

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát disertační práce

**Zdokonalené metody pro snímání obrazových dat a
analýzu tkání a buněk pomocí konfokální a multifotonové
mikroskopie**

**Improved Methods of Image Acquisition and Analysis of
Tissues and Cells by Confocal and Multi-Photon
Microscopy**

Oleksandr Chernyavskiy

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program:Vývojová biologie (P1520).....

Předseda oborové rady:doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

Autor:Oleksandr Chernyavskiy.....

Školitel:RNDr. Lucie Kubínová, CSc.

Školitel konsultant:RNDr. Jiří Janáček, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Souhrn.....	4
Abstract	6
Úvod.....	8
Cíle práce	8
Materiál a metodika.....	9
Výsledky a diskuse	11
Závěry	21
Introduction.....	23
Aims of the study	23
Materials and methods.....	24
Results and discussion	26
Conclusions	36
Použitá literatura / References	37
Seznam publikaci doktoranda / List of Publications of PhD student.....	42

Souhrn

Cílem této práce bylo vyvinout metody a přístupy snímání mikroskopických obrázků konfokální, multifotonovou mikroskopií a jejich kombinací, s následnou analýzou dat umožňující nové způsoby vizualizace a měření biologických tkání a buněčných struktur ve 3D. Zaměřili jsme se na metody, využívající výhod konfokální a multifotonové mikroskopie. Naším dalším cílem bylo ukázat použitelnost neinvazivních přístupů v aplikacích *in vivo*, užitečnost a význam těchto metod pro několik konkrétních biologických aplikací, s důrazem na zdokonalené metody snímání mikroskopických obrázků, analýzu a hodnocení reálných biologických preparátů.

Tato práce nebyla zaměřena na řešení konkrétního biologického problému, ale na metodologický přínos pro několik druhů biologických problémů. Ve výsledku bylo vyvinuto několik pokročilých metod snímání multifotonovou mikroskopií. Tyto metody byly také otestovány na různých biologických preparátech:

- 1) Vyvinuli jsme novou metodu analýzy kvasinkových kolonií pro studium jejich architektury a pro zavedení neinvazivní techniky pro sledování exprese a časově-prostorového uspořádání vybraných proteinů (označených fluorescenčními markery nebo obarvených specifickými barvivy), v podmínkách blízkých přirozeným;

- 2) otestovali jsme možnosti kombinace konfokálního a multifotonového *in vivo* a *ex vivo* snímání experimentálních melanomů u myši;

3) prozkoumali jsme vlastnosti Reinkeho krystalů (u mužů s normální morfologií – kontrolní skupina, a neplodných pacientů s diagnostikovaným kryptorchismem) také pomocí konfokální mikroskopie.

Zdokonalené metody snímání popsané v této práci mohou být aplikovány na různé biologické problémy, jako například neinvazivní studii nedotčených biofilmů nebo in vivo hodnocení kožních nádorů, včetně možných klinických aplikací.

Abstract

The aim of this study was to develop methods and approaches for image acquisition with subsequent image analysis of data, obtained by confocal and two-photon excitation microscopy as well as their combination, enabling new possibilities of visualization and assessment of information on biological tissues and cell structures in 3D and their measurement. We focused on methods that exploited advantages of confocal and multi-photon excitation microscopy. Our further aim was to demonstrate the applicability of non-invasive approach for *in vivo* applications, usefulness and the relevance of these methods in several special biological applications with emphasis on improved image acquisition, analysis and evaluation of real biological specimens.

The present work was not oriented on just one specific biological problem, but rather to methodological contribution to several types of biological problems. Specific 2PE image acquisition technics were developed and applied for studies of specific biologic samples. Earlier impossible investigations were performed for the first time. We tested our optimized procedures in following biological studies:

- 1) We developed new approach to the *in situ* analysis of the intact (whole) yeast microcolonies in order to reveal it's architecture and to implement a non-invasive technique to follow the expression and spatio-temporal distribution of selected proteins (tagged with fluorescent markers or stained with specific dyes), in conditions close to natural ones;

- 2) we investigated possibilities of the combination of the 1PE and 2PE microscopy techniques for *in vivo* and *ex vivo* imaging of the experimental melanoma tissue in the mouse;

3) we investigated the properties of Reinke's crystals in men with the normal morphology of the testis (control group) and infertile patients diagnosed with cryptorchidism by confocal microscopy;

Improved image acquisition approaches described in present work can be applied for different biological problems, such as studies of intact biofilms or in vivo assessment of skin tumours, including possible clinical applications.

Úvod

Vývoj řady metod světelné mikroskopie je založen na pokračujícím rychlém technickém pokroku přístrojů (nové nebo / a vylepšené komponenty strojů apod.), jakož i na stále se rozšiřujícím spektru jejich aplikací. Je přitom důležité využívat nové možnosti správně a účinně, aby to umožňovalo nejenom vizualizaci studovaných mikroskopických struktur, ale také jejich analýzu reprodukovatelným způsobem. Když uvážíme uznání, kterého se dostalo technologickému pokroku v oblasti mikroskopie v podobě udělení Nobelovy ceny za chemii (2014, super-rezoluční mikroskopie), můžeme bez nadsázky říci, že se v oblasti molekulární a buněčné biologie dá očekávat mnoho zajímavých a vzrušujících objevů. Proto jsme v dnešní době svědky renesance světelné mikroskopie, obzvláště po nedávném překonání difrakčního limitu, který byl považován za nepřekonatelnou překážku postavenou na fyzikálních principech [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8].

Cíle práce

Cílem této práce bylo vyvinout metody a přístupy snímání mikroskopických obrázků konfokální a multifotonovou mikroskopií a následnou analýzu dat, , umožňující nové způsoby vizualizace a měření biologických tkání a buněčných struktur ve 3D. Zaměřili jsme se na metody, využívající výhod konfokální a multifotonové mikroskopie. Naším dalším cílem bylo ukázat použitelnost neinvazivních přístupů v aplikacích *in vivo*, užitečnost a význam těchto metod pro několik konkrétních biologických aplikací, s důrazem na zdokonalené metody snímání mikroskopických obrázků, analýzu a hodnocení reálných biologických preparátů.

Materiál a metodika

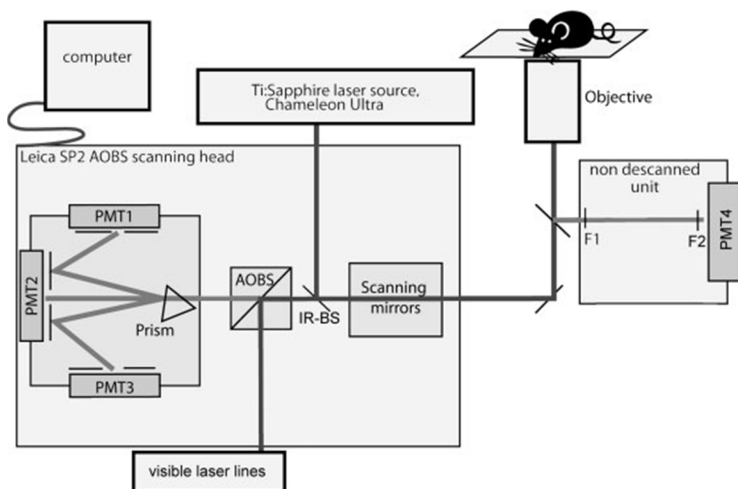
Všechna prezentovaná data byla nasnímana na komerčně dostupném konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu Leica SP2 AOBS MP s akustooptickým rozdělovačem paprsku (AOBS) na základu invertovaného stativu Leica DMIRE2 vybaveném argonovým laserem (458 nm / 5 mW, 476 nm / 5 mW, 488 nm / 20 mW, 514 nm / 20 mW) a dvěma helium-neonovými lasery : zeleným (543 nm / 1.2 mW) a červeným (633 nm / 10 mW) používanými pro konvenční jednofotonovou excitaci. Pro dvoufotonovou excitaci jsme použili Ti:Sapphire (titan-safírový) infra-červený pulsní laser s fixovatelným režimem (mode-locked) Chameleon Ultra (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA), laditelný v rozsahu 690 až 1040 nm s šířkou pulsu 140 fs, napojený na konfokální skenovací hlavu mikroskopu. Pro snímání poměrně velkých zorných polí jsme použili HC PL FLUOTAR 5x suchý objektiv s pracovní vzdáleností (WD) 12.2 mm a numerickou aperturou NA = 0.15 nebo HC PL APO CS 10x suchý planapochromatický objektiv (NA = 0.40, WD = 2.2 mm). Ve většině případů jsme použili planapochromatický objektiv s vodní imerzí HC PL APO CS 20x (NA = 0.7, WD = 250 μ m), který měl obvykle dostatečnou rozlišovací schopnost a poměrně velké zorné pole. Pro snímání buněk v detailech jsme použili planapochromatický objektiv s vodní imerzí HCX PL APO CS 63x (NA = 1.2, WD = 220 μ m). Pro co nejjemnější detaily byl použit planapochromatický objektiv s olejovou imerzí HCX PL APO CS 100x (NA = 1.4, WD = 90 μ m).

Experimentální sestava snímání obrázků je ukázána na Obrázku 1. Nádor po působení mikrovlnovým tepelným zásahem byl umístěn přímo na krycí sklíčko a zvlhčován kapkami stejné tekutiny jako byla použita pro imerze pro objektiv (ve většině případů jsme použili vodu s objektivem na vodní imerzi). Tak se zabránilo poškození preparátu usycháním, dosáhlo se homogennějšího přiléhání preparátu ke sklu, a byly sníženy možné optické aberace. Podobná

procedura byla použita na podkožní stranu ořezané části kůže, kterou jsme použili jako kontrolu, a pro čerstvé vzorky. Jak je uvedeno na Obrázku 1, mikroskopické obrázky byly nasnímány pomocí následujících způsobů:

i) 3-kanálovým konfokálním detektorem s flexibilně nastavitelnou spektrální detekcí, často se současným snímáním spektrálně rozlišené fluorescence;

ii) „non-descanned“ (přímý) detektor s fotonásobiči; ve většině případů– pomocí jednocanálového snímání signálu s využitím LP700 a BP430/24 (Chroma Technology Corporation) optických filtrů pro signál SHG s použitím IČ pulsního laseru Chameleon Ultra nastaveného na 860nm, příležitostně se současnou dvoukanálovou detekcí spektrálně rozlišených kanálů pomocí standartního filtr-bloku firmy Leica Microsystems s dichroickým zrcátkem SP700 a pásmovými filtry BP525/50 a BP610/75 používanými pro detekci signálu v zelené a červené spektrální oblasti.



Obrázek 1. Schematické zobrazení experimentální sestavy.

Výsledky a diskuse

Tato práce nebyla zaměřena na řešení konkrétního biologického problému, ale na metodologický přínos pro několik druhů biologických problémů. Ve výsledku bylo vyvinuto několik pokročilých metod snímání. Tyto metody byly také otestovány na několika různých biologických preparátech a ukázaly se jako výrazně přínosné pro řadu výzkumných projektů, jejichž výsledky byly publikovány v uznávaných mezinárodních časopisech.

Architektura vyvíjející se multibuněčné kvasinkové kolonie: časově prostorová exprese exportéru amonia Ato1p

Kvasinky vyrůstající na pevných površích vytvářejí organizované multibuněčné struktury, ve kterých se buňky diferencují a mají tak různé funkce a zažívají rozdílný osud. Pro porozumění principů zapojených do tvarování těchto struktur je třeba nových přístupů umožňujících studium individuálních buněk přímo na místě bez porušení přirozené struktury kolonií. Konfokální mikroskopie je považována za vhodnou metodu pro takové studium.

Při vývoji správného použití metodiky konfokálního snímání spočíval hlavní problém v poměrně nízké hloubce průniku laserového paprsku do kolonie, vzhledem k nízké průhlednosti kvasinkových buněk, které mají opticky husté buněčné stěny. To způsobilo rychlý pokles detekované intenzity signálu v hlubších vrstvách buněk, který se stal hlavním limitujícím faktorem při použití konvenční (jednofotonové) konfokální mikroskopie pro studia in situ.

Předpokládali jsme, že dva přístupy – shora (top-view), nebo ze spodní části (bottom-view) kvasinkových kolonií by nám umožnilo analyzovat hlubší vrstvy. Překvapivé bylo, že horní (top-view) a dolní (top-view) konfokální skenovací mikroskopie daly zcela odlišné obrázky. Pro dokončení přehledu architektury kvasinkové kolonie jsme připravili svislý příčný řez střední části kolonií (Obrázek 1c). Následné snímání tohoto vzorku odhalilo boční pohled na mikrokolonii.

Na rozdíl od 1PE konfokální mikroskopie, která nám pouze umožnila pozorovat vnější vrstvu kvasinek buněk, 2PE přístup nám umožnil také získat fluorescenční signál z několika vnitřních vrstev, bez poškození struktury této části kolonií. Proto jsme se ve všech pokusech uvedených v dané práci zaměřili výhradně na 2PE mikroskopii.

Nový přístup nám umožnil sledovat přítomnost a prostorovou polohu fluorescenčně značených proteinů, jakož i struktur obarvených specifickými (selektivními, těmi co se selektivně vážou na konkrétní proteiny) fluorescenčními barvivy v mikrokolonii *S. cerevisiae* s použitím dvou-fotonové (2PE) konfokální mikroskopie. Nová technika nám umožnila odhalit prostorové rozmístění buněk produkujících Ato1p transmembránový protein ve vyvíjející se kvasinkové mikrokolonii.

Navíc jsme ukázali, jak může být profil produkce (exprese) proteinu Ato1p ovlivněn vývojem kolonií nebo přítomností sousedních kolonií. Kromě toho jsme ukázali, že buňky nacházející se v povrchové vrstvě mikrokolonii *S. cerevisiae* jsou pevně propojeny přes tlusté buněčné stěny a tvoří tenkou ochrannou buněčnou vrstvu, která blokuje pronikání škodlivých látek. Buňky tvořící vrstvy jsou pevně spojeny přes buněčné stěny, jejichž přítomnost je nezbytná pro udržení funkce ochranné vrstvy. Zobrazení kolonie z různých úhlů nám umožnilo rekonstruovat trojrozměrné profily buněk produkujících prenašeče amonia Ato1p v rozvíjejících se mikrokoloniích rostoucích buď osamoceně, nebo v rámci skupiny mikrokolonii.

Zjištění, že 2PE konfokální mikroskopie poskytuje mnohem více informací o struktuře kolonií při pozorování buď ode dna nebo ze strany do struktury mikrokolonie také znamená zajímavou možnost použití podobné metody pro vyšetřování jiných mikrobiálních mnohobuněčných společenstev, včetně přírodních biofilmů. Naše nové přístupy by mohly také přispět k novým poznatkům o těchto strukturách a k rekonstrukci časoprostorových změn v přítomnosti určitých proteinů spojených s diferenciací buněk, stejně jako ostatních změn, které mohou odhalit specifika buněk umístěných na jednotlivých pozicích v mikrobiálních mnohobuněčných strukturách.

Byl tedy vyvinut nový přístup k analýze neporušených celých mikrokolonií kvasinek. 2PE přístup umožnil odhalení architektury mikrokolonií. Tato neinvazivní metoda navíc umožnila studie exprese a prostorově časového rozložení vybraných proteinů (označených fluorescenčními značkami nebo obarvených specifickými barvami) v přirozených podmínkách.

Flo11p, drug efflux čerpadla a extracelulární matrix se spolupodílejí na formování biofilmů kvasinkových kolonií

Stejně jako jiné mikroorganismy, nedomestikované kvasinky přednostně tvoří povrchově spojená společenstva, zejména biofilmy a kolonie, která jsou dobře chráněna proti nepříznivému prostředí, a pokud se vyvinou jako patogeny – před imunitním systémem hostitele. Nicméně, molekulární mechanismy, z nichž vychází časoprostorový rozvoj a odolnost vůči prostředí biofilmu a kolonie, zůstávají z velké části neznámé.

Zásady vývoje, odhalené v této studii, poskytují nové pohledy na diferenciaci biofilmu kolonie a funkce specializovaných buněčných subpopulací, a naznačují také přítomnost unikátních mechanismů ochrany kolonií. Kolonie

vznikla z jediné buňky, roste velmi rychle, protože většina buněk se účinně dělí. Na rozdíl od hladkého laboratorního kmene kolonie, kolonie tvořící biofilm se také podstatně rozšiřuje ve svislém směru. Toto rozšíření může být umožněno propojením jejích buněk připomínajícím suchý zip. Zpočátku se kolonie populace chrání před vnějšími chemickými hrozbami vyvoláním MDR přenašečů, které jsou schopné odstranit toxické sloučeniny [9]. Později aktivita přenašečů přetrvává výhradně ve vrstvách buněčného povrchu po celé kolonii, a současně jsou zapojeny další strategie ochrany. Horní vrstvy buněk z nadzemních částí kolonie zůstávají v klidu a jsou tak více odolné vůči chemické hrozbě a dalším hrozbám. Vzhledem k tomu, že živiny z agaru jsou účinně transportovány, tvorba takových nedělicích se buněk je, jak se zdá, nejen důsledkem vyčerpání živin, ale pravděpodobněji jde o regulovaný proces, který pomáhá chránit povrch kolonie, který je přímo vystaven vnějšímu prostředí. Současně začnou vnitřní buňky v blízkosti agaru produkovat ECM.

Zachování spojů připomínajících suchý zip pak přispívá k mechanické stabilitě rozšiřující se kolonie a vrstvy mohou získávat vrstvy flexibilitu, tvořící vzdušné vrásky s vnitřními dutinami. Následné buněčné generace tvořené vnitřními dělicími buňkami této vrstvy jsou tak dobře chráněny. Buňky ve vnitřní spodní části hřbetu a pseudohyfy v podpovrchových koloniích regiony nevstupují do stacionární fáze. Spíše pokračují ve výrobě ECM, která je nepropustná pro některé malé sloučeniny, jako je galaktóza, a až škodlivých chemických látek, jako jsou ionty mědi.

Následující generace buněk tvarované dělicími se vnitřními buňkami těchto vrstev jsou tak dobře chráněny. Buňky ve vnitřní spodní části hřebene a pseudohyfy z podpovrchové části kolonií nevstupují do stacionární fáze. Spíše pokračují v produkování extracelulární matrix (či mezibuněčné hmoty, ECM), která je nepropustná pro některé malé sloučeniny jako například galaktosa, a také pro škodlivé látky jako jsou ionty mědi. Jenom pseudohyfy vyčnívají z

ECM, ale ty jsou chráněny pumpami MDR. Tyto špičky mohou fungovat jako sensory výživy a také jiných stimulů prostředí, které jsou důležité pro kolonii. Zůstává otázkou, jaká je chemická podstata ECM a jak zakořeněné buňky dostávají výživu nezbytně nutnou pro jejich růst. Bylo již prokázáno, že ECM různých mikroorganismů fungují jako nasakovací houby, které obstavují organické molekuly v blízkosti buněk a také vážou a obstavují léčiva. ECM kvasinkových kolonií se může lišit svým obsahem polymerních a monomerních karbohydrátů, proteinů a fosfátů, a také je přednostně spásána nálevníky, což předpokládá, že ECM má výživnou hodnotu. Vyslovujeme tudíž hypotézu, že v biofilmové kolonii samotná ECM může fungovat jako sekvestrační bariéra a zásobárna výživných látek důležitých pro vznik nových buněk uvnitř dutin.

Závěrem, dynamika vývoje kvasinkových mikrokolonií byla studována metodami dvoufotonové konfokální mikroskopie v kombinaci s využitím metod fluorescenčních markerů a barvení. Odhalili jsme specifickou architekturu biofilmové kolonie, umožňující mnohonásobnou ochrannou strategii, přinášející vysokou úroveň rezistence v přirozených podmínkách. Je důležité, že některé rysy kolonií, které jsme předvedli v této práci (jako např. specifický profil rostoucích buněk, produkce ECM a sekreční pumpy) jsou specifické také pro formování složitých houbových biofilmů. Strukturovaná kvasinková kolonie proto představuje jasně definovaný a výkonný modelový systém *in vivo*, který může pomoci odhalit obecné principy tvarování mikrobiotických biofilmů.

Zobrazování experimentálních melanomů v myši *in vivo* a *ex vivo* pomocí kombinací konfokální a nelineární mikroskopie

Pro získání dostatečně informativních obrázků nebarvených nádorových tkání a jejich změn po hypertermální léčbě (hyperthermia treatment, HT) jsme zkoumali možnosti

snímání pomocí kombinace jedno- a dvoufotonové excitační mikroskopie (1PE a 2PE) pro vyšetření experimentálních melanomů *in vivo*, v myších při obecné anestezii, a *ex vivo* na čerstvě získaných vzorcích. Zkoumali jsme strukturu experimentálních melanomů a porovnávali ji s normální tkání ze stejného zvířete s využitím konfokálních a nelineárních přístupů, založených na (i) jednofotonové excitační mikroskopii (1PE), (ii) 1PE reflektanci, (iii) generování druhé harmonické (SHG) a (iv) dvoufotonové excitační (2PE) autofluorescenci.

V této studii přinesly různé způsoby snímání různé, často komplementární informace o histologii zkoumaných tkání. Zvláštní důraz byl kladen na vizualizaci nebarvených vzorků, pomocí 1PE (jednofotonová fluorescence a reflectance) a 2PE (včetně SHG zobrazování a dvoufotonové excitační autofluorescence).

Byly hodnoceny změny struktury myšího podkožního melanomu po léčbě indukovanými mikrovlnami vysokých teplot (MWH). Analýza byla založena na obrázcích pořízených na čerstvě získaných tkáních experimentálního nádoru pomocí 1PE modu pomocí excitační vlnové délky 488nm. Nádory byly získány z neošetřeného kontrolního zvířete nebo s načasováním (30 minut a 5 hodin po HT).

Nejprve byly předzpracovány šedotónové obrázky. Obrázky byly vyhlazeny Gaussovým filtrem se směrodatnou odchylkou $\sigma = 1.5 \mu\text{m}$ pro snížení úrovně šumu na obrázcích a pozadí bylo odstraněno použitím top-hat Lipschitzova filtru. Pro hodnocení granularity (buněčné agregace) tkání melanomu jsme změřili maximální Eulerovu-Poincarého charakteristiku (χ_{max}). Za tímto účelem byla vypočtena Eulerova-Poincarého charakteristika binárních obrázků získaných prahováním šedotónových obrázků pro hodnoty prahování v rozsahu od 0 do 255, a byla stanovena maximální hodnota, určující χ_{max} . Tento parametr byl vhodný pro analýzu morfologické struktury melanomu, jako např. stlačování buněk,

kdy se formují větší agregáty, což vede ke snižování hodnoty parametru χ_{\max} .

Tabulka 1. Maximální Eulerova-Poincarého charakteristika (χ_{\max}) změřená na obrázcích získaných reflektancí 1PE pomocí excitační vlnové délky 488 nm, z nádorové tkáně experimentálního melanomu odebrané před léčbou MWHT, 3 minuty a 5 hodin po zásahu MWHT. Jsou uvedeny hodnoty změřené pro 6 obrázků každé skupiny, a jejich směrodatné odchylky (SD). Data byla ohodnocena jednofaktorovým ANOVA a post hoc Newmanovými-Keulsovými testy. Byl zaznamenán významný rozdíl pro všechny páry skupin na 5% úrovni signifikance.

Image number	χ_{\max} (before HT treatment)	χ_{\max} (30 min after HT treatment)	χ_{\max} (5 hours after HT treatment)
1	1586	890	650
2	1131	672	474
3	1227	527	715
4	1151	885	790
5	1072	1239	315
6	1128	664	321
Mean	1216	813	544
SD	188	252	204

1PE reflektance se ukázala být dobře aplikovatelná na nebarvené čerstvé tkáně, a umožňuje zřetelnou vizualizaci různých vrstev kontrolních tkání a kapsul melanomu do

hloubky 70 μm od povrchu řezu. Byli jsme schopni touto metodou zaznamenat významné rozdíly po zásahu HT v porovnání s neošetřenou tkání, což nám přineslo sadu obrázků vhodných ke kvantitativní analýze morfologie nádoru, jak je uvedeno v Tabulce 1.

Vyzkoušeli jsme tedy různé spektrální podmínky a ostatní nastavení parametru snímání, stejně jako kombinace výše zmíněných modů, za účelem plného využití potenciálu těchto metod pro hodnocení morfologií ošetřených a neošetřených nádorových tkání.

Byli jsme schopni prokázat touto metodou významný rozdíl po HT ošetření v porovnání s neošetřenými tkáněmi. SHG mikroskopie se ukázala být velmi vhodnou metodou pro zobrazování kolagenových vláken v čerstvých vzorcích tkání bez jakéhokoli barvení vzhledem k vysoké specifitě, jak uvedlo několik autorů. Podle našeho názoru má tato metoda obrovský potenciál pro neinvazivní snímání *in vivo* jak pro experimentální zvířata, tak i pro klinické aplikace.

Na závěr jsme pro zobrazování nádorových struktur (*ex vivo* a *in vivo*) použili kombinace 1PE a 2PE mikroskopie, nabízené simultánní aplikací konfokální a nelineární mikroskopie v několika režimech snímání. Prokázali jsme, že podobný komplexní přístup zvyšuje významnost informace o mikroskopických strukturách, ulehčuje hodnocení vzájemných souvislostí mezi funkčními a morfologickými aspekty založenými na měřitelných optických vlastnostech tkání. Navíc to umožnilo studium sítí kolagenových vláken a identifikaci invazivních nádorových buněk, a zvyšuje tímto způsobem schopnosti diagnostikování. Takový přístup byl aplikován pro *in vivo* hodnocení experimentálních nádorů poprvé a je velmi slibný pro studia na lidech a pro klinické aplikace.

Vizualizace Reinkeho krystalů v normálních a kryptorchidních varlatech

Objevené a popsané Reinkem [10], nacházejí se tyto krystaly jenom u mužů s aktivní spermatogenezí a produkcí testosteronu. Kromě toho, že tyto krystaly jsou normální součástí lidských Leydigových buněk, o jejich funkčním významu je velmi málo známo.

Cílem této studie bylo prozkoumat vlastnosti Reinkeho krystalů u mužů s normální morfologií varlete (kontrolní skupina) a neplodných pacientů s diagnózou kryptorchismu. Bylo použito 20 biopsií od neplodných pacientů a 6 biopsií od mužů s pravidelnou spermatogenezí ve věku 20 až 30 let.

Reinkeho krystaly mohou být velmi užitečné při diagnóze nádoru Leydigových buněk, protože jejich přítomnost je patognomická (typická) pro identifikaci podobných nádorů.

Prostorová 3D rekonstrukce Reinkeho krystalu byla založena na sérii konfokálních obrázků zpracovaných dekonvolucí pomocí softwarového balíčku Hyugens Professional (SVI.nl) s využitím algoritmu 'quick maximum likelihood estimation' (QMLE) a experimentálně nasnímanými funkcemi rozmazání obrazu (point spread function, PSF). Následně byly 3D obrázky vyhlazeny Gaussovým filtrem a segmentovány prahováním s případnými manuálními korekcemi v programovém prostředí Ellipse. Nakonec byly vygenerovány triangulační isopovrchy segmentovaných krystalů a jejich zobrazení .

Reinkeho krystaly obarvené HE metodou byly snadno rozpoznatelné pomocí konfokální mikroskopie kvůli eosinem indukované fluorescenci krystalů. Rutinní HE preparáty s tloušťkou 7 μm se ukázaly být vhodnými. Konfokální mikroskopie prokázala různý vzhled krystalů: některé byly malé o velikosti 0.2-1 μm ; velikost ostatních dosahovala několika mikrometrů. Některé byly výjimečně velké, dosahující 10–12 μm . Mikroskopie v procházejícím světle nebyla schopna poskytnout přesná data ohledně okrajů krystalů,

konfokální obrázky detekovaly jejich polygonální formu a navzájem souběžné okraje. Navíc, po dekonvoluci pro zvyšování rozlišení konfokálních obrázků se polygonální forma stala mnohem ostřejší a připomínající obrázky získané transmisí elektronovou mikroskopií (TEM). Na základě série obrázků 3D byla možná rekonstrukce krystalů.

Obecně nebyl nalezen rozdíl ve vzhledu a jiných morfologických rysech krystalů mezi kontrolní skupinou a kryptorchidními vzorky, až na četnost krystalů, které se hojně vyskytovaly ve vzorcích od pacientů s kryptorchismem.

Na závěr jsme zanalyzovali Reinkeho krystaly ve vzorcích normálních kryptorchických varlat pomocí mikroskopií v procházejícím světle, konfokální a TEM, a stereologií. Všechny výše zmíněné metody byly užitečné pro vizualizaci krystalu. Stereologická analýza stanovila zvětšený počet krystalů v kryptorchických vzorcích. Optimální tloušťka vzorku 70 až 300 nm je prokazatelně optimální pro krystalografickou analýzu biokrystalu.

Konfokální mikroskopie se ukázala jako vhodná pro hodnocení formy a 3D rekonstrukce krystalu. TEM analýza potvrdila hexagonální formu krystalu, zatímco krystalografická data získaná na řezech tloušťky 70 až 300 nm umožnila lepší pochopení organizace krystalické mřížky. Stereologická analýza odhalila významné zvětšení počtu krystalů v kryptorchických varlatech v porovnání s kontrolní skupinou. Zvětšený počet krystalů v kryptorchických vzorcích vede k závěru, že prodloužené vystavení vysokým (břišním) teplotám může stimulovat enzymy zapojené do syntézy proteinu krystalu. Přesná molekulární povaha krystalické mřížky zůstává nicméně nejasná pro normální a kryptorchidní varle. 3D rekonstrukce krystalu ukázala, že velké krystaly jsou občas doprovázeny několika menšími. Mikroskopické metody se osvědčily při vizualizaci krystalů.

Vlastnosti Reinkeho krystalů (u mužů s normální morfologií – kontrolní skupina, a neplodných pacientů s

diagnostikovaným kryptorchismem) byly zkoumány konfokální mikroskopií. Na základě konfokálních sérií obrázků (po komplikovaném zpracování obrázků) byla vytvořena 3D rekonstrukce krystalů. Konfokální mikroskopie pomohla při identifikaci morfologického rysu krystalů, obzvláště jejich formy a uspořádání uvnitř Leydigových buněk. Vzájemná 3D orientace byla stanovena po zpracování obrázku, které zvýšilo rozlišení konfokálních obrázků. Konfokální mikroskopie s následným zpracováním pomocí dekonvolučních metod s následnou vizualizací může proto zaplnit mezeru mezi TEM a konvenční světelnou mikroskopií s následným zpracováním obrázku.

Závěry

Na závěr, byly vyvinuty konkrétní metody 2PE snímání a aplikovány pro studium biologických vzorků. Byla poprvé provedena dříve neproveditelná vyšetření. Kvantitativní hodnocení se proměnila v kvalitativní objevy. Otestovali jsme naše optimalizované metody v následujících biologických projektech:

1) Vyvinuli jsme novou metodu analýzy kvasinkových kolonií pro studium jejich architektury a pro zavedení neinvazivní techniky pro sledování exprese a časově prostorového uspořádání zvolených proteinů (označených fluorescenčními markery nebo obarvených specifickými barvami), v podmínkách blízkých těm přirozeným;

2) otestovali jsme možnosti kombinace 1PE a 2PE in vivo a ex vivo snímání experimentálních melanomů u myši;

3) prozkoumali jsme vlastnosti Reinkeho krystalů (u mužů s normální morfologií – kontrolní skupina, a neplodných pacientů s diagnostikovaným kryptorchismem) pomocí konfokální mikroskopie.

Zdokonalené metody snímání popsané v této práci mohou být aplikovány na různé biologické problémy, jako například neinvazivní studii nedotčených biofilmů nebo in vivo hodnocení kožních nádorů, včetně možných klinických aplikací.

Introduction

Development of a variety of optical microscopic techniques is based on ongoing fast improvement as to the technical advances (new and/or improved HW components, etc.) as well as the ever broadening scope of their applications. It is important to exploit the new possibilities correctly and efficiently, enabling not only visualization of microscopic structures of interest, but also their analysis in a reproducible way. Keeping in mind the recognition of technological progress in super-resolution light microscopy by the Nobel Prize in chemistry (2014), it would be no exaggeration to say that we can expect many interesting findings and exciting discoveries in molecular and cell biology. So, nowadays we are witnessing the renaissance of the light microscopy, especially after recent surpassing the diffraction limit, which seemed to be the unbeatable physical limitation [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8].

Aims of the study

The aim of this study was to develop methods and approaches for image acquisition with subsequent image analysis of image data, obtained by confocal and two-photon excitation microscopy as well as their combination, enabling new possibilities of visualization and assessment of information on biological tissues and cell structures in 3D and their measurement. We focused on methods that exploited advantages of confocal and multi-photon excitation microscopy. Our further aim was to demonstrate the applicability of non-invasive approach for in vivo applications, usefulness and the relevance of these methods in several special biological applications with emphasis on

improved image acquisition, analysis and evaluation of real biological samples.

Materials and methods

All presented data were obtained on commercially available confocal laser scanning microscope Leica SP2 AOBS MP with acousto-optical beam splitter (AOBS) based on a Leica DM IRE2 inverted microscope and equipped with an argon laser (458 nm / 5 mW, 476 nm / 5 mW, 488 nm / 20 mW, 514 nm / 20 mW) as well as two HeNe lasers: green (543 nm / 1.2 mW) and red one (633 nm / 10 mW) used for 1PE experiments. For 2PE excitation, we used a mode-locked Ti:Sapphire Chameleon Ultra laser (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA), tunable from 690 nm to 1040 nm with the pulse width of 140 fs, coupled to the confocal scanning head of the microscope. For the acquisition of relatively large field of view, an HC PL FLUOTAR 5x dry objective with a WD of 12.2 mm and an NA of 0.15 or an HC PL APO CS 10x dry planapochromat objective (WD = 2.2 mm, NA = 0.40) were used. In most cases we used an HC PL APO CS 20x water immersion planapochromat objective (WD = 250 μ m, NA = 0.7), often yielding sufficient resolution while offering a relatively large field of view. For imaging cell details we used an HCX PL APO CS 63x water immersion planapochromat objective (WD = 220 μ m, NA = 1.2). When the highest possible resolution was required, the HCX PL APO CS 100x NA = 1.4 oil immersion objective (WD = 90 μ m) was used.

The experimental setup of image acquisition is shown for the special case of melanoma imaging in Figure 1. The previously exposed tumour was directly placed on the cover slip glass, and maintained humid by drops of the same liquid used for the microscope objective (in most

cases we used water with water immersion objective). Thus, the damage by drying was avoided, more homogeneous adhesion to the glass was achieved, and possible optical aberrations were reduced. A similar procedure was applied for imaging the subcutaneous side of the skin flap, which was used as a control, and for the fresh samples. As indicated in Figure 1, the microscopic images were acquired in the following imaging modes:

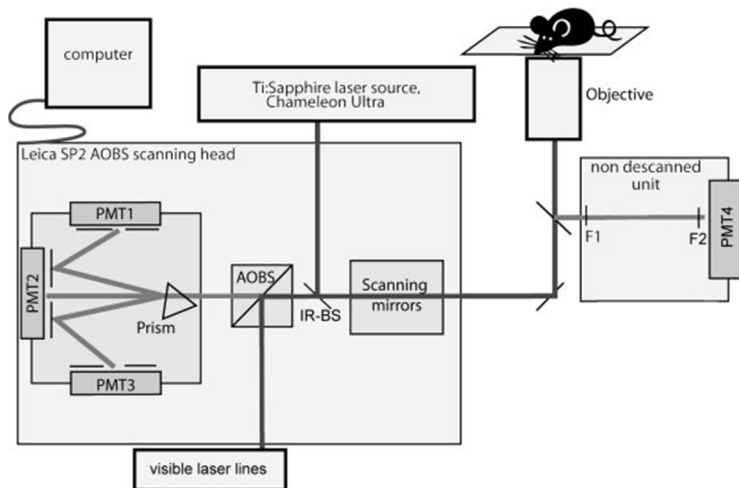


Figure 1. Schematic view of experimental setup. Confocal laser scanning microscope Leica SP2 AOBS was coupled with IR-pulsed laser Chameleon Ultra for two-photon excitation. In the presented setup, the living mouse, under general anaesthesia, lays on a cover slip glass placed on the stage of the inverted microscope, with the tumour exposed by dissecting and removing a skin flap.

i) 3-channel descanned confocal detector with flexibly tuneable spectral detection, often by simultaneous detection of spectrally resolved fluorescence;

ii) non-descanned PMT detector; in most cases – by single spectral channel detection of the signal with LP700 and BP430/24 (Chroma Technology Corporation) optical filters for the SHG signal with IR pulsed laser Chameleon Ultra at 860 nm, in some cases – by simultaneous 2-channel detection of the spectrally resolved fluorescence signal by the standard Leica filtercube with SP700 dichroic mirror and BP525/50 and BP610/75 band-pass emission filters used for green and red light detection respectively.

Results and discussion

The present work was not oriented on just one specific biological problem, but rather to methodological contribution to several types of biological problems. As a result, several advanced image acquisition modes were developed. Also, these approaches were tested on several different biological objects. Several research projects benefited substantially, and results were published in impacted international journals.

Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter

Yeasts, when growing on solid surfaces, form organized multicellular structures, colonies, in which cells differentiate and thus possess different functions and undergo dissimilar fate. Understanding principles involved in the formation of these structures requires new approaches that allow the study of individual cells directly in situ without needing to remove them from the microbial community. Confocal microscopy was considered as a suitable technique for these studies.

When developing a proper application of confocal microscopic technique, the main problem was connected with

the rather low penetration depth of the laser beam into the colony, due to the low transparency of yeast cells covered by optically dense cell wall. This caused a rapid decrease of the detected signal intensity in deeper cell layers, which became the main limiting factor of the *in situ* usage of confocal microscopy approach.

We supposed that two approaches – from the top (top-view) or from the bottom (bottom-view) of the yeast colony would allow us to analyze the deeper layers. Surprisingly, the top and bottom confocal microscopy scanning gave a completely different picture. To complete the view of the colony we prepared a sample of the vertical section of the microcolony by cutting it down the middle (side-view of a colony).

In contrast to 1PE confocal microscopy, which only allowed us to observe the outermost surface cell layer of the yeast, the 2PE approach enabled us to also obtain a fluorescent signal from several internal layers without damaging the cells. In all experiments described in this paper, we therefore focused exclusively on the 2PE confocal microscopy approach.

The new approach enabled us to monitor the presence and spatial location of fluorescently labelled proteins as well as structures stained with specific fluorescent dyes within *S. cerevisiae* microcolonies by use of two-photon excitation (2PE) confocal microscopy. The new technique allowed us to reveal spatial location of cells producing the transmembrane protein Ato1p within developing yeast microcolonies. Moreover, we show how the Ato1p production pattern can be influenced by colony development or by the presence of neighbouring colonies. In addition, we show that cells located in surface layer of *S. cerevisiae* microcolonies are tightly joined via thick cell wall and form a thin protective cell layer which blocks penetration of harmful compounds. The cells forming the layer are tightly connected via cell walls, the presence of which is essential for keeping protective layer

function. Viewing the colonies from different angles allowed us to reconstruct a three-dimensional profile of the cells producing ammonium exporter Ato1p within developing microcolonies growing either as individuals or within a group of microcolonies. We show that neighbouring microcolonies coordinate production of Ato1p-GFP. Ato1p itself appears synchronously in cells, which do not originate from the same ancestor, but occupy specific position within the colony.

The finding that 2PE confocal microscopy provides much more information on colony structure when observing it either from the bottom or from the side into the structure also indicates an interesting possibility of using similar method for investigation of other microbial multicellular communities including natural biofilms. So our new approaches could also contribute to new insights on these structures and to the reconstruction of spatio-temporal changes in the presence of particular proteins connected with cell differentiation as well as other changes, which can reveal specificities of cells located at particular positions within microbial multicellular structures.

To conclude, new approach to the analysis of the intact (whole) yeast microcolonies was developed. The 2PE approach allowed revealing architecture of microcolonies. Also, this non-invasive technique enabled studies of the expression and spatio-temporal distribution of selected proteins (tagged with fluorescent markers or stained with specific dyes) in natural conditions.

Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies

Much like other microorganisms, wild yeasts preferentially form surface-associated communities, such as biofilms and colonies, that are well protected against hostile environments

and, when growing as pathogens, against the host immune system. However, the molecular mechanisms underlying the spatiotemporal development and environmental resistance of biofilms and colonies remain largely unknown.

The developmental principles, revealed in this study, provide new insights into the differentiation of a biofilm colony and the function of specialized cell subpopulations, and they suggest the presence of unique mechanisms of population protection. A colony arising from a single cell grows very quickly, as most cells efficiently divide. In contrast to a smooth laboratory strain colony, biofilm colony also expands substantially in the vertical direction. This expansion may be enabled by the velcrolike interconnection of its cells. Initially, the colony population protects itself from external chemical threats by inducing MDR exporters, capable of removing toxic compounds [9]. Later, the activity of the exporters persists exclusively in the surface cell layers over the entire colony, and, in parallel, additional protection strategies are initiated. The upper cell layers of the aerial part of the colony become stationary and thus more resistant to chemical and other threats. As the nutrients from agar are efficiently transported, the formation of such nondividing cells appears to be not simply the result of nutrient exhaustion but, more likely, a regulated process that helps to protect the colony surface that is directly exposed to the open air. In parallel, the internal cells near the agar begin to produce the ECM. The preservation of the velcrolike joints then contributes to the mechanical stability of the expanding colony and may lend flexibility to the layer, forming aerial wrinkles with internal cavities. Subsequent cell generations formed by the dividing inner cells of that layer are thus well protected. The cells in the inner bottom part of the ridge and the pseudohyphae in the subsurface colony regions do not enter a stationary phase. Rather, they continue to produce the ECM that is impermeable to some small compounds such as galactose and to harmful chemicals such as copper ions. Only the pseudohyphae tips protrude from the ECM, but these are still protected by the MDR exporters. The tips may function as the sensors of

nutrients and other environmental stimuli important to the colony. The questions remain as to what the chemical nature of the ECM is and how the embedded cells access the nutrients that are essential for their growth. It was previously shown that the ECMs of various microorganisms function as sorptive sponges that sequester organic molecules close to the cells [10] and that they also bind and sequester drugs [11]. Yeast ECMs vary by their content of different polymeric and monomeric carbohydrates, proteins, and phosphorus [12] and are even preferentially grazed by ciliates [13], suggesting that ECMs have nutritional value. Thus, we hypothesize that in the biofilm colony, the ECM itself may function both as a sequestration barrier and a nutrient pool essential for new cell progeny within the cavities.

In conclusion, the dynamics of the yeast microcolonies development was studied by means of 2PE confocal microscopy in combination with fluorescent protein tagging and staining methods. We revealed specific architecture of the biofilm colony that enables multiple protection strategies, yielding a high level of resistance in the wild. Importantly, some of the colony features that we have shown here (e.g., a specific growth pattern, the production of the ECM, and drug efflux pumps) are the traits that are also implicated in the formation of complex fungal biofilms [14]. Thus, the structured yeast colony represents a well-defined and powerful *in vivo* model system that may help to uncover the underlying general principles of microbial biofilm formation.

Imaging of mouse experimental melanoma *in vivo* and *ex vivo* by combination of confocal and nonlinear microscopy

In order to obtain sufficiently informative images of unstained tumour tissues and their modifications after hyperthermia treatment (HT), we investigated possibilities of the combination of the one- and two-photon excitation

microscopy (1PE and 2PE accordingly) for examination of the experimental melanoma tissue *in vivo*, in mice under general anaesthesia, and *ex vivo* on freshly harvested specimens. The mouse experimental melanoma structure was studied and compared with normal tissue from the same animal by using confocal and nonlinear microscopy techniques based on (i) one-photon excitation (1PE) fluorescence, (ii) 1PE reflectance, (iii) second harmonic generation (SHG) imaging, and (iv) two-photon excitation (2PE) autofluorescence.

In the present study, the various imaging modes brought different and often complementary information on the histology of tissues under study. The special emphasis has been made to visualizing unstained specimens, by 1PE (one-photon excited fluorescence and reflectance) and 2PE (including SHG imaging and two-photon excited autofluorescence).

The changes in structure of mouse subcutaneous melanoma after microwave-induced HT were evaluated. The analysis was based on images acquired from fresh tissue of the experimental melanomas in 1PE reflectance mode, using the excitation wavelength of 488 nm. Tumours were obtained from untreated control mice or at a scheduled time after the HT treatment (either 30 minutes or 5 hours after HT). First, we preprocessed the greyscale images. The images were smoothed by Gaussian filter with standard deviation $\sigma = 1.5 \mu\text{m}$ to decrease the level of noise in the images, and the image background was removed using a top-hat Lipschitz filter [15]. For evaluation of the “granularity” (cell aggregation) of melanoma tissue, we measured the maximum Euler-Poincaré characteristic (χ_{max}). For this purpose, the Euler-Poincaré characteristic (i.e., the connectivity number [16]) of binary images obtained by thresholding of the greyscale image was calculated for thresholds ranging from 0 to 255 and the maximum value, determining χ_{max} , was found. This parameter was suitable for analysis of melanoma morphological structure, reflecting e.g. clamping of cells, when larger aggregates were formed, leading to a decrease in χ_{max} .

The 1PE reflectance mode proved to be well applicable to unstained fresh tissues, allowing clear visualization of different layers both in the control skin flap and in the melanoma capsule up to the depth of 70 μm from the specimen surface. We were able to find valuable differences after the HT administration in comparison with untreated tissues by this technique, which provided us with images suitable for quantitative analysis of tumour morphology, as demonstrated in Table 1.

Thus, we checked different spectral conditions and other settings of image acquisition, as well as combinations of the above imaging modalities, to fully exploit the potential of these techniques in the evaluation of treated and untreated cancer tissue morphology.

We were able to find significant differences after the HT administration in comparison with untreated tissues by this technique, which provided us with images suitable for quantitative analysis of tumour morphology, as demonstrated in Table 1. The SHG imaging microscopy proved to be very suitable for detecting collagen fibers in our fresh tissue samples without any staining, considering the high specificity of SHG imaging microscopy for detection of fibrillar collagen (i.e., collagen type I), as demonstrated by several authors [17], [18], [19]. We believe such approach has a significant potential for non-invasive *in vivo* imaging both for experimental models on animals and humans.

Table 1. Maximum Euler-Poincaré characteristic (χ_{max}) measured in the images acquired in 1PE reflectance mode, using the excitation wavelength of 488 nm, from tumor tissue of the experimental melanomas, excised before HT treatment, 30 min after HT treatment, and 5 h after HT treatment. Measured values for six images per group, their mean, and standard deviation (SD) are shown. The data were evaluated by one-way ANOVA and Newman-Keuls post hoc test. There

were found significant differences between all pairs of groups at 5% significance level.

Image number	χ_{\max} (before HT treatment)	χ_{\max} (30 min after HT treatment)	χ_{\max} (5 hours after HT treatment)
1	1586	890	650
2	1131	672	474
3	1227	527	715
4	1151	885	790
5	1072	1239	315
6	1128	664	321
Mean	1216	813	544
SD	188	252	204

In conclusion, for imaging cancer structures (both ex vivo and in vivo), we have used the combination of the 1PE and 2PE microscopy, offered by simultaneous application of confocal and nonlinear optical microscopy techniques in several acquisition modes. We have shown that such complex approach increased the level of information on the microscopic structures, facilitated the examination of interrelationships between functional and morphological aspects based on measurable optical properties of the tissues. Moreover, it enabled study of the collagen fibre network in relation to other tissues, and to identify invasive tumour cells, thus enhancing the diagnostic possibilities. Such approach was applied for in vivo examination of experimental melanoma for the first time and it is promising for translational studies in human.

Visualization of Reinke's crystals in normal and cryptorchid testis

Discovered and described by Reinke [20], these crystals are found only in men with active spermatogenesis and testosterone production. Apart from the fact that Reinke's crystals are normal constituents of human Leydig cells, their nature and function are poorly understood.

The aim of our study was to investigate the properties of Reinke's crystals in men with the normal morphology of the testis (control group) and infertile patients diagnosed with cryptorchidism. 20 biopsies from infertile patients and six biopsies from men with regular spermatogenesis (20-30 years.) were used.

Reinke's crystals could be very helpful in the diagnosis of Leydig cell tumours since the presence of crystals is pathognomonic for the identification of such neoplasms [21], [22], [23], [24], [25].

A three dimensional (3D) reconstruction of Reinke's crystal was based on a series of confocal microscopic images, which were deconvolved in the Huygens Professional software package (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) by 'quick maximum likelihood estimation' (QMLE) algorithm using the experimental PSF. Subsequently, by means of Ellipse software environment, 3D images were smoothed by a Gaussian filter and segmented by thresholding of the image connected with manual corrections as necessary. Finally, triangulated isosurfaces of segmented crystals were generated and surface rendering was applied.

Reinke's crystals stained with H&E were easily recognized by confocal microscopy, since eosin induced fluorescence of crystals. Routine H&E slides of 7 μm thickness proved to be satisfactory. Confocal microscopy recorded various appearances of the crystals: some were small, having

the size of 0.2-1 μm ; other larger ones reached, as already stated, several micrometers. Some were exceptionally large, bearing 10–12 μm . While bright field microscopy failed to provide precise data on the edges of the crystal sections, confocal images detected their polygonal shape and edges parallel to each other. Moreover, after applying deconvolution techniques to increase the resolution of confocal images [26], the polygonal shape of the crystal sections became much sharper and resembled that recorded by TEM. Based on the stacks of images, a 3D reconstruction of crystals could be made.

In general, there was no difference in appearance and other morphological features of crystals between control and cryptorchid specimens, apart from the frequency of the crystals which were more abundant in biopsies of patients with cryptorchidism.

In conclusion, we analyzed Reinke's crystals in specimens of the normal and cryptorchid testis by means of bright field, confocal and TEM and stereology. All aforesaid microscopy methods were useful in the visualization of the crystal. The stereological analysis established the increase in the number of Reinke's crystals in cryptorchid specimens. Section thickness of 70–300 nm proved to be optimal for crystallographic analysis of biocrystals.

Confocal microscopy proved to be very useful in the assessment of the shape and 3D reconstruction of the crystal. TEM analysis confirmed a hexagonal form of the crystal, while crystallographic data on sections of 70-300 nm thickness provided a better insight into the organization of the crystal lattice. Stereological analysis revealed a significant increase in the number of crystals in cryptorchid testes when compared with controls. Increased number of crystals in cryptorchid specimens leads to the assumption that the prolonged exposure to higher (abdominal) temperature might stimulate enzymes involved in the synthesis of the proteins of the crystal. However, the exact molecular nature of the crystal

lattice remains in both normal and cryptorchid testis obscure. The 3D reconstructions of crystals have shown that a large crystal is sometimes accompanied by a number of smaller ones. Microscopy methods were useful in the visualization of the crystal.

In conclusion, the properties of Reinke's crystals (in men with the normal morphology of the testis (control group) and infertile patients diagnosed with cryptorchidism) were investigated also by confocal microscopy. On the basis of confocal images z-series (that underwent a complex image processing), a 3D reconstruction of crystals was possible. CLSM helped in identifying the morphological features of the crystals, especially their shape and arrangement within the Leydig cell. The crystal's mutual 3D orientation was defined after image processing, improving the resolution of confocal images. Thus, the confocal microscopy approach with subsequent image processing by deconvolution and visualization of deconvolved images can fill the gap between TEM and conventional optical microscopy with image postprocessing.

Conclusions

In conclusion, specific 2PE image acquisition techniques were developed and applied for studies of specific biologic samples. Earlier impossible investigations were performed for the first time. Quantitative improvements are transformed into qualitative discoveries. We tested our optimized procedures in the following biological studies, in cooperation with our colleagues from the Institute of Microbiology CAS, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, and University of Zagreb (Croatia):

1) We developed new approach to the analysis of the intact (whole) yeast microcolonies in order to reveal this architecture and to implement a non-invasive technique to follow the expression and spatio-temporal distribution of selected proteins (tagged with fluorescent markers or stained with specific dyes), in conditions close to natural ones;

2) we investigated possibilities of the combination of the 1PE and 2PE microscopy techniques for in vivo and ex vivo imaging of the experimental melanoma tissue in the mouse;

3) We investigated the properties of Reinke's crystals (in men with the normal morphology of the testis (control group) and infertile patients diagnosed with cryptorchidism by confocal microscopy)

Improved image acquisition approaches described in present work can be applied for different biological problems, such as studies of intact biofilms or in vivo assessment of skin tumours, including possible clinical applications.

Použitá literatura / References

- [1] M. G. L. Gustafsson, „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,“ *Journal of Microscopy*, sv. 198, pp. 82-87, 2000.
- [2] M. G. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard a J. W. Sedat, „Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination,“

Biophysical Journal, sv. 94, pp. 4957-4970, 2008.

- [3] R. Heintzmann a C. Cremer, „Laterally modulated excitation microscopy: Improvements of resolution by using a diffraction grating,“ *Proceedings of SPIE*, sv. 3568, pp. 185-196, 1999.
- [4] R. Heintzmann a G. Ficz, „Breaking the resolution limit in light microscopy,“ *Brief Funct Genomic Proteomic.*, sv. 5, č. 4, pp. 289-301, Dec 2006.
- [5] C. Cremer, M. Hausmann, J. Bradl a B. Schneider, „Wave field microscope with detection point spread function“. US patent 7,342,717, filed 10 July 1997 Patent 7,342,717, 10 July 1997.
- [6] S. W. Hell a J. Wichmann, „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,“ *Optics Letters*, sv. 19, č. 11, pp. 780-782, 1994.
- [7] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz a H. F. Hess, „Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,“ *Science*, sv. 313, č. 5793, pp. 1642-1645, 15 Sep 2006.
- [8] R. E. Thompson, D. R. Larson a W. W. Webb, „Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes,“ *Biophys J.*, sv. 82, č. 5, pp. 2775-2783, May 2002.
- [9] G. Sipos a K. Kuchler, „Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification,“

Curr Drug Targets., sv. 7, č. 4, pp. 471-481, Apr 2006.

- [10] F. Reinke, „Beiträge zur Histologie des Menschen. I. Über Krystalloidbildungen in den interstitiellen Zellen des menschlichen Hodens,“ *Arch Mikr Anat.*, sv. 47, pp. 34-44, 1896.
- [11] G. Sipos a K. Kuchler, „Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification,“ *Curr Drug Targets.*, sv. 7, č. 4, pp. 471-481, Apr 2006.
- [12] A. W. Decho, „Microbial biofilms in intertidal systems: an overview,“ *Cont.Shelf Res.*, sv. 20, p. 1257–1273, 2000.
- [13] J. E. Nett, H. Sanchez, M. T. Cain a D. R. Andes, „Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan,“ *J Infect Dis.*, sv. 202, č. 1, p. 171–175, 1 Jul 2010.
- [14] M. A. Al-Fattani a L. J. Douglas, „Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance,“ *J Med Microbiol.*, sv. 55, č. Pt 8, pp. 999-1008, Aug 2006.
- [15] L. M. Joubert, G. M. Wolfaardt a A. Botha, „Microbial exopolymers link predator and prey in a model yeast biofilm system,“ *Microb Ecol.*, sv. 52, č. 2, pp. 187-97, Aug 2006.
- [16] J. R. Blankenship a A. P. Mitchell, „How to build a biofilm: a fungal perspective,“ *Curr Opin Microbiol.*, sv. 9, č. 6, pp. 588-594, Dec 2006.

- [17] M. Štencel a J. Janáček, „On calculation of chamfer distance and Lipschitz covers in digital images,“ v *Proceedings S4G*, Prague, 2006.
- [18] J. Serra, *Image analysis and mathematical morphology*, London: Academic Press, 1982.
- [19] A. Zoumi, A. Yeh a B. J. Tromberg, „Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence,“ *Proc Natl Acad Sci USA*, sv. 99, č. 17, pp. 11014-11019, 20 Aug 2002.
- [20] E. Brown, T. McKee, E. diTomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher a R. K. Jain, „Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation,“ *Nat Med.*, sv. 9, č. 6, pp. 796-800, Jun 2003.
- [21] M. Strupler, A. M. Pena, M. Hernest, P. L. Tharaux, J. L. Martin, E. Beaurepaire a M. C. Schanne-Klein, „Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues,“ *Opt Express.*, sv. 15, č. 7, pp. 4054-4065, 2 Apr 2007.
- [22] A. Assi, M. Sironi, A. M. Bacchioni, P. Dedlich, L. Cozzi a G. Pasquinelli, „Leydig cell tumor of the testis: a cytohistological, immunohistochemical, and ultrastructural case study,“ *Diagn Cytopathol.*, sv. 16, č. 3, pp. 262-266, Mar 1997.
- [23] S. K. Gupta, I. M. Francis, Z. A. Sheikh, N. A. al-Rubah a D. K. Das, „Intranuclear Reinke's crystals in a testicular Leydig cell tumor diagnosed by aspiration cytology. A

case report.," *Acta Cytol.*, pp. 252-256, Mar-Apr 1994.

- [24] M. Jain, H. M. Aiyer, P. Bajaj a S. Dhar, „Intracytoplasmic and intranuclear Reinke's crystals in a testicular Leydig-cell tumor diagnosed by fine-needle aspiration cytology: a case report with review of the literature,“ *Diagn Cytopathol.*, sv. 25, č. 3, pp. 162-164, Sep 2001.
- [25] F. Marino, G. Ferrara, G. Rapisarda a V. Galofaro, „Reinke's crystals in an interstitial cell tumour of a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*),“ *Reprod Domest Anim.*, sv. 38, č. 5, pp. 421-422, Oct 2003.
- [26] M. M. Pérez, V. J. Puerta a M. Sánchez González, „An occult Leydig-cell tumor in a cryptorchid testis,“ *Arch Esp Urol.*, sv. 52, č. 1, pp. 76-78, Jan-Feb 1999.
- [27] Y. Cotte, M. F. Toy, N. Pavillon a C. Depeursinge, „Microscopy image resolution improvement by deconvolution of complex fields,“ *Opt Express*, sv. 18, č. 19, pp. 19462-19478, 13 Sep 2010.

Seznam publikaci doktoranda / List of Publications of PhD student

(impakt faktor časopisu / parcialní IF / kumulativní IF)

(journal's impact factor / partial IF / cumulative partial IF)

1. Oleksandr Chernyavskiy, Luca Vannucci, Paolo Bianchini, Francesco Difato, Mustafa Saieh, Lucie Kubínová, ***Imaging of mouse experimental melanoma in vivo and ex vivo by combination of confocal and nonlinear microscopy***, *Microscopy Research and Technique* **72** (2009), pp. 411 – 423 423 (cover page); IF: 1.85 / 0.4625 / 0.4625.

2. Libuše Váchová, Oleksandr Chernyavskiy, Dita Strachotová, Paolo Bianchini, Zuzana Burdíková, Ivana Ferčíková, Lucie Kubínová, Zdena Palková, ***Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter***, *Environmental Microbiology* **11** (7) (2009), pp. 1866 – 1877 (cover page); IFs: 4.909 / 0.4909 / 0.9534.

3. Viviana Kozina, David Geist, Lucie Kubínová, Ernest Bilić, Hans Peter Karnthaler, Thomas Waitz, Jiří Janáček, Oleksandr Chernyavskiy, Ivan Krhen, Davor Ježek, ***Visualization of Reinke's crystals in normal and cryptorchid testis***, *Histochemistry and Cell Biology*, **135** (2011), pp. 215 – 228; (IFs: 2.588 / 0.2157 / 1.1691).

4. Libuše Váchová, Vratislav Šťovíček, Otakar Hlaváček, Oleksandr Chernyavskiy, Luděk Štěpánek, Lucie Kubínová, Zdena Palková, ***Flo11p, drug efflux pumps, and***

the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies, Journal of Cell Biology 194 (2011), pp. 679 – 687 (cover page); (IFs: 10.264 / 1.404 / 2.3095).

5. Oleksandr Chernyavskiy, Lucie Kubínová: ***Multi-photon excitation microscopy***, in *Proceedings of Advances in widefield and confocal fluorescence microscopy*, pp.20-28, Ljubljana (Slovenia), March 13-14, 2008 (ISBN 978-80-7399-377-1 (without IF)).