



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**VLIV NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH LÉČIV NA
ELEKTRICKOU AKTIVITU IZOLOVANÉHO SRDCE
POTKANA**

THE EFFECT OF NEW SYNTHETIZED DRUGS ON ELECTRICAL ACTIVITY OF RAT ISOLATED HEART

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ivona Korčáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Marina Ronzhina, Ph.D.

BRNO 2017



Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**
Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Ivona Korčáková

ID: 155585

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Vliv nově syntetizovaných léčiv na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti používání zvířat k testování nově syntetizovaných léčiv. Zaměřte se na model izolovaného srdce. 2) Zúčastněte se měření v Laboratoři experimentální kardiologie Fyziologického ústavu LF MU, kde se seznámte se snímáním experimentálního EKG a morfologií fyziologických záznamů EKG z izolovaného srdce potkana. 3) V záznamech z experimentů vyhledejte běžné patologie a proveďte jejich klasifikaci – jednotlivé případy konzultujte s externím školitelem. 4) Popište změny EKG způsobené účinkem vybraných léčiv a vyberte parametry (např. srdeční frekvence, délka QRS, PQ, aj.) vhodné k popisu žádoucího účinku léčiva. 5) Proveďte statistickou analýzu vypočtených parametrů a porovnejte výsledky mezi experimentálními skupinami. 6) Diskutujte získané výsledky v kontextu jiných prací v dané oblasti.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ŠTEJFA, Miloš, Josef ŠUMBERA a Pavel BRAVENÝ. Základy elektrokardiografie. Brno: Masarykova univerzita, fakulta lékařská, 1991, 147 s. ISBN 80-210-0265-4.

[2] HANTON, Gilles. Preclinical cardiac safety assessment of drugs. *Drugs R D*. 2007; 8 (4): 213-228. doi: 10.2165/00126839/200708040/00002.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. Marina Ronzhina, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Tibor Stračina

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
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.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá vlivem nově syntetizovaného léčiva na elektrickou aktivitu izolovaného potkanního srdce. Součástí práce je teoretický rozbor pojednávající o užívání laboratorních zvířat v experimentech a o etických aspektech, souvisejících s užíváním laboratorních zvířat. Dále se zde nachází rozbor o testování léčiv, testovaných látkách, elektrokardiografii a metodách používaných pro detekci a rozměření EKG signálu. Ze dvou uvedených metod je realizován automatický algoritmus pro rozměření QT intervalu. QT interval je hlavním ukazatelem kardiotoxicity a je považovaný za zlatý standart při hodnocení vlivu léčiva. V praktické části jsou zpracovány EKG záznamy získané na LF Masarykovy univerzity v Brně. Tyto záznamy jsou rozměřeny manuálně a také automaticky. Manuální rozměření bylo konzultováno s expertem v oblasti kardiografie a statisticky zpracováno. Statistické zpracování sloužilo k porovnání s výsledky automatického rozměření EKG záznamů. Pro automatické rozměření se použil vytvořený algoritmus a výsledky byly porovnány s referenčními body získanými od experta v oblasti kardiografie a s výsledky manuálního rozměření. Tato práce slouží jako pilotní studie pro vývoj a testování nového léčiva.

KLÍČOVÁ SLOVA

Laboratorní potkan, testování léčiv, rozměření EKG záznamů, izolované srdce podle Langendorffa, betablokátory, detekce QT intervalu, Philipsova metoda, P-wave template

ABSTRACT

This thesis deals with the influence of the newly synthesized drug on the electrical activity of the isolated heart of rat. Part of the thesis is a theoretical analysis of the use laboratory animals in experiments and ethical aspects related to the use of laboratory animals. There is also an analysis of drug testing, test substances, electrocardiography and methods used to detect and measure ECG signal. The two algorithms used for the QT interval are automated. The QT interval is the main indicator of cardiotoxicity and is considered to be the gold standard in evaluating the effect of the drug. In the practical part the ECG records obtained at the Faculty of Medicine at Masaryk University in Brno are processed. These records are dimmed manually and automatically. The manual dimming was consulted with a specialist in cardiography and statistically processed. Statistical processing served to compare with the results of the automatic ECG measurement. The algorithm is used to automate the measurement, and the results are compared with the reference points obtained from cardiology experts and manual measurement results. This work serves as a pilot study for the development and testing of a new active substance.

KEYWORDS

Rat, ethical aspects, drug testing, ECG measurement, Langendorf isolated heart, beta-blocker, QT interval, Philips method, P-wave template

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

KORČÁKOVÁ, I. *Vliv nově syntetizovaných léčiv na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 89 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Marina Ronzhina, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Vliv nově syntetizovaných léčiv na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma 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

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Marině Ronzhina, PhD. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při konzultacích, ochotu a za účinnou pedagogickou a odbornou pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych poděkovala panu MUDr. Tiboru Stračinovi, za odbornou konzultaci a velmi užitečné rady při tvorbě této práce. Také děkuji své rodině a partnerovi za neustálou podporu.

V Brně dne

.....

podpis autora

Obsah

Úvod	8
1 POUŽÍVÁNÍ ZVÍŘAT K TESTOVÁNÍ LÉČIV	9
1.1 Etické aspekty	9
1.2 Laboratorní zvířata používaná v experimentech.....	10
1.2.1 Modely využívané v experimentálních výzkumech	11
1.3 Testování léčiv	13
2 Beta-blokátory	16
2.1.1 Účinek a dělení beta-blokátorů	16
2.1.2 Využití beta-blokátorů v kardiologii.....	18
2.1.3 Beta-blokátor carvedilol	18
2.1.4 Nový beta-blokátor TP1.....	19
3 Elektrokardiografie	21
3.1 Stavba srdce, šíření a snímání srdečního vzruchu u člověka	21
3.2 Stavba, šíření a snímání elektrického vzruchu u potkana.....	23
3.2.1 Model izolovaného srdce podle Langendorfa.....	23
3.3 EKG křivka	24
3.3.1 EKG u člověka.....	24
3.3.2 EKG u potkana.....	25
3.4 Poruchy srdečního rytmu	27
4 Příklady studií testování léčiv	31
5 analýza EKG	33
5.1 Předzpracování signálu	33
5.2 Detekce QRS komplexu.....	34
5.3 Metody pro detekci QT intervalu.....	37
5.3.1 Detekce začátku Q, nebo detekce začátku komplexu QRS	37
5.3.2 Detekce konce vlny T	39
5.4 Závislost QT intervalu na frekvenci	41
6 PERIMENTY na izolovaných zvířecích srdcích	42
6.1 Experimenty s aplikací betablokátorů.....	42
6.2 Experimenty s aplikací haloperidolu	43

6.3	Manuální rozměření elektrogramů s aplikací haloperidolu	44
7	Statistická analýza dat	46
7.1.1	Kolmogorovův–Smirnovův	47
7.1.2	Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky	48
7.1.3	Kruskal-Wallisův test pro více než dva nezávislé výběry	48
8	Analýza experimentálních EKG	50
8.1	Manuální zpracování elektrogramů	50
8.1.1	Statistické vyhodnocení manuálního rozměření EKG záznamů.....	51
8.2	Manuální analýza arytmií	59
8.3	Diskuze výsledků manuálního hodnocení experimentálních EKG	61
8.4	Automatická analýza elektrogramů	62
8.4.1	Automatické rozměření EKG záznamů s aplikací beta-blokátorů.....	71
8.4.2	Statistické zpracování automatického rozměření dat s aplikací beta-blokátorů	72
8.4.3	Diskuze výsledků.....	75
9	Závěr	77
10	LITERATURA	78
	Seznam převzatých obrázků	83
	Seznam symbolů, veličin a zkratk	84
	Seznam obrázků	85
	Seznam tabulek	87
	Seznam příloh	88

ÚVOD

Sledování účinku léčiva na elektrickou aktivitu srdce je důležité pro detekci případné kardiotoxicity, která může způsobit závažné kardiovaskulární poškození. Kardiovaskulární onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Právě účinky některých léků mohou zvyšovat vznik arytmií a s tím spojenou náhlou smrt srdeční. Sledování vlivu léků a jejich hodnocení je důležité v prevenci vzniku arytmií. Jeden ze studovaných parametrů při sledování vlivu léčiva je délka QT intervalu. I přes velkou iniciativu výzkumu v oblasti rozměření QT intervalu stále neexistují metody, které lze považovat za dostačující.

Práce se konkrétně zabývá beta-blokátory, které se používají při kardiovaskulárních onemocněních. Kardioprotektivní efekt léku lze na EKG křivce hodnotit pomocí QT intervalu, který je považován za zlatý standart [9].

Tato diplomová práce se zabývá testováním vlivu nově syntetizovaného léčiva na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana. Za účelem výzkumu nového léčiva byly provedeny experimenty na izolovaných potkaních srdcích. Záznamy z těchto experimentů se použily pro vytvoření algoritmu, který hodnotí změny v QT intervalu.

V praktické části došlo k realizaci algoritmu podle dvou zvolených metod. Záznamy z experimentů byly vyhodnoceny manuálním a automatickým způsobem a následně porovnány.

V závěru práce jsou diskutovány postupy všech provedených analýz a jejich zhodnocení.

1 POUŽÍVÁNÍ ZVÍŘAT K TESTOVÁNÍ LÉČIV

Před začátkem jakéhokoliv vědeckého výzkumu je nutné si stanovit konkrétní přesné cíle. Od toho se odvíjí požadavky na daný experiment. Ve většině biomedicinských experimentů se pracuje s metodami, při kterých není nutné využívat laboratorní zvířata. V experimentech, které zkoumají účinky léků je důležité posouzení účinku léčiva na celý organismus jako jednotný systém. V tomto případě je nevyhnutelné použít jako model laboratorní zvíře.

Existuje několik důvodů, proč mohou být zvířata ve výzkumu používána. První důvod je funkční podobnost s lidským tělem. Většina základních buněčných procesů je probíhá stejně u lidí jako i u iných savců. Druhým důvodem je fakt, že rovněž chorobní procesy probíhají u lidí a laboratorních zvířat podobně. Například psi běžně onemocní rakovinou, diabetem, šedým zákalem, žaludečními vředy či poruchami srážlivosti krve. Kočky zase mají stejná zraková postižení jako lidé. Z tohoto důvodu jsou zvířata využívána ke studiu a poznání závažných chorob. Díky tomu lze studovat, jak nemoci ovlivňují tělo, jak reaguje imunitní systém a vyvíjet léky k boji proti těmto nemocem. Třetím důvodem je vývoj a testování potenciálních léčiv. Nové léčivo je nejprve testováno *in vitro* za použití tkánových kultur, následně na zvířatech, a až ve finále na lidských dobrovolnících [10], [11].

Používání zvířecích modelů je při výzkumu kardiovaskulárních poruch nenahraditelným nástojem. Tato diplomová práce se zabývá testováním vlivu nově syntetizovaného léčiva na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana.

1.1 Etické aspekty

S rozvojem lékařské vědy dochází k častějšímu využívání pokusných zvířat v experimentech. Využívání zvířat v experimentech je upraveno zákony, zejména Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č.246/1992 Sb, ve znění pozdějších předpisů. Tento zákon upravuje vyhláška ministerstva zemědělství č. 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat [13].

Ze zákona vyplývá, že je nutné chránit zvířata před týráním, nepoškozovat jejich zdraví a bezdůvodně je usmrcovat. Za pokusy na zvířatech lze považovat ověření vědecké hypotézy a získání nových poznatků, stanovení diagnózy, vývoj a ověření nezávadnosti léčiv a zjištění účinku léčiv, případně využití pokusných zvířat pro výukové účely.. Pokusy se provádí na pracovištích, kterým bylo uděleno oprávnění, mají odborně způsobilé pracovníky a potřebné vybavení k pokusům [11].

Zvířata pro laboratorní účely jsou chována ve specializovaných zařízeních. Tato zařízení jsou pravidelně kontrolována veterinární správou. Při chovu laboratorních zvířat a práci s nimi je nutné dbát na etické aspekty, které jsou definovány pod tzv. koncepcí tří R. Koncepce tří R značí počáteční písmena anglických slov reduction (snižování), refinement (zmírňování) a replacement (nahrazování) [13].

1) Reduction

Je to jakýkoli postup, který vede k dosažení stejného množství informací za použití nižšího počtu zvířat nebo k maximalizování získaných informací z jednoho zvířete

2) Refinement

Znamená upravení všech procedur, které zasahují do života laboratorního zvířete od jeho narození po jeho smrt tak, aby se minimalizovala bolest a utrpení, které zvíře prožívá a pozvedla se tak úroveň jeho života.

3) Replacement

Náhrada zvířete v pokusech technikami „*in vitro*“, matematickými modely, případně videozáznamem, či výukovými filmy,. Zvířata mohou být nahrazena těmito alternativami, pokud je dosažený výsledek na stejné nebo vyšší kvalitativní úrovni ve srovnání s pokusem na zvířeti.

1.2 Laboratorní zvířata používaná v experimentech

Pro účely experimentů se využívají různá laboratorní zvířata. Výběr laboratorního zvířete závisí na typu experimentu, anatomii a fyziologii zvířete. Ačkoliv experimentální výzkum na zvířecích modelech nemůže nahradit klinické studie na dobrovolnicích, má mnoho jiných výhod. Například díky zvířecím modelům lze získat přesné informace o specificky nasimulovaných událostech za přesně definovaných podmínek. Další výhodou je možnost jednoduchého porovnání více studií [25].

Zvířecí modely mohou být buď spontánní, kdy zvíře má stejné vlastnosti jako člověk a není nutné je nijak uměle modifikovat. Nebo indukované, kdy je uměle navozena změna, například prostřednictvím chirurgického zákroku, nebo genetické manipulace. Výhodou spontánních modelů je, že ukazují faktory jako je strava, genetika, životní prostředí a imunita, které mohou mít vliv při studiu onemocnění. Indukované modely jsou užitečné při studiu základních příčin onemocnění a slouží jako nástroj při vývoji léků [12], [25].

Důležitým parametrem při výběru laboratorního zvířete je jeho kvalita. Kvalitu ovlivňují fyzikální, chemické a biologické faktory chovného zařízení, které tvoří tzv. zoohygienické podmínky. Různé zoohygienické podmínky mohou způsobit rozdílnost výsledků stejných experimentů, což pak znemožňuje srovnání výsledků z různých laboratoří [11].

- Fyzikální faktory
 - Teplota prostředí – ovlivňuje metabolismus, což může měnit farmakokinetiku aplikovaných látek, proto jsou definována teplotní rozmezí pro jednotlivé druhy.

- Světelný cyklus – ovlivňuje sekreci hormonů, aktivitu a chování zvířete. Nejběžnější schéma používané v chovech je 12 hod světlo / 12 hod tma. Přílišné osvětlení ovlivňuje fertilitu.
- Prašnost prostředí – závisí na druhu a kvalitě steliva. Prach je nosič škodlivin a mikroorganismů, které mohou negativně ovlivnit výsledky pokusů na laboratorních zvířatech.
- Vlhkost, proudění vzduchu, hluk.
- Chemické faktory
 - Složení vzduchu – ovlivnění zvířat různými pachy například z dezinfekčních přípravků.
 - Chemické složení potravy – podle požadavků experimentu
- Biologické faktory
 - Vnější – ovlivňují podmínky chovu, například mikroorganismy.
 - Vnitřní – genetická výbava chovaných zvířat.

1.2.1 Modely využívané v experimentálních výzkumech

Před začátkem výzkumu je nutné zvážit, jaký zvířecí model je pro studium nejvhodnější. Každý model má své výhody a omezení. Z pohledu výzkumu kardiovaskulárního systému je důležité například zvážit typ anestezie, protože některá léčiva mohou ovlivňovat srdeční činnost, čímž dochází ke změně například elektrokardiografických parametrů [5]. Mezi další kritéria při výběru modelu patří informace o průběhu srdeční depolarizace a fungování iontových kanálů, které ovlivňují vznik akčního napětí. Pro účely kardiovaskulárních výzkumů se využívá řada zvířat. Nejčastěji používaná zvířata jsou popsána s jejich přednostmi i omezeními níže.

Laboratorní zvířata, které se nejvíce používají v experimentální kardiologii jsou laboratorní myš, potkan, králík a morče. Laboratorní myš má nejpodobnější genom s lidským genomem, proto se hojně využívá při genetických studiích. Lze ji jako model využít při sledování účinku farmak. Její výhodou je malá velikost a nízké náklady na chov. Laboratorní potkan je nejvyužívanější model v experimentální kardiologii. Geneticky je podobný laboratorní myši, ale mutantních typů potkanů je méně. Výhodou modelu je jednoduchá manipulace a nízké náklady na chov. Laboratorní morče bylo první zvíře použité jako laboratorní model. Při chovu je nutné pravidelně dodávat vitamín C v potravě, protože stejně jako člověk, není schopné si vitamín C samo syntetizovat. Vzhledem k dlouhodobé březosti, jak ukazuje Tabulka 1, malému vrhu a problémy s podáním anestezie se morče jako model nevyužívá a bývá nahrazeno laboratorním potkanem nebo laboratorní myši. Nevýhodou modelu laboratorního potkana a laboratorní myši je nízká genetická podobnost regulačních mechanismů kardiovaskulární činnosti, proto při aplikování výsledků na lidský kardiovaskulární systém musí být zváženy veškeré odlišnosti. Laboratorní králík je třetím hojně využívaným laboratorním modelem nejen v experimentální kardiologii, ale také v oblasti chirurgie. U tohoto modelu je nutné pravidelné očkování proti myxomatóze. Na laboratorním králíkovi byla vyvinuta vakcína proti vzteklině. Tento model je hojně využívaný v experimentální kardiologii, protože je zde podobnost s člověkem ve funkci iontových kanálů [12], [25], [33].

Dalšími zvířaty používanými při experimentech jsou kočka, pes a opice. Jedná

se o savce, obecně jsou většího vzrůstu, žijí delší dobu a jejich nároky na chov jsou náročnější. Kočka, která patří mezi savce je stejně jako morče nejstarším laboratorním modelem. Kočka jako model je využívána především ke studiu nervového systému a smyslů, má dobře vyvinutý sluch, zrak a rovnováhu. Také má dobrou paměť na vzpomínky, a proto se využívá při testech zaměřujících se na schopnosti učení. Kočka jako model pomohla objasnit řadu domněnek o epilepsii a hluchotě. U psů je nejpoužívanějším plemeno beagle. Pes jako model byl používán v řadě experimentů, za které byla udělena Nobelova cena. Například pomohl objevit fakt, že inzulin je produkován slinivkou břišní a umožňuje regulovat hladinu cukru v krvi. Další experiment umožnil podrobně fyziologicky popsat trávicí ústrojí a ukázal, že trávicí trakt je ovlivňován centrální nervovou soustavou. Nyní se pes jako model používá ke studiu kmenových buněk a poranění míchy. Posledním zvířetem, které je člověku nejpodobnější jsou primáti. Využívají se druhy nižších primátů, zejména makaků. Primáti se jako model využívají zejména pro pochopení léčby infekcí, chorob spojených se stárnutím, reprodukci, funkcí žláz s vnitřní sekrecí a metabolismem. Nicméně použití primátů, jako model při experimentu, vyžaduje dostatečné zdůvodnění a na tyto experimenty jsou kladeny vysoké nároky z hlediska dodržování všech předpisů. V experimentální kardiologii se nejvíce používají pes a prase. Využívají se při studiu ischemie, protože mají velmi podobný koronární systém s člověkem. Další výhodou je, že jejich srdce má přibližně stejnou velikost jako lidské a lze na něm provádět různé intervenční techniky, implantace kardiostimulátorů a defibrilátorů [13], [32], [33].

Výše popsaná laboratorní zvířata se dále ještě dělí na hlodavce a nehlodavce. Hlodavci mají obecně kratší dobu březosti a větší srdeční a respirační frekvence. Mezi hlodavce se řadí laboratorní myš a potkan. Morče se také řadí mezi hlodavce, ale u něj tato obecná kritéria neplatí, proto se jako model nevyužívá. Mezi nehlodavce patří králík, pes, kočka a opice. Tato zvířata mají delší dobu březosti, a nižší srdeční a respirační frekvence. Krevní tlak je u hlodavců i nehlodavců stejný a v průměru se pohybuje okolo 115/75 mmHg. Hodnoty březosti, srdeční a respirační frekvence a krevního tlaku pro jednotlivá zvířata jsou rozepsaná v Tabulka 1, [25], [33].

Pro účely této diplomové práce byl jako model použitý laboratorní potkan. Laboratorní potkan je dobře dostupný a levný model. Manipulace se zvířetem je velmi jednoduchá a experimenty lze snadno opakovat. Nevýhodou využití potkaního modelu při kardiovaskulárních experimentech je, že potkanům chybí určitý typ iontových kanálů a tím pádem má akční napětí mnohem kratší dobu trvání a zcela chybí fáze plató (refrakterní fáze, při které buňky nereagují na podráždění). Na EKG (elektrokardiogram) lze tento fakt pozorovat vymizením vlny S (Obrázek 5). Při experimentech bylo využito izolované srdce perfundováno podle Langendorffa. Výhodou tohoto systému je, že izolované srdce není ovlivněno žádnými orgánovými systémy. K funkci systému nejsou potřeba žádná další přídavná zařízení, například pro ventilaci plic. Model je dobře reprodučibilní [25].

Tabulka 1: Základní biologické parametry laboratorních zvířat, převzato z [12]

	Myš	Potkan	Morče	Králík	Pes	Kočka
Březost (dny)	19-21	21-23	65-72	30-33	58-66	56-64
Srdeční frekvence (tepů/min)	500-600	260-400	130-190	200-230	70-100	110-200
Respirační frekvence	100-210	70-150	90-150	35-60	12-20	18-25
Krevní tlak (mmHg)	115/80	120/80	90/56	110/80	115/60	120/75

1.3 Testování léčiv

Vývoj nového léčiva je náročný proces. Tento proces spojuje řadu různých oborů, například analytickou, fyzikální chemii a biochemii, biologii, experimentní a klinickou medicínu, farmacii, výpočetní techniku či statistiku, ale také legislativu a ekonomii. Při vývoji léku lze využít řadu metodik a postupů. Obecně vývoj nového léku probíhá ve dvou stádiích. Prvním stádiem je základní výzkum. Druhým stádiem je testování. Testování se dělí na dvě hlavní části: preklinickou část a část klinickou. Diagram postupu vývoje nového léčiva je na Obrázek 1. V této kapitole jsou popsána jednotlivá na sebe navazující stádia vývoje léku [27].

Metodiky a postupy vývoje nového léčiva:

- modifikace chemické struktury již známého léčiva,
- screening nově objevených přírodních látek,
- objevení nových vlastností již známých chemických látek,
- cílená syntéza nových chemických látek – struktura byla navržena na základě porozumění biologickým mechanismům účinku (lékový design),
- systematický screening vybraných molekul s využitím moderních počítačových technologií,
- screening molekul na základě korelace strukturních vlastností s biologickou aktivitou.

Prvním stádiem je základní výzkumu, který začíná vyhledávacím výzkumem, kde dochází k izolaci a syntéze nového léku. Následuje screening a testování vůdčích struktur. Cílem je nalézt vůdčí molekulu, která má dostatečný léčebný účinek a nízkou toxicitu. V tomto stádiu vývoje se využívají zejména počítačové technologie, které umožňují studovat mechanismy účinku na buněčné a receptorové úrovni pomocí signálních mechanismů uvnitř buňky. Po výběru vůdčí molekuly následuje syntéza účinné látky a navržení výrobního procesu. S novou látkou se provádí dlouhodobé studie v různých stresových podmínkách a hledá se ideální léková forma. Následuje

výroba a validace lékové formy. Poté se opět provádí stabilitní testy. Veškeré procesy a zkoušky probíhají v souladu s dobrou laboratorní a výrobní praxí a jsou zaznamenány v dokumentaci, která slouží jako podklad při registraci léku. Poté, co je lék vyroben, následuje stádium preklinického výzkumu [11], [27].

Druhá část je stádium preklinické, kdy dochází k prvnímu testování účinnosti a bezpečnosti látky. Testování je nejprve prováděno *in vitro* na bakteriích, cílových buněčných kulturách a tkáních. Následně *in vivo* na pokusných zvířatech. Testuje se farmakokinetika, farmakodynamika a toxikologie. Výsledky preklinických testů jsou pouze podkladem k dalšímu částem testování. Preklinický vývoj začíná farmakologickými screeningovými testy, následuje farmakologický výzkum, který zjišťuje mechanismus účinku látky na různých úrovních – molekulární, receptorové, orgánové a systémové, a následně jsou účinky léku testovány na zvířatech. Poslední fází jsou toxikologické testy, které stanoví latentní dávku u různých zvířat. Stanovení dávky se provádí vždy nejméně na dvou druzích zvířat. Jeden z druhů musí být hlodavec a druhý nehlodavec. Z hlodavců se využívá laboratorní myš, potkan a křeček. Z nehlodavců pak laboratorní králík, pes, kočka a prase. V této fázi se definuje maximální tolerovaná dávka, ta slouží k odvození dávky, která bude podána lidem v rámci klinického stádia vývoje. Preklinické testy probíhají v akreditovaných zařízeních a během testů jsou dodržovány etické standardy o zacházení s laboratorními zvířaty [11], [27].

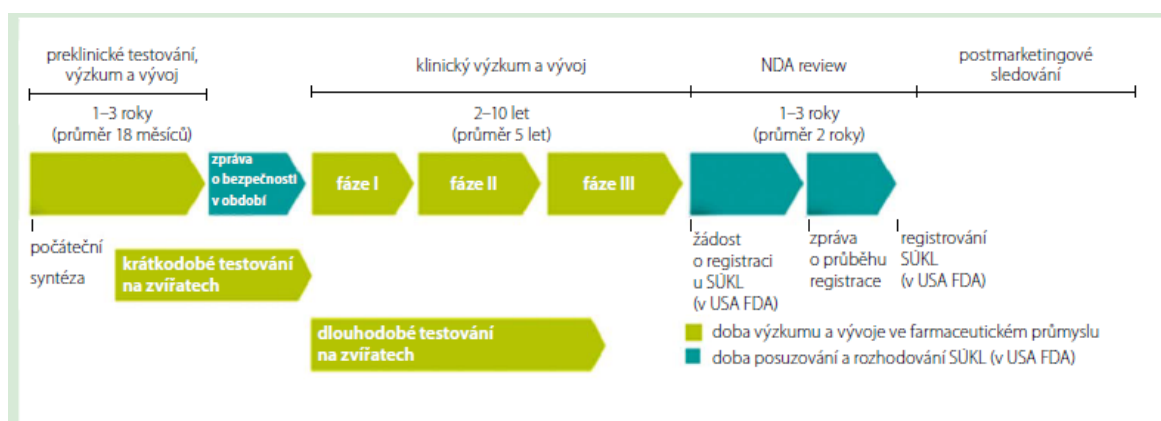
Posledním stádiem je klinické testování. Dělí se do 4 fází:

- 1. fáze – první podání léčiva člověku,
- 2. fáze – průzkumové léčebné podání léčiva,
- 3. fáze – potvrzovací léčebné podání léčiva,
- 4. fáze – klinické použití.

Tato část výzkumu zahrnuje zapojení lidských subjektů a je upravena Zákonem č. 378/2007 Sb. o léčivech a změnách některých souvisejících zákonů ve znění pozdějších předpisů. Tento zákon detailněji upravuje vyhláška č. 226/2008 Sb. o správné klinické praxi. Hlavním regulačním úřadem je Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL).

V první fázi klinického hodnocení je léčivo poprvé podáno lidem, zdravým dobrovolníkům. Sleduje se vliv látky na organismus a je zde kladen důraz zejména na bezpečnost, toleranci a snášenlivost, nikoli na účinnost. Cílem této fáze je získat informace o terapeutické dávce a intervalech podání léčiva. Pokud je léčivo na základě výsledků z fáze 1 vyhodnoceno jako bezpečné, následuje fáze 2. Zde je testované léčivo podáno v dané indikaci malému počtu (10-100 osob) přesně definovaných nemocných. Cílem fáze 2 je ověření a zhodnocení účinku léčiva na lidský organismus. Vyhodnocení nežádoucích účinků po jednotlivém a opakovaném podání v různých dávkách. Pokud jsou výsledky fáze 2 příznivé, potvrdí se dobrá účinnost a nízký výskyt nežádoucích účinků, následuje fáze 3. Ve fázi 3 probíhají mezinárodní studie v různých centrech, jejichž cílem je prokázat účinnost na velkém počtu pacientů. Zde bývá přípravek srovnán s tzv. kontrolou, nebo tzv. aktivním komparátorem. Kontrolou se rozumí stejná léková forma, která obsahuje neúčinnou látku místo účinné, tzv. placebo. Aktivní komparátor je konkurenční léčivo, které je považováno za standard v léčbě daného onemocnění. Cílem této fáze je získání velkého množství podkladů potřebných pro

registraci přípravku. V této fázi je také možné rozšířit spektra diagnóz, u kterých by bylo možné přípravek použít. Po ukončení 3 fáze a vyhodnocení výsledů je lék předložen regulačním orgánům k registraci. Po registraci a zavedení přípravku do klinické praxe následuje poslední fáze 4, tzv. peregistrační klinické hodnocení. Během tohoto hodnocení se shromažďují informace o účincích při dlouhodobém podávání, interakcích s jinými léky, ovlivnění mortality a dlouhodobě se sleduje bezpečnost léku [11], [27].



Obrázek 1: Vývoj nového léčiva, převzato z [27]

Experimenty prováděné pro účely této práce spadají do druhé části vývoje léčiva, konkrétně do preklinického testování. V této části patří experimenty do fáze krátkodobé testování na zvířatech. Sleduje se vliv účinku léčiva na orgánové úrovni, konkrétně na srdci.

2 BETA-BLOKÁTORY

Toto diplomová práce se zabývá účinkem nově syntetizovaného léčiva. Nové léčivo patří do skupiny léků nazývaných beta-blokátory, proto jsou v této kapitole podrobně beta-blokátory popsány. Jejich vznik, současné používání, dále je zde popsáno jejich dělení a využití v kardiologii.

Beta-blokátory jsou starší léková skupina hojně používaná v kardiologii. Mají významný kardioprotektivní efekt a snižují kardiovaskulární nemocnost a úmrtnost. Základním mechanismem účinku je blokování adrenergických beta-receptorů v srdci. U zdravého jedince se na beta-receptory váží hormony adrenalin a noradrenalin. Beta-blokátory tyto receptory zablokují, neumožní fosforylaci kalciového kanálu a vstup vápníku do buněk, čímž dojde ke zpomalení srdeční činnosti, snížení namáhání srdeční svaloviny a spotřeby kyslíku. Dále beta-blokátory svým účinkem snižují krevní tlak a u pacientů s onemocněním srdce snižují riziko vzniku arytmií [14], [15].

Již v roce 1905 Ehrlich a Langley zavedli pojem receptor. První zmínkou o objevu adrenergických receptorů byl článek „A study od the adrenotropic receptors“ publikovaný v roce 1948. Autor v článku popsal existenci dvou druhů adrenergických receptorů α a β [21]. První betablokátor s názvem propranolol vyvinul v roce 1964 britský farmakolog James W. Black. Spolu s chemikem J. S. Stephansonem se snažili testovat řadu látek, které snižují účinky adrenalinu a noradrenalinu na srdce, až dospěli k objevení léku propranolol. Následně bylo dokázáno, že tato látka snižuje mortalitu a morbiditu u onemocnění anginy pectoris a byly prokázány účinky v léčbě arytmií. V 90. letech byly betablokátor na základě výsledků klinických studií zařazeny do skupiny kardiovaskulárních farmak. V současné době je využití betablokátorů v kardiologii široké. Používají se jak v primární, tak v sekundární prevenci. V primární zejména při vzniku ischemie myokardu. V sekundární prevenci po prodělaném infarktu myokardu a v prevenci náhlé srdeční smrti [21], [28].

2.1.1 Účinek a dělení beta-blokátorů

Jak už bylo zmíněno, beta-blokátory jsou látky, které patří do skupiny kardiovaskulárních farmak. Jejich hlavním mechanismem účinku je blokáce funkce beta-adrenergických receptorů. Hlavními zprostředkovateli účinku (mediátory) beta-receptorů jsou noradrenalin a adrenalin. Noradrenalin se uvolňuje z axonů postgangliových nervových vláken v cílových orgánech a v centrálním nervovém systému. Adrenalin se uvolňuje z dřeně nadledvin. Tyto mediátory pak působí na specifické receptory (subtypy α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3) v cílových orgánech, jako jsou srdce, tepny, žíly, ledviny a centrální nervová soustava. Fyziologicky je vyplavení adrenalinu spojeno s uvolněním energie ze zásob v játrech a tukových tkáních, zvýšení krevního tlaku, zvýšení srdeční frekvence a zvýšení prokoagulační aktivity krve. Krátkodobá aktivace je výhodná zejména v zátěžových situacích. Naproti tomu dlouhodobá aktivace tohoto systému vede k závažným kardiovaskulárním důsledkům, jako je hypertenze, ischemie, infarkt myokardu, srdeční selhání, arytmie a náhlá smrt. Betablokátor zabraňují mediátorům v účinku na specifické receptory a eliminují uvedené negativní důsledky dlouhodobé aktivace [21], [28].

Beta-blokátory se dělí na kardioselektivní, neselektivní, s vnitřní sympatomimetickou aktivitou (ISA) a s vazodilatačním účinkem na cévy. Neselektivní beta-blokátory blokují β_1 i β_2 receptory. Jejich nežádoucí účinky v důsledku blokády β_2 receptorů jsou zúžení bronchů, snížení uvolňování inzulínu ze slinivky a chlad končetin, nejsou tedy vhodné pro pacienty s plicním onemocněním, diabetes mellitus a ischemickou chorobou srdeční. Kardioselektivní beta-blokátory mají větší afinitu k β_1 receptorům, z čehož vyplývá, že se mohou používat u pacientů s výše vyjmenovanými onemocněními. Avšak při dlouhodobém používání ve vysokých dávkách dochází k blokaci i β_2 receptorů a kardioselektivita mizí. ISA beta-blokátory jsou neselektivní i kardioselektivní a zároveň mají funkci aktivátorů, označují se jako kompetitivní dualisté. Vedou ke zmírnění nežádoucích účinků úplné blokády. Poslední skupinou jsou beta-blokátory s vazodilatačními účinky, například carvedilol a celiprolol [28].

Další dělení beta-blokátorů je z hlediska farmakokinetiky na lipofilní a hydrofilní. Lipofilní beta-blokátory se metabolizují v játrech a účinkují kratší dobu. Dobře pronikají buněčnými membránami a mají na ně stabilizační vliv. Mohou způsobovat poruchy spánku a únavu. Hydrofilní beta-blokátory mají pomalejší resorpci z gastrointestinálního traktu, málo se váží na plazmatické bílkoviny, metabolizují se v játrech a vylučují se ledvinami. Důležitý rozdíl oproti lipofilním je, že nepronikají do centrální nervové soustavy a neovlivňují spánek. Některé beta-blokátory se označují jako smíšené, to znamená, že jsou hydrofilní i lipofilní. Do této skupiny patří například carvedilol, bisoprolol a celiprolol. Rozdělení beta-blokátorů jak z hlediska selektivity, tak z hlediska farmakokinetiky je vidět v Tabulka 2, [28].

Tabulka 2: Klasifikace beta-blokátorů, (převzato z [28]).

	Název látky	Skupina
Neselektivní beta-blokátory		
	Sotalol	Hydrofilní (ledviny 100%)
Neselektivní beta-blokátory s ISA		
	Bopindolol	Smíšené (játra 60%)
Kardioselektivní beta-blokátory		
	Atenolol	Hydrofilní (ledviny 100%)
	Betaxolol	Hydrofilní (játra, ledviny 50%)
	Bisoprolol	Smíšené (játra, ledviny 50%)
	Metoprolol	Lipofilní (játra 100%)
Kardioselektivní beta-blokátory s ISA		
	Acebutolol	Lipofilní (játra 80%)
Beta-blokátory s vazodilatačním účinkem		
	Carvedilol	Smíšené (játra i ledviny 50%)
	Celiprolol	Smíšené (játra i ledviny 50%)

2.1.2 Využití beta-blokátorů v kardiologii

Základní indikací beta-blokátorů v kardiologii je léčba hypertenze. Hypertenze neboli zvýšení tlaku krve nad 140/90 mmHg je nejčastějším onemocněním kardiovaskulárního systému. Prevalence hypertenze se pohybuje okolo 20-30 % a zvyšuje se s věkem. Přesný mechanismus působení beta-blokátorů proti hypertenzi není zcela objasněn. Vědci se domnívají, že beta-blokátory mají účinek na centrální nervovou soustavu, inhibují periferní sympatickou aktivitu, snižují výdej reninu a angiotensinu II, zmenšují venózní návrat a plazmatický objem. Dále snižují uvolňování noradrenalinu na synapsích a snižují tlakovou odpověď na katecholaminy při stresu a námaze. Při léčbě lze beta-blokátory využít samotné, nebo v kombinaci s jinými léky. Nejvhodnější je kombinace s diuretiky. Při použití beta-blokátorů samotných je jejich účinek asi 50 %, v závislosti na typu hypertenze. V kombinaci je jejich účinnost 80-90 % [28].

Dál lze beta-blokátory využít v léčbě ischemické choroby srdeční (ICHS). ICHS je onemocnění, kdy se dostává nepoměr mezi dodávkou a spotřebou kyslíku v myokardu. Nedostatek kyslíku v myokardu vzniká při aterosklerotickém onemocnění koronárních tepen. Projevuje se zejména při emočním stresu a zvýšené námaze. Beta-blokátory v léčbě tohoto onemocnění mají výrazný vliv, protože snižují mortalitu o 20-30 %. Působí tak, že sníží celkovou spotřebu kyslíku v myokardu, poklesne celková srdeční práce a prodlouží se trvání diastoly, čímž selepší průtok krve v koronárních tepenách. Beta-blokátory se uplatňují v léčbě všech forem ICHS [28].

Při léčbě akutního infarktu myokardu se vždy volí orální beta-blokátory. Účinek beta-blokátorů v léčbě srdečního selhání je ochrana myokardu proti katecholaminové toxicitě a pokles stimulace vazokonstrikce, snížení spotřeby kyslíku myokardem a obnova krevního oběhu. Všechny tyto mechanismy vedou k normalizaci tvaru levé komory. Při léčbě srdečního selhání jsou doporučeny tři beta-blokátory: bisoprol, metoprolol a carvedilol.

Beta-blokátory lze také použít v léčbě arytmií a prevenci náhlé srdeční smrti. Z hlediska arytmií se jedná o sinusové tachykardie, síníové tachykardie a AV blokády. Dále se indikují ke kontrole frekvence u flutteru a fibrilace síní. Snižují počet předčasných komorových stahů a kontrolují komorové arytmie. Shrnutí všech onemocnění a volba jednotlivých typů beta-blokátorů jsou v Tabulka 3, [16], [28].

2.1.3 Beta-blokátor carvedilol

Carvedilol byl vybrán pro účely této práce jako pozitivní kontrola pro srovnávání s účinky nově syntetizovanou látkou, zejména proto, že účinky carvedilolu jsou dobře známé a předpokládány účinky testované látky jsou podobné účinkům carvedilolu. V této kapitole jsou shrnuty informace o carvedilolu.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, carvedilol patří do skupiny smíšených betablokátorů s vazodilatačním účinkem. V organismu blokuje beta i alfa-receptory. Při blokaci beta-receptorů dojde k tlumení stresové reakce na orgány a tím se sníží riziko vzniku arytmií. Při blokaci alfa-receptorů dojde k ovlivnění cévního tonu. Obecně carvedilol patří do skupiny léků užívaných na léčbu vysokého krevního tlaku, poruchy srdečního rytmu a dalších onemocnění srdce.

Při jeho použití dochází k poklesu krevního tlaku a snížení srdečné frekvence, což se na EKG křivce projeví zvýšením RR intervalu. Zároveň dochází ke zpomalení

vedení vzruchu přes síně. Carvedilol má rovněž kardioprotektivní účinky, snižuje velikost infarktu myokardu a závažnost poruch rytmu v souvislosti s akutní ischemií.

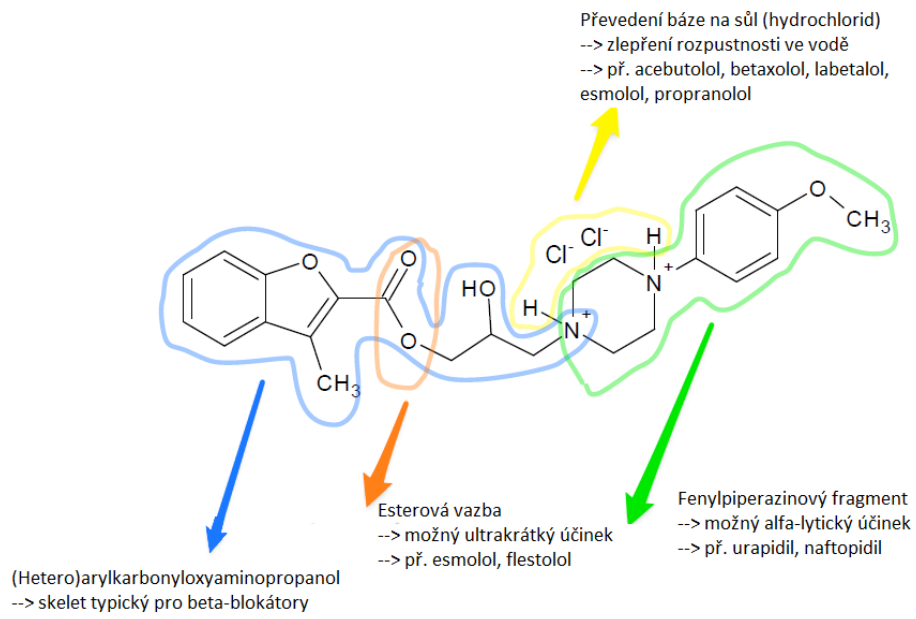
Studie, které se zabývaly srovnáním účinku jednotlivých betablokátorů potvrdily, že carvedilol má nejlepší účinky a nejmenší umrtnost pacientů. I když nelze říci, že lze všechna kardiovaskulární onemocnění léčit pouze carvedilolem a ostatní betablokátory nepoužívat. Carvedilol vyšel ze studií jasně nejlépe a lze říci, že jeho účinky jsou komplexní pro všechny typy kardiovaskulárních onemocnění [16], [36].

Tabulka 3: Volba jednotlivých typů beta-blokátorů v léčbě kardiovaskulárních onemocnění (převzato z [28]).

Onemocnění	Typ beta-blokátoru
Mladší hypertonici	Všechny
Starší hypertonici	Kardioselektivní, kardioselektivní s mírnou ISA
Ischemická choroba srdeční	Všechny, kromě silně vyjádřené ISA
Cukrovka	Kardioselektivní, kardioselektivní s ISA
Hyperlipoproteinémie	Kardioselektivní, kardioselektivní s ISA
Snížená systolická funkce LK	Bisoprolol, carvedilol, metoprolol
Ischemická choroba dolních končetin	Kardioselektivní s ISA, vazodilatační
Sklon k sinusové bradykardii	Beta-blokátory s ISA
Bronchiální obstrukce	Kardioselektivní, nižší dávky
Těhotenství	Kardioselektivní, kardioselektivní s IS, labetalol
Perioperační hypertenze	Esmolol, metoprolol

2.1.4 Nový beta-blokátor TP1

Tato látka byla nově syntetizovaná na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno. Látka byla syntetizována jako beta-blokátor. Tomu odpovídá její chemická struktura znázorněna na Obrázek 2 . Vzhledem k rozvoji medicíny je nutné vyvíjet nové léky pro využívání v klinické praxi.



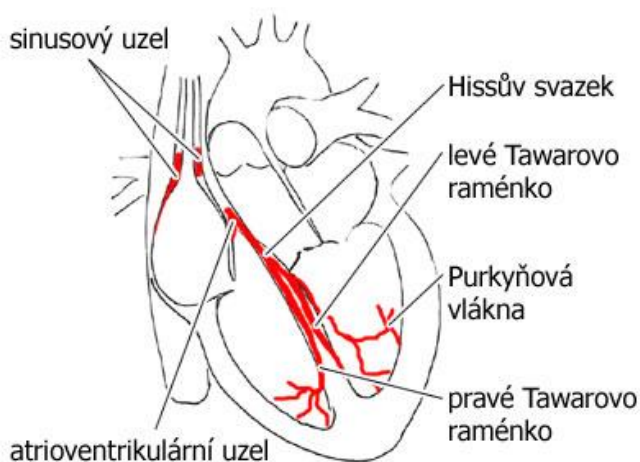
Obrázek 2: Nově syntetizovaný beta-blokátor TP1

3 ELEKTROKARDIOGRAFIE

Elektrokardiografie je vyšetřovací metoda, která popisuje elektrickou aktivitu srdce. Zaznamenává změny napětí v čase pomocí elektrod umístěných na povrchu těla. Výsledný záznam se skládá ze série vln, které slouží k diagnostice srdeční činnosti. Práce sleduje vliv léčiva na elektrickou aktivitu srdce. Proto se tato kapitola zabývá stručným přehledem, stavbou a šířením elektrického vzruchu srdcem, dále pak způsobem snímání elektrického vzruchu u člověka a potkana. Následně popisem vln a kmitů, které tvoří EKG křivku u člověka a u potkana.

3.1 Stavba srdce, šíření a snímání srdečního vzruchu u člověka

Srdce je dutý svalnatý orgán uložený v dutině hrudní a slouží k distribuci krve do cévního systému. Z anatomického hlediska se srdce dělí na pravou (P) a levou (L) polovinu. Každá polovina se skládá ze síně (atrium) a komory (ventriculus). Na povrchu srdce se nachází vnější vrstva (epikard). Jedná se o tenkou vazivovou blánu, která přechází v osrdečník (perikard). Střední vrstva (myokard) je tvořena dvěma typy buněk. První skupinu tvoří kardiomyocyty, které obsahují velké množství mitochondrií, myofibril a sarkoplazmatického retikula. Koordinovaným stahem kardiomyocytů je zajištěna mechanická práce srdce. Druhým typem jsou buňky převodního systému srdečního. Tento typ buněk tvoří a rozvádí elektrický vzruch po srdci. Převodní systém srdeční pozůstává z sinusového uzlu (SA), síňokomorového uzlu (AV), Hissova svazku, Purkyňových vláken a Tawarových ramének a lze jej vidět na Obrázek 3. Sinusový uzel (SA) udává frekvenci srdce a označuje se proto jako primární pacemaker. Od SA uzlu se depolarizace šíří přes levou a pravou síň k síňokomorovému uzlu (AV). Síňokomorový uzel zajišťuje koordinaci kontrakce síní a komor zpomalením vedení vzruchu. Převod vzruchu ze síně na komory zabezpečuje Hisův svazek. Následuje větvení přes Tawarova raménka na síť vodivých vláken, nazývaných Purkyňova vlákna, která šíří impuls do levé a pravé komory [1], [2], [7].



Obrázek 3: Převodní systém srdeční, převzato z [3]

Buňky převodního systému srdečního jsou vzrušivé. Vzrušivost se projevuje přechodem iontů přes membránu, a tím vzniká akční potenciál. Na rozhraních rozdílných potenciálů vznikají elektrické proudy. Díky vodivosti tělesných tekutin lze snímat změny potenciálů, které představují šíření akčního potenciálu myokardem. Snímání se provádí za pomoci elektrod. Měří se rozdíl napěťových potenciálů mezi dvojicí elektrod. Tento rozdíl se označuje jako svod. Existují dva typy svodů, bipolární a unipolární. Bipolární svody vznikají jako rozdíl elektrických potenciálů mezi dvěma elektrodami. Unipolární svody vznikají spojením aktivní elektrody s indiferentní elektrodou. Indiferentní elektroda vznikne spojením tří končetinových svodů do jednoho uzlu, tzv. centální svorky. Podle Kirchhoffova zákona je součet proudů protékajících takovým okruhem roven nule. Centrální svorka má tedy nulové napětí a odpovídá elektrickému středu srdce. Tento způsob zapojení je výhodný, protože má pouze malé výchylky a lze jednoduše zesílit úpravou zapojení. V případě snímání EKG u lidí se používá 12svodový systém. V experimentální kardiologii, kdy se signál snímá na izolovaných zvířecích srdcích, se využívá ortogonální svodový systém [4], [8], [9].

Standardní 12svodový systém zapojení

Tento systém tvoří bipolární končetinové svody (I, II, III), unipolární končetinové svody (aVR, aVL, aVF) a unipolární hrudní svody (V1–V6). Končetinové svody zaznamenávají informace ve frontální rovině a hrudní svody v transverzální rovině. Unipolární svody zaznamenávají šíření depolarizace směrem k elektrodě jako pozitivní výchylku a od elektrody jako negativní výchylku. V případě repolarizace opačně. Umístění elektrod má tedy vliv na výsledné hodnocení EKG záznamu, a udává informace o umístění srdce jako celku i jeho jednotlivých oddílů. Tento systém je nejvíce používaným svodovým systémem v klinické praxi [4], [9].

Ortogonální svodový systém

Vyjadřuje prostorové vlastnosti elektrického pole kolem srdce pomocí tří ortogonálních signálů. Elektrická aktivita je snímána ve třech navzájem kolmých směrech os X (rovina frontální), Y (rovina horizontální) a Z (rovina vertikální). Tento systém je využíván v experimentální kardiologii zejména pro možnost analýzy v trojrozměrném zobrazení [4], [9].

Elektrický vektor srdeční

Elektrický vektor srdeční je celkovým projevem dipólu srdeční svaloviny. Dipól je rozhraní mezi buňkou depolarizovanou a klidově polarizovanou a má směr a velikost, proto ho lze označit jako vektor. Součtem jednotlivých elementárních vektorů se získá elektrický vektor srdeční. Výsledkem projekce elektrického vektoru jsou kmity a vlny EKG křivky. Elektrický vektor udává směr šíření elektrického potenciálu a je dán velikostí a umístěním jednotlivých částí srdce. Elektrická osa srdeční je směr výsledného vektoru v okamžiku R kmity a shoduje se s anatomickým uložením srdce v hrudníku [4], [9].

3.2 Stavba, šíření a snímání elektrického vzruchu u potkana

Srdce potkana je stejně jako srdce člověka čtyřkomorové. Vzruch v srdci potkana je rovněž jako u člověka šířen pomocí převodního systému srdečního. Vzniká v SA uzlu a následně je veden do AV uzlu, Hisova svazku, Purkyňových vláken a Tawarových ramének. EKG tedy odráží sled 3 událostí, a to depolarizace síní (P vlna), depolarizace komor (QRS komplex) a repolarizace komor (vlna T) [5].

Pro pořízení záznamu existuje u potkana řada metod. Dělí se na invazivní a neinvazivní. Neinvazivní metody se využívají k lokalizaci patologických změn. Nejvyužívanější je použití končetinových svodů. Invazivní metoda znamená uvést potkana do anestezie a umístit elektrody pod kůži předních tlapek a ocasu. Výhodou této metody je jednoduchost, snadná opakovatelnost pokusu a velmi kvalitní záznam EKG, zatímco nevýhodou je zkrácení výsledků působením anestezie [5].

Dalším typem je metoda založená na telemetrii, která umožňuje dlouhodobé sledování. U této metody je telemetrický vysílač implantován mezi lopatky a elektrody na mečovitý výběžek na hrudníku. Data jsou přijímaná bezdrátově přijímačem umístěným uvnitř klece. Výhodou je měření volně se pohybujících potkanů, získání dat nezkreslených vlivem anestezie a artefaktů indukovaných stresem [5].

Poslední metodou, která byla aplikována pro potřeby této práce, je záznam z izolovaného srdce *in vitro*. Tato metoda je podrobně popsána níže.

3.2.1 Model izolovaného srdce podle Langendorfa

Prvního zcela izolovaného modelu srdce dosáhl Langendorff v roce 1895. Model byl založen na zpětné dodávce defibrinované krve do aorty a následně do koronární tepny díky uzavření aortální chlopně. Objev modelu přispěl ke studiu fyziologie srdce z pohledu funkce myokardu a elektrokardiologie, a také pochopení patofyziologie chorob. Dnes se model používá v mnoha oborech. Pro účely této práce se model využil ke studiu vlivu léčiva na elektrickou aktivitu srdce. Výhodou modelu je, že není ovlivněn žádnými orgánovými systémy a umožňuje pokusy jednoduše provádět a opakovat. Nevýhodou je, že model vyžaduje usmrcení zvířete. Zde je nutné dodržovat velmi přísné předpisy, které jsou popsány v kapitole 1.1 [6].

Popis modelu

Zvíře je uvedeno do anestezie. Poté je srdce vyjmuto z dutiny hrudní, ponořeno do studeného perfuzního roztoku, aby se zabránilo ischemickému poškození. Dle zkušeností závažná ischemie u potkaního srdce nastává do 30 sekund od přerušení perfuze. Rychlé ochlazení izolovaného srdce prodlouží čas nástupu ischemie. Následně je obnoven koronární průtok připojením srdce na kanylu perfuzního setu. Směr perfuze je retrográdní, tj. opačný se situací srdce *in situ* (na svém anatomickém místě). Aortální chlopně je vlivem tlaku roztoku uzavřená. Tím pádem roztok protéká pouze koronárními tepnami a udržuje srdce ve funkčním stavu. Roztok je ze srdce odváděn žilním řečištěm do pravé síně a odsud mimo srdce. Po začátku perfuze je pravidelný rytmus obnoven do několika vteřin. Následuje stabilizace preparátu, obvykle 20 minut, aby došlo ke stabilizaci srdeční funkce [6].

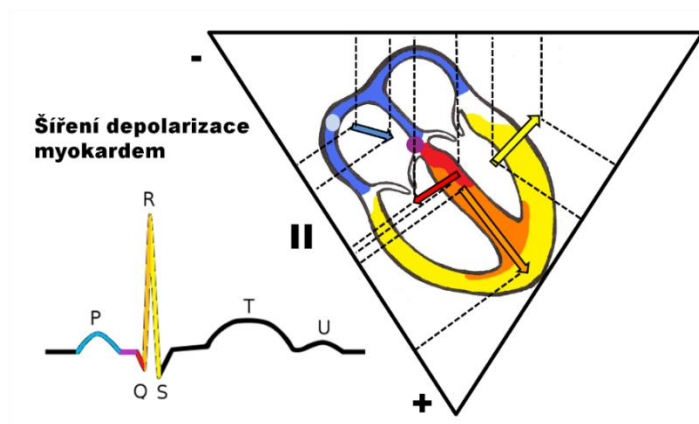
Experimentální podmínky se nastavují před experimentem a během něj se pravidelně sledují. Srdce bije spontánně, nebo nuceně stimulováno v požadované frekvenci. Jako perfuzát se využívá krev, nebo náhradí roztok, např. Krebs-Henseleitův, Lockeův nebo Tyrodeův. Většinou se využívají náhradní roztoky, protože krev může v perfuzním systému koagulovat a zapříčinit infarkt myokardu. V případě použití krve od jiného druhu může dojít k imunitní reakci a tím k poškození srdce. Správné okysličení roztoku je zajištěno probubláváním kyslíkem či změsí kysíku s oxidem uhličitým. Roztok je udržován při hodnotě pH 7,40 a stabilní teplotě 37,0 °C. Každé pracoviště si přesné složení pufrů přizpůsobuje dle svých zkušeností. Přidávají se složky jako dextran, albumin, mannitol (pro úpravu osmolarity), pyruvát, mastné kyseliny a inzulin. [6]

3.3 EKG křivka

Elektrokardiogram (EKG) je projevem sumární elektrické aktivity všech srdečních buněk. Elektrický cyklus se skládá ze tří fází, depolarizace, plató a repolarizace. Depolarizace je počáteční fáze, kdy dochází k prudké změně akčního napětí buňky a impuls je šířen napříč myokardem. Ihned po depolarizaci nastává fáze plató, kdy nemůže dojít k opětovnému podráždění buňky. Poté následuje repolarizace, kdy se buňky myokardu vrací ke klidové hodnotě [4], [7].

3.3.1 EKG u člověka

Průběh EKG křivky odráží postup depolarizace a repolarizace (viz Obrázek 4). Skládá se z vln (P, T, U), komplexu tvořeného kmity (Q, R, S), úseků (PR, ST) a intervalů (PR, QT). Interval PQ se považuje za izoelektrickou linii (nulový potenciál). Vlna P vyjadřuje depolarizaci síní. Komplex QRS odráží depolarizaci komor a vlna T vyjadřuje repolarizaci komor. Repolarizace síní je v EKG nerozpoznatelná, neboť se časově shoduje s komplexem QRS, který je mnohem výraznější. Na základě časového trvání a tvaru jednotlivých vln lze získat řadu informací o stavu srdce. Vlny a kmity jsou orientovány podle šíření elektrického vzruchu. Mohou být orientovány do kladných (k elektrodě), nebo záporných (od elektrody) hodnot vzhledem k izoelektrické linii [7], [9].



Obrázek 4: Šíření vzruchu myokardem, převzato z [29]

Vlna P představuje vzruchovou aktivitu SA uzlu a depolarizaci pravé i levé síně. V běžných podmínkách má pozitivní výchylku s amplitudou od 0,1 mV do 0,15 mV a době trvání 80 ms - 120 ms. Tato vlna má hladký charakter. V některých případech je velmi obtížné stanovit přesné hodnoty začátku a konce vlny. Při chybějící vlně P se jedná o junkční rytmus.

Interval PQ je úsek od počátku depolarizace síně k počátku depolarizace komor. Vyjadřuje dobu šíření vzruchu ze sinusového uzlu do atrioventrikulárního (AV) uzlu komor. Měří se od počátku vlny P po začátek komplexu QRS. Standartní délka je 120 – 200 ms. S rostoucí tepovou frekvencí dochází ke zkrácení.

Komplex QRS představuje depolarizaci komor a současně i repolarizaci síní. Repolarizace je potlačena díky slabému průběhu. Fyziologická doba trvání komplexu QRS je 80 ms – 100 ms. Komplex QRS je složený ze dvou negativních výchylek a jedné pozitivní, což je závislé na umístění elektrod. První negativní výchylka je označována jako vlna Q. Následuje pozitivní výchylka vlna R a poté druhá negativní výchylka vlna S. Komplex QRS je označován za nejvýraznější část celé křivky. Obsahuje spektrální složky o vyšších frekvencích než vlny P a T.

Úsek ST je úsek od konce komplexu QRS po počátek vlny T. Tento úsek označuje počátek repolarizace komor. Začátek ST úseku je označován jako bod J (junkční bod). Při hodnocení ST úseku se sleduje jeho vychýlení od izoelektrické linie. Vyraznější vychýlení může naznačovat ischemii či intoxikaci nějakou chemickou látkou.

Vlna T odráží rychlou repolarizaci komor a nachází se v intervalu 300 ms za komplexem QRS. Pozice vlny je závislá na tepové frekvenci. Při vyšších frekvencích se přibližuje ke komplexu QRS a zaniká při elevaci S-T segmentu, a proto není v záznamu viditelná. Po vlně T může následovat vlna U, jejíž původ není objasněn. Někdy dochází ke sloučení vln T a P, což je nevýhodou při detekci z důvodu špatného určení začátků a konců daných vln.

Interval QT vyjadřuje časový úsek mezi začátkem depolarizace a koncem repolarizace komor. Trvání intervalu je závislé na tepové frekvenci, fyziologicky se pohybuje kolem 430 ms. Některá léčiva mohou prodlužovat tento úsek.

Interval RR označuje dobu trvání komorového srdečního cyklu dvěma po sobě jdoucími vlnami. Na základě délky intervalu RR se určuje, zda se jedná o pravidelnou či nepravidelnou srdeční činnost. Interval slouží k popisu arytmii a analýze tepové frekvence.

3.3.2 EKG u potkana

Z důvodu provádění experimentu na izolovaných srdcích potkanů je v této kapitole popsáno EKG u potkana a rozdíl mezi EKG člověka a EKG potkana.

Záznam EKG potkanů je ve výzkumu široce používaná experimentální metoda. Na rozdíl od člověka nebyla pro všechny parametry stanovena přesná kritéria referenčních („fyziologických“) hodnot, ale i přesto je laboratorní potkan jako model používaný v experimentální kardiologii. Referenční hodnoty se v řadě studií liší. Článek [5] shrnuje poznatky z řady studií a porovnává referenční hodnoty EKG potkana a člověka, viz Tabulka 4.

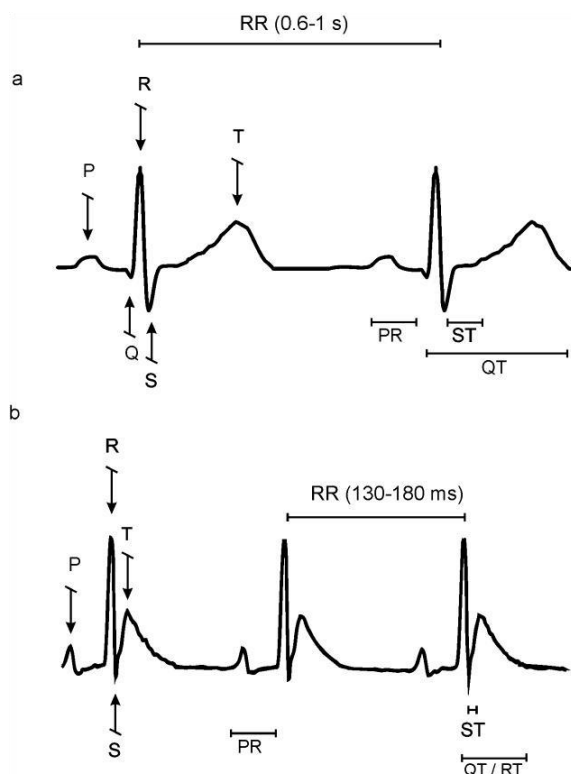
Stěžejním rozdílem je tepová frekvence. U potkana je zhruba 240-500 tepů za

minutu, kdežto u člověka se pohybuje okolo 60 - 100 tepů za minutu. Tepová frekvence u potkana závisí na věku a zvyšuje se v období prvních 4 týdnů života. U potkana se teprve 600 tepů za minutu považuje za fibrilaci, u člověka již 200 tepů za minutu. U člověka i potkana se tepová frekvence vypočítá z intervalu RR [4], [5].

Dalším rozdílem je elevaci ST úseku v potkaním EKG záznamu. Elevace je z důvodu jiné kanálové výbavy. Díky tomu dochází k tvorbě rozdílných intových proudů, které se podílí na vzniku akčního napětí Obrázek 5 [5].

Tabulka 4: Porovnání trvání vln a intervalů EKG u člověka a potkanů kmene Sprague-Dawley a Wistar, převzato z [5]

	HR (bpm)	PR (PQ) (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)	ST (ms)
Člověk	70-100	120-200	60-100	340-420	400	
Potkan kmen Sprague-Dawley	239-508	38-70	12-22	50-75,9	119-141	12,3-18,3
Potkan kmen Wistar	242-452	39-78	14-28	57-95	133-173	9,5-14,8



Obrázek 5: Záznam EKG člověka (a) a potkana (b), převzato z [20]

3.4 Poruchy srdečního rytmu

V kapitole 3.3 byla popsána fyziologická křivka EKG u člověka a u potkana. V této kapitole budou popsány nejčastější patologické změny srdeční činnosti a s tím související změny na EKG křivce. Tyto informace budou následně využity při manuálním hodnocení experimentálních záznamů pocházejících z potkaních srdcí. Patologickými změnami se rozumí poruchy srdečního rytmu, označované jako arytmie. Arytmie je způsobena postižením převodního systému srdečního, který řídí činnost srdce. Příčinou postižení převodního systému jsou poruchy v tvorbě, vedení či šíření depolarizačního vzruchu. Arytmie lze dělit dle srdeční frekvence a dle místa vzniku. Informace ke kapitole čerpány z [30], [31].

Dělení dle srdeční frekvence:

- a) Bradyarytmie
 - a. Blokády SA, AV, ramínkové
- b) Tachyarytmie
 - a. Tachykardie
 - Sinusová tachykardie
 - AV junkční tachykardie
 - AV reentry tachykardie
 - Komorová tachykardie
 - b. Flutter
 - Flutter síní
 - c. Fibrilace
 - Fibrilace síní
 - Fibrilace komor

Dělení dle místa vzniku:

- a) Sinusové
 - Sinusová tachykardie
 - Sinusová bradykardie
 - Sick sinus syndrom
- b) Supraventrikulární (extrasystoly)
 - Síňové extrasystoly
 - Junkční extrasystoly
 - Putující pacemaker
 - Sinusová tachykardie
 - AV junkční tachykardie
 - AV reentry tachykardie
 - Flutter síní
 - Fibrilace síní
- c) Komorové
 - Komorová tachykardie
 - Flutter komor
 - Fibrilace komor
 - Komorová zástava

Bradyarytmie

Bradyarytmie je porucha, při níž dochází ke zpomalení srdeční činnosti, nebo vynechávání srdečního rytmu. Jedná se o projev poruchy vzniku depolarizační vlny v sinoatriálním (SA) uzlu nebo následek poruch vedení vzruchu ze síně na komory přes atrioventrikulární (AV) uzel. Hovoříme-li o poruchách vzniku depolarizační vlny v SA uzlu, jedná se o sick sinus syndrom a sinusovou bradykardii. Do poruch vedení vzruchu se řadí SA, AV a ramínkové blokády.

Sinusová bradykardie

Sinusová bradykardie je u člověka charakterizována tepovou frekvencí <60 tepů/min. EKG křivka a její morfologie jsou zcela fyziologické. Fyziologicky se bradykardie vyskytuje u sportovců a pacientů léčených beta-blokátory.

SA blokády

Existují 3 druhy SA blokády. První je SA blokáda I. stupně. Jedná se o prodloužení vedení vzruchu z SA uzlu na svalovinu síní. Protože EKG záznam zachytí pouze aktivitu předsíně v podobě vlny P nikoli aktivitu SA uzlu. Tento typ blokády nelze v záznamu EKG běžně registrovat. Druhá je SA blokáda II. stupně. Jedná se o zkrácení intervalu mezi vlnami P, nebo o úplný výpadek vlny P. Poslední typ je SA blokáda III. stupně. V tomto případě nedojde k převedení impulzu z SA uzlu na předsíně a na EKG záznamu chybí P vlna. Tento fakt nelze opět diagnostikovat. Blokáda III. stupně se obvykle zjišťuje z AV junkčního rytmu.

AV blokády

Jedná se o skupinu poruch ve zpomalení nebo zastavení převodu vzruchu ze síně na komory. Rozlišujeme 3 stupně AV blokády. První je AV blokáda I. stupně, kdy dojde k prodloužení intervalu PQ v důsledku zpomalení síňokomorového vedení. Druhým typem je AV blokáda II. stupně, kdy dojde k výpadku síňokomorového vedení. Rozlišují se dva druhy, Wenckebachův a Mobitzův. U Wenckebachova druhu na EKG křivce dochází k postupnému prodlužování PQ intervalu až dojde k vymizení komplexu QRS mezi dvěma vlnami P. U Mobitzova druhu dochází na EKG křivce k náhlému výpadku komplexu QRS bez předchozích změn intervalu PQ. Posledním stupněm je AV blokáda III. stupně, kdy dojde k úplnému přerušení vedení vzruchu ze síně na komory. Aktivace komor se pak děje náhradním rytmem, označovaným jako junkční. Na EKG křivce se tento stupeň blokády projevuje velmi úzkými komplexy QRS s žádnou vazbou mezi vlnou P a komplexem QRS.

Ramínkové blokády

Jedná se o skupinu, která se na EKG křivce vyskytuje nejčastěji. Ramínkové blokády se dělí na blokády levého ramínka, pravého ramínka a hemibloků. Při blokáde jednoho z ramínek dojde k pozdější aktivaci komory. Na EKG křivce se tento fakt projeví rozšířením komplexu QRS a negativní vlnou T.

Tachyarytmie

Jedná se o poruchu, kdy srdce pracuje rychleji než normálně. Tepová frekvence u tachykardie je >100 tepů/min. Rytmus může být jak pravidelný, tak nepravidelný.

Tachyarytmie může být způsobena poruchou automacie, kdy vzniká elektrický vzruch rychlou aktivací srdce z malého ložiska umístěného kdekoli v srdci. Druhým mechanismem vzniku tachyarytmie je rychlý kroužící elektrický vzruch, který krouží v srdeční svalovině, označovaný reentry. Obecně projevem tachyarytmie je rychlé bušení srdce (palpitace) s frekvencí >200 tepů/min, točení hlavy, dušnost a pocit tlaku na hrudi.

Sinusová tachykardie

Jedná se o tachykardii, která se vyskytuje nejčastěji. Projevuje se urychlením sinusového rytmu nad 100 tepů/min. Na EKG křivce lze zaznamenat přechod vlny P v komplex QRS a pozvolné urychlení a zpomalení srdeční frekvence. Dochází ke snížení srdečního výdeje, což způsobí zhoršení prokrvení tkání.

Komorová tachykardie

Definována jako nález tří a více komorových extrasystol s frekvencí 100-250 tepů/min. Na EKG křivce lze vidět tři a více po sobě následující široké komplexy QRS. Způsobuje nedostatečnou cirkulaci krve a v důsledku toho ztrátu vědomí.

Flutter síní

Vzniká v důsledku nepřetržitého kroužícího elektrického vzruchu v síních a je charakterizován stahy síní s frekvencí 250-300 tepů/min. Na EKG křivce lze zaznamenat štíhlé komplexy QRS v nepravidelných intervalech, protože pouze v některých stazích je elektrický signál převeden přes AV uzel na komory. Vlna P má špičatý tvar a je ve všech cyklech stejná. Rytmus se označuje poměrem QRS ku vlně P (např. 2:1, 3:1, ...).

Fibrilace síní

V obou síních vzniknou mnohočetné okruhy funkčních reentry. Reentry vznikají v levé síni a v srdeční svalovině okolo plicních žil, jedná se o tzv. arytmogenní ložiska. Ztrácí se mechanická kontrakce síní. Na EKG lze vidět nahrazení vlny P fibrilačními vlnkami, nepravidelná srdeční frekvence se štíhlými komplexy QRS.

Fibrilace komor

Jedná se o chaotickou elektrickou aktivitu vedoucí k nekoordinovaným kontrakcím komor vedoucí k náhlé zástavě oběhu. Na EKG křivce jsou komplexy QRS nahrazeny rychlými nepravidelnými vlnami. Pro obnovení srdeční frekvence je nutná okamžitá kardiopulmonální resuscitace.

Supraventrikulární arytmie

Jsou označovány jako extrasystoly neboli předčasné stahy. Vznikají z ložiska či ložisek ektopické aktivity mimo sinusový uzel a jsou dvojího typu, síňové a junkční.

Síňové extrasystoly

Síňové jsou charakterizovány tím, že vlna P má abnormální tvar a přichází dříve než vzruch z SA uzlu. Komplex QRS je štíhlého tvaru a po něm následuje kompenzační pauza. Neúplná kompenzační pauza se na EKG záznamu rozpozná tak, že součet pre a

post extrasystolového intervalu R-R je menší než dvojnásobek běžného R-R intervalu.

Junkční extrasystoly

Junkční jsou charakterizovány tím, že vlna P přichází dříve, nebo splývá s komplexem QRS. Junkční extrasystoly nemají kompenzační pauzu. Jsou vzácné a často se nedají odlišit od síňových extrasystol. Běžně se rozlišení na síňové a junkční nepoužívá, protože to nemá praktický ani klinický význam, dostačující je označení supraventrikulární extrasystoly.

Komorové arytmie

Do této skupiny patří kromě komorové tachykardie a fibrilace komor, které jsou popsány výše, také komorové extrasystoly, flutter komor a komorová zástava.

Komorové extrasystoly

Vznikají díky přítomnosti ektopického ložiska v převodním systému srdečním. Mohou se vyskytovat i u zdravých jedinců. Na EKG křivce lze zaznamenat abnormálně široký QRS komplex, kterému nepředchází vlna P. Po QRS komplexu následuje kompenzační pauza a poté lze vidět další rozšířený komplex QRS. Kompenzační pauza je obvykle rovna dvojnásobku intervalu RR.

Flutter komor

Oproti fibrilaci komor se vyskytuje ojediněle, ale se stejnou závažností. Na EKG křivce jsou vidět silné komorové komplexy ve formě pravidelných a vysokých kmitů o frekvenci 180-220 tepů/min.

4 PŘÍKLADY STUDIÍ TESTOVÁNÍ LÉČIV

V této kapitole jsou uvedeny 2 případové studie. První z nich se zabývá vlivem určených antidepresiv na ischemické poškození srdce. Druhá studie se zabývá vlivem variability srdeční frekvence na izolovaném srdci králíka. Obě studie ukazují, že sledování vlivu léčiva na elektrickou aktivitu srdce je přínosné, a to hlavně z důvodu objasnění používání vhodného léčiva a zamezení růstu počtu kardiovaskulárních onemocnění.

- **Účinek vybraných léčiv na funkci potkaních srdcí v podmínkách ischemicko-reperfúzního poškození [17]**

Studie popisuje depresi jako závažné onemocnění, kterým trpí čím dál více osob. S léčbou depresí dochází mimo jiné i k ovlivnění kardiovaskulárního systému. Cílem studie bylo zjistit přímý vliv určených antidepresiv na ischemicko-reperfúzní poškození myokardu

Ke sledování bylo použito izolované srdce perfundované podle Langendorffa. Po 10-minutové stabilizaci bylo po dobu 15 minut aplikováno antidepresivum v koncentraci 10^{-7} mol/l. Poté následovala 30 minutová ischemie a reperfúze po dobu 45 minut.

Studie došla k závěru, že antidepresivum amitryptilín způsobuje oslabení myokardu o 36% a zpomaluje srdeční frekvenci a citalopram o 32% u kterého se rozdíl u srdeční frekvence neprokázal. Ještě autoři dospěli k závěru, že všechna testovaná antidepresiva snižují průtok krve věnčitými tepnami. Během ischemicko-reperfúzního poškození došlo k oslabení kontraktility, snížil se průtok a zvýšil se počet dysarytmií. Studie prokázala, že vybraná antidepresiva při koncentraci 10^{-7} mol/l vedou k poruchám srdeční činnosti.

- **Prodloužený QT interval u neurovývojového modelu schizofrenie potkana [18]**

V této studii bylo zkoumáno prodloužení QT intervalu u neurovývojového modelu schizofrenie potkana. Prodloužení QT intervalu je rizikovým faktorem pro vznik komorových arytmií. Prodloužení QT intervalu mohou způsobit různé v běžné praxi užívané léky. Tato studie se zabývala účinkem antipsychotika haloperidolu u potkana.

Pro studium byl vybrán model izolovaného srdce potkana podle Langendorffa. Bylo použito 9 schizofrenních (MAM) srdcí a 6 kontrolních (CON). Schizofrenie byla indukovaná prenatálně intraperitoneálním podáním methylazoxymethanolu acetátu v 17. dni gravidity potkanům kmene Sprague-Dawley. Kontrolní skupině byl podán solný roztok. Potomci jedinců byli odstaveni 22. den a chováni po dvojicích. Podmínky chovu: relativní vlhkost 20 – 60%, teplota 23 ± 1 °C a dvanáctihodinový cyklus světlo-tma. Experiment byl prováděn jen na samcích.

Potkani byli uspáni, provedla se izolace srdce, které bylo uloženo do Krebs – Henseleitova roztoku o teplotě 4 °C. Srdce bylo připojeno na Langendorfovú perfúzní systém, který udržoval konstantní tlak 75 mmHg. Nejprve proběhla 20minutová stabilizace, následovalo promývání Krebs – Henselotovým

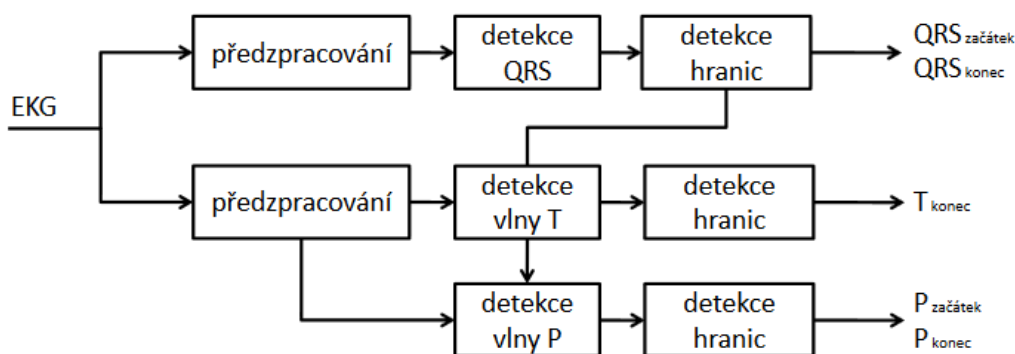
roztokem s přidaným lékem haloperidol o koncentraci 10 nmol/l po dobu 40 minut a dalších 40 minut vymývání. Běh experimentu byl průběžně zaznamenáván pomocí argent – chloridových elektrod. Elektrody byly zapojené do dvousvodového systému,. Signály byly zaznamenány se vzorkovací frekvencí 5 KHz. Následně bylo automaticky vyhodnoceno 10 po sobě jdoucích RR intervalů. QT intervaly byly změřeny manuálně.

V této studii nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi skupinami MAN a CON pro RR interval. Pro QT interval byl prokázán signifikantní rozdíl. Závěr studie prokázal, že prodloužení QT intervalu u modelu schizofrenie potkana se zvýrazní po podání antipsychotika haloperidolu[18]

V obou studiích se testoval vliv léčiv na elektrickou aktivitu srdce. Jako model bylo použito izolované srdce potkana podle Langendorffa. U obou studiích se jako model použilo izolované potkaní srdce podle Langendorffa. Tyto studie jsou uvedené pouze jako příklad. Mají poukázat, že i když potkan má jinou kanálovou výbavu, lze na jeho srdci prokázat vliv léčiv a srdce potkana lze tedy používat jako vhodný model ke studiu kardyototoxicity.

5 ANALÝZA EKG

Tato kapitola se zabývá obecným zpracováním záznamu EKG. Zpracování EKG signálu je složitý proces. EKG signál má svůj originální charakter, kterého lze při jeho zpracování využít. Pro zpracování EKG záznamu existují různé algoritmy lišící se složitostí, úspěšností detekce a rychlostí zpracovávání. Obecný princip rozměření EKG signálu je vidět na Obrázek 6. Rozměřené pozice jednotlivých vln poskytují informace o stavu srdce a ukazují jeho funkčnost.



Obrázek 6: Obecný princip zpracování EKG záznamu, převzato z [9]

Při snímání EKG nikdy nelze dosáhnout dokonalého signálu bez rušení. Rušení má za následek zastínění důležitých komponentů EKG signálu. Proto je prvním krokem tzv. předzpracování signálu, kterým se rozumí odstranění nežádoucích složek. Poté může následovat samotná detekce QRS komplexu, detekce hranic jednotlivých vln a kmitů a rozměření důležitých parametrů dle požadované analýzy.

5.1 Předzpracování signálu

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, předzpracováním se rozumí potlačení nežádoucích složek v signálu, tedy šumu. K potlačení nežádoucích složek se používá filtrace. Použité filtry se musí volit s ohledem na charakter a vlastnosti signálu, aby nedošlo k potlačení užitečného signálu. Rušivé signály rozlišujeme z hlediska jejich šířky na úzkopásmové a širokopásmové. Mezi úzkopásmové se řadí kolísání izoelektrické linie a síťový brum. Kolísání izoelektrické linie vzniká na rozhraní elektroda-kůže díky probíhajícím elektrochemickým procesům, dýcháním či pomalými pohyby pacienta. Ve spektru lze tyto elementy zaznamenat na frekvenci 0,8 Hz pro rozhraní elektroda-kůže, 0,5 Hz pro dýchání a 1,5 Hz pro pomalé pohyby pacienta. Síťové rušení, nazývané brum se vyskytuje na frekvenci 50 Hz a vzniká indukci napětí z rozvodné sítě. Mezi širokopásmové rušení se řadí myopotenciály. Vznikají při zátěžovém snímání EKG, kdy dochází k aktivnímu pohybu svalů pacienta. Ve spektru se toto rušení nachází na frekvenčním pásmu od 20 Hz do řádově kHz [37].

Pro odstranění rušení kolísáním nulové izolinie se používá filtr typu horní propust. Filtr musí mít lineární fázovou charakteristiku, aby nedošlo k fázovému zkreslení. Mezní kmitočet se volí podle frekvenčního obsahu spektra EKG signálu a srdeční frekvence.

K potlačení brumu se používá pásmová zádrž na kmitočtu $50 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$. Tato zádrž nemá zásadní vliv na změnu tvaru EKG. Lze ještě využít úzkopásmový filtr. Jedná se o nelineární filtr a jeho nevýhodou je, že způsobuje zkreslení.

Rušivé myopotenciály se vyskytují na frekvenci 20 Hz do řádově kHz. V tomto případě se nedoporučuje využívat lineární filtry, protože značně zkreslují komplexy QRS. Vhodnější je použití alternativních metod založených na kumulaci, nebo vlnkové transformaci. Kumulační metody pracují na principu zprůměrování jednoho srdečního cyklu s několika následujícími cykly. U této metody je důležité přesně synchronizovat komplexy QRS, aby došlo ke správnému průměrování. Metoda založená na vlnkové transformaci provádí rozklad EKG signálu na jednotlivé složky, které jsou pomocí vlnkové filtrace prahovány. Z upravených složek je zpět rekonstruován signál, ve kterém se již nenachází rušivé elementy [37].

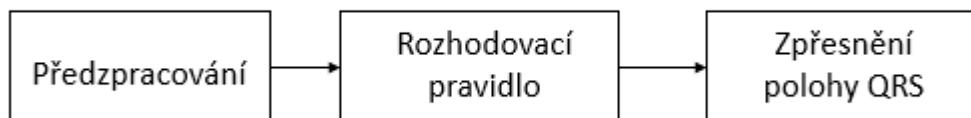
Doposud bylo popsáno obecné předzpracování EKG signálu. Pro analýzu při které dochází k rozměření EKG signálu je nutné používat filtraci, která je přizpůsobena procesu rozměření. Z Obrázek 6 je patrné, že pro detekci QRS je nutné jiné předzpracování, jak pro detekci vlny T a vlny P, což je dáno jiným rozložením energie komplexu QRS a těchto vln ve spektru. V případě rozměření EKG se filtrací snažíme zvýraznit úseky, které mají být detekovány a naopak potlačit ty úseky, které nejsou pro detekci důležité. V případě detekce QRS komplexu je nutné potlačit vlny P a T a naopak. Po filtraci následuje transformace signálu, která má za úkol ještě zvýraznit charakteristické vlastnosti detekovaných bodů.

5.2 Detekce QRS komplexu

Druhým krokem je detekce QRS komplexu. QRS komplex je nejdůležitější a nejmóraznější část signálu EKG. Detekce QRS je základní proces jakéhokoli algoritmu pro analýzu EKG záznamů. Poskytuje informace o tepové frekvenci, její variabilitě a referenci pro následnou klasifikaci dalších významných bodů.

Z literatury vyplývá, že existuje řada metod pro detekci komplexů QRS. Nejvíce se využívají algoritmy založené na první derivaci, vlnkové transformaci, genetických algoritmech a neuronových sítích. Méně využívané jsou metody založené na skrytých Markovovských řetězcích, průchodu nulou, nebo přizpůsobené filtraci [9].

Jednotlivé přístupy detekce se odlišují, ale obecně je lze popsat třemi kroky, které jsou vidět na Obrázek 7. Cílem předzpracování je zvýraznění komplexů QRS, které se pohybují ve frekvenčním pásmu od 10 do 30 Hz, a naopak potlačení nežádoucích složek. K tomu lze využít filtr typu horní propust, který slouží k odstranění vln P a T. Blok rozhodovací pravidlo značí detekci extrémů zvolnou metodou. Stručný přehled metod používaných k detekci extrémů je popsán níže. Poslední blok je zpřesnění polohy, který není podstatný pro samotnou detekci, slouží pouze pro korekci poloh komplexu QRS.



Obrázek 7: Schéma detektoru komplexu QRS

Detekce QRS založena na derivaci signálu

Metoda derivace EKG signálu je založena na principu zvýraznění QRS komplexu a k potlačení vln P a T. QRS komplex obsahuje vyšší frekvenční složky než vlny P a T. Tyto složky se v derivovaném signále promítnou výrazným strmým průběhem, který odpovídá komplexu QRS. Výpočet derivace diskrétního signálu lze provést odečtením sousedních vzorků.

$$y_1(n) = x(n + 1) - x(n - 1) \quad (1)$$

kde $y_1(n)$ je vstupní vzorek na pozici n a vzorky $x(n+1)$, $x(n-1)$ jsou vzorky, které následují a předcházejí vstupnímu vzorku.

Pro zvýraznění transformovaného signálu lze použít ještě výpočet druhé derivace.

$$y_2(n) = x(n + 2) - 2x(n) + x(n - 2) \quad (2)$$

Kde výsledný transformovaný signál je váhovaná lineární kombinace těchto dvou derivovaných signálů y_1 a y_2 .

K vyhodnocení pozic QRS se využívá porovnání transformovaného signálu s prahovou hodnotou. Prah se stanovuje buď pevný, nebo adaptivní podle charakteru signálu. Hodnota adaptivního prahu se stanovuje jako procentuální část z maxima hodnoty na daném úseku signálu. Hodnota pevného prahu se stanoví jako procentuální část z maxima hodnoty celého signálu. Finální detekce je pak zpřesněna pomocí rozhodovacích pravidel, které vyplývají z charakteru analyzovaného úseku signálu [9].

Metody založené na číslicové filtraci

Tyto metody využívají pro detekci QRS komplexu filtry typu horní propust, dolní propust, pásmová zadrž nebo nelineární filtry. Principem metody je sériové, nebo paralelní zapojení jednotlivých filtrů. Výstupy filtrů jsou dále lineární, nebo nelineární kombinovány.

U těchto metod lze kombinovat různé postupy. Například filtrace signálu pomocí dvou paralelních dolních propustí. Každá dolní propust má jiné mezní frekvence. Výsledný signál je určen jako rozdíl mezi výstupy z obou filtrů. Následně je výstup zpracován nelineární operací (3), která potlačí nízké amplitudy a vyhladí vrcholy. Signál je nakonec filtrován dolní propustí a vrcholy komplexu jsou určeny podle adaptivního prahu, který je určen z maxima signálu [9].

$$y_2(n) = y_1(n) \left[\sum_{k=-m}^m y_1^2(n+k) \right] \quad (3)$$

Další možný přístup je použití pásmové filtrace s následnou diferencí signálu. Diference signálu je umocněna na druhou a průměrována. Extrémy jsou detekovány podle stanoveného prahu.

Metody založené na neuronových sítích

Metody založené na umělých neuronových sítích se zejména využívají při klasifikacích a nelineárním zpracování EKG signálů. V řadě aplikací dosahují velmi dobrých výsledků oproti již zmíněným dvěma přístupům detekce. Pro aplikaci neuronových sítí při analýze EKG záznamu se využívá síť jako vícevrstvý perceptron (multiayer perceptron), funkce s radiální bází (radial basis function) a samoučící se síť (learning vector quantization) [9]. Každá z vyjmenovaných sítí má své výhody a nevýhody. Funkce s radiální bází se považuje za spolehlivější. Samoučící síť jsou naopak rychlé při výpočetních i klasifikačních postupech.

Pro detekci QRS komplexu se neuronové sítě využívají jako nelineární adaptivní prediktory. Princip je předpovědět současnou hodnotu signálu $x(n)$ díky znalosti jeho předešlých hodnot $x(n-i)$. Neuronová síť dobře předpovídá vzorky mimo komplex QRS a během něj dochází k náhlému zvýšení chyb predikce. Těchto bych se pak využije k následné detekci QRS komplexu.

Metody založené na vlnkové transformaci

Tyto postupy se v dnešní době řadí k neaktuálnějším přístupům jak při detekci komplexu QRS, tak při rozměření celého EKG signálu. Pro detekci komplexu QRS se využívá dyadická vlnková transformace s diskrétním časem. Princip metody spočívá ve hledání podobností napříč dyadickou škálou měřítek pomocí banky filtrů. Metoda je závislá na volbě vlnky. Vhodná volba vlnky způsobí výrazné potlačení rušivých elementů v signále a zároveň získá signál vhodný k detekci.

Většina detektorů založených na vlnkové transformaci využívají k detekci a klasifikaci rysů v signále lokálních maxim vlnkových koeficientů. Průběh QRS cyklu se v transformovaném signále projevuje jako dvojice opačných extrémů. Za potenciální QRS komplex je pak označen úsek, kde výskyt opačných extrémů se nachází v rámci několika charakteristických měřítek.

K úplnému určení kmitu R na základě Lipschitzova koeficientu α :

$$a_j = \log_2 |w_f(2^{j+1}, n^{j+1})| - \log_2 |w_f(2^j, n^j)| \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{\alpha_1 + \alpha_2}{2} \quad (5)$$

kde w_f jsou koeficienty vlnkové transformace v měřítku 2^j pro $j = 1 \dots n$.

Pokud $\alpha > 0$, dojde k potvrzení přítomnosti vlny R. A daný úsek je označen za QRS komplex, kde je přímo detekovaný kmit R.

Více o těchto metodách se lze dozvědět v dizertační práci Ing. Martina Vítka, PhD. [9].

Pro účely této diplomové práce se využil detektor z již zmíněné dizertační práce. Detektor je veřejně přístupný v databázi UBMI [48].

5.3 Metody pro detekci QT intervalu

Pro hodnocení vlivu léčiva se používá interval QT, který je v současné době označován jako zlatý standard [9]. Rozměření QT intervalu z EKG záznamu je spojeno s několika komplikacemi. Prvním problémem je přesná detekce začátku komplexu QRS a konce vlny T. K tomu se využívá řada metod, které budou popsány níže. Další komplikace je volba vhodného svodu. Je nutné volit svod, kde vlny a kmity mají dostatečnou amplitudu a nesplyvají dohromady, aby mohly být přesně detekovány. Pro analýzu QT intervalu se používá svod, v němž je tento interval nejdelší. Pokud se v tomto svodu překrývají vlny T a U doporučuje se měření intervalu QT ve svodu bez vlny U. Posledním faktorem znesnadňujícím kvalitní rozměření je výskyt nežádoucích složek v EKG záznamu. Mezi nežádoucí složky patří šum, jehož spektrum se překrývá se spektrem EKG signálu. QT interval je závislý na srdeční frekvenci a proto se zavádí korekce popsané v kapitole 5.4.

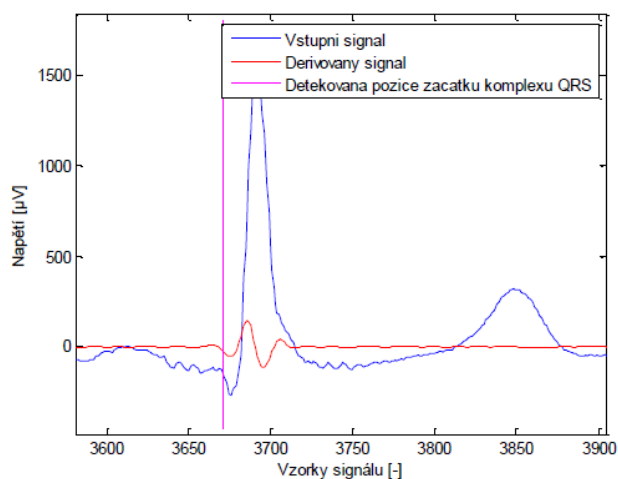
Interval QT je definovaný od začátku komplexu QRS, tedy kmitu Q po konec vlny T. Při detekci QT intervalu se nejprve detekuje začátek kmitu Q a následně konec vlny T. Řada studií popisuje různé metody a přístupy, avšak doposud nebyl nalezen vhodný algoritmus, který by byl dostatečně přesný. Z tohoto důvodu je detekce intervalu QT velkým předmětem zájmu a to především na konferenci Computing in Cardiology, která se zabývá výpočetní technikou v klinické kardiologii [34].

Obecně pro detekci QT intervalu existují 2 přístupy. První přístup shrnuje metody, které využívají amplitudových charakteristik vlny T. Z těchto metod lze jmenovat například derivační metodu, Philipsonovu metodu a mediánovou metodu. Druhý přístup spočívá ve vytvoření šablony a její korelace se signálem. Za konec vlny T je označen bod z konce šablony tam, kde šablona nejlépe kopíruje daný signál. Do druhého přístupu lze ještě zařadit metodu vlnkové transformace a metodu proložení polynomem druhého stupně [9], [35].

5.3.1 Detekce začátku Q, nebo detekce začátku komplexu QRS

Derivační metoda

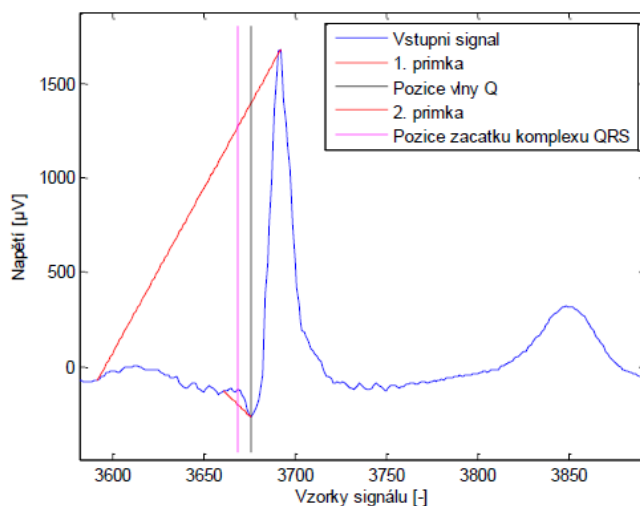
Pro detekci začátku komplexu QRS je signál filtrován pásmovou propustí k zvýraznění komplexu QRS. Poté je vypočtena první derivace. V derivovaném signálu se zjistí první extrém pomocí stanoveného prahu. Práh se stanovuje buď pevný, nebo adaptivní podle charakteru signálu. Algoritmus hledá první překročení nulové hodnoty před tímto extrémem. Tento bod odpovídá začátku komplexu QRS [35]. Derivační metoda je na Obrázek 8.



Obrázek 8: Derivační metoda pro detekci začátku QRS komplexu, převzato z [35]

Philipsova metoda

V této metodě je vytvořena přímka, která spojuje vrchol kmitu R a pozici signálu 200 ms před vrcholem. Kmit Q je pak detekován na pozici, kde je největší difference mezi vytvořenou přímkou a signálem. Následuje zjištění začátku kmitu Q, kdy je vytvořena druhá přímka, která spojuje maximum kmitu Q s bodem, který se nachází 50 ms před tímto maximum. Opět se zjistí největší difference a tento bod je označen jako začátek kmitu Q. Tato metoda má výhodu oproti ostatním v tom, že není závislá na změně tvaru vlny Q [40].



Obrázek 9: Philipsova metoda pro určení kmitu Q, převzato z [35]

Mediánová metoda

U této metody je detekce komplexu QRS provedena pomocí filtrace signálu filtrem typu pásmová propust 4. řádu s mezními frekvencemi 0,5-100 Hz. Následně jsou detekované vlny R pomocí překročení prahové hodnoty. Poté se určí začátek komplexu QRS, kmitu

Q. Pro určení začátku kmitu Q je vybrán úsek o velikosti 200 ms před kmitem R. V tomto úseku je pomocí plovoucího okna o délce 30 ms vyhledáván bod, který má minimální obsah amplitudy. Začátek vlny Q je vyhledávaný ve všech svodech EKG záznamu [34].

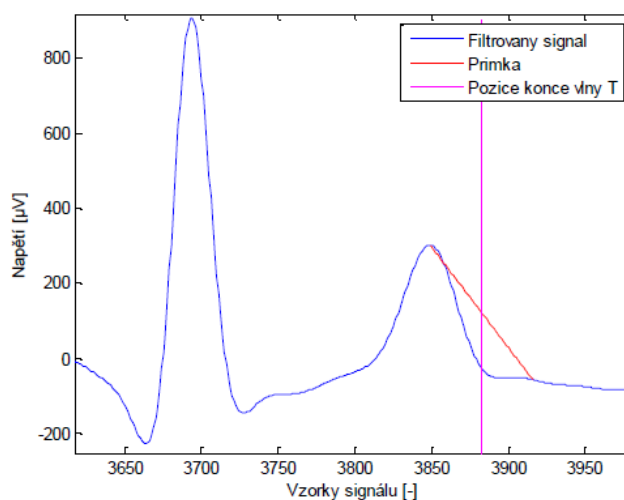
5.3.2 Detekce konce vlny T

Derivační metoda

Při detekování konce vlny T je za pozici vrcholu vlny T zjištěna pozice prvního extrému v derivovaném signálu. Práh je stanoven na desetinu z tohoto extrému. První následující hodnota v derivovaném signálu, která překročí práh, je označena jako konec vlny T [2], [35].

Philipsonova metoda

Obdobně jako začátek komplexu QRS se pomocí této metody detekuje konec vlny T. Zejména pro konec vlny T je tato metoda velmi účinná. Princip metody spočívá ve vytvoření přímky, která prochází vrcholem vlny T a bodem 100 ms za inflexním bodem sestupně části vlny T. Konec vlny T odpovídá největší hodnotě difference mezi přímkou a signálem. Výhodou metody je, že není závislá na změně tvaru vlny T během záznamu. Z tohoto důvodu se metoda doporučuje pro detekci QT intervalu v dlouhodobých Holterovských záznamech [40].



Obrázek 10: Philipsova metoda pro určení konce vlny T, převzato z [35]

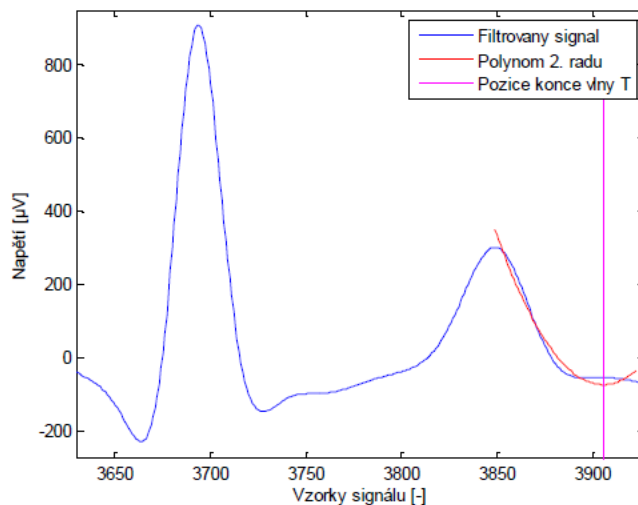
Prodloužení tečnou

Tato metoda je velmi podobná předchozí metodě s rozdílem, že při detekci konce vlny T přímka (tečna) prochází inflexním bodem a místo, kde se tečna protne s izolinií je označeno jako konec vlny T. Izolinie se stanoví z intervalu PQ [2], [35].

Prodloužení polynomem 2. stupně

Určení konce vlny T je provedeno pomocí prodloužení polynomem druhého stupně. Nejprve je nalezen vrchol vlny T, jako lokální maximum vyskytující se za komplexem QRS. Od pozice maxima je provedena aproximace polynomem druhého stupně

(parabola). V pozici, kde má parabola extrémní hodnotu se nachází konec vlny T.



Obrázek 11: Metoda prodloužení polynomem 2. stupně pro určení konce vlny T, převzato z [35]

Vlnková transformace

Tato metoda je založena na principu konvoluce vlnky se signálem. Pro použití algoritmu na lidské záznamy EKG je doporučena vlnka bior 1.5, měřítko 41. Výsledkem konvoluce je vyfiltrovaný a derivovaný signál. Nalezení konce vlny T je obdobné jako v derivační metodě, kdy se v derivovaném signálu hledá hodnota, která překročí práh stanovený na desetinu hodnoty extrému [9], [35].

Metoda založená na použití templátu

Výhodou této metody je, že se nejvíce přizpůsobuje morfologii vlny T. Nejprve je vybrán úsek signálu, ve kterém se nachází QRS komplex a vlna T. Poté je ručně vytvořena šablona QT intervalu. Tato metoda lze využít na detekci jak celého intervalu QT, tak na jednotlivé části, tedy začátek kmitu Q a konec vlny T. Rozdíl spočívá ve vytvoření dvou templátů místo jednoho. Poté opět následuje korelace jedné šablony se signálem a následně druhé šablony se signálem. Tam kde jsou korelace maximální, se určí podle šablony začátek kmitu Q a konec vlny T. Tato metoda je závislá na tvaru a délce šablony. Zmíněný přístup použili autoři článku [41] pro vytvoření programu, který hodnotí variabilitu QT intervalu v dlouhodobých záznamech. Tento program slouží v klinické praxi, kde v reálném čase získává a analyzuje QT interval [41], [42].

5.4 Závislost QT intervalu na frekvenci

QT interval představuje repolarizaci komor, jejíž délka trvání je závislá na srdeční frekvenci. Při vzrůstající srdeční frekvenci dochází ke zkracování QT intervalu a naopak. Pro odstranění vlivu závislosti na srdeční frekvenci byla navržena řada postupů. Použitím těchto postupů lze získat tzv. korigovaný QT interval označovaný jako QTc.

Mezi nejznámější korekční způsoby patří Bazettův vzorec (6), stanovený na základě QT intervalů u 39 osob. Bazettův vzorec dělí naměřenou délku QT intervalu druhou odmocninou RR intervalu. RR interval představuje časový úsek mezi dvěma po sobě jdoucími komplexy QRS [43].

$$QT_{cB} = \frac{QT}{\sqrt{RR}} \quad (6)$$

Další korekční způsobem je výpočet podle Fredericiho vzorce (7). Tento vzorec je podobný Bazettovu, ale místo druhé odmocniny je použita třetí odmocnina z intervalu RR.

$$QT_{cF} = \frac{QT}{\sqrt[3]{RR}} \quad (7)$$

Třetím způsobem je Framinghamův vzorec (8) ve kterém je ke QT intervalu přičtena stanovená hodnota. HR (hear rate) je srdeční frekvence.

$$QT_{cFra} = QT + 154 * \left(\frac{1 - 60}{HR}\right) \quad (8)$$

Dalším způsobem je korekce podle Hodgesova vzorce (9), kde se k intervalu QT opět přičítána hodnota, která je závislá na srdeční frekvenci.

$$QT_{cH} = QT + 1,75 * (HR - 60) \quad (9)$$

Ze studie [43] vyplývá že vzorec (6), (7) a (8) jsou více ovlivněny srdeční frekvencí než vzorec (9). I přes tuto skutečnost u všech způsobů korekce autoři článku [43] prokázali vliv testovaného parametru na QT interval, z čehož lze usoudit, že všechny uvedené postupy korekce jsou vhodné. Při vyšší frekvencích se doporučuje používat Fredericiho vzorec, protože je přesnější [43].

6 PERIMENTY NA IZOLOVANÝCH ZVÍŘECÍCH SRDCÍCH

Tato kapitola podává informace o zpracovávaných datech. Popisuje průběh experimentů a veškeré informace o zaznamenávaných signálech. Pro účely této diplomové práce byla použita data ze dvou experimentů. První sada dat je z experimentů, na kterých se sledoval vliv nově syntetizovaného léčiva. Na těchto datech proběhla manuální klasifikace a vyhodnocení vlivu testovaného léčiva. Druhá sada dat pochází z podobného experimentu, který byl publikován na konferenci Cinc v roce 2016 [18]. Na této sadě dat probíhala tvorba a testování algoritmu pro automatické rozměření dat. Informace o datech z obou experimentů jsou popsány v této kapitole.

6.1 Experimenty s aplikací betablokátorů

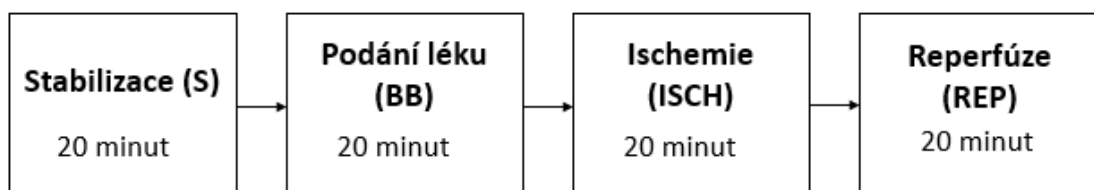
Experimenty pro účely hodnocení vlivu nově syntetizovaného beta-blokátoru byly prováděny v Laboratoři experimentální kardiologie Fyziologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Pro zkoumání byly vybráni potkani kmene Wistar, samci o hmotnosti 300 – 350g. Byly rozděleny 3 skupin: negativní kontrola (NK), pozitivní kontrola (PK) a testovaná látka (TL). Každá skupina obsahovala 3 experimenty. V experimentech skupiny PK byla podána látka carvedilol, který je popsána v kapitole 2.1.3. Testovaná látka s označením TP1 je nově vyvinutá. Podle chemické struktury se řadí mezi beta-blokátory. Nicméně její účinky na srdce dosud nebyly zkoumány. Experiment byl zaměřen na studium vlivu této látky na srdce v koncentraci 40 nmol/l. Aplikovaná koncentrace vychází ze studie [39], kde byl prokázán kardioprotektivní účinek carvedilolu na ischemicko-reperfuční poškození srdce. Ze studie je zřejmé, že koncentrace 10^{-6} mol/l ovlivňuje vedení vzruchu ze síně na komory. Koncentrace 10^{-8} mol/l ovlivňuje vedení vzruchu přes komory. Možno proto předpokládat, že zvolená koncentrace by měla ovlivňovat vedení ze síně na komory a prodlužovat tak PQ interval.

Experiment by proveden na izolovaném srdci dle Langendorffa. Obecný popis modelu se nachází v kapitole 3.2.

Při experimentu byla zvířata uvedena do anestezie. Následně byl zvířatům zlomen vaz a z hrudníku vyjmuto srdce s dostatečně dlouhou částí aorty. Srdce bylo umístěno do K-H roztoku o teplotě 4 °C (NaCl, 118 mM; NaHCO₃, 27 mM; KCl, 4,8 mM; KH₂PO₄, 1,0 mM; MgSO₄, 1,2 mM; CaCl₂, 1,2 mM; glukósa, 10 mM). Srdce bylo připojeno na Langendorfovův perfuční systém a bylo promýváno K-H roztokem o konstantní teplotě 37°C. Průtok roztoku byl udržován peristaltickým čerpadlem na konstantním tlaku 75 mmHg.

Nejprve proběhla 20 minutová stabilizace (S). Poté následovala fáze promývaná (BB) K-H roztokem s přidaným lékem (dle skupiny). Skupině NK byl během této fáze aplikovaný pouze čistý K-H roztok. Skupině PK lék carvedilol a skupině TL nová látka. Následovala fáze ischemie (ISCH) a po ní poslední fáze reperfúze (REP). Průběh celého

experimentu je na Obrázek 12. V průběhu stabilizace, konkrétně ve 12 minutě došlo k zapnutí lineárního dávkovače léku (Pumpa on). Lék z lineárního dávkovače se do srdce dostal za 8 minut, tedy na začátku fáze BB.



Obrázek 12: Schéma průběhu experimentů s aplikací beta-blokátoru.

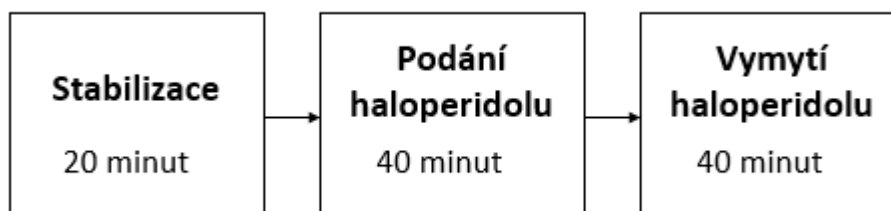
Elektrogram byl průběžně snímán pomocí arqent – chloridových elektrod. Elektrody byly zapojené do devítisvodového systému. Signál byl zaznamenáván pomocí systému Compact Langendorff (MDE, Německo) se vzorkovací frekvencí 1 kHz.

6.2 Experimenty s aplikací haloperidolu

Experimenty byly prováděny na potkanech kmene Spraque-Dawley s indukovanou neurovývojovou porucou projevující se schizofrenním fenotypem. Tyto potkani tvořili skupinu schizofrenní v počtu 9. Skupina kontrolní obshovala 6 jedinců.

Potkani byli uvedeni do hluboké anestezie a byla provedena izolace srdce. Srdce bylo vyjmuto s dostatečně dlouhou částí aorty a umístěno do Krebs – Henseleitova (K-H) roztoku o teplotě 4 °C. Srdce bylo připojeno na Lanqendorffův perfúzní systém, který udržoval konstantní tlak 75 mmHg.

Nejprve proběhla 20minutová stabilizace, následovalo promývání Krebs – Henselotovým roztokem s přidaným lékem haloperidol o koncentraci 10 nmol/l po dobu 40 minut a dalších 40 minut vymývání. Elektrogram izolovaného srdce byl kontinuálně zaznamenáván pomocí stříbro – chloridových elektrod. Elektrody byly zapojené do dvousvodového systému, jeden svod směřoval do levé komory a druhý svod byl na něj kolmý. Signály byly zaznamenány pomocí NI USB-6229 BNC (National Instruments, TX, USA) se vzorkovací frekvencí 5 kHz.

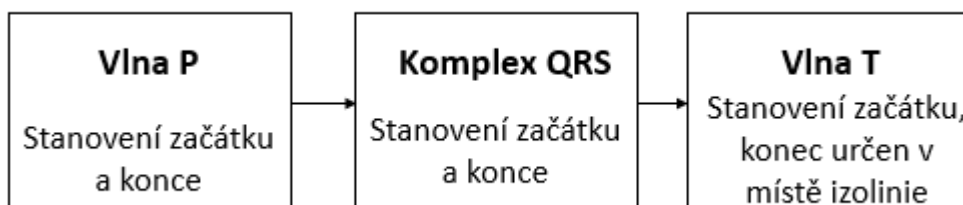


Obrázek 13: Schéma jednotlivých fází experimentů s aplikací haloperidolu a jejich časy trvání

Tyto experimenty poskytly sadu 5 experimentálních záznamů, která byla použita pro vytvoření algoritmu pro účely této diplomové práce.

6.3 Manuální rozměření elektrogramů s aplikací haloperidolu

Pro tvorbu algoritmu bylo potřeba zjistit referenční hodnoty vln a kmitů potkaního EKG záznamu za normálních podmínek (tj. ve stabilizaci). Vzhledem k tomu, že tyto hodnoty nejsou stanoveny obecně, bylo nutné rozměřit experimenty manuálně. Manuální zpracování všech pěti experimentálních záznamů bylo provedeno v programovém prostředí MATLAB. Toto manuální rozměření se použilo pouze pro tvorbu algoritmu. Byly rozměřeny začátky a konce vlny P, komplexu QRS a vlny T. Rozměřování probíhalo ve 3 úsecích signálu v období stabilizace, v každém úseku signálu bylo rozměřeno 10 cyklů podle následujícího schématu Obrázek 14.



Obrázek 14: Schéma manuálního rozměření EKG záznamů s aplikací haloperidolu

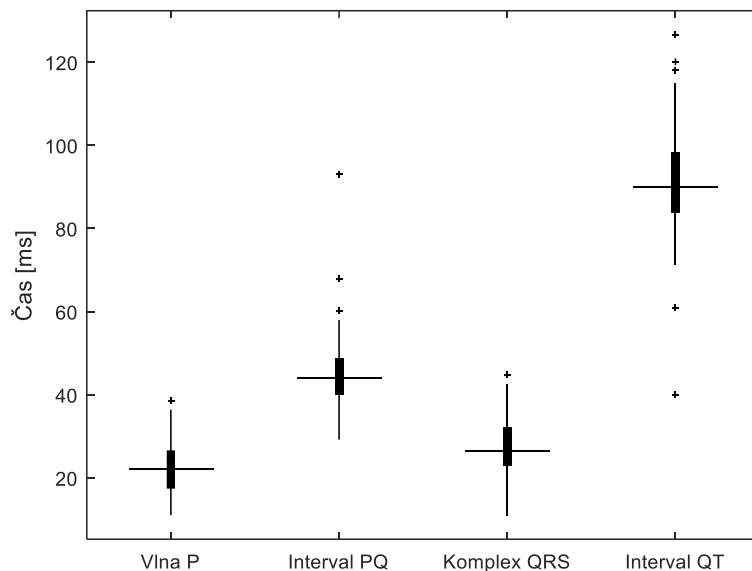
Manuální rozměření bylo provedeno jednou osobou (autorkou práce) za použití stejného zařízení a monitoru s dostatečnou rozlišovací schopností. Chybu, která mohla během rozměřování vzniknout, lze považovat za systematickou. Hodnoty rozměření byly statisticky zpracovány (Obrázek 15) a byly získány maxima, minima a medián trvání vlny P, intervalu PQ, komplexu QRS a intervalu QT, které jsou uvedeny v Tabulka 5.

Tabulka 5: Hodnoty manuálního rozměření

Název	Maximální délka [ms]	Minimální délka [ms]	Mediánová hodnota délky [ms]
Vlna P	11	38,4	22,2
Komplex QRS	11	44,8	26,4
Interval QT	40	126,6	90
Interval PQ	29,2	91,2	44

Druhé manuální rozměření dat bylo provedeno expertem v oblasti elektrokardiografických dat (externí vedoucí práce). Pro tento účel byl použit software

dostupný na UBMI [45]. Analýza byla provedena na stejném zařízení s monitorem, který měl dostatečnou rozlišovací schopnost. Chybu, která mohla během manuálního rozměření vzniknout, lze považovat za systematickou. Expertní rozměření záznamu bylo použito pro hodnocení kvality rozměřovacího algoritmu.



Obrázek 15: Výsledek manuálního rozměření

7 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Pro vyhodnocování experimentálních dat v medicínském a biologickém výzkumu se využívá řada statistických metod založených na testování statistických hypotéz. Výběrová data jsou získána měřením náhodné veličiny v experimentu. Díky statistické analýze výběrových dat lze rozhodnout o platnosti určitého tvrzení, které se nazývá statistická hypotéza.

Experiment je prováděn na sledovaných jednotkách, které se řadí do různých skupin podle použité pokusné intervence. Nejčastěji se volí tzv. komparativní metody. U těchto metod se pracuje minimálně se dvěma skupinami (kontrolní a pokusná). Kontrolní skupina obvykle není vystavena pokusné intervenci. Skupina vystavená intervenci se nazývá experimentální. Experimenty lze provádět i s několika ošetřenými skupinami. Cílem statistické analýzy experimentálních dat je zjistit a kvantitativně specifikovat rozdíly mezi jednotlivými skupinami [47].

Statistická hypotéza

Testování statistických hypotéz je jedna ze základních metod statistiky. Principem této metody je rozhodnout na základě informací z náhodných výběrů, zda přijmeme, či zamítneme určitou hypotézu. Statistická hypotéza je tvrzení, které se může týkat neznámých parametrů, daných funkcí parametrů, nebo také tvaru rozdělení základního souboru. Statistickou hypotézou může být tvrzení [47]:

- daný náhodný výběr pochází z normálního rozdělení,
- 2 náhodné výběry pocházejí ze stejného rozdělení,
- 2 náhodné výběry jsou z rozdělení, která mají stejnou střední hodnotu nebo rozptyl.

Platnost či neplatnost hypotézy lze určit pomocí statistických testů. Jestliže sledované parametry pochází ze známého rozdělení náhodné veličiny, nejčastěji Gaussovo normální rozdělení, k analýze lze využít parametrické testy. V opačném případě se statistické hypotézy týkají obecných vlastností základního souboru a příslušný test nevyžaduje znalost typu rozdělení v souboru, v tomto případě lze využít neparametrické testy.

Nejprve je nutné formulovat statistickou hypotézu, které bude následně testována. Statistická hypotéza má dvě formy, nulovou a alternativní. Tyto dvě formy se při testování kladou proti sobě.

- Nulová hypotéza: tvrzení, které vyjadřuje žádný neboli nulový rozdíl mezi testovanými soubory dat.
- Alternativní hypotéza: tvrzení, které popírá platnost nulové hypotézy, vyjadřuje existenci difference nebo závislosti mezi soubory.

Dalším krokem při testování hypotéz je určení hladiny významnosti. Hladina významnosti je pravděpodobnost, že se zamítne nulová hypotéza, i když platí. Pro biologická data se používá hladina významnosti 0,05, nebo 0,01. Volbou hladiny významnosti se udává síla testu. Posledním krokem je výběr správného testu. V tomto případě je nutné si uvědomit, co má být testované a kolik skupin má testem projít.

Přehled pro správný výběr statistického testu je na Obrázek 16, [44], [47].

1. krok	Testy normálního rozdělení (distribuce)	
	<ul style="list-style-type: none"> · Shapiro-Wilkův test pro menší soubory ($n < 50$) · Kolmogorov-Smirnovův test pro menší i větší soubory · Chi-kvadrát test (X^2) 	
2. krok	PARAMETRICKÉ TESTY	NEPARAMETRICKÉ TESTY
Testy pro nezávislé výběry, nezávislé vzorky (nepárové hodnoty)	<ul style="list-style-type: none"> · Studentův t-test dvouvýběrový pro nepárové hodnoty (jednoduchá varianta ANOVA) · Jednovýběrový test pro srovnání s jednou hodnotou (např. referenční) · Složitější varianty ANOVA pro srovnání více průměrů · Snedekorův F-test 	<ul style="list-style-type: none"> · Wilcoxonův nepárový test (Mann-Whitneův U test) pro nezávislé vzorky (dvouvýběrový) · Mediánový test · Kolmogorov-Smirnovův test pro dva výběry · Kruskal-Wallisův test pro více než dva nezávislé výběry (T_K)
Testy pro závislé výběry, závislé vzorky (párové hodnoty)	<ul style="list-style-type: none"> · Studentův t-test dvouvýběrový pro párové hodnoty 	<ul style="list-style-type: none"> · Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky (jednovýběrový) · Friedmanův test (Friedmanova ANOVA) pro více než dva závislé výběry (T_F) · Znaménkový test · McNemarův X^2 test
Testy korelace	<ul style="list-style-type: none"> · Jednoduchá lineární korelační analýza (Pearsonův korelační koeficient r) · Lineární regrese · Nelineární regrese · ANOVA jako test závislosti jevu na jednom či více faktorech 	<ul style="list-style-type: none"> · Spearmannův test pořadové korelace (Spearmanův koeficient r_s nebo R) · Chi-kvadrát test (X^2) · Kendallův test pořadové korelace

Obrázek 16: Tabulka statistických testů, převzato z [44]

Pro účely této práce se použili tři statistické testy. Pro ověření, zda data pochází z normálního rozdělení, se použil Kolmogorovův–Smirnovův test. Pro hodnocení jednoho výběru Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky a pro hodnocení tří výběrů Kruskal-Wallisův test pro více než dva nezávislé výběry.

7.1.1 Kolmogorovův–Smirnovův

Je statistický test, který zjišťuje, zda náhodné proměnné pocházejí ze stejného pravděpodobnostního rozdělení. Nulová hypotéza předpokládá, že testovaný soubor má normální pravděpodobnostní rozdělení. Alternativní hypotéza pak předpokládá, že testovaný soubor nemá normální pravděpodobnostní rozdělení. Test nejprve uspořádá hodnoty podle velikosti od nejmenšího po největší a poté testuje pomocí vzorce (10). Tento test lze použít i v případě malých náhodných výběrů.

$$D_n = \max \left\{ \left| F(x_{(i)}) - \frac{i-1}{n} \right|, \left| F(x_{(i)}) - \frac{i}{n} \right| \right\} \quad (10)$$

$$i = 1, 2, \dots, n$$

Je-li $D_n \geq D_\alpha$ zamítáme nulovou hypotézu [46].

7.1.2 Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky

Používá se pro hodnocení párových pokusů u vzorků, které neodpovídají normálnímu rozdělení. Test porovnává dvě měření z jednoho experimentu a testuje hypotézu, že distribuční funkce těchto měření jsou si rovny. Výpočet vychází z porovnání veličin X a X' (X je měření před pokusným zásahem, X' je měření po pokusném zásahu). Test zjistí rozdíly mezi párovými hodnotami (veličina z). V případě shody párových hodnot jsou rozdíly nulové, a ty se z dalšího hodnocení vyřadí. Nenulové rozdíly jsou uspořádány vzestupně v absolutní hodnotě.

Např: $|+z_3| < |-z_1| < |+z_4| < |+z_2| < |-z_5| < \dots \dots n$

n = počet párů s nenulovým rozdílem.

Poté je každému rozdílu z_n přiřazeno pořadí. Testuje se nulová hypotéza H_0 : rozdělení veličin X a X' je shodné, oproti alternativní hypotéze H_a : rozdělení veličin X a X' není shodné. Test se hodnotí podle vzorce (11). Pokud jsou rozdíly symetrické kolem 0, z čehož vyplývá, že součty kladných a záporných hodnot by měly být rovny 0, platí nulová hypotéza.

$$W_+ + W_- = \frac{n * (n + 1)}{2} \quad (11)$$

W_+ - součet pořadí odpovídajících kladným rozdílům

W_- - součet pořadí odpovídajících záporným rozdílům

$$W = \min(W_+, W_-) \quad (12)$$

Hodnota W se porovná s tabelovanou hodnotou podle příslušného n a zvolené hladiny významnosti. Je-li $W < W(a, n)$ dojde k zamítnutí nulové hypotézy a přijetí alternativní hypotézy, v opačném případě je tomu naopak. Pokud dojde k zamítnutí nulové hypotézy, znamená to, že pokusný zásah byl účinný [47].

7.1.3 Kruskal-Wallisův test pro více než dva nezávislé výběry

Tento test je zobecněním Wilcoxonova dvouvýběrového testu. Patří do skupiny neparametrických testů, takže není nutné, aby data pocházela z normálního rozdělení. Tento test se používá pro porovnání dvou a více výběrů. Pro tento test uvažujeme n nezávislých výběrů. Předpokládejme, že každý výběr pochází z nějakého rozdělení se spojitou distribuční funkcí. Testuje se hypotéza H_0 : všechny výběry pochází ze stejného rozdělení, oproti alternativní hypotéze H_A : všechny výběry nepochází ze stejného rozdělení.

Podobně jako u Wilcoxonova dvouvýběrového testu jsou data seřazena do rostoucí posloupnosti a je určeno jejich pořadí. Součet pořadí prvků v i -tém výběru se

označí T_i . Pro určení platnosti hypotézy je pak testovaná statistika podle rovnice (13) [46], [47].

$$Q = \frac{12}{n * (n + 1)} \sum_{i=1}^I \frac{T_i}{n_i} - 3(n + 1) \sim X_{I-1}^2 \quad (13)$$

Jestliže $Q \geq X_{I-1}^2(\alpha)$, zamítá se nulová hypotéza na hladině významnosti, která se rovna α . Při zamítnutí nulové hypotézy tedy platí tvrzení, že všechny výběry nepochází ze stejného rozdělení. Poté je nutné určit, které výběry se mezi sebou liší. K tomu lze využít Bonferroniho metodu mnohonásobného porovnání. Metoda porovnává všechny možné dvojice průměrů pomocí modifikovaného dvouvýběrového t-testu s upravenou hladinou významnosti $(I*(I-1)/2)$. Nulová a alternativní hypotéza je pak stejná jako pro dvouvýběrový t-test a testuje se podle rovnice (14).

$$T = \frac{\widehat{\mu}_1 - \widehat{\mu}_2}{\sqrt{s^2 * (\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}} \quad (14)$$

$\widehat{\mu}_1$ a $\widehat{\mu}_2$ jsou výběrové průměry v první a druhé skupině a s^2 je vážený průměr výběrového rozptylu. Po úpravě podle Bonferroniho metody se testuje nulová hypotéza podle rovnice (15). S_E značí reziduální rozptyl a f_E značí stupně volnosti.

$$T = \frac{\widehat{\mu}_1 - \widehat{\mu}_2}{\sqrt{\frac{S_E}{f_E} * (\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j})}} \quad (15)$$

Pokud platí $|T| \geq t_{I - \frac{I-1}{2}, \frac{\alpha}{2}}(N - I)$ platí nulová hypotéza. Hodnota $t_{I - \frac{I-1}{2}, \frac{\alpha}{2}}(N - I)$

je tabelovaná kritická hodnota Studentova rozdělení (viz statistické tabulky) [46].

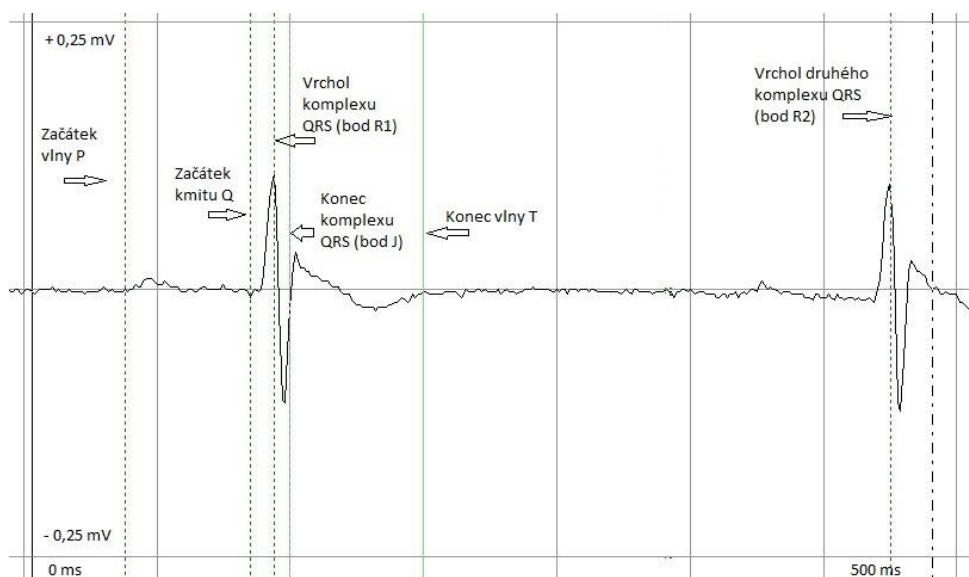
8 ANALÝZA EXPERIMENTÁLNÍCH EKG

V této práci byly zpracovány signály získané při experimentech, které probíhali na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně za účelem testování nového léku. Pro získání záznamu a manuální klasifikaci byl použit SPEL Advanced Haemosys software dostupný na Lékařské fakultě. Automatická analýza a statistické vyhodnocení bylo provedeno v programovém prostředí Matlab.

Data získaná z experimentů byla nejprve manuálně a poté automaticky rozměřena a následně statisticky vyhodnocena. Veškerá analýza dat je podrobně popsána v této kapitole. Hodnocena byla změna délky intervalu QT, která může poukazovat na proarytmogéní účinek léku, dále pak intervaly RR, PQ a komplex QRS.

8.1 Manuální zpracování elektrogramů

Pro manuální zpracování dat se použil software s názvem SPEL Advanced Haemosys. Tento software umožňoval rozměření 11 pozic v každém cyklu P-QRS-T. Pozice: začátek vlny P, vrchol vlny P, konec vlny P, začátek kmitu Q, vrchol kmitu Q, vrchol komplexu R1, bod J (junkční bod), začátek vlny T, vrchol vlny T a konec vlny T a vrchol následujícího komplexu R2. Z těchto bodů pak software určil hodnoty RR, HR, P,Q,R,T, úsek ST, PQ, QRS, QT, QTcb, QTcf, QTcv. Pro hodnocení EKG záznamu byly určeny vyhodnocované úseky. Tyto úseky stanovil expert v oblasti kardiologie (externí konzultant práce). Tyto úseky jsou popsány v tabulce pod tímto textem (Tabulka 6).



Obrázek 17: Ukázka rozměření významných bodů pomocí software SPEL Advanced Haemosys

Tabulka 6: Místa v EKG záznamu na kterých probíhalo manuální rozměření

<i>Název místa</i>	<i>Zkratka</i>	<i>Pozice místa</i>
<i>Pumpa on</i>	P1	1 minuta před zapnutím pumpy
<i>Pumpa on 2</i>	P2	1 minuta po zapnutí pumpy
<i>Stabilizace</i>	S1	20. minuta stabilizace
<i>Betablokátor 1</i>	BB1	1 minuta po podání látky
<i>Betablokátor 5</i>	BB5	5 minut po podání látky
<i>Betablokátor 10</i>	BB10	10 minut po podání látky
<i>Betablokátor 15</i>	BB15	15 minut po podání látky
<i>Betablokátor 20</i>	BB20	20 minut po podání látky
<i>Ischemie1</i>	ISCH1	1. minuta ischemie
<i>Ischemie5</i>	ISCH5	5. minuta ischemie
<i>Reperfúze5</i>	REP5	5. minta reperfúze
<i>Reperfúze 15</i>	REP15	15. minuta reperfúze
<i>Reperfúze 20</i>	REP20	20. minuta reperfúze

Manuální hodnocení probíhalo tak, že nejprve byl z celého záznamu vybrán stanovený úsek zájmu. Poté následovalo přesné vybrání dvou po sobě jdoucích P-QRS-T cyklů. Software poté umožňoval automatické rozměření pozic jednotlivých vln a kmitů podle jeho implementované metody. Ukázka rozměření významných bodů pomocí systému je na Obrázek 17. Poté proběhla vizuální kontrola těchto stanovených pozic, popřípadě upřesnění jejich polohy. Následné vyexportování pozic do formátu .csv. Tento .csv soubor sloužil pro statistickou analýzu. Toto manuální hodnocení bylo prováděno jednou osobou (autorkou práce) na jednom zařízení. Monitor tohoto zařízení měl dostatečnou rozlišovací schopnost. Chyby, které mohly během manuálního rozměření vzniknout, lze považovat za systematické, protože hodnotil stejný systém a stejná osoba. Toto manuální rozměření lze považovat pro účely této práce za zlatý standard, právě protože byl použit software i vizuální hodnocení osobou.

8.1.1 Statistické vyhodnocení manuálního rozměření EKG záznamů

Z manuálně vyhodnocených dat byla provedena statistická analýza pomocí testů popsaných v kapitole 7, za použití programového prostředí Matlab. Při statistické analýze byly vyhodnoceny intervaly RR, PQ, QRS a QT.

Nejprve došlo k testování normality dat. K tomuto účelu byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test popsaný v kapitole 7.1.1. Tento test byl vybrán z toho důvodu, že ho lze použít na malém počtu dat. Z testu vyplynulo, že data nepocháží

z normálního rozdělení, a proto je nutné používat neparametrické statistické testy.

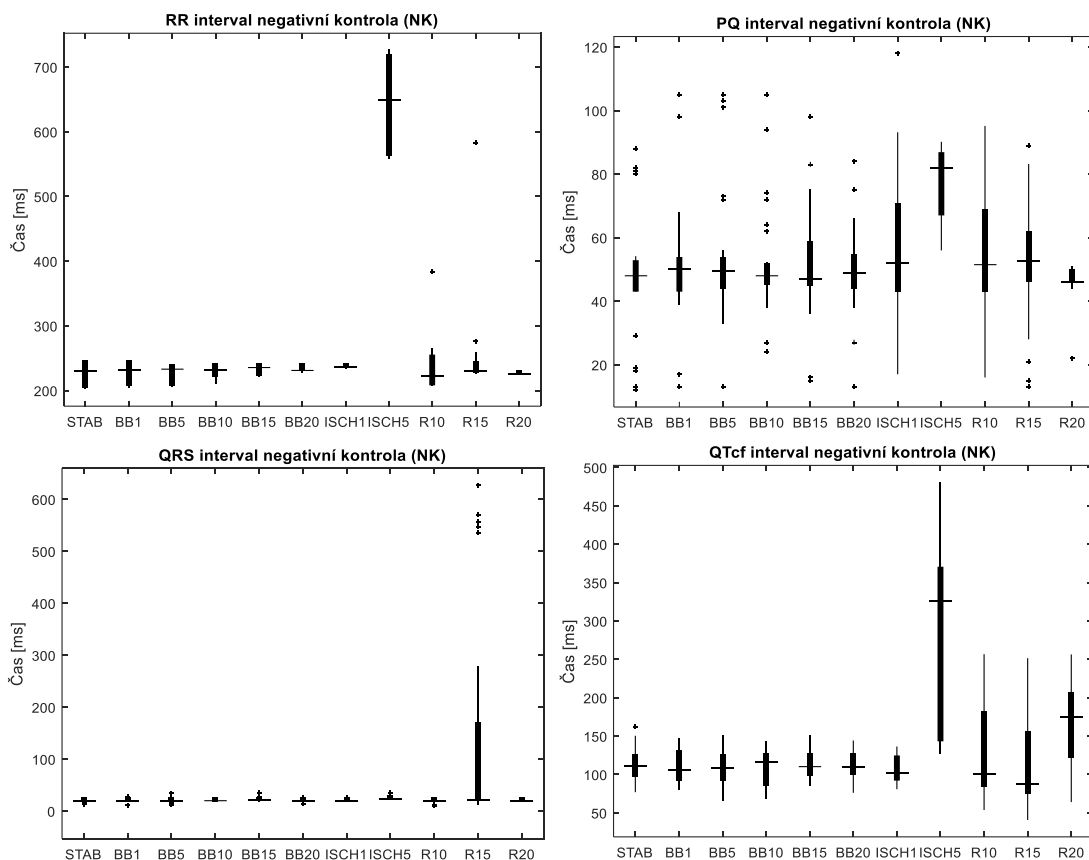
Následně byly vyhodnoceny změny v rámci každé experimentální skupiny. Pro tyto účely byl použit Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky popsany v kapitole 7.1.2. Tento test zjišťoval, zda aplikace látky má nebo nemá vliv na změnu určených intervalů. Za hladinu významnosti byla považována hodnota $p < 0.05$.

Výsledky srovnání všech vyhodnocovaných intervalů párového statistického testu pro negativní kontrolu (NK) lze vidět v Tabulka 7. Pokud je hodnota $p < 0,005$ je potvrzena nulová hypotéza, která říká, že došlo ke změně analyzovaného intervalu.

Tabulka 7: Výsledky Wilcoxonova testu pro negativní kontrolní skupinu (NK)

Parametry porovnání	p hodnota RR	p hodnota PQ	p hodnota QRS	p hodnota QTcf
P1 x P2	0,997	0,7671	0,998	0,9117
P1 x S1	0,1022	0,2077	0,0963	0,105
S1 x BB1	0,7833	0,3313	0,3447	1
S1 x BB5	0,5334	0,4063	0,141	0,8418
S1 x BB10	0,5048	0,6729	0,0352	0,8883
S1 x BB15	0,4632	0,5338	0,0243	0,5997
S1 x BB20	0,3688	0,2479	0,1375	0,61
BB20 x ISCH1	$9,9 e^{-4}$	0,4591	0,8073	0,1119
BB20 x ISCH5	$2,8 e^{-11}$	$7,3 e^{-10}$	$1,6 e^{-7}$	$2,14 e^{-10}$
BB20 x R10	0,0178	0,4029	0,3526	0,9705
BB20 x R15	0,2465	0,5738	0,1807	0,217
BB20 x R20	$2,8 e^{-6}$	0,1174	0,6817	0,0047
S1 x ISCH1	0,0266	0,0867	0,1034	0,0867
S1 x ISCH5	$2,8 e^{-11}$	$1,9 e^{-8}$	$6,4 e^{-9}$	$1,9 e^{-8}$
S1 x R10	0,5574	0,0735	0,053	0,0735
S1 x R15	0,3695	0,1254	0,0311	0,1254
S1 x R20	0,12	0,672	0,1471	0,0043

Z tabulky je zřejmé, že v rámci negativní kontrolní skupiny (NK) nedošlo k signifikantním změnám v žádném z intervalů až do fáze ischemie (označení ISCH1 a ISCH5). Na Obrázek 18 jsou zobrazeny krabicové grafy všech analyzovaných intervalů. Z těchto grafů je zřejmé, že u kontrolní skupiny zvířat (NK) došlo po pěti minutách ischemie (ISCH5) k signifikantnímu prodloužení RR, PQ a QTcf intervalu.

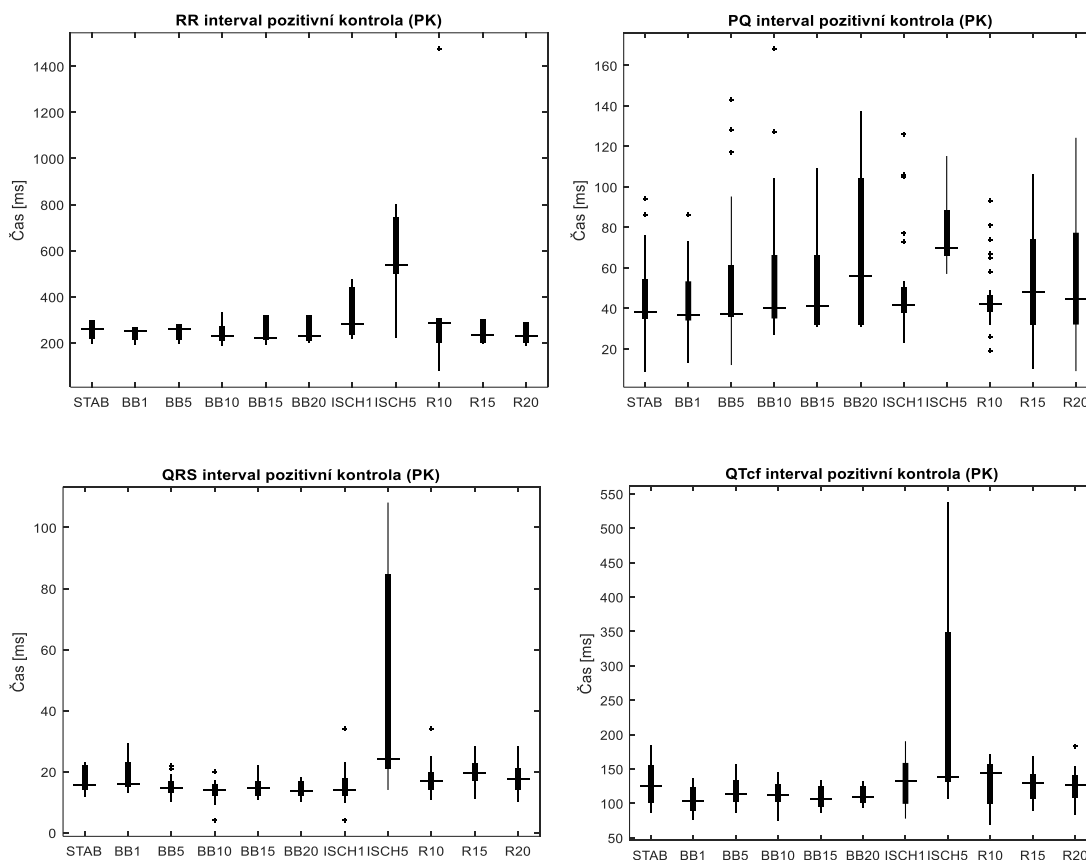


Obrázek 18: Krabicové grafy všech parametrů pro negativní kontrolní skupinu (NK), (intervaly: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)

Pro pozitivní kontrolní skupinu (PK) byl použit stejný statistický test, který je zmíněn výše. Výsledky testu jsou zobrazeny v Tabulka 8. Na Obrázek 19 jsou zobrazeny krabicové grafy všech analyzovaných intervalů pro pozitivní kontrolní skupinu. Z těchto grafů vyplývá, že v pozitivní kontrolní skupině došlo při podání léku k signifikantní změně pouze u QRS intervalu a částečně i QTcf. V případě QRS intervalu došlo k mírnému zkrácení. U RR a PQ intervalu je zřejmý trend prodloužení, který lze vidět na Obrázek 21 a Obrázek 23.

Tabulka 8: Výsledky Wilcoxonova testu pro pozitivní kontrolní skupinu (PK)

Parametry porovnání	p hodnota RR	p hodnota PQ	p hodnota QRS	p hodnota QTcf
P1 x P2	0,1995	0,8879	0,8694	0,9528
P1 x S1	0,6783	0,9115	0,4837	0,5444
S1 x BB1	0,0012	0,4238	0,2356	0,0035
S1 x BB5	0,7668	0,6946	0,117	0,2225
S1 x BB10	0,2968	0,45	0,0015	0,0646
S1 x BB15	0,8012	0,7277	0,0071	0,0314
S1 x BB20	0,6514	0,131	0,002	0,518
BB20 x ISCH1	$6,1 e^{-4}$	0,4241	0,6602	0,0117
BB20 x ISCH5	$2,6 e^{-10}$	0,1804	$1,5 e^{-10}$	$3,9 e^{-9}$
BB20 x R10	0,4438	0,941	$3,5 e^{-4}$	0,006
BB20 x R15	0,5005	0,7727	$2,8 e^{-6}$	0,0035
BB20 x R20	0,2572	0,5183	$6,5 e^{-4}$	0,0033
S1 x ISCH1	0,0111	0,1707	0,0215	0,0544
S1 x ISCH5	$2,8 e^{-10}$	$3,1 e^{-7}$	$3,8 e^{-7}$	0,0012
S1 x R10	0,0454	0,2502	0,5771	0,4574
S1 x R15	0,5538	0,3507	0,0748	0,8073
S1 x R20	0,0362	0,7108	0,694	0,9117

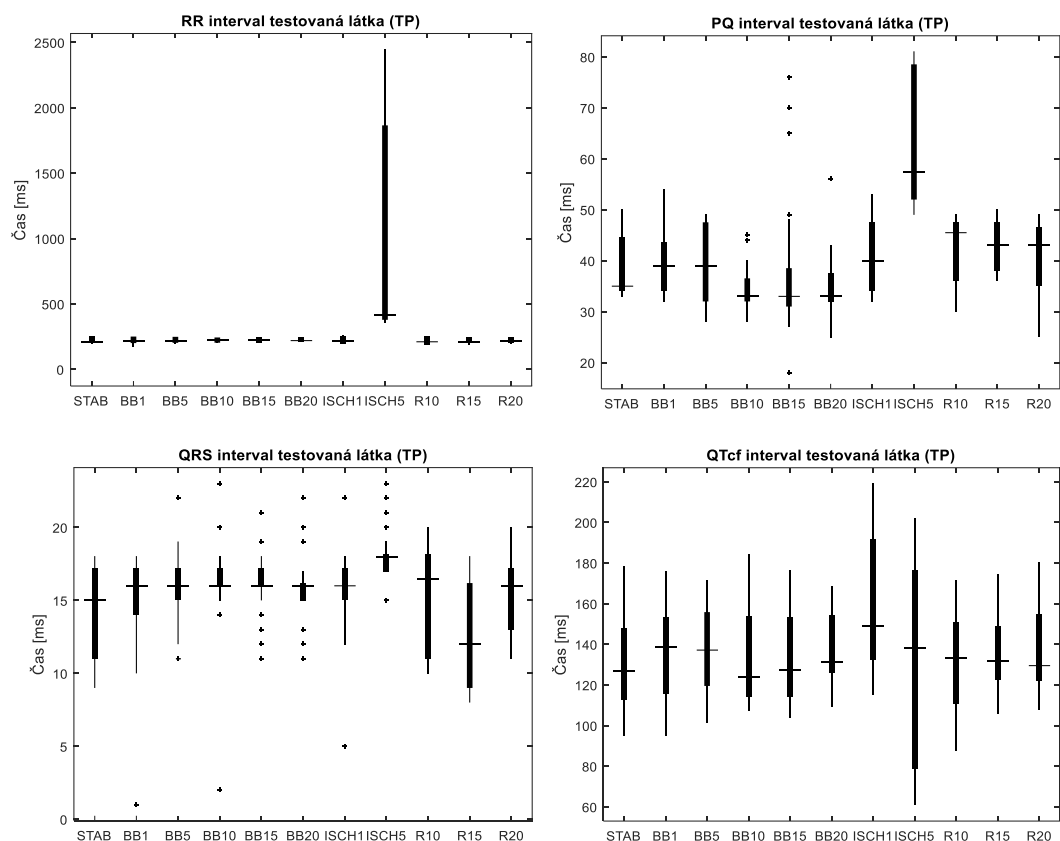


Obrázek 19: Krabicové grafy všech parametrů pro pozitivní kontrolní skupinu (PK), (intervaly: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)

Poslední skupinou byla skupina, které byla podána testovaná látka (TL). Testovaná látka má název TP1 a je popsána v kapitole 2.1.4. Za statistické analýzy testované látky, jejíž výsledky jsou v Tabulka 9, je patrné, že došlo k mírnému zkrácení QRS intervalu. Lze říci, že u zmíněné látky je tendence k pozitivnímu vliv na vedení elektrického vzruchu přes komory. Z Obrázek 20 je patrné, že ihned po podání látky došlo k prodloužení PQ intervalu a po delším časovém úseku naopak ke zkrácení PQ intervalu. Informace o tomto intervalu doplňuje Obrázek 24 na kterém jsou zobrazeny PQ intervaly pro každý experiment v jednotlivých fázích. Z obrázku lze opět vidět trend prodloužení. U RR intervalu je trend prodloužení viditelný méně než u carvedilolu Obrázek 22.

Tabulka 9: Výsledky Wilcoxonova testu pro skupinu testovaná látka (TL)

Parametry porovnání	p hodnota RR	p hodnota PQ	p hodnota QRS	p hodnota QTcf
P1 x P2	0,2379	0,7412	0,1998	0,865
P1 x S1	0,7724	0,6437	0,1337	0,2398
S1 x BB1	0,1952	0,8463	0,4668	0,3911
S1 x BB5	0,4009	0,6939	0,0742	0,1737
S1 x BB10	0,4625	0,0034	0,0177	0,7731
S1 x BB15	0,4623	0,0489	0,0438	0,6743
S1 x BB20	0,2527	7,2 e ⁽⁻⁴⁾	0,1314	0,1086
BB20 x ISCH1	0,9115	3,07 e ⁽⁻⁵⁾	0,9092	0,0057
BB20 x ISCH5	2,7 e ⁽⁻¹¹⁾	1,0 e ⁽⁻⁶⁾	1,9 e ⁽⁻⁶⁾	0,8418
BB20 x R10	0,3418	3,06 e ⁽⁻⁶⁾	0,5116	0,3402
BB20 x R15	0,0082	1,4 e ⁽⁻⁷⁾	6,9 e ⁽⁻⁴⁾	0,7618
BB20 x R20	0,0235	3,5 e ⁽⁻⁵⁾	0,7686	0,5297
S1 x ISCH1	0,1305	0,1314	0,1224	0,0003
S1 x ISCH5	2,7 e ⁽⁻¹¹⁾	3,5 e ⁽⁻¹¹⁾	6,2 e ⁽⁻⁸⁾	0,5201
S1 x R10	0,6871	0,0077	0,0451	0,9058
S1 x R15	0,8006	4,8 e ⁽⁻⁴⁾	0,0601	0,2339
S1 x R20	0,5569	0,0917	0,1811	0,2611



Obrázek 20: Krabicové grafy všech parametrů pro skupinu testovaná látka (TP), (intervaly: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)

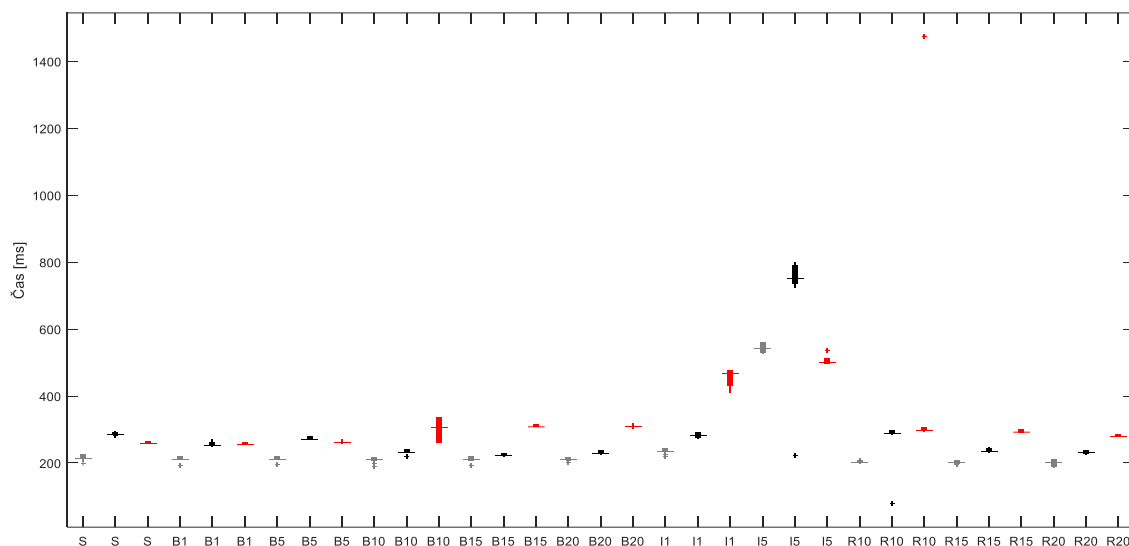
Druhá statistická analýza porovnávala jednotlivé skupiny mezi sebou. Pro tuto analýzu byl použit Kruskal-Wallisův test pro porovnání více skupin popsáný v kapitole 7.1.3. Zde bylo testováno zda se lišili analyzované intervaly mezi skupinami. Za signifikantní se považují výsledky testu s $p < 0,5$. Výsledky testu jsou shrnuty v Tabulka 10.

Při porovnání negativní skupiny (NK) a pozitivní skupiny (PK) došlo při podání léku k rozdílu v QRS a RR intervalu. U intervalů QTcf a PQ nebyl zjištěn rozdíl. Z této analýzy vyplývá, že podání léku carvedilolu nemá vliv na délku QT intervalu (v porovnání s NK) a tedy lék nemá arytmogenní vliv. Při porovnání skupiny NK a TL došlo k rozdílu ve všech intervalech. Mezi pozitivní kontrolou a testovanou látkou došlo k rozdílu ve všech intervalech u poloviny analyzovaných experimentálních fází. Rozdíl mezi skupinami ve fázi stabilizace je pravděpodobně způsoben tím, že v každé experimentální skupině jsou pouze 3 experimenty, přičemž experimentální data se vyznačují relativně vysokou variabilitou.

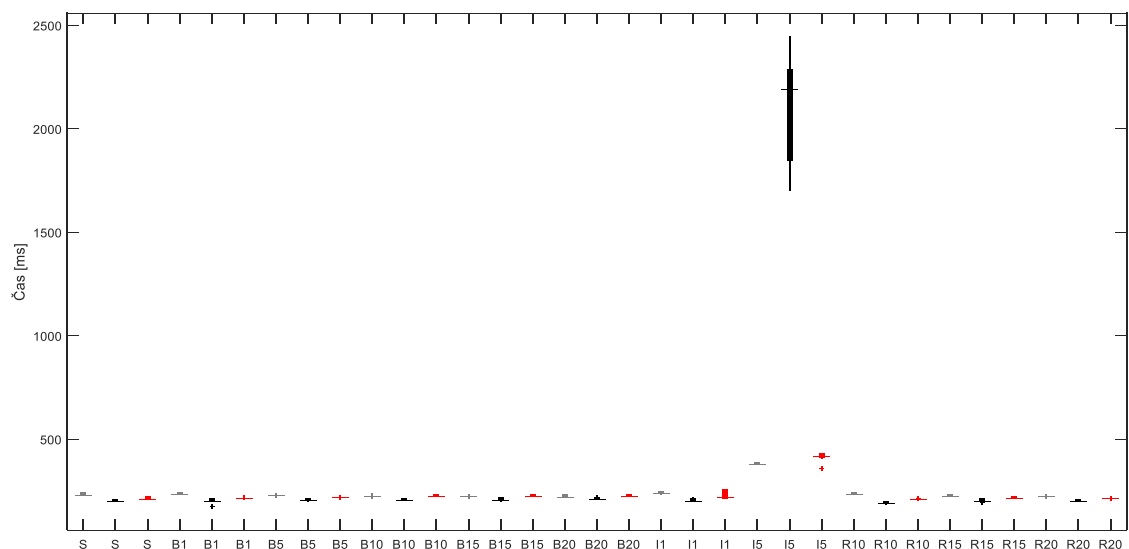
Tabulka 10: Výsledky Kruskal-Wallisova statistického testu pro porovnání více skupin (hodnota $p < 0,05$, porovnávané skupiny NK a PK, NK a TL, PK a TL, ano = je signifikantní rozdíl, ne = není signifikantní rozdíl)

Negativní kontrola (NK) a pozitivní kontrola (PK)				
	RR interval	PQ interval	QRS interval	QTcf interval
STABILIZACE	ano	ne	ano	ano
BB1	ne	ne	ano	ne
BB15	ano	ne	ano	ne
BB20	ano	ne	ano	ne
ISCH5	ne	ne	ne	ne
REP15	ne	ne	ne	ne
Negativní kontrola (NK) a testovaná látka (TL)				
	RR interval	PQ interval	QRS interval	QTcf interval
STABILIZACE	ano	ano	ano	ano
BB1	ano	ano	ano	ano
BB15	ano	ano	ano	ano
BB20	ano	ano	ano	ano
ISCH5	ano	ano	ano	ano
REP15	ano	ano	ano	ano
Pozitivní kontrola (PK) a testovaná látka (TL)				
	RR interval	PQ interval	QRS interval	QTcf interval
STABILIZACE	ano	ne	ano	ne
BB1	ano	ano	ne	ano
BB15	ne	ne	ne	ano
BB20	ano	ano	ne	ano
ISCH5	ne	ano	ano	ne
REP15	ano	ne	ano	ne

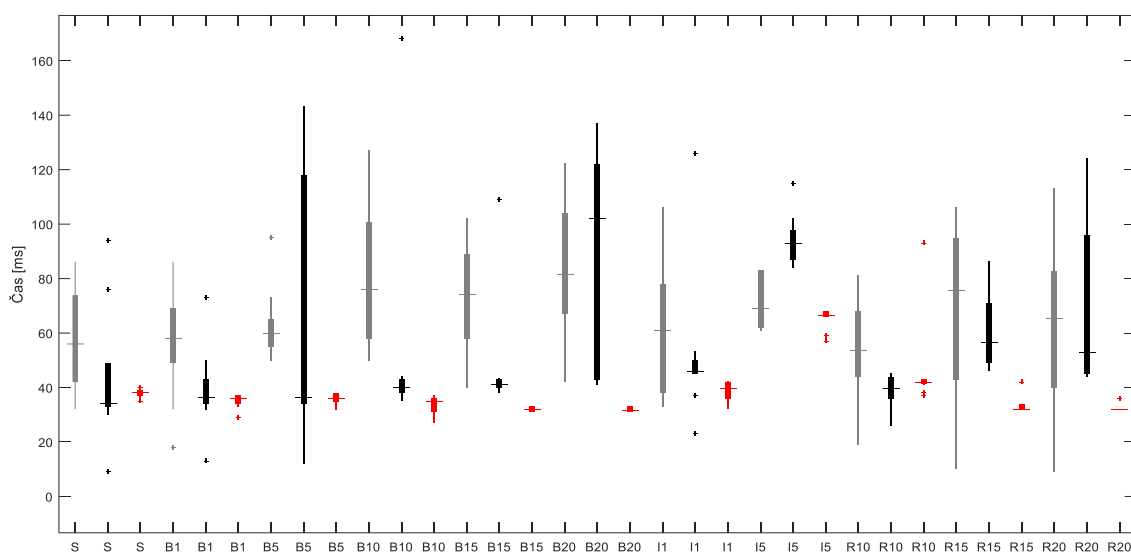
Na grafech zobrazených níže je vidět variabilita mezi jednotlivými subjekty. Variabilita je relativně velká, i přes to určité trendy jdou přítomny ve všech experimentech.



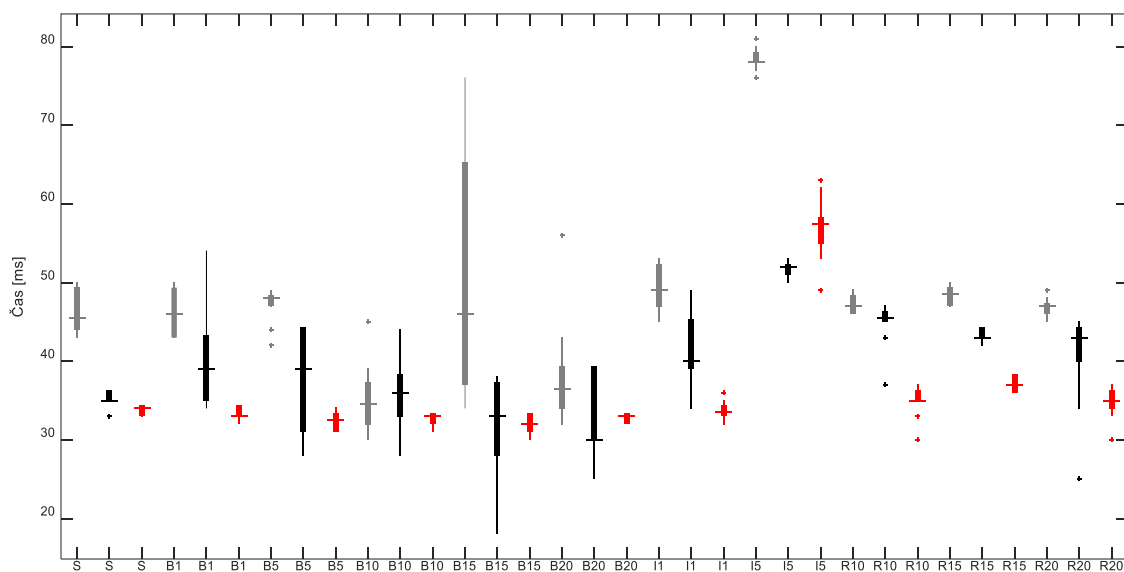
Obrázek 21: Krabicový graf RR intervalu jednotlivých experimentů ve skupině PK (šedá - 1. experiment, černá - 2. experiment, červená - 3. experiment)



Obrázek 22: Krabicový graf RR intervalu jednotlivých experimentů ve skupině TL (šedá - 1. experiment, černá - 2. experiment, červená - 3. experiment)



Obrázek 23: Krabicový graf PQ intervalu jednotlivých experimentů ve skupině PK (šedá - 1. experiment, černá - 2. experiment, červená - 3. experiment)

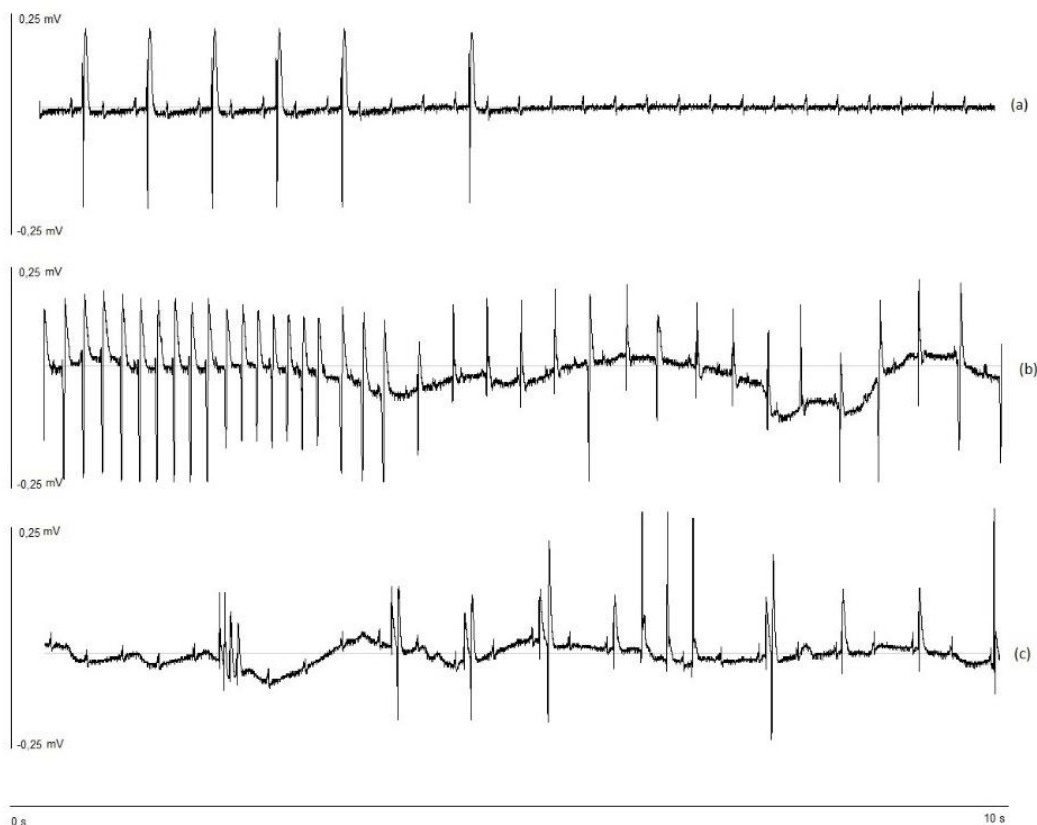


Obrázek 24: Krabicový graf PQ intervalu jednotlivých experimentů ve skupině TL (šedá - 1. experiment, černá - 2. experiment, červená - 3. experiment)

8.2 Manuální analýza arytmií

V průběhu stabilizace a fáze BB nebyly patrné žádné závažné arytmie. Během ischemie došlo u všech skupin k sinusové bradykardii, následně až AV blokádě III. stupně.

Případně až k srdeční zástavě. Během reperfúze se vyskytly typické reperfúzní arytmie: tachykardie, vázané extrasystoly a AV blokády. Arytmie vymizely většinou během prvních 5 minut reperfúze. Na Obrázek 25 lze vidět různé arytmie zachycené během manuálního hodnocení. Graf (a) ukazuje průběh signálu kde došlo k AV blokádě III. stupně, kdy po posledním P-QRS-T komplexu jsou viditelné už jen vlny P. U označení (b) lze vidět epizodu komorové tachykardie, která spontánně přechází do pomalejšího junkčního rytmu s AV disociací (vlny P a QRS komplexy vzájemně nesouvisejí). Část (c) ukazuje různé typy extrasystol v terénu AV blokády III. stupně.



Obrázek 25: Ukázka různých arytmii v experimentálních záznamech

Při manuálním hodnocení arytmii se sledovala první AV blokáda I. stupně, následně AV blokáda III. stupně. U negativní kontrolní skupiny (NK) došlo u všech experimentů k první AV blokádě I. stupně po 4 minutách od navození ischemie. Zhruba po 7 minutách od ischemie se dostavila AV blokáda III. stupně, poté byly viditelné pouze vlny P. Rozdíl dvou po sobě následujících vln P během ischemie byl zhruba 1 minutu. V reperfuzi se hodnotil návrat k sinusovému rytmu. U negativní kontrolní skupiny (NK) došlo k obnovení sinusového rytmu už po 4 minutách. K úplně pravidelné tepové frekvenci po obnovení průtoku došlo u negativní kontrolní skupiny do 8 minut.

Při hodnocení pozitivní kontrolní skupiny došlo v tomto případě k první AV blokádě I. stupně až po 8 minutách od začátku ischemie. Po 10 minutách následovala AV blokáda

III. stupně. Poté byly opět viditelné jen vlny P. Časový okamžik mezi dvěma vlnami P byl cca 0.5 minut. Při obnovení koronárního průtoku se sinusový rytmus obnovil do 1 minuty a do 2 minut se dostavila pravidelná tepová frekvence.

U skupiny TL jen u jednoho experimentu došlo k AV blokádě I. stupně a u ostatních dvou experimentů nastala až AV blokáda III. stupně, která byla viditelná do konce ischemie. Interval mezi dvěma P vlnami byl 0.5 minut. Po obnovení průtoku se sinusový rytmus dostavil do 3 minut. V období reperfúze byla viditelná nepravidelná síňová aktivita. Docházelo k vynechání vlny P.

Při porovnání časových okamžiků mezi NK a PK se u PK skupiny AV blokáda I. stupně dostavila po dvojnásobném časovém intervalu než u NK skupiny. Časový okamžik mezi dvěma P vlnami se zkrátil. Po obnovení koronárního průtoku se u experimentů, kterým byl aplikovaný carvedilol vrátil sinusový rytmus do 2 minut. U skupiny, které nebyl aplikovaný lék se průtok obnovil cca do 4 minut.

Při srovnání časových okamžiků mezi NK a TL se ve skupině TL se AV blokáda III. stupně dostavila o 3 minuty později. Interval mezi P vlnami se zkrátil na polovinu. Návrat k sinusovému rytmu v reperfúzi byl stejný.

U beta-blokátor carvedilol se potvrdil kardioprotektivní účinek, protože ischemie se dostavila později a návrat k sinusovému rytmu byl dříve. Tento efekt se očekával i skupiny TL. Zde je pouze patrné to, že ischemie se také dostavila později. Ale návrat v reperfúzi byl stejný.

8.3 Diskuze výsledků manuálního hodnocení experimentálních EKG

U NK skupiny nebyla předpokládána žádná změna ve fázi aplikování léku (BB1-BB20), protože zde žádný lék aplikovaný nebyl. Tento předpoklad byl statisticky potvrzen. Změny v období ischemie a reperfúze byly předpokladány a tento předpoklad se také potvrdil. V období ischemie a reperfúze se dotavily běžné arytmie. Při hodnocení arytmií byly vidět změny mezi jednotlivými skupinami.

U skupiny PK, které byl aplikovaný lék carvedilol. U tohoto léku byl předpoklad, že dojde k poklesu tepové frekvence a tedy k prodloužení RR intervalu. Tento předpoklad je ale závislý na koncentraci podaného léku. Vzhledem k tomu, že dávka byla 40 nmol/l, tedy poměrně nízká a byly testovány jen 3 experimenty, nemusel se tento efekt na analyzovaných datech projevit. Manuální hodnocení tento efekt potvrdilo i při malém počtu experimentů.

Dále se předpokládá, že při podání carvedilolu dojde k zkrácení QRS intervalu, protože carvedilol má efekt zrhylení vedení elektrického vzruchu přes komory. Z analýzy PK skupiny je tento efekt patrný. Opět lze tedy říci, že i při nízké koncentraci je vidět zkrácení QRS. Carvedilol tedy zrychlil vedení elektrického vzruchu přes komory a snížil tepovou frekvenci. Výběr tohoto léku jako pozitivní kontrolní skupina je vhodný, protože jeho účinky lze vidět jak při nízké koncentraci, tak při malém počtu. Z této analýzy lze předpokládat, že manuální rozměření bylo provedeno správně a ukázalo očekávaný efekt léku.

U skupiny, které byla podána látka TP1 byl předpoklad, že bude pozitivně ovlivňovat vedení přes komory stejně jako carvedilol. Tento fakt byl také prokázán díky zkrácení QRS intervalu. U této látky došlo také ke změně v PQ intervalu. Tento fakt byl předpokládán díky stanovené koncentraci. Lze tedy říci, že koncentrace 40 nmol/l látky TP1 způsobuje zpomalení vedení elektrického vzruchu mezi síněmi a komorami. Z analýzy, která proběhla na velmi malém počtu dat se ukázalo, že látka TP1 při nízké koncentraci má částečně očekávané účinky na srdce. Bylo by vhodné provést další analýzy, kde by se zaměřilo pouze na koncentraci. Také je nutné zvýšit počet experimentů v každé skupině.

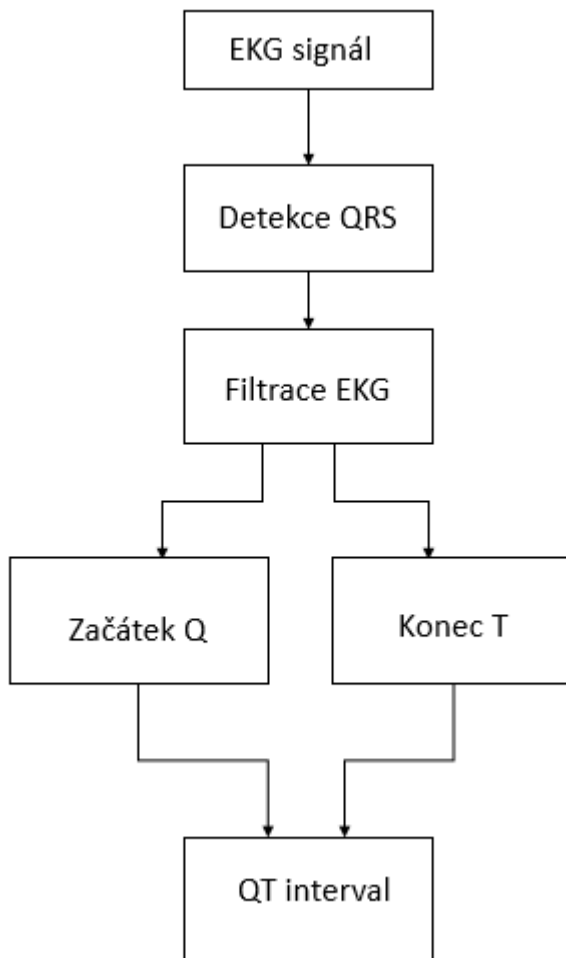
Z hodnocení arytmií byl potvrzen kardioprotektivní efekt carvedilolu. U TL skupiny se povrdilo jen pozitivní ovlivnění srdce v ischemii, kdy se u této skupiny ischmeie dostavila později než u kontrolní skupiny.

Vzhledem k počtu uskutečněných experimentů nelze považovat výsledky statistické analýzy za validní. Pro ověření viditelných trendů je nutné zvýšit počet experimentů. Vliv látky může být dále ovlivněn zvolenou koncentrací. U nové látky je nutné udělat další studie, které by sledovaly koncentrační závislost.

8.4 Automatická analýza elektrogramů

Z pohledu analýzy EKG signálu je automatické rozměření QT intervalu složitý proces zejména z důvodu různé morfologie vlny T. Pro detekci existuje řada metod. Některé z nich jsou popsány v kapitole 5.3. Pro účely této práce byla vybrána jedna metoda pro detekci kmitu Q a druhá metoda pro detekci konce vlny T. Pro detekci kmitu Q byla použita Philipsova metoda, která podle článku [35] dosahuje lepších výsledků než například metody, které vychází z derivovaného signálu. Pro určení konce vlny T se použila metoda založena na použití templátu. Výhodou této metody je, že se přizpůsobuje morfologii vlny T, což je jeden z problémů úspěšné detekce. Tyto metody byly naprogramované v prostředí Matlab. Pro vytváření algoritmu byly použité EKG signály popsané v kapitole 6.2. Na těchto signálech bylo provedeno porovnání manuální a automatické detekce. Druhá sada signálů, určená pro hodnocení vlivu nového léčiva, byla také rozměřena manuálně i automaticky. Avšak manuální rozměření probíhalo pomocí již zmíněného systému. Bohužel tento systém neposkytoval možnost exportu manuálně rozměřených hodnot, z tohoto důvodu nebylo možné navržený algoritmus otestovat i na těchto EKG záznamech (analýzou odchylky v detekovaných pozicích začátku Q kmitu a konce T vlny). Tento problém byl částečně kompenzován tím, že z automaticky rozměřených hodnot byla vypočítána hodnota QTcf a k porovnání manuálního a automatického rozměření došlo pomocí statistické analýzy intervalu QTcf, která je již dostupná v obou dvou případech.

Algoritmus pro detekci QT intervalu byl navržen podle vývojového schématu zobrazeného níže (Obrázek 26).

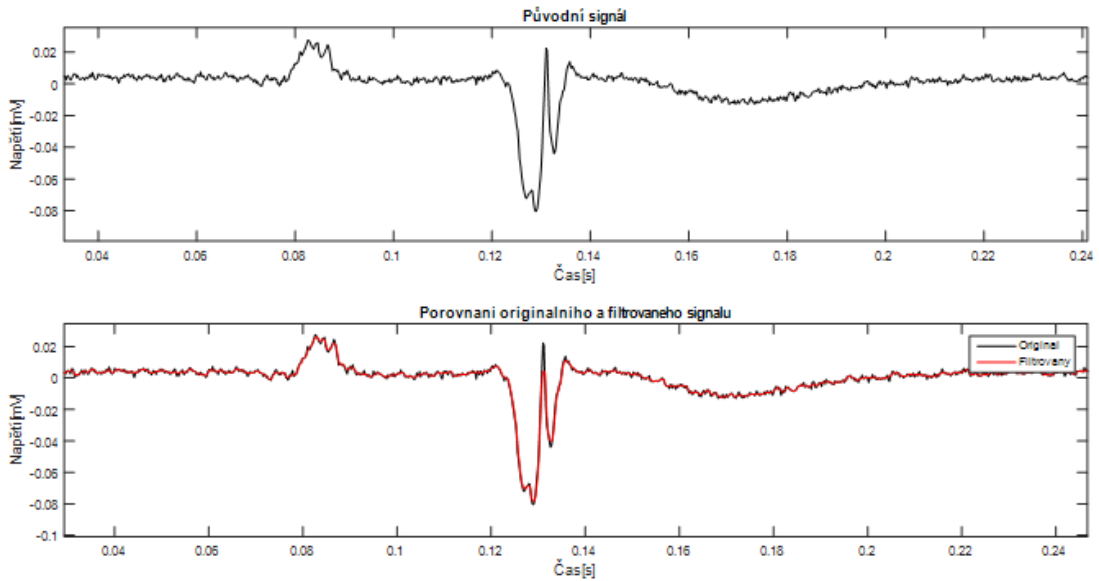


Obrázek 26: Blokové schéma algoritmu pro rozměření QT intervalu

Vstupem do programu je EKG signál. Na tomto signálu je provedena detekce QRS komplexu. K tomuto účel byl použit software veřejně dostupný na UBMI [48]. Tento software je založený na vlnkové transformaci a poskytuje velmi kvalitní výsledky. Detekované QRS komplexy slouží jako referenční hodnoty pro následné rozměření vlny Q i vlny T. Výsledek detekovaných komplexů je ošetřen podmínkou. Pokud se za detekovaným komplexem QRS nenachází více jak 800 vzorků dojde k odstranění tohoto detekovaného komplexu. Tato podmínka slouží k ošetření situace, aby mohlo za každým detekovaným komplexem QRS dojít k určení konce vlny T. Vlna T se nachází za komplexem QRS. Pokud by zde nebyl dostatečný počet vzorků, algoritmus není schopen pracovat.

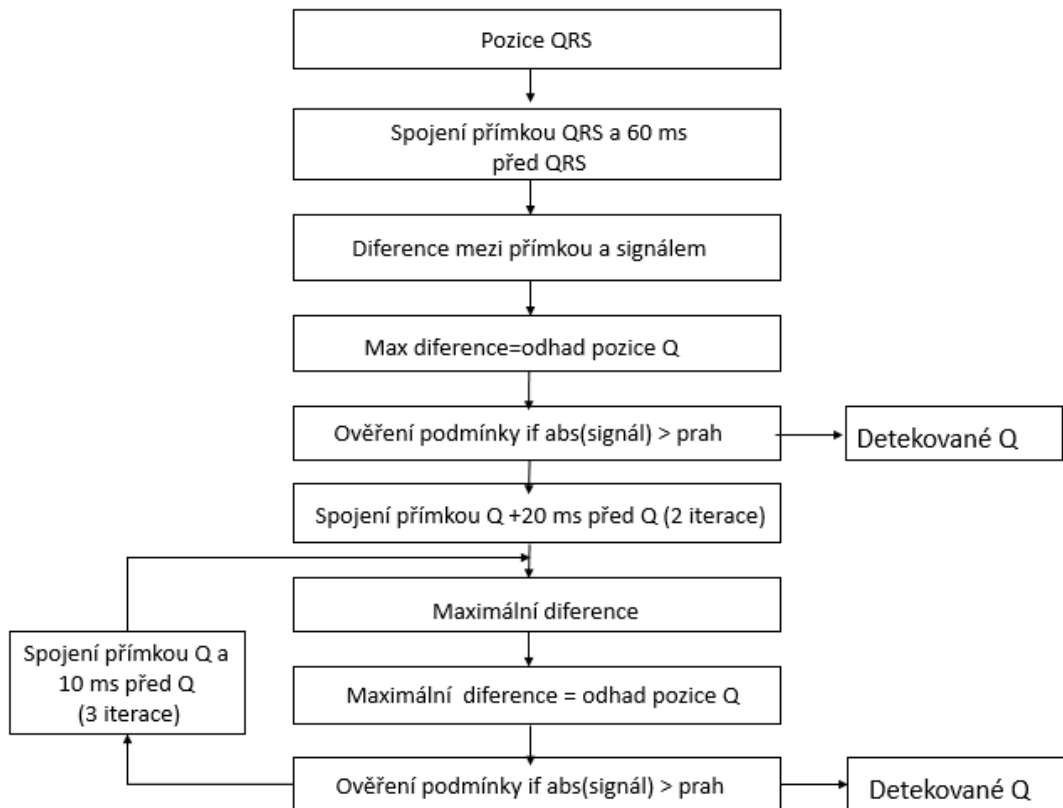
Po detekci QRS komplexu je signál filtrován mediánovou filtrací. Mediánová filtrace patří mezi nelineární metody filtrace a slouží k potlačení šumu a výrazných bodů EKG signálum(QRS komplex). Pro účely algoritmu byl zvolen řád filtru na hodnotu 6. Toto nastavení vykazovalo nejlepší výsledky pro všechny signály. Porovnání originálního

signálu s vyfiltrovaným signálem lze vidět na Obrázek 27. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Tento signál bude následně používán pro detekci začátku kmitu Q a vlny T.



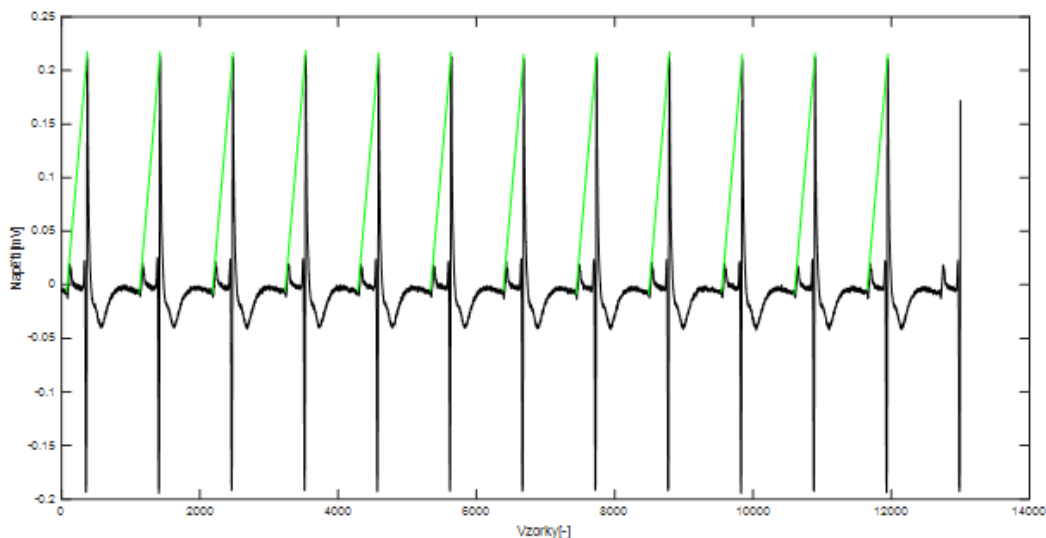
Obrázek 27: Mediánová filtrace signálu používaného k detekci kmitu Q a vlny T

Dalším krokem je detekce kmitu Q. Blokové schéma metody je zobrazeno níže (Obrázek 28).



Obrázek 28: Blokové schéma detekce kmitu Q

Nejprve dojde ke stanovení úseku ve kterém je kmit Q vyhledávan. Tento úsek je stanoven na základě manuálního rozměření signálů. Úsek, neboli okno začíná v detekovaném vrcholu komplexu QRS a sahá 60 ms před pozici tohoto vrcholu. V tomto okně se nachází i vlna P. V tomto okně dochází k detekci kmitu Q, která je založena na iterativním postupu. Dojde k vytvoření přímky. Přímka spojí komplex QRS se začátkem okna, tedy bodem 300 vzorků před komplexem (Obrázek 29).

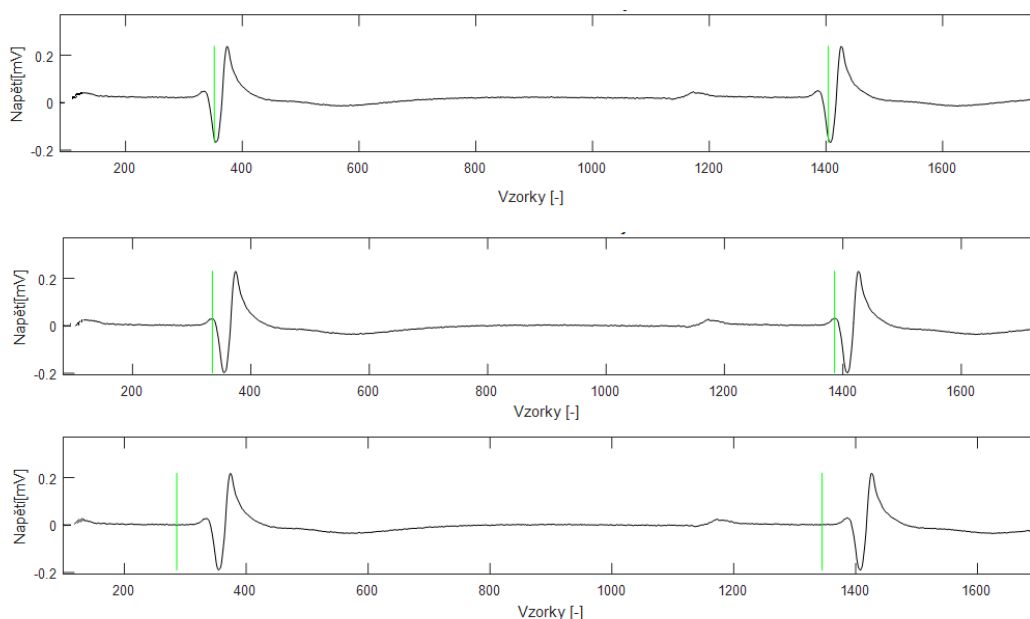


Obrázek 29: Vytvoření přímky od maxima komplexu QRS po bod 60 ms před maximem

Následuje výpočet difference mezi přímkou a signálem. Poté se určí maximální difference a na tomto místě se nachází potenciální pozice začátku kmitu Q (Q_{pot}). Následuje podmínka, která zjišťuje, zda tato pozice bude určena za začátek kmitu Q. V podmínce se porovnává absolutní hodnota signálu na potenciální pozici s prahovou hodnotou. Prahová hodnota je nastavena jako absolutní hodnota z 50% amplitudy maxima komplexu QRS. Pokud je potenciální pozice kmitu Q větší jak práh, algoritmus opět přechází do bodu, kdy se vytvářena spojovací přímka. V případě nesplnění podmínky, kdy je hodnota menší než práh, je potenciální pozice Q zvolena za začátek Q.

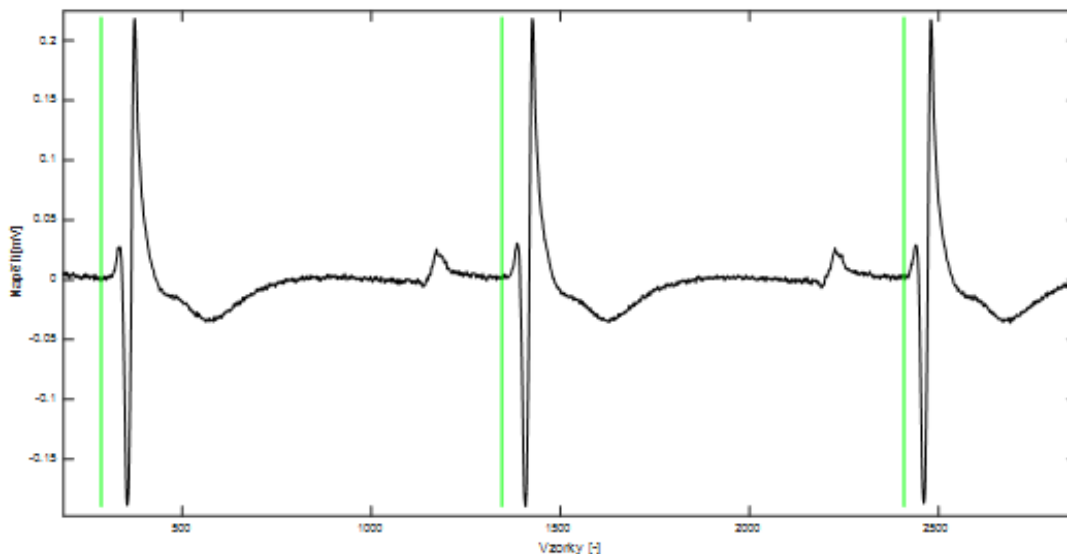
V případě nesplnění podmínky přímka spojuje potenciální pozici Q s bodem, který se nachází 100 vzorků (20 ms) před tímto Q. Počet vzorků byl opět stanoven na základě manuálního rozměření. Z manuálního rozměření byly stanoveny hodnoty maxima, mediánu a minima vlny P, které lze vidět v Tabulka 5. Z tabulky vyplývá, že maximum vlny P je 38 ms. Aby došlo k odstanění vlny P byla použita maximální hodnota doby trvání vlny P. Tato hodnota byla odečtena od prvního okna, které spojovalo vrchol QRS se začátkem vlny P. Tento úsek je považován za nové okno, ve kterém dochází k detekci nového potenciálního kmitu Q. Opět je provedena difference mezi spojovací přímkou a signálem. Na místě maximální difference dojde k označení nového (druhého) potenciálního kmitu Q. Opět následuje již zmíněná podmínka. Ale v tomto případě je stanoven nový práh, jako absolutní hodnota z 5% amplitudy maxima

komplexu QRS. V případě, že není podmínka splněna je potenciální Q označeno za správné. V opačném případě dojde k opakování iterace. V této třetí iteraci je nové okno stanoveno na polovinu druhého okna, tedy na hodnotu 50 vzorů (10 ms). V tomto případě už dochází pouze k upřesnění správné pozice kmitu Q, tedy není nutné volit okno větší délky. V tomto okně opět dojde k vytvoření přímky, diferenci a následné detekci kmitu Q. Pozice kmitu je už finální. Při vytváření algoritmu bylo zjištěno, že během tří iterací spolehlivě dojde ke kvalitní detekci kmitu Q a proto není důvod provádět další iterace, které by mohli zhoršovat výsledky detekce. Ukázka detekce kmitu Q ve všech třech iteracích je zobrazena na Obrázek 30. Z obrázku je patrné, že již 2 iterace splní podmínku a tedy toto Q je výsledné. Třetí iterace je na obrázku vykreslena pro vizuální porovnání.



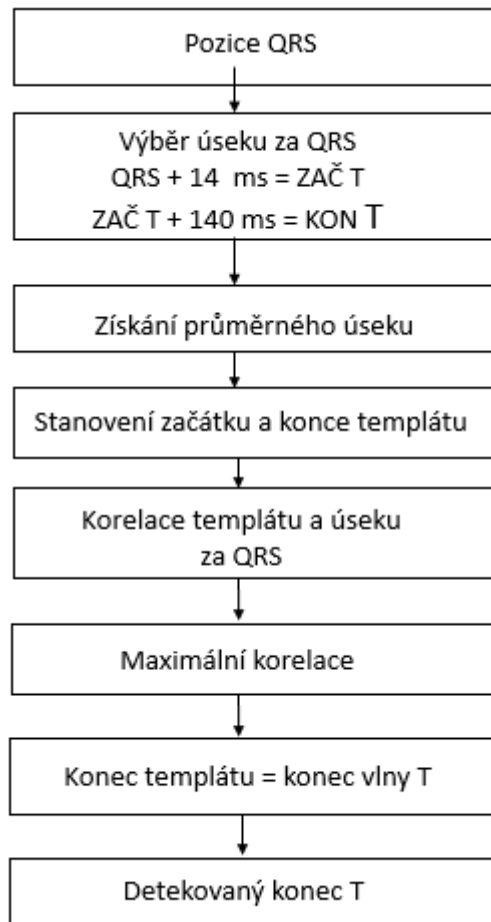
Obrázek 30: Postupná detekce kmitu Q ve všechn třech iteracích

Výstup z algoritmu pro detekci kmitu Q je vidět na Obrázek 31 .



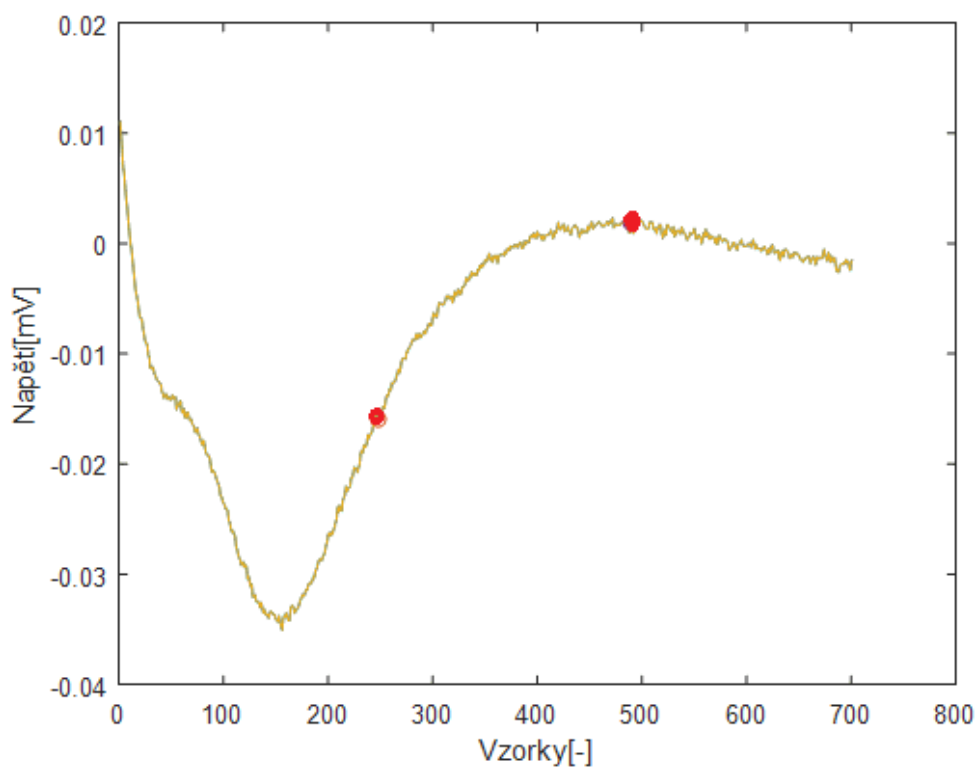
Obrázek 31: Detekované začátky kmitu Q pomocí Philipsovy metody

Druhým krokem je detekce konce vlny T pomocí metody založené na použití templátu. Tento postup je semiautomatický, protože templát na základě kterého probíhá určení konce vlny T je volen uživatelem, nikoli automaticky. Blokové schéma této metody je na Obrázek 32. V této metodě je opět zvolen úsek signálu (okno) ve kterém probíhá určení konce vlny T. Okno má délku 770 vzorků (140 ms). Délka okna byla opět stanovena na základě manuálního rozměření. Vzhledem k tomu, že v tomto okně uživatel volí manuálně konec vlny T, byl tento úsek nastaven tak, aby se v něm vždy nacházela celá vlna T, případně i část následné vlny P.



Obrázek 32: Blokové schéma detekce konce vlny T

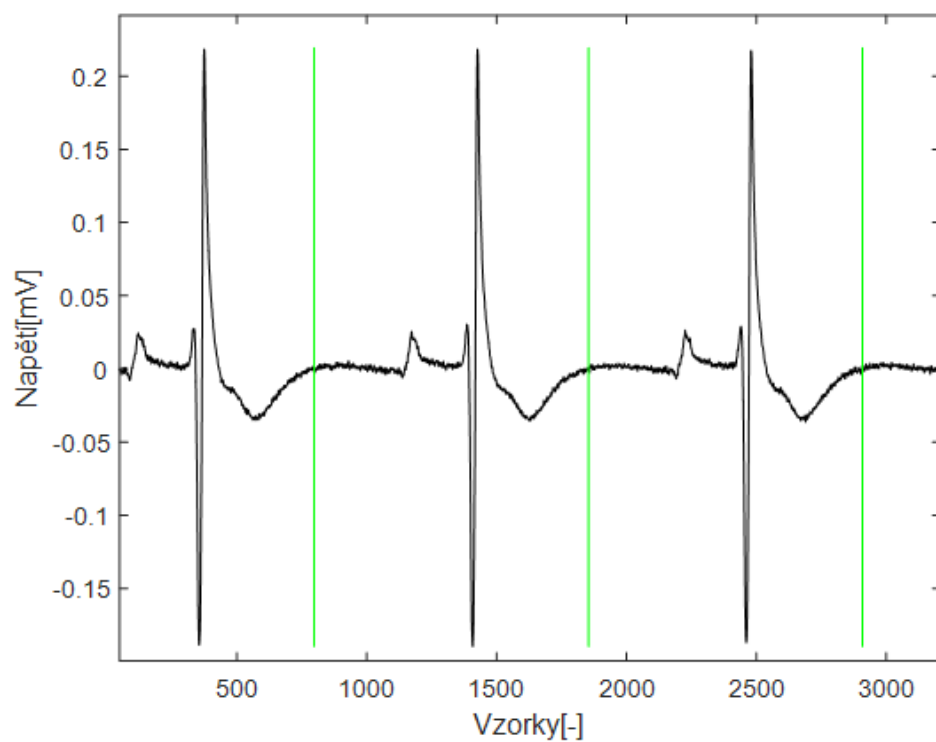
Z 10 zarovnaných úseků ve kterých jsou vlny T se vytvoří jeden průměrný úsek s vlnou T. V tomto úseku uživatel volí templát. Templát je označen pomocí dvou bodů. Příklad templátu je na Obrázek 33, kdy červeně jsou naznačené body začátku a konce templátu. Úsek signálu mezi nimi je považován za templát.



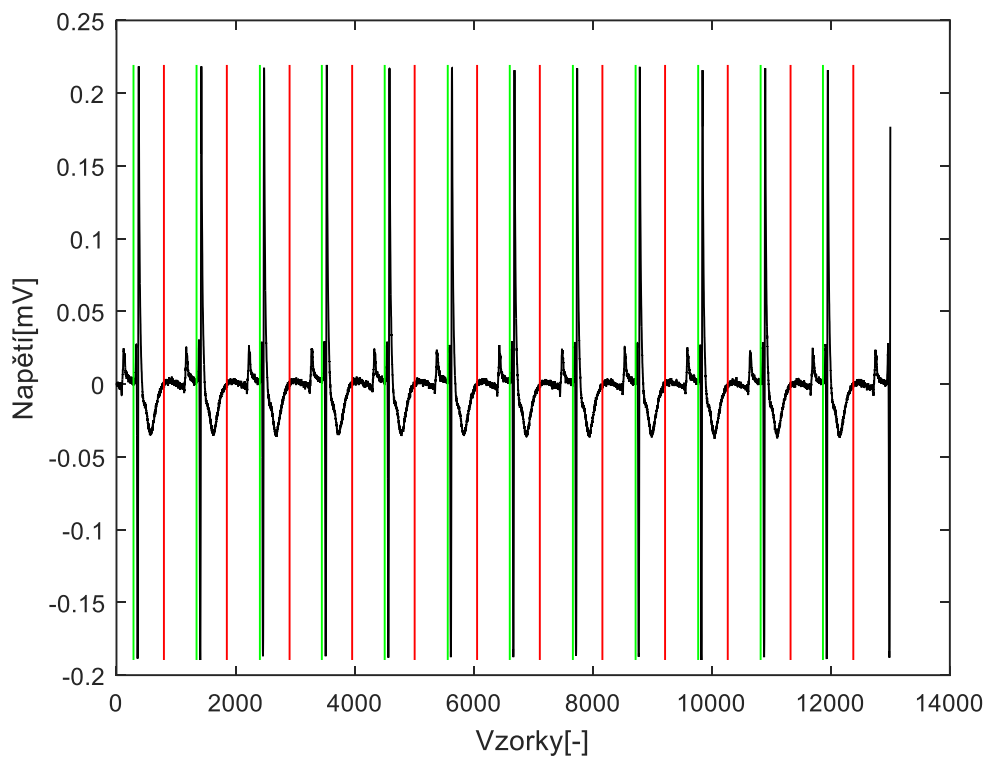
Obrázek 33: Ukázka označení templátu

Následuje korelace templátu a vlny T. Protože cílem je určení konce vlny T, tedy její sestupné části, je zjištěna pozice maximální korelace signálu a templátu. V tomto místě je templát nejvíce podobný se sestupnou částí vlny T. Podle maxima korelace ke které se přičte délka templátu je určena pozice konce vlny T. Pozice konce vlny T je vidět na Obrázek 34. Tato pozice je následně spojena s pozicí začátku Q a je určen QT interval (Obrázek 35).

Pro vytvoření algoritmu byly použity signály z experimentů s aplikací haloperidolu 6.2. Z technických důvodů byly experimenty s aplikací beta-blokátoru prováděny později. Proto se pro vytváření algoritmu použily tyto záznamy. Záznamy pochází ze stejného zvířete se stejnou vahou a pohlavím a experimenty probíhaly na stejném principu, proto bylo možné data použít k vytváření algoritmu.



Obrázek 34: Určení konce vlny T pomocí metody založené na šablóně



Obrázek 35: Detekovaný QT interval

Kvalita algoritmu byla porovnána na datech s aplikací haloperidolu s manuálním rozměření na stejných datech prováděným expertem. Pro porovnání byla zvolena průměrná odchylka mezi referenčními a detekovanými hodnotami (m) a směrodatná odchylka mezi referenčními a detekovanými pozicemi (s). Hodnoty jsou shrnuty v Tabulka 11. Z tabulky je patrné, že interval stanovený semiautomaticky je delší než interval stanovený expertem. Při srovnání Philipsovy metody pro detekci začátku komplexu Q s autorem [35], kde tato metoda vykazovala dobré výsledky detekce, lze říci, že směrodatná odchylka mezi hodnotami je podobná (v rozmezí $3,2 \pm 5,8$ ms).

Tabulka 11: Tabulka průměrné a směrodatné odchylky mezi referenčními a detekovanými hodnotami pro data s aplikací haloperidolu

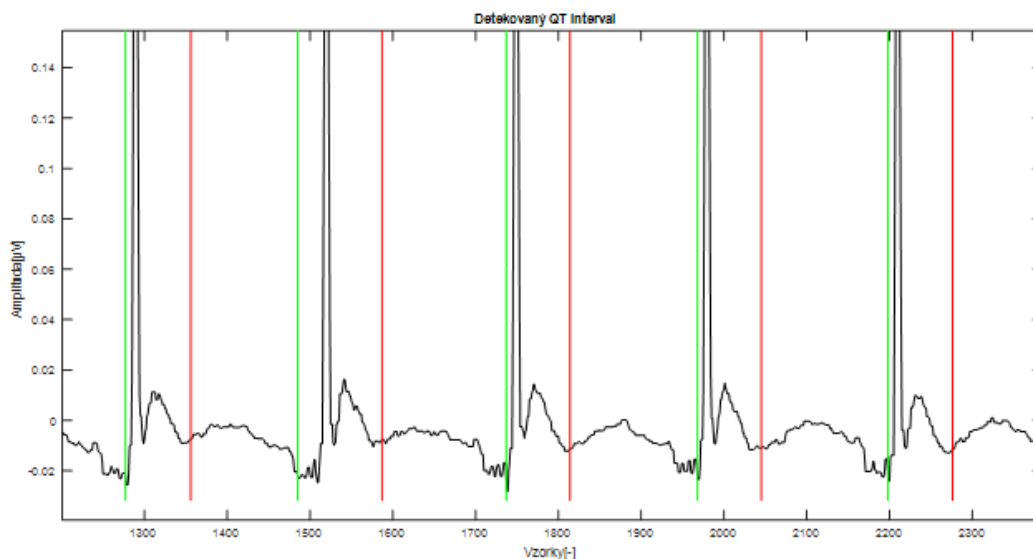
	$m \pm s$ [ms]
Začátek Q	$-3,235 \pm 3,4351$
Konec T	$1,800 \pm 8,250$
QT interval automaticky	$106,100 \pm 14,312$
QT interval manuálně	$101,120 \pm 15,948$
Rozdíl mezi QT automaticky a manuálně	$4,682 \pm 9,356$

8.4.1 Automatické rozměření EKG záznamů s aplikací beta-blokátorů

Tyto záznamy byly poskytnuty Fyziologickým ústavem lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Postup experimentálního snímání je popsán v kapitole 6.1. I před velké úsilí záznamy nebylo možné vyexportovat v dostatečné kvalitě. Tento fakt mohl ovlivnit automatickou detekci.

Algoritmus popsáný o kapitolu výše byl upraven pro potřeby druhé sady dat. Druhá sada dat měla vzorkovací frekvenci 1000 Hz, proto bylo nutné upravit velikosti časových oken. Okno pro detekci Q bylo nastaveno na 300 ms, druhé na 100 ms a třetí na 50 ms. Okno pro detekci vlny T bylo 700 ms. Také bylo nutné přidat do bloku předzpracování filtraci, která odstranila kolísání nulové izolinie.

Pro odstranění kolísání nulové izolinie byl použit filtr založený na nulování spektrálních čar dostupný na UBMI [48]. Poté byl detekován komplex QRS. Následně bylo nutné použít filtr dolní propust pro odstranění vysokých frekvencí. V tomto případě nebylo možné použít mediánovou filtraci, protože zvýrazňovala šum. Dolní propust byla nastavena s mezní frekvencí 130 Hz. Poté už probíhala detekce začátku a konce vlny T podle postupu posaném výše. Z detekovaných pozic byl určen interval QT, který lze vidět na Obrázek 36.



Obrázek 36: Ukázka detekce QT intervalu na datech s aplikací beta-blokátorů

8.4.2 Statistické zpracování automatického rozměření dat s aplikací beta-blokátorů

Statistická analýza manuálního rozměření QT byla prováděna na korigovaném intervalu QT_{cf}, který systém stanovil sám. Aby bylo možné data z manuálního a automatického porovnat, použila se stejná korekce podle Fredericiho. Tato korekce je doporučena pro záznamy s vyšší frekvencí. Automatické rozměření probíhalo na stejných úsecích záznamu popsanych v Tabulka 12. Jak je vidět v tabulce, pro automatické rozměření se nehodnotil úsek ve kterém došlo k zapnutí a vypnutí lineárního dávkovače léku. Tento fakt, že zapnutí lineárního dávkovače nemá vliv na změny sledovaných parametrů vyplynul již z manuální analýzy a proto nebylo nutné tuto analýzu provádět znovu.

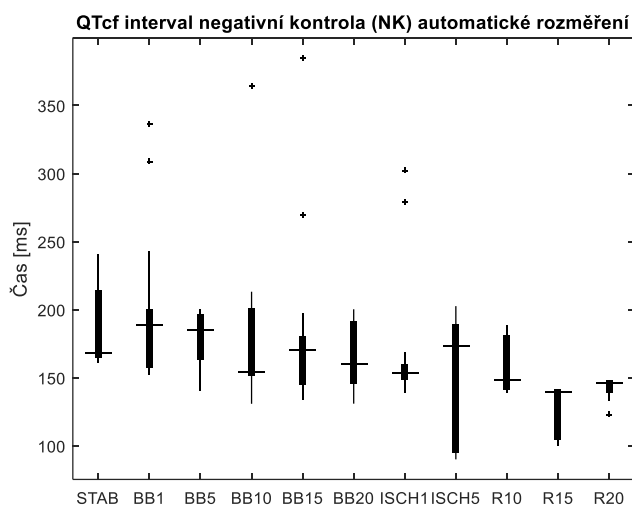
Statistická analýza automatického rozměření probíhala na stejných datech. Byly rozměřeny 3 skupiny (NK, PK a TL). Ve skupině NK a PK byly rozměřeny všechny 3 experimenty. Ve skupině TL pouze 2. U jednoho experimentu selhala již detekce QRS a na ní závislá detekce QT intervalu.

Ke statistické analýze ke zjištění rozdílů v jednotlivých intervalech se použil Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky stejně jako při statistické analýze manuálního rozměření. Statistická analýza sledování rozdílů mezi skupinami na tomto automatickém rozměření neproběhla z důvodu menšího počtu experimentů u skupiny TL.

Tabulka 12: Místa v EKG záznamu na kterých probíhalo automatické rozměření

Název místa	Zkratka	Pozice místa
Stabilizace	S1	20. minuta stabilizace
Betablokátor 1	BB1	1 minuta po podání látky
Betablokátor 5	BB5	5 minut po podání látky
Betablokátor 10	BB10	10 minut po podání látky
Betablokátor 15	BB15	15 minut po podání látky
Betablokátor 20	BB20	20 minut po podání látky
Ischemie1	ISCH1	1. minuta ischemie
Ischemie5	ISCH5	5. minuta ischemie
Reperfúze5	REP5	5. minuta reperfúze
Reperfúze 15	REP15	15. minuta reperfúze
Reperfúze 20	REP20	20. minuta reperfúze

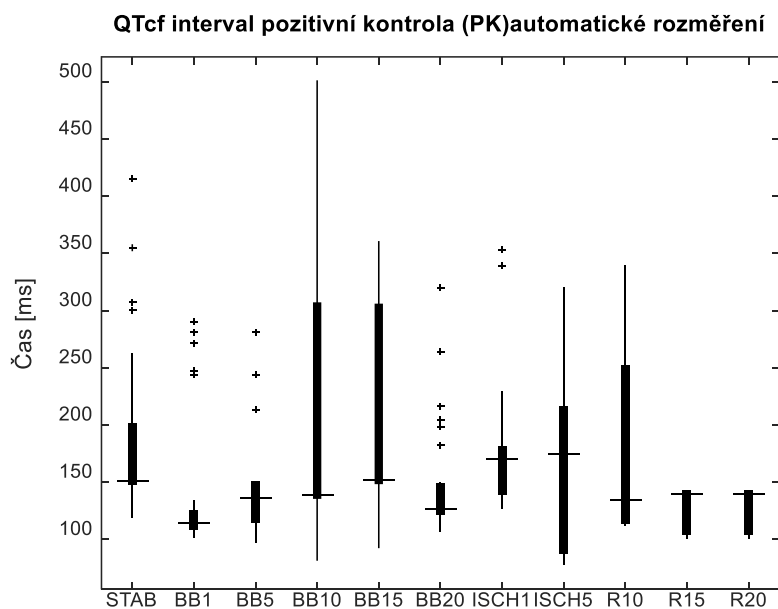
Výsledky statistické analýzy lze vidět v Tabulka 13. Z tabulky vyplývá, že pro skupinu NK se hodnoty QT intervalu změnily až v průběhu ischemie a reperfúze (Obrázek 37). Pro pozitivní kontrolní skupinu, které byl aplikovaný lék carvedilol došlo ke změně QT intervalu ihned po podání léku (BB1 a BB5). Následně ke konci aplikace léku (BB 20) a na začátku ischemie (ISCH1), (Obrázek 38). Během reperfúze nedošlo k signifikantní změně. Pro skupinu TL, které byla podaná látka TP 1 došlo ke změně QT intervalu po pěti minutách aplikace léku (BB5) a efekt trval dalších 5 minut (BB10). Dále byla signifikantní změna v QT intervalu ke konci ischemie a na začátku reperfúze, (Obrázek 39). Na Obrázek 39 je viditelný trend prodloužení.



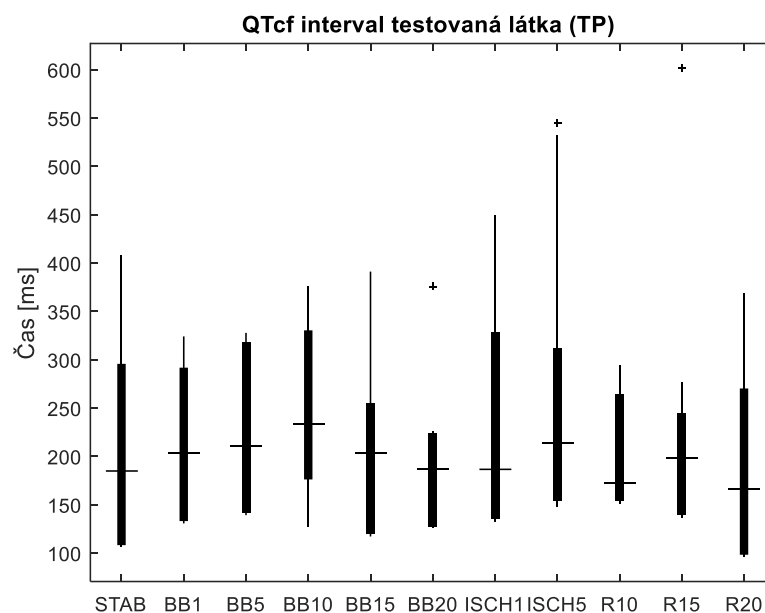
Obrázek 37: Krabicový graf intervalu QTcf pro negativní kontrolní skupinu (NK).

Tabulka 13: Výsledky Wilcoxonova testu intervalu QTcf pro automatické rozměření

	NEGATIVNÍ KONTROLA	POZITIVNÍ KONTROLA	TESTOVANÁ LÁTKA
PARAMETR	p hodnota QTcf	p hodnota QTcf	p hodnota QTcf
S1 X BB1	0.2472	8.1137e-08	0.2616
S1 X BB5	0.5201	3.1778e-04	0.0810
S1 X BB10	0.0030	0.6204	0.0256
S1 X BB15	0.1536	0.5395	0.7972
S1 X BB20	0.0012	0.0010	0.8181
BB20 X ISCH1	0.1623	0.0020	0.1075
BB20 X ISCH5	0.7394	0.3916	0.0256
BB20 X R10	0.2061	0.5692	0.0565
BB20 X R15	2.5360e-07	0.4823	0.0360
BB20 X R20	7.7422e-04	0.4823	0.7764
S1 X ISCH1	1.0618e-07	0.3711	0.1556
S1 X ISCH5	0.1668	0.5800	0.0909
S1 X R10	3.7633e-04	0.0635	0.7150
S1 X R15	2.9580e-11	1.8426e-06	0.7557
S1 X R20	2.8482e-09	1.8426e-06	0.1017



Obrázek 38: Krabicový graf intervalu QTcf pro pozitivní kontrolní skupinu (PK).



Obrázek 39: Krabicový graf intervalu QTcf pro skupinu, které byla podána testovaná látka (TL).

8.4.3 Diskuze výsledků

Pro hodnocení vlivu léčiva se využívá QT interval, proto byl navržen algoritmus, který zhodnotí délku tohoto intervalu. Byly vybrány dvě metody. Obě metody poskytují dobré výsledky, ale na lidských EKG záznamech. Vzhledem k tomu, že potkan má jinou kanálovou výbavu, nelze v jeho EKG křivce určit bod S a s ním spojený ST úsek. Tento fakt ale nijak neovlivňuje automatické metody, které byly vybrány pro detekci. Spíše ovlivňuje to, že výsledky testování léku na zvířeti nelze považovat za konečné a je nutné provést další testování a to nejprve na jiných druzích zvířete a následně na lidských subjektech.

Pro detekci konce vlny T byla vybrána metoda založena na templátu. Templát je předloha vytvořená ze signálu a algoritmus porovnává aktuální úsek signálu s tímto templátem. Jedná se tedy o metodu, která by se měla dostatečně přizpůsobovat vlně T. Ve většině případů došlo k relativně přesné detekci konce vlny T. Limitace tohoto algoritmu je v tom, že templát není pro všechny signály stejný. Uživatel si volí pro každý signál nový templát. Z tohoto důvodu nelze považovat daný algoritmus za automatický, ale pouze semiautomatický.

Philipsova metoda pro určení začátku kmitu Q byla v článku [35] interpretována tak, že poskytuje lepší výsledky než metody založené na derivovaném signálu. Proto byla zvolena i pro potřeby této práce. Využívá k detekci maximální diferenci mezi signálem a přímkou. Na signálech, na kterých byl vytvářen algoritmus, metoda poskytovala kvalitní výsledky. Signály z aplikace beta-blokátorů měly daleko horší kvalitu, proto metoda v některých případech selhala. O této metodě lze říci, že je velmi závislá na tvaru a kvalitě signálu.

Při porovnání z manuálního a automatického rozměření QTcf intervalu se dospělo k podobným závěrům. U skupiny NK se automaticky rozměřený QTcf interval měnil až od doby ischémie a reperfúze, stejně tak jako u manuálního rozměření. Avšak při porovnání rozměření pro PK došlo u automatického rozměření k prodloužení intervalu QTcf a u manuálního rozměření došlo naopak ke zkrácení. U skupiny TL v obou případech došlo k prodloužení QTcf intervalu.

U rozměření automatického se hodnoty QTcf pohybují okolo 150-300 ms, kdežto u rozměření manuálního jsou tyto hodnoty 100-150 ms. Protože v manuálu není stanoveno, jak komerční systém hodnoty získává, nelze tyto hodnoty porovnávat. Lze se pouze domnívat, že se jedná o využití stejného postupu pro korekci QT.

9 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá vlivem nově syntetizovaného léčiva na elektrickou aktivitu izolovaného srdce potkana. V úvodu práce je popsána problematika testování léčiv a s tím spojené používání laboratorních zvířat v experimentech. Pro účely této práce byl jako pokusné zvíře vybrán laboratorní potkan. I přes značné fyziologické rozdíly je potkan často využíván v preklinických studiích hlavně díky jeho dobré dostupnosti a nižší ceně. Vzhledem k hodnocení elektrické aktivity je v teoretické části popsána EKG křivka a rozdíl mezi EKG křivkou u člověka a potkana. Účinky léčiv mají velký vliv na kardiotoxicitu, která může způsobovat závažná kardiovaskulární onemocnění. Proto je v teoretické části zmínka o poruchách srdečního rytmu, které mohou vzniknout v souvislosti s užíváním léků. Následuje kapitola ve které jsou popsány způsoby rozměření EKG záznamů. Zde jsou vyjmenovány nejpoužívanější metody pro detekci QT intervalu. Dvě z těchto metod byly realizovány.

Další část teoretického rozboru se věnuje popisu experimentů. Experimenty probíhaly na Fyziologickém ústavu lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Byly koncipovány tak, aby bylo možné sledovat vliv nově syntetizovaného léčiva na srdce potkana. Jako autorka práce jsem se těchto experimentů také účastnila. Nové léčivo, které bylo hodnoceno, vyvinuli na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno. Tato látka byla navržena na základě klinických požadavků jako beta-blokátor. Pro srovnání účinku nově syntetizované látky sloužil v praxi běžně používaný lék carvedilol. Bylo provedeno 12 experimentů, 9 z nich bylo úspěšných. Při dvou experimentech selhalo zaznamenávání EKG pomocí systému. U jednoho experimentu došlo ihned po napojení na perúzní systém k ischmii. Devět z experimentů bylo rozděleno do 3 skupin. Jedna skupina - negativní kontrola, druhá skupina - pozitivní kontrola s carvedilolem a třetí skupina - nová testovaná látka.

Experimentální záznamy všech třech skupin byly vyhodnoceny dvojím způsobem. Prvním způsobem bylo manuální hodnocení pomocí komerčně dostupného systému. Z tohoto hodnocení systém poskytl referenční hodnoty důležitých parametrů, které byly následně statisticky zpracovány. Druhým způsobem bylo automatické rozměření pomocí vytvořeného algoritmu.

U manuálního rozměření se podařilo prokázat, že u léku carvedilolu došlo k poklesu tepové frekvence a zkrácení QRS intervalu, tak jak se předpokládalo. Podobné výsledky byly dosaženy i u nového léku. V diplomové práci vytvořený algoritmus ukázal změnu v QTcf intervalu. Lze ho použít pro účely sledování účinku nového léku.

10 LITERATURA

- [1] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2003, 771 s. ISBN 8024705125
- [2] XUE, Qiuzhen, Shankara REDDY, James M. LINDAUER, Richard E. GREGG a Dirk Q. FEILD. *Algorithms for computerized QT analysis*. DOI: 10.1016/S0022-0736(98)80072-1. ISBN 10.1016/S0022-0736(98)80072-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022073698800721>
- [3] *Fyziologie kardiovaskulárního systému: Převodní systém srdeční* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=194075&lang=fr>
- [4] BORSKÁ, Lenka. *EKG desatero*. DOI: 80 – 86633 – 52 – 7. ISBN 80-866-3352-7
- [5] KONOPELSKI, Piotr; UFNAL, Marcin. *Electrocardiography in rats: a comparison to human*. *Physiological research*, 2016.
- [6] OLEJNICKOVA, Veronika, Marie NOVAKOVA a Ivo PROVAZNIK. *Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances*. DOI: 10.1007/s11517-015-1270-2. ISBN 10.1007/s11517-015-1270-2. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11517-015-1270-2>
- [7] GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. DOI: 80-7262-311-7. ISBN 80-726-2311-7
- [8] WILHELM, Zdeněk. *Stručný přehled fyziologie člověka pro bakalářské studijní programy*. DOI: 978-80-210- 5283-3. ISBN 978-80-210-5283-3
- [9] VÍTEK, M. *Automatické rozměření signálu EKG*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 129 s. Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Jiří Kozumplík, CSc
- [10] JURAJDA, Michal, Julie Bienertová VAŠKŮ, Lydie Izakovičová HOLLÁ, Kateřina KAŇKOVÁ, Michal MASÁŘIKOVÁ, Lukáš PÁCAL, Monika Pávková GOLDBERGOVÁ, Anna VAŠKŮ: *Praktikum z patologické fyziologie. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů :: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity* [online] 18.1.2013, poslední aktualizace 8.7.2013 [cit. 2016-11-25] Dostupný z WWW: <<http://portal.med.muni.cz/clanek-605-praktikum-z-patologicke-fyziologie.html>>. ISSN 1801-6103
- [11] *Chemie léčiv* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/C8790/Farm06.pdf?lang=en>
- [12] *Laboratorní zvířata* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/zvirata/zvirata.htm>

- [13] *Inhalační anestezie laboratorních zvířat: Skriptum metodických materiálů* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: http://organonet.med.muni.cz/media/62770/vy_12.pdf
- [14] *Betablokátory u ichs: Postgradualni medicína* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/betablokatory-u-ichs-338158>
- [15] *MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ HEMODYNAMIKY KOMBINOVANOU LÉČBOU POZITIVNĚ INOTROPNÍMI LÁTKAMI A BETABLOKÁTORY: Disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D.* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/90637/lf_d/K_nahravani.pdf
- [16] BLOOM, Heather L., Aaron I. VINIK a Joe COLOMBO. Differential effects of adrenergic antagonists (Carvedilol vs Metoprolol) on parasympathetic and sympathetic activity: a comparison of clinical results. *Heart International*. 2014(9). DOI: 10.5301/HEART.2014.12496. ISSN 2036-2579.
- [17] *ÚČINOK VYBRANÝCH ANTIDEPRESÍV NA FUNKCIU SRDCA POTKANOV V PODMIENKACH ISCHEMICKO-REPERFÚZNEHO POŠKODENIA* [online]. In: [cit.2017-01-02]. Dostupné z: <https://portal.med.muni.cz/download.php?fid=1012>
- [18] STRAČINA, T.; RONZHINA, M.; STARK, T.; RUDA, J.; OLŠANSKÁ, E.; VESELÝ, P.; MICALÉ, V.; NOVÁKOVÁ, M. Prolonged QT interval in neurodevelopmental rat model of schizophrenia. In *Computing in Cardiology*. 2016. s. 1-4. ISBN: 978-1-5090-0684- 7.
- [19] HEJČ, Jakub, Martin VÍTEK, Marina RONZHINA, Marie NOVÁKOVÁ a Jana KOLÁŘOVÁ. A Wavelet-Based ECG Delineation Method: Adaptation to an Experimental Electrograms with Manifested Global Ischemia. *Cardiovascular Engineering and Technology*, New York: Springer Publishing Company, 2015, roč. 6, č. 3, s. 364-375. ISSN 1869-408X. doi:10.1007/s13239-015-0224-z.
- [20] FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The Utility of the Small Rodent Electrocardiogram in Toxicology
- [21] AHLQUIST, RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*. 1948
- [22] CHOBANIAN, Aram V. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure<SUBTITLE>The JNC 7 Report</SUBTITLE>. DOI: 10.1001/jama.289.19.2560. ISBN 10.1001/jama.289.19.2560. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.289.19.2560>
- [23] CHOBANIAN, Aram V. *Expert consensus document on β -adrenergic receptor blockers*The Task Force on Beta-Blockers of the European Society of Cardiology. DOI: 10.1016/j.ehj.2004.06.002. ISBN 10.1016/j.ehj.2004.06.002. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1016/j.ehj.2004.06.002>
- [24] MANCIA, G., G. DE BACKER, A. DOMINICZAK, et al. *2007 Guidelines for the*

management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). DOI: 10.1093/eurheartj/ehm236. ISBN 10.1093/eurheartj/ehm236. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehm236>

- [25] *Animal research info* [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.animalresearch.info/en/>
- [26] SOBOTKA, Pavel. *Patologická fyziologie: Praktikum*. 4 upravené vydání. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2128-9.
- [27] SVOBODNÍK, Adam, Regina DEMLOVÁ, Ladislav PECEN, Michaela HANÁKOVÁ, Pavla KADLECOVÁ, Jaroslav KOČA, Hana KOSTKOVÁ, Tomáš MACHULKA, Irena SOUČKOVÁ, Lenka SOUČKOVÁ, Martin ŠIMÍČEK a Radka ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinické studie v praxi*. 1. vyd. Brno: Facta Medica, 2014. 229 s. ISBN 978-80-904731-8-8.
- [28] *Betablokátory v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. SOLEN Medical Education: Medicína pro praxi* [online]. 2006(2) [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://solen.cz/>
- [29] Šíření vzruchu myokardem. In: *Wikiskripta* [online]. [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Depolarizace.png>
- [30] ŠTEFÁNEK, J. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF* [online]. [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>
- [31] LIPPINCOTT, W. *ECG interpretation made incredibly easy!*. 2011, 373 p. [cit. 2017-03-06]. ISBN 978-160-8312-894.
- [32] ABARBANELL, Aaron M., Jeremy L. HERRMANN, Brent R. WEIL, Yue WANG, Jiangning TAN, Steven P. MOBERLY, Jeremy W. FIEGE a Daniel R. MELDRUM. *Animal Models of Myocardial and Vascular Injury*. DOI: 10.1016/j.jss.2009.06.021. ISBN 10.1016/j.jss.2009.06.021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480409003515>
- [33] POGWIZD, Steven M., Donald M. BERS, Brent R. WEIL, Yue WANG, Jiangning TAN, Steven P. MOBERLY, Jeremy W. FIEGE a Daniel R. MELDRUM. *Rabbit models of heart disease*. DOI: 10.1016/j.ddmod.2009.02.001. ISBN 10.1016/j.ddmod.2009.02.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740675709000115>
- [34] LANGLEY, P a D ZHENG. *Fully Automated Computer Measurement of QT Interval from the 12-Lead Electrocardiogram* [online]. [cit. 2017-03-29]. Dostupné z: <https://physionet.org/challenge/2006/papers/0345.pdf>
- [35] CHROBÁK, Martin a Jiří KOZUMPLÍK. Porovnání nejpoužívanějších algoritmů pro detekci intervalu QT. *Elektrorevue* [online]. 2013, (4) [cit. 2017-04-19]. ISSN 1213-1539. Dostupné z: <http://elektrorevue.cz/>
- [36] VÍTOVEC, Jiří a Jindřich ŠPINAR. *Který betablokátor u srdečního selhání? Studie COMET - dala jasnou odpověď? Cor et Vasa*, Praha: Praha Publishing, 2003, roč. 45, č. 11, s. 527-528. ISSN 0010-8650.

- [37] KOZUMPLÍK, J. *Analýza biologických signálů*. Skripta UBMI FEKT VUT v Brně, Brno, 2012, 62 s. Dosud nepublikováno.
- [38] HAMILTON, P. *Open source ECG Analysis*. In *Computers In Cardiology 2002*, A. Murray, Editor. 2002. p. 101-104
- [39] HORIO, Toru, Shigenori ITO, Michihiko AOYAMA, et al. *Effect of carvedilol on atrioventricular conduction in the ischemic heart*. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00936-5. ISBN 10.1016/S0014-2999(00)00936-5. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299900009365>
- [40] ZHOU, Sophia H., Eric D. HELFENBEIN, James M. LINDAUER, Richard E. GREGG a Dirk Q. FEILD. *Philips QT Interval Measurement Algorithms for Diagnostic, Ambulatory, and Patient Monitoring ECG Applications*. DOI: 10.1111/j.1542-474X.2008.00258.x. ISBN 10.1111/j.1542-474X.2008.00258.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1542-474X.2008.00258.x>
- [41] STARC, Vito, Todd T. SCHLEGEL, James M. LINDAUER, Richard E. GREGG a Dirk Q. FEILD. *Real-time multichannel system for beat-to-beat QT interval variability*. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2006.03.004. ISBN 10.1016/j.jelectrocard.2006.03.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022073606000446>
- [42] BAUMERT, Mathias, Vito STARC, Alberto PORTA, Natasha M. MAURITS a Dirk Q. FEILD. *Conventional QT Variability Measurement vs. Template Matching Techniques: Comparison of Performance Using Simulated and Real ECG*. DOI: 10.1371/journal.pone.0041920. ISBN 10.1371/journal.pone.0041920. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041920>
- [43] FUJII, Kumiko, Yuji OZEKI, Hiroaki OKAYASU, et al. *QT Is Longer in Drug-Free Patients with Schizophrenia Compared with Age-Matched Healthy Subjects: Comparison of Performance Using Simulated and Real ECG*. DOI: 10.1371/journal.pone.0098555. ISBN 10.1371/journal.pone.0098555. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041920>
- [44] *Přehled vybraných parametrických a neparametrických testů ve statistice* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.fsps.muni.cz/~novotny/Statistika.htm>
- [45] RONZHINA, M.; POTOČNÁK, T.; KOLÁŘOVÁ, J.; PROVAZNÍK, I.: ANEG; *Software for annotation of heart beats ANEG*. (RONZHINA, M.; POTOČNÁK, T.; KOLÁŘOVÁ, J.; PROVAZNÍK, I.: ANEG; *Software for annotation of heart beats ANEG*. Ústav biomedicínského inženýrství, FEKT VUT v Brně, Kolejní 4 61200 Brno. URL: <http://www.ubmi.feec.vutbr.cz/vyzkum-a-vyvoj/produkty>. (software) <http://www.ubmi.feec.vutbr.cz/vyzkum-a-vyvoj/produkty>, počet stažení: 1)
- [46] DUBJAKOVÁ, Eva. *Metody mnohonásobného porovnávání pro jednoduché třídění* [online]. Brno, 2009 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/151390/prif_m/. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Marie Budíková.

- [47] MRKVIČKA, Tomáš a Vladimíra PETRÁŠKOVÁ. *Úvod do statistiky*. 2006. ISBN 80-7040-894-4.
- [48] SMITAL, L.; VÍTEK, M.; KOZUMPLÍK, J.: ASKLEPIOS; Software pro filtraci signálů EKG a srdečních akčních potenciálů. Ústav biomedicínského inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Kolejní 2906/ 4, 612 00 Brno, Česká republika. URL: <http://www.ubmi.feec.vutbr.cz/vyzkum-a-vyvoj/> produkty. (software)

SEZNAM PŘEVZATÝCH OBRÁZKŮ

[3] *Fyziologie kardiovaskulárního systému: Převodní systém srdeční* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=194075&lang=fr>

[44] *Přehled vybraných parametrických a neparametrických testů ve statistice* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.fsps.muni.cz/~novotny/Statistika.htm>

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

ms	milisekunda
mV	milivolt
ISCH	ischemická choroba srdeční
P	pravá polovina
L	levá polovina
SA	sinusový uzel
AV	síňokomorový uzel
EKG	elektrokardiogram
K-H	Krebs-Henseleitův roztok

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vývoj nového léčiva, převzato z [27]	15
Obrázek 2: Nově syntetizovaný beta-blokátor TP1	20
Obrázek 3: Převodní systém srdeční, převzato z [3]	21
Obrázek 4: Šíření vzruchu myokardem, převzato z [29]	24
Obrázek 5: Záznam EKG člověka (a) a potkana (b), převzato z [20]	26
Obrázek 6: Obecný princip zpracování EKG záznamu, převzato z [9]	33
Obrázek 7: Schéma detektoru komplexu QRS	35
Obrázek 8: Derivační metoda pro detekci začátku QRS komplexu, převzato z [35]	38
Obrázek 9: Philipsova metoda pro určení kmitu Q, převzato z [35]	38
Obrázek 10: Philipsova metoda pro určení konce vlny T, převzato z [35]	39
Obrázek 11: Metoda prodloužení polynomem 2. stupně pro určení konce vlny T, převzato z [35]	40
Obrázek 12: Schéma průběhu experimentů s aplikací beta-blokátoru.	43
Obrázek 13: Schéma jednotlivých fází experimentů s aplikací haloperidolu a jejich časy trvání	43
Obrázek 14: Schéma manuálního rozměření EKG záznamů s aplikací haloperidolu	44
Obrázek 15: Výsledek manuálního rozměření.....	45
Obrázek 16: Tabulka statistických testů, převzato z [44].....	47
Obrázek 17: Ukázka rozměření významných bodů pomocí software SPEL Advanced Haemosys	50
Obrázek 18: Krabicové grafy všech parametrů pro negativní kontrolní skupinu (NK), (interval: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)	53
Obrázek 19: Krabicové grafy všech parametrů pro pozitivní kontrolní skupinu (PK), (interval: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)	54
Obrázek 20: Krabicové grafy všech parametrů pro skupinu testovaná látka (TP), (interval: RR, PQ, komplex QRS a interval QTcf)	56
Obrázek 21: Krabicový graf RR intervalu jednotlivých experimentů ve skupině PK (šedá - 1. experiment, černá - 2.experiment, červená - 3.experiment).....	58
Obrázek 22: Krabicový graf RR intervalu jednotlivých experimentů ve skupině TL (šedá - 1. experiment, černá - 2.experiment, červená - 3.experiment).....	58
Obrázek 23: Krabicový graf PQ intervalu jednotlivých experimentů ve skupině PK (šedá - 1. experiment, černá - 2.experiment, červená - 3.experiment).....	59
Obrázek 24: Krabicový graf PQ intervalu jednotlivých experimentů ve skupině TL	

(šedá - 1. experiment, černá - 2.experiment, červená - 3.experiment).....	59
Obrázek 25: Ukázka různých arytmií v experimentálních záznamech.....	60
Obrázek 26: Blokvé schéma algoritmu pro rozměření QT intervalu.....	63
Obrázek 27: Mediánová filtrace signálu používaného k detekci kmitu Q a vlny T	64
Obrázek 28: Blokové schéma detekce kmitu Q.....	64
Obrázek 29: Vytoření přímky od maxima komplexu QRS po bod 60 ms před maximem	65
Obrázek 30: Postupná detekce kmitu Q ve všech třech iteracích.....	66
Obrázek 31: Detekované začátky kmitu Q pomocí Philipsovy metody	67
Obrázek 32: Blokové schéma detekce konce vlny T.....	68
Obrázek 33: Ukázka označení templátu	69
Obrázek 34: Určení konce vlny T pomocí metody založené na templátu	70
Obrázek 35: Detekovaný QT interval.....	70
Obrázek 36: Ukázka detekce QT intervalu na datech s aplikací beta-blokátorů.....	72
Obrázek 37: Krabicový graf intervalu QTcf pro negativní kontrolní skupinu (NK).....	73
Obrázek 38: Krabicový graf intervalu QTcf pro pozitivní kontrolní skupinu (PK).	74
Obrázek 39: Krabicový graf intervalu QTcf pro skupinu, které byla podána testovná látka (TL).	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní biologické parametry laboratorních zvířat, převzato z [12]	13
Tabulka 2: Klasifikace beta-blokátorů, (převzato z [28]).	17
Tabulka 3: Volba jednotlivých typů beta-blokátorů v léčbě kardiovaskulárních onemocnění (převzato z [28]).	19
Tabulka 4: Porovnání trvání vln a intervalů EKG u člověka a potkanů kmene Spague-Dawley a Wistar, převzato z [5]	26
Tabulka 5: Hodnoty manuálního rozměření	44
Tabulka 6: Místa v EKG záznamu na kterých probíhalo manuální rozměření	51
Tabulka 7: Výsledky Wilcoxnova testu pro negativní kontrolní skupinu (NK).....	52
Tabulka 8: Výsledky Wilcoxnova testu pro pozitivní kontrolní skupinu (PK)	54
Tabulka 9: Výsledky Wilcoxnova testu pro skupinu testovaná látka (TL)	55
Tabulka 10: Výsledky Kruskal-Wallisova statistického testu pro porovnání více skupin (hodnota $p < 0,05$, porovnávané skupiny NK a PK, NK a TL, PK a TL, ano = je signifikantní rozdíl, ne = není signifikantní rozdíl)	57
Tabulka 11: Tabulka průměrné a směrodatné odchylky mezi referenčními a detekovanými hodnotami pro data s aplikací haloperidolu	71
Tabulka 12: Místa v EKG záznamu na kterých probíhalo automatické rozměření	73
Tabulka 13: Výsledky Wilcoxnova testu intervalu QTcf pro automatické rozměření ...	74

SEZNAM PŘÍLOH

A Obsah přiloženého CD

A Obsah přiloženého CD

Přiložené CD obsahuje:

- Elektronická verze práce – ve formátu PDF je k dispozici v přiloženém CD pod názvem Korcakova_Ivona_DP.
- Realizovaný program – program v Matlab pro rozměření QT intervalu.
- Data – data ve formátu .mat.
- Informace ke spuštění programu.