



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

NOVÉ PŘÍSTUPY PRO OPTICKÁ MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ AKTIVITY MYOKARDU

NEW APPROACHES IN CARDIAC OPTICAL MAPPING

DIZERTACNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. MARTIN ŠVRČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2010

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
Faculty of Electrical Engineering and Communication
Department of Biomedical Engineering

NEW APPROACHES IN CARDIAC OPTICAL MAPPING

DISSERTATION

Study Specialization: Biomedical Electronics and Biocybernetics
Author: Ing. Martin Svrcek
Supervisor: prof. Ing. Ivo Provaznik, Ph.D.
Supervisor-specialist: prof. MUDr. Marie Novakova, Ph.D.

ABSTRACT

This dissertation deals with new approaches in cardiac optical mapping. The principle of cardiac optical mapping as well as the current research in this field was described. The new measurement system was developed and its characteristics presented. The system design allows epicardial and endocardial mapping, employing new ratiometric techniques in 2D acquisition and simultaneous electrical and optical mapping. The measured characteristics of fluorescent dye di-4-ANEPPSS were presented. The relation between movement and consequent motion artifacts is well described. Several new approaches in signal processing were proposed, including new ratiometry technique and using image registration to suppress motion artifacts. The algorithm for elastic image registration of optical signals and innovative method for verification of registration process were presented. Application of all proposed approaches and its results are included and discussed.

Key words: action potential, optical mapping, fluorescence, dye, di-4-ANEPPS, motion artifacts, ratiometry techniques, elastic image registration, epicard, endocard

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií
Ústav biomedicínského inženýrství

**NOVÉ PŘÍSTUPY PRO OPTICKÁ MĚŘENÍ
ELEKTRICKÉ AKTIVITY MYOKARDU**

DISERTACE

| | |
|------------------------------|--|
| Studijní obor: | Biomedicínská elektronika a biokybernetika |
| Autor: | Ing. Martin Švrček |
| Školitel: | prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D. |
| Školitel specialista: | prof. MUDr Marie Nováková, Ph.D. |

ABSTRAKT

Tato disertační práce se zabývá novými přístupy pro optické mapování elektrické aktivity na povrchu myokardu. V práci je popsán princip optického mapování, stejně jako současný stav dané problematiky ve světě. Součástí je návrh nového měřicího systému a popis jeho charakteristických vlastností. Navržený systém umožňuje měření na povrchu endokardu i epikardu, využití nové poměrové metody ve 2D a kombinaci elektrického i optického mapování. V práci jsou představeny výsledky z měření charakteristik napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS. Součástí je i popis vzniku pohybových artefaktů, včetně popisu algoritmu pro jejich potlačení s využitím poměrové techniky, nebo elastické registrace obrazů. Pro elastickou registraci optických záznamů, byl navržen registrační algoritmus, včetně inovativní techniky, která umožňuje jeho verifikaci. Aplikace a výsledky navržených přístupů jsou prezentovány včetně diskuze.

Klíčová slova: akční napětí, optické mapování, fluorescence, barvivo, di-4-ANEPPS, pohybový artefakt, poměrové techniky, elastická registrace obrazů, epikard, endokard

Bibliografická citace disertační práce

ŠVRČEK, M. Nové přístupy pro optická měření elektrické aktivity myokardu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 106 s. Vedoucí disertační práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci na téma „Nové přístupy pro optická měření elektrické aktivity myokardu“ jsem vypracoval samostatně pod vedením školitele a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Brně dne

.....
(podpis autora)

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat všem, kteří umožnili realizaci této dizertační práce. Děkuji školiteli prof. Ivo Provazníkovi, za metodickou a odbornou pomoc při jejím vypracování, konzultace a spolupráci na publikovaných výsledcích, včetně pomoci s organizací zahraniční stáže, prof. Marii Novákové za úvod do fyziologie myokardu a seznámení s problematikou experimentálního měření.

Děkuji elektrofyziologické skupině na pracovišti Auckland Bioengineering Institute, University of Auckland, New Zealand, za podporu při realizaci měřicího systému a souvisejících experimentů. Členy této skupiny byli: prof. Bruce H. Smaill, Dean C.-S. Tai, Sally Rutherford a Andy Y. H. Chen.

Za finanční podporu a projev důvěry v dosažení stanovených cílů disertace děkuji nadaci „Nadání, Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“. Za poskytnuté cestovní stipendium děkuji také VUT v Brně, zastoupené JUDr. Jarmilou Pončovou.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům nejen proto, že poskytli nezbytné zázemí, ale také motivaci a duševní podporu. Stejně tak děkuji přítelkyni Monice Přechkové, za pomoc a podporu, která vedla k dokončení této práce.

Zvláštní poděkování věnuji A. prof. Bruce H.Smaillovi, který svou metodickou a odbornou pomoci významně přispěl k naplnění stanovených cílů disertace.



A. prof. Bruce H. Smaill (vlevo) společně s autorem Ing. Martinem Švrčkem

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Obsah

| | |
|--|------------|
| Obsah | 1 |
| 1. Kapitola | |
| Úvod..... | 2 |
| 2. Kapitola | |
| Základy optického snímání elektrických projevů myokardu | 6 |
| 2.1 Princip optického mapování akčního napětí | 8 |
| 2.2 Technické prvky snímacího zařízení | 10 |
| 2.3 Biologická část experimentů..... | 16 |
| 2.4 Napěťově citlivá fluorescenční barviva | 17 |
| 2.5 Problémy optického mapování | 20 |
| 2.6 Pohybový artefakt..... | 23 |
| 2.7 Optické mapování akčního napětí na úrovni orgánu | 28 |
| 3. Kapitola | |
| Design realizovaného měřicího systému | 34 |
| 3.1 Definice požadavků | 35 |
| 3.2 Koncepce měřicího systému | 35 |
| 3.3 Zajištění vitálních funkcí vzorku..... | 36 |
| 3.4 Prvky pro snímání a excitaci | 41 |
| 4. Kapitola | |
| Zpracování a analýza měřených signálů | 47 |
| 4.1 Problematika zpracování signálů..... | 48 |
| 4.2 Předzpracování signálů..... | 48 |
| 4.3 Charakteristika odezvy barviva na AN..... | 51 |
| 4.4 Navržená poměrová metoda | 52 |
| 4.5 Popis vzniku pohybových artefaktů | 55 |
| 4.6 Registrace obrazu | 58 |
| 4.7 Realizovaný SW..... | 68 |
| 5. Kapitola | |
| Aplikace..... | 69 |
| 5.1 Měřicí systém | 70 |
| 5.2 Metody zpracování signálů..... | 79 |
| 6. Kapitola | |
| Diskuze a Závěr | 91 |
| 6.1 Diskuze dosažených výsledků..... | 92 |
| 6.2 Závěr | 98 |
| Literatura | 99 |
| Seznam zkratk a symbolů | 105 |
| Seznam příloh | 106 |

1. KAPITOLA

ÚVOD

Obsahem kapitoly:

Optické mapování akčních potenciálů je technikou poměrně mladou. Úvodní kapitola seznamuje s využitím optických metod pro snímání akčních napětí jako jedním ze základních pilířů současného výzkumu elektrofyziologie myokardu. Tato kapitola popisuje základní koncepty měření a zaměření této disertační práce na nové přístupy, které rozšiřují nebo doplňují stávající metody.

Měření elektrických projevů srdce je jedním z klíčových faktorů pro porozumění jeho funkce. Ať již jde o měření na úrovni buněk, tkání, nebo celého orgánu, měřicí metody nám poskytují informace, které mohou sloužit k diagnostice, léčbě, nebo prevenci srdečních onemocnění. První měření elektrické aktivity srdce se datuje až do roku 1842, kdy italský profesor fyziky Carlo Matteucci prokázal, že každý úder srdce je provázen slabým elektrickým proudem. Později v roce 1843 německý fyziolog Emil Dubois-Reymond popsal poprvé pojem akční napětí doprovázející stah svalů. Dále jej následovali Willem Eithoven v definici prvního elektrokardiogramu (EKG) a popisu jednotlivých vln měřeného signálu (P, Q, R, S, T) a mnozí další, zabývající se touto problematikou. Tento výzkum byl však podmíněn pokrokem ve vývoji měřicích systémů, kterým byl v počátcích galvanometr, vynalezený již v roce 1820 Johanem Schweiggerem z Norimberku. Moderní přístroje pro měření EKG využívají stejného principu, ačkoli galvanometry nahradily moderní diferenciální zesilovače a mechanické zapisovače pak digitální záznamy v osobním počítači, nebo v paměti přístroje.

V klinické praxi jsou signály EKG využívány k diagnostice řady onemocnění, ať již jde o diagnostiku poruch srdečního rytmu, tachykardií, bradykardií, fibrilaci, flutteru, diagnostiky infarktu myokardu, morfologických změn a dalších. Signály EKG jsou zpravidla měřeny na povrchu těla. Tyto signály představují záznam rozdílu potenciálů, který je projekcí elektrických projevů myokardu.

Pro bližší zkoumání srdeční aktivity, byly vyvinuty přístupy pro přímá měření na povrchu myokardu, ať již *in vitro*, *in vivo*, nebo *ex vivo*. Jednou z metod, která umožňuje podrobnější zkoumání myokardu, je měření na izolovaných srdcích. Perfúze izolovaných orgánů, byla představena již v roce 1895 Langendorfem. Tato technika perfúze, umožňuje měření přímo na povrchu extrahovaného myokardu (*ex vivo*), při zachování životních funkcí orgánu. Měření na izolovaných orgánech je součástí většiny experimentů zaměřených na elektrické či optické mapování.

Měření akčních napětí (membránové napětí) srdečních buněk bylo dříve omezeně realizovatelné pomocí intracelulárních mikroelektrod, nejčastěji metodou vnuceného napětí (voltage-clamp). Ačkoli je tento postup stále považován za zlatý standard, pro měření akčních napětí je jeho využití v mnoha aspektech omezené. Techniky měření pomocí mikroelektrod vyžadují komplikovanou aplikaci elektrody do intracelulárního prostoru a často mají za následek poškození měřených buněk, tato technika také neumožňuje měření na malých buňkách ($d < 3 \mu\text{m}$) [35]. Další nevýhodou této techniky je nemožnost provedení delších a stabilních záznamů z více než dvou až tří lokalit a to zejména v případech, kdy se preparát pohybuje [3]. Podobně monofázický záznam akčního napětí je možné realizovat jen na několika místech měřeného vzorku pouze v krátkých časových úsecích. Chceme-li pomocí těchto metod dosáhnout vyššího prostorového rozlišení, je nutné měření na

zkoumané ploše několikrát opakovat s posunem měřících elektrod. To omezuje studium elektrofyziologie daného preparátu, pouze na periodicky se opakující vzory. Zástupcem další techniky, kterou lze použít pro měření distribuce repolarizace, je využití měření refrakterní periody. Dosažení dostatečného prostorového i časového rozlišení této metody, však vyžaduje časově zdlouhavý přístup nastavování vazebného intervalu pro každý bod měření, což je pro vytvoření komplexnějších map repolarizace zdlouhavé. I tato metoda předpokládá, pro plošné mapování, pouze periodicky se opakující vzory v signálu AN [20]. Možným přístupem pro měření signálů akčního napětí na povrchu orgánu s vysokým rozlišením, je využití pole elektrod s vysokou hustotou, které je však velice náročné na realizaci a neposkytuje takové rozlišení, které může poskytnout mapování optické. Nevýhodou elektrického mapování je fakt, že měřeným signálem není membránové napětí, ale napětí na povrchu buněk. Problémem zde, je i interpretace takto získaného záznamu elektrokardiogramu s ohledem na stanovení doby repolarizace, jež není spolehlivé [64]. Omezení snímání pomocí mikroelektrod, nebo elektrod obecně, představuje jejich citlivost na externí elektrické pole během stimulace, nebo defibrilace, což znemožňuje zkoumání reakce měřeného vzorku během jejich aplikace [23]. Využití elektrod, představuje kontaktní metodu měření.

Techniky optického snímání přinesly revoluci ve zkoumání fyziologie srdečních buněk a pomohly překonat většinu nedostatku výše uvedených metod. Výzkum v oblasti optického mapování byl podmíněn vývojem fluorescenčních barviv, nebo také sond, jež umožňují měření buněčných potenciálů optickou cestou. Tyto fluorescenční barviva jsou schopna vazby na buněčnou membránu s tím, že v závislosti na rozdílu potenciálů uvnitř a vně buňky mění své optické vlastnosti, fluorescenci. Měření akčních napětí ovšem není jedinou možností využití takovýchto sond. V současnosti jsou vyvinuty sondy využívané k měření nejen membránových potenciálů, ale také například k měření koncentraci volného intracelulárního vápníku, sodíku, draslíku, pH a dalších parametrů. Každá z aplikací těchto sond představuje samostatně obsáhlou část, která však v celku umožňuje detailnější pochopení funkce buněk, tkání, případně celých orgánů.

Ačkoli v počátcích se tyto techniky uplatňovaly převážně na celulární bázi, v poslední dekádě došlo k významnému rozšíření optických metod, jež se zabývají bezkontaktním snímáním elektrické aktivity na úrovni orgánů a tkání. Tento postup byl umožněn zejména rozvojem a zdokonalením snímací i výpočetní techniky.

Budeme-li mluvit o měření akčních napětí na úrovni orgánů, jsou v současnosti pro takováto měření k dispozici systémy pro měření bodové, plošné i panoramatické. Realizované jsou i komplexní systémy umožňující měření více parametrů současně (např. akční napětí a vápníkové transienty).

Aplikace těchto metod dovoluje podrobné zkoumání distribuce depolarizace, repolarizace, nebo tvaru akčních napětí v souvislosti s okolními podmínkami. Sledování šíření elektrických signálů na povrchu myokardu, případně i v jeho stěně [35], umožňuje detailnější porozumění vzniku reentry arytmií, fibrilací, flutteru, AV blokády a dalších srdečních poruch [43, 44, 49, 68]. S tímto úzce souvisí vývoj v návrhu kardiostimulátoru, defibrilátoru, nebo antiarytmik [25]. Tento výzkum také přináší poznatky, jež umožňují realizaci kvalitnějších počítačových modelů myokardu [64].

Optické snímání srdeční aktivity s sebou, kromě výhod, přináší i jisté problémy dané podstatou navržených systémů. Výhody, jež spočívají v bezkontaktním, jedno i vícebodovém, a relativně snadno aplikovatelném měření, jsou doprovázeny nevýhodami v podobě optického šumu, vlivu okolního rozptýleného světla, pohybových i jiných artefaktů, nedostatečného časového či prostorového rozlišení a podobně.

Tato práce se zabývá návrhem inovativního měřicího systému a algoritmu pro optické měření akčních potenciálů s důrazem na eliminaci negativních aspektů, jež optické měření provází. Práce je rozčleněna na šest samostatných kapitol.

První kapitola tvoří úvod do problematiky měření elektrických projevů srdce a shrnuje obsah disertační práce. Druhá kapitola detailně popisuje teorii snímání akčních napětí optickými metodami a seznamuje se stavem dané problematiky ve světě. Třetí kapitola prezentuje nově realizovaný systém ve spolupráci s Auckland Bioengineering Institute, University of Auckland, New Zealand, jeho výhody a parametry, mezi ně patří, zejména možnost simultánního optického a elektrického měření (současný záznam akčních napětí a potenciálů na povrchu myokardu), možnost využití poměrových technik ve 2D a možnost měření na otevřeném řezu srdce. Kapitola čtvrtá pak řeší předzpracování a zpracování měřených signálů a popis nově realizovaných přístupů, týkajících se zejména využití algoritmů pro registraci (lícování) obrazů k eliminaci pohybových artefaktů. Součástí této kapitoly je i popis nově navržené metody pro ratiometrická měření s možností využití této techniky pro jednobodové i plošné měření akčních napětí. Jsou zde také prezentovány nově zjištěné vlastnosti používaného barviva di-4-ANEPPS v závislosti na excitačním zdroji. Kapitola pátá, pak shrnuje možné aplikace navrženého systému a ukazuje výsledky navržených metod zpracování signálů.

Součástí práce je diskuse a závěr zhodnocující dosažené výsledky v jednotlivých kapitolách projektu, možnosti navazujícího výzkumu a možnosti vylepšení navrženého systému.

2. KAPITOLA

ZÁKLADY OPTICKÉHO SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÝCH PROJEVŮ MYOKARDU

Obsahem kapitoly:

Měření elektrické aktivity myokardu optickou cestou je technika, která využívá vlastnosti fluorescenčního barviva speciálně vyvinutého k měření membránového napětí optickou cestou. Tato technika umožňuje bezkontaktní měření elektrické aktivity myokardu ve vysokém rozlišení, které nebylo dříve možné. Spolu s výhodami optického měření, přicházejí i nevýhody v podobě nedostatečného poměru signál/šum, pohybových artefaktů a podobně. Tato kapitola zachycuje současný stav řešení těchto problémů a popis realizovaných měřicích systémů doma i ve světě, na základě informací získaných studiem odborné literatury zachycující tuto problematiku. Nedílnou součástí této kapitoly je i popis principu optického snímání.

Tato kapitola si klade za cíl prezentovat současný výzkum v metodách zabývajících se optickým snímáním akčních napětí, jakožto jednou z metod umožňujících progresi v základním výzkumu elektrofyziologie srdce.

K dispozici je široká škála metod, od nejjednodušších, zabývajících se měřením optických signálů v jediném bodě na povrchu myokardu, až po metody zahrnující panoramatické měření ve 3D. Pokrok v realizaci takovýchto měřicích systémů umožnil zejména vývoj nových snímacích prvků, světelných zdrojů i výpočetní techniky. Podrobnější rozbor způsobů měření akčních napětí optickou cestou, lze najít v první části této kapitoly.

Nedílnou součástí měřicích systémů, je kromě technické části, zahrnující snímání a zpracování signálů, i část fyziologická, realizovaná opět technickými prostředky, jež zajišťuje fyziologické podmínky měřeným preparátům, aplikaci fluorescenčních barviv, podpůrných látek a podobně.

V následujících odstavcích budou popsány kategorie systémů, jež jsou ve světě realizovány a využívány k měření akčních napětí optickou cestou na úrovni orgánů. Přehled používaných technik lze nalézt například v [11, 19, 20, 21, 22, 23, 61, 73].

Problematika ovšem není jen na straně měření optických signálů, nýbrž také v jejich zpracování. Pro eliminaci šumu, pohybových a jiných artefaktů byla vyvinuta řada přístupů, které budou dále rozebrány.

2.1 Princip optického mapování akčního napětí

Optické metody, které jsou využívány k měření elektrické aktivity srdce, respektive k měření membránových napětí, k tomuto využívají speciálně vyvinutých napěťově citlivých barviv. Tato barviva, nebo také optické sondy mění své optické vlastnosti (zejména fluorescenci) v závislosti na membránovém napětí buňky.

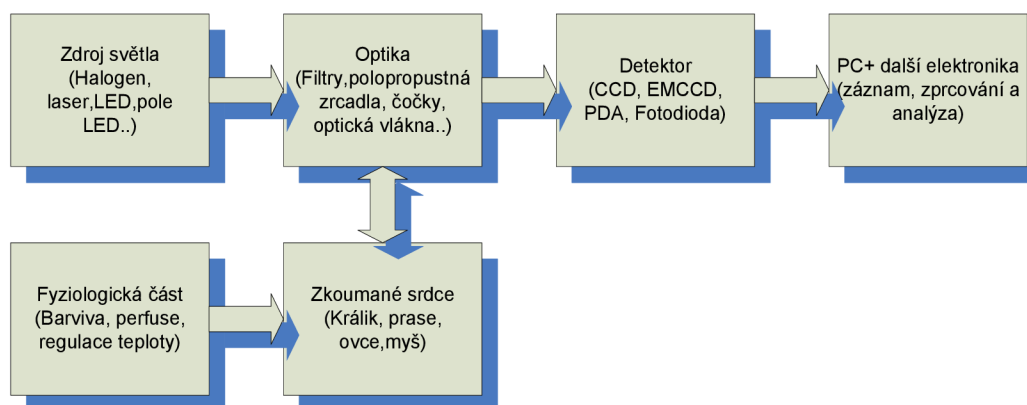
Měření akčních napětí (elektrické veličiny) se tedy transformuje na měření fluorescence optickými detektory. Fluorescence napěťově citlivého barviva je ovšem podmíněna jeho excitací, k čemuž se využívá široko paleta světelných zdrojů.

Optické detektory, jako fotodiody, fotonásobiče a kamery, jsou tedy zařízení, která zajišťují samotné měření. Tato zařízení ovšem nepracují autonomně a jsou tedy připojena k řídicímu, měřicímu PC přímo, nebo také pomocí externího rozhraní vstup/výstup- nejčastěji vývojové prostředí LabView doplněné měřicí kartou.

Měření probíhá zpravidla na izolovaných srdcích, což přináší požadavky na zajištění fyziologických podmínek pro měřený vzorek. S využitím gravitačního nebo nuceného oběhu jsou měřené vzorky perfundovány Krebsovým-Henseleitovým roztokem podle Langendorfa. Měření se provádí zpravidla na srdcích ovcí, myši, bílých novozélandských králíků nebo prasat.

Optický měřicí systém se obecně skládá ze zdroje světla, optiky, fotodetektoru, záznamového zařízení a měřeného vzorku spolu se zařízením pro podporu jeho životních funkcí. Blokový diagram takového systému ukazuje obrázek č. 1.

Celý měřicí systém je nutné stínit od přídavného světelného a elektromagnetického záření. Nejvhodnější je umístění ve Faradayově kleci a tmavé místnosti na stabilním podkladu, eliminujícím mechanické vibrace (například antivibrační stůl).

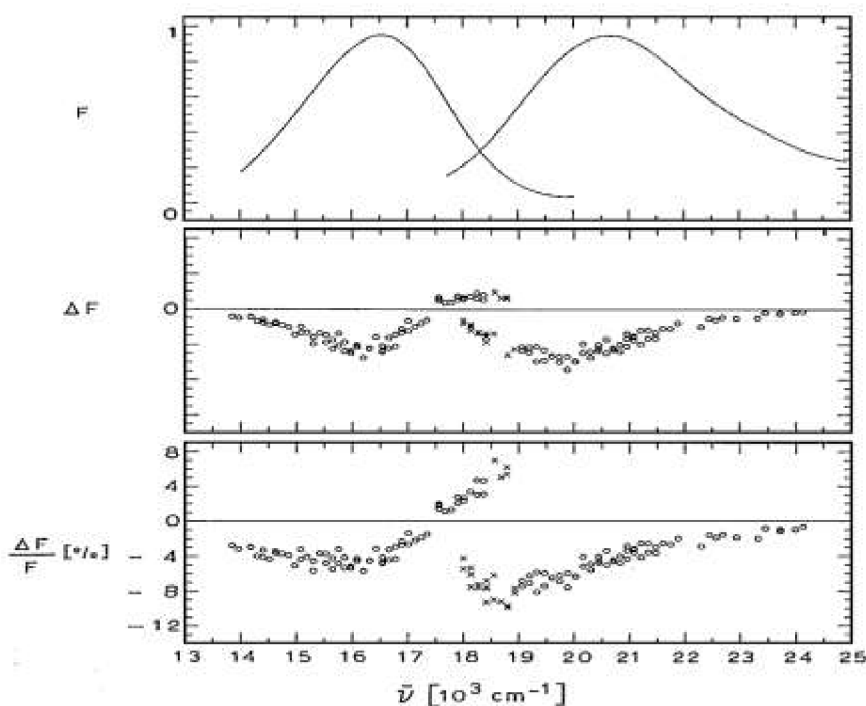


Obr. č.1: Blokové schéma optického snímacího systému

2.1.1. Změna optických vlastností barviva v závislosti na AN

Jak již bylo uvedeno dříve, změna optických vlastností fluorescenčních barviv, souvisí se změnou membránového napětí. Klíčový, pro samotné měření a návrh filtrů, je kvalitativní i kvantitativní popis této změny.

Měřením charakteru absorpčního a emisního spektra a jejich změny, pro di-4-ANEPPS, bylo popsáno například v [29, 46, 47, 60]. V relaci s depolarizací, dochází ke změně absorpčního i emisního spektra, tak jak je naznačeno na obrázku č. 2. Emisní spektrum měřeno při excitaci na 20750 cm^{-1} (481 nm), absorpční spektrum při detekci na 16400 cm^{-1} (610 nm). Relativní změna fluorescence má převážně negativní charakter pro vlnočty do 17500 cm^{-1} (571 nm) a pozitivní pro vlnočty vyšší (odpovídající „modré“ části spektra). Reakci na depolarizaci o 100 mV představuje posun emisního spektra směrem ke kratším vlnovým délkám (vyššímu vlnočtu), změna jeho tvaru případně amplitudy. Při repolarizaci je tato změna opačná. Podobné charakteristiky ukazují absorpční spektra, která však nevykazují pozitivní změnu v relaci s depolarizací na žádném z měřených vlnočtů. To, že v jisté části spektra dochází k pozitivní a v jiné k negativní modulaci vlivem depolarizace, úspěšně využívají ratiometrické přístupy [35, 47, 60]. Ty jsou podrobně popsány v kapitole 2.6.4. a 2.6.5. Zde přestavené charakteristiky jsou obdobné těm, které byly zjištěny později s využitím spektrometru [47]. Poznamenejme, že spektrální vlastnosti závisí na druhu rozpouštědla, měřeném prostředí a dalších aspektech.



Obr. č.2: Emisní (levá část grafů) a absorpční (pravá část grafů) spektrum (nahore). Absolutní (uprostřed) a relativní (dole) změna emisního a absorpčního spektra v reakci na depolarizaci o 100 mV. Křížky označují body ovlivněné rozptylem (převzato z [29])

2.2 Technické prvky snímacího zařízení

Koncepce systému pro optické mapování vychází z blokového digramu uvedeného na obrázku č. 1. Funkce a vlastnosti jednotlivých prvků (bloků) systému budou představeny v následujících podkapitolách.

2.2.1. Zajištění vitálních funkcí měřeného vzorku

K výzkumu elektrofyziologie měřených orgánů je nutná interdisciplinární spolupráce na poli medicíny a techniky. Extrakce orgánu z pokusných zvířat je částí, která souvisí s medicínskou problematikou a nebude zde dále popisována. Pro funkci měřicího systému jako celku je však potřeba zajistit vitální funkce extrahovaných orgánů, což popisuje tato kapitola. Základními parametry, které je potřeba zajistit, jsou:

- fixace vzorku,
- perfúze vzorku,
- regulace teploty,
- stimulace.

Po extrakci orgánu z experimentálního zvířete je tento umístěn na perfúzní systém dle Langendorfa. Podrobný protokol perfúze lze najít v kapitole 2.7.1. Měřený vzorek je uchycen v měřicí komůrce nebo misce, která zajišťuje kontrolu a nastavení teploty orgánu, umístění snímacích a stimulačních elektrod a mechanickou fixaci pohybu. Fixace je zpravidla ve vertikální nebo horizontální poloze, v závislosti na konfiguraci snímací optiky. K fixaci jsou využívány prvky popsané v kapitole 2.6.2. Měřený orgán může být také volně zavěšen za perfúzní kanylu (aorta).

Mezi základní technické prostředky pro zajištění perfúze patří perfúzní pumpa. Ta je využívána k řízení průtoku perfúzního oběhu. Zde je zpravidla nastavován průtok, tlak je pak kontrolován přídavným manometrem. Je také možné využití gravitačního okruhu, kdy je nádoba s perfúzním roztokem umístěna v dané výšce nad měřeným orgánem a perfúzní tlak je definován dle vztahu pro hydrostatický tlak ($p = h * \rho * g$).

Regulace teploty může být zajištěna různými prostředky. Zahrnuje ohřívání samotného vzorku dle nastavené teploty v měřicí komůrce a také kontrolu teploty přiváděného perfúzního roztoku. Termoregulace vyžaduje snímání teploty (termočlánky), tepelné výměníky, sekundární oběh termoregulační kapaliny (zpravidla voda) s přídavným čerpadlem a regulační zařízení umožňující nastavení požadované teploty. Nastavení teploty je klíčové pro různé fáze měřicího experimentu, k zajištění stabilní funkce myokardu a potlačení vzniku možných arytmií. Odezva na změnu teploty může být i součástí experimentálního výzkumu.

Zavedení elektrod v měřicí komůrce umožňuje provádět měření nebo stimulaci za účelem monitorování nebo regulace funkcí měřeného orgánu. Jedná se zpravidla o měření EKC a kontrolu, případně nápravu srdečního rytmu vhodnou stimulací.

2.2.2. Světelné zdroje

Pro optická měření jsou využívány různé světelné zdroje. Nejčastější je použití wolframových halogenových žárovek, LED nebo argonového laseru. Nejdůležitějšími parametry jsou intenzita vyzařovaného světelného toku, spektrální vyzařovací charakteristika a jejich stabilita. Použití konkrétního světelného zdroje závisí na měřicím experimentu.

Laser

Laser díky svým parametrům, našel využití v technikách optického mapování. Základními rozdíly v porovnání s ostatními světelnými zdroji je charakteristika vyzařovaného spektra (čárové), vysoká koherentnost a chromatičnost laserového svazku, které umožňuje soustředění energie na reálně malé ploše. Pro malou šířku světelného svazku, je vhodné využití laseru pro jednobodové měření. Laser zpravidla nachází využití pro ratiometrická měření [3, 35, 47]. Nejčastěji je využití vodou chlazeného argonového laseru na vlnových délkách (473 nm, 488 nm) což je v blízkosti excitačního maxima nejčastěji používaného barviva di-4-ANEPPS (480 nm). Využití excitace na této vlnové délce minimalizuje závislost membránového napětí na absorpci [47]. Výkonové rozpětí je nejčastěji 5-20 mW.

Využití laseru je možné i pro plošná měření s tím, že je vhodně použitých optických prvků, jako je například rozšiřovač svazku [15, 67].

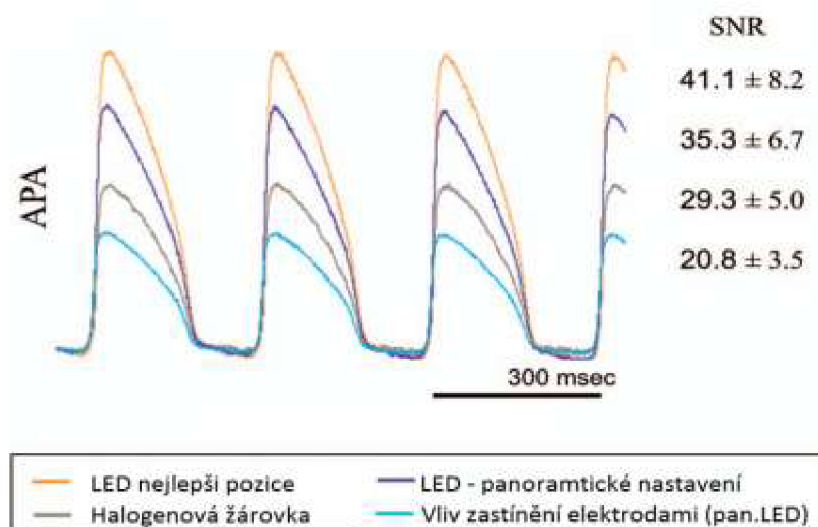
Halogenová žárovka

Klasický světelný zdroj. Účinnější než klasická wolframová žárovka, ale stále náročná na spotřebovanou energii. Používané zdroje s příkonem v rozmezí 150-400 W. Vzhledem k vysokému příkonu a s tím souvisejícím zahříváním, je potřeba řešit teplotní stabilizaci za účelem minimalizace šumu a stability vyzařovaného světelného toku. Používané pro plošná měření (reflektor), nebo také bodová (fokusace). Mají široké emisní spektrum, a tak v aplikacích optického mapování je potřeba použití emisních filtrů. Parametry použitých filtrů se pro různé experimenty liší, mezní vlnová délka je však zpravidla orientováno k absorpčnímu maximu daného barviva, v [56] například využili pro di-4-ANEPPS, 520 ± 40 nm a pro di-4-ANBDQPQ 650 ± 20 nm. Jednou z klíčových úloh filtrace u těchto zdrojů je také potlačení světelného záření, které způsobuje zahřívání měřeného vzorku.

Světlo emitující dioda – LED

Vzhledem k nedávnému vývoji na poli výkonných LED se otevřela možnost jejich využití v optickém mapování. Vzhledem k vysoké účinnosti, stabilitě vyzařovaného spektra a

nízkému šumu se jeví jako vhodný světelný zdroj. Využití LED kromě zmíněných výhod představuje i úsporu v pořizovacích nákladech. Používají se zpravidla zelené (530 nm) nebo modré (470 nm) LED, osazené přídatným reflektorem [85], je možné také využití LED pole pro uniformnější osvětlení. Jmenovitý výkon je řádově v jednotkách wattů (5-10 W). LED diody mohou být vybaveny přídatným emisním filtrem v závislosti na tvaru požadované emisní charakteristiky. Obrázek č. 3. ukazuje porovnání dosažitelného poměru signál/šum (SNR) pro LED pole (Luxeon Flood 18-up, Quadica Developments) při plošném a panoramatickém měření, halogenového světelného zdroje (250 W) při plošném měření a vlivu přítomnosti elektrody, stínící snímacímu prvku [68].



Obr. č.3: Porovnání světelných zdrojů a dalších vlivů na SNR (převzato z [68]-upraveno)

2.2.3. Optika

Optika je nedílnou součástí měřicích systémů, zahrnuje převážně použité optické emisní a excitační filtry aplikované na zdroj i senzory, světlovodná vlákna a jejich svazky, objektivy, polopropustná zrcadla a další optické komponenty.

Filtry

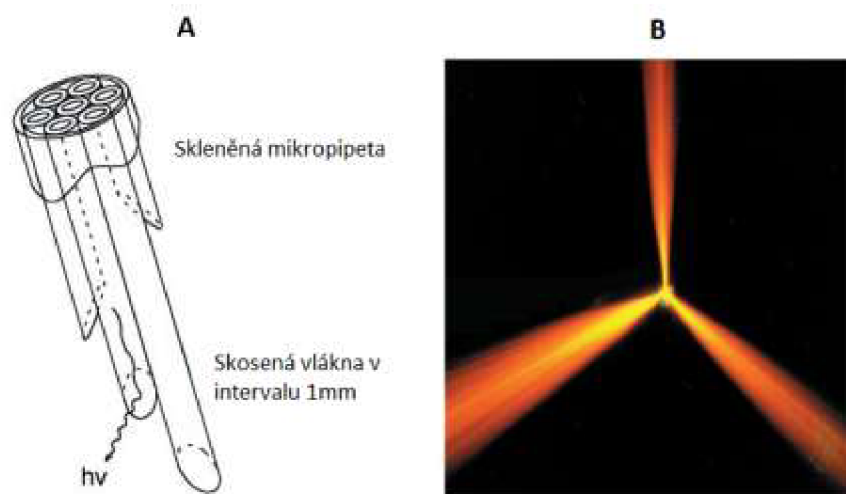
Filtry jsou jedním ze základních prvků měřicího systému, které definují jeho vlastnosti. V různých konfiguracích je třeba použít odlišné filtry pro zajištění správné excitace a schopnosti měřit emisní výkonové spektrum v oblasti, která definuje změny v akčním napětí. To souvisí zejména s použitým fluorescenčním barvivem a metodikou měření (viz. kapitola 2.4). Excitační filtry jsou zpravidla používány podle konkrétního světelného zdroje, jak je uvedeno v kapitole 2.2.2. Základními parametry filtrů je pak propustnost, absorpce, odrazivost a rozptyl.

Dichroická zrcadla

Dalším často používaným prvkem jsou dichroická zrcadla, která zajišťují rozdělení světelného toku v závislosti na vlnové délce. Toho je nejčastěji využíváno v případě, kdy světelný zdroj a optický detektor používají stejnou geometrii pohledu na měřený vzorek a je potřeba je prostorově oddělit [35, 64]. Dichroické zrcadlo také našlo uplatnění pro poměrové techniky, kdy je měřena fluorescence rozdělena podle vlnové délky na dva detektory [3, 68], nebo v aplikacích měření více parametrů, jako jsou vápníkové transieny společně s akčním napětím [37, 76].

Optické svazky

Měření pomocí optických svazků, umožňuje měření na konkrétním místě myokardu. Existují systémy pro jednobodové [47, 66], intramulární [35] nebo plošné měření [43]. Jednotlivá vlákna optického svazku zajišťují excitaci, snímání, nebo excitaci i snímání. Konfigurace optického svazku, měřicí sondy na jeho konci pro intramulární měření, je naznačena na obrázku č. 4. V tomto případě, jednotlivá vlákna svazku, slouží jak k excitaci, tak snímání fluorescence emitovaného světla.



Obr. č.4: Měřicí sonda pro intramulární měření, **A:** struktura sondy, **B:** funkce sondy demonstračně jen pro tři vlákna (převzato z [35]-upraveno)

Objektivy kamer

Pro kamery, případně PDA, se využívají klasické objektivy umožňující nastavení clony, optického přiblížení a zaostření. Jelikož pracujeme s velmi malými signály, je vyžadovaná dobrá světelnost použitých objektivů. S dobrou světelností a tedy i nízkým clonovým číslem, v relaci s velikostí snímacího prvku, je potřeba definovat i požadovanou hloubku ostrosti. Tato problematika úzce souvisí s pohybem myokardu a tím možným rozostřením (v případě malé hloubky ostrosti). Použitá optika je v závislosti na výrobci

kamery vybavena standardizovaným uchycením (např. C-mount). Optika rovněž umožňuje snadné uchycení používaných filtrů.

Další optické prvky

Mezi další používané optické prvky patří reflektory pro zdroje světla, expandéry svazku, vláknové odbočnice, samostatné čočky, zrcadla a světelné clony. Jejich využití závisí na návrhu a konfiguraci příslušného měřicího systému.

2.2.4. Detektory

Detektor je nejdůležitější část měřicího systému. Právě vývoj světelných detektorů umožnil značné rozšíření metod optického mapování. Vzhledem k charakteru signálů je u detektorů vyžadován nízký šum, vysoká citlivost a rychlost snímání. Je zde kladen důraz zejména na časové, případně časoprostorové rozlišení, při zachování dostatečné citlivosti a uspokojivého poměru signál/šum.

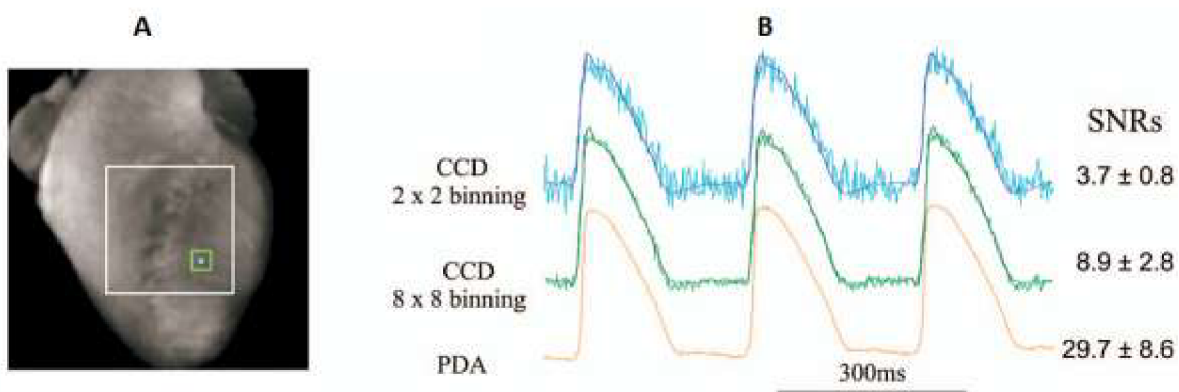
Vzorkovací frekvence použitého detektoru musí odpovídat, dle vzorkovacího teorému, alespoň dvojnásobku kmitočtu měřeného signálu. Výkonové spektrum akčních napětí zpravidla neobsahuje složky kmitočtů větších než 100 Hz [58], lze tedy použít s dostatečnou rezervou snímací frekvence okolo 400 vzorků (snímků) za sekundu. U měřených akčních napětí je důležitým parametrem strmost náběžné hrany AN, respektive doba jejího trvání, která je přibližně 1 ms [26], chceme-li ji měřit, je potřebná frekvence vzorkování alespoň 1000 vzorků (snímků) za sekundu.

U kamerových systémů je rozhodující i prostorová rozlišovací schopnost, která definuje rozlišení, s jakým je možné sledovat propagaci akčního napětí na povrchu myokardu. Tato závisí jednak na rozlišení snímacího prvku (kamery), ale také na nastavení optiky, respektive velikosti snímané oblasti. Zmenšením snímané oblasti lze dosáhnout vyššího prostorového rozlišení a naopak. Prostorové rozlišení je právě jednou z výhod optického mapování v relaci s konvenčním měřením pomocí elektrod.

Jako detektory pro jednobodové snímací systémy jsou využívány zpravidla fotodiody nebo také fotonásobiče. Oba tyto snímací prvky svými parametry umožňují měření akčních napětí s dostatečným odstupem signál/šum. Parametry záleží na provedení konkrétního snímacího prvku, zesilovače a A/D převodníku, umožňujícím digitalizaci a následující zpracování měřených signálů. Tyto senzory vynikají také svou rychlostí, danou zpravidla vzorkováním A/D převodníku. Jednobodové snímací systémy však mají omezené aplikační využití.

Častěji používané plošné měřicí systémy využívají jako detektory pole složené z jednotlivých fotodiód (PDA), snímače založené na technologii CMOS (complementary metal oxide semiconductor), CCD (Charge Coupled Device), nebo EMCCD (Electron

Multiplying Charge Coupled Device). Fotodiodová pole přináší obdobné vlastnosti jako samostatné fotodiody. Vzhledem k jejich fyzické realizaci je rozlišení omezeno zpravidla na 16x16 obrazových bodů. Tyto snímače vynikají svou citlivostí a rychlostí snímání. Systémy založené na senzorech typu CMOS, CCD nebo EMCCD poskytují vyšší rozlišovací schopnost. Vzhledem k relativně vysokému rozlišení, malé velikosti snímacího čipu a s tím související malé plochy jednotlivých pixelů, mají tyto snímače zpravidla nižší citlivost i SNR. Rozlišení je řádově v rozmezí 64x64-128x128 pixelů, přičemž snímací frekvence je v rozsahu 300-2000 snímků/s. Rychlost snímání, závislá zpravidla na rychlosti přenosu a digitalizaci dat ze snímacího čipu, se s novými technologiemi stále zvyšuje. Kamery založené na technologii CMOS bývají zpravidla rychlejší než ty se snímačem CCD. Pro zvýšení citlivosti lze na úkor prostorového nebo časového rozlišení provést prostorové průměrování sousedních pixelů (tzv. binning) nebo průměrování časové (průměr z několika period záznamu AN). Porovnání kvality signálu pro CCD snímač (v různých modech binningu) a PDA senzor, ukazuje obrázek č. 5.



Obr. č.5: Porovnání CCD a PDA, **A:** bílý čtverec-oblast referenčního signálu pro kalkulaci SNR, zelený čtverec-oblast odpovídající velikosti 8x8 px. nebo PDA, modrý čtverec-oblast odpovídající velikosti 2x2 px., **B:** odpovídající signály a SNR, u CCD také s FIR filtrací (převzato z [68])

2.2.5. Metody záznamu

Pro zaznamenání měřených signálů jsou využívány zpravidla běžné osobní počítače vybavené akviziční kartou (často využívané karty National Instruments), případně vlastním rozhraním dodávaným výrobcem snímacího prvku (připojeným do PCI, PCI express slotu) nebo s využitím jednoho ze standardních rozhraní PC (USB, FireWire).

U kamerových systémů, je vzhledem k vysoké rychlosti snímání a relativně vysokému rozlišení potřeba zajistit přenos velkého objemu dat, a tak je klíčová rychlost datového toku daného rozhraní. Snímané signály mohou být zaznamenány v režimu reálného času přímo na pevný disk kontrolního PC, nebo můžou být uloženy v paměti kamery a přeneseny do PC později. Řídicí počítač pak může sloužit k vizualizaci nebo zpracování signálů, které již probíhá off-line.

2.3 Biologická část experimentů

2.3.1. Volba měřeného orgánu

Volba měřeného orgánu zahrnuje výběr vhodného druhu srdce pro danou měřicí metodu v relaci s potřebami realizovaného výzkumu. Měřené preparáty jsou perfundovány zpravidla podle Langendorfa s využitím různých modifikací Krebsova-Henseleitova (K-H) roztoku. Některé experimenty využívají k perfúzi i krev [56]. Pro experimenty, které jsou zaměřeny na snímání aktivity na povrchu epikardu, ať metody bodové [6, 12, 66], plošné [18, 44, 49, 64, 79, 81], nebo panoramatické [25, 68], lze použít menší orgány (králík, myš) i větší orgány (prase, ovce) v závislosti na konfiguraci konkrétního systému. Pro intramurální měření jsou pak využívány orgány větší (prase, ovce), aby byla zajištěna dostatečná šířka srdečního svaly, v němž je umístěna snímací sonda [5].

Volba zvířecího experimentu může mít vliv také na možnosti zpracování měřených signálů. Zejména rychlost srdeční frekvence v relaci s vzorkovací frekvencí snímacího zařízení ovlivňuje výslednou četnost vzorkování pro jednotlivé srdeční revoluce. Dalším aspektem může být tvar AN, jenž má odlišný charakter v závislosti na měřeném orgánu. Tento aspekt může ovlivnit algoritmy pro filtraci a vyhodnocení měřených záznamů.

Volba měřeného orgánu také souvisí s nastavením perfúzního oběhu, a to zejména v základních parametrech jako je perfúzní tlak (mmHg), nebo alternativně rychlost perfúze (ml/min) a teplota.

Dalším z aspektů uvažovaných při měření je využití recirkulace [5, 68] v perfúzním oběhu. Použití recirkulace vyžaduje dodatečné prostředky pro zajištění filtrace.

Jako první realizovala experimentální výzkum postavený na optickém mapování s využitím lidských srdcí po provedených transplantacích skupina prof. Igora Efimova na pracovišti Washington University, St. Louis, USA [24].

2.3.2. Průběh měření

Fyziologická část experimentů zahrnuje soubor prostředků pro udržování vitálních funkcí měřeného orgánu, aplikaci fluorescenčního barviva, aplikaci dalších farmak ovlivňujících průběh měření (například blokátory vápníkových kanálů) nebo také látek, jejichž chování zkoumáme.

Průběh měření definuje jednotlivé etapy měřicího protokolu. Zpravidla se jedná o fáze stabilizace, aplikace fluorescenčního barviva, vymývání barviva, aplikaci farmak a samotné měření. Doba trvání těchto fází je různá a může ovlivnit výsledky měření. Některé z těchto fází nemusí být součástí měřeného protokolu a naopak zde můžou být zařazeny fáze jiné.

Zásadní je v tomto případě fáze, kdy dochází k aplikaci fluorescenčního barviva. Kromě druhu použitého barviva (kap. 2.4), má zásadní vliv jeho koncentrace a délka aplikace (doba, po kterou je barvivo zavedeno do perfúzního oběhu). V zásadě se dá aplikace rozdělit na aplikaci postupnou pomocí mikropumpy [35, 64], nebo aplikaci jednorázovou [82, 87]. Dříve bylo taky využíváno „namáčení“ měřeného vzorku do roztoku s barvivem o koncentracích 1-1000 $\mu\text{mol/L}$ na dobu 10-30 minut, které však neposkytovalo tak uniformní nabarvení vzorku a vyžadovalo 10 až 20krát větší koncentraci barviva než dnes běžné aplikace do koronárního oběhu. Kvalita měřených signálů pak byla podle parametru SNR 5 až 20krát nižší SNR [73]. Používané koncentrace a doby aplikace u vybraných experimentů (aplikace do koronárního oběhu) ukazuje tabulka č. 1. Jak lze vidět, hodnoty koncentrací a délky barvení pro různá experimentální měření se značně liší. V současné době není stanovena „zlatá“ metoda, která by určovala přesný způsob aplikace fluorescenčního barviva. Některé publikace se pouze omezují na informaci o aplikaci příslušného barviva, bez uvedení přesných koncentrací a doby aplikace. Úspěšnost měření je pak dána celkovým množstvím barviva, které je navázáno na buněčnou membránu.

| Autor | Ref. | Zvířecí exp. | Barvivo | Koncentrace [$\mu\text{mol/L}$] | Aplikace [min.] | Poznámka |
|---------------------|------|--------------|-------------|-----------------------------------|-----------------|----------|
| Laurita K.R. et al. | [49] | králík | di-4-ANEPPS | 10 | 10 | perfúze |
| Nygren et al. | [64] | Myš | di-4-ANEPPS | 1 | 5 | perfúze |
| Provaznik et al. | [66] | králík | di-4-ANEPPS | 1 | 20-25 | perfúze |
| Hooks et al. | [35] | králík | di-4-ANEPPS | 20 | 10 | perfúze |
| Efimov et al. | [20] | králík | RH-421 | 2,5 | 15-20 | perfúze |
| Tai et al. | [87] | prase | di-4-ANEPPS | 50* | 1x10 ml* | *injekce |
| Sung et al. | [82] | králík | di-4-ANEPPS | 10,4* | 1x10ml* | *injekce |

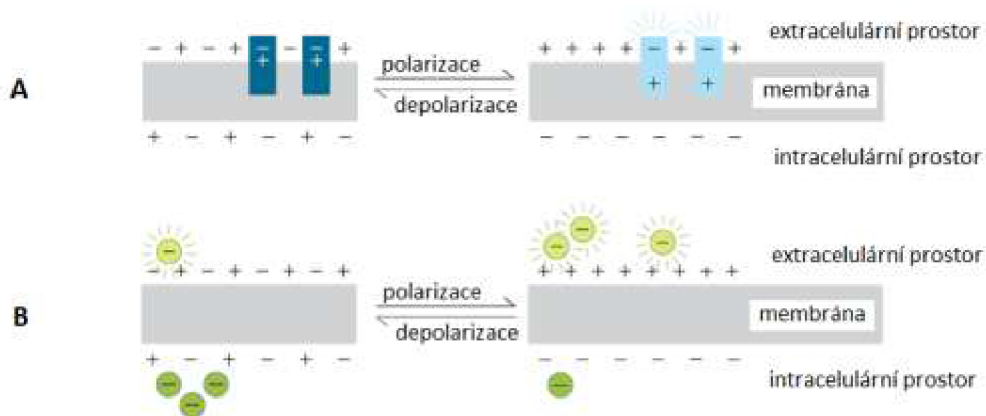
Tabulka č.1: Aplikace barviva di-4-ANEPPS

2.4 Napětově citlivá fluorescenční barviva

Základní vlastností používaných barviv je závislost jejich absorpce, fluorescence, nebo též absorpce i fluorescence [75] na změně membránového napětí buňky či buněk. K dispozici jsou i barviva určená k měření dalších parametrů, např. koncentrace volného intracelulárního vápníku, sodíku, draslíku, pH a dalších parametrů [22]. Z nich asi nejvýznamnější skupinu představují barviva užívaná pro měření koncentraci intracelulárního vápníku [37, 76].

Barviva používaná pro měření AN lze rozdělit na dvě základní skupiny, na barviva s rychlou a pomalou odezvou. Tato barviva se liší vazbou na buňku, jak lze vidět na obrázku č. 6. U barviv s rychlou odezvou je změna jejich optických parametrů dána změnou distribuce náboje na úrovni molekul (6A), reprezentováno změnou barvy. U barviv s pomalou odezvou jsou anionty (6B) nebo kationty přenášeny přes buněčnou membránu na bázi

elektroforézy. Rychlost odezvy u těchto barviv je dána rozdílem rychlostí mezimolekulární redistribuce elektronu (rychlé) versus pohyb celých molekul skrze buněčnou membránu (pomalé) [59].



Obr. č.6: Vazba barviva na buňku s: **A:** rychlou, **B:** pomalou odezvou (převzato z [59]-upraveno)

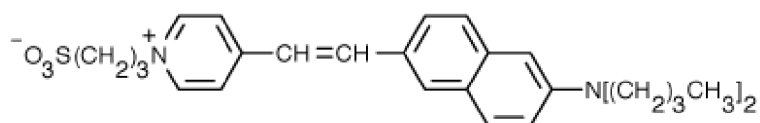
Pro účely měření jsou klíčové tyto parametry používaných barviv:

- rychlost odezvy a její linearita,
- citlivost, vyjádřena zlomkovou změnou absorpce / fluorescence na změnu AN ($\Delta F/F$), tento poměr vyjadřuje zpravidla změnu fluorescence úměrnou změně AN o $\Delta U=100$ mV,
- vybledávání barviva,
- foto-toxicita (viz. kapitola 2.5.1 Foto-toxicita používaných barviv).

Používaná barviva prošla významným vývojem. Barvivo Merocyanine 540 bylo použito jako první pro měření AN [77]. Toto barvivo je zástupce z rodiny barviv s pomalou odezvou, vykazovalo $\Delta F/F \approx 1\%$, což omezuje možnosti dosažení dostatečného odstup signál/šum (dále jen SNR) v relaci s kvalitami použitých světelných detektorů. Současným měřením pomocí intracelulárních elektrod zde byla potvrzena lineární závislost změny fluorescence v relaci s AN [77]. Jedním z nedostatků tohoto barviva, je také vysoká úroveň foto-toxicity, jež je jedním z hlavních negativních účinků používaných barviv. Tato problematika je dále rozebrána v kapitole 2.5.1.

Pro fluorescenční měření v elektrofyziologii se v současné době nejčastěji využívají tzv. rychlá barviva, která umožní sledovat napěťové změny v řádech mikrosekund. Rychlost odezvy barviva také závisí na dalších aspektech měření. Vlivem sumace optických signálů z okolí měřeného bodu dochází ke zpomalení náběžné hrany AN. Současným měřením pomocí tzv. voltage-clamp bylo prokázáno, že jestliže eliminujeme tento aspekt (je-li průměr excitačního svazku $d \leq 90 \mu\text{m}$), je náběžná hrana AN, měřená pomocí barviv s rychlou odezvou, v porovnání s voltage-clamp dokonce rychlejší [61].

Mezi nejvýznamnější a nejvíce používané zástupce barviv s rychlou odezvou patří barviva di-4-ANEPPS a RH-421. Barvivo RH-421 bylo využíváno počátkem devadesátých let [16,20], dnes jej nahrazují barviva z rodiny ANEP (Amino Naphthyl Ethenyl Pyridinium). Di-4-ANEPPS se vyznačuje poměrně vysokou změnou fluorescence v závislosti na změně napětí ($\Delta F/F \approx 8-15\%$) [59]. Tento poměr je relativně konstantní pro různé buňky a tkáně. Excitační maximum pro toto barvivo je přibližně na 498 nm (závisí na druhu rozpouštědla a na typu tkáně). Chemickou strukturu barviva ukazuje obrázek č. 7. Barvivo di-4-ANEPPS je v poslední době nejvyužívanější. Samozřejmě stále dochází k syntéze nových barviv například PGH I-VIII.

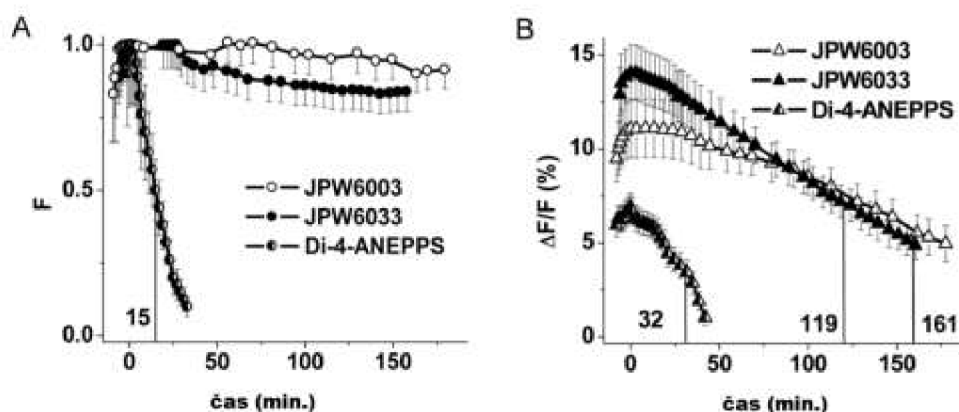


Obr. č.7: Chemická struktura barviva di-4-ANEPPS (převzato z [59])

V nedávné době byla představená barviva, která svými parametry překonávají nejčastěji používané di-4-ANEPPS. Nově syntetizovaná barviva Di-4-ANBDQPQ (JPW-6003) a Di-4-ANBDQBS (JPW-6033) vykazují lepší vlastnosti zejména v oblasti citlivosti a pozvolnějšího vybledávání barviva, tedy ztráty jeho schopnosti fluorescence nebo reakce na její změnu. Obrázek č. 8 ukazuje závislost fluorescence a citlivosti $\Delta F/F$ na délce excitace u příslušných barviv. Lze vidět, že byla vylepšena jak v oblasti vybledávání barviva (8A), tak hlavně v oblasti reakce na změnu AN $\Delta F/F$ (8B), což v podstatě definuje možnosti získatelného SNR.

V praxi Di-4-ANBDQBS vykazují přibližně dvounásobné zvětšení $\Delta F/F$ ($\Delta F/F \approx 20\%$) v porovnání s di-4-ANEPPS [57, 56].

Vybledávání barviva je jedním z aspektů poklesu fluorescence v průběhu měření. Dalším je tzv. „washout“ [75], tedy stav, při kterém dochází k vymývání barviva z měřeného vzorku.



Obr. č.8: Porovnání nově syntetizovaných barviv s di-4-ANEPPS, **A**: vybledávání barviva, **B**: citlivost $\Delta F/F$ (převzato z [56]-upraveno)

2.5 Problémy optického mapování

2.5.1. Foto-toxicita používaných barviv

Jedním ze zásadních negativních aspektů optického měření AN je vliv používaných barviv na elektrofyziologii srdce. Tato vlastnost je nazývána fototoxicita nebo také fotodynamický efekt. Těmto postraním efektům se věnovala řada odborných studií [4, 14, 33, 62, 64, 77].

Dřívější studie definují tzv. fotodynamický efekt, který popisuje expozici neuronu k chromoforu a intenzivnímu světelnému svazku, s následným zvýšením membránové permeability, membránové depolarizace a snížením transportu sodíkových ionty do buňky (I_{Na^+}) a případně také ztrátu schopnosti excitability. Fotodynamické poškození biologických membrán způsobeno elektromagnetickou radiací, je úměrné zvýšení intenzity světla, kyslíku a přítomnosti určitých chromoforu. Mechanismus, který je konzistentní napříč měřicími experimenty, popisuje, že excitace chromoforu intenzivním světlem, za přítomnosti kyslíku, generuje volné kyslíkové radikály, které způsobují tukovou peroxidaci a denaturaci bílkovin [73].

Například v počátcích používané barvivo Merocyanine 540 vykazovalo vysokou úroveň fototoxicity [65,77]. U barviva RH-421 bylo dokázáno, že má za následek zvýšení kontraktility izolovaných srdečních buněk i celého myokardu perfundovaného dle Langendorfa. Podobný efekt byl pozorován i u barviv di-4-ANEPPS a Di-8-ANEPPS [19].

Studiem vlivu di-4-ANEPPS na buňkách izolovaných z komor králičího myokardu bylo ukázáno, že při barvení s koncentracemi (30 nebo 60 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 10 minut) nedošlo ke změně tvaru AN. Při iluminaci (1 W/cm^2) však došlo k prodloužení trvání AN (dále jen APD), přítomnosti abnormálních depolarizací, redukci zbytkového potenciálu a také případné

nemožnosti excitace. Přidáním antioxidantu (Kataláza, 100 IU/ml) byl nástup těchto efektů odložen [78].

Nygren et al. [64] shrnuli několik typů vlivu nejpoužívanějšího barviva di-4-ANEPPS na elektrofiziologii srdce. Vliv barviva di-4-ANEPPS na vodivost AV uzlu, prodloužení PQ intervalu a následný vznik AV bloků. Možnost vzniku AV bloku byla potvrzena například v [62]. Dalším aspektem je přechodný vliv na vasodilataci. Při počáteční fázi barvení byl konzistentně pozorován pokles perfúzního tlaku o 27.4 ± 3.9 mmHg. Tento efekt však po několika minutách vymizel, na rozdíl od efektu prodloužení PQ intervalu, který trval řádově déle [64].

Naproti tomu se jako vedlejší efekt udává i vasokonstrikce [23]. Tento jev popisuje i [62] s tím, že nemá žádný efekt na morfologii ani funkci srdce.

2.5.2. Kalibrace optických signálů

Měřené optické signály dávají informaci o změně akčních potenciálů pouze relativně. Bylo publikováno několik postupů, které zkoumaly vztah optického záznamu k současně měřenému signálu z mikroelektrod [77].

Získání absolutní hodnoty membránového napětí je tedy obtížné a je jednou z limitací této metody. Ačkoli změna absolutní hodnoty fluorescence je lineárně úměrná počtu zobrazovaných buněk, stanovení absolutní hodnoty není možné, protože jejich počet je neznámý [19]. Montana et al. [60] ukázali, že takovéto hodnoty lze získat měřením poměru fluorescence se dvěma excitačními zdroji. Při buzení barviva di-4-ANEPPS na vlnových délkách 440 a 505 nm demonstrovali, že úroveň fluorescence lineárně závisí na membránovém napětí v rozsahu -125 až +125 mV. Měření probíhalo na tukovém váčku.

Současné měření ratiometrických signálů spolu s mikro-elektrodovým záznamem akčního napětí prokázalo výraznou korelaci a linearitu optických záznamů [47].

V absolutním měřítku pak kalibrace optických signálů probíhá tak, že předpokládáme, že zbytkový potenciál má hodnotu -85mV a akční potenciál ve své maximální hodnotě dosahuje 10 mV [68].

2.5.3. Kvalita signálů a jejich předzpracování

Vzhledem ke snímání světelných signálů, jež dosahují velice malých intenzit, je šum jedním z hlavních faktorů ovlivňujících výslednou kvalitu měřených signálů popisovaných parametrem SNR. Zdrojů šumu v systému může být několik. Zpravidla dochází ke kumulaci šumu světelného zdroje a optického snímače (tepelný šum, šum způsobený kvantovými jevy), vliv má i nedokonalost optiky. Dalším příspěvkem je šum laboratorního prostředí, odlesky, světlo z monitorů, a další elektroniky. Svůj vliv může mít i elektromagnetické pole, které ovlivňuje měřené signály na úrovni interference s elektronikou snímače (zpravidla ovlivnění signálů před digitalizací). Je-li měřený preparát umístěn v lázni perfúzního roztoku, lze předpokládat, že vlivem rozptylu, nečistot, nebo zbytkového množství barviva a jejich proudění bude vznikat další přídavná složka šumu. V neposlední řadě mají vliv i vibrace, a proto také většina experimentů probíhá na antivibračním stole.

Eliminaci šumu lze dosáhnout na straně návrhu zařízení, vyžitím vhodných světelných zdrojů a snímačů, případně volbou optiky a umístění měřicího experimentu (antivibrační stůl, Faradayova klec). Jak ukazuje [68], lze například, s využitím LED pole oproti wolframové halogenové žárovce, zlepšit poměr signál/šum o více než 30%. Na straně snímačů pak rozhoduje citlivost a vlastní šum snímače (zpravidla temný a kvantizační šum).

Pro zvýšení SNR lze využít techniky průměrování, ať již časového, prostorového, nebo jejich kombinace. Časové průměrování využívá průměru (kumulace) několika period AN [12, 35]. Tuto techniku lze úspěšně použít za předpokladu, že tvar a charakter AN se během průměrovaného časového úseku příliš nemění (předpokládáme periodicitu signálů). Prostorové průměrování je možné využít u systémů, které využívají plošné, případně panoramatické měření [43, 64]. Prostorové průměrování přináší nevýhodu zkreslení náběžné hrany signálu vlivem šíření depolarizace. K eliminaci lze například využít přístupu pro korekci fázového posunu [82]. Tyto techniky se často kombinují s využitím FIR filtru typu dolní propust, která zajišťuje filtraci vysokofrekvenčního šumu [43, 68].

Při volbě akvizičního systému musíme vycházet ze základního vztahu popisujícího akvizici obrazu uvedeného níže:

$$\text{časové rozlišení} \times \text{prostorové rozlišení} \times \text{energetické rozlišení} = \text{konstanta}.$$

Dalším parametrem kvality měřených signálů je přítomnost pohybových artefaktů. Podrobný popis této problematiky je zahrnutý v kapitole 2.6.

2.6 Pohybový artefakt

Jedním ze zásadních problémů optického snímání, je přítomnost tzv. pohybového artefaktu v měřených signálech. Tento vzniká hlavně příčinou pohybu srdečního svalu během srdeční revoluce a přináší v měřeném signálu zkreslení, které je jen obtížně odstranitelné. Jeho eliminaci lze zajistit:

- mechanicky,
- farmakologicky,
- vhodnou technikou měření a zpracování signálů.

2.6.1. Matematický popis pohybového artefaktu:

Před popisem způsobů eliminace pohybových artefaktů zavedeme matematický popis takového zkreslení. Vycházíme z postupu, který ukazuje [87]. Matematický aparát zde uváděný (1-8) vychází a byl převzat z popisu již zavedeného v [87].

Světlo, které je zachyceno fotodetektořem, je v podstatě úměrné integraci všech vlnových složek ve zvoleném okně (velikost dána filtrem), které na detektor dopadají. Světlo dopadající na detektor ve zvoleném vlnovém okně „i“ označíme $S_i(t)$. Lze konstatovat, že detekované světlo $S_i(t)$ se skládá ze dvou hlavních komponent. První je fluorescence, vzniklá excitací napěťově citlivého barviva (užitečná složka), a druhá pak je složka, která zahrnuje signál z pozadí měřené scény, souhrnně nazývaný auto-fluorescencí optického systému (rušení). Předpokládáme-li, že obě tyto složky jsou lineárně závislé na intenzitě budícího světelného zdroje $I(t)$, pak platí vztah (1).

$$S_i(t) = I(t)(E_i + D_i) \quad (1)$$

kde E_i je příspěvek emitovaného světla barvivem a D_i je intenzita z pozadí měřené scény. Napěťově citlivé barvivo emituje světlo, které je modulováno srdečním akčním potenciálem a je také zároveň ovlivněno pohybem srdeční stěny. Také se setkáváme se snižující se fluorescencí, jež je dána vybledáváním barviva. Každý z těchto faktorů můžeme označit jako časově závislou funkci ve vztahu (2).

$$E_i = F_i(t)M_i(t)C_i(t) \quad (2)$$

Zde $F_i(t)$ je signál, který je dán změnou fluorescence v závislosti na akčním potenciálu. $M_i(t)$ je složka vztažená k pohybu srdeční stěny a $C_i(t)$ popisuje malé změny fluorescence, způsobené vybledáváním barviva.

Poznamenejme, že fluorescence barviva jako odpověď na akční potenciál je dána spektrálním posunem, kde maximální amplituda a frekvenční distribuce zůstávají zachovány

a fotodetektor bude toto měřit jako součet celkové intenzity přes celou šířku okna emisního filtru. To lze modelovat lineárním systémem prvního řádu (3).

$$F_i(t) = A_i[1 + a_i v_m(t)] \quad (3)$$

kde A_i a a_i jsou na vlnové délce závislé konstanty a $V_m(t)$ je membránový potenciál. Mechanická aktivita srdeční stěny způsobuje zvýšení intenzity fluorescence, která však není stálá v celém rozsahu měřených vlnových délek. Reprezentovat ji lze lineárním modelem prvního řádu (4).

$$M_i(t) = 1 + b_1 M(t) \quad (4)$$

kde $M(t)$ reprezentuje mechanickou aktivitu a b_1 je vlnově závislá konstanta. V případě, že není přítomen pohybový artefakt $M_i(t)=1$.

2.6.2. Mechanická eliminace pohybových artefaktů

Jak vyplývá ze vztahu (1-3), je pohybový artefakt složkou signálů, která je úměrná pohybu myokardu (4). Mechanickou fixací lze tedy eliminovat pohyb a následně také pohybový artefakt.

Využití mechanické fixace k potlačení pohybových artefaktů bylo již mnohokrát úspěšně vyzkoušeno, ať již se jedná o prsteneц fyzicky obepínající myokard [66], fixaci pomocí speciálně upravené měřicí komůrky [2], nebo využití přitlačného tlaku sklíčka, jež navíc usnadňuje plošné měření [20, 63]. Vliv na tvar měřených akčních napětí nebo fyziologii srdce nebyl zaznamenán [20, 31]. Ačkoli tlak na srdeční stěnu může vyvolat arytmií [17], skupina Nygren et al. [64] experimentem zahrnujícím měření přitlačného tlaku ukázala, že tlak potřebný pro eliminaci pohybových artefaktů neovlivňuje fyziologii myokardu.

Metoda mechanické fixace má však i svá omezení. Například v aplikacích panoramatického měření, kdy je potřeba měření na celém povrchu myokardu, zde není prostor pro dodatečnou fixaci [25, 68]. Mechanická fixace rovněž znemožňuje zkoumání mechanické aktivity neboli pohyby myokardu.

Tuto metodu lze kombinovat s dalšími přístupy popsány níže.

2.6.3. Farmakologická eliminace pohybových artefaktů

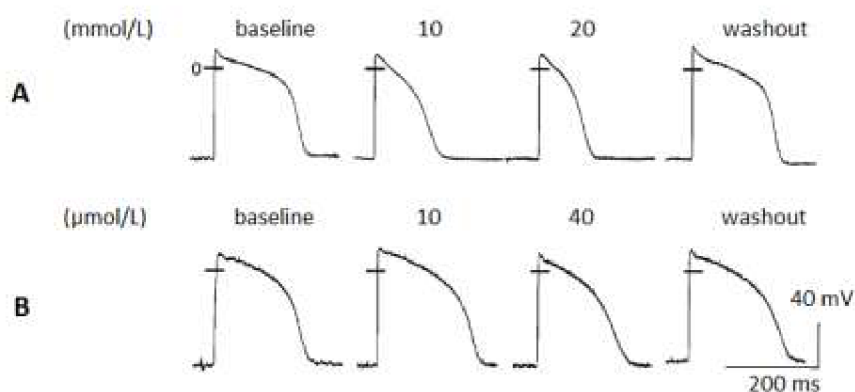
Mechanický pohyb myokardu lze potlačit využitím farmak, která zajišťují disociaci mechanické a elektrické aktivity, dále budou označována pojmem disociátory (z ang. „uncouplers“). Mezi nejčastěji používané disociátory pro aplikace optického mapování patří 2,3-butanedione monoxime (BDM), cytochalasin D a nedávno představený blebbistatin [27, 76].

BDM je jedním z prvních disociátorů používaných v technikách optického mapování myokardu. Jeho funkce je založena na ovlivnění stálosti síly-negenerujícího stavu

myosinu [1]. Tento disociátor vykazuje množství nežádoucích účinků. Bylo prokázáno, že při vyšších koncentracích (BDM > 10 mmol) ovlivňuje vápníkové transienty [1, 9, 32]. Použití BDM má za následek neselektivní redukci vodivosti některých membránových kanálů [53].

Cytochalasin D je toxin, který se váže na aktinová vlákna, potlačuje asociaci a disociaci sub-jednotek. Toto způsobuje „rozbití“ aktinových vláken a potlačení jejich polymerace [30]. Jak ukazují závěry některých studií [51, 92], Cytochalasin D neovlivňuje délku AN ani jeho transmurní šíření, přitom účinnost potlačení pohybových artefaktů je vysoká [72]. Jako první, skupina Caglan et al. [9] prokázala vliv tohoto disociátoru, na citlivost myofilament vůči Ca^{2+} a na maximum jejich tenze.

Vliv BDM a Cytochalasinu D na komorovou fibrilaci u prasečího srdce, byl popsán v [51]. Jak ukazují výsledky, u Cytochalasinu D nebyl prokázán jeho vliv na ventrikulární fibrilaci. Naproti tomu BDM významně ovlivňuje délku AN (Obr. č. 9), což mělo za následek přechod od ventrikulárních fibrilací, k ventrikulárním tachykardiím. Proto se jeho použití nehodí v případech zkoumání ventrikulárních fibrilací.



Obr. č.9: Efekt disociátorů: **A:** BDM, **B:** Cytochalasin D, a jejich koncentrací na délku trvání akčního napětí (převzato z [51])

Blebbistatin je disociátor, který byl představen nedávno a dle prvních studií představuje slibnou alternativu k farmakům výše uvedeným [27]. Blebbistatin je nekompetitivní inhibitor ne-svalového Myosinu II a Myosinu II kosterního svalstva [27, 48]. První studie ukazovaly, že vliv tohoto farmaka na fyziologii srdce je minimální [27, 28]. Později skupina Kanop et al. [45] prokázala vliv tohoto farmaka na vznik abnormálních elektrických aktivací. V současné době je tento disociátor v aplikacích optického mapování pravděpodobně nejvhodnější volbou.

2.6.4. Poměrová metoda pro eliminaci pohybových artefaktů

Poměrová metoda, jež je jednou z technik post-zpracování měřených signálů, umožňuje eliminaci pohybových artefaktů. Možnost měření na dvou vlnových délkách, s využitím poměru měřených signálů, byla představena skupinou Montana at el. [60]. Další z možných aplikací poměrové metody představil Kinsley at el. [47]. Pro využití poměrové metody je zapotřebí využití snímacího systému, který umožňuje měřit fluorescenci v jednom či více bodech a alespoň na dvou různých vlnových délkách.

Pro analýzu poměrové metody použijme model pohybového artefaktu popsany výše. Kombinací vztahu (1-4) můžeme snímaný signál vyjádřit vztahem (5).

$$S_i(t) = I(t)\{A_i C_i(t)[1 + a_i v_m(t)][1 + b_i M(t)] + D_i I(t)\} \quad (5)$$

$$S_i(t) = A_i I(t) C_i(t)[1 + a_i v_m(t)][1 + b_i M(t)] + D_i I(t)$$

Za předpokladu, že odstraníme intenzitu pozadí D_i , lze poměr dvou signálů (označených indexy 1, 2) vyjádřit následovně (6).

$$S_{1/2}^*(t) = \frac{S_1^*(t)}{S_2^*(t)} = \frac{A_1 I(t) C_1(t)[1 + a_1 v_m(t)][1 + b_1 M(t)]}{A_2 I(t) C_2(t)[1 + a_2 v_m(t)][1 + b_2 M(t)]} \quad (6)$$

$$S_i^*(t) = S_i(t) - D_i I(t)$$

Úpravou a zjednodušením lze získat přibližně vztah:

$$S_{\frac{1}{2}}^*(t) \approx \frac{H_1(t)}{H_2(t)} [1 + (a_1 - a_2)v_m(t)][1 + (b_1 - b_2)M(t)] \quad (7)$$

$$H_i(t) = A_i(t)I(t)C_i(t)$$

Jestliže $H_i(t) = kH_j(t)$, $b_1 = b_2$, nebo výraz po mechanickou aktivitu $M(t)$ je velmi malý, pak poměrový signál přechází v následující vztah (8).

$$S_{\frac{1}{2}}^*(t) \approx k[1 + (a_1 - a_2)v_m(t)] \quad (8)$$

Zde lze vidět, že poměrový signál nebude zatížen pohybovým artefaktem. Toto však bude platit pouze tehdy, bude-li splněna jedna z výše uvedených podmínek. V opačném případě poměrové měření nemusí zcela odstranit pokles obálky signálu způsobený vybledáváním [8]. V případě, že odezva barviva na akční napětí není definovaná jen pohybem spektra, nýbrž také změnou jeho amplitudy, je využití této metody omezené [83].

2.6.5. Subtrakční metoda

Tato relativně nová metoda popsána v [87], by měla řešit problém poklesu obálky signálu u metody poměrové. Bude použit stejný model signálu, jak uvádí kapitola 2.6.1. Prvním předpokladem je charakteristika obálky $H_i(t)$ v poměrovém signálu S_i^* , tak, aby mohla být odstraněna. Označme signál s odstraněnou obálkou za S^{**}_i , pro něj lze psát (9).

$$S_i^{**}(t) = H_i(t)^{-1}S_i^*(t) - 1 = [1 + a_i v_m(t)][1 + b_i M(t)] - 1 \quad (9)$$

$$S_i^{**}(t) = a_i v_m(t) + b_i M(t) + a_i v_m(t) b_i M(t)$$

Odečtením jedničky z (9) odstraníme konstantní offset z korigovaného fluorescenčního signálu. Pak je možné vyčíslit váhovaný rozdíl signálů zaznamenaných na dvou různých vlnových délkách tak, aby byl pohybový artefakt bezezbytku odstraněn, tak jak ukazuje následující rovnice (10).

$$S_{sub} = S_1^{**}(t) \frac{b_2}{b_1} - S_2^{**}(t) \quad (10)$$

$$S_{sub} = \frac{a_1 b_2}{b_1} v_m(t) + b_2 M(t) + a_1 b_2^2 v_m(t) M(t) - a_2 v_m(t) - b_2 M(t) - a_2 b_2 v_m(t) M(t)$$

$$S_{sub} = v_m(t) \left[\left(\frac{a_1 b_2}{b_1} - a_2 \right) + (a_1 b_2^2 - a_2 b_2) M(t) \right]$$

Zbytkový pohybový artefakt: $(a_1 b_2^2 - a_2 b_2) M(t)$ v (10) lze zanedbat, protože výsledek násobení konstant a_i a b_i by měl být relativně malý. Výsledkem je, že výsledný váhovaný signál z této metody přechází ve funkci lineárně závislou na $v_m(t)$ [56].

Tato metoda však vyžaduje správnou volbu váhovacího faktoru b_2/b_1 . Ten lze pro dosažení nejlepších výsledků určit experimentálně.

2.6.6. Metody lícování obrazu

Dalším z možných postupů, které umožňují zvýšení odstupu signál-šum a potlačení pohybových artefaktů, je využití technik lícování obrazů. Využití těchto technik pro eliminaci pohybových artefaktů v aplikacích optického mapování není příliš rozšířeno. Mezi publikované metody aplikované na techniky optického mapování lze zařadit [42, 70, 71]. V [42] autoři využili registračních technik k lícování obrazů získaných fluorescenční mikroskopii na tkáních myokardu. Představená metoda umožnila potlačení pohybových artefaktů, avšak pouze při relativně malém pohybu a s tím související nevýraznou složkou pohybových artefaktů (řádově jednotky procent). Metoda aplikovaná při optickém mapování na úrovni orgánů je popsána v [70]. Tato metoda registrace, využívající kritéria vzájemné informace, však nebyla primárně určena pro techniky optického mapování [69]. Sami autoři navrhují diskuzi o využití kritéria vzájemné informace pro tuto modalitu [71]. Presentované výsledky, nepopisují podrobně efektivitu registračního algoritmu. Presentovaná korekce pohybových artefaktů znázorňuje jeho eliminaci pouze u signálů, kde je jeho vliv minimální. Úroveň pohybových artefaktů korigovaných touto metodou je v porovnání s artefakty, s nimiž se setkáváme při našich studiích, marginální [85].

2.7 Optické mapování akčního napětí na úrovni orgánu

2.7.1. Fyziologická část experimentů

Pro většinu zde popsaných měřicích systémů je fyziologická část experimentů obdobná. Liší se hlavně ve způsobu aplikace barviva a jeho koncentrací, perfúzním tlaku, teplotě v různých fázích experimentů a druhu měřeného orgánu. Více podrobnosti lze nalézt v příslušných referencích. Jedna z možných variací je uvedena níže a vychází z [66].

Pro měření jsou využívána izolovaná srdce bílého novozélandského králíka. Srdce jsou napojena na Langendorfovův aparát a promývána okysličeným (95% O₂, 5% CO₂) Krebsovým-Henseleitovým (K-H) roztokem (1.25 mM Ca²⁺). Jsou umístěna v lázni o teplotě 37 °C. Srdce jsou perfundována pod konstantním tlakem (P=85 mmHg). Průběh měření sestává ze čtyř hlavních fází: stabilizace (30 min.), barvení (20-25 min.), vymývání barviva (20-25 min.) a měření. Jako barvivo je použit di-4-ANEPPS, rozpuštěno v K-H roztoku. Délka, popřípadě přítomnost jednotlivých fází je různá, koncentraci barviva a délku fáze barvení pro vybrané experimenty ukazuje tabulka č. 1.

2.7.2. Jednobodové měření AN

Jednobodové snímání je jednou z prvních metod aplikovaných při měření akčních napětí optickou cestou. Měření probíhá na povrchu epikardu pomocí optické sondy, která zajišťuje excitaci barviva, snímání fluorescence, nebo obojí a umožňuje tak snímání akčního napětí v jediném bodě na povrchu myokardu, definovaném polohou sondy. V této sekci budou popsány systémy [12, 66] a systém pro poměrové měření [47], ze kterých vychází návrh a realizace nového měřicího systému (kapitola 3.).

Měření pomocí fotodiody

V současnosti je na Ústavu biomedicínského inženýrství (VUT v Brně, Brno, Česká republika) k dispozici měřicí systém [66], který umožňuje kontinuální měření optických záznamů akčních potenciálů v jednom bodě.

Metodika měření:

Měření probíhá na srdcích bílého novozélandského králíka. Během celého experimentu je zaznamenáván EKG signál ze tří bezdotykových ortogonálních svodů. Signál z elektrod je zesílen a digitalizován 12bitovým A/D převodníkem při vzorkovací frekvenci 2 kHz s využitím měřicího systému LabView a multifunkční měřicí karty PCI-611E (National Instruments, USA). Optický signál je získáván pomocí pružného bifurkovaného optického kabelu (FCR-71R200-2-ME Aventes, Netherlands). Jako zdroj světla je použita 150 W wolframová halogenová žárovka, jako fotodetektor pak fotodioda 3WK16487 (Tesla Blatná,

Česká Republika). Světelný zdroj je vybaven pásmovým filtrem (560 nm +/- 30 nm). U fotodetektoru je použit filtr typu dolní propust (propouští vlnové délky vyšší než 610 nm, dále označované: >610 nm). Signál je zesílen a dále digitalizován obdobnou cestou jako signály ortogonálních svodů EKG. Zařízení je doplněno o regulaci teploty a tlaku, pro Langendorfov aparát.

Vlastnosti:

Takto realizovaný systém umožňuje bezdotykové měření akčních napětí ve zvolené oblasti myokardu. To nám dále umožňuje zkoumání vlivů jednotlivých fází experimentu na tvar a nejčastěji délku trvání akčních potenciálů. Lze pozorovat změny v souběžně zaznamenávaném signálu z ortogonálních svodů EKG a signálu akčních napětí.

Tato metoda však nemůže být využita k měření vlastností šíření, respektive aktivace srdečního myokardu. V oblasti kvality snímaného signálu byly navrženy již dokonalejší systémy, které umožňují získání lepšího odstupu signál/šum a potlačení případných pohybových a jiných artefaktů. Nicméně tato metoda dává slušný základ k vývoji nového zařízení s využitím nejnovějších poznatků.

Poměrová a subtrakční metoda

Kinsley et al. [47] publikovali na konci devadesátých let ratiometrickou metodu, která využívá snímání na dvou vlnových délkách, za účelem eliminace pohybových artefaktů.

Metodika měření:

Jako světelný zdroj je zde využit argonový laser s vlnovou délkou 488 nm, tato vlnová délka je volená v blízkosti excitačního maxima barviva, což neovlivňuje napěťovou závislost absorpce [8]. Emitované světlo je zaznamenáváno z jednoho bodu pomocí dvou oddělených kanálů. Červené s použitím filtru typu dolní propust (>610 nm) a zelené s využitím filtru typu pásmová propust (534-546 nm). Oddělení kanálů bylo provedeno pomocí speciální optiky s využitím polopropustných zrcadel. Nezbytnou součástí měření je i kalibrace jednotlivých kanálů, hlavně co se týče dosažitelného zisku.

Vlastnosti:

U poměrové metody se nevyužívají měřené absolutní hodnoty na výstupech jednotlivých kanálů samostatně, ale provádí se výpočet jejich poměru, jak bylo ukázáno v kapitole 2.6.4. Využití poměrové metody oproti měření pouze na jedné vlnové délce přináší výrazné zlepšení v oblasti potlačení pohybového artefaktu. Další nespornou výhodou je snížení závislosti na vybledávání barviva, ta se za předpokladu nezměnění spektrálních vlastností barviva eliminuje. Schopnost metody potlačit pohybový artefakt byl kvantitativně vyhodnocen při měření poměru amplitud změny v signálu během fáze nulové depolarizace k celkové změně během srdečního cyklu [47].

Subtrakční metoda [87] využívá podobného měřicího schématu, jen provádí s měřenými signály rozdílné matematické operace, jak bylo naznačeno v kapitole 2.6.5, za účelem potlačení poklesu obálky měřeného signálů vlivem vybledávání barviva.

Spektroskopické měření

Měření AN v jednom bodě lze provést s využitím spektrometru jako optického detektoru. Takovýto systém byl realizován na Auckland Bioengineering Institute (The University of Auckland, Auckland, New Zealand) [12].

Metodika měření:

Měření probíhá na srdci laboratorní krysy. Jako excitační zdroj je využíván laser s regulovaným výkonem (1-10 mW) a vlnovou délkou 473 nebo 532 nm. Pro snímání je využit spektrometr (Oceanoptics HR2000+), který umožňuje zaznamenat časově odlišená spektra se vzorkovací frekvencí 1 kHz. Světelný zdroj je vybaven excitačním filtrem dle budící vlnové délky. Světelný zdroj je napojen na vláknovou odbočnici (coupler) v konfiguraci 2x2. Jedna polovina excitačního světla je nasměrována pomocí optického vlákna na měřený vzorek, a druhá pak k fotodiodě, která slouží k monitorování šumu laseru. Část fluorescence je přivedena zpět přes vláknovou odbočnici do spektrometru (přes emisní filtr zachycující světlo excitačního zdroje). Spektrometr je propojen s laptopem, který zajišťuje sběr a analýzu dat v prostředí LabView, přes rozhraní USB.

Vlastnosti:

Tato realizace, v porovnání s výše popsány systémy, umožňuje získání více informací z měřicí scény v podobě časově vzorkovaného záznamu diskrétního spektra. Měřené signály je pak možné podrobit další analýze, aplikovat poměrové metody, nebo zkoumat vlastnosti fluorescenčních barviv.

Kromě fotodiody a spektrometru může být snímací systém založen na využití fotonásobičů, které vynikají svými parametry, zvláště vysokou citlivostí a dosažitelným SNR [47].

2.7.3. Měření AN ve 2D

Využití optických měření pro zkoumání šíření aktivace a repolarizace myokardu si vyžádalo rozšíření jednobodové akvizice na akvizici plošnou. Tato metoda je dnes nejrozšířenější.

Metodika měření:

Měřicí experiment se příliš neodlišuje od předcházejících způsobů. Nejvýznamnější změnou je nahrazení jednoduchého fotodetektoru polem fotodetektorů (PDA) [44, 76] nebo kamerou s technologií CCD [64, 79], EMCCD [85] nebo CMOS [24, 76]. Zvláštním případem je použití řádkové kamery zejména pro jejich rychlost [38], ovšem jen v aplikacích, kde nevyžadujeme plošné pokrytí měřené scény. Samozřejmostí je využití vhodné optiky a světelných zdrojů, které umožní homogenní osvětlení akviziční scény. Zdroje světla jsou vybaveny emisním filtrem tak, aby jejich spektrum nezasahovalo do pásma měřeného fluorescenčního signálu. Signál je zaznamenán detektorem zpravidla přes filtr typu dolní propust s mezní vlnovou délkou 600~610 nm. Zvláštní požadavky se kladou i na uchycení měřeného vzorku. Měřené srdce je umístěno zpravidla v měřicí komůrce s kontrolovanou teplotou, kde jsou k dispozici otvory se světlu propustnými výplněmi, jež umožňují excitaci (nsvícení měřeného povrchu) a akvizici měřených signálů. Podrobnější popis funkce takového systému lze najít v kapitole 2.1. Samotnou částí experimentu je nastavení optiky, zaostření a hloubky ostrosti tak, aby byl záznam co možná nejkvalitnější.

Vlastnosti:

Plošné měření umožňuje pokročilejší zkoumání depolarizace a repolarizace myokardu, které u jedno-bodové akvizice není možné. Největším úskalím plošného měření je dosažení přijatelné rozlišovací schopnosti spolu s dostatečným časovým rozlišením a zároveň i dosažením uspokojivého odstupu signál/šum. Vzorkovací frekvence, tedy i časová rozlišovací schopnost, se u těchto měření pohybuje mezi 500-2000 Hz. Rozlišení pak 16x16 u PDA a až 128x128 u systému založených na CCD, CMOS nebo EMCCD.

2.7.4. Panoramatická měření

Pro zkoumání elektrické aktivity na povrchu celého myokardu byly představeny techniky [25, 68], jež umožňují panoramatické měření.

Metodika měření:

Měření ve 3D je obdobné plošnému měření představenému v předchozí kapitole. K realizaci systému panoramatického, je potřeba tří snímacích kamer nebo PDA rozložených ve 120° rozestupech okolo měřeného preparátu. Před samotným měřením je měřený vzorek naskenován digitálním fotoaparátem tak, aby byla možná 3D rekonstrukce

jeho povrchu. Toto lze realizovat například nafocením povrchu otvorem pro jednu z kamer s tím, že vzorek je rotován kolem své osy a pro každý ze zvolených úhlů natočení je zaznamenána jeho projekce.

Samotné měření je obdobné předešlému 2D systému s tím, že proces zpracování signálů obsahuje algoritmy, které umožňují mapování měřených signálů na rekonstruovaný povrch měřeného vzorku a jeho zobrazení. Jedním z aspektů, který ovlivňuje kvalitu rekonstrukčního procesu, je vhodné nastavení zaostření a hloubky ostroty u jednotlivých snímacích kamer. To má zejména vliv při pohybu měřeného vzorku (přibližuje-li se k jedné z kamer, vzdaluje se od dvou ostatních).

Vlastnosti:

Takto realizovaný systém umožňuje sledování depolarizace a repolarizace na povrchu celého myokardu a tak umožňuje komplexnější zkoumání arytmií. Omezením tohoto systému však je nezbytnost využití farmakologických disociátorů pro zamezení pohybu. Změna objemu měřeného vzorku během perfúze by měla být zahrnuta ve studii, protože ovlivňuje mapování měřených signálů na povrch myokardu. Dalším z problémů je umístění stimulačních elektrod, které při panoramatickém měření, téměř vždy, zasahují do zorného pole měřicích kamer.

2.7.5. Intramulární měření

Hooks et al. [35] představili metodu pro intramurální měření srdeční aktivity. Tento nový přístup umožňuje měření aktivity srdce nikoliv jen na povrchu epikardu, ale také uvnitř jeho stěny.

Metodika měření:

Pro měření je využívána speciálně navržena sonda (optroda), která se skládá ze sedmi nezávislých vláken (obrázek č. 4). Každé z nich slouží pro zavedení excitačního světla a zároveň také pro snímání světla fluorescenčního. Optroda je umístěna v mikropipetě ($d=400\ \mu\text{m}$), vlákna jsou ukončena v jednomilimetrových intervalech se sklonem 60° . Tato optroda je pak využívána pro měření uvnitř srdeční stěny. Budícím zdrojem je argonový laser (488 nm). V optice jsou použita polopropustná zrcadla a filtry navržené tak, aby bylo možné využít měření na dvou vlnových délkách s následnou možností využití ratiometrické nebo substrakční metody pro potlačení pohybových artefaktů.

Vlastnosti:

Tato metoda je poměrně nová. Umožňuje měření nejenom na povrchu epikardu, ale také uvnitř srdeční stěny. Dostáváme se tedy do třetího rozměru, což výše uvedené metody neumožňovaly. Tato metoda má společné vlastnosti s výše zmíněnými, co se týče optického snímání. Objevuje se zde navíc požadavek na šířku vyšetřované stěny tak, aby mohla být

optroda aplikovaná kolmo k epikardu. Je třeba počítat s novými omezeními, způsobenými poškozením a následným odumíráním buněk v okolí optrody.

2.7.6. Další přístupy v optickém mapování

Optické mapování akčních napětí umožnilo lepší porozumění elektrickým vlastnostem myokardu. Tato technika umožnila monitorovat i další parametry buněk. Jedním z dalších, nejčastěji měřených, parametrů je koncentrace intracelulárního vápníku. Měřicí systém pro taková měření je obdobný tomu, který je používán pro měření akčních napětí. Je však využito jiného barviva (Rhod-2), reagujícího změnou fluorescence právě na změnu koncentrace intracelulárního vápníku. Vzhledem k odlišným spektrálním vlastnostem používaných barviv je nutná i záměna filtrů a excitačních zdrojů. Emisní spektrum je u těchto barviv posunuté oproti barvivům pro měření AN a to umožňuje souběžné měření akčních napětí společně s vápníkovými transiency [15, 37, 76]. Poznamenejme, že takovýto systém vyžaduje použití více kamer, kdy každá kamera s danými filtry snímá signál úměrný měřenému parametru.

Měření signálů společně s využitím stimulačních elektrod je komplikované, protože ty většinou stíní v optické cestě mezi zdrojem fluorescence a snímačem. Skupina Liao et al. [52], díky použití světlo-propustných elektrod (materiál: indium cínový oxid), použila optického mapování k měření AN pod povrchem a na okraji stimulačních elektrod.

Další z možných měření je provádění optického mapování na povrchu endokardu s pomocí zavedené endoskopické sondy. To umožňuje monitorovat elektrickou aktivitu nejen na povrchu, ale i uvnitř myokardu. Zorné pole takového systému je však omezeno použitou sondou [43].

3. KAPITOLA

DESIGN REALIZOVANÉHO MĚŘICÍHO SYSTÉMU

Obsahem kapitoly:

Součástí disertační práce byla i realizace zcela nového měřicího systému. Tento systém byl realizován na půdě The University of Auckland v rámci téměř dvouleté studijní stáže. Realizovaný systém přináší nové možnosti měření, jako je současné měření elektrických i optických signálů na povrchu myokardu, měření na endokardu, možnost sekvenčního měření s dvojicí filtrů. Součástí návrhu systému je i perfúzní část, která spolu s regulací teploty zajišťuje fyziologické podmínky měřených vzorků.

3.1 Definice požadavků

V relaci s cíli disertační práce byl navržen a realizován zcela nový měřicí systém, který přináší nové možnosti a techniky pro měření akčních napětí a jejich pozdější zpracování. Tento systém byl realizován na pracovišti Auckland Bioengineering institute, The University of Auckland, New Zealand. Návrh tohoto systému vycházel z požadavků definovaných v tezích této disertační práce a byl navíc rozšířen o některé vlastnosti na základě spolupráce realizačního týmu. Zejména pak o možnost elektrického mapování a měření na povrchu endokardu.

Klíčové požadavky byly stanoveny následovně:

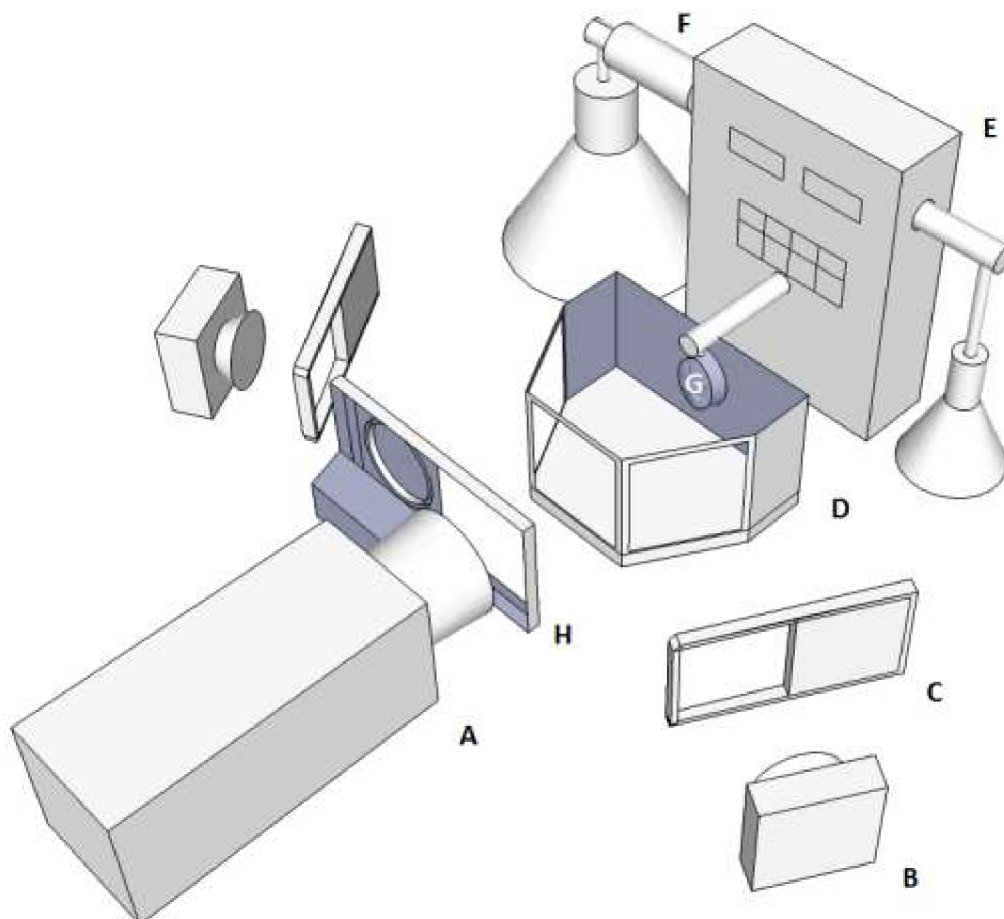
- realizace systému pro 2D optické mapování akčních napětí na malých orgánech (myš, krysa, králík),
- využití vysokého rozlišení společně s dostatečným SNR,
- zajištění vitálních funkcí měřených vzorků, kontrola teploty, perfúzního tlaku a fáze barvení,
- možnost měření bez použití farmakologických disociátorů,
- možnost aplikace poměrové techniky na plošné měření,
- měření optických signálů souběžně s elektrickými pomocí pole elektrod,
- umožnění stimulace a měření povrchových potenciálů (elektrické mapování),
- možnost měření na endokardu.

V této kapitole je popsán návrh jednotlivých částí realizovaného systému, nastavení vhodných parametrů a popis základního protokolu měření. V 5. kapitole je diskutována funkce a splnění požadavků kladených na realizovaný systém.

3.2 Koncepce měřicího systému

Koncepce měřicího systému vychází z klasického návrhu systému pro optická měření, tak jak je uveden na blokovém schématu (Obr.č. 1). Systém byl realizován s využitím rychlé EMCCD kamery, která byla již k dispozici. Analýza excitačních i emisních spekter umožnila návrh filtrů. Jako zdroje osvětlení byly použity vysoce svítivé LED. Každá z LED je vybavená mechanickou závěrkou. Systém je orientován do horizontální polohy na antivibračním stole, přičemž srdce je uchyceno za perfúzní kanylu. K perfúzi a aplikaci fluorescenčního barviva, popřípadě dalších farmak, je využívána dvouokružová mikro-pumpa. Systém umožňuje snímání pomocí pole elektrod, které je umístěno v měřicí komůrce, která zajišťuje kontrolu teploty měřeného vzorku společně s tepelným výměníkem

zařazeným v perfúzním oběhu. Kamera je přes datové rozhraní připojena k měřicímu PC. Měření elektrických signálů a stimulaci zajišťuje samostatný stimulační a akviziční systém UnEmap [88]. Systém je doplněn o zařízení pro rychlou výměnu měřicích filtrů. Schéma realizovaného systému ukazuje obrázek č. 10.



Obr. č.10: Schematický diagram měřicího systému, **A:** EMCCD kamera, **B:** LED, **C:** mechanická uzávěrka, **D:** měřicí komůrka, **E:** perfúzní pumpa, **F:** tepelný výměník, **G:** měřený vzorek, **H:** systém výměny filtrů

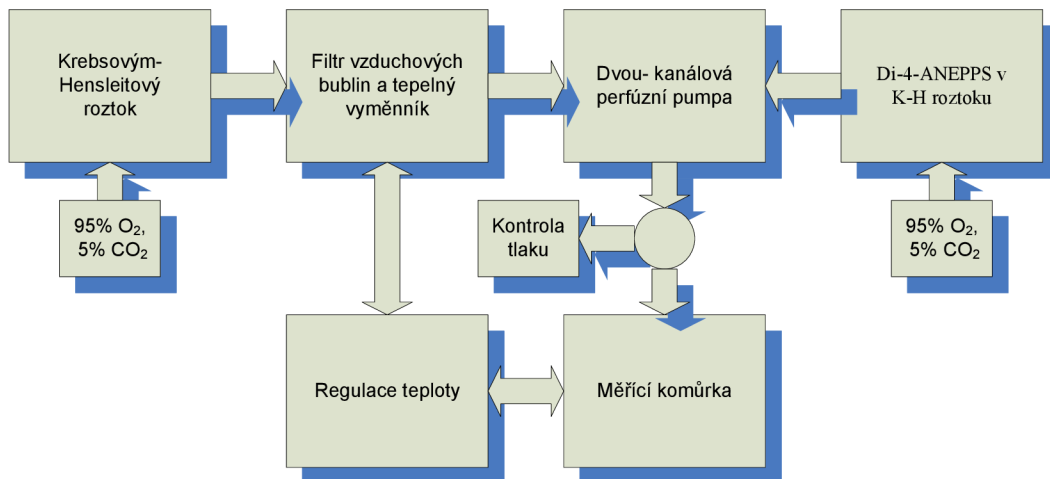
3.3 Zajištění vitálních funkcí vzorku

Pro zajištění vitálních funkcí měřených orgánů, aplikaci napětově citlivého barviva a dalších farmak byl navržen perfúzní systém. Tento systém se skládá z těchto hlavních částí:

- perfúzní pumpa,
- měřicí komůrka,
- teplotní výměníky, regulace teploty,
- okysličovací zařízení, filtr vzduchových bublin, laboratorní sklo.

Blokový diagram navrženého perfúzního systému je znázorněn na obrázku č. 11. Perfúze je řízena s využitím dvoukanalové mikro-pumpy, kdy je jeden z kanálů využíván pro

režim normální perfúze a druhý k aplikaci fluorescenčního barviva. V okruhu pro normální perfúzi je zařazen tepelný výměník k zajištění předeřtání perfuzátu a filtr pro zachycení vzduchových bublin. Nádoby s perfúzním roztokem a roztokem s fluorescenčním barvivem jsou vybaveny přívodem pro plynou směs (95% O₂, 5% CO₂), zajišťující jejich okysličení. Na výstupu pumpy jsou oba kanály propojeny a je zde také ventil, umožňující kontrolu tlaku v perfúzním oběhu. Měřicí komůrka obsahuje tepelný výměník, který společně s instalovanými senzory a termostatem zajišťuje nastavení požadované teploty měřeného vzorku.



Obr. č.11: Blokový diagram perfúzního systému

3.3.1. Perfúzní pumpa

Perfúzní pumpa byla vybrána s ohledem na požadavky systému, a to zejména využití dvou nezávislých kanálů, přesnou regulaci průtoku, detektor vzduchových bublin, provoz na baterie a možnosti externího řízení. Jako perfúzní pumpa byla vybrána IMED GEMINI PC-2. Tato pumpa splňuje výše zmíněné požadavky. Základní parametry jsou uvedeny v tabulce č. 2. Požadavek na dvoukanálové zařízení vychází z blokového schématu na obrázku č. 11. Důležitým parametrem je možnost provozu na baterie, z důvodu maximálně možného omezení elektromagnetického rušení měřicího systému. Provoz na baterie umožňuje rovněž eliminovat riziko přerušování perfúze v důsledku výpadku elektrické sítě. Ultrazvukový detektor na každém z kanálů zajišťuje kontrolu (signalizováno alarmem) nad případnými vzduchovými bublinami, které by mohly proniknout do koronárního oběhu měřeného vzorku. Komunikační rozhraní pro externí řízení není v tuto chvíli využíváno, ale v případě rozšíření měřicího systému umožňuje automatizaci procesu perfúze a barvení, bez nutnosti manuální interakce s ovládacími prvky pumpy. Perfúzní pumpa je schopna samostatného provozu, bez nutnosti propojení s řídicím PC.

| Specifikace | |
|-------------------------------------|--|
| Typ | Lineární peristaltická, dva kanály |
| Rozsah regulace (macro mode) | 1-999 ml/h (1 ml/h inkrement) |
| Rozsah regulace (micro mode) | 0,1-99 ml/h (0,1 ml/h inkrement) |
| Provoz na baterie | 4-5 h |
| Maximální tlak | 10 psi |
| Přesnost | 5% |
| Externí komunikační rozhraní | RS232C |
| Alarmy | Detekce vzduchových bublin Detekce ucpání oběhu |

Tabulka č.2: Vybrané parametry IMED GEMINI PC-2

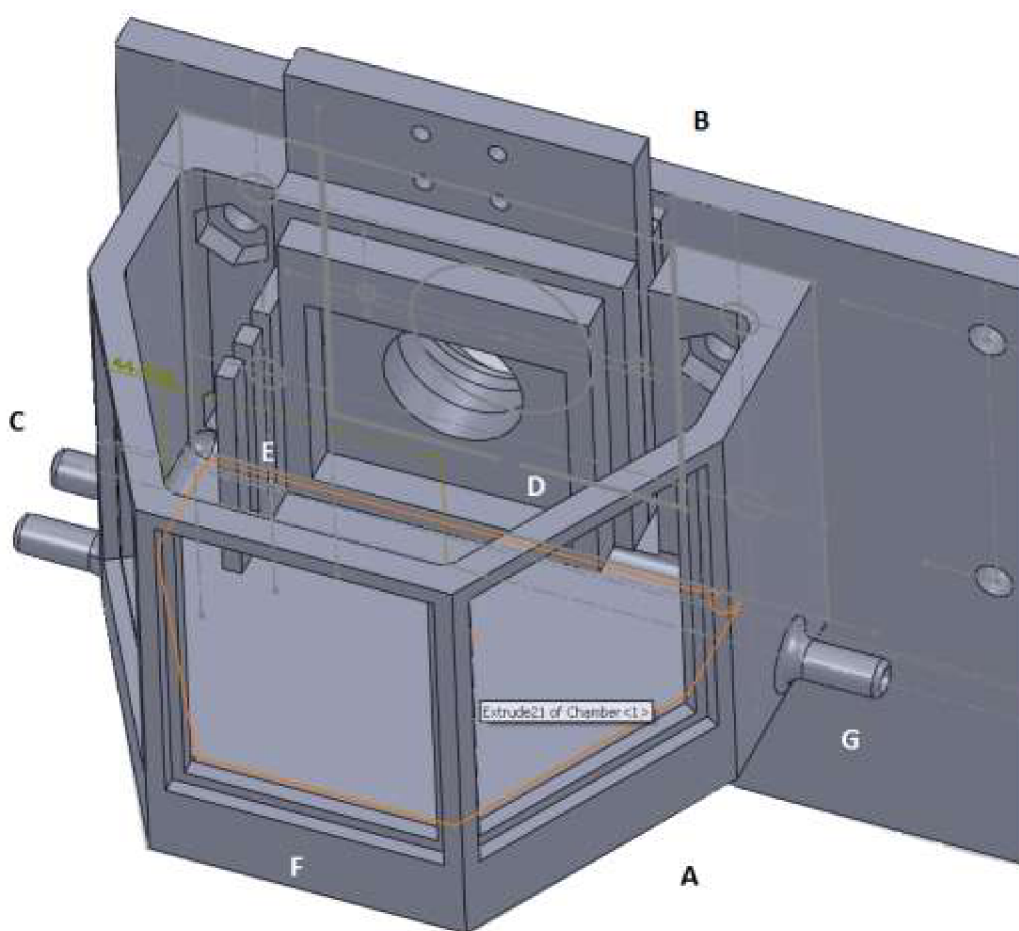
3.3.2. Měřicí komůrka

Měřicí komůrka je jedním ze základních prvků měřicího systému. Zajišťuje uchycení vzorku společně s možností manipulace, kontrolu teploty a připojitelnost měřicích elektrod. Návrh designu komůrky vychází z těchto požadavků, musí ovšem také umožňovat vhodné geometrické rozložení pro optiku, zdroje světla a snímací zařízení. Vzhledem k požadavkům na měřicí experiment, který se kromě měření na epikardu zabývá i měřením na endokardu, bylo potřeba navrhnout mechanismus umožňující oddělení části měřicí komůrky a pohodlný přístup k měřenému orgánu, během experimentů. Návrh měřicí komůrky byl realizován s využitím 3D CAD prostředí SolidWorks. Geometrie optiky (půdorys) vychází z tvaru poloviny pravidelného šestiúhelníku, kdy do čelních a boční strany jsou instalována skla (mikroskopická sklíčka s odpovídajícími optickými vlastnostmi), která slouží pro osvětlení vzorku (bočnice) a ke snímání optických signálů (čelní sklo). Geometrie osvětlovacích LED a snímací kamery je patrná ze schematického diagramu systému zobrazeného na obrázku č. 10.

Samotná realizace měřicí komůrky využívala 3D modelu, který byl převeden do formátu STL (StereoLithography) a pomocí 3D tiskárny Dimension Elite 3D, realizován z materiálu ABS plus. Vzhledem k tloušťce stěn modelu a požadavkům na jeho vodotěsnost, byl tento model penetrován kynoakrylátem. Model byl doplněn částmi, které rovněž byly navrženy společně s měřicí komůrkou v prostředí SolidWorks a byly vyrobeny z akrylových desek na laserové řezačce Trotec Speedy 300 z akrylových desek. Uchycení skleněných výplní bylo realizováno pomocí silikonového tmele. Model navržené komůrky ukazuje obrázek č. 12. Přední část komůrky (12A) realizované z materiálu ABB plus je kompletně oddělena od zadní části s možností rychlého spojení či rozpojení, a tak umožňuje přístup k měřenému vzorku a jeho manipulaci během samotného měření. Ve spodní části (12F) je integrovaný teplotní výměník s porty pro přívod termoregulační kapaliny (12C). Základní část (12B) je vybavena držákem kanyly (není zobrazen) pro manipulaci a změnu polohy

Design realizovaného měřicího systému

měřeného vzorku. Ve střední části je umístěn otvor (12D) pro pole 20x20 povrchových elektrod umístěných v silikonovém válci odpovídající velikosti. Rám kolem otvoru (12D) je vyplněn silikonovou výplní, která umožňuje fixaci vzorku. V případě potřeby je možné využití držáku fixačního sklíčka (12E) pro eliminaci pohybu měřeného myokardu. Mezi fixní (akrylátovou) částí a oddělitelnou komůrkou (ABB plus) je instalováno silikonové těsnění, stejně jako v otvoru pro pole elektrod. Ke kontrole výšky hladiny v měřicí komůrce je využíván výstupní port G, který také slouží k průběžnému upouštění perfúzního roztoku. Celý systém měřicí komůrky je připevněn k desce stolu pomocí 3D manipulátoru, který umožňuje měnit jeho polohu vzhledem k snímací kameře, a tak precizně kontrolovat vzájemnou polohu vzorku a zorného pole kamery.



Obr. č.12: Měřicí komůrka, **A:** přední část realizovaná z materiálu ABB plus, **B:** zadní část a úchyty měřeného vzorku, **C:** porty tepelného výměníku, **D:** otvor pro pole elektrod, **E:** držáky fixačního sklíčka, **F:** tepelný výměník, **G:** port pro kontrolu hladiny

3.3.3. Regulace teploty

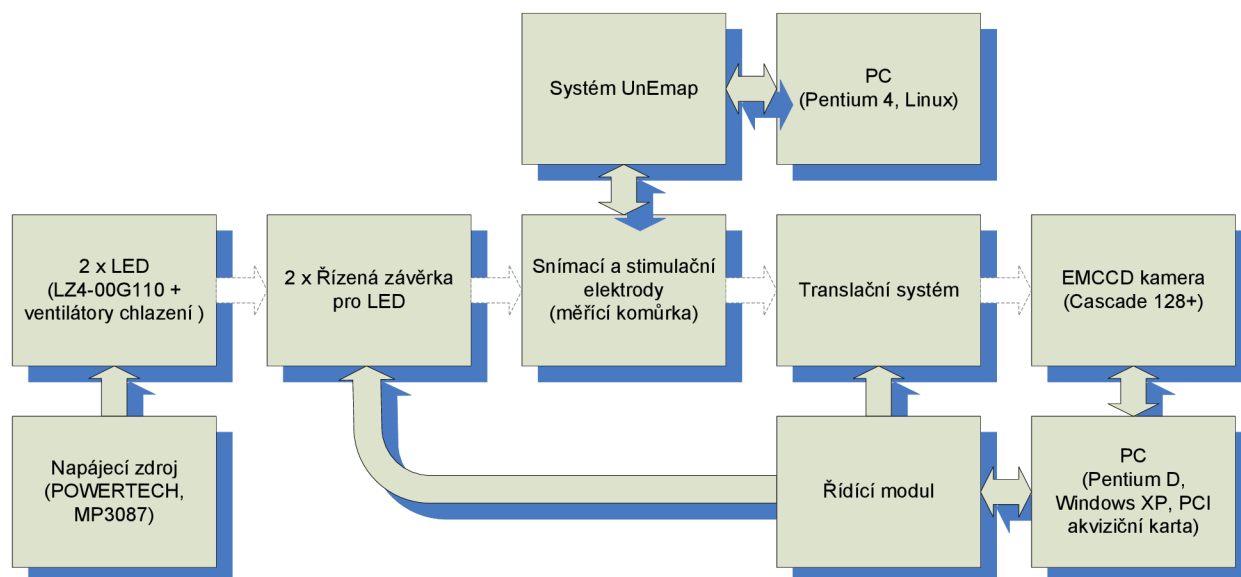
Řízení teploty je jedním ze základních předpokladů pro zajištění fyziologických nebo požadovaných podmínek měřených orgánů. V systému je využívána dvou-okruhová regulace, zajišťující kontrolu teploty v měřicí komůrce i teplotu perfúzního roztoku. Její zapojení je patrné z blokového schématu na obrázku č. 11. V systému jsou zapojená tepelná čidla (termočlánky), která monitorují teplotu vzorku. Systém je provozován v místnosti s pokojovou teplotou, která je rovněž monitorována. Jako regulační médium je využívána voda, ohřívána v bloku termostatu na požadovanou teplotu. Pomocí nastavení průtoku tohoto média v tepelných výměnících (měřicí komůrka a perfúzní oběh) je regulována teplota na požadované úrovni. Vzhledem k první fázi realizace měřeného systému je systém kontrolován manuálně, nastavením ventilů průtoku tepelných výměníků a požadované teploty regulačního média.

3.3.4. Další prvky systému

Kromě výše zmíněných prvků jsou v perfúzním systému využívány další prvky. Filtr vzduchových bublin zařazený těsně před perfúzní pumpou zajišťuje zachycení případných vzduchových bublin před vnikem do perfúzního oběhu. V těsné blízkosti perfúzní kanyly je zhotovena odbočka, která umožňuje měření perfúzního tlaku pomocí přídavného manometru. Vzduchové zařízení, vybaveno zásobníkem plynů a regulátory tlaku, slouží k zajištění okysličení perfuzátu. Dalšími prvky je laboratorní sklo (trubice, nádoby) zajišťující propojení jednotlivých funkčních celků. Za účelem eliminace poklesu nasycení perfuzátu kyslíkem je převážná část zařízení realizována skleněnými komponenty.

3.4 Prvky pro snímání a excitaci

Zajištění vitálních funkcí měřeného orgánu společně s aplikací fluorescenčního barviva, případně jiných farmak, poskytuje základní podmínky pro samotné měření. Nastavení snímacího a excitačního systému společně s kontrolou jeho parametrů představuje druhou část navrhovaného řešení. Je potřeba zvolit vhodné světelné zdroje, kameru a filtry tak, aby bylo umožněno měřit co nejkvalitnější signály. Blokové schéma elektrického propojení jednotlivých komponent akvizičního systému ukazuje obrázek č. 13. Realizované zařízení (vzhledem ke stádiu vývoje) nebylo vybaveno řídicím modulem a jednotlivé prvky byly ovládány manuálně. V návrhu se ovšem počítá s využitím řídicího systému, realizovaného pomocí multifunkční měřicí karty (National Instruments, USA) a kontrolního SW LabView.



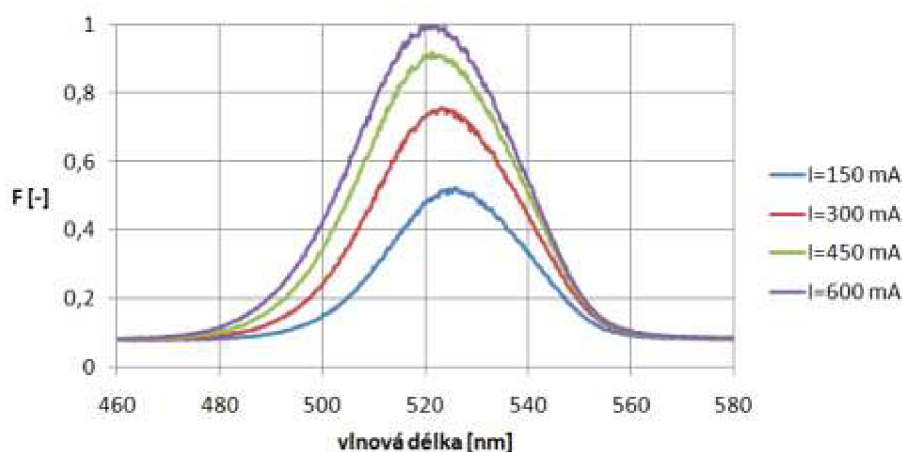
Obr. č.13: Blokové schéma elektrického propojení akvizičního systému, bílé šipky naznačují optickou cestu

3.4.1. Excitační zdroj – LED

Na základě diskuze parametru světelných zdrojů (kapitola 2.2.2) byly jako excitační zdroj zvoleny LED. V průběhu návrhu systému byla testována možnost využití několika druhů LED, Luxeon V Star (LXHL-LM5C-zelená, LXHL-LB5C-modrá) a LED LedEngin, Inc (LZ4-00G110-zelená, LZ4-00B210-modrá). V experimentálním zapojení bylo testováno i využití diodově buzeného pevnolátkového laseru (DPSS) na 473 nm a 532 nm, doplněného o rozšiřovač svazku.

Na základě měřicích experimentů byla zvolena varianta zelených LED od společnosti LedEngin, Inc (LZ4-00G110) [50]. Jedná se o 10 W LED, které poskytují až 4x větší světelný tok (pro $I_F=700$ mA, 445-556 lm) než dříve používané Luxeon V Star (LXHL-LM5C). Byla

zvolena zelená barva s dominantní vlnovou délkou (520 nm), která není striktně v blízkosti excitačního maxima di-4-ANEPPS (480 nm), ale oproti modré LED (465 nm) poskytovala větší změnu fluorescence v závislosti na akčním napětí ($\Delta F/F$). Měření a vyhodnocení závislosti, charakteru spektra a jeho změny v reakci na změnu akčního napětí, bylo publikováno [83]. Výsledky a závěry z tohoto měření budou dále popsány v kapitole 4.3. Volba LZ4-00G110 souvisí také s možností regulace vyzařovaného světelného toku, regulací proudu I_F . Změnou propustného proudu je možné korigovat výkon, dochází tím ovšem i k posunu vyzařovaného spektra. Tato závislost byla měřena v rozsahu používaného budicího proudu a ukazuje ji obrázek č. 14.



Obr. č. 14: Změna emitovaného spektra LED (LZ4-00G110) v závislosti na I_F

Dalším důležitým parametrem použitých LED je stabilita světelného toku. Ta souvisí hlavně se změnou teploty. Při zvyšující se teplotě dochází k poklesu vyzařovaného světelného toku, tak jak dokumentují charakteristiky výrobce [50]. Vzhledem k tomu, že optické měření akčních napětí poskytuje pouze relativní informaci o jeho změně, není absolutní změna vyzařovaného světelného toku excitačního zdroje, a s tím související změna fluorescence, klíčová. Důležité je naopak zajištění proti její změně během samotného měření. Toho bylo docíleno teplotní stabilizací použitých LED. Každá z LED byla vybavena instalovaným pasivním i aktivním (ventilátor) chladičem a byla zapnuta alespoň 30 minut před samotným měřením. Světlo LED bylo blokováno pomocí mechanických závěrek tak, aby byl osvětlován měřený vzorek pouze v době samotného měření. LED byly vybaveny reflektorem zajišťujícím rovnoměrné osvětlení excitované plochy.

LED byly buzeny stejnosměrným zdrojem (POWERTECH, MP3087) v proudovém režimu zpravidla jmenovitým proudem 650 mA. Tento zdroj je dvoukanálový a umožňuje současné nebo také jednotlivé nastavení proudu pro každou z LED v závislosti na požadavcích konkrétního měření. LED byly vybaveny emisními filtry typu dolní propust s mezním kmitočtem 505 nm.

3.4.2. EMCCD kamera

Klíčovým prvkem celého snímacího systému je EMCCD kamera Cascade 128+, Photometrics. Kamera je vybavena vysoce kvalitním, zezadu osvětleným CCD čipem s integrovaným nábojovým násobičem zisku, který poskytuje vysokou citlivost pro aplikace s nízkým osvětlením. Termoelektricky chlazené snímací pole s rozlišením 128x128 a velikostí pixelu $24 \mu\text{m}^2$ umožňuje frame-transfer přenos (přenos snímku s vyrovnávací pamětí). Rychlost snímání je až 500 snímků za vteřinu, v plném rozlišení při 16bitové hloubce. Parametry kamery a podrobný popis její funkce lze nalézt v [10, 89].

Kamera je dodávána s PCI kartou a propojovacím kabelem, jež umožňují propojení s řídicím a akvizičním PC (Pentium D, 2 GB RAM, Windows XP SP2). V instalačním balíčku je dodáváný PVCAM driver s akvizičním softwarem QED Capture. Díky standardizovanému formátu PVCAM, lze použít i jiný akviziční SW. Pro ovládání kamery a zaznamenávání měřených signálů byl využit V++ Software (Digital Optics, v5, 2010). Kamera je vybavena nastavitelným C-Mount adaptérem.

Kamera byla vybavena zvětšovací čočkou (B+W, NL-2) a objektivem (Navitar NAV DO-5095). Objektiv umožňuje zaostření a kontrolu clony v rozsahu (F1.4 – F8). Díky kontrolnímu softwaru je možná vizualizace v reálném čase, a tak je možné provést kontrolu zaostření, popřípadě jeho změnu. Nastavením clonového čísla, lze ovlivnit jak intenzitu snímaného signálu, tak hloubku ostrosti (pro měření bylo zpravidla využíváno nastavení clonového čísla na F2). Změnou vzdálenosti kamera-měřený vzorek lze doladit velikost snímané plochy.

K základnímu nastavení kamery byly využívány tyto parametry:

- přenosový mód (normální, transfer snímků),
- počet cyklů pro čištění CCD (vybití CCD),
- expoziční doba a nastavení násobiče zisku,
- délka záznamu (počet snímků).

Přenosový mód určuje způsob přenosu dat z CCD (z čipu do paměti). V normálním režimu (NT) kamera pracuje tak, že po vyčištění senzoru (odebrání volných elektronů s nastavitelným počtem cyklů), je po stanovenou dobu provedena expozice a poté je obraz přenesen do vyrovnávací paměti, z níž se pomocí posuvného registru převádí do paměti datové. Vzhledem k tomu, že přenos mezi CCD a vyrovnávací pamětí je velmi rychlý, není nutné použití mechanické závěrky. V režimu přenosu snímků (FT) probíhá expozice společně s transferem z posuvného registru do datové paměti. Tato metodika umožňuje významné zvýšení rychlosti. Zde jsou dále možné dvě varianty - doba expozice je kratší než přenos mezi vyrovnávací a datovou pamětí, nebo naopak. V prvním případě bude délka

expozice rovna době transferu (kromě prvního snímku, ten bude exponován dle nastavení), ve druhém případě pak bude doba expozice dána přesně dle jejího nastavení. Pro optické mapování byly využívány oba tyto režimy. Nastavený expoziční čas a skutečnou (měřenou) snímkovací frekvenci v odpovídajících módech ukazuje tabulka č. 3. Měření bylo prováděno nejčastěji v plném rozlišení s nastavenou expoziční dobou na 3 ms (skutečná 2.5 ms), v režimu „přenos snímků“ se snímkovou frekvencí 400 snímků/s.

| Rozlišení | Režim | Expoziční čas-nastavený (ms) | | | Expoziční čas-nastavený (ms) | | |
|------------|-------------------|------------------------------|-----|-----|------------------------------|-----|-----|
| | FT -přenos snímků | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | N-Normální | Expoziční čas-měřený (ms) | | | Snímkovací frekvence (sn./s) | | |
| 128x128 | FT | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 400 | 400 | 400 |
| 128x128 | N | 1 | 2 | 3 | 333 | 250 | 200 |
| Binning 2x | FT | 1,6 | 1,6 | 2,6 | 625 | 625 | 385 |
| Binning 2x | N | 1 | 3 | 3 | 455 | 313 | 238 |
| 64x64 | FT | 1,7 | 1,7 | 2,7 | 588 | 588 | 370 |
| 64x64 | N | 1 | 2 | 3 | 455 | 313 | 233 |

Tabulka č.3: Rychlost snímání v závislosti na nastavení módu a expoziční doby

Kromě expoziční doby bylo možné zvětšit zesílení (citlivost) pomocí násobiče zisku. Ten však vzhledem k dostatečné amplitudě měřených signálů, možnému vzniku nelinearit (má exponenciální charakteristiku) a přídavnému šumu nebyl využit. Dalším z nastavovaných parametrů je počet snímku, respektive délka zaznamenávané sekvence.

Kamera je kromě datového a napájecího konektoru vybavena vstupně-výstupním portem (DB26), který umožňuje její externí kontrolu. V navrhnutém systému byl používán signál „read out“, který definoval konec zaznamenaného snímku a umožňuje synchronizaci.

3.4.3. Snímací a stimulační elektrody

Součástí navrženého systému pro optické mapování je i systém elektrod, umožňující elektrické mapování i stimulaci. Navržený systém využívá zařízení pro elektrické mapování UnEmap [88], základní parametry uvádí tabulka č. 4. Tento systém byl doplněn o pole elektrod 20x20, v mřížovém uspořádání rovnoměrně rozloženém na ploše 15x15 mm. Elektrody jsou fixovány v silikonovém válci (realizace od Sally Rutherford, Auckland Bioengineering Institute). Toto pole je zasazeno do měřicí komůrky, obrázek č. 12(D).

Systém UnEmap je kromě zmíněných 400 snímacích/stimulačních kanálů rozšířen o vstup pro záznam signálu odpovídajícího snímací frekvenci kamery. Toto umožňuje časovou synchronizaci měřených signálů elektrického i optického mapování.

K měření byl využíván unipolární režim, kdy referenční elektroda byla umístěna ve spodní, přední části měřicí komůrky. Zaznamenání signálů, stejně jako konfiguraci měřicího

systému lze provádět v aplikaci UnEmap-Acquisition. Analýzu měřených signálů a jejich vizualizaci pak v aplikaci UnEmap-Analysis. Systém UnEmap, společně s dodávanými aplikacemi je instalován na PC (Pentium 4, 512 MB RAM) s instalovaným operačním systémem Linux.

| Specifikace - UnEmap | |
|---------------------------|--|
| Počet kanálů | 406 |
| Funkce kanálů | vstup nebo výstup |
| Vzorkovací kmitočet | 1 kHz až 5 kHz |
| Systém snímání | Unipolární (společná reference), bipolární |
| Nastavitelný zisk kanálu | 10 až 1000 |
| Filtry (kanál) | DP (50Hz až 5kHz), HP (0.05 Hz) |
| Vstupní impedance (kanál) | > 1TW |
| Vstupní proud (kanál) | < 5 nA |
| CMRR(kanál) | Typicky 90 dB |

Tabulka č.4: Vybrané parametry systému UnEmap

3.4.4. Translační systém

Realizovaný translační systém umožňuje rychlou výměnu emisních filtrů. Požadavek na realizaci takovéhoho systému vychází z nově navržené poměrové metody [83]. Využití poměrové metody pro plošné snímání vyžaduje dva samostatné detektory. Chceme-li tuto podmínku obejít, je možné, za předpokladu, že během daného měřicího úseku nedojde ke změně měřených signálů, rozdělit tento úsek na několik částí, u kterých předpokládáme relativně stejný charakter signálů. V každé z částí lze provést měření s jedním z filtrů a pozdějším zpracováním signálů dosáhnout efektu poměrové metody. Navržený translační systém umožňuje velmi rychlou mechanickou výměnu filtrů ($t_v < 300$ ms). Výměna je realizována pomocí servomotoru a ovládána přivedeným napětím (+/-)12 V, polarita řídí směr pohybu. Design realizovaného systému zachycuje obrázek č. 15.



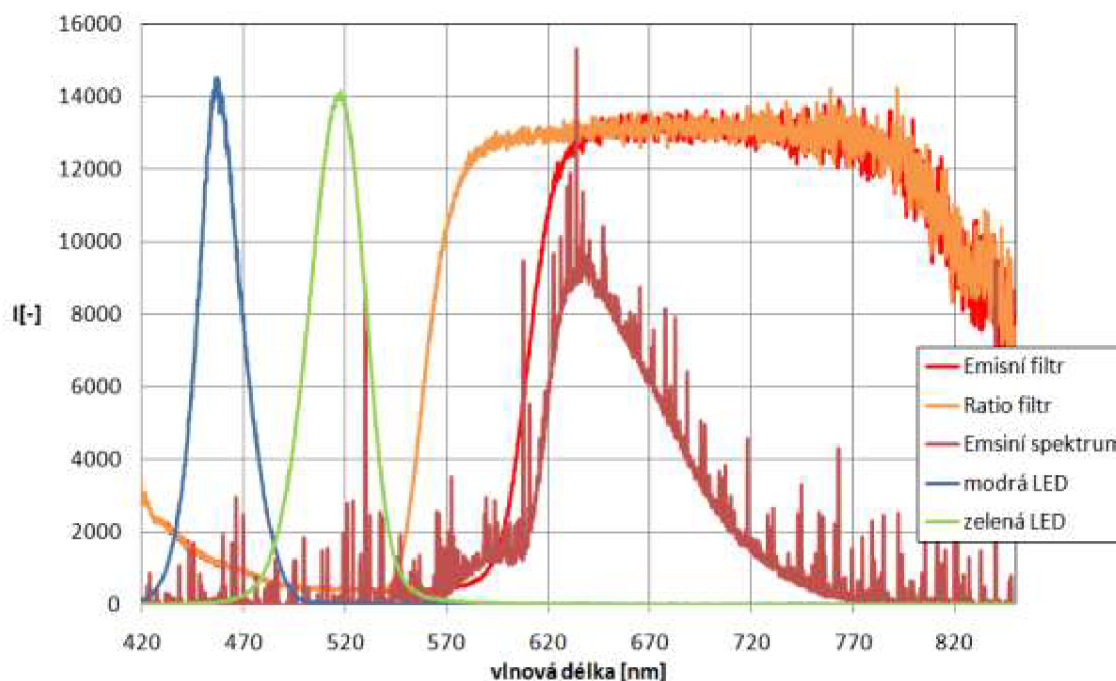
Obr. č.15: Realizovaný translační systém umožňující vložení emisního filtru do optické cesty snímání

3.4.5. Návrh filtrů

Návrh filtrů vychází z analýzy měřeného spektra. S využitím vlastností popsaných v kapitole 2.1.1 lze navrhnout emisní filtr, který bude změny spektra (posun, amplituda) vhodně transformovat na změnu intenzity (kamerovým systémem jsme schopni měřit pouze prostorové rozložení intenzity). Pro definování charakteristik filtrů bylo rovněž realizováno vlastní měření odezvy fluorescenčního barviva na AN, pomocí spektroskopického systému [12], jehož výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.3. Na základě těchto poznatků byly navrženy parametry emisního filtru. Vzhledem k charakteru změny emisního spektra, v závislosti na depolarizaci (u použitého di-4-ANEPPS), byl zvolen filtr typu dolní propust (>600 nm, Marumi MC-R2). Tento filtr zachycuje část emisního spektra, kde se depolarizace projevuje relativním poklesem jeho amplitudy. Tímto interpretuje depolarizaci AN jako pokles měřené intenzity na definovaném spektrálním rozsahu. Lze tedy poznamenat, že filtr vynechává (filtruje) oblast emisního spektra, kde je změna jeho amplitudy, v závislosti na depolarizaci, pozitivní.

Parametry referenčního filtru, který je součástí měřicího systému, vycházejí z nově navržené poměrové metody [83]. Princip této metody je dále popsána v kapitole 4.4.

Spektrální charakteristiky testovaných LED LedEngin, Inc. (LZ4-00G110-zelená, LZ4-00B210-modrá), charakteristiky emisního i ratiometrického filtru a měřené emisní spektrum di-4-ANEPPS (pro excitaci s LZ4-00G110) ukazuje obrázek č. 16.



Obr. č.16: Spektrální charakteristiky LED, emisního filtru, ratiometrického filtru a emisního spektra di-4-ANEPPS

4. KAPITOLA

ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA MĚŘENÝCH SIGNÁLŮ

Obsahem kapitoly:

Zpracování a analýza měřených signálů jsou nedílnou částí měřicího experimentu. V této kapitole jsou popsány parametry měřených signálů a algoritmy pro jejich předzpracování a zpracování.

Významnou částí této kapitoly je popis nově navržené metody pro eliminaci pohybových artefaktů, založené na aplikaci technik elastické registrace obrazů. Součástí této kapitoly je popis a rozbor nově navržené metody pro ratiometrická měření, která může být alternativou k technice stávající.

4.1 Problematika zpracování signálů

Optické mapování poskytuje signály, které reprezentují změnu membránového napětí. Tyto signály mají své specifické parametry dané použitím příslušného akvizičního systému. Vzhledem k tomu, že pracujeme s fluorescenčními signály malých intenzit, je důležité zajištění dostatečného SNR tak, aby bylo možno se signály dále pracovat. K tomu slouží zpravidla techniky předzpracování signálů. Kromě přídavného šumu se v signálech vyskytují pohybové i jiné artefakty, které je nutné, pro dosažení relevantních výsledků, odfiltrovat. Použití ratiometrických technik je jednou z možností, součástí této kapitoly je popis zcela nové metody navržené pro poměrová měření. Tato práce se také zabývá samotným popisem a definicí pohybových artefaktů a na základě tohoto rozboru navrhuje vysoce účinnou techniku pro jejich eliminaci, využívající elastickou registraci obrazů.

Kromě samotného předzpracování a zpracování signálů je potřeba navrhnout i rozhraní pro jejich vizualizaci a analýzu. Simultánní zobrazení signálů získaných optickým a elektrickým mapováním, analýzu doby trvání AN, šíření a rychlost depolarizace a další parametry. Realizovaný software pro vizualizaci a analýzu je popsán v závěrečné části této kapitoly. Zpracování signálů bylo realizováno zpravidla v programovacím prostředí Matlab verze R2007b (Mathworks).

Během realizovaného výzkumu se autor podílel na analýze a zpracování signálů z jednobodového systému [66], spektroskopického systému [12] a nově navrženého systému popsaného v kapitole 3. [85]. Veřejně přístupné databáze signálů získaných optickým mapováním nejsou k dispozici, proto zde popsané metody a přístupy využívají data pouze z těchto tří zdrojů.

4.2 Předzpracování signálů

4.2.1. Kvalita měřených signálů

Kvalita měřených signálů se liší, jak pro jednotlivé měřicí systémy, tak pro různá jejich nastavení nebo průběh měřicího experimentu. Klíčovým parametrem k popisu kvality signálů je poměr signál/šum, vyjádřený zpravidla jako velikost amplitudy měřeného akčního napětí, k rozkmitu šumu, který je superponovaný na základní linii signálu (měřený před depolarizací). Před aplikací technik předzpracování byl u využívaných snímacích systémů [12, 84, 85], dosažitelný SNR v závislosti na jejich nastavení v rozmezí $SNR=2.6-15$.

Dalším z parametrů popisujících kvalitu signálů je přítomnost nebo nepřítomnost nežádoucích artefaktů. Zpravidla se jedná o artefakty vzniklé v důsledku pohybu (kontrakce)

měřeného vzorku. Dalšími vlivy mohou být otřesy, kvalita optiky a uniformita osvětlení měřené scény, případně jejich změny.

K definici úspěšnosti metod pro eliminaci pohybového artefaktu bylo navrženo měřítko obdobné poměru signál/šum. Toto měřítko označme poměr signál/artefakt (SAR). Výpočet jeho hodnoty je obdobný jako u SNR, ale namísto šumu je používán rozkmit amplitudy přidavných artefaktů. Ačkoli v mnoha případech je stanovení tohoto poměru téměř jednoznačné, v některých případech tomu tak nemusí být. Zejména, když nelze přesně definovat, která složka signálů odpovídá přidavným artefaktům a která akčnímu napětí. V těchto případech může být stanovení SAR značně subjektivní, a tak by hodnota SAR měla být označena jako neidentifikovatelná.

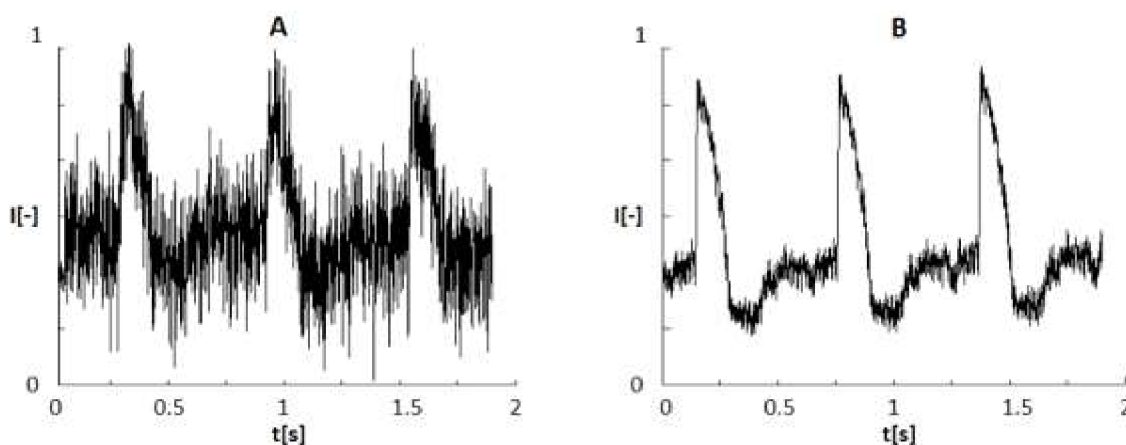
Nicméně i přes zmíněné nedostatky SAR poskytuje určité měřítko kvality, které společně s dalšími parametry signálů umožňuje jejich srovnání a vyhodnocení úspěšnosti použitých přístupů. Hodnoty SAR se můžou u jednotlivých experimentů značně lišit, dle konkrétního měřicího protokolu.

4.2.2. Časové průměrování

Jedním ze základních přístupů pro eliminaci šumu a zlepšení SNR je využití kumulačních technik. Využívá se zpravidla kumulace s rovnoměrnými vahami, jak popisuje následující vztah.

$$y(i) = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^{j=M} [x_j(i)], \quad i = 0, 1, 2, \dots, N \quad (11)$$

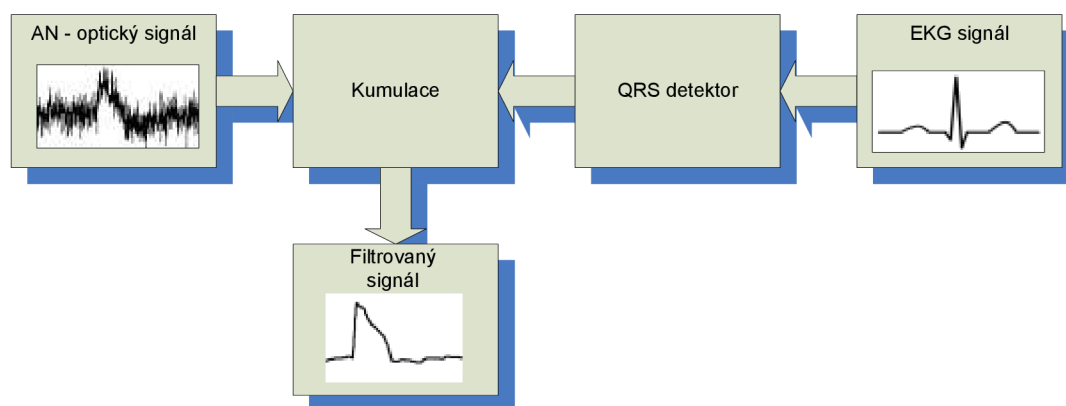
Délka okna M určuje počet průměrovaných repetitivních AN o délce N . V praxi je nutno vyřešit problém mezi zachováním dobrého časového rozlišení a zároveň získání přijatelného SNR. Délka okna se volí v závislosti na kvalitě měřeného signálu. Běžné nastavení se pohybuje v rozsahu $M=2$ až 25 [12, 84, 85].



Obr. č.17: Kumulace signálů ($M=25$), **A:** vstupní signál $SNR=2.6$, **B:** výstupní $SNR=11.6$

Výsledky kumulace pro signál získaný měřením jednobodovým systémem [12] s použitím okna délky $M=25$ ukazuje obrázek č. 17. Po kumulaci se SNR zvýšil z původní hodnoty $SNR=2.6$ na $SNR=11.6$.

Pro potřeby kumulace je potřeba rozdělit měřicí signál na jednotlivé periody. Vzhledem k tomu, že kvalita měřených signálů AN neumožňovala provést jejich rozdělení podle náběžné hrany AN, byl navržen postup, který využívá současně měřených signálů EKG. Tento postup byl popsán v [84]. Detekce a rozdělení signálů AN na jednotlivé periody vychází z dělicích značek, které jsou definovány QRS detektorem na signálech EKG. Použitý QRS detektor využívá diskrétní vlnkové transformace a je vybaven algoritmem automatického nastavení prahových hodnot pro detekci s využitím měření efektivní hodnoty EKG signálu (RMS). Vlnková transformace by se v tomto případě dala nahradit použitím příslušného pásmového filtru, odpovídajícího zvolenému pásmu. Blokové schéma systému detekce a kumulace je naznačeno na obrázku č. 18.



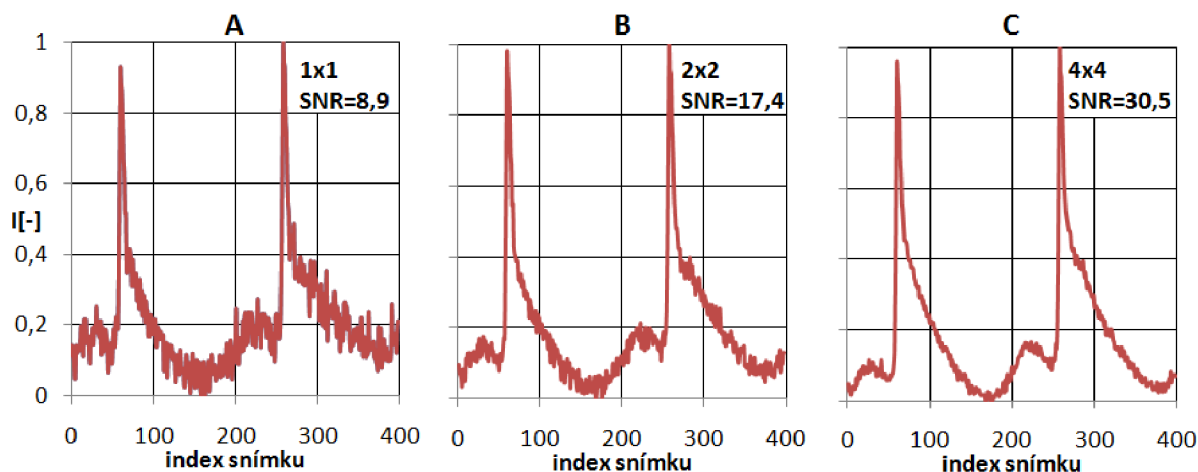
Obr. č.18: Blokové schéma kumulace s detekcí a rozdělením period AN s využitím EKG

Použití časového průměrování je možné, nedochází-li k významné změně tvaru nebo charakteru AN během měření. Není-li tato podmínka splněna, lze očekávat zkreslené výsledky.

4.2.3. Plošné průměrování

Další použitou technikou předzpracování signálů pro zvýšení SNR je prostorové průměrování. Tuto techniku je možné využít u systémů, které využívají plošné, případně panoramatické měření. Na úkor prostorového rozlišení jsme pak schopni zlepšit kvalitu signálů. Průměrování může využívat plochu od 2×2 až po velikost danou maximálním rozlišením kamery například 128×128 . Běžné nastavení prostorového průměrování signálů, měřených akvizičním systémem [85] a prezentovaných v této kapitole, bylo 2×2 pixelů. Zlepšení SNR oproti signálu v jednotlivých pixelech bylo přibližně dvou-násobné. Obrázek č. 19 ilustruje kvalitu signálů pro různá nastavení velikosti průměrovaného regionu.

Kromě ztráty prostorového rozlišení přináší plošné průměrování i jiné nevýhody. Pomineme-li změnu tvaru AN v rámci daného regionu, plošné průměrování signálů představuje součet stejných signálů s různou fází (dáno šířením depolarizace), což má za následek zpomalení náběžné hrany AN. Řešení je využití přístupu pro korekci fázového posunu [82]. Dalším problémem je možný vznik artefaktů nebo nedostatečný efekt této metody v důsledku rozdílné stejnosměrné složky v jednotlivých průměrovaných pixelech. Proto jsou jednotlivé signály před realizováním plošného průměru normovány.



Obr. č.19: Efekt prostorového průměrování na SNR, A: originál-oblast 1x1, B: oblast 2x2, C: oblast 4x4

4.2.4. Filtrace

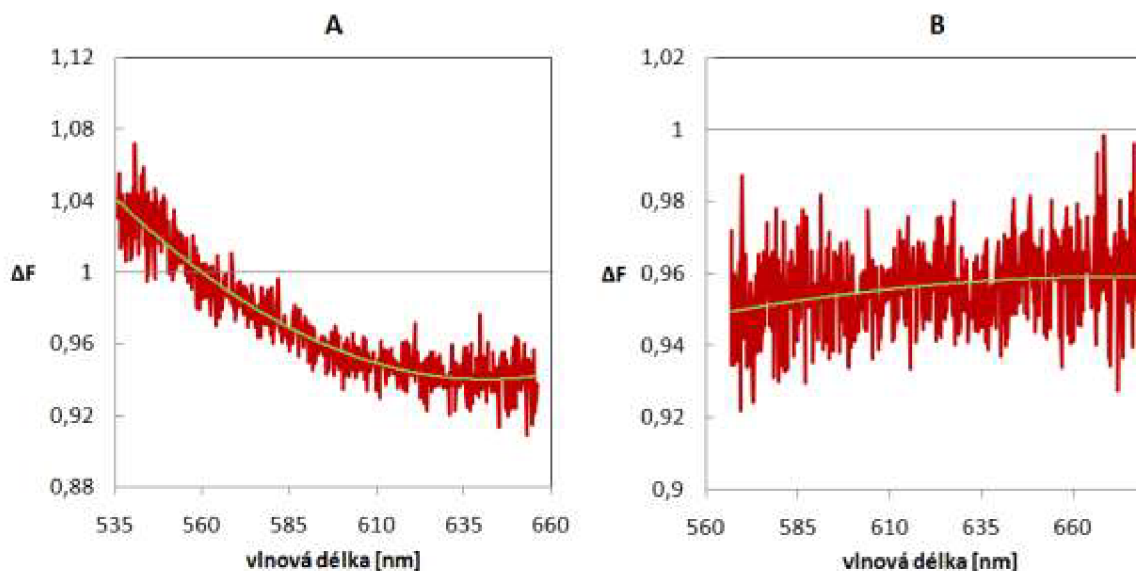
K potlačení vysokofrekvenčního šumu lze využít vhodně nastaveného filtru typu dolní propust. Frekvenční obsah záznamu AN neobsahuje zpravidla kmitočty vyšší než 100 Hz [58]. Použitím dolní propusti (FIR) s mezním kmitočtem $f_m=100$ Hz lze tedy potlačit vysokofrekvenční složky bez ovlivnění kvality měřených signálů.

Filtrace složek s velmi nízkými kmitočty (například pohybový artefakt) je obtížná, protože jejich frekvenční výkonové spektrum se překrývá s frekvenčním výkonovým spektrem měřených signálů. K eliminaci takových složek lze využít pokročilejších přístupů, které jsou popsány níže.

4.3 Charakteristika odezvy barviva na AN

Před realizací a návrhem filtrů měřicího systému byla provedena analýza odezvy zvoleného barviva di-4-ANEPPS, při použití zvolených excitačních zdrojů. Měření probíhalo s využitím systému pro spektroskopická snímání [12]. Jako excitační zdroj byl testován diodově buzený pevno-látkový laser (DPSS na 473 nm a 532 nm). Pro oba laserové zdroje byl testován vliv depolarizace o 90 mV na charakter změny emisního spektra. Spektra byla průměrována pro ($n=6$) period AN. Jak ukazuje obrázek č. 20, při excitaci na vlnové délce

473 nm představovala změna fluorescence, v reakci na depolarizaci, posun jejího emisního spektra směrem ke kratším vlnovým délkám. Toto odpovídá pozitivní modulaci na kratších vlnových délkách a negativní na vlnových délkách delších. Tyto závěry korelují s těmi, představenými v kapitole 2.1.1. Pro excitaci na vlnové délce 532 nm, se však charakter změny spektra, v reakci na depolarizaci, omezil pouze na modulaci jeho amplitudy. Poznamenejme, že v tomto případě nebudou poměrové metody schopny rekonstruovat měřený signál AN.



Obr. č.20: Změna emisního spektra jako odpověď barviva na depolarizaci o 90 mV při excitaci laserem, A: na 473 nm, B: na 532 nm

4.4 Navržená poměrová metoda

Existující poměrové techniky umožňují účinné potlačení pohybových artefaktů, případně poklesu obálky signálu AN. Chceme-li ovšem tyto techniky aplikovat kromě jednobodového také na plošné měřicí systémy, jsme limitováni několika aspekty:

- nutnost využití pásmových filtrů,
- použití dvou snímacích prvků (kamer),
- zajištění shodné geometrie obou snímacích prvků.

V této práci je prezentováno řešení, které tyto aspekty s určitými limitami překonává, jeho popis byl publikován v [83]. Navržená metoda využívá pouze filtrů typu dolní propust, striktně nepožaduje dvou snímacích prvků (pro plošná měření) a vzhledem k stejné optické geometrii systému nevyžaduje další korekční nastavení. Použití je možné jak u systémů jednobodových tak plošných. Dále v textu bude tato metoda označována jako referenční.

Pro měření se využívají dva kanály: signálový a referenční. Signálový slouží k zaznamenání změny fluorescence v souvislosti se změnou AN. Návrh filtru tohoto kanálu je

obdobný jako pro klasické metody měření a je popsán v kapitole 3.4.5. Vychází z posunu emisního spektra. Tento signál je modulovaný také změnou fluorescence (vybledávání barviva) a přídavným pohybovým artefaktem. Jak bylo ukázáno v kapitole 2.6.4, lze takovýto signál popsat následujícím vztahem (12).

$$S_S(t) = A_1 I(t) C_1(t) [1 + a_1 v_m(t)] [1 + b_1 M(t)] + D_1 I(t) \quad (12)$$

Referenčním signálem označme signál, který reprezentuje pouze modulaci způsobenou pohybovým artefaktem a změnou fluorescence. Je tedy potřeba potlačit změny vztahené k posunu spektra v relaci se změnou AN. Toho lze docílit použitím emisního filtru, který zachycuje celé emisní spektrum s přesahem pokrývajícími jeho posun, tento posun pak nemá vliv na modulaci měřeného signálu. Problematické je ovšem potlačit změny v amplitudě v relaci z AN, kterou je takto konstruovaný referenční signál stále modulován. Za předpokladu, že signál AN odpovídá pouze reakci na posun spektra, lze pro referenční signál psát (13).

$$S_R(t) = A_2 I(t) C_2(t) [1 + b_2 M(t)] + D_2 I(t) \quad (13)$$

Za předpokladu, že odstraníme intenzitu pozadí D_i , lze poměr signálového a referenčního kanálu vyjádřit následovně (14).

$$S_{S/R}^*(t) = \frac{S_S^*(t)}{S_R^*(t)} = \frac{A_1 I(t) C_1(t) [1 + a_1 v_m(t)] [1 + b_1 M(t)]}{A_2 I(t) C_2(t) [1 + b_2 M(t)]} \quad (14)$$

$$S_i^*(t) = S_i(t) - D_i I(t)$$

Úpravou a zjednodušením lze získat:

$$S_{S/R}^*(t) \approx \frac{H_1(t)}{H_2(t)} [1 + (a_1) v_m(t)] [1 + (b_1 - b_2) M(t)] \quad (15)$$

$$kde H_i(t) = A_i(t) I(t) C_i(t)$$

Jestliže $H_i(t) = k H_j(t)$, $b_1 = b_2$ nebo výraz pro mechanickou aktivitu $M(t)$ je velmi malý, pak poměrový signál přechází v (16).

$$S_{S/R}^*(t) \approx k [1 + a_1 v_m(t)] \quad (16)$$

Vztah (16) dokumentuje, že poměrový signál nebude zatížen pohybovým artefaktem. Tento vztah bude platit za předpokladu splnění výše uvedených podmínek. V případě, že odezva barviva na akční napětí není definovaná jen pohybem spektra, ale změnou jeho amplitudy, je využití této metody omezené [83].

4.4.1. Jednobodové snímání

Navržená poměrová metoda byla testována na spektroskopickém systému [12], který zaznamenává časově odlišená emisní spektra, a tak umožňuje aplikaci a porovnání obou ratiometrických technik. Poměrové signály (R) byly vypočítány pro novou i klasickou metodu dle vztahu (17).

$$R = \frac{A}{B} \quad \text{kde} \quad A = \sum_{h=as}^{h=al} S(h) \quad B = \sum_{h=bs}^{h=bl} S(h) \quad (17)$$

Kde $S(h)$ je diskrétní emisní spektrum, které je funkcí vlnové délky h . Pro referenční metodu byl rozsah vlnových délek pro sumaci v kanálu A (signálový kanál) $as=620 \text{ nm}$ a $al=755 \text{ nm}$, pro kanál B (referenční kanál) byl rozsah $bs=500 \text{ nm}$ a $bl=755 \text{ nm}$.

4.4.2. Plošná měření

V předešlé kapitole bylo popsáno využití nově navržené Referenční metody pro jednobodové snímání. Aplikace této metody na takto měřené signály se kromě nastavení limit ve vzorcích pro výpočet sumace neliší od klasické ratiometrické metody. V použití pro plošné měření se však představují další výhody, které byly klíčové pro možnost její aplikace.

Vzhledem k tomu, že pro měření je k dispozici systém pouze s jednou snímací kamerou, byla navržena metoda, která využívá toho, že během daného měřeného úseku nedochází k výrazné změně tvaru AN. Je-li tato podmínka splněna, je možné rozdělit tento úsek na úseky kratší a provést záznam jedné nebo několika period AN s různými filtry.

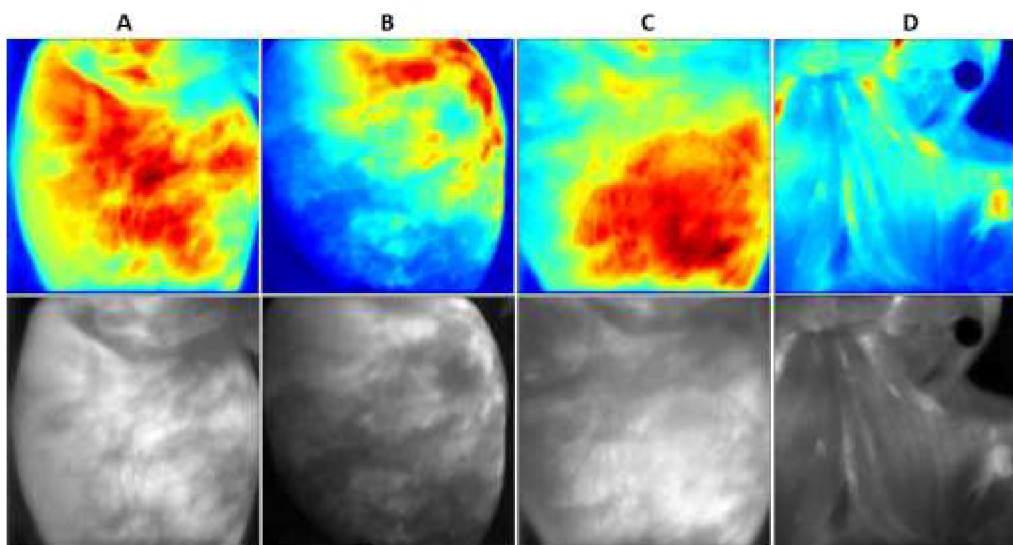
Pro klasickou ratiometrickou metodu by bylo potřeba vyměnit dva pásmové filtry a provést měření alespoň jedné periody AN na každém z filtrů, a následně pak realizovat poměr příslušných signálů. To vyžaduje nákladnou realizaci těchto pásmových filtrů a zároveň přináší komplikace s přeexponování CCD snímače během doby, kdy při změně filtrů není v optické cestě zařazen ani jeden z nich.

Referenční metoda vyžaduje použití pouze dvou filtrů typu dolní propust. Jeden z filtrů (referenční kanál) zachycuje celé emisní spektrum a za podmínky, že změna AN je interpretována pouze posunem tohoto spektra, poskytuje informaci pouze o změně snímané scény, například zachycuje relativní pohyb měřeného vzorku vůči kameře nebo pokles fluorescence daný vybledáváním barviva. Signálový kanál je pak nastaven tak, že zachycuje část spektra, kde se depolarizace AN projevuje negativní změnou fluorescence. Vzhledem k tomu, že signálový (emisní) filtr svou charakteristickou pouze zahrnuje část spektra měřeného referenčním filtrem (viz. obrázek č. 16), lze použít metody, kdy nedochází k výměně obou filtrů, ale pouze jednoho. Referenční filtr je pevně fixován k snímací kameře a do optické cesty, během časového okna pro měření signálového kanálu, je zaveden

pomocí translačního systému (viz. kapitola 3.4.4) emisní filtr. Pro oba měřené kanály je pak vypočítán příslušný poměrový signál. Aplikace této metody na měřené signály lze nalézt v 5. kapitole.

4.5 Popis vzniku pohybových artefaktů

Za předpokladu, že pohybový artefakt převážně souvisí s relativním pohybem měřeného vzorku vůči detektoru a jeho neuniformním obarvením, je možné fixaci tohoto pohybu tento artefakt eliminovat. Zaměříme-li se na nerovnoměrný charakter rozložení intenzit snímané fluorescence na povrchu myokardu, lze přepokládat, že vlivem pohybu (kontrakce) vzorku dojde ke změně snímané scény a tím i intenzity pozadí u každého snímacího pixelu detektoru. Je-li tato změna dostatečně velká (vysoký gradient intenzity na měřeném povrchu), projeví se modulací měřeného signálu. Typické prostorové rozložení intenzit na povrchu měřeného vzorku je patrné z obrázku č. 21. Znázorněny jsou čtyři různé vzorky a rozložení jejich intenzit na povrchu epikardu (A, B, C) a na povrchu endokardu (D). Obrázky jsou zobrazeny ve stupnici šedé a při použití barevného mapování, kde červená odpovídá vysoké intenzitě a modrá nízké.

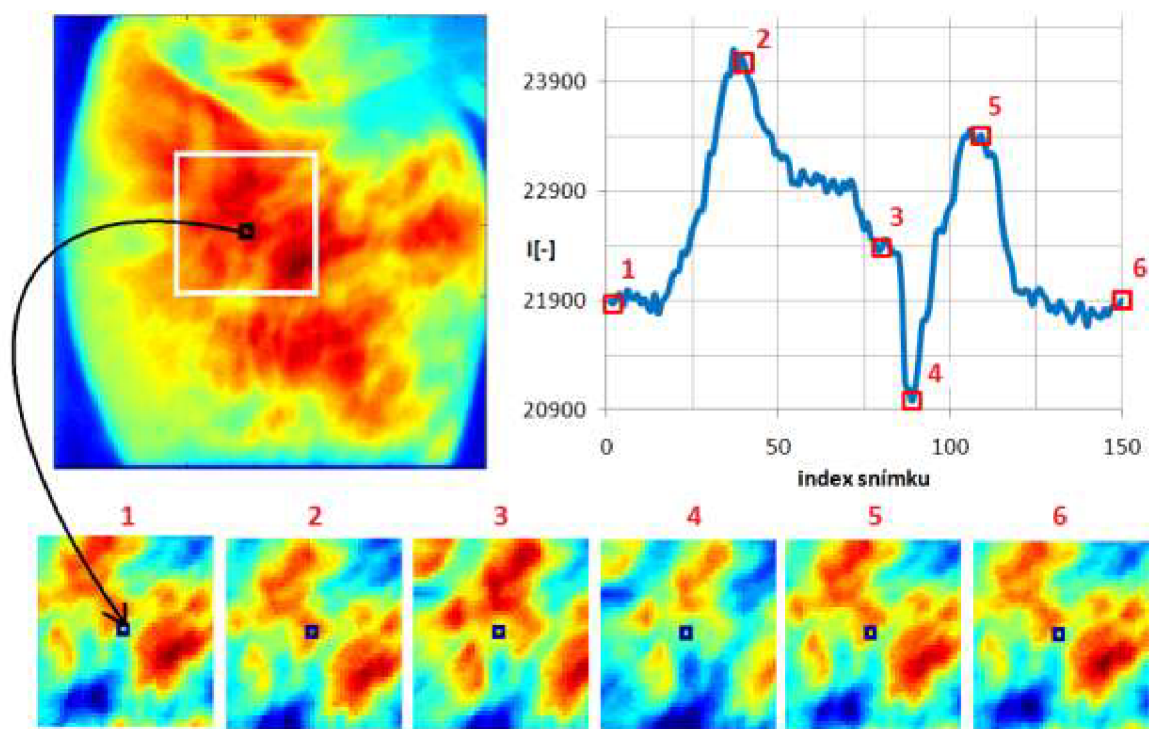


Obr. č.21: Prostorové rozložení intenzit, barevné mapování (nahore), stupnice šedi (dole), **A, B, C:** na povrchu epikardu, **D:** na povrchu endokardu

Spojitosť mezi změnou relativní pozice snímací scény vs. detektor dokumentuje obrázek č. 22. Pro vizualizaci vzniku pohybových artefaktů byla vybrána oblast na povrchu epikardu (bílý čtverec), kde byl v okně o velikosti 2x2 pixelů (černý čtverec) měřen signál AN. Změna rozložení intenzit v měřené oblasti (respektive její translační pohyb) dokumentuje série snímků s indexy 1-6. Měřený signál byl zaznamenán se snímkovací frekvencí 406 snímků/s a je zobrazen vpravo. Pozice jednotlivých snímků v měřeném signálu, je

označena stejnými indexy. Z obrázku je patrné, že dostává-li se do měřeného okna plocha s vyšší intenzitou (snímek č. 2 a 5), dochází k pozitivní modulaci měřeného signálu. Pokles intenzity signálu je patrný v oblastech, kde je intenzita nízká (snímek č. 1, 3 a 6). Pokles signálu (pozice 4) je způsoben depolarizací AN (negativní modulace). Vliv depolarizace lze pozorovat na snímku č. 4, kde je patrný náhlý pokles intenzity celého snímku (vůči snímku č. 3). Změny, které pozorujeme na zmíněném signálu, jsou interpretovány jako pohybový artefakt. Lze předpokládat, že použitím vhodné registrační techniky lze stabilizovat tento pohyb, a tak i eliminovat pohybový artefakt, bez nutnosti použití mechanické fixace vzorku, farmakologických disociátorů nebo poměrových technik, které jsou nyní k dispozici.

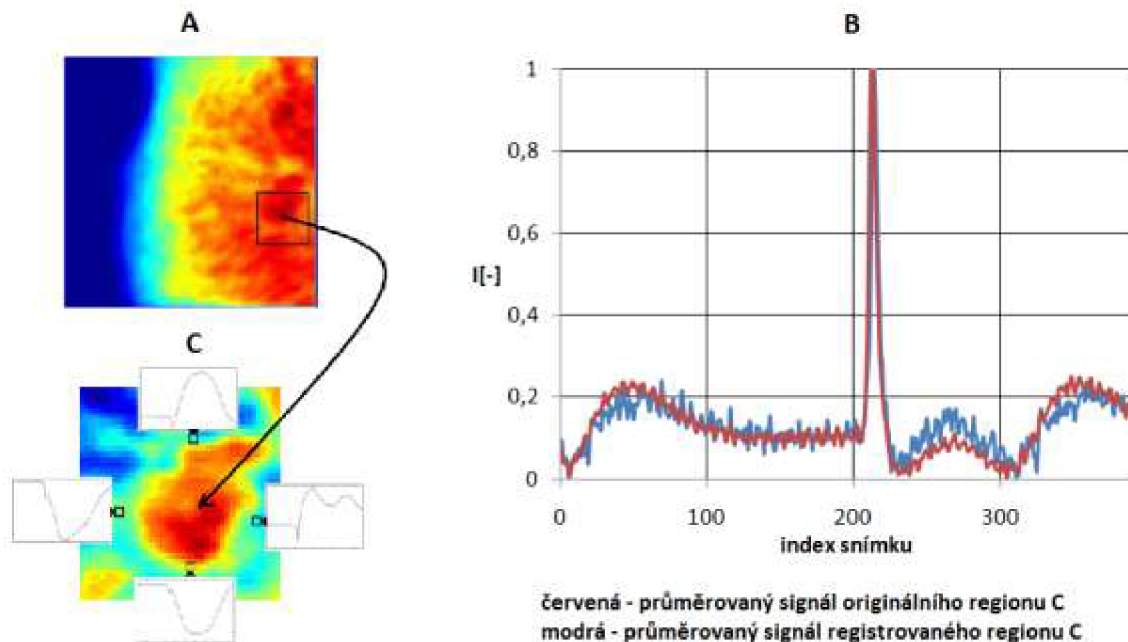
Je-li pohybový artefakt způsoben převážně vlivem neuniformního obarvení vzorku fluorescenčním barvivem a tím i nerovnoměrného rozložení fluorescence, lze se domnívat, že v oblastech, kde jsou prostorové gradienty, změny intenzity malé (uniformní nabarvení), bude i vliv pohybových artefaktů menší, což současná měření potvrzují.



Obr. č.22: Vliv relativní změny polohy detektoru (černý čtverec) a snímané scény na vznik pohybových artefaktů. Výřezy 1-6 odpovídají ploše označené bílým čtvercem v časových úsecích zobrazených na průběhu signálu AN. Podrobnější popis je uveden v textu.

Budeme-li předpokládat rovnoměrně nabarvenou tkáň, kde se vyskytuje určitá neuniformita, lze konstatovat, že zvětšením velikosti snímaného okna (prostorové průměrování) na velikost, která zachycuje celou tuto neuniformní oblast, lze eliminovat pohybový artefakt. Pohyb takové oblasti během měření se na hodnotě průměrovaného signálu neprojeví. Tento přístup byl publikován v [85].

Na obrázku č. 23 lze vidět neuniformní oblast (23A), jejíž pohyb se projevuje vznikem pohybových artefaktů, zobrazených ve vybraných bodech na (23C). Průměrováním signálu přes celou tuto oblast lze dosáhnout stejného efektu potlačení pohybových artefaktů jako její registrací (23B).



Obr. č.23: Vliv průměrování a registrace neuniformní oblasti na potlačení pohybových artefaktů, **A:** rozložení intenzit snímku, **B:** signály AN po zpracování, **C:** zobrazení originálních signálu AN ve vyznačených oblastech (s pohybovými artefakty)

4.6 Registrace obrazu

4.6.1. Úvodem

Účelem registrační techniky je zarovnat jednotlivé snímky optického záznamu AN tak, aby v každém snímku měřené sekvence, byly body měřené scény v odpovídajících si pozicích. Zajištěním neměnné pozice měřené scény a snímacího prvku lze eliminovat pohybový artefakt, jak bude ukázáno v kapitole 5.2.3.

Předpokládáme, že máme k dispozici sérii N snímků v rozlišení daném zvolenou snímací metodou. Snímky zachycují část epikardu, ve které se provádí optické měření. Počet snímků je dán snímkovou frekvencí kamery f a délkou záznamů t . Rozlišení pak určuje typ kamery a zvolený snímací mód (např. binning). Snímky tvoří množinu $\{I_1(\mathbf{x}), I_2(\mathbf{x}), \dots, I_N(\mathbf{x})\}$, kde $\mathbf{x}=\{x,y\}$. Dalším krokem je zvolení jednoho z těchto obrazů jako referenčního $T(\mathbf{x})$. Poté je potřeba zarovnat každý ze snímků I_k pro $k=\langle 1,N \rangle$ k referenčnímu snímku $T(\mathbf{x})$ pomocí vhodného lícovacího algoritmu. Optimalizační problém lze zpravidla popsat vztahem (18).

$$\arg \max_{f_k} Q \left(I_k(f_k(\bar{x})), T(\bar{x}) \right) \quad (18)$$

$$f_k(\bar{x}) = A_k \bar{x} + \bar{t}_k$$

Kde výraz $Q \left(I_k(f_k(\bar{x})), T(\bar{x}) \right)$ představuje vzájemnou podobnost, vypočítanou na základě zvoleného kritéria. Funkce $f_k(\bar{x})$ je dvoudimenzionální transformací obsahující šest nezávislých parametrů schopných vykonat rotaci, změnu velikosti, řez nebo posun s vektorem $\mathbf{t}_k = \{(t_x)_k, (t_y)_k\}$. Dochází-li k lokálním deformacím v registrovaných snímcích, je tato transformace nedostatečná a je potřeba použít transformaci elastickou.

4.6.2. Volba registrační metody

Proces registrace lze realizovat množstvím registračních technik, více či méně vhodných pro tuto aplikaci. Proto, aby bylo možné zvolit vhodnou techniku registrace, je potřeba zrekapitulovat základní parametry signálu.

Měřený signál je zaznamenán technikou optického mapování na bijícím srdci v rozlišení 128x128 pixelů, bitové hloubce 16 bitů při snímkovací frekvenci 406 snímků/s. Modulace měřeného signálu AN je v rozmezí 2-5%, typicky SNR≈4-10. Intenzita signálů je relativně malá, vzhledem k požadavku na použití nízkých koncentrací fluorescenčního barviva. Pohyb myokardu je komplexní a nelze jej popsat pouze translací, změnou velikosti, zkosením nebo rotací měřeného snímku. Na povrchu měřených vzorků nejsou zpravidla patrné body, struktury, které by bylo možno využít k registraci.

Existuje mnoho technik pro registraci obrazu, jejich přehled lze najít například v [7, 34, 54, 93]. Vzhledem ke komplexnosti pohybu myokardu bylo k registraci využito elastické registrace. Porovnání technik pro elastickou registraci lze najít například v [55].

Většina používaných metod obsahuje tyto čtyři kroky registrace [93]:

- vyhledání struktur, bodů či vlastností vhodných k registraci,
- vyhledání korespondence těchto struktur v referenčním snímku,
- výpočet potřebné transformace na základě nalezené korespondence,
- transformace snímku.

Vzhledem k tomu, že na měřeném signálu, zachycujícím povrch epikardu, nejsou k dispozici žádné typické struktury nebo body, které by se daly využít k registraci, byl zvolen přístup trasování pohybu, založený na distribuci intenzity. Největší výhodou intenzitních metod je, že více informací z měřené scény je použito k registraci. Tento přístup navíc nevyžaduje proces segmentace obrazu [36]. Pro registraci nebyla zvolena metoda optického toku, která sice dokáže přesně sledovat pohyb scény s malým pohybovým vektorem, ale selhává v případech, kdy je posun velký [13].

Vyhledávání korespondence mezi registrovanými snímky bylo založeno na sledování pohybu malých oblastí rovnoměrně rozložených na ploše snímku. Použitý algoritmus je podobný algoritmu „block-matching“ [39]. Velikost jednotlivých bloků a jejich počet na registrovaném snímku je potřeba stanovit. Zvolený přístup nevyžaduje segmentaci, a tak umožňuje vysokou míru automatizace registračního procesu. Použitý algoritmus porovnává korespondenci mezi jednotlivými bloky v referenčním a registrovaném snímku. Bloky jsou ekvidistantně rozloženy na ploše snímku. Vzhledem k tomu, že měřený signál představuje pouze jednu modalitu, je možné použití korelačního koeficientu (KK) [55]. Porovnání různých přístupů využitím korelace lze nalézt v [7]. Vzhledem k tomu, že korelované bloky jsou relativně malé, jako transformace je dostatečná jejich translace, případně rotace.

Pro elastickou registraci lze využít „spline“ metod. Tyto metody je vhodné použít tam, kde je k dispozici nerovnoměrné rozložení registrovaných bodů [91]. Použití těchto metod, pro registraci obdobných optických signálů měřených fluorescenční mikroskopií, bylo popsáno v [42]. Tato metoda byla použita vzhledem k tomu, že bylo k dispozici pouze malé množství spolehlivých registračních bodů.

K modelování komplexních, popřípadě lokalizovaných deformací, je potřeba využití velkého počtu registračních značek [80]. Využitím výše zmíněného přístupu, kdy jsou k dispozici souřadnice rovnoměrně rozložených značek na ploše snímku, umožňuje provést jejich bilineární interpolaci [55] a na základě takto získaných souřadnic rekonstruovat registrovaný snímek.

4.6.3. Trasování pohybu

Definice pohybu mezi jednotlivými snímky sekvence je důležitá pro realizaci registračního procesu. Všechny snímky měřené sekvence jsou registrovány k referenčnímu snímku, který je zvolen na začátku měřené sekvence.

Referenční i registrovaný snímek jsou rozděleny na $M \times M$ bloků o velikosti $N \times N$, jak ukazuje obrázek č. 26. Indexy (m, n) bude označována pozice bloku. Pro každý z bloků je použit nezávislý registrační proces definovaný vztahem (18). Jako kritérium podobnosti je zvolen korelační koeficient [40], jeho zápis ve 2D uvádí (19).

$$KK = \frac{\sum_i \sum_j (A_{i,j} - \bar{A})(B_{i,j} - \bar{B})}{\sqrt{\sum_i \sum_j (A_{i,j} - \bar{A})^2 \sum_i \sum_j (B_{i,j} - \bar{B})^2}} \quad (19)$$

$$kde \quad \bar{A} = \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j A_{i,j} \quad \bar{B} = \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j B_{i,j}$$

Matice A a B představují bloky referenčního a registrovaného snímku o velikosti $N \times N$. Vzhledem k tomu, že transformace pro zarovnání bloků obsahuje pouze translaci v ose x (t_x) a y (t_y), funkce $f_k(\vec{x})$ ve vztahu (18) má následující tvar (20).

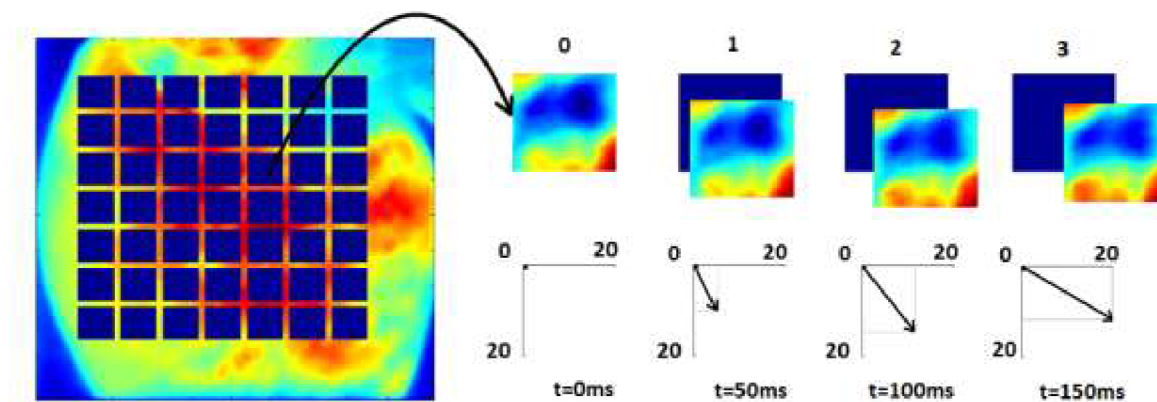
$$f_k(\vec{x}) = \vec{t}_k \quad (20)$$

$$kde \quad \vec{t}_k = \{t_{x,m,n}, t_{y,m,n}\}$$

Pohyb mezi jednotlivými bloky je trasován, vždy mezi sousedními snímky s tím, že pro nejvyšší hodnoty korelace je pro každý z bloku zaznamenán pohybový vektor \vec{t}_k . Vzhledem k tomu, že pohyb myokardu během srdeční revoluce je poměrně malý, je pro dosažení účinného potlačení pohybových artefaktů nutné provést registraci na úrovni sub-pixelu. Zvolené rozlišení registrace bylo nastaveno na $\frac{1}{4}$ originálního pixelu. K dosažení tohoto parametru je potřeba provést interpolaci rozlišení původního snímku z 128×128 na 509×509 . Pro interpolaci snímku byla použita bilineární interpolace.

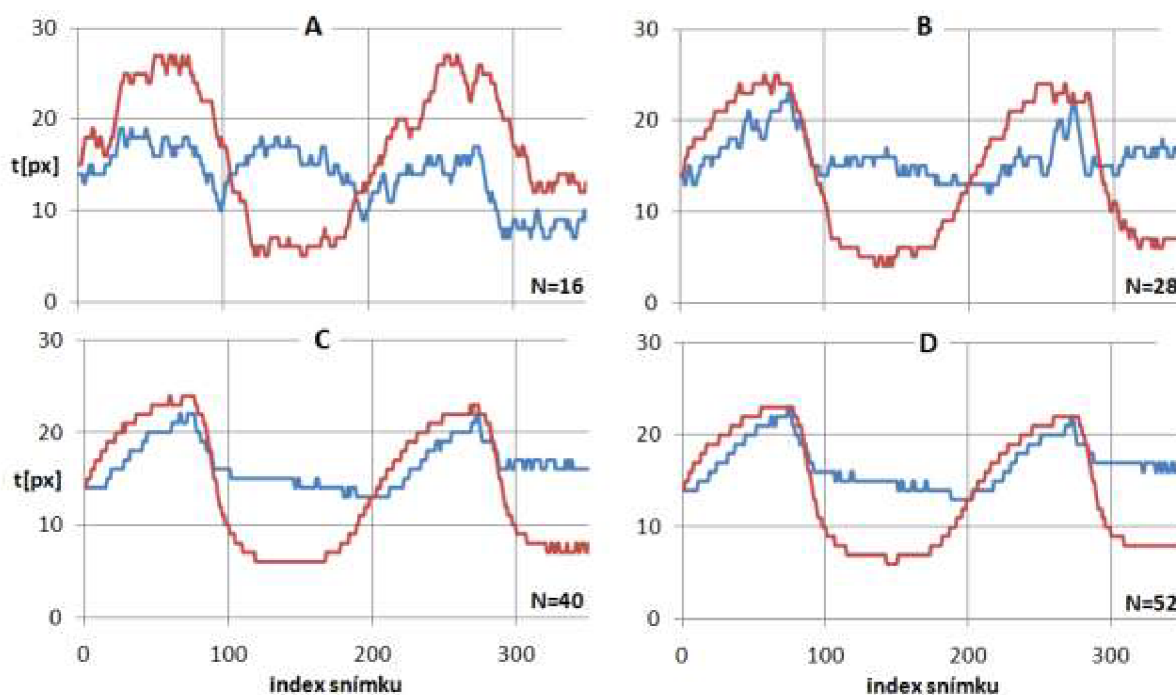
Optimalizační kritérium je nastaveno tak, že každý blok porovnávaného snímku je vyhledáván pouze v oblasti definované vzdálenosti od pozice známé z předchozího snímku. Nastavení velikosti této oblasti lze měnit v závislosti na rychlosti a velikosti pohybu myokardu u daného záznamu, a tím optimalizovat proces trasování, při zachování schopnosti reakce na jeho změnu. Algoritmus lze nastavit tak, že oblast vyhledávání reflektuje pohyb z předchozích snímků. Toto však vzhledem k rychlosti zpracování současného algoritmu a kladenému důrazu na jeho robustnost nebylo využito. Obrázek č. 24 znázorňuje pohyb v jednom ze sledovaných bloků. Nulová pozice odpovídá depolarizaci. Pohyb je zaznamenán ve třech dalších pozicích s časovým odstupem 50 ms (1-50 ms, 2-100 ms a 3-150 ms) od

depolarizace. Zobrazený vektor, vypočítaný na základě registračního algoritmu popsaného výše, určuje polohu sledovaného bloku vzhledem k jeho výchozí pozici na počátku depolarizace.



Obr. č.24: Vektor pohybu sledovaného regionu (bloku) a jeho změna, nulová pozice odpovídá depolarizaci, další pozice jsou v časových odstupech 50 ms.

Pro přesné sledování pohybu jednotlivých bloků je rozhodující spolehlivost zvoleného kritéria podobnosti. Pro přesnost registrace je klíčové nastavení velikosti a počtu bloků. Velikost bloků je potřeba nastavit s ohledem na SNR měřeného signálu. Počet bloků pak určuje schopnost algoritmu reagovat na lokální deformace. Pro měřené signály byly experimentálně testovány různá nastavení velikosti bloků. Porovnání výsledků zobrazujících průběžné hodnoty vektoru pohybu (souřadnice x a y) v registrované sekvenci 350 snímků v závislosti na nastavené velikosti bloku ukazuje obrázek č. 25.



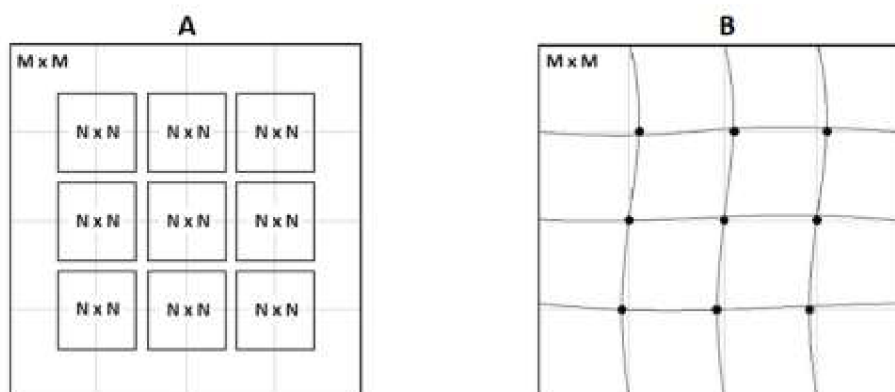
Obr. č.25: Charakteristiky pohybu u vybraného bloku ve svislé (červená) a vodorovné ose (modrá). Nastavená velikost bloku v interpolovaném snímku byla, **A:** N=16, **B:** N=28, **C:** N=40, **D:** N=52

Jak lze vidět velikost bloku u těchto charakteristik souvisí s dosažitelným SNR a tím s přesností registrace. Charakter detekovaného pohybu, byl pro všechna nastavení velikosti bloku obdobný. Pro bloky o velikosti $N=40$ a $N=52$ jsou charakteristiky téměř totožné, lze tedy usuzovat, že další zvětšování bloku by již nepřineslo zvýšení SNR a mělo by za následek pouze pokles citlivosti registrační metody na lokální deformace. Byla zvolena velikost bloku $N=51$ tak, aby vyhovovala s rezervou výše uvedeným závěrům. V závislosti na velikosti bloku byl stanoven jejich počet tak, aby vyplňovaly prostor snímané scény. Aby bylo možno dosáhnout přesnějšího popisu lokálních deformací, lze povolit překrytí bloků. V použitém algoritmu bylo použito až 50% překrytí jednotlivých bloků, což odpovídá při velikosti bloku $N=51$ maximálnímu počtu až $M=18$ bloků. Vzhledem k okrajovým podmínkám, které jsou definovány samotným pohybem měřené scény mimo zorné pole kamery, bylo k registraci nejčastěji využito 14×14 bloků (ve středu snímku). Vzájemná vzdálenost těžišť jednotlivých bloků (jejich geometrického středu) byla 26 pixelů.

Ačkoli zvolená hodnota velikosti bloků vyhovovala záznamům ze všech provedených experimentů ($n=12$), máme-li indicie, že registrace proběhla nekorektně (viz. kapitola 4.6.5), lze tento druh analýzy opakovat a stanovit vhodnou velikost bloku pro konkrétní signály.

4.6.4. Elastická registrace optických signálů AN

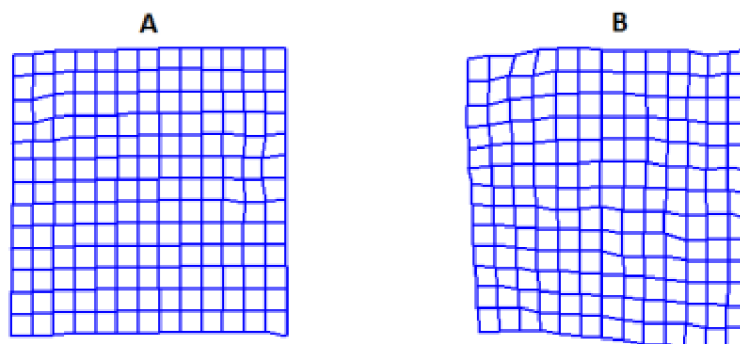
Na základě trasování, máme k dispozici pro každý z bloků informaci o jeho pohybu. Tuto informaci lze interpretovat jako posun referenčního bodu v jeho těžišti (geometrickém středu). Vztah mezi registrovanými bloky a jim odpovídajícími referenčními body je patrný z obrázku č. 26.



Obr. č.26: Rozdělení snímku na bloky a elastická registrace, **A:** snímek rozdělen na $M \times M$ bloků o velikosti $N \times N$, **B:** těžiště trasovaných bloků tvoří základ elastické registrace

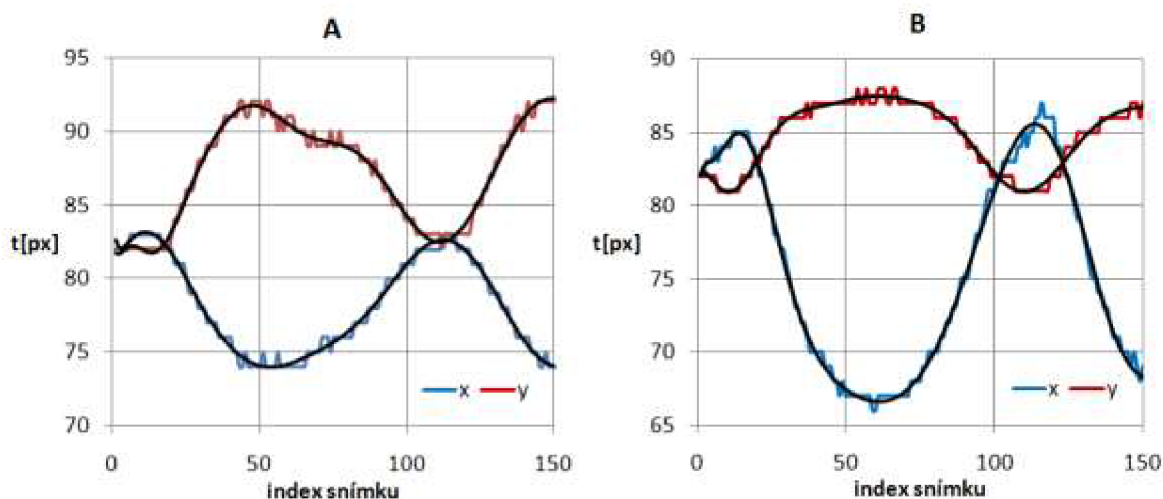
Takto definované referenční body tvoří síť, jejíž interpolaci lze získat masku pro rekonstrukci registrovaného obrazu. Vzhledem k tomu, že využíváme rovnoměrně rozloženou síť referenčních bodů, byla k interpolaci využita bilineární transformace. Pro interpolaci bylo testováno i využití algoritmu křivkové interpolace (kubická křivka). Využití této interpolační

metody poskytovalo téměř totožná data. Toto lze připisovat relativně malé vzdálenosti mezi referenčními body (v nativním rozlišení 6 pixelů). Na obrázku č. 27 je patrná mřížka a její elastická deformace. Zobrazená mřížka je realizovaná propojením referenčních bodů úsečkami.



Obr. č.27: Mřížka realizovaná propojením referenčních bodů získaných trasování, **A:** mřížka u snímku před depolarizací, **B:** mřížka u snímku snímek po depolarizaci

Registrovaný obraz je získán aplikací této masky na zpracovávaný snímek. Tento přístup vyžaduje přesné stanovení pohybových charakteristik jednotlivých bloků. Dojde-li k tomu, že u některého z bloků nejsou k dispozici přesné informace o jeho pohybu, je výsledkem lokální deformace v příslušném místě registrovaného snímku. Proto je potřeba vyhodnotit kvalitu trasování u jednotlivých bloků a na jejím základě provést korekci nebo úpravu těchto charakteristik. Touto problematikou se zabývá následující kapitola.



Obr. č.28: Proložení pohybových charakteristik polynomicickou křivkou ($n=24$), **A:** korektní proložení, **B:** chyba v proložení křivky (charakteristika x)

Pohybové charakteristiky pro každý z bloků je možné před registraci filtrovat. V navrhované metodě nebyla, vzhledem ke kvalitě signálů, filtrace provedena. Bylo testováno proložení těchto charakteristik polynomem vyšších řádů ($n=24$). Podle provedené

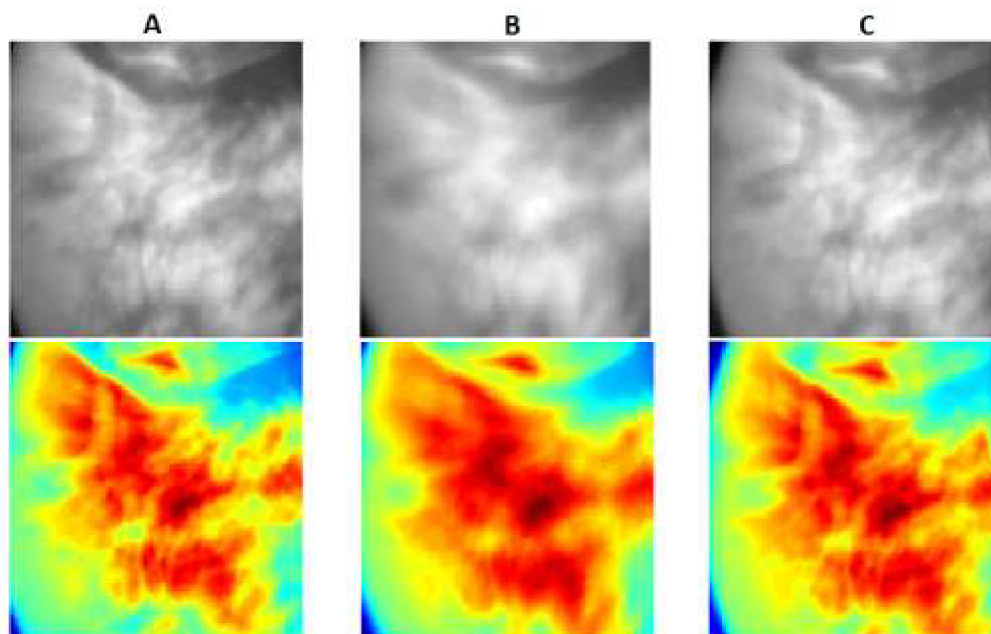
analýzy může proložení charakteristiky polynomem přinášet dodatečné zkreslení (fázové i amplitudové), tak jak ukazuje příklad na obrázku č. 28.

4.6.5. Verifikace registrace

Jedním z nejdůležitějších kroků, kromě samotné registrace, je ověření její správnosti. Toto je možné využitím tzv. „zlatého standardu“, tedy metody, která je všeobecně považována za správnou, a s ní výsledky navrženého postupu porovnat. Protože v aplikacích optického mapování neexistuje žádná taková metoda, bylo zvoleno několik jiných přístupů.

Přístupy pro vizuální zhodnocení kvality registrace

Jedním z nejzákladnějších je vizuální porovnání výsledků. Na měřených sekvencích lze vizuálně ověřit, zda došlo k potlačení pohybu, nedošlo ke vzniku nežádoucích artefaktů nebo jinému zkreslení. Vizuálně můžeme porovnat šíření depolarizace na originálních a registrovaných sekvencích. Je zde také možnost porovnání registrovaného záznamu AN s klasickým záznamem pořízeným po aplikaci farmakologického disociátoru pohybu. V tomto případě však je nutné uvažovat, že tato farmaka mohou ovlivnit (změnit) šíření depolarizace. Samotnou kapitolou je porovnání tvaru signálu AN v jednotlivých kanálech před a po registraci. Vizuálně lze rozhodnout, zda získané signály (hlavně co se týče tvaru) odpovídají teoretickým předpokladům.



Obr. č.29: Vizuální kontrola registrace, **A:** referenční snímek sekvence, **B:** průměrný snímek neregistrované sekvence, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

Pokročilá metoda vizuálního porovnání signálu a detekce jeho pohybu může zahrnovat zde představený přístup, který realizuje průměrný snímek z měřené a registrované

sekvence, a tak umožňuje jejich porovnání se snímkem referenčním (první snímek dané sekvence). V případě, že se scéna nepohybuje, měl by být průměrovaný snímek totožný s referenčním. Navíc by měl díky průměrování dosahovat vyššího odstupů SNR. V případě pohybu dojde k rozmazání průměrného snímku. Je-li proces registrace úspěšný, průměrný snímek registrované sekvence by měl být téměř shodný s referenčním snímkem. Průměrný snímek sekvence \bar{S} lze vypočítat dle vztahu (21), kde D udává celkový počet snímků S testované sekvence. Automatické vyhodnocení tohoto přístupu může zahrnovat měření kontrastu průměrovaného snímku (tady však není možné detekovat případné deformace).

$$\bar{S} = \frac{1}{D} \sum_{i=1}^{i=D} S_i \quad (21)$$

Pro ověření správnosti registrace je možné provést kontrolu konzistence mřížky. Jelikož každý referenční bod může během procesu registrace změnit libovolně svou polohu (maximální krok změny je omezen optimalizačním algoritmem), je konzistence mřížky (Obr. č. 27) dobrým indikátorem úspěšné registrace.

Automatická kontrola kvality registrace

Pro kontrolu kvality registrace byla navržena zcela nová metoda, která umožňuje testování registračního algoritmu přímo na registrovaném záznamu AN. Princip je následující.

Měřenou sekvenci registrujeme navrženým algoritmem s tím, že v paměti uchováme charakteristiky trasovaného pohybu pro každý z bloků. Poté měřenou sekvenci upravíme tak, že do ní zavedeme předem definovaný pohyb. Tato úprava spočívá pouze v transformaci, která vykonává posun jednotlivých snímků dle zvoleného schématu ve vodorovné a svislé ose. Opětnou registraci takto upravené sekvence získáme nové charakteristiky trasovaného pohybu pro každý z bloků, které by se v ideálním případě měly lišit od předchozích právě v přidaném pohybu. Je-li tomu tak, je zřejmé, že algoritmus trasování pohybu byl schopen spolehlivě detekovat přidaný pohyb a lze se domnívat, že s ním lze správně vyhodnotit i charakteristiky pohybu v měřené sekvenci. Jinými slovy lze říci, že trasované bloky, které vykazují malou odchylku (chybu registrace), svými parametry (distribucí intenzity, SNR) jsou vhodné k registraci navrženou metodou.

Umělý pohyb přidávaný do měřené sekvence může mít stejný charakter pro celý snímek (lineární pohyb-translace snímku) a i tak umožňuje testování schopnosti algoritmu měřit nelineární deformace. Toto souvisí s nezávislostí trasování jednotlivých bloků. Vzhledem k tomu, že pohyb v měřené scéně během srdeční revoluce je relativně malý (v nativním rozlišení 0 až 6 px.), byl přidaný pohyb u upravené sekvence v rozmezí (0 až 1 px.).

4.6.6. Využití selektivní filtrace

Trasování pohybu poskytuje pro každý z bloků informace o jeho poloze, respektive její změně, během sledovaného úseku. Algoritmus elastické registrace pak využívá těchto informací k registraci snímku. Dojde-li u některého bloku k chybě detekce pohybu, je tato chyba transformována do registrovaného signálu. Toto se může projevit vznikem lokálních deformací nebo jiných artefaktů.

Jak bylo popsáno v předešlé kapitole, máme k dispozici metodu, která umožňuje detekovat kvalitu registrace u jednotlivých bloků. Na základě této informace jsme schopni označit nevyhovující bloky a nahradit jejich pohybové vektory aproximovanými hodnotami získanými z okolních, korektně registrovaných, bloků. K tomuto je potřeba nastavit prahové hodnoty indikující nekorektní registraci a stanovit způsob aproximace chybějících hodnot. Pro aproximaci byl zvolen algoritmus, který umožňuje stanovit vektor pohybu pro nevyhovující blok s využitím váženého průměru přilehlých bloků. Jedná-li se o aproximaci bloku, který je na hraně oblasti, jsou použity pouze přilehlé bloky, jež jsou k dispozici. Výpočet aproximovaných vektorů pro blok se souřadnicemi (m, n) uvádí následující vztahy:

$$\bar{t}_{x,m,n} = \frac{\left(\sum_j \sum_k \frac{\bar{t}_{x,j,k}}{1 + E_{x,j,k}} \right) - \frac{\bar{t}_{x,m,n}}{1 + E_{x,m,n}}}{\left(\sum_j \sum_k \frac{1}{1 + E_{x,j,k}} \right) - \frac{1}{1 + E_{x,m,n}}} \quad (27)$$

$$\bar{t}_{y,m,n} = \frac{\left(\sum_j \sum_k \frac{\bar{t}_{y,j,k}}{1 + E_{y,j,k}} \right) - \frac{\bar{t}_{y,m,n}}{1 + E_{y,m,n}}}{\left(\sum_j \sum_k \frac{1}{1 + E_{y,j,k}} \right) - \frac{1}{1 + E_{y,m,n}}} \quad (28)$$

$$kde j, k, m, n \in \mathbf{N}; \quad m, n \leq M; \quad m - 1 < j < m + 1; \quad n - 1 < k < n + 1$$

Tento postup označujeme jako selektivní filtrace. Nevýhodou tohoto postupu je, že je závislý na korektnosti detekce chybové matice, která nemusí být vždy bezchybná. Možné příčiny, které vedou k nekorektním výsledkům, jsou popsány v kapitole 4.6.5. Nejsou-li k dispozici okolní bloky s dostatečnou kvalitou, lze použít několik iterací aplikování této filtrace.

Selektivní filtrace byla testována, ale vzhledem k uspokojivé kvalitě měřených signálů není pevnou součástí používaných algoritmů pro registraci. Jsou-li na základě automatické detekce kvality registrovaných bloků a současného vizuálního ověření kvality (dle postupů uvedených v kapitole 4.6.5) detekovány chyby v trasování pohybu, je možné aplikací selektivní filtrace tyto chyby eliminovat.

4.7 Realizovaný SW

Ke zpracování a analýze signálů bylo využito programového prostředí Matlab verze R2007b (Mathworks). V grafickém uživatelském rozhraní GUI byla vytvořena aplikace (Signal Analysis), která umožňuje provádění základních operací s měřenými signály. Signály lze zobrazit formou videosekvence v režimu plného rozlišení nebo řezu (s možností využití optimalizovaného nastavením kontrastu). Aplikace dovoluje jednotlivé signály procházet, porovnávat nebo u nich realizovat základní operace pro jejich předzpracování. Prostředí umožňuje současné zobrazení signálu optického a elektrického mapování.

Pro nastavení realizovaného akvizičního systému a měření v reálném čase bylo využito prostředí V++ 5.0 (Digital Optics). V tomto prostředí byla navržena aplikace pro zobrazení průběhu AN na vybraných místech epikardu v reálném čase. To umožňovalo konfigurovat jednotlivé prvky systému (například geometrie LED) a současně sledovat odezvu těchto změn na měřené signály. Pro práci v reálném čase nelze využít mód snímání FT (přenos snímků), a tak měření probíhá v pomalejším módu N (normální). Snímkové frekvence pro tuto konfiguraci uvádí tabulka č. 3.

K vizualizaci signálů z jednobodového mapování byl využit software realizovaný v programovém prostředí C++ Builder (Code Gear). Systémy jednobodového a spektroskopického měření využívaly ke kontrole akvizice a měření vývojové prostředí LabView (National Instruments).

5. KAPITOLA

APLIKACE

Obsahem kapitoly:

Tato kapitola rozebírá možnosti využití navrženého systému pro měření a analýzu signálů. Popisuje aplikaci nově navržené poměrové techniky na jednobodové i plošné snímání. Dále představuje funkci navržených algoritmů pro registraci obrazů a s tím související míry potlačení pohybových artefaktů. Součástí je také zhodnocení kvality signálů v relaci s jejich dalším využitím. Jsou zde popsány dva nové přístupy zahrnující optické mapování na povrchu endokardu a aplikace přístupu pro současné elektrické i optické mapování AN.

5.1 Měřicí systém

Realizovaný systém, jehož návrh je popsán ve 3. kapitole, přináší kromě tradičního optického mapování několik nových přístupů. Systém byl designován tak, aby umožňoval využití nově navržené poměrové metody ve 2D a aby bylo možné realizovat optická měření nejen na povrchu epikardu, ale i endokardu. Kombinace tohoto zařízení s dříve realizovaným systémem pro elektrické mapování umožňuje přímé srovnání obou těchto modalit (na jednom vzorku, v daném čase). Pro měření AN byl definován standardní měřicí protokol, který umožňuje dosažení konzistentních výsledků jednotlivých měření.

U všech signálů představených v této kapitole, je možné sledovat průběh depolarizace na videosekvencích, uložených na přiloženém CD. Jejich seznam je uveden v příloze č. 1.

5.1.1. Měřicí protokol

Každé měření se může lišit podle požadavků na zkoumané parametry, měřicí protokol však obecně obsahoval tyto fáze měření. Tento měřicí protokol je výsledkem experimentálních měření ($n=12$) a je optimalizován vzhledem k dosažitelné kvalitě měřených signálů (SNR) a stabilitě měřeného preparátu (zejména eliminaci vzniku fibrilací a podobně).

- Extrakce orgánu a jeho stabilizace dle Langendorfa,
- aplikace fluorescenčního barviva / aplikace farmak,
- samotný měřicí experiment.

Pro měření byla využívána malé srdce (krysa), systém však umožňuje měření i na jiných orgánech (myš, králík). Po extrakci byly tyto orgány ponořeny do studeného (4°C) salinového roztoku. Do aorty byla zavedena a fixována kanyla a srdce bylo napojeno na Langendrofův perfúzní systém. K perfúzi byl použit okysličený ($95\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$), modifikovaný Krebsovým-Henseleitovým (K-H) roztok (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, MgSO_4 1.18 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, NaHCO_3 24.8 mM, Glucose 10 mM, CaCl_2 2.5 mM). Srdce byla perfundována pod konstantním tlakem ~ 80 mmHg při teplotě 36°C , a to po dobu stabilizace (30 minut).

Fáze barvení popisuje aplikaci fluorescenčního barviva na měřený vzorek. Zvolení vhodné koncentrace, délky barvení, stejně jako nastavení teploty a tlaku během jeho aplikace je klíčové pro průběh celého měřicího experiment a kvalitu dosažitelných výsledků. Jako barvivo je využito široce rozšířené di-4-ANEPPS. Jeho parametry a srovnání s dalšími alternativami lze najít v kapitole 2.4. Ačkoli jsou v této době syntetizovaná barviva s lepšími parametry než di-4-ANEPPS, bylo toto barvivo zvoleno na základě jeho dostupnosti a

širokého množství studií, které se zabývaly jeho aplikací, negativními účinky i výhodami (viz. kapitola 2.5). Koncentrace barviva byla zvolena na 1 μM v modifikovaném K-H roztoku, kterým byl perfundován koronární oběh měřeného vzorku po dobu 5 minut při rychlosti perfúze 720 ml/h. Rychlost perfúze byla zvýšena o ~10% oproti fázi stabilizace, z důvodu rovnoměrnější distribuce barviva v myokardu. Celá fáze barvení probíhala za pokojové teploty za účelem potlačení možných fibrilací, které jsme pozorovali u dřívějších experimentů při fyziologických teplotách. Obdobný přístup byl využit například v [64].

Aplikace dalších farmak je možná jednak před, jednak po fázi barvení. Většina prováděných experimentů byla provedena za absence dalších farmakologických látek. Některá měření však využívala farmakologický disociátor 2,3-butanedione monoxime (2,3-BDM, 15 mM), který byl přidán během fáze měření do perfúzního oběhu.

Fáze měření, která následuje po fázi barvení (po jedné minutě od jejího ukončení), představuje samotný měřicí experiment. Měření probíhá v jednotlivých úsecích definovaných v požadavcích konkrétního měření. Nejčastěji bylo měření zaměřeno na optické mapování elektrické aktivity na epikardu levé srdeční komory. Koncepce systému však umožňuje bez přerušování perfúze provést chirurgický řez komorou a umožnit měření na povrchu endokardu. Optické mapování na povrchu endokardu i epikardu je možné kombinovat se současným elektrickým mapováním (na odvrácené straně). Pole elektrod je možné využít také ke stimulaci v definované lokalitě.

Pro optické mapování byl realizován systém založený na EMCCD kameře, s využitím výkonových excitačních zdrojů LED. Systém byl společně s měřicím protokolem během realizace testován a upravován tak, aby bylo dosaženo co možná nejvyšší kvality měřených signálů, jak po stránce signálových úrovní, tak po stránce zajištění minimálního vlivu měření na fyziologii měřeného vzorku.

5.1.2. Základní nastavení optického akvizčního systému

Před samotným měřením bylo nutné provést několik základních nastavení. Nastavuje se výkon LED pomocí proudového zdroje. Základní nastavení pro obě LED bylo $I_F=650$ mA, toto nastavení však bylo možné v závislosti na požadavcích měnit. LED byly zapnuty alespoň 30 minut před počátkem měřicího experimentu, aby byla zajištěna teplotní stabilizace.

U kamery bylo potřeba nastavení optiky i režimu snímání. Pro optiku bylo klíčové nastavení geometrie snímání (velikost zorného pole, poloha vzorku a relativní pozice vůči systému měřicích elektrod), clony (výchozí F2) a provedení zaostření měřeného vzorku (ve fázi těsně před aplikací barviva).

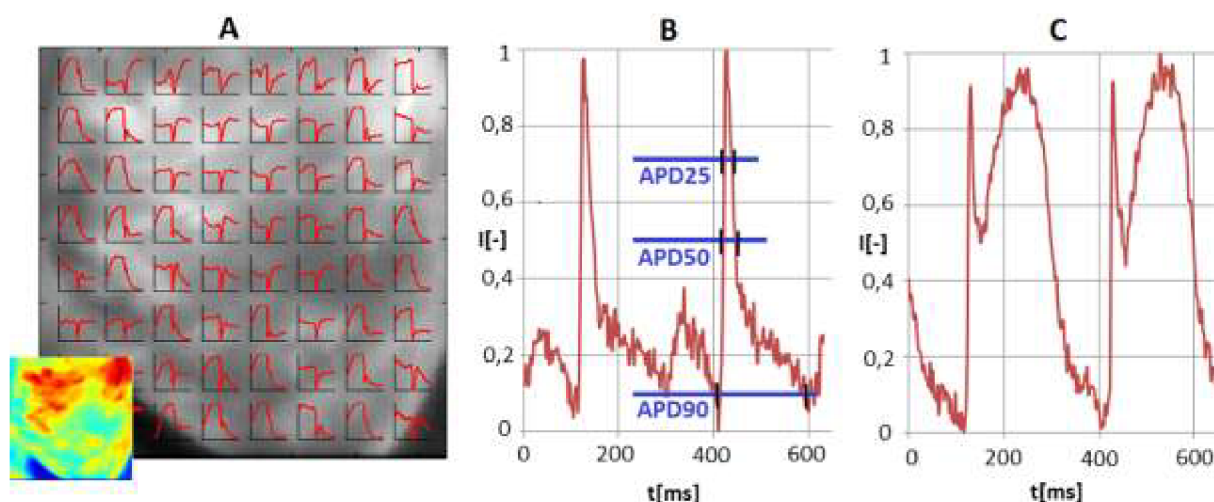
Nastavení akvizičních parametrů a způsobu snímání bylo přizpůsobeno způsobu měření. Pro experimentální měření bylo využito snímání v reálném čase. Pro tento druh měření bylo použito následující nastavení (snímací mód-normální (N), rozlišení 128x128, expoziční doba 1 ms, snímková frekvence 333 snímků/s) v tomto režimu bylo možné s využitím navrženého SW sledovat průběh AN v reálném čase ve zvolené lokalitě. Pro regulární měření však bylo využito módu, který to neumožňuje, ale poskytuje vyšší snímkovací frekvenci a delší expoziční čas. Pro tento druh měření použito následující nastavení (snímací mód-přenos snímků (FT), rozlišení 128x128, expoziční doba 2.5 ms, snímková frekvence 400 snímků/s). Snímaná oblast byla nastavena na 20x20 mm, což definuje plochu 156 μm^2 na snímaný pixel.

Před samotným měřením byla testována absolutní úroveň signálu a provedena opětovná kontrola zaostření.

5.1.3. Optické mapování AN

Měřené signály umožňují mapování elektrické aktivity na povrchu myokardu v relativně vysoké kvalitě. Prezentované optické signály (není-li uvedeno jinak) mají následující parametry. Rozlišení je 128x128 při bitové hloubce 16b a snímkovací frekvenci 400 snímků/s. Pro předzpracování bylo použito prostorové průměrování signálů (2x2). Časové průměrování, ani filtrace nebyla použita. Pro znázornění depolarizace-repolarizace myokardu bylo zvoleno zobrazení v plném rozlišení, kdy je provedeno odstranění stejnosměrné složky, normování signálů a barevné mapování dle intenzit (červená–maximální; modrá-minimální). Pro zobrazení těchto signálů nebyla korigována negativní modulace AN (depolarizace se projevuje poklesem intenzity) z důvodu možného rozlišení těchto signálů od signálů získaných elektrickým mapováním, u nichž je modulace pozitivní. Šíření depolarizace u optických signálů je tedy znázorněno pohybem plochy modré barvy (nízká amplituda odpovídající signálů na úrovni 10 mV). Měřicí systém umožňuje měření spontánní aktivity, nebo měření při využití stimulace. Dle současného měřicího protokolu a nastavení uvedeného výše bylo provedeno měření na srdcích krys (n=12).

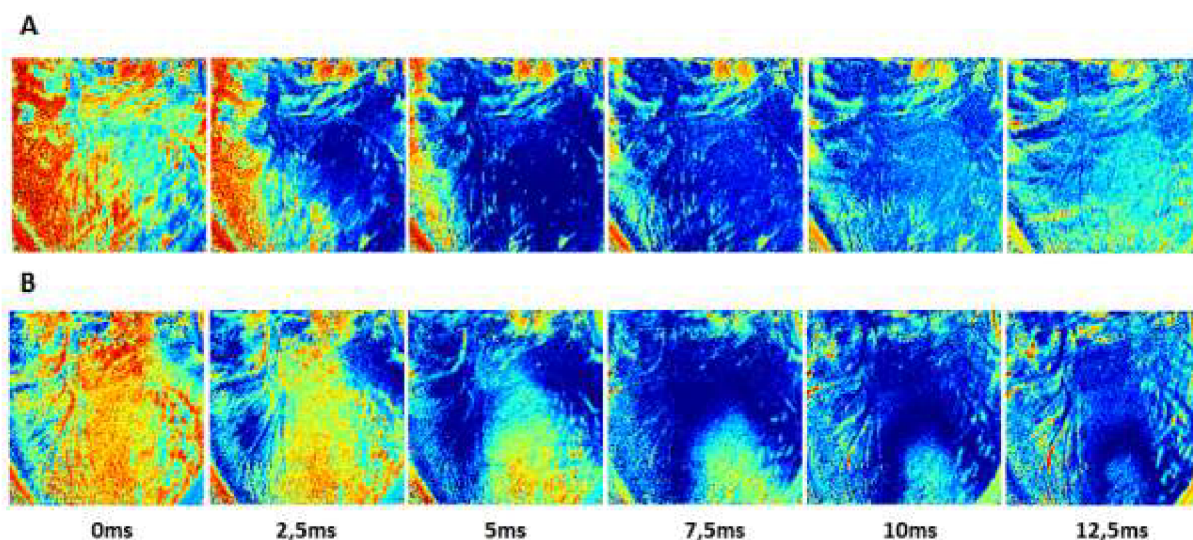
Obrázek č. 30 znázorňuje signály měřené na povrchu epikardu. Vzhledem k tomu, že v současném měřicím protokolu nebyly využity elektromechanické dissociátory, lze vidět, že některé signály jsou výrazně ovlivněny pohybovým artefaktem. U těchto signálů je obtížné, nebo nemožné stanovení délky trvání AN. V místech, kde má rozložení intenzity vysoký gradient, je přítomnost pohybových artefaktů čtenější a naopak. Délka AN je definována dobou od depolarizace po 25% (APD25), 50% (APD50) a 90% (APD90) repolarizaci. Představené signály mají SNR=13.5. U tohoto měření nebyla využita elektrická stimulace.



Obr. č.30: Optické mapování AN, **A:** rozložení signálů na povrchu myokardu, rozložení intenzit, **B:** signál bez pohybového artefaktu, stanovení délky AN, **C:** signál s pohybovým artefaktem

Optické mapování umožňuje sledování depolarizace myokardu. V navrženém systému je možné využití stimulačních elektrod systému UnEmap. Vzhledem k tomu, že stimulační/snímání elektrody jsou umístěny na odvrácené straně myokardu (vzhledem k opticky snímané části), není nutné řešit problematiku jejich optického stínu. Je-li potřeba provést stimulaci na přivrácené straně, lze použít externí elektrody. Pro stimulaci je využíváno pole 20x20 elektrod, které umožňuje prostorově definovat místo stimulace.

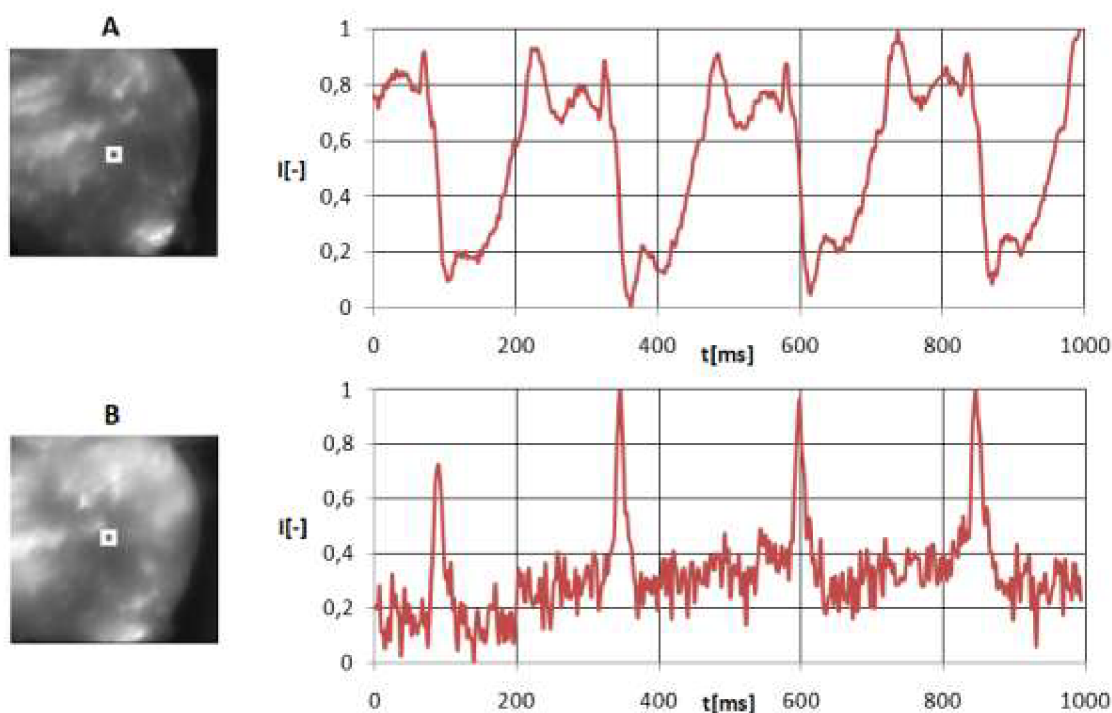
Na obrázku č. 31 lze vidět vizuální ukázkou šíření depolarizace pro měřený vzorek (RAT27) s využitím stimulace (31B, záznam č.7) a při sinusovém rytmu (31A, záznam č.8). Stimulační impuls byl situován do středu pole elektrod (mezi e-170 a e-190, BCL (perioda stimulace)=250 ms, 0.2 mA).



Obr. č.31: Měření depolarizace myokardu, snímky s odstupem 2.5 ms od počátku depolarizace, **A:** sinusový rytmus, **B:** stimulace

Vzhledem k tomu, že u provedených experimentů bylo předpokládáno využití registračních metod pro potlačení pohybových artefaktů, a tak nebylo využito farmakologických disociátorů, lze na představených snímacích pozorovat nerovnoměrné rozložení intenzit. Toto není přímo způsobeno neuniformním obarvením (v předzpracování je korigována DC složka), ale pohybem, který tak způsobuje změny stejnosměrné složky a znemožňuje její správnou korekci.

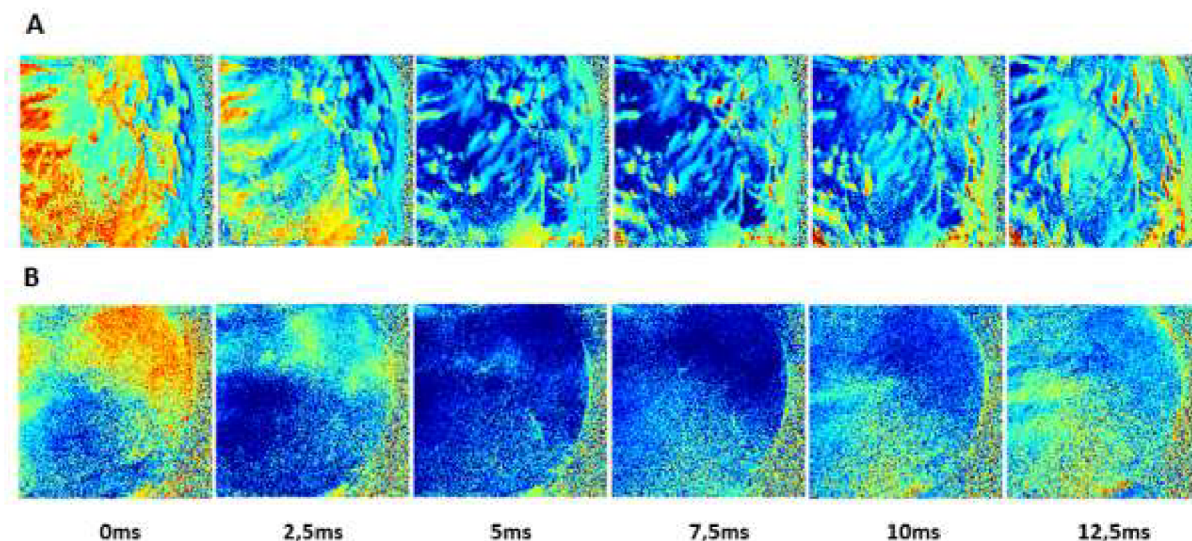
Pro eliminaci pohybu měřeného vzorku byla u některých záznamů testována mechanická fixace. Byla použita fixace pomocí sklíčka, kterým byl měřený vzorek přitlačen k poli elektrod na protější straně. Design systému neumožňuje přesné měření přitlačného tlaku. Ten byl nastaven tak, aby měřenému vzorku umožňoval alespoň minimální pohyb. Vliv mechanické fixace na měřené signály ilustruje obrázek č. 32. Zobrazené signály z experimentu (RAT20), bez využití fixace (32A, záznam č.4) a s využitím mechanické fixace (32B, záznam č.5). U měřeného záznamu AN je SNR=4 tato hodnota souvisí s relativně malou koncentrací fluorescenčního barviva (0.2 μM) použitého u tohoto experimentu.



Obr. č.32: Vliv mechanické fixace na potlačení pohybových artefaktů, **A:** bez fixace, **B:** s fixací

Vliv mechanické fixace je patrný na zobrazení depolarizace. Obrázek č. 33 ukazuje zobrazení pohybových artefaktů u měřeného signálu (33A), který se projevuje nerovnoměrným rozložením intenzit způsobeným neúčinným potlačením DC složky. Pro signál, kde je přítomnost pohybového artefaktu minimální (33B), je odstranění DC složky korektní a rozložení zobrazených intenzit rovnoměrnější. Poznamenejme, že přechod mezi

modrou a zelenou barvou (při porovnání snímků v 5 ms a 12.5 ms) ilustruje probíhající repolarizaci myokardu.



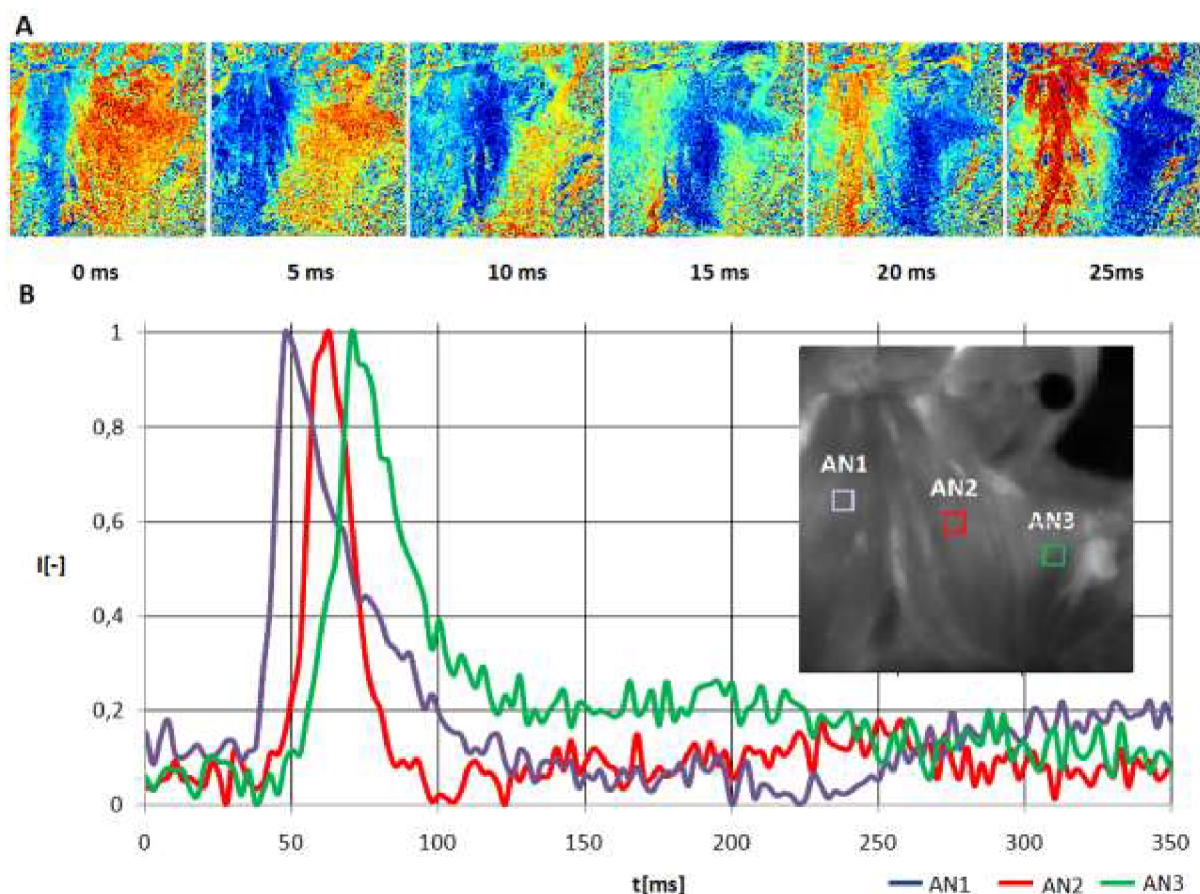
Obr. č.33: Vliv mechanické fixace na měřené signály, snímky s odstupem 2.5 ms od počátku depolarizace, **A:** bez mechanické fixace, **B:** mechanická fixace

5.1.4. Měření na endokardu

Pro optické mapování je typické měření na povrchu epikardu. Chceme-li provádět měření na endokardu, naskytuje se možnost využití endoskopických technik [79], které však mají omezené zorné pole a jsou aplikovatelné jen u větších orgánů (ovce, prase).

Pro měření na povrchu endokardu menších orgánů (myš, krysa, králík) byla navržena inovativní technika. Design navrženého měřicího systému byl přizpůsoben požadavku na možnost měření na povrchu endokardu. Během měření (perfúze) lze provést řez levou komorou a tak, při zachování životních funkcí měřeného orgánu, dále pokračovat při snímání AN na povrchu endokardu. Využitím tohoto přístupu není omezeno ani měření pomocí pole elektrod, které přiléhá k protější straně epikardu, a kromě simultánního měření umožňuje i stimulaci v definovaném bodě. Technika měření je v ostatních parametrech totožná s optickým mapováním na epikardu popsáním výše.

Měřené signály z povrchu endokardu (RAT26, záznam č.8) ukazuje obrázek č. 36. Šíření depolarizace lze vidět na (36A). Zobrazené průběhy AN (36B) byly získány z vyznačených lokalit endokardu, při použití prostorového průměrování 4x4. Fázový posun signálů AN (36B) odpovídá relativně pomalému šíření depolarizace (36A). SNR takto měřených signálů dosahoval SNR=11. Měření bylo provedeno bez stimulace při sinovém rytmu.

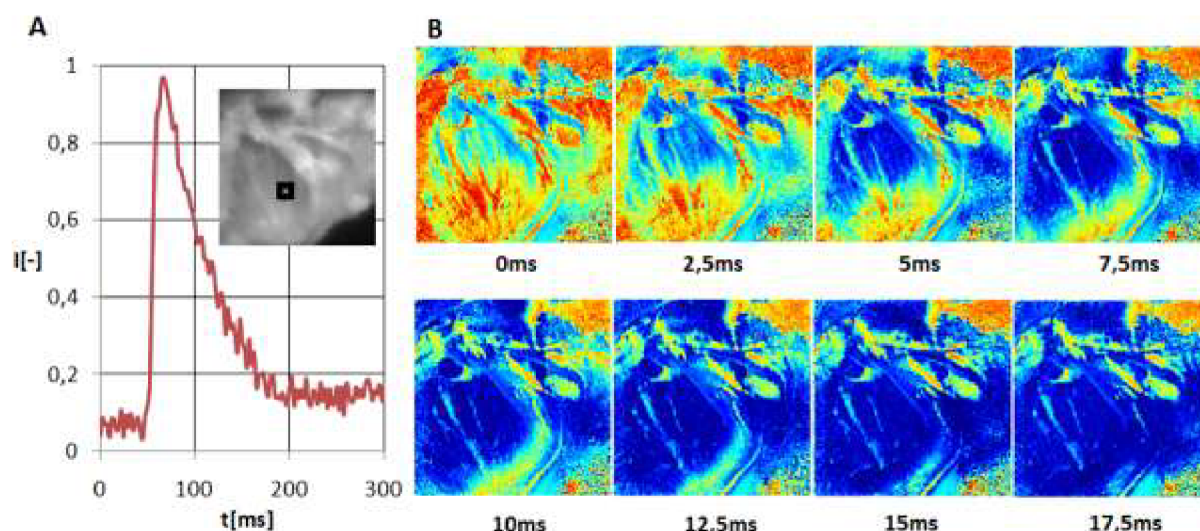


Obr. č.34: Měření na povrchu endokardu, **A:** šíření depolarizace, odstupy snímků 5 ms, **B:** signály AN ve vyznačených lokalitách

Pro měření na endokardu lze využít stejné prostředky jako pro měření na epikardu. Pro rovnoměrnou distribuci barviva, nebo jiných farmak, jsou tyto zavedeny do perfúzního oběhu před chirurgickým otevřením měřené komory.

V experimentu (RAT9, záznam č.6) bylo provedeno měření na endokardu s využitím farmakologického disociátoru BDM (10 mM BDM v perfúzním roztoku). Bylo využito stimulace ve středu pole elektrod (mezi e-210 a referenci, BCL=300 ms, 0.03 mA). Výsledky toho měření ukazuje obrázek č. 35. Měřený experiment probíhal za pokojové teploty. Průběh akčního napětí (35A) ve většině lokalit není ovlivněn pohybovými artefakty. Průběh depolarizace ilustruje (35B). SNR u těchto signálů dosahoval SNR=15.

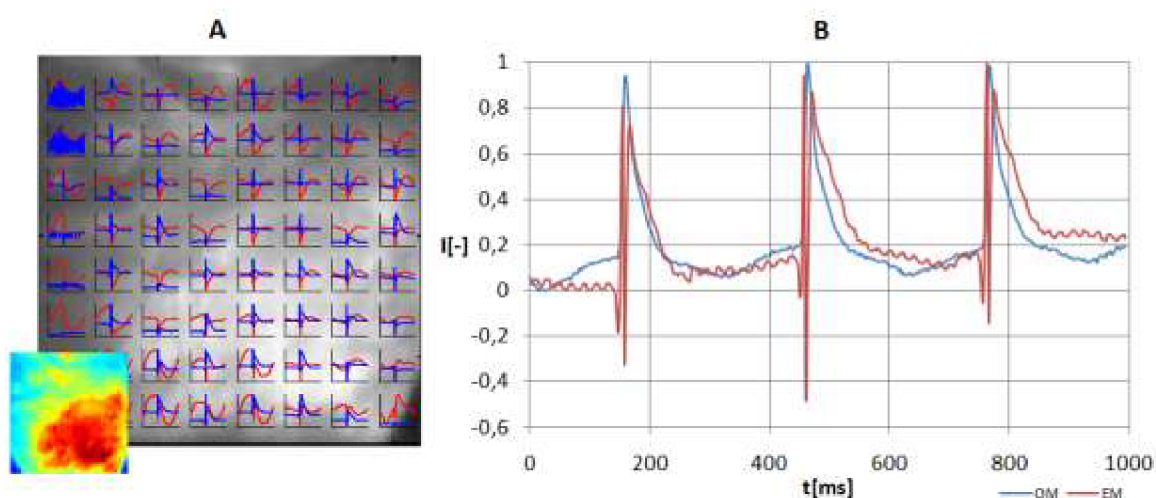
Tento přístup měření na endokardu nebyl doposud publikován, vzhledem k malému počtu realizovaných měření a jejich nedokončené analýze. Na návrhu této techniky se podíleli zástupci elektrofyziologické skupiny na Auckland Bioengineering institute. Návrh systému byl realizován autorem této disertační práce, metodiku řezu myokardu navrhla Sally Rutherford (Auckland Bioengineering institute).



Obr. č.35: Depolarizace endokardu, **A**: průběh AN ve vyznačeném bodě, **B**: sledování depolarizace, snímky s odstupem 2.5ms

5.1.5. Simultánní měření

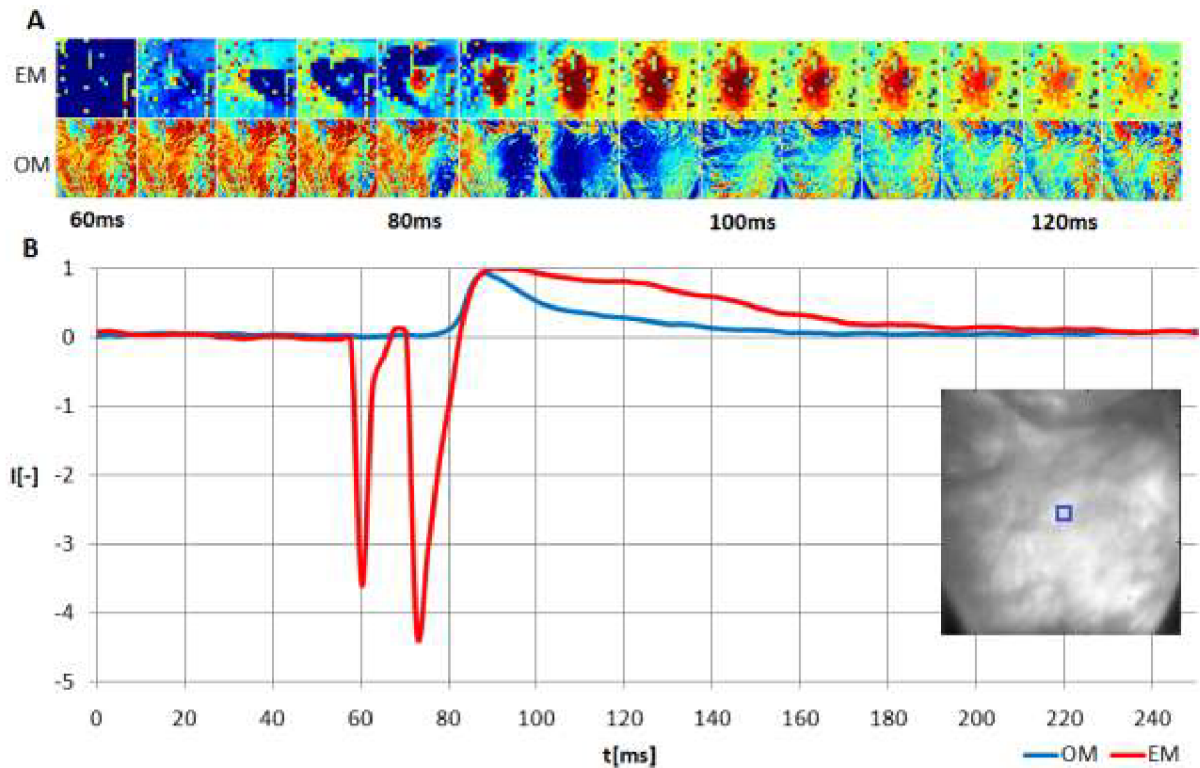
Návrh realizovaného systému umožňuje kombinaci elektrického a optického mapování. Měření pomocí pole elektrod je realizované na protější straně opticky snímané části měřeného vzorku. To umožňuje do určité míry sledovat průběh depolarizace v omezeném panoramatickém režimu (nejsou zobrazeny boční strany vzorku). Optické mapování poskytuje signály s vyšším prostorovým rozlišením, přičemž signály elektrické dosahují většího časového rozlišení (až 5 kHz). Pro společné zobrazení byly elektrické signály převzorkovány. Signály elektrického a optického mapování z experimentálního měření (RAT27, záznam č.8) ukazuje obrázek č. 36. Zobrazené signály byly měřeny bez využití stimulace. Rozložení signálů na ploše epikardu ukazuje (36A).



Obr. č.36: Signály elektrického a optického mapování, **A**: signály na povrchu epikardu, **B**: porovnání elektrického signálu a optického signálu AN

Porovnání elektrických signálů ve vybraném regionu a jim prostorově odpovídajícího optického záznamu AN je vidět na (36B). Měřené záznamy elektrické a optické, spolu významně korelují (s daným fázovým posunem). Lze sledovat vlnu obdobnou QRS komplexu v EKG signálů, která odpovídá depolarizaci AN a stejně tak obdobu P vlny, která odpovídá repolarizaci AN. SNR pro elektrické signály byl v rozmezí $SNR=20-40$, u optických signálů pak $SNR \approx 30$ (nebyl započítán vliv pohybového artefaktu). Signály elektrického mapování byly ovlivněny elektrickým šumem. Zejména je patrna 50Hz složka odpovídající síťovému kmitočtu. Optické signály byly průměrovány na ploše 6×6 pixelů, což přibližně odpovídá ploše jedné měřicí elektrody.

Zobrazení šíření depolarizace pro elektrické a optické mapování z experimentu (RAT27, záznam č.5) ukazuje obrázek č. 37. Pro měření bylo využito stimulace v čase $t=60\text{ms}$ ve středu pole (mezi e-230 a e-251, $BCL=250\text{ms}$, $0,1\text{mA}$). V elektrickém záznamu je patrné šíření depolarizace mezi 70-85 ms, znázorněno modrou vlnou (37A), jež odpovídá negativní vlně v grafu (37B). Šíření depolarizace na straně kamery je opožděno a je patrné mezi 80-95 ms, depolarizace má rovněž negativní amplitudu, která však byla pro korektní zobrazení AN korigována (37B). Repolarizace u elektrického signálu je reprezentována pozvolným poklesem pozitivní vlny signálu. Graficky je pak vyznačena poklesem intenzity u oblasti červené barvy na (37A-EM).

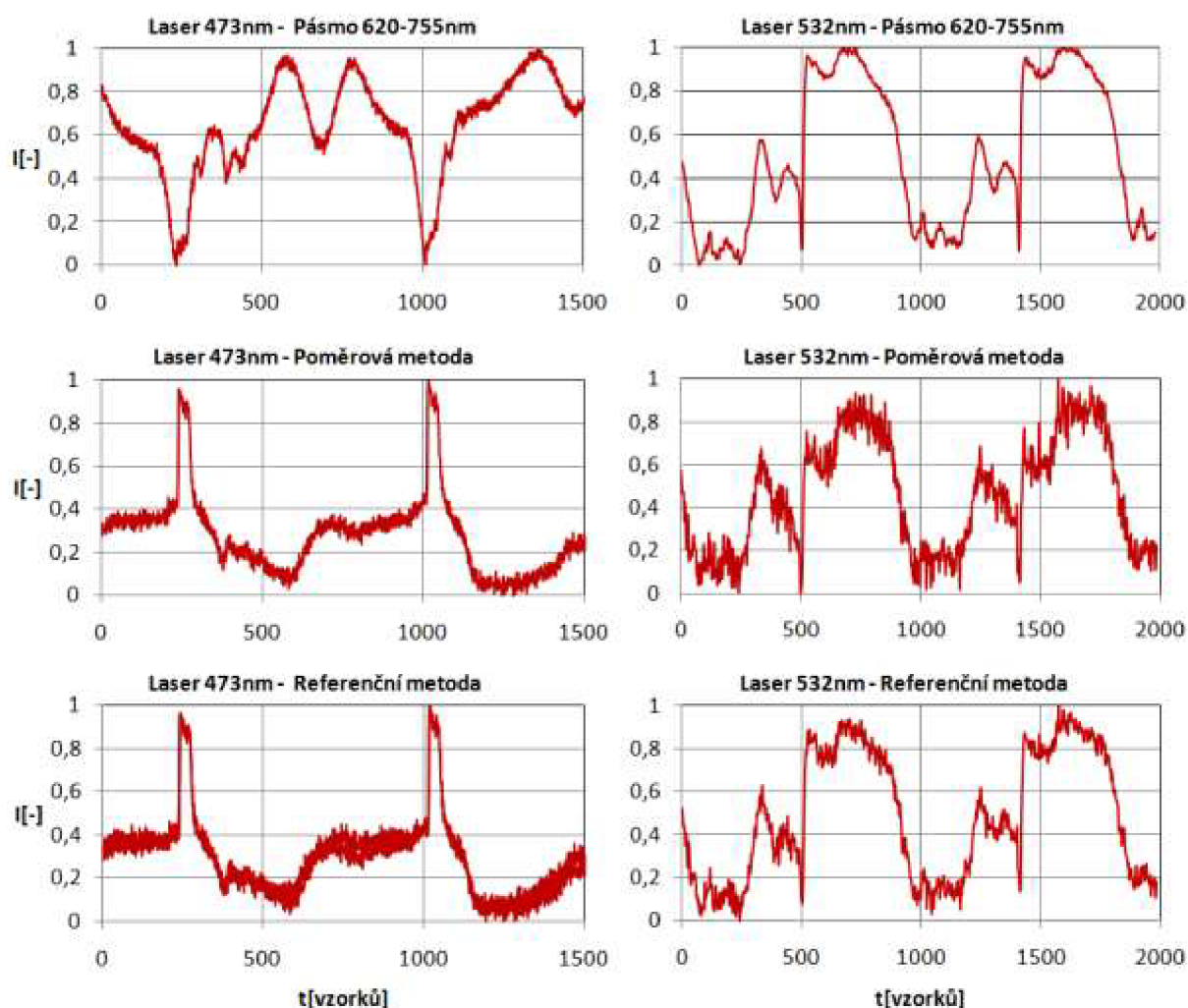


Obr. č.37: Simultánní měření při využití stimulace, **A:** zobrazení elektrických (nahore) a optických signálů (dole) po stimulačním impulsu v $t=60\text{ms}$, **B:** zobrazení optických (modrá) a elektrických (červená) signálu ve středu měřeného pole

5.2 Metody zpracování signálů

5.2.1. Referenční metoda

Hlavní výhodou ratiometrických metod je jejich schopnost potlačit pohybový artefakt. Nově představená referenční metoda (kapitola 4.4) byla z tohoto pohledu testována. Zde prezentované charakteristiky jsou obdobné pro všechny měřené experimenty, u nichž byla tato metoda aplikována ($n=6$). Obrázek č. 33 ukazuje výsledky měření pro experiment, kdy nebyly použity farmakologické disociátory. Měření bylo provedeno pro dva laserové excitační zdroje na 473 nm a 532 nm.



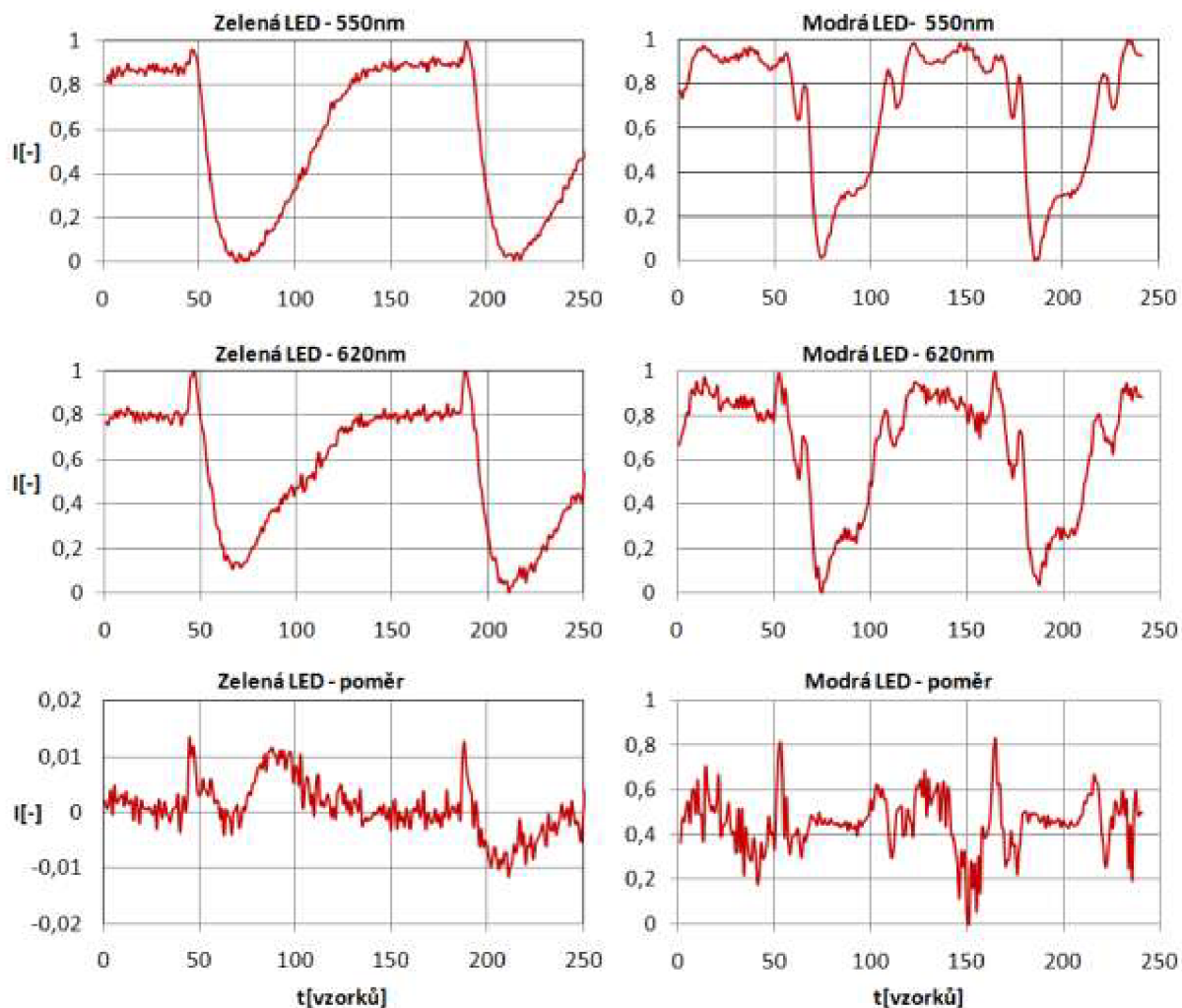
Obr. č.38: Porovnání účinnosti ratiometrických metod pro odstranění pohybových artefaktů při excitaci laserem 473 nm (vlevo) a 532 nm (vpravo). Měřený signál v základním pásmu 620-755 nm (nahore), klasická poměrová metoda (uprostřed) a nová Referenční metoda (dole)

Pro excitaci na 473 nm obě metody umožňují výrazné potlačení pohybových a jiných artefaktů a rekonstrukci měřeného AN s $SNR_P=12$ u poměrové metody a $SNR_R=10$ u metody referenční. Pro měření s excitačním zdrojem na 532 nm nebyla ani jedna z metod schopná

potlačení pohybových artefaktů. Jak bylo uvedeno v kapitole 4.3.1, odezva barviva na depolarizaci při buzení laserem na 532 nm nevykazuje spektrální posun, což vylučuje použití ratiometrických metod.

5.2.2. Referenční metoda ve 2D

Výsledky měření s využitím LED (LZ4-00G110-zelená, LZ4-00B210-modrá) jako excitačního zdroje ukazuje obrázek č. 34.



Obr. č.39: Porovnání účinnosti nově navržené referenční metod pro odstranění pohybových artefaktů při excitaci pomocí LED (zelená, modrá). Měřený referenční signál-referenční kanál (nahore), signál v základním pásmu-signálový kanál (uprostřed) a vypočteny poměrový signál (dole)

Navržená metoda je schopná výrazně potlačit pohybový artefakt a do určité míry rekonstruovat signál úměrný AN. Není zde zásadní rozdíl mezi signály z různých excitačních zdrojů. Nicméně z obrázku č. 33 je patrné, že referenční signál, při použití zelené LED, obsahuje složky úměrné AN, přičemž u excitace pomocí modré LED není modulace AN v referenčním kanálu patrná. To vysvětlujeme rozdílným chováním barviva v závislosti na

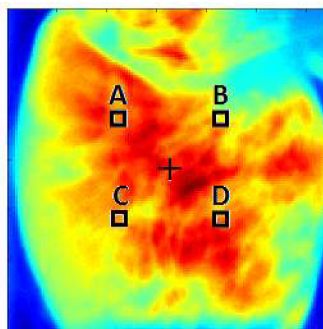
excitačním zdroji, jak bylo popsáno výše. Kvalita signálů vyjádřena poměrem SNR je velice nízká ($\text{SNR} \approx 2$). Výsledky byly podrobně popsány v [83].

5.2.3. Registrace obrazu

Pokročilou technikou zpracování signálů je využití registrace k potlačení pohybových artefaktů. Navržený algoritmus představený v kapitole 4.6 umožňuje účinné potlačení pohybových artefaktů. V této kapitole budou představeny jeho aplikace na datech z měřených experimentů, podle protokolu popsaného v kapitole 5.1.1.

Registrační algoritmus vyžaduje základní nastavení, která byla popsána v kapitole 4.6.3. Pro trasování pohybu měřeného pohybu je klíčová velikost registrovaných bloků a počet bloků na snímek. Pro optimalizaci registračního procesu pak nastavení oblasti možného pohybu registrovaného bloku mezi sousedními snímky, označovaná jako optimalizační rádius. Korektnost procesu registrace se testuje tak, jak bylo uvedeno v kapitole 4.6.5. Na základě testování kvality registrace je možné využití selektivní filtrace popsané v kapitole 4.6.6.

Pro proces registrace, není-li uvedeno jinak, byly využity následující parametry. Registrace byla provedena na úrovni sub-pixelu ($\frac{1}{4}$ velikosti originálního pixelu) s využitím bilineární interpolace. Rozlišení zpracovávaných snímků bylo 128×128 , respektive 509×509 po provedení interpolace. Velikost registračních bloků byla nastavena na $N=51$ a počet bloků v řádku i sloupci na $M=14$. Optimalizační rádius byl nastaven na $R=4$, což definuje maximální možný zaznamatelný pohyb mezi sousedními snímky na 1 pixel v originálním rozlišení. Při nastavení snímané oblasti kamery na plochu 20×20 mm, byl maximální zaznamatelný pohyb mezi dvěma sousedními snímky v libovolné ose, $|\mathbf{t}_{x,y,\max}| = 156 \mu\text{m}$. Před rekonstrukcí registrovaného snímku nebyla provedena filtrace měřených pohybových charakteristik.



Obr. č.40: Rozmístění kontrolních bodů pro porovnání AN, u registrované a neregistrované sekvence

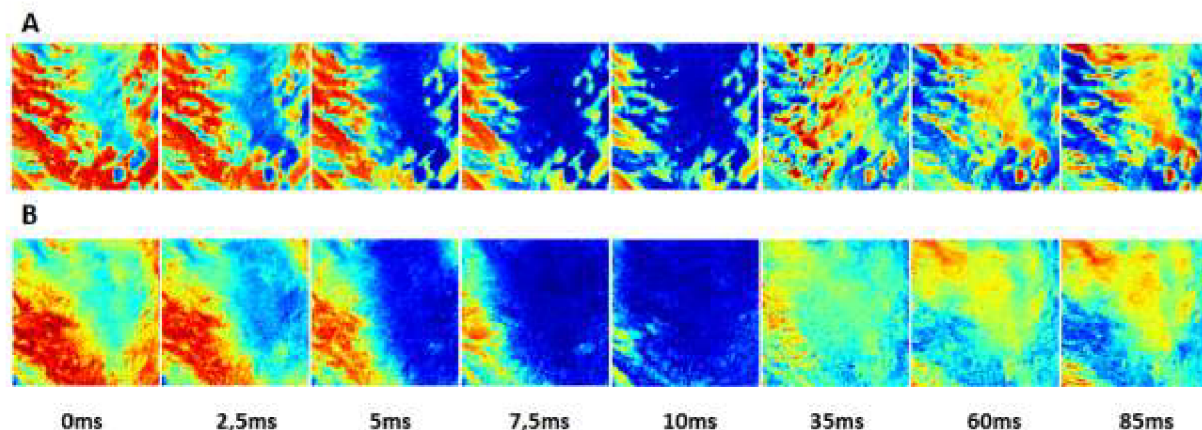
Pro demonstraci funkce registračního algoritmu byly vybrány čtyři záznamy z různých experimentů. Pro každý záznam jsou prezentovány výsledky zobrazující šíření depolarizace (repolarizace) a signály AN. Porovnávané signály AN u registrované a originální sekvence byly měřeny ve čtyřech lokalitách A, B, C a D, které byly vždy rozmístěny ve vertikální a

horizontální vzdálenosti 20 pixelů od středu snímku, jak ukazuje obrázek č. 40. Presentované signály jsou plošným průměr z plochy velikosti 2x2 pixelů. Snímky zachycující průběh depolarizace a repolarizace myokardu mají rozlišení 107x107 pixelů. Okraje snímků byly ořezány z obou stran tak, aby bylo možné provést registraci a prezentovat výsledky ve stejném formátu nezávisle na míře pohybu v konkrétním záznamu (bez artefaktů na okrajích snímků).

Verifikace registračního procesu je nedílnou částí registrace. Pro kontrolu kvality registrace signálů představených v této kapitole byly využity vizuální i automatické přístupy představené v kapitole 4.6.5. Prvním porovnávaným měřítkem, které indikuje úspěšnost registrace, je výsledná kvalita sledovaných signálů. Lze porovnat tvar AN s jeho předpokládanou charakteristikou (mírou potlačení pohybových a jiných artefaktů) a stanovit poměr těchto artefaktů k užitečné složce signálů (SAR). Pro signály, kde SAR je vyšší než 1.5, byla stanovena kvalita signálu hodnotou poměru SNR. Dalším aspektem je sledování depolarizace a repolarizace myokardu. Snímky ve správně registrované sekvenci by neměly obsahovat nežádoucí artefakty a mělo by být možné sledovat šíření depolarizace na měřené ploše. Druhým měřítkem je kontrola integrity (konzistentnosti) mřížky, tvořené získanými referenčními body. Tuto lze zobrazit formou videosekvence, a tak umožnit její vizuální kontrolu. Automatická kontrola registrace byla provedena pro všechny prezentované záznamy. Díky navrženému algoritmu můžeme stanovit kvalitu jednotlivých referenčních bodů. Výsledkem kontrolního algoritmu jsou dvě matice (vertikální a horizontální chyba), udávající souhrnnou chybovost trasování v registrované sekvenci pro jednotlivé bloky (referenční body). Posledním přístupem pro kontrolu pohybu v originální a registrované sekvenci bylo využití vizuální kontroly průměrného snímku. Ten by měl odpovídat referenčnímu snímku (snímek využívaný k registraci). Průměrný snímek by také neměl obsahovat kontury, které nejsou přítomné ve snímku referenčním.

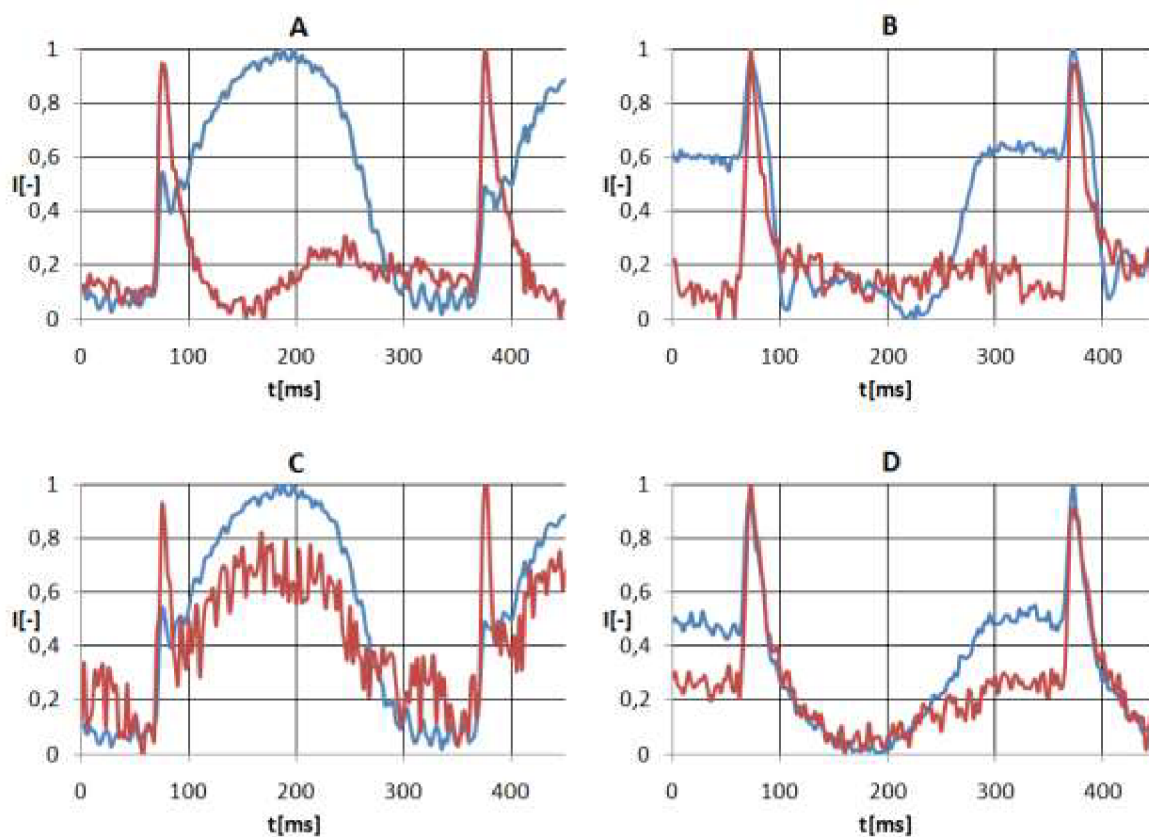
V následující části budou popsány a diskutovány výsledky implementace navrženého registračního algoritmu v oblasti optického snímání AN. Pro prezentaci funkce registračního algoritmu i jeho omezení, byly vybrány záznamy s různou mírou pohybu. Záznamy jsou seřazeny podle míry v nich obsaženého fyziologického pohybu od nejnižší po nejvyšší.

Záznam depolarizace myokardu z experimentu (RAT28, č.4) ukazuje obrázek č. 41. V neregistrované sekvenci (41A) jsou patrné artefakty, které neumožňují korektně reprodukovat depolarizaci epikardu. V registrované sekvenci (41B) je většina těchto artefaktů potlačena. Nicméně na snímcích v časovém úseku (0-5 ms) je v dolní levé části zobrazena červená oblast. Tato oblast nesouvisí s relativním pohybem měřené scény vs. kamera, ale vzniká v reakci na relativní polohu myokardu a osvětlovacích LED. Měřená plocha je osvětlována z jiného úhlu, což má za následek vznik takového artefaktu.



Obr. č.41: Šíření depolarizace (RAT28, č.4), **A:** originální sekvence, **B:** registrovaná sekvence

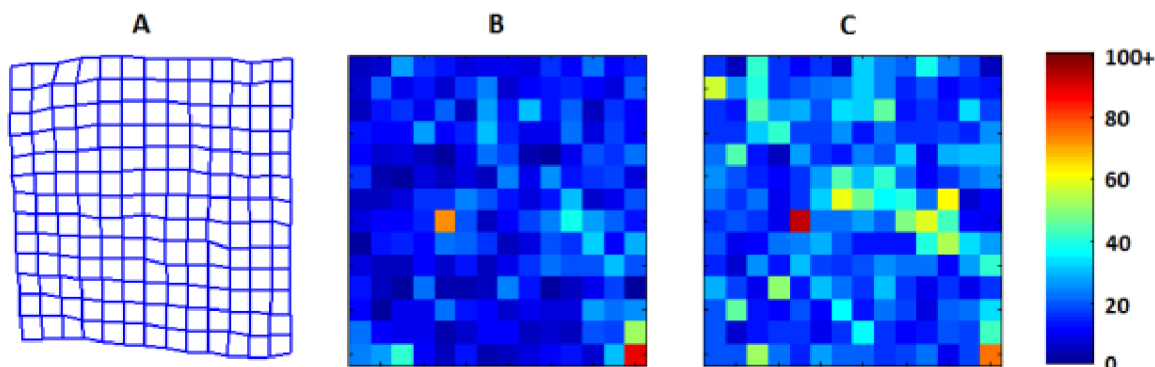
Obrázek č. 42 ukazuje signály z měřených lokalit A, B, C a D, tak jak byly definovány (viz. obrázek č. 40). Díky procesu registrace byly potlačeny pohybové artefakty a podařilo se rekonstruovat signály AN. Kvalitu potlačení pohybových artefaktů definujeme poměrem SAR_O , pro originální a SAR_R , pro registrovanou sekvenci. Hodnoty tohoto poměru byly stanoveny pro lokalitu A ($SAR_{OA}=0.4$; $SAR_{RA}=4.5$, $SNR_{RA}=14$), B ($SAR_{OB}=0.4$; $SAR_{RB}=4.5$, $SNR_{RB}=10$), C ($SAR_{OC}=0.2$; $SAR_{RC}=1.4$) a D ($SAR_{OD}=0.5$; $SAR_{RD}=4$, $SNR_{RD}=12$).



Obr. č.42: Signál AN v originální (modrá) a reg. sekvenci (červená) v pozicích **A**, **B**, **C** a **D**, (RAT28, č.4)

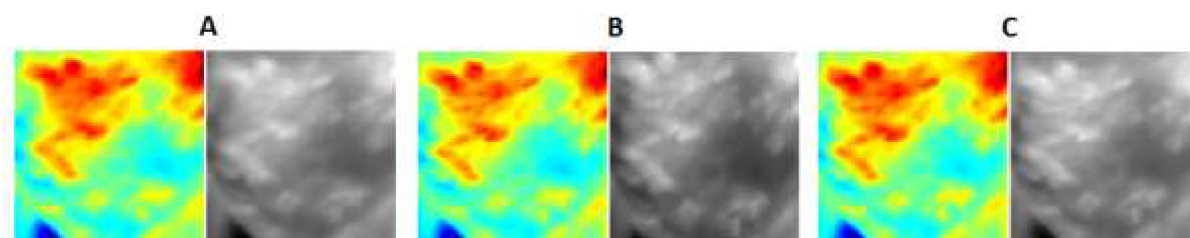
Kvalita vyjádřena poměrem SAR u registrovaných signálů byla, oproti neregistrované sekvenci, až 11krát vyšší. Nižší schopnost potlačení pohybového artefaktu v lokalitě C byla dána důvody popsány výše (vliv změny polohy snímané plochy vzhledem k LED).

Chybové matice a mřížku referenčních bodů ukazuje obrázek č. 43. Medián kumulované registrační chyby v horizontálním směru byl $\tilde{x}_h=12$, ve vertikálním směru pak $\tilde{x}_v=19$, pro délku sekvence $N=200$ snímků. Maximální zaznamenaný pohyb v horizontální ose $x_{max}=33$ px. (1.3 mm) a ve vertikální ose $y_{max}=30$ px. (1.2 mm).



Obr. č.43: Verifikace registrace (RAT28, č.4), **A:** mřížka referenčních bodů, **B:** chybová matice pro vertikální pohyb, **C:** chybová matice pro horizontální pohyb

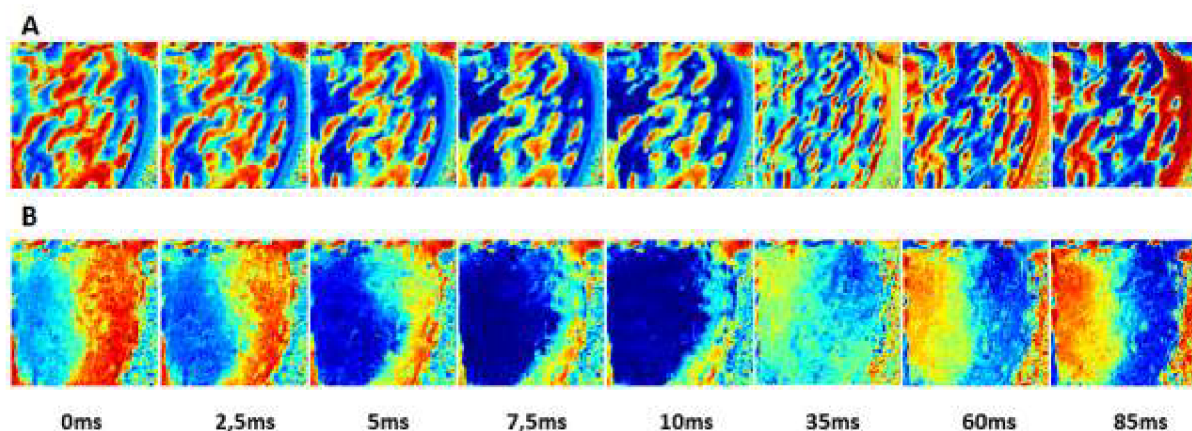
Na průměrných snímcích z obrázku č. 44, vzhledem k relativně nízkému pohybu, není příliš patrný rozdíl v ostrosti průměrných snímků registrované (44C) a originální sekvence (44A), ačkoli při bližším prozkoumání jsou rozdíly patrné, zejména na snímcích zobrazujících rozložení intenzit pomocí barevných map. Tento rozdíl bude lépe pozorovatelný u záznamů s větším pohybem měřeného vzorku. Referenční snímek (44B) je snímkem, ke kterému jsou registrovány ostatní snímky sekvence. Rozložení intenzit u průměrovaných snímků by mělo být v případě nulového pohybu obdobné tomu u referenčního snímku. Jak bylo popsáno v kapitole 4.6.5.



Obr. č.44: Signál (RAT28, č.4), **A:** průměrný snímek originální sekvence, **B:** referenční snímek, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

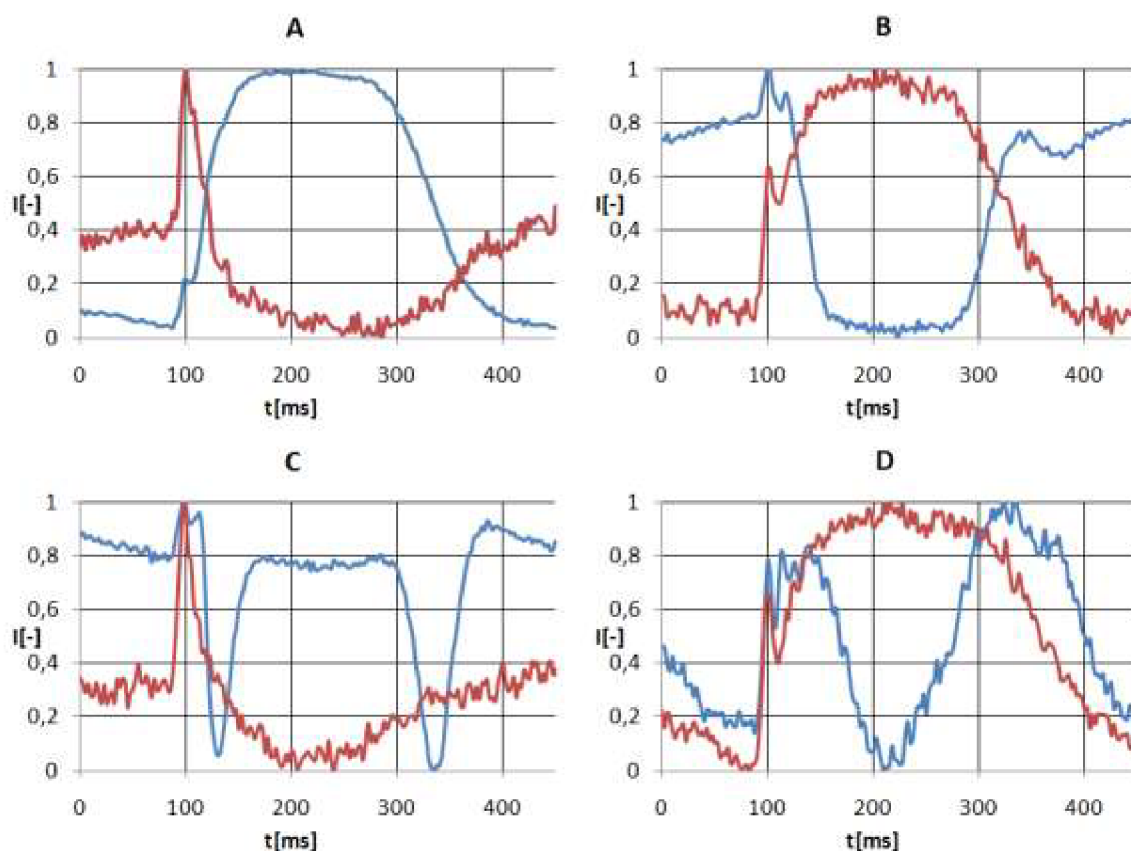
Záznam z experimentu (RAT19, č.1) ukazuje obrázek č. 45. Na tomto záznamu je patrná relativně větší míra pohybu. Originální sekvence obsahuje velké množství pohybových artefaktů, které znemožňují sledování šíření AN a jeho repolarizaci. V registrované sekvenci (45B) je však sledování průběhu depolarizace a repolarizace

epikardu možné. Registrovaná sekvence ovšem také obsahuje množství artefaktů, které nemají rozptýlený charakter (stejně jako v 49A), ale představují větší plochy s různou intenzitou (45B), jejichž vznik opět souvisí s relativní polohou vzorku k osvětlovacím prvkům.



Obr. č.45: Šíření depolarizace, (RAT19, č.1), **A:** originální sekvence, **B:** registrovaná sekvence

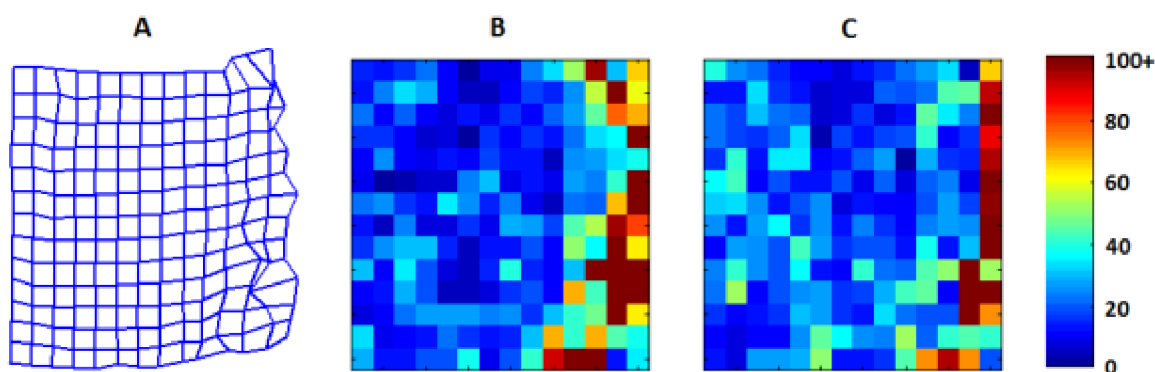
V záznamu AN na obrázku č. 46 lze pozorovat přítomnost pohybových artefaktů o relativně vysoké amplitudě. Rekonstruované signály v lokalitě A a C ukazují jejich účinné potlačení. V záznamech v lokalitě B a D je zřetelný vliv změny nasvětlení vzorku a s tím související vnik nežádoucího artefaktu, který se registrací nepodařilo odstranit.



Obr. č.46: Signál AN v originální (modrá) a reg. sekvenci (červená) v pozicích **A**, **B**, **C** a **D**, (RAT19, č.1)

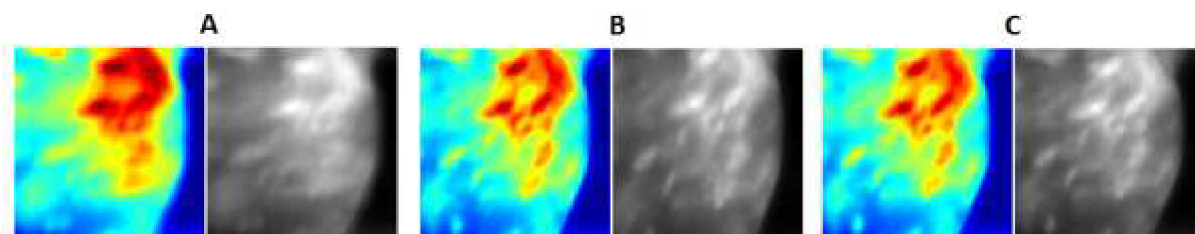
Hodnoty SAR byly stanoveny pro lokalitu A ($SAR_{OA}=0$; $SAR_{RA}=1.5$, $SNR_{RA}=12$), B ($SAR_{OB}=0$; $SAR_{RB}=0.1$), C ($SAR_{OC}=0$; $SAR_{RC}=2.3$, $SNR_{RC}=10$) a D ($SAR_{OD}=0.2$; $SAR_{RD}=0.2$).

Chybové matice a mřížka referenčních bodů (obrázek č. 47) ukazují na problematická místa, kde registrační algoritmus nebyl schopen korektně trasovat pohyb referenčních bodů. Je možné vidět, že automatická detekce korektnosti registrace, s využitím navrženého algoritmu, umožňovala lokalizaci problémových míst. Tato místa lze také vizuálně pozorovat na deformované mřížce referenčních bodů (47A). Příčina nekorektního trasování v těchto bodech je zřejmá z obrázku referenčního snímku (48B), který ukazuje, že problematické části snímku spadají do oblasti, kde nebyl zobrazován měřený vzorek, ale pouze pozadí měřené scény. Medián kumulované registrační chyby v horizontálním směru (pouze v oblasti vzorku) byl $\tilde{x}_h=16$, ve vertikálním směru pak $\tilde{x}_v=20$, pro délku sekvence $N=200$ snímků. Maximální zaznamenaný pohyb v horizontální ose $x_{max}=54$ px. (2.1 mm) a ve vertikální ose $y_{max}=20$ px. (0.8 mm). Rozdíl pohybu v jednotlivých osách je dán zavěšením vzorku za perfúzní kanylu (omezení vertikálního pohybu).



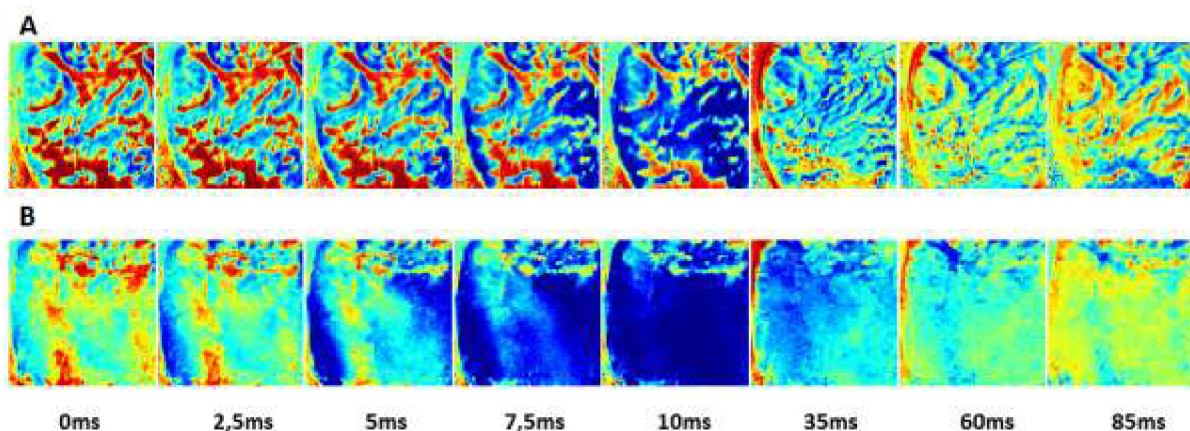
Obr. č.47: Verifikace registrace (RAT19, č.1), **A:** mřížka referenčních bodů, **B:** chybová matice pro vertikální pohyb, **C:** chybová matice pro horizontální pohyb

Na obrázku č. 48 lze pozorovat zřetelné rozdíly mezi průměrným snímkem originální (48A) a registrované sekvence (48C). Rozdíly mezi průměrným snímkem registrované sekvence a referenčním snímkem jsou téměř zanedbatelné, což ukazuje na kvalitu provedené registrace.



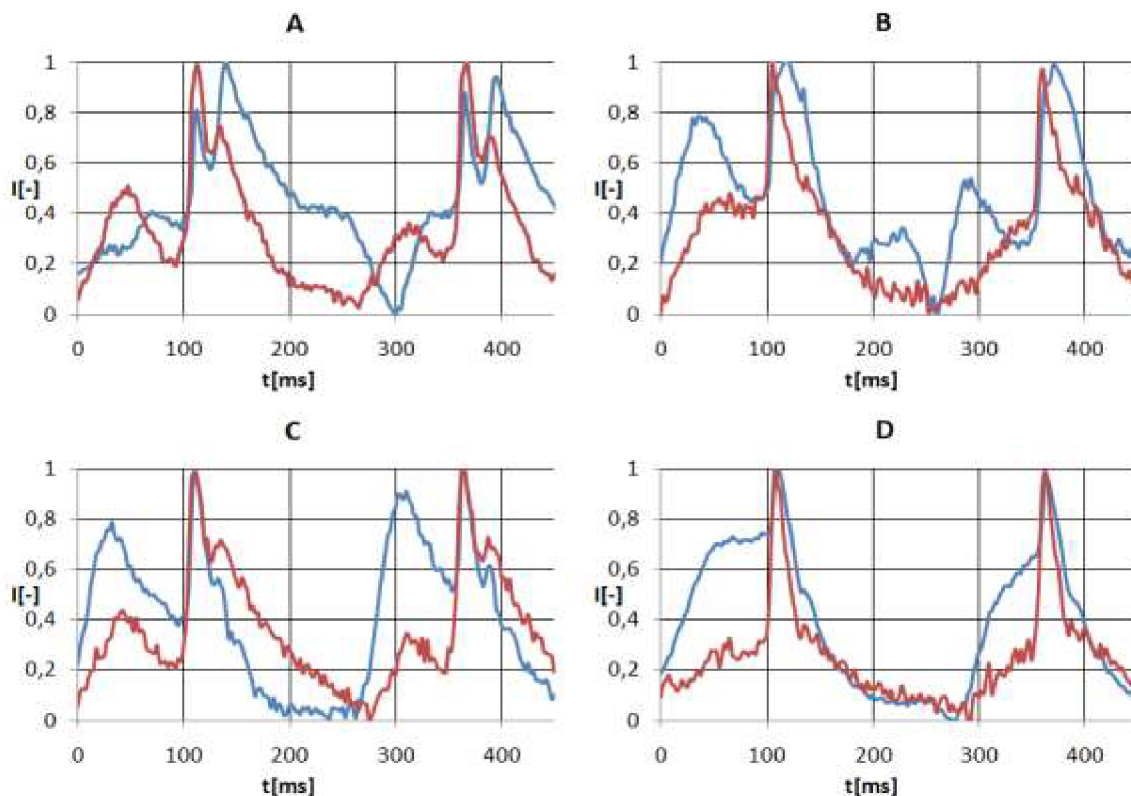
Obr. č.48: Signál (RAT19, č.1), **A:** průměrný snímek originální sekvence, **B:** referenční snímek, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

Záznam z experimentu (RAT27, č.3) ukazuje obrázek č. 49. Registrovaná sekvence (49B) umožňuje sledování průběhu depolarizace. Originální sekvence (49A) je zatížena mnohými pohybovými artefakty, což sledování průběhu depolarizace znemožňuje.



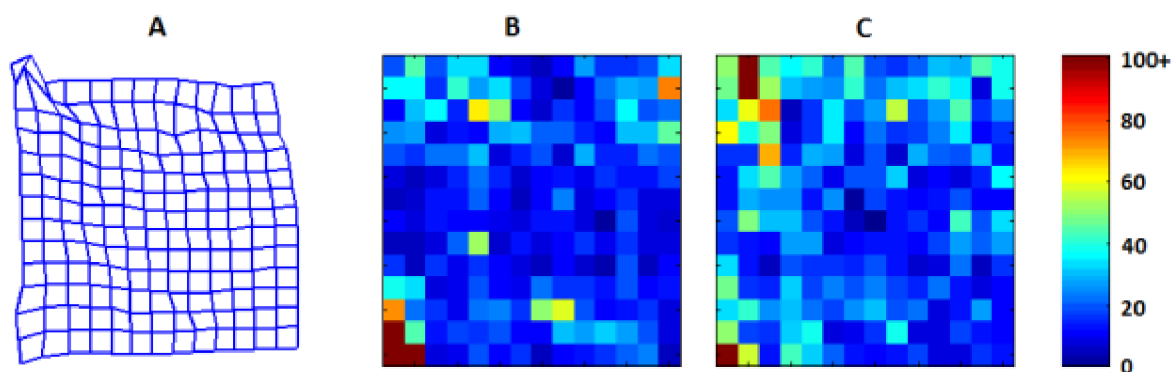
Obr. č.49: Šíření depolarizace, (RAT27, č.3), **A:** originální sekvence, **B:** registrovaná sekvence

Záznamy AN na obrázku č. 50 demonstrují zlepšení kvality měřených signálů v porovnání originální a registrované sekvence. Signály jsou i přes registraci zatíženy pohybovými artefakty. V oblasti D bylo potlačení artefaktu nejúčinnější. Hodnoty SAR byly stanoveny pro lokalitu A ($SAR_{OA}=0,4$ $SAR_{RA}=0,7$), B ($SAR_{OB}=0$; $SAR_{RB}=1,5$, $SNR_{RB}=10$), C ($SAR_{OC}=0,6$; $SAR_{RC}=1,3$) a D ($SAR_{OD}=0,2$; $SAR_{RD}=2,3$, $SNR_{RD}=12$).



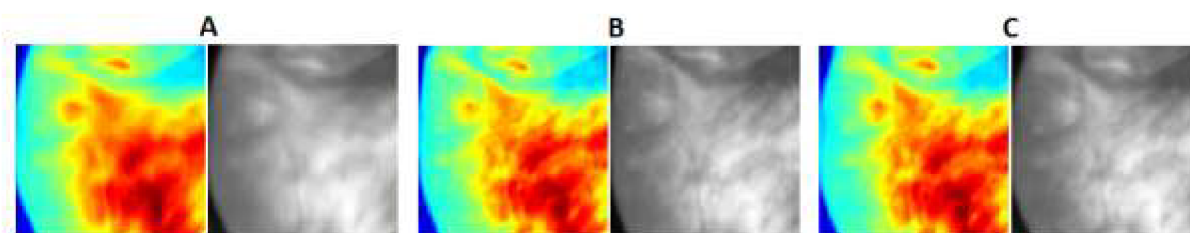
Obr. č.50: Signál AN v originální (modrá) a reg. sekvenci (červená) v pozicích **A**, **B**, **C** a **D**, (RAT27, č.3)

Chybové matice a mřížku referenčních bodů ukazuje obrázek č. 51. Medián kumulované registrační chyby v horizontálním směru (pouze v oblasti vzorku) byl $\tilde{x}_h=16$, ve vertikálním směru pak $\tilde{x}_v=18$, pro délku sekvence $N=200$ snímků. Maximální zaznamenaný pohyb v horizontální ose $x_{max}=50$ px. (1.96 mm) a ve vertikální ose $y_{max}=38$ px. (1.49 mm). Vzhledem k vyššímu pohybu je možné sledovat větší míru deformace mřížky (51A), přičemž chybovost registračního procesu, tak jak ji ukazují chybové matice (51B,C), je v porovnání se záznamy představenými výše obdobná. Vyznačená místa s vysokou chybovostí (100+) odpovídají části snímku, kde není zobrazen měřený vzorek, ale pozadí scény.



Obr. č.51: Verifikace registrace (RAT27, č.3), **A:** mřížka referenčních bodů, **B:** chybová matice pro vertikální pohyb, **C:** chybová matice pro horizontální pohyb

Průměrné snímky originální a registrované sekvence ukazuje obrázek č. 52. Ztráta detailu, respektive rozmazání obrazu u průměrného snímku originální sekvence (52A) dokumentuje vyšší míru pohybu v obraze. Rozdíl mezi referenčním snímkem (52B) a průměrným snímkem registrované sekvence (52C) je minimální, což ukazuje, že i zde by měla být registrace korektní.

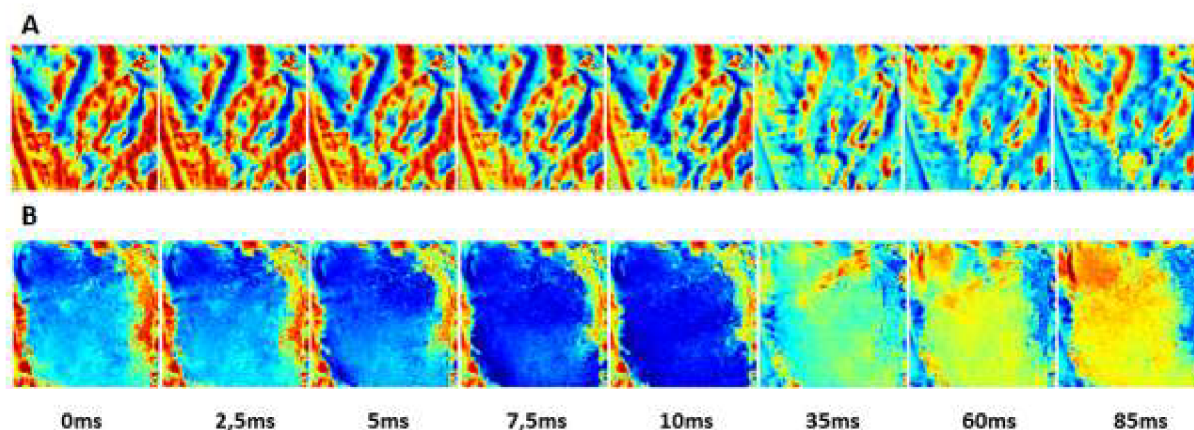


Obr. č.52: Signál (RAT27, č.3), **A:** průměrný snímek originální sekvence, **B:** referenční snímek, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

Záznam depolarizace myokardu z experimentu (RAT26, č.4) ukazuje obrázek č. 53. V neregistrované sekvenci (53A) je téměř nemožné lokalizovat začátek i průběh depolarizace. To ovšem neplatí pro registrovanou sekvenci (53B), kde je průběh depolarizace zřejmý. Originální sekvence obsahuje velké množství pohybových artefaktů, které se pomocí navrženého registračního postupu podařilo do jisté míry eliminovat.

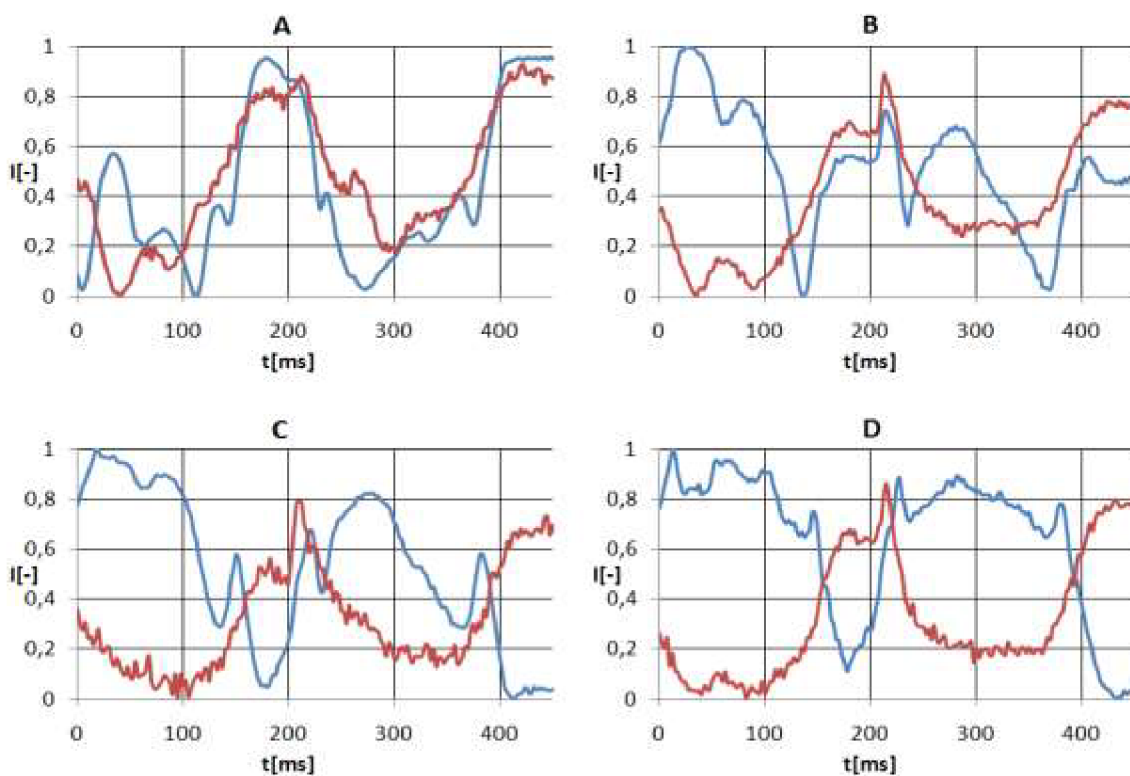
Aplikace

Měřené signály AN ve všech lokalitách A, B, C i D jsou značně zatíženy pohybovými artefakty. Tyto artefakty se převážně nepodařilo eliminovat ani v registrované sekvenci. V žádné z lokalit A, B, C ani D nebylo možné přesně definovat průběh AN, v registrované sekvenci v lokalitách B, C, a D je možné lokalizovat počátek depolarizace, signály AN obsahují vysokou míru pohybových artefaktů.



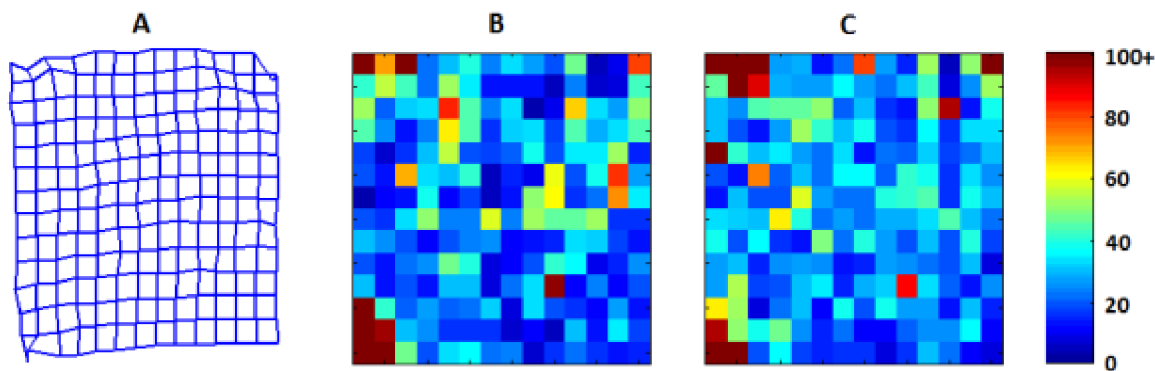
Obr. č.53: Šíření depolarizace, (RAT26, č.4), **A**: originální sekvence, **B**: registrovaná sekvence

Hodnoty SAR byly stanoveny pro lokalitu A ($SAR_{OA}=0$ $SAR_{RA}=0$), B ($SAR_{OB}=0$; $SAR_{RB}=0.2$), C ($SAR_{OC}=0$; $SAR_{RC}=0.2$) a D ($SAR_{OD}=0$; $SAR_{RD}=0.2$).



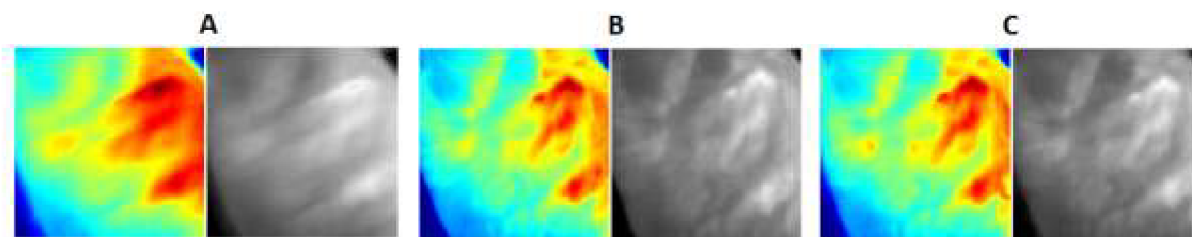
Obr. č.54: Signál AN v originální (modrá) a reg. sekvenci (červená) v pozicích **A**, **B**, **C** a **D**, (RAT26, č.4)

Chybové matice a mřížku referenčních bodů ukazuje obrázek č. 55. Medián kumulované registrační chyby v horizontálním směru (pouze v oblasti vzorku) byl $\tilde{x}_h=18$, ve vertikálním směru pak $\tilde{x}_v=20$, pro délku sekvence $N=200$ snímků. Tyto hodnoty jsou mírně vyšší jako ty, pro experimenty s nižší mírou zaznamenaného pohybu. Maximální zaznamenaný pohyb v horizontální ose $x_{max}=86$ px. (3.4 mm) a ve vertikální ose $y_{max}=39$ px. (1.5 mm).



Obr. č.55: Verifikace registrace (RAT26, č.4), **A:** mřížka referenčních bodů, **B:** chybová matice pro vertikální pohyb, **C:** chybová matice pro horizontální pohyb

Obrázek č. 56 ukazuje průměrné snímky originální a registrované sekvence. U originální sekvence průměrný snímek neobsahuje téměř žádné detaily, které jsou patrné ve snímku referenčním. To neplatí pro průměrný snímek registrované sekvence, kde je rozložení intenzit a míra zobrazených detailů téměř totožná. Toto demonstruje, že i v případě takto relativně vysoké míry pohybu, je navržený algoritmus schopen korektní registrace.



Obr. č.56: Signál (RAT26, č.4), **A:** průměrný snímek originální sekvence, **B:** referenční snímek, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

6. KAPITOLA

DISKUZE A ZÁVĚR

Obsahem kapitoly:

Závěrečná kapitola diskutuje dosažené výsledky v oblasti návrhu měřicího systému a pokročilých algoritmu pro zpracování signálů. Stejně tak popisuje vlastnosti navržených přístupů a možnosti navazujícího výzkumu. Závěr shrnuje tyto výsledky v relaci s realizovanými publikacemi.

6.1 Diskuze dosažených výsledků

6.1.1. Měřicí systém

V rámci plnění cílů disertační práce byl navržen a realizován měřicí systém pro optické mapování elektrické aktivity myokardu na izolovaných srdcích. Tento systém kromě optického mapování na povrchu epikardu, umožňuje i další inovativní přístupy, jakými jsou měření na povrchu endokardu, využití nově navržené poměrové metody ve 2D a simultánní optické a elektrické mapování. Návrh tohoto systému byl detailně popsán v kapitole 3. Tento návrh zahrnoval design samotného systému, jeho fyziologické a snímací části a v neposlední řadě i návrh měřicího protokolu. Základní koncepce návrhu vycházela ze zkušenosti získaných na základě studia nejnovějších poznatků v dostupné literatuře, měření na jednobodovém měřicím systému [66], dostupném na domovském pracovišti Ústavu Biomedicínského inženýrství, VUT Brno a dále při měření na systému spektroskopickém [12], dostupném na partnerském pracovišti Auckland Bioengineering Institute, Auckland, New Zealand. Realizace měřicího systému spočívala v detailním návrhu jeho designu s využitím moderních CAD nástrojů. Nejdůležitějšími prvky, které umožnily realizaci nových přístupů, byly inovativní návrh designu měřicí komůrky (kap. 3.3.2) a translačního systému pro rychlou výměnu filtru (kap. 3.4.4).

Kromě návrhu fyzické realizace systému, bylo potřeba provést i měření spektrálních charakteristik světelných zdrojů (kap. 3.4.1) a použitých filtrů (kap. 3.4.5) s navazujícími úpravami a změnami. Součástí návrhu byl i design perfúzního a termoregulačního systému pro zajištění fyziologických podmínek měřených vzorků (kap. 3.3). Další z otázek byla správná volba měřicího módu a nastavení parametrů snímací kamery Cascade 128+ (kap. 3.4.2). Návrh měřicího protokolu (kap. 5.1.1) byl jednou z nejdůležitějších částí realizovaného systému. Měřicí protokol definuje průběh měření a determinuje kvalitu měřených signálů, ať po stránce fyziologické, nebo technické. Jeho návrh vycházel z předešlých zkušeností a výsledků získaných při experimentálních měřeních (n=12). Sada experimentálních měření sloužila také k doladění parametrů konečné verze systému.

Optické mapování elektrické aktivity na povrchu myokardu představuje základní funkci systému. Díky použité technice osvětlení, snímací kameře a jejího nastavení umožňuje měřicí systém dosažení relativně vysoké kvality signálů. Pro nastavení, tak jak bylo uvedeno v měřicím protokolu, byl dosažitelný SNR, pro měření v plném rozlišení 128x128, 400 snímků/s, u provedených experimentů (n=12), typicky v rozmezí $SNR \approx 4-9$. Tyto hodnoty jsou ve srovnání s ostatními systémy nadprůměrné. Přímé srovnání je však obtížně realizovatelné, protože systémy využívají rozdílné rozlišení, snímkovou frekvenci,

velikost zobrazované oblasti, koncentraci nebo druh barviva i intenzitu (případně vlnovou délku) světelných zdrojů, přičemž všechny ze zmíněných parametrů mají zásadní vliv na kvalitu měřených signálů, nebo i možnosti ovlivnění fyziologie měřeného vzorku (druh a koncentrace barviva, intenzita světelných zdrojů). Porovnatelný systém (128x128, binning 2x2, $f_s=466$ snímků/s, di-4-ANEPPS- 1 μ M, fáze barvení $t_b=5$ min.) byl popsán v [68]. Autoři uvádějí, pro zmíněné nastavení $SNR=3.7\pm 0.8$. Stejně i vyšší hodnoty SNR dosahují signály, měřené zde navrženým systémem, při rozlišení 128x128 bez využití binningu. Při obdobném rozlišení lze u realizovaného systému dosáhnout SNR až 18. Pro systémy s mírně odlišným rozlišením snímací kamery udávají autoři následující hodnoty: $SNR=8.8$ (80x80px, $f_s=200-800$ snímků/s.) [43], $SNR=12$ (100x100, $f_s=2000$ snímků/s) [76].

Pro předzpracování měřených signálů bylo využito zpravidla plošného průměrování a to nejčastěji na ploše 2x2 pixelů, průměr byl realizován nad normalizovanými signály. Toto nastavení umožňovalo více než dvou-násobné zlepšení parametru SNR. Pro měření je také možné využití kamerového módu, který umožňuje realizovat plošný průměr přímo v kameře (tzv. binning 2x2), to přináší zdánlivě stejný efekt jako použité prostorové průměrování (2x2) s výhodou vyšší snímkovací frekvence, až 625 snímků/s, ale na druhé straně může způsobit i problémy, související s průměrováním signálů s rozdílnou stejnosměrnou složkou. Toto souvisí s neuniformní distribucí barviva, která dále může způsobit vznik dodatečné deformace signálu AN, nebo výrazně omezit schopnosti zlepšení SNR. Časové průměrování nebylo využito, ale jeho využití je možné například v aplikacích, kde je prostorové rozlišení klíčové. K synchronizaci signálů lze pak využít jak samotného záznamu AN, tak el. kanálů měřících EKG signály, jak bylo popsáno v kapitole 4.2.2.

Měřicí systém byl navržen tak, aby umožňoval kromě klasického optického mapování i kombinaci s měřením pomocí pole elektrod. Tedy kombinaci elektrického a optického mapování, jak bylo popsáno v kapitole 5.1.5. Pole elektrod poskytuje rozlišení 20x20 elektrod, při vzorkovací frekvenci až $f_{vz}=5$ kHz a dosažitelném $SNR\approx 40$. Každá z elektrod umožňuje snímání, stimulaci, nebo snímání i stimulaci, což rozšiřuje možnosti systému o testování režimu stimulace v definovaném plošném uspořádání, sekvenci. Omezení snímání pomocí pole elektrod bylo diskutováno v 1. kapitole. I přes tato omezení je systém schopný do jisté míry nahrazovat panoramatické měření (měříme signál ze dvou protilehlých stran, opticky vs. elektricky). Pro elektrické mapování byl využit systém UnEmap a pole elektrod, jejichž realizace však není produktem této disertační práce.

Měření na endokardu, tak jak je popsáno v kapitole 5.1.4, představuje unikátní možnost měření signálů na povrchu endokardu, bez nutnosti komplikované manipulace s měřeným vzorkem. Tato metoda využívá stejného nastavení akvizičního systému i totožné geometrie optiky jako pro měření na epikardu a umožňuje jejich porovnání. Kvalita signálů na

povrchu je obdobná signálům měřeným na epikardu. Měření na endokardu je možné, díky realizaci chirurgického řezu měřenou komorou. Optické mapování představuje optimální možnost pro měření na takto otevřeném myokardu, neboť nevyžaduje fyzický kontakt s jeho stěnou. V tomto uspořádání se ukazuje vhodnost využití pole elektrod pro simultánní měření a tedy současného záznamu na vnitřní i vnější straně myokardu a jejich vzájemného porovnání.

6.1.2. Referenční metoda

V cílech disertační práce bylo navrženo využití poměrové metody pro plošné měření, případně možnost její kombinace s registrací obrazu. Klasická ratiometrická metoda se ukázala pro tento účel nevhodná, a tak byla vymyšlena metoda nová, nazvaná referenční. Tato metoda je detailně popsána v kapitole 4.4. Pro její návrh bylo využito měření odezvy barviva na AN, jehož výsledky jsou popsány v kapitole 4.3. Nová metoda dosahovala při jednobodovém spektroskopickém měření obdobných vlastností jako metoda klasická, představuje tedy její alternativu. Výhodou metody je, že nevyžaduje pásmové filtry, ale pouze filtry typu dolní propust. Měření ukázalo, že obě tyto metody byly účinné pouze v případě využití excitačního zdroje na 473 nm (laser). Pro excitaci na 532 nm (laser) tyto metody neumožňovaly rekonstrukci signálů. Toto souvisí se spektrální odezvou barviva na depolarizaci AN a je diskutováno dále v této kapitole.

Ve využití ve 2D bylo počítáno se sekvenční změnou filtrů, která u navržené metody, vyžaduje změnu pouze jednoho z filtrů (charakteristiky referenčního a měřicího filtru se překrývají). Pro tento účel byl realizován translační systém popsáný v kapitole 3.4.4. V případě realizace stejného přístupu klasickou metodou by bylo potřeba vyrobit pásmové filtry s požadovanou charakteristikou (nejsou běžně komerčně dostupné jako filtry typu dolní propust) a realizovat změnu obou filtrů během měření, což by dále vyžadovalo komplikovanější translační systém, který by navíc musel zajistit, aby nebyl osvětlován snímací prvek kamery v době, kdy není v optické cestě zařazen ani jeden z filtrů. Sekvenční měření předpokládá obdobný tvar signálů v časovém úseku, během kterého probíhá změna filtrů a samotné měření záznamu pro oba kanály. Měření probíhalo s využitím dvou excitačních zdrojů (modrá a zelená LED) a jeho výsledky jsou popsány v kapitole 5.2.2. Tato metoda umožňovala potlačení pohybových artefaktů, ale vzhledem k tomu, že i v referenčním signálu byla přítomna modulace AN, nebylo možné rekonstruovat poměrový signál s dostatečnou kvalitou ($SNR \approx 2$). Dalším problémem bylo přesné prostorové zarovnání záznamů z jednotlivých period, u nichž se i malá odchylka projevuje vznikem nežádoucích artefaktů. Proto tuto metodu, ve 2D měření, nelze v současnosti označit jako alternativu jiným diskutovaným přístupům pro potlačení pohybových artefaktů.

6.1.3. Charakteristika odezvy barviva na AN

V dostupné literatuře není problematika vlivu excitačního zdroje na charakter odezvy barviva na AN diskutována. Naše měření s využitím spektroskopického systému [12] však prokázaly, že běžně popisovaná odezva spočívající v posunu spektra [19, 22, 29, 46, 47, 60] odpovídá měření pouze při excitaci na 473 nm u laseru, nebo modré LED (465 nm). Při buzení na vlnové délce 532 nm, nebo s využitím zelené LED (520 nm), neměla depolarizace AN téměř žádný vliv (neměřitelný) na posun spektra, ale projevovala se hlavně modulací jeho amplitudy. Vzhledem k šířce spektra obou LED se lze domnívat, že při jejich využití se do určité míry projevuje vliv obou těchto jevů současně. Tato teze však vyžaduje realizaci sady měření, které by měly být součástí navazujícího výzkumu.

Závěry z měření navržené referenční metody, představené v předchozí kapitole, potvrdily výsledky měření charakteru odezvy barviva na AN pro různé excitační zdroje, jak bylo diskutováno výše.

6.1.4. Popis vzniku pohybových artefaktů

Dalším z aspektů, kterým se věnovala tato práce, je popis a charakteristika vzniku pohybových artefaktů. Vznik pohybových artefaktů souvisí s pohybem měřeného vzorku, přičemž detailní popis jeho vzniku nebyl dosud prezentován. V prezentované práci se autor snažil ukázat, že hlavní příčinou vzniku pohybových artefaktů je relativní pohyb mezi měřeným vzorkem a snímacím prvem. V kapitole 4.5 je tato teze detailně popsána s ukázkou signálů, které toto dokumentují. Z této hypotézy vycházel i návrh registrační metody, která právě eliminaci vzájemného pohybu snímacího prvku a měřeného vzorku umožňuje potlačení takových artefaktů.

Je-li zajištěna rovnoměrná distribuce barviva a s tím i související uniformní distribuce fluorescenčního signálu na měřeném vzorku, je úroveň pohybových artefaktů minimální. V kapitole 4.5 jsme ukázali, že v případě, kdy se v měřené scéně vyskytuje neuniformní oblast, je možné průměrem signálu z plochy, která zahrnuje tuto oblast rozšířenou o její pohyb, pohybový artefakt, jinak přítomný v jednotlivých měřených signálech, eliminovat.

6.1.5. Registrace obrazu pro potlačení pohybových artefaktů

Na základě popisu vzniku pohybových artefaktů byla navržena metoda, která s využitím registrace jednotlivých snímků měřené sekvence umožňuje potlačení pohybových artefaktů. Registrační metoda využívá elastické registrace. Pro trasování pohybu v jednotlivých částech snímků byla zvolena intenzitní metoda s trasováním registrovaných bloků, rovnoměrně rozložených na ploše snímku. Jako registrační kritérium podobnosti, byl využit korelační koeficient. Metoda je detailně popsána v kapitole 4.6.

Registrační metoda byla testována na experimentech ($n=12$), které byly pořízeny dle současného měřicího protokolu (kap. 5.1.1). Každý měřicí experiment obsahoval průměrně ($z=12$) samostatných měření. Po aplikaci této techniky, bylo možné u měřených signálů pozorovat zlepšení parametru SAR, který vyjadřuje úroveň poměru signálu k pohybovým artefaktům. Výsledky registračního algoritmu pro vybrané záznamy, ze čtyř různých experimentů s rozdílnou mírou pohybu, ukazuje kapitola 5.2.3. Výsledky z dalších měřených a registrovaných sekvencí jsou obdobné. Z předložených výsledků je patrné, že po aplikaci registračního procesu je možné, u všech takto upravených signálů, sledovat šíření depolarizace, nebo repolarizace myokardu, které v případě originálních sekvencí nebylo možné. Míra potlačení pohybových artefaktů souvisí s velikostí pohybu v měřené sekvenci. Je-li pohyb relativně malý (do 1.5 mm), lze měřené signály poměrně úspěšně rekonstruovat, jak je patrné ze záznamu (RAT28, č.4; RAT19, č.1). Schopnost věrné rekonstrukce AN při pohybu vyšším je omezená, jak ukazují záznamy (RAT27, č.3; RAT26, č.4). V některých signálech, i po aplikaci registračního procesu, je stále patrný pohybový artefakt. Jeho distribuce je však odlišná od artefaktu před procesem registrace (tvoří shluky, větší oblasti s odlišnou intenzitou). Tento artefakt přisuzujeme změně orientace měřeného vzorku vůči reflektoru, v závislosti na jeho pohybu. Odstranění tohoto artefaktu, metodami pro zpracování signálů je jen těžce realizovatelné (závisí na 3D profilu měřeného vzorku, který není k dispozici). Pro eliminaci těchto artefaktů je možné změnit design osvětlovacích prvků a to tak, aby bylo zajištěno uniformnější osvětlení. V úpravách stávajícího systému, navrhujeme využití nejen dvou bodových zdrojů s reflektory, ale využití například matic LED s jejich vhodným rozmístěním.

Pro verifikaci registračního procesu bylo navrženo několik řešení, jak pro vizuální, tak i automatickou kontrolu. Metody verifikace jsou popsány v kapitole 4.6.5. Inovativním přístupem je využití automatického procesu kontroly kvality registračních bloků, který umožňuje odhad kvality registrace, přímo na registrované sekvenci, při stejných parametrech, jaké jsou využívány pro samotný registrační proces. Výsledky tohoto algoritmu, včetně porovnání s dalšími vizuálními přístupy, lze nalézt v kapitole 5.2.3. u každého z registrovaných záznamů.

Na základě těchto výsledků, lze navrhnout vhodné využití takového registračního algoritmu u vzorků s relativně nízkou mírou pohybu (do 1.5 mm), nebo využít tohoto procesu jako doplnku k stávajícím technikám farmakologickým, nebo mechanickým. S tím, že v těchto případech, využití navrženého přístupu může přinést prostor pro snížení koncentrací používaných farmak, nebo výrazné snížení přitlačného tlaku, v případě imobilizace mechanické. Lepší výsledky registračního algoritmu jsou očekávány v budoucnu, kdy budou k dispozici kamery s vyšší citlivostí, rychlostí a rozlišením. Zlepšení těchto klíčových

parametrů, zejména rozlišení, může představovat výrazné zpřesnění registračního procesu a následného potlačení pohybových artefaktů.

Registrace obrazu je technika, která se ukázala jak alternativa k farmakologickým disociátorům, mechanické fixaci nebo ratiometrickým technikám. Studium relevantní literatury ukazuje, že registrace snímků pro signály optického mapování není běžně využívána, což by se v budoucno mohlo změnit. Rozbor literatury zabývající se touto problematikou je uveden v kapitole 2.6.6. V dostupných publikacích nebyly doposud uveřejněny výsledky srovnatelné s těmi, jež jsou prezentovány v této práci.

6.2 Závěr

Představena disertační práce poskytuje úvod do problematiky optického mapování, popisuje jeho princip, výhody i problémy v relaci se současným stavem poznání. Práce se zabývá popisem existujících měřicích systémů, jejich analýzou a návrhem nových přístupů, které mohou rozšířit aplikace optického mapování, nebo eliminovat některé známé problémy.

Součástí dizertace je podrobný návrh měřicího systému, který umožňuje měření akčních napětí optickou cestou s relativně vysokou kvalitou měřených signálů. Inovativní návrh systému přináší vlastnosti, které u takých systému nejsou běžně k dispozici. Mezi ně patří: simultánní elektrické i optické mapování, měření na povrchu endokardu, nebo možnost využití poměrové metody ve 2D. Signály měřené na navrženém systému byly publikovány v [83, 85, 86] a další publikace jsou připravovány. Návrh systému je zapsán jako funkční vzorek. Diskuze možnosti jeho využití je náplní kapitoly 6.1.1.

Pro předzpracování měřených signálů byly využity přístupy časového, nebo prostorového průměrování. Metoda pro realizaci časového průměru u signálů s velmi malým SNR ($SNR < 3$), spolu s algoritmem pro klasifikaci signálů a detekci pohybových artefaktů, byla náplní publikace [84].

Pokročilé metody zpracování signálů zahrnovaly návrh nové referenční metody publikované v [83]. Ačkoli tato metoda poskytuje slibné výsledky u jednobodových systémů, její nasazení pro plošná měření je problematické. Podrobná diskuze je náplní kapitoly 6.1.2. Návrh, realizace i omezení této metody souvisí se zjištěním nových charakteristik odezvy barviva Di-4-ANEPPS na depolarizaci, v závislosti na excitačním zdroji. Tyto charakteristiky bylo možné měřit díky spektroskopickému systému, jenž byl publikován v [12]. Diskuze těchto vlastností je náplní kapitoly 6.1.3.

Další z přínosů disertační práce spočíval v detailní analýze vzniku pohybových artefaktů a ověření teze, že jejich vznik souvisí s relativním pohybem měřené scény a detektoru v kombinaci s nerovnoměrnou distribucí fluorescenčního barviva. Výsledky této práce byly publikovány v [85], diskuze je součástí kapitoly 6.1.4.

Využití registrace pro eliminaci pohybových artefaktů je ve své konfiguraci inovativní metodou, která definovala způsob a techniku, jak účinně potlačit pohybové artefakty a omezit nebo vypustit používání současných prostředků pro eliminaci pohybu. Práce na toto téma byla prezentována v [86]. Diskuze výhod i omezení této metody je náplní kapitoly 6.1.5.

Práce na této disertaci probíhala na domovské půdě Ústavu biomedicínského inženýrství, FEKT VUT v Brně a během téměř dvouročního studijního pobytu na Auckland Bioengineering Institute, Auckland, New Zealand.

Literatura

- [1] BACKX, P.H.; GAO, W.D.; AZAN-BACKX, M.D.; MARBAN, E. Mechanism of force inhibition by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac muscle: roles of $[Ca^{2+}]_i$ and cross-bridge kinetics. In *Journal of Physiology*, 1994, vol. 476, iss. 3, p. 487-500.
- [2] BAKER, L.C.; LONDON, B.; CHOI, B.R.; et al. Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. In *Circulation Research*, 2000, vol. 86, p. 396-407, ISSN 0009-7330.
- [3] BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; NOGOVA, K.; SEKORA, J. New recording setup for ratiometric recording of action potentials by optical means. In *Computers in Cardiology*, Bologna, Italy, 2008, iss. 35, p. 1085-1088, ISSN 0276-6547.
- [4] BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; SEKORA, J.; SVRCEK, M. Statistical approach in complex-valued wavelet analysis of voltage-sensitive dye mapping. In *Computers in Cardiology*, 2007, Durham, USA: IEEE, vol. 34, p. 101-104.
- [5] BAXTER, W.T.; MIRONOV, S.F.; ZAITSEV, A.V. et al. Visualizing excitation waves inside cardiac muscle using transillumination. In *Biophysical Journal*, 2001, vol. 80, iss. 1, p. 516-530.
- [6] BOVE, R.T.; DILLON, S.M.; Optically imaging cardiac activation with a laser system. In *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 1998, vol. 17, iss.1, p.84-94, ISSN: 0739-5175.
- [7] BROWN, L.G. A Survey of Image Registration Techniques. In *ACM Computing Surveys*, 1992, vol. 24, iss. 4, p. 325-376, ISSN 0360-0300.
- [8] BULLEN, A.; SAGGAU, P. High speed random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes, In *Biophysical Journal*, 1999, vol. 76, iss. 4, p. 2272-2287.
- [9] CALAGHAN, S.C.; WHITE, E.; BEDUT, S.; LE GUENNEC, J.Y. Cytochalasin D reduces Ca^{2+} sensitivity and maximum tension via interactions with myofilaments in skinned rat cardiac myocytes. In *Journal of Physiology*, 2000, vol. 529, iss. 2, p.405-411.
- [10] CASCADE 128+, Photometrics, datasheet PM-DS-002-CO, [cit. 17.8.2010] [pdf dokument]. <http://www.photometrics.com/products/datasheets/128_.pdf>
- [11] CHEMLA, S.; CHAVANE, F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. In *Journal of Physiology – Paris*, 2010, vol. 104, iss.1-2, p. 40-50.
- [12] CHEN, A.Y.H.; VANHOLSBECK, F.; TAI, D.C.S.; SVRCEK, M.; SMAILL, B.H. Time-resolved all fiber fluorescence spectroscopy system. In *BiOS 2010*, San Francisco, California, USA: SPIE Photonics West, 2010, vol. 7559, p. 755905-755911.
- [13] CHEN, Z. Efficient block matching algorithm for motion estimation. In *International Journal of Signal Processing*, vol. 5, iss. 2, p. 133-137.
- [14] CHENG, Y.; WAGONER, V.D.R.; MAZGALEV, T.N. et al. Voltage-sensitive dye RH421 increases contractility of cardiac muscle. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1998, vol. 76, iss. 12, p. 1146-1150.
- [15] CHOU, C.C.; ZHOU, S.; HAYASHI, H. et al. Remodelling of action potential and intracellular calcium cycling dynamics during subacute myocardial infarction promotes ventricular arrhythmias in Langendorff-perfused rabbit hearts. In *Journal of Physiology*, 2007, vol. 580, p. 895-906.
- [16] CLARKE, R.J.; ZOUNI, A.; HOLZWARTH, J.F. Voltage sensitivity of the fluorescent probe RH421 in a model membrane system. In *Biophysical Journal*, 1995, vol. 68, iss. 4, p. 1406-1415.
- [17] DALTON, G.R.; JONESB, J.V.; EVANSB, S.J.; LEVI, A.J. Wall stress-induced arrhythmias in the working rat heart as left ventricular hypertrophy regresses during captopril treatment. In *Cardiovascular Research*, 1997, vol. 33, iss.3, p. 561-572.

- [18] DILLON, S.M.; KERNER, T.E.; HOFFMAN, J. et al. A system for in-vivo cardiac optical mapping. In *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 1998, vol. 17, iss. 1, p. 95-108.
- [19] EFIMOV, I.R.; BIERMANN, M.; ZIPES, D. Fast fluorescent mapping of electrical activity in the heart: Practical guide to experimental design and applications. In *Cardiac mapping*, second edition, SHENSA, M., BORGGREFE, M., BREITHARDT, G., 2003, Berlin, Germany, chapter.7, p. 131-156. ISBN: 0-87993-404-2.
- [20] EFIMOV, I.R.; HUANG, D.T.; RENDT, J.M.; SALAMA, G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. In *Circulation*, 1994, vol. 90, iss. 3, p. 1469-1480, ISSN 0009-7322.
- [21] EFIMOV, I.R.; KROLL, M.W.; TCHOU, P.J. Cardiac bioelectric therapy: Mechanisms and practical implications, Springer, USA, 2009, p. 704, ISBN: 978-0-387-79402-0.
- [22] EFIMOV, I.R.; NIKOLSKI, P.V.; SALAMA, G. Optical imaging of the heart. In *Circulation Research*, 2004, vol. 95, p. 21-33, ISSN 0009-7330.
- [23] EFIMOV, I.R.; NIKOLSKI, V.P.; BUB, G. Optical mapping. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Informa Healthcare, USA, 2008, p. 2019-2027.
- [24] EFIMOV, I.R.; WAGONER V.D.R.; CHENG, Y. et al. High resolution mapping of electrical activity of human atrial preparations using voltage-sensitive dyes and fluorescent imaging techniques. In *Journal of Investigative Medicine*, 1996, vol. 44, iss. 7, p. 373A.
- [25] EVERTSON, D.W.; HOLCOMB, M.R.; EAMES, M.C. et al. High-resolution high-speed panoramic cardiac imaging system. In *IEEE Transaction on Bio-medical Engineering*, 2008, vol. 55, iss. 3, p. 1241–1243, ISSN 0018-9294.
- [26] FAST, V.G.; KLEBER, A.G. Microscopic Conduction in Cultured Strands of Neonatal Rat Heart Cells Measured With Voltage-Sensitive Dyes. In *Circulation Research*, 1993, vol. 73, iss. 5, p. 914-925, ISSN 0009-7330.
- [27] FEDOROV, V.V.; LOZINSKY, I.T.; SOSUNOV, E.A. et al. Application of blebbistatin as an excitation – contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 5, p. 619-626.
- [28] FENTON, F.H.; CHERRY, E.M.; KORNREICH, B.G. Termination of equine atrial fibrillation by quinidine: an optical mapping study. In *Journal of Veterinary Cardiology*, 2008, vol. 10, iss. 2, p. 87-103.
- [29] FROMHERZ, P.; LAMBACHER, A. Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl dye in neuron Membrane. In *Biochimica et biophysica acta*, 1991, vol. 1068, iss. 2, p. 149-156.
- [30] GIBCO® Cytochalasin D, datasheet PHZ1063, rev. 3.0 [pdf dokument]. [cit. 17.8.2010] <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/PHZ1063?ICID=search-product>>
- [31] GIROUARD, S.D.; LAURITA, K.R.; ROSENBAUM, D.S. Unique properties of cardiac action potentials recorded with voltage-sensitive dyes. In *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 1996, vol. 7, iss.11, p.1024-1038.
- [32] GWATHMEY, J.K.; HAJJAR, R.J.; SOLARO, R.J.; Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Eeffects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. In *Circulation Research*, 1991, vol. 69, iss. 5, p. 1280-1292, ISSN 0009-7330.
- [33] HARDY, M.E.; POLLARD, C.E.; SMALL, B.G. et al. Validation of a voltage-sensitive dye (di-4-ANEPPS)-based method for assessing drug-induced delayed repolarisation in beagle dog left ventricular midmyocardial myocytes. In *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 2009, vol. 60, iss. 1, p. 94-106.
- [34] HILL, D.G.; BATCHELOR, P.G.; HOLDEN, M.; HAWKES, D.J. Medical image registration. In *Physics in medicine and biology*, 2001, vol. 46, iss. 3, p. R1-R45
- [35] HOOKS, D.A.; LeGRICE, I.J.; HARVEY, J.D.; SMAILL, B.H. Intramular multisite recording of transmembrane potential in the heart. In *Biophysical Journal*, 2001, iss. 5, vol. 81, p. 2671-2680.

- [36] HORN, B.K.P.; RHUNCK, B.G. Determining Optical Flow. In *Artificial Intelligence*, vol. 17, iss. 3, 1981, p. 185-203.
- [37] HWANG, G.S.; HAYASHI, H.; TANG, L. et al. Intracellular calcium and vulnerability to fibrillation and defibrillation in Langendorff-perfused rabbit ventricle. In *Circulation*, 2006, vol. 114, iss. 24, p. 2595-2603, ISSN 0009-7322.
- [38] IRAVANI, S.; CHRISTINI, D.J. Optical mapping system with real-time control capability. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2007, vol. 293, iss. 4, p. H2605-H2611.
- [39] JAIN, J.R.; JAIN, A.K.; Displacement measurement and its application in interframe image coding. In *Communication*, IEEE Transactions, 1981, vol. 29, iss. 12, p. 1799-1808, ISSN 0090-6778.
- [40] JAN J. Medical image processing reconstruction and restoration: concepts and methods. In *CRC Press*, 2006, p. 730, ISBN 0-8247-5849-8.
- [41] JAN, J. Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů, Brno, VUTIU, 2002, ISBN 80-214-2911-9.
- [42] JANICH, M.; SEEMANN, G.; THIELE, J.; DÖSSEL, O. Elastic Registration of Optical Images showing Heart Muscle Contraction. In *4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*, IFMBE Proceedings, 2009, vol. 22, part. 7, p. 676-679, ISSN 1680-0737.
- [43] KALIFA, J.; KLOS, M.; ZLOCHIVER, S. et al. Endoscopic fluorescence mapping of the left atrium: A novel experimental approach for high resolution endocardial mapping in the intact heart. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 7, p. 916-924.
- [44] KANAI, A.; SALAMA, G. Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. In *Circulation Research*, 1995, vol. 77, iss. 4, p. 784-802, ISSN 0009-7330.
- [45] KANLOP, N.; SAKAI, T. Optical mapping study of blebbistatin-induced chaotic electrical activities in isolated rat atrium preparations. In *The Journal of Physiological Sciences*, 2010, vol. 60, iss. 2, p. 109-117, ISSN 1880-6546.
- [46] KAO, W.Y.; DAVIS, C.E.; KIM, Y.I.; BEACH, J.M. Fluorescence Emission Spectral Shift Measurements of Membrane Potential in Single Cells. In *Biophysical journal*, 2001, vol. 81, iss. 2, p. 1163-1170.
- [47] KNISLEY, S.B.; JUSTICE, R.K.; KONG, W.; JOHNSON, P.L. Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2000, Vol. 279, iss. 3, p. H1421-H1433.
- [48] KOVACS, M.; TOTH, J.; HETENYI, C. et al. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. In *The Journal of biological chemistry*, August 2004, vol. 279, iss. 34, p. 35557–35563.
- [49] LAURITA, K.R.; GIROUARD, S.D.; AKAR, F.G.; ROSENBAUM, D.S. Modulated dispersion explains changes in arrhythmia vulnerability during premature stimulation of the heart. In *Circulation*, American Heart Association, December 1998, vol. 98, iss. 24, p. 2774-2780, ISSN 0009-7322.
- [50] LEDENGIN, Inc., High Luminous Efficacy Green LED Emitter, datasheet LZ4-00G1100. rev. 01/13/10 [pdf dokument]. [cit. 17.8.2010]
<<http://www.ledengin.com/products/10wLZ/LZ4-00G110.pdf>>
- [51] LEE, M.H.; LIN, S.F.; OHARA, T. et al. Effects of diacetyl monoxime and cytochalasin D on ventricular fibrillation in swine right ventricles. In *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, vol. 280, iss. 6, p. 2689-2696.
- [52] LIAU, J.; DUMAS, J.; JANKS, D. et al. Cardiac optical mapping under a translucent stimulation electrode. In *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, vol. 32, iss. 9, p. 1202-1210, ISSN 0090-6964.
- [53] LIU, Y.; CABO, C.; SALOMONSZ, R. et al. Effects of diacetyl monoxime on the electrical properties of sheep and guinea pig ventricular muscle. In *Cardiovascular Research*, 1993, vol. 27, iss. 11, p. 1991-1997.

- [54] MAINTZ, J.B.; VIERGEVER, M.A. A survey of medical image registration. In *Medical Image Analysis*, 1998, vol. 2, iss. 1, p. 1-36.
- [55] MALSCH, U.; THIEKE, C.; HUBER, P.E.; BENDL, R. An enhanced block matching algorithm for fast elastic registration in adaptive radiotherapy. In *Physics in Medicine and Biology*, 2006, vol. 51, iss. 19, p. 4789-4806
- [56] MATIUKAS, A.; MITREA, B.G.; QIN, M. et al. Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 11, p. 1441-1451.
- [57] MATIUKAS, A.; MITREA, B.G.; PERTSOV, A.M. et al. New near-infrared optical probes of cardiac electrical activity. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2006, vol. 290, iss. 6, p. H2633-H2643.
- [58] MIRONOV, S.F.; VETTER, F.J.; PERTSOV, A.M. Fluorescence imaging of cardiac propagation: spectral properties and filtering of optical action potentials. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2006, vol. 291, iss. 1, p. H327-H335.
- [59] MOLECULAR PROBES®, Potential-Sensitive ANEP Dyes, datasheet MP01199, rev. 24.3.2006, [pdf dokument]. [cit. 17.08.2010]
<<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01199.pdf>>
- [60] MONTANA, V.; FARKAS, D.L.; LOEW, L.M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. In *Biochemistry*, 1989, vol. 28, iss. 11, p. 4536-4539.
- [61] MORAD, M.; SALAMA, G. Optical measurements of transmembrane potential in heart. In: Spectroscopic Probes of Membrane Potential. In *The Journal of Physiology*, 1988, vol. 292, p. 267-295.
- [62] NOVAKOVA, M.; BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I. et al. I. Effects of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS on guinea pig and rabbit myocardium. In *General Physiology and Biophysics*, 2008, vol. 27, iss. 1, p. 45-54.
- [63] NYGREN, A.; CLARK, R.B.; BELKE, D.D. et al. Voltage-sensitive dye mapping of activation and conduction in adult mouse hearts. In *Annals of Biomedical Engineering*, 2000, vol. 28, iss. 8, p. 958-967, ISSN 0090-6964.
- [64] NYGREN, A.; KONDO, C.; CLARK, R.B.; GILES, W.R. Voltage-sensitive dye mapping in the Langendorff-perfused rat heart. In *American journal of physiology, Hearted and circulatory physiology*, 2003, vol. 284, iss. 3, p. H892-H902, ISBN 0363-6135.
- [65] PERVAIZ, S.; HARRIMAN, A.; GULLIYA, K.S. Protein damage by photoproducts of merocyanine 540. In *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, vol. 12, iss. 5, p. 389-396.
- [66] PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; BLAHA, M.; CHMELAR, M.; VESELY, Z. Fibre optic sensor for recording of action potentials. In *Intelligent Sensors, Sensor Networks and Information Processing conference*, 2004, iss. 1, Melbourne, Australia: IEEE, 2004, p. 349-354, ISBN 0-7803-8893-3.
- [67] QIAN, Y.W.; SUNG R.J.; LIN, S.F. et al. Spatial heterogeneity of action potential alternans during global ischemia in the rabbit heart. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2003, vol. 285, iss. 6, p. H2722-33.
- [68] QU, F.; RIPPLINGER, C.M.; NIKOLSKI, V.P.; GRIMM, C.; EFIMOV, I.R. Three-dimensional panoramic imaging of cardiac arrhythmias in rabbit heart. In *Journal of Biomedical Optics*, 2007, vol. 12, iss. 4, p. 044019.
- [69] ROHDE, G.K.; ALDROUBI, A.; DAWANT, B.M. The adaptive bases algorithm for intensity-based nonrigid image registration. In *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, vol. 22, iss.11, p. 1470-1479.
- [70] ROHDE, G.K.; DAWANT, B.M.; LIN, S.F. et al. Correction of motion artifact in cardiac optical mapping using image registration. In *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2005, vol. 52, iss. 2, p. 338-341, ISSN 0018-9294.

Literatura

- [71] ROHDE, G.K.; DAWANT, B.M.; LIN, S.F. et al. Correction of motion artifact in cardiac optical mapping using Image registration technique. In *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2005, vol. 52, iss. 2, p. 338-41, ISSN 0018-9294.
- [72] SAKAI, T. Cytochalasin D as the depressant of contraction for the optical monitoring of action potentials in isolated rat atrium. In *The journal of Physiological Sciences*, 2006, vol. 56, iss. 5, p. 385-388, ISSN 1880-6546.
- [73] SALAMA, G. Optical mapping: background and historical perspective. In *Optical Mapping of Cardiac*, 2001, Chapter 1, p. 9–31.
- [74] SALAMA, G.; CHOI, B.R. Images of action potential propagation in heart. In *News in Physiological Sciences*, 2000, vol. 15, iss. 1, p. 33-41.
- [75] SALAMA, G.; CHOI, B.R.; AZOUR, G. et al. Properties of New, Long-Wavelength, Voltage-sensitive dyes in the heart. In *Journal of Membrane Biology*, 2005, vol. 208, iss. 2, p. 125-140.
- [76] SALAMA, G.; HWANG, S. Simultaneous optical mapping of intracellular free calcium and action potentials from Langendorff perfused hearts. In *Current Protocols in Cytometry*, 2009, Chapter 12, Unit 12.17.
- [77] SALAMA, G.; MORAD, M. Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart. In *Science*, 1976, vol. 191, iss. 4226, p. 485-487.
- [78] SCHAFFER, P.; AHAMMER, H.; MÜLLER, W. et al. Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes. In *Pfügers Archiv European Journal of Physiology*, 1994, vol. 426, iss. 6, p. 548-551, ISN 0031-6768.
- [79] SEDMERA, D.; RECKOVA, M.; ROSENGARTEN, C. et al. Optical mapping of electrical activation in the developing heart. In *Microscopy and Microanalysis*, Microscopy society of America, 2005, vol. 11, iss. 3, p. 209-215.
- [80] SERIFOVIC-TRBALIC, A.; DEMIROVIC, D.; PRLJACA, N. Intensity-based elastic registration incorporating anisotropic landmark errors and rotational information. In *International journal of computer assisted radiology and surgery*, 2009, vol. 4, iss. 5, p. 463-468.
- [81] SORNBORGER, A.; SIROVICH, L.; MORLEY, G. Extraction of periodic multivariate signals: Mapping of voltage-dependent dye fluorescence in the mouse heart. In *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2003, vol. 22, iss. 12, p. 1537-49, ISSN: 0278-0062.
- [82] SUNG, D.; SOMAYAJULA-JAGAI, J.; COSMAN, P. et al. Phase shifting prior to spatial filtering enhances optical recordings of cardiac action potential propagation. In *Annals of Biomedical Engineering*, October 2001, vol. 29, iss. 10 p. 854–861, ISSN 0090-6964.
- [83] SVRCEK, M.; CHEN, A.; RUTHERFORD, S. et al. Suppressing motion artifact in cardiac electrical optical mapping. In *Analysis of biomedical signals and images*, Analysis of Biomedical Signals and Images, Brno, 2010, vol. 20, p. 148-153, ISSN 1211-412X.
- [84] SVRCEK, M.; PROVAZNIK, I.; ARCHALOUS, T. Filtration and detection of action potential in optical recordings. In *Proceedings of the 14 th Conference STUDENT EEICT*, Brno, 2008, vol. 3, p. 72-77. ISBN 978-80-214-3616-9.
- [85] SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNIK, I.; SMAILL, B.H. Characteristics of Motion Artifacts in Cardiac Optical Mapping Studies. In *Proceedings of the IEEE EMBS Conference*, Mineapolis, USA, 2009. p. 3240-3, ISBN 978-1-4244-3296-7.
- [86] SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNIK, I.; SMAILL, B.H. Using Image Registration to Reconstruct Spatiotemporal Electrical Activity in Cardiac Optical Mapping Studies. In *Computers in Cardiology*, Park City, Utah, USA, 2009, p. 521-524, ISBN 978-1-4244-7281-9.
- [87] TAI, D.C.; CALDWELL, B.J.; LeGRICE, I.J. et al. Correction of motion artifact in transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2004, vol. 287, iss. 3, p. H985-H993.
- [88] UnEmap: 448 Channel Mapping, datasheet. [cit. 17.8.2010]
<http://www.uniservices.co.nz/LinkClick.aspx?fileticket=6idK_IF8ROg%3D&tabid=345>

Literatura

- [89] User Manual for Cascade® Systems, datasheet 57-476-001. rev. C2 [cit. 17.8.2010] [pdf dokument].
<<http://www.photometrics.com/support/pdfs/manuals/CascadeManual.pdf>>
- [90] WALTON, R.D.; MITREA, B.G.; PERTSOV, A.M.; BERNUS, O. A. Novel near-infrared voltage-sensitive dye reveals the action potential wavefront orientation at increased depths of cardiac tissue. In *31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Minneapolis, 2009, p. 4523-4526, ISBN 978-1-4244-3296-7.
- [91] WÄORZ, S.; ROHR, K. Hybrid Spline-Based Elastic Image Registration Using Analytic Solutions of the Navier Equation. In *Bildverarbeitung für die Medizin*, 2007, vol. 7, p. 151-155.
- [92] WU, J.; BIERMANN, M.; RUBART, M.; ZIPES, D.P.; Cytochalasin D as excitation-contraction uncoupler for optically mapping action potentials in wedges of ventricular myocardium. In *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 1998, vol. 9, iss. 12, p. 1336-1347.
- [93] ZITOVA, B.; FLUSSER, J. Image registration methods: a survey. In *Image and vision computing*, 2003, vol. 21, iss. 11, p. 977-1000.

Seznam zkratk a symbolů

| | |
|--------------------------------|--|
| A/D | Převodník analogové na digitální veličinu (z ang. Analog/Digital) |
| AN | Akční napětí (ekvivalent ang. AP- Action Potential) |
| ANEP | Amino Naphthyl Ethenyl Pyridinium |
| APD | Délka trvání akčního napětí (z ang. Action Potential Duration) |
| AV | Atrioventrikulární |
| BCL | Délka základního cyklu (Basic Cycle Length) |
| BDM | 2,3-ButaneDione Monoxime |
| CCD | Prvek s nábojovou vazbou (z ang. Charge Coupled Device) |
| CMOS | Technologie polovodičů s vrstvou kysličníku křemíku (z ang. Complementary Metal Oxide Semiconductor) |
| DC | Stejnoseměrný proud (z ang. Direct Current) |
| EKG | Elektrokardiogram |
| EMCCD | Prvek s nábojovou vazbou a elektronovou násobičkou (z ang. Electron Multiplying Charge Coupled Device) |
| FIR | Filtr s konečnou impulsní odezvou (z ang. Finite Impulse Response) |
| FT | Přenos snímku (z ang. Frame Transfer) |
| GUI | Grafické uživatelské rozhraní (z ang. Graphical User Interface) |
| K-H | Krebs-Henseleit |
| LED | Světlo emitující dioda (z ang. Light Emitting Diode) |
| NT | Normální přenos snímku (z ang. Normal Transfer) |
| PC | Osobní počítač (z ang. Personal Computer) |
| PCI | Sběrnice pro propojení komponent (z ang. Peripheral Component Interconnect) |
| PDA | Fotodiodové pole (z ang. o PhotoDiode Array) |
| RMS | Efektivní hodnota signálu (z ang. Root Mean Square) |
| USB | Sériové komunikační rozhraní (z ang. Universal Serial Bus) |
| SAR | Poměr signál / artefakt (z anglického Signal Artifact Ratio) |
| SNR | Poměr signál / šum (z anglického Signal to Noise Ratio) |
| $\Delta F/F$ | Zlomková změnou absorpce / fluorescence na změnu akčního napětí |
| f_{vz} | Frekvence vzorkování |
| f_s | Snímkovací frekvence |

Seznam příloh:

Příloha č.1 – Seznam a umístění videozáznamů signálů představených v 5. kapitole

Příloha č.2 - Navržený SW - Signal Analysis (fotodokumentace)

Příloha č.3 – Nastavení akvizičního SW - V++ 5.0

Příloha č.4 - Navržený měřicí systém (fotodokumentace)

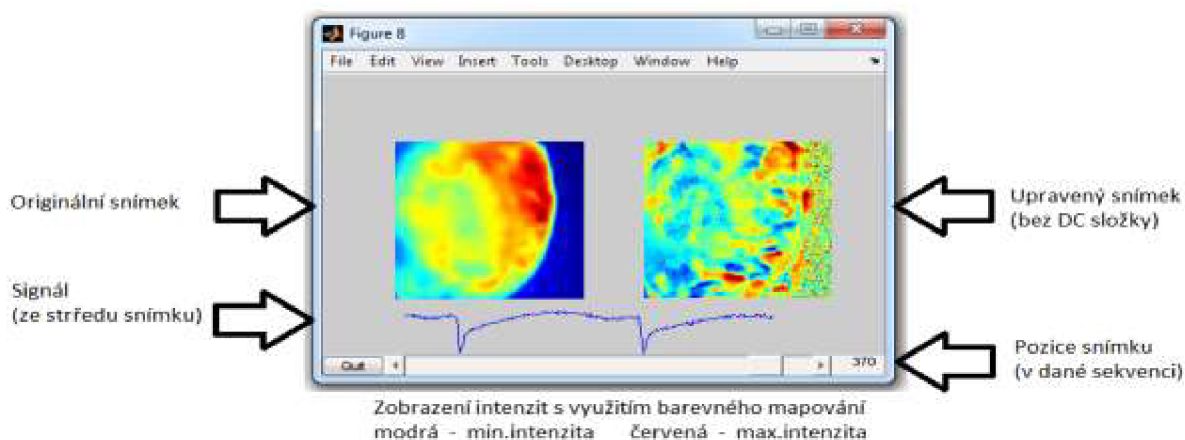
Příloha č.1 – Seznam a umístění videozáznamů signálů představených v 5. kapitole

Videozáznamy, zobrazující šíření depolarizace a repolarizaci, pro signály představené v 5. kapitole, jsou umístěny na příloženém CD, ve složce „Video“. Seznam těchto signálů uvádí tabulka č. 5.

| Videozáznamy na CD | | |
|--------------------|--------------|-------------------|
| Kapitola | Obrázek č. | Název na disku CD |
| 5.1.3 | Obr. č. 31-A | RAT27z8.wmv |
| 5.1.3 | Obr. č. 31-B | RAT27z7.wmv |
| 5.1.3 | Obr. č. 33-A | RAT20z4.wmv |
| 5.1.3 | Obr. č. 33-B | RAT20z5.wmv |
| 5.1.4 | Obr. č. 34-A | RAT26z8.wmv |
| 5.1.4 | Obr. č. 35-B | RAT9z6.wmv |
| 5.1.5 | Obr. č. 37-A | RAT27z5.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 41-A | RAT28z4orig.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 41-B | RAT28z4reg.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 45-A | RAT19z1orig.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 45-B | RAT19z1reg.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 49-A | RAT27z3orig.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 49-B | RAT27z3reg.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 53-A | RAT26z4orig.wmv |
| 5.2.3 | Obr. č. 53-B | RAT26z4reg.wmv |

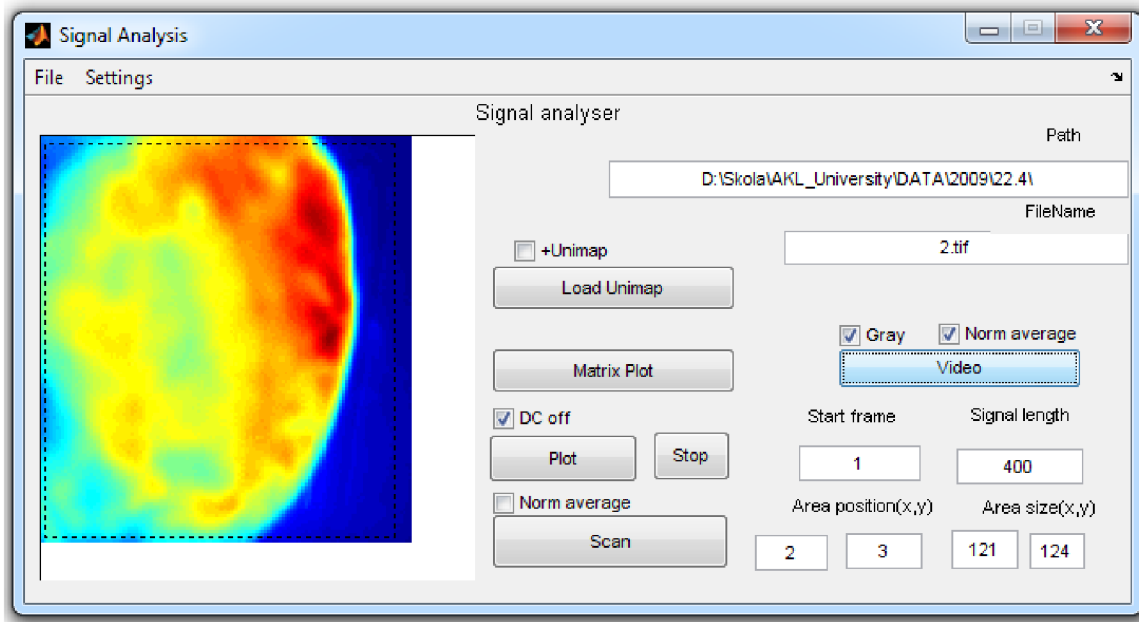
Tabulka č.5: Seznam videozáznamu signálů na příloženém CD

Popis zobrazeného okna příložených videozáznamů, ukazuje obrázek č. 57. Originální snímek je snímek neupravené sekvence. V záznamu (RAT20z4.wmv – simultánní optické a elektrické mapování) je v okně originálního snímku, zobrazen signál elektrického mapování. V okně upraveného snímku, je upravený snímek optického záznamu (originální snímek bez DC složky).

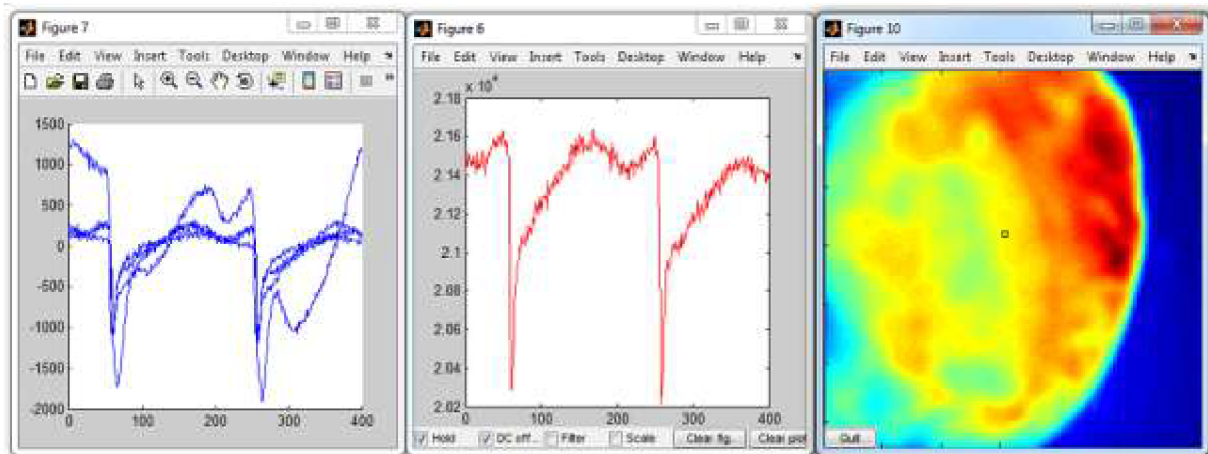


Obr. č.57: Popis okna příložených videozáznamů

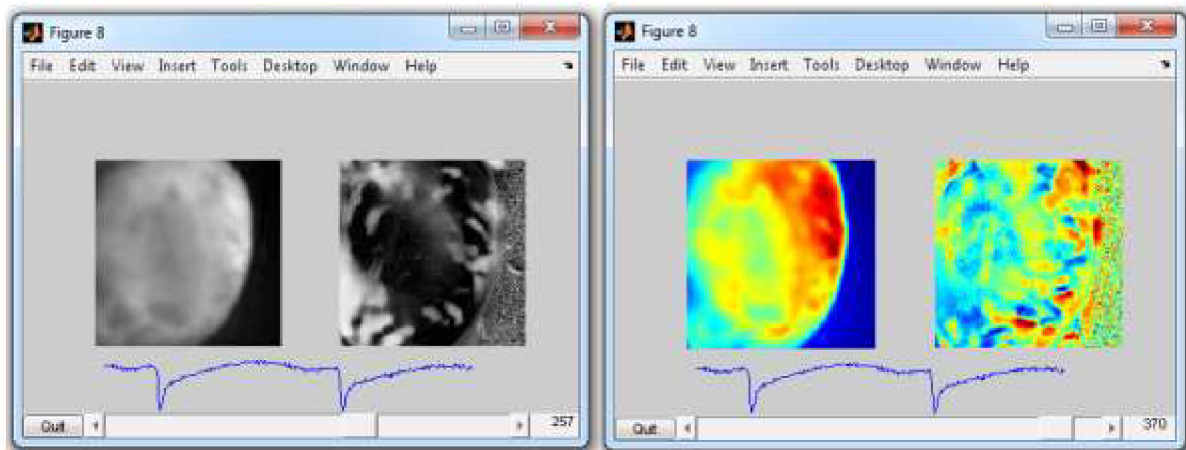
Příloha č.2 - Navržený SW - Signal Analysis (fotodokumentace)



Obr. č.58: Hlavní okno programu Signal Analysis

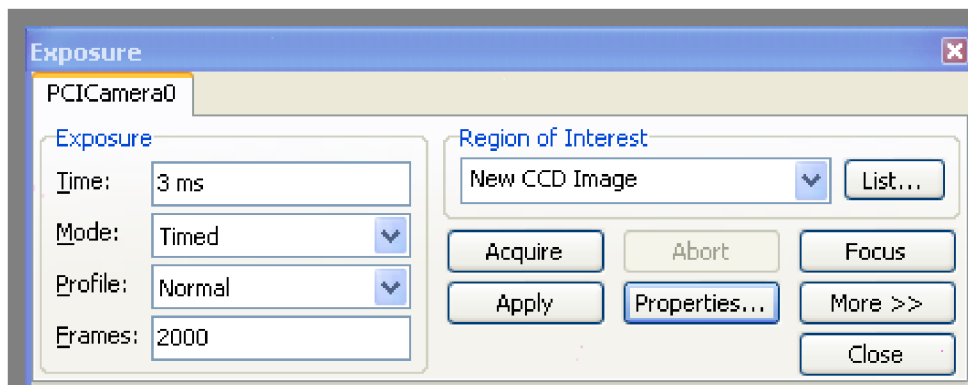


Obr. č.59: Procházení signálů v programu Signal Analysis

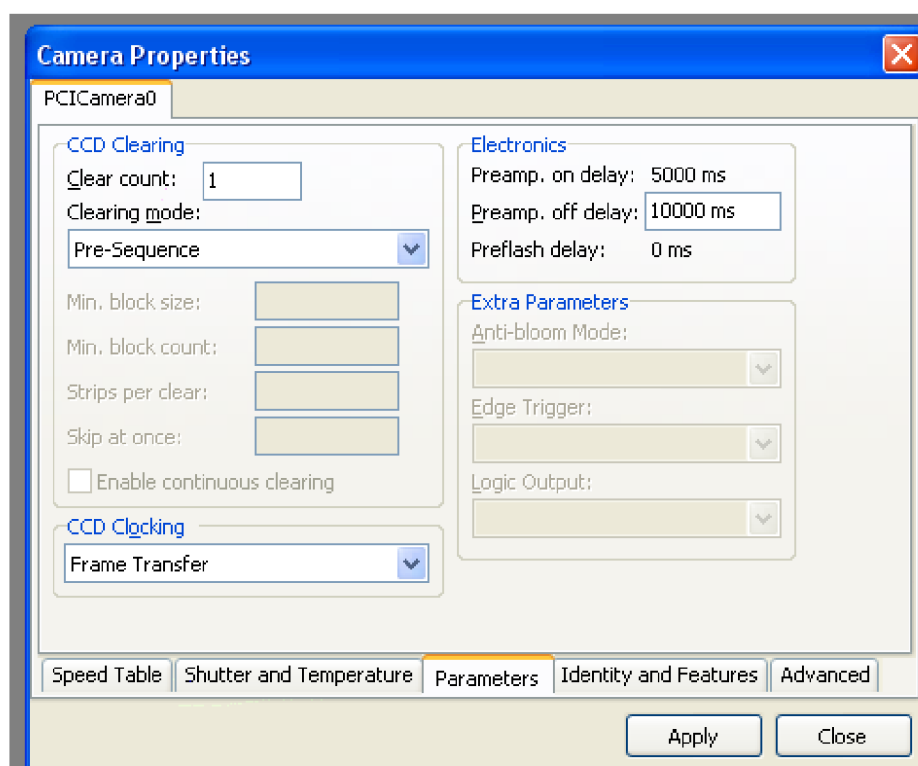


Obr. č.60: Sledování aktivace v okně programu Signal Analysis

Příloha č.3 – Nastavení akvizičního SW - V++ 5.0

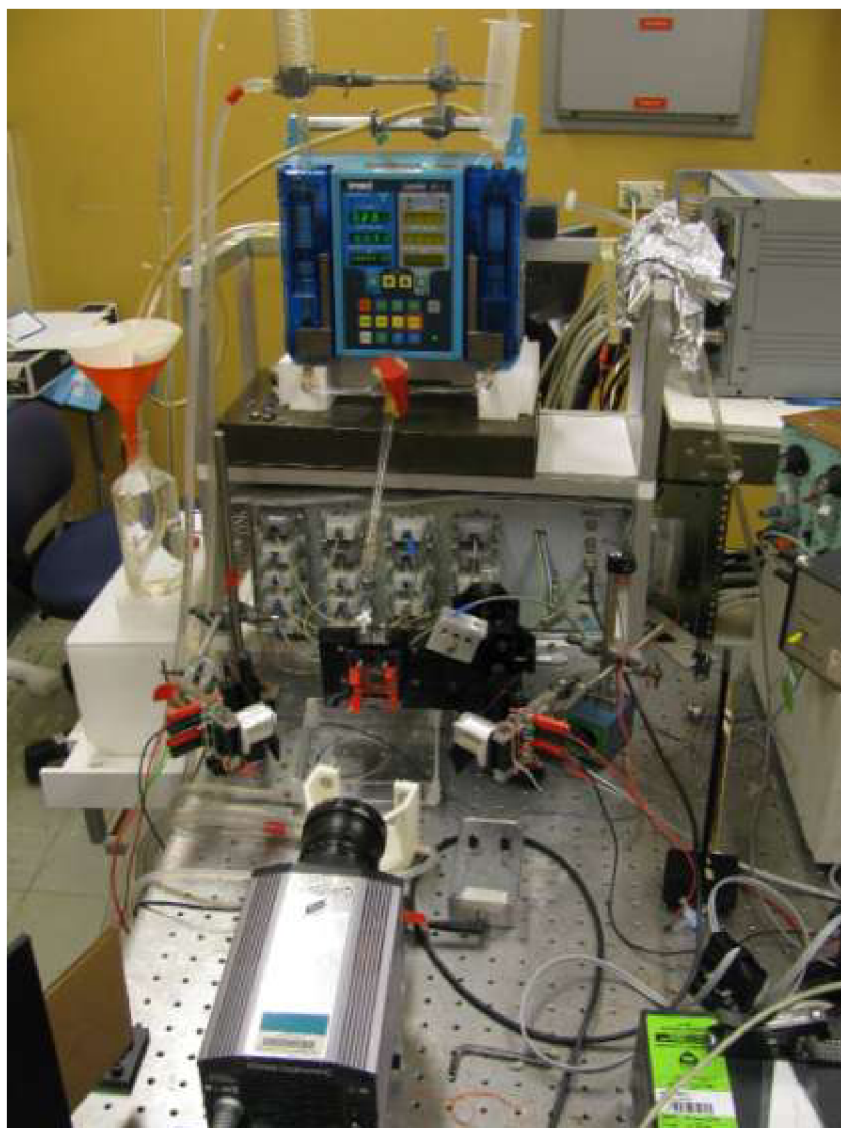


Obr. č.61: Nastavení základních parametrů akvizice

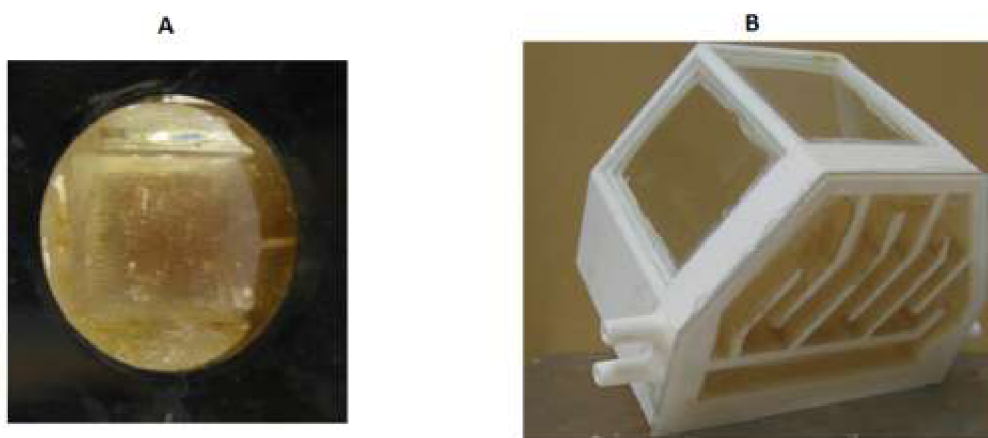


Obr. č.62: Pokročilé nastavení (měření v módu FT)

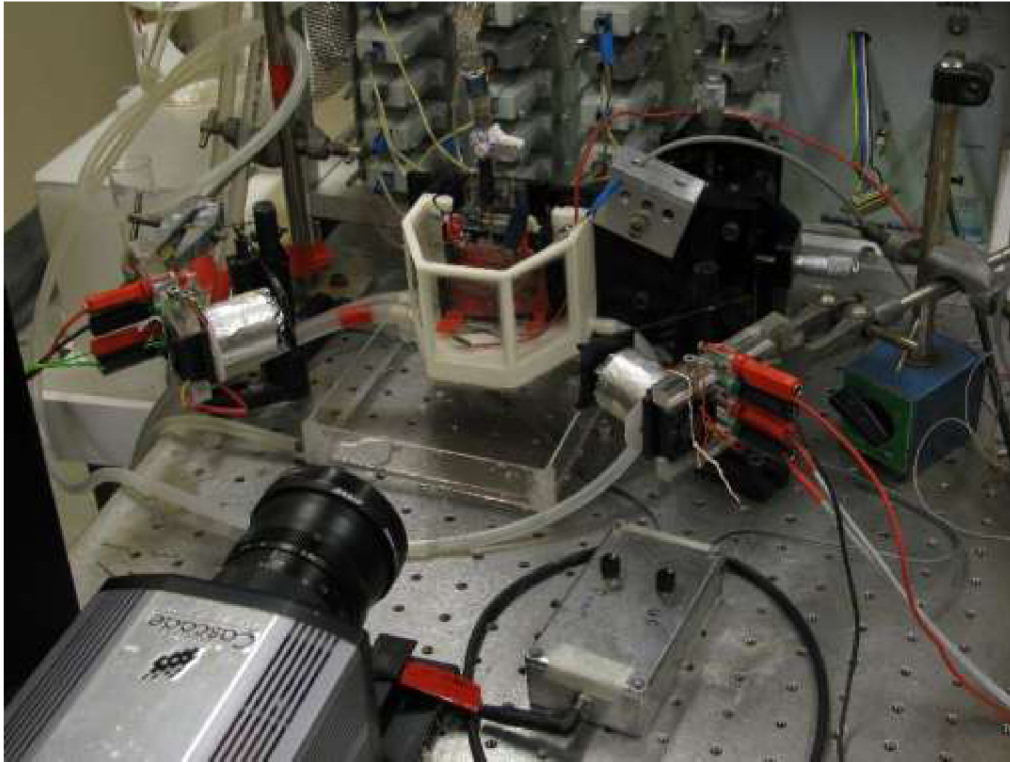
Příloha č.4 - Navržený měřicí systém (fotodokumentace)



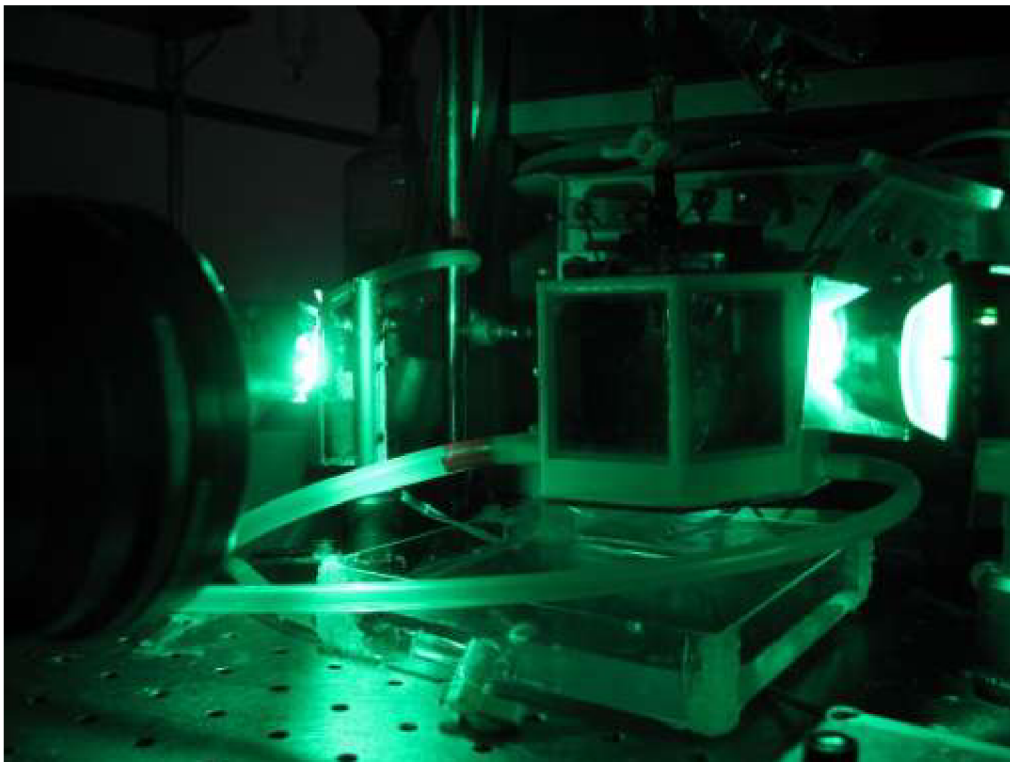
Obr. č.63: Měřicí systém, celkový pohled



Obr. č.64: Komponenty měřicího systému, **A**: Pole snímacích a stimulačních elektrod, **B**: Měřicí komůrka



Obr. č.65: Detail pozice kamery, měřicí komůrky a excitačních LED



Obr. č.66: Měřicí experiment