

Dalibor Štys : Technické a teoretické aspekty mikroskopie živé buňky

**České vysoké učení technické
Fakulta strojní**

**Czech Technical University in Prague
Faculty of Mechanical Engineering**

Doc. RNDr. Dalibor Štys CSc.

**Technické a teoretické aspekty mikroskopie živé buňky
Technical and Theoretical Aspects of Living Cell Microscopy**

Summary:

The lecture discusses principles of design of the microscope for applications in cell biology. There are discussed major aspects which need to be considered, namely the priority of the biological experiment over the optimisation of the optical setup. Consequently, main attention should be given to information content of the experiment. The biological cell is an asymptotically stable dynamic system, it is sensitive to exact performance of the sample preparation and reproducibility in the standard sense of chemistry and physics can never be achieved. In the lecture is proposed to use the general stochastic systems theory for description of dynamic behavior of living cell. It is given the reasoning why such approach is particularly applicable to the case living cell trajectory and how trajectory segments should be determined.

Next it is described the method of point information gain (PIG) which may serve for general assessment of information content of an image. It is discussed why in the case of structured objects the use of Shannon entropy is not appropriate and why it is necessary to use Rényi entropy as appropriate information measure. Derived are formulas for point information gain entropy (PIE) and point information gain entropy density (PIE/points). These phenomenological variables may be used for mapping of the unknown state space of the dynamic structured object such as living cell, but in principle equally well for any dynamic structured object.

Examples of utilisation of the method in real cell biology microscopy as well as examples on standard distributions are shown.

Further are given examples of potential technical improvements of the microscope for observation of living cell and concept of universal biological microscope is proposed. Such microscope is currently under construction in collaboration with a Czech technology company and by the time of the lecture first experiments will be available. From the proposed design are derived constructions of single-purpose microscopes for specific use in embryology, neurology etc.

Overall approach to microscopic experiment and its analysis is described in articles Štys et al. 2011a and b and Štys et al. 2012.

Shrnutí:

V přednášce jsou diskutovány principy návrhu mikroskopu pro aplikace v buněčné biologii. Jsou diskutovány hlavní problémy, především prioritizace biologického experimentu před optimalizací technického nebo optického uspořádání. Z toho vyplývá důraz, který je nutno klást na posouzení informačního obsahu experimentu. Živá buňka je asymptoticky stabilní systém a její přesný tvar a chování je citlivě závislé na počátečních podmínkách. Reprodukovatelnost ve stejném rozsahu jako v chemickém a fyzikálním experimentu není možno očekávat. V přednášce navrhuji a zdůvodňuji, proč je pro popis živé buňky zvláště vhodná obecná teorie stochastických systémů. Zmiňuji se též o teoretické základně pro stanovení segmentu trajektorie takového systému.

Dále je vysvětlena metoda výpočtu informačního příspěvku jednoho bodu (point information gain, PIG), která umožňuje stanovit informační obsah obrazu. Je vysvětlen způsob odvození této veličiny a zdůvodněno, proč je nutné použít Rényiho entropii jako správné měřítko informace. Odvozeny jsou též vzorce pro entropii informačního příspěvku (point information gain entropy, PIE) a hustotu entropie informačního příspěvku (point information gain entropy density, PIE/points). Tyto fenomenologické proměnné mohou být využity k popisu neznámého stavového prostoru dynamických objektů v živé buňce, ale v zásadě stejně tak dobře k popisu jakéhokoliv dynamického strukturovaného objektu. V přednášce jsou uvedeny příklady využití těchto veličin k popisu reálných živých buněk i standardních objektů známé struktury.

V poslední části jsou uvedeny příklady technických vylepšení mikroskopu pro pozorování živých buněk a je navržen koncept univerzálního biologického mikroskopu. Tento mikroskop je v současnosti konstruován ve spolupráci s českými firmami a v době veřejné přednášky budou k dispozici první výsledky. Z tohoto univerzálního návrhu jsou odvozeny jednoúčelové mikroskopy pro speciální využití v embryologii, neurologii a dalších disciplínách.

Celkový postup mikroskopického experimentu a jeho analýzy jsme popsali v článcích Štys a spol. 2011a a 2011b a Štys a spol. 2012.

„Nevyhnutelnost využívání matematiky vychází zejména z dominantního rozprostranění anorganické (lépe sub-organické) (formy hmoty). Ale pokud jde o zákony, kterými se řídí jiné jevy, zde mají anorganické – mechanické - zákony své analogie v životních projevech. Pouze zprostředkující role matematiky je zde povolena. Analogie je to jediné, co je zde třeba hledat. A využívání matematiky ve vytváření vyšších názorů o životě v přírodě nemá zacházet nad rámec paralelizace zákonů mechaniky se zákony živé přírody a jejich vztahy (s jejich odvozenými vztahy a kvantitativními předpověďmi)... Bylo by ale povznášející, prozkoumat zákony nekonečna pomocí matematiky, plnost a spontaneitu života neudělat nikdy zvykem... Při každém použití matematiky pro paralelizaci je třeba mít na paměti, že matematické symboly se nemají používat jen jako zprostředkující symboly (což se tak často děje), ale že musí být posuzovány v celém duchu svého významu. Tak, jako geometr používá svůj zápis s plnou matematickou korektností a ne jako bezvýznamné hieroglyfy“

G.F. von Buquoy, Idelle Verherrlichung des empirisch erfassten Naturlebens, Breitkopf und Härtel, Leipzig 1822.

Klíčová slova:

Dynamika vývoje živé buňky

Konstrukce mikroskopu

Informační obsah obrazu

Stavová trajektorie

Obecný stochastický systém

Obsah:

1. Mikroskopie živé buňky	7
2. Živá buňka jako kauzální stochastický systém	9
3. Informační příspěvek bodu a entropie informačního příspěvku	13
3.1 Informační příspěvek bodu	13
3.2 Entropie příspěvku informačního bodu	18
4. Experimentální stanovení trajektorie živé buňky	19
5. Konstrukce mikroskopu pro studium kultury živých buněk	23
6. Poděkování	26
7. Citovaná literatura	27
Dodatek č. 1 Vybrané pojmy obecné teorie systémů	30
Životopis	35

1. Mikroskopické sledování živých buněk z vyšších organismů

Výzkum na izolovaných buňkách z vyšších organismů, buněčných monovrstvách a tkáňových kulturách je klíčový pro základní poznání v biologii i praktickou medicínu. Pokud bychom byli schopni, například, na základě histologicky odebraného vzorku posoudit biokompatibilitu buněčného implantátu, či vhodnost jednotlivého chemoterapeutika pro potlačení určitého nádoru, medicína by se výrazně zefektivnila, zlevnila a stala se přístupnější. Vztah mezi chováním buňky v tkáni (in vivo) a živě izolované buňky (ex vivo) není dobře prozkoumán. V každém případě není pochyb o tom, že buňka izolovaná z příslušné tkáně nebo orgánu je nejlepším modelem původní tkáně, s níž je možno bez problémů experimentovat.

Z technického pohledu si výzkum na živých buňkách izolovaných z organismů klade za úkol pozorování buněk s dostatečným prostorovým rozlišením v živém stavu a analýzu jejich dynamického chování a dynamiky jejich složek. Veškeré experimenty se odvíjejí od požadavků na kultivační podmínky. Ty jsou zvláště náročné, pokud jde o somatické buňky odvozené z živočišných, například savčích, tkání. Takto připravené buňky jsou kriticky citlivé na zacházení. Proto se s nimi většinou pracuje v kultivačních komorách. Ty mnohdy znemožňují používání objektivů s vysokou rozlišovací schopností, maximální dostupná zvětšení bývají 20x – 40x. Z toho důvodu řada detailů nebývá rozlišitelná běžnými optickými mikroskopickými technikami.

Ze striktně fyzikálního hlediska pojem rozlišení musí být vztažen k faktu, že bod v původním objektu je optickým systémem přenášen jako skupina bodů ve výsledném obraze. Funkce přenosu informace systémem se nazývá point spread function (PSF), česky nejspíše funkce rozmítání bodu (Airy 1835, Braat a spol. 2008). Pro izolované a dostatečně vzdálené body lze definovat minimální vzdálenost mezi nimi, v níž je možno body rozlišit. Detaily a praktický rozbor problému založený na experimentu uvádíme v práci Náhlík a spol. (zasláno). V zobrazeních reálných vzorků jsou všechny body původního objektu reprezentovány, ale ve výsledné reprezentaci jsou smíšeny způsobem, který nelze jednoduše rozdělit na reprezentace jednotlivých objektů. Navrhli jsme, jak použít tuto informaci pro sledování dynamického chování živé buňky (Štys a spol. 2011a). Při použití standardního kamerového čipu se třemi barevnými kanály tak dostáváme unikátní kombinaci reprezentací na každém bodu kamery. Analýza této informace rozkladem na jednotlivé příspěvky prostřednictvím známé PSF je v případě živé buňky prakticky nemožná, protože jednotlivé objekty, které přispívají k vytvoření obrazu, jsou u sebe velmi blízko a nemají charakter hmotných bodů. Přehlednou analýzu problému pro nejběžnější typ optického kontrastování – fázový kontrast – a důsledky pro snímání digitální kamerou jsme zpracovali v článku Náhlík a spol. (zasláno).

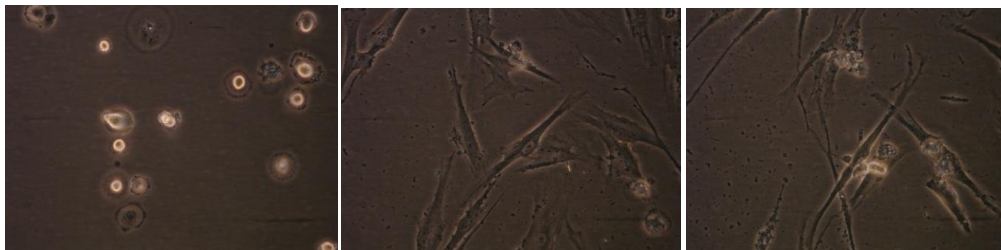
Živé buňky se navíc významně liší ve strukturních detailech, takže nelze jednoduše využít vyhledávání opakujících se podobných tvarů - patterns. Řadu tvarů objektů experimentátor i v mikroskopii s nejvyšším rozlišením

do značené míry odhaduje, například, ze série následujících snímků (Lichtscheidl a Foissner 1996). Je to možné proto, že se objekty navzájem podobají do té míry, že mozek je přirozeně reprezentuje jako podobné objekty. Je ale velmi těžké takové pozorování algoritmizovat, většina dostupných softwarů selhává při rozpoznávání i jen jednotlivých somatických buněk v kultuře.

Problém je z praktického pohledu možno rozdělit na tyto dílčí kroky

- 1) Reprodukovatelná příprava a kultivace buněčné kultury
- 2) Reprodukovatelné provedení mikroskopického experimentu
- 3) Správný způsob analýzy dynamického chování živé buňky na základě její reprezentace mikroskopem

První problém, reprodukovatelná příprava buněčné kultury, se nejspíše vždy bude vymykat pojmu reprodukovatelnosti tak, jak je chápán ve fyzice nebo chemii. Je tomu tak proto, že buňky jsou typické materiální projevy chování nelineárních dynamických systémů, jsou to asymptoticky stabilní objekty (Cvitanovič a spol. 2009). Obrazy jednotlivých buněk i buněčných kultur proto nebudou stejné, ale určitým způsobem si navzájem podobné. Právě získání měřítka podobnosti je jedním z výsledků, které budou v tomto textu diskutovány. Čím více buněk najednou pozorujeme, tím blíže se můžeme dostat ke „standardnímu“ statistickému popisu experimentu. V typickém experimentu pozorujeme maximálně několik desítek buněk (Obr. 1). Pro jakýkoliv detailnější popis stavu buněčné kultury musíme hledat popis buňky jako dynamického systému.



Obrázek 1 Příklad záznamu vývoje buněčné monovrstvy z buněk izolovaných z lidské kostní tkáně. Zleva doprava se jedná o 12., 700. a 1430. minutu záznamu. Záznam ukazuje základní problémy při využití této metody – experiment trvá velmi dlouho a scéna se v jeho průběhu zásadně nemění. Neboli množství nové informace je zdánlivě malé. Buňky ale mají velmi rychlou vnitřní dynamiku, která je obtížně zachytitelná i kamerami s poměrně vysokou frekvencí (např. videokamera s frekvencí $25s^{-1}$). Již s touto frekvencí vzniká takové množství dat, že jejich analýza je dostupnými metodami, vesměs s využitím lidské expertní práce, nereálná. Je nutno vypracovat metodu automatické klasifikace stavu buněk.

Druhý problém je předmětem konstrukce mikroskopu – návrh, k němuž jsme se dopracovali a na jehož základě je v současné době konstruován biologický sub-mikroskop – nanoskop, budu diskutovat v poslední kapitole této přednášky. Pro tento návrh jsme museli nejdříve pochopit, co vlastně lze na živé buňce měřit a jak měřené jevy interpretovat, což je obsahem třetího problému.

Jak se ale ukázalo, problémy od sebe není možno oddělit.

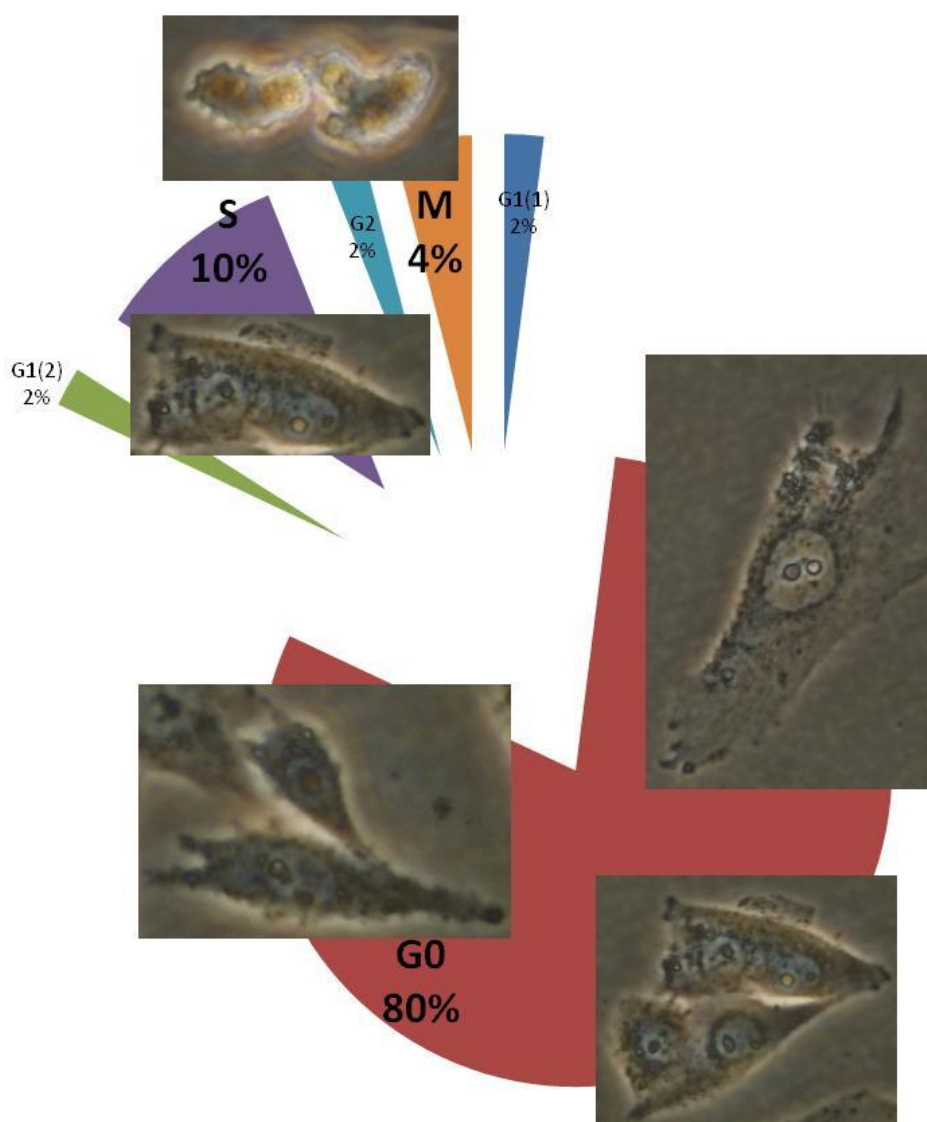
2. Živá buňka jako kauzální stochastický systém

Obecnou teorii systémů vhodnou pro popis studovaného problému vypracoval prof. Žampa z Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity (Žampa 2004). Teorie byla původně vyvinuta pro měřitelné technické systémy. Stav systému je definován ve vztahu k jeho měřitelnosti, zohledňuje fakt, že systémový čas je uspořádaná množina hodnot času t_i . Měřené veličiny z množiny veličin V jsou pouze měřítkem či reprezentací atributů systému z množiny atributů A můžeme je měřit jen s konečnou přesností. Trajektorie systému se skládá ze segmentů, což je taková množina hodnot času a atributů (veličin) systému, která umožní kauzálně, i když jen stochasticky, předpovědět jeho budoucí chování. Segment trajektorie se tedy skládá z množiny atributů systému příslušných jednomu nebo několika časům předcházejících času, který uvažujeme – *příčinu* a ze sady atributů v čase uvažovaném – *následku*. Podle obecné teorie systémů můžeme vždy zvolit takové množství atributů, které učiní pravděpodobnost systému nezávislou na historii. Segment trajektorie je pak z hlediska statistického chování Markovovský.

Podle původní teorie je předpověď chování systému pouze stochastická zejména z toho důvodu, že měření má pouze konečnou přesnost a měříme pouze v diskrétních časech. Deterministický systém s kontinuálním časem je pouze speciálním případem stochastického systému. (V principu, podle pravidel kvantové mechaniky, ale není nekonečná přesnost dosažitelná. Limituje ji princip neurčitosti (Heisenberg 1927, nedávná formulace relevantní pro tuto diskusi Bialynicky-Birula 2006).) Trajektorii systému tvoří sekvence segmentů, kdy každému z nich lze přiřadit určitou pravděpodobnost. Z nich lze vypočítat pravděpodobnost příslušné trajektorie. Vhodnou skupinu trajektorií nazveme *jevem*. (Detaily matematického popisu jsou v dodatku č. 1).

Cílem sledování živých buněk je jejich využití pro výzkum a medicínskou či veterinární diagnostiku. V biologii se stav živé buňky vztahuje zejména k různým stádiím buněčného cyklu. V základní učebnici (Alberts a spol. 2009) se buněčný cyklus definuje jako postupná sekvence událostí, v jejímž průběhu buňka zdvojí svůj obsah a pak se rozdělí na dvě. Buněčné cykly se liší mezi organismy i mezi typy buněk. Některé charakteristiky musí ale být zachovány, například přesná duplikace DNA, chromozómů, organel, synchronizace mezi buněčným růstem a rychlost dělení apod.

Buněčnému cyklu je z praktických důvodů v biologii věnována zásadní pozornost. Konstatovalo se, že u většiny heterotrofních eukaryot, od kvasinky až po člověka, jsou zásadní fáze buněčného cyklu a řídicí mechanismy stejné. Schématicky je to naznačeno na Obr. č. 2.



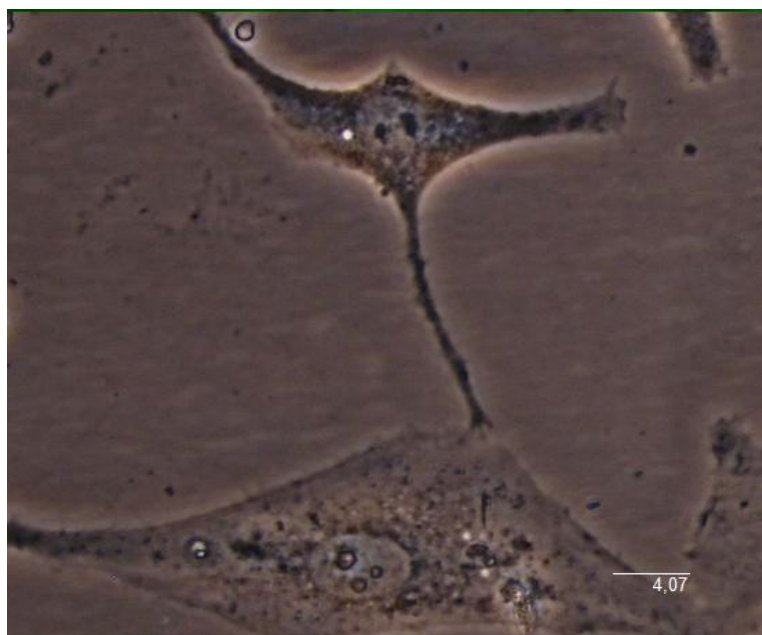
Obrázek 2 Schéma experimentálně pozorovaných fází buněčného cyklu pro buněčnou linii kostních rakovinných buněk Mg63. Standardní buněčná biologie se zabývá zejména vlastním buněčným cyklem. Rozeznává v něm fáze G1, kdy se buňka rozhoduje, zda proběhne buněčné dělení, nebo zda buňka vstoupí do G0 fáze, v níž se dlouhodobě nedělí. Dále následuje S fáze, v níž se duplikuje buněčný obsah, G2 fáze, v níž se rozhoduje o času dělení, M fáze – mitóza, v níž dojde k dělení a návrat do G1 fáze. Mitózu pak lze rozložit opět na několik konsenzuálních stádií. Schéma navozuje představu, že buněčný cyklus má nějakou typickou dobu. Pomocí námi vyvinutého software Cells (Levitner a spol. 2010) jsme byli schopni objektivně vyhodnotit dobu trvání a počty jednotlivých jevů buněčného cyklu. Jediným závěrem bylo, že žádné typické hodnoty nelze nalézt. Software, zejména jeho navazující verze, se však významně uplatnil při vytváření ontologie buněčných stavů. Zde se uplatňuje

především jako komunikační a klasifikační nástroj při interakcích mezi biologií a informatikou.

V realitě pozorování neovlivněných živých buněk je většina buněk v G0 fázi, od níž je rozpoznatelné pouze konečné stádium S fáze, kdy již proběhlo oddělení jader dvou budoucích buněk. Také mitózu lze málokdy klasifikovat do konsenzuálně přijatých stádií, vesměs lze sledovat velké množství různých struktur. Obecně lze říci, že když už buněčné dělení nastane, až na naprosté výjimky proběhne až do konce, vzniku dvou buněk v (z pohledu buněčného biologa) v G0 fázi.

Pro diagnostiku nad rámec zjištění, zda se buňka dělí či naopak zemře, je sledování pouhého buněčného dělení nedostatečné. Potřebujeme vědět, jak se buňky budou chovat po integraci do tkáně (v případě studia léčiv či implantátů), zda se dělí odlišně než zdravá tkáň, například rychleji nebo jinak anomálně (v případě nádorových buněk) a podobně. Popularita a úspěch sledování buněčného dělení jako takového spočívá v jeho uchopitelnosti, jakmile nastane, je dobře reprodukovatelné. Řízení procesu je zdánlivě deterministické a jeho stav lze sledovat monitorováním hladin řídicích proteinů, cyklinů. Ty lze označit fluorescenčně, například různými chemickými značkami (na chemicky modifikovaných buňkách), ale v poslední době zejména expresí fúzního proteinu s různými fluorescenčními proteiny. To je realizováno tak, že se ke genu kódujícímu daný protein připojí gen pro fluoreskující protein medúzy (Day a Davidson 2009, Shimomura, Chalfie a Tsien 2008). Tím se jasně určí, v jakém stádiu buněčného cyklu buňka je, vzniklé mikroskopické obrázky jsou poměrně jednoduché, je možno je do značné míry analyzovat automaticky.

Odpověď na otázku, co buněčný cyklus spouští, co spustí produkci cyklinů a dalších proteinů v mitotické fázi buněčného cyklu, není jasná. Jsou známy proteiny přítomné v mezibuněčném prostoru zvané mitogeny, které stimulují dělení buněk. Buňky si ale prokazatelně vyměňují informace i – při integraci do tkáně zejména – prostřednictvím transportu hmoty pomocí kanálků (Obr. 3) .



Obrázek 3 Výměna informace mezi dvěma buňkami monovrstvy kultury HeLa buněk (buněk rakoviny lidského vaječníku) prostřednictvím pseudopodia. Při analýze časového záznamu je možno sledovat jednotlivé „balíčky“ hmoty transportované mezi buňkami (Štys a spol. 2011a). Obsah těchto objektů, nejspíše lipidových váčků, které mohou nést například signální proteiny, signální metabolity nebo nukleové kyseliny, není znám.

Nemáme tedy k dispozici žádný jednoduchý řídicí signál, který bychom mohli sledovat. Musíme se orientovat na pozorování stavu buňky jako systému. Howard a spol. (2001) ukázali, že v buňce bakterie *Escherichia coli* probíhají oscilace proteinů MinD. O nich bylo známo, že jejich vyřazení vede k poruchám buněčného cyklu. Při prodlužování buňky se frekvence oscilace po určitou dobu prodlužuje, po dosažení limitu se buňka začne dělit. To je v souladu s představou Kaneka (2006), ale ve skutečnosti již s mnohem starší představou Prigogina (např. Nicolis a Prigogine 1977), že živé organismy jsou asymptoticky stabilní struktury. Po dobu, po níž byly parametry cyklu oscilací v buňce v mezích splňujících rámec jednoho asymptoticky stabilního cyklu, chovala se buňka jako jeden celek. Jakmile byla překročena maximální délka buňky, bylo zahájeno dělení. Schwille a spol. potvrdili tuto představu i experimentem in vitro, kde Min protein navázali na membránu upevněnou na skleněný povrch (Loose a spol. 2008). Pozorovali vznik putujících vln podobný jako u Bělousovovy-Žabotinského reakce (Bělousov 1956).

Zdá se tedy, že stav buňky by mohly charakterizovat dynamické struktury, které se v buňce opakovaně vyskytují. Řada vědců se snaží tyto jevy poslat jako analogie limitních cyklů či spíše složitějších asymptoticky stabilních objektů, chaotických atraktorů (Kaneko 2006). Přejít do jiného stavu bude způsoben takovou změnou parametrů, která povede na kvalitativně jiný asymptoticky stabilní objekt. Z pohledu interpretace experimentu je třeba nalézt takovou charakteristiku živé buňky, která určuje její makroskopickou strukturu a tuto s dostatečným časovým

rozlišením měřit. Musíme nalézt takový matematický popis, který je kvalitativně podobný chování buňky. Zdá, že jednou takovou možnou strukturou je chaotický atraktor. Diskuse v této práci vychází z předpokladu, že asymptotická stabilita živé buňky je založena na takové organizaci buněčných metabolických a signálních drah že vedou na chaotický atraktor.

Cílem konstrukce modelu je ujasnit si, jakou veličinu bychom měli měřit a jakou metodou. Nejstudovanějším asymptoticky stabilním objektem je Lorenzův atraktor (Lorenz 1963). Lorenzův atraktor je popsán rovnicemi

$$\dot{x} = v(x) = \begin{pmatrix} \dot{x} \\ \dot{y} \\ \dot{z} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sigma(x - y) \\ \mu x - y - xz \\ xy - bz \end{pmatrix} \quad (1)$$

Jedná se o radikálně zjednodušený model chování Raleyigh - Bénardovy cely (Raleyigh 1916). Proměnné x , y a z jsou jednoduchými transformacemi původního Saltzmannova popisu oscilující konvekce s konečnou amplitudou (Saltzmann 1962). U Saltzmannova X byla intenzita konvektivního pohybu, Y je úměrné rozdílu teplot přitékajícího a odtékajícího proudu a Z úměrná odchylce vertikálního teplotního profilu od linearity. V Lorenzově vyjádření $x = X$, $y = Y$ a $z = Z - \sigma - \mu$ kde σ a μ jsou koeficienty v rovnicích Lorenzova atraktoru. Tyto koeficienty jsou odvozeny z charakteristik toku, jedná se o Raleyighovo a Prandtlovo číslo. Podstatné pro další diskusi je, že se jedná o makroskopické proměnné stejného typu jako je frekvence oscilací v bakteriální buňce u Howarda a spol. (2001) nebo délka, tvar a rychlost postupujících vln u Loose a spol. 2008.

Současná systémová biologie využívá vesměs modely založené na principech modelování metabolických drah (např. Karp a spol. 2010, Waltermann a Klipp 2011). Koeficienty – z chemického hlediska rychlostní a rovnovážné konstanty - které tyto modely obsahují, pocházejí vesměs z biochemických experimentů ve zředěných roztocích. Opakovaně se ukázalo, že tyto výsledky mohou být velmi daleko od reality v živé buňce. Zejména ale je nejspíše problematické ztotožnění koncentrací metabolitů a proteinů s proměnnými charakterizujícími asymptoticky stabilní stav živé buňky. Pokud si uvědomíme, že je třeba studovat struktury tvořené více látkami a jejich dynamiku, přestává být problémem i fakt, že v mikroskopu vidíme jen jejich reprezentaci. Důležité je nalézt měřítko jímž je možné pozorované struktury měřit, nazvěme ho například mírou strukturovanosti objektu.

3. Informační příspěvek bodu a entropie informačního příspěvku

3.1 Informační příspěvek bodu – transformace jednoho obrazu

Pro zjištění informačního obsahu jednotlivého bodu na snímku jsme vyvinuli metodu informačního příspěvku jednoho bodu. Na počátku byla jednoduchá úvaha vycházející ze Shannonovy teorie informace (Shannon 1948). Pro Shannonovu entropii S platí vztah

$$S = \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i \quad (2)$$

Kde p_i je pravděpodobnost i -tého jevu a n je počet jevů. Pro nalezení informačního příspěvku obrazového bodu jsme za pravděpodobnost považovali relativní počet výskytů dané intenzity v obraze. Shannonovu entropii jsme spočítali pro rozdělení pravděpodobnosti se započtením a bez započtení uvažovaného bodu. Rozdíl těchto dvou hodnot dává informační přínos daného bodu, point information gain, FIG.

Problémem tohoto přístupu je fakt, že výskyty intenzit nemají normální rozdělení a proto Shannonovu entropii není zcela oprávněné použít. Z mnoha měř informace používaných pro jiná než normální rozdělení jsme zvolili Rényiho entropii (Rényi 1956).

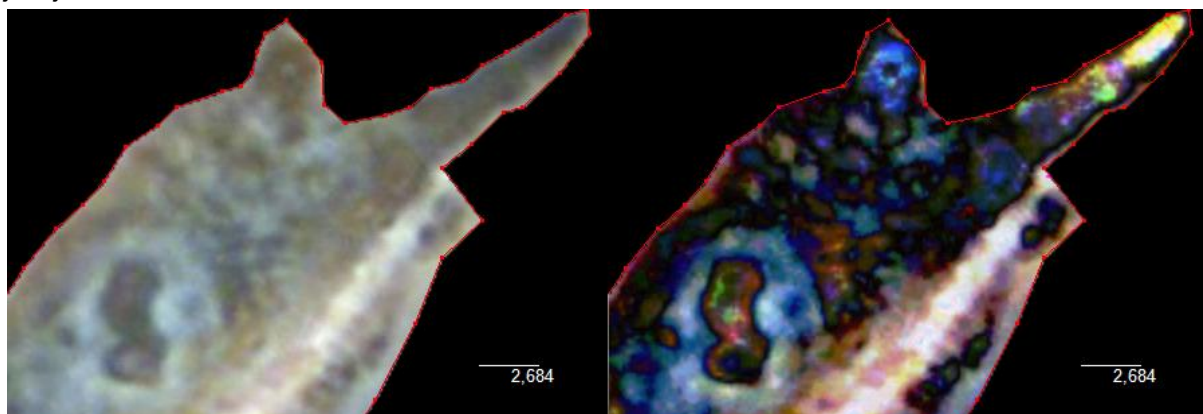
$$I_\alpha = \frac{1}{1-\alpha} \log_2 \sum_{i=1}^n p_i^\alpha \quad (3)$$

Kde α je koeficient, který má vztah k rozdělení pravděpodobnosti jevu. Theiler (1990) shrnuje, jaký má výběr koeficientu α vztah k obecné dimenzi prostoru D_α , pro nějž platí

$$D_\alpha = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{I_\alpha}{-\log r} \quad (4)$$

kde r je použité měřítko (Theiler 1990).

Při praktické aplikaci této metody jsme získali transformovaný obraz tak, jak je uveden na obr. 4.



Obrázek 4 Srovnání zobrazení buněk Mg63 pomocí fázového kontrastu (levý panel) s jeho obrazem transformovaným pomocí PIG jako $\Delta I_{x,y,1,5}$ (pravý panel). Pseudobarvy pocházejí z různé závislosti indexu lomu na vlnové délce – v případě fázového kontrastu – nebo z kombinace informačních příspěvků v jednotlivých barevných kanálech – v obraze transformovaném pomocí PIG.

Pro informační příspěvek jednoho bodu $\Delta I_{x,y,\alpha}$, FIG, pak platí vzorec

$$\Delta I_{x,y,\alpha} = I_\alpha - I_{x,y,\alpha} \quad (5)$$

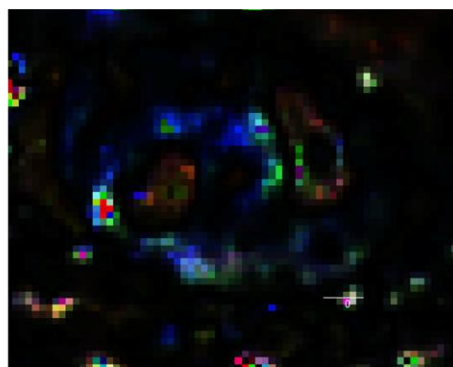
kde I_α a $I_{x,y,\alpha}$ jsou příslušná Rényiho entropie celého snímku a snímku s vynechaným posuzovaným bodem. Transformace obrazu z reprezentace pomocí původních intenzit do reprezentace pomocí PIG je sama o sobě velkým přínosem pro analýzu mikroskopického obrazu, ale i analýzu obrazu obecně (Urban a spol. 2009, Štys a spol. 2011a, Štys a spol. 2011b, Štys a spol. 2012). Na obr. 5 jsou zobrazeny obrazy transformované pro některé typické hodnoty α v porovnání s původním

obrázkem z fázového kontrastu. Na obr. 6 pak průběhy závislosti počtu bodů o daném PIG - $\Delta I_{x,y,\alpha}$ na $\Delta I_{x,y,\alpha}$. Je zřejmé, že nízké hodnoty koeficientu α zvýrazňují vzácné body, naopak α větší než 1 je potlačuje. Typickou vlastností obrazů transformovaných pomocí PIG je zvýraznění hranic objektů a zvýšení rozlišení jejich struktury pomocí pseudobarev. Zde je třeba si uvědomit, že fakticky každé zobrazení mikroskopem v průchodu světla je zobrazením v „pseudobarevách“ z pohledu standardní fotografie se záznamem na barevný film. Mikroskopický obraz je tvořen především rozptylem na hranicích objektů různého indexu lomu. Například fázový kontrast, použitý v obr. 4 a 5, je založen na kombinaci rozptylu světla a zpoždění, které vzniká při průchodu světla prostředím o různém indexu lomu. Experimentální analýzu funkce rozmítání bodu (PSF) a využití transformace obrazu pomocí PIE pro objektivizaci zaostření mikroskopu jsme popsali v nedávné práci (Náhlík a spol. zasláno). Při počtech obrázků získaných v typickém experimentu časosběrné mikroskopie, což jsou běžně tisíce až desetitisíce obrázků obsahujících desítky až stovky jednotlivých buněk, je nepředstavitelné, že by se výsledky detailněji interpretovaly ručním zpracováním. Přesto je to převažující styl práce v laboratořích buněčné biologie. Důvodem jsou zejména problémy s automatickým zpracováním obrazu, kdy identifikace buněk i dalších objektů ve větších scénách je zatím nevyřešeným problémem. Teprve v dalším kroku nastupuje analýza vnitřních struktur. Uspořádáme-li následující snímky do filmu, lidský mozek dokáže následné objekty integrovat a tím detekovat. To zákonitě vede k subjektivnímu výběru studovaných objektů. V této práci jsou diskutovány výsledky semiautomatického přístupu, kdy jsme jednotlivé buňky označovali ručně a zkoumali vhodnost transformace pomocí PIG pro jednoznačnou klasifikaci jejich stavů. Plně automatizovaný přístup je nejspíše v současné době mimo technické možnosti současné mikroskopie, jak budu diskutovat v kapitole 4.

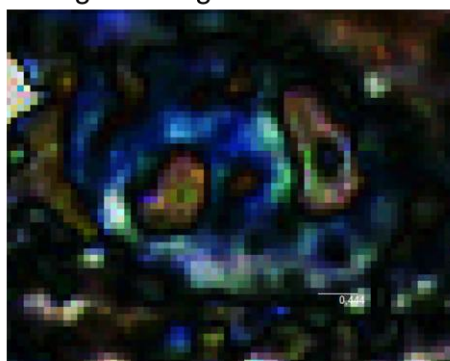
V každém případě má metoda transformace pomocí PIG velký praktický význam. Ne vždy je totiž dostupné jednoduché, například fluorescenční, barvení buněk. Navíc se při takovém barvení sleduje jen jeden jev a ostatní se zanedbávají. Pokud se tedy podaří jednotlivé jevy klasifikovat, získá se komplexní informace o organelách a jejich stavech v neovlivněných buňkách (Štys a spol. 2011 b).



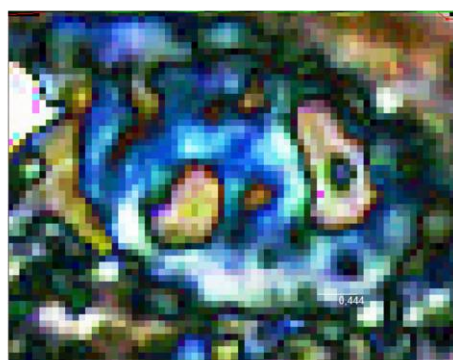
Original image



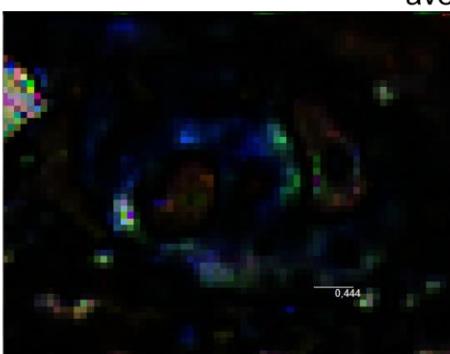
$\alpha = 0,1$ (block counting)



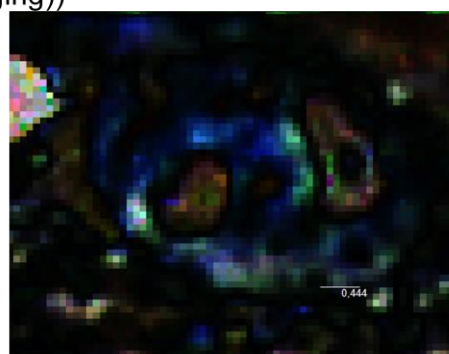
$\alpha = 1,0$ (Shannon entropy, geometric averaging)



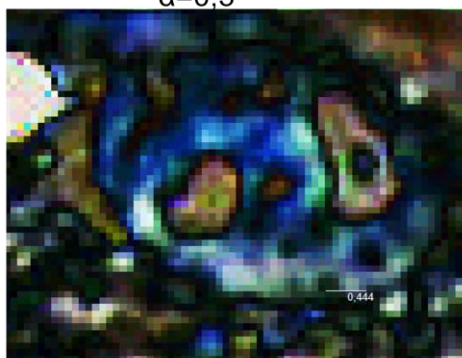
$\alpha = 2,0$ (arithmetic averaging))



$\alpha = 0,3$



$\alpha = 0,7$

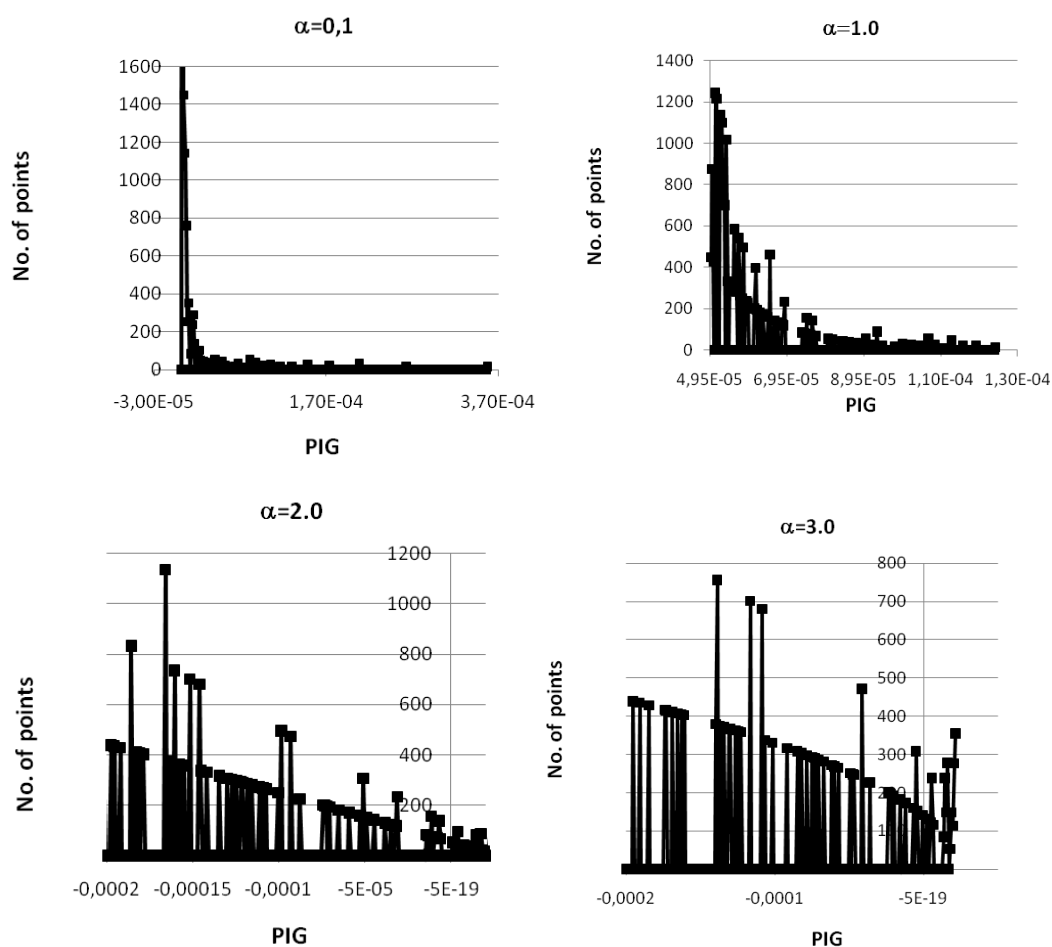


$\alpha = 1,3$



3,0 (cubic averaging)

Obrázek 5 Detail původního obrázku získaného metodou fázového kontrastu a vybrané typické transformace PIG. Zobrazen je výřez obrázku buněk HeLa v oblasti buněčného jádra. Při velmi nízkých hodnotách α jsou zdůrazněny vzácné body. Z praktického hlediska je důležitá možnost vynechat některé velmi vzácné body. Ty bývají často způsobeny, například vadami kamerového čipu, a neodrážejí žádné vlastnosti sledovaného objektu, zato však deformují rozdělení hladin PIG. Tuto vlastnost jsme do software implementovali po rozsáhlém testování v poslední době.



Obrázek 6 Vybrané závislosti počtu bodů na hodnotě PIG pro různé hodnoty α . Závislost počtu bodů na hodnotě PIG je z principu vždy hladká křivka. Pro Gaussovo rozdělení je rozdělení hodnot PIG po ose x rovnoměrné pro $\alpha=1$. Pro $\alpha=2$ a Gaussovo rozdělení je naopak závislost počtu bodů na PIG lineární. Z reálných závislostí je tak možno jednoduše zjistit, jak se studované rozdělení pravděpodobností liší od rozdělení normálního. Body, které vybočují z hladké křivky, jsou součty výskytů pro dvě nebo více reálných hodnot PIG. Tento jev je způsoben redukcí počtu hladin na 256 pro zobrazení pomocí počítače. V reálném experimentu se tato redukce objevuje hned dvakrát. Poprvé při kompresi obrazu při snímání kamerou, podruhé při výpočtu PIG.

3.2 Entropie příspěvku informačního bodu jako jednoznačná metoda klasifikace struktury objektu a stanovení experimentální stavové trajektorie živé buňky

Z hodnoty informačního příspěvku jednoho bodu je možno spočítat dvě veličiny charakterizující celý objekt.

$$\Delta I_{\alpha} = \sum_{x=1}^{x=n} \sum_{y=1}^{y=m} \Delta I_{x,y,\alpha} \quad (6)$$

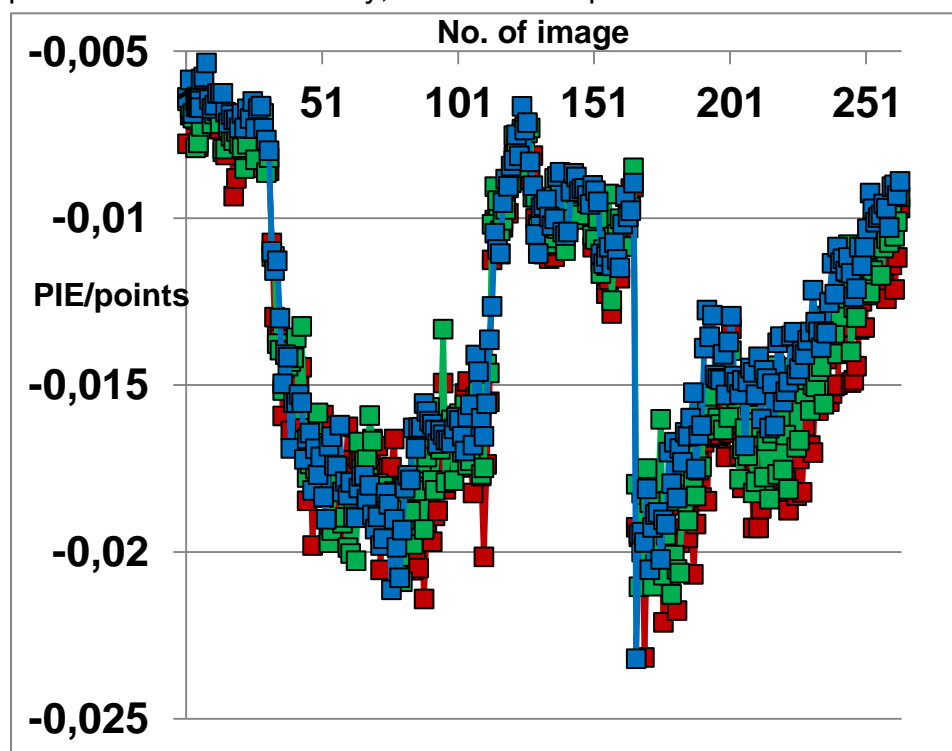
kteřou jsme nazvali entropií příspěvku informačního bodu (point information gain entropy, PIE) a kdy sčítáme informační příspěvky všech jednotlivých bodů. Hodnoty n a m jsou rozsahy bodů v obraze.

Případně můžeme sčítat jen přes hodnoty entropií pro jednotlivé nalezené hladiny entropie l

$$\Delta I_{\alpha,r} = \sum_{l=0}^{l=\maxlevel} \Delta I_{x,y,\alpha,l} \quad (7)$$

čímž získáme veličinu, kterou jsme nazvali hustotou entropie příspěvku informačního bodu (PIE/points). Obě veličiny je možno použít jako měřítko stavu objektu.

Obrázek 7 ukazuje, jak se hodnota PIE/points pro vybrané hodnoty α vyvíjí po 262 minut života buňky, během nichž proběhlo buněčné dělení.

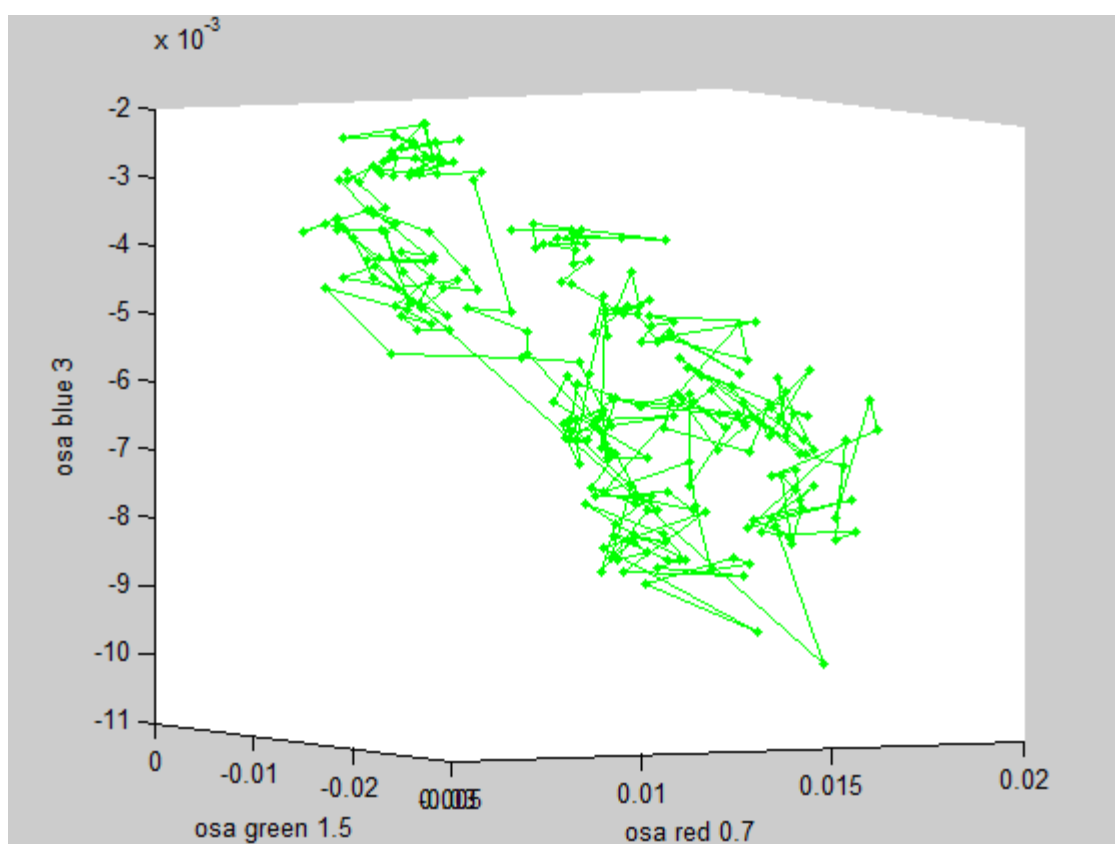


Obrázek 7 Závislost hodnoty PIE/points pro $\alpha = 1.5$ pro jednotlivou buňku Mg63 ve třech barevných kanálech. Jedná se o stejnou buňku jako na obrázku 4. Je patrné, že obraz buňky se v čase vyvíjí do několika objektů s podobnou hodnotou PIE/points.

Máme tedy k dispozici sadu proměnných, které odrážejí strukturu objektu. V optimálním případě bychom znali všechny obecné dimenze daného objektu a zvolili parametr α tak, aby vzniklé hodnoty PIG, PIE, respektive PIE/points pokrývaly správně a kompletně strukturu pozorovaného

objektu. Taková sada je pak unikátním identifikátorem daného obrázku, identifikuje ho ve vícerozměrném prostoru. V dalším textu budu předpokládat, že náhodně vybraná sada parametrů α dostatečně reprezentuje fázový prostor a že na základě takto vzniklých souřadnic můžeme studovat trajektorii živé buňky ve fázovém prostoru alespoň v rámci jednoho experimentu (viz obr. 8).

Podrobnější úvahy o identifikaci mezi skutečným fázovým prostorem pozorovaného asymptoticky stabilního objektu jevícího prvky samoorganizace jsme publikovali v článku ve sborníku Sixth International Workshop on Self-Organising Systems (Štys a spol. 2012). Do tohoto textu se bohužel nevešly.

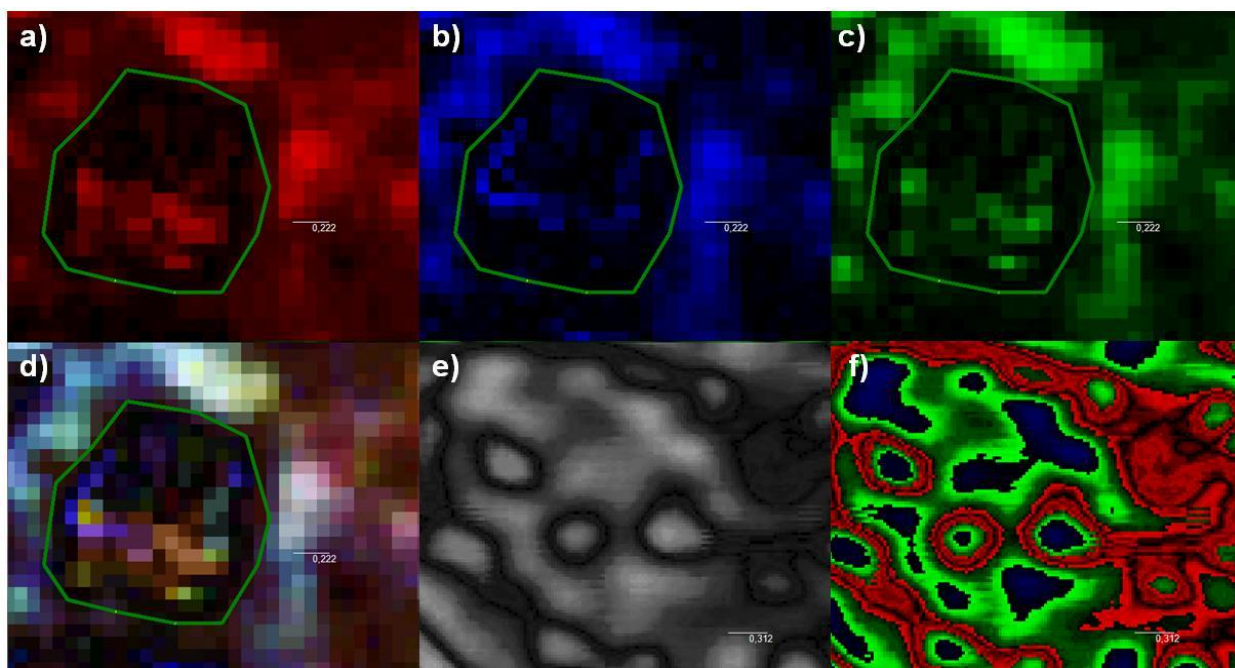


Obrázek 8 Stavová trajektorie buňky Mg63 v souřadnicích PIE/points ($\Delta I_{\alpha,r}$) $\alpha=0,7$ v červeném kanálu, $\alpha=1,5$ v zeleném kanálu a $\alpha=3$ v modrém kanálu. Jednotlivé stavy buňky jsou jasně oddělené a hodnoty se jasně shlukují. Shluky je možno považovat za jednotlivé, objektivně nalezené, stavy buňky.

4. Experimentální stanovení trajektorie živé buňky

Mnohem složitější je otázka srovnávání výsledků mezi sebou. Její řešení ale musí být cílem výzkumu dynamiky živé buňky, pokud ji někdy máme být schopni využít pro diagnostiku. Z předchozího rozboru je patrné, že

provedení experimentu a objektivní analýzu dat není možné oddělit. Při praktické aplikaci metody popsané v kap. 3 pracujeme fakticky se sadou fenomenologických parametrů. Diskuse, nakolik je podobný výběr fenomenologických parametrů v experimentální práci obecný přesahuje rámec tohoto textu. V každém případě je třeba hledat experiment, který bude možno co nejlépe reprodukovat původní strukturu. Na obrázku 9 je srovnání experimentu ze standardní mikroskopie a mikroskopie s videozesílením. Obrázky ze standardního mikroskopu v jednotlivých barevných kanálech a jejich kombinace ukazují, jak je informace přenesená mikroskopem závislá na vlastnostech konkrétního optického uspořádání. Konkrétní tvar zobrazení (v klasické mikroskopii vcelku nesprávně mluvíme o zkreslení) je navíc různý pro různou polohu vůči rovině zaostření. Tento problém jsme podrobně rozebrali v nedávné publikaci (Náhlík a spol. zasláno a též obr. 12). Detaily obrázku z mikroskopie s videozesílením a při teoretickém zvětšení objektivu 100x ukazuje detaily velikosti jednoho bodu na kameře, což je v tomto případě 24 nm v původním obrázku.



Obrázek 9 Porovnání objektu podobné velikosti v HeLa buňce zobrazené pomocí standardního a nejlepšího dosažitelného uspořádání. Standardní uspořádání je 40x zvětšení suchým objektivem, snímání fotoaparátem s třemi barevnými kanály, optické kontrastování pomocí fázového kontrastu (Zernike 1934) (panely a-d). Maximální dosažitelné rozlišení bylo realizováno mikroskopií s videozesílením (Reynolds 1969), 100x zvětšení imerzním objektivem, bez optického kontrastování (panely e a f). V obou případech je zobrazen informační příspěvek jednoho bodu. Panely a-c jsou jednotlivé barevné kanály PIG byla vypočtena s $\alpha=1,5$. Panel d) je kombinace těchto kanálů. Panel e) představuje PIG – transformovaný obrázek z mikroskopu snímáný v intenzivním bílém světle. Panel f) je

tentýž obrázek, kdy jednotlivé hladiny PIE byly rozděleny do tří pseudokanálu pro lepší vizualizaci jednotlivých objektů.

Objekty uvnitř označené oblasti na panelech a-d v obrázku 3 jsou typické pseudoobjekty pod rozlišením mikroskopu, řečeno slovy pokročilého uživatele mikroskopu. Skutečně není možno nijak posoudit, do jaké míry se jedná o reflexi skutečných objektů, které jsou významně opticky aktivní jen při určitých vlnových délkách, nebo zda se jedná o stejný objekt zobrazovaný jinou funkcí rozmítání bodu (PSF) při jiné vlnové délce. Další komplikací je fakt, že různé PSF působí na objekty v jiném místě vzhledem k ose čočky a v jiném místě vzhledem k rovině zaostření. Není však pochyb, že se jedná o jádro, objekt uvnitř buněčného jádra. Také není pochyb, že jiné uspořádání uvnitř objektu povede k jiné struktuře pseudoobjektů a že tato struktura do značné míry jednoznačně skutečnou vnitřní strukturu objektu odráží. Stavová trajektorie objektu je určena fenomenologickými proměnnými $\Delta I_{\alpha,r}$ objektu pro jednotlivé hodnoty α . A jedině, co nám zbývá, je použít mikroskopické pseudoobjekty jako fenomenologické charakteristiky, což je jiné vyjádření faktu, že jako stavové proměnné používáme veličiny PIE a PIE/points.

Objekty zobrazené pomocí mikroskopie s videorozlišením jsou reálné objekty. Je to dáno tím, že funkce rozmítání bodu – PSF – je v tomto případě menší než bod kamery. To je ověřeno experimentálně a připisuje se to kvantově-mechanickému chování fotonů v experimentu (Mizushima 1988, Lipson 2003), rozlišení mikroskopu se považuje za simultánní provedení mnoha kvantově mechanických experimentů. Z Heisenbergova principu neurčitosti pak lze odvodit, že pro rozlišení mikroskopu platí upravený Abbého vztah (Abbé 1873)

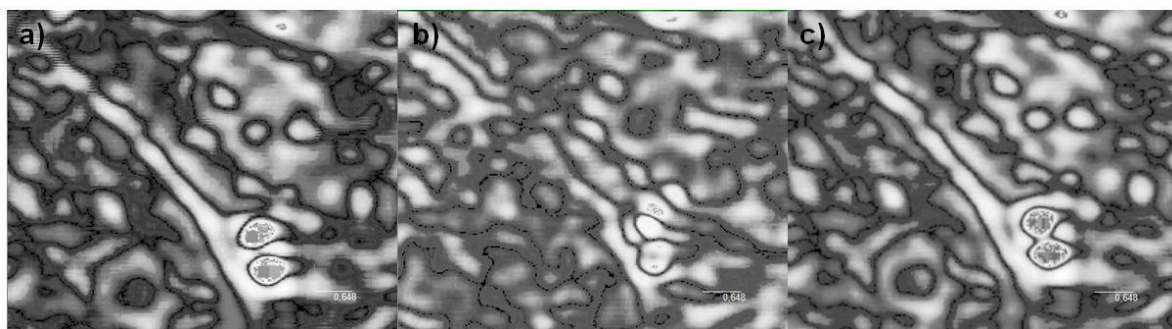
$$\delta x > \frac{\lambda}{2n\sqrt{N} \sin \alpha} \quad (8)$$

kde δx je rozlišení v rovině obrazu, λ vlnová délka, n index lomu skla, N počet dopadajících fotonů a $\sin \alpha$ je polovina úhlu, pod nímž je zobrazován bodový objekt. Při vysoké intenzitě (nekoherentního) světla je tak možné dosáhnout teoreticky nekonečného rozlišení. Bez hlubší analýzy detailů platnosti těchto odvození pro mikroskopii s videozesílením (VEM) je vidět z experimentu na obrázku 9, že teoretické rozlišení je možno dosáhnout, přinejmenším u zobrazení některých bodů. Technika VEM je přitom v zásadě velmi jednoduchá. Stačí velmi intenzivní světelný zdroj a kamera, na níž je možno snížit zesílení. Obraz pozorovaný pouhým okem je sice přesvícen, na kameře jsou však pozorovány všechny reálně dostupné detaily.

Přesto vysoké rozlišení je reálná informace získaná z obrazu menší než ta, která byla získána standardní metodou. Především proto, že velikost scény je řádově menší než při menším zvětšení a proto, že pozorujeme při jedné vlnové délce. Dalším problémem je potřeba pozorovat v komůrce tloušťky skleněného krycího sklíčka, aby bylo možno z obou stran dostatečně přiblížit optickou soustavu. Tyto problémy řeší nově navržený mikroskop, který byl zkonstruován a je v současné době testován

v laboratořích v Nových Hradech. Výsledky dosažené na tomto novém přístroji budou v přednášce prezentovány.

Pokud je živá buňka skutečně asymptoticky stabilním systémem, není libovolné, s jakou frekvencí snímky sbíráme. Extrémním příkladem vnitrobuněčné dynamiky je nejspíše narůstající buňka rostlinného kořenového vlášení. Tam se ukazuje, že i v rámci opakovací frekvence 25 s^{-1} dojde k takové reorganizaci buněčného interiéru, že vesměs není možno sledovat pohyb jednotlivých tvarů. Naším zájmem jsou buňky významné pro humánní a veterinární medicínu. Zde je situace příznivější, v sérii obrázků vzdálených od sebe o 1 s i 10 s lze snadno přiřadit odpovídající objekty (obr. 11). Na těchto snímcích je vidět jeden z významných technických problémů, kterým je velký vliv bodů mimo rozsah prostoru který se běžně označuje jako hloubka ostrosti. Tyto body se v obrázku vyskytují vždy, kdy pozorujeme transparentní objekt větší tloušťky a jeví se jako velmi jasné. I když strukturní přiřazení jednotlivých objektů pozorovatelem je relativně bez problémů, automatickou analýzu stavové trajektorie v tomto případě nelze použít. Přitom ruční analýza spotřebuje i několik týdnů. Také objem získaných dat je tak velký, že zpracování dat snímaných podobnými frekvencemi vede k velkým problémům při skladování a zpracování dat.



Obrázek 11 *Obrázek interiéru HeLa buňky transformovaný PIG s $\alpha = 2,0$. Snímky ze sekvence VEM jsou sbírána v čase 0, 1 a 10 s. Rozdíly v pseudointenzitách jsou způsobeny přítomností objektů na hranici hloubky ostrosti, které přispívají velmi intenzivním signálem.*

Z pohledu praktického využití stavové trajektorie živé buňky můžeme rozlišit dva úkoly: práci v konkrétní laboratoři, například akreditované medicínské kontrolní laboratoři, a experimentální laboratoř, která si klade za cíl produkovat výsledky porovnatelné v celém světě. Jádrem odlišnosti přístupů je vztah k biologickému materiálu. V akreditované laboratoři jde především o komfort laboratorního personálu, protože cílem je opakovaně a reprodukovatelně charakterizovat konkrétní vzorky. Ve výzkumné laboratoři se předpokládá možnost experiment se stejnou kulturou opakovat se stejným výsledkem kdekoli na světě, přičemž se snažíme získat zároveň co největší množství poznatků. V důsledku diverzity biologického materiálu a nákladnosti experimentů je však přese všechnu snahu reprodukovatelnost v biologickém výzkumu vesměs problematická. Ukázali jsme, že využití PIE umožňuje dobře rozdělit stavovou trajektorii živé buňky v jednom konkrétním experimentu vedeném metodou

využívanou v aplikační laboratoři. Naproti tomu využití vysoce rozlišené mikroskopie s videozesílením se zdá být mnohem problematičtější. Zdá se tedy, že jak sběr dat v intervalu minut, tak fakticky menší rozlišení mikroskopu – či větší zkreslení obrazu – není tak zásadním problémem, možná dokonce výhodou. Získáváme sice hodnoty zjevně fenomenologických proměnných, jejichž vztah k atributům původního objektu je velmi nejasný, ale na druhou stranu nesou tyto proměnné každá výrazně odlišnou informaci. Každý barevný kanál tak přináší do výsledku nezávislou a odlišnou, byť fenomenologickou, informaci. Především lze ale experiment bez problémů vždy provést tak, aby nebyl ovlivněn experimentálními podmínkami, jako je citlivost snímacího zařízení. (Zajisté však nelze říci, že by v biologické praxi byly experimenty vždy správně prováděny.)

Nemůžeme vyloučit, že některé části pozorovaných trajektorií by bylo možno dále rozdělit, pokud bychom byli schopni vyhodnotit rychlejší děje a tím stav buňky lépe diagnostikovat. V mikroskopii s videozesílením především dojde k zásadnímu zmenšení pozorované scény a tím fakticky ke znemožnění jakéhokoliv statistického vyhodnocení na úrovni více buněk. Dále, díky zmenšení hloubky ostrosti začnou informaci obsaženou v experimentu významně ovlivňovat signály objektů z jejich okrajů, které se chovají opticky výrazně odlišně. Z teoretické analýzy mikroskopie s videozesílením vyplývá, že rozlišení by nemělo být závislé na teoretickém rozlišení mikroskopu. Řečeno z pohledu kvantově-mechanického odvození (Lipson 2003), velikost tvaru, jímž mikroskop zobrazuje jeden bod v objektu, by vždy měla být menší než bod na kameře. Pro analytický přístup, kdy naším zájmem je pochopit příspěvky jednotlivých prvků systému, je mikroskopie s videozesílením zřejmě nejvhodnějším nástrojem. Při systémovém přístupu, kdy naším cílem je najít vhodné – pokud možno ortogonální - systémové proměnné, se mohou jiné metody nakonec ukázat vhodnější.

5. Konstrukce mikroskopu pro studium kultury živých buněk

Jak jsem naznačil v úvodu, existují tři navzájem provázané problémy

- 1) Reprodukovatelná příprava a kultivace buněčné kultury
- 2) Reprodukovatelné provedení mikroskopického experimentu
- 3) Správný způsob analýzy dynamického chování živé buňky na základě její reprezentace mikroskopem

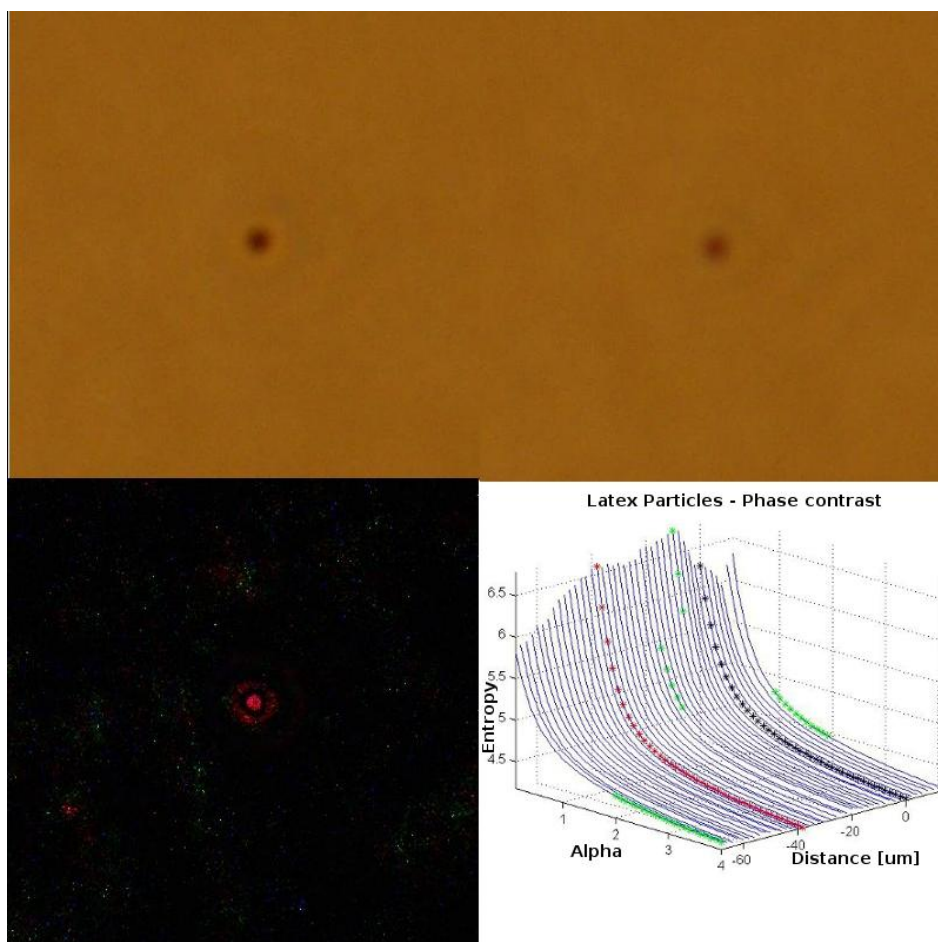
Celkový detailní popis mikroskopu vydá na samostatnou přednášku. Byl navržen ve spolupráci se dvěma českými výrobci a v současné době se testuje. V následujícím textu budu diskutovat jen hlavní specifika používání mikroskopu.

1. *Kultivace buněk*: V kapitole 4 je rozebrán problém experimentálního stanovení stavové trajektorie živé buňky. Ukázalo se, že i při technicky velmi detailně provedeném experimentu není možno jednoznačně rozhodnout jak experiment provést z hlediska optického uspořádání. Pro většinu reálných problémů by mělo být dostačující snímat s 20x až 40x zvětšením. Při použití mikroskopie

s videozvětšením a za použití vícebarevné kamery by neměla být problémem interpretace pozorovaných objektů. Toto uspořádání ale doposud nikde nebylo použito a ověřeno. Může se také ukázat, že právě nedokonalost optického uspořádání, a tím i zásadně odlišná reprezentace pozorovaného objektu, je pro stanovení stavové trajektorie stejně výhodná (Štys a spol. 2011a). O to významnější je ale reprodukovatelné provedení experimentu. Jádrem problému je tedy zajistit takové biologické provedení experimentu, které bude na jedné straně reprodukovatelné a co možná nejméně stresující pro buňky a na druhé straně umožní aplikaci většiny mikroskopických technik. Proto jsme vyvinuli mikrofluidní celu pro mikroskopii.

Problém optimalizace vývoje mikroskopických komůrek je velmi živý a nezdá se, že by bylo k dispozici univerzální řešení. Měli jsme příležitost měřit u firmy NeuroZone v Miláně, která spolu s IBM Zurich vyvíjí zařízení BrainChip (Lovchik et al. 2009). Jeho jádrem je specializovaná mikrofluidní komůrka geometrie optimalizované vzhledem k dobré kontrole komunikace mezi neurony a za účelem aplikace několika chemických signálů. Zdá se, že podobná komplikovaná řešení jsou nekompatibilní s reprodukovatelným provedením biologického experimentu. Je pravděpodobné, že jednoduché řešení vyvinuté v naší laboratoři bude nakonec po menší geometrické úpravě použito i těmito předními pracovišti.

2. *Reprodukovatelné provedení optické mikroskopie*: Experimentálně jsme dokázali (Náhlík a spol. v tisku), že metoda výpočtu PIE je vhodná i pro reprodukovatelné nastavení mikroskopu. Podle cíle práce je možno použít tři různá nastavení: (a) klasické zaostření, které je zaměřeno na co nejmenší velikost vybraných pozorovaných objektů, (b) zaměření na co největší informační obsah obrazu, maximalizace PIE a (c) nalezení pozice, v níž je nejlépe reprodukován tvar standardního objektu. Experimentálně jsme stanovili, že pozice, v níž je nalezen nejmenší objekt a pozice s největším PIE, se liší o jednotky mikronů. Běžná tloušťka buňky je do 20 mikronů (Obr. 11). Toto jednoznačné rozdělení je možné použít pouze v případě, že je tvar sledovaného objektu znám. Je vidět, že pro různé hodnoty α se maximální hodnota nachází v jiné pozici. Pozice pro maximum informační entropie se pro kulový objekt nachází v širokém rozsahu škály. V případě hodnot α , které zvýrazňují objekty průměrné velikosti ($\alpha = 0,7 - 1,7$), se maxima nacházejí po oboru stranách pozice nalezené pro nejmenší objekt. Z toho usuzujeme, že ustavení fokusu do centrální pozice mezi dvěma maximy PIE povede k nejlepšímu dosažitelnému optimálnímu zaostření.



Obrázek 12. Různé objektivně stanovitelné polohy zaostření mikroskopu pro fázový kontrast. Vodorovná osa zleva do středu ukazuje hodnotu koeficientu α , vodorovná osa ze středu doprava polohu mikroskopického stolku vzhledem k empirické poloze zaostření a svislá osa hodnotu PIE. Zaostření jsme posuzovali pro červený kanál. Modré body jsou hodnoty v poloze empiricky nejlepšího zaostření, která se objektivně shoduje s pozicí, v níž jsou nalezeny nejmenší body. Ty jsou však geometricky silně deformovány. Červené body udávají polohu stolku, v níž byla nalezena nejlepší shoda s předpovědí podle Airyho teorie. Zelené body vyznačují polohy maxim PIE pro jednotlivé hodnoty koeficientu α . Panely odpovídají poloze modrých bodů, přičemž levý horní panel je zobrazení pomocí fázového kontrastování a pravý horní panel zobrazení pomocí přímého průchodu světla (tzv. brightfield). Levý dolní panel je obraz levého horního panelu transformovaný pomocí PIC.

Pro objektivní nalezení zaostření je třeba pro každý mikroskop provést kalibraci. V případě mikroskopu Olympus IX 51 se pro objektivní výpočet optimálního zaostření ukázala hodnota koeficientu α v rozmezí 0,4 až 0,8, kde body maxima se nachází mezi nejlepším zaostřením v chápání běžného uživatele a nejlepší reprodukcí teoreticky očekávaného tvaru. Celý problém je

komplikován faktem, že pro každý barevný kanál je optimální nastavení odlišné.

Podobnou metodu s využitím PIE vypočtené pro Shannonovu entropii jsme úspěšně implementovali do software pro optimalizaci nastavení mikroskopu již v roce 2008. Skutečným praktickým problémem však je přesvědčit uživatele, aby software využívali. V nově navrženém mikroskopu bude autofokusace automatická.

3. *Analýza výsledků experimentu:* Jak bylo uvedeno v kapitole 4, jsou v zásadě dva cíle biologického experimentu, aplikační a výzkumný. Rozdílem mezi nimi je předpokládaná obecnost výsledků, v aplikační laboratoři předpokládáme reprodukovatelnost, například, diagnózy v rámci jedné laboratoře, výzkumná laboratoř předpokládá sdílení výsledků i měřících technik mezi laboratořemi. Naše zkušenost je taková, že v biologické a biochemické práci je dosažení reprodukovatelnosti ve stejném smyslu, jako je chápána v chemii nebo fyzice, velmi obtížné. To je dáno právě tím, že zatímco v chemii je lze bez problémů připravit čisté chemické individuum, například proteiny se při dalším čištění vesměs denaturují díky ztrátě klíčových kofaktorů nebo iontů. Čím podobnější je měřený objekt původnímu živému objektu, tím obtížnější je jeho příprava. Použití hodnot PIE a PIG, které umožňují objektivně definovat strukturu objektu a tím i stav systému, otevírá možnost jiného pohledu na definici reprodukovatelnosti. Pokud hledáme pouze asymptoticky podobnou strukturu s podobnou časovou dynamikou, je srovnávání experimentů mezi laboratořemi mnohem snazší. Zda je k tomu výhodnější „standardní“ mikroskopie se „zkreslující“ optikou nebo zda bude výhodnější využít zkreslení mikroskopu pro získání nezávislé informace – fenomenologické proměnné – bude předmětem dalšího experimentování.

6. Poděkování

Na úkolech, kterou popisují v této práci, se podílela řada členů oddělení biologického inženýrství ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity. Byli to zejména Petr Císař, Jan Urban, Jan Vaněk a Tomáš Náhlík na straně tvorby software, analýzy dat i mikroskopických experimentů. Metodu videozesílené mikroskopie nás naučila a umožnila nám ji provést Irene Lichtscheidel z Vídeňské univerzity. Za konstrukci mikroskopu děkuji především Ing. Petru Taxovi a dalším pracovníkům firem Optax a Compotech. Konečně děkuji i své rodině za trpělivost s níž snášela mé pracovní nasazení.

7. Citovaná literatura

- Abbe, Ernst (1873). "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung". *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1): 413–468
- Airy, G. B., "On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture," *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, Vol. 5, 1835, p. 283-291.
- Alberts B, Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M. Roberts K and Walter P., (2009) *Essential Cell Biology*, Garland Science
- Belousov B. P., Периодически действующая реакция и ее механизм. [A periodic reaction and its mechanism]. *Сборник рефератов по радиационной медицине (Compilation of Abstracts on Radiation Medicine)*, 147:145, 1959.
- Bialynicky-Birula I. (2006) Formulation of the uncertainty relations in terms of the Rényi entropies, *Phys. Rev. A* 74, 052101
- Braat J.J.M., van Haver S., Janssen A.J.E.M., Dirksen P., "Assessment of optical systems by means of point-spread functions," in *Progress in Optics*, Vol. 51, E. Wolf, ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2008, pp. 349-468.
- von Buquoy, G. F., *Idelle Verherrlichung des empirisch erfassten Naturlebens*, Breitkopf und Härtel, Leipzig 1822
- Day R.D., Davidson M.W. (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2887-2921
- Cvitanovič P., Artuso R., Mainieri R., Tanner G. and Vattay G., *Chaos: Classical and Quantum* (Niels Bohr Institute, Copenhagen (2009); ChaosBook.org/version13)
- Heisenberg, W. (1927), "Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik", *Zeitschrift für Physik* 43 (3–4): 172–198,
- Howard M., Rutenberg A.D., and de Vet S. (2001) Dynamic compartmentalization in bacteria: accurate division in *E. coli*. *Phys. Rev. Lett.* 87, 278102
- Kaneko K. (2006). *Life: An Introduction to Complex Systems Biology*. Springer.
- Karp, P.D., et al., *Pathway Tools version 13.0: Integrated Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology*. *Briefings in Bioinformatics*. 2010 11:40-79.
- Lichtcheidl I. K. and Foissner I. (1996) Video microscopy of dynamic plant cell organelles: principles of the technice and practical application, *J. Microsc.* 181, 117-128.
- Lipson S.G., 2003. Why is super-resolution so inefficient? *Micron* 34, pp. 309-312

- Lovchik RD, Bianco F, Matteoli M, et al Controlled deposition of cells in sealed microfluidics using flow velocity boundaries, 2009 Lab on a Chip, 9, 1395-1402
- Levitner T., Timr S., and Stys D. , (2010) Expertomica Cells: analysis of cell monolayer development Bioinformatics, 26: 278-279
- Loose M., Fischer-Friedrich E., Ries J., Kruse K. and Schwille P. 2008, Spatial regulators for bacterial cell division self-organise into surface waves in vitro. Science, 320, 789-792
- Lorenz, E. N. (1963). "Deterministic nonperiodic flow". J. Atmos. Sci. 20: 130–141
- Mizushima, Y., (1980) Detectivity limit of very small objects by video-enhanced microscopy. Applied Optics, 27, 2587-2594
- Náhlík a spol. submitted
- Nicolis G. and Prigogine I., Self-organisation in Nonequilibrium Systems: From Dissipative Systems to Order Through Fluctuations, John Wiley and Sons, New York, 1977
- Lord Rayleigh (1916) On convection currents in horizontal layer of fluid when the higher temperature is on the under side. Philos. Mag. Ser. 6 32(192), 529–546.
- Rényi A. (1961). "On measures of information and entropy". Proceedings of the 4th Berkeley Symposium on Mathematics, Statistics and Probability 1960. pp. 547–561
- Reynolds, G. T. (1968). Image intensification applied to microscope systems. Adv. Optical Electron Microsc. 2, 1-40.
- Shannon C.E. (1948) A mathematical theory of communication, The Bell System Technical Journal 27, 397-423, 623-656)
- Saltzman B. (1962) Finite amplitude free convection as initial value problem, J. Atmos. Sci. 19:329-341
- Shimomura O, Chalfie M and Tsien R.Y. (2008)
http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/chemadv08.pdf
- Stys D., Urban J., Vanek J., Císar P. Analysis of biological time-lapse microscopic experiment from the point of view of the information theory. Micron. 2011a, 42, 360-365. Epub 2010 Feb 12.
- Stys, D., Vanek, J., Nahlik, T., Urban, J., Cisar, P.: The cell monolayer trajectory from the system state point of view. Mol. BioSyst. 7, 2824-2833 (2011)
- Stys D., Jizba P., Papacek S., Nahlik T., and Cisar P., On measurement of internal variables of komplex self-organized systems and their relation to multifractal spectra, 2012, IWSOS 2012, LCNS 7166, pp. 36-47, Kuipers and Heegaard eds. Springer: Heidelberg Dordrecht London New York, ISBN 978-3-642-28582-0
- Theiler J., Estimating fractal dimension (1990) JOSA A, 7, 1055-1073

Urban J., Vanek J., Štys D.: "Preprocessing of microscopy images via Shannon's entropy", In Proc. of Pattern Recognition and Information Processing, pp.183-187, Minsk, Belarus, 2009

Waltermann C., Klipp E, Information theory based approaches to cellular signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1810 (2011) 924–932

Zernike, F., Diffraction theory of the knife-edge test and its improved form, the phase-contrast method., *Royal Astronomy Society Monthly Notices*: 94, 377-384 (1934)

Zampa P., The principle of causality and new approach to system theory, In: *Cybernetics and Systems*, 2004, pp. 3-8, ISBN 3-85206-169-5

Žampa P. 1996 Habilitační práce, Západočeská univerzita v Plzni

Dodatek č. 1 Vybrané pojmy obecné teorie systémů a jejich vztah k pozorování živých buněk

Abstraktní objekty v každé teorii jsou vytvářeny jako více či méně homomorfní modely reálných objektů (Žampa 1996). Každý model je vytvářen za nějakým cílem. Nejběžnějším cílem je zkoumat (přesně řečeno vyjádřit) shodný popis (a parametrizaci) známého obecného přírodního zákona platného pro daný objekt studia. Tento proces ověřuje nebo vylučuje jak obecnost uvažovaného přírodního zákona, tak hypotézu jeho platnosti v rámci daného studovaného objektu. V případech, kdy vyloučíme obecnost, musíme paradigma modifikovat. V praxi musíme přesné tvrzení ověřovat statisticky velkým množstvím (pozorování) a posuzovat jejich shodu s modelem.

1. Systém z pohledu měřitelných veličin

Každý systém, tedy de-facto jeho abstraktní model, popisujeme jeho atributy. *Atribut* je matematická abstrakce určité charakteristiky, například identity molekul nebo jejich počtu. Atribut je reprezentován *proměnnou* (délka, hmota, čas, teplota ...). Proměnná je pojem pro symbol, jehož hodnota se může měnit. Parametr je symbol, jehož hodnota se nemění. Hodnota určuje určitý případ proměnné.

V každém reálném měření je čas uspořádaná množina hodnot časů T v nichž bylo prováděno měření

$$t_j \in T, t_0 < t_1 < t_2 < \dots < t_K \quad (1)$$

kde t_j jsou hodnoty časů, v nichž bylo prováděno měření. Dále máme množinu atributů A

$$A = \{a_i | i \in I\} \quad (2)$$

kde a_i jsou všechny atributy s indexy z množiny I . Množiny A a I jsou tedy ekvivalentní. Dále existuje množina všech hodnot proměnných pro daný atribut V_i

$$v_i \in V_i, i \in I \quad (3)$$

a sjednocení těchto množin $V \cup_{i \in I} V_i$. Pro každou hodnotu proměnné v_i tedy platí, že $v_i \in V$

Pro zavedení pojmu trajektorie systému potřebujeme definovat, že b v každém časovém okamžiku $t_i \in T$ nabývá každý atribut a_i právě jednu hodnotu $v_i \in V_i$. Trajektorií systému je pak zobrazení z

$$z: T \times I \rightarrow \cup_{i \in I} V_i \text{ takové, že } z(t, i) \in V_i, i \in I \quad (4)$$

Dále definujeme množinu všech trajektorií Ω jako

$$\Omega = \{z\} \quad (5)$$

Vhodně vybranou skupinu trajektorií nazveme jevem systému $B \subset \Omega$ a definujeme ji

$$B = (z | V(z)) \quad (6)$$

kde množinu $V(z) \subset V$ nazýváme vlastnost trajektorie, což v praxi může znamenat, například, že proměnné v určitém rozmezí časů nabývají hodnoty v určitém rozmezí.

Nyní můžeme definovat obecný abstraktní systém S jako

$$S = (T, V) \quad (7)$$

Máme-li v systému definovanu trajektorii, pak deterministický systém je definován jako

$$DS = (T, V, z) \quad (8)$$

Reálný systém je vždy stochastický. Každému jevu B pak můžeme připsat pravděpodobnost $P(B)$. Uspořádanou trojici (T, V, P) pak nazveme stochastický systém **SS**.

$$SS = (T, V, P) \quad (9)$$

Stochasticita reálného mechanického systému v prvním plánu vychází z technické nemožnosti měřit s nekonečnou přesností a v kontinuálním čase. Přesnost měření i minimální časový interval je konečnou dánu kvantově mechanicky, vyplývá z Heisenbergova principu neurčitosti. Z teorie nelineární dynamiky (Cvitanovič a spol. 2009) vyplývá, že fázový prostor je přirozeně rozdělen na oblasti a přechody mezi nimi je možno popsat pravděpodobnostně. K důsledkům této představy obecně a specificky v případě stavové trajektorie živé buňky se vrátím v další části této diskuse.

2. Kauzální vztahy v systému a pojem elementu trajektorie

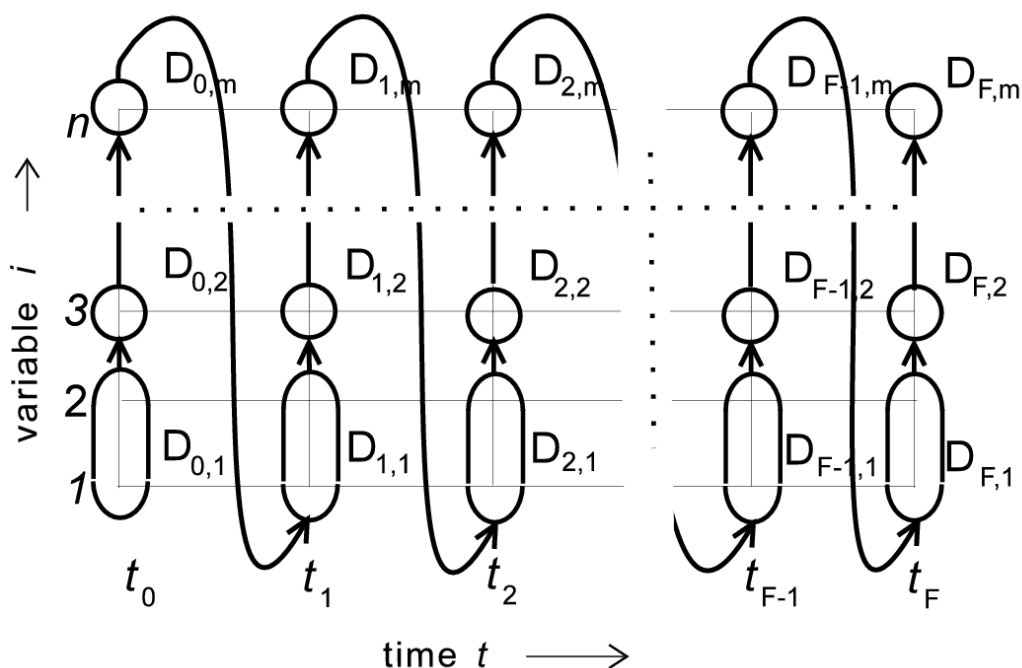
Definičním oborem trajektorie D je kartézský součin

$$D = T \times I \quad (10)$$

Protože neměříme v kontinuálním čase, musíme předpokládat, že i v rámci jednoho intervalu mezi naměřenými časy je trajektorie definována po částech, že každý vstup předchází příslušnému výstupu, každý signál předchází odezvě. Množinu I tedy můžeme vyjádřit jako

$$I = \{I_1, I_2, \dots, I_m\} \quad (11)$$

kde indexy 1,2 ... m odpovídají časovým úsekům, v rámci nichž je trajektorie systému po částech determinována. Vhodné rozdělení určuje vnitřní mechanismus dynamiky systému (Obr. D1.1) .



Obrázek D1.1 Sekvenční determinace stavové trajektorie. Mezi každými dvěma časy se systém sekvenčně vyvíjí. Jeho osud je definován sadou předchozích atributů, respektive proměnných. Při standardní technické realizaci měření není žádný důvod se domnívat, že zvolený časový interval mezi měřeními právě umožní zaznamenání dostatečného množství proměnných, které umožní jednoznačně definovat stavovou trajektorii, zobrazení z . Časový interval není libovolný, je dán vlastnostmi systému. Může nastat, a v buněčné biologii často nastává, i případ, že měření není prováděno s dostatečnou frekvencí a rozklad na segmenty trajektorie není možný.

V reálném měření můžeme definiční obor D zobrazení z rozložit na uspořádaný rozklad. Prvky tohoto rozkladu mohou být v extrémních případech sama původní množina D a v druhém extrémním případě všechny jednobodové podmnožiny množiny D . Lze definovat uspořádaný kartézský součin

$$D = \{D_{i,j} | D_{i,j} = T_i \times I_j, T_i \in \mathcal{T}, I_j \in \mathcal{J}\} \quad (12)$$

kde \mathcal{T} a \mathcal{J} jsou uspořádané rozklady množin T a I . Podle této představy je trajektorie determinována nejprve na množině $D_{0,1}$, dále na množinách $D_{0,2}, D_{0,3}, \dots, D_{0,m}$, posléze pak $D_{1,1}, D_{1,2}, \dots, D_{1,m}, \dots, D_{F,1}, D_{F,2}, \dots, D_{F,m}$, kde indexy $0, 1, \dots, F$ jsou indexy podmnožin, na něž byla uspořádaným způsobem rozložena množina T . Pro reálný případ tedy rozkládáme trajektorii systému $z: T \times I \rightarrow \bigcup_{i \in I} V_i$ na sekvenci segmentů trajektorie. To vyjadřujeme výrazem $z|D_{k,l}$. Fakt, že segmenty trajektorie na sebe následují, ošetříme definicí předcházejícího segmentu

$$C_{k,l} \subset \bigcup_{(i,j < k,l)} D_{i,j} \quad (13)$$

Pak existuje zobrazení \mathcal{K} množiny \mathcal{D} do potence množiny $\mathcal{P}(\mathcal{D})$ množiny \mathcal{D} takové, že každému prvku $D_{i,j} \in \mathcal{D}$, takzvanému důsledku, je přiřazen prvek

$C_{k,l} \in \mathcal{P}(\mathcal{D})$, takzvaná bezprostřední příčina. Tím definujeme všechny kauzální vztahy v systému a můžeme psát

$$\mathcal{K} = \{(C_{k,l}, D_{k,l}) | D_{k,l} \in \mathcal{D}\} \quad (14)$$

Kauzální systém je pak definován jako

$$\mathcal{KS} = (T, V, \mathcal{K}) \quad (15)$$

a reálný systém, který budeme uvažovat, jako stochastický kauzální systém

$$\mathcal{SKS} = (T, V, \mathcal{K}, \mathcal{P}) \quad (16)$$

kde \mathcal{P} je soubor všech kauzálních hustot pravděpodobnosti definovaných jako

$$p_{k,l}(z | D_{k,l}; z | C_{k,l}) \quad (17)$$

Z pohledu teorie nelineárních dynamických systémů (Cvitanovič a spol. 2009) je tato definice identická s rozkladem fázového prostoru na Markovovské elementy. Je zajímavé, že Žampa (2006) na tuto definici přišel jinou úvahou, vycházel z toho, že pouze takto definovaný systém může vykazovat stavové chování ve standardním mechanickém či termodynamickém smyslu. To má zajímavé důsledky až na úroveň fundamentálních modelů vesmíru.

3. Struktura kauzálních systémů

Systém ve smyslu, který je zde popisován, v sobě obsahuje i všechny vstupy. Systémy ve standardním slova smyslu jsou z hlediska systému ve smyslu obecné teorie systémů subsystémy. Subsystém je možno vymezit, můžeme-li vyčlenit proměnnou

$$v_{i,l}(t_k) \in V_{i,l}, \quad (18)$$

která odpovídá kauzálnímu vztahu

$$C_{k,l} = \{(t_k, i_l)\} \text{ a } D_{k,l} = \{(t_k, i_l)\} \quad (19)$$

neboli požadujeme, aby tento kauzální vztah byl požadován pouze jedním atributem. Takový kauzální vztah pak nazveme *informační vazbou* $c_l(t_k)$ systému, pokud jej lze přerušit, tj. pokud systém bude existovat i poté, kdy pro dané k a l nebude k důsledku $D_{k,l}$ existovat příčina $C_{k,l}$.

Tímto zásahem se systém rozdělí na *sub-systémy*. Definujeme si množinu všech informačních vazeb \mathcal{C} jako

$$c_l(t_k) \in \mathcal{C} \quad (20)$$

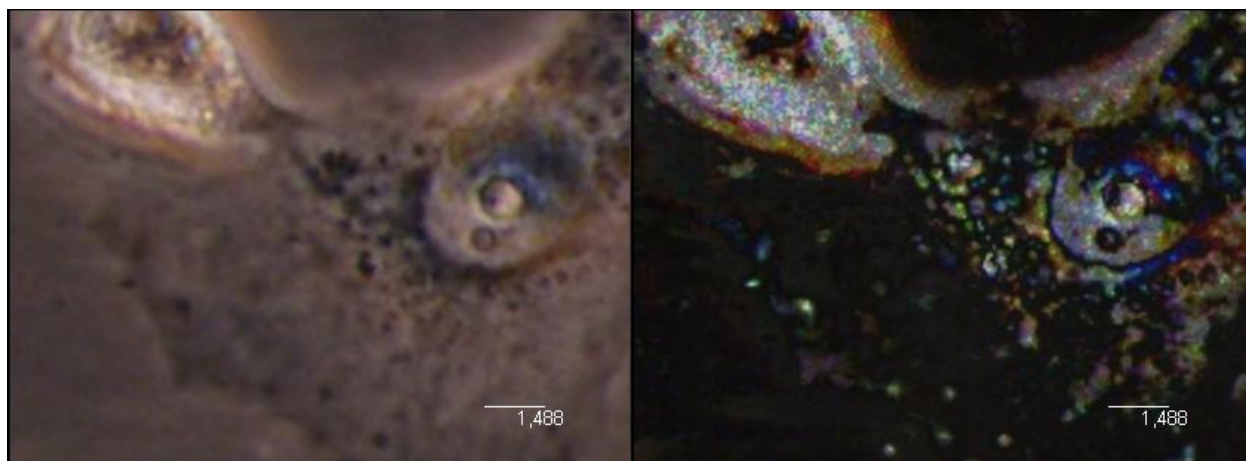
Můžeme tak definovat kauzální sub-systém

$$\mathcal{KS}_i = (T, V(i), \mathcal{K}(i)) \quad (21)$$

V tomto rozkladu můžeme pokračovat tak dlouho, dokud budou v systému existovat kauzální relace, které splňují definici informační vazby. Získáme tak soubor prvků systému $\pi(i)$, přičemž množinu těchto prvků Π nazveme univerzem systému. Celý kauzální systém pak můžeme popsat jako

$$\mathcal{KS} = (\Pi, \mathcal{C}) \quad (22)$$

Rozklad systému na sub-systémy je vhodným konceptem pro analýzu chování buněčné monovrstvy. Tam můžeme identifikovat buňky jako sub-systémy (Obr. D1.2) i komunikační kanály mezi nimi. Kvalitativně je možno kanály rozdělit (Štys a spol. 2011) podle velikosti a délky trvání, ale pro detailnější hodnocení je zatím příliš brzy.



Obrázek D1.2 Detail buněk jako přirozených subsystémů systému buněčné monovrstvy. Předpokládá se, že buňky spolu komunikují pomocí chemických signálů – hormonů, metabolitů, které jsou vnímány všemi buňkami zároveň. Tím je ale velmi často možno pozorovat výměnu hmoty – a tedy nejspíše informace – mezi konkrétními dvěma buňkami. Taková výměna může být masivní, jak ukazuje tento obrázek, nebo i jen malá a dočasná (viz. Štys a spol. 2011).

doc. RNDr. Dalibor Štys CSc.

Dalibor Štys (* 1. 9. 1962 v Praze) po ukončení studia na Střední průmyslové škole chemické v Praze absolvoval Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, obor fyzikální chemie v roce 1987. Titul RNDr. získal v oboru biofyzikální chemie v témže roce. Je ženatý, manželka Naděžda Štysová, a má dvě děti, Dalibora 1993 a Kryštofa-Mikuláše 2000.

V letech 1988-1992 působil jako odborný asistent na Ústavu organické chemie a biochemie v Praze, kde získal titul CSc, v oboru biochemie na základě práce Struktura a funkce proteinu P6 a imunoaktivních fragmentů glykoproteinu GP41 viru HIV. V letech 1992-1995 působil na katedře biologie rostlinné buňky na univerzitě v Lundu ve Švédsku, nejprve jako stipendista, poté jako výzkumný inženýr. Zde se zabýval strukturou a funkcí klíčových proteinů fotosyntetického aparátu.

V letech 1996-2001 byl hlavním administrátorem projektu z programu posílení výzkumu na vysokých školách (250) díky němuž vznikla laboratoř biomembrán, v letech 2000-2004 řešitelem projektu výzkumného centra Mechanismus, ekofyziologie a biotechnologie fotosyntézy. V roce 2002 založil ústav fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích se sídlem v Nových Hradech (samostatný vysokoškolský ústav na úrovni fakulty) jehož ředitelem byl do konce roku 2011. Podle hodnocení výzkumných institucí 2010 získal ústav 9770 bodů, čímž překonal i celou řadu mnohem větších a tradičnějších ústavů Akademie věd České republiky a univerzitních fakult.

Od 1. ledna 2012 je pracoviště založené doc. Štysem jako škola komplexních systémů součástí Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity a doc. Štys je proděkanem této fakulty pro rozvoj.

V roce 2001 získal doc. Štys infrastrukturní projekt z programu předstupních fondů EU, na jehož základě byl vybudován vědeckotechnický park „Centrum biologických technologií Nové Hrady“. Na tento projekt pak navázala řada projektů ze 6. Rámcového programu EU, programu OPVP, Interreg IIIA, Interreg IIIC, Interreg IVC, OPRLZ a operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace, kde spolu s Fakultou rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích získali projekt Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz v prioritní ose 2.

Doc. Štys připravil akreditační přihlášku doktorského oboru biofyzika, který byl akreditován v roce 2003 i všechny reakreditační materiály, na jejichž základě obor obdržel akreditaci do roku 2015. Tento program je nejúspěšnějším doktorským studijním programem v oboru Biofyzika s více než 10 absolventy a více než 30 v současnosti studujícími posluchači. Přednáší též, spolu s dalšími třemi přednášejícími, základní třítydenní kurs Fyzikální biologie, který obor profiluje a je povinným předmětem státní zkoušky. V původním oboru biofyzikální chemie a biotechnologie vychoval tři doktorandy.

V roce 2005 obnovil doc. Štys svou výzkumnou skupinu především s odborníky v oboru kybernetika, elektrické systémy a strojní inženýrství.

Zahájil práce na analýze informačního obsahu experimentu pro biochemii a systémové analýze pro modelování biologické dynamiky založené na experimentu. V tomto oboru vychoval jednoho doktoranda a dalších 9 je v různých stádiích přípravy disertační práce. V letech 2001-2011 (do dubna 2011) publikoval 17 prací v impaktovaných časopisech a jeho práce byly do dubna 2011 citovány 233 x.