

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Doc. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

**Experimentální metody získávání, zpracování a analýzy
biologických signálů**

**Experimental Methods Biological Signals of Acquisition,
Processing, and Analysis**

Teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení
v oboru
Elektronika a sdělovací technika



Brno 2005

Klíčová slova

biologický experiment, elektrická aktivita orgánů, optické metody snímání dat, číslicové zpracování signálů, vlnková transformace

Keywords

biological experiment, electrical activity of organs, optical methods of data acquisition, digital signal processing, wavelet transform

Obsah

1 ÚVOD	5
1.1 Biologický experiment a získávání dat	5
1.2 Možnosti měření elektrické aktivity srdce	7
2 OPTICKÉ SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÝCH POTENCIÁLŮ	8
2.1 Princip optického snímání elektrického potenciálu	8
2.2 Optický snímací systém	9
2.3 Parametry optického snímacího systému	11
2.4 Elektro-optický snímací systém	11
3 ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA ZÁZNAMŮ	13
3.1 FILTRACE záznamů	13
3.2 Vlnková analýza elektrické aktivity srdce	14
ZÁVĚR	19
POUŽITÉ ZDROJE	20

Ivo Provazník se narodil v roce 1968 v Brně. Vysokoškolská studia absolvoval na Fakultě elektrotechniky a informatiky Vysokého učení technického v Brně v letech 1986-1991. Studium úspěšně zakončil v červnu 1991 a byl mu udělen titul inženýr.

Od roku 1993 je zaměstnán na Ústavu biomedicínského inženýrství FEKT VUT v Brně (do r. 2002 jako odborný asistent, od r. 2002 jako docent). Na ÚBMI v současné době zastává funkci zástupce vedoucího ústavu.

V letech 1991-1996 úspěšně absolvoval doktorské studium v oboru Elektronika a sdělovací technika s disertační prací na téma „Adaptive Systems in ECG Signal Processing“. V roce 2002 úspěšně obhájil na VUT v Brně habilitační práci na téma „Wavelet Analysis for Signal Detection - Applications to Experimental Cardiology Research“ a byl mu udělen titul docent v oboru Elektronika a sdělovací technika.

Ve své kariéře krátce působil na Imperial College, Londýn, Velká Británie, v rámci programu TEMPUS, a na University of Leicester, Leicester, Velká Británie, v rámci výzkumného projektu „High resolution methods for detection of electrophysiological changes in the heart“ programu NATO. V letech 1997-98 pracoval na Johns Hopkins University, Baltimore, USA, jako hostující výzkumník programu Fulbright Commission Scholarship. Doc. Provazník dále úspěšně absolvoval mezinárodní kurs "European Education in Medical Informatics, Statistics and Epidemiology" v programu TEMPUS-PHARE v r. 1995.

Vědecko-výzkumná činnost Doc. Provazníka je orientována na zpracování a analýzu biologických signálů a zpracování medicínských obrazů. Je autorem nebo spoluautorem 11 vědeckých článků, více než 60 konferenčních příspěvků a koeditorem čtyř konferenčních sborníků. Byl odpovědným řešitelem projektu EU 5th Framework a projektu NATO, dále čtyř grantových projektů GAČR, tří projektů FRVŠ a spolupracoval na dalších čtyřech projektech GAČR a FRVŠ.

Do pedagogické praxe se Doc. Provazník zapojil ihned po ukončení studia, zpočátku jako asistent ve cvičení a laboratorních cvičení předmětů z oblasti číslicového zpracování signálů, později se postupně zapojoval i do ostatních oblastí. V minulých letech vybudoval celkem pět předmětů na všech stupních studia. Dosud vedl 23 úspěšně obhájených diplomových prací, každým rokem vede alespoň jeden ročníkový projekt. Byl školitelem 7 doktorských studentů v oboru Biomedicínská elektronika a biokybernetika, jeden z nich již úspěšně obhájil disertační práci.

Doc. Provazník je členem Výboru České společnosti biomedicínského inženýrství a lékařské informatiky ČLS JEP, členem profesních organizací IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE Computer Society a EURASIP.

Doc. Provazník obdržel v r. 2002 Cenu rektora VUT v Brně, v r. 1995 Cenu ministra školství TALENT '94 za přínos vědecko-technickému rozvoji v České republice a v témže roce cenu First Price in Young Scientists Competition na mezinárodní konferenci IMEKO TK-13 Symposium.

1 ÚVOD

Nedílnou součástí moderního biomedicínského výzkumu je v současné době experimentální získávání dat pro účely analýzy a modelování fyziologických i patologických dějů probíhajících v živém organismu. V základním výzkumu tak lze získat zásadní informace umožňující studovat elektrickou, mechanickou i chemickou aktivitu jednotlivých orgánů od makroskopické úrovně až na úroveň jednotlivých buněk.

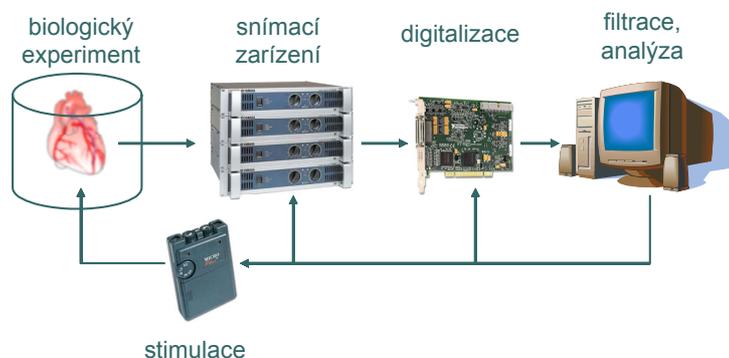
Snímání v biologickém experimentu dnes představuje rozsáhlou disciplínu, zahrnující na biomedicínské straně makromolekulární biologii, biochemii, biofyziku, obecnou fyziologii a další lékařské vědy, například kardiologii. Technická (inženýrská) stránka problematiky řeší především otázky senzorů, zesílení snímaných analogových veličin, jejich přesnou digitalizaci a zpracování a analýzu počítačem.

1.1 BIOLOGICKÝ EXPERIMENT A ZÍSKÁVÁNÍ DAT

Řetězec experimentu v biomedicínských vědách zahrnuje 4 základní kroky. Prvním z nich je provedení biologického experimentu. Za přesně definovaných podmínek je vymezena doba, po kterou je možné získávat informace o chování zkoumaného subjektu. V druhé fázi je provedeno snímání sestavou senzorů a zesilovačů. Snímané veličiny jsou obvykle převedeny na elektrické napětí. Snímání je kritickou částí celého systému; je totiž nutné extrahovat informaci z obvykle velmi zarušeného prostředí. Ve třetím kroku je provedena digitalizace – převedení elektrických signálů do posloupnosti čísel pro pozdější zpracování dat počítačem. Poslední krok spočívá v aplikaci metod číslicového zpracování a analýzy signálů počítačem.

V biologickém experimentu je často zavedena zpětná vazba umožňující kvalitativně vyšším způsobem experiment řídit. Obecně se jedná o stimulaci, t.j. ovlivňování zkoumaného orgánu obvykle sérií elektrických, světelných či mechanických impulsů.

Schematický obrázek procesu získávání dat v biologickém experimentu je uveden na Obr. 1.



Obr. 1 Proces získávání dat v biologickém experimentu.

1.1.1 Biologický experiment

Vlastní biologický experiment je nejdůležitější, ale také nejméně stabilní, součástí celého řetězce získávání dat. Obsahuje totiž objekt zkoumání, který je však živým organismem, resp. orgánem. Ten má zcela přirozeně deterministicky chaotické chování, které je dobře viditelné i v jeho elektrických (mechanických, chemických, atd.) projevech. Nesnáze při snímání a zejména při pozdější analýze těchto projevů přináší rovněž množství „parazitních“ vlivů, jako je např. aktivita jiných orgánů (svalová aktivita, apod.) nebo vliv okolí (elektromagnetické rušení, apod.).

Biologických experimentů je celá řada a lze je dělit podle živočišného druhu zkoumaného subjektu, podle orgánu, prostředí, ve kterém je prováděno snímání, a podle dalších kritérií. Jako příklad lze uvést Langendorffův experiment na izolovaném zvířecím srdci

Langendorffův experiment

Tato technika pro studium zcela izolovaného zvířecího srdce byla zavedena Oscarem Langendorffem v roce 1895 [7]. Metoda je široce využívána a byla v minulosti několikrát modifikována (např. [3]). Je vhodná pro srdce homeotermických zvířat. Její princip je prostý: izolované srdce je perfundováno okysličeným roztokem obsahujícím všechny nutné substráty (např. glukózu, některé aminokyseliny, atd) a ionty. Perfúze je prováděna kanylou zasunutou do dostatečně dlouhé vzestupné části aorty. Hydrostatický tlak roztoku uzavírá aortální chlopně (retrográdním tokem roztoku), a perfuzát je proto veden do koronárního systému, koronárního sinu a přes otevřenou pravou síň opouští srdce. Srdeční dutiny zůstávají v podstatě prázdné během celého experimentu.

Experiment má dvě základní verze: perfúze za konstantního perfúzního tlaku a perfúze za konstantního koronárního toku. Později byla popsána další verze – perfúze izolovaného srdce podle Neelyho, kdy všechny velké cévy jsou kanylovány a srdce tak pumpuje roztok přes všechny své dutiny. Takový způsob je však velice náročný a není často používán.

Obecně je Langendorffův experiment prováděn v několika krocích: zvíře je uvedeno do hluboké anestezie, uměle ventilováno a jeho hrudník je otevřen. Srdce je vyjmuto a dostatečně dlouhým koncem aorty. Aorta je kanylována, srdce je připevněno k Langendorffově aparátu a ponořeno do termostaticky vyhřívané lázně (37°C) s vyživovacím roztokem. Preparát je potom perfundován stejným roztokem. Nejčastěji je používán Krebsův-Henseleitův roztok následujícího složení (v mM): NaCl 118, NaHCO₃ 24, KCl 4.2, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, glukóza 5.5, Taurin 10 a CaCl₂ 1.2. Roztok je provzdušňován plynou směsí 95% O₂ a 5% CO₂.

1.1.2 Snímací zařízení

Snímací zařízení je systémem senzorů a zesilovačů, případně převodníků veličin a filtrů. Téměř výhradně pracují v analogovém režimu. Konkrétní sestavení snímacího zařízení závisí na charakteru projevů, které budou sledovány.

Příkladem je snímání elektrických projevů aktivity izolovaného srdce (viz výše). S úspěchem lze použít sady diskových Ag-AgCl elektrod umístěných uvnitř lázně s roztokem, ve které je ponořeno srdce. Elektrické signály v úrovni řádu milivoltů jsou vedeny svody do obvykle vícekanalového bipolárního zesilovače s frekvenční charakteristikou zahrnující pásmo alespoň 0-500 Hz. Po zhruba 1000x zesílení jsou signály vedeny do dalšího bloku systému.

Při návrhu snímacího zařízení je nutné uvažovat řadu fyzikálních jevů, které mohou negativně ovlivnit celý biologický experiment a následně kvalitu získaných dat. Samozřejmostí je netoxičita a chemická inaktivita elektrod, které jsou v přímém styku s perfuzátem nebo jinak se sledovaným subjektem. Problémem může být nežádaná změna elektrických parametrů přechodu elektroda-perfuzát nebo elektroda-povrch subjektu v čase. Jiným problémem může být vznik pohybových artefaktů při mechanické aktivitě sledovaného subjektu. Měnit se tak může např. vzdálenost elektrod a tím i velikost snímaných signálů.

Pokud za snímacím zařízením následuje digitalizace, bývá nezbytnou součástí tzv. anti-aliasingový filtr zabráňující vzniku nežádoucích překryvů ve frekvenčním spektru signálu.

1.1.3 Digitalizace

Digitalizace je nezbytnou součástí celého řetězce zpracování informací získaných ze subjektu. Umožňuje převést informaci do číselného kódu pro následnou analýzu algoritmu číslicového zpracování signálů. Parametry digitalizace jsou určeny zejména vlastnostmi snímaného signálu a dále nároky aplikace (tzn. požadovanými parametry extrahované informace).

Hlavními určujícími vlastnostmi signálu je jeho frekvenční rozsah a dynamika. Z toho vyplývají vzorkovací frekvence a bitová hloubka (potažmo kvantovací krok) digitizéru. Dále je samozřejmě nutné zvážit počet simultánně snímaných signálů a míru simultánnosti jejich

digitalizace. Obvykle není na závadu mírný časový posun digitalizace v jednotlivých kanálech v řádu tisícín či setin vzorkovacího intervalu.

Jako příklad lze uvést digitalizaci signálu elektrické aktivity srdce. Literatura uvádí frekvenční rozsah signálu pro klinické hodnocení 0-100 Hz, obvykle používaná vzorkovací frekvence je 250 nebo 500 Hz a bitová hloubka 8 nebo 12 bitů. Ve výzkumu se pak používá i vyšších vzorkovacích frekvencí, např. 1000 a 2000 Hz pro výzkum některých rychlých dějů v signálu a dále převodníky s dynamikou 16 bitů pro výzkum některých dějů projevujících se velmi malými změnami ve velikosti signálu.

Důležitou otázkou je také výběr vhodné časové a teplotní stability převodníku a jeho přesnosti. To může hrát roli při dlouhodobých experimentech v řádu hodin a při různých teplotních podmínkách.

1.1.4 Filtrace a analýza

Filtrace a analýza v sobě zahrnují množství použitelných algoritmů číslicového zpracování a analýzy signálů. Jejich použití závisí zejména na uživateli, který určuje charakter požadovaných informací a sledovaných parametrů včetně jejich časového určení.

Jaké příklad lze uvést potlačení elektrické aktivity svalů v elektrokardiografických záznamech pomocí kumulace, adaptivní filtrace pro potlačení síťového rušení, detekci jednorázových jevů v signálech, apod.

1.2 MOŽNOSTI MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ AKTIVITY SRDCE

Elektrickou aktivitu srdečního svalu lze měřit mnoha způsoby na různých úrovních. Jednotlivé úrovně vyplývají zejména z rozměrů částí srdce a také z použitých technických principů.

Snímání může probíhat na úrovni buněčné, tkáňové, celého srdce, celého organismu. U člověka pak jsou pak odpovídající rozměry řádově zhruba tyto: buňka 100 μm , tkáň 10 mm, celý orgán 10 cm, organismus 1 m. U všech typů úrovně lze snímání provést z prostoru uvnitř i vně daného segmentu, například z intracelulárního i extracelulárního prostoru.

Na buněčné úrovni se obvykle používají mikroelektrody, sestávající z tenké skleněné trubičky vyplněné vodivým roztokem a vloženým stříbrným vodičem připojeným k zesilovači. Trubička je pod mikroskopem podtlakově přisáta k povrchu izolované buňky a po protržení membrány propojena s intracelulárním prostorem. Signál v podobě proudů na úrovni pA je snímán oproti extracelulárnímu prostoru propojeného s uzemněním. S určitým omezením lze totéž provést na neizolované buňce na povrchu celého orgánu. Jinou možností snímání elektrických projevů jediné buňky je použití záznam změny optických vlastností buněčné membrány v závislosti na okamžitém elektrickém potenciálu v oblasti (viz kapitola 2).

Na tkáňové úrovni je měření prováděno např. na papilárním svalu v podobě úzkého pruhu tkáně pružně uchyceného na obou koncích a umístěného v lázni. Elektrická aktivita tkáně je snímána buď celkově plošnými elektrodami nebo obdobně jako v předcházejícím případě.

Při snímání na úrovni celého orgánu, ať už izolovaného nebo in situ, je možné používat dalších snímacích technik. Kromě diskových elektrod se používají jehlové, sukční, miniaturní multielektrody, dokonce i mikroelektrody. Výhodou je možnost uskutečnit mapování elektrické aktivity orgánu po celém jeho povrchu, částečně i uvnitř. Tak lze zjistit, jakým způsobem se šíří elektrické vzruchy jeho tkání. Kromě toho lze užít i optických metod buď s pevnou optikou nebo s možností mapování využitím flexibilní optiky (viz kapitola 2.2).

Ve výše uvedených případech lze samozřejmě využít stimulace. Zejména na úrovni izolovaných buněk a částí tkání je to nezbytné, neboť tyto části celého orgánu neobsahují centra automacie a nejsou schopny repetitivního chování – opakovaných svalových stahů. V případě úrovně celého orgánu lze automacie jednoduše docílit udržením fyziologických podmínek, v případě celého organismu pak včetně kompletního řízení parametrů srdeční aktivity nervovým systémem.

2 OPTICKÉ SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÝCH POTENCIÁLŮ

Optické snímání elektrické aktivity srdce je jedním z posledních příspěvků v oblasti základního kardiologického výzkumu, kde je nutnost pořizovat experimentální data. Možnost záznamu dynamických změn v transmembránovém potenciálu excitabilních buněk optickou cestou byl poprvé navržen Lawrence B. Cohenem v roce 1968 [2]. Cohen a jeho spolupracovníci objevili napětově závislé změny intrinsických optických parametrů ve velkých axonech olihní. Trvalo téměř desetiletí, než byly zaznamenány první akční potenciály z velkých axonů a srdcí savců s pomocí napětově citlivých barviv [11]. První kardiologické aplikace optické metody snímání elektrické aktivity se týkaly lokalizace srdeční aktivity v embryonálních preparátech v roce 1981 [6]. V 80. letech minulého století bylo optické snímání a mapování elektrické aktivity živých orgánů omezeno na několik málo výzkumných laboratoří ve světě, koncem 90. let se začala metoda pomalu rozšiřovat.

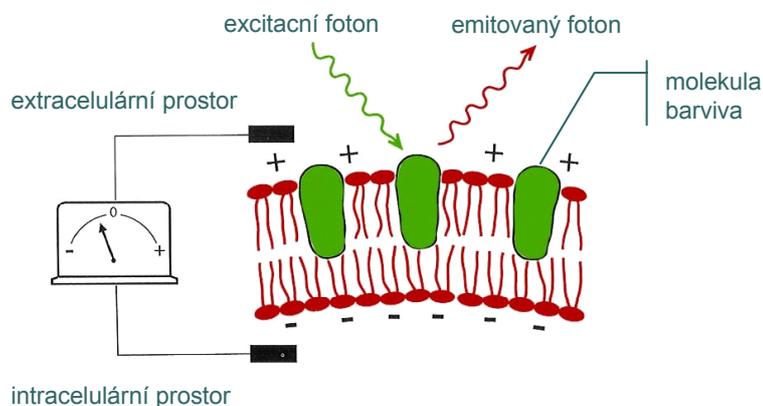
2.1 PRINCIP OPTICKÉHO SNÍMÁNÍ ELEKTRICKÉHO POTENCIÁLU

Optické snímání elektrické aktivity živých buněk (orgánů) je založen na využití fluorescenčního jevu v napětově citlivých barvivech. Obecným mechanismem fluorescence je absorpce fotonů jisté energie fluorescenční sloučeninou, která je tak excitována ze základní energetické hladiny na nestabilní vyšší hladinu. Při přechodu sloučeniny zpět do základního stavu jsou emitovány fotony. Jejich energie je nižší než energie excitačních fotonů, z čehož vyplývá i vyšší vlnová délka emitovaného světla.

Napětově závislá (citlivá) fluorescence může být konsekvencí několika možných mechanismů, které jsou spojeny s intra- a extracelulárními změnami (přesuny) v závislosti na napětovém gradientu. Cohen zavedl jednoduché dělení napětově citlivých barviv do dvou skupin: rychlá a pomalá barviva, podle jejich reakčního času a předpokládaného molekulárního mechanismu napětově citlivosti. V elektrofyziologii srdce jsou použitelná pouze tzv. rychlá barviva, která jsou schopna reakčních časů na úrovni mikrosekund.

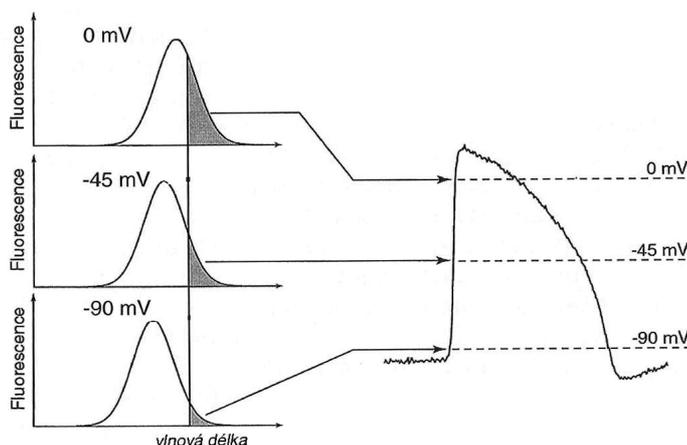
Přesný mechanismus napětově závislosti spektroskopických vlastností rychlých napětově citlivých barviv není zcela znám. Jednou z uznávaných teorií je, že spektrální posuv ve vlastnostech chromoforů je možný za splnění dvou podmínek: 1. fotonová excitace molekuly chromoforu ze základního stavu do excitovaného je doprovázen významnou změnou elektrického náboje, 2. vektor změny intramolekulárního náboje je orientován paralelně ke gradientu elektrického pole. Jestliže bude změna náboje v molekule barviva orientována kolmo k membráně srdeční buňky, fluorescence barviva bude závislá na transmembránovém potenciálu.

Na Obr. 2 je uveden princip převodu elektrických potenciálů buňky na změnu optických parametrů použitého napětově citlivého barviva.



Obr. 2 Princip převodu elektrických potenciálů na změnu optických parametrů.

Celý princip závislosti optických parametrů použitého napětově citlivého barviva na rozdílu elektrických potenciálů buňky lze doplnit takto: při kladné změně potenciálu dochází k posunu emisního spektra barviva směrem k vyšším vlnovým délkám. Pokud je detekována intenzita emitovaného světla v oblasti od pevně zvolené vlnové délky výše, je výsledkem křivka odpovídající časovému záznamu transmembránového potenciálu v místě excitace barviva. Na Obr. 3 je dokumentován princip vzniku záznamu změny transmembránového potenciálu měřením intenzity emitovaného světla.



Obr. 3 Princip vzniku záznamu změny transmembránového potenciálu měřením intenzity emitovaného světla.

Otázka použití napětově citlivého barviva je dnes v podstatě jednoduchá. Existují barviva s vyhovujícími fluorescenčními vlastnostmi a s garantovanou netoxicitou. Taková barviva mohou být např. přidána do perfuzátu v Langendorffově experimentu. Po dostatečné době nutné pro navázání barviva na membrány srdečních buněk (do 20 minut u většiny zvířecích srdcí) a po vymytí zbytků barviva lze provést měření.

Popsaný princip optického snímání elektrické aktivity srdce může být využit v různých záznamových systémech. Jejich konfigurace závisí na parametrech a zvoleném postupu biologického experimentu a dalších okolnostech. Příkladem snímacího zařízení může být systém popsany níže.

2.2 OPTICKÝ SNÍMACÍ SYSTÉM

Následující optický snímací systém byl použit ve projektech zabývajících se základním výzkumem elektrofyzologie zvířecího srdce, zejména pak ve výzkumu ischemie myokardu a při studiu vlivu farmak na srdeční funkci. Popsaný systém lze považovat za typický vyjma vstupní flexibilní části, která je ve světovém měřítku zatím ne zcela objevenou [10].

Optický snímací systém sestává z flexibilního bifurkovaného optického kabelu FCR-71R200-2-ME (Avantes, Nizozemí) se sedmi optickými vlákny: šesti iluminačními vlákny rozmístěnými v kruhu a jedním detekčním vláknem umístěným v středu kabelu. Vlákna mají průměr 200 nm a jsou použitelné v rozsahu vlnových délek od 350 do 1100 nm. Celý svazek optických vláken je chráněn silikonovým vnitřním obalem a vnějším flexibilním chromovaným mosazným „hadem“. Vlákňová optika je použita proto, aby měl uživatel možnost „skenovat“ povrch preparát a získávat záznam akčních potenciálů z různých částí srdce. Současně preparát není mechanicky ovlivňován, kabel je jen přiložen k jeho povrchu. Tím je zároveň vyřešena otázka případné nutné fokusace svazku světla.

„Vstupní“ konec optického kabelu je připojen ke 150W halogenovému zdroji světla Intralux® DC1100 (Volpi AG, Švýcarsko). Zdroj světla je navržen speciálně pro aplikace využívající

světlovodiče a vyžadující vysokou stabilitu. Zdroj má extrémně stabilní intenzitu generovaného světla se zvlněním $<0.01\%$. Intenzita světla je řízena otáčením srpkovitého kotouče a také řízením napětí halogenové žárovky přes sériové rozhraní RS232 prostřednictvím připojeného počítače. Zdroj obsahuje vestavěný infračervený filtr pro potlačení nežádoucího ohřevu osvětlovaného preparátu. Výstupní světlo také prochází optickým filtrem v pásmu 506 ± 30 nm, které koresponduje s excitačním spektrem použitého napěťově citlivého barviva.

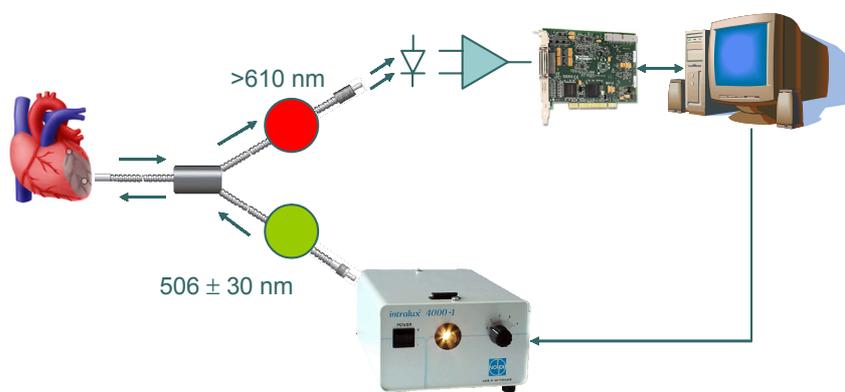
„Výstupní“ (detekční) konec optického kabelu je připojen k detektoru světla – křemíkové fotodiody 3WK16487 (Tesla Blatná, Česká republika), která snímá intenzitu dopadajícího světla. Většina dopadajícího světla by však obsahovala excitační světlo odražené od preparátu. Z toho důvodu je mezi kabel a fotodetektor zařazen filtr >610 nm. Příslušná vlnová délka byla zvolena mezi excitačním a emisním spektrem použitého barviva.

Výstupní signál z fotodiody je zesílen tak, aby byl získán signál úrovně vhodné pro následný digitizér. Elektrické obvody použitého zesilovače zahrnují analogový anti-aliasingový filtr typu dolní propust ($f_c=2$ kHz) a filtr typu horní propust ($f_c=0.05$ Hz) pro potlačení offsetu stejnosměrné složky.

Signál z fotodetektoru je digitalizován ve 12-bitovém A/D převodníku PCI-6111E (National Instruments, USA) se vzorkovací frekvencí 4 kHz. Digitalizovaný signál je v reálném čase ukládán na pevném disku počítače pomocí programu vytvořeného v softwarovém prostředí LabView (National Instruments, USA).

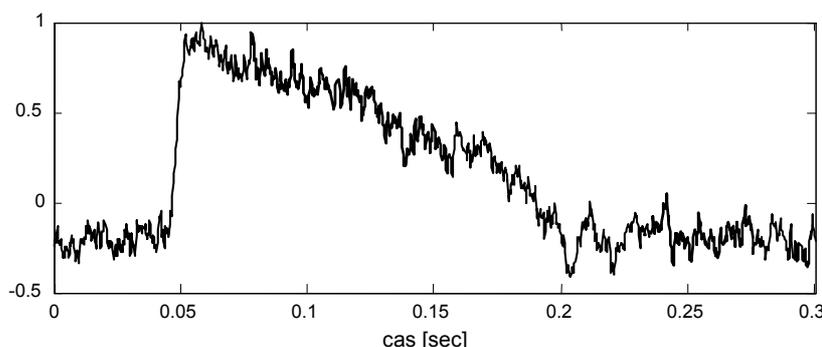
K optickému snímacímu zařízení lze doplnit, že musí být umístěno v temné komoře pro potlačení vlivu parazitního světla z jiných světelných zdrojů včetně slunce.

Schéma optického snímacího zařízení je znázorněno na Obr. 4. Schéma je doplněno o řízení výkonu excitačního světla počítačem, které je nutné také pro vypnutí světla v době nesnímání. Tak je redukováno „blednutí“ použitého fluorescenčního barviva vlivem světla.



Obr. 4 Schéma optického snímacího zařízení.

Na Obr. 5 je uveden příklad akčního potenciálu srdeční buňky z izolovaného srdce zaznamenaného optickým snímacím systémem z Obr. 4. Z obrázku je patrný charakteristický tvar akčního potenciálu, ale také silné rušení (viz kapitola 2.3). Vertikální osa neodpovídá žádné fyzikální veličině, neboť převod míry fluorescence na napětí nelze v tomto případě kvantifikovat.



Obr. 5 Příklad akčního potenciálu zaznamenaného optickým systémem.

2.3 PARAMETRY OPTICKÉHO SNÍMACÍHO SYSTÉMU

Optické snímání s sebou nese řadu vlivů, které mohou negativně působit na kvalitu zaznamenaných signálů. Většinu z nich lze potlačit použitím vhodných komponentů snímacího systému, volbou vhodné konfigurace experimentálního pracoviště, volbou vhodných parametrů některých nastavitelných prvků systému, apod. Další z negativních vlivů lze – alespoň částečně – potlačit při následném zpracování digitalizovaných záznamů.

Důležitou charakteristikou systému je volba intenzity excitačního světla. Při volbě se lze částečně řídit zkušenostmi popsány v literatuře, které jsou ovšem silně závislé na osvětlované ploše preparátu, živočišném druhu subjektu, druhu napěťově citlivého barviva, zvolené délce měření, apod. V zásadě je nutné volit nízkou intenzitu excitačního světla, aby nebyl preparát nevhodně zatěžován či ohříván a aby při delších experimentech nedocházelo k významné degradaci fluorescenčních vlastností použitého barviva (tzv. photobleaching). Na druhou stranu nízká intenzita světla znamená nízký poměr signál/šum na výstupu zesilovače, daný konstantním šumem zesilovače, fotodetektoru a rušivým okolním světlem.

Spektrum excitačního světla musí být zvoleno tak, aby byl maximalizována fluorescence. Je tedy nutné vyjít z excitačního spektra barviva. To ovšem závisí na živočišném druhu subjektu, druhu barviva a druhu rozpouštědla použitého při přípravě roztoku barviva. V tomto případě je nutné experimentální zjištění tvaru a polohy excitačního spektra barviva.

Má-li být experiment krátkodobě i dlouhodobě stabilní, je nutné zajistit zejména stabilitu světelného toku excitačního světla. Při snímání je totiž nutné uvážit, že změna elektrického potenciálu v srdeční buňce vyvolá max. 10% změnu v intenzitě emitovaného světla. K zajištění stability se používá především halogenových zdrojů světla se stejnosměrným stabilizovaným zdrojem napájení.

Ke správné funkci systému je také nutné určit vhodnou spektrální charakteristiku fotodetektoru. To vyplývá především z emisního spektra barviva, pro které platí stejné principy jako pro excitační spektrum barviva. I v tomto případě je nutné experimentální zjištění tvaru a polohy spektra.

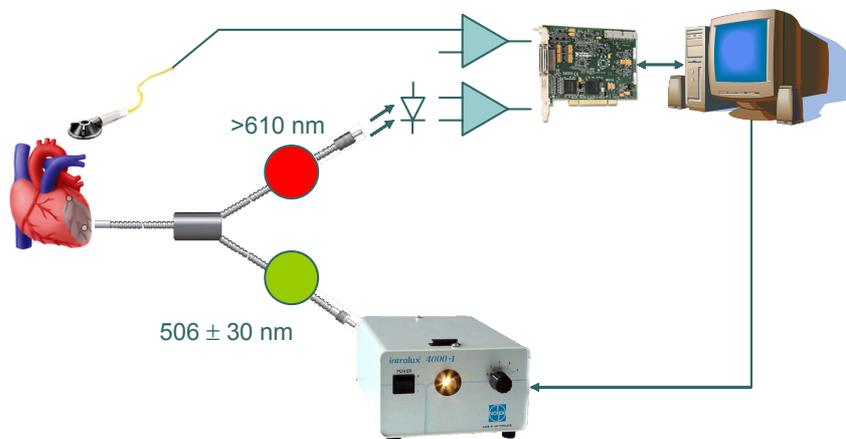
Pro dosažení stabilních výsledků je dobré zachovávat chemickou stabilitu experimentu (koncentraci napěťově citlivého barviva) ve fázi jeho aplikace i při snímání. Toho lze docílit různými technikami počínaje kontinuální injekcí do preparátu apod.

Mechanická stabilita experimentu (vzájemný pohyb objektu a snímače) je problémem, který významně zatěžuje experimentální data chybou. Je nasnadě, že vzájemný pohyb může způsobit nežádoucí optické efekty. Pak je systém nutné vhodně konfigurovat včetně uvážení mechanické restrikce zkoumaného preparátu nebo vyšší flexibility optické sondy.

2.4 ELEKTRO-OPTICKÝ SNÍMACÍ SYSTÉM

Optický snímací systém z Obr. 4 poměrně snadno doplnit o elektrickou část a získat tak elektrooptický snímací systém. To je výhodné v případě, že chceme např. zaznamenávat elektrickou aktivitu orgánu na úrovni buněk (akční potenciály) a současně na úrovni celého orgánu

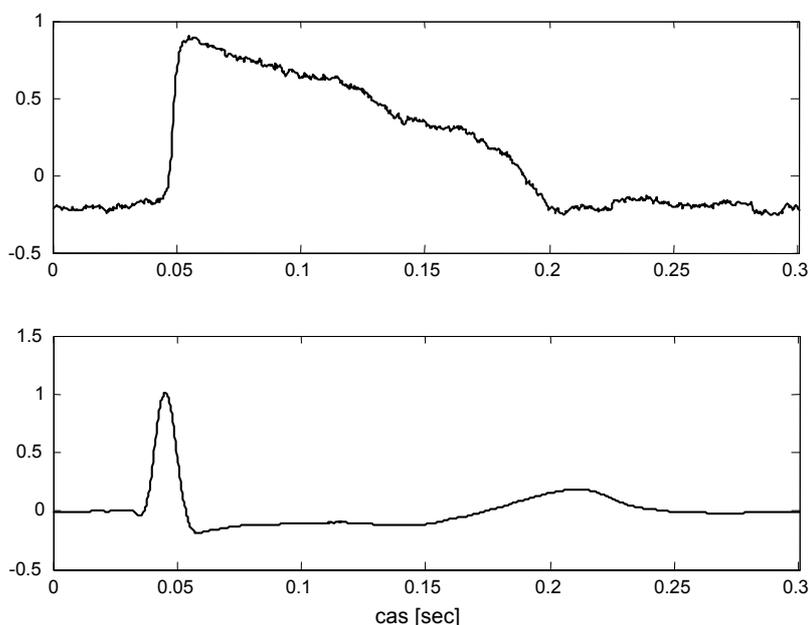
(elektrogramy). První z jmenovaných je zaznamenán již popsanou optickou metodou, druhý pak tradiční metodou využívající sady Ag-AgCl elektrod a elektrických kabelů. Na Obr. 6 je uvedeno schéma elektro-optického systému. Z obrázku je vidět, že elektrické signály z elektrod jsou zesíleny zesilovači a digitalizovány stejným A/D převodníkem, jako fluorescenční světlo převedené na elektrické napětí. Simultánní vícekanálový signál je pak zaznamenáván počítačem.



Obr. 6 Schéma elektro-optického snímacího systému

Popisovaný systém je výhodný zejména v modelování orgánů, kdy lze usuzovat na jejich chování v různých situacích ze dvou pohledů současně. Každý ze zaznamenávaných signálů pocházejících ze stejného zdroje nese jinou informaci, čehož lze využít.

Příklad akčního potenciálu a elektrogramu zaznamenaného současně elektro-optickým systémem je znázorněn na Obr. 7. Z obrázku je dobře vidět synchronnost obou záznamů. Pro upřesnění – záznam akčního potenciálu již byl upraven (viz kapitola 3.1).



Obr. 7 Příklad akčního potenciálu a elektrogramu zaznamenaného elektro-optickým systémem.

3 ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA ZÁZNAMŮ

Signály zaznamenávané optickou cestou a digitalizované je nutné následně předzpracovávat a později podle požadavků analyzovat. Předzpracování spočívá zejména v potlačení rušení a detekci význačných bodů v signálech, analýza je pak extrakcí požadovaných informací. Pro předzpracování i analýzu záznamů lze použít celou řadu metod objevených a popsanych v oboru číslicového zpracování a analýzy signálů. Jejich výběr je samozřejmě určen charakterem záznamů (biologickým i technickým) a cílem experimentální práce.

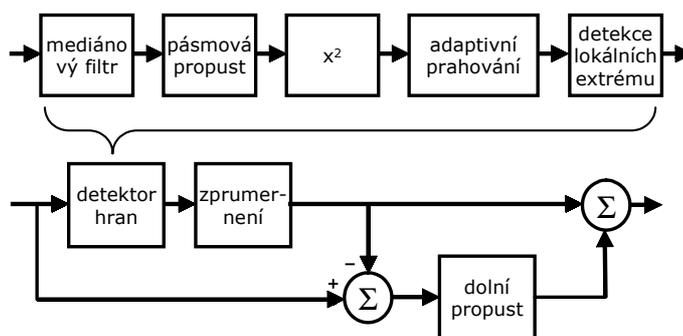
V následujícím textu jsou popsány vybrané metody založené na tradičních i moderních principech. Všechny uvedené metody obsahují nižší či vyšší míru originality, což je dané i charakterem originality snímacího zařízení. Metody byly realizovány během řešení několika výzkumných projektů a s úspěchem použity při zkoumání elektrofyzologie zvířecího srdce při ischemii myokardu a při aplikaci farmak.

3.1 FILTRACE ZÁZNAMŮ

Pro filtraci nasnímaných záznamů bylo využito charakteristického znaku funkce srdečního svalu – automacie. Záznamy srdeční aktivity jsou vysoce repetitivní signály – po většinou blíží se signálům periodickým. „Perioda“ ovšem stále kolísá, a to i za zcela fyziologických podmínek a u zdravého orgánu, navíc jednotlivé repetice nejsou zcela stejné. Drobné fluktuace jsou rovněž zcela fyziologické. Základní ideou je využít popsané charakteristiky pro zprůměrnění jednotlivých repetit a k získání „průměrného“ signálu. Při zprůměrnění samozřejmě dochází ke zvýraznění opakujících se (deterministických) komponent a naopak k potlačení stochastických částí signálů, zejména šumu. Z literatury je známo, že uvedené lze realizovat i s tzv. plovoucím oknem, kdy je kontinuálně získávaný zprůměrněný signál s průběžnou obnovou, resp. přizpůsobováním trendu.

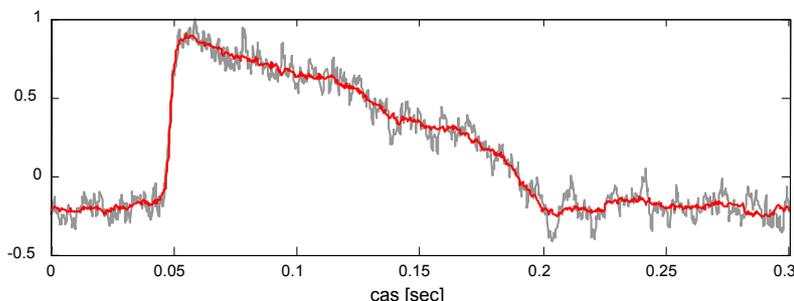
Uvedený postup je však možné významně zkvalitnit ve smyslu zachování náhlých změn a trendů v signálu. Během experimentu totiž může docházet k badatelsky zajímavým krátkodobým jevům, které by však v "průměru" zanikly a byly by odstraněny. Proto je hledáno reziduum subtrahací zprůměrněného signálu a originálu. Získané reziduum je následně filtrováno dolní propustí (s mezní frekvencí obvykle $f_c=10$ Hz) a výsledek je přičten zpět k zprůměrněnému signálu [5].

Kvalita zprůměrnění silně závisí na přesném spárování jednotlivých akčních potenciálů. To je ovlivněno spolehlivou a přesnou detekcí jejich významných bodů (zde náběžných hran při depolarizaci) v šumu. Toho lze dosáhnout například předřazenou mediánovou filtrací pro potlačení výrazného šumu impulzního charakteru. Po té je signál filtrován pásmovou propustí s propustným pásmem šířky 11 Hz centrováným na frekvenci 17 Hz, je vypočtena jeho druhá mocnina pro potlačení zbytkového šumu a vytvoření pozitivních extrémů, adaptivní prahování pro hrubou lokalizaci maxim a detekci lokálních maxim s refrakterní periodou. Struktura celého systému pro kumulaci s filtrací rezidua je uvedena na Obr. 8.



Obr. 8 Blokové schéma filtrace signálů metodou kumulace s filtrací rezidua.

Při filtraci akčních potenciálů snímaných optickým systémem lze dosáhnout použitím kumulace s filtrací rezidua úspěšného potlačení charakteristického šumu. Spektrum šumu významně zasahuje do spektra užitečného signálu, kumulace je tak alternativou lineární filtrace, která je zde nepoužitelná. Na Obr. 9 je ukázka filtrace akčních potenciálů popsanou modifikovanou kumulací. Zatímco šedá křivka představuje jeden vybraný originální akční potenciál, červená křivka jeho filtrovanou verzi.



Obr. 9 Blokové schéma filtrace signálů metodou kumulace s filtrací rezidua.

3.2 VLNKOVÁ ANALÝZA ELEKTRICKÉ AKTIVITY SRDCE

Moderní analýza projevů elektrické aktivity srdce spočívá v použití jednoduchých i sofistikovaných algoritmů číslicového zpracování signálů implementovaných v elektrokardiogramech. Použité algoritmy lze rozdělit do tří tříd podle toho, zda pracují v časové, frekvenční nebo časově-frekvenční oblasti. První dvě třídy algoritmů představují tradiční přístup, který se osvědčuje v mnoha klinicky ověřených aplikacích zpracování a analýzy signálů EKG [1]: potlačení kolísání isoelektrické linie, detekce komplexu QRS, stanovení počátku a konce komplexu QRS, analýza deviace segmentu ST, analýza variability srdečního rytmu, apod. Nové algoritmy pracující v časově-frekvenční oblasti spojují některé výhodné vlastnosti známé z klasických přístupů – především umožňují frekvenční analýzu signálů při zachování časové informace o analyzovaných jevech. Příkladem mohou být frekvenční změny objevující se během depolarizace srdečních komor v průběhu ischemie myokardu. Použití prosté časové analýzy zde přináší jen nekvalitní výsledky, dané především nízkou senzitivitou. To je často způsobeno malou amplitudou projevujících se změn. Frekvenční analýza sice zvýší senzitivitu, ale neumožní rozlišit, ve které fázi srdečního cyklu elektrofyziologické změny nastaly.

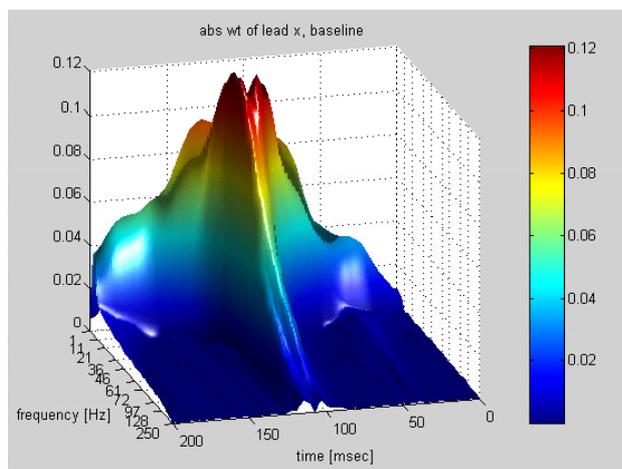
Pro časově-frekvenční analýzu bývá v současné době nejvíce využívána vlnková transformace [9]. Vlnková transformace je populární z důvodu snadné implementovatelnosti, její výstupy jsou dobře interpretovatelné podobně jako u klasické Fourierovy transformace používané ve frekvenční analýze [12]. Množství variant vlnkové transformace poskytuje při návrhu algoritmu velkou šíři výběru od redundantní podrobné analýzy až po rychlou analýzu s minimalizovaným množstvím výstupních dat. Zásadou pro výběr varianty vlnkové transformace je především typ aplikace (např. potlačení rušení, zvýraznění určitých časových nebo frekvenčních komponent užitečného signálu, detekce významných vln, detekce a sledování změn významných vln v čase, apod.). Dalšími určujícími prvky při návrhu jsou dostupné vybavení poskytující limitovaný výpočetní výkon.

Pro analýzu používaná spojitá vlnková transformace je definována vztahem

$$CWT(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{\infty} \psi^* \left(\frac{t-b}{a} \right) f(t) dt,$$

kde a je dilatace, b je časové posunutí, $f(t)$ je analyzovaná funkce a $\psi(t)$ je vlnková funkce. Výstupem vlnkové transformace je charakteristický obraz analyzovaného signálu, který vykazuje dobré frekvenční rozlišení (a nízké časové rozlišení) v nižších frekvenčních pásmech a nízké frekvenční rozlišení (a dobré časové rozlišení) ve vyšších frekvenčních pásmech.

Příklad výstupu vlnkové transformace elektrogramu je uveden na Obr. 10. Výstup je vždy dvourozměrným grafem, zde v třírozměrném zobrazení, kde v rovině je frekvenční a časová osa a v kolmá osa odpovídá "výkonu" v daném frekvenčním pásmu a čase.



Obr. 10 Příklad vlnkové transformace elektrogramu.

Pozn. Pojmy spektrum, frekvence, amplituda a fáze jsou v případě vlnkové transformace používány nepřesně. Uvedené pojmy jsou vyhrazeny fourierovské analýze, ze jsou použity z nedostatku vhodných pojmů.

3.2.1 Fázová vlnková analýza elektrogramů

Vlnková funkce $\psi(t)$ použitá ve vlnkové transformaci může být komplexní funkcí. Výstupem transformace je pak komplexní dvourozměrný obraz, obvykle znázorněný formou amplitudového a fázového časově-frekvenčního spektra. U signálů, kde se vyskytují pravidelné vlny s lokálními extrémy a inflexními body, lze použít analýzy fázového časově-frekvenčního spektra. Uvedené body křivek se totiž výrazně projeví ve fázi [8].

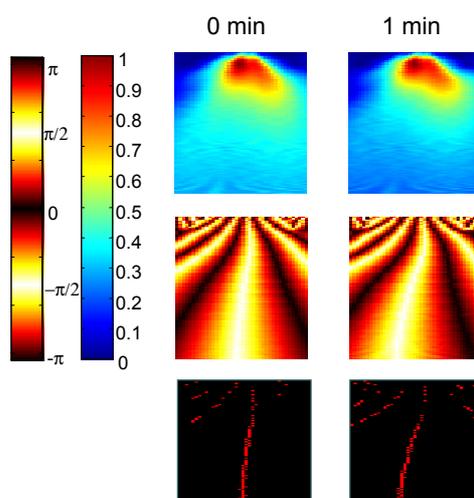
Pro snazší analýzu se často používá prahování fázového spektra. Výsledkem je méně komplexní obraz, ve kterém lze snáze detekovat případné změny či posuny. Prahované fázové spektrum je definováno jako

$$P_{th}(a, b) = \begin{cases} 1 & \text{pro } |\arg[CWT(a, b)]| \in \langle th - \varepsilon, th + \varepsilon \rangle \\ 0 & \text{pro } |\arg[CWT(a, b)]| \notin \langle th - \varepsilon, th + \varepsilon \rangle \end{cases}$$

kde $th = \{0, \pi\}$ nebo $\{-\pi/2, \pi/2\}$ je práh, ε je malé reálné číslo. Výsledkem prahování fázového spektra s prahy $\{-\pi/2, 0, \pi/2, \pi\}$ je binární obraz s vertikálně orientovanými čarami (křivkami) v místech fázových skoků. Ty pak odpovídají jednotlivým extrémům a inflexním bodům analyzované funkce.

Na Obr. 11 je uveden příklad analýzy dvou elektrogramů získaných z jednoho subjektu v rozmezí 1 minuty během uměle vyvolané ischemie myokardu. První dva obrázky představují amplitudové spektrum, další dva fázové spektrum a poslední dva prahované fázové spektrum.

V amplitudovém spektru je znatelná mírná změna, v prahovaném fázovém spektru ke pak vidět významný posun křivky odpovídající fázi $\pm\pi/2$.



Obr. 11 Vývoj v amplitudovém fázovém časově-frekvenčním spektru elektrogramu.

3.2.2 Analýza stability experimentu vlnkovou entropií

Použití fluorescenčního napětově citlivého barviva, iluminace zkoumané tkáně světlem s vysokou intenzitou, experimentální protokoly s dlouhými experimenty a další mohou negativně ovlivňovat kvalitu dat snímaných z živého orgánu optickou cestou. Dalšími negativními vlivy může být blednutí barviva, nehomogenita vyživovacího roztoku a chemické interakce barviva s roztokem a srdečními buňkami. Pro posouzení výše uvedených vlivů a celkové stability biologického experimentu s využitím napětově citlivých barviv je nutné analyzovat trendy ve snímaných signálech. Jednou z možností je posuzování změny entropie.

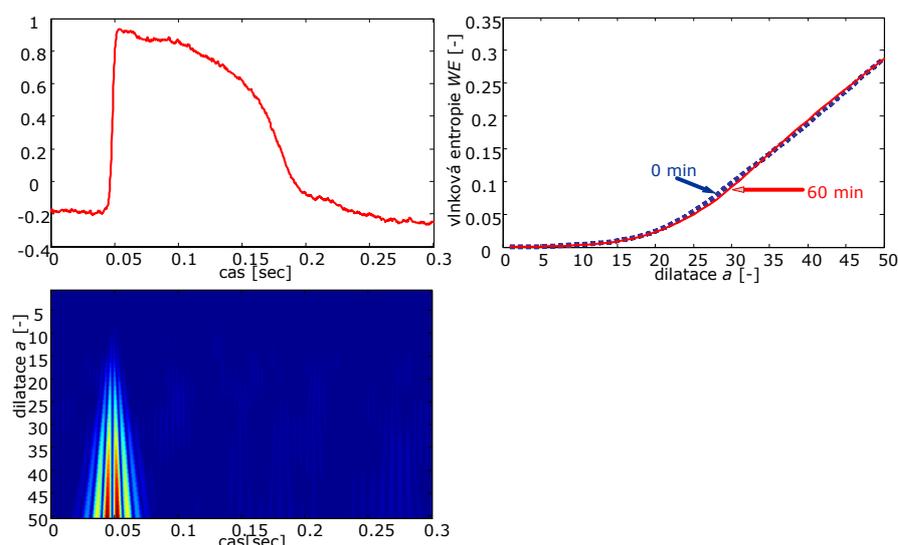
Entropie je definována jako míra neurčitosti informace skrytá v analyzovaných datech [4]. Pro daný problém může entropie odhalit změny ve statistických parametrech snímaných signálů, které nejsou detekovatelné klasickými deterministickými metodami. Pro zvýšení citlivosti metody je vhodné před výpočet entropie předřadit vlnkovou transformaci a vypočítat časově-frekvenční obraz (tzv. vlnková entropie). Výsledkem pak bude zjištění časového vývoje entropie v jednotlivých frekvenčních pásmech.

Vlnková entropie je definována jako

$$WE = -\sum_a p(a) \log_2 p(a),$$

$$\text{kde } p(a) = \frac{E(a)}{E_{total}}, \quad E(a) = \sum_b |CWT|^2(a, b), \quad E_{total} = \sum_a E(a).$$

Na Obr. 12 je dokumentována analýza vývoje tvaru akčních potenciálů vlnkovou entropií. Na prvním obrázku je příklad akčního potenciálu na začátku experimentu a na druhém obrázku pak jeho dvourozměrný vlnkový obraz, ze kterého je vypočítána entropie. Třetí obrázek znázorňuje vlnkovou entropii vypočítanou ve dvou časových okamžicích.



Obr. 12 Analýza vývoje tvaru akčních potenciálů vlnkovou entropií.

3.2.3 Analýza vlivu barviva vlnkovými konturami

Další možností analýzy trendů v záznamech elektrické aktivity srdce je posouzení změny tvaru tzv. vlnkových kontur. Jejich výpočet umožňuje snížit komplexnost vlnkového obrazu tak, aby byl snáze analyzovatelný.

Výpočet vlnkových kontur vychází z úpravy vlnkového obrazu na tzv. konturový obraz, definovaný jako

$$C_L(a, b) = \begin{cases} 1 & \text{pro } CWT(a, b) = L \\ 0 & \text{jinak} \end{cases},$$

kde L je prahová úroveň kontury (výška vrstevnice). Vlastní kontura je pak jednoduše odvozena jako

$$EC(b) = \min_{a \in A, C_L(a, b) \neq 0} [a].$$

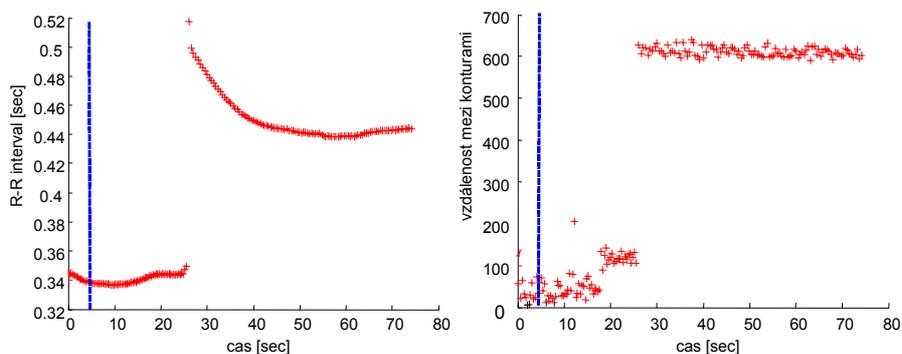
Kontura je potom jednorozměrnou funkcí času odvozenou z jediné vrstevnice ve dvourozměrném vlnkovém obrazu. Její tvar částečně odráží tvar původního analyzovaného signálu a především pak tvar vlnkového spektra.

Jednou z jednoduchých možností vyhodnocení změn ve vlnkových konturách v čase je výpočet vzdálenosti, definované jako

$$d_{rs} = \sum_b |EC_r(b) - EC_s(b)|,$$

kde r a s jsou označením dvou různých kontur.

Na Obr. 13 jsou uvedeny výsledky analýzy trendu v záznamech elektrogramů během určitého časového úseku. Na prvním obrázku je vynesena závislost R-R intervalů na čase (vzdálenosti mezi sousedními srdečními cykly) s označením časového okamžiku aplikace napětově citlivého barviva (modrá svislice). Prudká změna v grafu je reakcí buněk na vstup barviva na buněčné membrány. Na druhém obrázku je vynesena časová závislost vzdálenosti vlnkových kontur jednotlivých srdečních cyklů od kontury prvního cyklu opět s označením časového okamžiku aplikace napětově citlivého barviva.



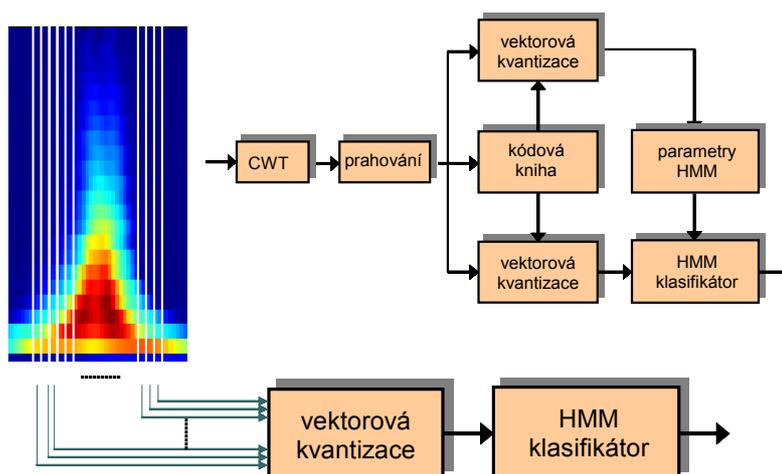
Obr. 13 Porovnání trendu R-R intervalů a vzdálenosti mezi vlnkovými obrazy QRS komplexů.

3.2.4 Klasifikace srdečních cyklů vlnkovou transformací a skrytými Markovovými modely

Posledním příkladem využití vlnkové transformace v analýze elektrických projevů srdeční aktivity je aplikace se začleněním skrytého Markovova modelu. Skryté Markovovy modely jsou v této oblasti často využívány pro jejich schopnost postihnout ne první pohled nezřetelné (podkladní) děje a změny statistického rázu. Jediným problémem je přizpůsobení vstupních signálů požadavkům Markovova modelu, který je obvykle modelován pro časové posloupnosti s limitovaným počtem kódů pro každý vzorek srdečního cyklu.

Výraznou modifikací přinášející vyšší citlivost skrytých Markovových modelů je u analýzy elektrických projevů srdeční aktivity předzpracování vlnkovou transformací. Ta umožní získat pro každý vzorek časové posloupnosti vektor příznaků (v terminologii Markovovy teorie) tak, že je extrahován jeden vektor z obrazu vlnkové transformace. Je tím využita schopnost vlnkové transformace zachytit změny v různých frekvenčních pásmech v jediném časovém okamžiku.

Na Obr. 14 je znázorněna aplikace zahrnující vlnkovou transformaci a skrytý Markovův model. Z obrázku je dobře patrné, jakým způsobem je využit obraz vlnkové transformace k tvorbě posloupnosti vektoru příznaků nutných ke klasifikaci předkládaných vzorů.



Obr. 14 Klasifikace vlnkových obrazů elektrogramů skrytým Markovovým modelem.

ZÁVĚR

Experimentální metody získávání, zpracování a analýzy biologických signálů jsou nezbytnou součástí moderního biomedicínského výzkumu. Jejich aplikace umožňuje získat dosud skryté informace o chování živého organismu, které je ze své podstaty deterministicky chaotické a komplexní. Právě složitost organismu a jeho projevů je často překážkou prokázání i jednoduchých hypotéz z oblasti vzniku a rozvoje chorob, účinnosti farmak, apod. Na druhou stranu však zmíněná složitost ukazuje na jistou pravděpodobnost získání *nových* informací nutných k odkrytí a hlubšímu pochopení biologických procesů v organismu.

Jedním z nedávných příspěvků k experimentálnímu výzkumu v oblasti je realizace optického snímání elektrické aktivity orgánů. Ve výše uvedeném textu je popsána jeho modifikace a zkušenosti s použitím optického snímacího systému v základním kardiologickém výzkumu.

Využití optického způsobu záznamu elektrických potenciálů s sebou nese řadu problémů, zejména vliv rušení, nízká úroveň signálu, chemické interakce s barvivem apod. Proto je nutné používat řadu metod pro zpracování signálů, které umožní zmíněné problémy potlačit či odstranit. Při tom se osvědčil jeden z moderních nástrojů číslicového zpracování signálů – vlnková transformace. Tentýž nástroj se pak osvědčil i při analýze záznamů. Samotná vlnková transformace je však pouze základem a pro dosažení relevantních a světově porovnatelných výsledků je nutné jej doplnit o řadu jiných nástrojů. Potom vzniká například vlnková entropie, vlnkové kontury, fázová vlnková analýza a vlnková kvantizace pro skryté Markovovy modely. Ve zmíněných metodách je pak dosahováno kvalitativně lepších výsledků, než při tradičních způsobem analýzy, které jsou většinou prováděny v časové oblasti.

POUŽITÉ ZDROJE

- [1] BRONZINO, J. D. The Biomedical engineering handbook. CRC Press, 1997.
- [2] COHEN, L. B., KEYNES, R. D., HILLE, B. Light scattering and birefringence changes during nerve activity, *Nature*, 1968, roč. 218, č. 140, s. 438-441.
- [3] DÖRING, H. J., DEHNERT, H. *The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff*, Biomesstechnik-Verlag, 1988.
- [4] GRAY, R. Entropy and Information Theory. New York: Springer, 1990.
- [5] IRAVANI, S., TUNG, L. A novel algorithm for cardiac biosignal filtering based on filtered residue method, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2002, roč. 49, s. 1310-1217.
- [6] KAMINO, K., HIROTA, A., AND FUJII, S. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye, *Nature*, 1981, roč. 290, č. 5807, s. 595-597.
- [7] LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen, *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, roč. 65, č. 1, s. 291-332, 1895.
- [8] PROVAZNÍK, I., BARDOŇOVÁ, J., NOVÁKOVÁ, M., NOVÁKOVÁ, Z., KOZUMPLÍK, J. High Resolution Methods For Detection Of Electrophysiological Changes In The Ischaemic Heart. *Scripta medica*, 2002, roč. 75, č. 5, s. 223 – 230
- [9] PROVAZNÍK, I., KOZUMPLÍK, J. Wavelet Transform in Electrocardiology - Data Compression. *International Journal of Medical Informatics*, 1997, roč. 45, č. 8, s. 111 - 128.
- [10] PROVAZNÍK, I., NOVÁKOVÁ, M., BLAHA, M., CHMELAR, M., VESELÝ, Z. *Fibre Optic Sensor For Recording Of Action Potentials* In Proceedings of the 2004 International Conference on Intelligent Sensors, Sensor Networks and Information Processing Conference. Melbourne: IEEE, 2004, s. 349-354.
- [11] SALAMA, G. AND MORAD, M. Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart, *Science*, 1976, roč. 191, č. 4226, s. 485-487.
- [12] UNSER, M. A Practical guide to the implementation of the wavelet transform. In: ALDROUBI, A., UNSER, M. Wavelets in Medicine and Biology. CRC Press, New York 1996; s. 37-76.