaci, bílkoviny plní rozmanité funkce od stavebních přes pohybové až po regulační a obranné, cukry (většinou polysacharidy) slouží často jako zásobárna energie, ale jsou také stavebními prvky a regulátory. Každá z těchto velkých skupin zahrnuje množství jednotlivých druhů molekul, které jsou zastoupeny v buňce určitým počtem kopií a plní svoje specifické úlohy. Aby daná molekula správně fungovala, potřebuje být v buňce na správném místě a interagovat s jinými molekulami. Pokud je narušena struktura molekul nebo jejich umístění, a následně i jejich interakce, nefungují tak, jak mají, což má za následek vznik rozličných nemocí.

K rozluštění složitých procesů v buňce potřebují vědci informaci o tom, kde se

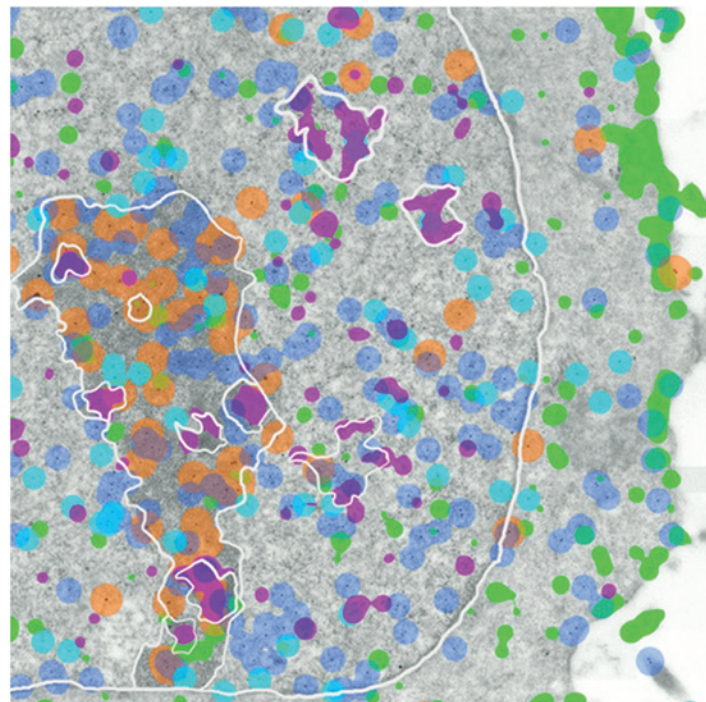
dané molekuly nacházejí a co tvoří jejich okolí. Nejlepší cestou je podívat se na ně v mikroskopu. Moderní elektronové mikroskopy mají rozlišení méně než 1 Angström, tedy  $10^{-10}$  m, což umožňuje zobrazovat dokonce jednotlivé atomy. Jestliže buněčné molekuly izolujeme, dokážeme pomocí speciálních metod kryoelektronové mikroskopie vytvořit prostorové modely molekul s přesností na atomy. V přirozeném prostředí uvnitř buňky jsou však molekuly natolik nahuštěné, že je není možné ani v nejlepším mikroskopu jednotlivě rozeznat.

Jedinou možností, jak zviditelnit určitou biologickou molekulu, je navázat na ni nějakou značku, která bude viditelná v mikroskopu a nesplyne s prostředím – bude vypadat jinak, než cokoli, co se v buňce běžně nachází. Jednou z cest, jak molekuly specificky označit, je imunocytochemie, neboli imunoznačení. Tato metoda je, jak napovídá její název, založená na vlastnostech imunitního systému vyšších obrat-

lovců. Ten totiž při vniknutí cizorodého organismu nebo látky začíná produkovat speciální molekuly – protilátky. Protilátky jsou unikátní v tom, že dokážou velmi specificky rozeznat cílové molekuly a pevně se na ně navázat. V těle slouží k obraně organismu před infekcí, ale vědci se jich naučili využívat při bádání. Na protilátku je možné chemicky navázat speciální značky, které jsou viditelné v mikroskopu. Takovými značkami jsou zlaté nanočástice s velikostí 5–15 nanometrů, které jsou pro elektrony neprostupné (jsou elektrondensní). Postup imunoznačení je poměrně jednoduchý. Speciálně připravený vzorek buněk či tkáně inkubujeme s roztokem specifické protilátky, která je buď sama přímo spojena s kovovou nanočásticí, nebo se na ni naváže další, tzv. sekundární protilátka se značkou. Ve výsledku vidíme v elektronovém mikroskopu buněčné struktury a tmavé kovové nanočástice označující pozice molekul, o které máme zájem.



Pro studium interakcí molekul v buňce potřebujeme označit více různých molekul zároveň. Abychom je rozlišili, použijeme zlaté nanočástice rozdílné velikosti. Můžeme však využít pouze částice v rozmezí 5 až 15 nm – menší nebudou vidět v mikroskopu na pozadí buněčných struktur, větší se jen obtížně dostanou k molekulám ve vzorku. Proto jsme použili nanočástice různých tvarů a dokázali rozlišit pět druhů biologických molekul zároveň. Práce byla publikována v časopise *Histochemistry and Cell Biology* (Philimonenko et al., 2014. *Histochem Cell Biol* 141(3):229-39)



# Co vše lze vidět bez značení?

Aleš Benda

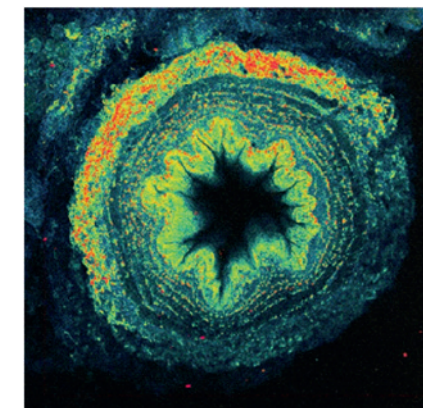
Fluorescenční mikroskopie je oblíbeným a mocným nástrojem zejména díky své specifitě a vysokému poměru signálu k šumu, což je dáno z velké míry nízkým autofluorescenčním pozadím většiny studovaných vzorků. Co se stane, když do fluorescenčního mikroskopu vložíme fluorescenčně neoznačený vzorek? Uvidíme vůbec něco? A proč bychom měli vlastně pracovat s neoznačenými vzorky?

Důvodem k práci s fluorescenčně neoznačenými vzorky není jen lenost či časové a ekonomické náklady, ale zejména snaha nijak nemodifikovat či neporušit vzorek. Fluorescenční barviva, ať už přidaná ke vzorku ve formě sond pronikajících do vzorku a značících specifické organely, nebo ve formě geneticky vložených fluorescenčních proteinů, nejsou pro buňky přirozenou součástí a mohou modifikovat buněčné vlastnosti a chování. Pro každou sondu je třeba otestovat, jaké koncentrace začnou způsobovat modifikace buňky, vedoucí až k její smrti. Každý geneticky modifikovaný fluorescenčně označený protein je třeba zkontrolovat, jestli si zachoval svoji původní funkci a jestli jeho množství v buňce odpovídá běžným fyziologickým podmínkám. Idea zobrazovat bez značení tak má své nesporné potenciální výhody. Ale co jsme vlastně schopni bez značení vůbec vidět?

Občas se s nadsázkou říká, že nativní autofluorescenční signál je pouze otázkou výkonu použitého laseru. Příliš mnoho světla však buňkám škodí, zejména v UV oblasti, proto omezíme hledání potenciálních zdrojů fluorescenčního signálu na buňkami tolerované hodnoty. Oblíbeným cílem autofluorescenčního zobrazování jsou koenzymy NAD(P)H a FAD, které se aktivně účastní metabolismu buňky. Poměr oxidovaných a redukováných stavů těchto metabolitů spolu s jejich celkovými koncentracemi je velmi vhodný k dokumentaci metabolické aktivity buněk. Měření metabolické aktivity mimo jiné umožňuje rozlišit zdravou tkáň od rakovinného bujení. Jakým způsobem lze tedy metabolickou aktivitu zobrazovat?

Shodou okolností jsou redukováné formy koenzymů NAD(P)H, a oxidovaná forma FAD slabě fluorescenční. Oproti fluoro-

forům používaných pro specifické značení mají sice řádově horší svítivost, ale kvalitu nahrazují kvantitou, tudíž se signál z celé buňky stává dostatečně silným pro analýzu. Jistou nevýhodou, zejména pro NAD(P)H, je nutnost použití UV světla, konkrétně kolem 370 nm, pro jejich excitaci. Jednak živé buňky opravdu nemají UV světlo rády, jednak na většině konfokálních mikroskopů chybí vhodný laser a optimalizovaná optika pro práci s takto krátkými vlnovými délkami. Jak se s tím poprat?



Autofluorescenční obrázek lidské cévy

Řešením je použít dva fotony k excitaci místo jednoho. Jeden UV foton 370 nm má totiž energii stejnou jako dva blízké infračervené fotony 740 nm. Současná absorpce dvou fotonů je velmi nepravděpodobný jev, o několik desítek řádů méně pravděpodobný než běžná jednofotonová absorpce. Není divu, že technologie nutná k využití dvoufotonové excitace pro zobrazování byla vyvinuta až v devadesátých letech dvacátého století. Potřebujeme totiž extrémně silné a velmi krátké (kolem sto femtosekund) laserové záblesky s vysokou opakovací frekvencí (desítky megahertzů), dokonalou odolnou optiku, rychlé skenery a citlivé detektory. Dvoufotonová excitace blízkým infračerveným spektrem má další výhody – díky menšímu rozptylu a absorpci světlo lépe proniká do hloubky biologických vzorků a excitace je dosaženo pouze v malém objemu, což automaticky umožňuje 3D zobrazování.

Výkonné lasery umožňují využít k zobrazování i jiné principy generování signálu než fluorescenci. Oblíbená je metoda gene-

race druhé harmonické frekvence (SHG; *second harmonic generation*), kdy díky lokální asymetrii uspořádání makromolekul, typicky vláken kolagenu či myosinu u živočišných buněk, nebo škrobu či celulosy u rostlinných, dochází ke generování světla o přesně poloviční vlnové délce oproti použitému zdroji. Například při použití infračervené vlnové délky 900 nm dochází ke vzniku modrého světla o vlnové délce 450 nm, které se lehce odlišuje od fluorescencce. Zobrazování nativních struktur tkání, včetně svalů, je užitečné při studiu mnoha degenerativních nemocí.

Další možností je využití generace třetí harmonické frekvence (THG; *third harmonic generation*), kdy ke vzniku signálu dochází na optických rozhraních, například mikrokapek, díky kombinaci tří fotonů za generování jednoho o třetinové vlnové délce. Zde je již nutno použít vlnové délky nad 1200 nm, aby generovaný signál byl ve viditelné oblasti a detegovatelný. Zajímavou aplikací je zobrazování červených krvinek, které umožňuje vizualizovat drobné kapiláry v tkáních, včetně rychlosti proudění krve.

Výčet alternativ k fluorescenci tímto nekončí. Lákavým zdrojem informací o vzorku je Ramanův rozptyl světla, protože Ramanovo spektrum je vysoce specifické a umožňuje potenciálně identifikaci nativních molekul skrz jejich vibrační hladiny. Bohužel Ramanův signál je velmi slabý, a tak přímé zobrazování není příliš praktické. Na druhou stranu kdyby Ramanův signál byl příliš silný, tak by vadil fluorescenčnímu snímání, protože se spolu spektrálně překrývají. Existuje však koherentně zesílený anti-Stokesův ramanovský rozptyl (CARS), který pomocí dvou překrývajících se infračervených paprsků sesynchronizuje přechod mezi vybranými vibračními stavy, a tím výrazně zesílí generovaný signál. Nejčastěji a nejjednodušší se zobrazují lipidové mikrokapénky díky vysoké koncentraci skupin  $\text{CH}_2$ .

Jak je patrné, i bez značení se toho dá vidět celkem dost, pokud máte vhodné přístrojové vybavení. Mikroskopy vybavené silnými infračervenými lasery najdete na Fyziologickém ústavu AV ČR a v BIOCEVU.

# Jak rychle se hýbou molekuly?

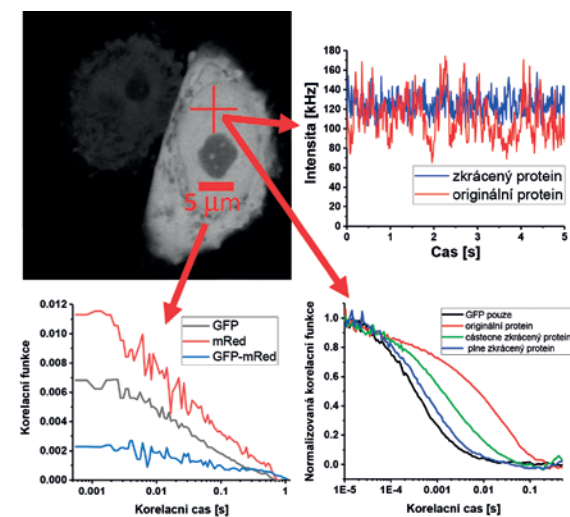
Aleš Benda

Mikroskopie je často spojována se statickými obrázky poskytující detaily struktury vzorku. Živá příroda je ale velmi dynamická a struktura bez dynamiky podhaluje jen část tajemství. Víme, kde se co vyskytuje, ale už moc netušíme, co přesně to tam dělá. Jedná se o pevně navázanou strukturální molekulu, nebo volně difundující protein? Chová se netečně vůči okolí, nebo s ním aktivně interaguje? Jaké možnosti nám mikroskopie skýtá pro zachycení pohybu, a tím i k podhalení skutečné funkce molekul?

Každého asi napadne možnost posbírat časovou sekvenci obrázků, tedy natočit video. Moderní citlivé a rychlé kamery zvládají přes 100 obrázků za sekundu, i konfokální mikroskopy jsou schopny se dostat na několik snímků za sekundu. Tato rychlost umožňuje dobře charakterizovat změny struktury buněk, přestavbu jejich vnitřního uspořádání. Nicméně jak zachytit a charakterizovat pohyb a přesuny molekul, které nemusí být nutně přímo spřaženy s konkrétními strukturami?

Jednou z možností je doplnit rychlé snímání cílenou fotomanipulací vzorku. Metoda fluorescenční obnovy po fotovybělení (FRAP; *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) cíleně zničí fluorescenční molekuly ve vybrané části vzorku pomocí silného ozáření, většinou za využití laseru, a v následném rychlém snímání sleduje, jak rychle a v jakém rozsahu dochází k obnově signálu. To poskytuje informace o rychlosti a způsobu pohybu sledovaných molekul, jejich interakci s okolím, případně i rychlosti jejich syntézy buněk.

Komplementární technikou je v poslední době populární selektivní fotoaktivace. Genetickými manipulacemi byly vyvinuty speciální fluorescenční proteiny, které v nativním stavu nefluoreskují. K jejich aktivaci je potřeba je ozářit specifickým světlem, které je teprve přepne do svítivého stavu. Ozářením vybrané části vzorku je tak možné fotoaktivovat pouze část molekul a následně sledovat, jestli molekuly zůstávají na místě, či se přesouvají do jiných částí buňky. Oproti fotovybělení stačí použít řádově menší intenzity s menším rizikem fototoxicity pro sledované živé buňky.



Příklad bodové a rastrovací fluorescenční korelační spektroskopie

Obě výše uvedené metody využívají narušení rovnováhy systému a sledují, jak se systém se změnou vypořádá. Lze sledovat dynamiku molekul i bez umělého porušení rovnováhy? Za jistých podmínek ano. Pokud lze vzorek označit extrémně nízkou koncentrací (řádově pikomolární) fluorescenčně značených studovaných molekul, které se nehýbou příliš rychle, a fluorescenční značka je dostatečně svítivá a stabilní, lze pomocí extra-citlivé kamery sledovat pohyb jednotlivých molekul. Metoda zvaná Sledování jednotlivých částic (SPT; *Single Particle Tracking*) se aplikuje zejména na membránové molekuly a analýzou trajektorií jednotlivých molekul umožňuje odhalit nejen rychlost pohybu či difuze, ale i případné specifické interakce.

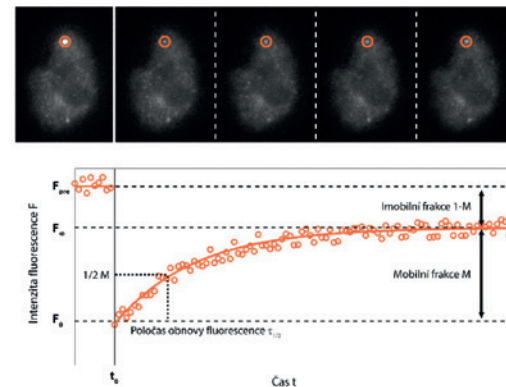


Schéma metody FRAP

Pokud studovaný vzorek nespĺňuje poněkud přísná kritéria pro SPT, je možné využít časově-prostorových korelačních technik. Název metody zní složitě, ale princip je poměrně jednoduchý. Metoda sleduje, jestli naměřená intenzita fluorescence v jednom bodě a/ nebo čase vzorku nějak souvisí (tedy koreluje) s fluorescenční intenzitou v jiném bodě a/nebo čase. Pokud spolu signály souvisejí, většinou to znamená, že jsou ovlivňovány pohybem stejných molekul. Ačkoliv se na první pohled často zdá, že analyzujeme pouze šum, z tohoto „šumu“ získáme informace o koncentraci molekul, rychlosti a módu jejich pohybu i o případné interakci či konformačních změnách. Podmínkou je, že koncentrace svítících molekul je natolik nízká, že změna způsobená jednou molekulou je rozlišitelná od reálného šumu. Nejrozšířenější realizací je bodová fluorescenční korelační a kroskorelační spektroskopie (point FCS a FCCS), která využívá konfokálních mikroskopů s velmi citlivými detektory schopnými přesně registrovat dopad jednoho jediného fotonu. Extrémně malé femtolitrové detekční objemy vytvořené nejlepšími objektivy na trhu umožňují analyzovat až sto-nanomolární koncentrace, které jsou již relevantní pro přirozené buněčné prostředí. Výhoda bodové FCS je, že zvládne pokrýt časovou škálu od nanosekund až po jednotky sekund. Pokud sledujeme pomalejší pohyby a rádi bychom znali i prostorové rozložení získávaných parametrů, lze s úspěchem aplikovat řádkovou či zobrazovací FCS (line-scanning FCS a Imaging FCS) a další odvozené metody. Czech-BioImaging nabízí v této oblasti některé unikátní metody, vyvinuté přímo odborníky v servisních laboratořích, které nejsou dostupné jinde ve světě.

# Kombinování neslučitelného aneb jak získat to nejlepší ze světů fotonů i elektronů

Aleš Benda

Ideální mikroskop pro biology by spojoval specifitu a citlivost pro identifikaci jednotlivých molekul s možností zobrazit ultrastrukturu s nanometrovým rozlišením. Umožňoval by pozorovat velké množství živých buněk, ale i nejjemnější detaily. Takový mikroskop bohužel neexistuje, alespoň zatím ne. Specifitu, citlivost a možnost pozorovat živé buňky přináší optická fluorescenční mikroskopie, zatímco ultrastruktura s nanometrovým rozlišením je doménou mikroskopie elektronové.

Oba druhy mikroskopie lze kombinovat, ale úplně jednoduché to není. Živá hmota totiž obsahuje velké množství vody, která sice pro fluorescenční mikroskopii žádný problém nepředstavuje (fotony ve viditelné části spektra procházejí vodou téměř bez jakékoliv interakce), ovšem elektrony využívané při elektronové mikroskopii zcela pohlcuje. I vysoce urychlený elektron (na 120–300 keV) dokáže proniknout nanejvýš několika stovkami nanometrů biologického materiálu – a to pouze za předpokladu, že se k vzorku vůbec dostane. Pokud bychom měli v elektronovém mikroskopu nad vzorkem plyn, elektrony by byly tímto plynem absorbovány, nebo by se v něm rozptýlily, a ke svému cíli – vzorku a pak kameře – by nedorazily. Východiskem je vytvoření vysokého vakua v komoře elektronového mikroskopu – ovšem co biologické vzorky, které obsahují vodu? Ta se ve vakuu začne ihned vypařovat, vzorek se scvrkne a zdeformuje – a je po krásném obrázku. Řešením je vzorek citlivě zbavit vody ještě před tím, než se do mikroskopu vloží.

Bez přidání těžkých kovů, obvykle osmia nebo uranu, pro zvýšení kontrastu buněčných struktur, toho není v elektronovém mikroskopu moc vidět. Jenže pokud při tomto kontrastování není fluorofor přímo chemicky zničen, tak přítomnost těžkých kovů způsobuje zhasnutí fluorescence a tím i pokles specifického fluorescenčního signálu pod úroveň pozadí. Proto je nutné fluorescenční a elektronovou mikroskopii od sebe časově oddělit.

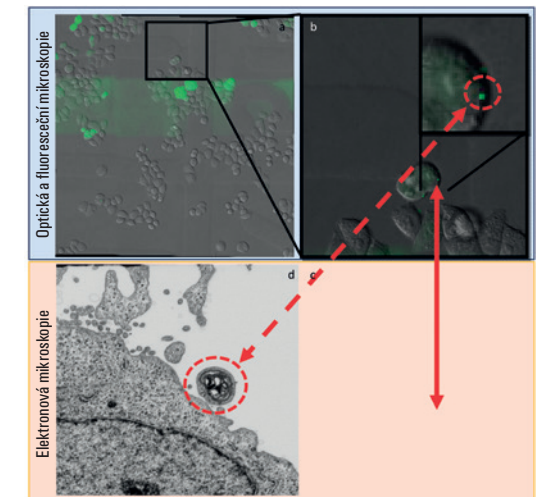
Při korelativní světelné a elektronové mikroskopii (CLEM) pozorujeme živý vzorek, často buněčné monokultury pěstované na sklíčku, klasickými optickými a fluorescenčními metodami. Je zde jen jeden drobný rozdíl: do sklíčka je vyrytý systém souřadnic, podobný šachovnici, který pomocí dvouznakového kódu umožňuje zaznamenat pozice vybraných buněk. Jakmile pomocí optické mikroskopie najdeme a nasnímáme hledané buňky, obvykle buňky vykazující hledaný fenotyp či buňky, ve kterých právě probíhá studovaný proces, rychle vzorek zafixujeme, třeba směsí formaldehydu a glutaraldehydu nebo, moderněji, rychlým zamrazením za vysokého tlaku. V obou případech následuje klasické zpracování vzorku pro elektronovou mikroskopii – zejména odstranění problematické vody a přidání kontrastu v podobě sloučenin těžkých kovů, které jsou selektivně absorbovány různými organelami buňky. Zpracovaný vzorek ve formě bločku vložíme

do ultramikrotomu pro nakrájení ultratenkých řezů, nebo přímo do skenovacího elektronového mikroskopu. Vybrané buňky k podrobnému nasnímaní nalezneme podle souřadnic ze sklíčka, na kterém byly buňky pěstovány – otisky se do reliéfu bločku.

Proč potřebujeme mít stejnou buňku nafocenou jak v optickém fluorescenčním mikroskopu, tak v elektronovém? Jednou z motivací je zachycení a prostudování vzácných událostí či fenotypů buněk. Hledat je pomocí elektronové mikroskopie je časově i finančně velmi náročné. Druhou motivací je zjistit, jak vypadá ultrastruktura buňky, ve které dochází například k hromadění specifického proteinu, nebo která z membránových struktur je ta, v níž dochází k akumulaci například léčiva. V tomto případě nestačí buňku pomocí fluorescence jen najít, ale je třeba ji rychle a kvalitně nasnímat, aby bylo možné později proložit fluorescenční obrázek s elektronovým.

V rámci infrastruktury Czech-BioImaging Servisní laboratoř zobrazovacích metod v BIOCEV kombinuje hlavně trojrozměrnou vícebarevnou klasickou nebo konfokální mikroskopii s trojrozměrným snímáním pomocí FIB-SEM elektronové mikroskopie a na Ústavu molekulární genetiky AV ČR kombinují fluorescenční snímání s transmisní elektronovou mikroskopii na ultratenkých řezech.

V budoucnosti se pravděpodobně obejdeme bez dehydratace vzorků a také bez těžkých kovů. Rychlé zamrazení vzorku do podoby amorfního ledu totiž velmi dobře zachovává jak fluorescenci, tak ultrastrukturu. Zároveň hluboce zmrazený vzorek jen málo sublimuje, takže může být umístěn a snímán ve vakuu pomocí kryo-EM tomografie. Jedná se o nové, finančně i dovednostně velmi náročné technologie, které se našim uživatelům pokusíme zpřístupnit v nadcházejících letech.



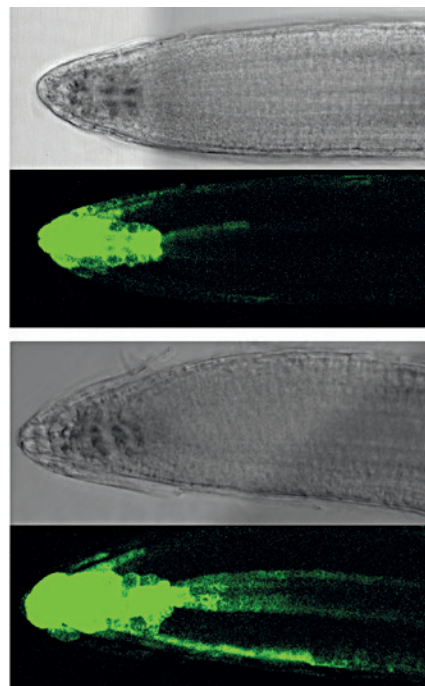
# Mikroskopie rostlin - kde je dole a kde nahoře?

Jan Petrášek

Všichni to dobře známe a pozorujeme kolem sebe. Rostliny jsou ve svém růstu orientovány vůči gravitačnímu poli Země. Jejich nadzemní části rostou vzhůru, zatímco kořeny v podzemí směřují proti gravitačnímu působení. Některé primitivní mikroskopy pro pozorování reakcí rostlin na gravitaci z konce 19. století byly vhodně uspořádány a nahlížely na rostoucí rostlinu ze strany. Ačkoliv by se mohlo zdát, že moderní mikroskopy jsou na tuto situaci již dlouho připraveny, překvapivě tomu tak není. Orientace mikroskopických stolků u moderních fluorescenčních mikroskopů je totiž běžně horizontální, což znamená, že rostlinu je nutné na takový stolek položit. Toto ale představuje opravdu velkou překážku při poznávání toho, jaké mechanismy rostlina při směřování svého růstu využívá. Takový výzkum se nejlépe provádí v podmínkách, kdy je možné rostlinám zachovat jejich přirozené prostředí i během náročných mikroskopických pozorování. Pro tyto účely se v poslední

době podařilo najít způsob, jak tuto situaci zvládnout. I velice složitý fluorescenční konfokální mikroskop, obsahující moduly pro pozorování molekulárních mechanismů řídicích dělení a růst buněk, lze totiž celý umístit na bok a umožnit tak rostlinám během pozorování růst v přirozeném gravitačním prostředí. Takové řešení bylo úspěšně zavedeno na pracovišti zobrazovacího centra Ústavu experimentální botaniky AV ČR (obrázek vlevo). Konfokální fluorescenční mikroskop je klasické konstrukce, je ovšem pevně přichycen k podložce, která je umístěna kolmo na antivibrační stůl. Důležité je, že stolek s rostlinou, kterou může být např. semenáček oblíbeného modelu huseničky rolního, je ve svislé orientaci. Tento mikroskop slouží pro neinvazivní pozorování různých signálních a strukturálních molekul, které jsou označeny fluorescenčními proteiny. Pěkným příkladem (vpravo) je ohybová reakce kořene, kterou lze pozorovat po natočení rostoucího semenáčku přímo

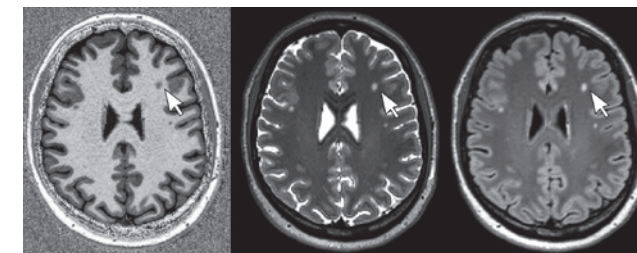
na mikroskopu do horizontální roviny. Kořen se velice rychle otáčí za gravitačním vektorem a během tohoto procesu lze pozorovat i celou řadu látek, které se tohoto procesu účastní. Fytohormon auxin se přesouvá během ohýbání kořene na spodní stranu kořene, kde blokuje prodlužování buněk, a proto se kořen ohýbá na tuto stranu. Auxin je na obrázku patrný jako zelený signál fluorescenční značky ve všech buňkách, které mají zvýšený obsah tohoto hormonu. 5 minut po otočení kořene o 90° jsou již těžká škrobová zrna spadlá na spodní stranu buněk (horní část obrázku), ještě ale není patrná žádná reakce hormonu. Tuto lze krásně pozorovat zhruba od 15. minuty dále, dolní část obrázku ukazuje stav zhruba po 60 minutách, kdy se již kořen ohnul do nové orientace. Vertikální uspořádání mikroskopického stolku představuje revoluci v možnostech neinvazivního sledování vývoje rostlin a dá se předpokládat, že postupně v mikroskopii živých rostlin zcela převládne.



# Vidíme do našich těl

Marie Nováková, Michal Mikl

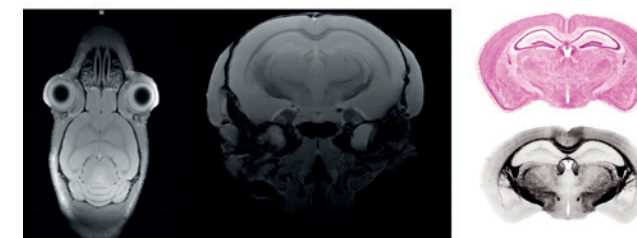
Vyšetření magnetickou rezonancí (MR) je neinvazivní zobrazovací metoda, která nevyužívá radiačního záření a poskytuje skvělé rozlišení pro zobrazení měkkých tkání v těle. Základní princip sběru dat vychází z umístění pacienta do silného magnetického pole a vybudování vodíkových jader v jeho těle pomocí vysokofrekvenčního magnetického pole. Snímaným signálem je pak opět elektromagnetické vlnění v radiofrekvenční části spektra, vzniklé jako odezva excitovaných jader v tkáni na excitační impuls. Výsledný obraz je pak vytvořen zpracováním dat z přijímacích cívek v MR scanneru. Pro běžné účely bývají používány skenery o síle magnetického pole 1,5 a 3T až 7T pro vědecké účely až 10,5T a pro živočišné studie až 14,4T. Pro srovnání síla tohoto pole na zemském povrchu je v rozmezí 25 a 65 mikrotesla.



Ložisko roztroušené sklerózy v oblasti levé hemisféry zobrazená různými měřícími MR sekvencemi. Zleva: T1-vážené se zvýšeným kontrastem, T2-vážené a FLAIR sekvence.

Změnou nastavení parametrů sekvencí skeneru je možné měnit kontrast v obraze, a zaměřit se tak na zvýraznění rozdílů mezi tkáněmi, které nás zajímají. Nejčastěji používané sekvence pro strukturní zobrazování se označují jako T1 a T2-vážené, přičemž toto označení vychází z nastavení optimalizovaného pro zobrazení s váhováním pomocí tzv. relaxačních časů, které jsou specifické pro různé tkáně a mohou také být ovlivněné depony různých biochemických látek, např. ukládáním železa či vápníku.

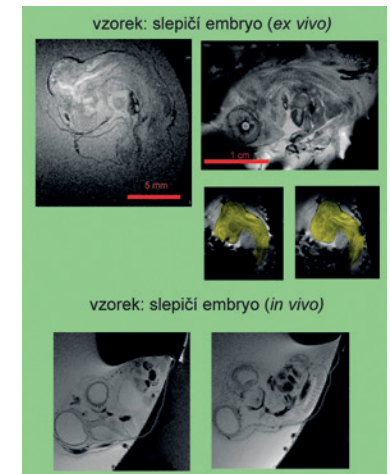
Využití strukturního MR zobrazení v neurovědním výzkumu přináší cennou kvalitativní i kvantitativní informaci o tvaru, velikosti a struktuře šedé a bílé hmoty mozku. Kontrast v obraze mezi šedou a bílou hmotou a mozkomíšním mokem vzniká na základě vyššího obsahu těl neuronových buněk v šedé hmotě a obsahu dlouhých nervových vláken v hmotě bílé. T1-vážené sekvence poskytují dobrý kontrast mezi šedou a bílou hmotou mozkovou, zatímco mozkomíšní mok a kost se zobrazuje s velice nízkým signálem



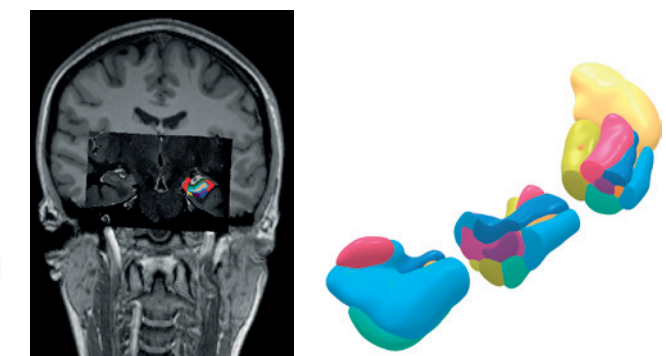
MR snímek mozku myši ve dvou různých řezech, vpravo odpovídající barvený histologický řez.

a v obraze se tedy jeví tmavé. Toto zobrazení je vhodné především pro zobrazení mozkového parenchymu a bývá obvyklým měřením v klinické praxi. T2-vážené sekvence poskytují dobrý kontrast mezi mozkomíšním mokem a mozkovou tkání (tmavá). Tyto snímky mohou být využity pro vyhodnocování prostor vyplněných CSF, edému nebo mrtvice. Pro zobrazení gliomu je pak vhodné využití FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery), které obdobně jako T2-vážené snímky zobrazuje šedou hmotu světlejší nežli bílou hmotu, ale mozkomíšní mok se jeví na snímcích tmavý.

Morfometrické metody umožňují studium makroskopických změn mozkové struktury pomocí automatizovaných analýz, které se hojně využívají především ve výzkumu. Pro morfometrické metody se nejčastěji využívají T1-vážené snímky. V začátcích byly morfometrické metody limitovány k pouhému globálnímu vyhodnocení celkového objemu mozku, zatímco v dnešní době je možné provádět měření lokálních morfometrických změn v mnohem detailnějším měřítku. Objem šedé a bílé hmoty se mění v dětství a během stárnutí. Tyto změny (regionální úbytky nebo naopak nárůsty) se ukázaly být vázané i na některá klinická a psychiatrická onemocnění. Příkladem může být Alzheimerova choroba, která je spojena s rychlým úbytkem šedé hmoty mozkové a zvětšením prostoru mozkových komor.



Výzkum vývoje chondrocytů

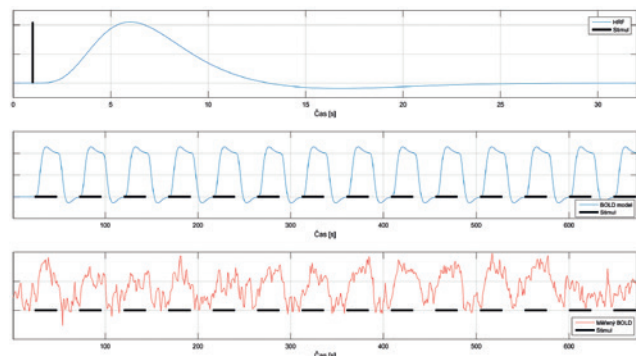


MR snímek celé hlavy s T1 váhováním (rozlišení 1x1x1 mm) kombinovaný s podrobnějšími snímky hipokampů pomocí T2 váhování a ZOOMit metody (rozlišení 0,4 x 0,4 x 1 mm). Na snímku je barevně označen automaticky segmentovaný levý hipokampus a vpravo je pak 3D vizualizace tohoto levého hipokampu rozdělením na jednotlivé anatomické oblasti.

# Zobrazování funkce mozku

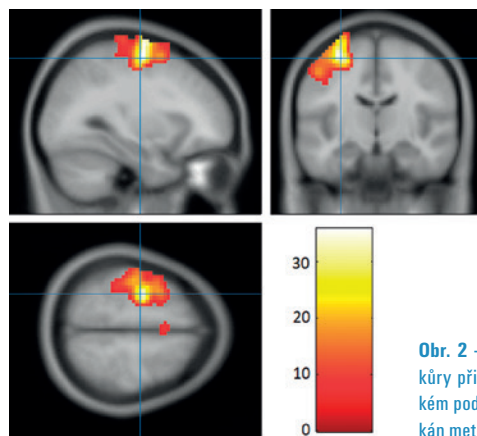
Martin Gajdoš, Michal Mikl

Funkční zobrazování mozku se uplatňuje jak v neurovědním výzkumu, tak i v klinických aplikacích. V tomto příspěvku se zaměříme na mapování funkce mozku pomocí funkční magnetické rezonance (fMRI) a elektroencefalografie (EEG).



**Obr. 1 -** V horní části je zachycena hemodynamická odezva, uprostřed modelový BOLD signál odpovídající zobrazené opakované aktivitě a dole je reálný BOLD signál měřený v primární zrakové oblasti při použití vizuální stimulace.

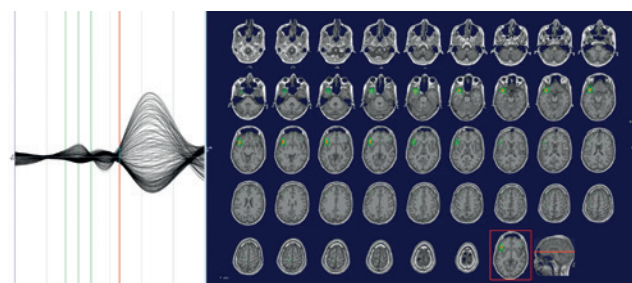
Při zobrazování metodou fMRI se využívá opakované měření mozku, které zaznamenává metabolickou stopu neuronální aktivity. Jak? Nejčastěji měříme fMRI závislou na úrovni oxygenu krve (BOLD fMRI; *blood oxygenation level dependent fMRI*). V tomto případě jsou zaznamenávány T2\* vážené snímky, které jsou citlivé na poměr oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu. Pokud je populace neuronů zapojena do aktivity, jakou je například zpracování vizuálního podnětu ve zrakové kůře, spotřebovává energii a kyslík a produkuje metabolity. Metabolity jsou odváděny odkysličenou krví a nová energie a kyslík jsou dodávány oxygenu krví. Oxygenu krev má díky diamagnetickému oxyhemoglobinu jiné magnetické vlastnosti než odkysličená krev, kde převládá paramagnetický deoxyhemoglobin. Jelikož jsme schopni pořídit fMRI sken mozku přibližně každou vteřinu, získáme tak časový vývoj poměru oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu, který je pro takové zapojení neuronální populace do aktivity charakteristický. Odezva na krátký impuls se nazývá hemodynamická odezva (obrázek 1).



**Obr. 2 -** Lokalizace motorické kůry při opakovaném motorickém podnětu. Výsledek byl získán metodou GLM.

Naměřená data je potřeba zpracovat a k tomu mají výzkumníci k dispozici velkou škálu metod, které volí dle řešené hypotézy. Jednou z nich je obecný lineární model (GLM), který využívá toho, že jsme schopni namodelovat teoretický průběh hledaného signálu. Tento model, neboli regresor, může představovat například časový průběh zapojení se zrakové kůry do zpracování vizuálních podnětů, které přicházejí v předem definovaných časových okamžicích. Metodou obecného lineárního modelu pak v každém elementu prostoru (voxelu) mozku určíme, nakolik je hledaný signál přítomen. Míra přítomnosti je ohodnocena statistickou hodnotou a výsledkem analýzy je prostorová mapa statistických hodnot. Tímto způsobem lze například při tuku prstů o palec u měřeného člověka lokalizovat motorickou kůru. Lokalizace funkční oblasti mozku je důležitá při předoperačním plánování, kdy se výsledná statistická mapa nahraje neurochirurgovi do navigačního systému (obrázek 2).

Pokročilejší metody analýzy, které nacházejí své uplatnění zatím spíše v základním výzkumu, jsou schopny například detegovat stavy mozku v jednotlivých časových okamžicích a následně tak díky nim můžeme analyzovat dynamiku přepínání mezi těmito stavy mozku. Tato dynamika se může lišit u zdravých a nemocných lidí a bylo například ukázáno, že metoda umožňuje odlišit pacienty se schizofrenií od zdravé populace.



**Obr. 3 -** Lokalizace epileptického výboje získaná metodou zpětné rekonstrukce elektrických zdrojů. Červená čára znázorňuje v levém grafu průběh EEG signálů časovou pozici odpovídající aktuálnímu stavu rekonstruovaného elektrického zdroje (vpravo).

Funkci mozku lze zobrazovat rovněž pomocí EEG. V tomto případě se využívá měření změny rozdílů elektrických potenciálů mezi elektrodami, které jsou nejčastěji umístěny na povrchu hlavy. Tyto změny jsou způsobeny synchronizovanými výboji populací neuronů. Hlavním zdrojem signálu EEG jsou postsynaptické proudy pyramidálních neuronů. Pro měřitelný EEG signál musí synchronizovaný výboj pocházet minimálně od stovek tisíc neuronů. Metoda EEG umožňuje – oproti fMRI – změřit stav potenciálů mozku několik tisícrát za vteřinu. Na druhou stranu je ale přesnost lokalizace zdroje aktivity vzhledem k fMRI nižší, jelikož se spoléhá obvykle „pouze“ na data z desítek až stovek povrchových elektrod.

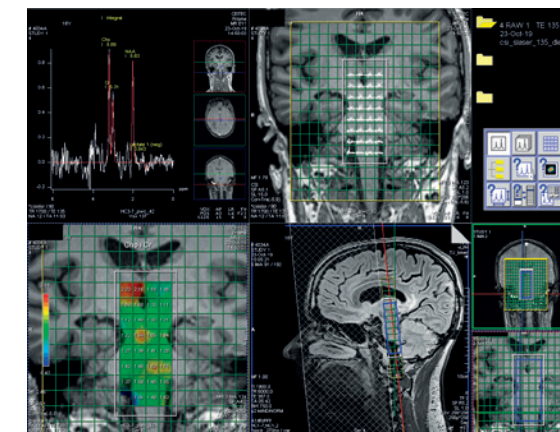
Vyšší časové rozlišení metody je vhodné při měření rychlých dějů, jakými jsou například epileptické výboje. Metodou zpětné rekonstrukce elektrických zdrojů je pak možné nejen lokalizovat počátek epileptického výboje, ale také sledovat jeho šíření mozkiem (obrázek 3).

# Vidíme stav tkání

Zenon Starčuk jr., Jana Starčuková

Správná funkce orgánů je založena na správné regulaci chemických reakcí, které probíhají v buňkách. Stovky typů molekul – metabolitů – jsou zapojeny do posloupnosti chemických reakcí – metabolických drah. Spektroskopické metody protonové magnetické rezonance nám umožňují do stavu metabolismu živých tkání nahlédnout prostřednictvím asi dvacítiky nízkomolekulárních metabolitů, jejichž molekuly lze detegovat díky koncentracím přesahujícím 1 mmol/L. Charakteristické interakce spinů atomových jader v jejich molekulách ovlivňují snímané signály a jsou základem rozlišitelnosti signálových složek příslušejících různým metabolitům. Údaje o změně koncentrace a prostorové distribuci metabolitů mohou v lékařství pomoci přesněji diagnostikovat nádorová, zánětlivá a neurodegenerativní onemocnění a sledovat efekty léčby. U MR spektroskopie v malých laboratorních zvířatech (myších, potkaních, králíciích) je hlavní přínos příspěvek k lepšímu porozumění mechanismů nemoci a k hodnocení nových léčebných postupů.

Vedle signálů vodíkových jader můžeme obdobně sledovat i jádra uhlíku, fosforu a fluoru.

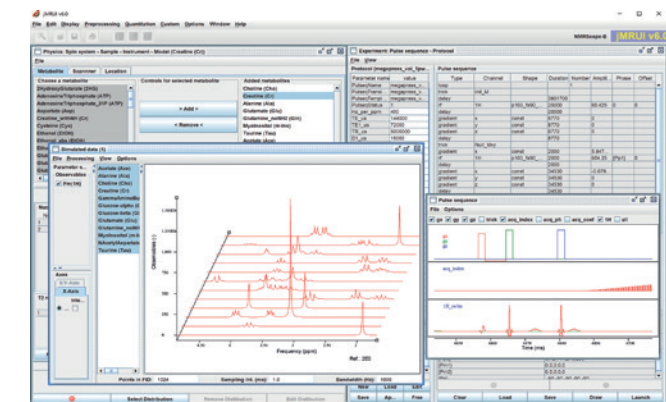


Příklad klinického spektroskopického zobrazování 3T magnetickou rezonancí v MAFIL CEITEC – hodnocení poměru metabolitů Cho/Cr pacientů s nádorem mozkuvého kmene.

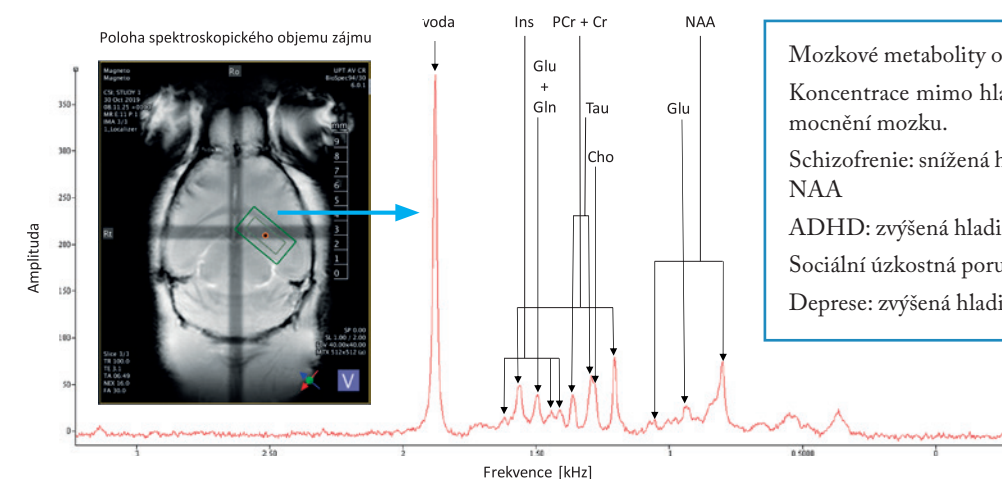
Podílíme se na vývoji softwaru jMRUI pro kvantifikaci koncentrací metabolitů, který má přes 4500 registrovaných uživatelů v nemocnicích a na univerzitách ve více než 60 zemích světa.

<http://www.jmru.eu/>

Kromě koordinace vývoje celé aplikace vyvíjíme modul NMRScope-B umožňující simulaci vývoje fyzikálních veličin, které popisují stav molekul v zobrazeném objemu v průběhu NMR experimentu. Simulace NMR signálů metabolitů je základem pro kvantifikaci koncentrací metabolitů, ať již dekompozicí signálu nebo pro tréninku automatu pro rozpoznávání vzorů. Simulace, zahrnující efekty chemických posunů, spin-spinových vazeb, relaxace i prostorové a spektrální selektivity excitace, slouží i k vývoji metod in vivo MR spektroskopie a spektroskopického zobrazování. Proto podporuje volnou tvorbu pulsních sekvencí a protokolů uživatelem. V této oblasti poskytujeme poradenství.



Simulace spektroskopického experimentu v programu jMRUI pomocí modulu NMRScope-B vyvíjeného naším týmem ÚPT AV ČR.



Mozkové metabolity odrážejí stav mozkové tkáně. Koncentrace mimo hladiny normy jsou znakem onemocnění mozku. Schizofrenie: snížená hladina NAA, vyšší poměr Cho/NAA. ADHD: zvýšená hladina Cr, Glu a Gln. Sociální úzkostná porucha: zvýšená hladina Glu, Gln. Deprese: zvýšená hladina Ins, Cho.

Příklad spektra vybraného objemu mozku myši s vyznačením hlavních metabolitů. Měřeno na 9,4T MR skeneru na ÚPT AV ČR.



# Měříme prokrvení tkání

Radovan Jiřík

Pomocí magnetické rezonance a metod zobrazování perfuze měříme a zobrazujeme parametry prokrvení tkáně na úrovni cévních kapilár. Využíváme metody DCE-MRI a DSC-MRI, založené na intravenózním podání kontrastní látky a sledování její distribuce v tkáni a v čase. Dále využíváme

## Vyvíjíme:

- nové metody měření magneticko-rezonančních dat pro výpočet parametrů prokrvení tkáně (pomocí moderních metod kompresního snímání můžeme měřit kompletní set parametrů prokrvení ve 3D)
- nové metody výpočtu parametrů prokrvení tkáně (pomocí tzv. slepé dekonvoluce získáváme přesnější odhady parametrů prokrvení)
- nové metody měření a výpočtu parametrů prokrvení spojením doposud samostatně používaných metodologií (DCE-MRI + DSC-MRI)

Vyvíjíme software PerfLab pro výpočet parametrů prokrvení tkáně a poskytujeme k němu přístup spolupracujícím vědeckým institucím.

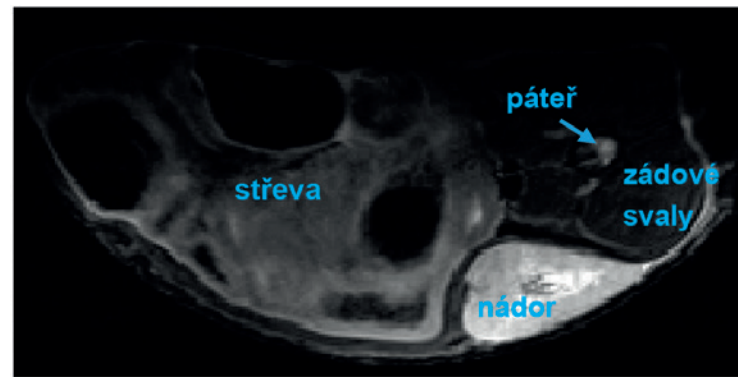
i metody ASL, kde je jako „kontrastní látka“ použita krev značená magneticky, tedy bez potřeby podávání vnější kontrastní látky.

V onkologii se tyto metody (převážně DCE-MRI a DSC-MRI) experimentálně používají pro odhalení maligní (zhoubné) povahy nádoru a pro monitorování léčby. Při léčbě nádorových onemocnění se standardně používá hodnocení založené na změně objemu nádoru. Objem nádoru se však zmenšuje velmi pomalu, v rozsahu od několika týdnů až po jednotky měsíců, případně se objem nemění vůbec. Parametry prokrvení tkáně se naopak v důsledku léčby mění velmi rychle (dny až týdny). Proto měření parametrů prokrvení umožňuje

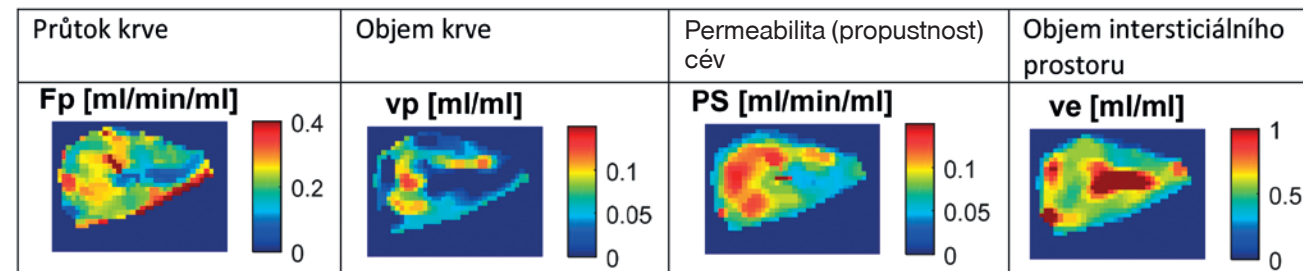
včasné přizpůsobení léčby aktuálnímu stavu pacienta a zvyšuje tak efektivitu léčby.

Další aplikací zobrazování perfuze (převážně DSC-MRI a ASL) je diagnostika ischemických onemocnění v neurologii a kardiologii. Například při mozkové mrtvici se zobrazování perfuze používá (zároveň s difúzně váhovaným MRI) k určení takzvané penumbry, tedy oblasti mozku, kterou lze akutní terapií zachránit.

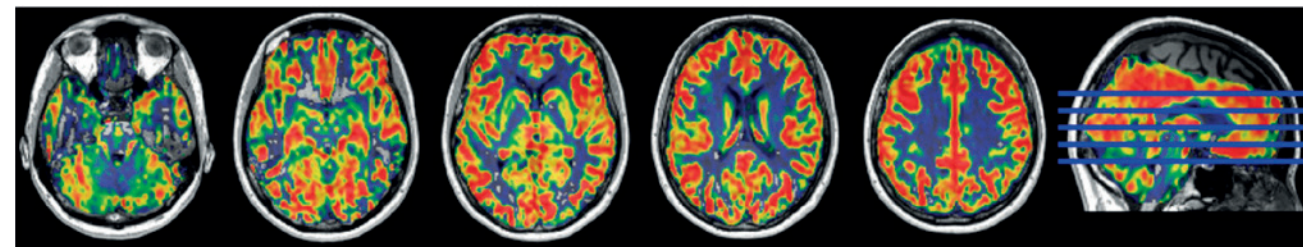
Na malých zvířatech (myši, potkani) se měření prokrvení tkáně aplikuje např. při vývoji nových postupů léčby nádorových onemocnění, zejména při vývoji antiangiogenní terapie, tedy postupu potlačujícího tvorbu nových cév v nádoru.



Příklad strukturálního magneticko-rezonančního obrazu, myš s nádorem, měřeno 9,4T MR skenerem na ÚPT AV ČR.



Příklad změřených map parametrů prokrvení nádoru získaných metodou DCE-MRI pomocí 9,4T MR skeneru na ÚPT AV ČR, nádor odpovídá předchozímu strukturálnímu obrazu.



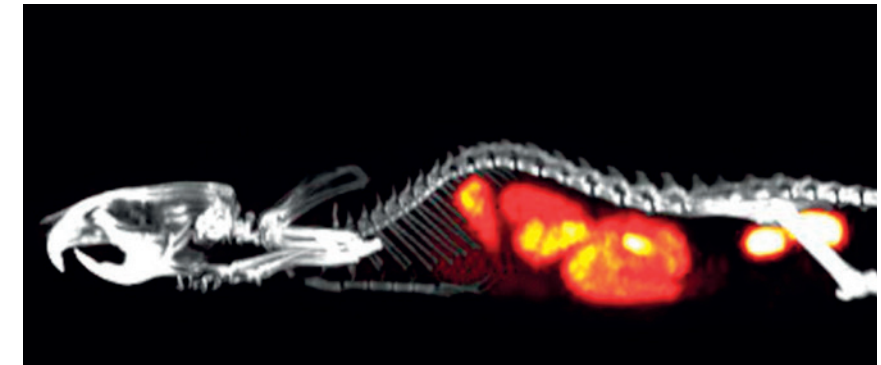
Příklad map průtoku krve mozku člověka změřených metodou ASL pomocí 3T MR skeneru v MAFIL CEITEC.

# Zvířecí modely slouží k vývoji nových léků proti rakovině

Luděk Šefc

Preklinické zobrazování malých laboratorních zvířat, především myši a potkanů, slouží k výzkumu a vývoji nových léků proti nádorovým onemocněním, ale třeba i proti neurodegenerativním a dalším chorobám. Existuje celá řada myších modelů všech vážných lidských chorob, a navíc je také možné transplantovat lidské nádorové i jiné buňky získané od pacientů do imunodeficientních myších kmenů a testovat možnou léčbu přímo v živém organismu, aniž bychom ohrozili lidské pacienty. Neinvasivní zobrazování nám na živém zvířeti ukáže jinak neviditelné defekty a změny uvnitř organismu.

Preklinické *in vivo* zobrazování dělíme na anatomické – strukturální, které nám dokáže detailně zobrazit tělesné struktury, např. kosti (CT) nebo měkké tkáně (MRI, ultrazvuk), a rovněž velmi důležité molekulární – funkční zobrazování, které nás upozorní na akumulaci určitých molekul, tzv. kontrastních látek, která souvisí s probíhající nemocí, nebo dokumentuje biodistribuci použitého léčiva a jeho účinek na probíhající onemocnění, např. nádor nebo zánět. Kontrastní látky mohou být



Vysokomolekulární polymer vychtává nežádoucí měď z potravy – SPECT/CT zobrazení myšeho modelu Wilsonovy choroby.

značeny radioizotopem. Tak můžeme sledovat nádory i jejich metastázy pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) nebo jednofotonové výpočetní tomografie (SPECT). Pro co nejmenší radiační zátěž se používají především radioizotopy s krátkým poločasem rozpadu, které z těla rychle zmizí. V současné době také probíhá intenzivní výzkum použití nových digitálních zobrazovacích detektorů, které jsou citlivější a vyžadují výrazně menší dávky použitého radiačního kontrastu, nebo umožňují zkrátit dobu vystavení rentgenovému záření při CT vyšetření a zároveň

lépe rozlišit i měkké tkáně – tzv. spektrální či barevná CT.

Jiný typ molekulárních kontrastů používaný v Centru pokročilého preklinického zobrazování (CAPI) na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy představují paramagnetické nanočástice. Nemají tolik škodlivých účinků jako ionizující záření a umožňují měření s využitím magnetické rezonance (MRI) nebo novou metodou zobrazování magnetických částic (MPI). Další možností je použití fluorescenčních značek, jež po nasvícení silnou fluorescenční lampou vydávají charakteristické světlo, které může být viditelné i v hloubce několika centimetrů. Máme k dispozici i geneticky modifikované buňky nebo organismy využívající enzym světlušek luciferázu, který jim po poskytnutí vhodného substrátu umožňuje vydávat světlo. Fluorescenci i luminiscenci můžeme sledovat za využití optického zobrazovače. Je to rychlé a levné vyšetření a k dispozici je mnoho komerčně dostupných kontrastů. V CAPI byl zprovozněn nedávno vyvinutý zobrazovač na bázi fotoakustického jevu, kdy laserový puls reaguje v tkáni s citlivými molekulami, které zahřeje a vyvolá charakteristickou tlakovou (zvukovou) vlnu zachytitelnou ultrazvukovou sondou. Pomocí fotoakustického zobrazování můžeme detailně studovat tvorbu cév v nádorech, míru oxysolčení tkáně nebo distribuci kontrastem označených a infuzí podaných kmenových buněk.



Vyšetření myši na zobrazovači magnetických částic (MPI).

# Počítačová analýza a vizualizace biomedicínských obrazů

David Svoboda, Michal Kozubek, Zuzana Kubínová, Lucie Kubínová, Milan Ešner

V rámci sdružení Czech-Bioimaging se můžete setkat se službami zaměřenými na *analýzu a vizualizaci biomedicínských obrazových dat* pořízených pomocí různých zobrazovacích metod. Mezi tyto metody patří například optická či elektronová mikroskopie, magneticko-rezonanční zobrazování (MRI), počítačová tomografie (CT), rentgen, ultrazvuk a další. Správnému pochopení obsahu snímku pořízeného výše uvedenými technologiemi ale takřka vždy předchází důkladné předpracování a analýza. Není vůbec výjimkou, kdy data pořízená i na velmi drahých zařízeních jsou na první pohled značně nekvalitní. Úloha předpracování zde spočívá v potlačení šumu, redukci míry rozmazání pomocí **dekonvoluce** či nalezení a odstranění nečistot nebo jiných nežádoucích artefaktů, které jsou pro další analýzu spíše překážkou. Následná obrazová

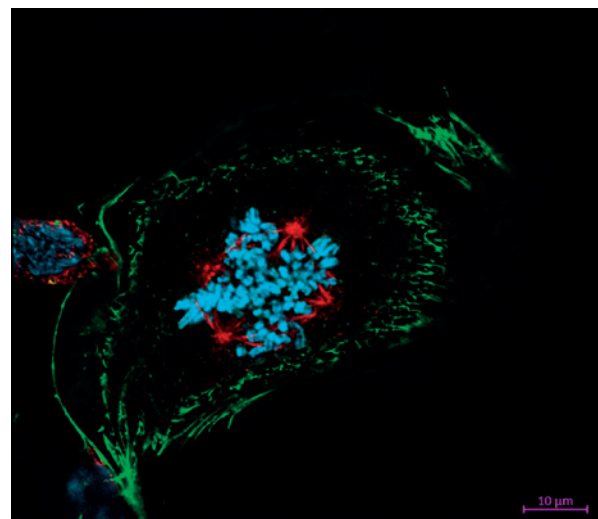
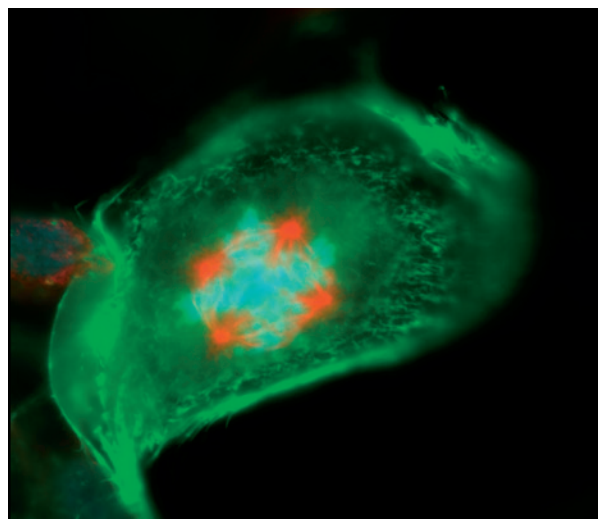
analýza pak umožňuje například lokalizovat zajímavá místa (nalezení zlomeniny v rentgenovém snímku končetiny), provádět měření velikosti sledovaných oblastí (změna velikosti nádoru), **sledování pohybu** (vývoj buněčné populace) nebo evidování počtu vybraných objektů (stav kolonie patogenních bakterií). Neméně důležitou úlohu zde sehrává rovněž vizualizace, která nám upravuje a zprostředkovává obrazová data tak, aby je bylo možné snadno prohlížet a všimnout si důležitých detailů a anomálií. Mnohdy stačí data správně označovat a zajímavá místa zvýraznit tak, aby byly patrné detaily, které jsou předmětem zájmu pozorování či diagnostiky. Nezřídka se k tomu také používají specializovaná zařízení, mezi něž patří například brýle pro **virtuální realitu**. Ty jsou vhodné zejména pro manipulaci s vícerozměrnými daty.

## Dekonvoluce

Principem mitotického dělení je správné rozdělení genetické informace zakódované v DNA do dceřiných buněk. Během mitózy se musí duplikovaná DNA kondenzovaná do chromosomů rovnoměrně rozdělit do dvou dceřiných buněk. Správnou distribuci zajišťují mikrotubuly, které se navážou na jednotlivé chromatidy a přetáhnou vždy jednu chromatidu daného chromosomu na opačnou stranu buňky. V normálním případě mikrotubuly vytvoří vždy dva póly a buňka se dělí na dvě dceřinné. Na přiložených obrázcích můžeme pozorovat abnormální mitotické dělení buňky nádoru

lidského vaječníku, kdy mikrotubuly mateřské buňky vytvářejí čtyři póly a mateřská buňka se připravuje k rozdělení na čtyři dceřiné buňky. Červeně jsou označeny mikrotubuly, zeleně jsou označena aktinová vlákna a modrou barvou je označena DNA.

Obrázek vlevo je nasnímaný na mikroskopu s použitím standardního osvětlení v širokém poli a je zamlžený, protože obsahuje informaci i z nezaostřených částí. Vpravo je stejný obrázek upravený matematickým procesem zvaným dekonvoluce.



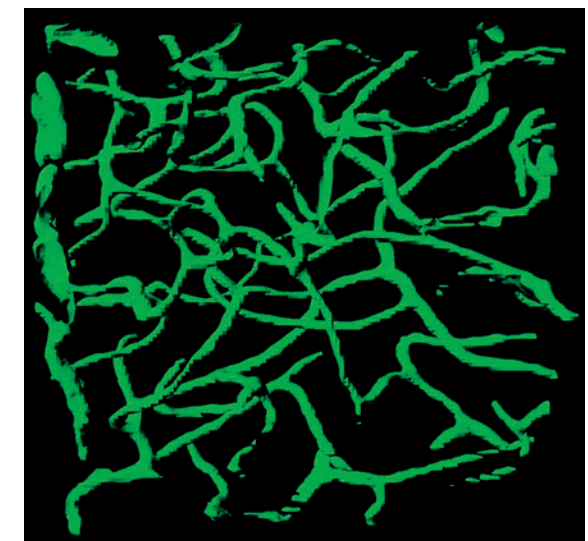
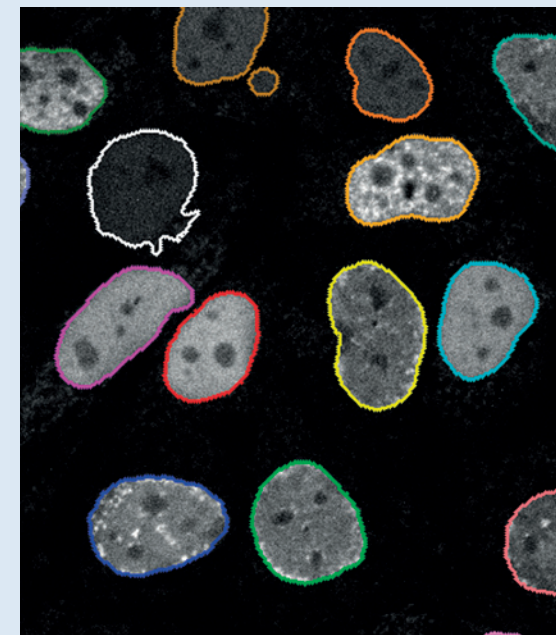
Tématu analýza a vizualizace biomedicínských obrazových dat se v infrastruktuře Czech Bioimaging věnují primárně následující tři výzkumná pracoviště:

- Oddělení biomatematiky, Fyziologický ústav, Akademie věd ČR, v. v. i.  
<https://www.fgu.cas.cz/departments/biomatematika>
- Centrální laboratoř buněčného zobrazování, CEITEC-Masarykova Univerzita  
<https://www.ceitec.cz/centralni-laborator-buncne-zobrazovani/cf119>
- Centrum analýzy biomedicínského obrazu, Fakulta informatiky, Masarykova univerzita  
<https://cbia.fi.muni.cz/research/CzBI.html>

## Sledování pohybu

Abychom dokázali správně rozhodnout, zda se sledovaná živá buněčná populace chová jako zdravá či nemocná, potřebujeme v obrazových datech umět jednotlivé buňky správně identifikovat, vzájemně je oddělit a u každé z nich sledovat její chování.

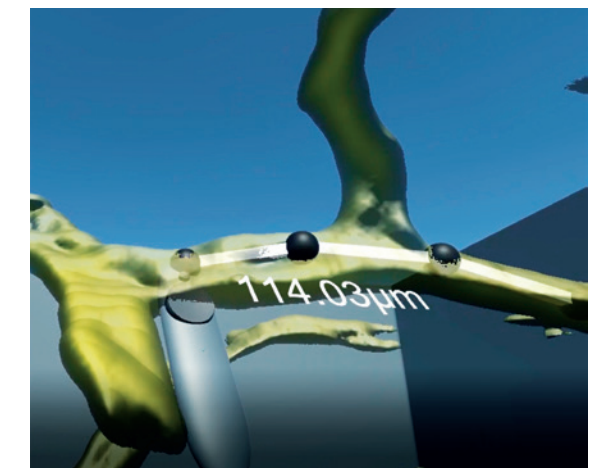
Na přiloženém snímku ze světelného mikroskopu jsou kolem každé buňky pomocí automatizovaného algoritmu vyznačeny její obrysy. Pro jednoznačné odlišení buněk jsou obrysy pro každou buňku barevně unikátní. Ze sledovaného pohybu takto označených buněk, periody jejich dělení a vzájemných interakcí pak již můžeme vyvozovat závěry, které mohou vést k mnohem přesnější diagnostice, než kdybychom pracovali přímo se surovými daty.

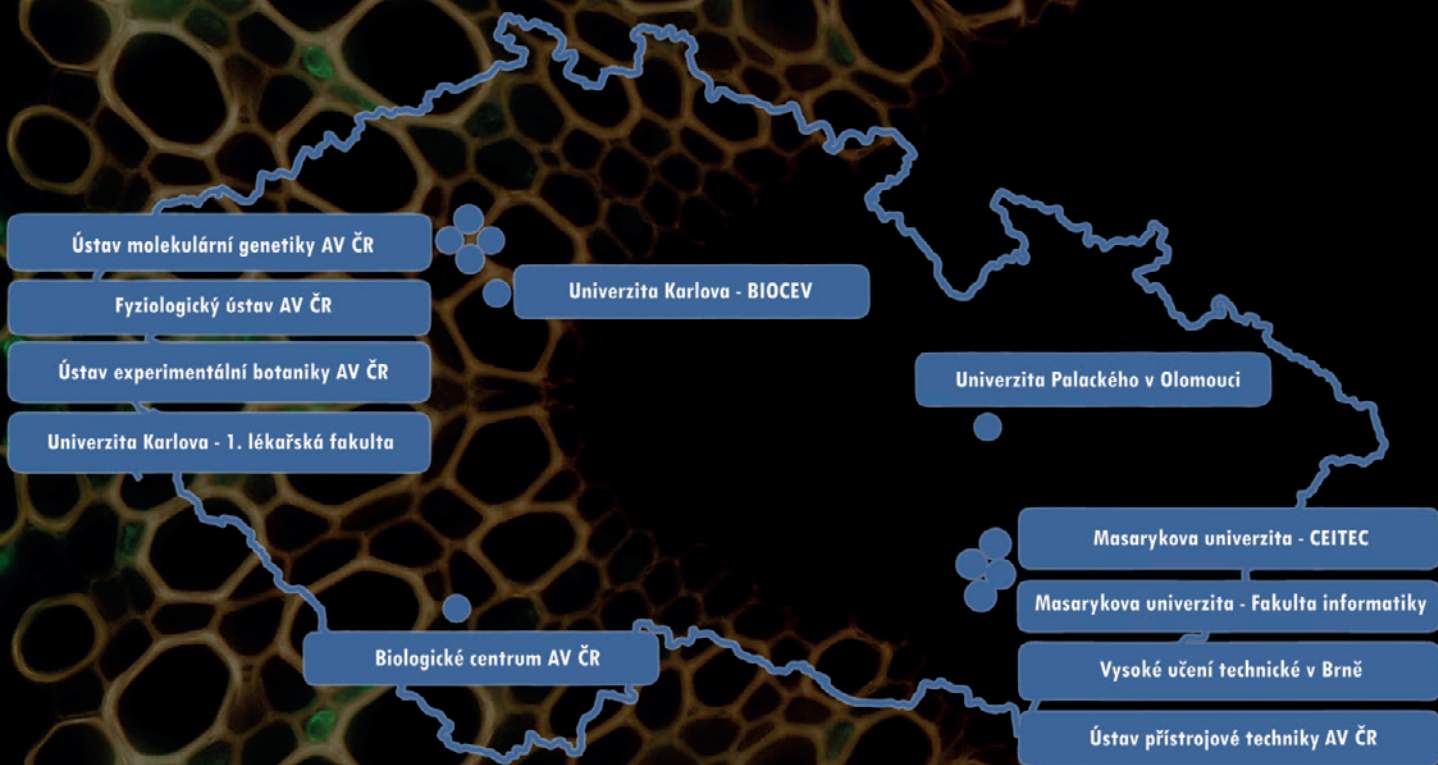


## Virtuální realita

Léčba rakoviny mozku může probíhat ozařováním postižené tkáně protony. Je otázkou, zda přitom nebude nepříznivě ovlivněna okolní zdravá tkáň. Ve vzorku zdravé tkáně na obrázku nahoře, pořízeném pomocí konfokálního mikroskopu, jsou obarvené vlasečnice vyživující mozkové buňky. Virtuální realita nám umožňuje se ve vzorku procházet a zkoumat délku a hustotu vlasečnic, a porovnávat tak vzorky ze zdravých mozků se vzorky z neozařených míst nemocných mozků.

Trojrozměrný obrázek vzorku je virtuálně promítán do prostoru a zároveň je zaznamenávána poloha a natočení speciálních brýlí a ručního ovladače. Podle toho nám počítač do obrazovek v brýlích promítá virtuální obraz. Pomocí ručního ovladače můžeme přímo pohybem ruky označovat měřené struktury ve vzorku (*obrázek dole*). Pohyb přímo ve vzorku umožňuje rychlejší měření než při vyhodnocování sérií obrázků na obrazovce počítače.





# [www.czech-bioimaging.cz](http://www.czech-bioimaging.cz)

Infrastruktura Czech-Bioimaging je v současnosti podporována z několika projektů poskytovaných Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.

Projekty „Národní infrastruktura pro biologické a medicínské zobrazování (Czech-Bioimaging)“ LM2015062 (2016-2019) a LM2018129 (2020-2022) jsou financovány z účelové podpory MŠMT pro velké výzkumné infrastruktury pro výzkum, vývoj a inovace.

Projekty „Modernizace a podpora výzkumných aktivit národní infrastruktury pro biologické a medicínské zobrazování Czech-Bioimaging“, reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001775 (2017-2020) a „Modernizace národní infrastruktury pro biologické a medicínské zobrazování Czech-Bioimaging“, reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/0016045 (2020-2022) jsou realizovány v rámci Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání (OP VVV), které jsou financovány z Evropského fondu pro regionální rozvoj.



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

