

# 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

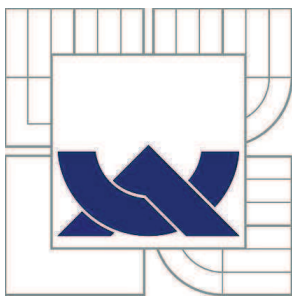
OPTICKÉ METODY MĚŘENÍ KONTRAKCE IZOLOVANÉ SRDEČNÍ  
BUŇKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

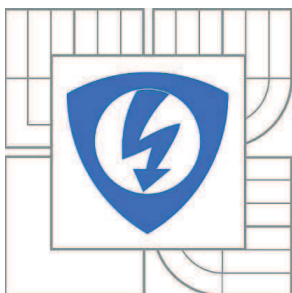
Bc. KRISTIÁN VADKERTI

BRNO 2010



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

## OPTICKÉ METODY MĚŘENÍ KONTRAKCE IZOLOVANÉ SRDEČNÍ BUŇKY

OPTICAL METHODS TO EVALUATE THE CONTRACTILE FUNCTION  
OF ISOLATED CARDIAC MYOCYTES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

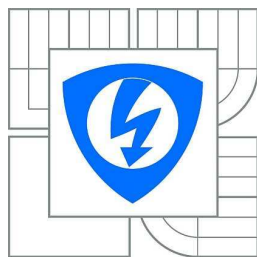
Bc. KRISTIÁN VADKERTI

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
Biomedicínské a ekologické inženýrství

**Student:** Bc. Kristián Vadkerti

**ID:** 78017

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2009/2010

## NÁZEV TÉMATU:

### Optické metody měření kontrakce izolované srdeční buňky

#### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prostudujte vlastnosti izolované srdeční buňky a jevy související s její kontrakcí. Dále prostudujte základní známé metody optického vyhodnocení její funkce kontrakce.

Při experimentu pořídte na mikroskopu kamerový záznam kontrakce izolované srdeční buňky při stimulaci. Využijte vhodné metody zpracování a analýzy obrazu v prostředí Matlab.

Práce musí teoretický rozbor problematiky, popis postupu a použitých metod zpracování, dále musí obsahovat funkční programové vybavení sestavené v prostředí Matlab pro vyhodnocení funkce kontrakce dvěma metodami a jejich vzájemné porovnání.

#### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Leanne M. D. Delbridge, Kenneth P. Roos: Optical Methods to Evaluate the Contractile Function of Unloaded Isolated

Cardiac Myocytes [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science?>

[2] ŠIMURDA, Jiří.: Elektronická podpora předmětu Biofyzika (BFE), [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.dbme.feec.vutbr.cz/kurzy/BFE/index.html>>

**Termín zadání:** 12.10.2009

**Termín odevzdání:** 21.5.2010

**Vedoucí práce:** Ing. Vratislav Čmiel

**prof. Ing. Jiří Jan, CSc.**

*Předseda oborové rady*

#### UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# LICENČNÍ SMLOUVA

## POSKYTOVANÁ K VÝKONU PRÁVA UŽÍT ŠKOLNÍ DÍLO

uzavřená mezi smluvními stranami:

### 1. Pan/paní

Jméno a příjmení: Bc. Kristián Vadkerti  
Bytem: Šurianská 18, Nové Zámky 940 66  
Narozen/a (datum a místo): 23. listopadu 1985, Nové Zámky

(dále jen „autor“)

a

### 2. Vysoké učení technické v Brně

Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií  
se sídlem Údolní 53, Brno, 602 00  
jejímž jménem jedná na základě písemného pověření děkanem fakulty:  
prof. Ing. Jiří Jan, CSc, předseda rady oboru Biomedicínské a ekologické inženýrství  
(dále jen „nabyvatel“)

### Čl. 1

#### Specifikace školního díla

1. Předmětem této smlouvy je vysokoškolská kvalifikační práce (VŠKP):

- disertační práce
  - diplomová práce
  - bakalářská práce
  - jiná práce, jejíž druh je specifikován jako .....
- (dále jen VŠKP nebo dílo)

Název VŠKP: Optické metody měření kontrakce izolované srdeční buňky  
Vedoucí/ školitel VŠKP: Ing. Vratislav Čmiel  
Ústav: Ústav biomedicínského inženýrství  
Datum obhajoby VŠKP: 7. nebo 8. června 2010 \*

VŠKP odevzdal autor nabyvateli\*:

- v tištěné formě – počet exemplářů: 2
- v elektronické formě – počet exemplářů: 2

2. Autor prohlašuje, že vytvořil samostatnou vlastní tvůrčí činností dílo shora popsané a specifikované. Autor dále prohlašuje, že při zpracovávání díla se sám nedostal do rozporu s autorským zákonem a předpisy souvisejícími a že je dílo dílem původním.
3. Dílo je chráněno jako dílo dle autorského zákona v platném znění.
4. Autor potvrzuje, že listinná a elektronická verze díla je identická.

---

\* hodící se zaškrtněte

## Článek 2

### Udělení licenčního oprávnění

1. Autor touto smlouvou poskytuje nabyvateli oprávnění (licenci) k výkonu práva uvedené dílo nevýdělečně užít, archivovat a zpřístupnit ke studijním, výukovým a výzkumným účelům včetně pořizování výpisů, opisů a rozmnoženin.
2. Licence je poskytována celosvětově, pro celou dobu trvání autorských a majetkových práv k dílu.
3. Autor souhlasí se zveřejněním díla v databázi přístupné v mezinárodní síti
  - ihned po uzavření této smlouvy
  - 1 rok po uzavření této smlouvy
  - 3 roky po uzavření této smlouvy
  - 5 let po uzavření této smlouvy
  - 10 let po uzavření této smlouvy(z důvodu utajení v něm obsažených informací)
4. Nevýdělečné zveřejňování díla nabyvatelem v souladu s ustanovením § 47b zákona č. 111/ 1998 Sb., v platném znění, nevyžaduje licenci a nabyvatel je k němu povinen a oprávněn ze zákona.

## Článek 3

### Závěrečná ustanovení

1. Smlouva je sepsána ve třech vyhotoveních s platností originálu, přičemž po jednom vyhotovení obdrží autor a nabyvatel, další vyhotovení je vloženo do VŠKP.
2. Vztahy mezi smluvními stranami vzniklé a neupravené touto smlouvou se řídí autorským zákonem, občanským zákoníkem, vysokoškolským zákonem, zákonem o archivnictví, v platném znění a popř. dalšími právními předpisy.
3. Licenční smlouva byla uzavřena na základě svobodné a pravé vůle smluvních stran, s plným porozuměním jejímu textu i důsledkům, nikoliv v tísní a za nápadně nevýhodných podmínek.
4. Licenční smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem jejího podpisu oběma smluvními stranami.

V Brně dne: 20. května 2010

.....  
Nabyvatel

.....  
Autor

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá základním popisem optických metod měření běžně užívaných k hodnocení kontrakce izolované srdeční buňky a popisem základních jevů, které s ní souvisejí. Mikroskopem pořízený kamerový záznam sloužil jako základ pro námi zvolené optické metody měření kontrakce s využitím vhodných metod zpracování a analýzy obrazu použitých k detekci významných částí buněčné struktury.

Navržená uživatelská aplikace sestavená v prostředí Matlab umožňuje analýzu a interpretaci funkcí kontrakce dvěma různými metodami.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kontrakce, myokard, sarkomer, videozáznam, buňka, detekce hran, morfologické transformace

## **ABSTRACT**

Diploma work is focused on basic characteristics of optical measuring methods commonly used to rate contractions of isolated heart cell and describes basic actions, that are connected with it. A camera record made by a microscope served as basis for optical measuring methods of contractions chosen by us, with using appropriate method elaborating and analysis of pictures used for detection of important part of cell structure.

The suggested user application built-up in Matlab environment allows analysis and interpretation of contractional functions in two methodical ways.

## **KEYWORDS**

Contraction, myocard, sarcomer, cell, edge detection, video, morfological transformation

VADKERTI, K. *Optické metody měření kontrakce izolované srdeční buňky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 44 s., 9 s. příloh. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Optické metody měření kontrakce izolované srdeční buňky jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)



# OBSAH

ÚVOD .....	1
<b>1. STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK.....</b>	<b>2</b>
1.1 ZPŮSOBY PŘENOSU VZRUCHŮ .....	4
<b>2. STRUKTURA A FUNKCE IZOLOVANÉ SRDEČNÍ BUŇKY .....</b>	<b>7</b>
2.1 OBECNÉ VLASTNOSTI SVALOVÉ TKÁNĚ .....	7
2.2 VLASTNOSTI SRDEČNÍ TKÁNĚ .....	8
2.3 ZPŮSOB KONTRAKCE SRDEČNÍ BUŇKY .....	9
<b>3. POPIS OPTICKÝCH METOD MĚŘENÍ.....</b>	<b>11</b>
3.1 METODA SVĚTELNÉHO OHYBU (LIGHT DIFFRACTION) .....	11
3.2 PŘÍMÉ OPTICKÉ METODY (DIRECTLY OPTICAL IMAGING).....	12
3.2.1 <i>Detekce striatury tvaru sarkomery (Sarcomere striation pattern detection).....</i>	<i>12</i>
3.2.2 <i>Záznam přímého pruhování (Direct striation imaging).....</i>	<i>12</i>
3.2.3 <i>Metoda detekce části buněčné struktury (Cell End Detection).....</i>	<i>13</i>
<b>4. METODY ZPRACOVÁNÍ OBRAZU.....</b>	<b>15</b>
4.1 DEFINICE OBRAZU A JEHO ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI .....	16
4.2 DIGITÁLNÍ REPREZENTACE OBRAZU .....	17
4.3 PŘEDZPRACOVÁNÍ OBRAZU .....	18
4.3.1 <i>Prahování.....</i>	<i>18</i>
4.3.2 <i>Matematická morfologie .....</i>	<i>18</i>
4.4 SEGMENTACE OBRAZU .....	20
4.4.1 <i>Detekce hran.....</i>	<i>20</i>
<b>5. POŘÍZENÍ VIDEOZÁZNAMU KONTRAKCE .....</b>	<b>23</b>
5.1 PREPARACE BUNĚČNÍ STRUKTURY (CELL PREPARATION).....	23
5.2 ZÁZNAM STIMULOVANÉ BUŇKY (MICROSCOPY AND DATA ACQUISITION) .....	24
<b>6. POUŽITÉ ZPŮSOBY OBRAZOVÉHO ZPRACOVÁNÍ SNÍMKŮ.....</b>	<b>26</b>
6.1 TVORBA GRAFICKÉHO ROZHRANÍ .....	26
6.2 NÁVRH APLIKACE .....	27
6.3 ÚPRAVA POŘÍZENÉHO VIDEOZÁZNAMU .....	29
6.4 ZPRACOVÁNÍ SEKVENCE SNÍMKŮ .....	32
6.4.1 <i>Pomocí metod hranové detekce a morfologických transformací .....</i>	<i>33</i>
6.4.2 <i>Pomocí metod přímé konverze a morfologických transformací.....</i>	<i>36</i>
6.5 UKÁZKA REALIZACE V SIMULINKU.....	38
<b>7. VYHODNOCENÍ FUNKCE KONTRAKCE .....</b>	<b>39</b>
7.1 METODA VYHODNOCENÍ ROZMĚRŮ .....	39
7.2 METODA MĚŘENÍ POČTU PIXELŮ .....	40
7.3 SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	41
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>43</b>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	45
---	----

PŘÍLOHY .....	46
---------------	----

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.1	Schematická struktura živočišné buňky [15] .....	2
Obr. 1.2	Schematická struktura buněčné membrány [2] .....	3
Obr. 1.3	Příklady průběhů akčního napětí AN [2] .....	4
Obr. 1.4	Struktura iontového kanálu [2] .....	5
Obr. 1.5	Funkční stavy sodíkového kanálu [13] .....	5
Obr. 2.1	Vazba aktinových a myozinových vláken.....	7
Obr. 2.2	Struktura svazku vláken [17] .....	8
Obr. 2.3	Srdeční buňky a jejich způsob přenosu vzruchů [2] .....	9
Obr. 2.4	Molekulární mechanismus kontrakce [2] .....	9
Obr. 2.5	Princip kontrakce po vybuzení AP [2], [20] .....	10
Obr. 3.1	Komerční program pro měření kontrakce od firmy IonWizard [18].....	13
Obr. 4.1	Čtvercová a hexagonální vzorkovací mřížka [5] .....	17
Obr. 5.1	Ilustrační obrázek fyziologického roztoku.....	23
Obr. 5.2	Blokové schéma principu záznamu stimulované buňky.....	24
Obr. 5.3	Ilustrační obrázek (IonWizard 6.0) [18].....	25
Obr. 5.4	Ilustrační obrázek stimulatoru [19] .....	25
Obr. 5.5	Ilustrační obrázek stimulační vaničky s elektrodami [12] .....	25
Obr. 6.1	Hierarchie základních grafických objektů v Matlabu.....	26
Obr. 6.2	Návrh grafického prostředí.....	27
Obr. 6.3	Ukázka načtení pořízeného videozáznamu.....	29
Obr. 6.4	Aplikace umožňující výběr ROI oblasti z načteného videozáznamu.....	30
Obr. 6.5	Aplikace umožňující přehrání ořezaného videozáznamu srdeční buňky.....	31
Obr. 6.6	Uživatelské rozhraní vytvořeného programu.....	32
Obr. 6.7	Ukázka aplikace zpracování na konkrétním snímku, ( <i>Edge methods</i> ).....	33
Obr. 6.8	Ukázka aplikace zpracování na konkrétním snímku, ( <i>BW method</i> ).....	36
Obr. 6.9	Ukázka realizace měření kontrakce pomocí metod přímé konverze.....	38
Obr. 6.10	Ukázka realizace měření kontrakce pomocí metod hranové detekce.....	38
Obr. 7.1	Výsledné průběhy získané z detekce délky buněčné struktury.....	39
Obr. 7.2	Výsledné průběhy získané z detekce počtu pixelů v buněčné struktuře.....	40
Obr. 7.3	Výsledné průběhy kontrakce .....	41

# SEZNAM TABULEK

Tab. 6.1	Základní parametry původního videozáznamu. ....	29
----------	---	----

# ÚVOD

S prudkým rozvojem techniky a technického vybavení byl umožněn rozvoj technik, využívajících k měření kontrakce, různé optické metody v kombinaci s různými metodami používanými pro obrazové zpracování. Takto mohou být pozorovány objekty malých velikostí s velkou dynamikou pohybu.

Optické metody měření běžně užívané k hodnocení kontrakce izolované srdeční buňky, slouží k získávání důležitých experimentálních informací, přičemž důraz je kladen na samotnou kontrakci, zkracování a roztahování buňky. Jedná se o cyklus nazývaný také jako kontrakce a relaxace. V současné době, již bylo vyvinuto velké množství optických technik pro vyhodnocení změn délky během kontrakčního cyklu. Řada rozličných metod však vyžadují drahé vybavení a sofistikované techniky k dosažení požadované analýzy. Využitím vhodných metod zpracování a analýzy obrazu lze výrazně snížit tyto hardwarové nároky kladené na analýzu kontrakčního cyklu.

Z tohoto důvodu si tato práce kládla za cíl použití metod optického vyhodnocení s využitím vhodných metod zpracování a analýzy obrazu, k detekci významných částí buněčné struktury sledovaného objektu. V převážné míře se jednalo o softwarové řešení.

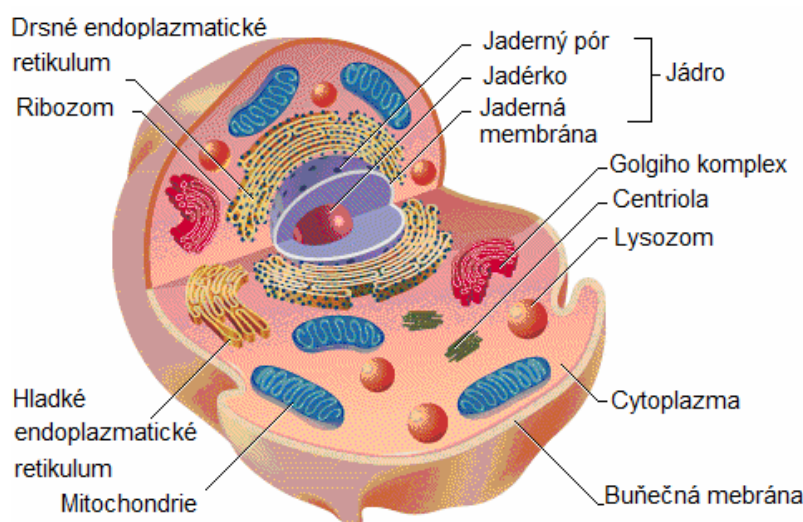
V teoretické části se tato práce zabývá popisem charakteristických vlastností izolované srdeční buňky, tzv. pracovního myokardu, a popisem jevů souvisejících s její kontrakcí. Další část mé práce byla zaměřena na popis dosud známých optických metod měření kontrakce a základních metod používaných pro obrazové zpracování.

Praktická část práce vyžadovala pořízení vhodného kamerového záznamu kontrakce izolované srdeční buňky při stimulaci, s využitím posledních trendů dvojrozměrného obrazového snímání pomocí mikroskopické CCD kamery. Následné grafické a číselné vyhodnocení kontrakce námi sledované buňky bylo realizované s využitím technik zpracování obrazu. Navržená uživatelská aplikace byla sestavená v prostředí Matlab. Jedná se o integrované prostředí pro vědeckotechnické výpočty, modelování, návrhy algoritmů, simulace, analýzu a prezentaci dat, měření a zpracování signálů a obrazů, návrhy řídicích nebo komunikačních systémů. Je to nástroj, jak pro pohodlnou interaktivní práci, tak pro vývoj širokého spektra aplikací. Výhoda spočívá ve velkých možnostech tohoto prostředí, neboť je velmi rozšířeno v průmyslu, vědě a v neposlední řadě jeho verze existují pro řadu operačních systémů.

# 1. Stručná charakteristika živočišných buněk

Základními stavebními částicemi každé živé buňky organismu jsou na atomové úrovni převážně prvky  $C$   $H$   $O$   $N$  a v menší míře zastoupeny  $P$   $S$   $N_a$   $C_l$   $K$   $C_a$   $M_g$  a také i různé stopové prvky, jako jsou  $F_e$   $C_u$   $M_n$   $C_o$   $B$   $J$   $F$   $B_r$   $S_i$   $L_i$   $R_b$   $S_r$   $B_a$   $A_l$   $Z_n$ .

Tyto anorganické elementy tvoří na molekulární úrovni buňky živých organismů. Systematicky je lze dělit na tuky, cukry, bílkoviny a nukleové kyseliny. Přičemž buňky jsou základními stavebními jednotkami každého živého organismu. Struktura buňky je závislá na různých faktorech souvisejících s její funkcí. Různou funkci mají jak buňky živočišného původu, tak i buňky původu rostlinného. Další podrobnosti lze nalézt v [2], [3].



Obr. 1.1 Schematická struktura živočišné buňky [15]

Základní strukturu, živočišných buněk, tvoří buněčné jádro, endoplazmatické retikulum, golgiho komplex, buněčná membrána, lyzosomy, cytoplazma.

Buněčné jádro obsahuje informace o struktuře a funkci dané buňky v rámci většího celku. Nositelem této informace jsou již zmíněné nukleové kyseliny (*NK, které lze dělit na RNA-ribonukleová kyselina a DNA deoxyribonukleová kyselina*).

Endoplazmatické retikulum tvoří systém plochých váčků a kanálků, kde probíhají syntetické děje. V zrnitém endoplazmatickém retikulu jsou připojeny ribozomy, které jsou zodpovědné za syntézu bílkovin. V případě zrnitého endoplazmatického retikula se tvoří lipidy.

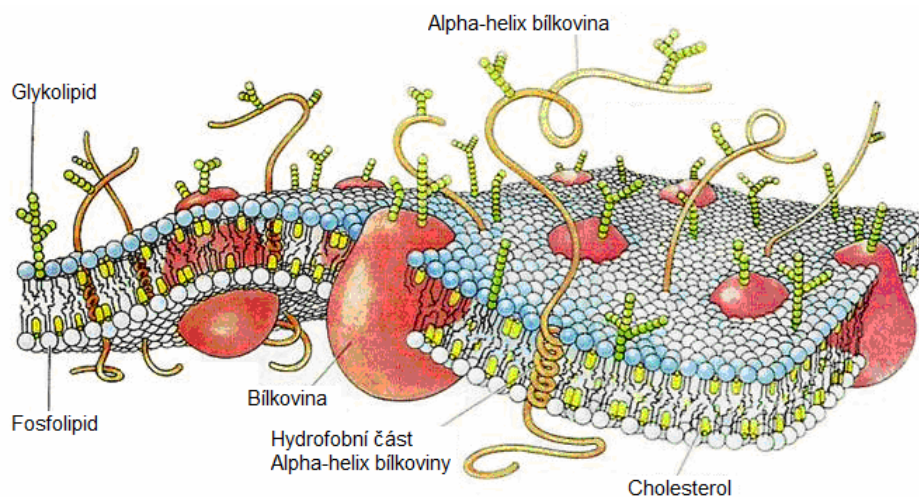
Lyzosomy zabezpečují odbourávání cizorodých látek nebo vlastních organel a jsou typické pro živočišné buňky.

Cytoplasma je strukturovaná vodní emulze tvořící vnitřní prostředí buňky. Nachází se ve všech buňkách.

Golgiho komplex slouží k tvorbě polysacharidů, glykoproteinů a odštěpuje sekreční granula. Energie se uvolňuje v mitochondriích.

Oxidativním štěpením v cyklu trikarbonových kyselin se z glukózy, respektive acylkoenzymu A, uvolňuje energie, která se ukládá do ATP (*adenosin trifosforečná*). Část energie se ztrácí ve formě tepla, konečnými produkty štěpení jsou oxid uhličitý a voda. ATP patří k nejvýznamnějším nositelům energie v buňkách.

Buněčná membrána je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, ve které jsou integrovány bílkoviny. Tyto bílkoviny tvoří strukturu kanálů a přenašečových systémů různých typů iontů. Membrána odděluje intracelulární prostředí buňky od extracelulárního, přičemž na rozhraní těchto dvou prostředí lze měřit membránové napětí. Z elektrického hlediska má membrána kapacitní charakter, z tohoto důvodu ji lze popsat elektrickým náhradním schématem.



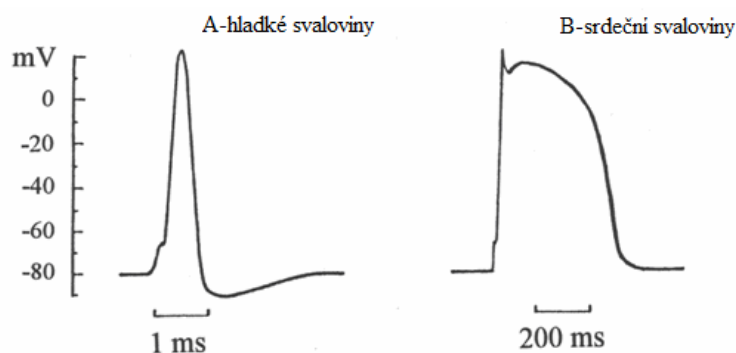
Obr. 1.2 Schematická struktura buněčné membrány [2]

Tato práce si neklade za cíl podrobný popis struktury buněk a jednotlivých organel, ale má sloužit jen jako jakýsi náhled (*průvodce*). Z tohoto důvodu zde byly zmíněny jen některé její části, převážně pak části buněk živočišných.

## 1.1 Způsoby přenosu vzruchů

Přenos informací mezi jednotlivými buňkami podobného nebo různého druhu probíhá obvykle pomocí chemických látek, či elektrického signálu nazývaného v tomto případě jako AN (*akční napětí*). V dalším textu se budeme zabývat pouze způsobem vzniku a šířením AN. Podrobně viz.[2].

Toto napětí, nazývané také jako AP (*akční potenciál*), vzniká nebo se přenáší pouze u tzv. excitabilních buněk (nervové, svalové). Při svalových buňkách rozlišujeme kosterní, srdeční a hladký sval. K přenosu či generování AN dochází pouze po překročení určité nad prahové hodnoty napětí, podráždění, tato hodnota je individuální u různých excitabilních buněk a buněčných struktur.



Obr. 1.3 Příklady průběhů akčního napětí AN [2]

Význam impulsů akčního napětí AN spočívá v přenosu informací (*modulovaný impulsní signál*) a také slouží jako spouštěcí mechanismus (*spouštění a řízení kontrakce svalu, uvolňování látek*).

### Membránový potenciál (MP)

Každá buňka má jistou hodnotu membránového napětí, která je dána rozdílem elektrického potenciálu v extracelulárním prostředí a v intracelulárním prostředí.

$$U_m = \varphi_i - \varphi_e \quad (1.1)$$

U většiny buněk existuje na membráně rozdíl potenciálu, přičemž uvnitř buňky je potenciál negativnější. Srdeční buňky mají membránový klidový potenciál  $-90 \text{ mV}$  ( $-85 \text{ mV}$  až  $-95 \text{ mV}$ ). Podráždění vyvolá šíření akčního potenciálu (AP), který odpovídá zahájení kontrakce. Základní vliv na vzniku napětí v buňce mají kladné a záporné ionty, zejména změny vyvolané změnou polohy iontů z extracelulárního do intracelulárního prostředí nebo naopak.

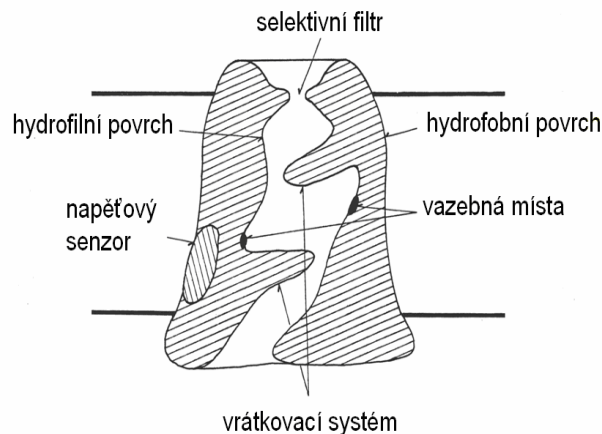
V různých buňkách lze najít různé zastoupení iontů, přičemž největší podíl mají ionty :

- v intracelulárním prostředí ionty  $[N_a^+]$ ,  $[C_a^{2+}]$ ,  $[K^+]$ ,  $[C_l^-]$ ,  $[A^-]$
- v extracelulárním prostředí ionty  $[N_a^+]$ ,  $[C_a^{2+}]$ ,  $[K^+]$ ,  $[C_l^-]$ .

## Iontové kanály

Přenos iontů membránou probíhá pomocí tzv. iontových kanálů, které mají různou vodivost, selektivitu propustnosti pro různé typy iontů. Jsou tvořeny převážně molekulami bílkovin v membránové struktuře.

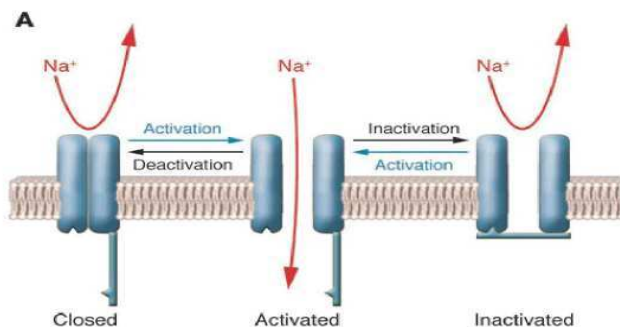
Pozn.: Přítok pozitivně nabitého iontu do buňky je popisován jako „inward“ proud. Přítok negativně nabitého iontu do buňky má na membránový potenciál buňky stejný efekt jako odtok pozitivně nabitého iontu z buňky, proto bývá nazýván „outward“ proud.



Obr. 1.4 Struktura iontového kanálu [2]

Nabitě částice (*ionty*) procházejí lipidovou dvojrůstvou velmi pomalu, dostávají se proto do buňky iontovými kanály. Některé kanály jsou nepřetržitě otevřené, zatímco jiné jsou řízené. Kanály řízené mají vrátka, která se otevírají a zavírají. Některé se uzavírají při změně membránového potenciálu, tj. jsou řízené napětím. Jiné se otevírají a zavírají, naváže-li se na ně ligand, tzn. jsou řízené ligandem. Některé kationtové kanály lze otevřít mechanickým napětím.

Z hlediska interakce některých látek na kanály lze tyto látky rozdělit na pozitivně působící, tzv. aktivátory, které zvyšují činnost daného typu kanálu, a na negativně působící, tzv. blokátory, které naopak činnost daného typu kanálu snižují, čímž dochází i ke snížení její vodivosti. Tyto látky také ovlivňují dobu, po kterou budou kanály otevřeny (*střední doba otevření nebo uzavření kanálu*). Převážně se jedná o účinky některých léků nebo toxických látek. Jako blokátor může být použita molekula organické látky nebo anorganický iont, který se naváže na dané místo v kanálu a tím znemožní přenos daného typu iontu.



Obr. 1.5 Funkční stavy sodíkového kanálu [13]



Vedle kanálů zprostředkovávají trans-membránový transport iontů také buňky přenašeče. Jsou také tvořeny molekulami bílkovin zabudovanými do membrány. Od kanálů se liší způsobem přenosu iontů. Nevytvářejí v membráně vodivý pór. Ionty jsou přenášeny prostřednictvím vazby na vazebná místa a následné změny konformace přenašeče.

Směr přenosu iontů je závislý na elektrochemickém potenciálu. Základem je pohyb iontů z místa s vyšším elektrochemickým potenciálem do místa s nižším a to v rámci intracelulárního i extracelulárního prostředí. Tento pohyb může být uskutečněn také za pomoci dodané energie ve formě ATP. V tomto případě pak může nastat i pohyb iontů opačný.

Srdeční iontové kanály jsou iontově specifické pro sodík, draslík, vápník či anionty. Počet a druh iontových kanálů exprimovaných v srdečním myocytu je ovlivněn faktory řídicími vývoj myocytu v závislosti na jeho lokalizaci v srdci.

Iontové kanály jsou součástí obrovských multiproteinových komplexů skládajících se z:

- $\alpha$ -podjednotek,
- $\beta$ -podjednotek (*pomocných*)
- komponent cytoskeletu,
- regulačních kináz a fosfatáz,
- přepravních proteinů
- proteinů tvořících extracelulární matrix.

Sodíkové kanály jsou heteromultimery složené z jedné velké  $\alpha$ -podjednotky tvořící pór a jedné nebo více menších pomocných  $\beta$ -podjednotek. Jedná se o integrální membránové proteiny, patřící do široké skupiny iontových kanálů, řízených změnami membránového potenciálu. Aktivace sodíkových kanálů vyvolá úvodní rychlou depolarizaci a nárůst AP v komorových a sinových myocytech. Podrobně viz.[13],

Na-kanály se přepínají mezi třemi různými funkčními stavy v závislosti na MP.

- 1) Depolarizace membrány vede k otevření (*aktivaci*) kanálů, pronikání  $\text{Na}^+$  do buňky vede k další depolarizaci membrány, což je charakteristické pro počáteční fázi srdečního AP.
- 2) Aktivace je pouze dočasná (*1-2 ms*) a poté dochází k inaktivaci, rychlá inaktivace trvá 10 ms. C-terminální část  $\alpha$ -podjednotky má vliv na kinetiku inaktivace.
- 3) Kanály se nemohou znovu otevřít, dokud není membrána repolarizovaná a dojde ke „zotavení“ z inaktivace. Deaktivace je uzavření kanálu. Může dojít rovněž k tzv. pomalé inaktivaci, pokud je membrána depolarizovaná delší dobu. To trvá v řádu sekund.

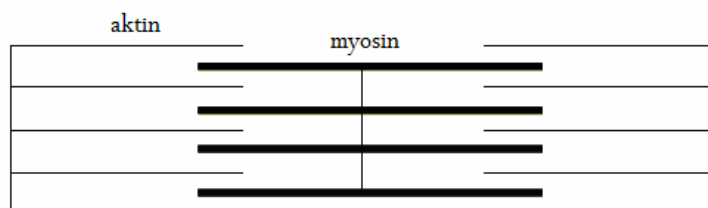
## 2. Struktura a funkce izolované srdeční buňky

V následujícím textu se budeme zabývat popisem a charakteristikou vlastností samotné svaloviny pracovního myokardu a její základní stavební jednotkou, která je tvořena izolovanou srdeční buňkou – myocyta.

Srdeční svalovina - myokard (*myocardium*) je zvláštní druh příčně pruhované svaloviny. Svalová vlákna srdečního svalu se větví a znovu spojují, ale každé tvoří úplnou jednotku obklopenou buněčnou membránou. Tam, kde konec jednoho vlákna přiléhá ke druhému, membrány obou vláken probíhají paralelně v sérii záhybů. Tyto útvary se nazývají interkalární disky a představují hranice jednotlivých buněk. Jedná se o velmi pevná spojení mezi vlákny udržující návaznost buněk, takže tah vyvinutý jednou kontraktlní jednotkou může být předán další. Buňky myokardu obsahují uprostřed oválné jádro, kolem něj jsou po délce buňky kontraktlní myofibrily, povrch buněk tvoří tenká sarkolemma.

### 2.1 Obecné vlastnosti svalové tkáně

Svalová tkáň je specifický typ tkáně schopná stahu (*kontrakce*), v podstatě se jedná o zasouvání bílkovinných vláken aktinu a myosinu. V klidovém stavu jsou částečně mezi sebe zasunuty a celý proces aktivace začíná podrážděním AN (*AP*) plazmatické membrány. Podrobně viz.[2], [3].



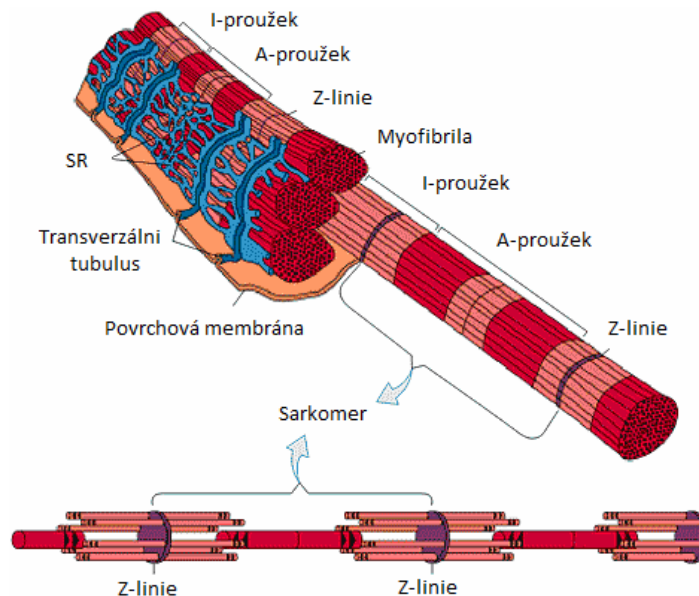
Obr. 2.1 Vazba aktinových a myozinových vláken.

Samotný kontraktlní aparát tvoří :

- kontraktlní bílkoviny (*aktin, myozin*),
- regulační bílkoviny (*tropomyozin, troponin*),
- zdroj energie (*ATP*),
- samotný spouštěcí mechanismus ( $Ca^{2+}$ ).

Pohyb mezi dvěma vlákny je mikroskopických rozměrů, celkový pohyb je dán sériovým zařazením obrovského množství aktinových a myozinových vláken ve větších vláknech - myofibrilách.

Svalovou tkáň dělíme podle funkčních vlastností tři druhy. Hladké svaly se stahují pomalu, bez řízení naší vůle, jsou neunavitelné a nacházejí se ve stěnách dutých orgánů. Svaly kosterní, neboli příčně pruhované, se stahují rychle, jsou řízené naší vůlí a dochází u nich k únavě. Schopnost volného řízení svalu je závislé na typu nervů, které do svalu vstupují. Speciálním typem příčně pruhovaného svalu je tzv. srdeční sval, který se stahuje rychle, je neunavitelný a nezávislý na naší vůli. Kontrakce srdce jsou řízeny srdečním pacemakerem, který se nachází v SA uzlu (*sinoatriální uzel*).



Obr. 2.2 Struktura svazku vláken [17]

Účinnost svalových vláken spočívá v jejich sériovém nebo paralelním uspořádání, přičemž svazek svalových vláken je složen z množství myofibril, které se dále skládají ze sarkomer.

## 2.2 Vlastnosti srdeční tkáně

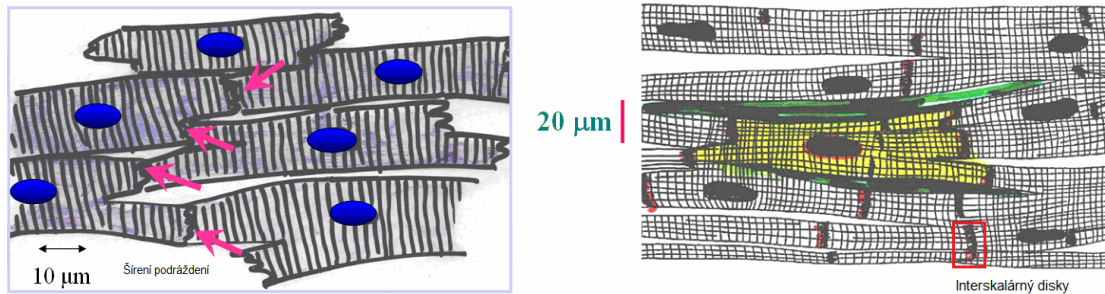
Z funkčního hlediska řadíme příčně pruhovaný sval, tzv. srdeční sval, ke speciálnímu typu svalové tkáně. Podrobně viz.[2], [3].

Ze strukturního hlediska je buňka srdečního svalu tvořena jednojadernými větvenými buňkami (*max. délky 100 μm*). Její aktivita není závislá na vůli, je tvořena pravidelně uspořádanými myozinovými a aktinovými filamenty. Má středně vyvinuté sarkoplazmatické retikulum, pravidelné uspořádání myozinových a aktinových filament (*sarkomery, příčné pruhování*) a funkční syncytium (*elektrická spojení „synapse“*). Kontrakce jsou spouštěny nezávisle na nervové stimulaci (*pravidelný rychlý „pacemaker“ v SA uzlu*), tetanická kontrakce nemůže vzniknout (*dlouhá refrakterní doba – dlouhé trvání AN*).

Srdce je tvořeno:

- vnitřní výstelkou (*endokard*),
- střední vrstvou (*myokard*),
- povrch kryje povrchová blána (*epikard*),
- zevní obal srdce je osrdečník (*perikard*)

Kardiomyocyty mají perinukleární prostor, v němž jsou uspořádána myofilamenta. Ty mají tzv. interkalární disky, což jsou specializované molekulové komplexy, oddělující jednu buňku od druhé. Téměř polovina buňky je tvořena mitochondriemi. Je to proto, že srdeční sval musí pracovat nepřetržitě po celou dobu života a kontrakce myokardu vyžaduje výlučně aerobní metabolismus (*regenerace ATP z ADP oxidací fosforylací*) a je navozována srdečním svalem samým (*autonomní srdeční systém*), nikoliv vnějšími nervovými podněty, ačkoliv nervová soustava může mít na tento stah vliv.

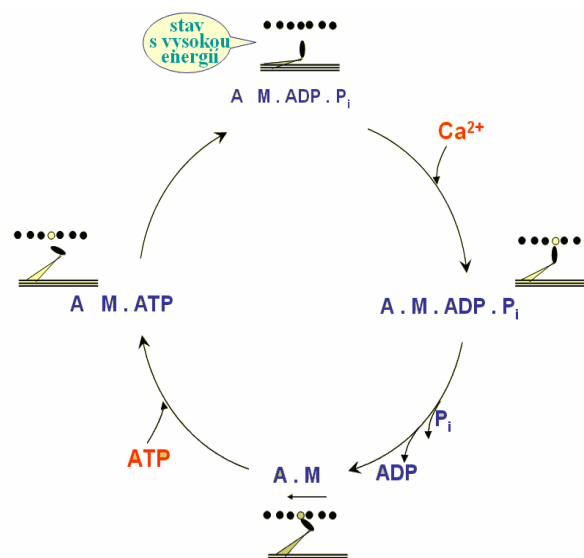


Obr. 2.3 Srdeční buňky a jejich způsob přenosu vzruchů [2]

Podráždění se srdeční tkání šíří z jedné buňky na druhou, přičemž jednotlivé buňky jsou spojeny interskalárními disky. Elektrické propojení buněk zajišťují tzv. elektrická synapse.

## 2.3 Způsob kontrakce srdeční buňky

Mechanismus kontrakce bývá spouštěn impulzem AN, přičemž nositelem signálu uvnitř buňky se stávají ionty  $Ca^{2+}$ . Šířící se podráždění vyplaví vápníkové ionty ze sarkoplazmatického retikula, které následně umožní vazbu aktinu a myozinu a ohnutí hlavice na konci myozinového vlákna. Zmenšení úhlu představuje vlastní pohyb. Po rozpojení nastává opět zvětšení úhlu a hlavice se naváže na sousední vazné místo aktinu. Celý cyklus se opakuje a nazýváme jej klouzavým modelem kontrakce. Čerpáno literatura [2], [3].

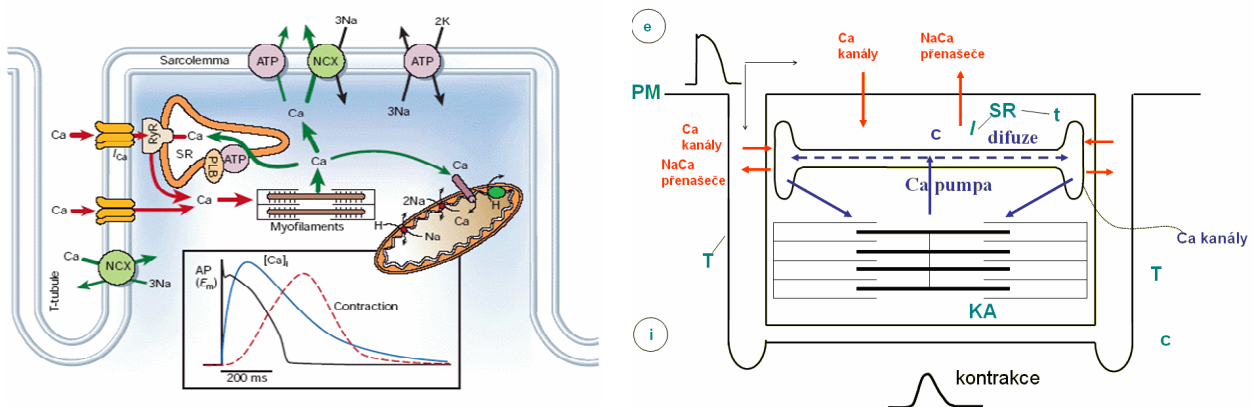


Obr. 2.4 Molekulární mechanismus kontrakce [2]

V cytoplazmě svalového vlákna jsou podélně uloženy myofibrily, které jsou příčinou jeho příčného pruhování. Myofibrily jsou tvořeny dvojlomnou (*anisotropní*) bílkovinou myozinem a jednolomnou (*isotropní*) bílkovinou aktinem.

Propojení i tah se uskutečňuje pomocí příčných výběžků, tzv. myozinových hlav, na koncích myozinových filament. Myozinové hlavy se napojují na aktin a vykonávají koordinovaný kývavý pohyb. Myozinová hlavička se přitom odkloní o 45° od sousední linie Z a tak popotáhne tenkou filamentu o 10 nm vzhledem k tlusté filamentě. Protilehlá aktinová filamenta se srážejí uprostřed sarkomery. Poté jsou ionty kalcia transferovány zpět do SR, dojde ke snížení jejich koncentrace v myoplazmě, ustává chemická interakce mezi myozinovými hlavičkami a aktinovou filamentou a vlákna tropomyozinu opět překrývají vazebná místa pro hlavičky myosinu a sval se relaxuje. Celý děj je závislý na ATP. Na každý pohyb hlavy je hydrolyzována 1 molekula ATP na ADP + Pi. Tato reakce je velmi efektivní. Stažený sval může být až o třetinu kratší než sval relaxovaný.

Myofibrila jsou tak tvořena základními válcovitými úseky, umožňující její smršťování. Tyto základní úseky se nazývají sarkomery. Při svalovém stahu se myozin nasouvá na aktin a tím se zkracuje délka myofibrily. Přitom dochází ke štěpení molekul ATP. K tomu je zapotřebí přítomnost  $Ca^{2+}$  iontů. Podnět pro svalový stah u srdečních buněk vzniká přímo v SA uzlu (v srdečním pacemaker).



Obr. 2.5 Princíp kontrakce po vybuzení AP [2], [20]

PM – povrchová membrána T – tubulární systém SR – sarkoplazmatické retikulum (rezervoár vápníku , l longitudinální t terminální) KA – kontraktilný aparát c- cytoplazma

Jinými slovy by dalo se říct, že srdeční buňka, jinak nazývaná jako myokard, je schopna dvou protichůdných dějů (*kontrakce a relaxace*), přičemž tyto děje se cyklicky opakují. V relaxačním stavu jsou myozinové hlavičky vzhledem k aktinovému vláknu orientovány kolmo. Při kontrakci se hlavičky myozinu zalomí pod úhlem 45° a zároveň sebou táhnou aktinové vlákno. To se posouvá směrem k centru sarkomery, Z linie se k sobě přibližují, rozsah překrytí aktinových a myozinových vláken vzrůstá. Důsledkem toho dojde ke zkrácení sarkomery.

### 3. Popis optických metod měření

Optické metody měření kontrakce izolované srdeční buňky (*cardiac myocyte*) nebo svazku buněk sarkomer lze rozdělit na dvě kategorie zmíněné níže. Mezi základní zájmy obou způsobů patří dosažení co nejlepšího časového nebo prostorového rozlišení z důvodu optimálního hodnocení funkce buňky. Optické metody slouží k získávání důležitých experimentálních informací, přičemž důraz je kladen na samotnou kontrakci (*zkracování a roztahování*) buňky. Použita literatura [1].

V průběhu rozličných kardiovaskulárních výzkumných aktivit a jejich analýzy již bylo vyvinuto několik rozličných metod, přičemž tyto metody vyžadují drahé vybavení a sofistikované techniky k dosažení požadované analýzy.

Mezi první pokusy měření kontrakce a relaxace řadíme pokusy vykonané pomocí asistence videozáznamových zařízení (*video based devices*), které byli schopné zaznamenat rozsah a poměr zkracování délky izolované srdeční buňky. Byly to jedny z prvních navržených metod tohoto druhu. Metody založené na videozáznamu využívají dvou sledujících bodů, na každém konci myocyty a zjišťují posunutí způsobené samotnou kontrakcí. K tomuto účelu byly používány hranové detektory. Tyto metody přinášeli natolik uspokojivé výsledky, že byly používány skoro 20 let. S prudkým rozvojem techniky a technického vybavení byl umožněn i rozvoj jiných technik, zavedení stále přesnějších snímačů, a nebo různých metod používaných pro obrazové zpracování.

Mezi omezující faktory níže popsaných metod patří zejména samotný tvar sledované srdeční buňky, který je způsoben převážně geometrií, rotačními a translačními pohyby myocyty a dále také kvalitou pořízeného záznamu, což souvisí s provedením samotného snímáče a způsobu zpracování snímků.

#### 3.1 Metoda světelného ohybu (Light diffraction)

Pomocí tohoto způsobu lze pozorovat periodicitu sarcomery, prosvěcování svazků svalových vláken monochromatickým světlem, přičemž zaznamenáme sérii světelných ohybů (*layer lines*) svazku. Rozstup je nepřímo úměrný příčně pruhovanému vzoru sledovanému skrz optický mikroskop. Takto lze získat tzv. index sledovaného svalu, který vyplývá z ohybových zákonitostí světla.

Tato metoda dokáže sledovat dynamiku sarcomeru ze svalového preparátu použitím vhodné detekční metody. Použitím laserového svazku lze prosvítit pouze hranice svalu, které jsou podstatné pro měřitelnost ve vícenásobných oblastech vícebuňčných preparátů. Při aplikaci na izolované srdeční buňky, kdy je celá buňka osvětlená, odpadá řada problémů a lze tak dosáhnout významně ostřejších, snáze zaznamenanějších a spolehlivější dat.

Metoda světelného ohybu nepatří mezi běžně používané způsoby, jakými jsou například přímé optické metody, ale přesto jsou stále účinným způsobem hodnocení kontrakčních funkcí myocyty. Celkový výsledek je hodně závislý na typu použitého detekčního systému. Limity této metody spočívají v průměrné hodnotě periodicity sarkomery, geometrii buňky nebo také na vzniklých optických artefaktech, které mohou získána data zkreslit. Difrakční techniky jsou méně schopné popisu prostorově nestejnorodých a asynchronně se chovajících buněk, jako jsou myocyty.

## 3.2 Přímé optické metody (Directly optical imaging)

Tyto metody umožňují pořízení záznamů s vysokým časovým a prostorovým rozlišením. Takto mohou být pozorovány objekty malých velikostí. Použitím moderních detekčních i analyzačních systémů lze monitorovat dynamiku pohybu za hranice nelineární detekce našeho zraku.

Metody užívané ke kvantifikaci měření vyžadují drahé vybavení oproti optickým metodám námi užitými, které lze realizovat relativně levně a jednoduše.

### 3.2.1 Detekce striatury tvaru sarkomery (Sarcomere striation pattern detection)

*Analýza pomocí uzavřené fázové smyčky (Phase locked loop analysis)*

Někdy se také nazývá i jako FM demodulace, přičemž lze pomocí této metody získat uniformní (*stejnorodé*) a dynamická data ze sarkomery srdeční buňky. Jejich použitím lze dosáhnout vysokého časového rozlišení v závislosti na použitém typu detektoru. Běžně se používají CCD snímače (*charge couple device*), někdy také nazývané i jako senzor s nábojově vázanou strukturou.

Poskytují průměrnou hodnotu periodicity sarkomery z celé buňky, nebo oblasti uvnitř buňky, kterou zahrnuje detekční okno. Procedura je ovlivnitelná chybami vyplývající z geometrie a rotačních změn, které se mohou vyskytnout během kontrakce. Tato data mohou být matoucí v závislosti na počtu pruhů (*striatura*) uvnitř detekčního okna během kontrakčního cyklu jako výsledek buněčného pohybu. Nepatří však mezi široce používané techniky současnosti.

### 3.2.2 Záznam přímého pruhování (Direct striation imaging)

*Lineární pole zobrazování (Linear array imaging)*

Pomocí této metody lze získat 1D, 2D nebo 3D data pomocí CCD kamery s řádkovým polem detektorů (*single line array cameras*), na které se pak aplikuje multidimensionální rekonstrukce. Jedná se o náročnou metodu z hlediska časového a prostorového rozlišení.

*Zobrazování oblastní (Area imaging)*

K zobrazení předmětu, zkoumaného objektu, lze v zásadě použít několik různorodých typů dvojdimensionálních přístupů, které se postupně zdokonalovaly v závislosti na technologických možnostech detekčních systémů. Jednalo se zejména o analogové kamerové systémy, které byly časem částečně nahrazeny digitálními snímacími systémy typu CCD. V případě analogových kamerových systémů byly snahy o různé vylepšení, které však s sebou většinou přinesly množství kompromisů a problémů při dodatečném zpracování.

### 3.2.3 Metoda detekce části buněčné struktury (Cell End Detection)

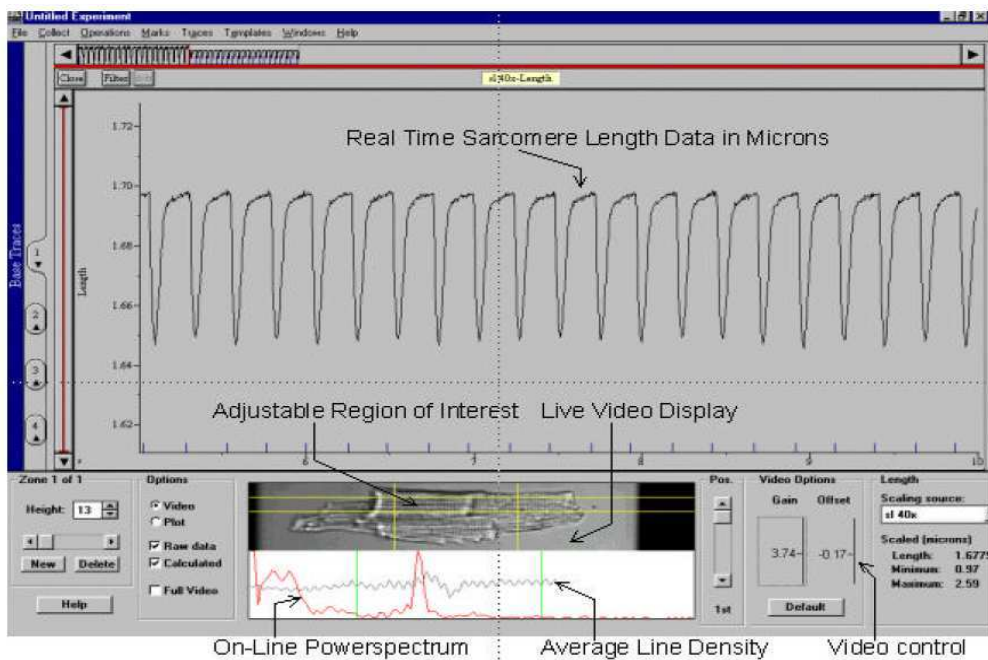
Tyto metody patří v současné době mezi nejvíce používané optické metody měření kontrakcí srdečních buněk. V principu se jedná o jednu z prvních přímých snímacích procedur kontrakční odezvy celé buňky. Jde přitom o poměrně jednoduchou metodu, která slouží k monitorování změn v důsledku intenzity světelného rozptylu, spojený s okrajovými částmi buňky. Informační výtěžnost těchto metod je limitována hodnocením relativních změn v kontrakčním rozsahu kvůli nelineárním vztahům mezi pohybem buněk a přenášeným světlem z nepravidelného tvaru buněk. Tyto procedury byly časem nahrazeny mnohem více přesnějšími metodami navrženými s účelem, aby sledovaly pohyb jedné nebo obou konců z kontrahující myocyty, založené na lineární nebo dvojdimenzionální (*bi-dimensional*) snímací technice.

#### *Prostá hranová detekce s 1D zobrazováním (Single edge detection with 1D imaging)*

Při této metodě se nasnímán pohyb jednoho konce myocyty použitím fotodiody. Ta může být buď přímo propojena s mikroskopem nebo videozařízením. Největšího časového a prostorového rozlišení přitom lze dosáhnout při přímé projekci světelného signálu na řádkové pole snímačů (*line array detektor*) namontované přímo na mikroskop. Úrovně napětí jsou přitom snímány každým polem fotodiody. Hlavní nevýhodou této metody (*single edge*) je, že konce buněk jsou často nepravidelné a vykazují asymetrický způsob pohybu.

#### *Celo buněčná 2D (dvojrozměrné) zobrazování (Whole cell two-dimensional imaging)*

Jak již název napovídá, základ těchto metod spočívá v dvojrozměrném obrazovém zpracování. V mnohých případech jde o pracné měření lokalizace okrajů buňky, které lze získat náročnou analýzou snímku po snímku.



Obr. 3.1 Komerční program pro měření kontrakce od firmy IonWizard [18]



Alternativou je použití individuální rastrové čáry, prostřednictvím které lze videosnímky analyzovat. Z takto získaných snímků, pořízených použitím rastrových čar, lze pomocí okénkování a analýzy sledovat levé i pravé hranice (*cell-end*) buněčného pohybu. Tyto buněčné okraje mohou být identifikovány v závislosti na prahu podmíněných danou sadou. Přístupem okénkování je umožněno vyloučit jiné buňky a zbytky ze signálového zpracování. Zároveň tento postup zabraňuje vzniku jasových oblastí uvnitř buňky, které by mohly způsobit falešně pozitivní zjištění okrajů buňky. Obzvláště užitečnou vlastností je schopnost vizuálně zobrazit přesnost, hranové sledování během datového sběru a přehrání. Tyto systémy jsou komerčně dostupné a jsou rozšířeně využívány.

Časová rozlišovací schopnost je přitom u všech těchto základních video systémů omezená počtem obrázků za sekundu (*video frame rates fsp*), přičemž vzorkovací kmitočet 16-20ms bývá již hodně dobrý.

V současné době jsou hodně popisovány systémy pro zpracování obrázku, které zachycují „captures“ obrázky buněk v mírně odlišných časech vztažených k elektrickému stimulu, po sobě jdoucích kontrakcích též buňky. Tato metoda zahrnuje překrytí (*epigenézu*) posloupnosti, získanou zvětšením obrysů buňky, identifikaci bunčkové délky a šířkovou změnu. Dále jsou zde i různé hybridní techniky, které vyžadují složité provedení série sub snímků, které jsou pak analyzované jako snímek jeden.

#### *Dvojhřanná detekce s 1D zobrazováním (Two edge detection with one dimensional imaging)*

V případě, že je mikroskopické zobrazování celé buňky fokusované přímo na 1D pole snímačů (*line array*), pak může být buněčné zkracování měřené s dobrým časovým rozlišením, které již není limitováno časovým omezením z konstrukce 2D snímků.

Touto metodou lze zpracovávat signál odvozený ze skenování pomocí 256-elementového pole snímačů, používající jednoduché prahování, které je běžně používané k rozpoznání hran buněk. Po identifikaci hlavních hran buňky je hodinový pulz spočtený dokud ostatní hrany nejsou identifikované. Tento úplný součet je převedený na výstupní napětí úměrný délky buňky. Z toho lze následně zjistit nediferenci maximálního poměru a velikost zkracování buňky při časovém poli skenování 1,5 – 5ms. Tato metoda se úspěšně používá k detailní studii vlastností kontrakce myocity menším než 5ms rozlišením.

Dalším způsobem je technika používající fluorescenci a elektrofyziologické měření, které využívá 1026-elementové lineární pole, skenující v intervalech 3-5ms. Pro porovnání byl buněčný pohyb sledován video pohybovým analyzátozem, při kterém bylo zjištěno, že zkracování rychlosti bylo podhodnocováno o 20% v důsledku limitujícího časového rozlišení základních video systémů.

Techniky digitálního zobrazování mají odlišný charakter provedení. Základem je výstup z 512-elementovou řádkovou skenovací kamerou (*line scan camera*). V těchto systémech nastane jeden kompletní sken délky buňky vždy v každé ms průběhu a spouštění kontrakčního cyklu a kamerového výstupu. Následného skenování je digitalizované. Nazývá se to také jako „X-T“ snímek, který je vytvořený z každé kontrakce. Následně je analyzovaný „on-line“ pro získání údajů o délce buňky, při použití uspořádaného digitálního prahování a současné identifikace okrajů vytvořeným algoritmem. Tyto systémy mohou být řízeny s nižší úrovní časového rozlišení, ale jsou běžně používané s vzorkovacím kmitočtem 1ms.

Pozdější „off-line“ automatický výpočet rozsahu zkracování a délkového parametru je provedený pro záznam každého kontrakčního cyklu. Velmi vysoké časové rozlišení těchto systémů je cenným způsobem, dovolující extrémně podrobnou analýzu kontrakčního cyklu, kdežto nevýhodou je, že pořízená data jsou nespojitého základu.

## 4. Metody zpracování obrazu

Vlastním cílem zpracování a případného rozpoznávání obrazu je obrazová informace o reálném objektu (*zaznamenávaný předmět*), která do počítače vstupuje přenosovou cestou, nejčastěji z televizní či jiné kamery. V našem případě se jednalo o CCD kameru. Pomocí různých metod zpracování obrazu lze snáze porozumět obsahu obrazu. Další podrobnosti lze nalézt v [6], [7], [20].

Samotný proces zpracování a rozpoznání obrazu rozdělujeme do několika základních kroků.

- Snímání obrazu a uložení obrazu v počítači.
- Digitalizace obrazu.
- Předzpracování obrazu.
- Segmentace a popis objektů.
- Porozumění obsahu obrazu, klasifikace objektů.

Snímání obrazu je základním způsobem získávání signálu vhodného pro zpracování obrazu. Je to převod optické veličiny na elektrický signál, který je spojitý v čase i v úrovni. Vstupní informace lze získávat z různých zdrojů, jako je například jas (z kamery, scanneru), intenzita rentgenového záření, napětí z elektrody nebo i jiné.

Digitalizace obrazu je důležitým krokem při získávání vhodného obrazu, kde se pomocí převodu spojitého analogového signálu získá signál digitální – digitalizace, které je nutným předpokladem pro další zpracování v počítači. V našem případě se jedná o sekvenci snímků, které lze také nazvat videem. Většina metod pro zpracování pohyblivého obrazu vychází nebo je shodná se základními a pokročilými technikami digitálního zpracování obrazu. Hlavní myšlenkou tohoto přístupu je hledání kompromisu mezi počtem a komplexností použitých metod a rychlosti výpočtu daného algoritmu.

Digitální obraz je ekvivalentem spojitě obrazové funkce  $f(x,y)$ , kde  $x$  a  $y$  jsou souřadnice jednotlivých bodů v prostoru. Vstupní signál je vzorkován a kvantován. Výsledkem je matice čísel popisujících obraz. Jednomu prvku matice se říká obrazový element – pixel. Digitální obrázek je tedy diskrétní pole pixelů, kde intenzita každého pixelu je reprezentována číslem. Může se jednat o šedotónový, binární nebo RGB obraz v různém typu formátování.

Předzpracování slouží jako prostředek pro potlačení šumu a zkreslení vzniklé při digitalizaci a přenosu obrazu. Jindy se předzpracování snaží zvýraznit určité rysy obrazu podstatné pro další zpracování. Příkladem může být hledání hran.

Segmentace je jedním z nejnáročnějších postupů zpracování. Umožňuje v obraze nalézt objekty. Za objekty lze považovat ty části obrazu, které nás z hlediska dalšího zpracování zajímají. Popis nalezených objektů v obraze je ovlivněn tím, na co se bude užívat. Lze je popsat buď kvantitativně pomocí souboru číselných charakteristik nebo kvalitativně pomocí relací mezi objekty.

Při klasifikaci objektů není v některých případech nutné provádět všechny uvedené kroky. Někdy se segmentace a popis objektů explicitně neprovádí, ale o to větší důraz může být kladen na kvalitní předzpracování obrazu.

## 4.1 Definice obrazu a jeho základní vlastnosti

V technické terminologii lze obraz označit za dvourozměrnou projekci trojrozměrné scény.

Jas obrazu je parametr, který reprezentuje množství světelné energie přijaté z původní scény. Jeho velikost v jednotlivých pixelech určuje povrch a odrazivost těles, zdroj světla a jeho umístění ve scéně.

Kontrast je parametr, kde každý obrazový element má omezený počet hladin jasu. Vzdálenost mezi jednotlivými dvěma hladinami dvou vedlejších oblastí obrazových bodů (*oblast je tvořená body o stejném jasu*) je vlastnost obrazu nazývaná kontrast. Kontrast je tím vyšší, čím jsou hladiny dvou sousedních oblastí bodů vzdálenější.

Ostrost obrazu je parametr, který nám určuje ostrost hran mezi hranou tělesa a okolním prostředím. Zaostření je tím větší, čím je jas hrany zaostřeného objektu větší - menší než-li jas okolního prostředí. Ostrost obrazu je závislá na správné ohniskové vzdálenosti záznamového zařízení (*kinofilm, digitální senzor*) a zaostřeného předmětu.

Barevná hloubka je předpokládaný rozsah barev zařízení, na kterém se obraz bude prohlížet nebo zpracovávat. Nejčastěji se používá kombinace barev v systému RGB, kombinace barev červená, zelená, modrá.

Monochromatický obraz je obraz, u kterého se spíše než o barevnou hloubku jedná o hloubku jasu. Jas je zde reprezentován hladinou šedi v rozmezí od bílé po černou. Barevná hloubka je tedy předpokládaný rozsah hladin šedi zařízení, na kterém se obraz bude prohlížet, popřípadě zpracovávat.

Při zpracovávání obrazových dat se dostáváme do oblasti zpracovávání signálu, neboť statický obraz patří do skupiny signálů vícerozměrných. Obraz je tedy definován jako jasová funkce dvou prostorových souřadnic  $f(x,y)$ . Funkci  $f$  nazýváme obrazovou funkcí. V případě obrazu měnícího se v čase nebo objemových dat je funkce  $f$  rozšířena pro tři proměnné. Jedná se tedy o trojrozměrný signál. Dnešní technika dovoluje zpracovávat i čtyřrozměrná objemová časově proměnná data. Toho je běžně využíváno v medicínských zobrazovacích systémech. S očekávaným nárůstem výkonu výpočetní techniky bude možno zpracovávat a analyzovat mnohorozměrné signály přiměřené komplikovanými metodami, využívající složitých vnitřních vazeb mezi prvky a složkami takových signálů. Ustálený název intenzitní obraz se používá při popisu statického obrazu definovaného skalární obrazovou funkcí  $f(x,y)$ .

Při snímání a zpracování obrazu dochází k částečné ztrátě informace a tím k degradaci obrazu. To znamená, že obraz může obsahovat různé nežádoucí poruchy, kterým se říká šum. Pro popis šumu se nejčastěji používá pravděpodobnostních charakteristik. Podle vzniku a závislosti na vlastním obrazovém signálu dělíme šum na bílý šum, aditivní šum, multiplikatívni šum, kvantizační a impulsní šum. Dále lze šumy dělit i podle způsobu nebo místa vzniku. Podrobně viz [4].

## 4.2 Digitální reprezentace obrazu

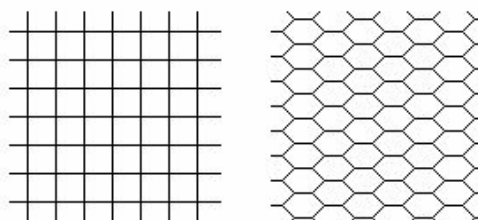
Abychom mohli obraz zpracovávat na počítači, je nejprve nutné jej digitalizovat. Digitalizace se skládá ze dvou kroků :

- vzorkování obrazu do matice  $M \times N$  prvků
  - kvantování navzorkovaného obrazu do jasových úrovní
- *Vzorkování obrazu*

V průběhu vzorkování plošně spojitě obrazové funkce  $f(x,y)$  je nutno vyřešit dva základní problémy, které souvisejí s určením plošné vzorkovací frekvenci, která reprezentuje vzdálenost mezi nejbližšími vzorkovacími body v obraze a plošné uspořádání bodů při vzorkování (*ve vzorkovací mřížce*).

První problém lze řešit pomocí Shannonovy věty o vzorkování z teorií signálů, která říká, že vzorkovací frekvence musí být alespoň dvakrát větší než maximální frekvence ve vzorkovaném signálu, což je také nejmenší detail zastoupený v obraze.

Druhým problémem je plošné uspořádání bodů při vzorkování (*ve vzorkovací mřížce*). Existuje několik typů mřížek, např. čtvercová a hexagonální. Čtvercová mřížka je častější díky snadnější technické realizaci a reprezentaci v počítači, ale na rozdíl od hexagonální mřížky nemá mezi okolními obrazovými body stejné vzdálenosti.



Obr. 4.1 Čtvercová a hexagonální vzorkovací mřížka [5]

Jeden obrazový bod v uspořádané vzorkovací mřížce se nazývá obrazový element (*pixel*), který má hodnotu  $f(x,y) = b$ , kde  $x, y$  představují prostorové souřadnice a  $b$  jeho barvu, popřípadě odstín.

- *Kvantizace*

Principem kvantování je diskretizace oboru hodnot obrazové funkce, kde se k spojitému signálu přiřadí diskrétní hodnota. Signál se nejprve rozdělí do několika (*kvantizačních*) úrovní, které svou šířkou pokrývají celou amplitudu vzorku. Výzkumem se zjistilo, že pro lidské oko je dostatečný počet úrovní 230 stupňů šedi. Proto se ve výpočetní technice používá 256 (*28 bitů*) úrovní. Pro barevné obrazy potom pro každou složku 28 bitů. Při kvantizaci vzniká tzv. *kvantizační zkreslení*, kdy je vstupním spojitým vzorkům v určitém intervalu přiřazena pouze jedna hodnota odpovídající jednomu kvantizačnímu stupni. Z tohoto důvodu je nutno na základě daného počtu kvantizačních úrovní stanovit rozhodovací a rekonstrukční úrovně, tak aby kvantizační chyba byla minimální. Takto digitalizovaný obraz dále používáme v počítačovém zpracování. Použita literatura [5].

## 4.3 Předzpracování obrazu

Námi popsaný způsob zpracování je založen na předpokladu, že zpracovávaný obraz bude získán za pomoci digitální kamery a že počítačová interpretace bude matice s rozměry danými rozlišením kamery s hodnotami určujícími barvu a jas v daném bodě. Z čehož také vyplývá, že samotné rozlišení kamery bude mít výrazný vliv na přesnost měření a hlavně na dobu zpracování, která je k rozlišení přímo úměrná.

Každý systém zabývající se zpracováním obrazu se dá rozdělit na dvě hlavní části a těmi jsou předzpracování, které bude popsáno v následující kapitole a detektor. Detektor je část systému, který se zabývá rozpoznáváním určitých objektů v obraze.

Metody předzpracování obrazu slouží ke zlepšení obrazu z hlediska jeho dalšího zpracování, přičemž jejich hlavním cílem je potlačení šumu v obraze vznikající díky digitalizaci a přenosu obrazu, odstranit zkreslení dané vlastnostmi snímacího zařízení nebo potlačit či zvýraznit jiné rysy důležité z hlediska zpracování obrazu. Jedná se o poskytnutí obrazu s co nejmenším množstvím pixelů samotnému detektoru, ale přitom takového, kde informace pozadí a popředí budou od sebe v co největší možné míře odlišeny. Podrobně viz [4], [5].

### 4.3.1 Prahování

Prahování je jedním z bodových operátorů, který se používá k segmentování obrazu na základě jasu. V nejběžnější podobě se jedná o operaci, která podle předem zvolené hranice jasu zobrazí vše pod touto hranicí jako 0, tedy černě a vše nad zvolenou hranicí jako 1, tedy bíle. Tím vznikne matice, která bude mít pouze dvě hodnoty jasu.

K interpretaci těchto hodnot jasu stačí pouze jeden bit, a proto úpravou tabulky jasu lze vytvořit tzv. digitální matici. Tato operace je výhodná jak pro výkon, tak i pro paměť výpočetní techniky, protože není zapotřebí počítat s osmibitovými čísly, ale pouze s čísly jednobitovými. Dochází sice k degradaci obrazu, ale často je tento postup žádoucí, např. při porovnávání tvaru objektu. Příkladem využití je například detektor, který pracuje na základě rozdílu mezi dvěma snímky a umožňuje provést finální výpočet, kolik je mezi snímky odlišných pixelů. Výsledek po aplikaci filtru rozdělí tedy pixely na bílé (*rozdíly mezi snímky*) a černé. Filtr se nepoužívá na úpravu snímku před vstupem do detektoru, protože při jeho aplikaci je odstraněna většina informací a výsledkem jsou pouhé siluety objektu.

### 4.3.2 Matematická morfologie

Matematická morfologie využívá matematický aparát, vycházející z algebry nelineárních operací. Do značné míry předstihuje při zpracování signálů či obrazů tradiční lineární přístup, který využívá lineární kombinaci (*konvoluci*) bodových zdrojů představovaných Diracovými impulsy. Operátory matematické morfologie se obvykle používají tam, kde je požadavek na krátký čas zpracování. Vychází z vlastností bodových množin. Lze zpracovávat jak obrazy s více úrovněmi jasu, tak i binárními obrazy.

Metody matematické morfologie se užívají především pro :

1. Předzpracování (*odstranění šumu, zjednodušení tvaru objektů*)
2. Zdůraznění struktury objektů (*kostra, ztenčování, zesilování, výpočet konvexního obalu, označování objektů*)
3. Popis objektů číselnými charakteristikami (*plocha, obvod, projekce*).

Tyto operace se používají ke zjednodušení výstupního binárního obrazu, ve kterém se poté nachází menší množství detailů. Provedením těchto operací odstraníme samostatně stojící body a seskupíme ostatní body do kompaktních celků.

### Dilatace

Dilatace ( $\oplus$ ) skládá body dvou množin pomocí vektorového součtu.

$$X \oplus B = \{d \in E^2 : d = x + b, x \in X, b \in B\} \quad (4.1)$$

Dilatace se používá samostatně k zaplnění malých děr, úzkých zálivů a jako základ složitějších operací. Dilatace zvětšuje objekty. Má-li se zachovat jejich původní rozměr, kombinuje se dilatace s erozí.

Má následující vlastnosti : je komutativní operací:  $A \oplus B = B \oplus A$  (4.2)

je také asociativní operací:  $A \oplus (B \oplus C) = (A \oplus B) \oplus C$  (4.3)

je invariantní vůči posunu

Používá se k zdůraznění těch částí obrazu, které obsahují tvary, dochází k zvětšování hranic objektu v obraze na základě podobností s dosavadní hranicí.

### Eroze

Eroze skládá dvě bodové množiny s využitím rozdílů vektorů. Pro každý bod obrazu  $p$  se ověřuje, zda pro všechna možná  $p + b$  leží výsledek v  $X$ . Pokud ano, zapíše se v reprezentativním bodě do výsledného obrázku 1 a v opačném případě 0.

Eroze je duální operací k dilataci. Ani dilatace ani eroze nejsou invertovatelné.

Používá se pro zjednodušení struktury objektů. Složené objekty spojené čarami tloušťky 1 se rozloží na několik jednodušších objektů. Používá se k vyplnění celistvých siluet objektu jednou barvou a hlavně k odfiltrování osamocené skupinky pixelů.

Kombinací eroze a dilatace vytvoří další významné morfologické transformace – otevření a uzavření. Výsledkem obou je zjednodušený obraz, který obsahuje méně detailů.

## Otevření

Je to vlastně eroze následována dilatací. Tato operace oddělí objekty spojené úzkou šíjí a tak zjednoduší strukturu objektů.

$$X \circ B = (X \ominus B) \oplus B \quad (4.4)$$

## Uzavření

Je vlastně dilatace následovaná erozí. Tato operace spojí objekty, které jsou blízko u sebe, zaplní malé díry a vyhladí obrys tím, že zaplní úzké zálivy.

$$X \bullet B = (X \oplus B) \ominus B \quad (4.5)$$

## 4.4 Segmentace obrazu

Obecná definice segmentace říká, že je to proces dělení obrazu do částí, které korespondují s konkrétními objekty v obraze. Jinými slovy, každému obrazovému pixelu je přiřazen index segmentu vyjadřující určitý objekt v obraze.

Segmentace obrazu je jedním z nejdůležitějších kroků vedoucích k analýze obsahu zpracovaných obrazových dat. Snahou je rozčlenit obraz do částí, které mají úzkou souvislost s předměty či oblastmi reálného světa zachyceného na obraze. Výsledkem má být soubor vzájemně se nepřekrývajících oblastí, které buď jednoznačně korespondují s objekty vstupního obrazu (*kompletní segmentace*), anebo vytvořené segmenty nemusí souhlasit s objekty obrazu (*částečná segmentace*).

### 4.4.1 Detekce hran

Pro zrakové vnímání člověka jsou velmi důležitá místa v obraze, ve kterých se mění hodnoty jasu. Taková místa se nazývají hrany. K nalezení těchto významných oblastí v obraze patří právě detekce hran.

Segmentace na základě detekce hran vychází ze skutečnosti, že hranice oblastí obrazu jsou složeny z hran, které jsou v obraze nalezeny aplikací některého z hranových detektorů. Po detekci hran následuje další zpracování obrazu, které spojuje hrany do řetězců lépe odpovídajících průběhu hranic. Při detekci hran nesmí být obraz zašuměn, protože by tím byla určena spousta neexistujících hran. Obraz proto musí být nejprve zbaven šumu a to lze několika způsoby.

Segmentace vychází ze skutečnosti, že objekty v obraze jsou ohraničeny hranami, které jsou nalezeny některým z hranových operátorů. Hrana v obraze je vektorová veličina a je určena velikostí a směrem. Hrana indikuje body obrazu, ve kterých dochází ke změnám obrazové funkce.

Hranové operátory se dělí do dvou skupin:

- Metody založené na první derivaci

Všechny následně uvedené operátory aproximují první derivaci obrazové funkce, přičemž výběr vhodného operátoru se často opírá o experiment a také o charakter obrazu.

Tyto metody aproximují derivace obrazové funkce pomocí diferencí realizovaných diskrétní konvolucí. Směr gradientu  $\nabla$  se odhaduje hledáním masky  $h$ , která odpovídá největší velikosti gradientu.

- *Sobelův operátor*

Ukázka pouze prvních tří masek. Nejčastěji se používají masky  $h_1$  a  $h_3$ , které slouží k hledání vertikálních a vodorovných hran. Ostatní masky si lze představit pootočením.

$$h_1 = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{pmatrix}, h_2 = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \\ -2 & -1 & 0 \end{pmatrix}, h_3 = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & -2 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (4.6)$$

- *Robertsův operátor*

Jedná se o nejstarší a velmi jednoduchý operátor, který využívá pouze okolí 2x2 obrazového bodu. Jeho konvoluční masky jsou :

$$h_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}, h_2 = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ -1 & 0 \end{pmatrix} \quad (4.7)$$

Velikost gradientu se počítá podle vztahu :

$$g(x,y) = g(x+1,y+1) + g(x,y+1) - g(x+1,y) \quad (4.8)$$

- *Operátor Prewittové*

Opět pouze první tři masky, ostatní si lze představit pootočením.

$$h_1 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{pmatrix}, h_2 = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & -1 & 0 \end{pmatrix}, h_3 = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (4.9)$$

Gradient tohoto operátoru je odhadován v 3x3 pro osm směrů. Vždy se vybírá jedna maska z osmi, které odpovídá největší modul gradientu. Dají se vytvářet i větší masky s podrobnějším směrovým rozlišením.



- Metody založené na druhé derivaci

Při použití první derivace nabývala obrazová funkce v místě hrany svého maxima. Druhá derivace obrazové funkce protíná v místě hrany nulovou hodnotu. Nalezení hrany v místě průchodu nulou je díky strmosti přechodu spolehlivější než na plochem maximu u první derivace.

- *Laplaceův operátor*

Laplaceův gradientní operátor  $\nabla^2$  aproximuje druhou derivaci, je invariantní vůči otočení a udává pouze velikost hrany a ne její směr. V digitálním obraze může být také Laplaceův operátor aproximován pomocí diskretní konvoluce. Používá konvoluční jádra 3x3 pro 4-sousedství a 8-sousedství.

$$h = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}, h = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

Někde se můžeme setkat také s Laplaceovým operátorem, který využívá větší váhu pixelů blíže reprezentativnímu bodu masky. V takovém případě neplatí invariantnost vůči otočení.

$$h = \begin{pmatrix} 2 & -1 & 2 \\ -1 & -4 & -1 \\ 2 & -1 & 2 \end{pmatrix}, h = \begin{pmatrix} -1 & 2 & -1 \\ 2 & -4 & 2 \\ -1 & 2 & -1 \end{pmatrix} \quad (4.11)$$

Nevýhodou tohoto operátoru je velká citlivost na šum, protože se snaží aproximovat druhou derivaci primitivními prostředky. Další nevýhodou je dvojitá odezva na hrany, kterým odpovídají tenké linie v obraze.

- *Cannyho metoda*

Základním principem této metody je hledání průchodu druhé derivace obrazové funkce nulou. Na principu různých rozlišení a hledání nejlepšího z nich, je založen právě Cannyho hranový detektor. Základní myšlenka je, že skokovou hranu lze hledat filtrem. Aby byl detektor optimální pro skokové hrany musí splňovat následující tři kritéria.

- Detekční kritérium (*neopomíjení významných hran*)
- Lokalizační kritérium (*minimální rozdíl mezi skutečnými a detekovanými hranami*)
- Jednoznačnost hran (*žádná hrana nesmí být detekována dvakrát*)

Při aplikaci Cannyho hranového detektoru je nutno eliminovat šum použitím vhodného filtru, vypočítat gradient  $\nabla^2$ , nalézt lokální extrém a eliminovat nevýznamné hrany. Jedná se o pokročilý hranový detektor.

## 5. Pořízení videozáznamu kontrakce

V současné době, již bylo vyvinuto velké množství optických technik pro vyhodnocení změn délky během kontrakčního cyklu. Různé systémy jsou navrženy pro konkrétní experimentální aplikace. Námí představené řešení je navrženo tak, aby využívalo posledních trendů dvojrozměrného obrazového snímání pomocí mikroskopické CCD kamery v dostatečném rozlišení a následného využití technik zpracování obrazu zahrnující detekci konců buňky a následné grafické a číselné vyhodnocení kontrakce.

Běžné zařízení pro snímání mikroskopického obrazu se skládá ze samostatného, plně nastavitelného stimulačního přístroje pro generování stimulačních impulzů, mikroskopu s kamerou, přístrojových a programových částí pro snímání a zpracování obrazu a vyhodnocení kontrakce. Celý systém je složen z hardwarové části: PC, měřicí karty, stimulační vaničky s elektrodami, mikroskopu a mikroskopické kamery. Použitá literatura [12].

### 5.1 Preparace buněčné struktury (Cell Preparation)

Nutným předpokladem k zahájení celého měření byla nutnost dispozice vhodného technického vybavení a též vhodného biologického materiálu ke konkrétním účelům měření. Tento materiál byl poskytnut Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity v Brně, za který bych rád i touto cestou poděkoval. Následující přímý experiment probíhal v areálu VUT v laboratoři biofyziky, který byl k charakteru tohoto měření nejlépe vybavený.

Studium enzymaticky izolované srdeční buňky zaujímá přední místo mezi experimentálními modely pro výzkum souvislosti mezi srdeční excitací a kontrakcí.



Obr. 5.1 Ilustrační obrázek fyziologického roztoku.

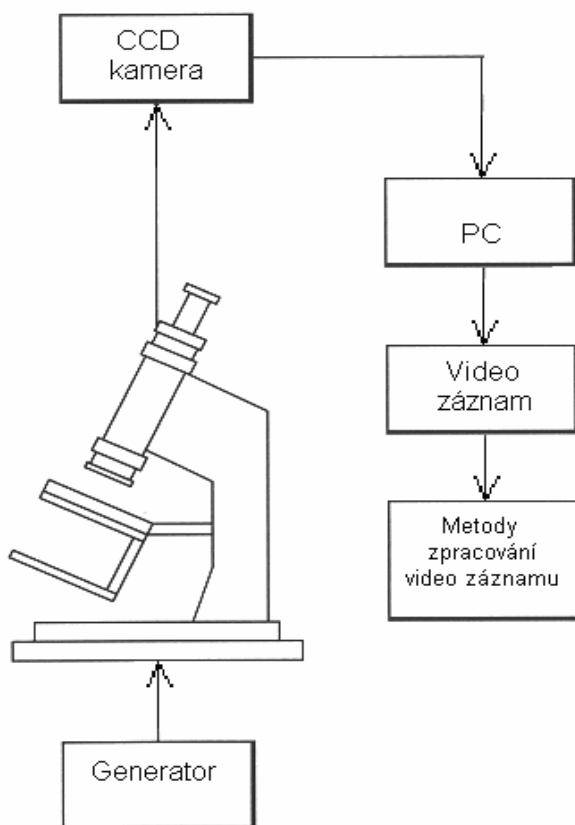
V prvním kroku samotného měření bylo zapotřebí již extrahovanou savčí buňku umístit do vhodného fyziologického roztoku, aby byly zajištěny adekvátní životní podmínky a nedošlo ke znehodnocení vzorku. Po vhodné preparaci a umístění biologického vzorku bylo možno přistoupit k samotnému snímání.

## 5.2 Záznam stimulované buňky (Microscopy and Data Acquisition)

Základním požadavkem pro další průběh práce bylo pořízení vhodného videozáznamu z experimentu kontrakce izolované srdeční buňky při vhodné stimulaci. V následujícím textu se budu podrobně zabývat popisem způsobu pořizování tohoto záznamu.

Biologický preparát byl umístěn do stimulační vaničky s elektrodami, kde byly ke generaci AN izolované srdeční buňky použity pulzy z vhodně nastaveného generátoru. Po dosažení určité nad prahové hodnoty AN, v našem případě se jednalo o vhodně zvolené stimulační pulzy, bylo možné pomocí sestavy mikroskopu s upevněnou CCD kamerou pořídit digitální videozáznam s vysokým prostorovým a časovým rozlišením. Tím bylo umožněno zahájení samotného měření, jehož výsledky byly dále exportovány vhodným přenosovým kanálem a následně archivovány na záznamové zařízení osobního počítače PC. Takto pořízený a archivovaný datový záznam může být dále upravován vhodnými metodami pro zpracování obrazu. Rád bych také ještě dodal, že vhodná volba stimulačních impulsů měla výrazný vliv na celkovou kvalitu pořízeného záznamu.

Na následujícím blokovém schématu viz (obr 5.2) lze snáze schematicky pochopit způsob použité metody pořizování požadovaného videozáznamu.



Obr. 5.2 Blokové schéma principu záznamu stimulované buňky.

Takto získaná data byla nasnímaná pomocí kamery Olympus i-SPEED 3, využívající CMOS snímač o rozlišení 1280x1024. Takto pořízená data byla pak dále s použitím programového vybavení výrobce kamery převedena na námi zvolený videozáznam.

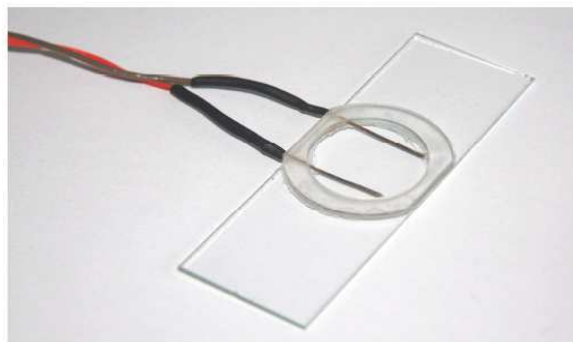
V současné době jsou již k dispozici přímé systémy skládající se jak z hardwarové, tak i přímo softwarové podpory pro měření kontrakčních vlastností izolovaných srdečních buněk, viz. obr.5.3.



Obr. 5.3 Ilustrační obrázek (IonWizard 6.0) [18]



Obr. 5.4 Ilustrační obrázek stimulátoru [19]



Obr. 5.5 Ilustrační obrázek stimulační vaničky s elektrodami [12]

## 6. Použité způsoby obrazového zpracování snímků

Trendy předešlých let v oblasti výzkumu a různých studií izolovaných srdečních buněk, které jsou v dnešní době stále více v centru pozornost, aktuálně realizovaných ve světě v kardiovaskulární biologii, poukazují na možný potenciál uplatnění těchto metod k hodnocení stavu myokardu. Tyto studie mohou být potenciaálně přínosné v oblasti porozumění funkcí srdce a jeho onemocnění. Bylo by proto užitečné vyvinout takovou neinvazivní metodu, která by umožňovala kvantifikaci kontrakce srdeční buňky (*cell boundary video tracking method*).

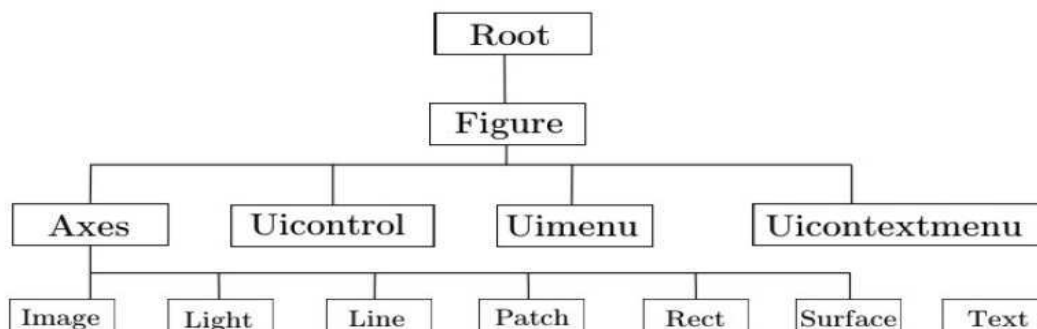
Měření změn délky během kontrakčního cyklu u izolované srdeční buňky umožňuje popsat dynamiku cele srdeční buňky i sarkomer a zkoumat některé základní vlastnosti kardiomyocyty.

### 6.1 Tvorba grafického rozhraní

Vytvořené uživatelské prostředí, nebo jinak řečeno grafické rozhraní, slouží k prezentaci vytvořených programů a dosažených výsledků. Všechny grafické objekty dané aplikace tvoří grafické uživatelské prostředí. Název je převzat z anglického Graphical User Interface (*GUI*). Výhoda práce s vytvořeným grafickým rozhraním spočívá, v jednoduchosti a její přehlednosti. Práce je řízena interaktivními kroky. Všechny grafické objekty jsou vytvářeny přímo v editoru zdrojového kódu. Programové prostředí Matlab umožňuje výběr ze dvou možností, jakým způsobem grafickou aplikaci naprogramovat. Použitá literatura [8], [14].

Prvním způsobem je tzv. nízko úroňové programování, který vytvoří všechny požadované grafické prvky pouhým přetažením. Sestavená aplikace automaticky vygeneruje příslušný zdrojový kód. Tento nástroj se jmenuje GUIDE (*Graphical User Interface Development Environment*). Použití tohoto způsobu je univerzální a časově nenáročné. Nevýhodou tohoto způsobu je možná nekompatibilita se staršími verzemi programového prostředí Matlab a zdrojový kód nemusí a často není optimální.

Druhým způsobem řešení je využití znalostí systému Handle Graphics. Nástroj s jehož pomocí lze efektivně pracovat s grafickými objekty. Velkou výhodou tohoto způsobu je absolutní kontrola programátora nad aplikací narozdíl od předchozího způsobu programování. Grafickými objekty jsou všechny základní elementy grafického výstupu. Aby systém fungoval správně musí být mezi jednotlivými objekty přesně daná hierarchie, která je zobrazena na následujícím obrázku.

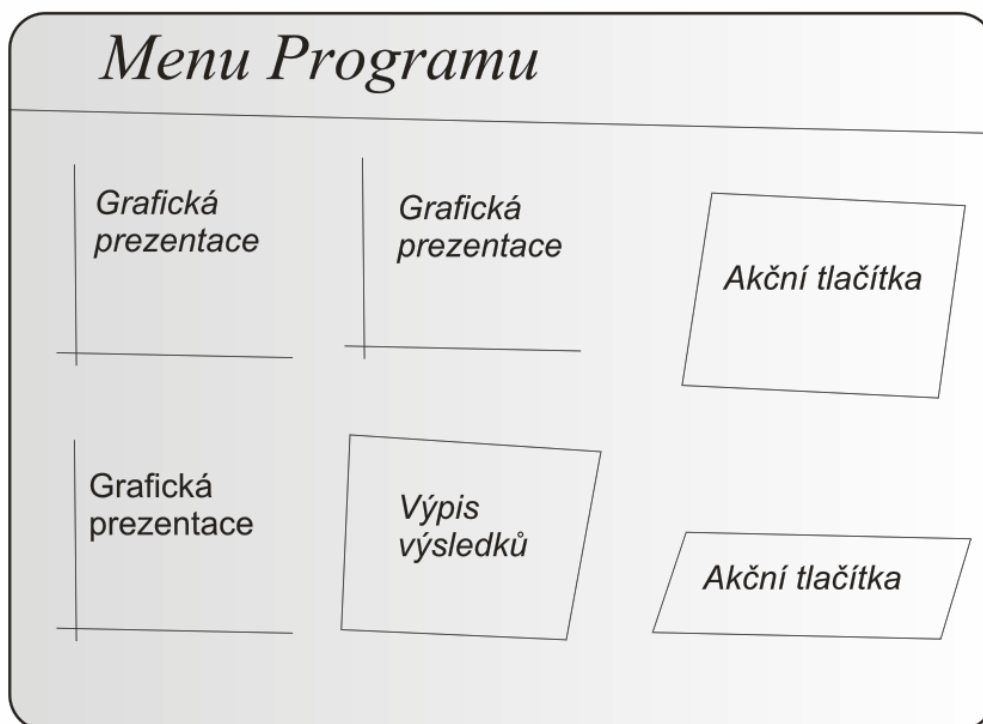


Obr. 6.1 Hierarchie základních grafických objektů v Matlabu.

V hierarchii grafických objektů stojí nejvýše objekt Root, kterému jsou podřízeny všechny ostatní jako jsou objekty Figure. Tomuto objektu jsou dále podřízené objekty Uicontrol, Uimenu a Uicontextmenu. Pokud je provedena změna na vyšší úrovni, tak tato změna může být zděděna nižšími podřízenými objekty viz. hierarchie grafických objektů. S pojmem hierarchie objektů také souvisí pojmy jako jsou, Parent a Children.

## 6.2 Návrh aplikace

Před vlastním programováním daného grafického prostředí je vždy vhodné rozhodnout se, jak by měla daná aplikace vypadat. Z tohoto důvodu je užitečné nakreslit si návrh na papír a ten poté realizovat v prostředí Matlab. Jedná se o možná nejefektivnější vývojový proces před vlastní prací v programovém prostředí.



Obr. 6.2 Návrh grafického prostředí.

Tento program byl naprogramován pomocí metody Switched Board Programming. Předpokladem je znalost systému Handle Graphics. Jedná se o metodu využívající příkazy Switch a Case. Jde o dvojici příkazů používající se v případě, kdy chceme větvit algoritmus podle hodnoty obsahu nějaké proměnné. Základem této metody je využití jedné vlastnosti funkce, a to možnosti volat sama sebe s různými parametry. Rozložení aplikace je navrženo tak, aby bylo co nejlépe přehledné a nečinilo tak uživateli problémy s ovládáním. Z funkčního hlediska by navrhovaná aplikace měla mít několik částí navzájem od sebe oddělených. Oddělení je důležité pro odlišení prvků s různou funkcí. Předběžná vizuální podoba programu je na obrázku 6.2.

### Námi vytvořená grafická aplikace umožňuje :

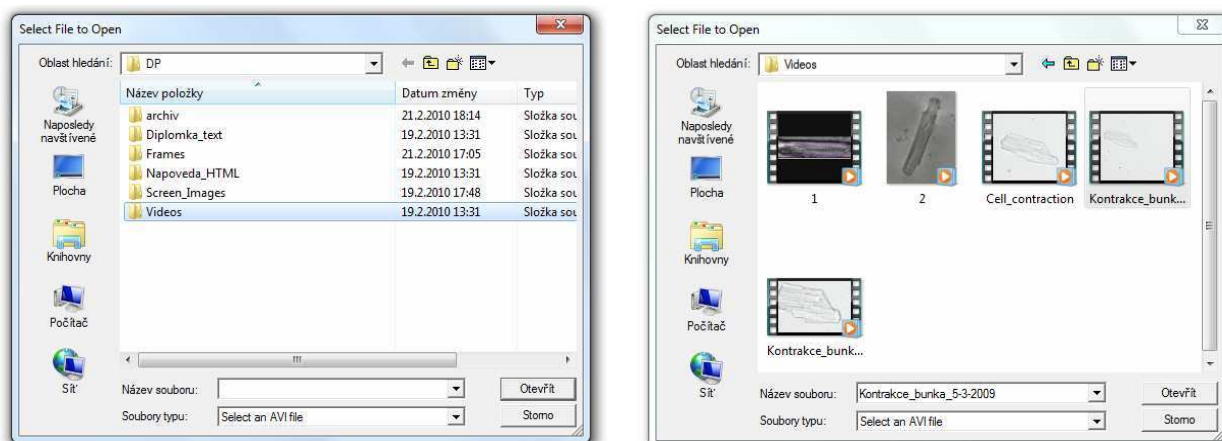
1. Načtení libovolného nekomprimovaného video souboru formátu (.avi .mpeg, ...) a jiných podporovaných formátů funkce `mmread`, která je součástí již zmíněného toolboxu.
2. Výběr (*ROI*) oblasti z načteného videozáznamu, viz. obr.6.4
3. Možnost přehrání takto upraveného videozáznamu a zobrazení výsledku po úpravě, obr.6.5.
4. Použití optických metod k měření kontrakce ze sekvence snímku z upraveného videozáznamu pomocí některých obrazových metod zpracování.
  - a) Práci se skupinou snímků z *ROI* oblasti načteného videozáznamu.
    - Využití metod obrazového prahování v kombinaci s morfologickými operacemi.
    - Využití metod hranové detekce v kombinaci s morfologickými operacemi.
  - b) Práci se zvoleným snímkem z *ROI* oblasti načteného videozáznamu.
    - Využití metod obrazového prahování v kombinaci s morfologickými operacemi.
    - Využití metod hranové detekce v kombinaci s morfologickými operacemi.
  - c) Zobrazení dosažených výsledků získaných pomocí optických metod měření .
5. Archivace výsledků
  - a) do textového editoru Excel
  - b) do souborů ve formě .jpg snímků
6. Grafické rozhraní dále umožňuje
  - a) načtení nového videozáznamu
  - b) přepínání mezi grafickými rozhraními
  - c) stručnou *html* nápovědu nebo přímou programovou nápovědu
  - d) ukončení aplikace

## 6.3 Úprava pořízeného videozáznamu

Námi získaný videozáznam kontrakce samotné izolované buňky myokardu dále sloužil jako podklad pro následné obrazové zpracování. Z tohoto důvodu bylo nutné pořízený záznam před zahájením samotného obrazového zpracování (*snímek po snímku*) modifikovat z důvodu snazšího zpracování. Pod pojmem snazší zpracování lze v našem případě chápat jako přesnost výpočtu vzhledem k optimální době nutné k obrazovému zpracování zvolenou metodou.

K tomuto účelu bylo možno využít různé, volně šiřitelné programy s GPL (*General Public License*), jako je program VirtualDub-1.8.8, který kromě jiných funkcí umožňuje modifikaci originálního videozáznamu pomocí různých úprav, jako je přímý výběr informačně významné oblasti, tzv. ROI (*region of interest*), a tím pádem modifikaci na námi požadovaný videozáznam.

Z důvodu kompaktnosti námi vytvořeného programového rozhraní jsme tuto funkci přímo implementovali do našeho grafického rozhraní, vytvořeného v programovacím prostředí Matlabu, čímž nám odpadla nutnost využití jiných programů k výběru ROI oblasti z pořízeného videozáznamu.



Obr. 6.3 Ukázka načtení pořízeného videozáznamu.

Nutnost použití těchto prvních úprav vyplývá ze samotných rozměrů pořízeného primárního videozáznamu viz. tab.6.1.

Filename	"Kontrakce_bunka_5-3-2009.avi"
FileSize	1416MB
FileModDate	"5-March-2009 14:24:06"
NumFrames	360
FramesPerSecond	50
Width	1280
Height	1024
ImageType	"truecolor"
VideoCompression	"none"
Quality	0
NumColormapEntries	0

Tab. 6.1 Základní parametry původního videozáznamu.



Z tohoto důvodu jsou tyto úpravy nezbytné před přistoupením k samotnému obrazovému zpracování. Je nutné podotknout, že tato úprava videozáznamu nijak nemodifikuje bližší prostředí ROI oblasti stimulované buňky myokardu, pouze podstatně zrychluje celkovou dobu nutnou k výpočtu.

Funkce popisující výběr ROI oblasti se nazývá:

- Crop\_video.m

Jedná se o skript vytvořený v programovacím prostředí Matlabu, který slouží k načtení původního videozáznamu a výběru zájmové oblasti měření, tzv. ROI oblasti viz. obr.6.4 a obr.6.5.

Ukázka části zdrojového kódu :

```
obj = mmreader([adresar, jmeno]);
video = read(obj,1);

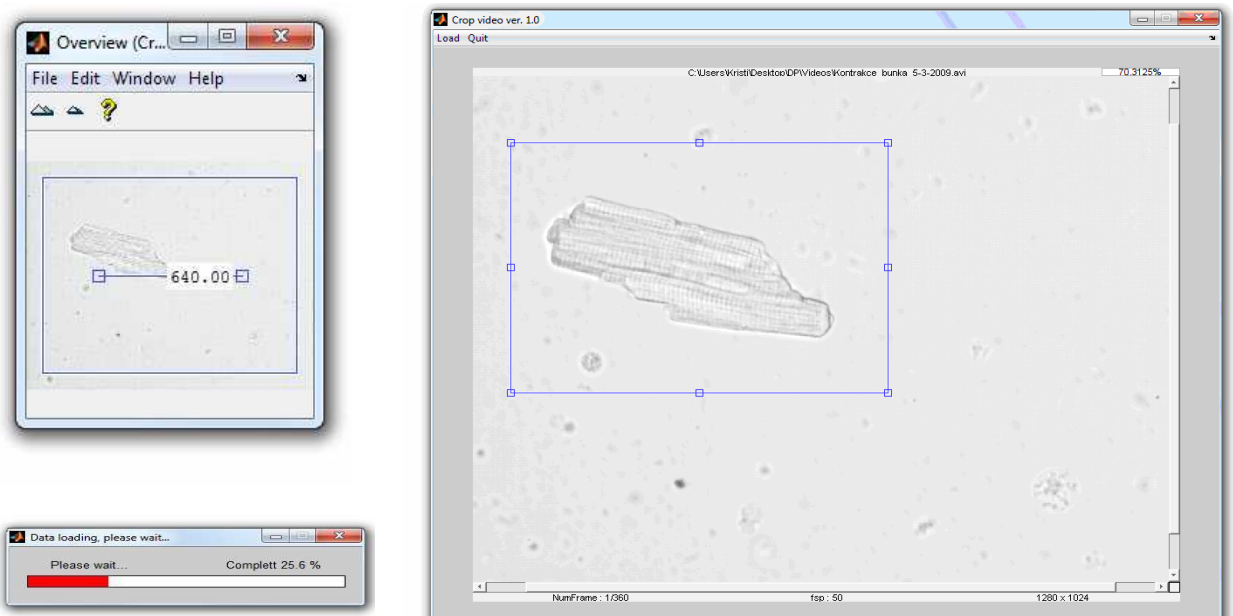
mov(1).cdata = video(:,:,1);
mov(1).colormap = [];

Obr = (mov(1).cdata);
hImag = imshow(Obr);

[X,Y,I2,rect] = imcrop(hImag);
```

Zde použitá funkce `mmreader` je dostupná pouze v Matlab Version 7.7.0.471 a výše. Lze také použít funkci `aviread`, která však dokáže načíst pouze videozáznam o velikosti do 1Gb a pouze videozáznam formátu `.avi`. Z tohoto důvodu byla použita funkce `mmreader`.

Zde dále zmíněná funkce `imcrop` umožňuje výběr samotné ROI (*region of interest*) oblasti, což je patrné na následujícím obrázku, obr. 6.4 Jedná se přitom o vektor čtyř proměnných, označené názvem `rect`.



Obr. 6.4 Aplikace umožňující výběr ROI oblasti z načteného videozáznamu.

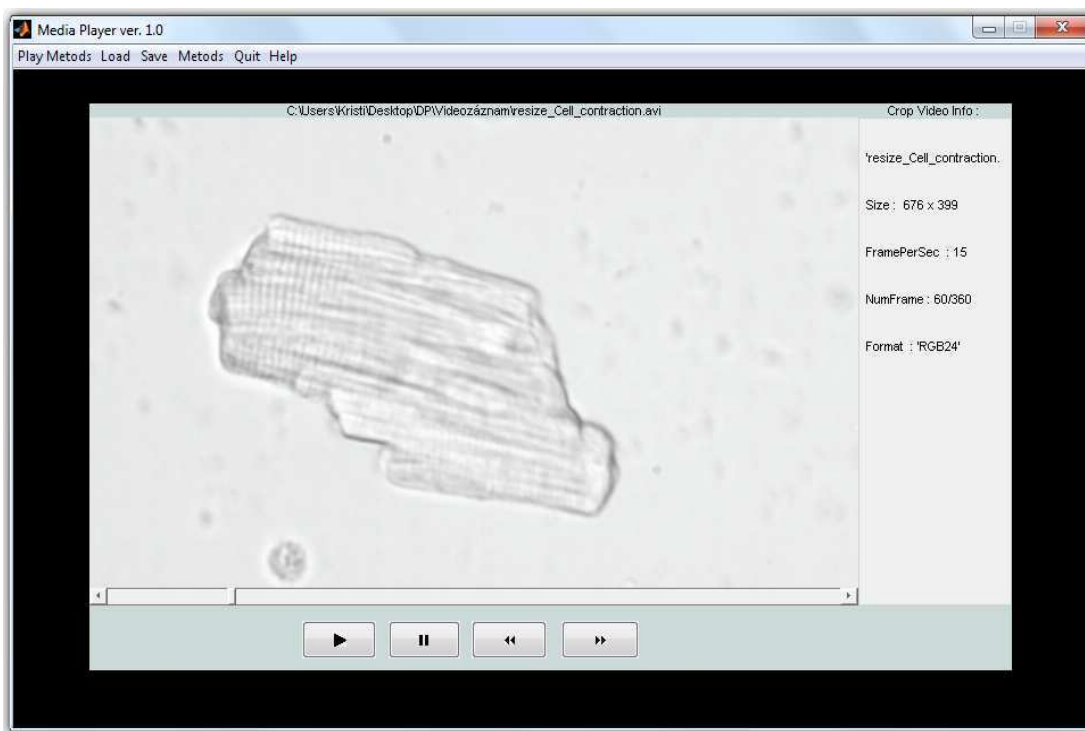
Výhodami výše popsaných úprav je již zmíněná výpočetní náročnost z důvodu nižšího rozlišení, souvisejí s již zmíněnou nižší výpočetní náročností, dále také celková datová velikost a tím pádem i snazší archivace takto upraveného záznamu. Funkce umožňující zobrazení a přehrání výsledku po úpravě načteného videozáznamu se nazývá :

- Load\_video.m

Jedná se přitom o aplikaci, která má sloužit uživateli pouze jako nástroj k dodatečné kontrole správnosti zvolené ROI oblasti vzhledem k následnému obrazovému zpracování.

Zde navržený program *Media Player ver 1.0* umožňuje :

- Přehrání sekvence snímků záznamu
- Pozastavení sekvence snímků záznamu
- Listování mezi snímky záznamu
- Zobrazení informací o ROI videozáznamu



Obr. 6.5 Aplikace umožňující přehrání ořezaného videozáznamu srdeční buňky.

Volba samotného CCD snímače kamery byla ovlivněna samotnou vlastností kontrakce buňky, jejím rychle se měnícím tvarem, který je ovlivňován její geometrií měnící se v důsledku rotačních a translačních pohybů myocyty, což způsobuje možnost pohybového rozmazání, tzv. (*motion blure*). Všechny tyto body si kladly vysoké požadavky na časovou rozlišovací schopnost použitého snímače. Z tohoto důvodu musela být námi použita kamera schopná pořizování co největší sekvence snímků za sekundu a co neoptimálnějšího rozlišení z důvodu dalšího obrazového zpracování.

Běžně k tímto účelům užívané snímače mají kolem 25-30 fsp. V našem případě bylo použito 50 fsp, ale i takové nastavení se ukázalo jako nedostačující z důvodu velké dynamiky pohybu sledovaného objektu. Viz tabulka 6.1.

## 6.4 Zpracování sekvence snímků

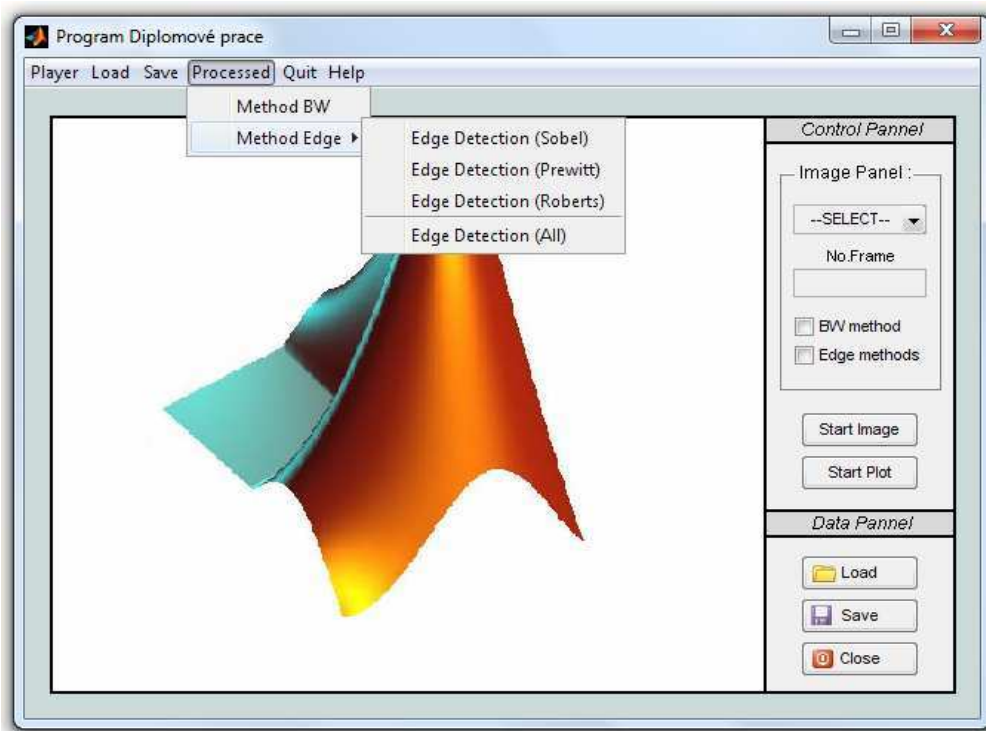
Výše popsané způsoby pořizování a následné prvotní úpravy sekvence snímků nám poskytly vhodná data k další práci s použitím vhodných metod zpracování obrazu. Jako programovací prostředí pro tyto úpravy byl zvolen program s názvem Matlab Version 7.7.0.471 (R2008b) s dostupným Image Processing toolboxem a v něm zahrnutými funkcemi.

Jedná se o přímé optické metody měření, v rámci kterých jsme se pokoušeli prostřednictvím metody detekce části buněčné struktury (*cell end detection*) získat informačně podstatné body zkoumaného vzorku, jako jsou rozměry zkoumaného objektu a hodnoty počtu pixelů v jednotlivých snímcích.

K tomuto účelu jsme si vytvořili skript v programovacím jazyce Matlab, který nám umožňuje dále zpracovávat nasnímaná data nejprve vybranými metodami předzpracování obrazu a následně jejich segmentaci. Navržený software dovoluje měření plochy (*area*) a perimetru objektu kardiomyocytu. Jako obrazové optimalizační techniky byly využity metody segmentace, prahování, morfologické transformační metody (*dilatece, eroze*) nebo také metody hranové detekce, které se po použití na sekvenci snímků zobrazujících kontrahující myocytu, ukázaly jako postačujícím nástrojem pro analýzu sledované kontrakce.

Jako přímé metody měření buňkové kontrakční odezvy byly použity metody kombinující metod hranové detekce a morfologických transformací. Dále bylo využito metody přímé konverze, jejímž obrazovým prahováním byl snímek převeden do ČB oblasti. Následně pak byly aplikovány funkce morfologických operací, které pomohly eliminovat nežádoucí částice v obrazu a získat tak kvalitní obraz buňky s vyplněnou vnitřní strukturou, oddělené od pozadí.

Použité metody zpracování obrazu byly implementovány v uživatelské rozhraní naprogramované metodou Switch Board v již zmíněném programovacím prostředí Matlabu viz obr.6.6. Použitá literatura [8].



Obr. 6.6 Uživatelské rozhraní vytvořeného programu.

Hlavní, a tudíž i nejdůležitější částí celého navrženého programového vybavení, je grafické rozhraní umožňující práci s již upraveným videozáznamem vhodnými metodami zpracování snímků. Tato aplikace byla koncipována s možností výběru :

- práce s celým sledem snímků obsažených ve zvoleném videozáznamu
- práce s jedním snímkem obsaženým ve zvoleném videozáznamu

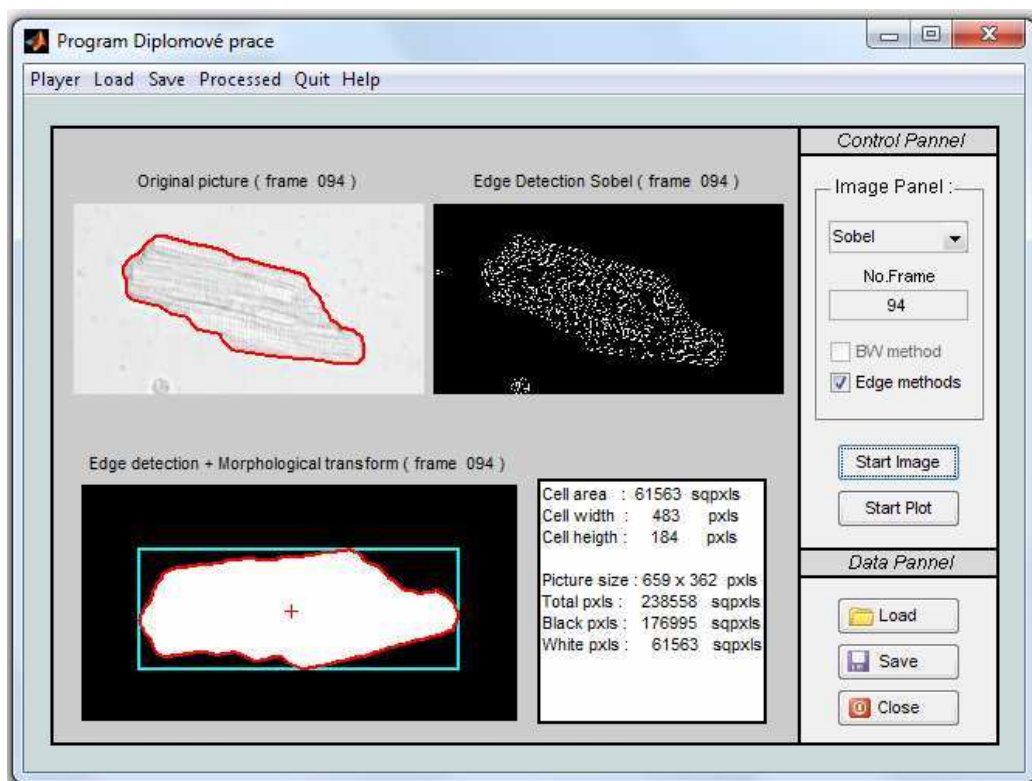
#### 6.4.1 Pomocí metod hranové detekce a morfologických transformací

Tato metoda vychází z principů matematické morfologie, kterou je nutno aplikovat na některou z metod detekce hran, přičemž je vhodné podotknout, že vhodné nastavení jednotlivých parametrů hranové detekce a morfologických transformačních metod je z zcela nezbytné z hlediska přesnosti dosažených výsledků.

Z následujících ukázek je patrné, že lze volit mezi jednoduchými maskovými operátory první derivace jako jsou :

- Sobelův,
- Robertův,
- Prewittové,

kteří v kombinaci s vhodně zvolenými morfologickými transformacemi a výběrem konkrétního snímku nebo skupiny snímků umožňují stanovit důležité parametry z hlediska optické analýzy buněčných struktur ve snímcích.



Obr. 6.7 Ukázka aplikace zpracování na konkrétním snímku, (*Edge methods*).

Námi vytvořená grafická aplikace umožňuje přímou demonstraci zvolené metody. V našem případě se jedná o metodu hranové detekce pomocí maskového operátoru, kterou si uživatel sám zvolil na konkrétním snímku z celkového počtu snímků v daném videozáznamu. Výsledek této metody je patrný z následujícího obrázku viz. obr.6.7

Přímou demonstraci zvolené metody zajišťuje funkce s názvem:

- zpracovani.m

Jedná se přitom o rozsáhlou funkci umožňující zpracování konkrétního snímku nebo sledu snímků z načteného videozáznamu, archivaci a zobrazení naměřených výsledků zpracování vybraným způsobem a metodou.

Prezentovaná ukázka aplikace zpracování snímku demonstruje :

- původní ROI snímek porovnaný s výsledným snímkem
- snímek po hranové detekci maskovým operátorem (*Sobel*)
- snímek po aplikaci morfologické transformace a její vhodné rotaci
- tabulku parametrů zkoumaného objektu

Porovnáním původního šedotónového ROI snímku s hranicemi objektu získaného výsledným obrazovým zpracováním lze jednoduše prezentovat dosažené výsledky použité metody, viz. obr.6.7.

Nastavení prahu u hranové detekce a použitý typ maskového operátoru hraje významnou roli z hlediska přesnosti a možnosti dosažitelných výsledků. Správná volba a nastavení morfologických transformačních metod sehraje také klíčovou roli v průběhu obrazového zpracování zkoumaného objektu ve snímku. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že nelze navrhnout skript, který by zpracovával adekvátním způsobem libovolný videozáznam. Toho lze docílit pouze vhodným nastavením parametrů nutných k zpracování vzhledem k charakteru snímku a objektu ve snímku.

Ukázka části zdrojového kódu hranové detekce :

```
[junk threshold] = edge(Gray_1, 'sobel');  
fudgeFactor = 0.75;  
I = edge(Gray_1,'sobel', threshold * fudgeFactor);
```

Ukázka části zdrojového kódu morfologické transformace :

```
I = bwmorph(I, 'close', Inf);  
I = imfill(I, 'holes');  
.  
.  
.  
se = strel('disk', 20); I=imopen(I, se);
```

Ukázka části zdrojového kódu rotace objektu :

```
LL = double(I);  
  
ss = regionprops(LL, 'Centroid', 'Orientation', ...  
                'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', ...  
                'Area', 'BoundingBox', ...  
                'Eccentricity', 'Extrema');  
  
image_rot=imrotate(I, -ss.Orientation, 'bilinear', 'crop');  
  
L_rot = double(image_rot);  
  
s_rot = regionprops(L_rot, 'Centroid', 'Orientation', ...  
                  'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', ...  
                  'Area', 'BoundingBox', ...  
                  'Eccentricity', 'Extrema');
```

Stručný popis zde použitých funkcí:

V části ukázky zápisu zdrojového kódu hranové detekce je nezbytné zmínit, že je zde využit maskový operátor typu 'sobel', který zde operuje s pevně nastaveným prahem.

V části ukázky zápisu zdrojového kódu morfologické transformace jsou zde využity funkce morfologického uzavření 'close', detekce děr, jejich zaplnění a také odstranění objektu pod určitou velikostí.

V části ukázky zápisu zdrojového kódu rotace objektu je prve nutno zmínit, že tato úprava slouží převážně k eliminaci rotačních a translačních pohybů snímaného objektu, které by mohly do daného optického měření vnášet určité nežádoucí změny, jež by se pak mohli projevit ve výsledcích měření.

Odstranění rotačních a translačních změn lze dosáhnout dvojím způsobem. Jednak pomocí postupného natáčení a porovnávání velikosti sledovaného objektu, kdy se vybere maximální hodnota. Tento způsob je výpočetně hodně náročný, a proto nebyl následně implementován do daného zdrojového kódu. Druhou možností bylo využití momentu natočení v rámci pixelů, tato varianta se ukázala jako rychlejší a spolehlivější.

Uživatel má možnost volby mezi demonstračním modem měření, který je pouze ukázkou principu funkce metod a nebo přímo měřením na sekvenci snímků, které jsou provedeny zcela automaticky. Takto získaná data jsou vhodně archivována do Excel souboru s příponou .xls. Z těchto archivovaných dat lze dále zobrazit průběhy kontrakce pomocí grafického rozhraní.

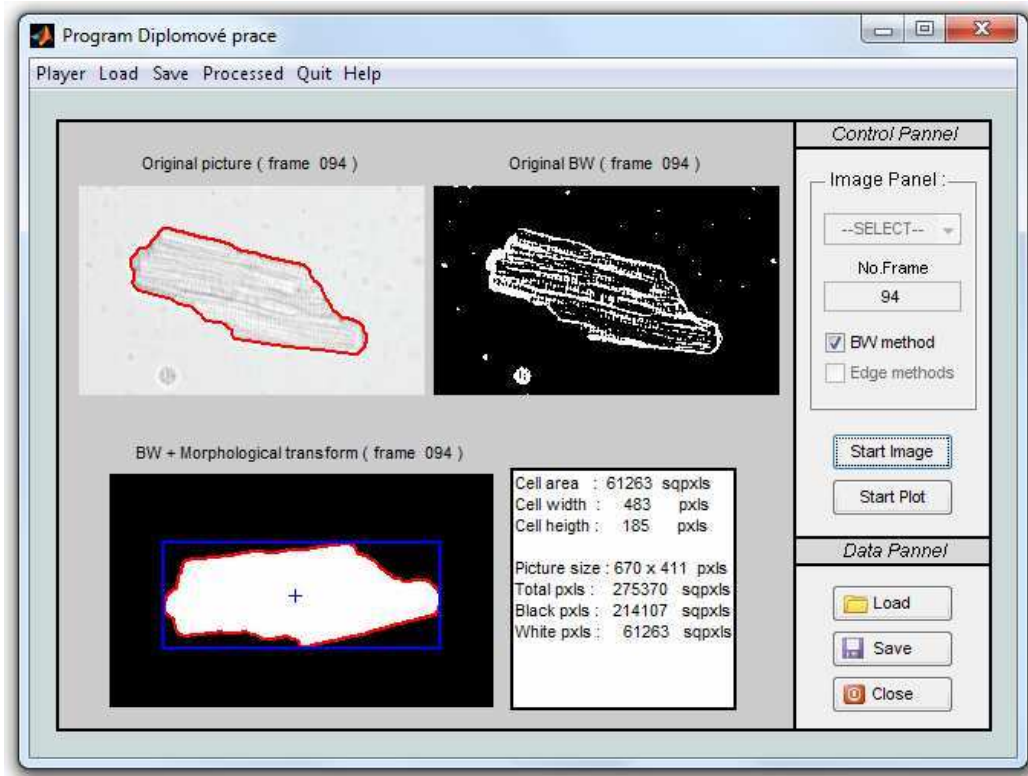
K obrazovému zpracování sekvence snímků slouží funkce :

```
- fun_sobel.m  
- fun_roberts.m  
- fun_prewitt.m
```

Tyto funkce lze spouštět v tzv. *uipanel* vytvořeného grafického rozhraní. Nejedná se přitom již o funkci umožňující přímou demonstraci konkrétního snímku, ale o zpracování sekvence snímků obsažených v daném videozáznamu. Výsledky z tohoto zpracování jsou uloženy jak v textové, tak i grafické formě. Pomocí těchto textových a grafických záznamů lze posoudit kontrakční vlastnost sledované srdeční buňky.

## 6.4.2 Pomocí metod přímé konverze a morfologických transformací

Další použitou metodou byla metoda převodu originálního šedotónového snímku pomocí histogramu na přímý černobílý snímek. V rámci této metody je možné po vhodně zvolených a nastavených morfologických transformačních metodách stanovit důležité parametry z hlediska optické analýzy buněčných struktur ve snímcích, jak tomu bylo u metody první.



Obr. 6.8 Ukázka aplikace zpracování na konkrétním snímku, (*BW method*).

Přímou demonstraci zvolené metody zajišťuje také funkce s názvem:

- zpracovani.m

Jde o funkci umožňující zpracování konkrétního snímku nebo sledu snímků z načteného videozáznamu, archivaci a zobrazení naměřených výsledků zpracování vybraným způsobem a metodou.

Prezentovaná ukázka aplikace zpracování snímku demonstruje :

- původní ROI snímek porovnaný s výsledným snímek
- snímek po obrazovém prahování je převeden do ČB oblasti
- snímek po aplikaci morfologické transformaci a její vhodné rotaci
- tabulku parametrů zkoumaného objektu

Tato metoda také vychází z přímé úpravy načteného snímku, kterou si uživatel sám zvolil z celkového počtu snímku v daném videozáznamu. Výsledek této metody je patrný z následujícího obrázku viz. obr.6.8 nebo ze sekvence snímků, z nichž lze pak kontrakční křivku myocyty vytvořit. Snímek byl obrazovým prahováním převeden do ČB oblasti, poté byly aplikovány funkce morfologických operací, které pomohly eliminovat nežádoucí částice v obrazu a získat kvalitní obraz buňky s vyplněnou vnitřní strukturou a oddělené od pozadí. Dále lze tyto úpravy provádět zcela automaticky na všech snímcích daného videozáznamu s následnou archivací nebo zpracováním hodnot parametrů takto vhodně modifikovaných objektů.

Ukázka části zdrojového kódu využití obrazového prahování :

```
Gray_1 = rgb2gray(I2);  
level = graythresh(Gray_1);  
bw = im2bw(Gray_1,level);  
bwinv=1-bw;
```

Ukázka části zdrojového kódu morfologické transformaci :

```
bwinv = imfill(bwinv, 'holes');  
bwinv = bwareaopen(bwinv,100);  
se = strel('disk',10);  
  
bwinv=imclose(bwinv,se);  
bwinv = imfill(bwinv, 'holes');  
bwinv = bwareaopen(bwinv,1000);  
se = strel('line',45 , 55);  
  
bwinv=imclose(bwinv,se);  
bwinv = imfill(bwinv, 'holes');  
se = strel('disk',10);  
bwinv=imopen(bwinv,se);
```

Stručný popis zde použitých funkcí :

V části ukázky zápisu zdrojového kódu využívajícího obrazového prahování bylo nutné nejprve převést šedotónový snímek na černobílý. K tomuto účelu byla použita funkce s názvem `im2bw` , která umožňuje vytvoření binárního obrazu s využitím prahové hodnoty. Hodnotám pixelů vyšším než nastavená prahová hodnota je přiřazena jednička, hodnotám nižším je přiřazena nula, což odpovídá černé barvě. Následně ještě byla provedena inverze takto získaného binárního snímku, s kterou již bylo možné dále pracovat pomocí morfologických transformací.

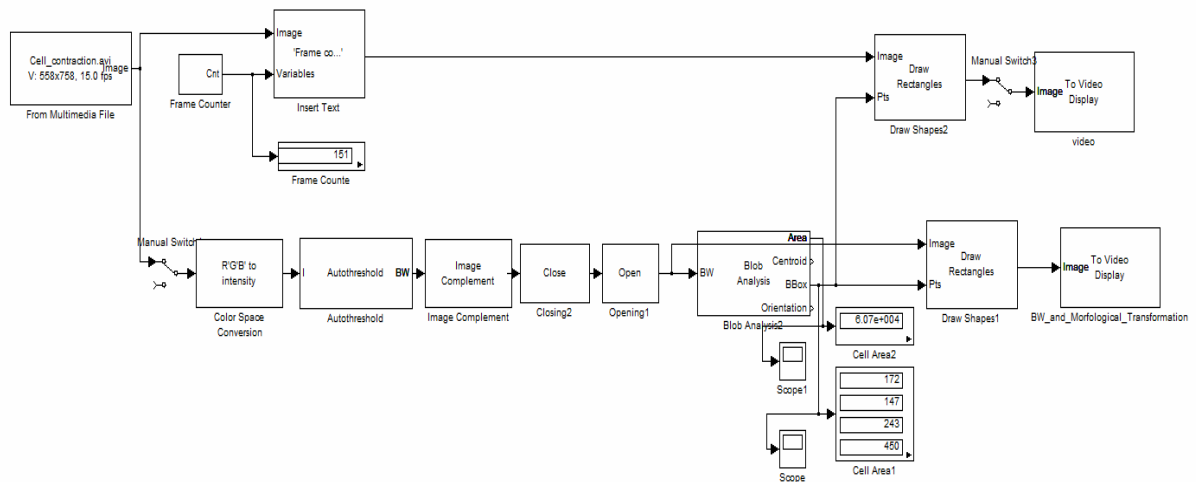
Uživatel má možnost volby mezi demonstračním modelem měření, který je pouze ukázkou principu funkce metod a nebo přímo měřením na sekvenci snímků, které se provedou zcela automaticky. Takto získaná data jsou vhodně archivována do Excel souboru s příponou `.xls`. Z těchto archivovaných dat lze dále zobrazit průběhy kontrakce pomocí grafického rozhraní.

Z důvodu neustálého pohybu objektu v důsledku kontrakce a relaxace, zaznamenaných v jednotlivých snímcích a tím související změna úhlu natočení, bylo nutné zajistit adekvátní úpravu z hlediska změn velikosti a to jak velikosti objemové, reprezentované počtem bílých pixelů, tak i velikosti plošné, reprezentované parametrem délky objektu.

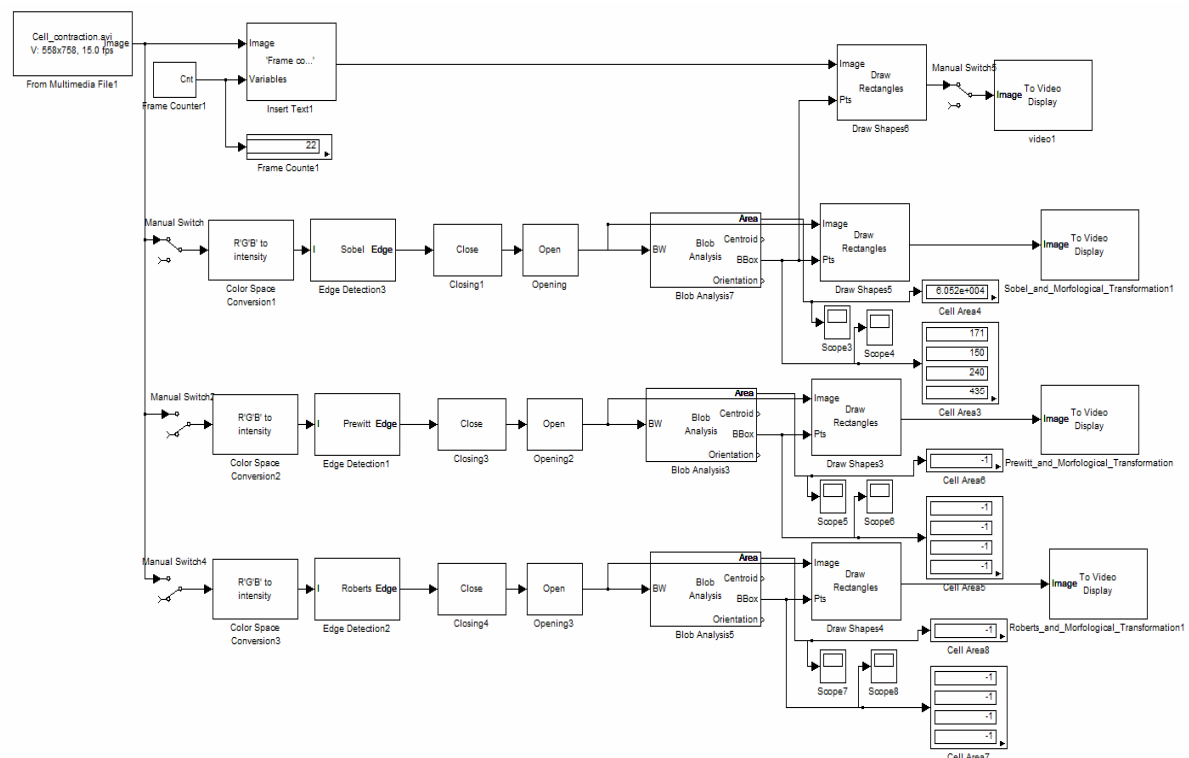


## 6.5 Ukázka realizace v Simulinku

Kromě využití knihoven Image Processing Toolbox lze také k realizaci optického měření kontrakce z pořízeného videozáznamu použít knihoven Video and Image Processing Blockset, které jsou součástí matlabovského programu Simulink.



Obr. 6.9 Ukázka realizace měření kontrakce pomocí metod přímé konverze.



Obr. 6.10 Ukázka realizace měření kontrakce pomocí metod hranové detekce.

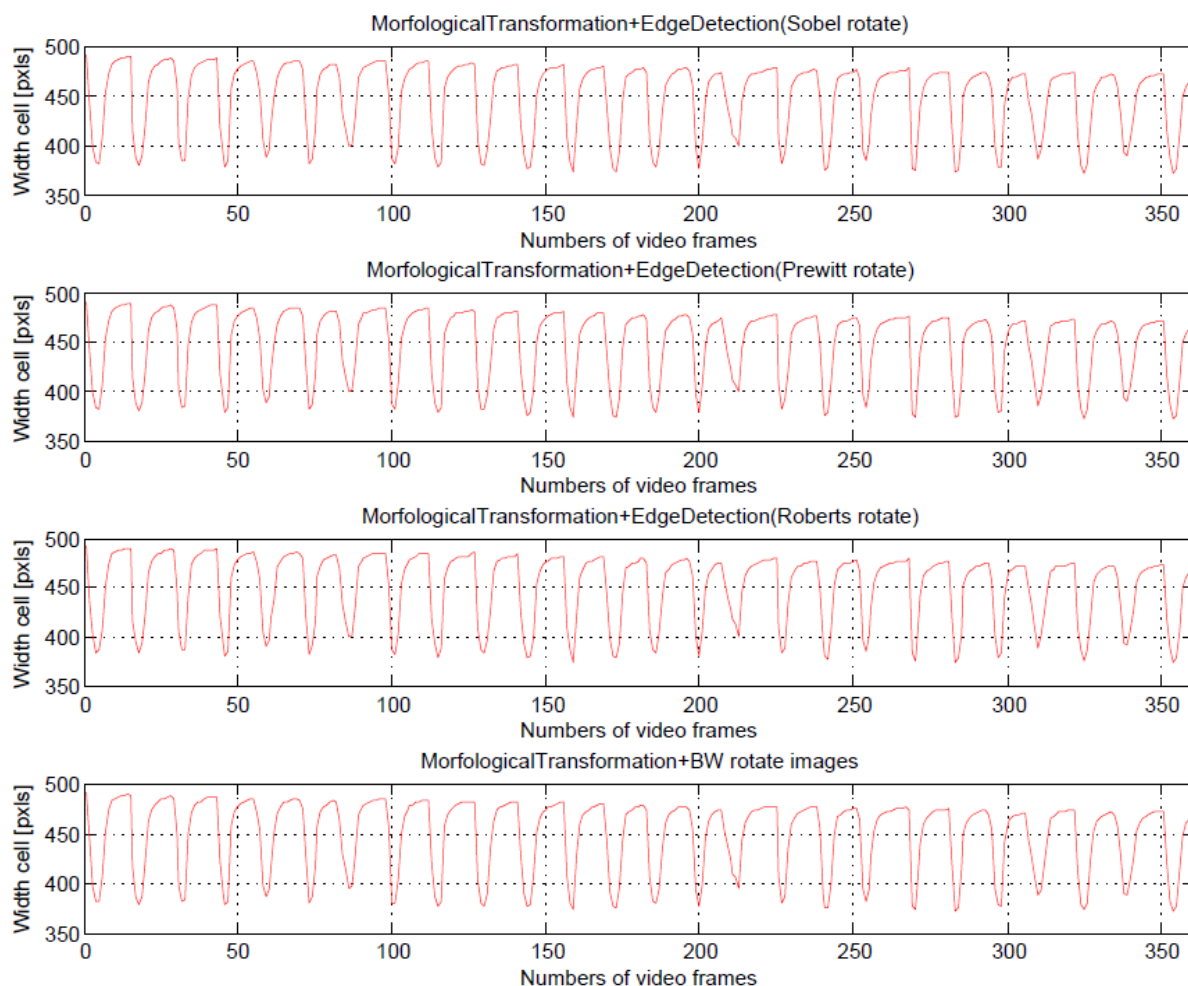
Jedná se pouze o ukázkové realizace, které nejsou určeny k přesnému měření kontrakce myocyty.

## 7. Vyhodnocení funkce kontrakce

Po ukončení optických metod měření, které vycházejí z obrazových metod zpracování, sledující kontrakční a relaxační vlastnosti srdečního myokardu, lze přistoupit k samotné prezentaci námi získaných hodnot jednotlivými metodami, které lze vidět v obr.7.1. a 7.2.

### 7.1 Metoda vyhodnocení rozměrů

Tyto metody vyhodnocují závislost kontrakce a relaxace na čase, přičemž kontrakční a relaxační vlastnosti sledovaného objektu jsou v prvním případě dány šířkou buněčné struktury (*osa y*) a číslem snímku v čase (*osa x*) viz. obr.7.1 .

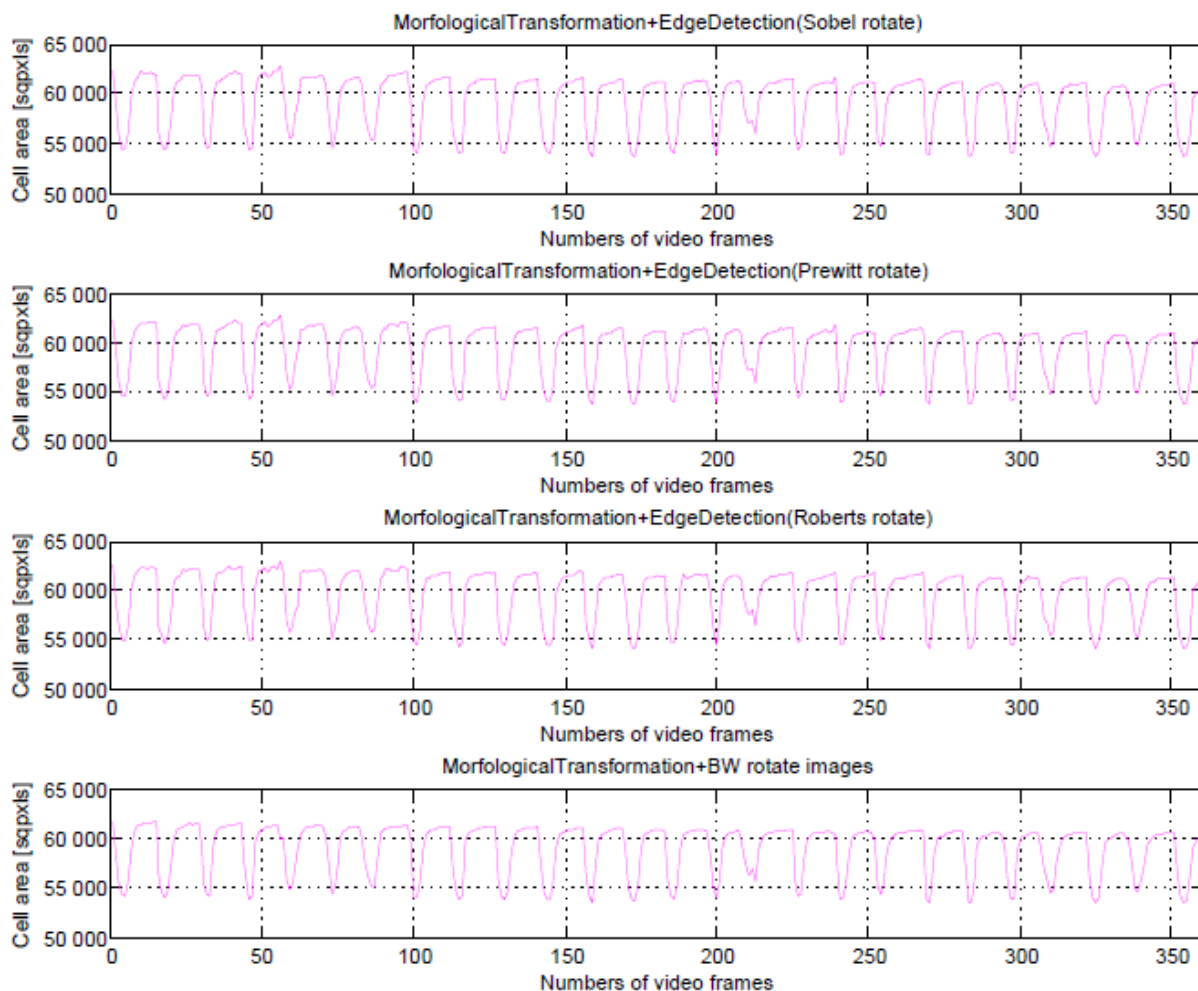


Obr. 7.1 Výsledné průběhy získané z detekce délky buněčné struktury.

Jak je z grafů patrné, metoda vyhodnocující délku buněčné struktury patří k přesnějším metodám hodnocení kontrakce nezávislé na použité obrazové metodě zpracování. Drobné výkyvy v signálu kontrakce nebo právě relaxace v některých snímcích jsou způsobeny dynamikou pohybu sledovaného objektu, tj. rozmazáním objektu, které již zde byli kompenzovány.

## 7.2 Metoda měření počtu pixelů

Tyto metody, obr.7.2 vyhodnocují také závislost kontrakce a relaxace na čase, přičemž kontrakční a relaxační vlastnosti sledovaného objektu jsou v druhém případě dány plochou buněčné struktury (*osa y*) a číslem snímku v čase (*osa x*).



Obr. 7.2 Výsledné průběhy získané z detekce počtu pixelů v buněčné struktuře.

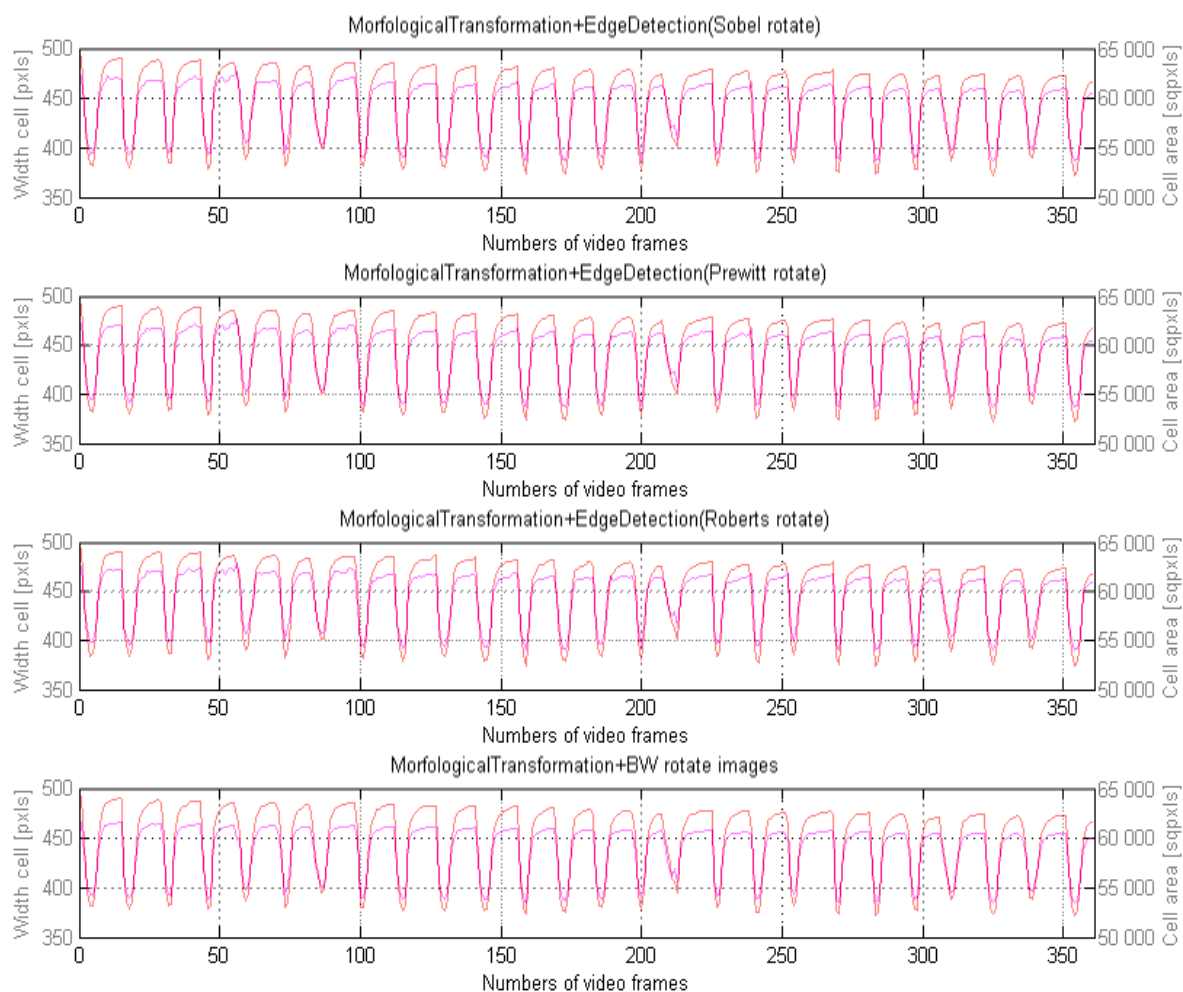
Z následujících grafů lze vidět, že tyto metody dávají téměř u každého snímku přesný výsledek a to jak v případě použití maskových operátorů, tak i při přímém převodu na černobílý snímek.

Z grafů lze jednoznačně vyčíst, že uplatnění pohybového rozmazání a částečně i artefaktů souvisejících s cizími objekty je výraznější při použití hranové detekce než při přímém převodu. Odstranění ojedinělých pohybových artefaktů lze kompenzovat vhodným nastavením morfologických transformací, které již zde byly takto kompenzovány.

Grafy také poskytují informaci o tom, ve kterých snímcích se nejvíce uplatňují tyto nežádoucí jevy, z čehož lze konstatovat, že výrazněji jsou nežádoucí jevy zřejmé při použití hranové detekce než v případě přímého převodu. Metoda vyhodnocení rozměrů patří k přesnějšímu způsobu optického měření kontrakce izolovaného srdečního myokardu.

## 7.3 Srovnání výsledků

Z výsledků práce lze konstatovat, že metoda detekce rozměrů (*konkrétně délky objektu aproximovaného obdélníkem*) je přesnější metodou, která je méně náchylná na pohybové rozmazání než metoda, při níž se zjišťuje přímo počet pixelů uvnitř měřeného objektu. Dále lze také konstatovat, že z metod obrazového zpracování je v našem případě vhodnější použití morfologické transformace aplikované přímo na získaný černobílý snímek, než metod s hranovou detekcí.



Obr. 7.3 Výsledné průběhy kontrakce

Přičemž lze říci, že dosažené výsledky v rozhodující míře závisí na *fsp* použitého CCD snímače, budícím pulzu generátoru, s kterým následně souvisí projevy pohybového artefaktu, tzv. (*motion blure*). Podstatný vliv na dosažení adekvátních výsledků má také použití vhodné kombinace morfologických transformačních metod vzhledem k tvaru sledovaného objektu a různých jiných artefaktů v pozorovaném prostoru buňky.

# ZÁVĚR

V závěru své práce bych rád zhodnotil dosažené výsledky a stanovené cíle, které jsem definoval v úvodu své práce a které jak doufám, jsem zvládnul tak, jak bylo třeba.

Základním cílem mé práce byl teoretický popis metod optického vyhodnocení funkcí kontrakce buněk a prostudování vlastností a jevů související s kontrakcí izolovaných srdečních buněk myokardu. Z potřeby další práce byly také popsány některé základní metody používané pro obrazové zpracování.

V rámci práce bylo také vytvořeno uživatelské prostředí, umožňující detekci významných částí buněčné struktury s využitím přímé konverze na černobílý snímek, nebo hranové detekce v kombinaci s morfologickými transformacemi. Celá aplikace byla vytvořena pomocí metody Switch Board přístupný v programovacím jazyce Matlab. K obrazovému zpracování byly použity funkce již implementované v Image Processing toolboxu nebo by také bylo možné využít funkce knihovny Video and Image Processing Blockset v rámci Simulinku.

Z výsledků měření lze stanovit, že kvalita a přesnost optického měření kontrakce závisí nejen na použitém typu snímače, ale také ve velké míře i na volbě a nastavení použitých metod obrazového zpracování. Z výsledků práce lze konstatovat, že metoda detekce rozměrů (konkrétně délky objektu aproximovaného obdélníkem) je přesnější metodou, která je méně náchylná na pohybové rozmazání než metoda, při níž se zjišťuje přímo počet pixelů uvnitř měřeného objektu. Dále lze také konstatovat, že z metod obrazového zpracování je v našem případě vhodnější použití morfologické transformace aplikované přímo na získaný černobílý snímek, než metod s hranovou detekcí.

K programu byla naprogramována nápověda ve formě jednoduchých HTML stránek obsahujících některé teoretické poznatky, ovládání, popis programu a některé další důležité informace. Nápověda je přístupná z okna grafického prostředí.

Práce byla také prezentována na studentské soutěži EEICT 2010 v kategorii Zpracování signálů, obrazu a dat.

Dle mého názoru byly stanovené cíle splněny v dostatečné míře, vyhovující danému zadání.

# SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Leanne M. D. Delbridge, Kenneth P. Roos: *Optical Methods to Evaluate the Contractile Function of Unloaded Isolated Cardiac Myocytes* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://www.sciencedirect.com/science?> >
- [2] ŠIMURDA, Jiří.: Elektronická podpora předmětu Biofyzika (BFE), [online].  
Dostupné z WWW: < <http://www.dbme.feec.vutbr.cz/kurzy/BFE/index.html> >
- [3] HONZÍKOVÁ, N., HONZÍK, P. Biologie člověka - elektronická skripta. Biologie člověka. Elektronická skripta VUT Brno. Brno: VUT Brno, 2003. s. 1-135.
- [4] JAN.J.: Číslíková filtrace analýza a restaurace signálu  
2.vyd.VUTIM Brno 2002. 427 s. ISBN 80-214-2911-9
- [5] BLÁZSOVITS, Gábor: *Interaktívna učebnica spracovania obrazu* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://dip.sccg.sk/> >
- [6] HOLOTA, R. , FIŘT, J.: *Digitalizace a zpracování obrazu* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://home.zcu.cz/~holota5/publ/DigZprO.pdf> >
- [7] ŠPANĚL, M., BERAN, V.: *Obrazové segmentační techniky* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://www.fit.vutbr.cz/~spanel/segmentace/cs.iso-8859-2> >
- [8] ZAPLATÍLEK, K., DONAR, B. Matlab tvorba uživatelských aplikací  
1.vyd.Praha 2005. 216s. ISBN 80-7300-133-0
- [9] Lena van der Stap , Patrick McNairnie: *Simulation of The Contractile Behavior of An Isolated Cardiac Myocyte* [online]. Dostupné z WWW:  
< <http://www.edcenter.sdsu.edu/cso/paper.html> >
- [10] BAZAN, C., TORRES, D., BLOMGREN, P., PAOLINI, P.: *Image Processing Techniques for Assessing Contractility in Isolated Adult Cardiac Myocytes* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://www.hindawi.com/journals/ijbi/2009/352954.html> >
- [11] TORRES, D., PAOLINI, P.: *A Non-Invasive Method for Measuring Contractility in Cardiocytes* [online]. Dostupné z WWW:  
< <http://www.csrc.sdsu.edu/cscc/acsess/reports/AP0911.pdf> >
- [12] ČMIEL, V., PROVAZNÍK, I.: *Systém pro Snímání a Vyhodnocení Kontrakce Izolované Srdeční Buňky v Prostředí LabView* [online].  
Dostupné z WWW: < <http://www.elektrorevue.cz/> >
- [13] Schmidtová, Z. *Mutační analýza kandidátního genu SCN1B syndromu dlouhého QT intervalu*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007. 103 s.
- [14] Tošer, P. *Hledání kořenů polynomu metodou přírůstku argumentu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2008. 66 s.

- [15] Donald M. Bers: *Cardiac excitation–contraction coupling* [online]. Dostupné z WWW: < <http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6868/pdf/415198a.pdf> >
- [16] *Public Gallery* [online]. 2009, 4.2.2010 [cit. 2010-04-26]. SciencePradeep. Dostupné z WWW: < <http://sciencepradeep.com/gallery.php> >
- [17] *Бодибилдинг: персональные тренировочные программы бодибилдинга, статьи о бодибилдинге, учебное видео* [online]. 2008 [cit. 2010-04-26]. Скорость восстановления скелетных мышц. Dostupné z WWW: < <http://www.bodybuild.com.ua/images/uploads/fckeditor/sarkomer.gif> >
- [18] *Ratiometric Fluorescence and Cell Dimensioning Data Acquisition Systems / IonOptix* [online]. 2008 - 2010 [cit. 2010-04-26]. SarcLen Sarcomere Length Acquisition Module. Dostupné z WWW: < <http://www.ionoptix.com/products/saracq> >
- [19] *ASI - Aurora Scientific Inc* [online]. 1994, 1.4. 2009 [cit. 2010-04-26]. Aurora Scientific muscle\_physiology. Dostupné z WWW: < [http://www.aurorascientific.com/\\_images\\_products/701Photo.htm](http://www.aurorascientific.com/_images_products/701Photo.htm) >
- [20] Vlach, J. *Metody a aplikace detekce mrkání očí s využitím číslicového zpracování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2008. 98 s.

# SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AP akční potenciál

AN akční napětí

ROI region of interest

DNA deoxyribonukleová kyselina

RNA ribonukleová kyselina

NK nukleová kyselina

ATP adenosintrifosfát

ADP adenosindifosfát

SA sinoatriální uzel

$U_m$  rozdíl membránového napětí

$\varphi_i$  membránové napětí intracelulárního prostředí

$\varphi_e$  membránového napětí extracelulárního prostředí

GUI grafické uživatelské prostředí

GUIDE grafické uživatelské prostředí vývojové prostředí

HTML značkovací jazyk pro vytváření dokumentů s hypertextovými odkazy

















# PŘÍLOHY



## Příloha 1 – Obsah přiloženého CD

Název adresáře	Popis
Dokument Diplomové práce Program Matlab Program Simulink Videozáznam Výstupní data	Elektronická verze diplomové práce Hlavní program s grafickým rozhraním Ukázka realizace v simulinku Vstupní data myocyty Naměřené data kontrakce

## Příloha 2 – Vytvořené m-file

 about.m	about.m	- informace o programu a autorovi
 napoveda.m	napoveda.m	- informace o možnosti ovládnání programu
 Crop_video.m	Crop_video.m	- funkce umožňující výběr ROI oblasti
 Load_video.m	Load_video.m	- funkce umožňující přehrání ROI videozáznamu
 zpracovani.m	zpracovani.m	- uživatelské prostředí vytvořené pro obrazové zpracování
 fun_sobel.m	fun_sobel.m	- funkce umožňující obrazové zpracování, s využitím hranové detekce a morfologické transformace
 fun_roberts.m	fun_roberts.m	- funkce obrazového zpracování, s využitím hranové detekce a morfologické transformace
 fun_prewitt.m	fun_prewitt.m	- funkce obrazového zpracování, s využitím hranové detekce a morfologické transformace
 fun_BW.m	fun_BW.m	- funkce obrazového zpracování, s využitím metod prahování a morfologické transformace
 fun_edge.m	fun_edge.m	- funkce umožňující uložení snímků po hranové detekci
 fun_bwinv.m	fun_bwinv.m	- funkce umožňující uložení snímku po převodu na ČB
 fun_original.m	fun_original.m	- uloží ROI grayscale snímky
 Save_video.m	Save_video.m	- uloží nový ROI videozáznam
 konec.m	konec.m	- ukončení aplikace

## Příloha 3 – Vytvořené simulink model files

 simulink_bw.mdl	simulink_bw.mdl	-	model umožňující obrazové zpracování, pomocí metod prahování a morfologických transformací
 simulink_edge.mdl	simulink_edge.mdl	-	model umožňující obrazové zpracování, pomocí metod hranové detekce a morfologických transformací

## Příloha 4 – Vytvořené HTML Soubory

napoveda.html - hlavní menu nápovědy

srdeč\_tkan - všeobecné vlastnosti srdečné tkáně

AP.html - přenos vzruchů

light\_diffraction.html - optická metoda měření kontrakce

direct\_optical\_imaging.html - optická metoda měření kontrakce

moznosti.html - možnosti vytvořeného programu

popis.html - grafický popis vytvořeného programu

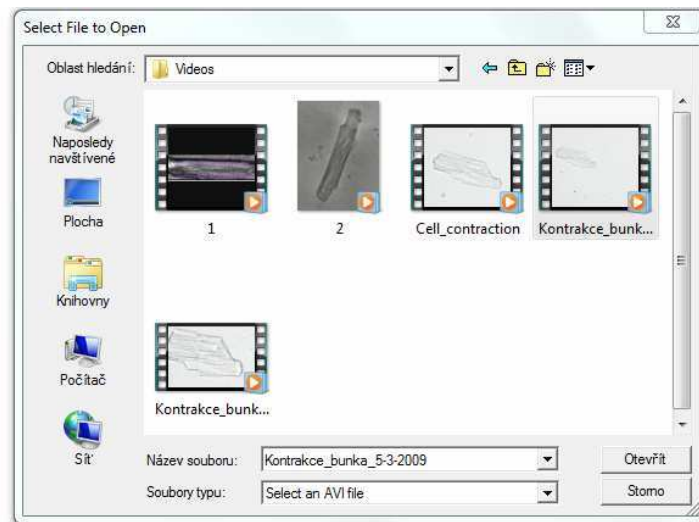
informace.html - doplňující informace

## Příloha 5 – Návod k práci s programem

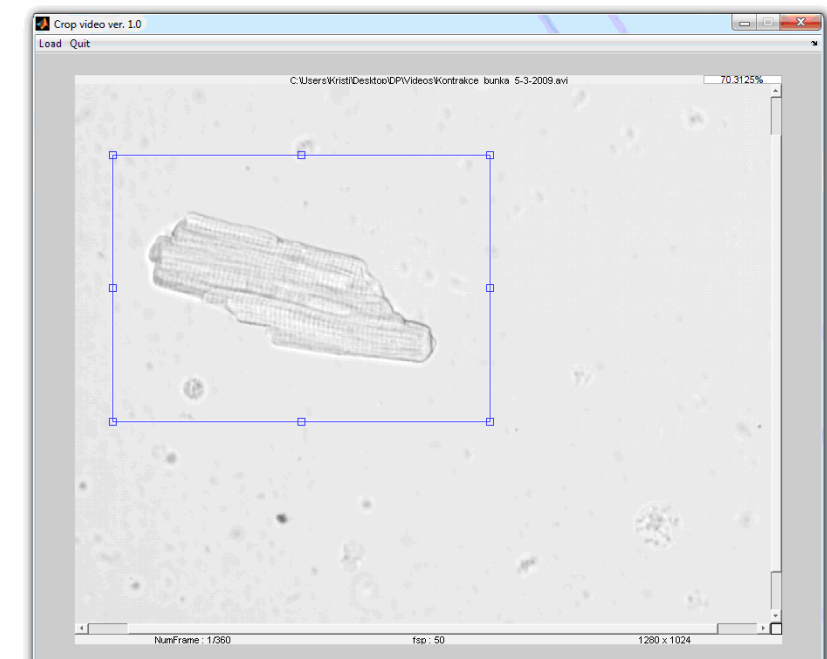
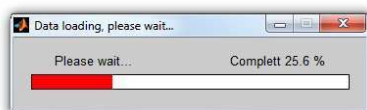
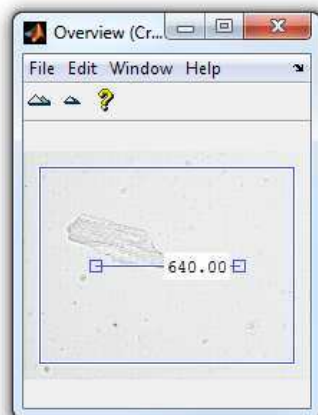
### 1) Spuštění programu

Po spuštění programu je potřeba zvolit m-file s názvem `Crop_video.m` který umožní:

- načtení videozáznamu

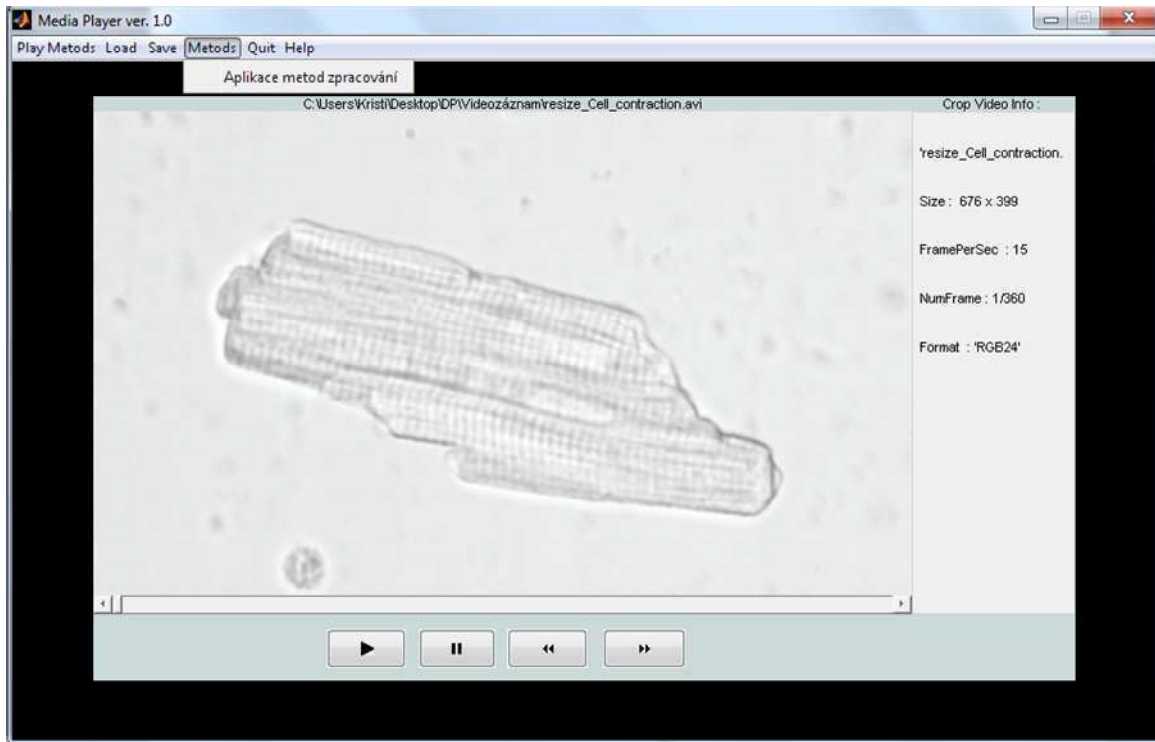


- výběr ROI oblasti z načteného videozáznamu



## 2) Zvolená ROI oblasti

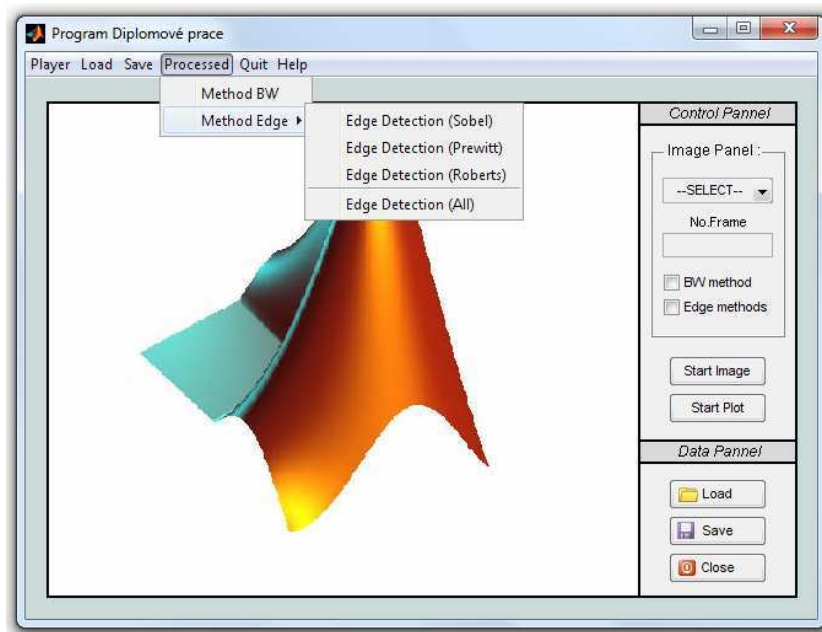
Takto upravený videozáznam lze dále zobrazit, m-file s názvem `Load_video.m`. Jedná se o aplikaci, která má sloužit uživateli pouze jako nástroj k dodatečné kontrole správnosti zvolené ROI oblasti.



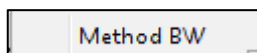
Volba  spouští GUI aplikaci obrazového zpracování.

### 3) Zpracování snímků

#### Režim „Automatické zpracování“



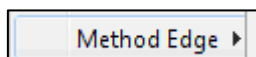
- Metoda BW



automaticky zpracuje všechny snímky videozáznamu.

Obrazovým prahováním jsou načtené snímky z pořízeného videozáznamu převedeny do ČB oblasti, a poté jsou na takto upravené snímky aplikovány funkce morfologických operací.

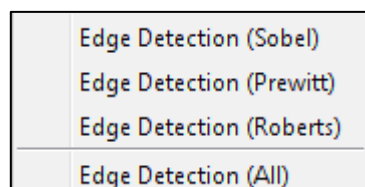
- Metoda Edge

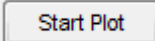


automaticky zpracuje všechny snímky videozáznamu.

Načtené snímky z pořízeného videozáznamu jsou nejprve upraveny metodami hranové detekce a poté jsou na takto upravené snímky aplikovány funkce morfologických operací.

Volit lze mezi jednoduchými maskovými operátory první derivace jako jsou :

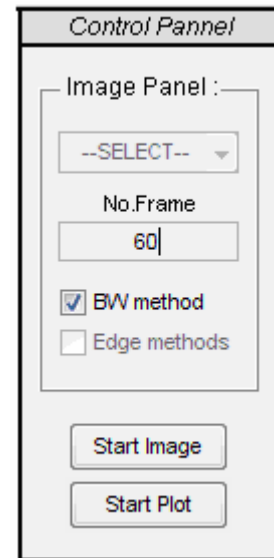
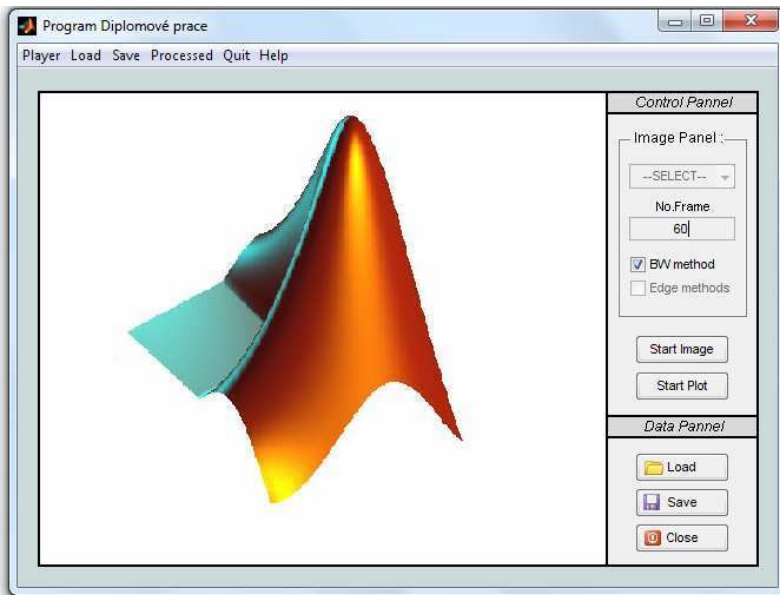


Volba 

zobrazí křivku kontrakce a relaxace sledovaného objektu.

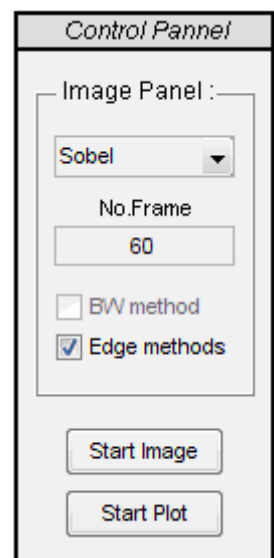
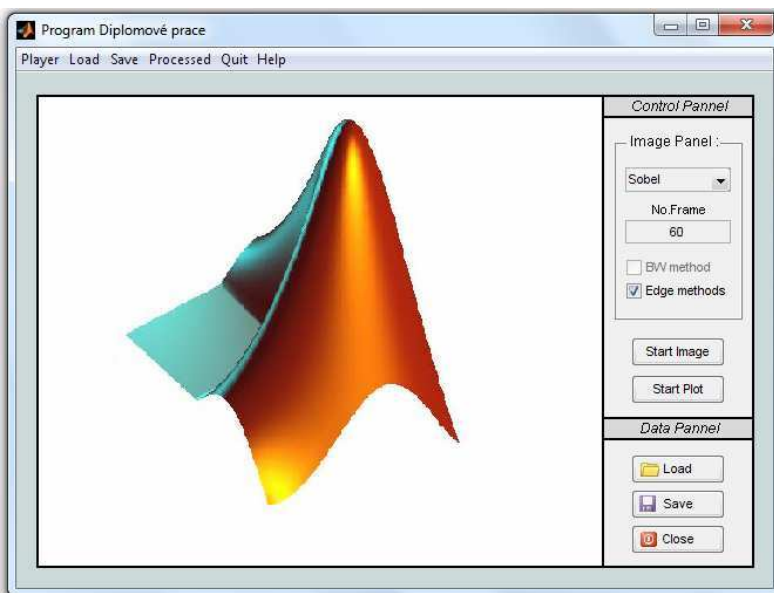
## Režim „Demonstračního zpracování“

### ▪ *BW metoda*



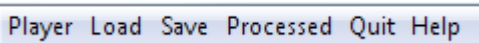
1. Výběr metody (*BW methods/Edge methods*)
2. Výběr snímku (*No.Frame*)
3. Spuštění aplikace (*Start Image*)

### ▪ *Edge metoda*



1. Výběr metody (*BW methods/Edge methods*)
2. Výběr snímku (*No.Frame*)
3. Výběr typu maskového operátoru (*Sobel, Roberts, Prewitt*)
4. Spuštění aplikace (*Start Image*)

## 4) Stručná nápověda

Uipanel programu 

Uimenu *Player* otevře aplikaci umožňující přehrání videozáznamu.

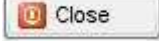
Uimenu *Load* nebo PushButton  otevře nabídku načtení nového videozáznamu.

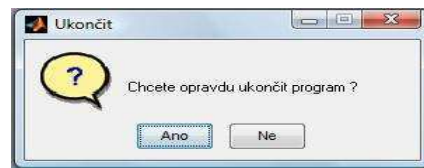
Uimenu *Save*

Save Original-grayscale (ROI) Video /.avi
Save Original-grayscale (ROI) Image /.jpg
Save Original-BINV (ROI) Image /.jpg
Save Original-Edge Detection (ROI) Image /.jpg

- uloží ROI videozáznam
- uloží ROI snímky
- uloží ROI snímky po prahování
- uloží ROI snímky po hranové detekci

PushButton  uloží ROI videozáznam.

Uimenu *Quit* nebo PushButton  otevře nabídku ukončení aplikace.



Uimenu *Help* otevře uipanel s volbou

Návod
Nápověda
About    Ctrl+A

Volba *Návod* otevře HTML nápovědu k vytvořené aplikaci, rámci této práce.

Volba *Nápověda* otevře nápovědu.

Volba *About* otevře okno s názvem této práce a jméno autora

