



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY BUNĚČNÉ LINIE V
MULTIMODÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU V
TRANSMISNÍM MÓDU**

CELL TRACKING IN MULTIMODAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE USING TRANSMISSION MODE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucia Blaštáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Štrbková

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka: **Lucia Blaštáková**
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 dynamiky buněčné linie v multimodálním holografickém mikroskopu v transmisním módu

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 rakovinné buňky. Pozorováním dynamiky buněk touto technikou je možné získat nové poznatky o buněčných mechanizmech.

Cíle bakalářské práce:

- 1) Vypracování rešerše způsobu sledování buněčné linie multimodálním holografickým mikroskopem.
- 2) Návrh a provedení experimentu pro měření dynamiky buněk multimodálním holografickým mikroskopem v transmisním módu.
- 3) Vyhodnocení dynamiky a dalších parametrů buněčné linie digitálním zpracováním snímků z mikroskopického pozorování.

Seznam literatury:

Kim, M.: Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications, Springer, 2011

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 Šikola, CSc.
ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h.
c.
děkan fakulty

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberá sledovaním dynamiky bunecnej línie v multimodálnom holografickom mikroskope v transmisnom móde. Cieľom experimentu je kvantitatívny popis epiteliálno-mezenchymálneho prechodu nádorových buniek NMuMG.

V úvode práce je stručne popísaná história interferenčnej mikroskopie a jej aplikácie, konštrukčné riešenie multimodálneho holografického mikroskopu Q-Phase a práca s programom použitým na spracovanie dát. Ďalej nasleduje stručný popis parametrov, ktoré boli vybrané pre kvantitatívny popis epiteliálno-mezenchymálneho prechodu.

V závere práce boli zhrnuté všetky získané poznatky z pozorovania epiteliálno-mezenchymálneho prechodu.

Abstract

This thesis is focused on the monitoring of cell dynamics in multimodal holographic microscope using transmission mode. The goal of this experiment is a quantitative description of the epithelial-mesenchymal transition of cancer cells NMuMG.

The introduction briefly describes a history of interference microscopy and its applications, design of multimodal holographic microscope Q-Phase and work with the program used for data processing. Next follows a brief description of parameters that were selected to quantify the epithelial-mesenchymal transition.

In conclusion, all results from the observation of epithelial-mesenchymal transition were summarized.

Klíčová slova

Multimodální holografický mikroskop, kvantitatívny fázový obraz, epiteliálno-mezenchymálny prechod

Keywords

Multimodal holographic microscope, quantitative phase image, epithelial-mesenchymal transition

BLAŠŤÁKOVÁ, Lucia. *Sledování dynamiky bunecnej línie v multimodálním holografickém mikroskopu v transmisním módu*. Brno, 2016. 36 s. Bakalárska práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedúci bakalárskej práce Ing. Lenka ŠTRBKOVÁ.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu *Sledování dynamiky buněčné linie v multimodálním holografickém mikroskopu v transmisním módu* vypracovala samostatne pod vedením Ing. Lenky Štrbkovej, s použitím materiálov uvedených v zozname literatúry.

25.5.2016

Lucia Blašťáková

Na tomto mieste by som rada poďakovala svojej vedúcej bakalárskej práce Ing. Lenke Štrbkovej za trpezlivé vedenie, cenné rady a predávaný optimizmus, svojej rodine za morálnu a finančnú podporu.

Lucia Blašťáková

Obsah

1 Úvod do interferenčnej mikroskopie.....	1
1.1 História interferenčnej mikroskopie.....	1
1.2 Rozdelenie interferenčných mikroskopov.....	2
1.3 Holografická mikroskopia na FSI VUT v Brne.....	3
2 Multimodálny holografický mikroskop Q-Phase	5
2.1 Konštrukcia Q-Phase	5
2.2 Zobrazenie v Q-phase.....	6
2.3 Spracovanie hologramu.....	6
2.4 Popis použitého softwaru, meranie a ukladanie dát.....	8
3 Popisné parametre bunky	11
3.1 Plocha bunky A (area).....	11
3.2 Obvod plochy bunky P_A (perimeter)	11
3.3 Kruhovitost' R (roudnness).....	11
3.4 Suchá hmota bunky M (mass)	11
3.5 Rýchlost' pohybu bunky (speed)	12
4 Epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT)	13
5 Štatistika	17
5.1 Testovanie normality dát.....	17
5.2 F-test (test rozdielu dvoch rozptylov).....	18
5.3 T-test (test rozdielu dvoch stredných hodnôt).....	19
6 Experiment	21
6.1 Kultivácia bunkovej línie NMuMG	21
6.2 Pozorovanie buniek	21
6.3 Analytické spracovanie dát pre vyhodnotenie experimentu.....	22
6.4 Výsledky.....	23
6.5 Zhrnutie výsledkov experimentu.....	28
7 Záver.....	29
Literatúra.....	31
Zoznam použitých symbolov a skratiek.....	35

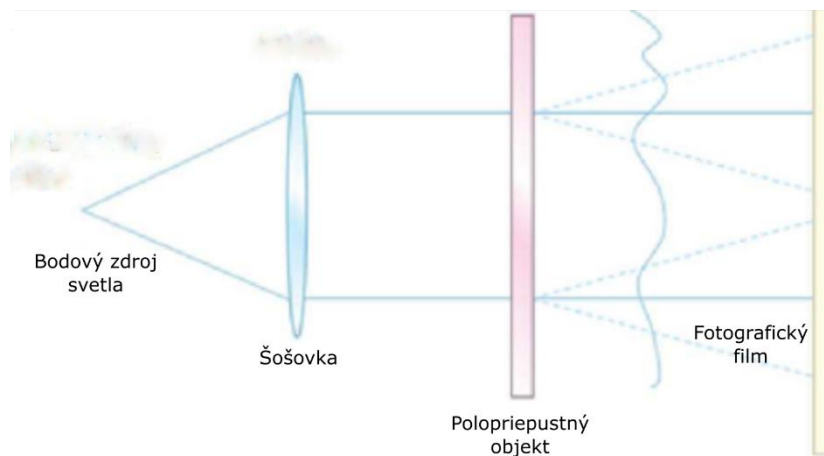
1 Úvod do interferenčnej mikroskopie

Interferenčná mikroskopia umožňuje zaznamenávať a rekonštruovať predmetové svetelné vlny nesúce informácie o skúmaných objektoch. Jedná sa o dvojfázový postup. V prvom rade je vytvorený hologram, tj. záznam o intenzite interferencie dvoch dopadajúcich svetelných vln, ktorý nesie informácie nielen o amplitúde ale aj fáze. Záznam sa zachytáva na CCD kameru a následne prebieha numerická rekonštrukcia predmetovej vlny. Takéto zobrazenie sa nazýva zobrazenie v kvantitatívnom fázovom kontraste. Získaná fáza poskytuje informácie o topografii alebo morfológii preparátu s vysokou presnosťou (desatiny nanometra). Zobrazovanie v kvantitatívnom fázovom kontraste je neinvazívne a nevyžaduje prítomnosť fluorescenčných farbív. Z tohto dôvodu sa interferenčné mikroskopy využívajú pre pozorovanie biologických, ale aj technických preparátov. V biológii sa jedná hlavne o pozorovanie dynamiky a morfológie buniek [1,2,18].

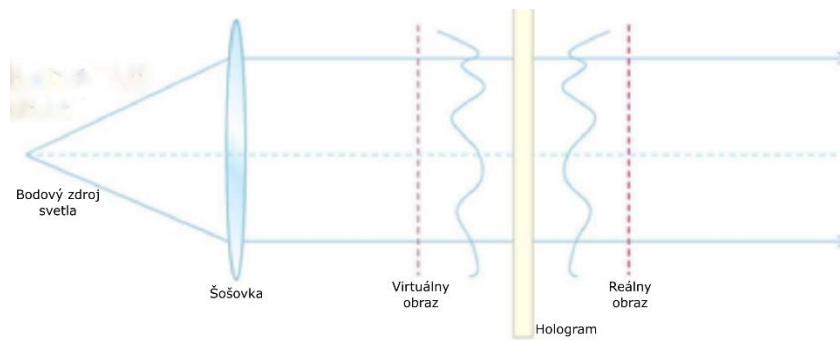
1.1 História interferenčnej mikroskopie

Robert Hook (1635-1703) vlastnoručne zostrojeným mikroskopom pozoroval fantastické farby interferenčných prúžkov na vzorku sľudy. Pojem interferencia, tj. skladanie koherentných vlnení rovnakého druhu do jednej výslednej vlny, však zaviedol a následne tento jav popísal až jeho súčasník Isaac Newton (1643-1727). Značný podiel na objasnení javu interferencie mal Thomas Young (1773-1829), ktorý v roku 1801 svojim pokusom na dvojštrbine zistil, že zložením dvoch svetelných vln vznikajú tmavé a svetlé prúžky [2]. Takmer dvesto rokov od Hookovho pozorovania vzorku živice J.L.Sirks v roku 1893 popísal prvý interferenčný mikroskop s oddeleným predmetovým a referenčným zväzkom, ktorý označil názvom „interferentiemicroscoop“ [4].

Za zakladateľa holografie je považovaný Dennis Gabor (1900-1979), ktorý v roku 1948 pri pokusoch zvýšiť rozlišovaciu schopnosť elektrónového mikroskopu navrhol dvojstupňový proces nazývaný rekonštrukcia vlnoplochy, neskôr tiež holografia. Prišiel s myšlienkou zaznamenať celú informáciu o vlne - nielen intenzitu ale aj fázu - čo ďalej viedlo k použitiu tzv. referenčnej vlny [5]. V podstate ide o záznam Fresnelovho difrakčného obrazca objektu a následné použitie tohto obrazca pre rekonštrukciu objektu [8]. Schéma pre záznam hologramu je na obr. 1.1. Svetlo z bodového zdroja bolo usmerňované šošovkami na polopriepustný objektív. Časť svetla sa na vzorku rozptýlila a časť prešla nerozptýlená. Na fotografický film bola zaznamenaná intenzita interferencie týchto častí zväzku. Osvietením hologramu rovnakým spôsobom ako by sa jednalo o nový objekt, dôjde k jeho rekonštrukcii [8].



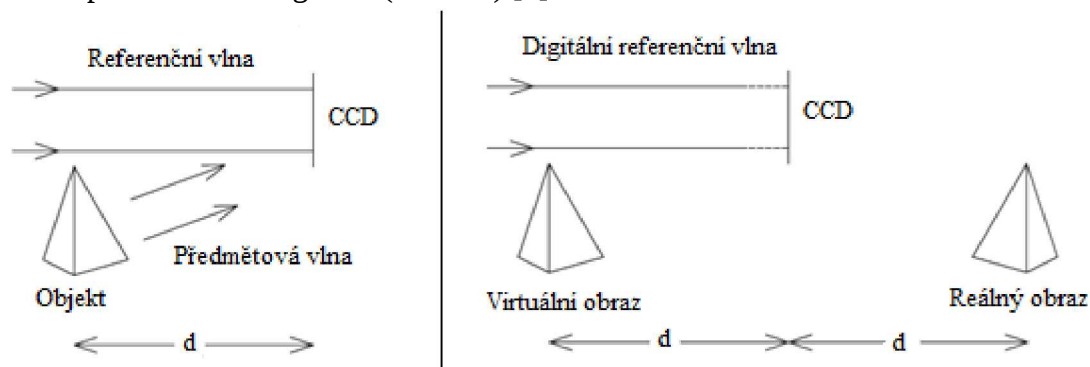
Obr.1.1 Gáborovo optické usporiadanie pre záznam hologramu vo Fresnelovej rovine. Prevzaté a upravené z [18].



Obr. 1.2 Opeť provizórny treba doplniť info. Gáborovo optické usporiadanie pre čítanie hologramu zaznamenaného vo Fresnelovej rovine. Prevzaté a upravené z [18].

Pri pozorovaní v smere chodu lúčov je vidieť za hologramom reálny obraz (obr. 1.2). Druhý virtuálny obraz vznikne pred hologramom, čo vedie k prekrytiu a značnému zhoršeniu kvality zobrazenia. Nobelovu cenu za tento objav dostáva Dennis Gabor až v roku 1971, pretože vďaka vynálezu laseru, ako koherentného zdroja monochromatického žiarenia dochádza k veľkému rozvoju holografie až v 60. rokoch 20. storočia [8,18].

W.Horn v 50. rokoch skonštruoval transmisný interferenčný mikroskop (jednalo sa o dva mikroskopy v dvoch vetvách Machovho-Zehnderovho interferometru). Pomocou systému hranolov a deličov zväzkov rozdelil osvetľovací zväzok svetla do dvoch vetví mikroskopu a následne zväzky prejdené identickým systémom spojil [3]. O niekoľko rokov neskôr bola navrhnutá Jamin-Lebedeffova konštrukcia, v ktorej bolo používané polarizované svetlo a umožňovala meranie rozdielu optických dráh zväzkov referenčnej a predmetovej vetvy [3]. Interferenčná mikroskopia bola nedocenená z dôvodu vysokej ceny a nedostatočnej výpočtovej techniky, ktorá by umožnila rýchly a jednoduchý záznam obrazu a jeho následné spracovanie [3,5]. Veľkým posunom bol priamy záznam interferenčného obrazca na CCD čip, čo umožňuje digitálne spracovanie hologramu (obr. 1.3) [9].



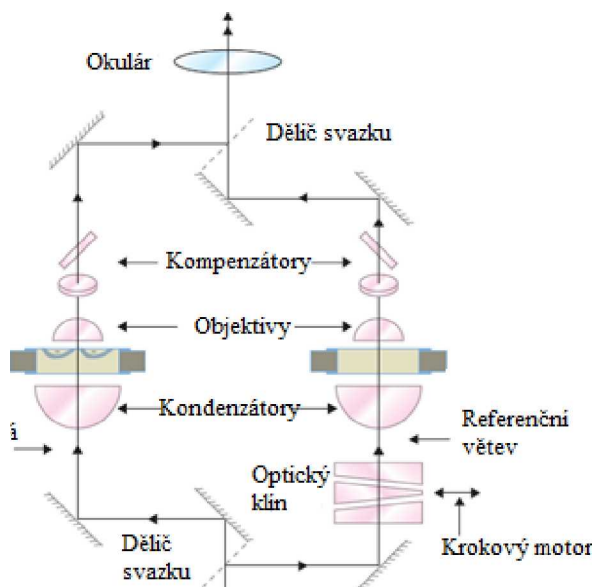
Obr.1.3 Princíp záznamu a čítania digitálneho hologramu. Prevzaté a upravené [16].

Až v posledných 20 rokoch dochádza k obnoveniu záujmu o interferenčný mikroskopiu, a to hlavne v biomedicínskych aplikáciách. Aj keď nie je tak rozšírená ako fluorescenčná a konfokálna mikroskopia, stala sa komerčne dostupnou.

1.2 Rozdelenie interferenčných mikroskopov

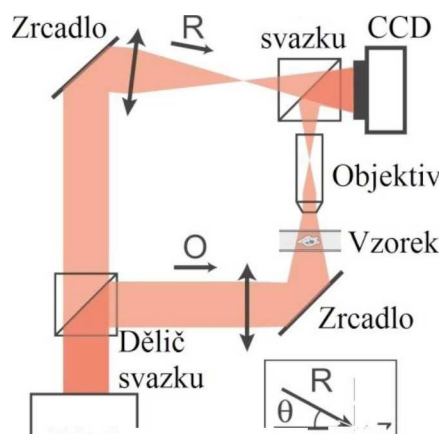
Rozlišujeme dve základné skupiny interferenčných mikroskopov, podľa uhla, ktorý zvierá referenčný a predmetový zväzok vo výstupnej rovine interferometra. Ako interferometrické (Furierovské) sú označované tie mikroskopy, kde sa predmetový a referenčný zväzok schádzajú v osi („in-line“) (obr. 1.4), mikroskopy s nulovým alebo takmer nulovým uhlom. Zariadenia

s týmto usporiadaním umožňujú použitie nekoherentných zdrojov svetla, ktoré vedú k potlačeniu koherenčného šumu a možnosti tvorby optických rezov. Ich nevýhodou je nutnosť minimálne troch hologramov na vytvorenie jedného amplitúdového a jedného fázového snímku. Sú náchylné na vibrácie, ktoré môžu spôsobovať nepresnosti v meraní a nedokážu presne zaznamenať rýchlo sa meniace deje [15, 21, 30,].



Obr. 1.4 Usporiadanie holografického mikroskopu využívajúceho posúvanie fáze. Prevzaté a upravené z [18]. holografického

Ako digitálne holografické mikroskopy (DHM), tiež niekedy Hilbertovské, sa označujú tie, v ktorých nastáva mimoosová interferencia („off-axis“) (obr. 1.5), mikroskopy s nenulovým uhlom. Vyžadujú použitie koherentných svetelných zdrojov, čo spôsobuje zníženie kvality zobrazenia vplyvom koherenčného šumu, parazitných interferencií a znemožňuje pozorovanie preparátov v rozptyľujúcom prostredí. Zároveň však umožňujú rekonštrukciu objektivej vlny z jediného snímku (hologramu), čo prináša možnosť zobrazovania rýchlych dejov [14,15,18,30].



Obr. 1.5 Usporiadanie mimoosového holografického mikroskopu. R, referenčná vetva. O, predmetová vetva. Prevzaté a upravené z [31].

1.3 Holografická mikroskopia na FSI VUT v Brne

Unikátne usporiadanie mimoosových koherenciou riadených holografických mikroskopov vyvíjaných na VUT umožňuje využitie priestorovo a časovo nekoherentných zdrojov

osvetlenia. To vedie k spojeniu výhod obidvoch skupín interferenčných mikroskopov a súčasne k eliminácii ich nevýhod. Takto usporiadaný mikroskop umožňuje zobrazovanie dynamických dejov v kvantitatívnom kontraste, potlačenie koherenčného šumu a parazitných interferencií, hĺbkovú diskrimináciu a priečne rozlíšenie porovnateľné s konvenčnými optickými mikroskopmi [14].

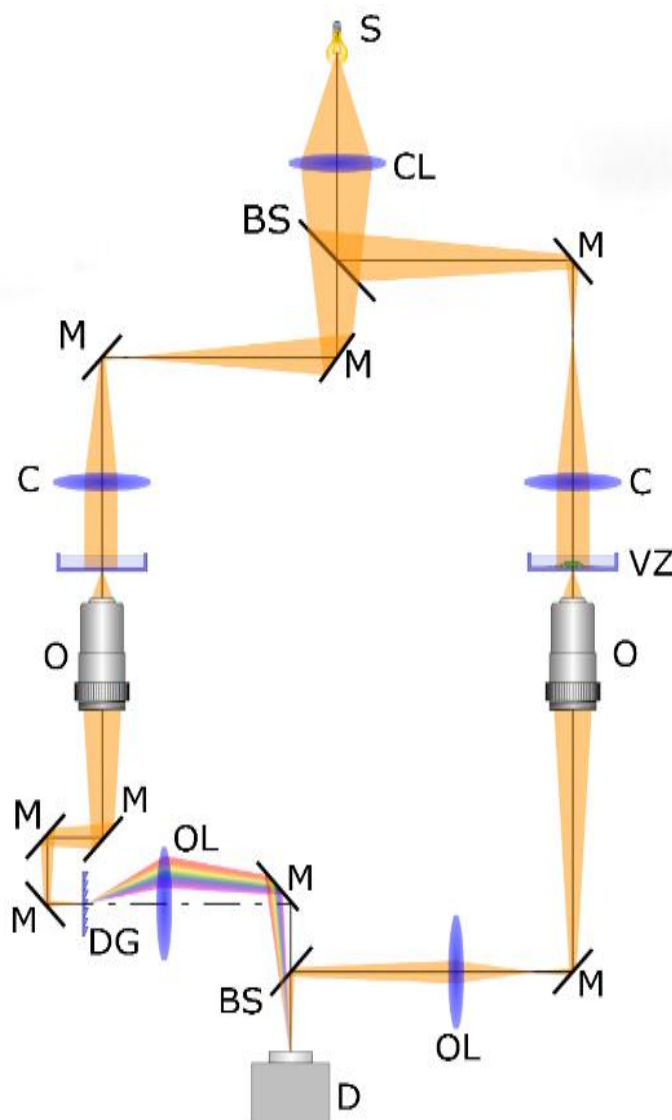
V roku 1999 sa R. Chmelík a Z. Harna stali autormi prvého holografického mikroskopu na VUT v Brne, ktorý využíva achromatický interferometer a nekoherentné svetlo pre mimoosové holografické zobrazovanie v odrazenom svetle. Tento mikroskop mal umožňovať veľmi presné merania povrchov [7,14]. Ďalším krokom vo vývoji bol návrh koherenciou riadeného holografického mikroskopu CCHM (z anglického názvu Coherence-controlled holographic microscope) prvej generácie vyvinutí P. Kolmanom a R. Chmelíkom [15]. V tomto prípade išlo o usporiadanie v prejdennom svetle vhodnom pre biologické vzorky. Mikroskop funguje pre ľubovoľný stupeň koherencie použitého svetla. Koherencia sa stala parametrom definujúcim vlastnosti mikroskopu [16]. CCHM prvej generácie umožnil pozorovanie bunkových procesov kvantitatívnym fázovým kontrastom v reálnom čase. Jeho nedostatky (napr. spektrálna priepustnosť mikroskopu pre vlnové dĺžky líšiace sa od centrálnej vlnovej dĺžky) viedli k vzniku CCHM druhej generácie, ktorá prekonala väčšinu nevýhod prvej generácie a zachovala všetky pozitívne vlastnosti mimoosového usporiadania, achromatického interferometru a použitia nekoherentného svetla. Druhá generácia umožňuje mikroskopu pracovať v transmisnom aj reflexnom móde ale je možné skombinovať aj jeho holografickú časť s fluorescenčným módom [17]. Zatiaľ posledný model holografického mikroskopu vyvinutého na VUT v Brne v spolupráci s firmou TESCAN ORSAY HOLDING je MHM Q-Phase (multimodálny holografický mikroskop Q-Phase, ďalej len Q-Phase). Kombinuje tri módy: transmisnú a reflexnú holografiu a epi-fluorescenciu.

2 Multimodálny holografický mikroskop Q-Phase

2.1 Konštrukcia Q-Phase

Optická zostava mikroskopu Q-Phase je zobrazená na obr. 2.1 a podrobne popísaná v nasledujúcom texte.

Zdroj svetla (S) tvorí halogénová výbojka, odkiaľ svetelný zväzok prechádza kolektorom (CL) a dopadá na delič zväzku (BS). Tu je zväzok rozdelený do referenčnej a predmetovej vetvy. Zväzok pokračujúci predmetovou vetvou dopadá na zrkadlo (M), ktoré mení jeho smer a odráža ho do kondenzoru (C). Za kondenzorom je umiestnený preparát (VZ), ktorým prechádza svetlo a dopadá na objektív (O). Ďalej na zrkadlo (M), ktorým je nasmerované do objektívovej šošovky (OL), za ktorou prechádza deličom zväzku (BS) a dopadá na detektor. Zväzok v referenčnej vetve sa odráža cez zrkadlá (M) do kondenzora (C) a pokračuje referenčným objektom cez objektív (O) na sústavu zrkadiel (M). Prechodom cez túto sústavu je odrazený na difrakčnú mriežku (DG). Tu je vybraný prvý difrakčný rád a pokračuje na objektívovú šošovku (OL) a cez zrkadlo (M) a delič zväzku (BS) na detektor (D) [17].



Obr. 2.1 Optická zostava multimodálneho holografického mikroskopu Q-Phase.

2.2 Zobrazenie v Q-phase

Ako už bolo spomenuté vyššie, nekoherentné svetlo z plošného zdroja prechádza kolektorom (pre dosiahnutie Köhlerovho osvetlenia) a následne sa rozdeľuje na deliči zväzkov do dvoch vzájomne oddelených optických vetiev. V referenčnej vetve sa nachádza difrakčná mriežka, ktorá rozkladá prejdenný zväzok svetla do difrakčných rádov (ďalej prechádza len 1. difrakčný rád). Využitím iba prvého difrakčného rádu mriežky nie je štruktúra vrypov mriežky rozlíšená vo výstupnej rovine. Oba zväzky interferujú vo výstupnej rovine a tvoria interferenčný obrazec, ktorý zaznamenáva CCD kamera. Z výsledného hologramu sa numericky vypočíta fáza a amplitúda [17,20].

Vo väčšine holografických mikroskopov sa ako zdroj svetla používa vysoko koherentný zdroj, laser. To spôsobuje koherenčný šum, nežiaduce interferencie v optickej sústave a tým sa zhoršuje kvalita zobrazenia. Halogénová výbojka použitá v Q-Phase mikroskope umožňuje využitie celého spektra vlnových dĺžok. Koherenčnú dĺžku vypočítame podľa nasledujúceho vzťahu

$$L = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}, \quad (2.1)$$

kde λ je centrálna vlnová dĺžka a $\Delta\lambda$ je pološírka spektra. Využitie nekoherentného zdroja svetla vedie k potlačeniu koherenčného šumu a nežiaducich interferencií [11]. Malá koherenčná dĺžka ponúka možnosť vytvárania optických rezov (v reflexnom móde). Efekt potlačenia svetla rozptýleného mimo rovinu ostrosti zlepšuje kontrast a SNR (signal-to-noise-ratio). To sa využíva v transmisnom móde pri pozorovaní buniek v rozptyľujúcom prostredí. Vlnová dĺžka a spektrálna šírka sú dôležitými parametrami mikroskopu. Použitie časovo nekoherentného osvetlenia umožňuje dosiahnutie lepšieho laterálneho a osového rozlíšenia.

Achromaticita interferometra je zaistená použitím difrakčnej mriežky Leithovho návrhu a správnym nastavením výstupného uhla β . Tento uhol nadobúda odlišné hodnoty pre rôzne vlnové dĺžky. Čím väčšiu vlnovú dĺžku má použité svetlo, tým je uhol β väčší. Pri nesprávnom nastavení výstupného uhla je výrazne ovplyvnený kontrast interferenčných prúžkov. To kladie vysoké požiadavky na dôkladné zosadenie optických prvkov sústavy [17].

2.3 Spracovanie hologramu

Hologramy získané z mikroskopu Q-Phase sa ďalej spracovávajú pomocou Fourierových transformácií. Na obr.2.3 je graficky znázornený postup spracovania hologramu, ktorý sa používa v súčasnej dobe. Na digitálny hologram je aplikovaná 2D rýchla Fourierova transformácia (FFT), zo spektra priestorových frekvencií sa vyberie oblasť odpovedajúca reálnemu obrazu a na túto oblasť je aplikovaná okienková funkcia (window function). Oblasť je použitá ako nové spektrum priestorových frekvencií, kde je nulová frekvencia posunutá do stredu. Z inverznej Fourierovej transformácie (IFFT) sa získa komplexná amplitúda, z ktorej je následne vypočítaná mapa fázy a intenzitný obraz. Každý pixel vo fázovom obraze odpovedá zmene optickej dráhy predmetovej vlny oproti referenčnej, spôsobenej prechodom preparátom [20].

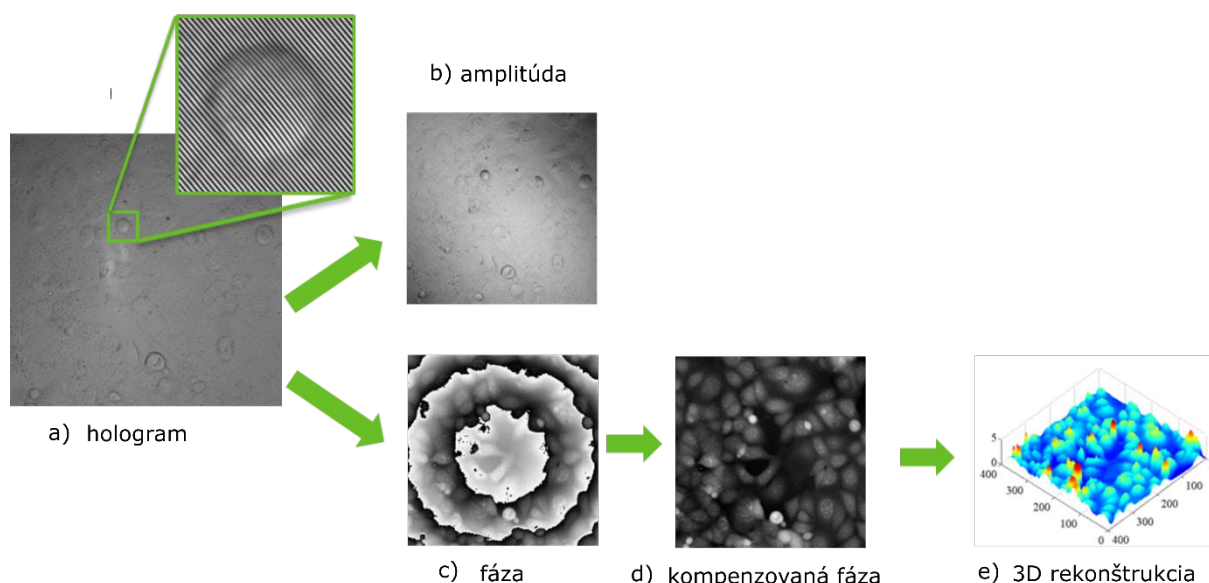
Fáza je počítaná pomocou vzorca

$$\varphi(x, y) = \arctan\left(\frac{\text{Im}[o(x, y)]}{\text{Re}[o(x, y)]}\right), \quad (2.2)$$

kde $o(x, y)$ je komplexná amplitúda. Pretože je fáza vyjadrená periodickou funkciou, objavujú sa v obraze fázové skoky. Preto sa musí fáza naviazať (unwrapping) čím dostaneme obraz

zbavený týchto skokov. Naviazaním sa myslí pripočítanie alebo odčítanie celočíselného násobku hodnoty 2π [21].

Obraz fáze je deformovaný časovo premenlivým nenulovým pozadím, čo je spôsobené nepresnosťami optického systému, jeho aberáciami, nedokonalou rekonštrukciou predmetovej vlny, zmenami teploty súčiastok a neideálnou pozíciou preparátu. Na VUT bola vyvinutá metóda riešiaci tento problém, ktorá je postavená na vytvorení polynomiálnej plochy prechádzajúcej vybranými oblasťami a čo najviac sa blížiacej svojim tvarom pozadiu. Táto plocha je odčítaná od obrazu fáze [22]. V časozbernej sérii snímkov sa pre odčítanie vyrovnávacej plochy používa algoritmus dynamickej fázovej masky. Metódou najmenších štvorcov určí vhodnú vyrovnávaciu plochu z hodnôt v oblasti mimo bunky, a tú odčíta od obrazu fáze. V takto upravenom obraze nájde miesta s hodnotou fáze nižšou ako je zvolená prahová hodnota a tieto miesta tvoria oblasti bez buniek, masku, ktorá je použitá pre výpočet vyrovnávacej plochy v nasledujúcom snímku.



Obr.2.3 Numerické spracovanie hologramu. Hologram (a) je pomocou 2D FFT prevedený do spektra priestorových frekvencií. Na oblasť odpovedajúcu spektru reálneho obrazu je aplikovaná okienková funkcia a 2D IFFT. Tým je získaný komplexný obraz tvorený komplexnou amplitúdou. Z komplexnej amplitúdy je pomocou prepočtu získaný obraz amplitúdy (b) a fáze (c). Fáza je naviazaná a kompenzovaná (d). Profil vzorku je získaný prepočtom fáze na výšku vzorku (e). Prevzaté a upravené z [20].

V takto upravenom obraze je obrazová fáza priamo úmerná rozdielu dĺžok optických dráh predmetovej a referenčnej vetvy podľa vzťahu

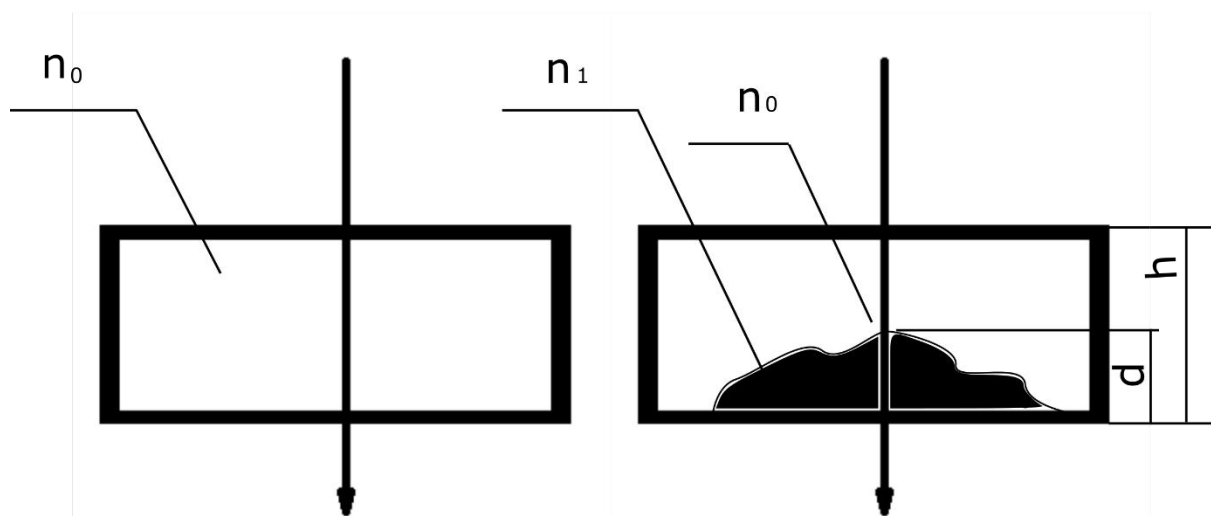
$$\Delta\phi(x, y) = \phi_p(x, y) - \phi_r = \frac{2\pi}{\lambda} [n_0(h - d(x, y)) + n_1(x, y)d(x, y)] - \frac{2\pi}{\lambda} n_0 h \quad (2.3)$$

$$= \frac{2\pi}{\lambda} d(x, y)(n_1(x, y) - n_0) = \frac{2\pi}{\lambda} d(x, y)\Delta n(x, y),$$

kde $\Delta\phi$ je rozdiel obrazovej fáze predmetovej a referenčnej vlny, ϕ_p je obrazová fáza predmetovej vlny, ϕ_r je obrazová fáza referenčnej vlny, λ je vlnová dĺžka použitého svetla, Δn je rozdiel indexu lomu v danom mieste bunky a indexu lomu média, d je hrúbka bunky a h je výška použitých komôrok (obr. 2.4) [23,24].

Referenčná vetva

Predmetová vetva



Obr.2.4 Znáznornenie optických dráh v referenčnej a predmetovej vetve mikroskopu. Kde n_0 je index lomu média, n_1 je index lomu bunky, d je výška bunky a h je výška pozorovacej komôrky.

Index lomu n_1 závisí na obsahu suchej hmoty v bunke podľa nasledujúceho vzťahu

$$n_1(x, y) = n_0 + \alpha C(x, y), \quad (2.4)$$

kde α je refrakčný prírastok a C je koncentrácia suchej hmoty v roztoku [23]. Oneskorenie fáze svetelného zväzku prechádzajúceho živou bunkou je úmerné hmoty bezvodného obsahu bunky, teda suchej hmoty. Plošnú hustotu suchej hmoty ρ_i vypočítame podľa vzťahu

$$\rho_i(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \Delta\phi(x, y). \quad (2.5)$$

Obrazovú fázu môžeme tiež interpretovať spôsobom, kedy je bunka aproximovaná jedinou hodnotou indexu lomu a informácia o fáze je prepočítaná na výšku bunky podľa vzťahu (2.3) [24].

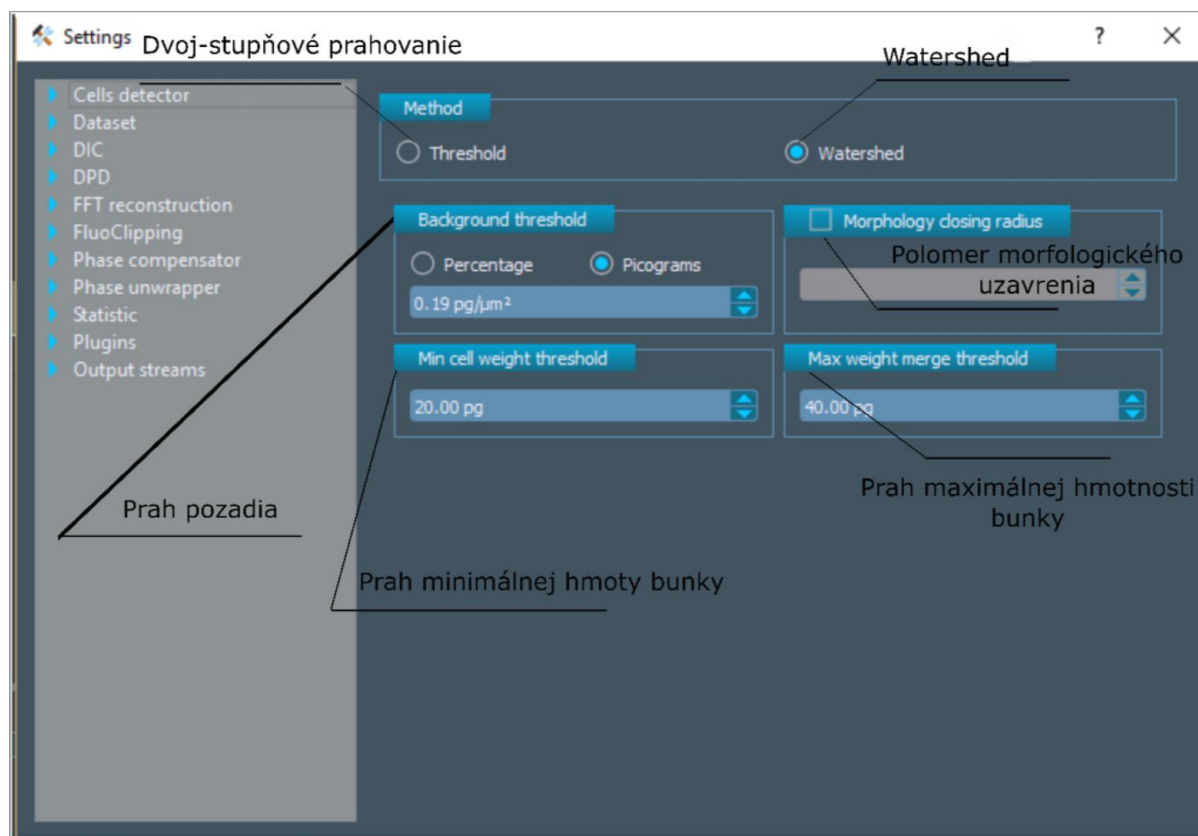
2.4 Popis použitého softwaru, meranie a ukladanie dát

Súčasťou multimodálneho holografického mikroskopu Q-Phase je aj program pre meranie, ukladanie a analýzu obrazov. Naladený hologram je základom pre naviazaný a vyrovnaný fázový obraz, z ktorého získavame informácie o bunkách v obraze. Akékoľvek artefakty v naviazanom a vyrovnanom fázovom obraze ovplyvňujú presnosť segmentácie buniek, na ktorej je založená následná analýza.

Pre segmentáciu buniek si môžeme vybrať jeden z dvoch programom ponúkaných metód (obr. 2.8), dvoj-úrovňové prahovanie alebo watershed. Pre metódy segmentácie buniek je najvýhodnejšie zvoliť metódu watershed. Táto metóda je schopná vysegmentovať aj navzájom sa dotýkajúce bunky.

Metóda watershed má štyri parametre: *prah pozadia*, *prah minimálnej hmoty bunky*, *prah maximálnej hmotnosti bunky* a *polomer morfológického uzavrenia*. Polomer morfológického uzavrenia je možné aplikovať na odprahovanú masku, čím sa dosahuje odstránenie chybné vytvorených dier vnútri bunky (môžu vznikať v mieste vakuol, blízko

okraja bunky vplyvom šumu). Parameter *prah minimálnej hmoty bunky* slúži k odfiltraniu niektorých anomálií v obraze (napr. nečistoty v roztoku, výstrelový šum).



Obr. 2.5 Uživatelské prostredie softwaru Q-Phase. Okno pre výber metódy pre segmentáciu buniek.

Zadaná hodnota tohto parametra by mala byť menšia ako najnižšia hmotnosť jednej bunky zo súboru, ktorý bude pozorovaný. Aby sa predišlo tomu, že watershed zlúči dve dotýkajúce sa bunky do jednej, je zaradený parameter *prah maximálnej hmotnosti bunky*. Hodnota tohto parametru je rovná najvyššej možnej hmotnosti, ktorú môže jedna pozorovaná bunka dosiahnuť, aby nebola programom rozdelená na dve bunky.

Po skončení segmentácie máme k dispozícii masku buniek, ktoré algoritmus v obraze rozpoznal, ich plošné a vážené ťažiská a parametre buniek v danom čase.

Pre realizáciu analýzy je k dispozícii sada nástrojov (obr.2.6) pre zobrazenie a vyhodnotenie získaných informácií. Medzi tieto nástroje patria napríklad časové grafy, kde každý zobrazuje časový priebeh niektorej vlastnosti u vybranej podmnožiny buniek. Jedným z ďalších nástrojov je tiež tabuľka priemerných parametrov, ktorá obsahuje pre každú bunku

z aktuálne vybranej množiny buniek výpis priemerných hodnôt všetkých ich parametrov za vybranú dobu.



Obr. 2.6 Užívateľské prostredie softwaru Q-Phase. Okno nástroja analýza, v ktorom zobrazujeme tabuľku priemerných parametrov a časové grafy priebehu jednotlivých pozorovaných parametrov.

3 Popisné parametre bunky

K vyhodnocovaniu rôznych bunečných dejov nám slúžia viaceré popisné parametre bunky. K základnému popisu bunky sa v práci používajú tieto parametre: *plocha bunky*, *obvod plochy bunky*, *kruhovitosť*, *suchá hmota bunky*. Pre vyhodnotenie rôznych bunkových dejov je prospešné sledovať tieto parametre a ich zmenu v čase. Pre popis niektorých bunkových dejov je tiež výhodné sledovať *rýchlosť pohybu buniek*.

3.1 Plocha bunky A (area)

Plocha bunky A udáva informácie o jej rozložení na povrchu pozorovacej komôrky. Súčet všetkých pixelov, ktoré bunka okupuje udáva veľkosť jej plochy. Celková plocha bunky je počítaná ako

$$A = \sum_{i=1}^k n_i S , \quad (2.6)$$

kde n môže nadobúdať hodnoty $n=1$ pre pixely, ktoré plocha bunky okupuje a $n=0$ pre pixely ležiace mimo túto plochu. Hodnota S udáva plochu jedného pixelu a k je ich počet.

3.2 Obvod plochy bunky P_A (perimeter)

Obvod plochy bunky P_A je definovaný ako súčin celkového počtu pixelov na vnútornej hranici tejto plochy a veľkosti pixelu.

3.3 Kruhovitosť R (roudnness)

Tento parameter určuje odchýlku tvaru bunky od kruhového tvaru v závislosti na obvode a ploche priemetu podľa nasledujúceho vzťahu

$$R = \frac{4\pi A}{(P_A)^2} . \quad (2.7)$$

Hodnota $R=1$ odpovedá kruhovému tvaru bunky, v prípade nekruhovitého tvaru bunky je hodnota $R<1$.

3.4 Suchá hmota bunky M (mass)

Suma hodnôt fáze v pixeloch patriacich ploche bunky udáva celkovú hodnotu fáze bunky. Ako už bolo vyššie uvedené fáza je priamo úmerná rozloženiu hustoty suchej hmoty vnútri bunky a preto môže byť absolútna hodnota fáze vyjadrená pomocou hmotnostných jednotiek (pikogramy).

Celková *suchá hmota bunky M* je definovaná následne

$$M = S \sum_{i=1}^j \rho_i , \quad (2.8)$$

kde ρ_i vyjadruje plošnú hustotu suchej hmoty v i -tom pixeli nachádzajúcom sa na ploche bunky a j je počet pixelov plochy bunky vo fázovom obraze.

3.5 Rýchlosť pohybu bunky (speed)

Rýchlosť pohybu bunky je počítaná ako zmena polohy ťažiska za určitý časový interval. Súradnice ťažiska bunky vypočítame nasledovne

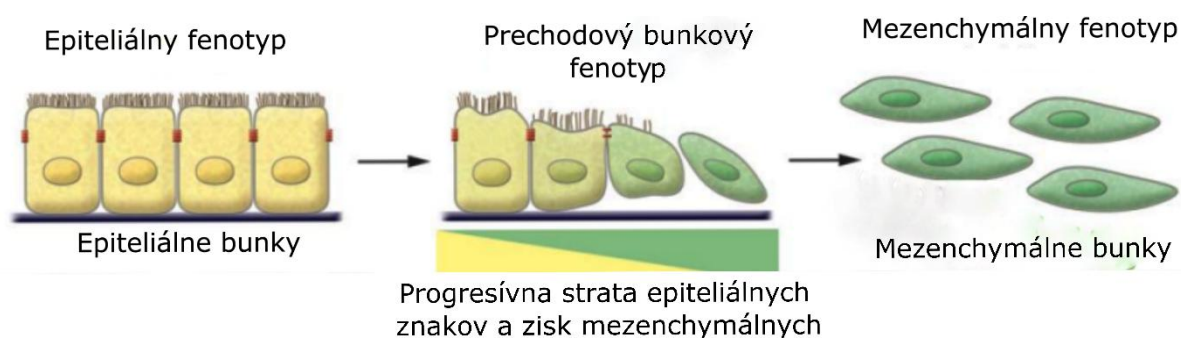
$$x_t = \frac{1}{A} \sum_{x,y} x n_i S , \quad (2.9)$$

$$y_t = \frac{1}{A} \sum_{x,y} y n_i S , \quad (2.10)$$

4 Epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT)

Epitel je jedna alebo viacero vrstiev buniek s rôznymi funkciami (napr. krycia, respiračná, atď.), kde spolu jednotlivé bunky tesne susedia a sú spojené rôznymi typmi medzibunkových spojov, ako napríklad adherentnými spojmi, medzerovými spojmi, tesnými spojmi atď. Bunky majú aplikálne-bazálnu polarizáciu, ktorá je určená najmä rozložením adhézných molekúl, organizáciou spojov, polarizáciou aktívneho cytoskeletu a sú spojené s bazálnou membránou, ktorá im pomáha udržiavať ich prirodzenú fyziológiu. Toto usporiadanie zaisťuje integritu epitelu a nedovoľuje bunkám migrovať. Pre mezenchymálne bunky je charakteristická zvýšená migračná kapacita, invazivita a zvýšená produkcia zložiek extracelulárnej matrix (ECM) [26].

Pre organizmy je nevyhnutné, aby epiteliálne bunky boli v určitých okamžikoch schopné zmeniť svoj fenotyp a migrovať. Táto premena bunky sa nazýva epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT) (obr 4.1). EMT môžeme na základe jeho funkčných odlišností rozdeliť na tri typy.



Obr.4.1 Priebeh a znaky epiteliálno-mezenchymálneho prechodu (EMT). Polarizované epiteliálne bunky postupne obmedzujú medzibunkové spojenie, dochádza k zníženiu expície epiteliálnych znakov a bunky získavajú mezenchymálny fenotyp, pre ktorý je charakteristická expresia mezenchymálnych znakov. Zmena je sprevádzaná degradáciou bazálnej membrány [25].

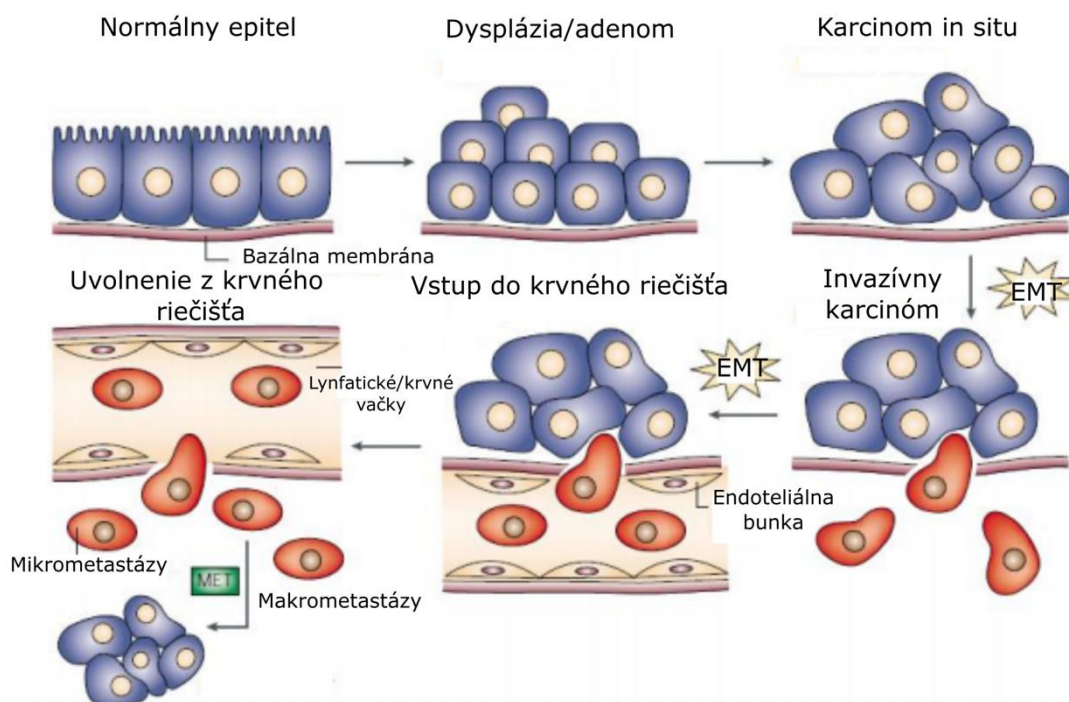
Prvý typ EMT súvisí s implantáciou embria, jeho formovaním a vývojom. Pre tento typ EMT je príznačné, že nespôsobuje fibrózu tkanív ani neindikuje v bunke invazívny fenotyp, vďaka ktorému by sa mohla šíriť cievny riečišťom.

Druhý typ EMT súvisí s hojením rán a regeneráciou tkanív u dospelých jedincov. Tento druh EMT indukuje tvorbu fibroblastov zo sekundárnych epiteliálnych buniek ako odpoveď na zápal. V prípade chronického zápalu nie je EMT ukončený a dochádza k fibróze, ktorá môže spôsobiť poškodenie tkanív alebo až zničenie orgánov. Tento patologický proces je sprostredkovaný bunkami imunitného systému a fibroblastami, ktoré uvoľňujú zápalové signály a produkujú zložky ECM, napríklad kolagény a elastíny. Zápalové zranenia môžu viesť k uvoľneniu rastových faktorov ako napríklad TGF- β (transformujúci rastový faktor β), ktoré môžu indukovať EMT [27].

Tretí typ EMT prebieha pri neoplastických bunkách, ktoré nesú určité genetické a epigenetické zmeny. Niektoré bunky, ktoré prejdú týmto typom EMT si zachovávajú časť svojich epiteliálnych vlastností, iné úplne zmenia svoj fenotyp z epiteliálneho na mezenchymálny. Tento typ EMT je často spojovaný s progresivitou a agresivitou nádorov. EMT je považovaný za kritický krok vedúci k uvoľneniu buniek z primárneho nádoru a ich následné rozšírenie po tele. Podľa miesta sekundárneho nádoru býva niekedy potrebná reverzia buniek späť na epiteliálny fenotyp pomocou mezenchymálne-epiteliálneho prechodu (MET).

Aby nádorové bunky mohli opustiť miesto primárneho nádoru a tvoriť metastázy, musia oslabiť medzibunkovú adhéziu a získať pohyblivosť, ktorá má za následok zvýšenú bunkovú migráciu a tkaninové zmeny (obr. 4.2). Bunky musia byť schopné preniknúť do krvného

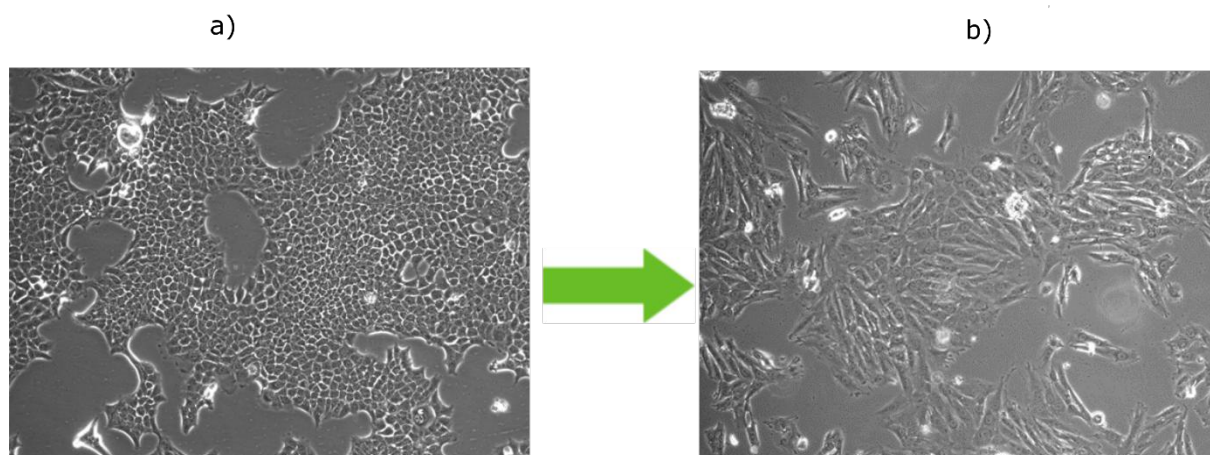
riečišť'a, odolat' mechanickým vplyvom v cievach, preniknúť do iných tkanín v tele a zachovať si pritom schopnosť prežiť a deliť sa [27, 28].



Obr. 4.2 EMT spojený s nádorovou progresiou a tvorbou metastáz. Normálny epitel sa skladá z vzájomne prepojených epiteliálnych buniek prisadlých k bazálnej membráne. Bunky opúšťajúce primárny nádor sa vyznačujú získaním niektorých vlastností mezenchymálnych buniek, vstupujú do krvného riečišťa a putujú telom. Na inom mieste organizmu prostredníctvom procesu MET vzniká sekundárny epiteliálny tumor [29].

Premena epiteliálnych buniek na mezenchymálne je riadená sekvenciou prísne regulovaných molekulárnych dejov spoločných pre všetky typy EMT. Na začiatku dochádza k rozpadu medzibunkových spojov, potom nastáva premena polarizácie z aktívne-bazálnej na predozadnú, reorganizácia cytoskeletu a zmeny tvaru buniek, útlm epiteliálneho génového programu a aktivácia génov určujúcich mezenchymálny fenotyp a nakoniec zvýšenie mobility a invazivity buniek (schopnosť migrovať z pôvodnej epiteliálnej vrstvy) vrátane schopnosti prestavovať extracelulárny matrix. Bunky, ktoré prešli EMT majú zvýšenú rezistenciu k starnutiu buniek a apoptóze (programovaná bunková smrť).

EMT v bunkách môžu indikovať rôzne fyzikálne, chemické či biologické faktory. Medzi molekuly indukujúce EMT patria rastové faktory, cytokiny, hormóny a časti ECM. Najznámejší a najviac preskúmaný rastový faktor indukujúci EMT je transformujúci rastový faktor β (Transforming Growth Factor beta, TGF- β) (obr.4.3). TGF- β sa nachádza v ECM v latentnej forme a je aktivovaný proteolýzou a interakciou s matrix a proteínmi bunkovej membrány [28, 29].



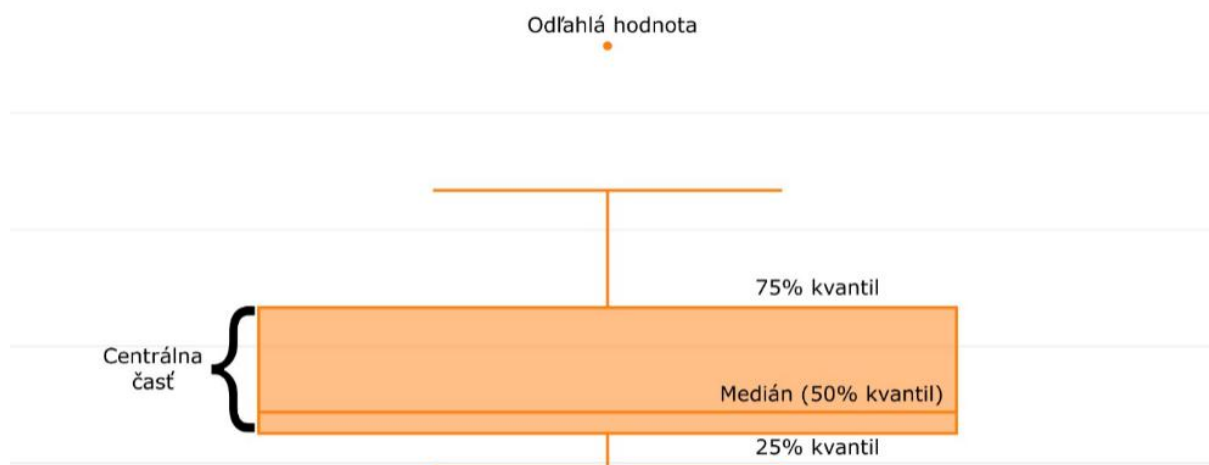
Obr. 4.3 Pôsobenie transformujúceho rastového faktoru $TGF-\beta$ na bunky (Zernike fázový kontrast). Na neošetrené bunky (a) bol aplikovaný rastový faktor $TGF-\beta$. Jeho pôsobením po dobu 48h bunky v dôsledku EMT strácajú vlastnosti epiteliálnych buniek a získavajú vlastnosti mezenchymálnych (b).

5 Štatistika

Štatistickou analýzou dát získaných sledovaním meranej náhodnej veličiny v experimente môžeme rozhodnúť o platnosti určitého tvrdenia (štatistickej hypotézy) na úrovni celej populácie. Najčastejším typom experimentu je tzv. komparatívny experiment, kde pracujeme minimálne s dvomi skupinami, kontrolnou a pokusnou skupinou. Kontrolná skupina pozostáva z jedincov, ktorí nie sú vystavení pokusnej intervencii. Naopak pokusná skupina je vystavená skúmanému typu zásahu, experiment je možné uskutočniť aj s niekoľkými takto ošetrovanými skupinami. Cieľom štatistickej analýzy nameraných dát je zistenie a kvantitatívna špecifikácia rozdielu medzi jednotlivými skupinami prostredníctvom štatistických metód pre vzájomné porovnávanie výberových súborov zúčastnených v experimente. Najčastejšie používaným parametrickým testom pre testovanie rozdielu dvoch stredných hodnôt je t-test tiež známy ako Welch's t-test (študentov t-test). Predpokladom pre použitie štatistických parametrických testov vrátane t-testu je, že súbor dát má normálne rozdelenie. Z toho dôvodu pred samotnou analýzou musí byť tento predpoklad overený.

5.1 Testovanie normality dát

Normalitu dát je možné predpokladať vizuálne alebo pomocou testov významnosti. Jednou z vizuálnych metód ako približne určiť, či dáta majú normálne rozdelenie je zostrojenie boxplotu. Boxplot (obr. 5.1) alebo tiež krabicový graf, ktorého stredná obdĺžniková časť je zdola ohraničená 1. kvartilom a z vrchu 3. kvartilom, vnútri obdĺžnika sa nachádza 50% hodnôt. Plná čiara vnútri predstavuje medián daného súboru dát. Whiskers úsečky alebo tiež fúzy reprezentujú minimálne a maximálne hodnoty v rámci 1,5 násobku interquartilu (IQR). Dáta nachádzajúce sa mimo rozsah boxplot obdĺžnika a whiskers úsečiek sú považované za odľahlé hodnoty (outliers) a bývajú znázornené bodkou. V prípade, že boxplot a whiskers úsečky sú symetrické a medián sa nachádza približne uprostred, môžeme predpokladať že súbor dát má normálne rozdelenie.



Obr. 5.1 Boxplot

Ako test významnosti pre stanovenie normality dát je možné použiť Shapiro-Wilkov test. Jedná sa o test, ktorý umožňuje overenie zhody empirického pravdepodobnostného rozdelenia s normálnym rozdelením. Je vhodný pre súbory so stredným objemom dát ($n \leq 2000$). Pre usporiadaný štatistický súbor, kde $x_1 < x_2 < \dots < x_n$ je Shapiro-Wilkov test definovaný následne [34].

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}, \quad (5.1)$$

kde x_i označuje poradové štatistiky, $\bar{x}$ je výberový aritmetický priemer a koeficient a_i je váha, ktorá je odvodená zo stredných hodnôt a variančnej matice poradových štatistík prostého náhodného výberu z $N(0,1)$ rozsahu n . Tieto koeficienty bývajú tabelované.

Testuje sa nulová hypotézu, ktorá predpokladá, že dáta pochádzajú z normálneho rozdelenia. V prípade, že p -hodnota je nižšia ako zvolená hladina významnosti, nulová hypotéza neplatí, a to ukazuje, že testované dáta nepochádzajú z normálneho rozdelenia. V prípade kedy je p -hodnota väčšia ako zvolená hladina významnosti, nulovú hypotézu, že dáta sú normálne distribuované nemožno zamietnuť. Prípady, kedy dáta nespĺňajú podmienku normality možno riešiť odstránením odľahlých dát (outliers) [32,33].

5.2 F-test (test rozdielu dvoch rozptylov)

Testom rozhodujeme, či pokusný zásah má vplyv na premenlivosť (rozptyl σ^2) skúmanej náhodnej veličiny v populácii. Je tiež dôležitý pre porovnávanie presnosti dvoch meraní.

V F-teste testujeme nulovú hypotézu: $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$.

Výpočet Fisherovho F-testu vychádza z dát dvoch výberových súborov, ktoré sú predmetom porovnávania. O každom tomto súbore predpokladáme, že pochádza z populácie s Gaussovým normálnym rozdelením s parametrami μ (stredná hodnota) a σ^2 (rozptyl).

Nech $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ je náhodný výber z rozdelenia $N(\mu_1, \sigma_1^2)$ a nech $(y_1, y_2, \dots, y_n)$ je na ňom nezávislý náhodný výber z rozdelenia $N(\mu_2, \sigma_2^2)$. Rozptyly týchto výberov vypočítame následne:

$$s_i^2 = n \frac{\sum_{k=1}^n x_k^2 - \frac{(\sum_{k=1}^n x_k)^2}{n_i}}{n_i - 1}, \quad (5.2)$$

kde x_k^2 je kvadrát k -teho členu náhodného výberu a n_i je počet členov v náhodnom výbere. Stanovíme počet stupňov voľnosti v_i pre obidva výbery

$$v_i = n_i - 1, \quad (5.3)$$

a vypočítame testovacie kritérium F nasledujúcim vzťahom:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad (5.4)$$

kde do čitateľa dosadíme väčší z rozptylov, $s_1^2 > s_2^2$. Obdobne platí že $v_1 > v_2$ a v_1 je počet stupňov voľnosti patriaci náhodnému výberu s väčšou hodnotou rozptylu s_1^2 a v_2 je počet stupňov voľnosti patriaci náhodnému výberu s menšou hodnotou rozptylu s_2^2 . Ďalej zvolíme hladinu významnosti α a v štatistických tabuľkách vyhladáme odpovedajúcu kritickú hodnotu pre F-test :

$$F_{krit} = 1 - \frac{\alpha}{2}, \quad (5.5)$$

Následne vypočítanú štatistiku F porovnáme s tabuľkovou kritickou hodnotou. V prípade, že $F > F_{krit}$ ($p < \alpha$) zamietame nulovú hypotézu $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ a dostávame výsledok, že rozptyl obidvoch výberov sa štatisticky významne líši. V opačnom prípade, kedy je $F < F_{krit}$ ($p > \alpha$) nulovú hypotézu nemôžeme zamietnuť a predpokladáme, že rozptyl obidvoch výberov sa štatisticky významne nelíši [35].

5.3 T-test (test rozdielu dvoch stredných hodnôt)

Študentov t-test je parametrickým testom, ktorý sa používa pre testovanie rozdielu stredných hodnôt μ dvoch náhodných výberov. Podľa štatistickej významnosti rozdielu stredných hodnôt môžeme uvažovať o účinnosti aplikovaného pokusného zásahu v sledovanom experimente.

Dvoj výberový t-test sa používa pre hodnotenie experimentov, kde nepoznáme strednú hodnotu základného súboru a porovnávame iba dva súbory výberových dát. Tieto dáta môžu byť predstavované buď dvoma meraniami uskutočnenými opakovane u jednej skupiny jedincov (meranie pred aplikáciou pokusného zásahu a po aplikácii) tzv. závislý výber alebo dvomi nezávislými skupinami meraní tzv. nezávislý výber. V prípade dvoj výberového t-testu testujeme nulovú hypotézu: $H_0: \mu_1 = \mu_2$.

Nepárový t-test porovnáva dáta, tvorené dvoma nezávislými výbermi, tzn. že pochádzajú z dvoch rôznych skupín jedincov. Najčastejšie ide o porovnanie hodnôt pokusnej skupiny, kde bol aplikovaný pokusný zásah a kontrolnej skupiny, kde nebola uskutočnená aplikácia pokusného zásahu.

Testovaná nulová hypotéza: $H_0: \mu_1 = \mu_2$ hovorí, že stredná hodnota μ_1 populácie, z ktorej pochádza pokusný výber sa rovná strednej hodnote μ_2 populácie, z ktorej pochádza kontrolný výber.

Výpočet testu vychádza z odhadu parametrov obidvoch porovnávaných populácií, aritmetického priemeru a rozptylu. Pretože testované súbory môžu pochádzať z populácií, ktoré majú rovnaký alebo naopak rôzny rozptyl hodnôt sledovanej veličiny, je nutné najprv otestovať rozdiel rozptylov oboch súborov pomocou F-testu. Podľa jeho výsledku zvolíme odpovedajúci postup pre nepárový t-test.

a) Ak $F \leq F_{0,975}$

tzn. že platí $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$. Oba výbery pochádzajú z populácií so zhodným výberom. Pre testovanie rozdielu stredných hodnôt použijeme nepárový t-test pre zhodné rozptyly:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}}}, \quad (5.6)$$

kde $\bar{x}_i$ je aritmetický priemer i-teho výberu, s_i^2 je rozptyl i-teho výberu a n_i je počet členov v i-tom výbere.

Stupne voľnosti pre t-test sa vypočítajú nasledujúcim spôsobom

$$v = n_1 + n_2 - 2 \quad (5.7)$$

b) Ak $F > F_{0,975}$

tzn. že neplatí nulová hypotéza $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$. Oba výbery pochádzajú z populácií s rôznym rozptylom. Pre testovanie rozdielu stredných hodnôt použijeme nepárový t-test pre rôzne rozptyly:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}, \quad (5.8)$$

kde $\bar{x}_i$ je aritmetický priemer i-teho výberu, s_i^2 je rozptyl i-teho výberu a n_i je počet členov v i-tom výbere

Stupne voľnosti pre t-test sa vypočítajú nasledujúcim spôsobom

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1-1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2-1}}. \quad (5.9)$$

Vypočítanú štatistiku t porovnáme s tabuľkovou kritickou hodnotou $t_{1-\frac{\alpha}{2}}$, ktorú nájdeme podľa daného stupňa voľnosti v a zvolenej hladiny významnosti α , ktorá môže nadobúdať hodnoty 0,05; 0,01 a 0,001.

V prípade, že $t \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$ nezamietame nulovú hypotézu $H_0: \mu_1 = \mu_2$, tzn. že stredná hodnota pokusného súboru sa nelíši od strednej hodnoty kontrolného súboru. Rozdiel medzi μ_1 a μ_2 je štatisticky nevýznamný. Aplikovaný pokusný zásah bol neúčinný, pretože nebola ovplyvnená stredná hodnota pokusného súboru vplyvom aplikácie zásahu v porovnaní so strednou hodnotou kontrolného súboru ($p > 0,05$). Ak $t > t_{1-\frac{\alpha}{2}}$ zamietame nulovú hypotézu $H_0: \mu_1 = \mu_2$ tzn. že stredná hodnota pokusného súboru sa líši od strednej hodnoty kontrolného súboru. Rozdiel medzi μ_1 a μ_2 je štatisticky významný na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ a vysoko štatisticky významný na hladine významnosti $\alpha = 0,001$. Pokusný zásah bol účinný, pretože spôsobil zmenu strednej hodnoty pokusného súboru vplyvom aplikácie pokusného zásahu v porovnaní s kontrolným súborom ($p < 0,05$; $p < 0,01$ alebo $p < 0,001$) [35,36].

6 Experiment

Hlavným dôvodom uskutočnenia experimentu, v ktorom je pozorovaný vplyv TGF- β na bunky NMuMG (nádorové bunky prsnej žľazy) je získanie kvantitatívnych informácií o priebehu EMT. V dnešnej dobe existuje množstvo informácií o EMT spracovaných pomocou rôznych techník svetelnej mikroskopie. Nikdy však nebol tento dej popísaný pomocou kvantitatívneho fázového kontrastu. Preto v spolupráci so skupinou „Molecular cancer and stem cell therapeutics“ pôsobiacou na univerzite „Karolinska Institutet“ prebehol prvý experiment, v ktorom bol pozorovaný a následne kvantitatívne popísaný priebeh EMT pomocou multimodálneho holografického mikroskopu Q-Phase. Cieľom experimentu bolo presne popísať zmenu pozorovaných parametrov v čase pre správny spôsob indikácie vyvíjaných terapeutík.

6.1 Kultivácia bunkovej línie NMuMG

Bunková línia NMuMG bola odvodená z myšej prsnej žľazy. Bunková kultúra NMuMG je tvorená cystickými miestami ohraničenými vrstvou kubických epiteliálnych buniek. Bunky boli kultivované pri teplote 37 °C a 5% koncentrácii CO₂ v komerčnom médiu DMEM obsahujúcom GlutaMAX™ (Life Technologies). Do média bolo pridaných 10% objemu FBS (Life Technologies), 100 U/ml penicilínu s 0,1mg/ml streptomycínu (Life Technologies).

6.2 Pozorovanie buniek

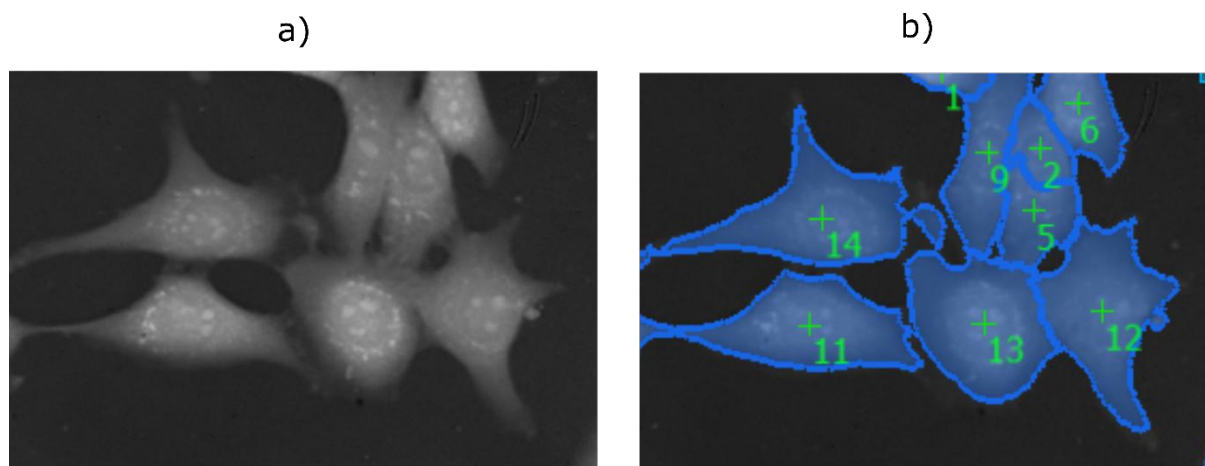
Bunky NMuMG boli pozorované v mikroskope Q-Phase v transmisnom móde objektívmi 20x/0,5 v Ibidi pozorovacích komôrkach (*obr.6.1*) sadené s koncentráciou 50 buniek/mm². Boli uskutočnené dve sady meraní. Každé meranie trvalo 48 hodín. Bolo zaznamenávaných 6 zorných polí s frekvenciou záznamu jedna snímka za 5 minút na každej zo šiestich pozícií. Ako prvé bolo realizované kontrolné meranie buniek bez akéhokoľvek pokusného zásahu. V druhom meraní sme skúmali bunky bezprostredne po aplikácii rastového faktorku TGF- β s koncentráciou 5ng/ml. Získané dáta boli uložené v podobe datasetu k následnému spracovaniu.



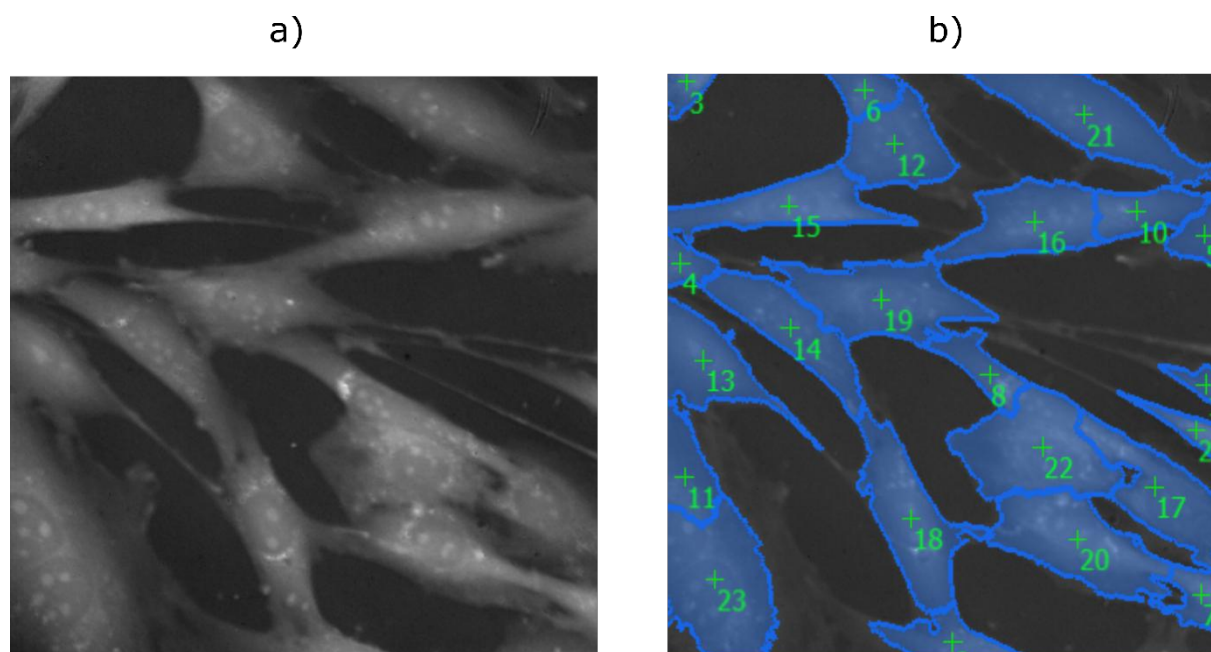
Obr. 6.1 Statická pozorovacia Ibidi komôrka určená pre pozorovanie biologických preparátov.

6.3 Analytické spracovanie dát pre vyhodnotenie experimentu

Segmentáciou buniek v programe, ktorý je súčasťou mikroskopu Q-Phase boli získané dva súbory dát o pozorovaných parametroch: *plocha bunky*, *obvod plochy bunky*, *kruhovitosť bunky*, *suchá hmota bunky*, *rýchlosť pohybu bunky*. Jedna sada dát patriaca kontrolnému súboru bola po segmentácii a štatistickom spracovaní porovnávaná s druhou sadou dát patriacou súboru, na ktorý bol aplikovaný rastový faktor TGF- β . Segmentáciou buniek (obr. 6.1 a obr. 6.2) a analýzou nameraných dát boli získané informácie o pozorovaných parametroch, ktoré boli popísané v 3. kapitole. Tieto parametre boli nakoniec sledované v ôsmich expertom indikovaných časových úsekoch (v 0h, 17h, 21h, 25h, 29h, 34h, 38h a 48h).



Obr. 6.1 Ukážka segmentácie epiteliálnych buniek v programe Q-Phase metódou watershed. Obráz kompenzovanej fáze a). Segmentácia buniek funkciou analýze b).



Obr. 6.2 Ukážka segmentácie mezenchymálnych buniek v programe Q-Phase metódou watershed. Obráz kompenzovanej fáze a). Segmentácia buniek funkciou analýze b).

Spôsob štatistického spracovania dát je podrobne popísaný v 5. kapitole. Pre odhad normality dát boli použité boxplot grafy a numerický Shapiro-Wilkov test. Pokiaľ súbor dát spĺňal podmienku normality, bol na neho aplikovaný F -test. Tento test bol použitý pre zistenie rozdielu rozptylov dvoch súborov dát a taktiež ukázal, či mal aplikovaný pokusný zásah vplyv

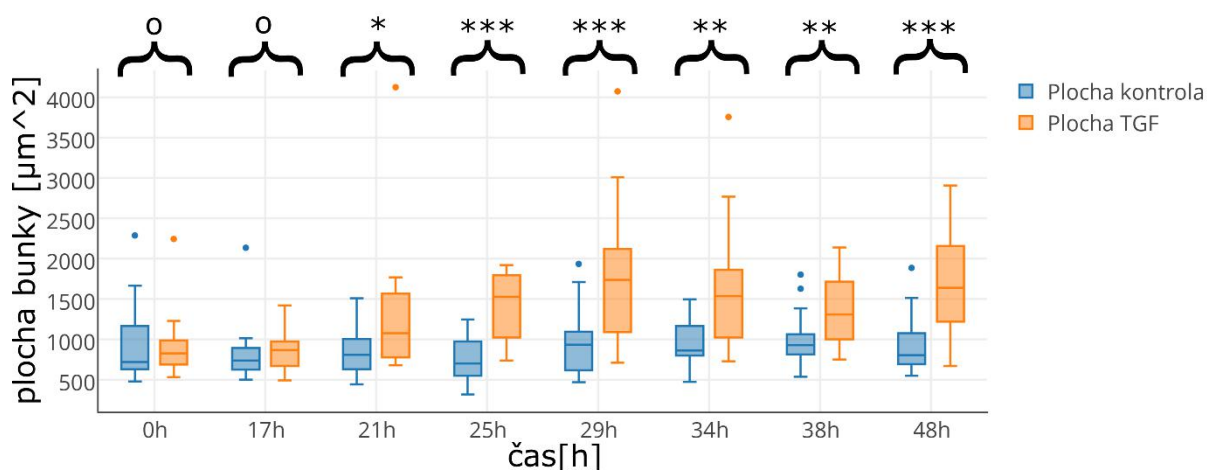
na pozorovaný parameter a jeho výsledok je tiež dôležitý pre výber správneho druhu t -testu. Pre vyhodnotenie F -testu bola zvolená hladina významnosti $p_0 = 0,05$.

Podľa výsledku F -testu vyberáme t -test pre súbory s rovnakým rozptylom, alebo t -test pre súbory s rôznym rozptylom. Pre t -test sme zvolili tri hladiny významnosti $p_0 = 0,05$; $p_1 = 0,01$ a $p_2 = 0,001$. Ak p vypočítané z t -testu je $p > p_0$ (o) predpokladáme, že aplikovaný pokusný zásah nemal vplyv na zmenu stredných hodnôt pozorovaného parametru a nulovú hypotézu $H_0: \mu_1 = \mu_2$ prijímame. V prípade, že $p < p_0$ (*) (resp. $p < p_1$ (**), $p < p_2$ (***)) predpokladáme, že aplikovaný pokusný zásah mal vplyv na zmenu strednej hodnoty pozorovaného súboru a nulovú hypotézu $H_0: \mu_1 = \mu_2$ zamietame.

6.4 Výsledky

Plocha bunky A

Na základe štatistického spracovania dát, ktorého výsledky môžeme vidieť na obr. 6.3 a v tabuľkách tab. 3.1 a tab. 3.2, usudzujeme že aplikácia rastového faktoru TGF- β v čase medzi 0 až 17 hodinou nemala na zmenu plochy bunky žiadny vplyv, jej zmena sa začala prejavovať až po 17 hodine a môžeme ju pozorovať až do konca experimentu. Z toho možno vyvodíť, že epiteliálny fenotyp buniek sa mení na mezenchymálny približne medzi 17. – 21. hodinou. Bunky sa začínajú rozťahovať.



Obr. 6.3 Graf pre pozorovaný parameter „plocha bunky A“.

Tab. 6.1 Výsledky F -testu aplikovaného na dáta pozorovaného parametru „plocha bunky A“.

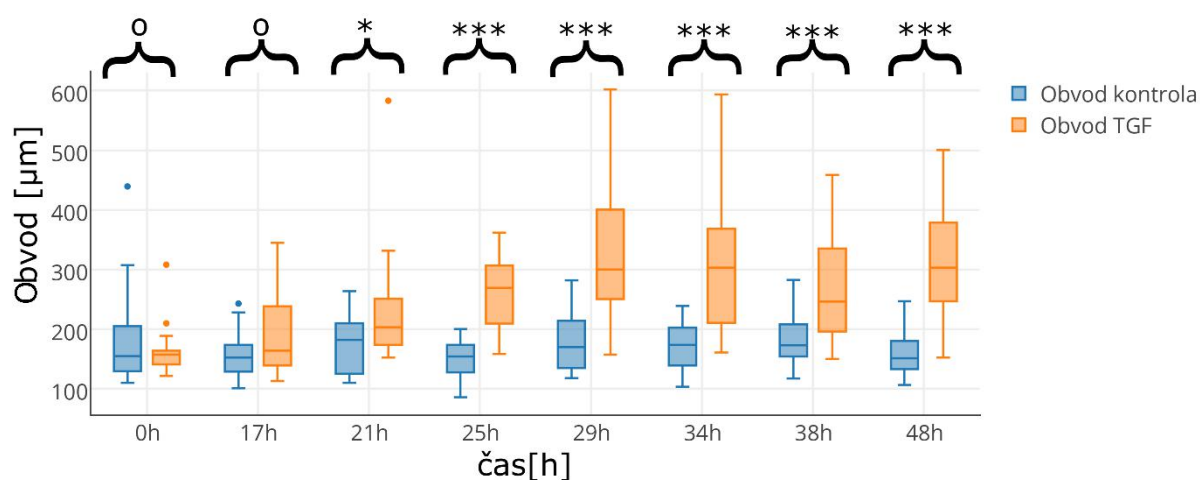
čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
$p =$	0,50070	0,05342	0,00001	0,10271	0,00478	0,00012	0,07437	0,00058
$p_0 < p$								
rovnaké								
σ^2								

Tab. 6.2 Výsledky t -testu aplikovaného na dáta pozorovaného parametru „plocha bunky A“.

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p=	0,90446	0,88143	0,03785	0,000001	0,00012	0,00212	0,00121	0,00015
p > p ₀		p > p ₀	p < p ₀	p < p ₂	p < p ₂	p < p ₁	p < p ₁	p < p ₂
rovnaké	rovnaké	rovnaké	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne
μ (o)	μ (o)	μ (o)	μ (*)	μ (***)	μ (***)	μ (**)	μ (**)	μ (***)

Obvod plochy bunky P_A

Z výsledkov zhrnutých na obr.6.4 a v tab. 6.3, tab. 6.4 možno vyvodiť záver, že rovnako ako vo vyššie popísanom prípade, nemal aplikovaný rastový faktor žiadny vplyv na zmenu *obvodu plochy bunky* až do 17. hodiny. V čase po 17. hodine môžeme pozorovať zmenu vo výsledku t-testu. Rozdiel stredných hodnôt porovnávaných dát po 17. hodine nás navádza k predpokladu, že bunky po aplikácii TGF- β menia svoj obvod až po uplynutí času dlhšieho ako 17 hodín. Toto pozorovanie korešponduje so zmenou *plocha bunky* popísanej vyššie.



Obr. 6.4 Graf pre pozorovaný parameter „obvod plochy bunky P_A“.

Tab. 6.3 Výsledky F-testu realizovaného na dátach pozorovaného parametru „obvod plochy bunky P_A“.

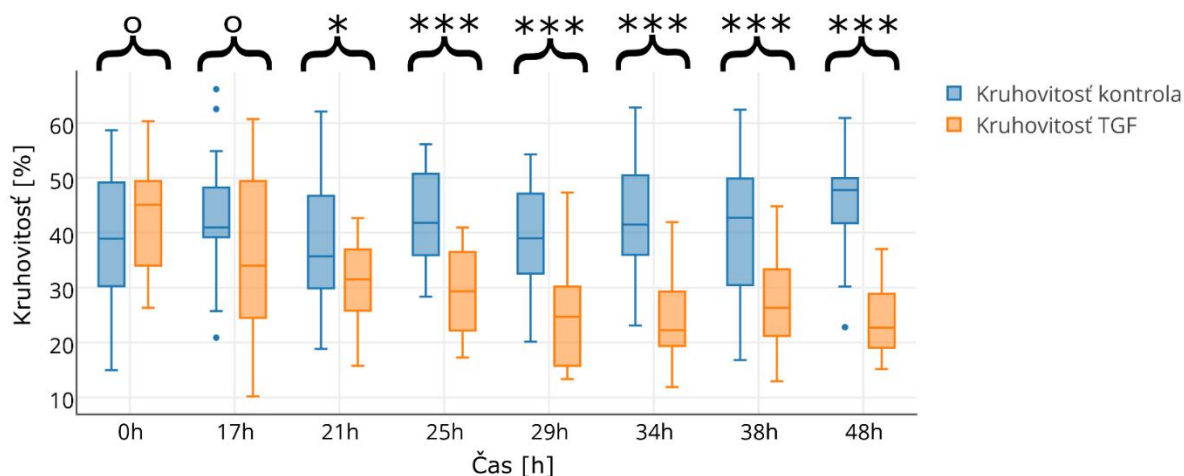
čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p =	0,01176	0,03416	0,00128	0,00307	0,00022	0,00003	0,00084	0,00001
p ₀ > p		p ₀ > p	p ₀ > p	p ₀ > p	p ₀ > p	p ₀ > p	p ₀ > p	p ₀ > p
rôzne		rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne
σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2

Tab. 6.4 Výsledky t-testu uskutočneného na dátach pozorovaného parametru „obvod plochy bunky P_A“.

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p=	0,36484	0,11745	0,03375	0,00002	0,0000039	0,00009	0,00015	0,0000001
p > p ₀		p > p ₀	p < p ₀	p < p ₂	p < p ₂	p < p ₂	p < p ₂	p < p ₂
rovnaké	rovnaké	rovnaké	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne	rôzne
μ (o)	μ (o)	μ (o)	μ (*)	μ (***)	μ (***)	μ (***)	μ (***)	μ (***)

Kruhovitosť R

Parameter *kruhovitosť bunky* sa rovnako ako *plocha bunky* a *obvod plochy bunky* bezprostredne po aplikácii rastového faktorku najprv neodlišuje od kontrolného merania. Zmena nastáva až po 17. hodine. Vtedy sa tvar buniek začína odchyľovať od kruhovitého tvaru typického pre epiteliálne bunky, tvar buniek sa predlžuje a splošťuje, čo je typické pre mezenchymálny fenotyp buniek. Na obr. 6.5 a v tab. 6.5, tab. 6.6 sú zhrnuté výsledky štatistickej analýzy na základe ktorých boli tieto závery uskutočnené.



Obr. 6.5 Graf pre pozorovaný parameter „kruhovitosť bunky R“.

Tab. 6.5 Výsledky F-testu realizovaného na dátach pozorovaného parametru „kruhovitosť bunky R“.

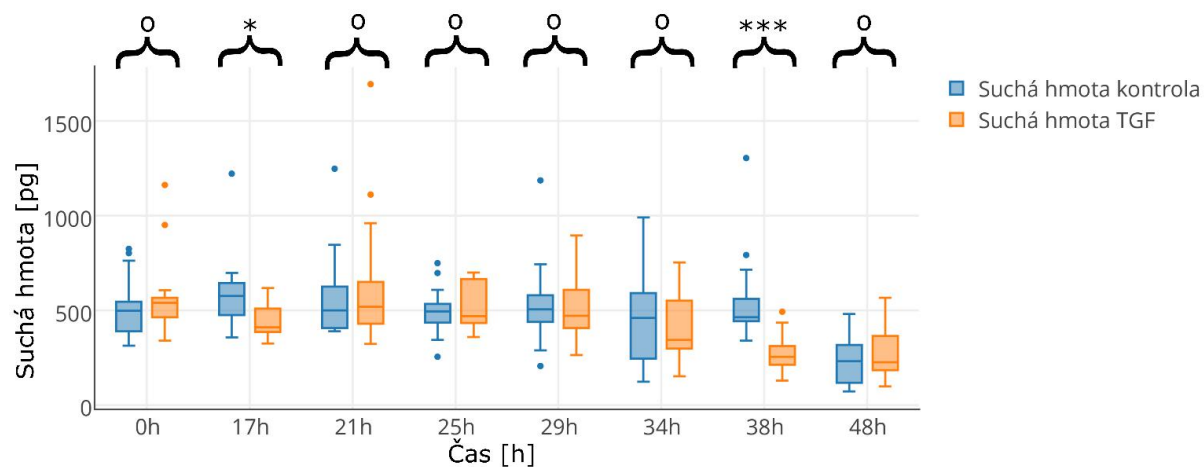
čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p =	0,37932	0,30497	0,17446	0,72810	0,84864	0,51991	0,11054	0,42883
$p_0 < p$								
rovnaké								
σ^2								

Tab. 6.6 Výsledky t-testu uskutočneného na dátach pozorovaného parametru „kruhovitosť bunky R“.

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p=	0,21637	0,16952	0,03310	0,00001	0,000001	0,000001	0,00004	0,000001
$p > p_0$								
rovnaké								
μ (o)								

Suchú hmotu bunky M

Na základe analýzy je možné konštatovať, že bunky po aplikácii TGF- β nemenia množstvo priemernej suchej hmoty. Rozdiel stredných hodnôt v 38. hodine, ktorý môžeme pozorovať na obr. 6.6 a v tab. 6.7, tab. 6.8, indikuje zmenu množstva priemernej suchej hmoty. Rozdiel môže byť spôsobený nedokonalou segmentáciou buniek. V 48. hodine je taktiež pozorovateľný pokles priemernej suchej hmoty buniek u oboch pozorovaných vzorkov. Tento rozdiel je možné taktiež prisúdiť nedokonalej segmentácii. Problém pri segmentácii buniek mohol byť v takto pokročilom čase experimentu spôsobený vysokým stupňom konfluencie buniek a obtiažnym rozoznávaním ich hraníc.



Obr. 6.6 Graf pre pozorovaný parameter „suchá hmota bunky M“.

Tab. 6.7 Výsledky F-testu realizovaného na dátach pozorovaného parametru „suchá hmota bunky M“.

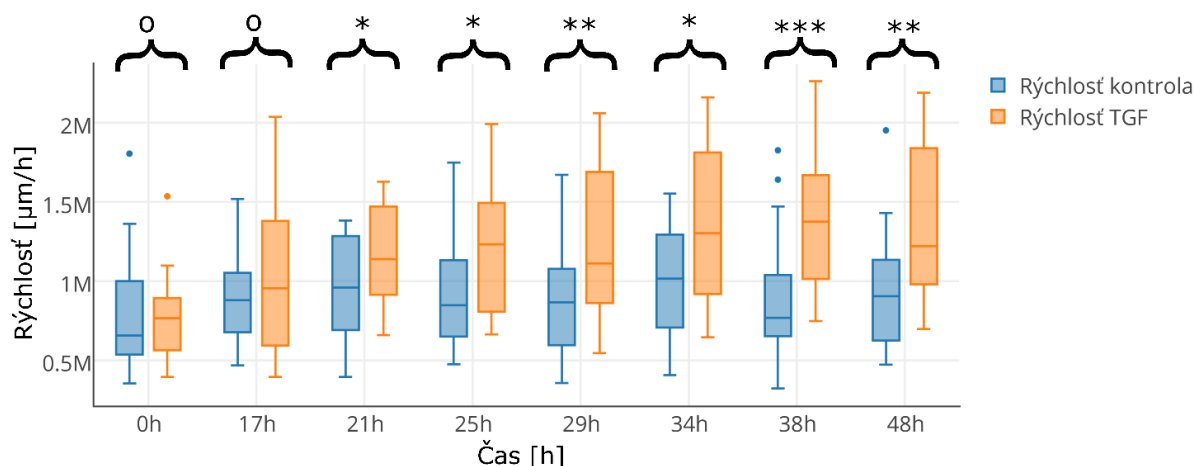
čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p =	0,24012	0,00379	0,03373	0,42837	0,18028	0,16553	0,00043	0,38950
$p_0 < p$		$p_0 > p$	$p_0 > p$	$p_0 < p$	$p_0 < p$	$p_0 < p$	$p_0 > p$	$p_0 < p$
rovnaké		rôzne	rôzne	rovnaké	rovnaké	rovnaké	rôzne	rovnaké
σ^2		σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2

Tab. 6.8 Výsledky t-testu uskutočneného na dáta pozorovaného parametru „suchá hmota bunky M“.

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p =	0,33326	0,01309	0,55930	0,39122	0,53585	0,47767	0,00000045	0,30591
$p > p_0$		$p < p_0$	$p > p_0$	$p > p_0$	$p > p_0$	$p > p_0$	$p < p_2$	$p > p_0$
rovnaké		rôzne	rovnaké	rovnaké	rovnaké	rovnaké	rôzne	rovnaké
$\mu (o)$		$\mu (*)$	$\mu (o)$	$\mu (o)$	$\mu (o)$	$\mu (o)$	$\mu (***)$	$\mu (o)$

Rýchlosť pohybu bunky

Pre parameter *rýchlosť pohybu bunky* sme zistili, že aplikáciou rastového faktoru TGF- β sa *rýchlosť pohybu bunky* mení podobne ako parametre *plocha bunky*, *obvod plochy bunky* a *kruhovitosť*. Zmena nastáva až medzi 17. a 21. hodinou. Vtedy je *rýchlosť pohybu buniek* vo vzorku s TGF- β vyššia ako v kontrolnom vzorku. Tento pozorovaný jav je v súlade s teoretickým predpokladom, že mezenchymálny typ buniek má tendencie migrovať rýchlejšie ako epitelálny typ buniek. Výsledky analýzy na základe, ktorej bol vyvozený tento záver sú zhrnuté na obr. 6.7 a v tab. 6.9, tab. 6.10.



Obr. 6.7 Graf pre pozorovaný parameter „rýchlosť pohybu bunky“

Tab. 6.9 Výsledky F-testu aplikovaného na dátach pozorovaného parametru „rýchlosť pohybu bunky“

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p =	0,23758	0,05256	0,89542	0,47576	0,21022	0,13916	0,20432	0,23500
$p_0 < p$								
rovnaké								
σ^2								

Tab. 6.10 Výsledky t-testu realizovaného na dáta pozorovaného parametru „rýchlosť pohybu bunky“

čas [h]	0	17	21	25	29	34	38	48
p=	0,84953	0,56995	0,03440	0,03523	0,00336	0,01119	0,00007	0,00215
$p > p_0$								
rovnaké								
μ (o)								
μ (*)								
μ (**)								
μ (***)								

6.5 Zhrnutie výsledkov experimentu

Po uvážení výsledkov štatistických testov pre jednotlivé pozorované parametre môžeme usudzovať, že uskutočnením experimentu sa nám podarilo potvrdiť vplyv rastového faktoru TGF- β na EMT a popísať časový priebeh zmien pozorovaných parametrov. Epiteliálne bunky približne sedemnášť hodín po aplikácii TGF- β začnú strácať svoje epiteliálne vlastnosti a získavať mezenchymálne vlastnosti buniek. Zmenu tvaru bunky potvrdzujú rozdiely stredných hodnôt *t*-testu pre parametre *plocha bunky*, *obvod plochy bunky* a *kruhovitost' bunky*. Zvýšenú migračnú kapacitu a invazivitu bunky možno usudzovať z parametru *rýchlost' pohybu bunky*.

7 Záver

V rámci bakalárskej práce som sa zaoberala sledovaním dynamiky bunečnej línie v multimodálnom holografickom mikroskope v transmisnom móde. Cieľom experimentu je kvantitatívny popis epiteliálno-mezenchymálneho prechodu nádorových buniek NMuMG.

V prvej časti práce bol stručne popísaný historický vývoj interferenčnej mikroskopie, spôsob delenia interferenčných mikroskopov a vývoj digitálnej holografickej mikroskopie na FSI VUT v Brne.

V ďalšej časti práce bol popísaný multimodálny holografický mikroskop Q-Phase, ktorý bol použitý na uskutočnenie experimentu. Táto časť sa zaoberá konštrukciou mikroskopu Q-Phase, interferenciou, koherenciou, achromaticitou a vlnovou dĺžkou svetla použitého Q-Phase mikroskope. Ďalej pojednáva o spôsobe spracovania hologramu, približuje prácu so softwarom a meranie dát.

Nasleduje kapitola zaoberajúca sa popisnými parametrami bunky, ktorá popisuje pozorované parametre buniek, použitých pre posúdenie bunkového správania pri epiteliálno-mezenchymálnom prechode.

Ďalej nasleduje kapitola približujúca informácie o epiteliálno-mezenchymálnom prechode buniek, jeho vlastnostiach, o spôsobe delenia ETM a vplyve rastového faktoru TGF- β na EMT.

Spôsob, akým boli získané dáta z programu Q-Phase spracované, bol popísaný v časti s názvom štatistika. Tu boli popísané štatistické testy, ktoré boli použité pri spracovávaní dát, získaných počas experimentu a spôsob akým boli tieto testy vyhodnotené.

V experimentálnej časti boli uskutočnené dve sady meraní. Meranie kontrolného preparátu a meranie preparátu, na ktorý bol aplikovaný rastový faktor TGF- β . Každé meranie trvalo 48 hodín a bolo snímaných 6 vybraných zorných polí s frekvenciou snímania 1 snímka za 5 minút. Získané dáta boli uložené v podobe datasetu pre neskoršie spracovanie v offline móde programu, ktorý je súčasťou mikroskopu Q-Phase. V tomto programe bola uskutočnená segmentácia buniek a následná analýza dát z ôsmich vybraných časových úsekov, z ktorej sme získali informácie o piatich pozorovaných parametroch. Výstupy sme podrobili štatistickej analýze. Na základe výsledkov testu normality, F -testu a t -testu boli vyvedené závery experimentu.

Zo získaných výsledkov môžeme usudzovať, že prvých 17 hodín po aplikácii rastového faktoru TGF- β nepozorujeme žiadne zmeny epiteliálneho fenotypu buniek. Prechod od epiteliálnych vlastností buniek k mezenchymálnym indikuje rozdiel stredných hodnôt parametrov *plocha bunky*, *obvod plochy bunky*, *kruhovitosť* a *rýchlosť pohybu bunky* až medzi 17. a 21. hodinou experimentu. Zo zmeny *kruhovitosti bunky* môžeme vyvodiť, že bunky strácajú kruhovitý tvar typický pre epiteliálne bunky, ich tvar sa predlžuje a splošťuje, čo je typickým znakom mezenchymálnych buniek. Zvýšenú invazivitu a tendenciu migrovať predpokladáme na základe rozdielu stredných hodnôt parametru *rýchlosť pohybu bunky*. Pri parametri *suchá hmota bunky* nedochádza k zmene strednej hodnoty parametru medzi kontrolným a pokusným preparátom. Pokles priemernej suchej hmoty v oboch preparátoch v 38. a 48. hodine pripisujeme nedokonalnej segmentácii. Problém pri segmentácii ku koncu experimentu mohol byť zapríčinený tým, že vrstva buniek už bola takmer konfluentná, čo spôsobuje značné obtiaže softwaru pri odsegmentovávaní jednotlivých buniek.

Experiment potvrdil predpokladaný vplyv TGF- β na epiteliálne bunky a poskytol časový popis epiteliálno-mezenchymálneho prechodu pomocou pozorovaných parametrov. Boli teda získané kvantitatívne informácie o jednom z prvých pozorovaní EMT pomocou digitálnej holografickej mikroskopie.

Literatúra

- [1] KUBITSCHKE, U. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. Weinheim (Německo): Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-3-527-32922-9.
- [2] POPESCU, G et al. *Diffraction phase and fluorescence microscopy*. Optics Express, 2006. vol. 14, issue 18, s. 8263-8268. DOI: 10.1364/OE.14.008263.
- [3] DUNN, G.A. *Transmitted-light Interference Microscopy: a Technique Born Before its Time*. Proceedings of the Royal Microscopical Society, 1998. vol. 33, pp. 189-196.
- [4] KRUG, W., J. REINITZ a G. SCHULTZ: *Contributions to Interference Microscopy*. London: Hilger & Wats Ltd, 1964.
- [5] GABOR, D. *Using Interference Microscopy to Study Cell Behaviour*, Nobel Lecture, Les Prix Nobel en 1971. Imprimerie Royale P. A. Norstedt & Soner, Stockholm 1971, 169.
- [6] DAVIES, H. V. a M.H. WILKINS. *Interference microscopy and mass determination*. Nature, 1952. vol. 169. pp 541. DOI: 10.1038/169541a0
- [7] CHMELÍK, R. a Z. HARNA. *Parallel-mode confocal microscope*. Optical Engineering, 1999. vol. 38, pp. 1635-1639.
- [8] LEITH, E. N. a J. UPATNIEKS. *Reconstructed Wavefronts and Communication Theory*. Journal of the Optical Society of America, 1962. vol. 52. issue 10. s. 1123-1128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1364/JOSA.52.001123>.
- [9] SCHNARS, U. a W. JUEPTNER. *Digital holography: digital hologram recording, numerical reconstruction, and related techniques*. Berlin: Springer, 2005, 164 s. ISBN 35- 402-1934-X.
- [10] PROKOPOVÁ, M. *Transmisní holografický konfokální mikroskop*. Disertační práce, VUT v Brně, 2002.
- [11] KOLMAN, P. *Koherencí řízený holografický mikroskop*. Disertační práce, VUT v Brně, 2010.
- [12] JANEČKOVÁ, H. *Interferenční mikroskopie biologických vzorků*. Disertační práce, VUT v Brně, 2006.
- [13] UHLÍŘOVÁ, H. *Mikroskopie časově proměnných biologických objektů*. Disertační práce, VUT v Brně, 2010.
- [14] SLABÝ, T. *Koherencí řízený holografický mikroskop nové generace*. Pojednání ke státní doktorské skoušce, VUT v Brně 2012.
- [15] KOLMAN, P. a R. CHMELÍK. *Coherence-controlled holographic microscope*. Optics Express, 2010. vol. 18, issue 21, s. 21990-22003. DOI: 10.1364/OE.18.021990
- [16] CHMELÍK, R. *Koherencí řízená holografická mikroskopie: Coherence-controlled holographic microscopy : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru aplikovaná fyzika*. Brno: VUTUM, 2011. ISBN 978-80-214-4336-5.

- [17] 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.
- [18] POPESCU, G. *Quantitative phase imaging of cells and tissues*. New York: McGrawHill, 2011. 362 s. McGraw-Hill biophotonics. ISBN 00-716-6342-8
- [19] PAVILLON, N. et al. *Cell morphology and intracellular ionic homeostasis explored with a multimodal approach combining epifluorescence and digital holographic microscopy*. Journal of Biophotonics, 2010. vol. 3. issue 7. s. 432-436. DOI: 10.1002/jbio.201000018.
- [20] SLABÝ, T. et al. *Coherence-controlled holographic microscope. 17th Slovak-CzechPolish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*. Proceedings of the SPIE, 2010. č. 7746. 8 s. DOI: 10.1117/12.882048.
- [21] DUNN, G. A. a D. ZICHA. *Phase-shifting interference microscopy applied to the analysis of cell behaviour*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1993. č. 47. s. 91-106.
- [22] 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.
- [23] BABER, R. *Interference microscopy and mass determination*. Nature, 1952. vol. 169, pp. 366-367.
- [24] POPESCU, G. et al., *Optical imaging of cell mass and growth dynamics*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2008. vol. 295, pp. C538-C544.
- [25] KALLURI, R. and R.A. WEINBERG. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1420-8.
- [26] LAMOUILLE, S., J. Xu a R. DERYNCK. *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(3): p. 178-96.
- [27] KANGAE, L. C.M.N. *New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis*. International Review of Cell and Molecular Biology, 2012. 294: p. 173- 206.
- [28] THIERY, J.P. *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nature Reviews, 2002. 2: p. 442-454.
- [29] MOUSTAKAS, A. a C.H. HELDIN. *Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor beta*. Semin Cancer Biol, 2012. 22(5-6): p. 446-54.
- [30] MYUNG, K. K. *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications*. Springer, 2011. ISBN 1441977929.
- [31] COLOMB, T. *Enhancing the performance of digital holographic microscopy*. SPIE Newsroom. 2007. DOI: 10.1117/2.1200709.0872.
- [32] ELLIOT, A. C. a W. A. WOODWARD. *Statistical analysis quick reference guidebook: With SPSS examples*. Sage, 2007.
- [33] MATHWORKS. *Global optimization toolbox: User's guide (r2011b)*. Retrieved April 05, 2015 from <http://www.mathworks.com/help/stats/boxplot.html>

- [34] RAZALI, N. M. a Y. B. WAH. *Power comparisons of Shapiro-Wilk, KolmogorovSmirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests*. Journal of Statistical Modeling and Analytics, 2(1):21–33, 2011.
- [35] MELOUN, M. a J. MILITKÝ. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004. ISBN 80200-1254-0.
- [36] SATTERTHWAIT, F. E. *An approximate distribution of estimates of variance components*. Biometrics bulletin, 1946. pages 110–114.
- [37] PROCHÁZKA, V. *Q-PHASE – Cell segmentation, tracking and analysis*. BRNO, 2015.

Zoznam použitých symbolov a skratiek

Symbol	Rozmer	Veličina
A	$[\mu m^2]$	Plocha bunky (area)
a_i	$[-]$	Štatistická váha
d	$[m]$	Hrúbka bunky
h	$[m]$	Výška použitých komôrok
H_0	$[-]$	Nulová hypotéza
L	$[\mu m]$	Koherenčná dĺžka
M	$[pg]$	Suchá hmota bunky (mass)
n_0	$[-]$	Index lomu média
n_1	$[-]$	Index lomu bunky
p_0	$[-]$	Hladina významnosti
P_A	$[\mu m]$	Obvod plochy bunky (perimeter)
R	$[\%]$	Kruhovitost' (roundness)
x_k^2	$[-]$	Kvadrát k-teho členu štatistiky
x_i	$[-]$	I-ty člen štatistiky
$\bar{x}$	$[-]$	Aritmetický priemer
α	$[ml/g]$	Refrakčný prírastok
β	$[^\circ]$	Výstupný úhol
Δn	$[-]$	Rozdiel indexu lomu v danom mieste bunky a indexu lomu média
$\Delta \lambda$	$[nm]$	Pološírka spektra
$\Delta \phi$	$[rad]$	Rozdiel obrazovej fáze predmetovej a referenčnej vlny
λ	$[nm]$	Centrálna vlnová dĺžka, vlnová dĺžka použitého svetla
μ	$[-]$	Stredná hodnota
ν_i	$[-]$	Počet stupňov volnosti
ρ_i	$[pg/\mu m^2]$	Plošná hustota suchej hmoty
σ^2	$[-]$	Rozptyl
ϕ_p	$[rad]$	Obrazová fáza predmetovej vlny

ϕ_r	[rad]	Obrazová fáza referenčnej vlny
φ	[rad]	Fáza

Skratka	Význam
CCD	Charge-Coupled Device
CCHM	Koherenciou riadený holografický mikroskop (Coherence-controlled holographic microscope)
DHM	Digitálny holografický mikroskop (Digital holographic microscopy)
EMT	Epiteliálno-mezenchymálny prechod (Epithelial–mesenchymal transition)
ECM	Extracelulárny matrix (Extracellular matrix)
FFT	Rýchla Fourierova transformácia (Fast Fourier transform)
IFFT	Rýchla inverzná Fourierova transformácia (Inverse fast Fourier transform)
IQR	Rozdiel medzi prvým a tretím kvartilom (Interquartile range)
MET	Mezenchymálno-epiteliálny prechod (Mesenchymal–epithelial transition)
NMuMG	Nádorové bunky prsnej žľazy
SNS	Signal-to-noise ratio
TGF	Transformujúci rastový faktor (Transforming growth factor)