



# 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

## VYUŽITÍ MOBILNÍHO TELEFONU K ANALÝZE TEKUTÝCH VZORKŮ

USE OF CELL PHONE IN LIQUIDS ANALYSIS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Křístek

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel

BRNO 2016



# Diplomová práce

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

**Student:** Bc. Tomáš Křístek

**ID:** 147521

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2015/16

## NÁZEV TÉMATU:

### Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků

#### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti využití mobilního telefonu v biomedicině v metodách s optickou analýzou tekutých vzorků. Zaměřte se na přehled konstrukčních řešení s využitím 3D tisku a na varianty používaných elektrooptických prvků. 2) Zaměřte se na metodu ELISA s využitím mobilního telefonu. 3) Návrh metody doplňte o technické řešení se začleněním mobilního telefonu a ostatních potřebných prvků. Návrh musí obsahovat postup měření a hodnocení dat spolu s vizualizací výsledků na displeji telefonu. 4) Vytvořte 3D model konstrukce navrženého zařízení, model vytiskněte na 3D tiskárně a optimalizujte. 5) Realizujte navrženou metodu. Připravte sadu vzorků, které následně využijte pro ověření metody a funkčnosti sestaveného zařízení. 6) Proveďte zhodnocení výsledků. Proveďte diskusi nad možnostmi minimalizace počtu externích prvků spolupracujících s telefonem.

#### DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] COMINA G., SUSKA A. a D. FILIPPINI. Autonomous Chemical Sensing Interface for Universal Cell Phone Readout. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015.

[2] COSKUN A., NAGI R., SADEGHI K., PHILLIPS S a A. OZCAN. Albumin testing in urine using a smart-phone. *Lab on Chip*, 2013.

**Termín zadání:** 8.2.2016

**Termín odevzdání:** 29.7.2016

**Vedoucí práce:** Ing. Vratislav Čmiel

**Konzultant diplomové práce:**

**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**

Technologický rozvoj, všeobecná dostupnost a rozšířenost mobilních telefonů umožnily v nedávných letech podniknout řadu kroků, vedoucích k začlenění mobilních telefonů do analytických metod biomedicíny, rozvoji telemedicíny a k boomu osobních zdravotních mobilních aplikací. Tato práce se zabývá literární rešerší využití mobilních telefonů v biomedicině, s důrazem na metody optické analýzy a řešení využívající technologie 3D tisku. Vypracovává návrh a realizuje praktické řešení systému pro měření hladiny kortizolu ve slinách s využitím mobilního telefonu, analytické metody ELISA, technologie 3D tisku a souboru funkcí pro programové prostředí Matlab ve spojení s aplikací Matlab Mobile a MathWorks Cloud. Dále poskytuje kritické zhodnocení výsledků a možností metody, a předkládá soubor návrhů a poznatků pro optimalizaci z hlediska kvality měření.

## **Abstract**

Technological development, broad availability and ubiquity of mobile phones made it possible in recent years to start a progression leading to the integration of mobile phones into biomedical analytical methods, the development of telemedicine and mobile personal health applications. This paper deals with the literature review of the mobile phone usage in biomedicine, with emphasis on the methods of optical analysis and technical solutions using 3D printing technology. It provides a draft and practical implementation of salivary cortisol level measuring system using a mobile phone, ELISA analytical methods, 3D printing technology and a set of custom Matlab functions connected with Matlab Mobile application and Mathworks Cloud. Also provides critical evaluation of results and method possibilities, and presents set of proposals and findings for quality of measurement optimization.

## **Klíčová slova**

Mobilní telefon, biomedicína, 3D tisk, Matlab Mobile, kortizol, ELISA

## **Keywords**

Cell phone, biomedicine, 3D printing, Matlab Mobile, cortisol, ELISA

## **Bibliografická citace**

KŘÍSTEK, Tomáš. *Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 73 s. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Využití mobilního telefonu k analýze tekutých vzorků jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

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

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi za poskytnutou pedagogickou a odbornou pomoc, a také za prokázanou trpělivost při konzultacích.

V Brně dne .....

.....

(podpis autora)

# Obsah

1	Úvod .....	9
2	Využití mobilních telefonů v biomedicínských aplikacích s optickou analýzou .....	11
2.1	Kolorimetrie – testovací proužky .....	11
2.2	Spektrofotometrie/Fotometrie .....	15
2.3	Fluorescence a fluorimetrie .....	19
2.4	ELISA .....	22
2.5	Mikroskopie.....	25
2.6	Mikrofluidní čipy.....	26
2.7	Obecné problémy a nevýhody .....	27
3	Návrh realizace řešení pro měření hladiny kortizolu pomocí mobilního telefonu .....	28
3.1	Kortizol.....	28
3.2	Princip řešení.....	29
4	Praktická realizace analytického systému .....	31
4.1	Hardware .....	31
4.1.1	Mobilní telefony – obecně .....	31
4.1.2	Pouzdro.....	31
4.1.3	Osvětlovací jednotka .....	34
4.1.4	Difuzor .....	36
4.1.5	Stínítko.....	38
4.1.6	Reflektor .....	40
4.1.7	Mikrotitrační destička.....	41
4.2	Software .....	42
4.2.1	Matlab Mobile .....	42
4.2.2	Vývoj vlastních analytických funkcí .....	44
4.2.3	Funkce cloud_load.m .....	44
4.2.4	Funkce inicializace.m .....	45
4.2.5	Funkce mereni.m.....	46
4.2.6	Funkce rotace_hrany.m.....	47
4.3	Postup práce s analytickým systémem.....	49
4.3.1	Počáteční nastavení aparátu a mobilního telefonu .....	50
4.3.2	Snímek prázdné destičky a inicializační funkce .....	50
4.3.3	Snímek destičky se vzorky a měřicí funkce.....	51

5	Testování .....	53
5.1	Rozvržení snímání a mobilní telefon .....	53
5.2	Zkoumaná látka a vzorky .....	54
5.3	Průběh testování .....	55
5.4	Vyhodnocení kalibrační křivky .....	57
5.5	Relativní chyba vzhledem k měřicímu rozsahu .....	57
5.6	Diskuze výsledků .....	58
6	Realizovaný vývoj v průběhu práce .....	62
7	Teoretické varianty řešení a optimalizační návrhy .....	66
7.1	Využití optických vláken .....	66
7.1.1	Konstrukce .....	66
7.1.2	Software .....	67
7.1.3	Teoretické výhody .....	67
7.1.4	Teoretické nevýhody .....	68
7.2	Matice samostatných LED .....	68
7.3	Obecné úvahy .....	69
8	Závěr .....	71

# 1 Úvod

Mobilní telefony dnes krom komunikace běžně suplují funkce jiných zařízení, která se kdysi vyskytovala pouze jako samostatné přístroje, ať se již jedná o fotoaparáty či kamery, GPS navigace, hudební přehrávače apod. Moderní telefony obvykle disponují značným výpočetním výkonem, kvalitním sensorovým vybavením (pro účely biomedicíny jsou myšleny především obrazové senzory), a se znalostí prostředí operačních systémů a programovacích jazyků pro ně lze vytvořit nepřehledné množství různých aplikací.

Ve světle narůstajících technologických možností a nových trendů bylo jen otázkou času, než se objeví první pokusy nahradit malé jednoúčelové analyzátoři, a poté i dražší a větší laboratorní přístroje, mobilními telefony. Dnes již lze ve světě nalézt poměrně široké zastoupení malých jednoduchých analyzátoři připojitelných k telefonu, sloužících především k osobním potřebám. Často se jedná o osobní glukometry. Pozvolna se však objevují i mobilní systémy, které nahrazují větší laboratorní přístroje, jako jsou spektrofotometry, mikroskopy, nebo čtečky mikrotitračních destiček.

Se zjednodušováním a zmenšováním měřících přístrojů souvisí, mimo jiné, tzv. point-of-care testování (POCT), a lab-on-chip (LOC). POCT, tedy měření přímo v místě péče o pacienta, využívá především jednoduchých, někdy jednorázových analyzátoři (jako příklad lze uvést měření hladiny CRP z kapky krve přímo v ordinaci praktického lékaře, nebo jednorázový set pro diagnostiku syfilis). Výsledky jsou však známy prakticky okamžitě, přímo na místě. Přístup LOC spočívá v koncentraci analytické metody do rozměrově malého, levného a jednoduchého čipu. Oba tyto přístupy se mohou využitím mobilních telefonů výhodně podporovat.

Některé projekty s úspěchem využívají pro své systémy technologie 3D tisku. Právě 3D tisk, umožňující po vrstvách vytvořit objekt prakticky jakéhokoliv tvaru, přímo na pracovišti, a v relativně krátkém čase, výrazně zjednodušuje a zlevňuje tvorbu jednotlivých komponent, a tím i celých systémů.

Tato práce se zaměřuje především na využití mobilních telefonů v optické analýze tekutých vzorků, a to jak pro osobní použití, tak jako levnější a jednodušší náhrady za klasické laboratorní přístroje. Je vhodné však pamatovat na to, že mobilní telefony se v biomedicíně neomezují jen na optickou analýzu, ale jejich využití, jak potenciální, tak praxí prověřené, je mnohem širší. Za zmínku stojí například rychle rozvíjející se telemedicína, nebo různé adaptace menších monitorovacích a diagnostických přístrojů (EKG, tlak krve, ale i přístroje pro oftalmologická měření, či ultrazvukové sondy) pro mobilní telefony. Trendem posledních let jsou tzv. zdravotní aplikace (health apps), které dávají uživateli informace o jeho zdravotním či fyzickém stavu. Často pracují v kombinaci s přídatným zařízením (wearables - senzory, hodinky), a jsou dostupné široké veřejnosti.

Tato práce si klade za cíl sestavit literární rešerši ohledně inovativních řešení relevantních k zadanému tématu, vypracovat teoretický návrh analytické metody pro měření ELISA, realizovat vybranou metodu, v praxi vyzkoušet, zhodnotit a případně optimalizovat nebo poskytnout návrhy pro další vylepšení.

Pro účely této práce se mobilním telefonem dále rozumí tzv. chytrý mobilní telefon (smartphone), obvykle vybaven vlastní kamerou/fotoaparátem, případně i vlastním přisvětlovacím prvkem (např. LED), a schopností připojení k Wi-fi a/nebo k mobilním datovým sítím.

## 2 Využití mobilních telefonů v biomedicínských aplikacích s optickou analýzou

Tato kapitola se zabývá řešerší v oblasti využití mobilních telefonů pro aplikace a metody využívající různé formy optické analýzy, s důrazem na řešení s využitím 3D tisku. V každé kapitole je zařazen stručný úvod a dále popis konkrétních realizací. V poslední podkapitole jsou rozebrány některé problémy a nevýhody vyplývající z použití mobilních telefonů pro biomedicínské účely.

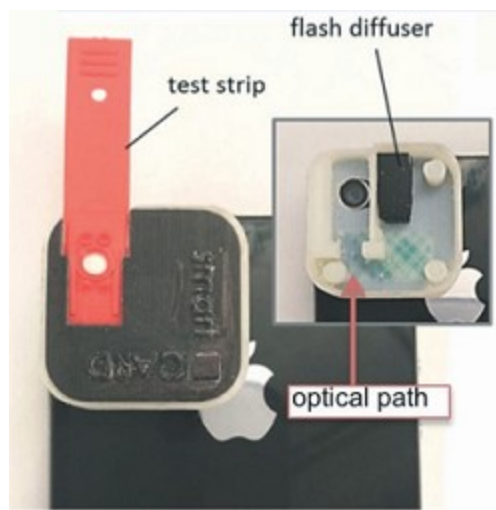
### 2.1 Kolorimetrie – testovací proužky

Kolorimetrie v chemii označuje metodu, založenou na porovnávání obarveného vzorku s neznámou koncentrací dané látky vůči referenčním (kalibračním) vzorkům téže látky o známých koncentracích. Základem je reakce zkoumané látky (případně jiné látky, jejíž koncentrace je na koncentraci analyzované látky závislá), se specifickým barvicím činidlem [4][16].

Vnímání atributů zbarvení jak lidským okem, tak přístroji, je silně ovlivněno světlem dopadajícím na vzorek a tím, jak se od něj odráží. Aby byla měření opakovatelná, je nutné zajistit co možná nejjednodušší podmínky osvětlení vzorku. Ideálně je vhodné se zbavit vlivu okolního osvětlení, které je náročné, či přímo nemožné regulovat. Toho lze dosáhnout jednoduše uzavřením snímací soustavy se vzorkem do neprůhledného obalu. Pak je ovšem nutné zajistit umělé osvětlení, které však lze zpravidla dobře regulovat. Pakliže je prováděno měření na vzorku za proměnného osvětlení (ambientní světlo, vzájemně se lišící umělé zdroje), je nutné kalibrovat měření pro dané světelné podmínky, nebo korigovat naměřené výsledky. Některé aplikace provádějí korigující měření pro zvýšení přesnosti i při použití jediného, stabilního světelného zdroje [14][16].

Pro kolorimetrická měření pomocí telefonů bývá nezdívka využíván převod z RGB do HSL prostoru, neboť lépe odpovídá barevným atributům, jejichž změny vzorek prodělá (odstín, sytost, světlost/jas) [1][14][19].

Častým řešením, se kterým se lze v oblasti optoanalýzy mobilním telefonem setkat, je využití biochemických testovacích proužků. Tyto proužky při kontaktu se zkoumaným analytem mění některou svou barevnou charakteristiku (odstín, světlost) v závislosti na přítomnosti a/nebo množství hledané látky, nebo na hodnotě zkoumaného parametru. Příkladem mohou být proužky pro měření hladiny glukózy či cholesterolu, nebo pH proužky. Díky využití kamery mobilního telefonu a algoritmů pro analýzu obrazu je pak možné měřit nejen kvalitativní parametry, ale i relativně jemné kvantitativní změny [14][16][18][19].



Obrázek 1: Pouzdro pro snímání testovacích proužků. Zdroj [16]

Jednoduchou a relativně robustní konstrukční metodou je použití malého, vzhledem k okolnímu světlu uzavřeného systému, který lze nasadit na kryt mobilního telefonu, do oblasti fotoaparátu a přisvětlovací diody (případně xenonového blesku). Toto řešení demonstrují např. práce [14][16][17]. Testovací proužek s naneseným analytem se vkládá do tohoto systému, před kameru telefonu. Součástí systému mohou být vhodně zvolené optické čočky, které řeší problém příliš nízké vzdálenosti snímaného proužku od kamery (obvykle v řádech mm či cm, zatímco zaostřovací vzdálenosti telefonních kamer se pohybuje v řádech jednotek až desítek cm). Po umístění proužku mobilní telefon s použitím vlastního světelného zdroje a kamery pořídí snímek (lze však uvažovat i nad souvislou analýzou v průběhu času nahráváním videa, pokud je předmět zájmu vývoj vzorku v čase). Následně lze pomocí analýzy výsledného snímku a kalibrační křivky uplatnit kolorimetrické metody a provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Součástí těchto řešení je obvykle i mobilní aplikace, nainstalovaná na dotyčném telefonu, která řídí snímání, provádí samotnou analýzu a prezentuje výsledky [14][16][17]. Dále pak může obsahovat i jiné přídatné funkce, dle libosti autorů, např. odesílání výsledků do e-mailové schránky.

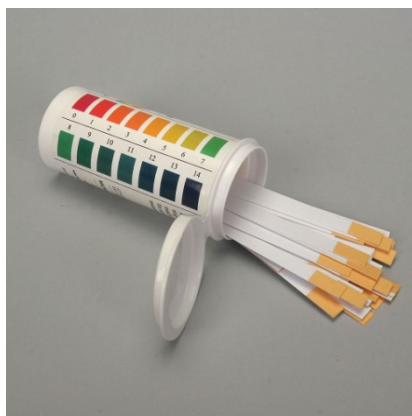


**Obrázek 2: Grafické rozhraní aplikace pro měření cholesterolu. Zdroj: [16]**

Velkou výhodou tohoto řešení je zbavení se nutnosti řešit proměnlivé podmínky osvětlení vlivem okolního světla. Jediným zdrojem světla, který bude při snímání na proužek působit je vlastní světelný zdroj telefonu. Pro zajištění co nejvyšší homogenity osvětlení cílové oblasti testovacího proužku využívají někteří autoři difuzér, umístěný před světelný zdroj telefonu [16][17].

Obecně lze říci, že tento způsob řešení přináší velké výhody zejména, co se samotného snímání týká. Krom odstínění okolního světla a opakovatelnosti podmínek daných světelným zdrojem telefonu, se jedná také o stabilní a jednotnou vzdálenost objektu od senzoru, nezávislost na jemných pohybech přístroje při držení v ruce (třes či houpavé pohyby rukou). Celkově se pak jedná o levné, na výrobu nenáročné, a vzhledem k uvedenému spolehlivé řešení. Samotné pouzdro bývá vyrobeno pomocí 3D tisku. Někteří autoři uvádějí schopnost dosáhnout kvality výsledků srovnatelné s většími laboratorními přístroji, nebo alespoň úroveň běžně potřebné v praxi (mimo medicínské určení) [14][16][17].

Na straně nevýhod pak vystupují především rozdíly v prostorových a osvětlovacích podmínkách, které vytvářejí samotné telefony. Různé modely disponují nejen rozdílnými kamerami s rozdílnými vlastnostmi a různými světelnými zdroji, ale také odlišným prostorovým uspořádáním jednotlivých prvků na těle telefonu. Zda je systém kompatibilní s různými telefony, nebo je závislý pouze na jediném modelu, pak záleží na konkrétním provedení. Obecně rozdíly mezi různými modely telefonu přinášejí jak komplikace konstrukční, tak analytické. Pro každý odlišný model je nutno provést kalibraci, pokud testovací proužek sám nenesou autokalibrační prvky. Telefony bez přisvětlovacího zdroje nelze pro tato řešení vůbec použít. Zajímavým a zjevně ne zcela prozkoumaným elementem může být také možnost kontaminace mezi proužky při vkládání do těla systému, pokud tento není používán jednorázově.



Obrázek 3: Ilustrační příklad testovacích proužků (Hydrion Spectral pH Strips)

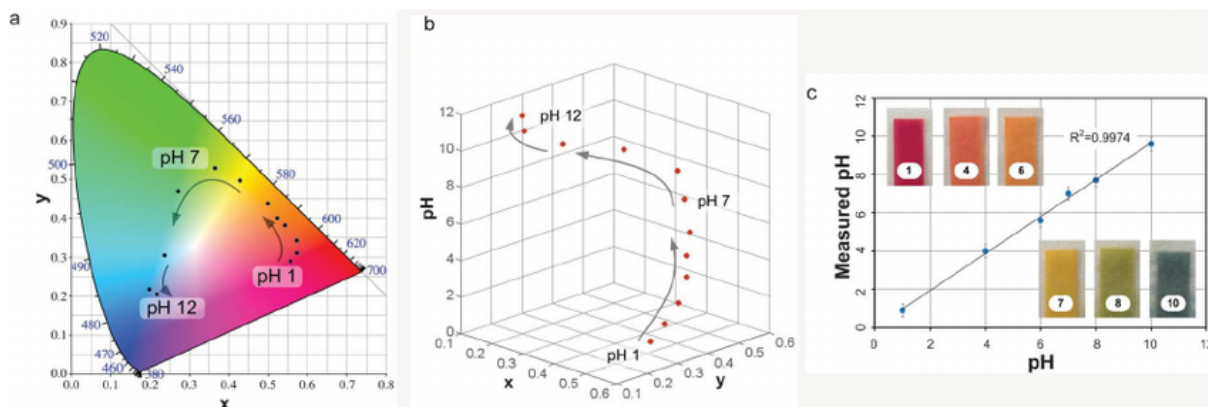
Jiným přístupem pro kolorimetrické měření testovacích proužků je fotografování proužků bez zásahů do způsobů a podmínek osvětlení. Snímání se tedy provádí jak při ambientním světle, tak při osvětlení např. bleskem telefonu.



Obrázek 4: Kolorimetrie s využitím referenčních hodnot. Zdroj: [19]

Takovýmto řešením se zabývá například práce [19]. Jedná se sice o optickou analýzu, nevyužívá však žádných doplňkových optických či elektronických prvků, ani 3D tisku. Nicméně autoři se zajímavým způsobem vyrovnávají s rozdíly v osvětlení při snímání.

Práce demonstruje řešení, které je na způsobu osvětlení nezávislé. Při snímání v proměnlivých světlených podmínkách do procesu zasahují automatické funkce telefonu, např. automatické vyvážení bílé [19]. Autoři vytvořili referenční diagram s několika barvami a odstíny šedi o známých intenzitách. Zachycením tohoto diagramu v zorném poli fotoaparátu jsou kompenzovány automatické zásahy telefonu do snímání. Protože při snímání intenzit v RGB nevykazuje škála pH žádný rozumný trend [19], převádí se snímek z RGB prostoru do CIE 1931. Zde již vykazuje změna pH zřetelný trend a lze sestavit kalibrační křivku, v závislosti na souřadnicích chromaticity  $x$  a  $y$ .



Obrázek 5: pH standardů v CIE 1931 v 2D (a) a 3D (b). Srovnání naměřených a skutečných pH (c). Zdroj: [19]

Autoři prokázali, že hodnoty intenzit naměřené za rozdílných světelných podmínek mají mezi sebou lineární vztah [19]. Tento vztah lze odhadnout na základě porovnání intenzit referenčního diagramu při kalibračním měření a měření za jiných světelných podmínek.

Tento přístup je závislý na modelu telefonu, a proto je potřeba každý použití model recalibrovat. Stačí tak však učinit pouze při inicializačním nastavení. Jedním ze zdrojů nepřesností jsou materiálové rozdíly mezi testovacím proužkem a referenčním diagramem, které způsobují rozdíl v odrazech světla. Autoři odhadují, že vytištěním referenčního diagramu na stejný materiál, jako je testovací proužek, dojde k eliminaci tohoto problému [19]. Použití metody předpokládá homogenní osvětlení snímané oblasti, proto uživatel musí věnovat pozornost správnému umístění telefonu, aby například nezastínil část snímané plochy.

## 2.2 Spektrofotometrie/Fotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda stanovující vlastnosti vzorku na základě absorpce procházejícího světla různých vlnových délek. Metody pracující s jednou, případně několika konkrétními vlnovými délkami, nazýváme fotometrie, pokud pracujeme s rozsahem vlnových délek, hovoříme o spektrofotometrii. Obvyklou aplikací je stanovování koncentrace určité látky ve vzorku, vycházející z Lambert-Beerova zákona, který udává závislost absorpance vzorku při určité vlnové délce procházejícího světla, na koncentraci zkoumané látky [21]:

$$A = c \cdot l \cdot e$$

kde  $A$  je absorpance,  $c$  je koncentrace zkoumané látky,  $l$  je délka květy, a  $e$  je molární absorpční koeficient [21].

Principem funkce je prozařování vzorku monochromatickým světlem, obvykle z UV či VIS části spektra (méně často IR), a měření intenzity prošlého světla dopadajícího na

detektor. Molekuly ve vzorku absorbují část procházejícího záření a snižují tak intenzitu prošlého světla. Při znalosti intenzity vyzařovaného světla lze zjistit transmitanci, dle vztahu:

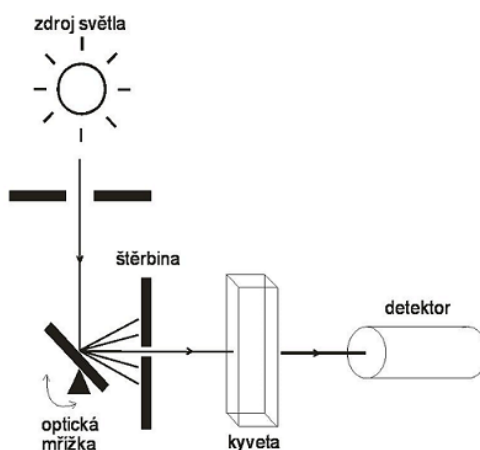
$$T = \frac{I}{I_0}$$

kde  $T$  je transmitance,  $I$  je detekovaná intenzita prošlého světla, a  $I_0$  je intenzita vyzařovaného světla. Z transmitance snadno získáme absorbanci dle vztahu:

$$A = -\log T$$

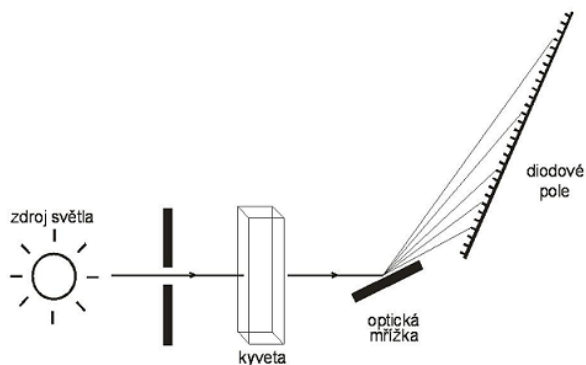
kde  $A$  je absorbance, a  $T$  je transmitance [21].

Hlavními částmi obvyklého spektrofotometru jsou: zdroj světla, monochromátor, část se vzorkem, a detektor. Dále bývají obsaženy čočky a štěrby [21].



Obrázek 6: Jednoduché schéma klasického spektrofotometru

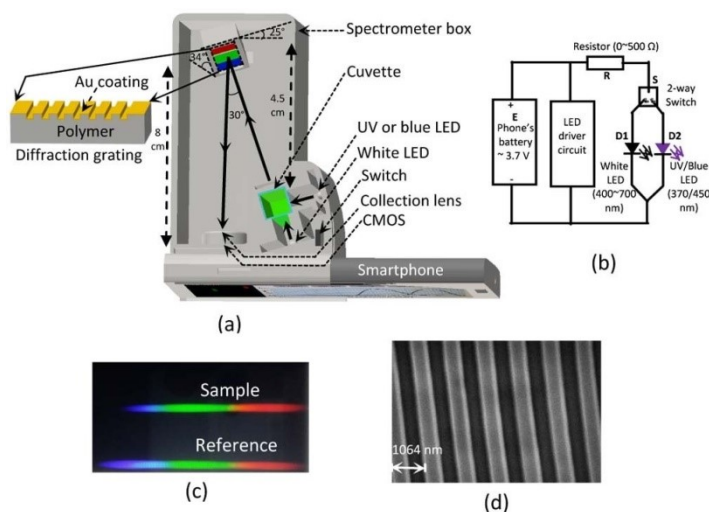
Právě monochromátor je, nejen z hlediska použití mobilního telefonu, pro spektrofotometrii/fotometrii nejkritičtější součástí. V klasickém spektrofotometru bývá monochromátor obvykle realizován pomocí optické mřížky a štěrby. Nakláněním optické mřížky se určuje pracovní vlnová délka světla, které prochází štěrbinou ke vzorku. Šířka štěrby pak určuje specifitu vybrané vlnové délky (čím užší štěrbina, tím užší/přesnější je rozsah prošlých vlnových délek, způsobuje však také vyšší útlum intenzity světla) [21].



**Obrázek 7: Jednoduché schéma spektrofotometru s diodovým polem**

Technicky vyspělejší variantou spektrofotometru je řešení s polem detektorů.

V tomto případě prochází vzorkem světlo přímo ze zdroje. Teprve až prošle světlo se rozkládá na jednotlivé vlnové délky pomocí statické optické mřížky a jednotlivé úzké svazky pak dopadají na jednotlivé detektory v poli (fotodiodové pole nebo CCD/CMOS). Takto lze změřit celé spektrum najednou. Absence pohyblivých částí zlepšuje opakovatelnost měření a činí přístroj robustnějším a konstrukčně jednodušším. Právě tato vlastnost může být pro využití mobilního telefonu pozitivem. Mezi dalšími metodami lze ještě zmínit spektrofotometrii pomocí svislého paprsku a reflexní fotometrii [21].



**Obrázek 8: Spektrofotometr založený na mobilním telefonu: a) schéma celého systému b) schéma zapojení c) porovnání snímků vzorku a standardu d) detail optické mřížky na snímku z elektronového mikroskopu. Zdroj: [1]**

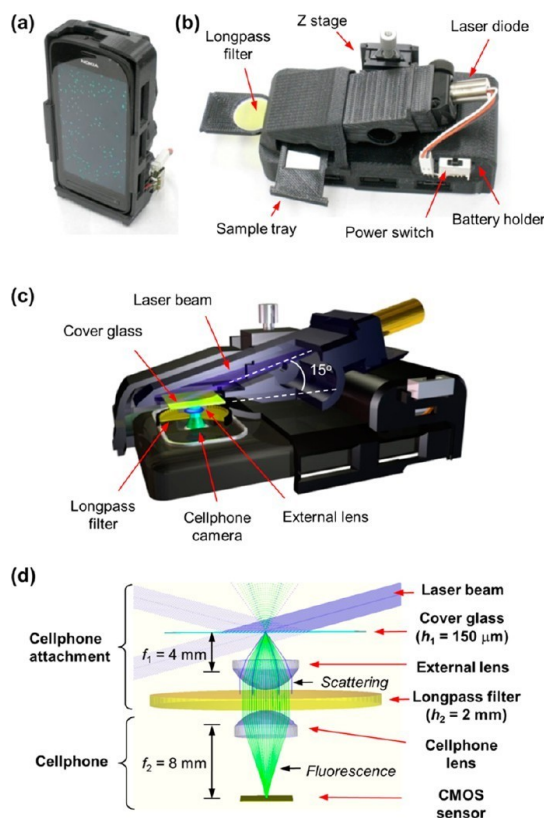
Sestavení spektrofotometru s polem detektorů se věnují například autoři práce [1]. Pomocí 3D tisku je vytvořeno pouzdro spektrofotometru, ke kterému se telefon připojuje. Zdrojem světla je bílá LED telefonu (400-700 nm), a UV nebo modrá LED (370 nebo 450 nm), integrovaná v pouzdře spektrofotometru. Mezi světelnými zdroji lze přepínat. Světlo ze zdroje prochází květou a dopadá na optickou mřížku. Tato mřížka, rozkládající bílé světlo na složky, je vyrobena z polymeru technologií nanoimprintingu a její aktivní povrch je pokryt tenkou vrstvou zlata. Světlo po odrazu a rozložení putuje přes cylindrickou čočku, která jej vhodně koncentruje do úzkého pásu, a dopadá na obrazový senzor telefonu (zde konkrétně CMOS). Použití cylindrické čočky zvyšuje SNR, díky zvýšení intenzity na menší ploše. Vyhodnocení obrazu provádí speciální aplikace pro Android. Pro samotné měření intenzit prošlého světla nejsou využity přímo hodnoty RGB, ale aplikace je převede do HSV prostoru, neboť RGB není monotónní vzhledem k vlnovým délkám a intenzitě [1].

Kalibrace škály vlnové délky byla provedena pomocí 2 LED (červená a zelená) se známými charakteristikami. Rozlišení systému je především ovlivněno vlastnostmi kamery a displeje telefonu [1] (Pozn. Autoři neuvádějí přesný popis aplikace, zřejmě však odečítá hodnoty pro měření z displeje telefonu, nikoliv přímo ze senzoru.).

## 2.3 Fluorescence a fluorimetrie

Fluorescence patří mezi fotoluminiscenční záření. Jednoduše řečeno je principem fluorescenčních měření ozáření látky excitačním zářením, čímž dojde k přechodu elektronů do excitovaných stavů. Při návratu do původního stavu elektrony vyzáří emisní fluorescenční záření s vlnovou délkou větší nebo rovnou vlnové délce excitačního záření. Fluorofory lze obecně dělit na vlastní (přírodně se vyskytující) a nevlastní (značky a sondy). Mezi analytickými metodami našla fluorescence uplatnění především při pozorování objektů ve fluorescenční mikroskopii, ve spektrofluorimetrech a fluorescenčních skenerech při měření intenzity záření (koncentrace látky), a v průtokových cytometrech [8].

Jednoduchý fluorescenční mikroskop s využitím mobilního telefonu demonstruje práce [17]. Autoři zkonstruovali sestavu propojitelnou s telefonem, která slouží jako držák pro vzorek, zdroj excitačního záření, a obsahuje několik optických prvků. Pouzdro je vyrobeno pomocí 3D tisku.

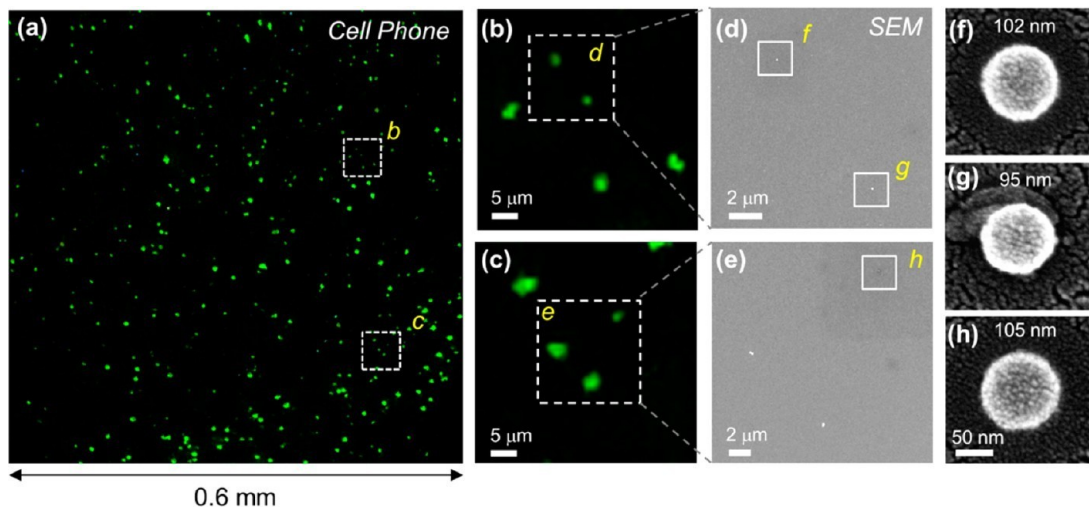


Obrázek 9: Jednoduchý fluorescenční mikroskop pomocí mobilního telefonu. Zdroj [18]

Laserová dioda (450 nm, napájeno 3xAAA baterie) svým zářením excituje fluorofory ve vzorku. Produkované emisní záření prochází 2 optickými čočkami (kamery mobilního telefonu a externí), mezi kterými je optický filtr nepropouštějící odražené excitační záření (pásmová zádrž 500 nm).

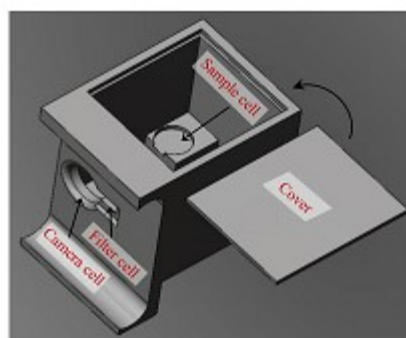
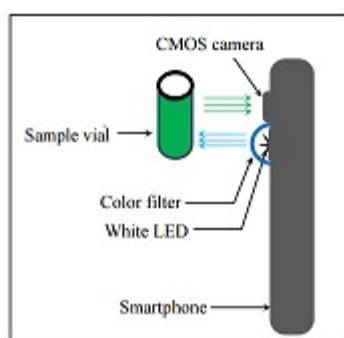
Externí čočka poskytuje 2násobné zvětšení. Laserová dioda s výkonem 75mW, ozařující pod úhlem 75°, spolu s filtrem a čočkou s nízkou numerickou aperturou, zvyšují SNR [18].

Dle prezentovaných výsledků může toto řešení sloužit především pro detekci a kvantifikaci přítomnosti elementů o velikosti virů a nanočástic, kdy není zapotřebí pozorování konkrétních tvarů. Testování autoři provedli na 100nm polystyrenových fluorescenčních nanočásticích a lidském cytomegaloviru (HCMV). Své výsledky validovali pomocí elektronového mikroskopu [18].



Obrázek 10: Výsledný snímek a porovnání s výsledky elektronového mikroskopu. Zdroj: [18]

Fluorimetrií pomocí mobilních telefonů se zabývá práce [10]. Autoři vypracovali pomocí 3D tisku jednoduché pouzdro, obsahující průzor, optický filtr a prostor pro vzorek s fluoroforem. Excitaci provádí přisvětlovací dioda telefonu, přičemž světlo prochází přes filtr (pásmová propust', 450 nm). Kamera telefonu pak snímá emitované zelené fluorescenční záření ze vzorku. Vyhodnocení provádí aplikace v telefonu. Protože emitované záření se nachází v zelené části spektra a na vzorek díky pouzdru nedopadá vnější světlo, lze přímo využít RGB barevný prostor. Autoři uvádějí, že černé stěny pouzdra dostatečně redukuje excitační záření a vyhodnocení se provádí z fixního ROI (region of interest), žádné další korekce neuvádějí [10]. Vyhodnocení probíhá podobně jako u kolorimetrie (vzorky o známé koncentraci, kalibrační křivka).

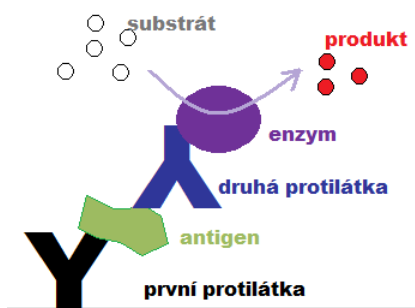


**Obrázek 11: Fluorimetrie pomocí mobilního telefonu. Nahoře schéma systému, dole vizualizace pouzdra. Zdroj [10]**

V rámci práce je systém využit pro měření pH. Intenzita fluorescenčního záření je nepřímo úměrná měřené hodnotě pH. Výsledky jsou validovány pomocí laboratorního spektrofluorimetru [10].

## 2.4 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) patří mezi nejpoužívanější imunologické biochemické metody. Cílem je kvantitativní stanovení měřených antigenů nebo protilátek. Přestože existuje několik variant provedení (přímá, nepřímá, sandwichová, kompetitivní), základem všech je specifická vazba antigen-protilátka. Ve všech metodách je jedním z účastníků reakce protilátka s navázaným enzymem. Po promytí odpovídá koncentrace této protilátky koncentraci měřeného antigenu/protilátky. Po přidání enzymového substrátu se rozvíjí nejčastěji barevná nebo fluorescenční reakce (méně často elektrochemická). Po spektrofotometrickém nebo fluorescenčním měření lze z intenzity záření odvodit koncentraci zkoumané látky [11].



Obrázek 12: Sandwichová ELISA. Zdroj: wikiskripta.eu

Protože se ELISA používá jako test na některá infekční onemocnění, zasahující především chudší oblasti světa (Ebola) [6], lze na využití mobilních telefonů ve spojení s touto metodou nahlížet jako na možnost zvýšení dostupnosti a snížení nákladu pro práci v nízko-zdrojových oblastech (v porovnání s vybavením ve větších městech či finančně vyspělejších státech). Autoři několika prací se demonstrují řešení, která pomocí mobilních telefonů plní funkci čteček mikrotitračních destiček. Volí přitom konstrukčně značně odlišené přístupy.



Obrázek 13: Mikrotitrační destička a klasická čtečka. Zdroj: bio-rad.com

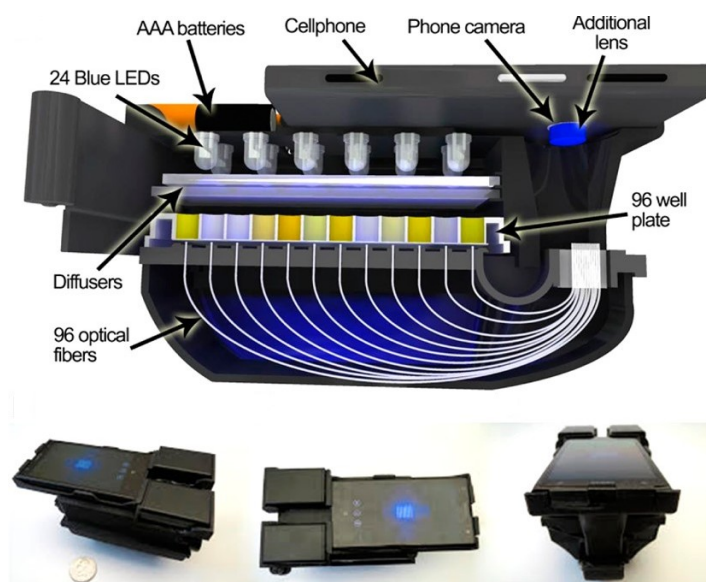
Autoři [23] ukazují přístup založený především na zpracování obrazu a sestavení vlastního ELISA mikročipu. Místo klasické jamkové destičky vytvořili mikročip se třemi dutinami, ve kterých probíhá sandwichová ELISA. Práce se zaměřuje konkrétně na detekci a kvantifikaci HE4 – biomarkeru karcinomu ovaria, v moči. Autoři připravili několik vzorků se známou koncentrací pro kalibraci měření. Po vnesení vzorků pomocí pipet a rozvinutí barevné reakce je telefonem pořízen snímek mikročipu (alternativně byl použit samostatný CCD čip).

Mobilní aplikace měří průměrnou hodnotu intenzity v R kanálu (RGB) v oblastech zájmu. Těmi jsou tři dutiny se vzorky a malá výseč předpokládaného pozadí. Ze změřených hodnot intenzity v oblasti dutinek se vzorky, a známých koncentrací standardů sestaví aplikace kalibrační křivku. Hodnotu intenzity pozadí využije při dalších měřeních s neznámými vzorky k normalizaci hodnot. Kalibrační křivka pro každé měření je upravena dle rozdílu v pozadích mezi měřením standardů a neznámých vzorků. Tímto se eliminují rozdíly v osvětlení mezi jednotlivými měřeními. Z korigované kalibrační křivky pak aplikace vypočítá žádanou koncentraci neznámých vzorků v daném měření.



Obrázek 14: Vyhodnocení ELISA pomocí mobilního telefonu. Vlevo ilustrace snímání, vpravo uživatelské rozhraní mobilní aplikace. Zdroj [23]

Robustní řešení demonstrují autoři [2]. Jejich práce se nevěnuje konkrétní ELISA aplikaci, výsledkem je mobilní čtečka, de facto jednoduchá analogie klasického readeru, vhodná pro různá měření s klasickou 96jamkovou destičkou. Pomocí 3D tisku bylo vytvořeno pouzdro, připojitelné k mobilnímu telefonu. Prostor pro vzorky je shora osvětlen 24 modrých LED, pod nimiž je plošný difuzér, zajišťující rovnoměrné osvětlení celé destičky. Pod destičkou prošle světlo vstupuje do 96 nezávislých optických vláken, jedno vlákno pod každou z 96 jamek, která převádějí světlo od destičky k optickému senzoru telefonu. Samotný mobilní telefon pak neprovádí analýzu, nýbrž pomocí běžící aplikace odesílá data na server, který provádí jak kvalitativní, tak kvantitativní kolorimetrickou analýzu. Telefon tak slouží především jako uživatelské rozhraní. LED jsou napájeny pomocí 6 AAA článků, umístěných v pouzdře. Testování proběhlo na vzorcích příušnic, spalniček a herpes simplex viru 1 a 2. Autorům se podařilo dosáhnout velmi vysoké přesnosti, přesahující 99 %.



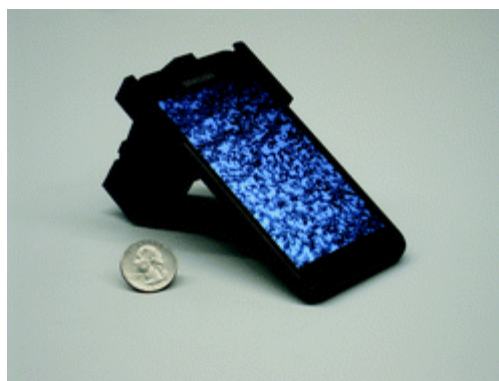
Obrázek 15: Schéma a fotografie čtečky 96jamkových destiček. Zdroj [2]

V obchodech s aplikacemi pro iOS a Android lze také nalézt aplikace, které provádějí měření přímo z fotografie destičky, např. Enzo ELISA Plate Reader [7]. Popis aplikace na stránkách výrobce uvádí 90% korelaci se spektrofotometrickými výsledky a schopnost analýzy na 5 vlnových délkách [7]. Technické podrobnosti však nebylo možné dohledat.

## 2.5 Mikroskopie

Mikroskop je dnes již klasický přístroj pro pozorování objektů miniaturních rozměrů, s dlouhou historií sahající až do 17. století, mající dnes velké množství variant od standardních optických, přes fázové, až po elektronové mikroskopy. Pokusy převést konstrukci optického mikroskopu do mobilního telefonu nejsou nijak výjimečné, dané práce obvykle napodobují klasickou mikroskopii ve světlém poli (fluorescenční mikroskopie je zmíněna v dřívější kapitole) a s konstrukcí zahrnující čočky a tubus. Některá řešení spoléhají na propracovanou analýzu obrazu, čímž mohou vynechat nejkritičtější a nejdražší komponenty - optické čočky. Například holografický mikroskop, ve kterém se vzorek prosvětlí pomocí LED přes miniaturní otvor a interferencí se světlem v pozadí, vzniká holografický obraz. Nutnou součástí je pak komplikovaná analýza obrazu [12]. Obecně je doplnění samotných „mikroskopů“ o mobilní aplikace s různými funkcemi poměrně časté (nejen analýza obrazu, ale i cytometrie, odesílání dat apod.).[12]

Zajímavé řešení vyvinuli autoři práce [15]. Konstrukteři zde využili pro přenos obrazu ke kameře telefonu optických vláken, uchycených v pouzdře (vytvořeno pomocí 3D tisku) schopném rotace okolo své osy. Optická vlákna se směrem od vzorku ke kameře kuželovitě rozšiřují (taper). Zkoumaný vzorek je v kontaktu s jedním koncem optického kanálu. Při prosvětlení vzorku světelným zdrojem (např. LED) je na druhou stranu optického kanálu přenesen obraz zvětšený (3násobné zvětšení ve všech směrech). Tento obraz je pak promítán na kameru mobilního telefonu. Mezi optická vlákna a kameru lze ještě vložit optické čočky. Pro kompletní snímání je nutno provést několik operací, protože použití optických vláken představuje de facto vzorkování scény. Zatímco vzorek a kamera zůstávají ve fixní pozici, optický aparát rotuje, s krokem 1-2°. V každé pozici se pořídí snímek, výsledná sekvence snímků se následně fúzuje pomocí speciální mobilní aplikace a shift-and-add algoritmu. Tím je dosaženo zlepšení rozlišení a odstranění prostorových artefaktů.[15]



Obrázek 16: Mobilní mikroskop s optickými vlákny. Zdroj [15]

## 2.6 Mikrofluidní čipy

Řešení využívající architektury lab-on-chip (LOC). Obvykle se jedná o malá pouzdra, často jednorázová. Obsahují systém mikrokapilár a dutinek, přes které proudí tekuté látky ve velmi malých objemech. Tělo LOC může být vytvořeno pomocí 3D tisku, některá řešení využívají papírový podklad. Použité reagentie mohou být do LOC přidány až před měřením, nebo mohou být naplněny již při výrobě, pokud to charakter použitých látek vzhledem ke skladování umožňuje (skladování při určité teplotě, rozklad účinné látky v průběhu času apod.). Druhý jmenovaný způsob pak zrychluje a zjednodušuje manipulaci před samotným měřením.[20]



Obrázek 17: Mikrofluidní lab-on-chip pro měření koncentrace glukózy ve vzorku. Zdroj: [3]

Konkrétní řešení: Autoři [3] využívají pro měření hladiny glukózy malé jednorázové pouzdro se systémem kapilár a dutinek s předpřipravenými reagentii. Pouzdro je vybaveno malou optickou čočkou pro rozšíření zorného pole, snímání probíhá pomocí kamery mobilního telefonu (obvykle přední). Celé LOC se přikládá přímo ke kameře. Systém obsahuje předpřipravené kalibrační vzorky s nízkou a vysokou koncentrací glukózy pro kalibraci. Vložení vzorku do systému a zahájení pohybu látek v kapilárách realizováno stisky silikonové trubičky, plnicí funkci pumpy. Průchodem analyzovaného vzorku a obou kalibračních vzorků dutinkami s reagentii dochází ke změnám jejich barev. Po úplném smíchání všech reagentii s každým vzorkem je zahájeno měření časového úseku, ve kterém se vyvíjí intenzita barevného odstínu. Čas, za který dosáhne daný vzorek maximální barevné intenzity, je úměrný jeho koncentraci. Protože závislost potřebného času a koncentrace je lineární a jsou známy 2 kalibrační hodnoty, lze sestavit kalibrační křivku a zjistit koncentraci neznámého vzorku. Za tímto účelem lze vývoj nahrávat do paměti telefonu ve formě videa. Tento přístup elegantně obchází problematiku osvětlení (vše lze provádět při ambientním osvětlení) a rozdíly v konstrukcích a vybavení mezi různými modely telefonů. Prakticky nezáleží na parametrech kamery telefonu (v rámci běžně dostupných modelů) ani na jejich tvaru. Zároveň není potřebná žádná další mobilní aplikace, pouze standardní, obsluhující kameru.[3]

## 2.7 Obecné problémy a nevýhody

Krom výhod přináší použití mobilních telefonů v biomedicíně samozřejmě i nevýhody či problémy, spojené s konkrétní realizací. Mezi časté neduhy spojené především s použitím externích pouzder, na která se telefony příkládají, patří adaptace pouzdra pouze na jeden model telefonu. Může se jednat o nemožnost vsadit jiný telefon do prostoru k tomu určenému, častěji však na sebe nenavazují kamera či přisvětlovací prvek telefonu a prvky pouzdra pro ně určené. Lze však rozumně předpokládat, že v případě masovějšího využití by byl tento problém vyřešen adaptabilnímu nástavci, nebo přímo přepracováním pouzder na nastavitelná.

Některá řešení jsou vytvořena pro použití jen na jednu konkrétní aplikaci. Tato determinovanost je určena například použitými reagensy nebo komponentami. Zároveň mobilní řešení obvykle disponují jen nízkou nebo nulovou mírou automatizace. Toto negativum se projevuje především při zpracování většího množství vzorků. Je nutné však uvést, že toto negativum stojí v protíváze k jednoduchosti a nízkým nákladům, které jsou obvykle hlavními motivy vývoje těchto zařízení.

Spolehlivost telefonu může být při použití kritickým článkem. Protože většina uvedených metod spočívá v přímém použití telefonu, a zároveň je telefon obvykle nejsložitější součástí celého řešení, může jakékoliv, především skryté, nestandardní chování telefonu zkreslit podané výsledky. Lze však předpokládat, že závadu, která je obsluze zjevná, bude možné snadno kompenzovat nahrazením telefonu jiným kusem díky snadné dostupnosti a velké rozšířenosti mobilních telefonů v populaci.

Přesnost svých řešení obvykle autoři testují proti zavedeným vrcholovým přístrojům v dané kategorii. Přestože jsou prezentovaná řešení často schopna dosáhnout úctyhodných výsledků, obvykle se nejedná o kvalitu absolutně srovnatelnou. Vzhledem k tomu, že se jedná o přístroje, jejichž výsledky měření mohou mít vliv na lidský život, lze právě toto považovat za největší bariéru proti většímu rozšíření ve světě. Tento fakt jde také ruku v ruce s nedůvěrou, kterou může náhrada drahého a komplexního přístroje malým, levným a na mobilním telefonu založeným řešením, vzbuzovat.

Pro výše uvedené důvody je zatím širší použití mobilních telefonů pro biomedicínské aplikace ve vyspělém prostředí nepravděpodobné. Lze si však představit úspěšné použití v prostředí, kde jsou tradiční zdroje těžko dostupné, kde jsou kladeny vysoké požadavky na cenovou dostupnost, a kde mohou být požadovaná rychle dostupná, na obsluhu a energii nenáročná technická řešení, u kterých nebude nejvyšší přesnost a robustnost laboratorních přístrojů úplnou prioritou. Také lze uvažovat o uplatnění v prostředí těch výzkumů, ve kterých není vysoká přesnost a široká paleta schopností laboratorních přístrojů pro účely daného výzkumu nutností, a použití mobilních telefonů by ušetřilo významnou část finančních prostředků nebo času.

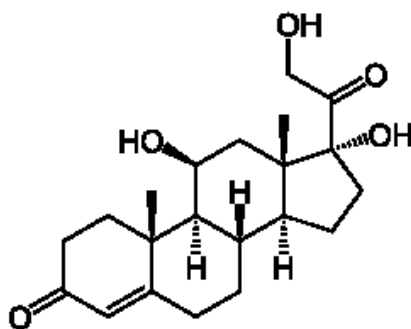
### 3 Návrh realizace řešení pro měření hladiny kortizolu pomocí mobilního telefonu

Cílem této části je vytvořit návrh řešení s využitím mobilního telefonu, pomocí kterého bude možné experimentálně stanovovat hladinu kortizolu ve slinách, která dle v současnosti dostupných informací významně koreluje s hladinou kortizolu v séru [9][20][22].

#### 3.1 Kortizol

Kortizol (Obrázek 18) je hormon patřící mezi glukokortikoidy, hormony produkované adrenálním kortexem (kůra nadledvin). Jedná se o hlavní stresový kortikosteroid. Produkce kortizolu je řízena osou HPA (hypotalamus-hypofýza-nadledviny). V této ose působí CRH (kortikoliberin, hypotalamus) na produkci ACTH (adrenokortikotropní hormon, adenohipofýza), který následně působí na produkci kortizolu (nadledviny). Regulace produkce probíhá pomocí negativní zpětné vazby. V krvi je většina kortizolu vázána na CBP (cortisol binding protein), malá část je vázána na albumin, zbytek je ve volné formě [13].

Právě pouze volný kortizol má biologické účinky. Mechanismem účinku kortizolu je působení na GR receptor (glucocorticoid receptor) v cytoplazmě, který se po navázání kortizolu přesouvá do jádra, kde působí jako transkripční faktor (případně působí na transkripci genů pomocí interakcí s jinými proteiny v jádře nebo cytosolu). Úlohou kortizolu jako stresového hormonu je udržování fyziologické homeostázy při stresové reakci, mobilizace energetických zdrojů a utlumení procesů energie spotřebovávajících a po dobu trvání stresové reakce nepotřebných. Je za hodno zmínit několik mechanismů, pomocí kterých kortizol plní své funkce (uvádět plný výčet však nekoresponduje s cíli této práce). Zvyšuje hladinu glukózy v krvi jednak uvolňováním buněčných zásob, a dále pomocí glukoneogeneze. Stimuluje glykogenezi a lipolýzu (především v dolních končetinách, naopak ovšem podporuje ukládání tuku v trupu a obličejí). Katabolický působí především na svalové a pojivové proteiny. Zesiluje demineralizaci kostní tkáně. Ovlivňuje CNS (zvyšuje dráždivost), zmírňuje imunitní reakce a zpomaluje hojení ran [13].



Obrázek 18: Strukturální vzorec kortizolu. Zdroj: darthmouth.edu

Mimo zvýšené sekrece při akutní stresové reakci je kortizol v krvi přítomen v bazálních koncentracích i za běžných podmínek. Uvolňován je v pravidelném cirkadiánním rytmu. Koncentrace vykazuje tři hlavní maxima: ranní, okolo poledne, a odpolední. Bazální koncentrace slouží k regulaci některých metabolických aktivit (mozek, ledviny, játra) a diferenciaci některých tkání (tuková) [13].

Patologické stavy může způsobovat jak snížená, tak zvýšená produkce kortizolu. V případě snížené produkce hovoříme o Addisonově chorobě. Obvykle je hypokortizolismus způsoben adrenální insuficiencí, primární nebo sekundární (problém přímo v nadledvinách nebo v hypofýze, která se účastní regulace kortizolu). Při zvýšené produkci (hyperkortizolismus) se jedná o Cushingův syndrom. Opět lze dělit na primární – příčinou zvýšené hladiny kortizolu je porucha nadledvin nebo terapeutické podávání kortizolu, a sekundární – příčinou je problém v hypofýze. Měření hladiny kortizolu se provádí, mimo jiné, právě při podezření na tyto choroby [13].

Referenční hodnoty [20]:

ranní.: 100-750 ng/dL

odpolední.: <401 ng/dL

noční: <100 ng/dL

### 3.2 Princip řešení

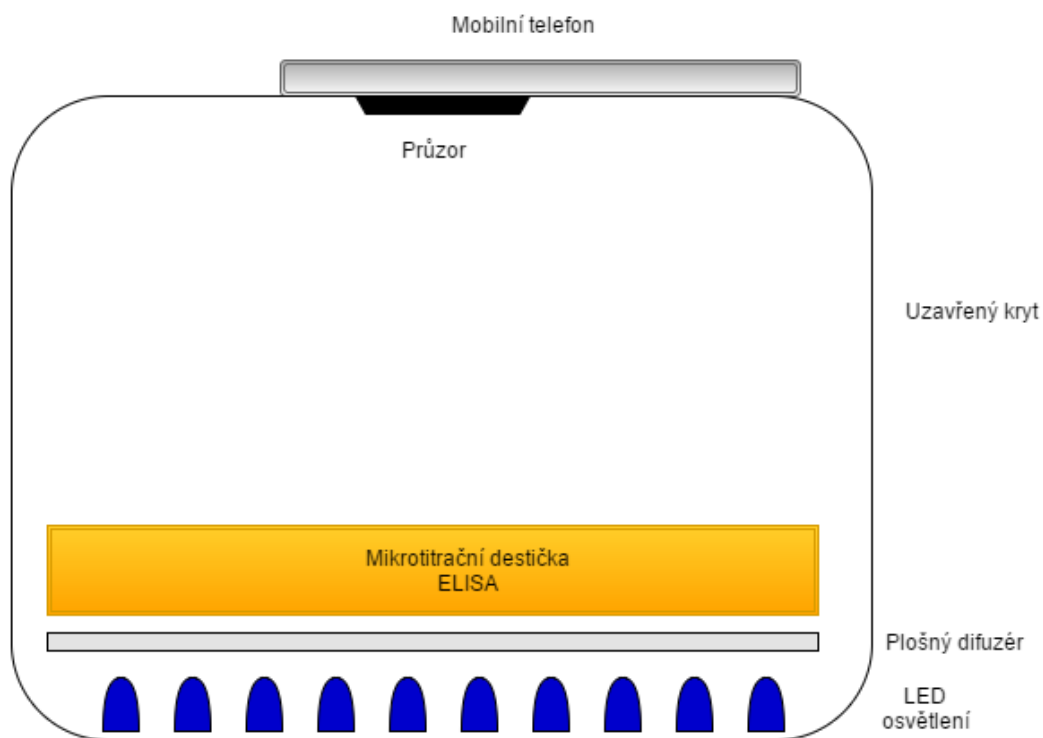
Jako analytická metoda pro měření hladiny kortizolu byla vybrána ELISA, pro svou všeobecnou rozšířenost a dostupnost hotových měřících kitů. Řešení předpokládá pořízení hotového kitu pro měření hladiny kortizolu ve slinách pomocí metody ELISA, ve vyhotovení s 96jamkovou titrační destičkou a všemi potřebnými reagensy.

Principiálně tedy navrhované řešení napodobuje úlohu ELISA readerů. Obecně lze navrhovaný systém měření rozdělit do tří funkčních částí: mobilní telefon, snímací blok, a analytický blok. Při vytváření snímacího bloku se předpokládá využití technologie 3D tisku.

Snímací blok je realizován pomocí komůrky, do které se vkládá mikrotitrační destička. Pod destičkou se nachází soubor LED (pro kortizol obvykle barva z modré části spektra) jako zdroj procházejícího světla. Protože samostatně by LED nevytvářely homogenní osvětlení, je nutné vložit mezi destičku a LED plošný difuzér (způsobí útlum). Samotný modul bude napájen pomocí napájecího adaptéru (případně galvanickými články).

Mobilní telefon slouží jako senzor a jako pracovní platforma pro zpracování dat. Počítá se s využitím zadní kamery - telefon je položen na vrchní straně pouzdra, kamera přiložena k průzoru na vrchní straně pouzdra. Sepnutím obvodu dojde k rozsvícení LED a telefonem lze manuálně pořídít fotografický snímek.

Analytický blok tvoří vypracované matlabovské funkce v kombinaci s aplikací Matlab Mobile. Jeho úkolem je provést zpracování dat pomocí analýzy obrazu, vypočítat koncentraci měřené látky v jednotlivých jamkách a prezentovat výsledek na mobilním telefonu. Jednoduché schéma ukazuje Obrázek 19.



Obrázek 19: Jednoduché schéma návrhu praktické realizace

Vzhledem k navrhovanému řešení zadaného problému není aparát omezen pouze na měření kortizolu, ale je obecně možné provádět měření daného charakteru s látkami, které absorbují v modré části spektra.

## 4 Praktická realizace analytického systému

Mezi cíle této práce patří mimo jiné dvě základní komplexní úlohy: realizace hardware v souladu s navrhovaným řešením a vytvoření analytického software ke zpracování nasnímaných dat.

### 4.1 Hardware

#### 4.1.1 Mobilní telefony – obecně

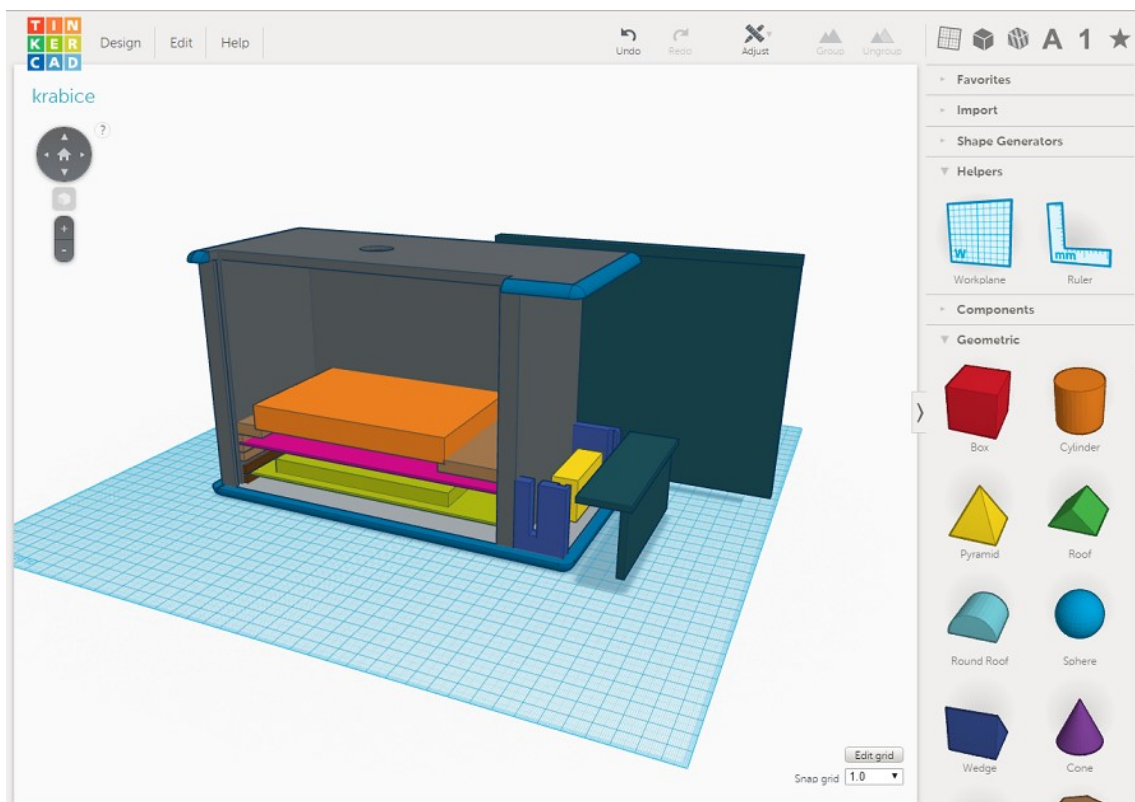
Na mobilní telefon, použitý pro měření, je kladen jeden velmi důležitý nárok, a tím je schopnost exportovat fotografie do formátu DNG (nejrozšířenější otevřený formát RAW, jiné formy RAW formátů nebyly testovány), ať už nativně nebo po instalaci speciální fotografické aplikace. Tento zásadní požadavek omezuje množství použitelných telefonů, většinou tuto podmínku splňují telefony vyšších cenových tříd a některé telefony střední třídy. Obecně se nedá říct, který výrobce či typy umí exportovat fotografie do DNG, obvykle je to záležitostí konkrétního modelu.

Nastavení hodnoty zesílení ISO je dnes již běžnou součástí fotografických aplikací. Výhodné však je, pokud aplikace umí také manipulovat s jinými parametry snímání, např. s rychlostí závěrky. To se však bohužel opět vztahuje pouze na konkrétní modely.

#### 4.1.2 Pouzdro

Jak již bylo zmíněno dříve, zde předkládané zařízení je založeno na principu kvádrového uzavřeného boxu s otvorem na vrchní straně, skrz nějž je fotografována mikrotitrační destička, prosvětlená panely LED přes vrstvy světelného difuzoru. Tato metoda eliminuje vliv okolního světla na měření.

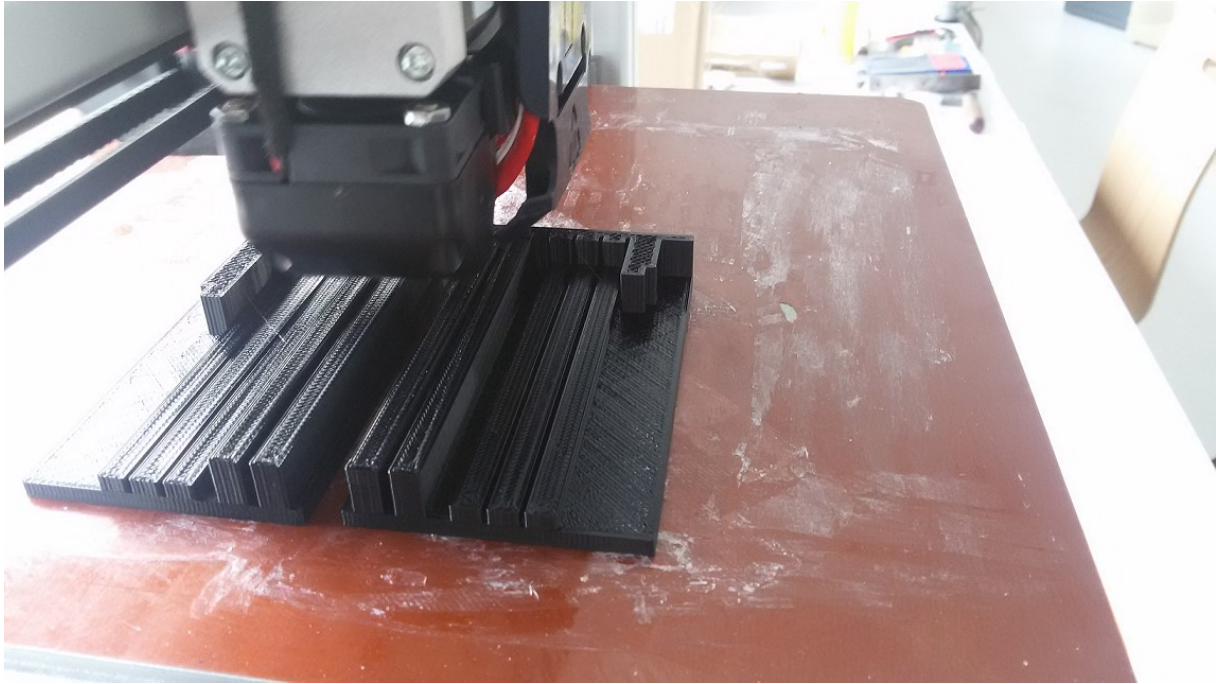
Jako konstrukční metoda byl původně zvolen 3D tisk z materiálu PLA (Polylactid acid). Navrhování a modelace konstrukce zařízení probíhalo ve volně dostupném webovém návrhovém prostředí Tinkercad (po registraci dostupné na [www.tinkercad.com](http://www.tinkercad.com), Obrázek 20). Toto prostředí bylo zvoleno krom volné dostupnosti také pro svou jednoduchost a uživatelskou přívětivost, díky které bylo možno se s ním rychle naučit pracovat. Obsahuje množství základních plných tvarů a mezer a umožňuje základní prostorové změny, především velikostní. Daní za jednoduchost je pak právě absence složitějších, avšak často užitečných prvků. Pro účely této práce však byl Tinkercad plně dostačující.



**Obrázek 20: Návrhové prostředí Tinkercad**

Původně byla celá konstrukce navržena pro 3D tisk, a to i s důrazem na robustnost. Postupem času však byl tento přístup částečně opuštěn a to především za účelem úspory finančních zdrojů, tiskového materiálu a tiskového času, neb původní návrh by vyžadoval více než 24 hodin nepřetržitého tisku. Některé části však byly v modelu zachovány, především ty, u kterých by se manuální výroba vyznačovala vyšší náročností. Jedná se především o držák s lištami (Obrázek 21), ve kterém jsou uchyceny vzorky, difuzory a světelné zdroje. Pro výrobu ostatních částí, především destiček s větší plochou, byly pořízeny pruhy balsaového dřeva. Za účelem využití standardizovaných rozměrů pruhů byl model konstrukce mírně přepracován, pruhy dřeva byly nařezány na destičky požadovaných rozměrů a slepeny k sobě univerzálním lepidlem Herkules.

Výsledný produkt je de facto složen ze dvou hlavních bloků. Prvním je báze zařízení, složená z podkladu a lištové konstrukce, osazené vzorkem, difuzory a osvětlovací jednotkou. Podklad je vyroben z pruhu balsaového dřeva o rozměrech 225 x 100 x 9 mm. Na podkladové části je připevněna lištová konstrukce, vyrobená 3D tiskem, o vnějších rozměrech 183 x 93 mm. Ta je složena ze tří na výšku stojících pravoúhlých destiček, na nichž je natištěno pět úzkých lišt, mezi které je možné vkládat desku s osvětlovací jednotkou a difuzory. Nad lištami jsou natištěny dvě nosné plochy s výřezem po stranách, do kterých se vkládá mikrotitrační destička se vzorky. Vzdálenosti mezi plochami odpovídá přesně velikosti destičky, tedy 128 mm. Na pravé straně konstrukce je vytvořen otvor pro připojení osvětlovací jednotky k napájení. 3D tisk této části zabral přibližně šest hodin času.

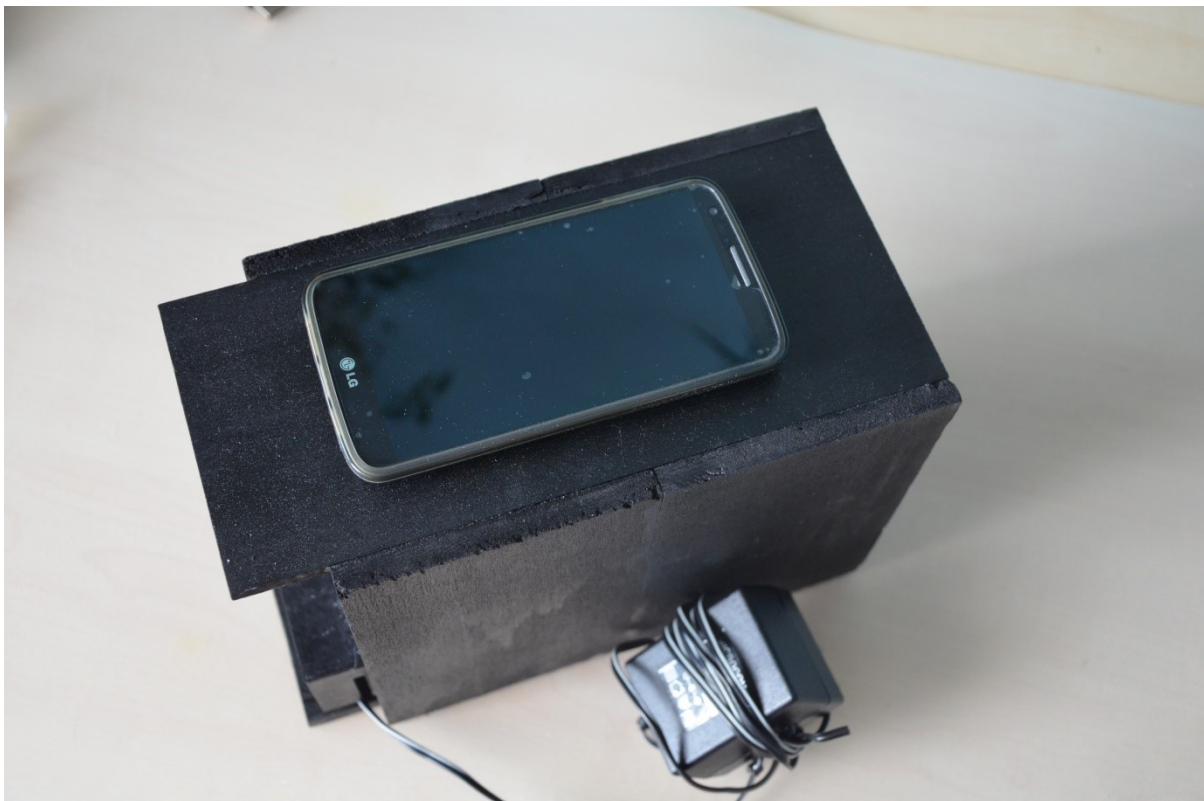


**Obrázek 21: 3D tiskárna na UBMI během tisku lištové konstrukce**

Druhým blokem je velký nasazovací kryt o rozměrech 200 x 120 x 300 mm. Slouží k zamezení přístupu okolního světla ke vzorku a jako podstavec pod mobilní telefon. Celý je vyroben z nařezaného balsové dřeva a na horní straně disponuje rozšířením, korespondujícím s rozměry dna, pro lepší stabilitu telefonu (spíše pro případ použití většího zařízení). Také je zde vyřezán kruhový otvor o průměru přibližně 2 cm jako průzor pro fotoaparát mobilního telefonu. Kryt je poměrně vysoký proto, aby zajistil telefonu dostatečné zorné pole, při kterém bude pozorovatelná celá destička se vzorky - původně dosahovala výška necelé poloviny současné hodnoty, vzhledem k horšímu náhledu do krajních jamek bylo pouzdro navýšeno. Výška krytu nad destičkou činí přibližně 24 cm. Při výměně vzorku je třeba celý velký kryt sejmout, je vhodné při tom dbát na stálou pozici telefonu (usnadňuje obrazové zpracování), ovšem vzhledem k materiálu krytu a jeho nabarvení není udržení telefonu ve stále pozici a při pohybu nijak složité a stačí jen trocha opatrnosti.

Naopak pro připojení a odpojení zdroje napájení od osvětlovací jednotky není nutno s krytem manipulovat, neboť v souladu s otvorem v lištové konstrukci je také v krytu vyřezán otvor, bez spodní hrany, umožňující zasunutí konektoru napájení.

Všechny balsové části byly nabarveny černou barvou ve spreji. Tištěné komponenty jsou černé již z výroby. Kompletní systém v zavřeném stavu ukazuje Obrázek 22.



Obrázek 22: Kompletní analytický systém v uzavřeném stavu

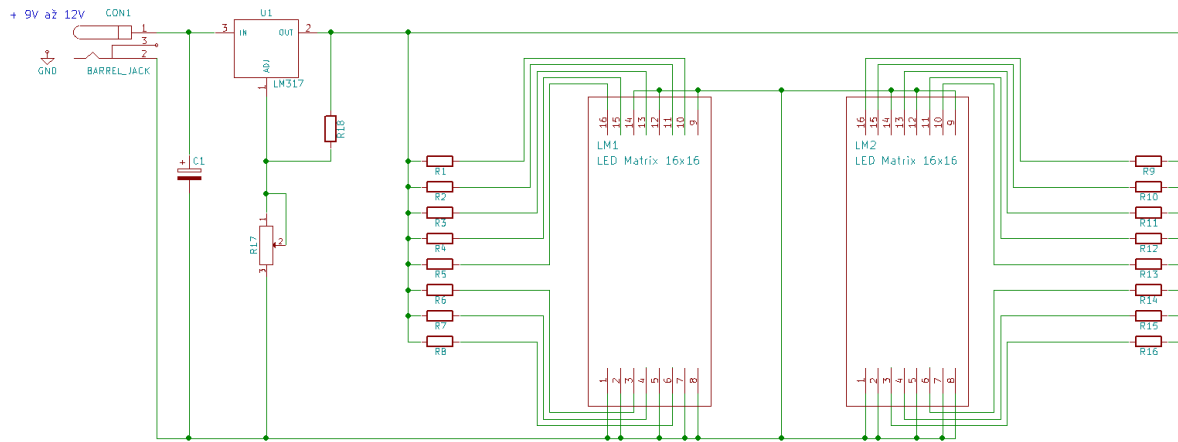
### 4.1.3 Osvětlovací jednotka

Jako zdroj procházejícího světla pro měření bylo postupně uvažováno několik možných zdrojů – 24 samostatných modrých LED, pravidelně rozmístěných mezi každé čtyři jamky tak, aby jedna LED svým světlem prozařovala převážně nejbližší jamky; 96 samostatných LED – jedna LED pro jednu jamku, a 2 64bodové LED matice, které pokrývají většinu plochy mikrotitrační destičky, avšak bez přímé vazby mezi konkrétními LED a jamkami. Vzhledem k jednoduchosti a praktičnosti byla zvolena varianta s dvěma LED maticemi o 8x8 prvcích.

Zvolené měření vyžaduje prosvětlení světlem v modré oblasti spektra, proto byly pořízeny matice s modrými LED, s vyzařovacím maximem na 470 nm a FWHM 25 nm. Vyzařovací úhel není ve specifikaci uveden. Další specifikace jsou uvedeny v příložené dokumentaci. Jedna matice se skládá z 64 diod v zapojení se společnou katodou a vyvedenými 16 piny.

V rámci řešení byl navržen také elektrický obvod pro LED matice (Obrázek 23), obsahující několik prvků. Pro připojení napájení slouží DC konektor. Ten je možné spojit například s 12V adaptérem nebo s 9V článkem se speciálním nastavcem. Obvod také obsahuje stabilizátor napětí U1 typ LM317 s variabilním výstupním napětím, který zajišťuje kompatibilitu obvodu s jinou velikostí vstupního napětí, při zachování stálého napětí na LED

panelech Výstupní napětí je řízeno pomocí keramického odporového trimru 5 k $\Omega$ . Dále obvod obsahuje kondenzátor C1 1000  $\mu$ F / 25 V pro filtraci napěťových špiček.

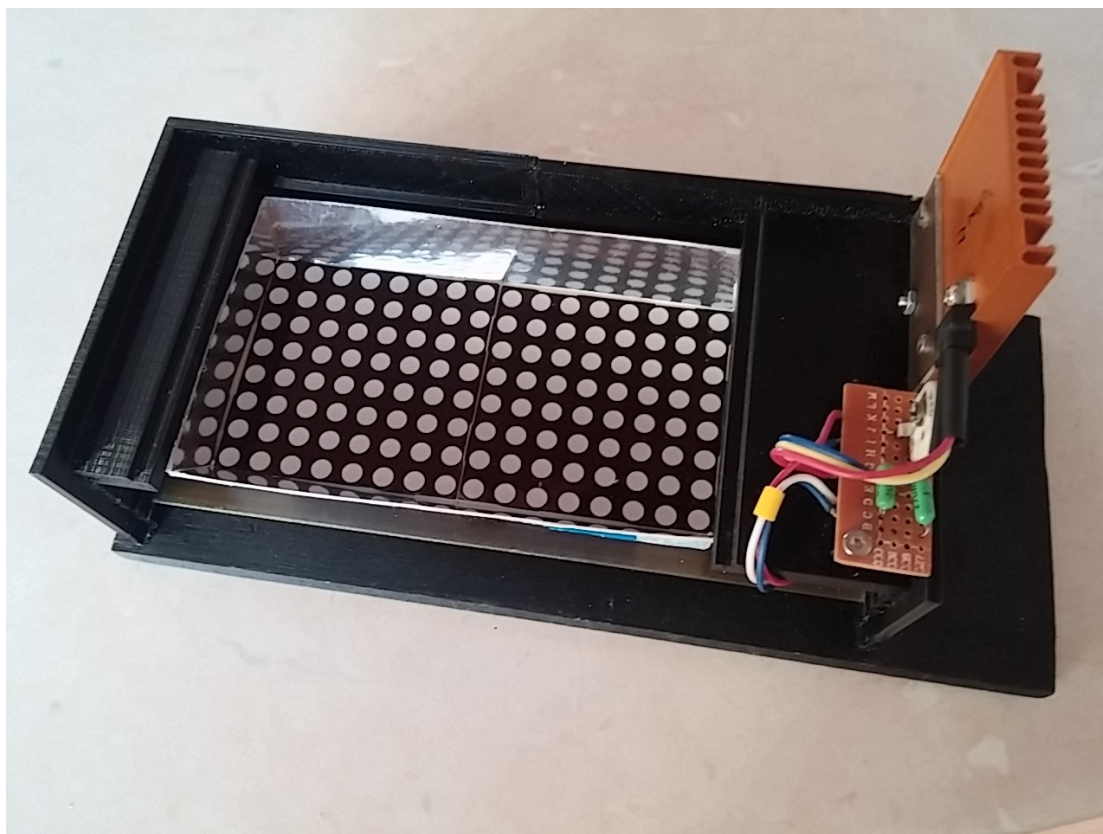


**Obrázek 23: Schéma obvodu osvětlovací jednotky**

Při sepnutí obvodu (měření) se napěťový stabilizátor průchodem relativně velkého proudu zahřívá, k bázi aparátu byl proto přimontován pasivní chladič, k němuž byl stabilizátor vyveden a připevněn. Díky tomuto je možné držet obvod sepnutý po dlouhou dobu.

Navržený obvod zdroje světla byl realizován formou vlastní výroby desky s plošnými spoji s uvedeným rozvržením spojů a osazením potřebnými součástkami. Návrh desky probíhal ve volně dostupném návrhovém programu KiCad ([www.kicad-pcb.org](http://www.kicad-pcb.org)). Navržena byla jednovrstvá deska o rozměrech 177 x 75 mm s odpovídajícím zapojením (viz příloha). Návrh plošného spoje byl přenesen na speciální modrou folii (výrobce CADware s.r.o.) pomocí laserového tisku a následně nažehlen na cuprexitovou desku. Takto připravená deska s naneseným obrazem plošného spoje byla ponořena do lázně s leptacím roztokem. Po cca hodině se nepotřebná měď odleptala a zůstaly jen měděné spoje.

Jako zdroj napětí osvětlovací jednotky slouží napájecí adaptér 12 V / 1,5 A se souosým DC konektorem, opatřený vypínačem. Kompletní osvětlovací jednotku i s reflektorem, vsazenou do lištové konstrukce zobrazuje Obrázek 24.



Obrázek 24: Hotová DPS s osvětlovací jednotkou a reflektorem, vsazená do lištové konstrukce

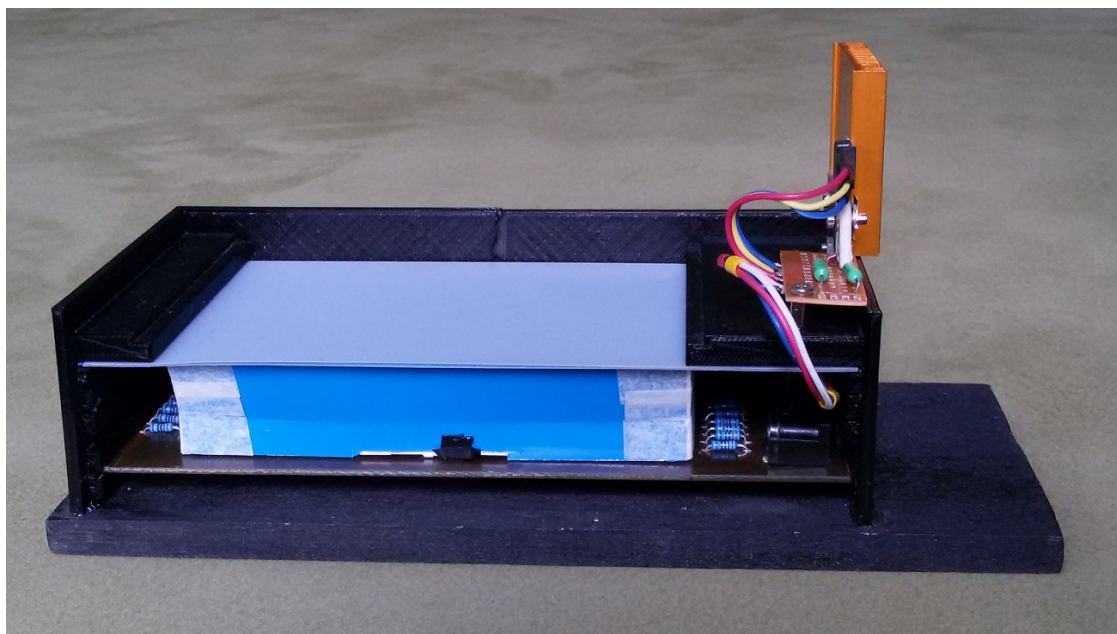
#### 4.1.4 Difuzor

Difuzor je částečně světlopropustná folie z materiálu s difuzními vlastnostmi, která slouží k homogenizaci rozložení intenzity osvětlení v prostoru pod mikrotitrační destičkou. Protože jsou LED nespojitě rozmístěny v prostoru a rozměr LED panelů nekopíruje rozměr mikrotitrační destičky, je homogenizace nutnou součástí řešení.

Difuzor se vkládá do vnitřních vodících lišt základny. Nad LED panely jsou připraveny celkem tři lišty s odstupem 0.5 cm, difuzor je tedy možné uložit do tří poloh, případně použít více difuzorů najednou. Při použití reflektoru (kapitola 4.1.6), který zabere prostor bezprostředně nad panely, je však možné vložit jen jeden difuzor do horní lišty.

Ačkoliv existují různé difuzory s vysokou kvalitou z různých materiálů, vzhledem k finančnímu omezení je pro účely této práce vhodné využít materiály s difuzními vlastnostmi snadno dostupné v běžném životě. Celkem byly zpracovány a otestovány tři typy difuzorů: složený difuzor z tří vrstev tenkého polypropylenu – sandwichové uspořádání dvou poloprůhledných vrstev a jedné modré vrstvy, mléčná novodurová (neměkčené PVC) folie a pruh mléčného HDPE (High density polyethylene - Polyethylen s vysokou hustotou).

Hlavním difuzorem při testování aparátu byl sandwichová difuzor z modrého a poloprůhledného polypropylenu (Obrázek 25). Mezi jeho hlavní přednosti patří dostatečná pevnost a především nízký útlum procházejícího světla. To umožňuje nastavit při snímání na telefonu nízkou hodnotu ISO (na testovacím telefonu LG G2 ISO 100 – bez zesílení) a snížit tak vliv šumu.



**Obrázek 25: Lištová konstrukce se zasunutou osvětlovací jednotkou, reflektorem a difuzorem**

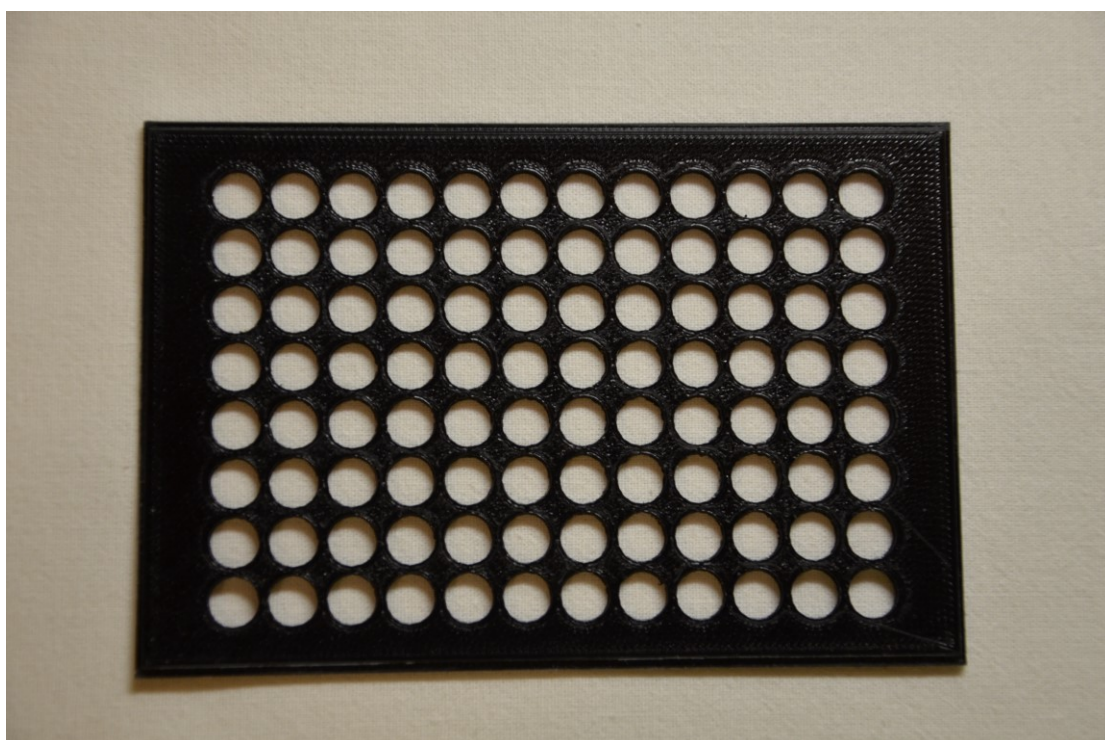
Druhým difuzorem je tenká destička neměkčeného PVC (novodur). Jedná se o mléčný neprůhledný plast. Jeho výhodou je účinnější homogenizace rozložení intenzity osvětlení než u polypropylenu, tvarově je také stálý a pevný. Nevýhodou je však značný útlum, nejsilnější z použitých difuzorů. To vyžaduje nastavení vyšší hodnoty ISO a zesílení svítivosti LED (dle použitého obrazového snímače). Vyšší hodnota ISO vede ke zvýšení šumu.

U difuzoru z mléčného HDPE dochází k dostatečné homogenizaci a vyššímu útlumu procházejícího světla. V těchto parametrech zaujímá HDPE střední pozici a jeví se tak jako rozumný kompromis. Nevýhodou HDPE je však tvarová nestálost. Po vyříznutí potřebného tvaru docházelo v různě dlouhém časovém horizontu ke změnám tvaru a na původně plochém kusu se začaly objevovat zvlnění. Difuzor byl tedy vyřazen z testování.

Všechny uvedené difuzory pochází z předmětů běžné denní potřeby a jejich cena je v porovnání s kvalitními difuzory zanedbatelná, což je důležité, jelikož cena byla v průběhu této práce významným omezením. Vzhledem k uvedeným pozitivům a negativům byl pro testy realizace vybrán polypropylenový sandwichový difuzor, u novodurového difuzory byl odrazující silný útlum, u HDPE zase tvarová nestálost. Novodur zavrhnut nebyl, jeho použití závisí spíše na specifických podmínkách a je přiložen k odevzdávané práci.

#### 4.1.5 Stínítko

Důležitou součástí realizovaného řešení, které výrazně ovlivňuje proces snímání a zpracování obrazu je černé tištěné plastové stínítko (Obrázek 26). Jedná se o destičku s rozměry shodnými s rozměry mikrotitračního pole, perforovanou 96 otvory v místech, kde se na mikrotitračním poli nacházejí jamky. Průměr otvorů je mírně větší než vnitřní průměr jamek pod nimi (přesný rozměr nelze určit kvůli teplotní roztažnosti PLA, viz dále). Stínítko se přikládá na horní plochu mikrotitrační destičky, správnému umístění pomohou drobné vodící lišty na jeho spodních okrajích.

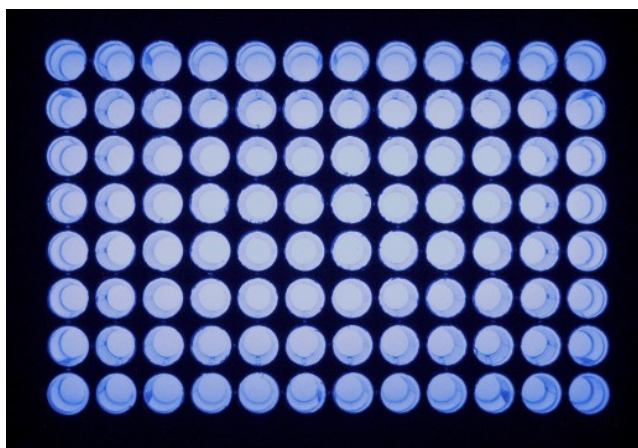


Obrázek 26: Stínítko s 96 otvory

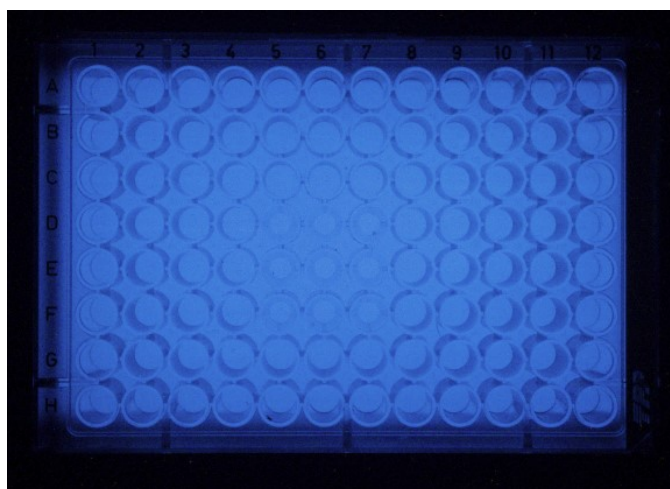
Účelem použití stínítka je odstínění světla, které prochází skrz mikrotitrační destičku, ale ne skrz jamky se vzorky, nýbrž jejich okolím. Tato část světla výrazně snižuje kontrast v zájmové oblasti snímku, především v okolí jamek se vzorky o nízkých koncentracích. Po přiložení stínítka se jeví oblast mimo samotné jamky jako velmi tmavá, čímž je dosaženo zvýšení kontrastu mezi jamkami a jejich okolím. Pokud však jamka obsahuje koncentrovaný vzorek, který silně absorbuje procházející modré světlo, projeví se ve snímku také jako pixely s nízkou hodnotou jasu. Proto je průměr otvorů ve stínítku vždy o něco větší než vnitřní průměr jamek pod nimi (modelovaný průměr 8.0 mm, v důsledku teplotní roztažnosti mírně odlišný), díky čemuž otvory propouští také světlo procházející průhlednými stěnami jamek. V obraze se pak okolo jamek při obsahu vzorku s vysokou koncentrací a nízkou jasovou hodnotou pixelů objeví světlejší prstenec. Vyššího kontrastu mezi pixely jamek (případně

prstence) a jejich okolí pak využívají matlabovské funkce při detekci jamek v obraze (viz popis software).

Pro účely měření byla vyhotovena dvě stínítka přikládána na horní stranu mikrotitrační destičky, a to v tloušťce 1 a 3 mm. U tenčí varianty se předpokládala jistá možnost průsvitu v důsledku nedokonalosti tisku. Hrubší destička tímto negativem netrpí, zároveň však mírně ale ne nezanedbatelně ovlivňuje vzhled do krajních jamek. Jak se však během testování ukázalo, očekávaný průsvit tenkého stínítka se sice projevil, předpokládávaný vliv na detekci jamek (hledání kružnic pomocí Houghovy transformace s vyšší citlivostí – možnost falešné detekce v hranové nebo binární reprezentaci) se však i díky morfologickým operacím v obraze neuplatnil, stejně tak u hrubšího stínítka byla detekce jamek i náhled stále dostatečné. Nadále bylo tedy v měření používání tenké stínítka (1 mm). Nepředpokládá se, že by použití druhého stínítka přineslo znatelné změny. Porovnání snímků se stínítkem a bez stínítka ukazují Obrázek 27 a Obrázek 28.



**Obrázek 27: Snímek destičky se stínítkem**



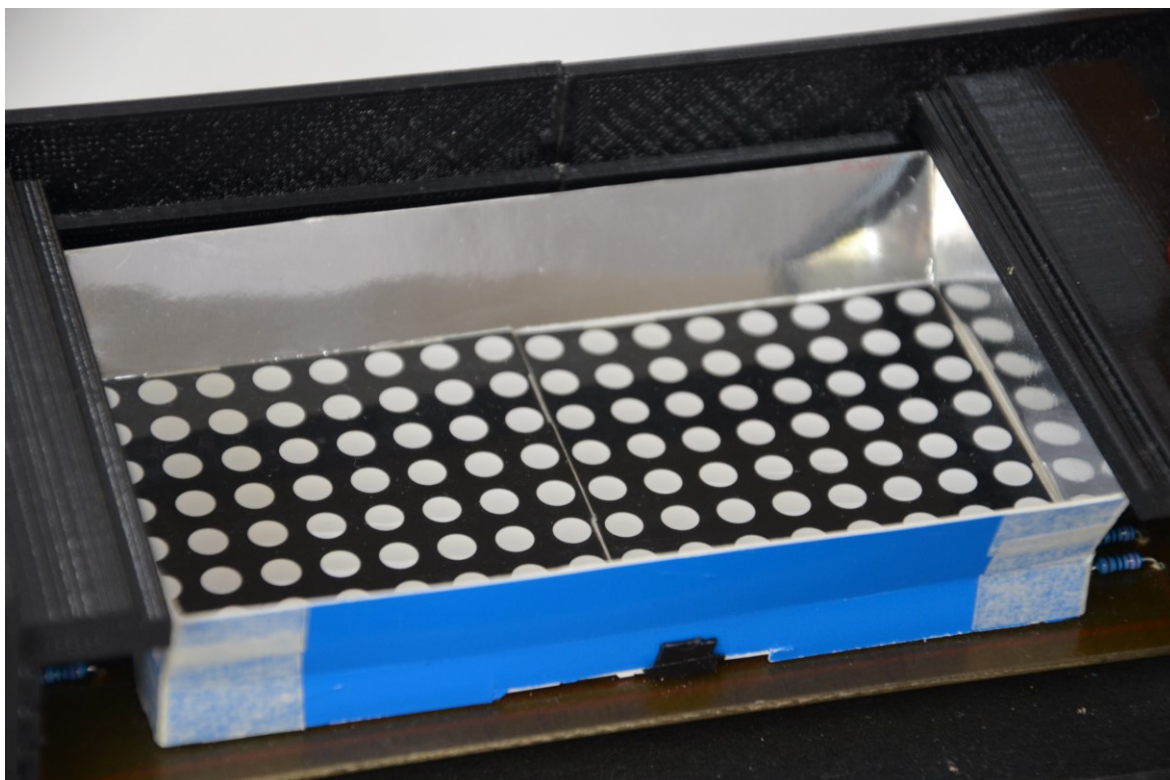
**Obrázek 28: Snímek destičky bez stínítka**

Zhotoveno bylo i spodní stínítko, které se vkládá přímo pod mikrotitrační destičku a od vrchních stínítek se liší jen formou přiložení k mikrotitrační destičce – místo drobných lišt po okrajích jsou použity zářezy, do kterých kraje destičky zapadnou. Účelem spodního stínítka bylo doplnit horní stínítko a navíc propouštět jamkami především světlo, které prochází rovnoběžně se svislou osou jamky. Ukázalo se však, že spodní stínítko omezuje intenzitu světla procházejícího stěnou jamky, čímž, především u jamek s vysoce koncentrovanými vzorky, snižuje kontrast prstence a okolí (tedy snižuje jasové hodnoty pixelů mezi obsahem jamky a horním stínítkem v obraze). Při jeho použití se neprojevila tak značná výhoda, která by převážila toto negativum, a proto bylo od jeho použití upuštěno.

U všech vytištěných stínítek se projeví dva faktory, které mírně negativně ovlivnily jejich celkové zpracování. Prvním je samotné modelování v prostředí Tinkercad, které umožňuje práci v rozměrech na úrovni desetin milimetru, zatímco mikrotitrační destičky jsou vyměřené na úrovni setin milimetru. Druhým faktorem je teplotní roztažnost materiálu PLA, ze kterého jsou všechny tištěné části přípravku vyrobeny. Po dokončení tisku vyhotovený prvek chladne a s tím se mění jeho rozměry. U všech stínítek se projevila změna v řádu desetin až celého milimetru. To mírně negativně ovlivnilo rozložení otvorů ve stínítcích i samotné krajní lišty/zářezy a tedy přikládání stínítek k mikrotitrační destičce. Tyto faktory spolu s následným nutným manuálním dobrušováním způsobily vznik mírné nepřesnosti v konstrukci stínítek. Tato nepřesnost však nijak znatelně neovlivňuje výsledek měření a práce obslužného software jí není nijak poznamenána.

#### **4.1.6 Reflektor**

Zvolené řešení zdroje světla – tedy 2 LED panely - přináší cenovou úsporu, zavádí však jeden značný problém a tím je nehomogenita intenzity osvětlení užitečné plochy difuzoru s následnou nerovnoměrnou distribucí intenzity osvětlení mezi jednotlivými jamkami. Celková plocha obou LED panelů je menší než užitečná plocha difuzoru nad nimi i plocha mikrotitrační destičky. Proto především krajní jamky trpí snížením intenzitou osvětlení, které jimi prochází. Jednou z odpovědí na tento problém je, krom softwarové korekce, také použití reflektoru (Obrázek 29) obklopujícího LED panely. Jedná se o pruhy metalického zrcadlového papíru umístěné po obvodu LED panelů, které usměrňují část světla vzhůru k difuzoru, respektive k mikrotitrační destičce, a zajišťují tak zvýšení intenzity osvětlení u krajních jamek.



Obrázek 29: LED panely s nasazeným reflektorem

#### 4.1.7 Mikrotitrační destička

Při vývoji byl brán zřetel na úmysl použít zařízení k měření koncentrace kortizolu ze slin pomocí metody ELISA. Vzhledem k tomu jsou například jako zdroj světla použity modré LED, neboť látky použité pro analýzu absorbují v modré části spektra. Protože se ale mikrotitrační destičky a reagenty pro ELISA vyznačují vyšší finanční náročností, bylo rozhodnuto použít pro účely této práce jako testovací nosič vzorků pouze obyčejnou mikrotitrační destičku, bez chemické úpravy povrchu.

Použitá destička je standardizovaná 96jamková mikrotitrační destička značky TPP (Obrázek 30), o rozměrech 128 x 86 mm. Pracovní objem jedné jamky činí dle specifikace 0.34 ml. Další údaje jsou uvedeny v příložené dokumentaci.



Obrázek 30: Standardní mikrotitrační destička, 96jamková, propagační foto výrobce TPP

## 4.2 Software

Třetí velkou kapitolou práce je návrh, zpracování a postupný vývoj obslužného software, který bude vykonávat analytickou část práce – stanovení koncentrace předkládaných vzorků pomocí obrazové analýzy.

Použitý software lze rozdělit do dvou skupin:

- 1) Soubor matlabovských funkcí vytvořených pro tuto práci
- 2) Aplikace Matlab Mobile pro mobilní telefony

O aplikaci Matlab Mobile lze uvažovat jako o prostředníkovi, který zprostředkovává uplatnění vytvořených matlabovských funkcí na snímky z mobilního telefonu bez nutnosti je přenášet do PC (samotné propojení aplikace s instancí Matlabu na PC však je jednou z možností realizace, i když není v této práci rozebírána).

### 4.2.1 Matlab Mobile

Hlavním vývojovým nástrojem je programové prostředí Matlab. Mezi hlavní přednosti ve vztahu k této práci patří silné nástroje pro zpracování obrazu a provázanost s dosavadní výukou. Popis samotného Matlabu samozřejmě není předmětem této práce, je ovšem dobré se

zmínit o mobilní aplikaci Matlab Mobile a několika jejích specifických vlastnostech, které výrazně ovlivnily řešení zadaného problému.

Matlab Mobile je volně dostupná mobilní aplikace pro zařízení na platformách Android a iOS. Aplikace umožňuje spustit na mobilním zařízení některé části Matlabu, zejména Command Window a prohlížení grafů a obrazů. Pokročilejší funkce a Editor nejsou přítomny. Samotná aplikace výpočty a úlohy neprovádí, využívá výpočetní výkon vzdálených zdrojů – aplikace se přes internet připojuje buď k MathWorks Cloud nebo k plné verzi Matlabu na běžném PC.

Při spojení s cloudem pak aplikace pracuje s výpočetními zdroji MathWorks a se soubory nahranými v Cloud Storage. Pokud má uživatel zřízen účet u MathWorks, je mu poskytnut úložný prostor 500 MB. Vzhledem k tomu, že jeden soubor ve formátových třídách RAW má velikost až několik desítek MB, je nutno s využitím prostoru zacházet obezřetně, při testování však byl limit dostačující.

Výhoda Matlab Mobile spojeného s cloudem spočívá jednoznačně v absenci nutnosti mít zapnutý vlastní počítač, avšak také v dostupnosti většiny toolboxů s nejrůznějšími funkcemi, které na běžném PC nemusí mít uživatel k dispozici. Zřetelným faktem je také vyšší výpočetní síla cloudu a s tím spojené rychlejší provádění komplikovanějších funkcí. Ovšem tato výhoda je často smazána rychlostí připojení.

Stěžejní nevýhodou, a zároveň výraznou komplikací pro tuto práci, je nemožnost nahrávat jakékoliv soubory do Cloud Storage přímo z mobilního zařízení. K tomu je nutné klasické PC s webovým prohlížečem. Tato možnost zásadně komplikuje postup při měření v rámci této práce, neboť neumožňuje nahrávat vyfocené snímky na cloud přímo. Toto negativum bylo kompenzováno za využití jiných cloudových služeb, přístupných z mobilních zařízení přes internetové připojení, zejména se jedná o Google Drive a Dropbox. Obě tyto služby lze při měření využít a lze mezi nimi libovolně volit.

Dalším negativem aplikace je absence zobrazení prostoru s proměnnými Workspace. Proměnné lze jen vypsát do Command Window pomocí příkazů, nelze je však zobrazit trvale. Toto sice opět komplikuje práci, nejedná se však o závažný nedostatek.

Tím je naopak omezení času, po který je aplikace ochotna vykonávat spuštěné příkazy. At je již uživatel připojen ke cloudu nebo ke svému PC, po 50 sekundách dojde v aplikaci k přerušení činnosti. V operačním systému Android je toto provázeno hláškou oznamující, že aplikace nepodporuje operace trávající déle než 50 s. V systému iOS dojde k odpojení uživatele od účtu s doprovodným chybovým hlášením a selhání spojení a nutnosti opakovat akce. Po opětovném připojení k účtu se však v některých případech zobrazují správné výsledky prováděné operace. Nebyla však prokázána žádná závislost vedoucí k úspěšným či

neúspěšným vykonáním úlohy. Někdy vedlo vymazání inkriminovaných proměnných před opětovným spuštěním funkce k jejímu úspěšnému vykonání (samozřejmě s odpojením v mezikroku), mohlo se však stále jednat o náhodu. Tato vlastnost systému nuceně vedla k takovým úpravám algoritmů, aby se výpočetní čas snížil pod tuto hranici.

Nutné je také zmínit časté výpadky ve spojení po spuštění různých funkcí. Při přepínání mezi aplikacemi pak někdy dochází k opakovanému připojování aplikace ke cloudu. Objevuje se také zamrzání při pokusu o spojení. Nejedná se sice o kritické problémy, výrazně to však obtěžuje při práci.

Celkově však lze konstatovat, že Matlab Mobile je nepochybně užitečným nástrojem, který umožňuje propojit schopnosti Matlabu při práci s obrazem s možnostmi cloudu a širokou dostupností mobilních telefonů. Tato vlastnost je pro předkládanou práci stěžejní.

#### **4.2.2 Vývoj vlastních analytických funkcí**

Pro analytickou část práce byl vyvinut soubor čtyř matlabovských funkcí. Jedná se o soubory `cloud_load.m`, `kalibrace.m`, `mereni.m` a `rotace_hrany.m`

Tyto dodané soubory je před započítím práce s analytickým systémem nutno vložit do úložiště Matlab Cloud Storage nebo do příslušné složky na PC (při propojení s PC místo cloudu). V Matlab Mobile se pak volají z Command Window stejným způsobem jako v klasickém Matlabu.

#### **4.2.3 Funkce `cloud_load.m`**

Jak už bylo řečeno v předchozí kapitole, jsou pro matlabovský cloud specifické dvě negativní vlastnosti: neumožňuje nahrávat souboru do úložiště přímo z mobilního telefonu a omezuje běh spuštěných funkcí na 50 s (v pozdější fázi vývoje se objevilo systémové varování bez uvedení času, povolená doba však zůstala přibližně stejná). Pro zmírnění těchto obtíží byla vytvořena malá funkce `cloud_load`. Jejím úkolem je přednačtení snímků z externích cloudových služeb a jejich uložení ve formě proměnné v souboru `.mat` do Matlab Cloud Storage. Další funkce již pak nemusejí stahovat snímky z externího úložiště, ale načítají si proměnné přímo z vlastního cloudu, kde jsou samy uloženy. Tím jednak ulehčuje práci uživateli, neboť je možné přenést z externího úložiště více fotografií najednou, a dále šetří ostatním funkcím výpočetní čas, protože stahování a načítání relativně velkých souborů (DNG) ukrajuje z povoleného časového limitu. Načtení proměnných ze stejné lokality je podstatně rychlejší.

Funkce obsahuje blok:

```

switch zdroj
    case 'dr' %dropbox
        url = strrep(url, 'dl=0', 'dl=1');
    case 'gd' %google drive
        url = strrep(url, 'file/d/', 'open?id=');
        url = strrep(url, 'open?', 'uc?export=download&');
        url = strrep(url, '/view?usp=drivesdk', '');
    otherwise %chyba
        error('Zadat správný zdroj')
end

```

který mění předloženou url adresu v závislosti na jejím zdroji. Externí úložiště poskytují odkazy pro sdílení souborů ve formě, která spouští náhled. Funkce nicméně potřebuje soubory stáhnout, proto předtím musí pozměnit obsah url adresy tak, aby došlo ke stažení souboru.

Vstupními argumenty jsou proměnná `url` s adresou/adresami snímků na externím úložišti, a `zdroj` odkud snímek pochází (`gd` - Google Drive; `db` - Dropbox). Výstupem jsou soubory `.mat` s obsahem matic načtených obrázků a metadata.

Následuje příklad: byly nahrány dva snímky na externí úložiště Google Drive, jejich adresy pro sdílení vloženy do proměnné `url`.

#### 4.2.4 Funkce inicializace.m

Funkce `inicializace` slouží ke zjištění hodnot jasů pixelů jamek naplněných jen destilovanou vodou. Toto slouží jednak pro přenos hodnot do měřicí funkce, která z nich dále počítá absorbance, a dále faktorů relativního útlumu, které umožní korigovat nehomogenitu osvětlení u měřících snímků se stejnými snímacími parametry.

Běh funkce začíná úpravou předložených url adres a načtením snímků nebo případně rovnou načtením, pokud jsou snímky uloženy již v Matlab Cloudu. Následuje výběr modrého kanálu (platí pro Bayerovské rozložení pixelů RG/GB) a normalizace rozmezí jasů na hodnoty 0 až 1. Dále je provedena binarizace obrazu a morfologická operace dilatace, rotace snímku pokud nejsou hrany destičky aspoň přibližně rovnoběžné s okrajem snímku a detekce kružnic pomocí Houghovy transformace. Zjištěné středy kružnic/jamek jsou následně korigovány vzhledem k různým úhlům vzhledu senzoru do jamek. Z vybraného okolí korigovaných středů jamek jsou následně hodnoty filtrovány mediánovým filtrem a průměrovány konvolucí s maskou za účelem potlačení šumu. Za každou jamku je pak mediánem vybrána jedna reprezentativní hodnota jasů. Matice těchto hodnot a matice korekčních faktorů relativního útlumu (viz kapitola Realizovaný vývoj) pak slouží jako vstup funkci `mereni`.

Vstupními argumenty jsou proměnná `url` s adresou snímku na externím úložišti (pokud využijeme místo toho Cloud Storage, vloží se místo ní hodnota 0), dále

`img_file_name` se jménem předuloženého souboru v Cloud Storage (pokud využijeme url přímo z externího úložiště, vložíme místo argumentu hodnotu 0) a zdroj, odkud snímky načíst (krom ‚gd‘ a ‚db‘ z předchozí funkce je možné hodnotou ‚cloud‘ určit za zdroj Matlab Cloud Storage). Výstupem jsou proměnné `transm_fault` obsahující matici faktorů relativního útlumu pro každou jamku na destičce a proměnná `well_empty` obsahující matici hodnot pixelů jamek bez vzorku.

#### 4.2.5 Funkce `mereni.m`

Jedná se o hlavní měřicí funkci. Jejím účelem na základě snímku a dat z funkce `inicializace` vypočítat absorbance v jednotlivých jamkách (někdy také udávána jednotka OD = Optical Density), vytvořit kalibrační křivku a z ní vypočítat koncentrace měřené látky v jednotlivých vzorcích.

Vstupní argumenty jsou:

`url`, `img_file_name` a `zdroj` - stejně jako u předchozí funkce  
`concentr` - vektor koncentrací standardů seřazený od maxima po minimum  
`transm_fault` - faktory relativního útlumu z funkce `inicializace`  
`well_empty` - hodnoty jasu z jamek s destilovanou vodou z funkce `inicializace`

Vstupní snímky lze vložit stejně jako u přechozí funkce. Následující kroky jsou také shodné s předchozí funkcí až po dokončení čtení hodnot jasu z jednotlivých jamek. Dále funkce započne s výpočtem koncentrací vzorků v jamkách souběžně dvěma způsoby. Oba vychází z klasického výpočtu absorbance z transmitance vycházejícího z Lambert-Beerova zákona:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

#### *Způsob A*

První možností je do výpočtu absorbance pro každou jamku dosadit za veličinu  $I_0$  hodnotu jasu v dané jamce z funkce `inicializace`, tedy hodnotu detekovaného jasu, když byla jamka naplněna jen destilovanou vodou.

```
well_OD_A = -log10( well_vals ./ well_empty )
```

## ***Způsob B***

Druhou možností je dosadit za  $I_0$  detekovanou jasovou hodnotu blanku. Protože však plocha destičky není osvětlena homogenně, jak už bylo zmíněno, nebyla by daná hodnota blanku přenositelná na všechny jamky. Proto je třeba nejprve na změřené hodnoty v jamkách aplikovat korekci pomocí faktorů relativního útlumu. Tím dojde k předpokládanému vyrušení vlivu nehomogenity podsvětlení na změřené hodnoty jasu v jamkách, včetně jamek s blankem. Hodnoty blanku jsou tedy nyní přenositelné na všechny jamky – jasovou hodnotu jamky s destilovanou vodou stačí zjistit jen z jedné pozice na destičce (respektive dvou, na destičce jsou vloženy dvě řady standardů za účelem průměrování).

```
well_vals_cleared = well_vals ./ transm_fault;  
well_OD_B = -log10( well_vals_cleared ./ mean(well_blank) )
```

Po získání hodnot absorbance z každé jamky oběma způsoby pak funkce pokračuje dalšími výpočty pro oba způsoby zároveň. Parametry koncentrace standardů a jejich změřených absorbancí jsou předány funkci `polyfit`. Ta se snaží pomocí metody nejmenších čtverců co nejlépe proložit zadané body polynomiální křivkou a vrací koeficienty její parametrické rovnice. Při nastaveném stupni polynomu 1 vypočítá koeficienty parametrické rovnice přímky (předpokládáme linearitu závislosti v měřeném rozsahu). Tímto je získán parametrický popis kalibrační křivky. Krom parametrického popisu funkce ještě stanovuje hodnotu  $R^2$  mezi změřenými hodnotami OD standardů a hodnotami vypočítanými s pomocí nově vzniklé kalibrační křivky. Oba zmíněné popisné parametry jsou zobrazeny jako doplněk v grafu závislosti absorbance vzorku na jeho koncentraci s proloženým trendem (kalibrační křivkou).

Následuje výpočet koncentrace z kalibračních křivek a nastavení jamek se zápornou koncentrací nebo absorbancí na koncentraci nulovou. Vypočítané koncentrace se zobrazí ve dvou mapách rozložení vzorků i s barevným podkladem.

### **4.2.6 Funkce `rotace_hrany.m`**

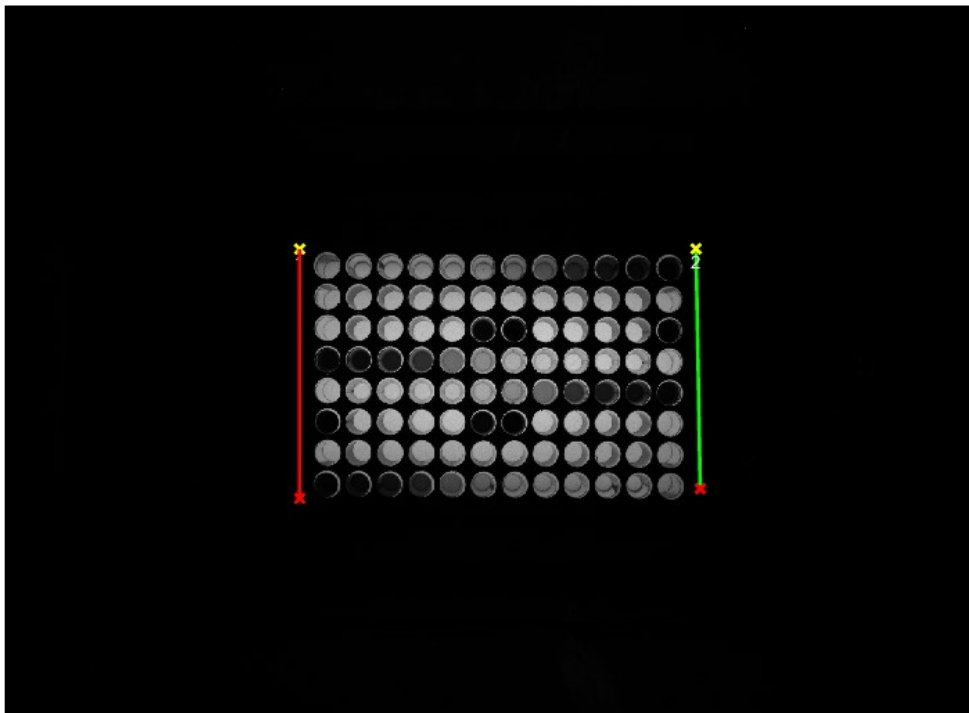
Funkce `rotace_hrany` je vnitřní funkce sloužící hlavním funkcím k rotaci snímků dle hran destičky v obraze. Pokud nejsou hrany destičky aspoň přibližně rovnoběžné s okraji snímků, je nutné snímek pootočit a oříznout. Toto je důležité pro detekci rozložení jamek, neboť ta postupuje po souřadnicích a mohla by chybně detekovat pořadí jamky a přiřadit jí chybnou pozici v matici.

Do funkce vstupuje binární obraz a původní obraz (modrý kanál, normalizovaný). Pracuje se však pouze s binárním obrazem. Nejdříve jsou aplikovány dvě morfologické operace dilatace s tvary disku a čtverce. Tím je z binárního obrazu jamek vytvořen solidní

blok ve tvaru obdélníku. Následuje aplikace Cannyho hranového detektoru a detekce přímek s pomocí Houghovy transformace. Detekce je prováděna v rozsahu  $-45^\circ$  až  $45^\circ$ . Je rozumné předpokládat, že uživatel nebude telefon nastavovat do nepřírodných pozic a úhlů, proto je tento rozsah více než dostačující.

```
[H, theta, rho] = hough(hrany1, 'Theta', -45:45);  
  
P = houghpeaks(H, 2, 'threshold', ceil(0.5*max(H(:))));  
  
Lines = houghlines(hrany1, theta, rho, P, 'MinLength', 400, ...  
...'FillGap', 300);
```

Při úspěšné detekci jsou nalezeny dvě kratší boční hrany (Obrázek 31). Z výsledků Houghovy transformace se vyextrahuje úhel  $\theta$  jedné z nich (obě přímky budou mít úhel stejný nebo velice podobný). Pokud je tento úhel větší než nastavený práh ( $2^\circ$ ), provede se rotace originálního i binárního obrazu o příslušný počet stupňů v příslušném směru a výsledek se zapíše do příslušných proměnných. Pokud prahový úhel překročen není, do výstupních proměnných se zapíše vstupní obrazy. Není nutné naprosto přesné zarovnání, postačí, aby žádný ze středů jamek z daného řádku nezasahoval mezi středy jamek z řádku nad nimi.



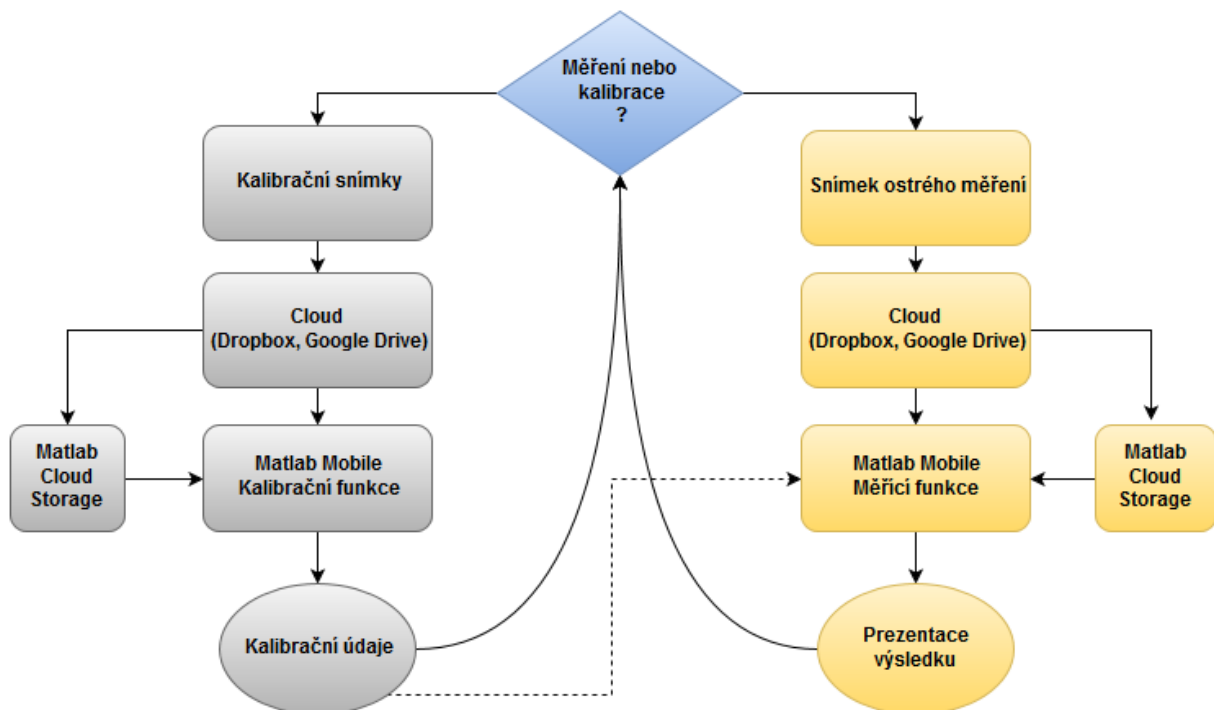
Obrázek 31: Hrany destičky detekované funkcí `rotace_hrany`

### 4.3 Postup práce s analytickým systémem

Postup práce s celým analytickým systémem lze pomyslně rozdělit do tří bloků:

- 1) Počáteční nastavení aparátu a mobilního telefonu
- 2) Snímek prázdné destičky a inicializační funkce
- 3) Snímek destičky se vzorky a měřicí funkce

Tato kapitola popisuje obecný postup, konkrétní kroky podniknuté při testování jsou popsány v kapitole 5 Testování. Zjednodušený diagram ukazuje Obrázek 32.



Obrázek 32: Zjednodušený diagram práce se systémem

Při přípravě na měření nasuneme kryt na bázi aparátu (případně vložíme mikrotitrační destičku, pokud se již chystáme měřit), sepne spínač na kabelu napájecího adaptéru a nachystáme telefon na vrchní stranu krytu, tak aby fotoaparát směřoval skrz průzor do snímacího prostoru a telefon ležel souběžně s vrchní stranou krytu. Při práci ve fotografické aplikaci je třeba věnovat pozornost třeba náhodnému otáčení rozhraní mobilní aplikace, aby nedošlo k obrácení snímku – rozložení standardů by neodpovídalo schématu. Pokud se tak stane, lze to snadno a rychle napravit otočením ještě v telefonu před odesláním na externí úložiště.

### 4.3.1 Počáteční nastavení aparátu a mobilního telefonu

Před započítáním samotných měření je nutno nastavit snímací přípravek a parametry fotografování na mobilním telefonu, oboje v závislosti na použitém mobilním telefonu, respektive jeho obrazovém snímači.

Po výběru difuzoru (doporučen a testován sandwichový difuzor z polyuretanu) je nutno nastavit svítivost LED odporovým trimrem, v kombinaci s hodnotou ISO na mobilním telefonu, tak aby u pixelů na senzoru (respektive u pixelů připadajících na vnitřky jamek) nedocházelo k překročení jejich dynamického rozsahu. Takovým pixelům je v obraze přiřazena hodnota zcela bílého odstínu (konkrétní hodnota před normalizací je závislá na bitové hloubce) a dochází ke ztrátě informace. Zde je nutno připomenout, že zvyšováním citlivosti snímače dochází také ke zvýšení šumu a dlouhým přetěžováním obvodu může dojít k jeho poškození (např. vytečení kondenzátoru). U telefonů umožňujících manipulovat s dalšími expozičními parametry lze k omezení překročení dynamického rozsahu s výhodou využít např. rychlost závěrky. Blesk je vhodné vypnout. Měření expozice scény je vhodné nastavit na spot-metering a měřící bod dát do tmavé oblasti snímku.

Pro zpracování fotografií je nutno fotit do třídy formátů RAW, nejlépe do DNG (realizace testována jen na rozšířený formát Adobe DNG verze 1.3 se snadno dostupnými nástroji, u jiných RAW formátů je otázka, zda by s nimi dokázal Matlab pracovat).

Tento krok se provádí pouze jednou pro daný mobilní telefon. Nastavené parametry (včetně těch, které nemají přímý vliv na schopnost měření (pokud jsou nastaveny) – např. vyvážení bílé) je pak třeba udržovat během celého měření. Také je nutno nahrát všechny potřebné funkce do Matlab Cloud Storage, případně je mít uložené v příslušné složce na PC.

### 4.3.2 Snímek prázdné destičky a inicializační funkce

Druhým krokem, pakliže jsou správně nastaveny snímací parametry a připraveny potřebné matlabovské funkce je vyhodnocení dat z prázdné destičky – jamky naplněné jen destilovanou vodou. Tento krok lze provádět také společně s předchozím bodem. Hodnoty jasu z prázdných jamek jsou nutné pro zjištění nehomogenity rozložení intenzity osvětlení po ploše destičky a pro výpočet koncentrace v následujícím bodě.

Po pořízení snímku je nutné odeslat soubor na vybrané cloudové úložiště (Google Drive nebo Dropbox). Zde je třeba si vygenerovat odkaz pro sdílení souboru a ten si uložit. Po aktivaci a přihlášení v aplikaci Matlab Mobile lze výhodně použít funkci `cloud_load`, která snímek/snímky ukládá přímo do proměnných ve formě `.mat` souboru do Matlab Cloud Storage. Dále použijeme funkci `inicializace`, jejímž výstupem jsou hodnoty korekčních

faktorů a jasové hodnoty jednotlivých jamek, uložené v daných proměnných, které budeme dále předávat měřicí funkci. Obě proměnné se zároveň uloží do souboru `inicializace_var.mat`, tak aby je bylo možné znovu načíst, pokud by došlo k jejich nechtěné změně.

Tento krok je stejně jako krok 1) potřeba provádět jen jednou pro dané uspořádání, před započítím samotného měření.

### 4.3.3 Snímek destičky se vzorky a měřicí funkce

Pakliže jsou správně nastaveny všechny parametry snímání na přípravku i na mobilním telefonu, máme k dispozici proměnné v Matlab Mobile z předchozího kroku, je možné přikročit k samotnému měření.

Na začátku je třeba naplnit jamky v mikrotitrační destičce dle daného schématu (Tabulka 1), koncentrace standardů klesá s řádkem, tedy v prvním řádku je koncentrace standardu nejvyšší, v sedmém řádku pak nejnižší.

**Tabulka 1: Schéma plnění jamek pro měření – prázdné jamky jsou volné pro vzorky**

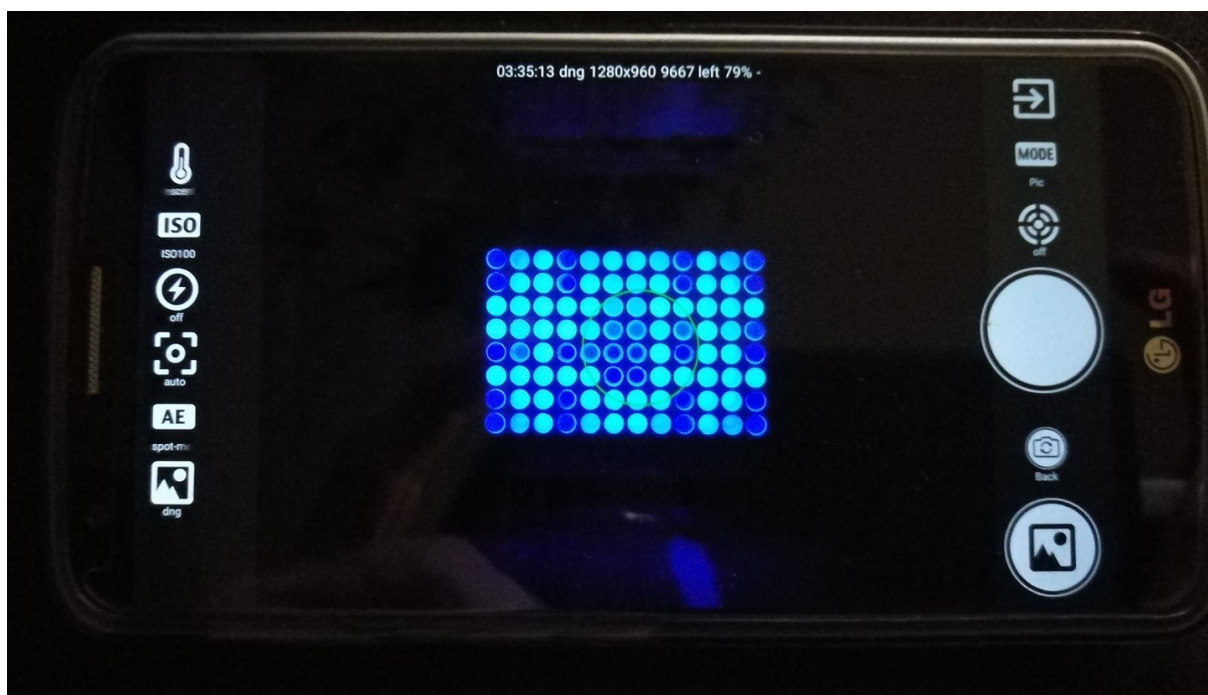
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						STD1	STD1					
B						STD2	STD2					
C						STD3	STD3					
D						STD4	STD4					
E						STD5	STD5					
F						STD6	STD6					
G						STD7	STD7					
H						Blank	Blank					

Toto schéma je defaultně nastavené uvnitř měřicí funkce, jeho změna vyžaduje zásah do kódu úpravou na PC, neboť samotný Matlab Mobile neumožňuje otevřít Editor, a tvořit schéma na malém displeji by bylo značně nepraktické.

Po přípravě vzorků následuje focení a odesílání snímku/snímků do úložiště stejně jako v předchozím bodě (opět je vhodné využít funkci `cloud_load`). Pro měření využijeme v Matlab Mobile funkci `mereni` s patřičnými argumenty, mezi které mimo jiné vkládáme také vektor koncentrací standardů (seřazený od maxima po minimum). Po dokončení činnosti

a zobrazení výstupů zkontrolujeme kalibraci a odečteme výsledky. V případě nesrovnalostí nebo nevhodných výsledků měření opakujeme.

Dodatkem je také vhodné apelovat na snahu a) držet stálou pozici mobilního telefonu mezi jednotlivými snímky b) fotit mikrotitrační destičku tak, aby její hrany byly rovnoběžné s okraji snímku. Jedná se spíše o doporučení, než nutnost, nicméně je vhodné nevytvářet zbytečný prostor pro chyby. Jak vypadá správně nastavený telefon, ukazuje Obrázek 33.



**Obrázek 33: Pohled na správně zacílený telefon. Hrany destičky jsou přibližně rovnoběžné s okraji displeje. Lze si povšimnout levého sloupce s nastavenými parametry snímání. Měření expozice scény se provede v tmavé oblasti.**

## 5 Testování

Testování probíhalo s odlišným rozložením vzorků na destičce a s mírně upravenými funkcemi, aby bylo možné zhodnotit vlastnosti systému.

### 5.1 Rozvržení snímání a mobilní telefon

Jak už bylo řečeno, je třeba, aby mobilní telefon disponoval možností exportovat fotografie ve formátu DNG, což zužuje výběr možných modelů. Zároveň je snímání modelově specifické, nelze tedy automaticky porovnávat snímky z rozdílných telefonů (samozřejmě není vyloučeno, že některé modely budou poskytovat stejné výsledky)

Pro tuto práci byl k dispozici telefon LG G2 (Obrázek 34) s operačním systémem Android ve verzi 5.0.2. Je vybaven 13MPix CMOS čipem Sony IMX135 Exmor RS, s clonovým číslem F2.4 a ohniskovou vzdáleností 4 mm (35 mm ekvivalent činí 29.5 mm). Pro snímání obrázku do formátu DNG byla použita aplikace FreeDCam ve verzi 3.3.138, která disponuje nezbytnými expozičními parametry, především: nastavení ISO, korekce expozice -2EV/+2EV, vyvážení bílé a měření expozice scény ve vybraném bodě.



Obrázek 34: Propagační snímek společnosti LG k modelu G2

Při volbě expozičních parametrů bylo snahou nastavit co nejnižší hodnotu ISO, aby se omezil šum v obraze. Při výběru polypropylenového difuzoru a adekvátním nastavení svítivosti LED bylo možno nastavit hodnotu ISO 100, tedy bez zesílení. Bod měření expozice byl nastaven do temné části snímku, mezi okraj a ROI, aby bylo měření opakovatelné – předpokládá se, že v temné části snímku, mimo destičku nedochází k významným změnám jasu. Vyvážení bílé nastaveno na ‚fluorescence‘. Pro měření bylo použito 1mm stínítko na horní stranu mikrotitrační destičky.

## 5.2 Zkoumaná látka a vzorky

Práce si v úvodu kladla za cíl měření hladiny kortizolu ve slinách. Protože však kompletní ELISA kit nebyl v době zpracování dostupný a jeho pořizovací cena je pro tuto práci příliš vysoká, byla jako náhrada pro testovací účely vybrána jiná látka s absorpčními vlastnostmi v dané části spektra. Jedná se o červený inkoust, který dobře absorbuje v oblasti spektra okolo 460-480 nm. (empiricky určeno, nebyla nalezena křivka závislosti absorpce na vlnové délce). Zaměření na kortizol odpovídá volba zdroje světla – modrá LED s nejvyšší intenzitou vyzařování na 470 nm. Teoreticky je však možné měřit celou řadu látek, které sdílí obdobné absorpční vlastnosti. Měření absorpčně odlišných látek je pak možné dosáhnout snadnou záměnou LED panelů za jinou barevnou variantu. Lze teoreticky uvažovat i nad IR nebo UV LED, je však nutné také zvažovat spektrální vlastnosti snímače použitého mobilního telefonu.

Pro testování metody byla vytvořena vzorková sada roztoků různého objemu červeného inkoustu v destilované vodě. Jednotlivé vzorky uvádí Tabulka 2. Uvedené hodnoty koncentrace jsou v jednotkách ml / 100 ml rozpouštědla – destilované vody.

**Tabulka 2: Koncentrace sady testovacích roztoků**

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Koncentrace [ml /100 ml]	1,5	1,25	1	0,75	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156	0,0078	0,0039

Standardy s nízkou koncentrací mají mezi sebou úmyslně malé rozestupy, aby bylo možné zjistit spodní hranici použitelného měřicího rozsahu. Naopak koncentrace vzorku A svým útlumem přibližuje jasové hodnoty skoro k nule. Zda na úrovni vzorku A leží horní hranice použitelného měřicího rozsahu, však není prakticky důležité, neboť horní rozsah koncentrace není prakticky nijak omezen – pokud koncentrace překročí horní mez detekčního rozsahu aparátu, lze vzorek zředit přidáním rozpouštědla a snížit tím jeho koncentraci. Pro získání validního výsledku pak stačí nově změřenou koncentraci vynásobit zředovacím faktorem.

Je důležité zdůraznit, že zde uvedené hodnoty vzorků nijak nesouvisí s rozsahem měřitelných hodnot kortizolového ELISA kitu, ani s jinými látkami. Pro každou teoretickou látku je nutno stanovit konkrétní koncentrační rozsah.

Testovací vzorky byly rozmístěny do mikrotitrační destičky podle následujícího schématu (Tabulka 3). Toto schéma je sestaveno za účelem testování a liší se od schématu pro obvyklé měření. Má za účel stanovit přesnost měření v závislosti na prostoru a koncentraci, a určit použitelný měřicí rozsah.

**Tabulka 3: Schéma rozložení vzorků pro testování**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0	0,0039	0,0078	0,0156	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,25
<b>B</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>C</b>	0	0	0	0	0	1.25	1.5	0	0	0	0	1.5
<b>D</b>	1,25	1	0,75	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156	0,0078	0,0039	0
<b>E</b>	0	0,0039	0,0078	0,0156	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,25
<b>F</b>	1.5	0	0	0	0	1.25	1.5	0	0	0	0	0
<b>G</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>H</b>	1,25	1	0,75	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156	0,0078	0,0039	0

Do každé označené jamky bylo pipetováno 300  $\mu$ l vzorku. Ostatní jamky byly ponechány prázdné. Od metody se očekává, že označí jamky se vzorkem správnou koncentrací a prázdné jamky správně identifikuje jako prázdné/bez zkoumaného vzorku (přiřadí jim nulovou koncentraci). Protože jsou všechny vzorky na destičce známé, je možné také určit relativní chybu vzhledem k měřicímu rozsahu.

### 5.3 Průběh testování

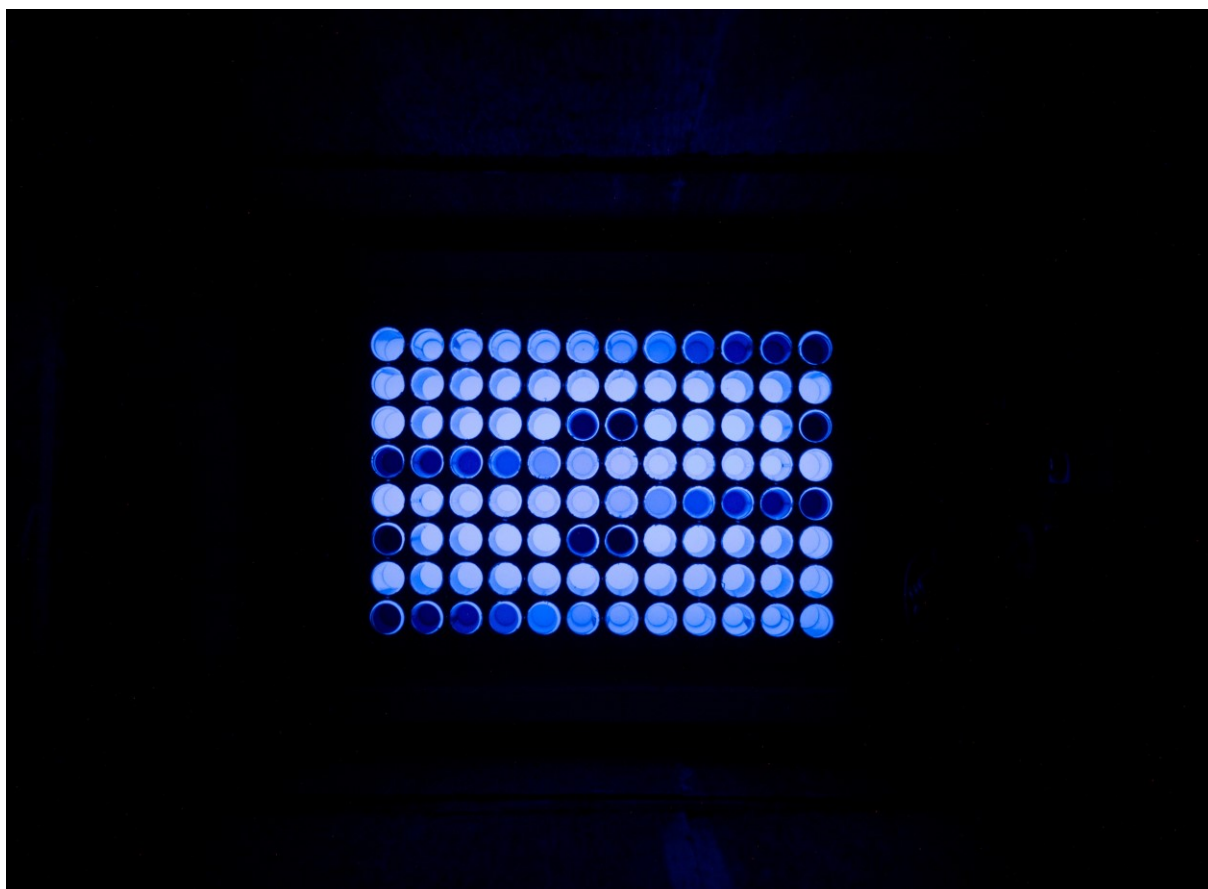
Do vodících lišt difuzoru byl nasunut polypropylenový sandwichový difuzor, a na mobilním telefonu nastaveny tyto parametry:

Rozlišení	4208 x 3082
ISO	100
Vyvážení bílé	Fluorescence
Měření expozice	Spot-metering
Formát souboru	DNG
Zaostřování	Automatické

Pro určení faktorů relativního útlumu a hodnot jasu v prázdných jamkách byly pořízeny tři snímky destičky se všemi jamkami naplněnými 300  $\mu$ l destilované vody a tři snímky destičky se vzorky vnesenými dle schématu. Tyto snímky byly odeslány do externího úložiště Google Drive. Dále byla spuštěna aplikace Matlab Mobile a url adresy pro sdílení souborů byly vloženy do proměnné `url`. Pomocí funkce `cloud_load` byly načtené snímky uloženy také do Matlab Cloud Storage jako matice v souborech pod jmény `cloud_imgX.mat`, kde X indikuje pořadí obrázku

Dále byla pro volána funkce inicializace pro každý snímek. Dle kontrolních obrázků byl zkontrolován správný průběh funkce.

Sady obou výstupních proměnných byly zprůměrovány a předány funkci `mereni` (s upraveným rozložením jamek pro tento test). Té byl také předán vektor koncentrací, seřazený od maxima po minimum. Po doběhnutí každého měření byl dle kontrolních obrázků zkontrolován správný průběh funkce. Výstupní matice se změřenými koncentracemi byla opět zprůměrována. Po dokončení měření bylo provedeno vyhodnocení, jak úspěšně se v kterých jamkách povedlo určit požadované koncentrace vzorku. Ukázku jednoho z testovaných snímků zobrazuje Obrázek 35.



Obrázek 35: Třetí testovaný snímek

## 5.4 Vyhodnocení kalibrační křivky

Každé měření (snímek) využívá pro výpočet koncentrací v jamkách svou vlastní kalibrační křivku, stanovenou z několika standardních vzorků a blanku. Vzniká zde nutnost vyhodnocení kvality stanovené kalibrační křivky

Koeficienty polynomu, kterým je kalibrační křivka popsána, sestavuje funkce *polyfit* s parametrem udávajícím stupeň polynomu 1. Funkce tedy vždy předložené body prokládá přímkou. Tímto je zajištěna linearita kalibrační křivky, je ovšem nutné vyhodnotit, do jaké míry odpovídá proložená přímka (trend) předloženým hodnotám. K tomu slouží hodnota  $R^2$ :

```
RA = corrcoef(OD_computed_A,well_stds_OD_A); R2A = RA(2)^2;  
RB = corrcoef(OD_computed_B,well_stds_OD_B); R2B = RB(2)^2;
```

Získat tuto hodnotu je možné z korelační matice sestavené funkcí `corrcoef`.

Čím je hodnota  $R^2$  blíže jedné, tím lépe kalibrační křivka vystihuje předložená data, respektive hodnota  $R^2$  určuje procento vyčerpané variability dat.

Jeden z výstupních grafů zobrazuje změřené hodnoty absorbance pro různé koncentrace, ze kterých výpočet kalibrační křivky vychází, dále přímkou znázorňující kalibrační křivku, a hodnotu parametru  $R^2$  spolu s parametrickou rovnicí přímky s hodnotami koeficientů vypočítanými funkcí `polyfit`.

## 5.5 Relativní chyba vzhledem k měřicímu rozsahu

Maximální chyba vzhledem k měřicímu rozsahu (také Třída přesnosti) je parametr, který udává maximální relativní chybu měření v celém stanoveném měřicím rozsahu. Shrnuje v sobě vliv různých chybových faktorů, které na měření při správném postupu a nastavení působí. Lze je stanovit dle rovnice

$$\delta = \frac{|\Delta_m|}{X_R} * 100 [\%]$$

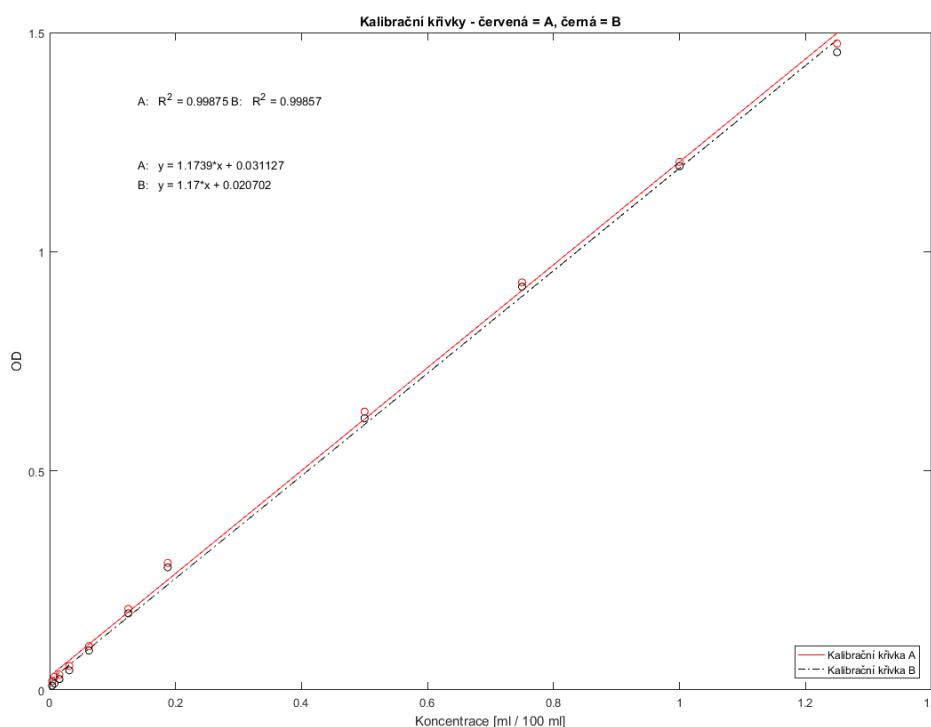
Kde  $\delta$  je stanovená třída přesnosti,  $\Delta_m$  je maximální absolutní chyba a  $X_R$  je hodnota měřicího rozsahu.

Maximální relativní chybu vzhledem k rozsahu je nutné stanovovat pro specifickou kombinaci: daný typ mobilního telefonu - kombinace hodnot snímacích parametrů nastavených na mobilním telefonu - nastavení svítivosti LED. Absolutní chyby jsou zjištěny jako rozdíly měřené hodnoty v každé jamce oproti očekávané hodnotě při naplnění vzorky se známými koncentracemi. Tyto hodnoty jsou dále vztaženy k rozsahu měřených koncentrací.

Ze získané matice hodnot se pak vybere maximum, které reprezentuje maximální relativní chybu z daného rozsahu. Zjištěná hodnota se ještě zkontroluje pomocí histogramu četnosti jednotlivých hodnot chyb, ze kterého je možno usoudit, zda je výsledná hodnota validní nebo je výsledkem chyby v měření (osamocený outlier).

## 5.6 Diskuze výsledků

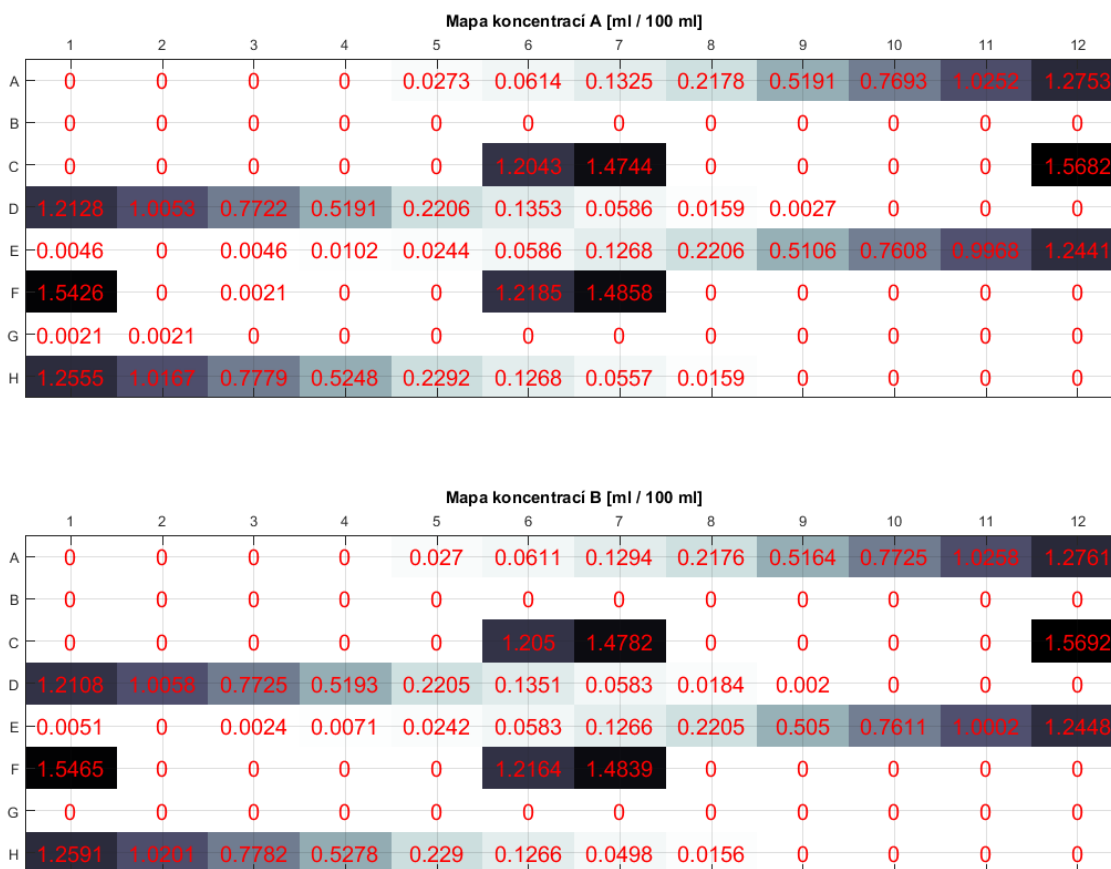
Prvním výstupem testu je kalibrační křivka, konkrétně Obrázek 36 ukazuje kalibrační snímky obou metod pro třetí snímek. Všechny kalibrační křivky z testu jsou si velmi podobné. Pohled na rozdíly mezi křivkou metody A a metody B již naznačuje, že obě metody dávají přibližně shodné výsledky. V grafu jsou vyobrazeny obě parametrické rovnice. Již vizuálně je zřejmé, že proložené křivky dobře reprezentují vstupní data. Uvedené parametry  $R^2$  toto potvrzují svými vysokými hodnotami, velmi blízkými jedné.



Obrázek 36: Kalibrační křivky třetího snímku

Obrázek 37 ukazuje vypočítané koncentrace v jednotlivých jamkách oběma metodami. Výsledky jsou kvůli zobrazení zaokrouhleny na 4 desetinná místa. Tento snímek potvrzuje, že obě metody výpočtu absorbance dávají skoro stejné výsledky. Dále lze říci, že obě metody určují koncentrace relativně přesně, konkrétní hodnocení poskytne výpočet maximální relativní chyby z rozsahu níže. U nízkých koncentrací dochází v některých případech k označení vzorku jako nulového, tady prázdná jamka nebo destilovaná voda bez přidání

zkoumané látky. Toto indikuje, že bude třeba omezit měřící rozsah zdola, neboť takto nízké koncentrace jsou již mimo rozlišovací schopnost metody.



**Obrázek 37: Mapa změřených koncentrací průměrovaného snímku**

Obrázek 37 také ukazuje, že došlo k několika falešným detekcím koncentrace v prázdných jamkách, pravděpodobně v důsledku šumu. Jak je vidět, šum má tedy na výsledné měření značný vliv a to přesto, že jsou jasové hodnoty pixelů z jamek dvojnásobně filtrovány, výsledné jasové hodnoty přípravných blanků byly průměrovány a hodnoty z měřících snímků byly také průměrovány.

Maximální chybu z rozsahu pro obě metody výpočtu ukazuje Tabulka 4.

**Tabulka 4: Maximální chyby z rozsahu při jednotlivých měřeních testovaného snímku**

	Maximální chyba z rozsahu metody A	Maximální chyba z rozsahu metody B
1. Měření	4,98 %	4,67 %
2. Měření	4,26 %	4,51 %
3. Měření	4,44 %	4,24 %
Průměrované měření	4,56 %	4,63 %

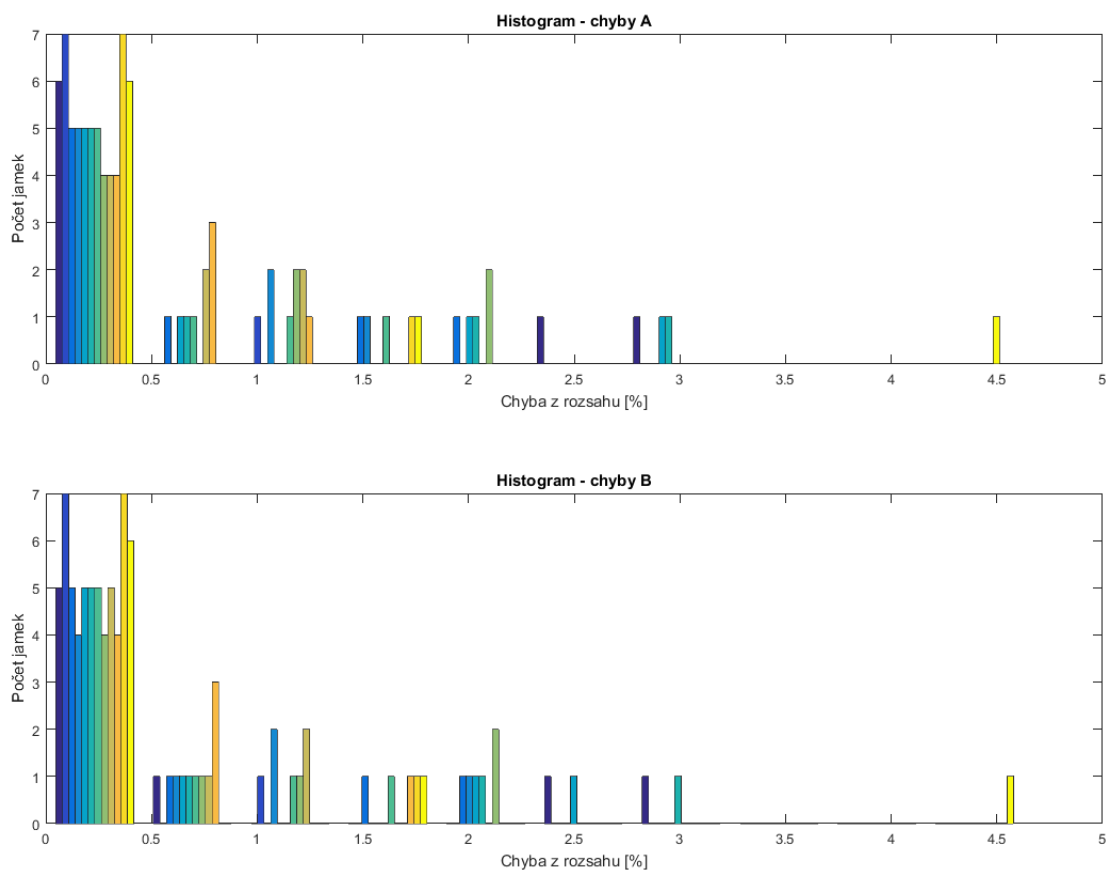
Z uvedené tabulky lze vyvodit, že maximální hodnota chyby nepřesáhla úroveň 5 %. Lze tedy říci, že za daných testovaných podmínek měří metoda v rozsahu koncentrací 0.0039 až 1.5 ml / 100 ml s 5% chybou. Zároveň obě metody stanovení dosahují v chybovosti srovnatelných výsledků. Jelikož byla měření provedena na třech snímcích stejné destičky, bez aktivního zásahu do jakéhokoliv parametru (zvýšená pozornost byla věnována zachování konstantní polohy telefonu) a v krátkém časovém intervalu, za jednotlivými odlišnostmi v měřených parametrech stojí pouze šum.

Tabulka 5 ukazuje rozložení chyby v prostoru. Hypoteticky by mohla chyba růst směrem k okrajovým jamkám, jelikož se ale vyšší i nižší chyby vyskytují jak u krajů, tak v prostředních jamkách, je závislost chyby na prostoru spíše nevýznamná. Taktéž by chyba mohla být ovlivněna koncentrací vzorku. Protože jsou ale vysoké i nízké koncentrace určovány s proměnlivou chybou, ani tento vliv nejspíš není příliš významný.

**Tabulka 5: Rozložení chyby z rozsahu v prostoru**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,00	0,26	0,52	1,04	0,26	0,07	0,50	2,03	1,28	1,29	1,68	1,69
<b>B</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>C</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,05	1,71	0,00	0,00	0,00	0,00	4,56
<b>D</b>	2,49	0,35	1,48	1,28	2,21	0,69	0,26	1,03	0,86	0,52	0,26	0,00
<b>E</b>	0,31	0,26	0,21	0,36	0,46	0,26	0,12	2,21	0,71	0,72	0,21	0,39
<b>F</b>	2,85	0,00	0,14	0,00	0,00	2,11	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G</b>	0,14	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>H</b>	1,12	1,86	1,66	2,79	0,12	0,45	1,03	1,04	0,52	0,26	0,00	0,00

Pohled na histogram Obrázek 38 však ukazuje jednu odlehlou hodnotu. Tato chyba patří jamce s nejvyšší koncentrací, je však ojedinělá a proto ji lze považovat za outliera. Za tohoto předpokladu pak lze uvažovat nad schopností systému měřit s hodnotou chyby z rozsahu 3 %.



**Obrázek 38: Histogram chyb z rozsahu u průměrovaného výsledku**

Na základě uvedených informací lze o testování vyvodit následující závěry: Zvolený rozsah koncentrací dobře reprezentuje teoretický rozsah, kterým by mohl systém disponovat. Prakticky se však nejnižší uvedené koncentrace projevily jako problém, neboť u nich již dochází k záměně s nulovým vzorkem. Je tedy nutné omezit měřicí rozsah zdola. Nejvyšší koncentrace byla detekovaná s max 3% chybou, mimo jednoho outliera s chybou vyšší. Vezmeme-li v úvahu, že z exponenciálního tvaru transmitance lze dovodit nízké rozlišení u vysokých koncentrací v důsledku toho, že i relativně velká změna koncentrace již vyvolá jen malou změnu odezvy na senzoru – a naopak tedy malé změny odezvy v důsledku šumu mohou imitovat změny větší koncentrace) se navrhuje snížit používaný měřicí rozsah pro dané snímací podmínky z 0,0039 – 1,5 ml / 100 ml s 5% (respektive 3%) chybou z rozsahu na užší interval 0,0156 – 1,25 ml / 100 ml. Horní omezení hranice není příliš důležité, neboť vyšší koncentrace lze vždy zředit, změřit a výsledek vynásobit číslem zředění.

Obecně pak lze konstatovat, že vzhledem k podmínkám, za jakých byl systém vytvořen, měří dostatečně přesně pro nenáročné aplikace a dokonce i v celém testovaném rozsahu dosahuje maximální chyby 5% a to i se započtením outliera.

## 6 Realizovaný vývoj v průběhu práce

Během práce na zadaném tématu proběhl značný vývoj v různých částech řešení, ovšem v souladu s původním teoretickým návrhem. Nejvýznamnější z nich jsou uvedeny dále v této kapitole.

Jak už bylo psáno dříve, z hlediska konstrukce zařízení byla většina částí místo 3D tisku zaměněna za balsaové dřevo. Toto bylo učiněno především z důvodu šetření tiskového času, také tím byla získána možnost částečných úprav zařízení i po kompletaci, neboť dřevo je stále možné ořezat, případně rychle dolepit nové kusy. Tištěny zůstaly pouze lištová konstrukce pro umístění osvětlovací jednotky, difuzoru, reflektoru a destičky. Velký kryt však tímto krokem ztratil na své robustnosti a je nutné s ním nakládat s opatrností.

V první verzi byl kryt aparátu nižší, výška činila 160 mm, protože se však objevily problémy s náhledem obrazového senzoru telefonu do krajních jamek, byl tento problém kompenzován zvýšením krytu na 300 mm.

Protože balsaové dřevo je nativně světle hnědé, zatímco tiskový plast PLA byl dodán v černé barvě a samotnou podstatou krytu je izolace vzorků od vnějšího světla, byl kryt nabarven černou sprejovou barvou pro minimalizaci vnitřních odrazů.

Při prvotním pořizování snímků v hotovém zařízení bylo zjištěno, že intenzita světla prošlého přes difuzor i destičku způsobuje přesycení snímače telefonu. Na snímcích se tak objevoval rozsáhlá čistě bílá oblast, ve které docházelo k úplné ztrátě informace. Protože změny v nastavení fotoaparátu nevedly k dostatečnému zlepšení, byl v obvodu vyměněn napěťový stabilizátor za variantu s nastavitelným výstupním napětím, kterým lze regulovat napájecí napětí LED a tedy jejich svítivost.

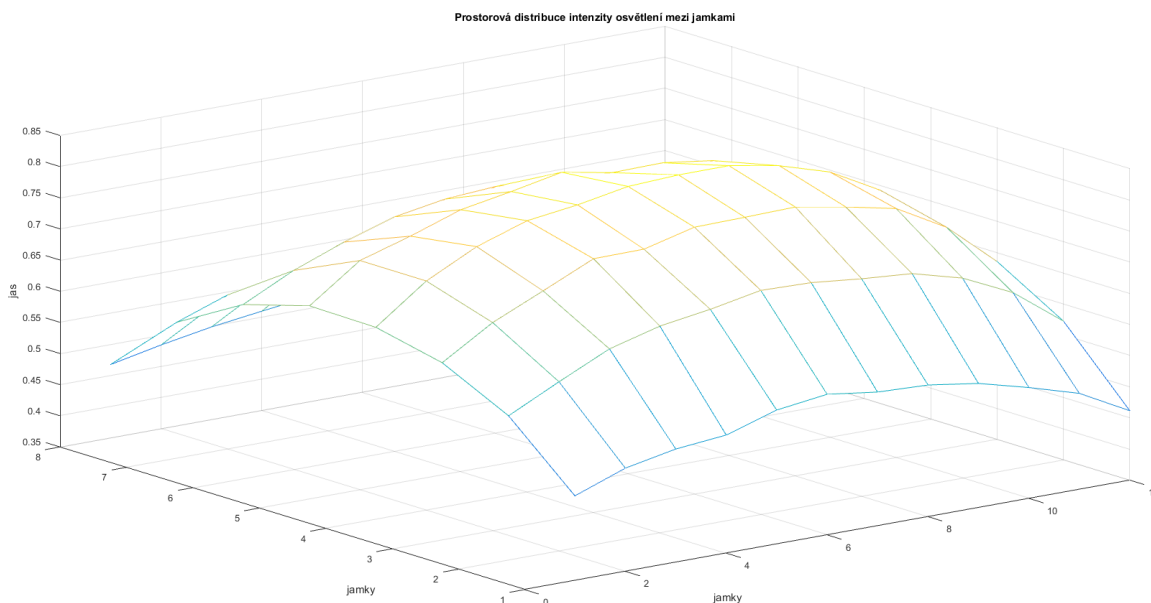
Stabilizátor napětí se průchodem proudu zahřívá, což by při delším sepnutí obvodu mohlo ovlivnit jeho funkčnost. Proto byl umístěn mimo DPS a opatřen pasivním chladičem, přimontovaným k bázi aparátu (Obrázek 39). Ten zajišťuje dostatečné chlazené a umožňuje nechat obvod sepnutý po dlouhou dobu bez výraznějšího zahřívání.



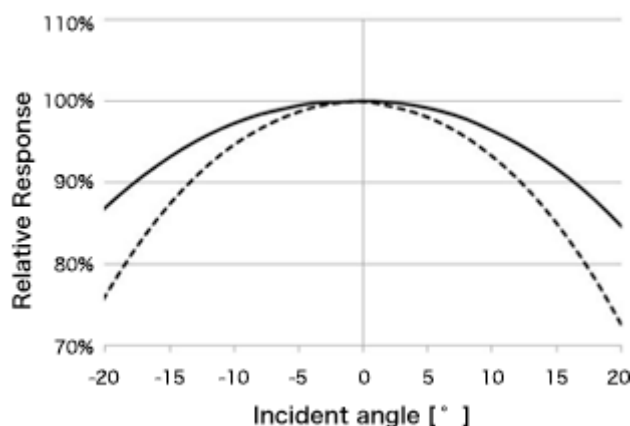
**Obrázek 39: Pohled na odkrytou bázi aparátu s oranžovým pasivním chladičem napěťového stabilizátoru. Po jeho levé straně se nachází odporový trimr. Výřez dole vede k DC konektoru osvětlovací jednotky.**

Značným vývojem prošla softwarová detekce jamek na destičce. Zpočátku byla zobrazována celá mikrotitrační destička, jelikož je však destička průhledná, vzniká mezi jamkami s nízkou absorpčností a okolím velmi nízký kontrast, což znesnadňuje detekci jamek. Nejdříve byla snahou řešit tento problém softwarově, řešení však nebyla dostatečně efektivní. Naopak elegantním se ukázalo být řešení pomocí kombinace jednoduššího software s 3D tištěným stínítkem. Stínítko zavedlo do snímku vysoký kontrast jak mezi světlými jamkami a tmavým okolím, tak i u tmavých jamek díky přítomnosti světlého prstence mezi objemem jamky a hranou otvoru ve stínítku. Tím se stala detekce jamek mnohem jednodušší a účinnější. Byly opuštěny postupy spoléhající na registraci snímků, které konzumovaly vyšší množství času, a místo nich byly zavedeny morfologické operace a detekce kružnic pomocí Houghovy transformace.

Při snímání do formátu DNG lze u rozložení jasových hodnot pixelů připadajících na obraz difuzoru (potažmo jamkové destičky) pozorovat zřetelnou nehomogenitu v závislosti na jejich pozici, kdy pixely přibližně ve středu difuzoru se jeví velmi světlé a směrem ke krajům se šíří útlum (Obrázek 40). Na tento jev mají pravděpodobně vliv různé faktory, jako směrová citlivost snímače (např. Obrázek 41), rozdíl v prostorovém rozložení LED panelů a difuzoru/mikrotitrační destičky nad nimi, počet diod přispívajících svým světleným tokem do konkrétní oblasti difuzoru klesající směrem ke krajům, nezanedbatelně malý rozdíl v dráze detekovaného světla skrz jamku v závislosti na úhlu náhledu, či nedokonalosti samotného difuzoru nebo destičky.



Obrázek 40: Prostorová distribuce detekovaného jasu mezi jamkami



Obrázek 41: Směrová citlivost obrazového senzoru - IMX135 čárkovaně

Konceptem faktorů relativního útlumu je myšlena hypotéza, že na takto prostorově rozložený útlum jasových hodnot pixelů v oblasti zájmu (ROI – difuzor/destička) lze nahlížet jako na výsledek aplikace jakési útlumové funkce. Hodnota jasu každého pixelu v ROI by v ideálním případě měla stejnou velikost (nyní neuvažujeme šum) jako je maximální hodnota jasu mezi všemi pixely v ROI – tedy nejnižší možný útlum. Na prostorově závislé tlumení (uvažujeme nyní pouze prostorovou závislost tlumení) lze nahlížet jako na násobení maximální hodnoty jasu u každého pixelu v ROI funkční hodnotou útlumové funkce v daném bodě/pixelu. Pokud položíme maximální zaznamenaný jas pixelu jako roven 1, pak hodnota každého dalšího tlumeného pixelu v ROI je zároveň hodnotou oné funkce prostorově závislého útlumu.

Nazvěme tedy tuto hodnotu faktorem relativního útlumu (proti nejvyšší zaznamenané hodnotě jasu v ROI, nikoliv proti maximální možné hodnotě). Pro účel této práce se stačí omezit na jasové hodnoty reprezentující hodnotu v dané jamce, není třeba se zabývat úplně každým pixelem v ROI. Z funkce `inicializace` tedy zjistíme jasové hodnoty reprezentující každou z jamek naplněných jen destilovanou vodou, tedy matici o 8x12 prvcích. Každou hodnotu této matice vydělíme jejím maximem – tím získáme relativní útlum každé jamky oproti jamce s maximálním jasnem (rozumně lze předpokládat, že ta bude někde uprostřed matice). Vznikne matice 8x12 obsahující ony faktory relativního útlumu uloženou v proměnné `transm_fault`:

```
transm_fault = well_vals ./ max(well_vals(:));
```

Protože předpokládáme, že tlumené hodnoty jasu v jamkách byly získány násobením hodnoty jamky s nejvyšším jasnem funkční hodnotou oné pomyslné tlumící funkce, kterou již známe, zbavíme se jejího vlivu dělením hodnoty z matice změřených jasů odpovídající hodnotou z matice faktorů relativního útlumu:

```
well_vals_cleared = well_vals ./ transm_fault;
```

Jednou z příčin výše popsaných problémů je právě rozdíl mezi rozměry mikrotitrační destičky a rozměry LED panelů (varianta panelů s korespondující velikostí nebyla nalezena). Softwarově je sice tento problém řešen vzhledem k měření koncentrace vzorku, nicméně útlum světla pod krajními jamkami stále snižuje použitelný rozsah koncentrací, které je možné měřit. Další odpovědí na tento problém bylo tedy sestavení reflektoru – pruhů zrcadlového metalického papíru rozmístěných po obvodu LED panelů. Ty směřují část jinak nevyužitého světla vzhůru k difuzoru, čímž zlepšují prostorovou distribuci intenzity osvětlení. Tím se zároveň snižuje vliv faktorů relativního útlumu (viz dále), což je žádané, neboť faktory sice částečně kompenzují problém prostorové distribuce intenzity světla, ale také zesilují jemné odchylky v hodnotách vzniklé negativním vlivem šumu či nepřesností v přípravě a měření.

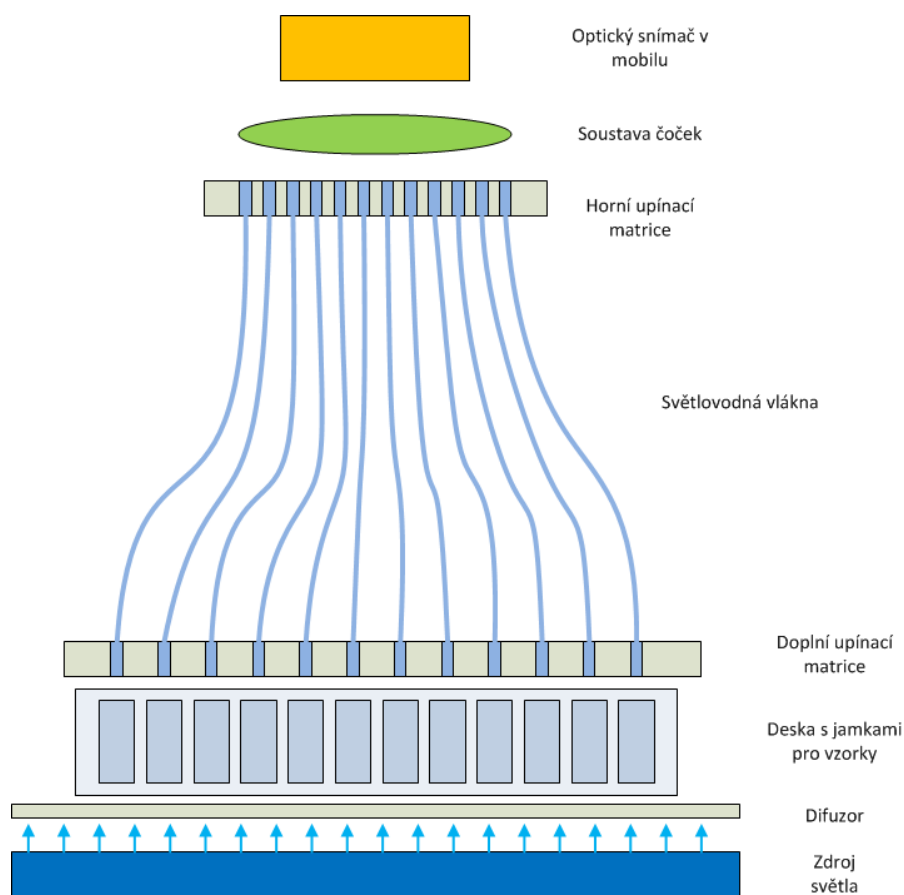
## 7 Teoretické varianty řešení a optimalizační návrhy

### 7.1 Využití optických vláken

V rámci teoretických návrhů byla vypracována varianta konstrukce obsahující světlovodná - optická vlákna. Účelem jejich použití je odstranění negativního vlivu náhledu do jamek pod různými úhly, omezení vlivu směrové citlivosti obrazového senzoru, spolehlivé vzorkování jamek z destičky a zvýšení kontrastu v zájmové části obrazu. Výhodu lze také spatřovat v širších možnostech tvarů konstrukce celého snímacího přípravku, který díky optickým vláknům nemusí být omezeny na vertikální řazení prvků *zdroj světla – vzorky – snímač*.

#### 7.1.1 Konstrukce

Konstrukci aparatury lze uvažovat například takto (Obrázek 42): Při dispozici 96 vláken s průměrem 1 až 3 mm je možné namodelovat a na 3D tiskárně vyrobit upínací destičku, vysokou několik milimetrů, s 96 otvory daného průměru. Tato destička je upevněna k tělu snímacího přípravku, ve výšce několik milimetrů nad svrchní plochou mikrotitračního jamkového pole. Otvory v upínací destičce jsou svými středy shodné se středy jamek pole. Jednotlivé spodní konce optických vláken jsou pak vsazeny do odpovídajících otvorů a fixovány (pokud konce vláken v otvorech nedrží samy, např. kvůli nepřesným rozměrům otvoru, lze uvažovat nad fixací například pomocí plastické modelovací hmoty – reverzibilní upevnění a neagresivita k plastovému povrchu vlákna). Následně jsou vlákna vedena (různými způsoby dle návrhu konstrukce přípravku) k druhé, horní upínací destičce. Tuto destičku lze opět modelovat a vyrobit 3D tiskem, opět obsahuje 96 otvorů daného průměru, ovšem tentokrát jsou otvory koncentrovány do menší plochy, v souladu s robustností tištěné destičky (tedy nakolik je možné otvory k sobě přiblížit, aniž by byla ohrožena strukturální integrita destičky). Optická vlákna jsou do této destičky fixována obdobně jako v případě spodní destičky. Lokalizace horní upínací destičky je v blízkosti fotoaparátu (v řádu jednotek cm), upevněna na těle snímacího přípravku. Při lokalizaci příliš blízko mobilnímu fotoaparátu, kdy by již na danou vzdálenost telefon nebyl schopen správně zaostřit, nebo při, vzhledem k vzdálenosti od fotoaparátu, příliš širokému rozložení celé matice vláken (široký průměr vláken, vyšší vzdálenost mezi upínacími jamkami apod.) lze uvažovat zařazení malých optických čoček mezi fotoaparát telefonu a horní upínací destičku, tak aby se fotoaparát jevila upínací destička menší a ve větší vzdálenosti. Při návrhu konstrukce celého přípravku a umístění horní upínací destičky je nutno brát v úvahu mezní úhel ohybu použitých optických vláken.



Obrázek 42: Jednoduché schéma návrhu obsahujícího optická vlákna

## 7.1.2 Software

Z obrazového hlediska je snímačem pořízena fotografie tmavé plochy s 96 světlejšími modrými kruhy, rozmístěnými v matici 12 x 8 prvků. Při zpracování obrazu lze tedy v zásadě postupovat obdobně jako v realizované variantě. Je zde však přítomna záruka správného vzhledu do všech jamek (tedy vždy shodně s vertikální osou jamky) a konstantních rozměrů modrých disků. Lze tedy ze zpracování vypustit kroky realizující čtecí rámec (část snímku, ze které jsou pro danou jamku načítány jasové hodnoty pixelů) a kompenzující nesprávný vzhled do jamky pomocí posunu čtecího rámce od vypočteného středu jamky.

## 7.1.3 Teoretické výhody

Mezi výhody uvedeného řešení lze jednoznačně zařadit záruku správného vzhledu do jamek a zjednodušení a zpřesnění procesu detekce zájmových oblastí v obraze (modré disky). Dále lze uvést širší možnosti pro konstrukci celého měřicího přípravku, kdy by bylo možné snížit celkovou výšku přípravku, nebo dokonce změnit polohu mobilního telefonu vzhledem k přípravku. Lze například uvažovat i převrácení řazení prvků v přípravku, kdy se bude zdroj

světla nacházet nad vzorkovým polem, optická vlákna pod ním a mobilní telefon na boční straně přípravku.

#### **7.1.4 Teoretické nevýhody**

Mezi nevýhody pak stejně jednoznačně patří vyšší cena optických vláken v daném množství. Ta byla mezi hlavními důvody, proč nebyla tato možnost realizována. Dále je nutno uvažovat konstrukční složitosti, které by tato varianta zaváděla. Při tisku předmětů 3D tiskárnou z materiálu PLA se projevuje teplotní roztažnost, kdy při ochlazení vyhotoveného tělesa po dokončení tisku dojde ke změně rozměrů tělesa. V případě destičky by tento jev negativně zasáhl především délkové rozměry, změnu výšky lze při malých rozměrech zanedbat. V průběhu práce na realizované variantě bylo u 12,8cm x 8,6cm destiček zaznamenáno zkrácení o několik desetin milimetru. Tento jev by mohl negativně ovlivnit především fixaci vláken v upínacích destičkách. Jak již bylo zmíněno, za tímto účelem by však mohlo být výhodně použít plastické modelovací hmoty nebo jiné fixační prostředky.

Další nevýhodou je pak přítomnost optických čoček, které dále zvyšují především cenu a také konstrukční složitost přípravku.

## **7.2 Matice samostatných LED**

Jako alternativu k dvěma LED panelům a reflektoru lze uvažovat 96 samostatných LED napájených na DPS v matici 12 x 8 s odpovídající lokalizací jamek a diod – 1 jamka/1 dioda. Zapojení lze uvažovat podobně jako u LED panelů – se společnou katodou/anodou. Výhodou by pravděpodobně bylo použití LED s difuzním pouzdrem, které by produkovaly již mírně rozptýlené světlo ještě před vstupem do hlavního difuzoru. Řešení by také bylo možné doplnit o již použitý reflektor, který by odrážel část jinak nevyužitého světla do difuzoru, potažmo do mikrotitrační destičky.

Výhodu takového řešení lze očekávat ve zmírnění nehomogenity intenzity osvětlení plochy difuzoru a tím i vyrovnanější hodnoty intenzity osvětlení v jednotlivých jamkách. Zároveň je však důvodné předpokládat, že by nedošlo k úplné homogenizaci, neboť střední část difuzoru by na rozdíl od částí okrajových byla stále vystavena nejen záření z LED přímo pod ní, ale také záření s nižší intenzitou pocházející z okolních LED. Ze softwarového hlediska by tato varianta neznamenalala žádnou změnu.

Nevýhodou pak je opakovaně zmiňovaný problém s vyšší cenou oproti LED panelům a také vyšší konstrukční složitost, neboť je zapotřebí připájet všech 96 LED samostatně. Zároveň je třeba dbát na dodržení rovnoměrné kvality pájení, aby nedocházelo mezi jednotlivými LED k rozdílné svítivosti. Při selhání jedné LED však toto řešení umožňuje rychlou náhradu jednoho elementu místo celého panelu.

### 7.3 Obecné úvahy

Jedním z cílů této práce je samozřejmě navrhnout další možnosti optimalizace metody. Zde navrhovaná řešení lze v zásadě rozdělit do dvou skupin. První vychází z omezených zdrojů, které byly při této práci k dispozici, kdy při jejich navýšení by nepochybně došlo ke kvalitativnímu posunu v některých oblastech. Tyto návrhy jsou v zásadě opačné k optimalizačním krokům, které byly reálně podniknuty především v zájmu snížení finančních nákladů, zatímco zde předkládané návrhy mají za cíl optimalizovat z hlediska kvality. Druhá skupina je pak založena na nových poznatcích, získaných během řešení této práce a směřujících k obecnému zlepšení metody.

V otázce difuzorů lze pravděpodobně dosáhnout další optimalizace. V této práci byly prozkoumány tři různé plastové difuzory a pro testování byl vybrán ten, který nejlépe odpovídal daným podmínkám. Jistě však existují i jiná možná řešení, která mohou být i vhodnější a přispět k lepším výsledkům. Testování různých jiných difuzorů by vyžadovalo další výzkum.

Dále lze navrhnout tisk celého zařízení na 3D tiskárně, nevýhodou by zde byl převážně potřebný tiskový čas. Balsové dřevo, prodávané navíc ve standardizovaných prknech, neposkytuje proti tiskovému materiálu PLA výraznější cenovou výhodu (pokud ovšem není nutné z nějakého důvodu tisk opakovat, především u větších částí). Naopak použitím tisku by bylo docíleno vyšší robustnosti celého zařízení než u ručně řezané lehké balsy. Nutné je ovšem brát v potaz teplotní roztažnost PLA.

Při konstrukci zařízení lze uvažovat i variantu, u které není celý velký kryt při výměně vzorků snímán, ale zůstává přiklopen a otevírají se jen boční dvířka na delší straně. Jedná se o jednu z možností, jak zamezit pohybu telefonu usazeného na vrchu velkého krytu při jeho výměně a tím opět omezit prostor pro vznik chyby.

Určitý návrh lze také vznést směrem k použití Matlabu a aplikace Matlab Mobile. Protože je aplikace v některých ohledech značně omezená, vyžaduje účet u MathWorks (pro práci s Matlab Cloud), blokuje operace trvající déle než 50 s a často dochází ke kritickým selháním, lze za určitých velmi specifických okolností doporučit přechod na jiné prostředí. Avšak vzhledem k tomu, že je Matlab velmi dobře vybaven pro prováděnou analýzu obrazu a přes uvedené nedostatky je pro tento úkol velmi silným nástrojem, lze toto doporučit opravdu pouze za omezených okolností – vysoké znalosti programování mobilních aplikací (Java, SDK), vlastní server apod.

Pokud se budeme ubírat směrem hypotetické profesionalizace nad rámec této práce, lze pak navrhnout vytvoření kombinace čtecí hlavy s několika upnutými optickými vlákny, kombinované s uchycením v systému pojezdů a krokových motorků, které budou schopny

přesouvat čtecí hlavu nad jednotlivé jamky, tak jako to činí komerční ELISA čtečky. Tento systém by mohl být ovládán prostřednictvím mikrokontroléru, spojeného s mobilním telefonem.

Zajímavá je teoretická úvaha, zda by bylo možné uplatnit podobné algoritmy, jako zde prezentované, pro fotografování vzorků a vyhodnocování měření bez potřeby komplexního zařízení, nýbrž na otevřeném světle bez podpory dalších systémů. Dle mínění autora lze důvodně předpokládat možnost takového přenosu metody s použitím části zde prezentovaných řešení, a to za předpokladu rozumného přístupu k osvětlení a okolnímu světlu, homogenního a reprodukovatelného podkladu, korekce na světelné podmínky a kalibrace na základě koncentračních standardů.

## 8 Závěr

První část předkládané práce zaměřené na využití mobilních telefonů k analýze tekutých vzorků se věnuje provedené literární rešerši, poskytující základní náhled na využití mobilních telefonů v biomedicině, novou a rozvíjející se větev oboru. Protože se jedná o relativně nové prostředí, většina zdrojů je tvořena především pracemi univerzitních týmů, publikovanými v odborných časopisech, a předkládajícími řešení inovativní nebo demonstrativní.

Druhá část práce se věnuje teoretickému návrhu analytického systému, který využije mobilní telefon pro měření hladiny kortizolu ve slinách. Navrhovanou metodou analýzy je ELISA na standardní 96jamkové mikrotitrační destičce. Systém je rozvržen do tří funkčních bloků: snímací přípravek, mobilní telefon a analytický software ve spojení s mobilní aplikací Matlab Mobile.

Jádrem práce i předkládaného textu je pak samotná realizace návrhu, a to jak z hlediska hardware a výroby snímacího přípravku, skládajícího se z uzavřené pouzdro, báze obsahující osvětlovací jednotku s napájením, difuzor, reflektor a samotnou mikrotitrační destičku, tak z hlediska vývoje software, který provádí obrazovou analýzu snímků nafocených mobilním telefonem ve formátu DNG prostřednictvím souboru vytvořených funkcí spuštěných pod aplikací Matlab Mobile.

Realizované řešení bylo otestováno pro vybrané podmínky pomocí vzorků červeného inkoustu, výsledky testů byly diskutovány a byly vyvozeny závěry ohledně kvality měření a použitelného měřícího rozsahu.

Závěrečnou část práce tvoří úvaha nad možnostmi optimalizace systému a také jeden konkrétní teoretický návrh řešení, které by zvýšilo úroveň zde představeného systému.

## Literatura

- [1] ARAFAT H., J. CANNING, et al. *Combined “dual” absorption and fluorescence smartphone spectrometers*. *Optics Letters* [online]. 2015, 40(8): 1737- [cit. 2015-12-31]. DOI: 10.1364/OL.40.001737. ISSN 0146-9592. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-40-8-1737>
- [2] BERG, B., B. CORTAZAR, et al. *Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*. *ACS Nano* [online]. 2015, 9(8): 7857-7866 [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.1021/acsnano.5b03203. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b03203>
- [3] COMINA, Germán, Anke SUSKA, Daniel FILIPPINI, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Autonomous Chemical Sensing Interface for Universal Cell Phone Readout* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1002/anie.201503727. ISBN 10.1002/anie.201503727. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201503727>
- [4] *Colorimetry*. *Encyclopædia Britannica* [online]. [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/colorimetry>
- [5] COSKUN, Ahmet F., Richie NAGI, Kayvon SADEGHI, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Albumin testing in urine using a smart-phone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc50785h. ISBN 10.1039/c3lc50785h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50785h>
- [6] *Ebola Virus Disease: Diagnosis*. Centers for Disease Control and Prevention [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/diagnosis/>
- [7] *ELISA plate reader*. Enzo Life Sciences [online]. [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/mobile-application/elisa-plate-reader/>
- [8] Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. Praha: 1. lékařská fakulta UK. 2009, [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [9] Francis, S.J., Walker, R.F., Riad-Fahmy, D., et al. Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations. *J of Pediatrics*, 1987, 129-33.
- [10] HOSSAIN, Arafat, John CANNING, et al. *Lab-in-a-Phone: Smartphone-Based Portable Fluorometer for pH Measurements of Environmental Water*. *IEEE Sensors Journal* [online]. 2015, [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1109/JSEN.2014.2361651. ISSN 1530-437x. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6916991>

- [11] *Imunoreakce se značenými protilátkami* [online]. Praha: Ústav imunologie, 2. LF UK [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: [http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf)
- [12] KARLEN, Walter. *Mobile point-of-care monitors and diagnostic device design*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2015, xvi, 169 s. Devices, circuits, and systems. ISBN 9781466589292.
- [13] LEDVINA, MIROSLAV. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 8024614162.
- [14] LEE, Seoho, Vlad ONCESCU, Matt MANCUSO, Saurabh MEHTA a David ERICKSON. *A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc51375k. ISBN 10.1039/C3LC51375K. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC51375K>
- [15] NAVRUZ, Isa, Ahmet F. COSKUN, et al. *Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array*. Lab on a Chip [online]. 2013,[cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1039/c3lc50589h. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50589h>
- [16] ONCESCU, Vlad, Matthew MANCUSO, David ERICKSON, Saurabh MEHTA a David ERICKSON. *Cholesterol testing on a smartphone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc51194d. ISBN 10.1039/C3LC51194D. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC51194D>
- [17] ONCESCU, Vlad, Dakota O'DELL, David ERICKSON, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva*[online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c3lc50431j. ISBN 10.1039/c3lc50431j. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50431j>
- [18] QINGSHAN WEI, HANGFEI QI, ET AL. *Fluorescent Imaging of Single Nanoparticles and Viruses on a Smart Phone*. ACS Nano [online]. 2013 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1021/nn4037706. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn4037706>
- [19] SHEN, Li, Joshua A. HAGEN, Ian PAPAUTSKY, Stephen PHILLIPS a Aydogan OZCAN. *Point-of-care colorimetric detection with a smartphone* [online]. [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1039/c2lc40741h. ISBN 10.1039/c2lc40741h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40741h>
- [20] Test ID: SALCT: Cortisol, Saliva. Mayo Clinic: Mayo Medical Laboratories [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/84225>

[21] VEJRAŽKA, Martin. *Optické metody používané v biochemii* [online]. Praha. ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE 1. LF UK, 2008 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <https://el.lf1.cuni.cz/p90c9dnejag/>

[22] Vining, R.F., McGinley, R.A., Maksvytis, J.J., Ho, K.Y. Salivary cortisol: A better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem*, 1983, 329-35.

[23] WANG, S., X. ZHAO, et al.. *Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care*. Lab on a Chip [online]. 2011, 11(20): 3411- [cit. 2015-12-27]. DOI: 10.1039/c1lc20479c. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1lc20479c>

## Seznam zkratk a symbolů

CCD	Charge-Coupled Device
CMOS	Complementary Metal–Oxide–Semiconductor
DPS	Deska Plošných Spojů
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FWHF	Full Width at Half Maximum
HSL/V	barevné prostory Hue, Saturation, Lightness / Value
I/O	Input/Output
LED	Light-Emitting Diode
OS	Operační Systém
RGB	barevný prostor Red,Green,Blue
ROI	Region Of Interest
SNR	Signal-to-Noise Ratio
URL	Uniform Resource Locator

## Seznam Příloh

Specifikace mikrotitrační destičky: ANSI\_SLAS\_1-2004\_FootprintDimensions1.pdf

Specifikace LED 8x8 matrix: KWM-50881XBB.pdf

3D model kryt: cell phone box 2 demonstrace.stl

3D model stínítko: stinitko\_horni\_1mm.stl

osvetlovaci\_jednotka\_v2-brd.svg

Skripty a funkce:     mereni.m

                  inicializace.m

                  cloud\_load.m

                  rotace\_hrany.m

                  testing.m – skript, jen pro PC

                  lab\_kal\_avg.mat – soubor s inicializačními proměnnými pro testing.m

3 inicializační snímky DNG (jen na CD kvůli omezené velikosti přílohy)

3 snímky z testování DNG (jen na CD kvůli omezené velikosti přílohy) pro skript testing.m

Ilustrační varianty snímků ve formátu JPEG