

VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské a ekologické inženýrství

Student: Bc. Jiří Podhorský

ID: 101880

Ročník: 2

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Výpočet frekvenčně-admitančních charakteristik z naměřených patchclampových dat

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s problematikou měření iontových proudů buněčných membrán metodou patch-clamp a jejím využitím pro měření frekvenčně-admitančních charakteristik. Nastudujte možnosti využití změřených frekvenčně-admitančních charakteristik k popisu membránových proudů. V prostředí Matlab realizujte program pro výpočet frekvenčně-admitančních charakteristik z poskytnutých dat. Vlastní diplomová práce musí obsahovat formulaci cíle, charakteristiku současného stavu, teoretická a odborná východiska problémů.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Molecular devices: pCLAMP 10 user guide (manual), rev. A

[2] Šimurda J.: Měření elektrických projevů srdečního svalu. [Kandidátská disertace]. Brno 1975. 101s + přílohy. VUT v Brně. Fakulta elektrotechnická.

Termín zadání: 15.10.2010

Termín odevzdání: 20.5.2011

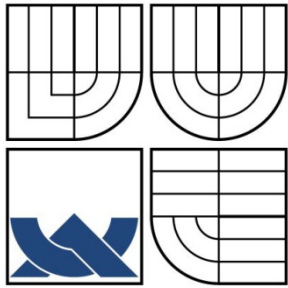
Vedoucí práce: Ing. Milan Rychtárik

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

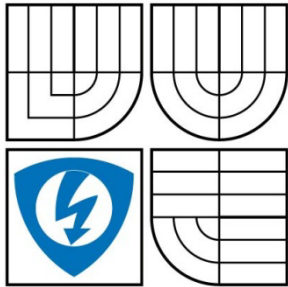
Předseda oborové rady

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.



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKACNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND
COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

VÝPOČET FREKVENČNĚ-ADMITANČNÍCH CHARAKTERISTIK Z NAMĚŘENÝCH PATCHCLAMPOVÝCH DAT

EVALUATION OF FREQUENCY-ADMITTANCE CHARACTERISTICS FROM MEASURED
PATCH CLAMP DATA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JIŘÍ PODHORSKÝ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MILAN RYCHTÁRIK

BRNO 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „**Výpočet frekvenčně-admitančních charakteristik z naměřených patchclampových dat**“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího semestrální práce s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené semestrální práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

podpis autora

Poděkování

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

V Brně dne 20. května 2011

.....

podpis autora

Anotace:

Předmětem diplomové práce je „Výpočet frekvenčně-admitančních charakteristik z naměřených patchclampových dat“. Výpočet je zpracován na základě studia uvedené problematiky měření iontových proudů buněčných membrán metodou patch-clamp a jejím využitím pro měření frekvenčně-admitančních charakteristik. Následně je zvolena metoda postupu výpočtu a realizace v prostředí Matlab z poskytnutých dat.

Annotation:

The goal of diploma these is ‘Calculation of frequency-admittance characteristics from measured patchlamps dates’. Calculation is made on the basis of study of mentioned problematic measure ion current cell membrane by patch-clamp method and its using for measure frequency-admittance characteristics. After it selected method of calculation was realized in software calculator Matlab.

Obsah

1. Úvod	1
2. Měření membránových proudů metodou Patch Clamp.....	2
3. Techniky Patch Clamp	3
3.1. Metody pro patch clamp záznam	3
4. Záznam měření membránové admitance malým vnuceným harmonickým napětím	11
5. Kvantitativní analýza membránových proudů srdečních buněk.....	13
5.1. Kvantitativní popis el. aktivity v srdečních buňkách.....	13
6. Filtrace a filtry	14
6.1. FIR filtry	14
6.2. IIR filtry	15
7. Metoda nejmenších čtverců	16
8. Adaptivní Filtrace	17
9. Analýza naměřených dat	19
10. Důkaz funkčnosti použitých metod výpočtu fáze a amplitudy.....	21
10.1. Metoda „proložení sinus“	22
10.2. Metoda „adaptivní filtr a proložení sinus“	23
10.3. Metoda „adaptivní filtrace a spektrální analýza“	26
11. Důkaz druhý – amplituda signálu	27
12. Segmentace	30
13. Základní výpočet admitance	31
13.1. FFT v matlabu	36
13.2. Použití oken.....	36
13.3. Sumace spektra.....	37
14. Frekvenčně-admitanční charakteristika.....	37
15. Závěr	38
16. Seznam obrázků:.....	40
17. Seznam použité literatury:	41

1. Úvod

Předmětem práce je najít možnost výpočtu frekvenčně-admitančních charakteristik srdeční buňky z reálně naměřených dat, která byla změřena patch-clampovou metodou. Realizovat program v prostředí Matlab, který bude data zpracovávat a vytvoří graf frekvenčně-admitanční charakteristiky.

V práci jsou popsány měřicí i vypočtení metody, které jsou jak při měření, tak při výpočtech používány a jsou nedílnou součástí procesu získání dat. Některé metodiky a postupy byly během práce zavrženy, protože nesplňovaly teoretické předpoklady a byly hledány další postupy, které se postupně blížily požadovanému výsledku a předpokládané validity. Obecně lze říct že ani jeden ze zkoumaných postupů nelze selektivně použít na realizaci předmětu práce, protože neexistuje ideální řešení výpočtu, který by eliminoval všechny nevýhody.

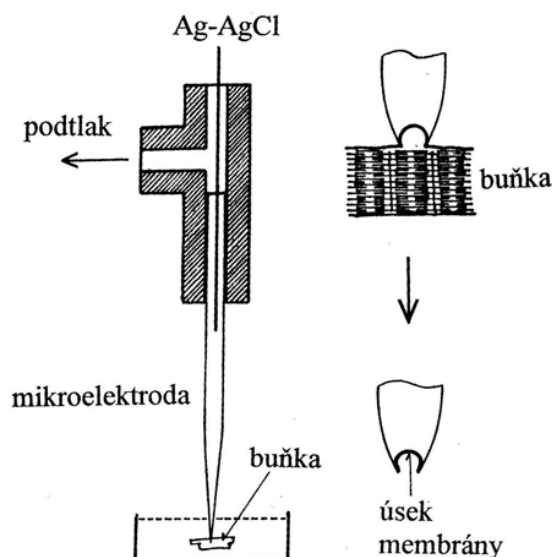
Důvodem proč studovat detailní elektrofyziologii buněk je skutečnost, že elektrické signály hrají primární roli při řízení činnosti všech hlavních orgánů v těle. Tyto signály zabezpečují rychlý přenos informací v celém organismu a spouštějí řetězce dějů, vedoucí k jejich kontrakci. Tyto děje vznikají na buněčné úrovni a získání jejich vlastností, popisu a chování je důležité pro řadu odvětví. Jsou důležité jak pro klinické diagnostické metody, tak pro výzkum a vývoj léků. Zde se zabýváme konkrétně elektrofyziologií srdečních buněk a kvantitativní analýzou měřených membránových proudů.

Velkou úlohu v získávání informací o chování a struktuře srdečních buněk představuje právě kvantitativní analýza a následný popis. Kvantitativní analýzou rozumíme zjištění koncentrace různých látek v daném vzorku.[1]

Průkopníky v modelování elektrické aktivity buněk jsou Alen Hodgkin a Andrej Huxley, kteří realizovali své pokusy na obrovském axonu sépie *Loligo* a dokázali tak matematicky popsat první model biologické membrány tzv. H-H rovnicemi. Zde jsou popsány napět'ově řízené kanály pro sodík a draslík. Právě tyto kanály hrají jednu z nejdůležitějších rolí v chování buněčné membrány. Za tuto práci dostali v roce 1963 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

2. Měření membránových proudů metodou Patch Clamp

Metoda patch clamp je laboratorní technika v elektrofyziologii, která umožňuje studovat jednotlivé nebo i více iontových kanálků v buňce a je možné analyzovat elektrické iontové proudy na molekulární úrovni. Název metody vychází z anglického slova „*patch*“, což lze přeložit jako malý kousíček a slova „*clamp*“, které souvisí s názvem metody „*voltage clamp*“ metoda vnučeného napětí. Jedná se tedy zjednodušeně o metodu „*voltage clamp*“ měřenou jen na velmi malém vzorku membrány tak, aby obsahovala co nejméně kanálů. K měření se používají skleněné mikroelektrody s otvorem velikosti okolo 1 μm . Mikroelektroda je přiložena na membránu buňky a podtlakem se membrána vychlípí dovnitř mikroelektrody a přilne ke sklu Obr. 2-1.



Obr. 2-1 Metoda „Patch-clamp“ [1]

Při měření na malém úseku membrány je odpor membrány řádově větší než odpor mikroelektrody, což nám vyhovuje pro měření a záznam proudů. Buňka je buzena generátorem napětí. Velikost měřených proudů se pohybuje řádově v nA při měření celé buňky a pA při měření jednoho kanálu. Bližší popis této metody je popsán v literatuře [1].

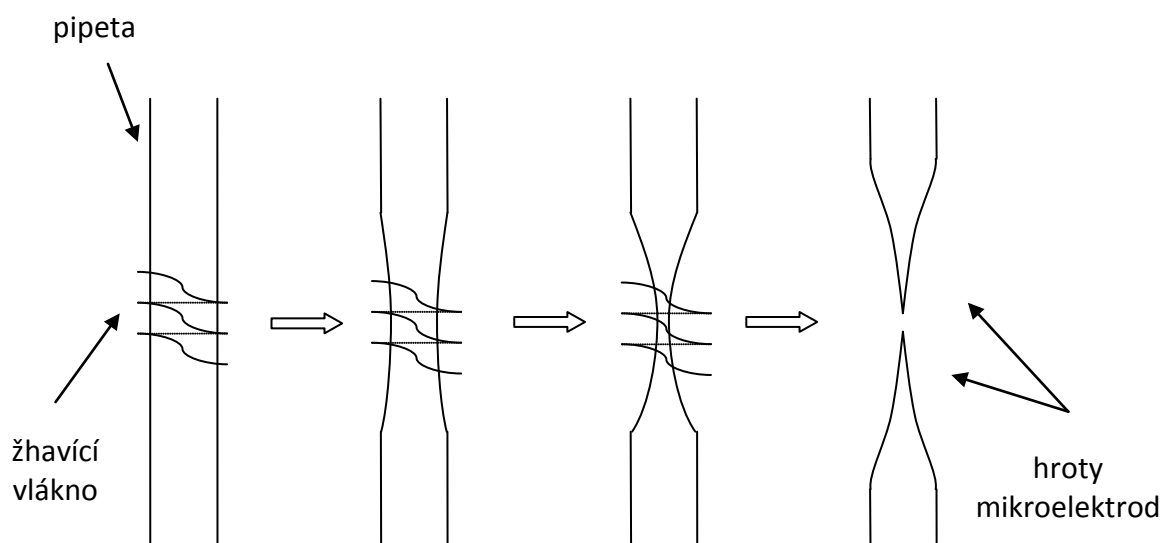
3. Techniky Patch Clamp

Jednotlivé techniky se od sebe liší způsobem přisátí pipety k povrchu buňky ale také způsobem zaznamenávání jednotlivých kanálků. V následujícím textu jsou popsány různé techniky záznamu. *Patch clamp* technika byla poprvé použita Ervinem Neherem and Bertem Sakmannem v roce 1976 na analýzu proudů skrz jednotlivé acetylcholinem aktivované kanálky v *cell-attached patches* buněk kosterních svalů žab. Metoda, kterou použili, a její částečné vylepšení vedla k technikám pro vysokorozlišovací měření proudů.

Single channel recording, což je záznam z jediného kanálku přináší informace o jednotné vodivosti a kinetickém chování iontových kanálků již částečně prozkoumaných klasickou *voltage clamp* a šumovou analýzou a vede k poznání nových iontových kanálků. Dohromady s metodou *whole-cell*, která dovoluje aplikaci *voltage clamp* buňkám, které jsou malé pro mikroelektrodové metody. *Patch clamp* technika také dovoluje vyšetření fyziologické role iontových kanálků v buňkách jinak nepřístupných *voltage clamp* a buňkám, které nejsou elektricky excitované.

3.1. Metody pro patch clamp záznam

Princip metody je izolovat patch membrány elektricky od vnějšího roztoku a zaznamenávat proud tekoucí do patche. Tohoto je dosaženo upravením pipety. Pipeta jakožto zprvu tenká dutá skleněná trubička je ve střední části natavena rozehřátou spirálou a následným tlakem na koncích trubičky je tlačena na vnější stranu od sebe, jak je naznačeno na Obr. 3-1. Pipeta se v rozžhavené části zúží. Následuje druhý krok, kdy se opět pipeta ve zúžené části nahřeje a roztrhne, čímž vzniknou dvě samotné mikroelektrody, jejichž špičky tvoří zúžené části. Pipeta je naplněna vhodným elektrolytickým roztokem, jehož vlastnosti se co nejvíce blíží intracelulárnímu prostředí měřené buňky. Následně je pipeta přitlačena na povrch buňky a lehkým přisátím je vytvořen kontakt s povrchem buňky. Tento proces je v mnoha případech nejdůležitější a nejtěžší na celém měření a vyžaduje obrovskou trpělivost. Buňky se po přisátí často začnou hýbat a mají tendenci se odtrhnout, navíc cukání buněk způsobuje impulsy, které se objevují v měření. Pohyb buněk se dá eliminovat omýváním roztokem obsahující bor. Roztok je po celou dobu pouštěn na buňku. Za předpokladu že pipeta a buněčná membrána jsou čisté, vznikne gigaohmové spojení buňky a elektrody tzv. „*gigaseal*“. Za těchto podmínek skleněná pipeta a buněčná membrána budou od sebe vzdáleny pouze jeden nm.



Obr. 3-1 Proces vytváření mikroelektrody

Vysoký gigaohmový odpor potřebujeme ze dvou důvodů. Za prvé, čím vyšší je odpor, tím větší je izolace membránového patche od mikroelektrody. Za druhé, odpor redukuje proudový šum při zaznamenávání jednoho kanálku ve vysokém časovém rozlišení, jejichž amplituda je řádově pA.

Šum pozadí je tedy minimalizován gigasealem. Rozdíl proudového šumu je příbuzný s Johnsonovým napěťovým šumem, který je dán vztahem

$$S_i^2 = 4kTf_c / R ,$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je teplota [°K], f_c je šířka pásma [Hz] filtru dolní propusti. Takže pro odpor 10 G Ω při 20 °C na 1 kHz je standardní odchylka proudového šumu 0,04 pA, ale pro odpor 100 M Ω to bude 0,4 pA. Při zaznamenávání *patch clamp*, bude odpor proudu záviset na všech odporových cestách vedoucích do země ze vstupu zesilovače, který se snižuje se vzrůstajícím odporem. Protože odpor patche je vysoký přibližně 100 Ω nebo více, nízký odpor spojení převládá a vyústí v šum, který zabrání dobrému rozlišení proudů menších než 4 nebo 5 pA. Taková byla situace v nejstarších *patch clamp* experimentech, kde odpor spojení byl menší než 100 M Ω . I přes tuto obtíž byla získána informace o acetylcholinem aktivovaných kanálcích a o blokačních efektech místních anestetik na tyto kanálky. Dále o glutamátém aktivovaných kanálcích hmyzího svalu. Úspěch

gigasealu výrazně zlepšil kvalitu zaznamenávání a umožnil studium kanálků nižší jednotné vodivosti.

Těchto spojení se většinou dosahuje dvoustavovým způsobem a způsobuje vysoké vylepšení poměru signál šum. Podmínky, které jsou zřejmě vyžadovány pro vznik gigaseal jsou následující:

1. Povrch membrány musí být čistý a bez extracelulárního roztoku a pojivové tkáně. Buňky v tkáňové kultuře jsou často preferovány; dospělé buňky jsou většinou čištěny enzymy nebo mechanicky.
2. Roztoky by neměly obsahovat prach a makromolekuly jakožto komponenty séra v tkáňové kultuře prostředí. Roztoky jsou filtrovány za použití 0,2 μm-etrových filtrů bez použití detergentů. Buněčné kultury jsou několikrát omyty, aby se odstranilo sérum.
3. Hrot pipety je očištěn právě při vytváření hrotu tavením pipety.
4. Během vytvoření každého spojení je aplikován malý pozitivní tlak na pipetu k odplavení roztoku z hrotu pipety a tak se zbrání pozůstatkům a drží ji čistou.[12]

Dále zde budou popsány různé metody *patch clamp* a jejich použití, rozdíly, výhody a nevýhody.

Loose-patch clamp

První z metod se nazývá *loose-patch clamp*. V určitých situacích, může být malý odpor spojení pipety a buňky výhodou. Tato vytvořená metoda dovoluje měření rozdělení iontových kanálků na membráně, využívá malého odporu spojení v mezeře, která existuje mezi membránou a pipetou, dovoluje postraní pohyb iontových kanálků. Pipeta má průměr zhruba 10 μm a je použita pro měření proudů z více iontových kanálků najednou. Proudů, které jsou sbírány pipetou, musí být násobeny *seal faktorem* k_s (*odporem spojení*), aby korigovaly dělení membránového proudu, který teče do země.

$$k_s = \frac{(R_{pip} + R_{seal})}{R_{pipseal}}$$

Tato metoda se používá k vyšetření sodíkových kanálků kosterního svalu. Kanálky jsou aktivovány stupňováním membránového potenciálu. Změnou napětí uvnitř pipety dosáhneme změny v membránovém potenciálu, což vyústí v rozsáhlé proudy, tekoucí skrz odpor spojení do zemního roztoku ve vaničce. Prosakující proudy musí být odečteny. Navíc napětí aplikované jako V_{ref} musí být větší než požadovaná změna v membránovém potenciálu *seal faktoru*, pro upravení rozdělení, které se vyskytuje mezi pipetou a spojením. Tyto úpravy

mohou být aplikovány smíšenými analogovými a digitálními prostředky. Jestliže je použita pouze jedna pipeta, nemůže být provedena žádná úprava pro přídavný zdroj chyby, aktivace nekontrolovaného napětí iontových kanálků v membráně pod okrajem pipety, kde je vytvořeno spojení. Koncentrovaná dvouhlavá pipeta může být použita na odstranění této chyby.

Cell-attached patch

Elektroda je přisáta k povrchu buňky. Patch buňky není nijak odstraněn a ani nedochází k destrukci či proděravění membrány. Jsou zaznamenávány pulzy pouze jedním kanálkem. Tato metoda slouží k měření charakteristik jednotlivých kanálků. Zkoumaný kanál se musí nacházet v části membrány, ke které je elektroda přisáta.

Inside-out patch

Po přisátí elektrody k buňce je elektroda prudce odtržena, přičemž útržek membrány zůstane stále přisán ke špičce elektrody. Tato metoda se používá při studiu kanálků ovládaných vnitrobuněčným ligandem. Výhodou je možnost snadno měnit koncentraci tohoto ligandu změnou externího roztoku.

Outside-out patch

Vzniká aplikací sáním a zničení membrány buňky. Po přisátí elektrody je odstraněn zbytek buňky, přičemž vnitřek útržku je perforován a membrána by měla být opět spojena s elektrodou. Okraje útržku membrány směřující mimo vnější okraj špičky mikropipety se spojí a výsledkem je „boule“ na špičce pipety, kdy je vnější část membrány orientována vnějškem ven vůči vnitřku elektrody. Výhodou tohoto způsobu měření je opět možnost snadno měnit koncentraci různých látek v okolí buněčné membrány [12].

Perforated patch

Je modifikací techniky *whole cell recording*. Patří mezi *gigaseal* metody, ale nevyužívá protrhnutí a zničení membrány. Výsledný elektrický kontakt s vnitřkem buňky je získán přidáním antibiotika do interního roztoku v mikropipetě. Přidání antibiotika způsobí narušení buněčné membrány a získání elektrického kontaktu s vnitřkem buňky. Výhodou tohoto způsobu měření, je nízká dualizace buňky oproti klasickému *whole cell recording*. Zároveň je tato technika využívána k vytvoření malých pórů v buněčné membráně, na nichž je možné testovat schopnost difuze monovalentních kationtů. Nevýhodou je v první řadě velký sériový odpor (součet odporu elektrody a spojení elektroda-buňka se v tomto případě pohybuje kolem

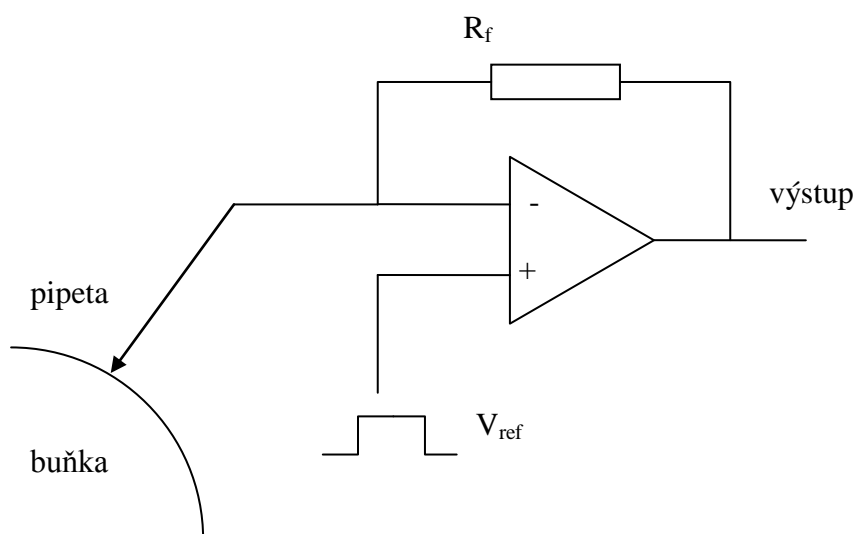
10 M Ω), který snižuje přesnost měření poměr signál-šum a v druhém případě pak nutnost dlouho čekat na ustálení sériového odporu a perforaci membrány antibiotikem, což jsou desítky minut [13].

Obrovský patch a měření proudů pump

Procedura byla popsána pro vytvoření gigasealu s pipetou s velkým průměrem (10-25 μ m) a byla použita pro studování elektrogenické pumpy a transport jednosměrných proudů. Je použita varianta lipophilické emulze na zlepšení odporu spojení a vytváří velké okolí izolované membrány. Proudů generované iontovými výměnnými procesy jsou nazvané jako sodíko-vápníková pumpa. Mnoho výměn je řízeno elektrochemickým gradientem sodíku. Jsou to velice malá rozložení, jako jednosměrné proudy a v normální velikosti patche nejsou v současné době měřitelné. U velkých patchů jsou proudy dobře rozeznatelné díky iontovým měničům a pumpám. Ty jsou využívány při *inside-out* konfiguraci dovolující změny na cytosolickém povrchu, který upraví poměr charakteristicky měřitelných proudů pipetou.[12]

Použití single channel recording

Obr. 3-2 ukazuje základní rysy zesilovače užitý *headstage* v patch clamp. Je to v podstatě operační zesilovač převádějící proud na napětí s velkým ziskem, kvůli velké zpětné vazbě rezistoru R_f , který je zařazen jako potenciál vnitřku pipety, V_{ref} , může být buď drženo jako trvalá úroveň nebo se měnit v rozumném tvaru.



Obr. 3-2 Schema *headstage*

Vstup zesilovače má JFET tranzistory s nízkým vstupním proudem a šumem. Musí se dávat pozor, aby vstup zesilovače nebyl poškozen v případě, když se současně dotýká země při připojování pipety. Odpor ve zpětné vazbě určuje citlivost, míra šumu v pozadí a rozpětí měření proudů. Jestliže i_p je proud protékající membránou a $V_{out}-V_{ref}$ je napěťový výstup.

Zpětnovazební odpor má podíl na proudovém šumu, který se snižuje s rostoucím odporem.

Pro stejnosměrné nízkošumové nahrávání by měl být $R_f = 50 \text{ G}\Omega$. Nicméně, protože V_{out} bude kmitat s maximální amplitudou $\pm 12\text{V}$, výstup *headstage* bude saturovaný, jestliže i_p přesáhne 240 pA . Ve *whole-cell recording* proudy mohou často přesáhnout tuto úroveň. Hodnota R_f musí být proto vybrána tak, aby byla vhodná pro experiment buďto předchozím výběrem vhodné *headstage* nebo užitím vhodného zesilovače, který umožní výzkumníkovi přepnout hodnotu R_f vzdáleně. Několik komerčních nástrojů obsahuje toto přepínání. Alternativou může být s upraveným 5 nebo $10 \text{ G}\Omega$ rezistorem pro R_f .

Kapacitní zpětná vazba. Šum vytvořený odporovou zpětnou vazbou je eliminován výměnou za kapacitní zpětnou vazbu vedoucí do invertujícího vstupu a vytváří proudový výstup, který je integrován v čase. Výstup je upraven derivátorem. Zlepšení poměru signál šum je zhruba 30% , kdy šum z ostatních zdrojů je minimalizován. Toto zlepšení se vyplatí pro vysokorozlišovací jednokanálové nahrávání. Nevýhodou je potřeba vybití napětí do kondenzátoru, jak se blíží výstupní napětí saturaci zesilovače, vytváří přechodný reset, který se přestože v zadání může objevit častěji s širším rozložením proudů takových, jako ty se kterými se setkáváme ve *whole-cell recording*.

Potenciál v pipetě je roven V_{ref} . Tento potenciál je nastaven pro nulový proud vyrovnávající potenciál na začátku experimentu. To může být nastaveno manuálně použitím *search mode* nebo *cracking mode* na patch clamp zesilovači, který používá integrační obvod k tomu, aby držel nulový proud podle nastaveného V_{ref} . Jak se získá jednou vysoký odpor spojení tak zesilovač přepne do *voltage clamp* modu, V_{ref} může být změněno, aniž by změnilo proud mezi pipetou a vaničkou (stejně jako v metodě *loos-patch*). Změna V_{ref} změní potenciál patche. Většina zesilovačů má deseti otáčkový potenciometr označený jako V_{HOLD} nebo V_{PIP} , který dovoluje změnit potenciál patche. Pulsy z externího zdroje ($V_{COMMAND}$) můžou být použity pro změnu V_{ref} postupně. Zpravidla protože šumu aplikovaného na *headstage* s řídicím signálem se objevuje v cestě proudu, řídicí napětí (a šum aplikovaný s ním) se

rozdělí do 10 nebo 50 složek v *headstage*, vyžadující řídicí puls o 10 nebo 50 složek větší než pipetový potenciál s lepším signálem.

Rychlé změny pravoúhlých pulsů dávají vzniknout rozsáhlým proudům v důsledku nabití zbloudilého kapacitního odporu spojeného s pipetou a buňkou. Ty mohou saturovat zesilovač, který musí být vybaven kompenzačními obvody. Oddělená kompenzace je obvykle poskytnuta pro rychlé (primárně zbloudilé) a pomalé (buněčné) kapacity.

Speciální pozornost je třeba věnovat uzemnění a stínění. Signálová zem zesilovače by měla být propojena s hlavním zemnicím bodem soustavy. Zemnicí svorka *headstage* je připojena k signálové zemi v zesilovači a je spojena s elektrodou vaničky. Všechna kovová příslušenství měření (vanička, misky, základní deska, stoleček mikroskopu, nánosník a kondenzátor) a jejich vodivé spojení by mělo mít ve spojení s hlavním zemnicím bodem menší odpor než $0,5\Omega$. Skříňka *headstage* zesilovače může být připojena na V_{ref} , aby se snížilo nabíjení během napět'ových skoků. Skříňka by proto měla být izolována od země, i když je nasazena na mikromanipulátor. V_{ref} může být dostupný u objímky *headstage*, aby mohlo být využito k minimalizování přechodných kapacitních proudů u pipety (ochraný potenciál).

Je důležité si zapamatovat konvenci membránových proudů, vnější tok kationtů (nebo vnitřní tok aniontů) je pozitivní. Výstupní polarita patch clamp může být + nebo $-R_f i_p$ určena vnitřním systémem po *headstage* a proto může být správný pro celé *whole-cell recording* a obrácený pro *cell-attached*.

Následující nástroje jsou zvláště užitečné pro práci patch clamp: 4FM nebo digitální (VTR nebo DAT) záznamová páska; počítačové rozhraní a software na voltage pulses datovou analýzu a šířku pásma charakteristického rekordéru [12].

Patch pipety

Vysoký odpor spojení mezi skleněnou pipetou a buněčnou membránou znamená, že se zde mezi nimi vyskytuje hydrofobní chemická interakce. Chemické složení skleněné pipety tedy může ovlivňovat parametry spojení, ačkoliv komplexní studie Rae & Lewis (1992) nepotvrzují žádné velké změny vlastností spojení za použití různých složení skleněných pipet. Další fakta, která musí být vzata v úvahu při výběru skleněné pipety, jsou následující:

- Schopnost vytvořit pipetu, jež bude mít vhodnou velikost, zúžení špičky a faktory, které mohou ovlivňovat oblast izolované membrány v patchy nebo sériový odpor v *whole –cell recoding*.
- Šum pozadí musí být maximálně redukován.
- Sklo obsahuje některé těžké kovy, aby byl redukován bod tání. Ionty těžkých kovů mohou z pipety vylouhovat roztok, který bude ovlivňovat kanálkové vlastnosti. Složení a vlastnosti různých typů skla jsou diskutované v Rae & Levis (1992).

Následující typy skel jsou běžně užívány:

Soft Glass (s nízkým bodem tání). Tento typ skla byl z počátku užíván pro patch clamp recording, protože se snadno táhlo a formovalo při relativně nízkých teplotách. Vyrobita se velká štěrbina pipety s tupými hranami. To není obvyklé pro použití jako nahrávací pipety, ale může být užitečná pro vytvoření velké apertury pro čištění tkáňových řezů nebo aplikace léků. Některá měkká skla obsahují stopy olova nebo barya (Ba) a hematokritové trubičky

'Pyrex' borosilicate glass (borokřemičité sklo)- Standardní skleněné mikroelektrody tohoto typu jsou obvykle používány nejběžněji jako patch pipety. Táhnutí a leštění vyžaduje vysoké teploty, obvykle oranžový žár platinového drátu. Někteří autoři argumentují, že spojovací vlastnosti těchto druhů pipet jsou lepší než *Soft Glass* (Sakmann & Neher, 1983), přesto že (Hamill a spol. 1981) tvrdí, že je spoj se sklem tohoto typu pak málo stabilní. Nízko odporové pipety (průměr 1-3 μm ; odpor 1-5 $\text{M}\Omega$) jsou většinou snadno taženy z tenkého skla. Tlusté sklo pipet zpravidla dělá lepší spojení a má nižší hladinu šumu, protože má nižší kapacitní odpor elektrody. Příslušenství k pipetě je zhotoveno z elektrodového skla, které má obzvlášť výhodné tavné žhavicí vlákno.

Sklo pro nízkošumový jednonábový záznam. Proudový šum ve vysokorozlišovacím záznamu je z důvodu rozdílů odporových a kapacitních vlastností tenkého skla ve špičce pipety ovlivněn typem použitého skla. Tyto vlastnosti jsou zhodnoceny v Rae & Levis (1992). Nejvýznamnější poznatky jsou ve velkém zlepšení poměru signál šum díky potažení *Sylgard* nebo jiným potažením pipety ze všech druhů skel. Značně lepší vlastnosti jsou dosaženy s pipetami z křemenného skla s nízkou rozptylovou vodivostí ve špičce pipety. Křemen změkne až při vysokých teplotách žhavicího vlákna. Pipety jsou taženy buď na plynovém ohni nebo na laserem zahřátém natahovákku.

Efekt skla na kanáلكové vlastnosti. Dvě studie ukazují, že použitý typ skla pro výrobu pipet může ovlivnit vlastnosti kanáلكového záznamu. Cota & Armstrong (1988) ukázali dva typy skel s nízkým bodem tavení z uhlíčitanu sodného nebo uhlíčitanu draselného, které produkovaly další rychlé inaktivace draslíkových kanáلكů ve srovnání s kanáلكovými vlastnostmi za použití borokřemičitého skla. To následně ukázalo očekávané uvolnění báryových iontů ze skla z uhlíčitanu sodného (Copello 1991). Furman & Tanaka (1988) srovnali vlastnosti cGMP-aktivovaných kanáلكů ve fotoreceptorové membráně zaznamenávané šesti druhy skel. Našli rozdíly v napěťově proudovém vztahu, který mohl být obrácený, když EDTA nebo EGTA (který váže těžké kovy) byl obsažen v mM koncentraci v pipetě roztoku se všemi až na jeden typ testovaných skel. Tyto a další úkazy signalizují nutnost nezbytně se vyhnout těm typům skel, u kterých se prokázalo ovlivnění vlastností kanáلكů a testovat znečištění těžkými kovy a porovnávat různé typy skel před použitím na záznamu z kanáلكů.

I druhý zdroj znečištění by měl být uveden. Ten vzniká z nerezové jehly pro zakládání pipet, které jsou považovány za zdroj různých iontů.

4. Záznam měření membránové admitance malým vnuceným harmonickým napětím

Princip metody spočívá v měření admitance membrány v podmínkách vnuceného napětí. Napětí je rostoucí od -80 mV do $+20$ mV. Na něj je superponován harmonický signál s určitou frekvencí, ale dostatečně malou amplitudou okolo 1 mV, tak aby bylo možno soustavu považovat za kvazilineární. Byla změřena kmitočtová závislost admitance [3]. Výsledkem je soustava kmitočtových charakteristik v komplexní rovině, kde je parametrem vnucované membránové napětí. Tato admitance je obecně vyjádřena vztahem

$$y(\omega, E_S) = Y_{E_S} (i\omega T_{E_S} + 1) + \sum_{t=1}^k \frac{Y_{E_S}}{i\omega T_{E_S} + 1}, \quad (1)$$

kde $y(\omega, E_S)$ je admitance membrány, Y_{E_S} je veličina specifické vodivosti vztažená na jednotkovou plochu membrány, T_{E_S} je časová konstanta, jako funkce vnucené úrovně membránového napětí E_S [3].

Měření může probíhat dvojím způsobem. V prvním případě je možno měnit frekvenci při konstantním napětí a sledovat proudovou odezvu a následně proměřit charakteristiky pro požadovaná napětí. V druhém případě máme napětí o konstantní frekvenci superponované na náběžné napětí, které roste dostatečně pomalu tak, abychom zachovali membránu v ustáleném stavu. Tento způsob je pro nás vhodnější z hlediska realizace.

Jak jsme se již zmínili, podmínkou pro správné měření je ustálený stav membrány. Toho docílíme tak, že náběžné napětí budeme zvyšovat dostatečně pomalu. První problém nastává při nízkých kmitočtech, protože nám náběžné napětí deformuje tvar harmonické složky. Druhý problém nastává při vysokých hodnotách membránového napětí, kdy je buňka delší dobu depolarizována a její zatížení je nepřiměřené.

Řešení prvního problému by mohlo spočívat v superponování harmonické složky na schodovitou náběžnou stejnosměrnou složku nebo druhý způsob měření konstantního napětí a proměnné frekvence.

Výhodou naší používané metody je větší odolnost proti šumu vycházející z kmitočtové selektivity celého měření. Další výhodou je možnost získat popis jednotlivých proudových komponent bez použití blokátorů a získat tak kvantitativní popis v reálných fyziologicky příznivých podmínkách buňky.

Vyřešení měření výsledných admitancí je možné provést dvěma způsoby. Jeden spočívá v přímém měření impedance pomocí impedančního analyzátoru. Druhou možností je výpočet admitance z naměřených hodnot napětí a proudu. Výpočet je předmětem této semestrální práce a bude realizován v prostředí Matlab.

5. Kvantitativní analýza membránových proudů srdečních buněk

Dostupná data získaná z této analýzy umožnili formulovat realistické kvantitativní modely popsané skupinou nelineárních diferenciálních rovnic. Byly postupně doplněny popisem nově identifikovaných proudů a také ději mezi elektrickou excitací a buněčnou kontrakcí. Jsou popsány mnohé přístupy k *voltge-clamp* analýze membránových proudů, které přispěli k doplnění dat potřebných ke kvantitativnímu popisu. Ukazuje se, že počítačové simulace používající tyto modely jsou cennými nástroji pro detailní studie podmínek iniciace a farmakologické potlačení srdečních arytmií. [10]

Ve své první práci Alen Hodgkin a Andrej Huxley (dále jen HH) vytvořili základ kvantitativní analýze elektrických jevů v excitabilních buňkách. Přesto že pozdější experimentální data vedla k dalšímu rozpracování a generalizaci filozofie stanovená HH se stala a zůstala dosud hlavní metodou analýzy buněčné elektrické aktivity. V experimentech na obřích nervových vláknech HH analyzovali odezvy membránových proudů na trojúhelníkové napěťové pulzy. Po separaci kapacitních proudů se jim podařilo rozdělit celkový vodivý proud na součet iontových proudů přes membránové kanálky, které jsou charakterizovány selektivními vodivostmi iontů a kinetickými vlastnostmi. Každý kanálek v el. ekvivalentním okruhu membrány byl představován sériemi kombinace její vodivosti a elektromotorického napětí, které záviselo na koncentraci procházejících iontů na obou stranách membrány. Napěťová a časová závislost vodivostí byla popsána diferenciálními rovnicemi prvního řádu s koeficienty závislými na napětí. Řešení výsledné skupiny čtyř diferenciálních rovnic zahrnovalo odezvu membránového napětí, které vcelku dobře korespondovalo s akčním potenciálem zaznamenaných v experimentech.

5.1. Kvantitativní popis el. aktivity v srdečních buňkách

Později byly identifikovány nové kanály a byly kvantitativně popsány. Zobecněná sada HH rovnic může být popsána vzorci

$$\frac{dU}{dt} = -\frac{1}{C} I_l(U, x_l) + \frac{1}{C} I_m, \quad l = 1, \dots, k, \quad (2)$$

$$\frac{dx_l}{dt} = \frac{1}{\tau_l(U)} [x_{l\infty}(U) - x_l], \quad (3)$$

kde U je membránové napětí, I_m membránový proud z externího zdroje, I_l představuje celkový iontový proud membránových kanálů. Bezrozměrné veličiny x_l jsou v intervalu (0;1) a mohou být interpretovány na molekulární úrovni jako pravděpodobnosti výskytu kanálových vrátek v otevřeném stavu. $x_{l\infty}$ jako funkce membránového napětí jsou vyjádřeny empirickými vzorci. Veličiny x_l se vyskytují v popisu proudů, které neodpovídají okamžitým krokům membránového napětí, ale jsou aktivovány (deaktivovány) po zpoždění. Dva první kvantitativní modely srdečního akčního potenciálu založené na analýze měřených membránových proudů zahrnovaly základní komponenty I_l [10].

6. Filtrace a filtry

V analýze signálů rozumíme filtraci jako potlačení určitých složek signálu. Nejčastěji myslíme složky signálu ve frekvenční oblasti. Jedná se o harmonické komponenty signálu, ze kterých je podle Fourierovy transformace signál složen a jejichž amplituda a fáze se filtrací změni. Tyto vlastnosti jsou u filtru zobrazeny jako amplitudová a fázová charakteristika. Jelikož pracujeme s diskrétními signály, jsou tyto charakteristiky periodické a stačí udávat hodnoty jen v rozsahu kmitočtů $\langle 0, \omega_s/2 \rangle$, kde ω_s je úhlový vzorkovací kmitočet.

Požadavkem na tyto filtry je nulová fázová charakteristika, která souvisí s potřebou zachovat filtrovaný signál nezpožděný od originálního signálu. Obzvláště důležité je to v naší práci, kde budeme měřit fázové posunutí signálů.

Lineární časově invariantní filtry jsou hlavní aplikací diskrétních lineárních systémů a realizují konvoluci mezi svou impulzní charakteristikou a vstupním originálním signálem [8].

6.1. FIR filtry

FIR (finite impulse response) filtry patří mezi filtry s konečnou impulzní charakteristikou. Mezi základní vlastnosti FIR filtrů patří stabilita, možnost linearity fázové charakteristiky, velký řád přenosové funkce, hůře se dosahuje strmosti mezi propustným a nepropustným pásmem, je nerekurzivní a zasahuje vždy do časového i frekvenčního průběhu. Zprvu budeme používat filtry jen pro potlačení šumu typu dolní propust. Potřebujeme lineární fázovou charakteristiku a strmost mezi propustným a nepropustným pásmem nepotřebujeme nijak zvlášť strmou. V případě potřeby FIR filtru se strmou charakteristikou je možné toho

dosáhnout dlouhou impulzní charakteristikou, ale výpočet takového filtru je velice profesně a časově náročný.

Tyto filtry jsou definovány N hodnotami impulzní charakteristiky tvořící vektor systémových konstant $\mathbf{h} = [h_n]$, $n \in \langle 0, N - 1 \rangle$. Diferenční rovnice hodnot vyjadřuje konečnou diskretní konvoluci

$$y_n = \sum_{k=0}^{N-1} (x_{n-k} h_k) \quad (4)$$

FIR filtry lze navrhnout s lineární fázovou charakteristikou. Abychom docílili linearitu, potřebujeme, aby impulzní charakteristika splňovala jednu z podmínek

$$h_n = h_{(N-1-n)} \text{ nebo } h_n = -h_{(N-1-n)},$$

což je tzv. symetrická resp. antisymetrická charakteristika. Detailnější vlastnosti filtrů, metody návrhů a realizaci najdeme v literatuře [8] a [9].

6.2. IIR filtry

IIR (infinite impulse response) filtry patří mezi filtry s nekonečnou impulzní charakteristikou. Mezi základní vlastnosti IIR filtrů patří malý řád přenosové funkce, relativně malé zpoždění při zpracování vstupního vzorku, nestabilita, nelineární fázová charakteristika a jsou rekurzivní. Vzhledem k nelineární fázové charakteristice se v našem případě IIR filtrům snažíme vyhnout. Ve srovnání s FIR filtry jsou IIR filtry při srovnatelné kvalitě zpracování signálů řádově méně náročné na rozsah výpočtů. Pokud bychom chtěli využít výhod IIR filtrů je tu možnost při známé fázové charakteristice tuto nevýhodu korigovat avšak takový zásah je velice pracný a způsobil by nepřesnosti ve výpočtech.

IIR filtry jsou popsány rekurzivními diferenčními rovnicemi

$$y_n = \sum_{i=0}^r (L_i x_{n-i}) - \sum_{i=1}^m (K_i y_{n-i}) \quad (5)$$

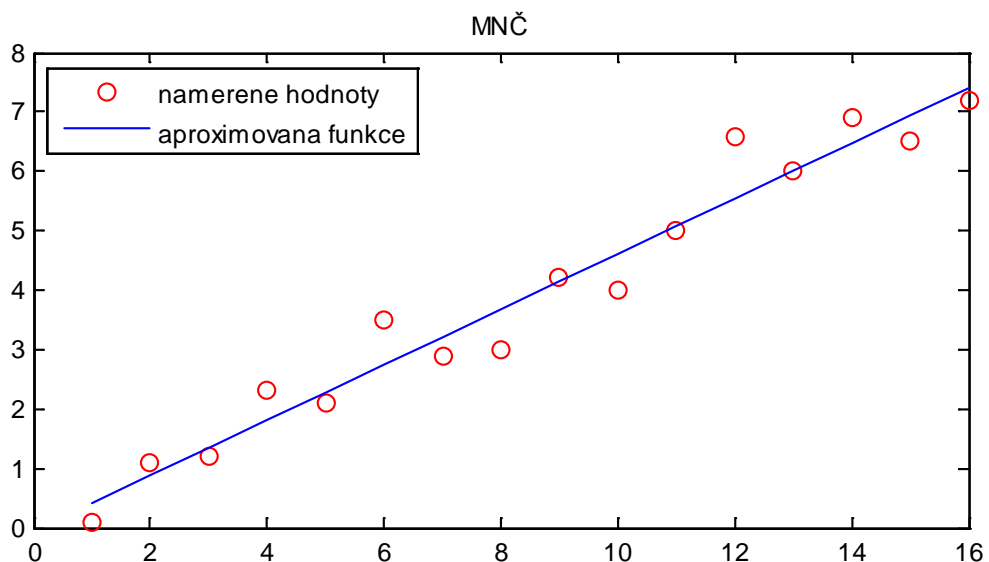
Kde L_i a K_i jsou systémové koeficienty v dopředných resp. zpětných vazbách, r je počet zpoždění v nerekurzivní a m v rekurzivní části systému [8].

7. Metoda nejmenších čtverců

Jednou z mnoha úloh matematiky je aproximace funkcí. Aproximace se používá například pro proložení funkce dané funkční tabulkou naměřených hodnot. Tyto hodnoty mohou být například výsledky měření. Díky této aproximaci najdeme daný předpis funkce z hodnot, který jsme naměřili a ze kterých není jasný předepsaný průběh funkce. Nejjednodušší příklad aproximace vidíme na Obr. 7-1 kdy prokládáme všechny naměřené body přímkou neboli polynomem prvního řádu s rovnicí $y = f(u) = k_1 u + k_0$ dostaneme z normální soustavy rovnic vztahy

$$k_1 = \frac{n \sum u_i y_i - \sum u_i \sum y_i}{n \sum u_i^2 - (\sum u_i)^2}, \quad (6)$$

$$k_0 = \frac{\sum u_i^2 \sum y_i - \sum u_i \sum u_i y_i}{n \sum u_i^2 - (\sum u_i)^2}. \quad (7)$$



Obr. 7-1 Aproximace MNČ

Pro aproximaci parabolou platí aproximace s rovnicí $y = f(u) = k_2 u^2 + k_1 u + k_0$. Optimální parametry k_i získáme řešením soustavy rovnic

$$A^T A x = \begin{bmatrix} \sum u_i^4 & \sum u_i^3 & \sum u_i^2 \\ \sum u_i^3 & \sum u_i^2 & \sum u_i \\ \sum u_i^2 & \sum u_i & n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} k_2 \\ k_1 \\ k_0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum y_i u_i^2 \\ \sum y_i u_i \\ \sum y_i \end{bmatrix} = b. \quad (8)$$

Pro naše účely je důležitý pouze princip výpočtu proložení funkce, kdy budeme prokládat část průběhu sinusovou funkcí o známé frekvenci, ale neznámé amplitudě a fázi. Funkci prokládáme podole vzorce

$$A e^{i\left(\frac{2\pi ft}{f_{vz}} + \varphi\right)}, \quad (9)$$

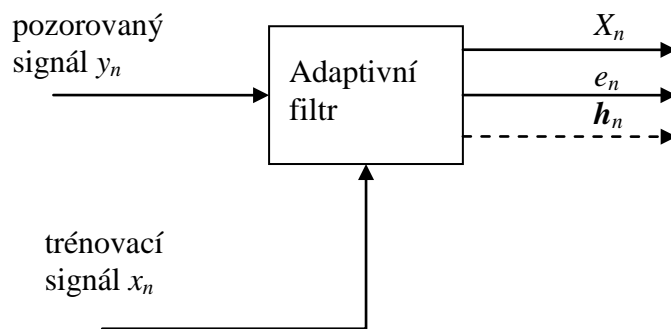
a stejně jako v předchozích příkladech hledáme takové A a φ , kdy je součet ploch čtverců nejmenší. Vytváříme tím vlastně amplitudový a fázový demodulátor. V určitých situacích může být problematické správně rozeznat fázový posuv (například rozeznání 0 a 180°). Takto velký rozdíl v reálných signálech sice nenastane, ale pokud se vyskytuje v signálu chyba či velký šum, může být problém rozeznat správnou fázi. Řešením je upravení výpočtu do adaptivní podoby tak, aby bylo rozhodnuto o správné fázi z předchozího výsledku sousedních výpočtů a případně i následujících výpočtů, aby nemohly být výsledky chybně ovlivněny hned od začátku výpočtů.

8. Adaptivní Filtrace

Adaptivní filtrací se rozumí použití filtru umožňujícího optimální odhad originálního signálu na základě zašuměné nebo zkreslené verze.

Filtr pracuje v neznámém prostředí, v němž předběžná identifikace není možná nebo jde o časově proměnné prostředí, jehož vývoj do budoucna není znám. Proto je třeba vytvořit adaptivní filtr, který je schopný se během filtrace učit a měnit své koeficienty v průběhu filtrace. Takový filtr bude pomaleji nebo rychleji reagovat na změny signálu. Jelikož adaptivní filtry nevyžadují předběžnou identifikaci zdroje, je nutné mu průběžně dodávat informace v podobě tzv. *trénovacího signálu*, který je přiváděn do filtru. Tento *trénovací signál* úzce souvisí se signálem, který požadujeme jako výstup z našeho filtru a dá se říct, že je jeho aproximací. V nejjednodušším případě je *trénovací signál* identický s výstupním signálem filtru.

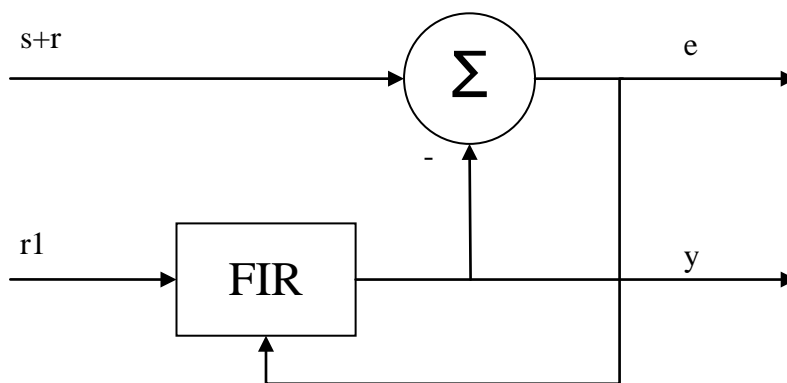
Na Obr. 8-1 je obecné schéma adaptivního filtru, který má dva vstupy v podobě *pozorovacího signálu* y_n který je filtrem zpracováván a *trénovací signál* x_n , který se svými parametry blíží požadovanému výstupu. Výstupy z filtru jsou X_n odhadovaný signál, který je aproximací originálu. Dále tu je $e_n = X_n - x_n$ chybový signál a \mathbf{h}_n což je posloupnost okamžitých hodnot vektoru parametrů filtru.



Obr. 8-1 obecné schéma adaptivního filtru

Adaptivní filtry mohou být navrženy jako filtry s nekonečnou nebo konečnou impulzní charakteristikou. A však přesnější odhad umožňují filtry s obecně rekurzivní strukturou typu ARMA. Jejich nevýhodou je, že mohou být nestabilní a vyžadují komplikovanější opatření v adaptačním mechanismu. Bližší informace jsou popsány v [8].

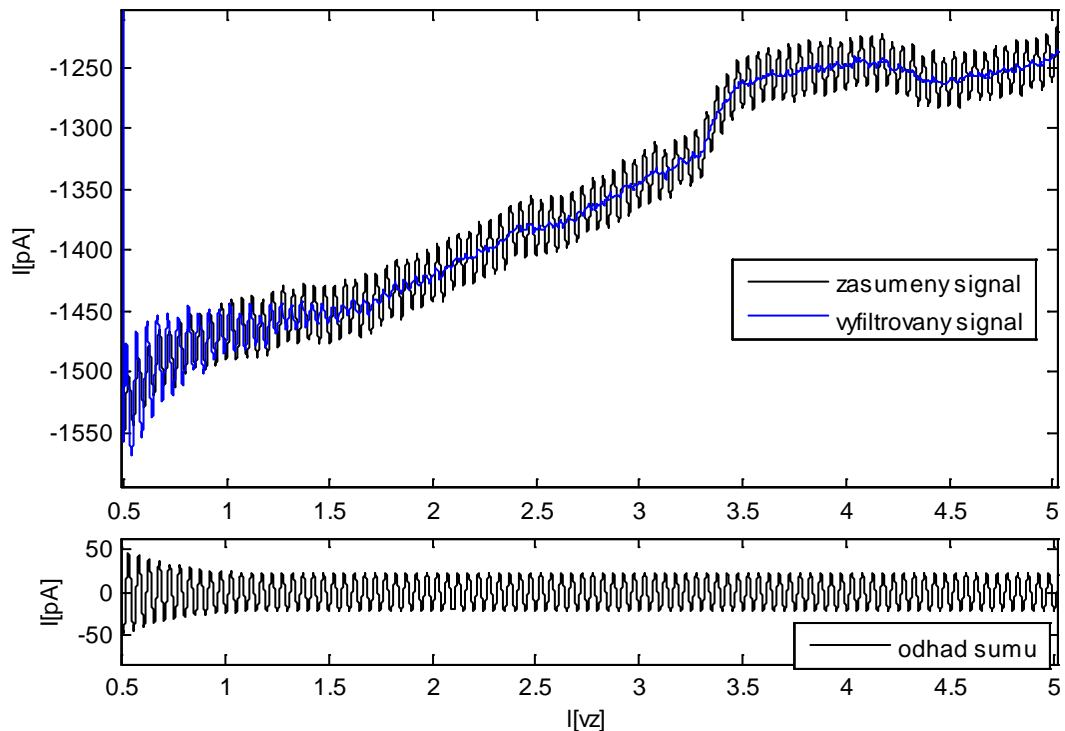
V našem případě budeme používat adaptivní filtr typu FIR tj. filtr s konečnou impulzní charakteristikou, který je popsán v kapitole 6.1.



Obr. 8-2 Blokové schéma adaptivního filtru

Ve skutečnosti je použita koncepce adaptivního filtru pro adaptivní potlačení rušení. Vycházíme z předpokladu, že rušení je harmonický signál s náhodnou fází r , který je korelován se signálem $r1$. Součet $s+r$ vyjadřuje harmonický signál v součtu s nosným rampimpulzem. Výsledkem je odhad šumu y , kterým je právě ten harmonický signál, který chceme získat. Dalším výstupem je signál e , který je zbaven harmonického signálu a reprezentuje nechtěnou složku signálu.

V souhrnu jde o následující postup. Máme dva signály, jež jsou zaznamenány z buňky. Jde o napěťový signál se superponovanou harmonickou složkou a signál proudu, kde je neznámým způsobem superponován harmonický signál o stejné frekvenci. Jelikož frekvenci harmonického signálu známe, můžeme využít odhad této harmonické složky. Odečtení už je jen kontrolou pro správný postup.



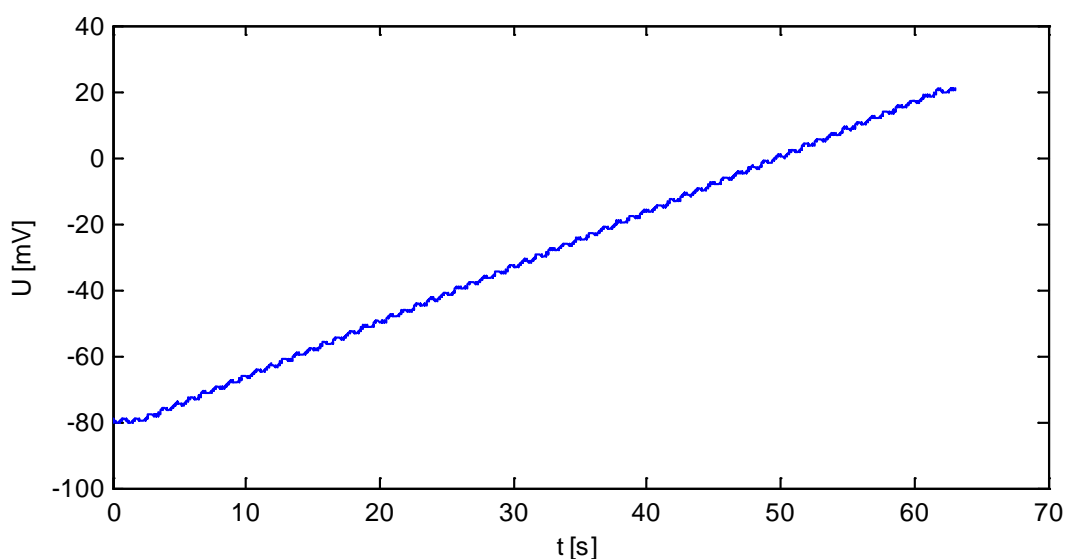
Obr. 8-3 Ukázka práce adaptivního filtru

Na Obr. 8-3 vidíme část reálného proudového signálu. Výsledný odhad šumu je harmonický signál, který je připraven k další analýze.

9. Analýza naměřených dat

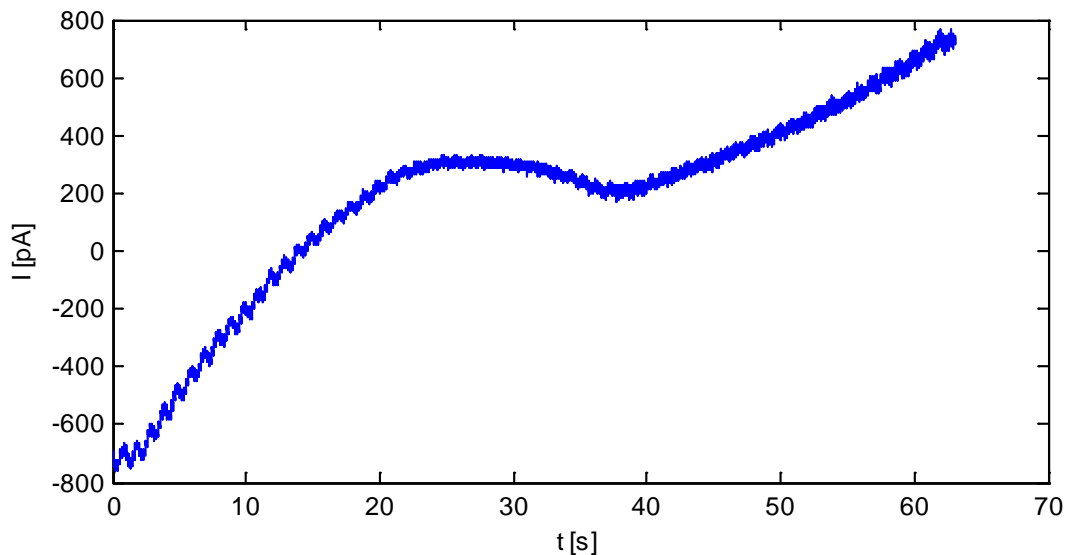
Naměřená data pořídil výše popsanou metodou pomocí programu „pclamp 10.0 – complex 10“ [4] vedoucí práce Ing. Milan Rychtárik. Data byla uložena do souboru abf (axon binary files v 2.0). Jelikož jsou data uložena ve formátu, který Matlab neumí samostatně číst ani zpracovávat, musel být použit skript „import_abf“ a knihovny „abf2mat.m“ a „abf2mat.m_batch“, který dokáže data převést a načíst do Matlabu. Autorem skriptu je John Bender [7].

Na Obr. 9-1 vidíme průběh postupně rostoucího vnučeného membránového napětí. Úroveň se pohybuje od -80 až do +20 mV. Na toto napětí je superponována střídavá složka o frekvenci 1 Hz o amplitudě 1 mV. Vzorkovací frekvence, kterou je signál snímán byl zvolen 10 kHz. Vzorkovací frekvence je dostatečná, maximální frekvence superponované složky je 400 Hz, což nám dává na jednu periodu záznamu $vz = \frac{fvz}{f} = \frac{10^4}{400} = 25$ vzorků. Záznam byl původně dlouhý 64 sec, obsahoval však zbytečné informace z následujícího měření. Proto budeme pracovat jen se signálem dlouhým 63 sec., což platí i pro proudovou odezvu.



Obr. 9-1 Vnučené membránové napětí a superponovaná složka 1 Hz

Typický průběh proudové odezvy je vidět na Obr. 9-2. Na první pohled je zřetelně vidět odezva na harmonický signál. Šum se v signálu vyskytuje na relativně malé úrovni, pohybujeme se řádově v pA. Za pozornost stojí i kolísání proudu v rozmezí 25-40 sec, což vypovídá o nelinearitě systému.



Obr. 9-2 proudová odezva na vnučené napětí pro 1Hz

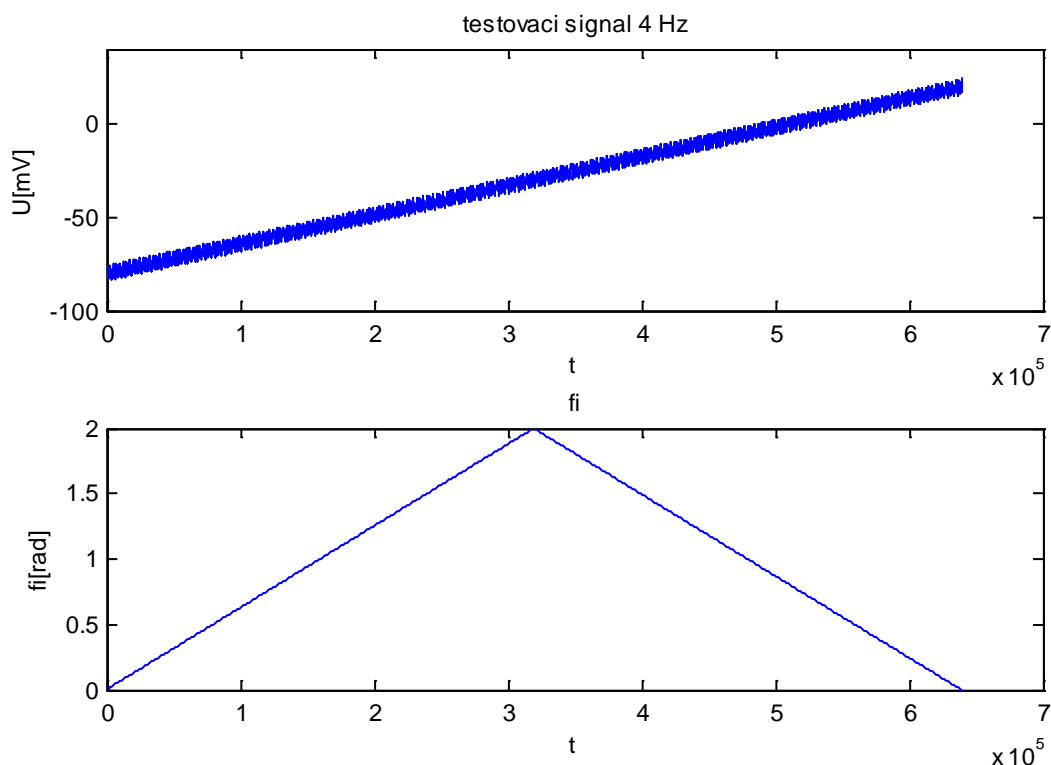
Tyto a podobné průběhy byly změřeny při konstantním kmitočtu 1, 4, 10, 40, 100 a 400 Hz. Detailní analýza bude provedena v následujících kapitolách.

10. Důkaz funkčnosti použitých metod výpočtu fáze a amplitudy

Byl vygenerován umělý signál dle vzorce:

$$A \sin\left(\frac{2\pi f t}{f_{vz}} + \varphi\right), \quad (10)$$

kde A - je amplituda periodické funkce, t - čas neboli časový úsek signálu, f_{vz} - vzorkovací frekvence a φ - počáteční fázový posuv. Amplituda periodické funkce je zvolena 4 [mV], frekvence 4 [Hz] a časový úsek signálu byl zvolen 64 [s] při vzorkovací frekvenci 10 [kHz], což odpovídá reálně naměřeným signálům. Tento signál byl následně fázově modulován, modulační průběh je vidět ve spodní části obrázku Obr. 10-1 Vygenerovaný umělý signál a průběh jeho fáze. Dále byl připočten náběžný ramp impulz v rozsahu -80 až +20 [mV].



Obr. 10-1 Vygenerovaný umělý signál a průběh jeho fáze

10.1. Metoda „proložení sinus“

Byla zkoumána jen pro testování proložení amplitud segmentu signálu. Fáze je u této metody vypočítána správně a výsledkem je na Obr. 10-3 černý průběh.

Signál je rozdělen na segmenty, ve kterých se určí amplituda a fáze. Původně byl každý segment zbaven náběžného impulzu odečtením směrnice, která byla získána metodou nejmenších čtverců viz. kap. 7. Takto získaná směrnice však neodpovídala skutečnému náběžnému impulzu. Proto je vyzkoušen následující krok, aby odhalil, zda bude získaná amplituda a fáze závislá na skutečné směrnici signálu.

Následně byla na každý segment aplikována funkce proložení kosinusovou funkcí danou exponenciálním tvarem komplexního čísla

$$A e^{i\left(\frac{2\pi ft}{fvz} + \varphi\right)} \quad (9)$$

Při neznámých hodnotách Amplitudy A a fáze φ , dále viz. **Metoda nejmenších čtverců**. Délka segmentu byla zvolena na dvě periody, aby byl získán dostatečný počet hodnot a zároveň při takto krátkém segmentu se nejvíce projeví chyba způsobená náběžným impulzem. Průběh vypočtených koeficientů fáze a amplitudy jsou zobrazeny na Obr. 10-3. (pro tuto

metodu černou barvou). Pokud jde o fázi, vidíme, že odpovídá modulačnímu průběhu z Obr. 10-2. Při pozornějším pohledu zjistíme, že fáze nezačíná v nule, což je způsobeno jen oříznutím signálu při výpočtu, který je nutný hlavně pro druhou metodu. Avšak vypočtená amplituda periodické funkce se pohybuje v rozmezí 4,02 až 4,12 [mV], což odpovídá chybě pohybující se v rozmezí 0,5 až 2,49 %. Při dané amplitudě 4 [mV].

10.2. Metoda „adaptivní filtr a proložení sinus“

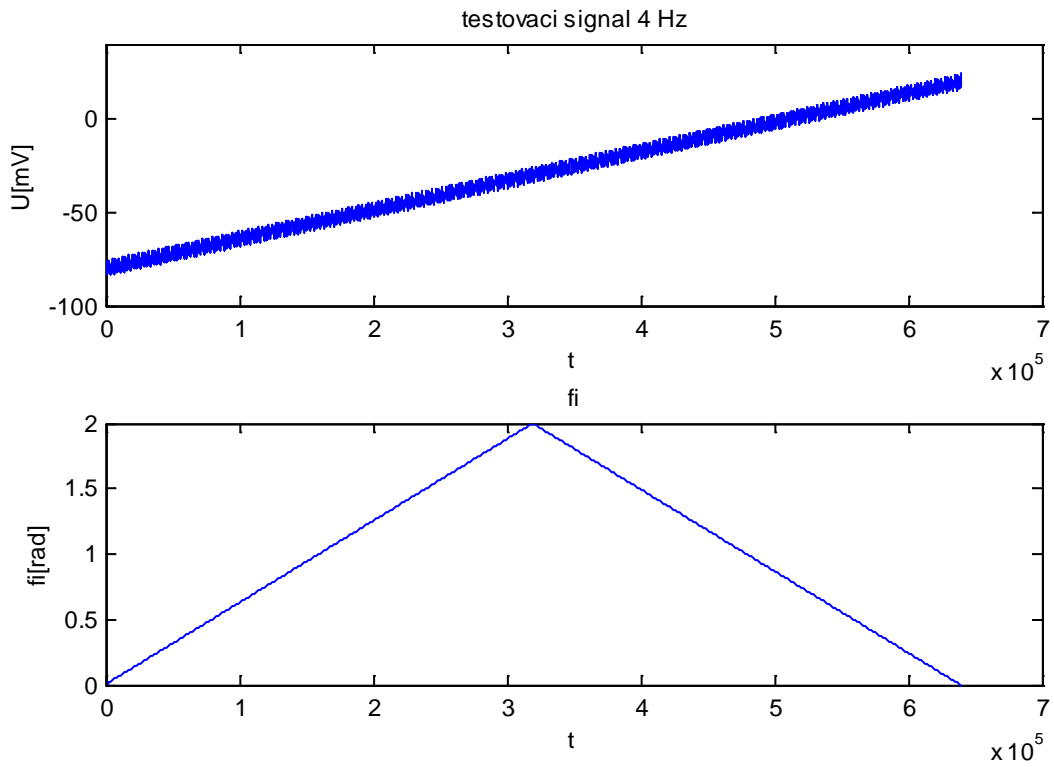
Využívá stejný postup, jako je popsán v předchozí metodě, který je však doplněn o adaptivní filtr. Cílem je dokázat že adaptivní filtr neztratí fázi hledaného signálu. Adaptivní filtr je užit také pro získání periodického signálu z šumu.

Přesuneme se do bodu, kdy máme již vygenerovaný testovací signál, na který je aplikován adaptivní filtr viz **Adaptivní Filtrace**. Filtru je zadán pomocný signál, podle kterého se filtr adaptuje. Pomocný signál zadáváme ve tvaru

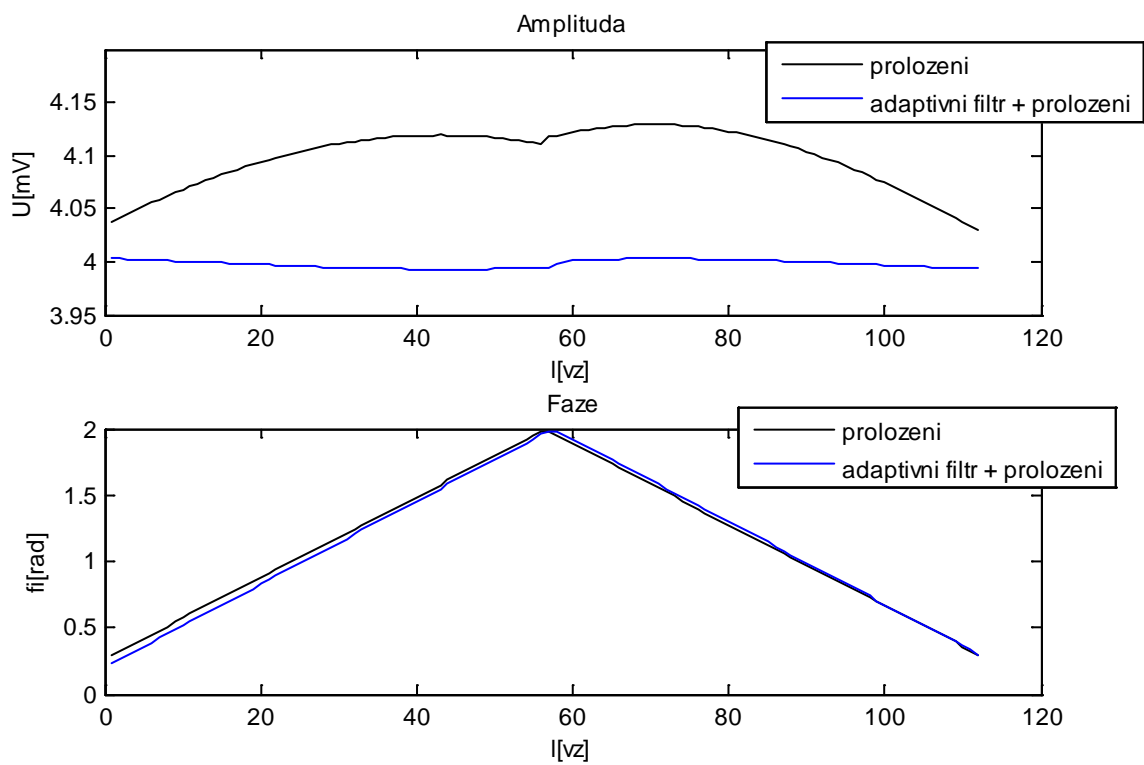
$$A \sin \left(\frac{2\pi f t}{f_{vz}} + \varphi \right), \quad (10)$$

přičemž je jedno jakou zvolíme fázi. Velikost zvolené amplitudy, ovlivňuje rychlost adaptace filtru. Přesto je vhodné zvolit amplitudu rovnu jedné. Dále volíme rychlost adaptace a řád filtru. Vhodná rychlost adaptace je závislá na všech hodnotách nastavení filtru a zároveň na hledaném signálu. Jelikož je hledaný signál s velmi malou frekvencí (v tomto případě 4 Hz), je zvolen nejmenší vyhovující řád filtru 5000. Důsledkem velkého řádu filtru je značně delší výpočet.

Amplituda v proložených bodech je téměř konstantní a chybu lze zanedbat (Obr. 10-3 modrý průběh). Chybu v amplitudě proložených signálů můžeme čekat při silně zdeformovaném průběhu hlavně v proudových signálech ve střední části. Takovou chybu však nemůžeme považovat jako chybu metody, ale jako chybu měření, která by mohla být odstraněna zprůměrováním výsledků z více měřených buněk průběhu. Průběh fáze z Obr. 10-3 odpovídá také modulačnímu signálu. Vidíme, že začátek průběhu se mírně liší od předchozí metody. Je to způsobeno postupnou adaptací filtru. Toto odchýlení od skutečnosti by bylo možné řešit tím, že by se před zkoumaný signál umístil stejný signál, na který by se adaptivní filtr adaptoval. Avšak takové řešení bude méně účinné u reálných průběhů, kde je vyžadována adaptace filtru v průběhu času. Nepřesnost způsobenou adaptací filtru považujeme za akceptovatelnou chybu.



Obr. 10-2 Předzpracované testovací signály



Obr. 10-3 Amplituda a Fáze vypočtené z obou metod

Připomínám, že na Obr. 10-3 jsou pouze výsledky amplituda a fáze vypočítané proložení, nikoli komplexní hodnoty, které jsou cílem této studie.

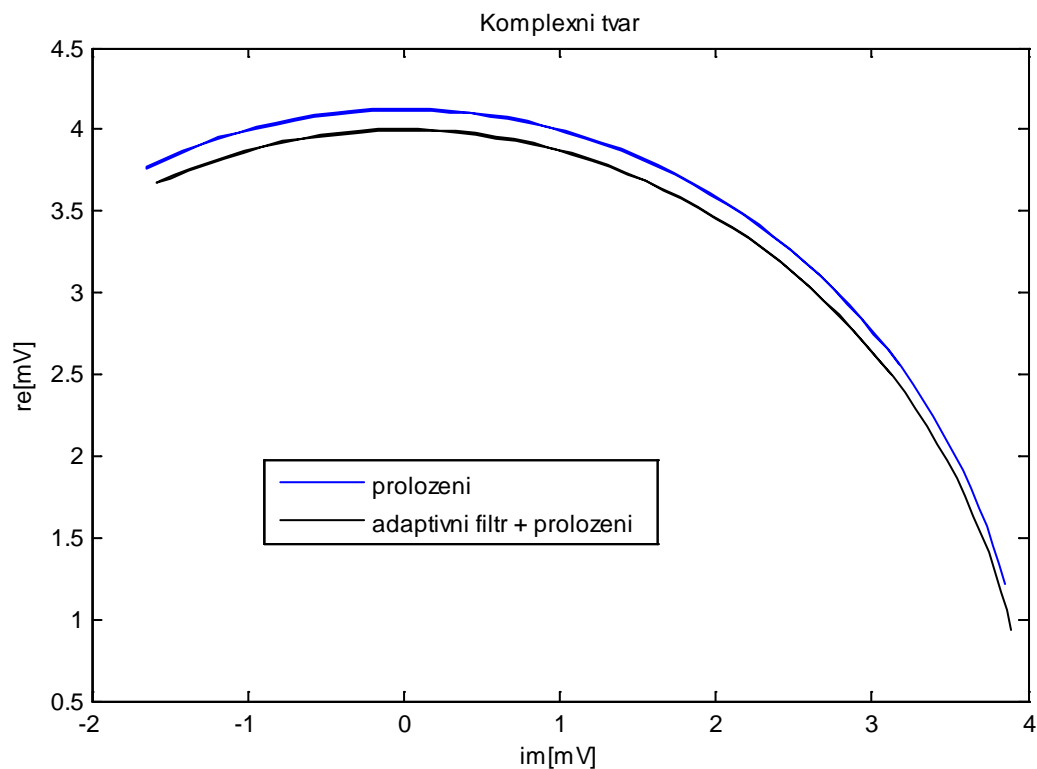
Komplexní hodnoty se získají po dosazení vypočtených hodnot do vzorečku

$$X = A e^{i\left(\frac{2\pi ft}{fvz} + \varphi\right)}. \quad (11)$$

Kde se dosadí za A a φ . V Matlabu `x=A.*exp(j.*(w/fvz*f +fi)).`

Výsledkem je komplexní číslo X které je zobrazeno na Obr. 10-4, jehož funkcí je čas (nebo můžeme napsat i modulační fázový průběh z Obr. 10-2. Při bližším zkoumání Obr. 10-4 je vidět, že průběh začíná v pravém spodním rohu, kam se ke konci opět vrátí, což odpovídá změně fáze a její vracení na původní hodnotu. Amplituda signálu je v grafu zobrazena jako vektor začínající v nule, který bude opisovat zobrazenou funkci podle vzorce:

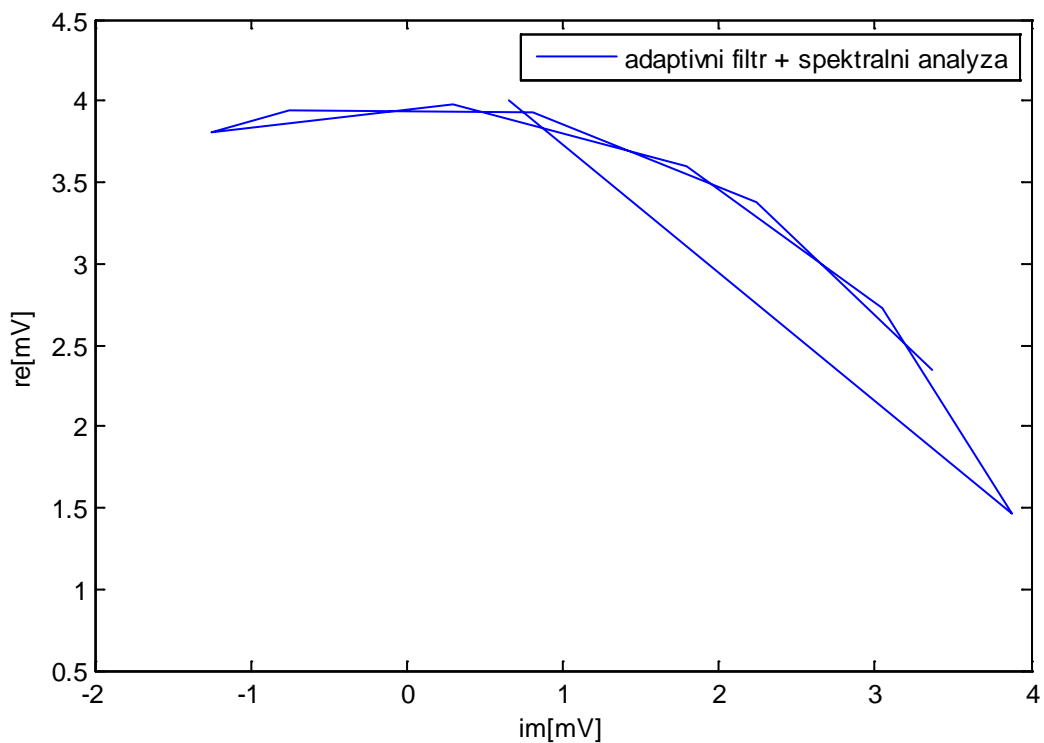
$$A = \sqrt{re^2 + im^2}. \quad (12)$$



Obr. 10-4 Komplexní tvar zobrazení obou metod

10.3. Metoda „adaptivní filtrace a spektrální analýza“

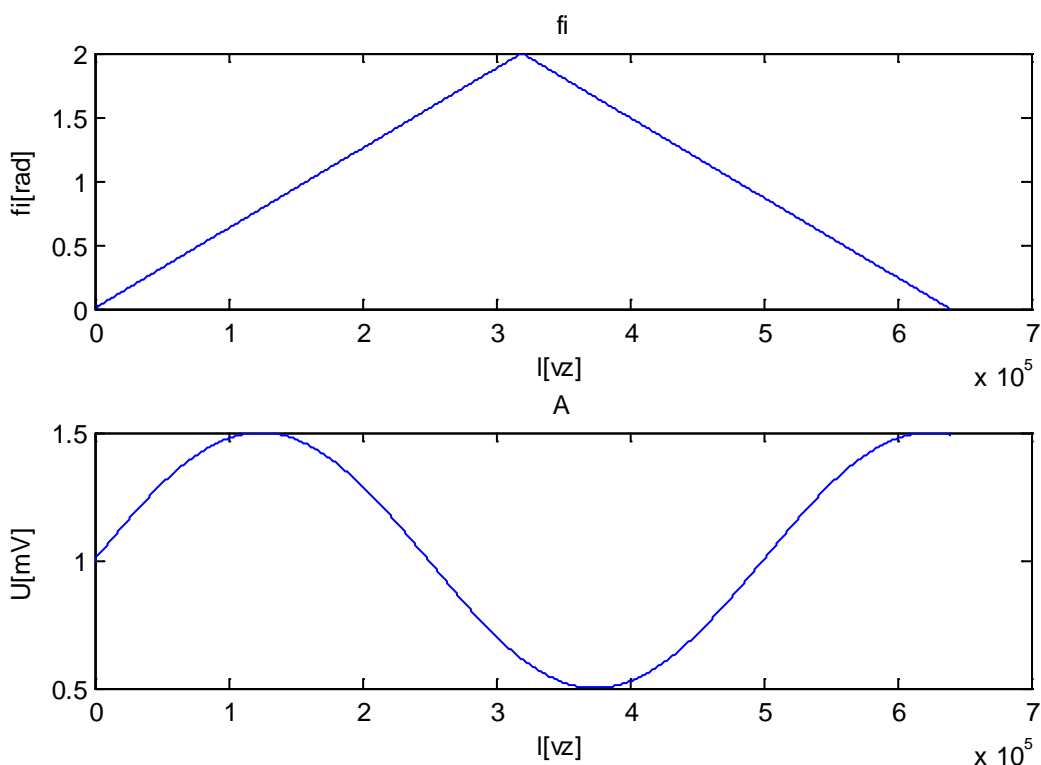
Je kombinací postupů, jež byly řešeny dříve u adaptivního filtru. Jedná se o spektrální analýzu. Signál je nejdřív podroben adaptivnímu filtru (výsledek Obr. 10-2 spodní část). Tento signál je rozdělen na 10 segmentů podle napěťové úrovně rampimpulzu po 10 mV. Předchozí průběhy byly rozděleny na 110 segmentů, tudíž byl průběh daleko jemnější. Na Obr. 10-5 je vidět výsledek v komplexní rovině a je srovnatelný s předchozími metodami. První hodnota, která je mimo předpokládanou pozici, je výsledkem prvního segmentu signálu, kde ještě není filtr adaptován.



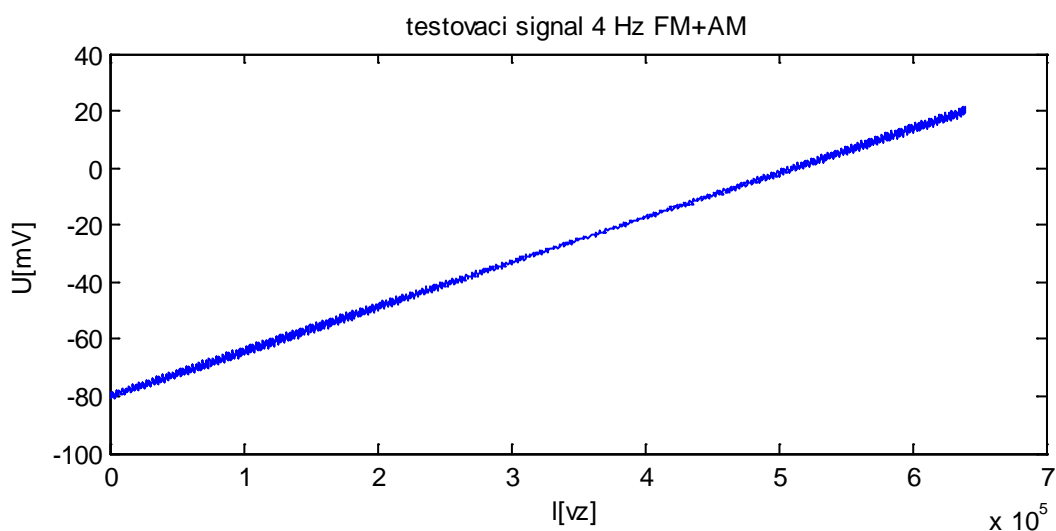
Obr. 10-5 Komplexní tvar metody adaptivního filtru + spektrální analýza

11. Důkaz druhý – amplituda signálu

Pro detailnější studování průběhu amplitudy v signálu byla na základní harmonický signál modulována fáze i amplituda, jejichž základní modulační funkce jsou na Obr. 11-1.



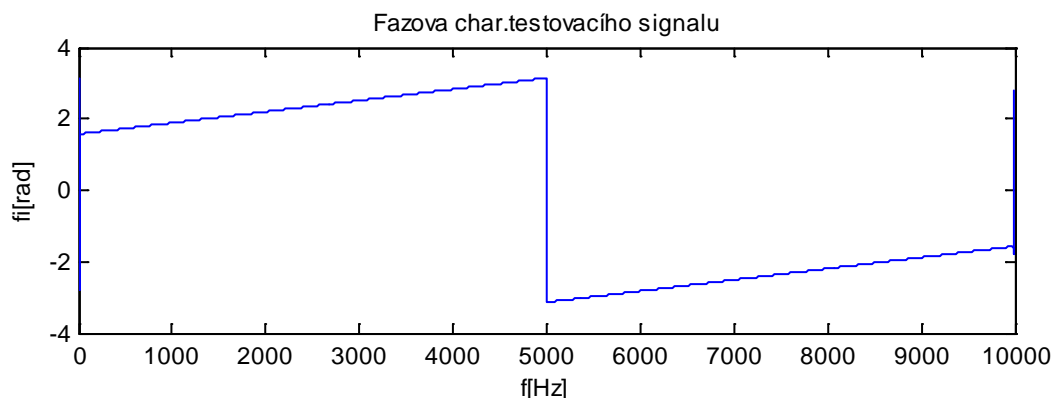
Obr. 11-1 Fáze a amplituda



Obr. 11-2 Výslední signál modulovaný fázově i amplitudově

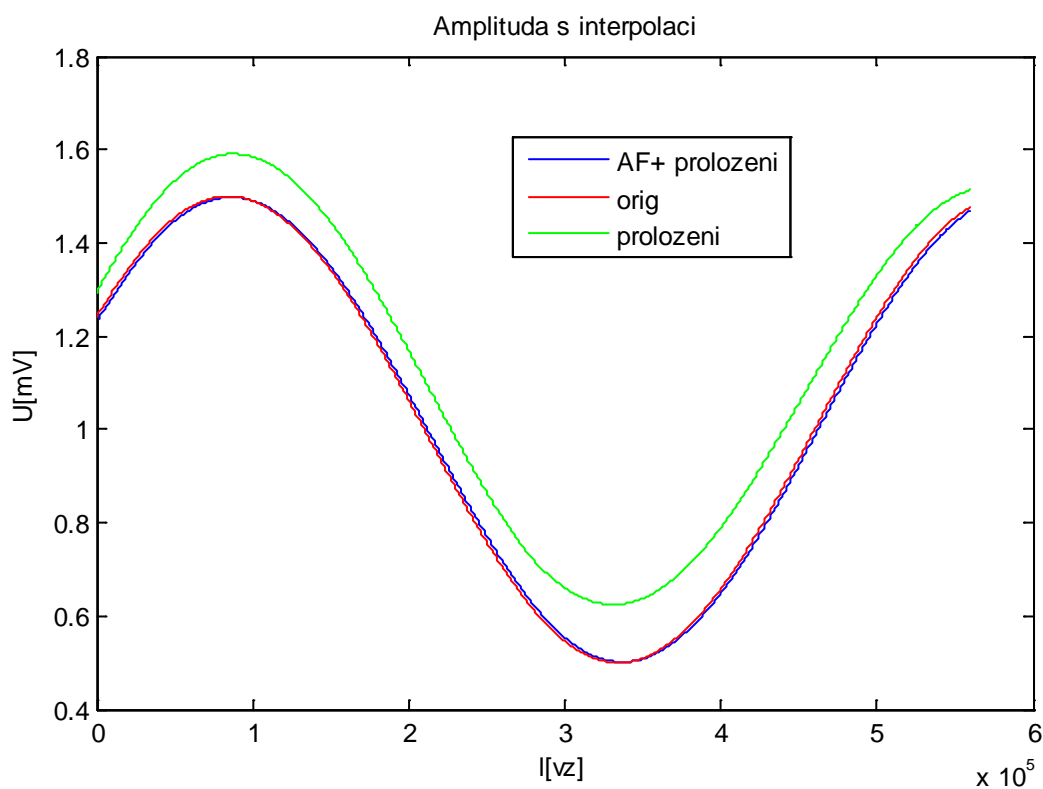
Opět byly použity metody z předchozí kapitoly. Bylo vypočítáno 110 hodnot ze segmentů signálu a byla na ně aplikována interpolace. Na Obr. 11-4 a Obr. 11-5 vidíme srovnání

vypočítaných průběhů s originálními modulačními signály. Zde již vidíme, že metoda pouhého proložení nám zavádí značnou chybu obzvláště amplitudového průběhu.

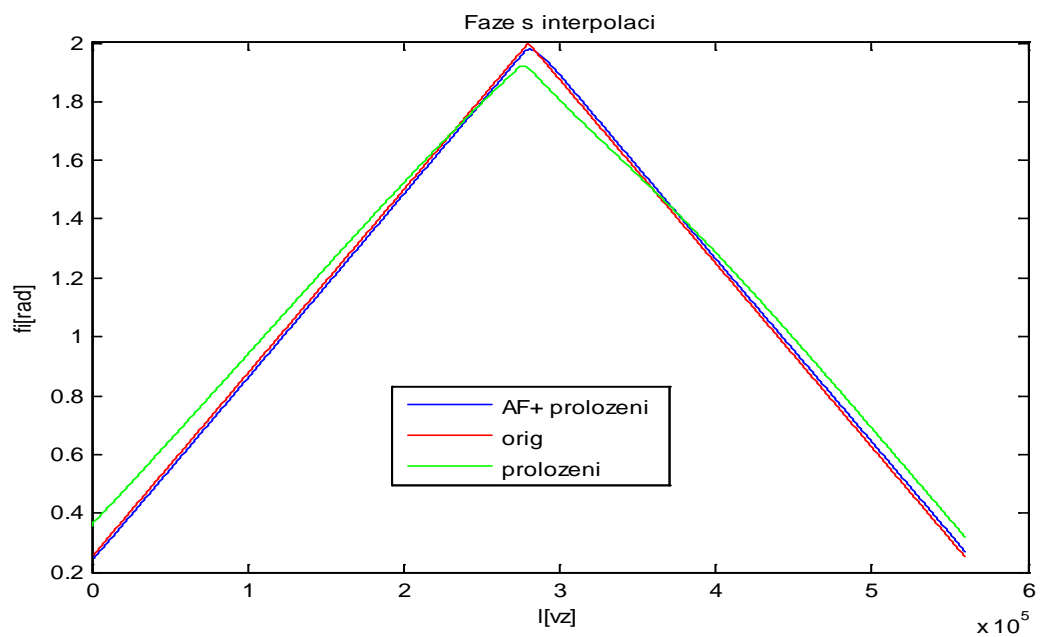


Obr. 11-3 Fázová charakteristika testovacího signálu

Chyba je zavedena náběžným rampimpulzem, kterého se metodou pouhého proložení nezabavíme a velice příznivé pro zbavení chyby se jeví adaptivní filtr a následné proložení.



Obr. 11-4 Výsledná amplituda

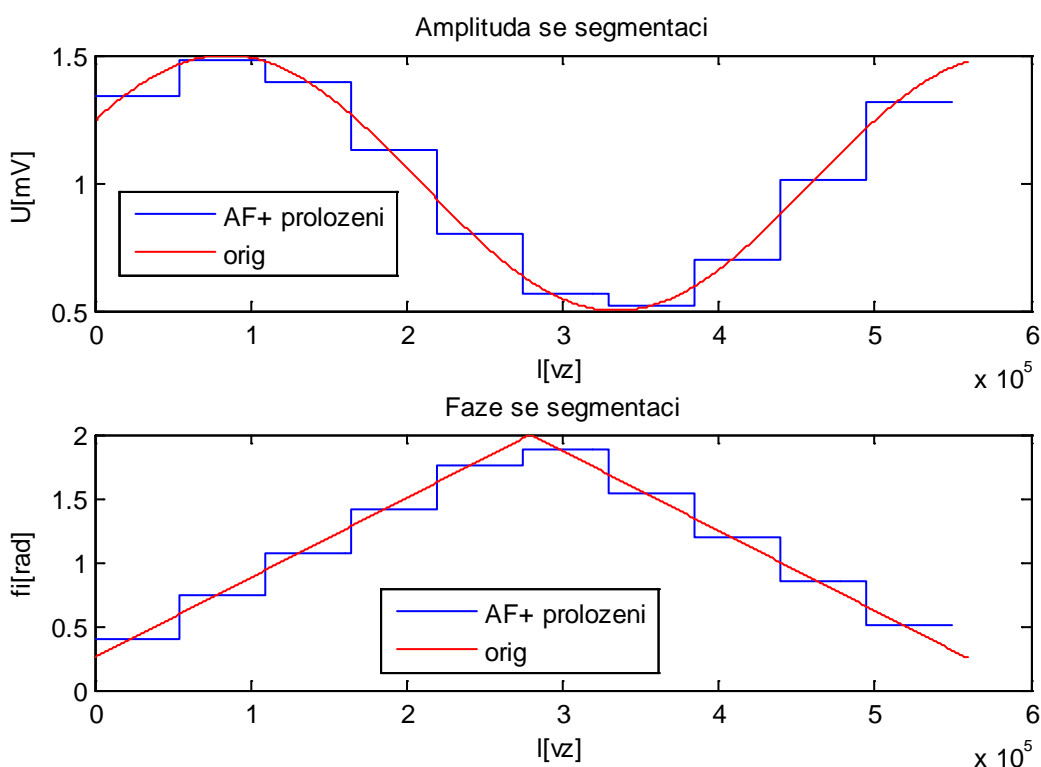


Obr. 11-5 Výsledná fáze

Za povšimnutí stojí i odchylka na začátku průběhu „AF+proložení“, která se minimalizuje právě velkým počtem vybraných segmentů oproti Obr. 10-5, kde je první bod zcela chybně vypočten.

12. Segmentace

Již bylo zmíněno, že segmentace signálu nám zavádí chyby a nepřesnosti při výpočtu. S počátku se jeví, že při rozdělení signálu na velký počet segmentů je zavedena menší chyba. Na následujícím **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** vidíme originální modulační signál fáze a amplitudy ve srovnání s deseti vypočtenými hodnotami. Každá hodnota představuje vodorovný úsek, jehož délka je rovna délce segmentu, ze kterého byl výpočet proveden. Je vidět že vypočtené hodnoty jsou průměrem všech hodnot dané délky segmentu jak u amplitudy tak u fáze.



Obr. 12-1 Porovnání segmentace

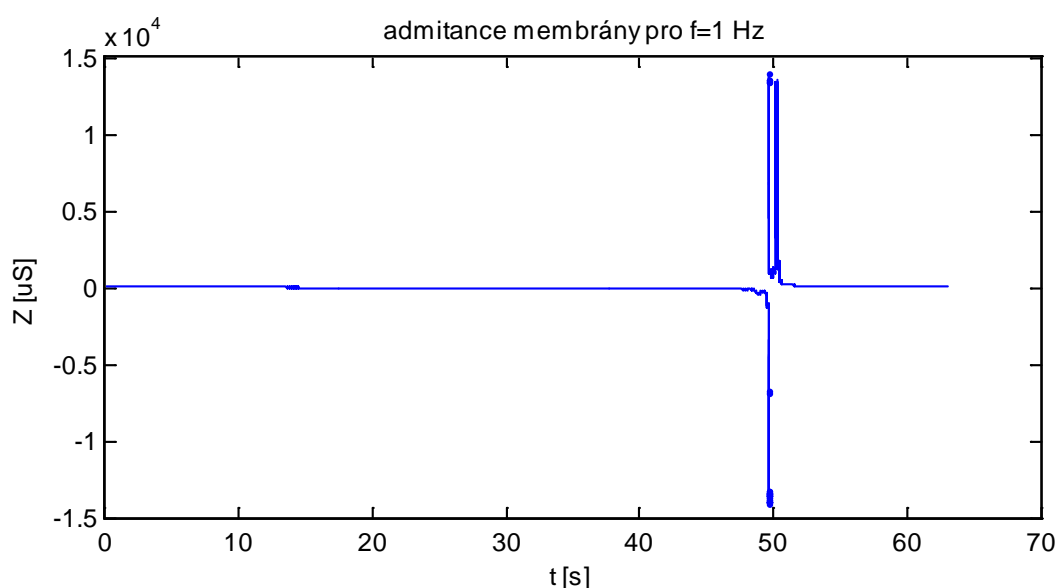
Pokud chceme dosáhnout výsledků co nejbližší realitě, je dobré zvolit délku počítaného segmentu rovnu dvou periodám signálu. Pro nízké kmitočty do 10 Hz se zdá tato délka segmentu nutná. Pro vyšší kmitočty 100 až 400 Hz bychom získali velké množství hodnot a postup by byl velice výpočetně náročný. Můžeme tedy zvolit segmenty o délce až desetinásobku periody přičemž bereme v potaz to, že vypočítané hodnoty jsou průměrem celé délky segmentu. Pokud se celé délce segmentu objeví chyba, která nebyla odstraněna předešlou filtrací, projeví se ve vypočítaných výsledcích. Řešením je opět vybírat pouze segmenty o délce dvojnásobku periody, kde je projeví chyba s menší pravděpodobností.

13. Základní výpočet admitance

V této kapitole jsou uvedeny postupy a pokusy výpočtu admitance na reálných signálech měřených ze srdečních buněk laboratorních potkanů. Základní metody byly použity při řešení v rámci semestrální práce a nebyly označeny za vhodné k výpočtu frekvenčně-admitančních charakteristik. Přesto jsou zde uvedeny základy, které jsou využity u jiných použitých metod. Pro výpočet admitance lze použít vzorec

$$Y = \frac{I}{U} [S] \tag{13}$$

a dosadit každou hodnotu proudu a napětí vstupního signálu. Výsledek vidíme na Obr. 13-1.



Obr. 13-1 Ukázka chybně vypočtené admitance membrány

První problém vzniká při snaze dělení nulou (hodnoty v okolí 50s), kdy výsledek z matematického hlediska vychází nekonečně velký.

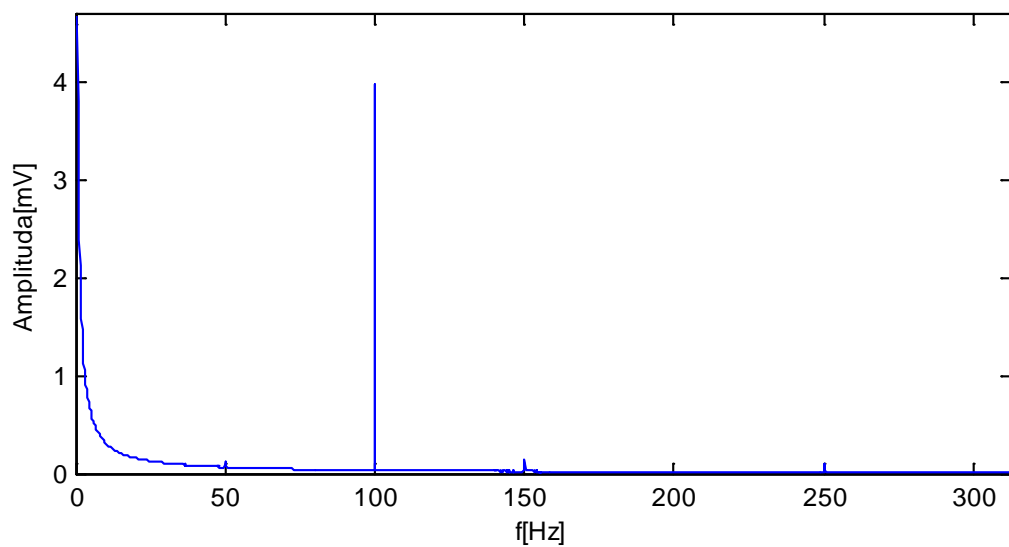
Druhý problém je, že výsledkem nejsou komplexní čísla a tudíž nelze považovat výsledek za admitanci, ale pouze jako reálnou složku vodivosti i přesto, že je parametrem harmonický signál. Do výsledku tak není možné započítat informaci o imaginární složce.

Z tohoto důvodu byl zvolen jiný způsob výpočtu, který řeší problematiku značně odlišně.

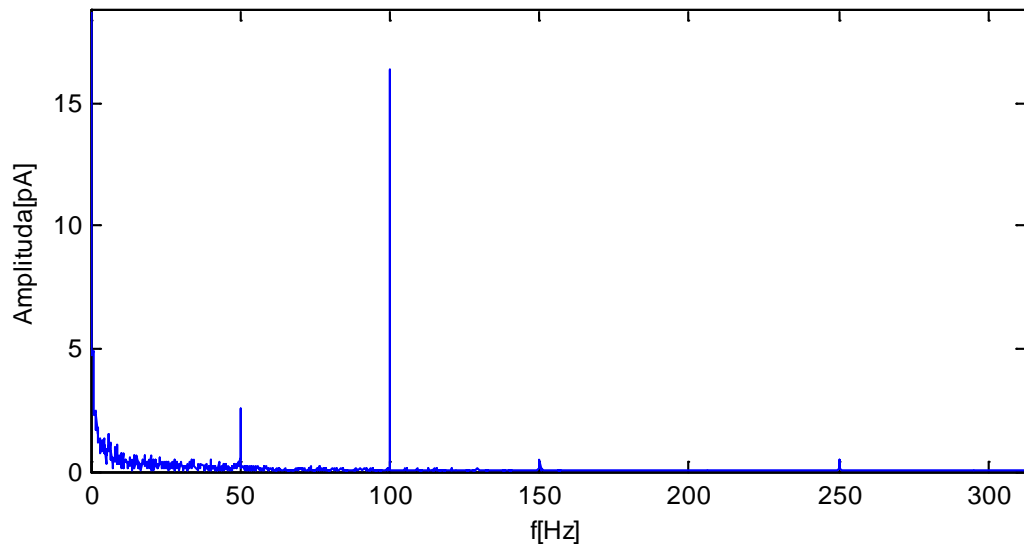
Vstupní signál, kterým budíme buněčnou membránu a proudová odezva, představují spektrum harmonických složek, které dále zpracujeme. Ve spektru nás zajímá právě ta harmonická složka, pro kterou daný výpočet provádíme. Potřebujeme získat admitanci, pro kterou bude parametrem frekvence a úroveň vnuceného membránového napětí. Je nutné

stanovit jednotlivá spektra pro každý úsek napětí zvlášť. Rozdělíme si tedy signály napětí na deset částí a stanovíme spektra pro zvolené části signálu po 10 mV a v časovém úseku 6,3 sec. Protože je vzorkování 10 kHz, tak se každá část bude skládat z 63 000 vzorků, což je dostatečné pro reálně zobrazené spektrum i pro frekvence do 400 Hz.

Spektrum jednotlivých úseků signálů vnučeného membránového napětí a proudové odezvy zobrazíme pomocí rychlé Fourierovy transformace v Matlabu pomocí funkce „fft“ Obr. 13-2. Na obrázku vidíme jen část spektra, protože ostatní složky jsou řádově menší a nejsou v grafu vidět.

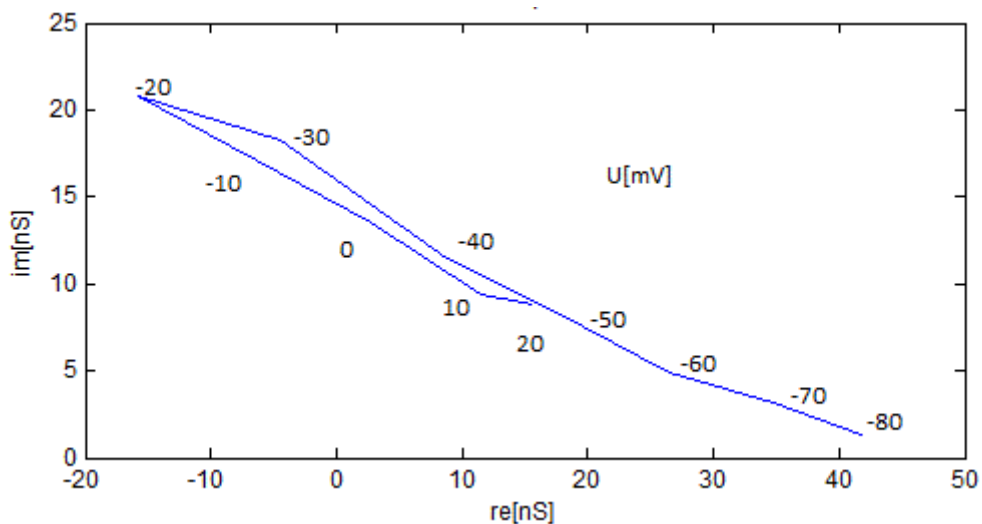


Obr. 13-2 Spektrum jednoho úseku napětí, vidět je střídavá superponovaná složka 100 Hz



Obr. 13-3 Spektrum jednoho úseku proudu, vidět je střídavá superponovaná složka 100 Hz

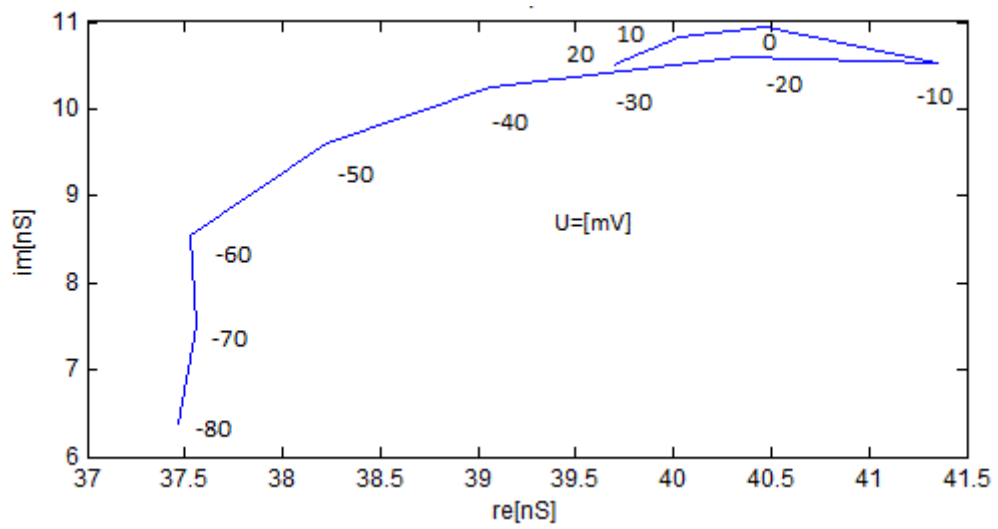
Z obou spekter vybereme pouze odpovídající harmonickou složku a opět na ně aplikujeme jednoduchý vzorec (2). Rozdíl spočívá v tom, že nyní počítáme v komplexním oboru hodnot a předpokládáme, že představují požadované informace pro výpočet admitance.



Obr. 13-4 Vypočtená admitance pro $f=10$ Hz

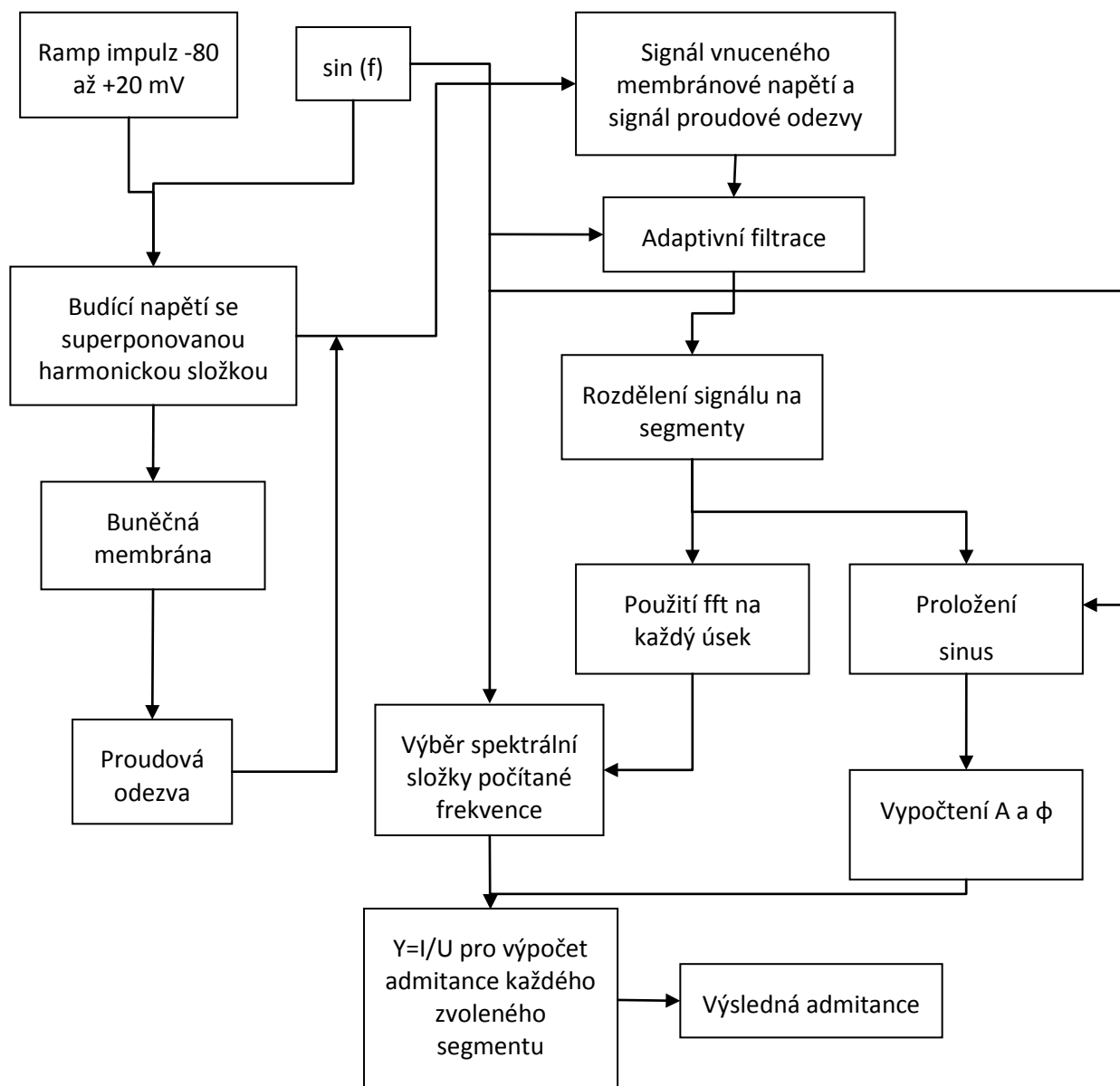
Ukázky výpočtů admitancí vidíme na Obr. 13-4 a Obr. 13-5.

Průběh admitance na Obr. 13-4 vychází podle teoretických předpokladů. Průběh na Obr. 13-5 má však odlišný charakter. Dále bude potřeba analyzovat spektra, zda vybrané kmitočty zobrazují pravdivé informace.



Obr. 13-5 Vypočtená admittance pro $f=100$ Hz

Kompletní postup získané admittance je naznačen na blokovém schématu Obr. 13-6.



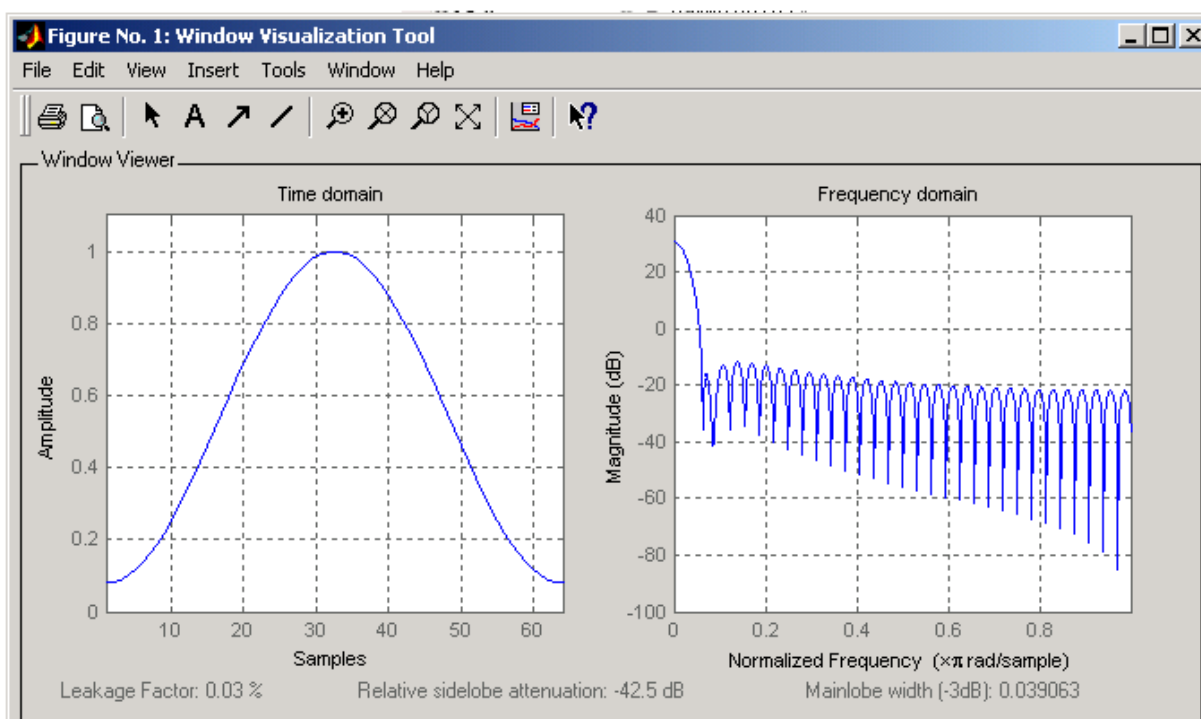
Obr. 13-6 Blokové schéma kompletního postupu získané admittance

13.1. FFT v matlabu

Protože používáme fft (Discrete Fourier transform), je potřeba si uvědomit, že tato metoda využívá části signálu, jejíž délka je ve dvojkové řadě. Pokud signál rozdělíme po 60 000 vzorcích, matlab si každou část signálu před použitím transformace doplní o nuly tak, aby byl signál dlouhý 65 536 vzorků a teprve potom na ní aplikuje fft a vytvoří spektrum, což nám může zanést do signálu nežádané harmonické složky. Řešením tedy je rozdělit signál po vzorcích dvojkové řady. Tato řada se může bez problému překrývat a můžeme tedy rozdělit signál opět na deset částí.

13.2. Použití oken

Vhodným úkonem, který nám pomůže ke kvalitnějším výsledkům, je použití oken jiných než obdélníkových. Pokud vymežíme pouze část signálu, způsobíme tak umělé posunutí fáze superponované harmonické složky a deformujeme tím veškeré výsledky. Je tedy třeba vybrat vhodné okno pro použití fft. Nejjednodušším případem by mohlo být Hammingovo okno Obr. 13-7. Možnost použití jiných oken je také reálná.

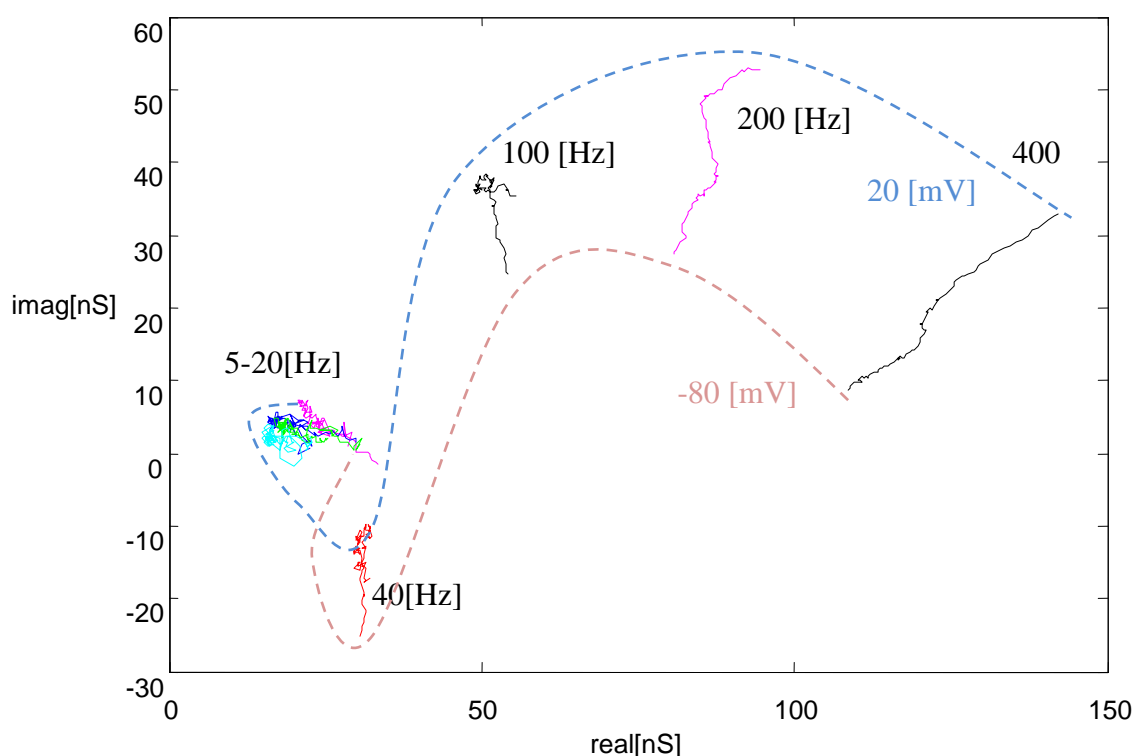


Obr. 13-7 Hammingovo okno a jeho přenosová charakteristika

13.3. Sumace spektra

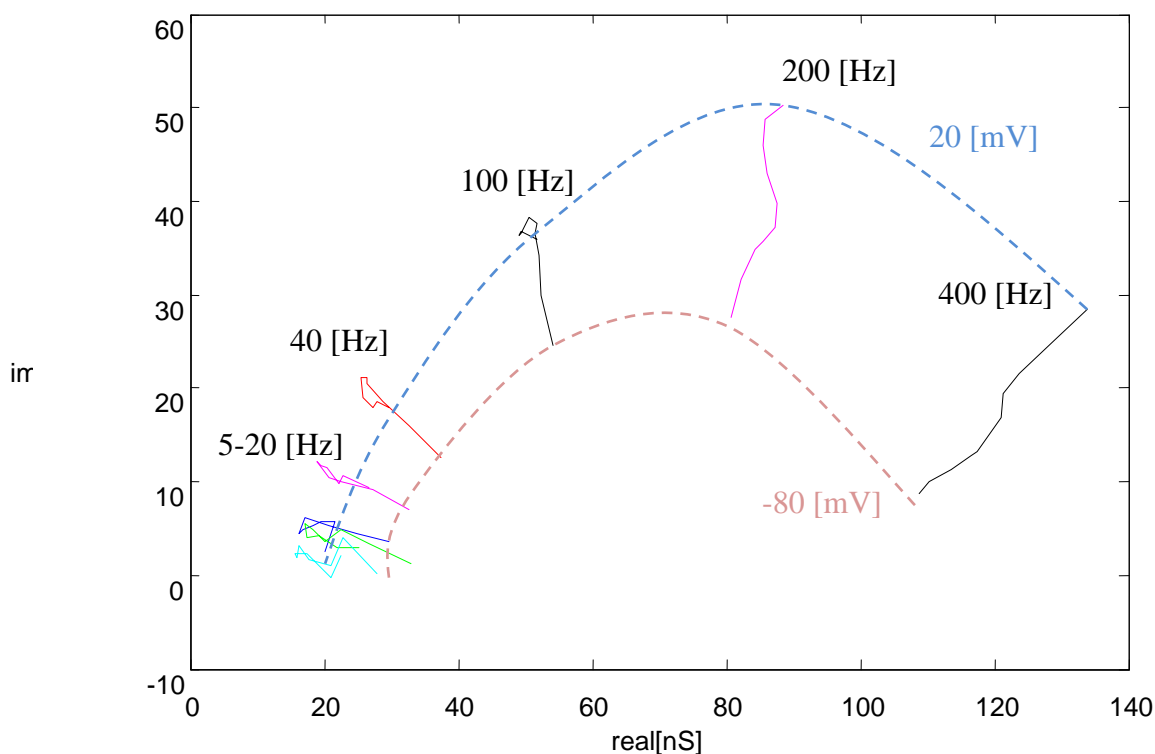
Další metoda, která by mohla vést k lepším výsledkům, je sečtení vyšších harmonických složek. Pokud se podíváme detailněji hlavně na spektrum proudu, vidíme zde vyšší harmonické složky a složky subharmonické. O jejich původu lze diskutovat. Avšak při bližším zkoumání spektra napětí nalezneme vyšší harmonické, subharmonické a další parazitní složky i zde. Lze tedy říci, že membrána není buzena čistě sinusovou funkcí a i tyto složky bychom měli do výsledku započítat. Nelze však pouze sumovat celé spektrum, ale musí se odstranit stejnosměrná složka. Problém nabývá na intenzitě, pokud řešíme soustavu pro velice nízké kmitočty, kdy nám zasahuje hlavní harmonická složka do frekvencí, které nám určují ramp impuls.

14. Frekvenčně-admitanční charakteristika



Obr. 14-1 Výsledná admitance AF a proložení

Výsledná admitance byla získána metodou „Adaptivního filtru a proložení sinus“. Admitance jsou vypočteny pro frekvence 400, 200, 100, 40, 20, 10, 8, 5 Hz. Průběh admitance pro 40 Hz je z neznámých důvodů mimo předpokládanou pozici. Jeden z důvodů by mohl být špatné prokládání, kdy se převrátí hodnota amplitudy a fáze, čemuž odpovídají záporné hodnoty na reálné ose.



Obr. 14-2 Výsledná admitance SA a proložení

Výsledná admitance vypočítaná metodou „Adaptivního filtru a spektrální analýzy“ je velice podobná předešlým výsledkům. Průběh admitance 40 Hz je zde už podle předpokladů.

15. Závěr

Tématem diplomové práce byl „VÝPOČET FREKVENČNĚ-ADMITANČNÍCH CHARAKTERISTIK Z NAMĚŘENÝCH PATCHCLAMPOVÝCH DAT“, za tím účelem bylo nezbytné sestrojít program pro výpočet frekvenčně-admitanční charakteristiky.

Základní problém však nespočíval v samotné realizaci programu, ale ve způsobu výpočtu admitance. Byly zkoušeny a analyzovány různé metody výpočtu, které se více či méně přiblížily k předpokládanému správnému výsledku. Největší problém představovaly signály s nízkými kmitočty, které ve spektru splývají s kolísavou stejnosměrnou složkou vytvořenou odezvou srdečních buněk na zvyšování napěťové úrovně budicího periodického signálu, který byl modelován jako rampimpulz.

První způsob řešení problematiky je použití adaptivního filtru a následné prokládání sinusovou funkcí, kterou jsou zjištěny potřebné parametry.

Druhý způsob řešení je použití adaptivního filtru a frekvenční analýzy, kdy při výpočtu admitance použijeme danou spektrální složku.

Pro jednodušší a přesnější výpočet charakteristik je důležité mít k dispozici kvalitně naměřené průběhy signálů.

V diplomové práci jsou diskutovány známé vlivy související s buzením buňky a snímáním odezvy signálů. Metoda “Měření membránové admitance malým vnuceným harmonickým napětím“ je v současné době předmětem výzkumu. Je možné očekávat jak zvýšení validity měřených signálů, tak výpočtu charakteristik, kterým se zabývá i tato práce.

Problematika analýzy signálů v extracelulárním a intracelulárním prostředí měřené buňky podléhá průběžnému vývoji a lze předpokládat, že problematika uvedená a diskutovaná v diplomové práci bude sloužit k navázání dalších prací pro rozvoj a dosažení optimálních výsledků následných výzkumných prací.

16. Seznam obrázků:

Obr. 2-1 Metoda „Patch-clamp“ [1]	2
Obr. 3-1 Proces vytváření mikroelektrody	4
Obr. 3-2 Schema <i>headstage</i>	7
Obr. 7-1 Aproximace MNČ	16
Obr. 8-1 obecné schéma adaptivního filtru	18
Obr. 8-2 Blokové schéma adaptivního filtru	18
Obr. 8-3 Ukázka práce adaptivního filtru	19
Obr. 9-1 Vnucené membránové napětí a superponovaná složka 1 Hz	20
Obr. 9-2 proudová odezva na vnucené napětí pro 1 Hz	21
Obr. 10-1 Vygenerovaný umělý signál a průběh jeho fáze	22
Obr. 10-2 Předzpracované testovací signály	24
Obr. 10-3 Amplituda a Fáze vypočtené z obou metod	24
Obr. 10-4 Komplexní tvar zobrazení obou metod	25
Obr. 10-5 Komplexní tvar metody adaptivního filtru + spektrální analýza	26
Obr. 11-1 Fáze a amplituda	27
Obr. 11-2 Výslední signál modulovaný fázově i amplitudově	27
Obr. 11-3 Fázová charakteristika testovacího signálu	28
Obr. 11-4 Výsledná amplituda	28
Obr. 11-5 Výsledná fáze	29
Obr. 12-1 Porovnání segmentace	30
Obr. 13-1 Ukázka chybně vypočtené admitance membrány	31
Obr. 13-2 Spektrum jednoho úseku napětí, vidět je střídavá superponovaná složka 100 Hz ..	32
Obr. 13-3 Spektrum jednoho úseku proudu, vidět je střídavá superponovaná složka 100 Hz.	33
Obr. 13-4 Vypočtená admitance pro $f=10$ Hz	33
Obr. 13-5 Vypočtená admitance pro $f=100$ Hz	34
Obr. 13-6 Blokové schéma kompletního postupu získané admitance	35
Obr. 13-7 Hammingovo okno a jeho přenosová charakteristika	36
Obr. 14-1 Výsledná admitance AF a proložení	37
Obr. 14-2 Výsledná admitance SA a proložení	38

17. Seznam použité literatury:

- [1] ŠIMURDA, J.: Bioelektrické jevy I. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 1995, ISBN 80-85867-64-8
- [2] ŠIMURDA, J., ŠIMURDOVA, M.: Dynamic Analysis of Transmembrane Currents. Digest of the 10th International Conference on Medical and Biological
- [3] ŠIMURDA, J.: Měření elektrických projevů srdečního svalu. [Kandidátská disertace]. Brno 1975. 101s + přílohy. VUT v Brně. Fakulta elektrotechnická
- [4] Molecular devices: pCLAMP 10 user guide (manual), rev. A
- [5] HERINGOVÁ, B., HORA, P.: Matlab Díl.I – práce s programem (on-line). H-S 1995. Přístup z Internetu: www.cdm.cas.cz/czech/hora/vyuka/mvs/tutorial.pdf
- [6] MATLAB *User's Guide*. The MathWorks, Inc., 1993
- [7] SOFTPEDIA (on-line) 2010. Přístup z Internetu: <http://webscripts.softpedia.com/script/Scientific-Engineering-Ruby/import-abf-36724.html>
- [8] JAN, J.: Číslíková filtrace, analýza a restaurace signálů. Druhé rozšířené vydání. VUTIUM Brno 2002 (dotisk 2005). ISBN 80-214-2911-9.
- [9] KOZUMPLÍK, J. KOLÁŘ, R., JAN, J. Číslíkové zpracování signálů v prostředí MATLAB®. Skriptum VUT FEKT v Brně, Ústav biomedicínského inženýrství, 2001. ISBN 80-214-1964-4.
- [10] ŠIMURDA, J., CHRISTÉ, G.: Quantitative analysis and modelling of membráně currents in cardiac cells. EuroConference BIOSIGNAL 2000 Brno, Czech Republic, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University
- [11] VAMPOLOVÁ, J.: Metoda nejmenších čtverců (bakalářská práce). Olomouc: Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2009. RNDr. Jitka Machalova, Ph.D.
- [12] OGDEN, D., STANFIELD, P.: Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. Cambridge, 1994; 53-78s.
- [13] KYROZIS, A., REICHLING, D.B.: Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods*, 1995, vol. 57, s. 27-35.