



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**SLEDOVÁNÍ VLIVU TENKÝCH VRSTEV NA BUNĚČNÉ
CHOVÁNÍ V MULTIMODÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM
MIKROSKOPU**

OBSERVATION OF INFLUENCE OF THIN LAYERS ON CELL BEHAVIOUR BY MULTIMODAL
HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martin Vengh

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Štrbková

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Student: **Martin Vengh**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Štrbková**
Akademický rok: 2015/16

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Sledování vlivu tenkých vrstev na buněčné chování v multimodálním holografickém mikroskopu

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Multimodální holografický mikroskop sestavený na ÚFI VUT v Brně umožňuje kvantitativní fázové zobrazování transparentních fázových objektů. Mezi takové objekty patří i buňky. Pozorováním chování buněk a jejich interakce s různými materiály je možné vyhodnotit biokompatibilitu těchto materiálů.

Cíle bakalářské práce:

- 1) Vypracování rešerše způsobu sledování buněčné linie multimodálním holografickým mikroskopem.
- 2) Návrh a provedení experimentu pro sledování vlivu tenkých vrstev na chování buněčné linie v multimodálním holografickém mikroskopu v transmisním módu.
- 3) Vyhodnocení parametrů popisujících chování buněčné linie digitálním zpracováním snímků z mikroskopického pozorování a zhodnocení vlivu přítomnosti tenkých vrstev na buněčné chování.

Seznam literatury:

Kim, M.: Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications, Springer, 2011, ISBN 978-1-4419-7792-2.

Janečková, H. Mikroskopie časově proměnných biologických objektů. Brno, 2009. 66 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2015/16

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Úpravy povrchov materiálov pre kontakt so živými tkanivami a napodobenie prirodzeného prostredia bunky je stále viac predmetom záujmu pre ich potencionálne využitie v tkanivovom inžinierstve. Jedna z možností modifikovať povrch materiálu je vystavenie materiálu účinkom plazmy elektrického výboja v parách cyklopropylaminu. V tomto type plazmy dochádza k nízkotlakovej plazmovej polymerizácii, ktorá vytvorí tenkú povrchovú vrstvu obsahujúcu aminové skupiny. Ako sledovacia technika bol použitý multimodálny holografický mikroskop MHM Q-Phase pre určenie biokompatibility takýchto materiálov. Ten umožňuje pozorovanie v kvantitatívnom fázovom zobrazení, kde je fáza priamo úmerná suchej hmote bunky. Z toho vychádza možnosť určenia rôznych parametrov buniek, ktoré sa stávajú parametrami určujúcimi biokompatibilitu materiálov. Na základe výsledkov, tenké vrstvy bohaté na aminové skupiny zlepšili podmienky pre adhéziu a proliferáciu buniek.

Kľúčové slová

Multimodálny holografický mikroskop, kvantitatívny fázový obraz, plazmová polymerizácia, adhézia buniek

Abstract

Surface treatment of materials for the cell-surface interaction and imitating intrinsic environment of cells is still subject of matter for their potential usage in the bioengineering. One of the options to modify the surface of material is exhibiting them to effects of plasma of electrical discharge in steam of cyclopropylamine. In this type of plasma, the low pressure plasma polymerization takes place, which creates thin amine-rich layer. There is an assumption that this type of layer is appropriate for cell adhesion and proliferation. As a superior technique for a label-free monitoring of the cell-surface interaction, multimodal holographic microscope (MHM) Q-Phase was exploited to determine the biocompatibility of materials. MHM enables observation in quantitative phase imaging, where the phase is directly proportional to the cell dry mass. This gives opportunity to define various features able to determine the biocompatibility of materials. According to the results amine-rich films enhanced the conditions for the cell adhesion and proliferation.

Keywords

Multimodal holographic microscope, quantitative phase imaging, plasma polymerization, cell adhesion

VENGH, M. *Sledování vlivu tenkých vrstev na buněčné chování v multimodálním holografickém mikroskopu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016. XY s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Lenka Štrbková.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu *Sledování vlivu tenkých vrstev na buněčné chování v multimodálním holografickém mikroskopu* vypracoval samostatne pod vedením Ing. Lenky Štrbkovej s použitím materiálov uvedených v zozname literatúry.

Dátum

Martin Vengh

Pod'akovanie

V prvom rade sa chcem poďakovať Ing. Lenke Štrbkovej za odborné rady, všestrannú pomoc a trpezlivosť. Ďalej sa chcem poďakovať svojej rodine za podporu a vytvorenie vhodných podmienok po dobu celého štúdia.

Martin Vengh

Obsah

1.	Úvod do interferenčnej mikroskopie.....	12
2.	História interferenčnej mikroskopie	13
3.	Holografia na VUT.....	15
3.1.	Koherenciou riadený holografický mikroskop (CCHM) prvej generácie	15
3.2.	CCHM druhej generácie.....	16
3.3.	Multimodálny holografický mikroskop (MHM) Q-Phase.....	16
3.3.1.	Optické usporiadanie transmisného módu MHM Q-Phase	16
3.3.2.	Spustenie a nastavenie MHM Q-Phase	18
3.3.3.	Numerické spracovanie hologramu	18
4.	Význam fáze v obraze	20
5.	Software Q-Phase a segmentácia watershed	20
6.	Získavanie morfológických parametrov buniek.....	23
6.1.	Popis morfológických parametrov buniek + konfluencia	24
7.	Testovanie hypotéz v štatistike.....	27
8.	Plazmová polymerizácia kultivačných povrchov	30
9.	Experiment	31
9.1.	Motivácia experimentu.....	31
9.2.	Kultivácia buniek	31
9.3.	Pozorovanie	31
9.4.	Výsledky experimentu.....	32
9.5.	Zhrnutie výsledkov experimentu.....	36
10.	Záver	37

1. Úvod do interferenčnej mikroskopie

V dnešnej dobe je mikroskopia neoddeliteľnou súčasťou mnohých vedných disciplín. Jednou z nich je cytológia, oblasť zaoberajúca sa bunkami živých organizmov. Pozorovanie takýchto objektov pod svetelným mikroskopom naráža na problém. Bunky patria medzi transparentné objekty, tzn. objekty, ktoré slabo absorbujú a rozptyľujú svetlo. Tieto objekty sa tiež nazývajú fázové kvôli posunu fáze svetla spôsobeného rozdielnym indexom lomu objektu od okolia. Oko je schopné vnímať len rozdiely intenzity svetla, teda kvadrát komplexnej amplitúdy. To znamená, že tieto objekty sa stávajú pre oko takmer neviditeľné. S riešením prišiel Frits Zernike, ktorý vynášiel mikroskopiu s fázovým kontrastom (Nobelova cena 1953) [1,2]. Táto metóda umožňuje fázový posun svetla, spôsobený objektom, zmeniť na rozdiely jasů v obraze. S ďalšími zlepšeniami fázového kontrastu prišli Normanski a Hoffman[3,4]. Napriek tomu tieto metódy stále neumožňujú kvantitatívnu detekciu fázy. Celkové riešenie poskytla až interferenčná mikroskopia s príchodom digitálnych kamier.

Obecne sa interferenčné mikroskopy delia podľa uhlu medzi referenčnou a predmetovou vetvou na osovú (in-line) resp. mimoosovú (off-axis), ktoré spolu zvierajú nulový resp. nenulový uhol.

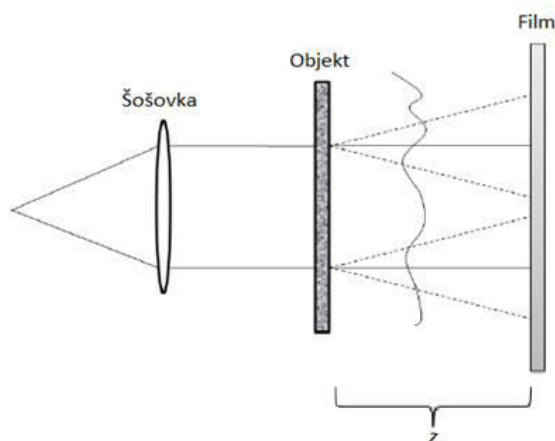
Osovú usporiadanie [5,6-9] nepožaduje použitie koherentných zdrojov, z čoho vyplýva významné potlačenie koherentného šumu a hĺbková diskriminácia pomocou koherenčnej brány [10]. Nevýhoda spočíva v rekonštrukcii predmetovej vlny, kedy je potrebné zaznamenať viacero hologramov s rôznymi fázovými posunmi.

Mimoosové systémy[11,12], označované aj ako digitálne holografické mikroskopy (DHM) požadujú použitie koherentných zdrojov pre vytvorenie interferenčného obrazca. Takéto osvetlenie ale degraduje kvalitu zobrazenia vplyvom parazitných frekvencií a koherentného šumu a znemožňuje pozorovanie preparátov v rozptýlnom prostredí. Tiež laterálne rozlíšenie DHM je nižšie v porovnaní s konvenčnými optickými mikroskopmi. Výhodou je, že pre rekonštrukciu postačí jediný snímok čo zrýchľuje zobrazovanie a umožňuje pozorovať dynamické deje.

2. História interferenčnej mikroskopie

Zrod holografie prichádza s menom Dennis Gabor v roku 1947. Vtedy Gabor pracoval na usporiadaní elektrónových mikroskopov, ktoré podľa výpočtov mali mať mnohonásobne väčšiu rozlišovaciu schopnosť ako optické mikroskopy. Problém, ktorému Gabor čelil bol v nepresnosti fokusovania elektrónových vln pomocou magnetických šošoviek a ďalších skreslení [13]. Gábor dúfal, že sa mu podarí tento problém vyriešiť pomocou optických komponentov a očakával, že elektrónový hologram môže byť zrekonštruovaný vo viditeľnom spektre so zväčšením $\lambda_{\text{viditeľné}}/\lambda_{\text{elektron}}$, čo sa ukázalo byť neúspešné. Gaborove riešenie prišlo s nápadom skombinovať objektovú vlnu s referenčnou za vytvorenia interferenčného obrazca. Obrazec obsahoval všetky informácie o rozdieli fázy medzi objektovým a referenčným zväzkom. Interferenčný obrazec bol zaznamenaný vo forme priestorovo premennej priepustnosti amplitúdy, použitím striebornej halogenidovej fotografickej emulzie. Po spracovaní bola emulzia osvetlená referenčnou vlnou. Pôvodná vlna, vrátane jej fázy, bola zrekonštruovaná pomocou difrakcie. Gaborovi ale stálo v ceste ešte pár prekážok k progresu tejto metódy. Jedna z nich bola, že svetelný zdroj s koherentnou dĺžkou viac ako pár milimetrov neboli jednoducho dostupné. Tento problém sa ale vyriešil s príchodom laseru a v roku 1971 obdržal Gabor Nobelovu cenu za fyziku. Na Gaborov obdivuhodný nápad naviazali v 60. rokoch Leith a Upatnieks, ktorý prišli s nápadom mimoosového usporiadania, čo položilo ďalšie základy holografie.

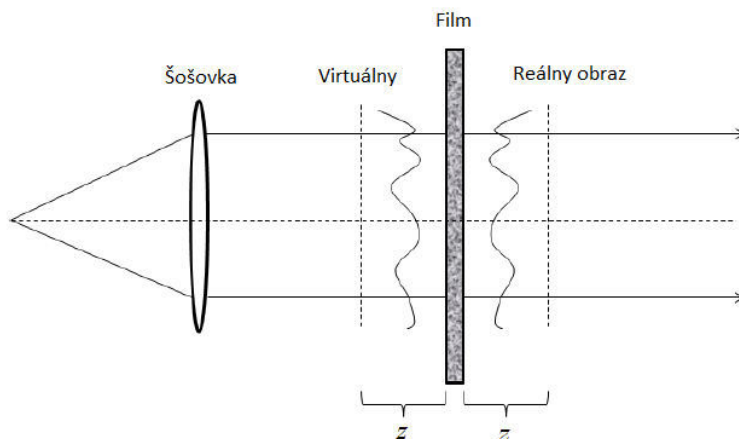
Gaborove pôvodné usporiadanie je na obr. 1. Bodový zdroj monochromatického svetla je kolimovaný šošovkou, kde výsledný kolimovaný zväzok osvetľuje polopriepustný objekt. Svetlo difraktuje na objekte a rozkladá sa na dve časti - rozptýlenú a nerozptýlenú časť. Fotografický film zaznamená Fresnelov difrakčný obrazec vystupujúci z objektu. Vo vzdialenosti z za objektom zaznamenal film distribúciu intenzity generovanú interferenciou rozptýlenej a nerozptýlenej časti.



Obr. 1 : Záznam Gaborovho hologramu. Prevzaté a upravené z [17].

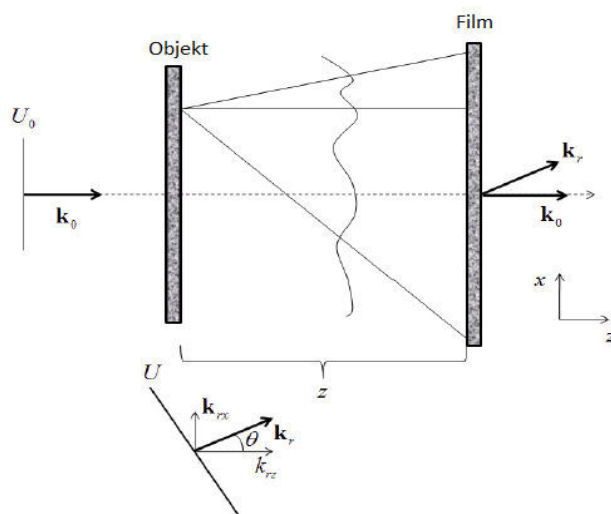
Rekonštrukcia hologramu je na obr. 2. Osvietením hologramu, teda rekonštrukciou, dostávame dva obrazy zo vzdialenosti z a $-z$, reálny a virtuálny. Nevýhodou Gaborovho usporiadania je, že pre rekonštrukciu je potreba zaznamenať niekoľko snímok s rôznymi fázovými posunmi.

Významný rozvoj a zdokonalenie Gaborovej metódy priniesla dvojica Leith a Upatnieks [31]. Leith a Upatnieks navrhli off-axis usporiadanie zabezpečujúce zachovanie informácie o fáze v jedinom holograme.



Obr. 2: Rekonštrukcia Gaborovho hologramu. Prevzaté a upravené z [17].

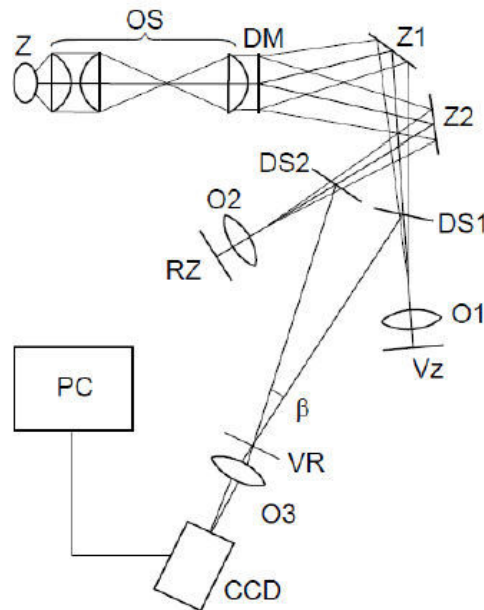
Obr. 3 znázorňuje záznam off-axis hologramu, kde ide v podstate o Gaborovu metódu doplnenú o monochromatický rovinný referenčný zväzok. Predmetová vlna difrakтуje na objekte, kde mení svoju amplitúdu a fázu a pokračuje ďalej ako Fresnelov difrakčný obrazec. Pred fotografickým filmom vzniká štruktúra hologramu, kedy interferuje predmetová vlna s referenčnou. Jednotnú štruktúru interferencie týchto dvoch vln ovplyvňuje difraktovaná vlna predmetovej vetvy. Tým vzniká hologram s informáciou o amplitúde a fáze.



Obr. 3: Off-axis usporiadanie Leith a Upatnieks. Prevzaté a upravené z [17].

3. Holografia na VUT

Za počiatok holografickej mikroskopie na VUT by sme mohli považovať rok 1999 kedy R. Chmelík a Z. Harna publikovali práce o novo postavenom mimoosovom holografickom mikroskope využívajúcom nekoherentné svetlo a achromatický interferometer [14,15]. Zámerom stavby tohto mikroskopu bolo docieľiť optických rezov z konfokálnej mikroskopie nerastrovacou metódou. Využitie mal nájsť pri vysoko presnom meraní povrchov. Na základe toho bol zvolený reflexný mód. Optická schéma mikroskopu je na obr. 4.

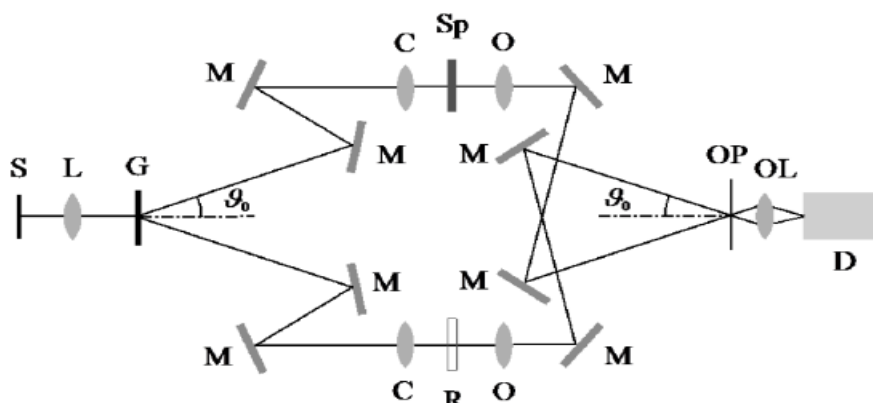


Obr. 4 Schéma holografického mikroskopu využívajúci reflexiu. Zdroj svetla (Z), Osvetľovacia optika (OS), Difrakčná mriežka (DM), Zrkadlá (Z1, Z2), Deliče zväzkov (DS1, DS2), Objektívy (O1, O2, O3), Referenčné zrkadlo (RZ), Vzorka (Vz), Výstupná rovina (VR). Prevzaté z [16]

3.1. Koherenciou riadený holografický mikroskop (CCHM) prvej generácie

Ďalším krokom vo vývoji bolo usporiadanie vyvinuté Kolmanom a Chmelíkom [18]. Išlo o mikroskop prvej generácie nazývaný koherenciou riadený holografický mikroskop (CCHM). Transmisné usporiadanie ho predurčovalo na využitie pozorovania biologických vzoriek. Mikroskop pracuje v ľubovoľnom stupni koherencie použitého svetla. Týmto sa stáva koherencia novým parametrom určujúcim vlastnosti mikroskopu. Pri vysokom stupni koherencie svetla odpovedajú vlastnosti mikroskopu vlastnostiam komerčných holografických mikroskopov. Vzniká koherenčný šum a parazitické interferencie. Na druhej strane je zase možné numericky preostrovať vo veľkom rozsahu a vytvoriť 3D zobrazenie z jediného hologramu. Znižovaním časovej a priestorovej koherencie sa začínajú prejavovať konfokálne vlastnosti spôsobené koherenčnou bránou, kedy sa strácajú spomínané nevýhody [18]. Efekt koherenčnej brány bol overený viacerými prácami [19,20,21].

Hlavným dôvodom konštrukcie CCHM prvej generácie bolo pozorovanie buniek *in vitro*. Pozorovanie v kvantitatívnom fázovom kontraste umožňuje zobraziť bunky s dostatočným kontrastom bez použitia fluorescenčných farbív. Optické usporiadanie je na obr. 5.



Obr. 5 Schéma CCHM prvej generácie: Zdroj (S), Šošovka (L), Difrakčná mriežka (D), Zrkadlo (M), Kolektor (C), Objektív (O), Vzorka (Vz), Referenčná vetva (R), Výstupná rovina (OP), Šošovka (OL). Prevzaté z [18]

3.2. CCHM druhej generácie

CCHM prvej generácie znamenal veľký krok vpred a podal pomocnú ruku pri vývoji CCHM druhej generácie, ktorý bol navrhnutý práve kvôli nedostatkom prvej generácie. Pri vývoji tejto novej koncepcie CCHM vzniklo niekoľko návrhov optického usporiadania mikroskopu. Všetky koncepcie boli založené na off-axis holografii s využitím difrakčných mriežok na zaistenie achromaticity interferometra podľa [22]. Tvorba návrhov optických usporiadaní sa držala požiadavkou ako achromaticita, časovo a priestorovo nekoherentné osvetlenie, neobmedzená priepustnosť v celom viditeľnom spektre a viac v [28]. Tieto návrhy podporili vznik konečného návrhu novej koncepcie mikroskopu CCHM druhej generácie.

3.3. Multimodálny holografický mikroskop (MHM) Q-Phase

Multimodálny holografický mikroskop navrhnutý na VUT ÚFI v Brne skonštruovaný v spolupráci s firmou TESCAN Brno s.r.o. vychádza z druhej generácie koherenciou riadeného holografického mikroskopu. Oproti druhej generácii boli urobené zmeny pre zvýšenie užívateľského komfortu. Účastníci tohto projektu boli ocenení Najlepšou spoluprácou roku 2013 [29]. MHM dokáže pracovať v troch módoch zobrazenia: transmisný, reflexný a epi-fluorescenčný mód.

3.3.1. Optické usporiadanie transmisného módu MHM Q-Phase

MHM Q-Phase pozostáva z osvetľovacej sústavy, zobrazovacej sústavy a z detektoru. Využíva optické usporiadanie založené na interferometre Mach-Zehnderovho typu pre achromatickú mimoosovú holografiiu.

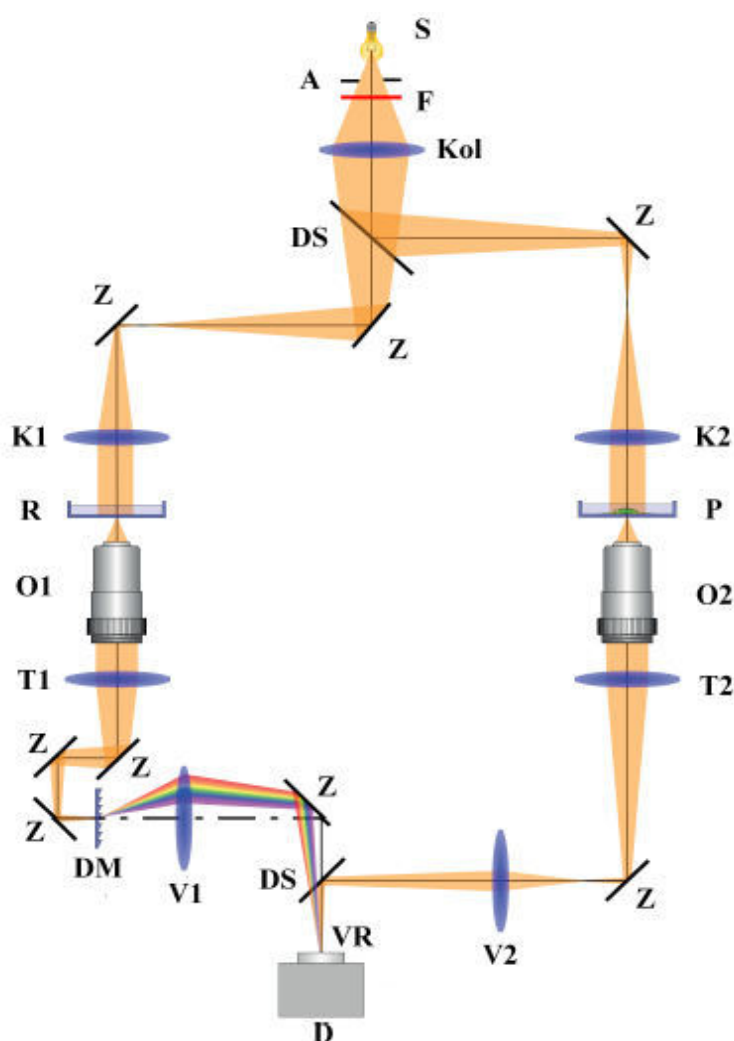
Plošný zdroj generuje priestorovo i časovo nekoherentné svetlo prechádzajúce kolektorom, ktorý zobrazuje rovinu zdroja do prednej ohniskovej roviny kondenzoru pre zaistenie Köhlerovho zobrazenia. Svetlo je rozdelené deličom zväzkov do dvoch vetiev, referenčnej a objektovej. Referenčná a objektová vetva sú tvorené zhodnými optickými prvkami pre vytvorenie rovnakej optickej dráhy, požadovanej nízko koherentným zdrojom.

Dôležitým prvkom je transmisná difrakčná mriežka, ktorá je umiestnená v ohniskovej rovine tubusovej šošovky referenčnej vetvy mikroskopu a je zobrazená do výstupnej roviny podľa základného princípu navrhnutého Leithom [27]. Povrch difrakčnej mriežky je priamo zobrazený výstupným objektívom do výstupnej roviny. Zväzok rozložený do difrakčných rádov je obmedzený filtrom, ktorý prepúšťa len 1. rád. Tým, že je využitý len prvý rád, štruktúra

vrypov mriežky nie je vo výstupnej rovine rozlíšená. Až interferenciou referenčného a predmetového zväzku vzniká vo výstupnej rovine interferenčná štruktúra. Výsledná interferenčná štruktúra je teda tvorená sústavou prúžkov rovnobežných s vrypmi mriežky. Táto štruktúra má priestorovú frekvenciu zhodnú s priestorovou frekvenciou f_G vrypov difrakčnej mriežky zníženú vplyvom zväčšenia m_{OL} výstupného objektívu. Túto frekvenciu nazývame nosnou frekvenciou f_C a platí [28]:

$$f_C = \frac{f_G}{m_{OL}} \quad (3.1)$$

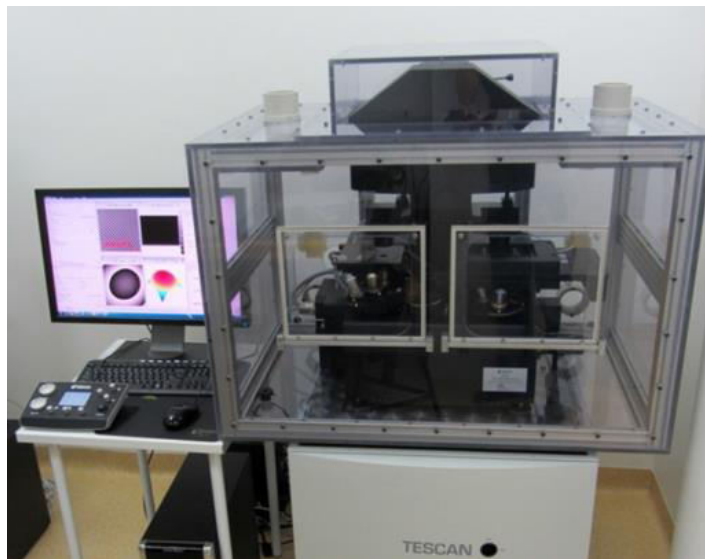
Pre achromaticitu interferometru je rozhodujúce správne nastavenie uhla β (uhol medzi referenčnou a predmetovou vetvou vo výstupnej rovine) pre všetky použité vlnové dĺžky. Inak je výrazne ovplyvnený kontrast interferenčných prúžkov. To znamená, že sú kladené vysoké nároky na precízne zosadenie optických prvkov sústavy.



Obr. 6 Schéma MHM Q-Phase: Zdroj (S), Apertúrna clona (A), Filter (F), Kolektorová šošovka (Kol), Zrkadlo (Z), Kondenzory (K1, K2), Vzorka (P), Referenčný objekt (R), Objektívy (O1, O2), Difrakčná mriežka (DM), Delič zväzku, Tubusové šošovky (T1, T2), Výstupné objektívy (V1, V2), Výstupná rovina (VR), Detektor (D). Prevzaté z [34]

3.3.2. Spustenie a nastavenie MHM Q-Phase

Mikroskop (obr. 7) sa spúšťa pomocou veľkého centrálného spínača umiestneného na boxe. MHM Q-PHASE používa svoj vlastný software Q-PHASE, vďaka ktorému je takmer plne automatizovaný. Priamy kontakt s mikroskopom nastáva jedine pri vkladaní vzorku a sklíčok, zasúvaní poľnej clony a jej doostrenia. Mikroskop využíva 5 objektívov (zväčšenie: 4x, 10x, 20x, 40x, 60x) a farebné filtre, z ktorých najviac využívaný je filter s vlnovou dĺžkou 650nm. Ďalším dôležitým parametrom pre experiment je hodnota apertúrnej clony, ktorou určujeme hodnotu priestorovej koherencie. MHM udržiava po celý čas zhodnú konštantnú teplotu v referenčnej a objektovej vetve, tak aby boli zabezpečené vhodné podmienky pre pozorovanie živých buniek.



Obr.7: Multimodálny holografický mikroskop na ústave experimentálnej biofotoniky na VUT v Brne.

Samotné nastavenie MHM pre experiment spočíva v zapnutí lampy a vložení vzorky. Ďalej je potreba absolútnym ostrením nájsť rovinu vzorku. Zasunie sa poľná clona, ktorú doostrojujeme pomocou manuálne otáčavej hlavice v predmetovej vetve a v referenčnej vetve pomocou vložených sklíčok. Následne poľnú clonu otvoríme. Obrazy sú automaticky zosadené na seba. V ďalšom kroku je treba naladiť interferenciu, čo je docielené automaticky. Nakoniec podľa potreby doostrojujeme obraz pomocou relatívneho ostrenia. Priebežné doostrovanie obrazu prebieha počas celého experimentu kvôli nerovnostiam, čo znemožňuje automatické zberanie dát.

3.3.3. Numerické spracovanie hologramu

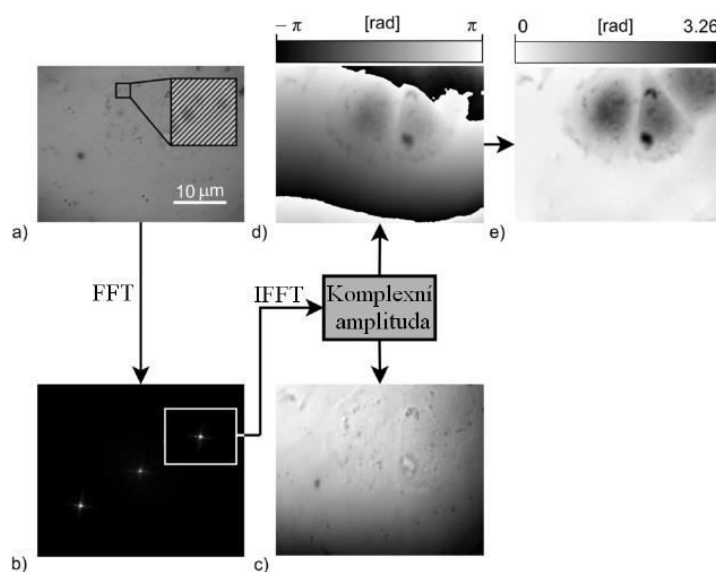
Hologram vzniknutý interferenciou vetiev je zaznamenaný na CCD kameru. Hologram je vlastne intenzitný obraz, v ktorom je implicitne uchovaná informácia o amplitúde a fáze. Je numericky spracovávaný softwarom počítača. Ten používa metódy rýchlej Fourierovej transformácie (FFT).

Na hologram je aplikovaná FFT. Tým je získané spektrum priestorových frekvencií, v ktorom sú zrejmé 3 oblasti (viz. obr. 8b). Prostredná oblasť je DC komponent, ktorý vypovedá o homogénnom pozadí a pre ďalšie účely je neúčinný. Ďalšie dva členy sú symetricky rozložené vzhľadom k DC komponentu a sú od neho vzdialené o hodnotu priestorovej frekvencie interferenčných prúžkov. Výrezom sa vyberie jeden z týchto dvoch členov tak, že jeho maximálnu intenzitu umiestnime do stredu výrezu a aplikujeme inverznú FFT (IFFT). Získame tak komplexnú amplitúdu zobrazenia vzorky. Z nej je možné vypočítať fázu

a intenzitu predmetovej vlny. Intenzitný obraz odpovedá obrazu konvenčného optického mikroskopu a fázový obraz odpovedá zmene optickej dráhy predmetovej vlny voči referenčnej, spôsobenej vzorkou [28]. Takže uhol komplexného čísla odpovedá rozdielu fázy dvoch vln a kvadrát modulu určuje intenzitu zobrazenia. Pre uhol platí:

$$\varphi(x, y) = \arctan\left(\frac{\text{Im}[a(x, y)]}{\text{Re}[a(x, y)]}\right) \quad 3.2$$

kde $a(x, y)$ je komplexná amplitúda. Ak sa vo fázovom obraze objavia skoky rozdielu fázy, vzniknuté v miestach, kde fáza dosahuje hodnôt $\pm\pi$, je nutné ich odstrániť a fázu naviazať (unwrapping) [30]. Odstránenie sa prevedie pričítaním, alebo odčítaním hodnoty $2\pi n$, kde n je celé číslo. Ku skokom dochádza z definície funkcie $\arctan(x)$, ktorá je definovaná len na intervale $(-\frac{\pi}{2}; \frac{\pi}{2})$.



Obr. 8: Spracovanie obrazu: a) hologram, b) spektrum priestorových frekvencií, c) obraz amplitúdy, d) obraz fáze, e) obraz naviazanej fáze. Prevzaté z [Kovarova 4]

K získaniu kvalitného obrazu je ešte potrebné kompenzovať deformáciu fáze spôsobenú nepresnosťami optického systému, jeho aberáciami, neideálnou pozíciou vzorky, či nedokonalou rekonštrukciou predmetovej vlny. Toto riešia dve metódy, štatistická (vyžaduje manuálny zásah) a dynamická (automatická). Sú založené na vytvorení polynomiálnej plochy, ktorá čo najpresnejšie kopíruje deformované pozadie. Táto plocha je odčítaná od obrazu fáze [25].

4. Význam fáze v obraze

Fázové zobrazenie objektov v MHM Q-PHASE poskytuje kvantitatívnu informáciu fáze. Tá je úmerná dráhovému rozdielu objektovej a referenčnej vetvy (obr. 9). Tento rozdiel je vyjadrený nasledovne [24]:

$$\begin{aligned}\Delta\varphi(x, y) &= \frac{2\pi}{\lambda} [n_m(h - d(x, y)) + n_c(x, y)d(x, y)] - \frac{2\pi}{\lambda} n_m h \\ &= \frac{2\pi}{\lambda} d(x, y) \Delta n(x, y)\end{aligned}\quad 4.1$$

kde λ je vlnová dĺžka osvetlenia, n_m je index lomu média, n_c je index lomu bunky, h je výška pozorovacej komôrky, d je výška bunky a Δn je rozdiel medzi indexom lomu bunky a média.



Obr. 9: Znáozornenie optických dráh predmetovej (vľavo) a referenčnej vetvy (vpravo); n_m – index lomu média, n_b – index lomu bunky, d – výška bunky, h výška pozorovacej komôrky.

Objavujú sa dva prístupy v dostupnej literatúre k interpretácii obrazovej fáze. Podľa prvého z nich závisí hodnota indexu lomu bunky n_b na obsahu suchej hmoty bunky podľa vzťahu [26]:

$$n_b(x, y) = n_m + \alpha C(x, y) \quad 4.2$$

kde α je refrakčný prírastok (ml/g) a C je koncentrácia suchej hmoty v roztoku (g/ml). Ďalej sa predpokladá, že rôzne zložky bunky majú veľmi podobné špecifické refrakčné prírastky, a preto je spomalenie fáze svetelnej vlny prechádzajúcej živou bunkou úmerné hmoty bezvodného obsahu bunky, teda suchej hmoty. Nasledujúci vzťah udáva plošnú hustotu suchej hmoty bunky [26]:

$$\rho(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\varphi(x, y) \quad 4.3$$

Druhý prístup aproximuje bunku jedinou hodnotou indexu lomu a informácia o fáze je prepočítaná na výšku bunky podľa vzťahu (4.1). Typické hodnoty aproximácie indexu lomu bunky sú 1,38 - 1,41 [32].

5. Software Q-Phase a segmentácia watershed

Aby sme mohli identifikovať a kvalitatívne popísať získané dáta, teda fibroblasty, je potrebné ich v obraze najprv správne vysegmentovať. Segmentácia slúži na presné určenie hraníc buniek, rozdelenie v prípade zhlukovania a odstránenie nežiadúcich objektov v obraze.

Q-Phase je software vyvinutý na VUT v spolupráci s TESCANA s.r.o. pre automatizáciu MHM Q-Phase. V rámci biologických účelov Q-Phase ponúka modul cell detector. Tento modul používa marker-controlled watershed techniku pre segmentáciu buniek. Segmentáciu a určovanie hraníc je možné ladiť parametrami *background threshold*, *minimum* a *maximum cell weight*, čím sa udáva aj prah pre odstránenie nechcených artefaktov. Vysegmentované

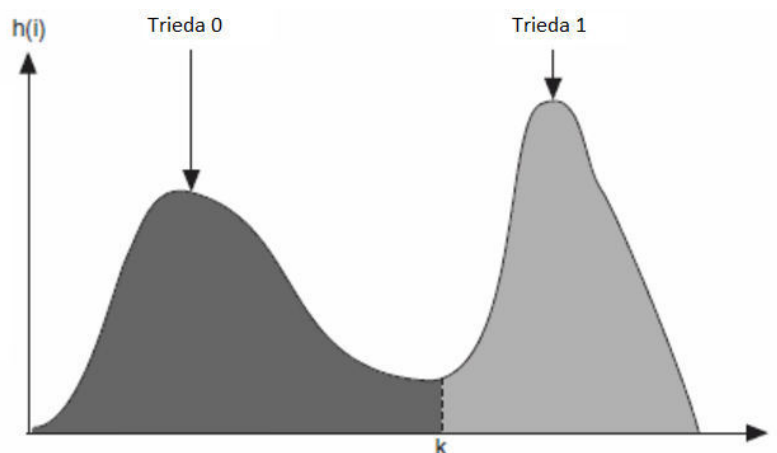
obrazy sú uložené a ďalej spracovávané v MATLAB-e.

Segmentáciou rozumieme rozklad obrazu na podmnožinu pixelov, ktoré sa nazývajú objekty. Objekty nutne nemusia byť disjunktné. Medzi objektmi sa definuje špeciálny objekt, ktorý sa nazýva pozadie. Toto je objekt, ktorý nechceme analyzovať. Nasledujúce metódy sú využívané pri spracovaní obrazov v Q-Phase.

Thresholding

Prvou podmienkou pre správnu segmentáciu pomocou thresholding-u sú svetlé objekty na tmavom pozadí, alebo naopak. Druhou podmienkou je bimodálne rozloženie histogramu. V takomto histograme sa nachádza lokálne minimum, ktoré tvorí približný prah a rozloží obraz do dvoch tried. Po aplikovaní thresholdingu vzniká binárny obraz. Pre zlepšenie metódy je možné použiť adaptívne prahovanie, kedy sa vyberá histogram postupne z každej časti obrazu a vhodne určí parameter k .

Na obr. 10 je histogram, v ktorom os y určuje početnosť $h(i)$ hodnôt pixelu i . Rozhodujúcim faktorom je správne určenie parametru k .



Obr. 10: Histogram s bimodálnym rozložením počtosti $h(i)$ s parametrom k .

Dilatácia, Erózia

Tieto operácie sa používajú pre ďalšie spracovanie binárneho obrazu získaného prahovaním.

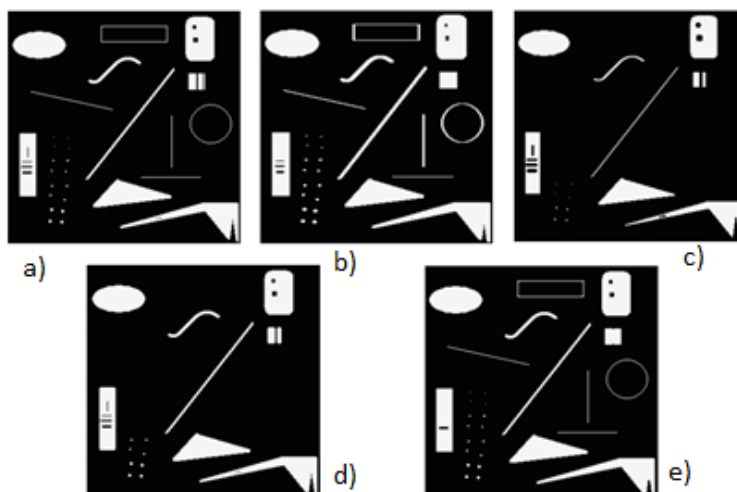
Označme O_{ij} okolie pixelu x_{ij} (tvar okolia je ľubovoľný). Nech $A = [a_{ij}]$ je pôvodný obraz a $B = [b_{ij}]$ je nový obraz. Ak platí, že $b_{ij} = \max O_{ij}$, na A bol použitý *max* filter a ak $b_{ij} = \min O_{ij}$, bol použitý *min* filter.

Použitie filtrov je vidieť na obr. 11. Ak máme svetlý objekt a tmavé pozadie *max* filter spôsobuje zväčšenie objektu a nazveme ho dilatáciou a *min* filter spôsobuje zmenšenie objektu a nazveme ho eróziou.

Opening, Closing

Opening a Closing využívajú erózie a dilatácie. Closing je definovaný ako aplikácia dilatácie nasledovaná eróziou s rovnakým okolím. Opening je opakom Closing-u.

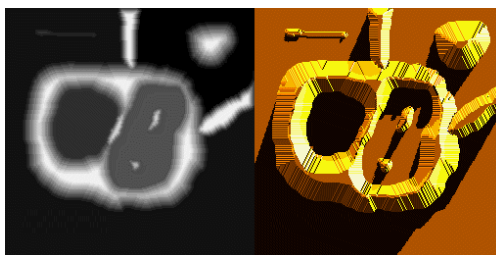
Tieto operácie (aj erózia a dilatácia) majú spoločný názov morfológické operácie. Ich výsledkom sú rôzne zjednodušenia štruktúry objektov, zaplňovanie dier, odstránenie tenkých čiar, ale zároveň celkový tvar objektu sa (zväčša) neporuší. Jednotlivé obrázky znázorňujú výsledky aplikácie operácií.



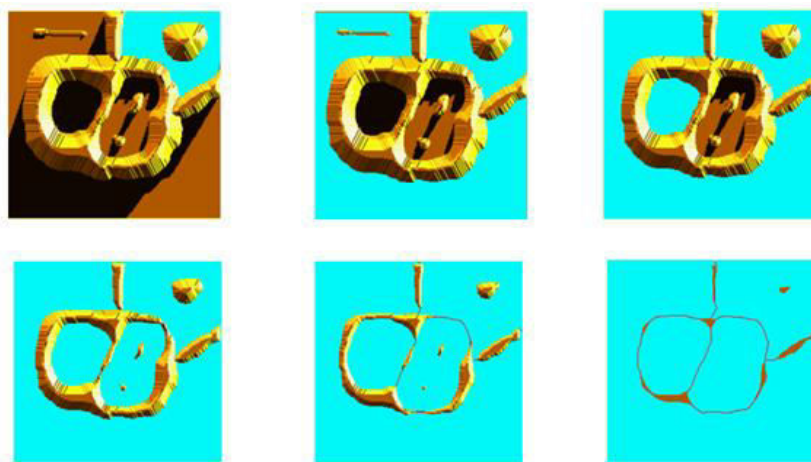
Obr. 61: Vždy zľava doprava a) pôvodný obraz, b) dilatovaný obraz, c) iterácia erózie, d) opening, e) closing.

Watershed transformácia a flood-fill

Watershed transformácia (obr. 12) transformuje šedotónový obraz na topografický reliéf. Táto transformácia sa dosiahne tak, že hodnotu pixelu budeme považovať za hodnotu výšky reliéfu. Potom môžeme watershed transformáciu považovať za transformáciu vytvárajúcu horský hrebeň, ktorý formuje hranice medzi dolinami. Takto vytvorený povrch začneme „zaplavovať“ (flood-filling) od minima a ak zabránime spájaniu zaplavených oblastí pochádzajúcich z rôznych zdrojov, rozdelíme obraz na dve rozdielne množiny: catchment basins a watershed lines. Operáciu zaplavovanie je možné vidieť na obr. 13.



Obr. 7: Aplikácia watershed transformácie.



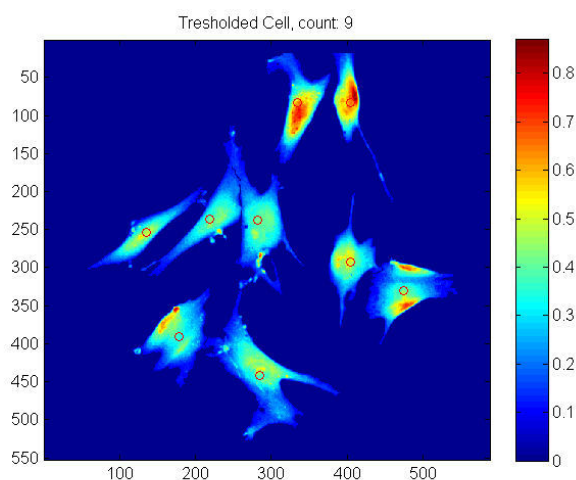
Obr. 8: Aplikácia zaplavovania (flood-fill).

Marker-controlled watershed segmentácia MCWS

Táto metóda je vstavaná v program Q-PHASE a pomocou nej prebieha segmentácia výstupného fázového obrazu MHM. MCWS kombinovane využíva všetky spomínané metódy. Marker-controlled znamená, že segmentácia je usmerňovaná markermi. Tie slúžia k tomu, aby nedošlo k prehnanej segmentácii. Počet markerov určuje počet vysegmentovaných objektov.

6. Získavanie morfológických parametrov buniek

Obrazy vysegmentovaných buniek boli prevedené do prostredia MATLAB, kde prebieha identifikácia buniek ako separovaných objektov a výpočet parametrov charakterizujúcich bunky. MATLAB ponúka objektovo orientované programovanie, v ktorom bol napísaný M-file využívajúci vstavanú funkciu regionprops. Funkcia regionprops slúži na výpočet parametrov buniek ako obsah plochy bunky, obvod bunky, hustotu suchej hmoty bunky a viac v ďalšej podkapitole 6.1. M-file tiež obsahuje kód odstraňujúci objekty menšie ako stanovený počet pixelov a objekty dotýkajúce sa krajov obrazu, pre zabezpečenie správnej identifikácie. Hodnoty parametrov boli použité tiež na vykreslenie boxplotov v MATLAB-e (kapitola 9.).



Obr. 94: Identifikácia buniek v MATLAB-e. Vpravo škála vyjadrujúca hodnotu hustoty suchej hmoty bunky v $\text{pg}/\mu\text{m}^2$. V bunkách je vyznačené ťažisko.

6.1. Popis morfológických parametrov buniek + konfluencia

Plocha bunky P

Plocha bunky je počítaná ako suma pixelov, ktoré bunka v obraze obsahuje. Pixely patriace ploche (priemetu) bunky majú hodnotu $n = 1$, inak $n = 0$. Po vynásobení hodnotou plochy pixelu S dostávame celkovú plochu bunky P v jednotkách plochy (μm^2):

$$P = \sum_{i=1}^k n_i S \quad (6.1)$$

kde k je počet pixelov. Plocha bunky P poskytuje informáciu o adhézii a rozložení bunky na povrchu.

Obvod plochy bunky O_P

Obvod plochy bunky je počítaný ako suma pixelov na vnútornej hranici tejto plochy vynásobený rozmerom pixelu, pričom dostávame hodnotu v jednotkách dĺžky (μm).

Konvexná plocha KP

Konvexná plocha je počítaná ako suma pixelov konvexnej plochy bunky. Hranice sú definované ako najmenší konvexný polygón, ktorý obsahuje celú plochu bunky. Pre výslednú hodnotu v jednotkách plochy je počet pixelov násobený plochou jedného pixelu.

Obvod konvexnej plochy O_{KP}

Obvod konvexnej plochy je počítaný ako suma pixelov vnútornej hranice tejto plochy vynásobená veľkosťou pixelu.

Celistvosť C

Tento parameter špecifikuje pomer pixelov v ploche bunky a pixelov obsiahnutých v konvexnej ploche bunky. Celistosť C je teda počítaná ako podiel plochy bunky P a konvexnej plochy KP .

Členitosť I (Indentation)

Tento parameter určuje mieru členitosti hranice bunky. Členitosť môžeme počítat ako pomer obvodu konvexnej plochy ku obvodu plochy bunky:

$$I = \frac{O_{KP}}{O_P} \quad (6.2)$$

Parameter členitosť nadobúda hodnoty v intervale od nula po jedna, kde hodnoty blízke nule vypovedajú o hranici bunky, ktorá je hladká a nečlenitá, v opačnom prípade dostávame hodnoty menšie ako jedna.

Celková hodnota fázy bunky F a suchej hmoty bunky M

Absolútna hodnota fázy je počítaná ako suma hodnôt fázy φ_i (v radiánoch) v jednotlivých pixeloch patriacich do plochy bunky.

$$F = \sum_{i=1}^k \varphi_i \quad (6.3)$$

Keďže fáza je priamo úmerná rozloženiu hustoty suchej hmoty bunky, celková hodnota fáze môže byť vyjadrená aj v jednotkách hmotnosti (zvyčajne v pikogramoch). Potom môžeme zaviesť parameter celkovú suchú hmotu (M), počítaný nasledovne:

$$M = S \sum_{i=1}^k \rho_i \quad (6.4)$$

kde ρ_i je hodnota hustoty suchej hmoty v i -tom pixeli patriacom ploche bunky vo fázovom obraze.

Priemerná hodnota fáze μ_φ a hustoty suchej hmoty bunky m_φ

Parameter μ_φ špecifikuje priemernú hodnotu fáze v oblasti bunky. Priemerná hodnota fáze je definovaná ako celková hodnota fáze (v radiánoch) na plochu bunky (v pixeloch). Táto hodnota vypovedá o miere bunkovej adhézie. Vypočítame ho nasledovne:

$$\mu_\varphi = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \varphi_i \quad (6.5)$$

Rovnako je možné zaviesť priemernú hodnotu hustoty suchej hmoty bunky ($\text{pg}/\mu\text{m}^2$):

$$m_\varphi = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \rho_i \quad (6.6)$$

Rozptyl hodnôt hustoty suchej hmoty Roz_φ a smerodajná odchýlka σ_φ

Tieto parametre udávajú veľkosť rozptylu suchej hmoty bunky. Rozptyl a smerodajná odchýlka sú dané nasledovne:

$$Roz_\varphi = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k (\rho_i - m_\varphi)^2 \quad (6.7)$$

$$\sigma_\varphi = \sqrt{Roz_\varphi} \quad (6.8)$$

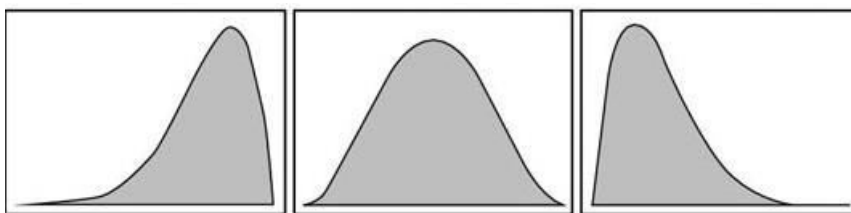
kde ρ_i je hodnota hustoty suchej hmoty v i -tom pixeli patriacom ploche bunky.

Šikmosť rozloženia hodnôt hustoty suchej hmoty $Skew_\varphi$ (Skewness)

Šikmosť je počítaná z histogramu hodnôt fáze a opisuje tvar histogramu. Parameter $Skew_\varphi$ udáva symetriu distribúcie hustoty suchej hmoty v bunke vzhľadom k strednej hodnote. Šikmosť je definovaná nasledovne:

$$Skew_\varphi = \frac{\sum_{i=1}^k (\rho_i - m_\varphi)^3}{(k-1)\sigma_\varphi^3} \quad (6.9)$$

Hodnoty tohto parametru blízke nule vypovedajú o symetrickej distribúcii hodnôt hustoty suchej hmoty v bunke. Symetrická distribúcia je charakteristická pre bunky rozťahnuté a adherované na povrchu. Na obr. 15 je vidieť možné hodnoty Skewness.



Obr. 15: Šikmosť: vľavo Skew<0, stred Skew=0, vpravo Skew>0

Špicatosť rozloženia hodnôt hustoty suchej hmoty $Kurt_{\varphi}$ (Kurtosis)

Tento parameter získaný z histogramu hodnôt suchej hmoty a je počítaný ako:

$$Kurt_{\varphi} = \frac{\sum_{i=1}^k (\rho_i - m_{\varphi})^4}{(k-1)\sigma_{\varphi}^4} \quad (6.10)$$

Špicatosť udáva rozsah v akom tvar rozdelenia dát zodpovedá tvaru normálneho rozdelenia. Ak sa rozdelenie dát blíži normálnemu rozdeleniu, je tento parameter blízky nule.

Konfluencia

Parameter konfluencia udáva aká časť obrazu je obsadená bunkami. Konfluencia je počítaná ako podiel plochy obsadenej bunkami a celkovej plochy obrazu. Po vynásobení podielu konštantou $c = 100$ dostávame vyjadrenie v percentách.

7. Testovanie hypotéz v štatistike

Testovanie štatistických hypotéz je jedna z najdôležitejších častí vyhodnocovania experimentálnych dát v biologickom a medicínskom výskume. Štatistickou analýzou výberových dát získaných sledovaním meranej náhodnej veličiny v experimente sme schopní rozhodnúť o platnosti určitého obecného tvrdenia (štatistickej hypotézy) na úrovni celej populácie.

Experiment je uskutočnený na sledovaných jednotkách (v našom prípade bunky), ktoré experimentátor radí do rôznych skupín (výberových súborov) podľa použitej pokusnej intervencie. Najčastejším typom experimentu je tzv. komparatívny experiment, kedy bádateľ (pozorovateľ) pracuje minimálne s dvoma skupinami – tzv. kontrolnou a pokusnou skupinou. Kontrolná skupina zvyčajne pozostáva z jedincov, ktorí nie sú vystavení pokusnej intervencii, ktorej účinky sú študované. Skupina vystavená skúmanému typu pokusného zásahu sa nazýva experimentálna (pokusná) skupina. Cieľom štatistickej analýzy experimentálnych dát je potom zistenie a kvantitatívna špecifikácia rozdielov medzi jednotlivými skupinami prostredníctvom štatistických metód pre vzájomné porovnanie výberových súborov zúčastnených v experimente.

Štatistická hypotéza

Úlohou štatistickej indukcie je rozhodnúť na základe informácií získaných z náhodných výberov, či prijmeme, alebo zamietneme určitú hypotézu týkajúcu sa základného súboru. Štatistickou hypotézou rozumieme akékoľvek tvrdenie, ktoré sa môže týkať neznámych parametrov, daných funkcií parametrov, ale tiež tvaru rozdelenia a ďalších vlastností základných súborov. Pravidlo, ktorým určíme rozhodnutie o platnosti či neplatnosti hypotézy, sa nazýva štatistický test. Ak sa štatistické hypotézy týkajú neznámych parametrov a pri uskutočnení testov hypotéz sa vychádza zo známeho rozdelenia sledovanej náhodnej veličiny v základnom súbore (najčastejšie Gaussové normálne rozdelenie), hovoríme zvyčajne o parametrických testoch. Ak sa štatistické hypotézy týkajú obecných vlastností základného súboru a príslušný test nevyžaduje znalosť typu rozdelenia v základnom súbore, hovoríme o neparametrických testoch.

Pri štatistickom testovaní najprv formulujeme štatistickú hypotézu, tzn. formuláciu výskumnej otázky v rámci experimentu do formy nulovej a alternatívnej hypotézy, ktoré kladieme pri testovaní proti sebe:

- nulová hypotéza (označenie H_0) – tvrdenie, ktoré zvyčajne vyjadruje „žiadny, teda nulový rozdiel“ medzi testovanými súbormi dát. Nulová hypotéza môže byť napríklad: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2$, $\mu_1 = \mu_2$, $\mu = \text{konšt.}$, a pod.
- alternatívna hypotéza (označenie H_1) – popiera platnosť nulovej hypotézy H_0 . Zvyčajne sa vyjadruje ako „existencia diferencie“ medzi súbormi, alebo „existencie závislosti“ medzi premennými. Ide o logický opak nulovej hypotézy, tzn. napríklad $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$, $\mu_1 \neq \mu_2$, $\mu \neq \text{konšt.}$

Pokiaľ pri štatistickom testovaní nedokážeme opak, predpokladáme, že platí nulová hypotéza.

Hladina významnosti testu

Druhý krom pri testovaní štatistických hypotéz spočíva v určení hladiny významnosti testu (chyba α zvolená experimentátorom). Je to pravdepodobnosť, že bude testom zamietnutá nulová hypotéza pri jej platnosti.

Testovanú hypotézu vždy prijímame, alebo zamietame na základe výsledku náhodného výberu, a preto môže byť zamietnutie i nezamietnutie hypotézy H_0 správne, ale i nesprávne. Obecne je možné sa dopustiť jednej z 2 chýb:

- chyba 1. druhu α – zamietneme hypotézu H_0 v prípade jej platnosti
- chyba 2. druhu β – nesprávne prijmeme hypotézu H_0 v prípade jej neplatnosti

Snahou je voliť test tak, aby pravdepodobnosť chyby 1. a 2. druhu bola čo najmenšia. Univerzálny test minimalizujúci obe chyby neexistuje, pretože čím väčšie je α , tým menšie je β a naopak. Chyba α sa zvyčajne volí 0,05 (prípadne 0,01) a tým dostaneme 95% (99%) istotu správneho rozhodnutia.

Výpočet testovacieho kritéria

Po určení významnosti je nasledujúcim krokom pri testovaní hypotéz výpočet testovacieho kritéria. Na jeho základe uskutočňujeme rozhodnutie o platnosti (neplatnosti) nulovej hypotézy. Existuje mnoho testovacích štatistík. Výpočet závisí na povahe dát a testovanej hypotézy. Testovacie kritéria sa riadia rôznymi typmi rozdelenia. Ako testovacie kritérium slúžia napríklad veličiny:

- t (Študentov t -test pre testovanie rozdielu 2 stredných hodnôt)
- F (F -test pre testovanie rozdielu 2 rozptylov)

Obor hodnôt testovacieho kritéria rozdeľujeme pri testovaní hypotéz na 2 časti:

- kritický obor – obor hodnôt, ktorý svedčí v prospech alternatívnej hypotézy H_1 (zamietame H_0)
- obor prijatia – ak padne vypočítaná hodnota testovacieho kritéria do tohto oboru, potom testovanú nulovú hypotézu H_0 nezamietame.

Vymedzenie kritického oboru a oboru prijatia sa udáva pomocou kritických hodnôt testovacieho kritéria, čo sú špecifické kvantily príslušných rozdelení súvisiacich so zvolenou hladinou významnosti α . V tejto práci sa využíva kvantil $1 - \alpha$ príslušného rozdelenia. Kvantily sú tabelované v štatistických tabuľkách.

Výsledný krok testovania hypotéz je formulácia záveru. To znamená prevedenie testovacej štatistiky do pravdepodobnostnej škály a počítanie pravdepodobnosti p , ktorá udáva hranicu platnosti nulovej hypotézy, tzn. ak je p -hodnota menšia ako hodnota zvolenej hladiny významnosti, nulovú hypotézu zamietneme.

Študentov t -test

T -test patrí medzi parametrické testy a skúma rozdiel 2 stredných hodnôt. Rozdielnosť výberových stredných hodnôt môžu podmieňovať náhodné vplyvy; vo všeobecnosti to nastane aj vtedy, ak sú obidva výbery z toho istého základného súboru. Rozdiel však môže vzniknúť aj z toho, že výbery sú zo základných súborov s rozdielnymi strednými hodnotami. Podľa hladiny významnosti testovacieho kritéria rozdielu stredných hodnôt usudzujeme účinnosť zmien podmienok v experimente.

Za predpokladu normálneho rozdelenia s parametrami σ^2 a μ je vypočítané testovacie kritérium t pomocou odhadov s^2 a x parametrov normálneho rozdelenia.

T -test je možné rozdeliť na jednovýberový a dvojitý. Jednovýberový t -test používame ak poznáme strednú hodnotu základného súboru. Potom nulová hypotéza znie, že stredná hodnota je rovná konštante. Dvojitý t -test delíme na párový a nepárový. Ak je experiment uskutočnený na jednej skupine jedincov s dvomi meraniami pri nerovnakých podmienkach používa sa párový t -test. Ak pri experimente skúmame rozdielnosť dvoch nezávislých skupín je použitý nepárový t -test. V mojej práci porovnávame stredné hodnoty dvoch súborov s neznámou strednou hodnotou základného súboru. Z toho dôvodu je použitý nepárový dvojitý t -test.

Hypotéza nepárového dvojitý t -testu znie: $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Výpočet testu vychádza

z odhadov parametrov obidvoch porovnávaných skupín, tj. aritmetického priemeru $\bar{x}$ a výberového rozptylu s^2 . U výberových súborov sa vypočítajú výberové charakteristiky prvého (x_1, s_1^2) a druhého súboru (x_2, s_2^2). Testované parametre môžu pochádzať zo súborov s rovnakými a nerovnakými hodnotami rozptylu. Preto je najprv nutné otestovať zhodnosť rozptylov dvoch skupín. Na to slúži F -test, ktorý je opísaný v ďalšom odstavci. Podľa výsledku F -testu zvolíme postup pre nepárový t -test.

T-test pri rovnakom rozptyle

Testovacie kritérium:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad (7.1)$$

kde n_1 a n_2 sú počty jedincov v dvoch nezávislých súboroch, x_1 a x_2 ich aritmetické priemery a s je celková smerodajná odchýlka počítaná z s_1 a s_2 .

Toto testovacie kritérium porovnáваме s kritickou hodnotou $t_{\alpha, f}$, ktorá je tabelovaná pre rôzne stupne voľnosti f :

$$f = n_1 + n_2 - 2 \quad (7.2)$$

T-test pri nerovnakom rozptyle

Testovacie kritérium:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (7.3)$$

kde s_1 a s_2 sú smerodajné odchýlky dvoch nezávislých súborov.

Toto testovacie kritérium porovnáваме s kritickou hodnotou $t_{\alpha, f}$, ktorá je tabelovaná pre rôzne stupne voľnosti f :

$$f = \frac{1}{\frac{c^2}{n_1 - 1} + \frac{(1 - c)^2}{n_2 - 1}} \quad (7.4)$$

pričom

$$c = \frac{\frac{s_1^2}{n_1}}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \quad (7.5)$$

F-test

Ako bolo uvedené v predchádzajúcom odstavci, pred použitím t -testu treba teda overiť, či možno rozdiel rozptylov výberov považovať ešte za náhodný, alebo či je so zreteľom na rozdielnosť parametrov signifikantný.

Z dvoch normálne rozdelených základných súborov s neznámymi rozptylmi σ_1^2 a σ_2^2 vezmeme vzorku s rozsahom n_1 , resp. n_2 . Vypočítame výberové rozptyly s_1^2 a s_2^2 . Tieto môžu

byť rozdielne, aj keď $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$. Formulujeme nulovú hypotézu $\sigma^2 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ a pýtame sa, či výberové hodnoty súhlasia s touto hypotézou, alebo nie.

F -test je založený na výberovom rozdelení podielu výberových rozptylov pre prípad, že obidva výbery sú zo základných súborov s tou istou varianciou.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (7.6)$$

Znalosť tohto rozdelenia umožňuje, podobne ako pri iných testovacích metódach, určiť obor prijatia a kritický obor pre danú pravdepodobnosť omylu α .

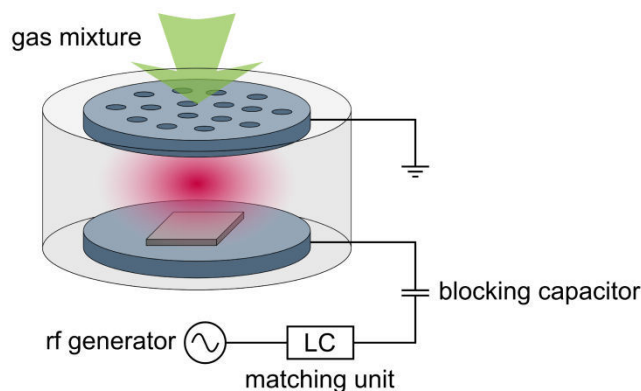
F -rozdelenie má dva parametre, počet stupňov voľnosti f_1 a f_2 . Pre porovnanie variancií dvoch nezávislých výberov platí $f_1 = n_1 - 1$ a $f_2 = n_2 - 1$. F -rozdelenie je tabelované. Vypočítanú hodnotu F porovnávame s tabuľkovou hodnotou $F_{\alpha; n_1-1, n_2-1}$.

8. Plazmová polymerizácia kultivačných povrchov

Úpravy povrchov materiálov pre kontakt so živými tkanivami a napodobenie prirodzeného prostredia bunky je stále viac predmetom záujmu pre ich potencionálne využitie v tkanivovom inžinierstve. Plazmová polymerizácia ponúka nenákladnú a účinnú metódu úpravy povrchov pre zvýšenie biokompatibility. Plazmová polymerizácia je využiteľná na širokú škálu materiálov a po aplikácii neovplyvňuje samotné vlastnosti materiálov.

Jedna z možností modifikovať povrch materiálu je vystavenie materiálu účinkom plazmy elektrického výboja v parách cyklopropylaminu. V tomto type plazmy dochádza k nízkotlakovej plazmovej polymerizácii, ktorá vytvorí tenkú povrchovú vrstvu obsahujúcu aminové skupiny. Predpokladá sa, že tento povrch je vhodný pre adhéziu a proliferáciu buniek. Cieľom tejto práce bol tento predpoklad overiť pomocou multimodálneho holografického mikroskopu MHM Q-Phase.

Samotné plazmové polyméry boli pripravené v reaktore s platňami z nerezovej oceli podľa obr. 16. Spodná elektróda bola kapacitne spojená s rádiovýkvečným generátorom. V reaktore bol vyčerpaný vzduch turbomolekulárnou pumpou a bol plnený plynmi cyklopropylaminu cez hornú uzemnenú elektródu s komôrkami. Depozícia prebiehala 60 min.



Obr. 106: Aparatúra pre prípravu plazmových polymérov.

9. Experiment

9.1. Motivácia experimentu

Vlastnosti prostredia buniek ovplyvňujú parametre ako proliferácia, migrácia a diferenciácia, určujúce mieru biokompatibility materiálov a schopnosti napodobniť prirodzené bunkové prostredie. Práve povrchy upravené plazmovou polymerizáciou v parách cyklopropylaminu by mali vykazovať vyššiu mieru biokompatibility. Pozorovanie interakcie povrchov materiálov s bunkami je v záujme ľudí práve pre aplikácie v úprave povrchov implantátov, hojenie rán a pod. Preto má zmysel sledovať interakcie s novými materiálmi pre zlepšenie prostredia a možného využitia v medicíne.

9.2. Kultivácia buniek

Pre všetky pozorovania boli použité bunky s označením LF (stabilizovaná línia ľudských podkožných fibroblastov). Všetky vzorky LF buniek boli kultivované v laboratórií Experimentálnej biofotoniky na Ústave fyzikálneho inžinierstva VUT v Brne. Kultivácia bunkovej línie prebiehala pri teplote 37°C a atmosfére 5% CO₂ v štandardnom médiu M1H.



Obr. 17: Pozorovacia komôrka z nerezovej oceli.

9.3. Pozorovanie

Vzorky buniek LF s kontrolnou vrstvou a vrstvou bohatou na aminové skupiny boli pozorované v MHM Q-PHASE v transmisnom móde počas troch dní vždy s približným časovým odstupom 24h. Bolo pozorovaných viacero zorných polí náhodne rozmiestnených po preparáte, z ktorých bolo v každom dni z oboch vzoriek získaných približne 100 buniek pre spracovanie. Boli použité objektívy 10x/0,3. Samostatne pre parameter konfluencia boli použité objektívy 4x/0,1. Pre biele svetlo bol použitý filter s maximálnou priepustnosťou na vlnovej dĺžke 650nm. Pri sledovaní bola v inkubátore MHM Q-PHASE po celý čas teplota 37°C. Štatistický súbor bol testovaný na hladine významnosti 0,05 *F*-testu. *T*-test bol rozdelený podľa tab. 1 na 4 skupiny podľa hladiny významnosti. Každá hladina vypovedá o signifikantnosti rozdielu. Bunky boli umiestnené v nerezovej kruhovej pozorovacej komôrke, ktorej dno a uzáver tvorilo kruhové krycie sklíčko. V jednom prípade išlo o kontrolné sklíčko a v druhom o sklíčko ošetrené plazmovou polymerizáciou. Úpravu povrchov materiálov zabezpečila skupina zaoberajúca sa plazmovými technológiami CEITEC Brno pod vedením doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.. Výsledná vrstva upravená plazmovou polymerizáciou má vysoké zastúpenie aminových skupín. Hustota sadenia buniek bola 50 buniek/mm².

Tabuľka 1: Rozdelenie t-testu

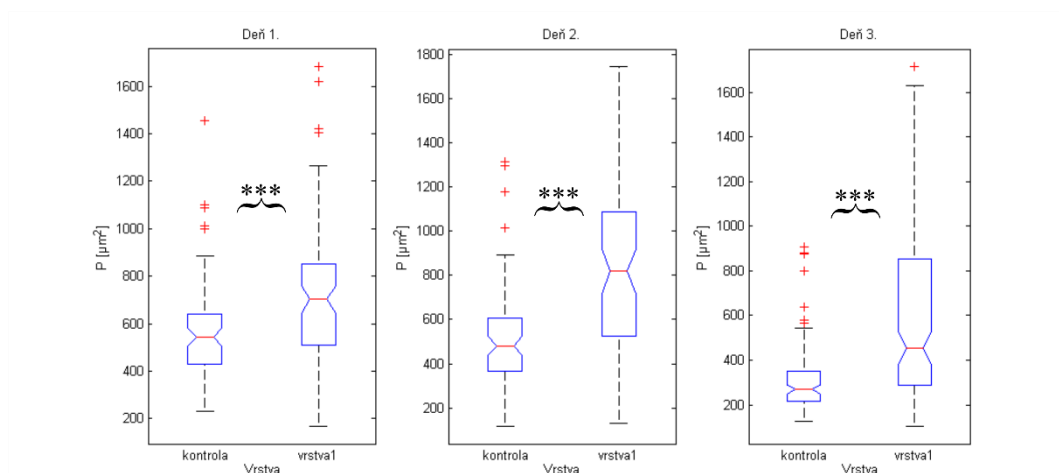
Pravdepodobnosť chyby	>0,05	<0,05	<0,01	<0,001
Slovné vyjadrenie	Nesignifikantná	Signifikantná	Vysoko signifikantná	Veľmi vysoko signifikantná
Písmenová symbolika	n. s.	s.	v. s.	v. v. s.
Grafická symbolika	o	*	**	***

9.4. Výsledky experimentu

Pre grafické znázornenie výsledkov boli z uvedených parametrov vybrané len niektoré, vhodné pre popis buniek.

Plocha bunky P

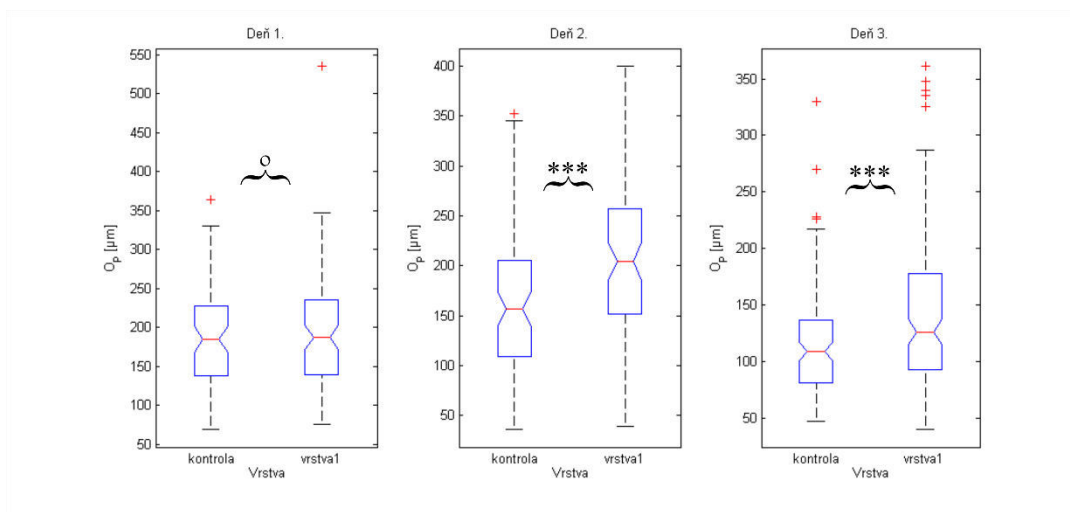
Plocha bunky vypovedá o rozložení (rozťahnutí) bunky na povrchu. Porovnanie kontroly s vrstvou parametrom *plocha bunky P* štatistický test zamietá nulovú hypotézu na hladine významnosti $\alpha = 0,001$ vo všetkých troch dňoch. To znamená, že plocha buniek na vzorke s plazmou upraveným povrchom je veľmi vysoko signifikantne vyššia ako na kontrole vzorku. Značný rozdiel je zrejmý aj z grafu 1.



Graf 1: Parameter *plocha bunky P* pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Obvod plochy O_P

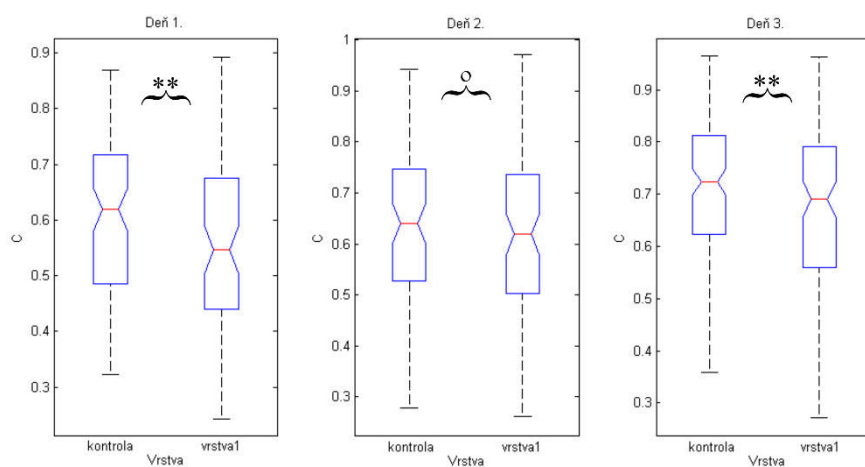
Obvod plochy bunky vypovedá z jednej časti o ploche bunky a z druhej o jej členitosti. Štatistický test ukázal, že v prvom dni nebol pozorovaný žiadny signifikantný rozdiel medzi kontrolnou vrstvou a vrstvou upravenou plazmovou polymerizáciou. V nasledujúcich dvoch dňoch test ukázal signifikantný rozdiel na hladine významnosti $\alpha = 0,001$. Neúkaznosť rozdielu v prvý deň je možné odôvodniť výsledkom z parametru *členitosť I*, ktorý tiež nevykazoval značný rozdiel v prvom dni. To znamená, že bunky 1. deň nie sú na upravenej vrstve výrazne členitejšie ako na kontrolnej vrstve, teda nemajú ani väčší obvod plochy. Signifikantne väčší rozdiel plochy v prvom dni nemusel dostatočne určovať rozdiel medzi obvodmi vzoriek



Graf 2: Parameter *obvod plochy* O_p pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Celistvosť C

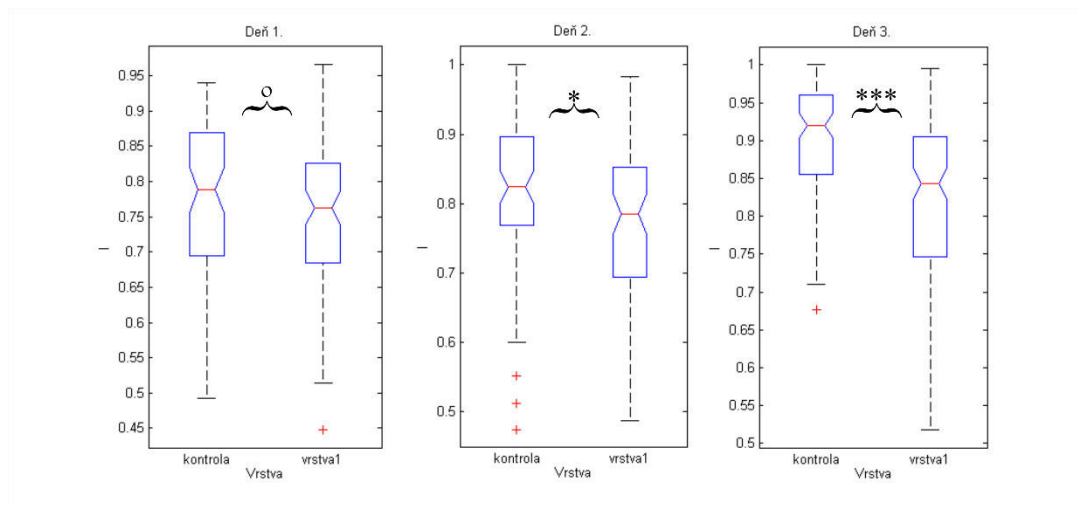
Celistvosť udáva (po prenasobení faktorom $c = 100$) percentuálnu zhodu plochy bunky P a konvexnej plochy KP . Čím menšia je hodnota tohto parametru tým členitejšia je bunka. Rozdielnosť tohto parametru sa z doterajších úvah a predpokladov potvrdila v prvom a treťom dni. Z výsledku vyplýva, že bunky na upravenom povrchu sú členitejšie. V druhom dni test neukázal žiadny významný rozdiel.



Graf 3: Parameter *celistosť* C pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Členitosť I

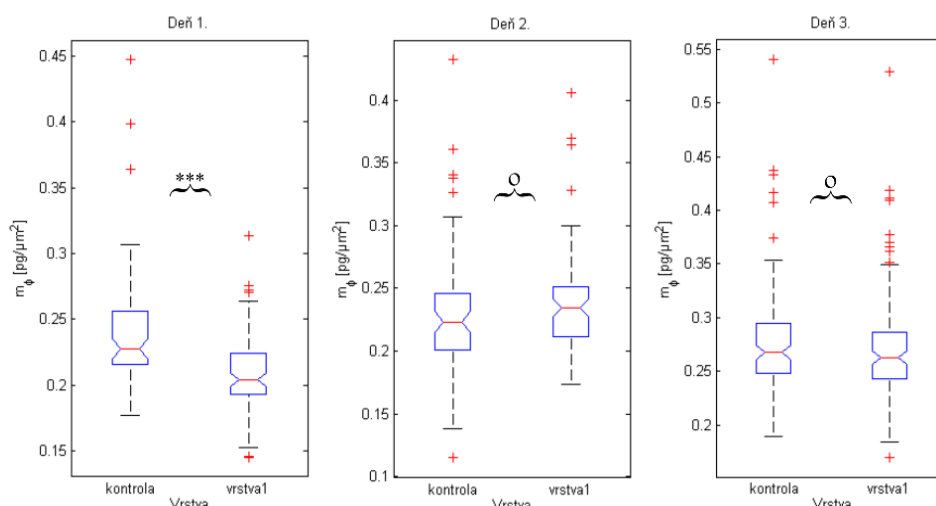
Členitosť dáva do pomeru obvod konvexnej plochy O_{KP} k obvodu plochy O_P . Členitosť je tým menšia, čím členitejšia je bunka. Z testu vyplynula, že členitosť v treťom dni dosiahla veľmi vysoko signifikatne väčší rozdiel. Z grafu vidieť nižšiu strednú hodnotu pre bunky s nanosenou vrstvou, z čoho plynie ich väčšia členitosť.



Graf 4: Parameter členitosť I pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Priemerná hodnota hustoty suchej hmoty m_ϕ

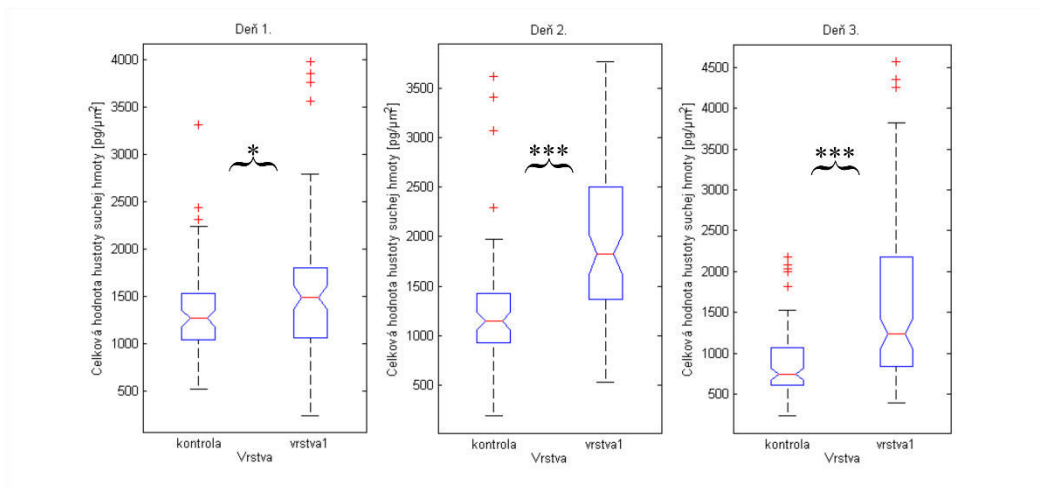
Test ukázal veľmi vysoký signifikantný rozdiel v prvom dni merania, kdežto v ďalších dvoch dňoch test neukázal žiadny signifikantný rozdiel. To znamená, že bunky sú 1. deň na plazmovo-upravenom povrchu viac adherované. Rozdiel už nie je signifikantný v druhom a treťom dni, z toho vyplýva, že priemernú hustotu suchej hmoty bunky ovplyvňuje upravený povrch len prvý deň. To je prekvapujúci záver, keďže so zväčšujúcou adhéziou by mal tento parameter klesať za predpokladu, že bunky majú rovnakú celkovú hodnotu suchej hmoty. To sa ukázalo ako nesprávny predpoklad, ktorý vyvrátil test parametru celková suchá hmotnosť.



Graf 5: Parameter priemerná hodnota hustoty suchej hmoty m_ϕ pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Celková hodnota hustoty suchej hmoty M

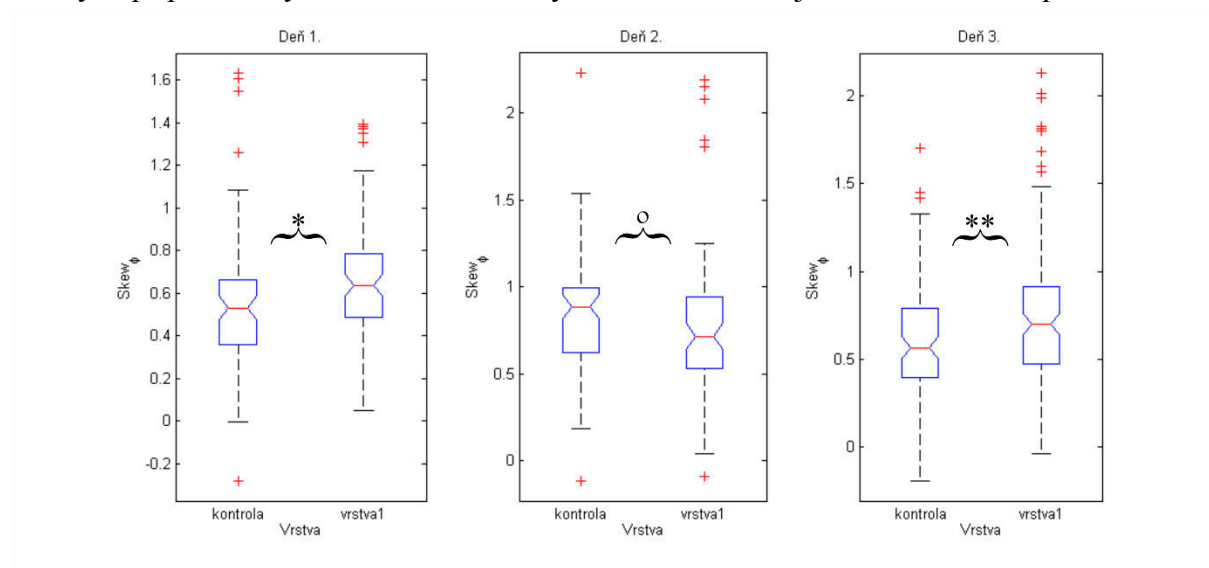
Celková hustota suchej hmoty vypovedá o životaschopnosti buniek. Významnosť rozdielu parametru M má stúpajúcu tendenciu s väčšími hodnotami pre plazmou upravený povrch. To značí prijateľnejšie prostredie pre bunku na nanesej vrstve.



Graf 6: Parameter celková hodnota hustoty suchej hmoty M pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Šikmosť rozloženia hodnôt hustoty suchej hmoty bunky $Skew_{\phi}$

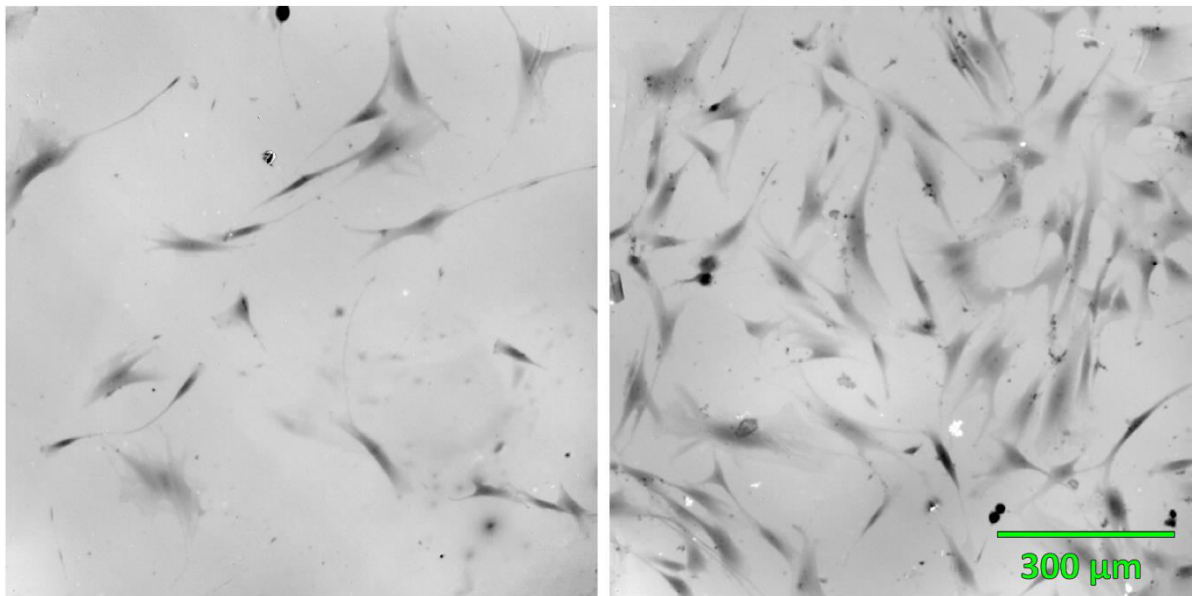
Tento parameter špecifikuje symetriu distribúcie hustoty suchej hmoty bunky okolo strednej hodnoty, takže dáva informáciu o zastúpení hodnôt hustoty suchej hmoty v bunke. Vo všetkých prípadoch vyšla šikmosť v kladných hodnotách s najväčším rozdielom pre 3. deň.



Graf 7: Parameter šikmosť $Skew_{\phi}$ pre 1., 2. a 3. deň s vyznačenou hladinou významnosti testu

Konfluencia

Konfluencia hovorí o zhlukovaní buniek. Tá je už z obr. 18 zjavne vyššia pre vrstvu. Bolo získaných 10 obrazov z rôznych zorných polí. Priemerné percentuálne zastúpenie plochy obrazu bunkami pre kontrolnú vrstvu resp. upravenú vrstvu je 8% resp. 22%.



Obr. 18: Snímok z MHM Q-Phase zobrazujúci *konfluenciu*. Vľavo kontrolná vrstva, vpravo upravená vrstva.

9.5 Zhrnutie výsledkov experimentu

Výsledky testov ukázali rozlišovaciu schopnosť jednotlivých parametrov. Parametre vhodné na popis diferencií daných vrstiev sú plocha bunky P , obvod plochy OP , členitosť I , celková hodnota suchej hmoty M , konfluencia. Tie sa vyznačujú hladinou významnosti $\alpha = 0,001$ v treťom dni. Pomocou týchto parametrov je možné vyvodiť záver, že nanosená vrstva je prijateľnejším prostredím pre bunky, kedy sa preukázala vyššia adhézia a životaschopnosť buniek na upravenom povrchu.

10. Záver

Cieľom tejto práce bolo sledovanie bunečnej línie v kvantitatívnom fázovom zobrazení a navrhnutie experimentu pre sledovanie vplyvu tenkých vrstiev na chovanie bunečnej línie v multimodálnom holografickom mikroskope a spracovanie získaných dát.

Prvá časť práce pojednáva o probléme zobrazenia a kvantitatívneho popisu fázových objektov, ďalej je stručne opísané rozdelenie interferenčných metód v mikroskopii a je podaná stručná história holografie a holografie na VUT.

V ďalšej časti práce je popísaný multimodálny holografický mikroskop MHM Q-Phase skonštruovaný na VUT. Je opísané optické usporiadanie a software Q-Phase. Táto časť pojednáva aj o výhodách tohto mikroskopu a možnostiach jeho využitia.

Ďalej je popísaný význam fáze v obraze a jej bezprostredné využitie v kvantitatívnom popise živých buniek. Sú popísané techniky segmentácie obrazu získaného multimodálnym holografickým mikroskopom Q-Phase, potrebné pre správne určenie parametrov buniek. Je popísané získavanie morfológických parametrov buniek a ich podrobný jednotlivý popis.

V ďalšej časti boli uvedené a opísané použité štatistické testy ich kritéria a hladiny významnosti pre správne vyhodnotenie experimentálnych dát.

Práca ďalej pojednáva o plazmovej polymerizácii o jej výhodách a samotnom procese úpravy povrchov materiálov.

Experimentálna časť zahŕňa motiváciu experimentu. Je spomenuté, že vlastnosti prostredia buniek ovplyvňujú parametre ako proliferácia, migrácia a diferenciácia, určujúce mieru biokompatibility materiálov a schopnosti napodobniť prirodzené bunkové prostredie. To do akej miery biokompatibilná bola skúmaná vrstva, mala overiť táto práca.

Boli pozorované dve skupiny LF buniek nasadených na kontrolnú vrstvu a vrstvu s upraveným povrchom pomocou plazmovej polymerizácie pre zvýšenie adhézie. Obidve skupiny boli pozorované deň po nasadení v troch dňoch s 24 hodinovými odstupmi pomocou MHM Q-Phase. Získané dáta boli štatisticky spracované za pomoci *F*-testu a *t*-testu.

Z testov a grafov parametrov bol určený záver, že vytvorená tenká vrstva pomocou plazmovej polymerizácie v parách cyklopropylaminu zlepšila prostredie bunky a tým zvýšila ich životaschopnosť. Bunky boli viac adherované na plazmou upravenom povrchu v porovnaní s kontrolnou vrstvou.

Zoznam použitej literatúry

- [1] ZERNIKE, F.: Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Part I. *Physica*, 1942, vol. 9, no. 7, s. 686-698.
- [2] ZERNIKE, F.: Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Part II. *Physica*, 1942, vol. 9, no. 10, s. 974-986.
- [3] NOMARSKI, G.: Differential microinterferometer with polarized waves. *J. Phys. Radium*, 1955, vol. 16, 9S-13S.
- [4] HOFFMAN, R., GROSS, L.: Modulation contrast microscope. *Applied Optics*, 1975, vol. 14, no. 5, s. 1169-1176.
- [5] DUBOIS, F., JOANNES, L., LEGROS, J. C.: Improved three-dimensional imaging with digital holography microscope using a partial spatial coherent source, *Appl. Opt.*, 1999, vol. 38, no. 34, s. 7085-7094.
- [6] YAMAGUCHI, I., ZHANG, T.: Phase-shifting digital holography. *Optics Letters*, 1997, vol. 22, no. 16, s. 1268-1270.
- [7] PEDRINI, G., FRONING, P., FESSLER, H., TIZIANI, H. J.: In-line digital holographic interferometry. *Applied Optics*, 1998, vol. 37, no. 26, s. 6262-6269.
- [8] ZHANG, T., YAMAGUCHI, I.: Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography, *Opt. Lett.*, 1998, vol. 23, s. 1221-1223.
- [9] XU, L., MIAO, J. M., ASUNDI, A.: Properties of digital holography based on in-line configuration. *Optical Engineering*, 2000, vol. 39, no. 12, s. 3214-3219.
- [10] INDEBETOUW, G., KLYSUBUN, P.: Imaging through scattering media with depth resolution by use of low-coherence gating in spatiotemporal digital holography, *Opt. Lett.*, 2000, vol. 25, no. 4, s. 212-214.
- [11] CUCHE, E., BEVILACQUA, F., DEPEURSINGE, C.: Digital holography for quantitative phase-contrast imaging, *Opt. Lett.*, 1999, vol. 24, no. 5, s. 291-293.
- [12] CARL, D., KEMPER, B., WERNICKE, G., VON BALLY, G.: Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis, *Appl. Opt.*, 2004, vol. 43, no. 36, s. 6536-6544.
- [13] GABOR, D.: A new microscopic principle, *Nature*, 161, 777 (1948).
- [14] CHMELÍK, R., HARNA, Z.: Parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 1999, vol. 38, issue 10, s. 1635-1639. DOI: 10.1117/1.602217.
- [15] CHMELÍK, R., HARNA, Z.: Surface profilometry by a parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 2002, vol. 41, issue 4, s. 744-745. DOI: 10.1117/1.1461832.

- [16] MACHÁLEK, M.: *Zobrazení biologických vzorku v holografickém konfokálním mikroskopu*. Brno, 2001. Diplomová práce. VUT Brno, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [17] POPESCU, G.: *Quantitative phase imaging of cells and tissues*. New York: McGraw-Hill, 2011, 362 s. McGraw-Hill biophotonics. ISBN 00-716-6342-8.
- [18] KOLMAN, P., CHMELÍK, R.: Coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2010, vol. 18, issue 21, s. 21990-22003. DOI: 10.1364/OE.18.021990.
- [19] LOŠŤÁK, M. *et al.* Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, vol. 7746, 9 s. DOI: 10.1117/12.882198.
- [20] KOLMAN, P. *et al.* In vitro dynamic observations in a low-coherence holographic microscope. *15th Czech-Polish-Slovak Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2007, Vol. 6609, 7 s. DOI: 10.1117/12.739502.
- [21] JANEČKOVÁ, H. *et al.* Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination. *Optical and Digital Image Processing*. Proceedings of the SPIE, 2008, 70002E, 8 s. DOI: 10.1117/12.800392.
- [22] LEITH, E. N., UPATNIEKS, J.: Holography with Achromatic-Fringe Systems, *J. Opt. Soc. Am.*, 1967, vol. 57, no. 8, s. 975-980.
- [23] SLABÝ, T. *et al.* Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21, issue 12, s. 14747-14762. DOI: 10.1364/OE.21.014747.
- [24] B. KEMPER, A. BAUWENS, A. VOLLMER, S. KETELHUT, P. LANGEHANENBERG, J. MUTHING, *et al.*, Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy, *J. Biomed. Opt.* 15 (2010) 036009.
- [25] ZIKMUND, T. *et al.* Dynamical deformation compensation of phase in digital holographic microscopy. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, č. 7746, 7 s. DOI: 10.1117/12.882171.
- [26] BARER, R.: Interference Microscopy and Mass Determination, *Nature*. 169 (1952) 366–367.
- [27] LEITH, E. N., UPATNIEKS, J.: Holography with Achromatic-Fringe Systems, *J. Opt. Soc. Am.*, 1967, vol. 57, no. 8, s. 975-980.
- [28] SLABÝ, Tomáš *et al.* Coherence-controlled holographic microscope. *17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010, č. 7746, 8 s. DOI: 10.1117/12.882048.

- [29] Nejlepší spolupráce roku mezi firmami a výzkumnou sférou. [online]. [Cit. 2014-05-17]. Dostupné z <http://www.spolupraceroku.cz/> (10.5.2016).
- [30] CHMELÍK, R.: Koherenci řízená holografická mikroskopie: Coherence-controlled holographic microscopy : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika. Brno: VUT IUM, 2011, 23 s. ISBN 978-80-214-4336-5.
- [31] LEITH, E., UPATNIEKS, J.: Reconstructed wavefronts and communication theory, JOSA, 52, 1123-1128 (1962).
- [32] POPESCU, G. et al., Optical imaging of cell mass and growth dynamics. American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 295, pp. C538-C544, (2008).
- [33] Testování hypotéz ve statistice, dostupné z <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/hypotezy.htm> (14.5.2016).
- [34] CHMELÍK, R., EOLLÁKOVÁ, J., KOÍŘOVÁ, A., DOSTÁL, Z., ANTOČ, M., VAŠÍČEK D. Multimodální hologra_cký mikroskop | Společný projekt VUT a TESCAN. Jemná mechanika a optika, e. 6-7, 2014.