

Kalcium felszabadulási események számítógépes elemzése

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Szabó László Zsolt

Témavezetők: Dr. Pethő Attila és Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Informatikai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2013

Tartalom

1.Bevezető.....	1
2.Célkitűzések.....	2
3.Alkalmazott számítógépes módszerek	3
3.1.Kép javítási és előfeldolgozási eljárások	4
3.2.Esemény detektálás.....	5
3.3.Biofizikai paraméterek számítása és statisztikai feldolgozása.....	6
3.4.Szoftver.....	6
4.Eredmények.....	7
4.1.Klasszikus módszerekkel végzett elemzés.....	7
4.2.Az à trous wavelet transzformáció használata elemzési módszerekben.....	9
4.3.Nagyfrekvenciás line-scan mérések elemzése.....	14
4.4.Elért eredmények hasznosíthatósága.....	16
5.Továbbfejlesztési lehetőségek	16
6.Publikációs lista.....	17
7.Tézisfüzet irodalmi hivatkozásai.....	19
1.Introduction.....	21
2.Goals of the thesis.....	22
3.Computer based methods.....	23
3.1.Image enhancing and preprocessing methods	24
3.2.Detection of events.....	24
3.3.Calculation of biophysical parameters.....	25
3.4.Software.....	25
4.Results.....	26
4.1.Analysis performed by classical methods.....	26
4.2.Using the à trous transform in confocal image analysis.....	28
4.3.Analysis of high frequency line-scan images.....	32
4.4.Usage of the results.....	33
5.Improvements.....	33
6.References.....	34

1. Bevezető

A dolgozat témáját az élettan és biofizika egy sajátos jelenségét vizsgáló kutatások keretén belül alkalmazott számítógépes módszerek képezik. A jelenség izomsejteken belül történik és az izom kontrakciót megvalósító folyamatokat foglalja magába, amelyeknek fontos szereplője a sejten belüli kalcium, mint biológiai üzenethordozó. A tanulmányozott folyamatot először 1993-ban rögzítették konfokális mikroszkóppal, fluoreszcencia alapú képalkotó módszerekkel. Az intracelluláris térrészben történő kalciumkoncentráció változásokat összefoglalóan elemi kalciumfelszabadulási eseményeknek nevezzük, ezek egész sejtre kiterjedő (globális) illetve csak kis térrészben megjelenő (lokális) eseményeket gerjesztenek.

A néhány mikron átmérőjű térben lezajló események rögzítésének eszköze a konfokális mikroszkóp volt a kutatások utóbbi 20 esztendejében, az esemény megfigyelése Ca^{2+} ionokhoz kötődő festékek fluoreszcens tulajdonságán keresztül lehetséges. A festék megvilágítása lézer sugárral történik, a konfokális mikroszkóp működéséből adódóan az ily módon felfogott jelek igen kis térrészből rögzítik a jelenség dinamikáját.

Ezen a területen a mérési folyamatok vezérlése és rögzítése is számítógépes módszerekkel történik, és szükség van számítógépes módszerekre az eredmények kiértékelésénél is. Az egy, két vagy több dimenziós jelek kép és jelfeldolgozás területén alkalmazott módszerekkel értelmezhetőek. A számítógépes feldolgozások az informatika több területét érintik.

A konfokális mikroszkóppal készített mérések egy, vagy több dimenziós képek formájában tárolódnak, ezek elemzése képfeldolgozási módszerekkel történik, amelyek közt helyet kapnak a klasszikus képfeldolgozás területébe sorolt, illetve a speciális, mikroszkópos képek feldolgozását biztosító módszerek, különös

Bevezető

tekintettel a fluoreszcens képalkotásra.

A biofizika, illetve élettan tárgykörébe tartozó lokális kalcium események paraméterszámítása numerikus módszerekkel történik. A numerikus számítások bemenetét a képfeldolgozás során lokalizált események területeinek mérési adatai jelentik.

Az események vizsgálatához a számítógépes megjelenítések, illetve interaktív és automatikus bejelölések is használatosak. Így a mérések komplex elemzési folyamaton mennek keresztül, a nagyszámú mérés miatt szükséges ezeknek a folyamatoknak az automatizálása. Mivel bizonyos esetekben a képek igen zajos háttérén az elemi események szemmel is nehezen detektálhatóak, a számítógéppel végzett detektálás biztosítja az objektív alapot összehasonlító kísérletekben.

A tézis háttérét jelentő kutató munka elemi kalciumfelszabadítási események automatikus és interaktív elemzéséhez kötődik, a módszerek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Élettani Intézetében folytatott kísérletek folyamán kerültek alkalmazásra.

2. Célkitűzések

A tézis célkitűzései egyrészt a terület ismert számítógépes módszereinek ezen kutatási területre való alkalmazását, illetve új módszerek bevezetését érintették, másrészt a témával kapcsolatos kutatási feladatok gyakorlati, számítógéppel segített feldolgozásait célozták. Ezek az alábbiak:

- a) Konfokális mikroszkóppal készült line-scan képek elemzése számítógépes kép és jelfeldolgozási módszerekkel. Ezek a képek az Élettani Intézetben készültek elemi Ca^{2+} események biofizikai mechanizmusainak tanulmányozására végzett kísérletekben, munkánk első szakaszában klasszikus kis frekvenciás konfokális mikroszkópokkal (a mikroszkóp

sor pásztázási periódusa 1 ms körüli).

- b) Vázizomban történő, konfokális mikroszkóppal (elsősorban line-scan típusú képek létrehozásával) rögzített Ca^{2+} események tanulmányozása, statisztikai feladatok megoldásához szükséges paraméterek számítása, Ca^{2+} esemény jellemzők meghatározása és számítása olyan esetekben, amikor nem létezik az irodalomban általánosan elfogadott módszer erre, pl. Ca^{2+} „ember” (parázs) típusú események esetében. A kidolgozott módszerek alkalmazása kísérleti adatok feldolgozásában.
- c) Az esemény detektáló algoritmusok hatékonyságának és megbízhatóságának vizsgálata kalcium eseményeket tartalmazó line-scan képeken. Az algoritmusok konfigurálható paramétereinek hatását lemérve az optimális beállíthatóság elemzése.
- d) A kidolgozott algoritmusok és elemzési módszerek adaptálása nagy frekvenciás line-scan képek elemzéséhez. A nagy frekvenciás (pásztázási periódus 50 μs körüli), modern mikroszkópok által rögzített képeken ugyanazok a jelenségek más alakzattal jelennek meg, mint a klasszikus képeken.
- e) A témakörben általánosan használható függvény csomag és grafikus felületű feldolgozó programok kidolgozása az a-d pontokban említett feladatokhoz.

3. Alkalmazott számítógépes módszerek

Az elemi kalcium események megfigyelésének egyik lehetőségét a konfokális mikroszkóppal rögzített mérések (képek) jelentik. A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Élettani Intézetében két készüléket használtunk mérések előállítására, A Zeiss LSM510 META és Zeiss LSM LIVE

készülékeket. Az elemi kalcium események regisztrálását preparált béka, patkány és egér izomrostokon végezték. Munkám során elsősorban line-scan módszerrel rögzített képeket elemeztem. Általában ezek a mérés típusok biztosítják a legnagyobb pásztázási frekvenciát, így az elemi kalcium események dinamikája ezeken a tér-idő koordinátájú két dimenziós képeken keresztül figyelhető meg a legjobban. Az LSM510 META klasszikus készülék, pásztázási periódusa line-scan képeken ms körüli (pl. 1.5 ms), az LSM LIVE esetében ez az érték 50 μ s, így az események kinetikája jobban követhető. LSM LIVE típusú mikroszkóp csak az utóbbi években került használatra az intézetben.

A képek elemzéséhez az alábbi számítógéppel támogatott módszereket használtam:

- a) kép javítási és előfeldolgozási eljárások,
- b) esemény detektálás különböző, képfeldolgozás területén használatos módszerrel,
- c) biofizikai paraméterek számítása,
- d) a tanulmányozott események paramétereinek statisztikai feldolgozása.

3.1. Kép javítási és előfeldolgozási eljárások

A képek előfeldolgozásához elsősorban a fluoreszcens, sejten belüli mikroszkóp képek esetében alkalmazott ismert eljárásokat használtam, így a képek normalizálását, illetve fotokioltság javítását célzó eljárásokat. A klasszikus képfeldolgozási eljárások közül térbeli szűrőket használtam ezekre a feladatokra, például egyszerű zajsűrést megoldó medián és átlagoló szűrések. Ezeknek az eljárásoknak a használata általános gyakorlat a konfokális mikroszkóppal rögzített, fluoreszcenciára épülő képek elemzésekor.

3.2. Esemény detektálás

A tézis *Módszerek* fejezetében áttekintettem a területen használatos esemény detektálási eljárásokat. Munkám első szakaszában kettős küszöbölésre épülő, ismert eljárást használtam erre a célra, ezt a módszert különböző módosításokkal több kutatócsoport alkalmazta (Song és mtsai. 1997; Cheng és mtsai. 1999), a jelenség kutatásának első időszakában általánosan használt detektáló algoritmus volt.

A második szakaszban egy diszkrét wavelet transzformációra épülő eljárást használtam, ezt Starck és Murtagh alkalmazta először csillagászati képek elemzésére (Starck és mtsai. 1998), illetve von Wegner és mtsai. (2006) konfokális képekre. Az transzformáció egyik ismert neve *à trous* transzformáció (stacionárius wavelet transzformáció név alatt is ismert). Wavelet függvényként a köbös B-spline skálafüggvényre épülő waveletet használtam (akárcsak a módszer bevezetői), ennek tulajdonságai különlegesen alkalmassá teszik orvos-biológiai képek elemzésére (véges intervallumon definiáltak, egyszerű algoritmusok alakíthatóak használatukkal, szimmetrikusak, optimális idő-frekvencia lokalizáló tulajdonságaik vannak).

Az *à trous* wavelet transzformáció segítségével több elemi eljárás oldható meg, így a zajszűrés és esemény detektálás. A transzformáció folyamán az eredeti jel wavelet együttható szintekre bontható, ezek a jelben található frekvenciákat lokalizáltan (térben és időben, a kép koordinátái szerint) jelenítik meg diadikus skálát használva. Így ún. *sokskálás felbontás* hozható létre, amely tetszés szerint használható a jelek elemzésére, és sok változatot biztosít jellemzők kinyerésére. A transzformáció egy és két dimenzióban is működik, van inverz transzformációja, ami a wavelet együttható szintek módosítását kihasználva többféle jelfeldolgozási műveletet

Alkalmazott számítógépes módszerek

tesztelhető. A transzformációt megvalósító algoritmus egyszerű, számítógépes implementációja gyors, több dimenzióban szeparábilis.

3.3. Biofizikai paraméterek számítása és statisztikai feldolgozása

Az elemzett kalcium kibocsájtási események statisztikai osztályozása és kontroll csoportos kísérletekben való összehasonlítása biofizikai paraméterek alapján történik. A paramétereket a mérésekben detektált területekből, valamint adatpontokból számoltam numerikus módszerekkel. A jellegzetes kalcium kibocsájtási események esetében, például az ún. kalcium *sparkok* (gyors lefutású események, 20-30 ms) esetében a paraméterszámítás módszerei jól körülírtak, így a szakirodalomban és kutatási gyakorlatban elterjedt módszereket alkalmaztam (időbeli és térbeli evolúciót jellemző paraméterek). Más esetben, ha nem létezett általánosan elfogadott módszer az esemény jellemzésére, saját paraméter számítási módszert dolgoztam ki, például a kalcium „*ember*” (parázs) időben lassú lefutású esemény esetében (esemény időtartama > 100 ms).

A paraméterek egy része a pixel szintű adatokból nyert térbeli kiterjedésre utaló jellemzővel, másik része nemlineáris görbék illesztéséből kapott paraméterekkel utal az elemi kalciumfelszabadulási események evolúciójára. A nemlineáris illesztéseket legtöbb esetben Levenberg-Marquardt módszerrel végeztem.

3.4. Szoftver

Az elemzés gyakorlati megvalósítása folyamán a MATLAB (*The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States*) programozási környezetet használtam. A munkám folyamán alap algoritmusokat

implementáló függvénycsomagokat, interaktív grafikus felülettel rendelkező elemző programokat, illetve automata elemzést biztosító eljárásokat fejlesztettem. Következmenyeként a fontosabb eljárások egy-egy függvénycsomag részeként felhasználhatóak új feldolgozások gyors előállítására.

4. Eredmények

4.1. Klasszikus módszerekkel végzett elemzés

A szakirodalomban található módszerek, illetve a Debreceni Egyetem – Orvos- és Egészségtudományi Centrum – Élettani Intézetben létező tapasztalat alapján elkészítettem egy line-scan képek elemzését megoldó függvénycsomagot és grafikus interfésszel rendelkező programot. Az alábbi feladatokat oldottam meg:

- a) Kép előkészítési és javítási eljárásaként megvalósítottam egy módszert line-scan képek normalizálására, illetve a fotokioltság hatásainak javítására.
- b) Kidolgoztam a klasszikus, kettős küszöbölést használó detektáló algoritmus módosított változatát esemény detektálásra.
- c) Módszereket dolgoztam ki a kalcium spark típusú események paramétereinek (amplitúdó, FWHM, FTSM, felfutási idő, időtartam) számítására és ezek statisztikai feldolgozására.
- d) Kidolgoztam egy módszert kalcium „ember” típusú, lassú lefutású (időtartam >100ms) és igen kis amplitúdójú események jellemzőinek számítására.

A fotokioltság javítására egy saját algoritmust fejlesztettem, ez figyelembe veszi a folyamat exponenciális vagy

biexponenciális jellegét. Line-scan képek esetében korrigálja a fluoreszcens intenzitás esést a paraméterszámításhoz. A képek normalizálásának megoldásához a klasszikus eljárás saját implementációját használtam.

Munkám első fázisában a klasszikus, kettős küszöbölést alkalmazó algoritmust használtam esemény detektálásra, megoldottam az algoritmus saját implementációját. Ez az implementáció az algoritmus második, esemény elfogadási fázisában konfigurálható (a második küszöb által meghatározott terület pixeleinek száma, alakzata vagy x illetve t irányban megadott feltételek által).

Kalcium spark típusú események kutatásának első időszakában (1999-2003) kialakultak az általánosan elfogadott paraméterszámítási eljárások és modellek, ezeket alkalmaztam. Megoldottam a számításokhoz szükséges adathalmazok kinyerését a képeken detektált eseményekből, és numerikus számítási eljárásokat dolgoztam ki a következő spark paraméterek számításához: amplitúdó, térbeli félérték szélesség, felfutási idő, időbeli félérték szélesség és időtartam. A sparkokhoz csatolt jellemzőket kontrollcsoportos kutatásokban használtuk. A paraméterek számítási módszereiben igazodtam a területen ismert eljárásaihoz, ez biztosítja az eredményeink előző munkákkal való összehasonlítását.

Megoldottam a kísérletekhez kötött nagy számú kép automatikus elemzését, ugyanakkor interaktív módszereket is biztosítottam kalcium események számítógépes vizsgálatához. Ezek biztosítják Ca^{2+} események manuális bejelölését és paraméterszámítások elvégzését.

A kalcium „ember” típusú események paraméterszámításához nem létezett általánosan elfogadott módszer, így megadtam egy eljárást az események időtartamának, térbeli kiterjedésének és amplitúdójának számításához, ezt felhasználtuk Lukács és mtsai. (2008) publikációjában. Ezek a számítási módszerek lehetővé teszik

a hosszan elhúzódó (>100 ms), egy vagy néhány ioncsatorna nyitva maradása által jellemezett események osztályozását.

Az eljárásokhoz egy szoftvercsomagot fejlesztettem, az egyes algoritmus megvalósítások külön is használhatóak és kombinálhatóak. A megjelenítéshez és interaktív kijelöléshez grafikus komponenseket fejleszttem. Az elemzési folyamatokat automatizáltam, így nagyszámú kép elemzése automatikusan futtatható.

A klasszikus spark elemzési módszer általam implementált, az előbbieken említett vonatkozásokban módosított változata megoldotta az elemi kalcium események kutatása folyamán készített konfokális képek elemzését az Élettani Intézetben.

Új módszert dolgoztam ki a kalcium „ember” (parázs) típusú események paraméterszámítására.

A módszerek gyakorlati alkalmazásához grafikus interfésszel rendelkező interaktív, illetve automata elemzést biztosító szoftvert fejlesztettem. Ezekkel a módszerekkel, illetve implementációikkal megoldható a kalcium „spark” és „ember” típusú eseményeket tartalmazó line-scan képek elemzése.

Az elemző módszerek implementációját az LSM nevű MATLAB programcsomagban valósítottam meg.

4.2. Az \hat{a} trous wavelet transzformáció használata elemzési módszerekben

Az esemény detektálás megbízhatóbbá tétele és szenzitivitásának növelése érdekében több algoritmust építettem wavelet alapú megoldásra. Az \hat{a} trous diszkrét wavelet algoritmusnak egy és két dimenziós változatait használtam, köbös B-spline skála

Eredmények

függvényekre épülő waveletekkel. A módszer alapjait töltéscsatolt és fényelektromos sokszorozó detektorokkal csillagászat területén készült képekre Starck és Murtagh dolgozta ki, konfokális képekre von Wegner használta először.

Elkészítettem a transzformáció saját implementációját, egy és két dimenzióban. A két dimenziós transzformációt, amelynek használata közel izotróp események feldolgozásánál indokolt a következőkre használtam:

- a) **Zajszűrés:** Starck és Murtagh módszerét használva kiindulópontnak, implementáltam egy zaj szűrő algoritmust. Az algoritmus általam megvalósított implementációjában paraméterezhető a szűrést megvalósító küszöbölési módszer (*hard*, *soft*, *affin*), ez tudtommal nem található meg az eddigi megvalósításokban. A zajszűrést normalizált képekre alkalmazva megoldható a sparkok detektálása igen zajos képeken is. A szűrés mértéke paraméterezhető (δ).
- b) **Két dimenziós esemény detektálás:** Starck és Murtagh módszerét felhasználva implementáltam egy kalcium spark detektáló algoritmust line-scan képekre a két dimenziós à trous transzformáció alkalmazásával, és használtam ezt kalcium sparkokhoz kötődő kísérletek kiértékelésében. A detektálás folyamán használt küszöbölés paraméterezhető (τ).

A detektálás jobbá tétele érdekében a wavelet alapú detektáló algoritmus hatékonyságának és megbízhatóságának javításával, illetve paraméterezése hatásainak felmérésével foglalkoztam.

A konfokális képeken jelentkező foton zaj miatt a detektálás wavelet módszerrel nem robusztus, ezért ezeken a képeken a

Az *à trous* wavelet transzformáció használata elemzési módszerekben

jellemző zajmintákon előszűrést kell alkalmazni. Előszűrésre az *à trous* wavelet transzformáció első 2 szintjét használva kidolgoztam egy túske szűrő eljárást konfokális képeken. Az eljárás az *à trous* transzformáció első két szintjének együttthatóit használva állapítja meg a képek nagyfrekvenciás pontjait, és azokat küszöbölő módszerrel transzformálja, a küszöbölés paramétere H .

Az *à trous* transzformációra épülő detektálás elemzéséhez hatékonyságot és megbízhatóságot mérő tesztekkel végeztem. Bemenetként szimulált méréseket állítottam elő zaj és esemény szimulációval. A zaj szimulálására két módszert alkalmaztam, egy normális eloszlású háttérzajt, illetve egy kalcium spark eseményeket nem tartalmazó kísérleti képekből generált háttérzajt.

Az bemeneti teszt képekbe illesztett események szimulációjához egy kísérleti spark átlagoló, illetve egy reakció-diffúzió szimuláló programot készítettem.

A tesztelés folyamán három kérdéskört vizsgáltam:

- a klasszikus és az *à trous* transzformációra épülő detektálás összehasonlítása,
- az *à trous* transzformációra épülő detektálás megbízhatóságának javítása túske szűrő alkalmazásával,
- szimulált, különböző méretű és amplitúdójú sparkok esetében a detektált és eredeti spark paraméterek közti arány kérdése (amplitúdó és spark térbeli félérték szélesség paraméterekre).

Összehasonlítottam a klasszikus módszert az *à trous* transzformációra épülő detektálással, és megállapítottam, hogy az utóbbi megbízhatóbb és nagyobb szenzitivitású kis

Eredmények

amplitúdójú ($A < 0.8 \Delta F/F_0$) sparkok esetében kísérleti képekből generált háttér esetében.

A szakirodalomban publikált hasonló tesztek esetében ismereteim szerint először használtam olyan szimulált képeket, amelyeken a háttérzaj kísérleti képek adataiból lett előállítva, és így jobban közelítette a kísérleti képek zaj eloszlását.

Előszűrés (konfokális képekre jellemző foton zaj szűrése) alkalmazásával alátámasztottam azt a feltevést, miszerint az *à trous* transzformációra épülő detektálás megbízhatóbbá tehető, és jelentősen csökkenthető a hamisan pozitív találatok száma, a módszer szenzitivitásának igen kis mértékű csökkenésével.

Az algoritmus tesztelése folyamán két jellemzőt számoltam ki: a pozitív prediktív értéket (PPV), ez a találatok megbízhatóságát fejezi ki (mennyire lehetünk biztosak abban, hogy egy találat valódi pozitív) és a szenzitivitást (S) (detektálás valószínűsége). Mindkét jellemző empirikus valószínűséget ad meg spark amplitúdót jellemző relatív fluoreszcencia értékekre. A tesztek normális eloszlású és kísérleti zajból előállított háttérzajon végeztük. PPV_{50} illetve S_{50} -el jelöltem azokat a relatív fluoreszcencia értékeket (detektált spark esemény amplitúdó) amelyekre a predikció, illetve szenzitivitás valószínűsége 0.5.

Az összehasonlítás 1.54 ms pásztázási sebességgel előállított képekre készült (a kísérleti képek paramétere), amelyekre a háttér kísérleti képekből, illetve normális eloszlású zajból generáltam (ugyanolyan jel/zaj aránnyal – a továbbiakban *BSNR* – a háttér

Az *à trous* wavelet transzformáció használata elemzési módszerekben

pontjaiban, $BSNR = m/\sigma$, m a zaj középértéke, σ a zaj szórása). Az alábbiakban megadott értékek $BSNR = 3.5$ -re érvényesek.

Míg a szenzitivitás vonatkozásában normális eloszlású háttér esetében a wavelet alapú keresés a hagyományossal összevethető eredményt mutat, lényegesen jobban teljesít kísérleti háttér esetében ugyanazoknál a relatív fluoreszcencia egységekben kifejezett amplitúdóknál. **Az *à trous* wavelet transzformációra épülő algoritmus PPV_{50} értéke kísérleti képek pontjaiból szimulált háttér esetében több mint 0.3 relatív fluoreszcencia egységgel (0.287 a 0.59-höz képest) jobb mint a hagyományos módszeré.**

Az megadott túske szűrési módszert használva kimutattam, hogy az *à trous* wavelet transzformációra épülő algoritmus szenzitivitása gyakorlatilag nem változik a túske szűrés nélkül alkalmazott algoritmushoz képest, a PPV_{50} értéke viszont javul (0.21 a 0.32-höz képest).

A kísérleteinkben rögzített line-scan képek esetében emlősökben jelentkező sparkok detektálására az optimális paraméterek $\delta=4.0$, $\tau=3$ és a túske szűrő beállítása $H=4.5$, így jobb PPV görbét kapunk szenzitivitás veszteség nélkül.

Különböző méretű és amplitúdójú szimulált sparkokat elemezve alátámasztottam azt a felvetést, hogy a detektált amplitúdó az eredeti amplitúdó lineáris függvénye, 0.4 relatív fluoreszcencia egység fölötti amplitúdónál. Az ennél kisebb amplitúdójú sparkoknál a detektált amplitúdóban egy eltolódás jelentkezik a zaj miatt. A detektált félérték

Eredmények

szélesség általában alul becsli az eredeti félérték szélességet és nem függ a sparkok amplitúdójától.

A wavelet alapú elemző módszerek implementációját beépítettem az LSM, illetve a LIVE (lásd alább) programcsomagokba. Az algoritmus szimulált képeken való futtatásához és PPV, illetve S értékek kinyeréséhez külön eljárást implementáltam, ezzel a továbbiakban is előállíthatóak a PPV és S görbék más zaj típusok és esemény alakzatokra.

4.3. Nagyfrekvenciás line-scan mérések elemzése

Az \hat{a} trous transzformációra épülő módszert alkalmaztam nagy frekvenciás line-scan mérések eseményeinek detektálására is. Ezekon a képeken a spark típusú események kb. 30-szor nagyobb frekvenciával vannak rögzítve, így időbeli, pixelekben adott kiterjedésük lényegesen különbözik a klasszikus képeken találhatóaktól.

A két dimenziós \hat{a} trous transzformáció azonos vagy hasonló pixelekben mért tér és időbeli kiterjedés esetében alkalmazható hatékonyan. Ha a keresett két dimenziós esemény nem izotróp jellegű jobban megoldható a feladat egy dimenziós transzformációval. Az események időbeli kiterjedéséből meghatározható az optimálisan kereső wavelet szint, ezért ez a módszer általánosan használható line-scan és XY-t képeken egyaránt.

Mivel ezeken a képeken az események nem izotróp kiterjedésűek, a detektálást az egy dimenziós \hat{a} trous transzformáció idő koordináta irányában történő alkalmazásával lehet megoldani, két magasabb wavelet szint együtthathóinak küszöbölésével. Szintként

használhatóak a 6-7 illetve 8-9-es szintek, ezek kiválasztása az események időtartamától függ.

Nagyfrekvenciás line-scan képek (50 μ s pásztázási periódus) esetében a spark típusú események detektálása megoldható az à trous transzformáció egy dimenziós változatával, magasabb wavelet szintek küszöbölésével (6-7 vagy 8-9 szinteket használva).

A detektálás mellett további módszereket dolgoztam ki nagyfrekvenciás képeken a spark paraméter számításokra. Ezekben a képeken, a nagy frekvenciás pásztázás miatt jobban követhető az események kinetikája, így a teljes esemény tartalmára (vagy annak jelentős hányadára) számíthatóak a sparkokat jellemző amplitúdó és térbeli félérték szélesség paraméterek.

Nagyfrekvenciás képek esetében megoldottam egy olyan paraméter számítását amely jól jellemzi a sparkokat kiváltó kalcium kiáramlás dinamikáját, ez az ún. *signal mass* görbe meredeksége. Az eredmények konferencia absztraktokban, illetve poszter formájában kerültek publikálásra, publikáció írása folyamatban van.

Az általam megadott számítási módszerekkel meghatározott amplitúdó, félérték szélesség és *signal mass* görbe meredekség paraméterekkel jellemezhetőek a nagy frekvenciás képeken rögzített sparkok.

Az LSM LIVE képek elemzéséhez a LIVE nevű grafikus interfésszel rendelkező program és függvénycsomagot implementáltam. Ebben a csomagban több detektáló és paraméter számító módszer választható ki, és új elemzési láncok is futtathatóak, amelyeket az általam fejlesztett függvénycsomag felhasználásával lehet

Eredmények

összeállítani. Detektáló módszerként a küszöbölő, egy és két dimenziós \hat{a} trous egyaránt használható.

A LIVE programcsomaggal az Élettani Intézet laborjában mindeddig előállított line-scan típusú képek elemezhetőek. A csomag a számolt paraméterek gyors statisztikai megjelenítésére is alkalmas.

4.4. Elért eredmények hasznosíthatósága

A kalcium eseményekhez kötődő kutatásokban használt konfokális képek különböznek az egyedi kutatásoktól függően, esetenként a paraméter számítások is változnak. Rugalmasan használható függvény csomagot alakítottam ki, ebből rövid idő alatt összeállíthatóak a szükséges elemzés láncok kalcium eseményekhez kötődő kísérletekhez (konfokális line-scan és x-y képekhez) valamint idősorokhoz (x-y-t, x-y-z-t). Ezek a LIVE grafikus interfész alól futtathatóak.

5. Továbbfejlesztési lehetőségek

- a) Jelenleg nincs megoldva a képek megfelelő kép-szerven történő tárolása és hosszú távon való kezelése. Jelenleg ezen a területen az egyik legelfogadottabb megoldás az OMERO (The Open Microscopy Environment, <http://www.openmicroscopy.org>) környezet. Ennek használata beépíthető a szoftverbe (a megoldás kidolgozása folyamatban van).
- b) A LIVE mikroszkópokon készült nagy méretű képek szükségessé teszik az alap algoritmusok gyorsítását. Több processzoron való párhuzamosítás, grafikus kártyákat használó algoritmusok implementálás lehetséges, több algoritmus olyan feldolgozásra épül amik párhuzamosíthatóak (szűrések, normalizálás, konvolúció, \hat{a} trous algoritmus).

- c) Gépi tanulásra épülő eljárások használata detektálásra.

6. Publikációs lista

Impakt faktorral rendelkező publikációk

1. Szigeti G. P., Almássy J., Sztretye M., Dienes B., **Szabó L.**, Szentesi P., Vassort G., Sárközi S., Csernoch L., Jóna I. (2007). *Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats.*, Pflugers Arch 455 : 541-553.
2. Almássy J., Sztretye M., Lukács B., Dienes B., **Szabo L.**, Szentesi P., Vassort G., Csernoch L., Jóna I. (2008). *Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle.*, Pflugers Archiv (European Journal of Physiology) 457 : 171-183.
3. Fodor J., Gönczi M., Sztretye M., Dienes B., Oláh T., **Szabó L.**, Csoma E., Szentesi P., Szigeti G. P., Marty I., Csernoch L. (2008). *Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca²⁺ release events and global Ca²⁺ signals in skeletal muscle cells in culture.*, Journal of Physiology 586 : 5803-5818.
4. Lukács B., Sztretye M., Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C., **Szabó L.**, Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L. (2008). *Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor.*, Biophysical Journal 95 : 3497-3509.
5. **Szabó L. Z.**, Vincze J., Csernoch L., Szentesi P. (2010). *Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms.*, Journal of Theoretical Biology 264 : 1279-1292.

Konferenciakötetben megjelent publikációk

1. **Szabó L. Z.**, Dienes B., Csernoch L. (2007). *An image analyser program written in MATLAB to detect and analyse calcium sparks.*, Proc. of the 7th International Conference on Applied Informatics Eger, Hungary.

Absztrakt kötetekben megjelent publikációk

1. Csernoch L. , Fodor J., Fehér M. , Dienes B., Deli T. , Szentesi P,

Publikációs lista

- Szabó L.** , Marty I. Suppressed SR calcium release and modified elementary calcium release events in Triadin-overexpressing cultured myotubes, *BIOPHYSICAL JOURNAL* 79A-79A Suppl. S, JAN 2007
2. Fuzi M., Palitz Z., **Szabo L.**, Vincze J., Szentesi P., Paragh G., Kertai P., Csernoch L. (2009). *Fluvastatin Alters Both The Calcium Homeostasis And Cell Proliferation In Cultured Myotubes And The Calcium Release Events In Adult Muscle Fibers Of The Rat* , *Biophysical Journal* 96 : 23a -
 3. Vincze J., **Szabó L. Z.**, Csernoch L., Szentesi P. (2009). *Reliable methods for spark and ember detection using stationary wavelet transform.*, *Folia Medica Cassoviensia*, International Student Medical Congress Košice June 23-25, 2009 ISSN: 1337-7817.
 4. **Szabó L. Z.**, Vincze J., Csernoch L., Szentesi P. (2009). *Fine tuning of algorithms using the a trous wavelet transform in confocal microscopy line scan image analysis.*, *Proc. of MACRO 2009, International Conference On Recent Achievements in Mechatronics, Automation, Computer Sciences and Robotics. March 20-21 2009, Tg-Mures.*
 5. **Szabó L. Z.**, Vincze J., Csernoch L., Szentesi P. (2010). *Algorithms for analysis of calcium events from muscle on confocal microscopy images using stationary wavelet transforms.*, *Proc. of Number Theory and its Applications, october 4-8, 2010, Debrecen, Hungary.* .
 6. Szentesi P., Vincze J., Bodnar D., **Szabo L.**, Dienes B., Szappanos H. C., Schneider M. F., Csernoch L. (2011). *Caffeine and depolarization alters the morphology of calcium spark in amphibian skeletal muscle.*, *European Biophysics Congress, August 23rd–27th 2011, Budapest, in European Biophysical Journal* 40 (Suppl 1) S35-S241.
 7. Szentesi P., Vincze J., Bodnar D., **Szabo L.**, Dienes B., Cserne-Szappanos H., Schneider M. F., Csernoch L. (2011). *Spatio-temporal morphology of calcium sparks recorded on intact*

amphibian skeletal muscle fibres., Joint Australian Physiological Society/ASCEPT/HBPRCA Meeting, Perth 2011, Proceedings Of The Australian Physiological Society, Volume 42, ISSN 0067-2084.

8. Vincze J., Szentesi P., Bodnár D., **Szabó L.**, Dienes B., Cserné Szappanos H., Schneider M., Csernoch L. (2012). *Caffeine Treatment and Depolarization Alter the Spatial and Temporal Characteristics of Calcium Sparks on Intact Amphibian Skeletal Muscle*, Biophysical Journal 102 : 310.

Posztterek

1. Vincze J., **Szabó L. Z.**, Dienes B., Szentesi P., Csernoch L. (2013). *Efficient Automatic Analysis Of High-speed Confocal Images Containing Localized Calcium Release Events.*, Poster, Biophysical Society, 57th Annual Meeting, February 2-6, Philadelphia.

Oktatással kapcsolatos és más témakört érintő munkák

1. **Szabó László Zsolt**, Shell vagy héjprogramozás, tananyag. (2011), Kelet-Magyarországi Informatika Tananyag Tárház, TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0046, Debreceni Egyetem.
2. **Szabó László Zsolt**: UNIX alapú rendszerek használatának oktatása a műszaki informatikus és informatikusokképzésben, Informatika a felsőoktatásban Konferencia, Debrecen, 2008. augusztus 27-29, ISBN 978-963-473-120-0

7. Tézisfüzet irodalmi hivatkozásai

1. Cheng H., Song L.-S., Shirokova N., González A., Lakatta E. G., Ríos E., Stern M. D. (1999). *Amplitude Distribution of Calcium Sparks in Confocal Images: Theory and Studies with an Automatic Detection Method*, Biophysical Journal 76 : 606 - 617.
2. Song L. S., Stern M. D., Lakatta E. G., Cheng H. (1997). *Partial depletion of sarcoplasmic reticulum calcium does not prevent calcium sparks in rat ventricular myocytes.*, J Physiol 505 (Pt 3) : 665-675.
3. Starck J.-L., Bijaoui A., 1998. *Image Processing and Data Analysis*.

Tézisfüzet irodalmi hivatkozásai

- The Multiscale Approach*. Cambridge University Press, .
4. von Wegner F., Both M., Fink R. (2006). *Automated Detection of Elementary Calcium Release Events Using the \hat{A} Trous Wavelet Transform*, Biophysical Journal 90 : 2151 - 2163.

1. Introduction

The main topic of this thesis are computer based methods used by a specific field of research in physiology and biophysics: calcium signaling in muscle cells. As a biological messenger, intracellular calcium plays an important role in muscle excitation-contraction process. Intracellular local calcium concentration changes induce the muscle contraction, these are termed intracellular calcium release events in muscle cells. They have been first observed in 1993 by methods based on fluorescence imaging.

One of the most used instrument in the last two decades for capturing the phenomena located in a few microlitre volume has been the confocal microscope. The method is based on the usage of fluorescent dyes excited by the laser beam of the microscope.

In this area measurements are controlled by computers, moreover, evaluation of the results need also computational techniques. Confocal microscopes register signals as one, two or multidimensional images, in consequence measurement interpretation is based on methods used in image and signal processing. Some of the applied image processing methods belong to classical methods, some to special methods established in fluorescent imaging.

The biophysical and physiological parameters appear as main features of these events, and are calculated traditionally by numerical methods, notably the input of these calculations are microscope registered data of detected events.

Investigation of elementary calcium events is based on computer aided visualization, event locations on images are marked by manual or automatic procedures. Analysis of confocal images is a complex procedure, the number of images produced during a research study might be of hundreds, and in consequence automatic

Introduction

procedures are needed in analysis. In addition, due to the high level of noise in these images, some of the events are difficult to detect by eyes, therefore computer based detection has delivered objective methods from the beginning of these research studies.

Background of this thesis is an ongoing research activity targeting the study of elementary calcium release events in muscle cells organized at the Department of Physiology, Research Centre for Molecular Medicine, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen.

2. Goals of the thesis

The primary goal of the thesis was to adapt well known computer based methods to this field of research, the secondary goal was to develop new methods for the area. My research and developmental activity included the following:

- a) Analysis of line-scan confocal images based on image and signal processing methods. The images were registered at the Department of Physiology during research studies of elementary calcium release events. The first period of these research programs was characterized by the recording of classical line-scan images (scanning period around 1 ms/line).
- b) Study of elementary calcium events in skeletal muscle by calculating biophysical parameters needed for statistical processing, first of all by applying known and generally accepted methods. Calculating event characteristic features for cases when no established method exists, like in the case of calcium „*ember*“-s.
- c) Study of efficiency and reliability of elementary calcium event detection methods on line scan images. Our intent was to specify guidelines, how to set up algorithm

configuration in order to achieve the best results in experimental data analysis.

- d) Adoption of event detection and parameter calculation methods used for classical line-scans to the analysis of high frequency line scan images. Events on high frequency line scans (scanning period $\sim 50 \mu\text{s}/\text{line}$) appear with a different calcium event kinetics.
- e) Implementation of a software library and analysis programs for the above mentioned research activities.

3. Computer based methods

Observation of elementary calcium events is achieved by measurements (images) registered by confocal microscopy. At the Department of Physiology two instruments were used to generate images: the Zeiss LSM510 META and the Zeiss LSM LIVE. The measurements were carried out on specially prepared skeletal muscle fibers of frog, rat and mouse. During our work first of all line-scan images were used, known as the best time related information capturing scanning method. Generally, this method provides the highest confocal scanning frequency, as a consequence the elementary events are observed in the best way regarding calcium kinetics. Scanning period of the LSM 510 META is around milliseconds, in the case of the LSM LIVE this value is $50 \mu\text{s}/\text{line}$, in consequence kinetics appear more precisely.

For the analysis of line-scan images following methods were used:

- a) image enhancing and preprocessing methods,
- b) event detection methods,
- c) biophysical parameter calculations by numerical methods,
- d) statistical analysis of these parameters.

3.1. Image enhancing and preprocessing methods

In order to apply preprocessing to images, known methods from the area of intracellular fluorescence imaging were used, namely image normalization and photobleaching correction. From classical image processing methods spatial filters were applied, like enhancing images by median or mean filters. These procedures are generally accepted as usual practice during analysis of confocal images based on fluorescence.

3.2. Detection of events

Known procedures to detect elementary calcium events on line scan images are presented in the *Methods* chapter of the thesis. Historically a detection method based on a double threshold procedure was first introduced in this field, later the method was used by various research groups (Song et al. 1997; Cheng et al. 1999). A modified version of the algorithm was used also in this research work, as a first tool in event detection on low speed line-scans.

In the second part of our work the approach was changed, and a discrete wavelet transform based method was used. The method had been introduced by Starck and Mourtagh in astronomical image analysis (Starck et al. 1997) and later was applied to confocal line-scans by von Wegner (2006). The transform is known as the à trous or stationary wavelet transform. The used wavelet is based on the cubic B spline scaling function, whose properties make it suitable for biological and medical signal and image processing (compact support, generating simple and fast algorithms, symmetric shape, and optimal time-frequency locating properties).

The transform serves as basis for some elementary signal processing operations, like noise filtering and signal or shape

detection. The original signal is transformed to wavelet coefficients (levels, same size as the original signal), the frequencies of the signal appear localized in space or time (according to the coordinates of the signal) on a dyadic scale. The resulting *multiresolution support* is suitable for signal analysis. Detection of shapes is a common usage of the method, but various features for classification tasks might be also extracted. The transform performing algorithm is fast, has a simple implementation and is separable in multiple dimensions.

3.3. Calculation of biophysical parameters

Statistical analysis and classification of elementary calcium events is based on the calculated biophysical parameters. Parameters are calculated from measured data using numerical methods. For typical events like calcium *sparks* (having short duration, 20-30 ms) parameter calculation methods are well established, consequently these known methods were used (parameters describing the temporal and spatial evolution of sparks observable on line-scans). Alternatively, for cases when no generally accepted method was given (like the case of long lasting - duration > 100 ms - calcium *ember* events) new parameter calculation method was developed.

Some parameters result as features from pixel level data, others are calculated by numerical methods, particularly curve fitting is used frequently. In most of the cases Levenberg-Marquart method was used for nonlinear curve fitting.

3.4. Software

To solve the practical tasks related to data analysis we used the MATLAB (*The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States*) environment. As a result, we developed a function library containing all our basic algorithms for calcium event analysis, in addition two GUI based applications and automatic analysis

Computer based methods

methods were implemented.

4. Results

4.1. Analysis performed by classical methods

Based on previous scientific results and the experience in the Department of Physiology, we developed a function library and a GUI based line-scan analysis program. The following analysis related tasks were solved:

- a) As image preprocessing procedure a method for line-scan normalization and photobleaching correction was developed.
- b) A modified version of the classical double thresholding detection algorithm was introduced.
- c) Methods were presented for calcium event parameter calculations (amplitude, FWHM, FTHM, rise time, duration). The parameters were used in statistical comparative studies.
- d) The parameters of low amplitude calcium *embers* were calculated by a method developed during the research.

To correct photobleaching effects an algorithm based on the exponential or biexponential characteristics of the process was developed. This is an intensity correction procedure, needed for parameter calculations in case of line-scan images. Normalization of images was performed by a proprietary implementation of the classical normalization algorithm used in the research field.

During the first part of our work we used our own implementation of the double threshold algorithm for detection. The implementation is configurable in the event confirmation phase of the algorithm (by selecting a shape as the confirmation area or by

defining conditions for t and x directions on the second threshold area).

During the beginning of calcium sparks research (1999-2003) methods have been developed for parameter calculations, correspondingly we used also these methods. We solved the problem of detection and data selection for parameter calculations. Numerical methods were specified to calculate the following spark parameters: amplitude, full width at half maximum (FWHM), rise time, full time at half maximum (FTHM) and duration. The parameters of sparks were used in control group based research projects. By using generally recognized methods, results are comparable with previous research works.

Automatic analysis of a large number of images was solved, in addition interactive methods for researchers were also provided for the researchers at the Department of Physiology. Namely calcium events are selectable manually also, and parameter calculations are performed on the selected area.

Due to lack of parameter calculation methods for calcium *ember* events, a method was specified and used in Lukács et al. (2008). This method permits the analysis of long lasting (duration > 100 ms) calcium events generated by the opening of one or few ion channels.

A software function library was developed, algorithm implementations are usable to form analysis chains for confocal images. For visualization and interactive work a GUI based program was developed. Analysis of large number of images is now possible through automatic procedures.

Various research projects at the Department of Physiology used these procedures for elementary calcium event analysis.

A GUI based interactive program was developed to supervise the analyses procedures during research studies. By using these

methods and software implementations calcium spark and ember like events analysis on confocal line-scan images is achievable. Software implementation is presented as a MATLAB function library named LSM.

4.2. Using the à trous transform in confocal image analysis

In order to raise the reliability and sensitivity of the detection algorithm some of our algorithms were rebuilt on wavelet based solutions. The one and two dimensional à trous algorithm based on cubic B-spline scaling functions was used. The foundation of these methods had been given by Strack and Mourtagh in astronomical image analysis, first use for confocal images belongs to von Wegner.

An own implementation for the one and two dimensional transform was developed during our work. The two dimensional transform fits well for detection algorithms for nearly isotropic events in image processing. This was used for:

- (a) Noise filtering: Based on Starck and Mourtagh's method a noise filtering algorithm was implemented. The implementation has selectable threshold method (hard, soft, and affine). Spark detection is resolved on images with high noise level if previously noise filtering is applied. The filter level is controlled by a parameter (δ).
- (b) Two dimensional event detection: a two dimensional detection algorithm for line-scan images was implemented based on the method proposed by Starck and Murtagh. The method was used in experiments targeting calcium sparks. The threshold level used by the detection algorithm is also controlled by a parameter (τ).

Consequently, to improve the results of wavelet based detection, next the effects of parameters on the reliability and sensitivity of

detection were evaluated.

Due to the photon noise present in confocal images, the à trous wavelet based detection method is not robust, hence we proposed a prefiltering algorithm targeting these noise patterns. A filter for removing spikes based on the first two wavelet levels of the à trous transform was introduced. The method considers the coefficients of the first two à trous wavelet transform levels to detect high frequency components of images. The high frequency image positions are transformed by a threshold procedure using parameter H .

As for the analysis of à trous wavelet based detection, testing procedures to evaluate reliability and efficiency were constructed. As input for the analysis simulated images were used, created from simulated events and noise patterns. Noise was simulated by two methods: generated Gaussian background noise and noise obtained from experimental image backgrounds (images without the presence of eye detectable calcium events) with a suitable processing method. Events simulation was solved by a spark averaging procedure (as input in focus experimental sparks are used) or by processing the output of intracellular calcium reaction-diffusion simulation in 3D (scanning the diffusion space along a line and simulating the presence of the point spread function by blurring).

Therefore during the testing procedure three problems were studied:

- comparison of the double threshold detection (classical) and the à trous wavelet based algorithm,
- improvements obtained by using a spike filter as

Results

preprocessing phase for the à trous algorithm,

- relation between detected and real spark parameters on simulated images (amplitude and full width at half maximum).

The classical method was compared with the à trous method on simulated images with background generated from experimental images. In cases of low spark amplitude ($A < 0.8 \Delta F/F_0$), the latter has greater sensitivity and is more reliable than the classical algorithm. To our knowledge, simulated images based on experimental noise distribution were first time used in calcium event detection tests.

In the case when prefiltering of photon noise is applied, the detection based on the à trous wavelet transform tends to be more reliable, false positive detection rate decreases considerably, whereas the decrease of sensitivity is negligible.

Following the testing procedures two statistical parameters were calculated: the positive predictive value (PPV, probability of a detected event of being a true event) and the sensitivity (S, expressing the probability of detection). The parameters are calculated for amplitudes of the embedded simulated sparks given in relative fluorescent units.

Detection tests were executed on backgrounds generated from Gaussian and experimental noise. The notation of PPV_{50} and S_{50} were used to indicate the relative fluorescence value of spark amplitude where the probability of positive prediction and sensitivity is 0.5.

Simulated line scan images of 1.54 ms scanning period were used in comparative tests, background was generated from Gaussian noise or experimental data based noise (with identical background signal to noise ratio, $BSNR$ defined as $BSNR = m/\sigma$, m mean value, σ standard deviation of noise data). The values given in the following

paragraphs are valid for BSNR = 3.5.

Concerning sensitivity, in cases of Gaussian background noise results obtained for classical and wavelet based detection are nearby. However, the wavelet based detection performs considerable superior results on simulated images generated from experimental background. In case of background generated from experimental images, the PPV₅₀ value of the à trous algorithm based detection is by 0.3 relative fluorescence unit larger (0.287 compared to 0.59) then the value obtained for the classical method.

Moreover, when the proposed spike filter is used, the sensitivity of the wavelet detection algorithm suffers practical no modification (compared to the value without spike filter), in contrast the PPV₅₀ value is improved (0.21 compared to 0.32).

With respect to experimental images obtained at the Department of Physiology, it was concluded that for detection of calcium sparks (in mammals) on line scan images the optimal parameters are $\delta=4.0$, $\tau=3$, $H=4.5$.

As for the topic of detected and real spark parameters, tests were run in order to detect calcium sparks of various sizes. In cases of calcium sparks of amplitude > 0.4 relative fluorescence units the linear relation between detected and real spark amplitude was confirmed. By sparks with amplitude < 0.4 $\Delta F/F_0$ detected amplitude contains a bias due to the presence of the noise. The detected FWHM generally underestimates the real FWHM and has no dependence on spark amplitude.

The wavelet based analysis algorithms were included in the LSM and LIVE function libraries. In order to obtain the PPV and S values, a procedure was implemented, as a result these parameters

Results

are calculable for other simulated images with different noise patterns and simulated sparks.

4.3. Analysis of high frequency line-scan images

The detection method based on the à trous transform was used on high frequency line-scan images also. On these images sparks are recorded with 30 times higher frequency, thus the time dimension is different compared to classical line-scans.

The two dimensional à trous transform fits best to detection of events with isotropic or nearly isotropic extension in the two dimensions. In cases when the studied event is not isotropic, the detection performs better by using the one dimensional transform. Considering the size (dimension) in time of the events, the optimal wavelet level of the one dimensional à trous transform is determined. In consequence, the method based on the one dimensional transform is generally usable on high frequency line-scans and XY images.

Due to the lack of isotropic extension, detection is performed by applying the one dimensional à trous transform according to the time coordinates and using two wavelet levels for thresholding. As wavelet coefficients levels 6-7 or 8-9 of the transform give the best results. Selection of levels depends on the duration in time of the targeted events and is estimated considering the duration of the scaling function. The method was applied successfully to detect calcium sparks on high frequency line-scans.

Furthermore, methods were created for spark parameter calculations on high frequency images. Due to the high frequency scanning, the images provide better possibility to study the kinetics of calcium sparks. Parameters like amplitude and FWHM are calculable for the whole duration of the event (or at least for a

considerable part of the event time coordinates).

For high frequency events a method was given to calculate a parameter in order to characterize the dynamics of calcium release, namely the slope of the signal mass. The method was presented in conference presentations recently and a research paper is on the way.

To work with LSM LIVE images the LIVE software function library was implemented. The user is allowed to select various detection and parameter calculation algorithms. Moreover, it is simple to create new analysis chains for specific experimental images. As detection methods the classical, the one and two dimensional à trous wavelet based methods are selectable. The LIVE package assures the analysis of various confocal images in the laboratory.

4.4. Usage of the results

Line-scan images created during research project studied calcium sparks may differ considerably, concerning noise level and event shape. In some cases the parameter calculations should be also modified. Our software function library permits a flexible usage in order to create analysis chains for various images in short time. They can be applied for x-t, xy or xy-t images. The chains can be run by the LIVE graphical interface.

5. Improvements

Some possible improvements of this work:

- a) Use of an image server as confocal microscopy image repository, and accessing the server from the LIVE GUI. An accepted solution for our area is OMERO (The Open Microscopy Environment,

Improvements

<http://www.openmicroscopy.org>). A solution to connect the LIVE interface to an OMERO instance is on the way.

- b) Most of the algorithms used in our analysis chains are suitable for parallel processing on GPU-s or multicore processors. Rewriting the algorithms for parallel processing is a future challenge.
- c) The use of machine learning methods for detection.

6. References

1. Cheng H., Song L.-S., Shirokova N., González A., Lakatta E. G., Ríos E., Stern M. D. (1999). *Amplitude Distribution of Calcium Sparks in Confocal Images: Theory and Studies with an Automatic Detection Method*, Biophysical Journal 76 : 606 - 617.
2. Song L. S., Stern M. D., Lakatta E. G., Cheng H. (1997). *Partial depletion of sarcoplasmic reticulum calcium does not prevent calcium sparks in rat ventricular myocytes.*, J Physiol 505 (Pt 3) : 665-675.
3. Starck J.-L., Bijaoui A., 1998. *Image Processing and Data Analysis. The Multiscale Approach*. Cambridge University Press, .
4. von Wegner F., Both M., Fink R. (2006). *Automated Detection of Elementary Calcium Release Events Using the À Trous Wavelet Transform*, Biophysical Journal 90 : 2151 - 2163.