

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

**Ing. Martin Švrček**

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

NEW APPROACHES IN CARDIAC OPTICAL MAPPING

ZKRÁCENÁ VERZE PH.D. THESIS

Obor: Biomedicínská elektronika a biokybernetika

Školitel: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Akční napětí, optické mapování, fluorescence, barvivo, di-4-ANEPPS, pohybový artefakt, poměrové techniky, elastická registrace obrazů, epikard, endokard

## **KEYWORDS**

Action potential, optical mapping, fluorescence, dye, Di-4-ANEPPS, motion artifacts, ratiometry techniques, elastic image registration, epicard, endocard

Disertační práce je k dispozici na Vědeckém oddělení děkanátu FEKT VUT v Brně, Údolní 53, Brno, 602 00

## OBSAH

1 ÚVOD.....	4
2 ZÁKLADY OPTICKÉHO SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÝCH PROJEVŮ MYOKARDU.....	4
2.1 Princip optického mapování akčního napětí .....	5
2.2 Problémy optického mapování.....	6
2.3 Optické mapování akčního napětí na úrovni orgánu .....	7
3 DESIGN REALIZOVANÉHO MĚŘICÍHO SYSTÉMU.....	9
3.1 Definice požadavků.....	10
3.2 Koncepce měřicího systému .....	10
3.3 Zajištění vitálních funkcí vzorku .....	12
3.4 Prvky pro snímání a excitaci.....	13
4 ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA MĚŘENÝCH SIGNÁLŮ.....	13
4.1 Předzpracování signálů .....	13
4.2 Charakteristika odezvy barviva na AN .....	14
4.3 Navržená poměrová metoda.....	15
4.4 Popis vzniku pohybových artefaktů .....	15
4.5 Registrace obrazu .....	16
5 APLIKACE .....	20
5.1 Měřicí systém.....	20
5.2 Metody zpracování signálů .....	21
6 ZÁVĚR.....	25
LITERATURA .....	26
STRUKTUROVANÝ ŽIVOTOPIS.....	30
ABSTRACT .....	32

# 1 ÚVOD

Měření elektrických projevů srdce je jedním z klíčových faktorů pro porozumění jeho funkci. Ať již jde o měření na úrovni buněk, tkání, nebo celého orgánu, měřicí metody nám poskytují informace, které mohou sloužit k diagnostice, léčbě, nebo prevenci srdečních onemocnění.

V klinické praxi jsou nejčastěji měřeny signály EKG. Signály EKG jsou zpravidla měřeny na povrchu těla. Představují záznam rozdílu potenciálů, který je projekci elektrických projevů myokardu.

Pro bližší zkoumání srdeční aktivity byly vyvinuty přístupy pro přímá měření na povrchu myokardu, ať již *in vitro*, *in vivo*, nebo *ex vivo*. Jednou z metod, která umožňuje podrobnější zkoumání myokardu, je měření na izolovaných srdcích. Měření akčních napětí (membránového napětí) srdečních buněk bylo dříve omezeně realizovatelné za pomoci intracelulárních elektrod. Ačkoli je tento postup stále považován za zlatý standard, pro měření akčních napětí je jeho využití v mnoha aspektech omezené.

Techniky optického snímání přinesly revoluci ve zkoumání fyziologie srdečních buněk. Výzkum v oblasti optického mapování byl podmíněn vývojem fluorescenčních barviv, anebo také sond, jež umožňují měření buněčných potenciálů optickou cestou. Tato fluorescenční barviva jsou schopna vazby na buněčnou membránu s tím, že v závislosti na rozdílu potenciálů uvnitř a vně buňky mění své optické vlastnosti a umožňují tak jejich nepřímé měření.

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

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

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

Tato práce se zabývá návrhem inovativního měřicího systému a algoritmu pro optické měření akčních potenciálů s důrazem na eliminaci negativních aspektů, jež optické měření spolu provází.

Realizovaný měřicí systém ve spolupráci s Auckland Bioengineering Institute (University of Auckland, New Zealand) umožňuje optické mapování, simultánní optické a elektrické mapování (současný záznam akčních napětí a potenciálů na povrchu myokardu), možnost využití poměrových technik ve 2D a

také možnost měření na endokardu. Metody zpracování a analýzy signálů se zaměřují na popis vzniku pohybových artefaktů, využití algoritmů pro registraci (lícování) obrazů k eliminaci pohybových artefaktů a návrh nové ratiometrické techniky.

## **2 ZÁKLADY OPTICKÉHO SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÝCH PROJEVŮ MYOKARDU**

Tato kapitola si klade za cíl prezentovat současný výzkum v metodách zabývajících se optickým snímáním akčních napětí. K dispozici je široká škála metod, od nejjednodušších, zabývajících se měřením optických signálů v jediném bodě na povrchu myokardu, až po metody zahrnující panoramatické měření ve 3D. V následujících odstavcích budou popsány systémy, metody a principy, jež jsou ve světě realizovány a využívány k měření akčních napětí optickou cestou na úrovni orgánů. Přehled používaných technik lze nalézt v [8, 14, 15, 16].

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

### **2.1 PRINCIP OPTICKÉHO MAPOVÁNÍ AKČNÍHO NAPĚTÍ**

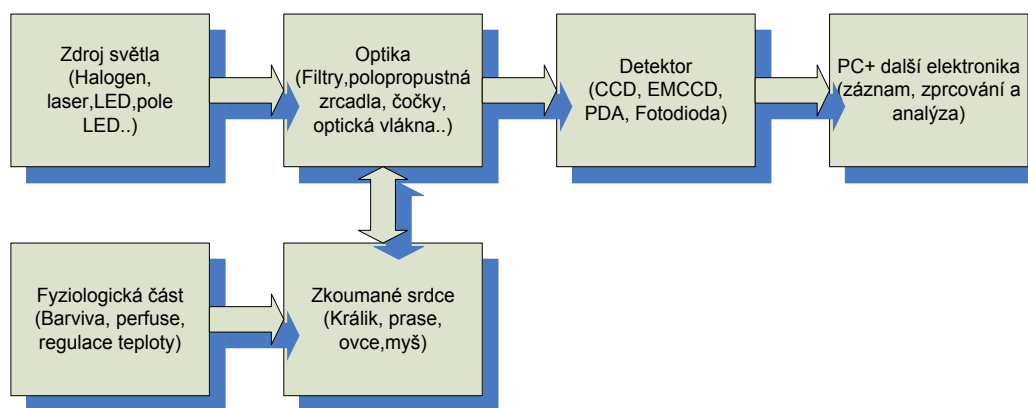
Optické metody, které jsou využívány k měření elektrické aktivity srdce, respektive k měření membránových napětí, k tomuto využívají speciálně vyvinutých napětově citlivých barviv. Tato barviva, nebo také optické sondy, mění své optické vlastnosti (zejména fluorescenci) v závislosti na membránovém napětí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

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

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

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

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



**Obr. č.1:** Blokové schéma optického snímacího systému

### 2.1.1 Volba měřeného orgánu

Volba měřeného orgánu zahrnuje výběr vhodného druhu srdce pro danou měřicí metodu v relaci s potřebami realizovaného výzkumu. Měřené preparáty jsou perfundovány zpravidla podle Langendorfa s využitím různých modifikací Krebs-Henseleit (K-H) roztoku. Některé experimenty využívají k perfúzi i krev[33]. Pro experimenty, které jsou zaměřeny na snímání aktivity na povrchu epikardu, ať metody bodové [5, 9], plošné [13, 27], nebo panoramatické [18, 42], lze použít menší orgány (králik, myš) i větší orgány (prase, ovce) v závislosti na konfiguraci konkrétního systému. Pro intramurální měření jsou pak využívány orgány větší (prase, ovce), aby byla zajištěna dostatečná šířka srdečního svalů, v němž je umístěna snímací sonda [4].

### 2.1.2 Průběh měření

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

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

Zásadní je v tomto případě fáze, kdy dochází k aplikaci fluorescenčního barviva. Kromě druhu použitého barviva má zásadní vliv jeho koncentrace a délka aplikace. V zásadě se dá aplikace rozdělit na aplikaci postupnou pomocí mikropumpy [21, 40], nebo aplikaci jednorázovou [50, 55].

### 2.1.3 Napětově citlivá fluorescenční barviva

Základní vlastností používaných barviv je závislost jejich absorpce, fluorescence, nebo též absorpce i fluorescence [46] na změnu membránového napětí buňky-ek, bavíme-li se o barvivech sloužících k měření akčního napětí.

Barviva používaná pro měření AN lze rozdělit na dvě základní skupiny, na barviva s rychlou a pomalou odezvou.

Pro fluorescenční měření v elektrofyziologii se v současné době nejčastěji využívají tzv. rychlá barviva, která umožní sledovat napětíové změny v řádech mikrosekund. Mezi nejvýznamnější a nejvíce používané zástupce barviv s rychlou odezvou patří barviva Di-4-ANEPPS a RH-421. Barvivo RH-421 bylo využíváno počátkem devadesátých let [11, 15] dnes jej nahrazují barviva z rodiny ANEP (Amino Naphthyl Ethenyl Pyridinium). Di-4-ANEPPS se vyznačuje poměrně vysokou změnou fluorescence v závislosti na změně napětí ( $\Delta F/F \approx 8-15\%$ ) [36].

V nedávné době byla představena barviva, která svými parametry překonávají nečastěji používané Di-4-ANEPPS. Nově syntetizovaná barviva Di-4-ANBDQPQ (JPW-6003) a Di-4-ANBDQBS (JPW-6033) vykazují lepší vlastnosti zejména v oblasti citlivosti a pozvolnějšího vybledávání barviva, tedy ztráty jeho schopnosti fluorescence nebo reakce na její změnu [33, 34].

## **2.2 PROBLÉMY OPTICKÉHO MAPOVÁNÍ**

### **2.2.1 Foto-toxicita používaných barviv**

Jedním ze zásadních negativních aspektů optického měření AN je vliv používaných barviv na elektrofyziologické vlastnosti srdce. Tato vlastnost je nazývána fototoxicita nebo také fotodynamický efekt. Těmto postranním efektům se věnovala řada odborných studií [3, 10, 38, 40, 48].

Nygren et al. [40] shrnuli několik efektů nejpoužívanějšího Di-4-ANEPPS na elektrofyziologii srdce. Prokázali vliv barviva Di-4-ANEPPS na vodivost AV uzlu, prodloužení PQ intervalu a následný vznik AV bloků. Možnost vzniku AV bloku byla potvrzena například v [38]. Dalším aspektem je přechodný vliv na vasodilataci koronárního řečiště.

### **2.2.2 Kalibrace optických signálů**

Měřené optické signály dávají informaci o změně akčních potenciálů pouze relativně. Bylo publikováno několik postupů, které zkoumaly vztah optického záznamu k současně měřenému signálu z mikroelektrod [48].

Současné měření ratiometrických signálů spolu s mikro-elektrodovým záznamem akčního napětí prokázalo výraznou korelaci a linearitu optických záznamů [30]. V absolutním měřítku pak kalibrace optických signálů probíhá tak, že předpokládáme, že zbytkový potenciál má hodnotu -85 mV a akční napětí ve své maximální hodnotě dosahuje 10mV [42].

### **2.2.3 Pohybový artefakt**

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

### ***Mechanická eliminace pohybových artefaktů***

Pohybový artefakt představuje složkou signálu, která je úměrná pohybu myokardu. Mechanickou fixací lze eliminovat pohyb myokardu a následně také pohybový artefakt.

Využití mechanické fixace k potlačení pohybových artefaktů bylo již mnohokrát úspěšně vyzkoušeno, ať již se jedná o prstenec fyzicky obepínající myokard [41], fixaci pomoci speciálně upravené měřicí komůrky [2], nebo využití přítlačného tlaku sklíčka, jež navíc usnadňuje plošné měření [15, 39]. Vliv na tvar měřených akčních napětí nebo fyziologii srdce nebyl zaznamenán [15, 20], ačkoli tlak na srdeční stěnu může vyvolat arytmiu [12].

### ***Farmakologická eliminace pohybových artefaktů***

Mechanický pohyb myokardu lze potlačit využitím farmak, která zajišťují disociaci mechanické a elektrické aktivity, dále budou označovány pojmem disociátory (z ang. „uncouplers“). Mezi nejčastěji používané disociátory pro aplikace optického mapování patří 2,3-butanedione monoxime (BDM), cytochalasin D a nedávno představený blebbistatin [19, 47]. Použití těchto disociátorů umožňuje eliminovat pohybové artefakty, ale současně také ovlivňuje elektro-fyziologii myokardu, BDM [1, 6], Cytochalasin D [6], Blebbistatin [28]. V současné době je Blebbistatin v aplikacích optického mapování pravděpodobně nejvhodnější volbou.

### ***Poměrová metoda pro eliminaci pohybových artefaktů***

Poměrová metoda, jež je jednou z technik post-zpracování měřených signálů, umožňuje eliminaci pohybových artefaktů. Možnost měření na dvou vlnových délkách, s využitím poměru měřených signálů, byla představena skupinou Montana at el. [37]. Další z možných aplikací poměrové metody představil Kinsley at el. [30]. Pro využití poměrové metody je zapotřebí využití snímacího systému, který umožňuje měřit fluorescenci v jednom či více bodech a alespoň na dvou různých vlnových délkách. V případě, že odezva barviva na akční napětí není definovaná jen pohybem spektra, nýbrž také změnou jeho amplitudy, je využití této metody omezené [51].

### ***Subtrakční metoda***

Tato relativně nová metoda, popsána v [55], využívá obdobného principu jako poměrová metoda, navíc vhodnými matematickými úpravami měřených signálů umožňuje řešit problém poklesu obálky signálu.

### ***Metody lícování obrazu***

Dalším z možných postupů, které umožňují zvýšení odstupu signál-šum a potlačení pohybových artefaktů, je využití technik lícování obrazů. Využití těchto technik pro eliminaci pohybových artefaktů v aplikacích optického mapování není příliš rozšířeno. Mezi publikované metody aplikované na techniky optického mapování lze zařadit [25, 44, 45]. V [25] autoři využili registračních technik

k lícování obrazů získaných fluorescenční mikroskopii na tkáních myokardu. Metoda aplikovaná při optickém mapování na úrovni orgánů je popsána v [44]. Tato metoda registrace, využívající kritéria vzájemné informace, však nebyla primárně určena pro techniky optického mapování [43]. Sami autoři navrhnou diskusi o využití kritéria vzájemné informace pro tuto modalitu [45]. Prezentovaná korekce pohybových artefaktů u výše uvedených přístupů znázorňuje jeho eliminaci pouze u signálů, kde je jeho vliv minimální. Úroveň pohybových artefaktů, korigovaných touto metodou, je v porovnání s artefakty, s nimiž se setkáváme při našich studiích, marginální [53].

## **2.3 OPTICKÉ MAPOVÁNÍ AKČNÍHO NAPĚTÍ NA ÚROVNI ORGÁNU**

### **2.3.1 Fyziologická část experimentů**

Pro většinu zde popsaných měřicích systémů je fyziologická část experimentů obdobná. Liší se hlavně ve způsobu aplikace barviva a jeho koncentrací, perfúzním tlaku, teplotě v různých fázích experimentů a druhu měřeného orgánu. Více podrobnosti lze nalézt v příslušných referencích.

### **2.3.2 Metody měření AN**

#### ***Jednobodové měření AN***

Jednobodové snímání je jednou z prvních metod aplikovaných při měření akčních napětí optickou cestou. Měření probíhá na povrchu epikardu pomocí optické sondy, která zajišťuje excitaci barviva, snímání fluorescence, nebo obojí a umožňuje tak snímání akčního napětí v jediném bodě na povrchu myokardu, definovaném polohou sondy.

V současnosti je na Ústavu biomedicínského inženýrství (VUT Brno, Brno, Česká Republika) k dispozici měřicí systém [41], který umožňuje kontinuální měření optických záznamů akčních potenciálů v jednom bodě.

#### ***Měření AN ve 2D***

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

Měřicí experiment se příliš neodlišuje od předcházejících způsobů. Nejvýznamnější změnou je nahrazení jednoduchého fotodetektoru polem fotodetektorů (PDA) [27, 47] nebo kamerou s technologií CCD [40, 49], EMCCD [53] nebo CMOS [17, 47]. Zvláštním případem je použití řádkové kamery zejména pro její rychlost [23], ovšem jen v aplikacích, kde nevyžadujeme plošné pokrytí měřené scény. Samozřejmostí je využití vhodné optiky a světelných zdrojů, které umožní homogenní osvětlení akviziční scény.

#### ***Panoramatické měření***

Pro zkoumání elektrické aktivity na povrchu celého myokardu byly představeny techniky [18, 42], jež umožňují panoramatické měření.

Měření ve 3D je obdobné plošnému měření představenému v předchozí kapitole. K realizaci systému panoramatickému je potřeba tří snímacích kamer, nebo PDA rozložených ve 120° rozestupech okolo měřeného preparátu. Před samotným měřením je měřený vzorek naskenován digitálním fotoaparátem tak, aby byla možná 3D rekonstrukce jeho povrchu. Proces zpracování signálů obsahuje algoritmy, které umožňují mapování měřených signálů na rekonstruovaný povrch měřeného vzorku a jeho zobrazení.

### ***Intramulární měření***

Hooks et al. [21] představili metodu pro intramurální měření srdeční aktivity. Tento nový přístup umožňuje měření aktivity srdce nikoliv jen na povrchu epikardu, ale také uvnitř jeho stěny.

Pro měření je využívána speciálně navržena sonda (optroda), která se skládá ze sedmi nezávislých vláken. Každé z nich slouží pro zavedení excitačního světla a zároveň také pro snímání světla fluorescenčního. Optroda je umístěna v mikropipetě ( $d=400\ \mu\text{m}$ ), vlákna jsou ukončena v 1mm intervalech se sklonem 60°. Tato optroda je pak využívána pro měření uvnitř srdeční stěny.

### ***Další přístupy v optickém mapování***

Technika optického mapování umožňuje monitorovat i další parametry buněk. Jedním z nejčastěji měřených parametrů je koncentrace intracelulárního vápníku. Měřicí systém pro taková měření je obdobný tomu, který je používán pro měření akčních napětí. Je však využito jiného barviva (Rhod-2), reagujícího změnou fluorescence právě na změnu koncentrace intracelulárního vápníku [22, 47].

Měření signálů společně s využitím stimulačních elektrod je komplikované, protože ty většinou stíní v optické cestě mezi zdrojem fluorescence a snímačem. Skupina Liao et al. [32] díky použití světla propustných elektrod (materiál: indium cínový kysličník) použila optického mapování k měření AN pod povrchem a na okraji stimulačních elektrod.

Další z možných měření je provádění optického mapování na povrchu endokardu s pomocí zavedené endoskopické sondy. To umožňuje monitorovat elektrickou aktivitu nejen na povrchu, ale i uvnitř myokardu. Zorné pole takového systému je však omezenou použitou sondou [26].

## **3 DESIGN REALIZOVANÉHO MĚŘICÍHO SYSTÉMU**

### **3.1 DEFINICE POŽADAVKŮ**

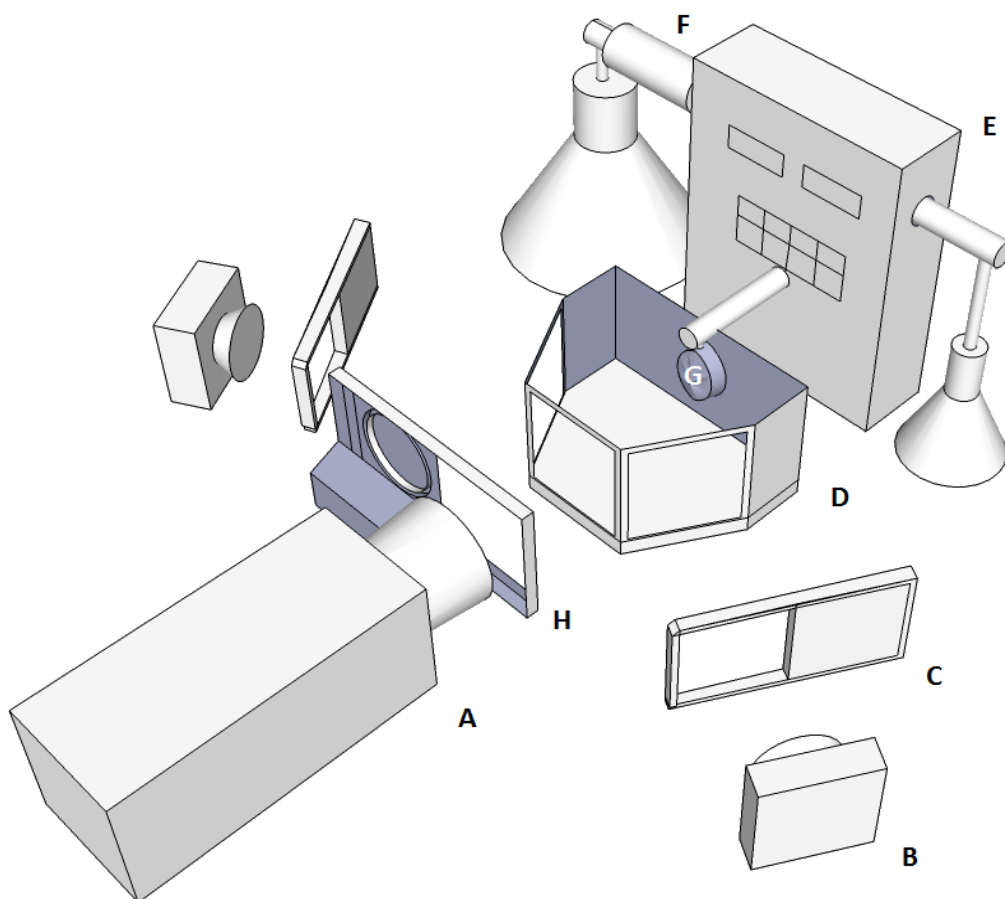
V relaci s cíli disertační práce byl navržen a realizován zcela nový měřicí systém, který přináší nové možnosti a techniky pro měření akčních napětí a jejich pozdější zpracování. Tento systém byl realizován na pracovišti Auckland Bioengineering institute, The University of Auckland, New Zealand. Návrh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

Klíčové požadavky byly stanoveny následovně:

- Realizace systému pro 2D optické mapování akčních napětí na malých orgánech (myš, krysa, králík)
- Zajištění vitálních funkcí měřených vzorků, kontrola teploty, perfúzního tlaku a fáze barvení
- Možnost měření bez použití farmakologických disociátorů
- Možnost aplikace poměrové techniky na plošné měření
- Měření optických signálů souběžně s elektrickými pomocí pole elektrod
- Umožnění vícebodové stimulace
- Možnost měření na endokardu

### 3.2 KONCEPCE MĚŘICÍHO SYSTÉMU

Koncepce měřicího systému vychází z návrhu systému pro optická měření, tak jak je uveden na blokovém schématu (Obr.č.1). Systém byl realizován s využitím rychlé EMCCD kamery. Analýza excitačních i emisních spekter umožnila návrh filtrů. Jako zdroje osvětlení byly použité vysoce svítivé LED,



**Obr. č.2:** Schematický diagram měřicího systému, **A:**EMCCD kamera, **B:**LED, **C:**mechanická uzávěrka, **D:**měřicí komůrka, **E:**perfúzní pumpa, **F:**tepelný výměník, **G:**Měřený vzorek, **H:**systém výměny filtrů

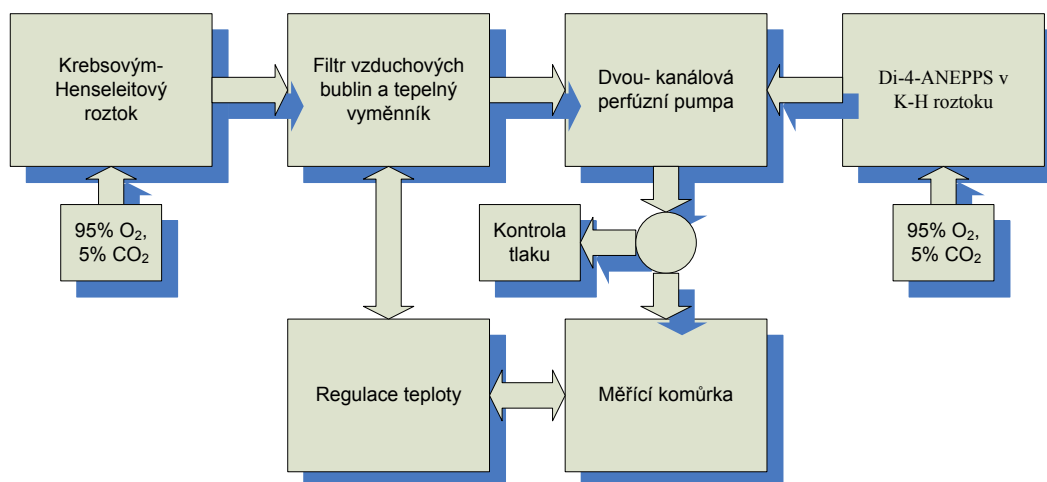
každá z LED je vybavená mechanickou závěrkou. Systém je orientován do horizontální polohy na antivibračním stole, přičemž srdce je uchyceno za perfúzní kanylu. K perfúzi a aplikaci fluorescenčního barviva popřípadě dalších farmak je využívána dvouokruhová mikro-pumpa. Systém umožňuje snímání pomocí pole elektrod, které je umístěno v měřicí komůrce, která zajišťuje kontrolu teploty měřeného vzorku společně s tepelným výměníkem zařazeným v perfúzním oběhu. Kamera je přes datové rozhraní připojené k měřicímu PC. Měření elektrických signálů a stimulaci zajišťuje samostatný stimulační a akviziční systém UnEmap [56]. Systém je doplněn o zařízení pro rychlou výměnu měřicích filtrů. Konfiguraci realizovaného systému ukazuje obrázek č. 2.

### 3.3 ZAJIŠTĚNÍ VITÁLNÍCH FUNKCÍ VZORKU

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

- Perfúzní pumpa
- Měřicí komůrka
- Teplotní výměníky, regulace teploty
- Okysličovací zařízení, filtr vzduchových bublin, laboratorní sklo

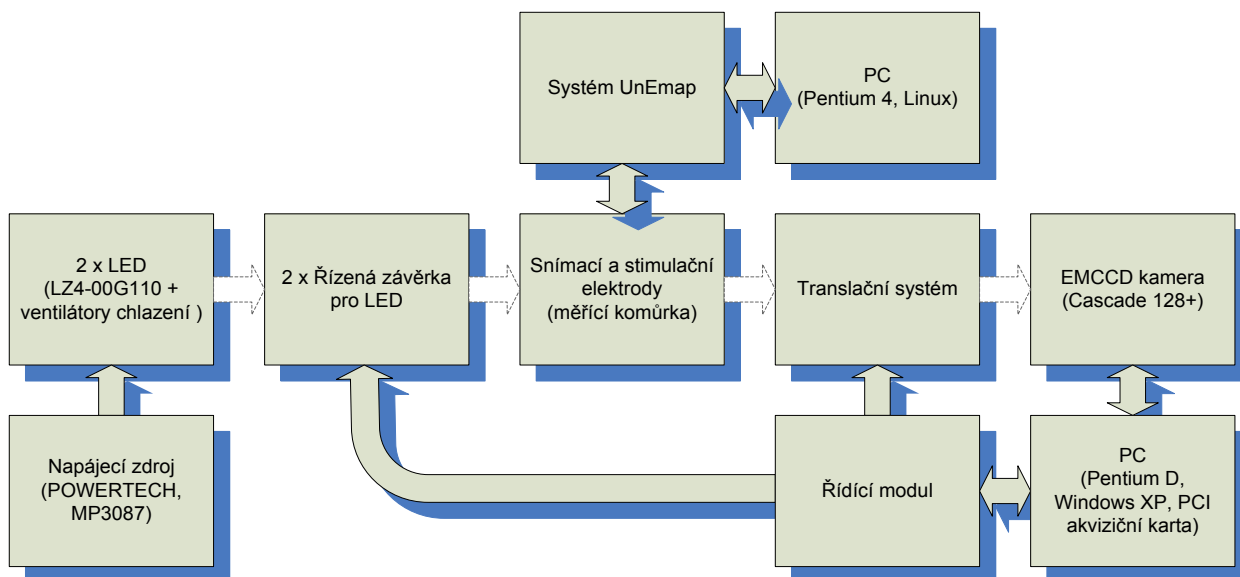
Blokový diagram navrženého perfúzního systému je znázorněn na obrázku č. 3. Perfúze je řízena s využitím dvoukanalové mikro-pumpy, kdy je jeden z kanálů využíván pro režim normální perfúze a druhý k aplikaci fluorescenčního barviva. V okruhu pro normální perfúzi je zařazen tepelný výměník k zajištění předeřtí perfuzátu a filtr pro zachycení vzduchových bublin. Nádoby s perfúzním roztokem a roztokem s fluorescenčním barvivem jsou vybaveny přívodem pro plynnou směs (95% O<sub>2</sub> , 5% CO<sub>2</sub>), zajišťující jejich okysličení. Na výstupu pumpy jsou oba kanály propojeny a je zde také ventil, umožňující kontrolu tlaku v perfúzním oběhu. Měřicí komůrka obsahuje tepelný výměník, který společně s instalovanými senzory a termostatem zajišťuje nastavení požadované teploty měřeného vzorku.



Obr. č.3: Blokový diagram perfúzního systému

### 3.4 PRVKY PRO SNÍMÁNÍ A EXCITACI

Nastavení snímacího a excitačního systému společně s kontrolou jeho parametrů představuje druhou část navrhovaného řešení. Je potřeba zvolit vhodné světelné zdroje, kameru a filtry tak, aby bylo umožněno měřit signály v nejvyšší možné kvalitě. Propojení prvků systému ukazuje blokový diagram na obrázku č.4.



**Obr. č.4:** Blokové schéma elektrického propojení akvizičního systému, bílé šipky naznačují optickou cestu

Na základě porovnání parametrů světelných zdrojů a provedených měření byly jako excitační zdroj zvoleny LED LedEngin, Inc (LZ4-00G110) [31]. Klíčovým prvkem celého snímacího systému je EMCCD kamera Cascade 128+, Photometrics. Parametry kamery a podrobný popis její funkce lze nalézt v [7]. Součástí navrženého systému pro optické mapování je i systém elektrod umožňující elektrické mapování i stimulaci. Navržený systém využívá zařízení pro elektrické mapování UnEmap [56]. Tento systém byl doplněn o pole elektrod 20x20, v mřížovém uspořádání rovnoměrně rozloženém na ploše 15x15mm. Elektrody jsou fixovány v silikonovém válci (realizace od Sally Rutherford, Auckland Bioengineering Institute). Návrh měřících a excitačních filtrů vychází z analýzy měřeného spektra [29, 30].

## 4 ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA MĚŘENÝCH SIGNÁLŮ

Optické mapování poskytuje signály, které reprezentují změnu membránového napětí. Tyto signály mají své specifické parametry dané použitím příslušného akvizičního systému. Vzhledem k tomu, že pracujeme s fluorescenčními signály malých intenzit, je důležité zajištění dostatečného SNR tak, aby bylo možno se signály dále pracovat. K tomu slouží zpravidla techniky předzpracování signálů. Kromě přídatného šumu se v signálech vyskytují pohybové i jiné artefakty, které je nutné, pro dosažení relevantních výsledků, odfiltrovat. Použití ratiometrických technik je jednou z možností, součástí této

kapitoly je popis zcela nové metody navržené pro poměrová měření. Tato práce se také zabývá samotným popisem a definicí pohybových artefaktů a na základě tohoto rozboru navrhuje vysoce účinnou techniku pro jejich eliminaci, využívající elastickou registraci obrazů.

## 4.1 PŘEDZPRACOVÁNÍ SIGNÁLŮ

### 4.1.1 Kvalita měřených signálů

Kvalita měřených signálů se liší, jak pro jednotlivé měřicí systémy, tak pro různá jejich nastavení, nebo průběh měřicího experimentu. Klíčovým parametrem k popisu kvality signálů je poměr signál/šum (SNR). Dalším z parametrů popisující kvalitu signálů je přítomnost nebo nepřítomnost nežádoucích artefaktů. Zpravidla se jedná o artefakty vzniklé v důsledku pohybu (kontrakce) měřeného vzorku. Dalšími vlivy mohou být otřesy, kvalita optiky a uniformita osvětlení měřené scény, případně jejich změny. K definici úspěšnosti metod pro eliminaci pohybového artefaktu bylo navrženo měřítko obdobné poměru signál/šum. Toto měřítko označme poměr signál / artefakt (SAR).

#### *Časové průměrování*

Jedním ze základních přístupů pro eliminaci šumu a zlepšení SNR je využití kumulačních technik. Využívá se zpravidla kumulace s rovnoměrnými vahami, jak popisuje následující vztah (1).

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

Délka okna  $M$  určuje počet průměrovaných repetitiv AN o délce  $N$ . V praxi je nutno vyřešit problém mezi zachováním dobrého časového rozlišení a zároveň získání přijatelného SNR. Délka okna se volí v závislosti na kvalitě měřeného signálu. Běžné nastavení se pohybuje v rozsahu  $M=2$  až 25 [9, 53]. Pro potřeby kumulace je potřeba rozdělit měřicí signál na jednotlivé periody. Vzhledem k tomu, že kvalita měřených signálů AN neumožňovala provést jejich rozdělení podle náběžné hrany AN, byl navržen postup, který využívá současně měřených signálů EKG. Tento postup byl popsán v [52].

#### *Plošné průměrování*

Další požitou technikou předzpracování signálů pro zvýšení SNR je prostorové průměrování. Tuto techniku je možné využít u systémů, které využívají plošné, případně panoramatické měření. Na úkor prostorového rozlišení jsme pak schopni zlepšit kvalitu signálů.

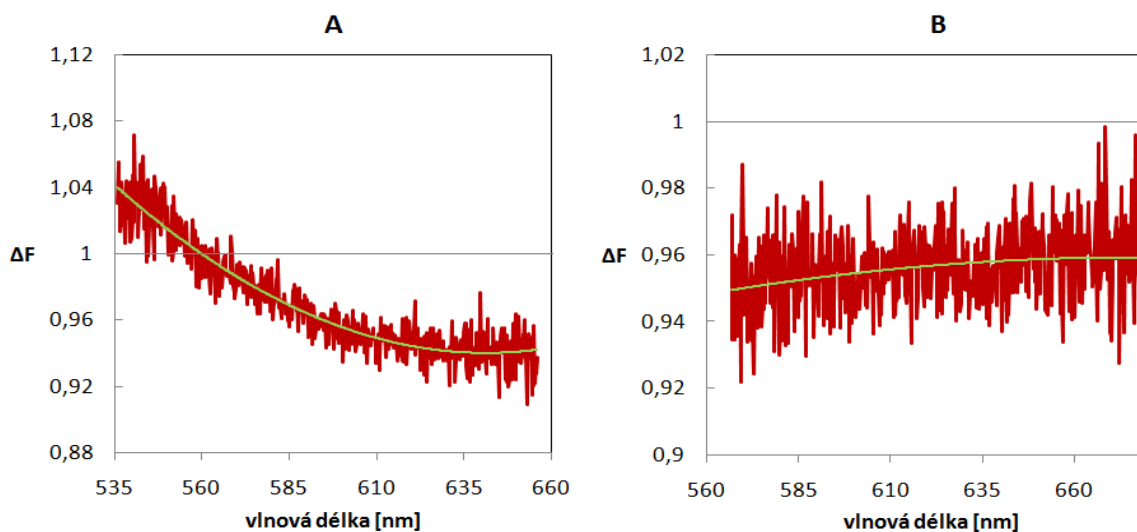
#### *Filtrace*

K potlačení vysokofrekvenčního šumu lze využít vhodně nastaveného filtru typu dolní propust. Frekvenční obsah záznamu AN neobsahuje zpravidla kmitočty vyšší než 100 Hz [35], použitím dolní propusti (FIR) s mezním kmitočtem  $f_m=100$  Hz lze tedy potlačit vysokofrekvenční složky bez ovlivnění kvality

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

## 4.2 CHARAKTERISTIKA ODEZVY BARVIVA NA AN

Před realizací a návrhem filtrů měřicího systému byla provedena analýza odezvy použitého barviva Di-4-ANEPPS, při použití zvolených excitačních zdrojů. Měření probíhalo s využitím systému pro spektroskopická snímání [9]. Jako excitační zdroj byl testován diodově buzený pevno-látkový laser (DPSS na 473 nm a 532 nm). Pro oba laserové zdroje byl testován vliv depolarizace o 90 mV na charakter změny emisního spektra. Spektra byla průměrována pro  $(n=6)$  period AN. Jak ukazuje obrázek č.5, při excitaci na vlnové délce 473 nm představovala změna fluorescence, v reakci na depolarizaci, posun jejího emisního spektra směrem ke kratším vlnovým délkám. Toto odpovídá pozitivní modulaci na kratších vlnových délkách a negativní na vlnových délkách delších. Pro excitaci na vlnové délce 532 nm se však charakter změny spektra, v reakci na depolarizaci, omezil pouze na modulaci jeho amplitudy. Poznamenejme, že v tomto případě nebudou poměrové metody schopny rekonstruovat měřený signál AN.



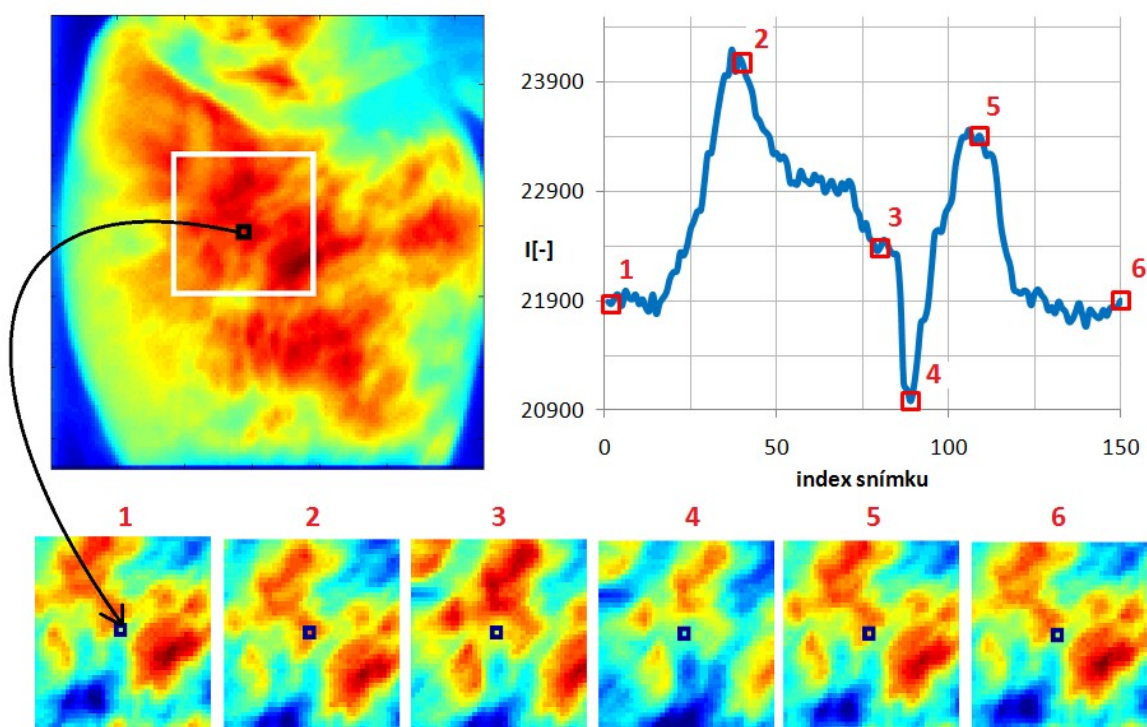
**Obr. č.5:** Změna emisního spektra jako odpověď barviva na depolarizaci o 90 mV při excitaci laserem na **A:** 473 nm, **B:** 532 nm

## 4.3 NAVRŽENÁ POMĚROVÁ METODA

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

- Nutnost využití pásmových filtrů
- Použití dvou snímacích prvků (kamer)
- Zajištění shodné geometrie obou snímacích prvků

V této práci je prezentováno řešení, které tyto aspekty s určitými limitami překonává, jeho popis byl publikován v [51]. Navržená metoda využívá pouze filtrů typu dolní propust, striktně nepožaduje dvou snímacích prvků (pro plošná měření) a vzhledem k stejné optické geometrii systému nevyžaduje další korekční nastavení. Použití je možné jak u systémů jednobodových tak plošných. Pro měření se využívají dva kanály (signálový a referenční), signálový slouží k zaznamenání změny fluorescence v souvislosti se změnou AN a je měřen s využitím filtrů pro běžná jednokanálová měření. Referenčním signálem označme signál, který reprezentuje pouze modulaci způsobenou pohybovým artefaktem a změnou fluorescence. Je tedy potřeba potlačit změny vytažené k posunu spektra v relaci se změnou AN. Toto lze docílit použitím emisního filtru, který zachycuje celé emisní spektrum s přesahem pokrývajícím jeho posun, pak tento posun nemá vliv na modulaci měřeného signálu. Výsledný signál AN napětí je získáván jako poměr signálového a referenčního kanálu.



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

#### 4.4 POPIS VZNIKU POHYBOVÝCH ARTEFAKTŮ

Za předpokladu, že pohybový artefakt převážně souvisí s relativním pohybem měřeného vzorku vůči detektoru a jeho neuniformním obarvením, je možné fixaci tohoto pohybu tento artefakt eliminovat.

Zaměříme-li se na nerovnoměrný charakter rozložení intenzit snímané fluorescence na povrchu myokardu, lze přepokládat, že vlivem pohybu (kontrakce) vzorku dojde ke změně snímané scény a tím i intenzity pozadí u

každého snímacího pixelu detektoru. Je-li tato změna dostatečně velká (vysoký gradient intenzity na měřeném povrchu), projeví se modulací měřeného signálu.

Spojitosť mezi změnou relativní pozice snímací scény vs. detektor, dokumentuje obrázek č.6. Pro vizualizaci vzniku pohybových artefaktů byla vybrána oblast na povrchu epikardu (bílý čtverec), kde byl v okně o velikosti 2x2 pixelů (černý čtverec), měřený signál AN. Změna rozložení intenzit v měřené oblasti (respektive její translační pohyb) dokumentuje série snímků s indexy 1-6. Z obrázku je patrné, že dostává-li se do měřeného okna plocha s vyšší intenzitou (snímek č. 2 a 5), dochází k pozitivní modulaci měřeného signálu. Pokles intenzity signálu je patrný v oblastech, kde je intenzita nízká (snímek č. 1, 3 a 6). Pokles signálů (pozice 4) je způsoben depolarizací AN (negativní modulace). Změny, které pozorujeme na zmíněném signálu, jsou interpretovány jako pohybový artefakt.

## 4.5 REGISTRACE OBRAZU

Účelem registrační techniky je zarovnat jednotlivé snímky optického záznamu AN tak, aby v každém snímku měřené sekvence byly body měřené scény v odpovídajících si pozicích. Zajištěním neměnné pozice měřené scény a snímacího prvku lze eliminovat pohyby artefaktů.

Předpokládáme, že máme k dispozici sérii N snímků v rozlišení daném zvolenou snímací metodou. Snímky zachycují část epikardu, ve které se provádí optické měření. Počet snímků je dán snímkovou frekvencí kamery  $f$  a délkou záznamů  $t$ . Rozlišení pak určuje typ kamery a zvolený snímací mód (např. binning). Snímky tvoří množinu  $\{I_1(\mathbf{x}), I_2(\mathbf{x}), \dots, I_N(\mathbf{x})\}$ , kde  $\mathbf{x} = \{x, y\}$ . Dalším krokem je zvolení jednoho z těchto obrazů jako referenčního  $T(\mathbf{x})$ . Poté je potřeba zarovnat každý ze snímků  $I_k$  pro  $k = \langle 1, N \rangle$  k referenčnímu snímku  $T(\mathbf{x})$ , pomocí vhodného lícovacího algoritmu. Optimalizační problém lze zpravidla popsat vztahem (2).

$$\arg \max_{f_k} Q(I_k(f_k(\bar{x})), T(\bar{x})) \quad (2)$$

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

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

### 4.5.1 Trasování pohybu

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

Referenční i registrovaný snímek jsou rozděleny na  $M \times M$  bloků o velikosti  $N \times N$ , jak ukazuje obrázek č.7. Indexy  $(m, n)$  budeme označovat pozice bloků. Pro každý z bloků je použitý nezávislý registrační proces definovaný vztahem (2). Jako kritérium podobnosti je zvolen korelační koeficient [24], jeho zápis ve 2D uvádí (3).

$$KK = \frac{\sum_i \sum_j (A_{i,j} - \bar{A})(B_{i,j} - \bar{B})}{\sqrt{\sum_i \sum_j (A_{i,j} - \bar{A})^2 \sum_i \sum_j (B_{i,j} - \bar{B})^2}} \quad (3)$$

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

Matice A a B představují bloky referenčního a registrovaného snímku o velikosti  $N \times N$ . Vzhledem k tomu, že transformace pro zarovnání bloků obsahuje pouze translaci v ose x ( $t_x$ ) a y ( $t_y$ ), funkce  $f_k(\bar{x})$  ve vztahu (2) má následující tvar (4).

$$f_k(\bar{x}) = \bar{t}_k \quad (4)$$

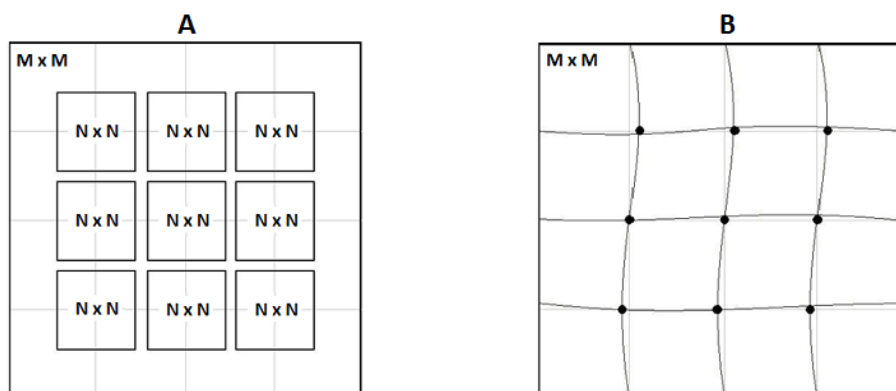
$$\text{kde } \bar{t}_k = \{t_{x,m,n}, t_{y,m,n}\}$$

Pohyb mezi jednotlivými bloky je trasován, vždy mezi sousedními snímky s tím, že pro nejvyšší hodnoty korelace je pro každý z bloků zaznamenán pohybový vektor  $\bar{t}_k$ .

Optimalizační algoritmus je nastaven tak, aby vyhledával bloky jen v omezeném okolí poslední známé pozice bloku.

#### 4.5.2 Elastická registrace optických signálů AN

Na základě trasování máme k dispozici pro každý z bloků informaci o jeho pohybu. Tuto informaci lze interpretovat jako posun referenčního bodu v jeho těžišti (geometrickém středu). Vztah mezi registrovanými bloky a jim odpovídajícími referenčními body je patrný z obrázku č.7.



**Obr. č.7:** Rozdělení snímku na bloky a elastická registrace, **A:** snímek rozdělen na  $M \times M$  bloků o velikosti  $N \times N$ , **B:** těžiště trasovaných bloků tvoří základ elastické registrace

Takto definované referenční body tvoří síť, jejíž interpolaci lze získat masku pro rekonstrukci registrovaného obrazu. Vzhledem k tomu, že využíváme rovnoměrně rozložené síť referenčních bodů, byla k interpolaci využita bilineární transformace.

### 4.5.3 Verifikace registrace

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

#### *Přístupy pro vizuální zhodnocení kvality registrace*

Na měřených sekvencích lze vizuálně ověřit, zda došlo k potlačení pohybu, nedošlo ke vzniku nežádoucích artefaktů, nebo jinému zkreslení. Vizuálně můžeme porovnat šíření depolarizace na originálních a registrovaných sekvencích, nebo porovnání tvaru signálu AN v jednotlivých kanálech před a po registraci. Vizuálně lze rozhodnout, zda získané signály (hlavně co se týče tvaru) odpovídají teoretickým předpokladům. Pokročilou metodou vizuálního porovnání signálu a detekce jeho pohybu může zahrnovat přístup, který realizuje průměrné snímky, snímek z měřené a registrované sekvence a umožňuje jejich porovnání se snímkem referenčním (první snímek dané sekvence). V případě, že se scéna nepohybuje (úspěšná registrace), měl by být průměrovaný snímek totožný s referenčním.

#### *Automatická kontrola kvality registrace*

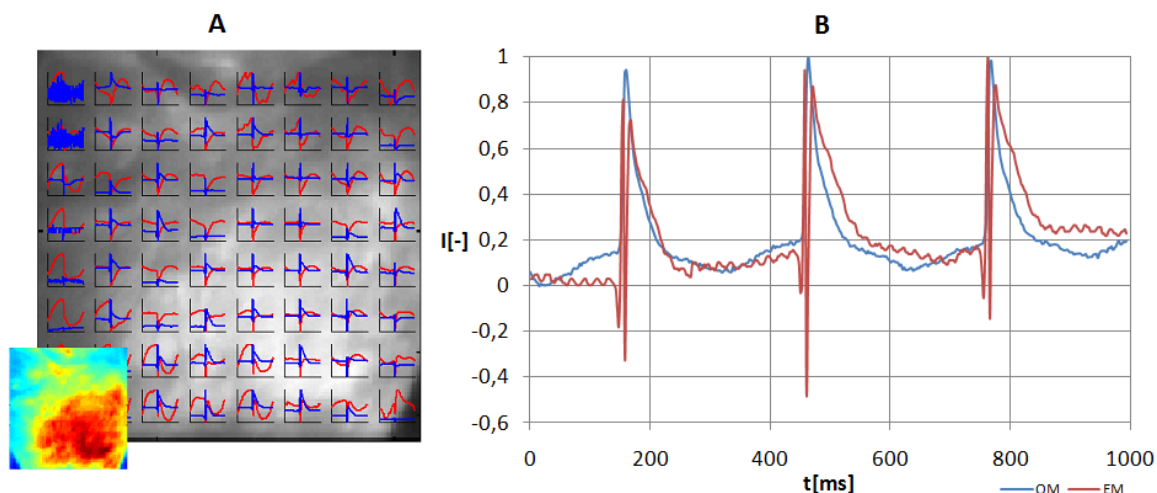
Pro kontrolu kvality registrace byla navržena zcela nová metoda, která umožňuje testování registračního algoritmu přímo na registrovaném záznamu AN. Princip je následující. Měřenou sekvenci registrujeme navrženým algoritmem s tím, že v paměti uchováme charakteristiky trasovaného pohybu pro každý z bloků.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

Označíme-li originální interpolovanou sekvenci o  $N$  snímcích  $A_i(x, y)$  a vektor přidaného pohybu o délce  $D$ , ve vodorovné ose  $\bar{v}_x$  a ve svislé ose  $\bar{v}_y$ , lze pro upravenou sekvenci psát (5).



## 5.1.2 Simultánní měření

Návrh realizovaného systému umožňuje kombinaci elektrického a optického mapování. Měření pomocí pole elektrod je realizované na protější straně opticky snímané části měřeného vzorku. To umožňuje do určité míry sledovat průběh depolarizace v omezeném panoramatickém režimu (nejsou zobrazeny boční strany vzorku).



**Obr. č.8:** Signály elektrického a optického mapování, **A:** signály na povrchu epikardu, **B:** porovnání elektrického signálu a optického signálu AN

Optické mapování poskytuje signály s vyšším prostorovým rozlišením, přičemž signály elektrické dosahují většího časového rozlišení (až 5 kHz). Pro společné zobrazení byly elektrické signály převzorkovány. Signály elektrického a optického mapování z experimentálního měření (RAT27, záznam č.8) ukazuje obrázek č.8. Rozložení signálů na ploše epikardu ukazuje (8A).

## 5.2 METODY ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLŮ

### 5.2.1 Referenční metoda

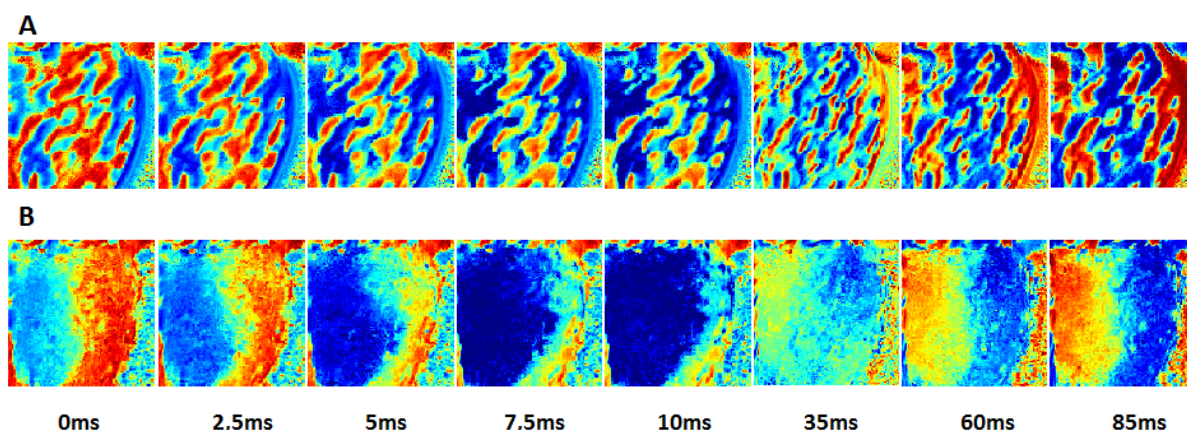
Hlavní výhodou ratiometrických metod je jejich schopnost potlačit pohybový artefakt. Nově představená referenční metoda (kapitola 4.3) byla z tohoto pohledu testována. Měření bylo provedeno pro dva laserové excitační zdroje na 473 nm a 532 nm. Pro excitaci na 473 nm, nová metoda v porovnání s klasickou ratiometrickou metodou, umožňuje výrazné potlačení pohybových a jiných artefaktů a rekonstrukci měřeného AN. Pro měření s excitačním zdrojem na 532nm nebyla ani jedna z metod schopná potlačení pohybových artefaktů, což souvisí s rozdílnou odezvou barviva v závislosti na excitaci.

Referenční metoda ve 2D je schopná výrazně potlačit pohybový artefakt a do určité míry rekonstruovat signál AN. Kvalita signálů rekonstruovaných signálů, vyjádřena poměrem SNR, je však velice nízká ( $SNR \approx 2$ ). Výsledky byly podrobně popsány v [51].

## 5.2.2 Registrace obrazu

Navržený registrační algoritmus, představený v kapitole 4.5, umožňuje účinné potlačení pohybových artefaktů v záznamech AN. Pro demonstraci jeho funkce byly porovnány signály ze čtyř lokalit A, B, C a D u registrované i neregistrované sekvence (rozmístěny ve vertikální a horizontální vzdálenosti 20 pixelů od středu snímku). Porovnávána byla také série snímků zachycující depolarizaci a repolarizaci. Pro kontrolu kvality registrace signálů představených v této kapitole, byly využity vizuální i automatické přístupy představené v kapitole 4.5.3.

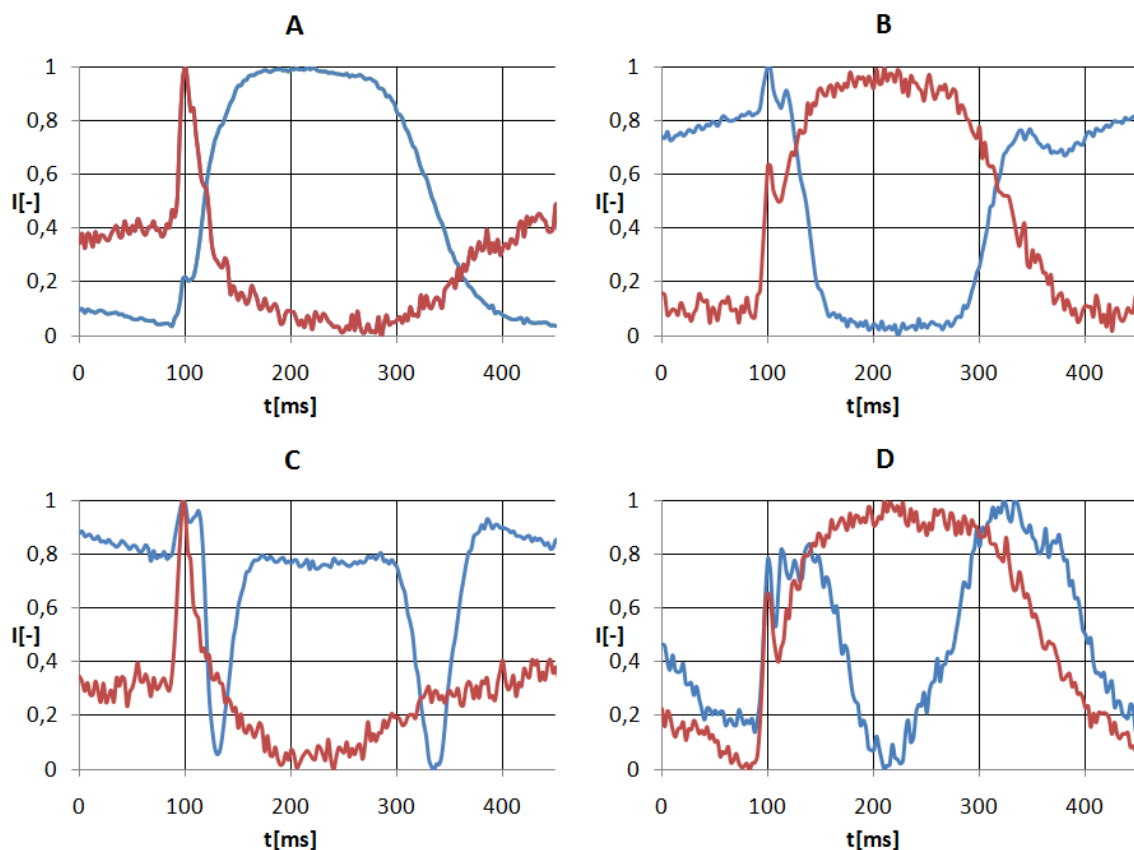
V následující části budou popsány výsledky implementace navrženého registračního algoritmu na záznamu č.1 z experimentu RAT19. Záznam depolarizace myokardu z experimentu ukazuje obrázek č.9. V neregistrované sekvenci (9A) jsou patrné artefakty, které neumožňují korektně reprodukovat depolarizaci epikardu. V registrované sekvenci (9B) je většina těchto artefaktů potlačena. Registrovaná sekvence ovšem také obsahuje artefakty, které nemají rozptýlený charakter jako v (9A), ale představují větší plochy s různou intenzitou. Jejich vznik nesouvisí s relativním pohybem měřené scény vs. kamera, ale vzniká v reakci na relativní polohu myokardu a osvětlovacích LED. Měřená plocha je osvětlována z jiného úhlu, což má za následek vznik takového artefaktu.



**Obr. č.9:** Šíření depolarizace, **A:** Originální sekvence, **B:** Registrovaná sekvence

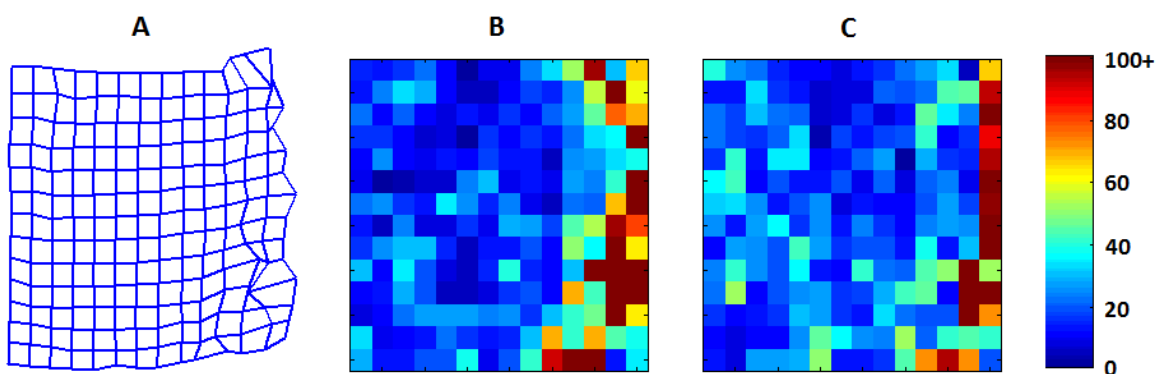
V záznamu AN na obrázku č.10, lze pozorovat přítomnost pohybových artefaktů o relativně vysoké amplitudě. Rekonstruované signály v lokalitě A a C ukazují jejich účinné potlačení. V záznamech v lokalitě B a D je zřetelný vliv změny nasvětlení vzorku a s tím související vznik nežádoucího artefaktu, který se registraci nepodařilo odstranit. Kvalitu potlačení pohybových artefaktů definujeme poměrem SAR ( $SAR_{O}$ , pro originální a  $SAR_{R}$ , pro registrovanou sekvenci). Pro signály, kde SAR je vyšší než 1.5, byla stanovena také kvalita signálu hodnotou SNR.

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



**Obr. č.10:** Signál AN v originální (modrá) a reg. sekvenci (červená) v pozicích **A, B, C a D**

Chybové matice, tak jak je vyhodnotil algoritmus pro automatickou verifikaci, společně s mřížkou referenčních bodů, ukazuje obrázek č.11. Z obrázku je patrné, že automatická detekce korektnosti registrace umožňovala lokalizaci problémových míst. Tato místa lze také vizuálně pozorovat na deformované mřížce referenčních bodů (11A). Příčina nekorektního trasování v těchto bodech je zřejmá z obrázku referenčního snímku (12B), který ukazuje, že

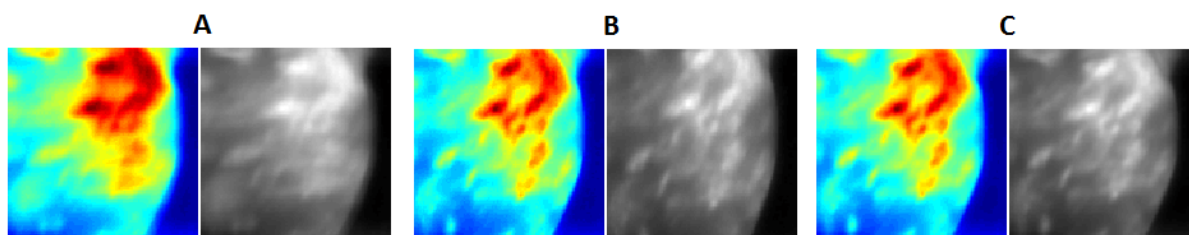


**Obr. č.11:** Verifikace registrace, **A:** mřížka referenčních bodů, **B:** chybová matice pro vertikální pohyb, **C:** chybová matice pro horizontální pohyb

problematické části snímku spadají do oblasti, kde nebyl zobrazován měřený vzorek, ale pouze pozadí měřené scény. Medián kumulované registrační chyby

v horizontálním směru (pouze v oblasti vzorku) byl  $\tilde{x}_h=16$ , ve vertikálním směru pak  $\tilde{x}_v=20$ , pro délku sekvence  $N=200$  snímků. Maximální zaznamenaný pohyb v horizontální ose  $x_{max}=54$  px. (2.1 mm) a ve vertikální ose  $y_{max}=20$  px. (0.8 mm). Rozdíl pohybu v jednotlivých osách je dán zavěšením vzorku za perfúzní kanylu (omezení vertikálního pohybu).

Na obrázku č.12 lze pozorovat zřetelné rozdíly mezi průměrným snímkem originální (12A) a registrované sekvence (12C). Rozdíly mezi průměrným snímkem registrované sekvence a referenčním snímkem jsou téměř zanedbatelné, což ukazuje na kvalitu provedené registrace.



**Obr. č.12:** Verifikace registrace, **A:** průměrný snímek originální sekvence, **B:** referenční snímek, **C:** průměrný snímek registrované sekvence

## 6 ZÁVĚR

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

Součástí dizertace je podrobný návrh měřicího systému, který umožňuje měření akčních napětí optickou cestou s relativně vysokou kvalitou měřených signálů. Inovativní návrh systému přináší vlastnosti, které u takových systémů nejsou běžně k dispozici. Mezi ně patří: simultánní elektrické i optické mapování, měření na povrchu endokardu, nebo možnost využití poměrové metody ve 2D. Signály měřené na navrženém systému byly publikovány v [51, 53, 54] a další publikace jsou připravovány. Návrh systému je zapsán jako funkční vzorek.

Pro předzpracování měřených signálů byly využity přístupy časového, nebo prostorového průměrování. Metoda pro realizaci časového průměru u signálů s velmi malým SNR ( $SNR < 3$ ) spolu s algoritmem pro klasifikaci signálů a detekci pohybových artefaktů byla náplní publikace [52].

Pokročilé metody zpracování signálů zahrnovaly návrh nové referenční metody publikované v [51]. Ačkoli tato metoda poskytuje slibné výsledky u jednobodových systémů, její nasazení pro plošná měření je problematické. Návrh, realizace i omezení této metody souvisí se zjištěním nových charakteristik odezvy barviva Di-4-ANEPPS na depolarizaci, v závislosti na excitačním zdroji. Tyto charakteristiky bylo možné měřit díky spektroskopickému systému, jenž byl publikován v [9].

Další z přínosů disertační práce spočívá v detailní analýze vzniku pohybových artefaktů a ověření teze, že jejich vznik souvisí s relativním pohybem měřené scény a detektoru v kombinaci s nerovnoměrnou distribucí fluorescenčního barviva. Výsledky této práce byly publikovány v [53]. Podrobný popis této problematiky je uveden v kapitole 4.4.

Využití registrace pro eliminaci pohybových artefaktů je ve své konfiguraci inovativní metodou, která definovala způsob a techniku, jak účinně potlačit pohybové artefakty, a omezit nebo vypustit používání současných prostředků pro eliminaci pohybu. Práce na toto téma byla prezentována v [54]. V kapitole 5.2.2 je popsána aplikace této metody na měřených signálech, společně s demonstrací funkce navrženého algoritmu pro automatickou verifikaci registrace.

Práce na této disertaci probíhala na domovské půdě Ústavu Biomedicínského inženýrství, VUT Brno a během téměř dvouročního studijního pobytu na Auckland Bioengineering Institute, Auckland, New Zealand.

## LITERATURA

- [1] BACKX, P.H.; GAO, W.D.; AZAN-BACKX, M.D.; MARBAN, E. Mechanism of force inhibition by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac muscle: roles of  $[Ca^{2+}]_i$  and cross-bridge kinetics. In *Journal of Physiology*, 1994, vol. 476, iss. 3, p. 487-500.
- [2] BAKER, L.C.; LONDON, B.; CHOI, B.R.; et al. Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. In *Circulation Research*, 2000, vol. 86, p. 396-407, ISSN 0009-7330.
- [3] BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; SEKORA, J.; SVRCEK, M. Statistical approach in complex-valued wavelet analysis of voltage-sensitive dye mapping. In *Computers in Cardiology*, 2007, Durham, USA: IEEE, vol. 34, p. 101-104.
- [4] BAXTER, W.T.; MIRONOV, S.F.; ZAITSEV, A.V. et al. Visualizing excitation waves inside cardiac muscle using transillumination. In *Biophysical Journal*, 2001, vol. 80, iss. 1, p. 516-530.
- [5] BOVE, R.T.; DILLON, S.M.; Optically imaging cardiac activation with a laser system. In *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 1998, vol. 17, iss.1, p.84–94, ISSN: 0739-5175.
- [6] CALAGHAN, S.C.; WHITE, E.; BEDUT, S.; LE GUENNEC, J.Y. Cytochalasin D reduces  $Ca^{2+}$  sensitivity and maximum tension via interactions with myofilaments in skinned rat cardiac myocytes. In *Journal of Physiology*, 2000, vol. 529, iss. 2, p.405-411.
- [7] CASCADE 128+, Photometrics, datasheet PM-DS-002-CO, [cit. 17.8.2010] [pdf dokument]. <[http://www.photometrics.com/products/datasheets/128\\_.pdf](http://www.photometrics.com/products/datasheets/128_.pdf)>
- [8] CHEMLA, S.; CHAVANE, F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. In *Journal of Physiology – Paris*, 2010, vol. 104, iss.2, p. 40-50.
- [9] CHEN, A.Y.H; VANHOLSBECK, F.; TAI, D.C.S.; SVRCEK, M.; SMAILL, B.H. Time-resolved all fiber fluorescence spectroscopy system. In *BiOS 2010*, San Francisco, California, USA: SPIE Photonics West, 2010, vol. 7559, p. 755905-755911.
- [10] CHENG, Y.; WAGONER, V.D.R.; MAZGALEV, T.N. et al. Voltage-sensitive dye RH421 increases contractility of cardiac muscle. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1998, vol. 76, iss. 12, p. 1146-1150.
- [11] CLARKE, R.J.; ZOUNI, A.; HOLZWARATH, J.F. Voltage sensitivity of the fluorescent probe RH421 in a model membrane system. In *Biophysical Journal*, 1995, vol. 68, iss. 4, p. 1406-1415.
- [12] DALTON, G.R.; JONESB, J.V.; EVANSB, S.J.; LEVI, A.J. Wall stress-induced arrhythmias in the working rat heart as left ventricular hypertrophy regresses during captopril treatment. In *Cardiovascular Research*, 1997, vol. 33, iss. 3, p. 561-572.
- [13] DILLON, S.M.; KERNER, T.E.; HOFFMAN, J. et al. A system for in-vivo cardiac optical mapping. In *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 1998, vol. 17, iss. 1, p. 95-108.
- [14] EFIMOV, I.R.; BIERMANN, M.; ZIPES, D. Fast fluorescent mapping of electrical activity in the heart: Practical guide to experimental design and applications. In *Cardiac mapping*, second edition, SHENSA, M., BORGGREFE, M., BREITHARDT, G., 2003, Berlin, Germany, chapter.7, p. 131-156. ISBN: 0-87993-404-2.

- [15] EFIMOV, I.R.; HUANG, D.T.; RENDT, J.M.; SALAMA, G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. In *Circulation*, 1994, vol. 90, iss. 3, p. 1469-1480, ISSN 0009-7322.
- [16] EFIMOV, I.R.; NIKOLSKI, P.V.; SALAMA, G. Optical imaging of the heart. In *Circulation Research*, 2004, vol. 95, p. 21-33, ISSN 0009-7330.
- [17] EFIMOV, I.R.; WAGONER V.D.R.; CHENG, Y. et al. High resolution mapping of electrical activity of human atrial preparations using voltage-sensitive dyes and fluorescent imaging techniques. In *Journal of Investigative Medicine*, 1996, vol. 44, iss. 7, p 373A.
- [18] EVERTSON, D.W.; HOLCOMB, M.R.; EAMES, M.C. et al. High-resolution high-speed panoramic cardiac imaging system. In *IEEE Transaction on Bio-medical Engineering*, 2008, vol. 55, iss. 3, p. 1241–1243, ISSN 0018-9294.
- [19] FEDOROV, V.V.; LOZINSKY, I.T.; SOSUNOV, E.A. et al. Application of blebbistatin as an excitation – contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 5, p. 619-626.
- [20] GIROUARD, S.D.; LAURITA, K.R.; ROSENBAUM, D.S. Unique properties of cardiac action potentials recorded with voltage-sensitive dyes. In *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 1996, vol. 7, iss.11, p.1024-1038.
- [21] HOOKS, D.A.; LeGRICE, I.J.; HARVEY, J.D.; SMAILL, B.H. Intramular multisite recording of transmembrane potential in the heart. In *Biophysical Journal*, 2001, iss. 5, vol. 81, p. 2671-2680.
- [22] HWANG, G.S.; HAYASHI, H.; TANG, L. et al. Intracellular calcium and vulnerability to fibrillation and defibrillation in Langendorff-perfused rabbit ventricle. In *Circulation*, 2006, vol. 114, iss. 24, p. 2595-2603, ISSN 0009-7322.
- [23] IRAVANI, S.; CHRISTINI, D.J. Optical mapping system with real-time control capability. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2007, vol. 293, iss. 4, p. H2605-H2611.
- [24] JAN J. Medical image processing reconstruction and restoration: concepts and methods. In *CRC Press*, 2006, p. 730, ISBN 0-8247-5849-8.
- [25] JANICH, M.; SEEMANN, G.; THIELE, J.; DÖSSEL, O. Elastic Registration of Optical Images showing Heart Muscle Contraction. In *4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, IFMBE Proceedings*, 2009, vol. 22, part. 7, p. 676-679, ISSN 1680-0737.
- [26] KALIFA, J.; KLOS, M.; ZLOCHIVER, S. et al. Endoscopic fluorescence mapping of the left atrium: A novel experimental approach for high resolution endocardial mapping in the intact heart. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 7, p. 916-924.
- [27] KANAI, A.; SALAMA, G. Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. In *Circulation Research*, 1995, vol. 77, iss. 4, p. 784-802, ISSN 0009-7330.
- [28] KANLOP, N.; SAKAI, T. Optical mapping study of blebbistatin-induced chaotic electrical activities in isolated rat atrium preparations. In *The Journal of Physiological Sciences*, 2010, vol. 60, iss. 2, p. 109-117, ISSN 1880-6546.
- [29] KAO, W.Y.; DAVIS, C.E.; KIM, Y.I.; BEACH, J.M. Fluorescence Emission Spectral Shift Measurements of Membrane Potential in Single Cells. In *Biophysical journal*, 2001, vol. 81, iss. 2, p. 1163-1170.

- [30] KNISLEY, S.B.; JUSTICE, R.K.; KONG, W.; JOHNSON, PL. Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2000, Vol. 279, iss. 3, p. H1421-H1433.
- [31] LEDENGIN, Inc., High Luminous Efficacy Green LED Emitter, datasheet LZ4-00G1100, rev. 01/13/10 [pdf dokument]. [cit. 17.8.2010]  
<<http://www.ledengin.com/products/10wLZ/LZ4-00G110.pdf>>
- [32] LIAU, J.; DUMAS, J.; JANKS, D. et al. Cardiac optical mapping under a translucent stimulation electrode. In *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, vol. 32, iss. 9, p. 1202-1210, ISSN 0090-6964.
- [33] MATIUKAS, A.; MITREA, B.G.; QIN, M. et al. Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium. In *Heart Rhythm*, 2007, vol. 4, iss. 11, p. 1441-1451.
- [34] MATIUKAS, A.; MITREA, B.G.; PERTSOV, A.M. et al. New near-infrared optical probes of cardiac electrical activity. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2006, vol. 290, iss. 6, p. H2633-H2643.
- [35] MIRONOV, S.F.; VETTER, F.J.; PERTSOV, A.M. Fluorescence imaging of cardiac propagation: spectral properties and filtering of optical action potentials. In *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2006, vol. 291, iss. 1, p. H327-H335.
- [36] MOLECULAR PROBES®, Potential-Sensitive ANEP Dyes, datasheet MP01199, rev. 24.3.2006, [pdf dokument]. [cit. 17.08.2010]  
<<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01199.pdf>>
- [37] MONTANA, V.; FARKAS, D.L.; LOEW, L.M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. In *Biochemistry*, 1989, vol. 28, iss. 11, p. 4536-4539.
- [38] NOVAKOVA, M.; BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I. et al. I. Effects of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS on guinea pig and rabbit myocardium. In *General Physiology and Biophysics*, 2008, vol. 27, iss. 1, p. 45-54.
- [39] NYGREN, A.; CLARK, R.B.; BELKE, D.D. et al. Voltage-sensitive dye mapping of activation and conduction in adult mouse hearts. In *Annals of Biomedical Engineering*, 2000, vol. 28, iss. 8, p. 958-967, ISSN 0090-6964.
- [40] NYGREN, A.; KONDO, C.; CLARK, R.B.; GILES, W.R. Voltage-sensitive dye mapping in the Langendorff-perfused rat heart. In *American journal of physiology, Hearted and circulatory physiology*, 2003, vol. 284, iss.3, p. H892-H902, ISBN 0363-6135.
- [41] PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; BLAHA, M.; CHMELAR, M.; VESELY, Z. Fibre optic sensor for recording of action potentials. In *Intelligent Sensors, Sensor Networks and Information Processing conference*, 2004, iss. 1, Melbourne, Australia: IEEE, 2004, p. 349-354, ISBN 0-7803-8893-3.
- [42] QU, F.; RIPPLINGER, C.M.; NIKOLSKI, V.P.; GRIMM, C.; EFIMOV, I.R. Three-dimensional panoramic imaging of cardiac arrhythmias in rabbit heart. In *Journal of Biomedical Optics*, 2007, vol. 12, iss. 4, p. 044019.
- [43] ROHDE, G.K.; ALDROUBI, A.; DAWANT, B.M. The adaptive bases algorithm for intensity-based nonrigid image registration. In *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, vol. 22, iss.11, p. 1470-1479.

- [44] ROHDE, G.K.; DAWANT, B.M.; LIN, S.F. et al. Correction of motion artifact in cardiac optical mapping using image registration. In *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2005, vol. 52, iss. 2, p. 338-341, ISSN 0018-9294.
- [45] ROHDE, G.K.; DAWANT, B.M.; LIN, S.F. et al. Correction of motion artifact in cardiac optical mapping using Image registration technique. In *IEEE Transactions on Medical Imagin*eg, 2005, vol. 52, iss. 2, p. 338-41, ISSN 0018-9294.
- [46] SALAMA, G.; CHOI, B.R.; AZOUR, G. et al. Properties of New, Long-Wavelength, Voltage-sensitive dyes in the heart. In *Journal of Membrane Biology*, 2005, vol. 208, iss.2, p. 125-140.
- [47] SALAMA, G.; HWANG, S. Simultaneous optical mapping of intracellular free calcium and action potentials from Langendorff perfused hearts. In *Current Protocols in Cytometry*, 2009, Chapter 12, Unit 12.17.
- [48] SALAMA, G.; MORAD, M. Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart. In *Science*, 1976, vol. 191, iss. 4226, p. 485-487.
- [49] SEDMERA, D.; RECKOVA, M.; ROSENGARTEN, C. et al. Optical mapping of electrical activation in the developing heart. In *Microscopy and Microanalysis*, Microscopy society of America, 2005, vol. 11, iss. 3, p. 209-215.
- [50] SUNG, D.; SOMAYAJULA-JAGAI, J.; COSMAN, P. et al. Phase shifting prior to spatial filtering enhances optical recordings of cardiac action potential propagation. In *Annals of Biomedical Engineering*, October 2001, vol. 29, iss. 10 p. 854–861, ISSN 0090-6964.
- [51] SVRCEK, M.; CHEN, A.; RUTHERFORD, S. et al. Suppressing motion artifact in cardiac electrical optical mapping. In *Analysis of biomedical signals and images*, Analysis of Biomedical Signals and Images, Brno, 2010, vol. 20, p. 148-153, ISSN 1211-412X.
- [52] SVRCEK, M.; PROVAZNIK, I.; ARCHALOUS, T. Filtration and detection of action potential in optical recordings. In *Proceedings of the 14 th Conference STUDENT EEICT*, Brno, 2008, vol. 3, p. 72-77. ISBN 978-80-214-3616-9.
- [53] SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNIK, I.; SMAILL, B.H. Characteristics of Motion Artifacts in Cardiac Optical Mapping Studies. In *Proceedings of the IEEE EMBS Conference*. IEEE, Mineapolis, USA, 2009. p.3240-3, ISBN 978-1-4244-3296-7.
- [54] SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNIK, I.; SMAILL, B.H. Using Image Registration to Reconstruct Spatiotemporal Electrical Activity in Cardiac Optical Mapping Studies. In *Computers in Cardiology*, Park City, Utah, USA, 2009, p. 521-524, ISBN 978-1-4244-7281-9.
- [55] TAI, D.C.; CALDWELL, B.J.; LeGRICE, I.J. et al. Correction of motion artifact in transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. In *American Journal of Physiology*, Heart and Circulatory Physiology, 2004, vol. 287, iss. 3, p. H985-H993.
- [56] UnEmap: 448 Channel Mapping, datasheet. [cit. 17.8.2010]  
<[http://www.uniservices.co.nz/LinkClick.aspx?fileticket=6idK\\_IF8ROg%3D&tabid=345](http://www.uniservices.co.nz/LinkClick.aspx?fileticket=6idK_IF8ROg%3D&tabid=345)>

# STRUKTUROVANÝ ŽIVOTOPIS



Ing. Martin Švrček

Vyšní Lhoty 2

73951 Dobrá

Email: [martin.svrcek@phd.feec.vutbr.cz](mailto:martin.svrcek@phd.feec.vutbr.cz)

Tel.: +420 724900653

+64 2102356065

## Osobní údaje:

---

Jméno a Příjmení: **Ing. Martin Švrček**

Datum narození: 6. června 1982

Národnost: česká

Stav: svobodný

## Vzdělání:

---

2008-2010 The University of Auckland, Bioengineering institute, Auckland, New Zealand, zahraniční stáž

2006-2010 VUT Brno Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, doktorský studijní program, obor Biomedicínská elektronika a biokybernetika

2001-2006 VUT Brno Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, magisterské studium, obor elektronika a sdělovací technika, zaměření na biomedicínské inženýrství.

## Jazykové znalosti:

---

**Angličtina** - pokročilá, plynule, slovem i písmem

## Jiné znalosti:

---

Kancelářské aplikace: **Word, Excel, Power Point** – perfektní  
**Access, Visio** - dobrá

Program. jazyky a další SW: **C, C++ Builder**-pokročilá  
**Matlab**-pokročilá, **LabView**-střední  
**Auto CAD, Eagle, PSpice**-střední

Další dovednosti: Návrh elektronických obvodů, elektrotechnická měření, analýza a zpracování signálů

### **Osobnostní charakteristika:**

---

Vlastnosti: Výborné komunikační a prezentační schopnosti, bezúhonnost, spolehlivost, zodpovědnost

Zájmy: Sport, kultura, cestování

### **Pracovní zkušenosti:**

---

2009-2010 **THE UNIVERSITY OF AUCKLAND**  
Bioengineering institute, Auckland, New Zealand

**Pozice:** Research Scientist

**Náplň práce:** Vývoj optického měřicího systému pro měření elektrické aktivity myokardu, návrh hardware a software

2006-2008 **VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**  
Ústav biomedicínského inženýrství, Brno, ČR

**Pozice:** Odborný asistent

**Náplň práce:** Vyučování, vedení bakalářských a diplomových projektů (v oblasti mikrokontrolerů, měření, GSM komunikace a analýzy signál na PC)

### **Vybrané Publikace:**

---

SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNÍK, I.; SMAILL, B. Using Image Registration to Reconstruct Spatiotemporal Electrical Activity in Cardiac Optical Mapping Studies. In Computers in Cardiology 2009. Park City, Utah, USA: Computers in Cardiology, 2009.

SVRCEK, M.; RUTHERFORD, S.; CHEN, A.; PROVAZNÍK, I.; SMAILL, B. Characteristics of Motion Artifacts in Cardiac Optical Mapping Studies. In Proceedings of the IEEE EMBS Conference. IEEE, 2009.

## **ABSTRACT**

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