



Kalcium felszabadulási események számítógépes elemzése

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szabó László Zsolt

Témavezetők: Dr. Pethő Attila és Dr. Csernoch László

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

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Informatikai Tudományok Doktori Iskola Digitális Kommunikáció programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2013.

.....

Szabó László Zsolt

jelölt

Tanúsítom, hogy Szabó László Zsolt doktorjelölt 2003.- 2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola Digitális Kommunikáció programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2013.

.....

Dr. Pethő Attila

témavezető

Tanúsítom, hogy Szabó László Zsolt doktorjelölt 2003.- 2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola Digitális Kommunikáció programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2013.

.....

Dr. Csernoch László

témavezető

Kalcium felszabadulási események számítógépes elemzése

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Informatika tudományágban

Írta: Szabó László Zsolt okleveles számítástechnika szakos mérnök

Készült a Debreceni Egyetem Informatikai Tudományok doktori iskolája
(Digitális Kommunikáció programja) keretében

Témavezető: Dr. Pethő Attila és Dr. Csernoch László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	

A doktori szigorlat időpontja: 200...

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 201...

Tartalomjegyzék

1.Bevezető.....	1
1.1.Számítógépes feldolgozások a kalciumfelszabadulási események kutatásában.1	
1.1.1.Kép- és jelfeldolgozás területeiről vett módszerek.....	1
1.1.2.Numerikus számítási módszerek.....	2
1.1.3.Mérések megjelenítése.....	2
1.1.4.Mérési adatok számítógépes menedzselése.....	3
1.2.A tézis felépítése.....	4
1.3.Az elemi kalciumfelszabadulási események élettani és biofizikai háttere.....	5
1.3.1.A kalcium szerepe élettani folyamatokban.....	5
1.3.2.Az izomsejt felépítése.....	5
1.3.3.A kalcium szerepe az izomsejt működésében.....	7
1.3.4.Az excitációs-kontrakciós kapcsolat.....	8
1.3.5.A sejten belüli kalcium diffúziós szemlélete.....	10
1.3.6.Kalciumfelszabadulási események, eseménytípusok.....	13
2.Célkitűzések.....	15
3.Módszerek.....	16
3.1.Kísérleti körülmények, izomrost előkészítése és preparálása.....	16
3.2.A konfokális mikroszkóp használata kalciumfelszabadulási események tanulmányozásában.....	16
3.2.1.A konfokális mikroszkóp.....	16
3.2.2.Fluoreszcenciára épülő mérések.....	17
3.2.3.Line-scan képek.....	19
3.3.Konfokális mikroszkóp képek jellemzői.....	20
3.3.1.A jel-zaj szint jellemzése.....	20
3.3.2.A háttér fluoreszcencia.....	22
3.3.3.A fotokioltság.....	23
3.3.4.A pont-kiterjedés függvény hatása.....	24
3.4.Kép és jelfeldolgozási módszerek.....	25
3.4.1.Zajmodell.....	25
3.4.2.A pont-kiterjedés függvény hatásának kijavítása.....	25
3.4.3.Az à trous wavelet transzformáció alkalmazása.....	27
3.4.3.1.Jelfeldolgozás wavelet transzformációval.....	27
3.4.3.2.A diszkrét wavelet transzformáció.....	29
3.4.3.3.Az à trous algoritmus.....	30
3.4.3.4.A két dimenziós à trous algoritmus.....	35
3.4.3.5.Objektum azonosítás (detektálás) à trous transzformációval.....	37
3.4.4.Zajszűrés.....	37
3.4.4.1.A zaj kezelésére alkalmazott módszerek konfokális képeknél.....	37
3.4.4.2.Zajszűrés a starlet transzformációval.....	38
3.4.4.3.Fotonzaj szűrés.....	41
3.5.Line-scan képek normalizálása.....	42
3.5.1.A normalizálási eljárás.....	42
3.6.Eseménydetektálási módszerek line-scan képeken.....	42
3.6.1.A detektáló algoritmusok teljesítményének jellemzői.....	43
3.6.2.A hagyományos, kettős küszöbölést alkalmazó algoritmus.....	44

3.6.3.A kettős küszöbölést alkalmazó algoritmus változatai.....	46
3.6.4.Sejtautomatát használó megközelítés.....	47
3.6.5.Lokális maximum pontok kiemelése.....	47
3.6.6.Statisztikai módszerek.....	48
3.6.7.Wavelet transzformációt alkalmazó módszerek.....	48
3.6.8.Mintaillesztés.....	48
3.6.9.Szórás stabilizálásának alkalmazása.....	50
3.7.Kalciumfelszabadulási események jellemzői.....	51
3.7.1.Tanulmányozott események típusai.....	51
3.7.2.Ca spark paraméterek 1-2 ms körüli pásztázási sebességnél.....	52
3.7.3.A sparkok időbeli profiljának jellemzői.....	54
3.7.4.A spark térbeli jellemzői.....	55
3.7.5.A signal mass függvény.....	56
3.8.Kalcium „ember” típusú események jellemzői.....	58
4.Eredmények.....	59
4.1.Elemzés a klasszikus módszerrel.....	59
4.1.1.Normalizálási és fotókioltás korrekciós eljárás.....	59
4.1.2.Detektálás kettős küszöböléssel.....	62
4.2.Spark paraméterek számítása.....	65
4.2.1.line-scan méréseken észlelt sparkok jellemzői.....	65
4.2.2.A spark időbeli profiljához kötődő paraméterek.....	66
4.2.3.A spark térbeli profiljához kötődő paraméterek.....	68
4.2.4.Kalcium „ember” típusú események paraméterei.....	69
4.3.Elemzés wavelet módszerrel.....	73
4.3.1.Zajszűrés.....	73
4.3.2.Sparkok detektálása 1.5 ms körüli pásztázási sebességnél.....	75
4.3.3.Foton zaj szűrése.....	79
4.3.4.Ember típusú események detektálása.....	80
4.4.Az algoritmusok megbízhatóságának és hatékonyságának elemzése.....	83
4.4.1.Az elemzés során használt képek.....	83
4.4.2.A hagyományos és wavelet alapú elemzés összehasonlítása.....	85
4.4.2.1.Összehasonlítás szimulált képeken.....	85
4.4.2.2.A küszöbölési operátor.....	88
4.4.2.3.Az események mérete.....	89
4.4.2.4.Tüske szűrés alkalmazása.....	90
4.4.2.5.Szimulált események paraméterei.....	90
4.4.2.6.Összehasonlítás kísérleti képeken.....	93
4.5.A kiértékelési módszerek használata kísérletekben.....	93
5.Diszkusszió.....	95
5.1.Kép javítás és előkészítés.....	95
5.2.Detektálási módszerek.....	96
5.3.Paraméter számítás.....	99
5.4.A line-scan mérések jellegéből adódó kérdések.....	100
5.5.Alkalmazás nagyfrekvenciás konfokális méréseken.....	102
5.6.LSM LIVE nagyfrekvenciás képek elemzése.....	102
5.6.1.Detektálás.....	102
5.6.2.Paraméterszámítás.....	103

5.7.Következtetések.....	105
6.Irodalomjegyzék.....	106
Összefoglaló.....	113
Summary (angol összefoglaló).....	117
Függelékek.....	121
A. A felhasznált konfokális mérések adatai.....	121
LSM510 és LSM510 META mérések.....	121
LSM LIVE mérések.....	121
Tesztekben és példákban használt mérések.....	123
Tesztekben és példákban használt események.....	124
B. Grafikus interfésszel rendelkező alkalmazások, függvénycsomagok.....	124
Az LSM grafikus felület.....	125
LIVE grafikus felület.....	125
C. Mesterséges sparkok előállítása szimulációval.....	127
D. Publikációk jegyzéke.....	127
E. Köszönetnyilvánítások.....	130

Ábrajegyzék

1.1. ábra. A vázizom felépítése.....	6
1.2. ábra. A rianodinreceptor.....	9
1.3. ábra. Szimulált line-scan kép.....	12
1.4. ábra. Konfokális mikroszkóppal rögzített kalcium spark.....	13
3.1. ábra. Konfokális mikroszkóp és felépítése.....	17
3.2. ábra. A fluo-3 festék kalcium függő emissziós spektruma.....	18
3.3. ábra. XY és Xt pásztázás.....	19
3.4. ábra. A starlet transzformációban alkalmazott skála függvény és wavelet.....	33
3.5. ábra. Az egydimenziós starlet transzformáció alkalmazása line-scan jelre.....	34
3.6. ábra. A starlet transzformációval előállított wavelet együttható szintek.....	36
3.7. ábra. Zajszűrés line-scan képen.....	41
3.8. ábra. Tipikus line-scan módszerrel rögzített spark.....	52
3.9. ábra. Line-scan módszerrel rögzített spark térbeli ábrázolása.....	53
4.1. ábra. line-scan mérés részlete.....	59
4.2. ábra. Fotókioltás korrekciója.....	61
4.3. ábra. line-scan mérés normalizált alakja.....	62
4.4. ábra. A kettős küszöbölést megvalósító algoritmus folyamatábrája.....	64
4.5. ábra. Kontroll mérésen detektált spark paraméter számításra használt területe.....	65
4.6. ábra. A spark időprofilját adó exponenciálisok.....	67
4.7. ábra. A spark térbeli profilja.....	69
4.8. ábra. Kalcium „ember” típusú esemény normalizált képen.....	70
4.9. ábra. Kalcium „ember” jelenség időbeli lefutása.....	71
4.10. ábra. Kalcium „ember” jelenség térbeli profilja.....	72
4.11. ábra. Spark és ember jelenségek egymásra tevődése line-scan képen.....	72
4.12. ábra. Wavelet módszerrel történő detektálás folyamatábrája.....	74
4.13. ábra. Küszöbölési operátorok hatása a zaj szűrt képre.....	76
4.14. ábra. Szimulált line-scan kép és a starlet transzformáció első öt szintje.....	78
4.15. ábra. Ember típusú események automata detektálása I.....	82

4.16. ábra. Ember típusú események automata detektálása II.....	84
4.17. ábra. Szenzitivitás és PPV érték a relatív amplitúdó függvényében.....	86
4.18. ábra. A fotonzaj hatása a wavelet alapú detektálási algoritmusra.....	87
4.19. ábra. line-scan képek háttérzajára jellemző hisztogram.....	88
4.20. ábra. Szenzitivitás és pozitív prediktív érték.....	90
4.21. ábra. Eredeti és detektált paraméterek közti összefüggés.....	91
4.22. ábra. Spark paraméterek eloszlása kísérleti képek elemzése esetében.....	92
5.1. ábra. MRS maszkok használata detektálásra.....	97
5.2. ábra. Wavelet módszerrel zajszűrt spark.....	98
5.3. ábra. Spark paraméter számítás normalizált és zajszűrt képen.....	100
5.4. ábra. Sparkok morfológiai paramétereinek empirikus eloszlása.....	101
5.5. ábra. LSM Live készülékkel készült nagyfrekvenciás line-scan.....	102
5.6. ábra. Paraméterszámítás nagyfrekvenciás LSM Live képen.....	104

Táblázatjegyzék

3.1. táblázat. A szórás terjedése a wavelet együtthatókban.....	39
4.1. táblázat. A B3 spline függvény diadikus pontokon skálázott méretei.....	77
4.2. táblázat. A háttér zaj hatása a detektálási statisztikára.....	89
5.1. táblázat. A starlet transzformáció skálafüggvényeinek kiterjedése.....	103

Rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
CCD	Charge Coupled Device
DHPR	dihidropiridin-receptor
DWT	Discrete Wavelet Transform
ECC	Excitation-Contraction Coupling
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FTHM	Full Time at Half Maximum
FWHM	Full Width at Half Maximum
IUWT	Isotropic Undecimated Wavelet Transform
MCa	maurocalcine
MRA	Multiresolution Analysis sokskálás analízis
MRS	Multiresolution Support, sokskálás felbontás
MSV	Multiscale Vision Model
PMT	Photo Multiplier Tube
PPV	Positive Predictive Value

ROC	Receiver Operating Characteristics
RyR	ryanodine receptor
S	Sensitivity
SERCA	Sarco/Endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
SM	signal mass
SNR	Signal to Noise Ratio
SNR	Signal to Noise Ratio
SR	sarcoplasmic reticulum
TC	terminal cisterna
UWT	Undecimated Wavelet Transform

1. Bevezető

1.1. Számítógépes feldolgozások a kalciumfelszabadulási események kutatásában

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 összehúzódását előidéző folyamatokat foglalja magába, amelyeknek fontos szereplője a sejten belüli kalcium, mint biológiai jelátvivő anyag. A tanulmányozott folyamatot az először 1993-ban rögzítették konfokális mikroszkóppal, fluoreszcencia alapú képalkotó módszerekkel (Cheng és mtsai. 1993). A néhány mikron átmérőjű térben lezajló események rögzítésének eszköze a konfokális mikroszkóp volt a kutatások utóbbi 20 esztendejében. A folyamat néhány részlete mindmáig nem vált pontosan ismertté, ezért a témában kiterjedt kutatások folynak napjainkban is. A tanulmányozott jelenséget részletesen a 1.3 fejezetben ismertetem.

Ezen a területen a mérési folyamatok vezérlése és rögzítése is számítógéppel történik, és szükség van számítógépes módszerekre az eredmények kiértékelésénél is. A mikroszkóp optikai képét visszaadó analóg jel digitális mintavételezéssel kerül rögzítésre, egy-egy kísérlet folyamán a rögzített mérések száma százas nagyságrendű is lehet. Mivel a rögzített események gyakran szemmel is nehezen észlelhetőek, már a kutatások elején felmerült annak a szükségessége, hogy a nagyszámú mérés elemzését objektív számítógépes módszerekre bízzák. Az alábbiakban röviden utalok azokra a területekre ahonnan ezek a feldolgozások módszereiket veszik, később munkám *Módszerek* fejezetében részletesen bemutatom az általam is alkalmazott módszereket.

1.1.1. Kép- és jelfeldolgozás területeiről vett módszerek

Az egy, két vagy több dimenziós jelek kép és jelfeldolgozás területén alkalmazott módszerekkel vizsgálhatóak. Mikroszkópos képek feldolgozása során a jelenleg használt klasszikus képfeldolgozási módszerek jelentős része használható (Wu és mtsai. 2008), így például a térbeli és frekvencia tartománybeli transzformációk és szűrések, geometriai transzformációk, morfológiai műveletek, klasszikus képjavító módszerek (küszöbölés, hisztogram kiegyenlítés, Fourier és wavelet együtthatókat alkalmazó szűrések).

A jelekben kimutatható kalcium felszabadulási események tér és időbeli lokalizációjára (detektálás, szegmentálás) több jel-, illetve képfeldolgozási módszer kerül alkalmazásra. Mivel a térben egy dimenziós, de időben ismételt mérések is „kép” formában jelennek meg, ezt a feladatot képfeldolgozási módszerekkel lehet megvalósítani.

Az elvégzendő feladatok közé tartozik a jelekben jelenlevő magas zajszint kezelése,

illetve a konfokális mikroszkóp és a fluoreszcenciára épülő képalkotást figyelembe vevő jel helyreállítási módszerek alkalmazása.

Ezekre a kérdésekre a konfokális mikroszkóp képek feldolgozása során speciális módszereket alakítottak ki, mint a fluorofórokra jellemző hatások: fotókioltás és pont kiterjedés függvény hatásainak kezelése, dekonvolúciós eljárások (Pawley 2006). A mikroszkópokban használt detektorok (fényelektromos sokszorozó és töltéscsatolt eszközök) jellegzetes zajt hoznak létre a képeken, így ennek kezelése sajátos feladat.

Az utóbbi években az említett feladatok egy részének elvégzésére sikerrel alkalmaztak wavelet felbontásra épülő módszereket, ebben a munkában erre a vonatkozásra is építettem.

1.1.2. Numerikus számítási módszerek

Az elemi kalcium események értelmezése, illetve osztályozása a térben és időben lezajló eseményekre jellemző biofizikai paraméterek alapján történik, amelyeket a mérési adatokból lehet meghatározni a tanulmányozott események lokalizációja után. Ezeket a paramétereket jellemzően numerikus számításokon keresztül nyerik, ami a legtöbb esetben az események evolúcióját jellemző függvények numerikus módszerekkel történő illesztését, illetve a kapott paraméterezett görbékből végzett jellemzők számítását jelenti. A paraméterszámítások a legtöbb esetben nem lineáris görbék illesztésével történnek.

Az izomsejteken belüli kalciumfelszabadulási események diffúziós-reakciós modellekkel ábrázolhatóak (lásd 1.3.5), ezek tanulmányozása numerikus módszerekkel végezhető el. Bár ebben a munkában csak érintőlegesen használtam diffúzió-reakció szimulációt, a területre jellemző ez a megközelítés. A numerikusan számolt diffúziós térből kinyerhetőek a konfokális mikroszkóp képek által mutatott területek, így alkalmasak hipotézisek vizsgálatára.

A néhány mikrométer sugarú térrészben szimulált diffúziós-reakciós jelenség még mindig makroszkopikusnak számít, tulajdonképpen a jelenség nem pontosan ismert része nanométeres léptékű, kalciumspecifikus receptorok (molekulák) szintjén zajlik, így az utóbbi években a szimulációk erre is fókuszáltak (valószínűségi modellek alkalmazása a receptorok szintjén).

A modellek diffúzió-reakció egyenleteinek numerikus megoldása általában jelentős számítási kapacitást igényel.

1.1.3. Mérések megjelenítése

A kutatások folyamán szükséges biztosítani a biológusok-biofizikusok számára a mérések, képek megfelelő megjelenítését, sok esetben a megjelenítés bejelöléssel, a képek területeihez csatolt bejegyzésekkel társul (bejelölt területre vonatkozó numerikus számítások, illetve megjegyzések). Bár a számítógépes feldolgozások célja a munkának minél magasabb szintű automatizálása (a nagy számú kép, illetve a bejelölések szubjektivitásának kerülése miatt, lásd a következő szakaszt), sokszor

elkerülhetetlen a kézi kijelölések és bejegyzések biztosítása. Így az elemző folyamat feltételezi a megjelenítő és kézi bejelölést végző informatikai megoldások jelenlétét. A szükséges műveletek magukba foglalják a képek végigjárását, részletek megjelenítését, különböző geometriai alakzatok bejelölését, illetve számítások interaktív indítását. A feladat megoldására a jelenleg elterjedt, tudományos kutatásban leginkább használt szoftver környezetek általában alkalmazhatóak. Jelen munkában A MATLAB (*The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States*) szoftvercsomagot használtam ezekre a feladatokra. Megemlítendő, hogy az utóbbi években jelentőset fejlődtek a terület nyílt forráskódú csomagjai, így a speciálisan orvos-biológiai képekre fejlesztett ImageJ (Schneider és mtsai. 2012) környezet, így a munkám egyes részeiben ezt is használtam.

1.1.4. Mérési adatok számítógépes menedzselése

A konfokális mikroszkóppal készült mérések egy vagy több dimenziós (2-5) képek, amelyeket a készülékek gyártótól függő kép formátumba mentenek. Ez leggyakrabban egy saját tervezésű TIF (Tagged Image File Format) fájl és a mérési adatokon kívül a mikroszkópra (lencsék, szűrők, stb.) és a konkrét mérésre jellemző (konfokális apertúra mérete, pásztázási periódus, lézer intenzitás, stb.) meta adatokat tartalmaz. Egy kísérletsorozat alatt több száz, esetenként akár ezres nagyságrendű kép készülhet. A mérések kiértékelése folyamán a képekhez transzformált képek, kép részletek, terület bejelölések, illetve numerikus paraméterek rendelődnek. Ezek típusa és formátuma az általános tapasztalat szerint egy adott jelenség tanulmányozása folyamán sem azonos: a kutatók gyakran folyamodnak új, előre nem meghatározott bejelölések, illetve paraméterek számításához. Ennek következtében ezeknek a társult adatoknak a tárolása rugalmas, alakítható formátumba kell történjen, ezzel párhuzamosan biztosítani kell különböző informatikai eszközökbe (táblázatkezelők, statisztikai feldolgozást végző programok) való importálásukat. Az időben sokasodó képek és járulékos adatok kezelése akár egy kis labor szintjén is komoly menedzselési problémákat vet fel (tárolás és rendszerezés). A kutatást jelentősen megkönnyíti, ha létezik olyan szoftver rendszer amelyik utólag biztosítja a kutatások adataihoz való gyors és jól áttekinthető hozzáférést.

Így a képeket elemző szoftverek (leszűkítve) két alternatíva közt választhatnak. Az elemző szoftvereket asztali alkalmazásként tervezzük, és az adatok menedzselésére nem használunk speciális eszközöket. A képeket fájlrendszeri szinten kezeljük, a csatolt adatokat pedig saját vagy táblázatkezelő szoftverek formátumában tároljuk. Evidens, hogy nagy számú kísérlet után, az időben haladva ez az alternatíva akár egy kis méretű kutató csoport esetében is nehézzé vagy lehetetlenné teszi a koherens hosszú távú tárolási, illetve visszakeresési feladatokat.

A második alternatíva feltételezi a felmerülő feladatok következetes informatikai megoldását. A megoldások általában kliens-szerver architektúrát alkalmaznak, így lehetőség van a tárolási, illetve az időigényes számítási feladatok szerver oldali

megoldására. Egy ilyen rendszer által megoldott fontosabb feladatok például: a különböző eszközök (mikroszkópok) által szolgáltatott adatok közös standard formátumra való átvitele, saját kiterjeszthető adatmodellek alkalmazása; a képek feldolgozásához szerver oldali és kliens oldali hozzáférés biztosítása a tudományos kutatásban alkalmazott elterjedtebb szoftver eszközök és programozási nyelvek részére; a képek meta adatainak relációs adatbázisban való tárolása; a kutatási területek szemantikus leírása szemantikus web és XML alapú leíró nyelvekkel.

A komplex feladatra több kereskedelmi megoldás létezik (különösen orvosi képek tárolásra), és vannak nyílt forráskódú megoldások is, mint a Bisque (Bio-Image Semantic Query User Environment, <http://www.bioimage.ucsb.edu/bisque>) vagy az OMERO (The Open Microscopy Environment, <http://www.openmicroscopy.org>).

Ebben a munkában az adatok kezelésére (tárolás, elemzés, megjelenítés) asztali alkalmazásként a MATLAB tudományos programcsomagot használtam. Így a kép és meta adatok kezelését saját programok végzik, a kimeneti adatokat pedig klasszikus táblázatkezelő szoftverek által olvasható formában állítom elő. Utólag megoldottam az OMERO rendszerben tárolt képek elérését is alkalmazásaimból. Az OMERO hosszú távú használata feltételezi intézmény szintű szerver vagy szerverek fenntartását, amelyek egyrészt az elemzések lefuttatására biztosít annak számítási kapacitást, másrészt megoldják a nagy mennyiségű adat biztonságos tárolását.

1.2. A tézis felépítése

A tézis bevezető részének 1.3 szakaszában az izomkontrakcióhoz kötődő kalciumfelszabadulási események élettani hátterét tekintem át. Fontosnak tartottam a jelenség részletes bemutatását, így az elemzések során tett állítások jobban követhetőek.

A módszerekkel kapcsolatos részben (3 fejezet) a téma irodalmában fellelhető és általam is alkalmazott jel- és képfeldolgozási, valamint numerikus módszerekkel foglalkozom. A 4-dik, eredményeknek szentelt fejezet az általam végzett megvalósításokat mutatja be. A diszkusszióban (5 fejezet) a bemutatott módszerek gyakorlati alkalmazása során felmerült kérdéseket tárgyalom. A tézis függelékében néhány technikai részletet, illetve a munka során alkalmazott szoftvereket mutatom be.

A módszerek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Élettani Intézetében folytatott kísérletek folyamán kerültek alkalmazásra.

1.3. Az elemi kalciumfelszabadulási események élettani és biofizikai háttere

1.3.1. A kalcium szerepe élettani folyamatokban

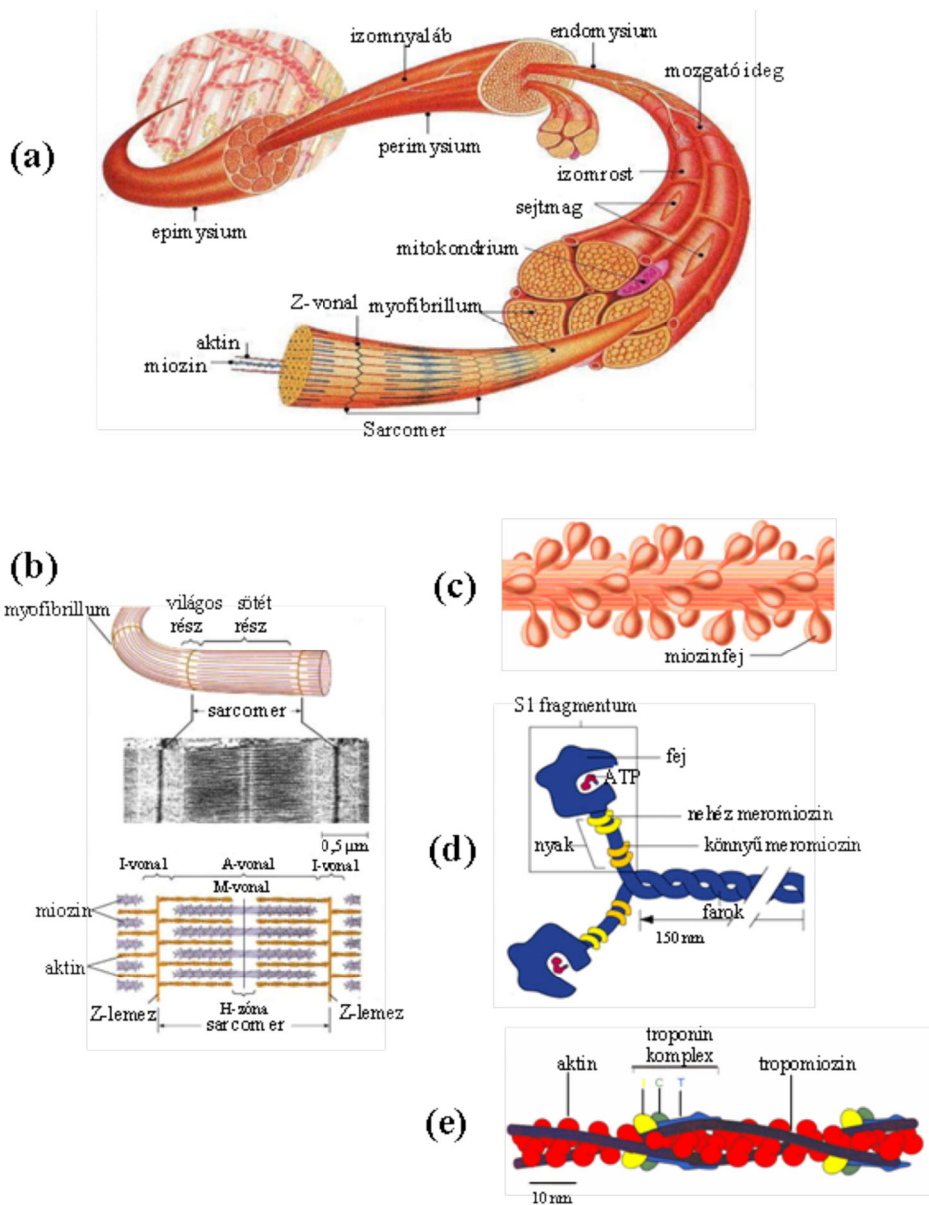
A sejten belüli kalcium sok élettani folyamatban vesz részt, a legfontosabb másodlagos hírvivő. Információ hordozó szerepe sejtmembránon keresztüli mozgással létrehozott biológiai áramok kialakításában, illetve proteinekhez történő kötődésén keresztül valósul meg. Bár kötődési folyamatai egyszerűek, azáltal, hogy sokszor ugyanazon a sejten belül ellentétes folyamatokat is létrehozhat, komplex jelenségek kiváltásában és ellenőrzésében vesz részt. Az utóbbi évtizedekben igen élénk kutatás kötődött a kalcium helyi, sejtekben megvalósított üzenet közvetítő szerepéhez. Mindez nem egy bizonyos élettani jelenséget érintett, izom, ideg és más sejtekben is fontos szerephez jut az ion formájában jelenlevő kalcium (Cheng és mtsai. 2008). Ebben a munkában a vázizom sejtjeiben történő (Baylor 2005; Csernoch 2007), sejten belüli kalciumfelszabadulási jelenségek tanulmányozását segítő számítógépes jelfeldolgozási módszerekkel foglalkozunk.

1.3.2. Az izomsejt felépítése

Az izomszövetek szövettanilag eltérő típusokat mutatnak (szív, sima- illetve vázizom), de a sejtek szintjén hasonló összehúzódnási mechanizmusra épülnek, az ún. aktin-miozin rendszerre. Munkánk folyamán vázizmon történő mérésekre alkalmazunk kiértékelési módszereket, ezek a módszerek alkalmazhatóak szív-, sima- illetve vázizmon végzett kísérletek esetében is. A továbbiakban röviden ismertetjük azt a biofizikai-élettani hátteret amely kontextusában ezeket alkalmaztuk.

A vázizom (1.1 ábra) izomrostok kötegeiből épül fel, ezek egyenként többmagvú izomsejtek, amelyeket sajátos sejtmembrán, a sarcolemma, vesz körül, ez a kontraktilis fehérjéken kívül a sarcoplazmát (az izomsejt citoplazmáját), valamint több sejtmagot, mitokondriumokat és más sejtalkotókat borít be. A körülvelt térben enzimek, aminosavak és más anyagok találhatóak még oldott állapotban. A vázizomsejtek átmérője 10-100 μm , hosszuk 20 centiméterre is kiterjedhet. A rost (izomsejt) szarkoplazmájának jelentős részét kontraktilis fehérjék alkotják, ezt nevezzük miofilamentumnak.

Ezek néhány száz miofibrillumot tartalmaznak, amelyek mindegyike az ún. Z-lemezek (1.1 ábra b) révén kb. 2 μm -es szakaszokra oszlik, ezek a sarcomerák. A sarcomerákat mikroszkópos megfigyeléssel két dimenzióban világos és sötét vonalakként lehet elkülöníteni, innen származik az izom harántcsíkoltsága. Ezek a vastag miozin és vékony aktin filamentumok elrendeződése következtében jönnek létre.



1.1. ábra. A vázizom felépítése

Forrás: (Sztretye 2009)

Három dimenzióban a sarcomera két Z-lemez közti hengert képez, a több száz (kb. 2000-ig) aktin filamentum középső szakaszával rögzül a Z-lemezbe, két végük

pedig az egymás után található sarcomerába nyúlik be. Az izom kontrakció a sarcomerák fizikai hosszának megváltozása révén jön létre, ennek kiváltó oka a sejt sarcoplazmájában megnövekedő Ca^{2+} koncentráció. A filamentumok hossza ilyenkor nem változik, de egymáshoz viszonyított elrendeződésük igen (*csúszó filamentum* elmélet).

1.3.3. A kalcium szerepe az izomsejt működésében

Az aktin molekulák szabályozó fehérjékkel együtt vannak jelen (egy fehérje komplexumot képezve, 1.1 e ábra, ezek a tropomiozin és troponin. A Ca^{2+} ionok fogadását a troponin végzi el, amely 4 Ca^{2+} kötőhelyet hordoz. A Ca^{2+} kötődése akkor jönnek létre, ha a sarcoplazma Ca^{2+} koncentrációja megemelkedik (ennek kiváltó okát lásd alább). A troponin leválásának következtében az aktin molekulán miozin kötőhely szabadul fel. Az aktin-miozin kötés létrejöttét a miozin molekula ATP hasító aktivitása biztosítja, ehhez ATP is szükséges. Így az aktin-miozin kötés létrejöttékor a miozin molekulák magukkal húzzák az aktin filamentumot, és egy mechanikai változás jön létre a sarcomerában. Eredményképpen az I-csík és H-zóna szűkül. Egy csúszási ciklus mintegy 1%-kal rövidíti a sarkomera hosszát, ezért nagyobb méretű rövidülést ismételt ciklussal valósítanak meg az izomsejtek.

Sejten belül a Ca^{2+} koncentráció szabályozását egy specializálódott endoplasmaticus retikulum, az ún. sarcoplasmaticus retikulum (SR) oldja meg, ennek aktiválását pedig a sarcolemmába épült receptorok végzik, amelyek a neuronokon keresztül a membrán felszínére érkező akciós potenciált fordítják át sejten belüli, sarcoplasmaticus retikulumot aktiváló jellé.

A membránra érkező feszültség alapú jelek átvitelét a sejt belsejébe a sarcolemma biztosítja. Ez elhatárolja a sejten kívüli, kb. 2.5 mM Ca^{2+} koncentrációjú térrészt a sejten belüli, kb. 100 nM nyugalmi koncentrációjú tértől, így a két térrész közt igen erős feszültség gradiens van (fiziológiás körülmények között ez kb. 90 mV). A sarcolemmában feszültségfüggő gyors Na^+ és K^+ csatornák vannak, amelyek lehetővé teszik az akciós potenciál gyors terjedését. A sarcolemma felszínén számos betüremkedés található: ez lehetővé teszi, hogy az itt elhelyezkedő receptorok fizikai közelségbe kerüljenek a sejt belsejében található receptorokkal.

A sarcoplasmaticus retikulum egy zárt, kiterjedt csatorna (csövekből, tubulusokból felépülő) rendszert képez az izomsejt miofibrillumai körül, legfontosabb szerepei: a sejten belüli kalcium raktározása, kibocsátása az intracelluláris térbe ingerlés hatására, majd „visszapumpálása” a kalcium raktárba. A longitudinális tubulusok hosszában veszik körül a miofibrillumokat, a Z-lemezek fölött ún. terminális ciszternákká (TC) táguznak, és igen közel helyezkednek el a sarcolemma betüremkedéseihez (T-tubulusok), emlős vázizomban ezek az A és I vonalakkal egy szinten találhatók. A T-tubulusok mindkét oldalán az SR egy-egy kiszélesedő zsákja, a terminális ciszterna található. A három térrész alkotja triádot, ezen keresztül valósul meg az elektro-mechanikai jelátvitel. Nyugalmi állapotban az SR

Ca^{2+} koncentrációja 1 mM körül van, ellentétben a citoplazma 100 nM-os koncentrációjával. Az SR belsejében (lumen) a Ca^{2+} ionok szabadon, illetve egy calsequestrin nevű fehérje által kötött állapotban vannak (kisebb mennyiségben más fehérjék is részt vesznek a tárolás mechanizmusában).

A sejtmembránra feszültség formájában érkező jel először a sarcolemmán keresztül adódik át, ebben a folyamatban egy feszültség függő receptor vesz részt, ez a jelet a Ca^{2+} koncentráció változássá, majd mechanikai konformáció változássá alakítja (a receptor a sarcolemma membránjában található a T-tubulus területén). Váz és szívizomban ez a receptor egy L-típusú csatorna, amelyet *dihidropiridin receptornak* neveznek (DHPR). Szívizomban a membrán feszültség változásának hatására a receptor nyílik, és a sejt belseje felé irányuló lassú Ca^{2+} áramot hoz létre. Az áramcsúcs eléréséhez szükséges idő 100-200 ms., az aktivációs küszöb -10 mV körüli.

A sejten belül a jelátvitel megvalósítója az SR membránjában a TC területén található *rianodinreceptor* (RyR). Nevét az általa nagy affinitással kötött rianodin nevű növényi alkaloida szolgáltatta. Mivel a RyR központi szerepet játszik az izom kontrakció megvalósításában, és működésének részletei jelenleg sem ismertek minden részletében, az izomélettan egyik legtöbbet tanulmányozott fehérjéje.

Fiziológiás körülmények között a RyR több hatást integrál (citoplazmában és lumenben levő Ca^{2+} koncentráció, más ionok jelenléte, foszforilációs jelek, ATP jelenléte, valamint a DHPR receptorok konformáció változása harántcsíkolt izom sejtekben) és ezek összességét fordítja le Ca^{2+} csatorna nyitáson keresztül megvalósított jellé. Komplex működési folyamata nem teljesen tisztázott.

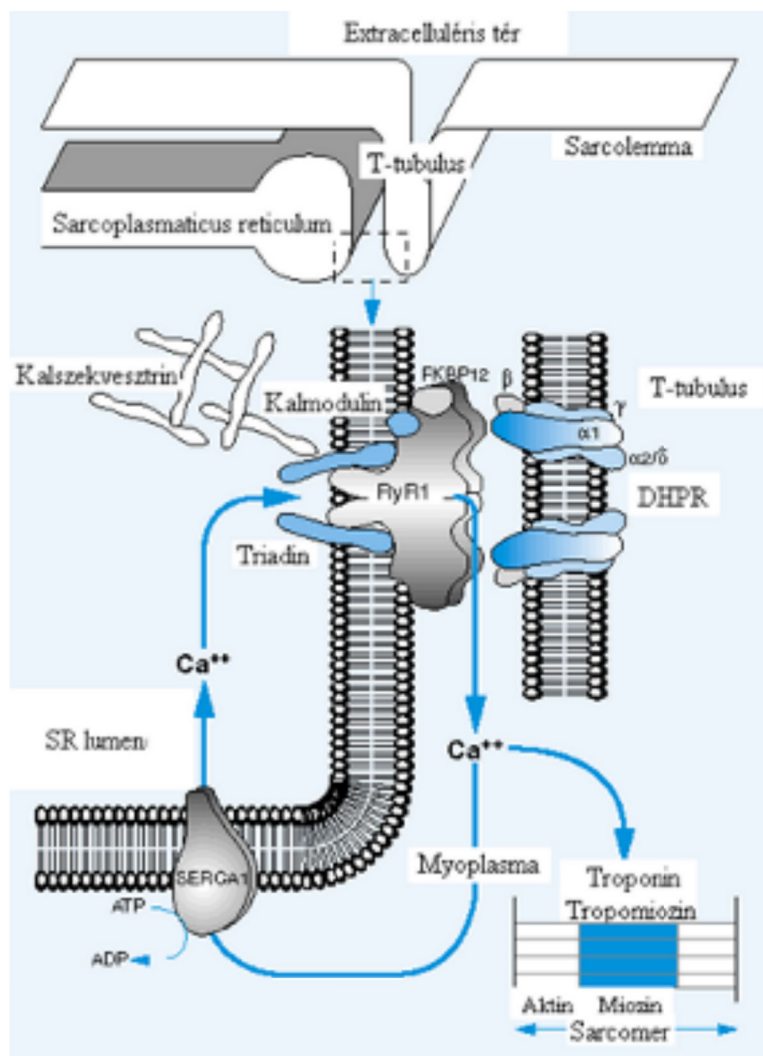
Az SR-ból kiáramló Ca^{2+} -ot troponinhoz és más molekulákhoz történő kötődés után egy az SR membránban elhelyezkedő fehérje, a Ca^{2+} -ATPáz (Sarcoplasmatic Reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) viszi vissza az SR-ba. Ez egy aktív pumpa mechanizmus, amely a Ca^{2+} ionok transzlokációja során ATP-t fogyaszt.

1.3.4. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat

A vázizomban lejátszódó folyamatot, melynek során a feszültség formájában érkező jel mechanikai kontrakcióvá alakul excitációs-kontrakciós kapcsolatnak nevezzük (*Excitation-Contraction Coupling*, a továbbiakban ECC).

A folyamatban résztvevő sejten belüli szerkezeteket az 1.2 ábrán látjuk. Harántcsíkolt izomban az izomsejt membránjára érkező feszültség jelet a DHPR receptorok érzékelik, és konformáció változásuk nyitja meg az SR terminális ciszternái Ca^{2+} csatornáit. A kontrakció kiváltását nem ez a Ca^{2+} áram okozza, hanem a DHPR aktiválását érzékelő RyR receptorok által kibocsátott, magas Ca^{2+} koncentrációt létrehozó receptor aktivitás. Az citoplazmába került nagy mennyiségű Ca^{2+} többek közt reakcióba lép az aktin filamentumok troponin molekuláival, és kiváltja az aktin-miozin kölcsönhatást, ami a sarcomerák kontrakcióját eredményezi.

A citoplazmában jelenlevő Ca^{2+} ionokat az SR membrán SERCA (SR Ca^{2+} pumpa) molekulái által megvalósított aktív pumpa viszi vissza lumenbe, így a csökkenő citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció következtében a felszabaduló troponin molekulák visszaállítják az eredeti állapotot.



1.2. ábra. A rianodinreceptor

Forrás: Monnier és mtsai. (2000) után.

A Ca^{2+} kibocsátás mértéke és kinetikája a jelenlegi kutatások szerint egy bonyolult feltételrendszertől függ, ami magába foglalja a membránra érkező feszültséget, a

DHPR receptorok által indukált Ca^{2+} koncentrációt, a lumen Ca^{2+} koncentrációját és más feltételeket (Cheng és mtsai. 2008). Az elmúlt két évtizedben a folyamat a biofizikai és élettani kutatások gyakori témájává vált, mert a jelenség egyes részletei ma sem ismertek teljesen.

1.3.5. A sejten belüli kalcium diffúziós szemlélete

Az SR-ből történő Ca^{2+} kiáramlás és különböző molekulákhoz történő kötődés a háromdimenziós, néhány μm dimenziójú térben egy diffúziós-reakciós folyamattal modellezhető, ennek folyamán a Ca^{2+} különböző Ca^{2+} pufferekkel (proteinek, illetve a Ca^{2+} kötő festék) lép reakcióba. A pufferek egy része mobilis, akárcsak a Ca^{2+} , saját diffúziós-reakciós jelenséget követve. A nagyszámú protein, illetve más ionok (pl. magnézium) miatt a folyamat bonyolult, de megfelelő egyszerűsítéseket és közelítéseket alkalmazva részlegesen modellezhető. A modell Fick szerinti diffúzióra épül, de vannak más megközelítések is (Tan és mtsai. 2007). A modellben az SR mint Ca^{2+} ionokat kibocsájtó forrás vesz részt, a Ca^{2+} sejten belüli koncentrációja megnő, és diffúzió alakul ki a sarcoplazmában. A diffúzió folyamán a lokális koncentrációkat a kialakuló reakciók is befolyásolják, ezek során a Ca^{2+} a festékhez, illetve a kötésekért egymással versenyző puffereihez kötődik. A térbeli koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]$) leegyszerűsített modelljét az alábbi diffúzió-reakció egyenlet adja (Smith és mtsai. 1998):

$$\frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = D_{\text{Ca}} \nabla^2 [\text{Ca}^{2+}] + J_{\text{dye}} + J_{\text{buff}} + J_{\text{pump}} + J_{\text{leak}} + J_{\text{ryr}} \quad (1.1)$$

amelyben a Ca^{2+} ionok Fick szerinti diffúzióval (Crank 1979) mozognak (D_{Ca} diffúziós állandóval, ∇^2 -el a tér koordináták szerinti másodrendű parciális differenciálást jelöltük: $\nabla^2 = \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial z^2}$ három dimenziós

$[\text{Ca}^{2+}](x, y, z)$ függvény esetében), a helyi térbeli koncentrációt a reakciókba lépő vagy reakcióból felszabaduló Ca^{2+} ionok befolyásolják, mindezzel párhuzamosan más sejten belüli áramok is jelen vannak. Ezek az alábbiak:

- J_{buff} a Ca^{2+} puffereivel történő reakció következtében kialakuló koncentráció csökkenés vagy növekedés,
- J_{dye} a festékekkel történő kötődés miatt kialakuló koncentráció változás,
- J_{pump} az SR-be pumpa mechanizmussal visszajuttatott $[\text{Ca}^{2+}]$ csökkenés,
- J_{leak} az SR-ből kiszivárgó Ca^{2+} , amely nyugalmi állapotban ellensúlyozza a pumpa mechanizmust,
- J_{ryr} a RyR által kibocsájtott Ca^{2+} áram.

A Ca^{2+} által kötött festék (CaF , F a szabad festék, az általunk végzett kísérletekben fluo3 vagy fluo4) szintén mobilis résztvevője a folyamatnak (1.2 képlet), D_F diffúziós állandóval:

Az elemi kalciumfelszabadulási események élettani és biofizikai háttere

$$\frac{\partial [CaF]}{\partial t} = D_F \nabla^2 [CaF] - J_{dye} \quad (1.2)$$

A J_{dye} a festék és Ca^{2+} reakciójából adódik:

$$J_{dye} = -k_F^+ [Ca^{2+}] [F] + k_F^- [CaF] \quad (1.3)$$

ahol k_F^+ és k_F^- a Ca^{2+} és a festék asszociációs, illetve disszociációs reakció sebesség állandói. A reakcióban résztvevő festék koncentrációjának követéséhez tudni kell a kezdeti, $[F_T]$ teljes festék koncentrációt, így a pillanatnyi szabad ($[F]$), illetve reakcióba lépett festék ($[CaF]$) közti összefüggés követhető:

$$[F] = [F_T] - [CaF] \quad (1.4)$$

Hasonló egyenlettel írható le a Ca^{2+} pufferek (B_i) viselkedése, ezekből több (i index szerint) is részt vehet a modellben (troponin, parvalbumin, EGTA és más pufferek):

$$\begin{aligned} \frac{\partial [CaB_i]}{\partial t} &= D_{B_i} \nabla^2 [CaB_i] - J_i \\ J_{buff} &= \sum_i J_i \end{aligned} \quad (1.5)$$

Ca^{2+} -al történő reakcióik eredménye a J_{buff} áram.

A pufferek lehetnek mobilis (ATP, EGTA) vagy nem mobilis (troponin) pufferek, ez utóbbiak esetében a D_{B_i} diffúziós állandó nulla. A pufferek által felszabadított vagy lekötött Ca^{2+} fluxust a megfelelő reakciók adják:

$$J_i = -k_i^+ [Ca^{2+}] [B_i] + k_i^- [CaB_i] \quad (1.6)$$

az 1.5 összefüggésben ezek össze adja a J_{buff} áramot. A pillanatnyi és teljes puffer koncentrációt a festékéhez hasonlóan lehet számolni:

$$[B_i] = [B_i]_T - [CaB_i] \quad (1.7)$$

Az SR -be visszajuttatott, pumpa mechanizmus által mozgatott Ca^{2+} a pillanatnyi $[Ca^{2+}]$ koncentráció és egy V_{max} maximális sebesség függvénye (Smith és mtsai. 1998):

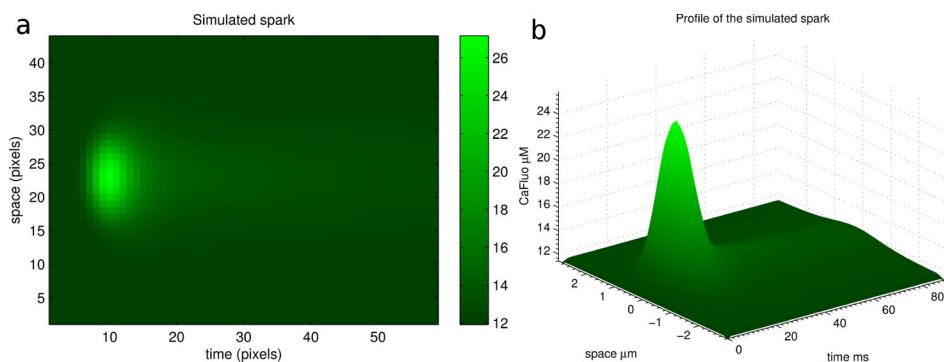
$$J_{pump} = \frac{V_{max} [Ca^{2+}]^m}{K^m + [Ca^{2+}]^m} \quad (1.8)$$

amelyben K és m kísérleti úton meghatározott állandók. Végül a J_{leak} áram nyugalmi állapotban a pumpa ellensúlyozását biztosítja, ez a pumpa háttér $[Ca^{2+}]_0$ koncentrációra kiszámolt áram:

$$J_{leak} = -J_{pump} \quad .$$

A J_{rr} áram a rianodinreceptor által kibocsájtott Ca^{2+} fluxusból adódik, a szimulációk folyamán ez különböző alakú impulzus függvényekkel modellezhető (négyszög, Gauss függvény alakú, stb.). Feltételeztett, hogy a diffúzió nem izotrop a különböző pufferek és a mitokondriumok elhelyezkedése miatt, így a sejt longitudinális irányába gyorsabb (Cheng és mtsai. 2008).

Az ismertett parabolikus differenciál egyenletrendszert numerikusan lehet megoldani, ebben a különböző koncentrációk 3 dimenziós térbeli függvények. A feladatra több megoldás született (Jiang és mtsai. 1999; Ríos és mtsai. 1999; Ríos és mtsai. 2002; Sobie és mtsai. 2002; Chandler és mtsai. 2003; Zhou és mtsai. 2003).



1.3. ábra. Szimulált line-scan kép

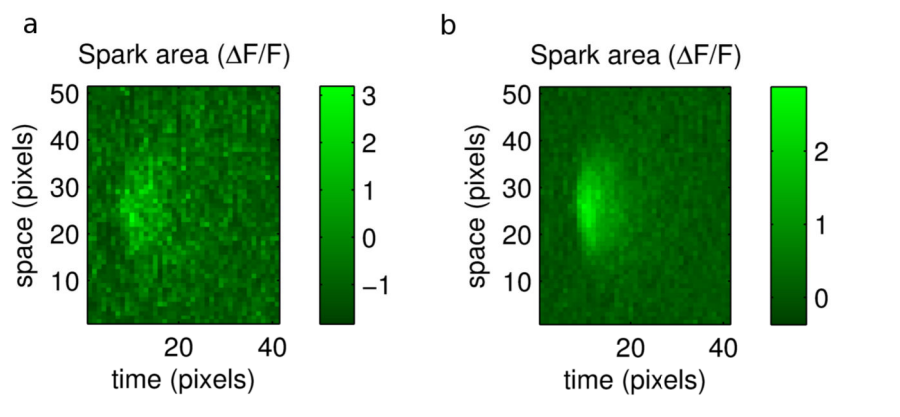
a. Szimulált line-scan kép: A szimulált spark pontjainak számértéke Ca^{2+} és fluo-3 festék reakciója után keletkezett CaFluo koncentráció értékek μM -ban. A szimulációt végrehajtó program Douglas-Gunn módszerrel numerikusan oldotta meg az 1.1 egyenletet, a line-scan képet a diffúziós tér egyenes menti pásztázásával kaptam (részletek a C Függelékben és a szövegben). A tér és időbeli felbontás megegyezik az általunk használt line-scan képek felbontásával (idő: 1 pixel 1.54 ms, tér 1 pixel 0.14 μm). b. A line-scan kép térbeli megjelenítése idő-tér koordinátákkal. A képen nincs konfokális képekre jellemző háttérzaj.

A jelenség szimmetriája (diffúzió) miatt egyes esetekben a numerikus megoldást gömbi (szferikus) vagy henger (cilindrikus) koordináta rendszerre adják (Smith és mtsai. 1998; Uttenweiler és mtsai. 2002). A szimulációk legtöbb esetben véges differencia módszerekkel készültek.

A modell alkalmazó szimulációk lehetővé teszik mesterséges line-scan képek generálását a diffúziós tér egyenes menti pásztázásával (lásd 1.3 ábra), és a kapott struktúra megfelelő feldolgozásával (zaj és pont kiterjedés függvény hatásának szimulálása). A módszert több kutatócsoport használta a RyR Ca^{2+} forrás alakjának és fluxusának becslésére. Az ismert körülmények közt előállított line-scan szimulációk tanulmányozhatóvá teszik a rendszer különböző paramétereinek (diffúziós és reakciós állandók) mérésekre gyakorolt hatását.

1.3.6. Kalciumfelszabadulási események, eseménytípusok

Az intracelluláris térrészben történő kalciumkoncentráció változásokat összefoglalóan kalciumfelszabadulási eseményeknek nevezzük, amelyekből léteznek egész sejtre kiterjedő (globális) és csak kis térrészben megjelenő (lokális) formák. A szakirodalom kísérleti körülményeik és fluoreszcens képalkotás során kapott megjelenésük szerint osztályozza az izomsejteken belüli lokális kalciumfelszabadulási eseményeket (lásd, az esemény térbeli alakjának, illetve a lezajlás időtartamának, megfelelő névvel jelölve ezeket, mint *calcium sparks*, *syntilla*, *sparklet*, *ember*, *quark*, *puff*, és más elnevezések (Cheng és mtsai. 2008).



1.4. ábra. Konfokális mikroszkóppal rögzített kalcium spark

a. Konfokális mikroszkóppal rögzített spark képe (060 130a07 mérés, pásztázási periódus 1.54 ms/pixel, térbeli felbontás 0.14 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, normalizált amplitúdó értékek), b. ugyanabból a mérésből származó, 7 hasonló idő és térbeli lefutású spark átlaga.

Kalcium *spark*-ról („szikra”, lásd 1.4 ábra) beszélünk abban az esetben ha az eseményt egyetlen kalcium kibocsájtó egység (Calcium Release Unit, CRU, lásd Cheng és mtsai. (2008)) hozza létre. Az elnevezés a sejt típusától függetlenül vált általánossá, először Cheng és mtsai. alkalmazták szívizom sejteken végzett kísérleteknél (Cheng és mtsai. 1993). Mivel az esemény fluoreszcens képalkotással rögzíthető, és tulajdonképpen a festékhez kötődő Ca^{2+} ionokat „látjuk”, a megnevezés általában a megfigyelt fluoreszcens eseményre vonatkozik, bár kontextustól függően jelentheti a kiáramló Ca^{2+} fluxust is (Cheng és mtsai. 2008). Sikertült olyan kalciumfelszabadulási eseményeket is rögzíteni, amelyeket egyetlen rianodin receptor hoz létre, ezeket szívizomban *sparklet*-eknek nevezi a szakirodalom (Wang és mtsai. 2001).

Kalcium *ember* (parázs) megnevezéssel jelöljük a hosszú időtartamú, kis amplitúdójú eseményeket. Feltételezés szerint ebben az esetben a Ca^{2+} kibocsátásban egy vagy nagyon kevés RyR vesz részt (Gonzalez és mtsai. 2000; Csernoch és mtsai. 2004).

Globális kalciumfelszabadulási eseményeket elő sejtekben először az 1960-as évek végén észleltek (Cheng és mtsai. 2008), de képi rögzítésük csak az 1970-es végén sikerült, aequorin nevű indikátorral, később több kísérlet bizonyította jelenlétüket (Cheng és mtsai. 2008). A jelenség tanulmányozását jelentősen megkönnyítette a konfokális mikroszkópok paramétereinek fejlődése, amellyel célzottan lehet pásztázni a sejt kis térfogatait. A Ca^{2+} fluoreszcens indikátorok fejlesztése a későbbi időszakban jelentősen hozzájárult a jelenség kimutatásához.

Az izom sejten belüli lokális kalciumfelszabadulási események konfokális mikroszkóppal történő első rögzítése szívizom sejtekben történt az 1990-es évek elején (Cheng és mtsai. 1993).

A kutatások következő időszakában (és a jelenig) a konfokális képek használata rendszeressé vált ezen a területen. Az igen magas zajszintet tartalmazó képeken detektált események jellemzőiből és biofizikai paramétereiből készült statisztikák fontos kiindulópontok lettek a hipotézisek tárgyalásában. Nemcsak a nagyszámú kép, hanem a képeken megjelenő Ca^{2+} jelenségekre mutató alacsony jelszint, a rögzítési módszerből adódó bizonytalansági faktorok is megkövetelték a képek számítógéppel végzett elemzését és kiértékelését (a képeket jellemző tulajdonságokat a Módszerek fejezet 3.2 és 3.3 szakaszában mutatom be).

2. Célkitűzések

A tézisben bemutatott munka célkitűzései a következők:

- a) konfokális mikroszkóppal készült line-scan (3.2.3) képek elemzése számítógépes kép és jelfeldolgozási módszerekkel,
- b) vázizomban lezajló, konfokális mikroszkóppal (elsősorban line-scan típusú képek létrehozásával) rögzített Ca^{2+} események tanulmányozása, statisztikai jellemzők számításához szükséges paraméterek számítása,
- c) az eseménydetektálási algoritmusok hatékonyságának és megbízhatóságának vizsgálata és optimalizálása,
- d) Ca^{2+} esemény jellemzők meghatározása és számítása olyan esetekben, amikor nem létezik az irodalomban általánosan elfogadott módszer erre, pl. *ember* típusú események esetében,
- e) a témakörben általánosan használható függvény csomag és grafikus felületű feldolgozó programok kidolgozása az a-d pontokban említett feladatokhoz,
- f) a kidolgozott módszerek alkalmazása kísérleti adatok feldolgozásában.

A konfokális mikroszkóppal készült mérések elemzését számítógépes módszerekkel lehet elvégezni, minél több részfolyamat automatizálásával. Annak ellenére, hogy elképzelhető (és első fázisban néha szükséges is) ezeknek a manuális, ember általi kiértékelése, a kísérletekhez tartozó mérések nagy száma miatt ez gyakorlatilag lehetetlen. Ezzel párhuzamosan, a manuális, számítógéppel támogatott kiértékelés is fontos marad az orvos és biológus kutatók szempontjából, így mindkettőt biztosítani kell. Bizonyos esemény jellemző számításokat szintén csak számítógéppel lehet elvégezni. Bár jelentek meg a feladatra nyilvánosan elérhető programok vagy program részletek (függvények), nem mindig használhatóak megfelelően (részleges kódok, nincs forráskód, nem működik a kutatók elvárása szerint), és általában a detektálást érintik, paraméterszámítás, illetve statisztikai jellemzők számítására nincs elérhető nyílt forráskódú eszköztár. Nem minden típusú Ca^{2+} eseményre létezett jellemző számítási eljárás, a kísérletekben jelennek meg egyedi események, amelyekre nincs kidolgozott módszertan (pl. *ember* típusú jelenségek paraméterei).

A Debreceni Egyetem Élettani Intézetében több Ca^{2+} eseményekkel kapcsolatos kutatás folyt és folyik, így szükséges az ezeken belül készített konfokális line-scan, illetve más típusú képek egységes módszertannal történő elemzése. Fontos, hogy rendelkezésre álljanak olyan jelfeldolgozó módszereket kivitelező számítógépes eszközök, amelyekből egy-egy új kutatás méréseinek feldolgozó folyamatát össze lehessen állítani. A Ca^{2+} eseményeket rögzítő mérések sokszor egy kutatáson belül is jelentősen különböznek, ezért esetenként beállítható, paraméterezhető feldolgozási eljárásokra van szükség.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti körülmények, izomrost előkészítése és preparálása

A feldolgozásokat a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében készített konfokális mikroszkóp felvételekre alkalmaztuk. A kutatások során patkány, béka, illetve egér izomrostokat használtunk. Az izomrost előkészítést az Orvos- és Egészségtudományi Centrum Élettani Intézetének laboratóriumában végezték. Az Intézményes Európai Állatetikai Elvek által megengedett protokollal leölt állatok izmaiból izomrostokat izoláltak, ezután a rostok különböző előkészítő oldat kezelésén mentek át, végül szaponint tartalmazó relaxáló oldatba lettek helyezve (részletesen lásd Szentesi és mtsai. (2004). A mérés előtt a sejtek kalciumérzékeny festéket tartalmazó oldatba lettek helyezve (pl. 50 μ M fluo-3) és a relaxáló oldat egy fiziológiás oldattal lett lecserélve.

Az izomrostok preparálásának, illetve a mérések előállításának pontos módszertana részletesen a következő publikációkban található: patkány (Szentesi és mtsai. 2004; Szigeti és mtsai. 2007), béka (Cheng és mtsai. 1999; Szentesi és mtsai. 2004; Picht és mtsai. 2007; Kong és mtsai. 2008; Lukács és mtsai. 2008; Sztretye 2009) patkány és egér (Fodor és mtsai. 2008; Sztretye 2009).

3.2. A konfokális mikroszkóp használata kalciumfelszabadulási események tanulmányozásában

3.2.1. A konfokális mikroszkóp

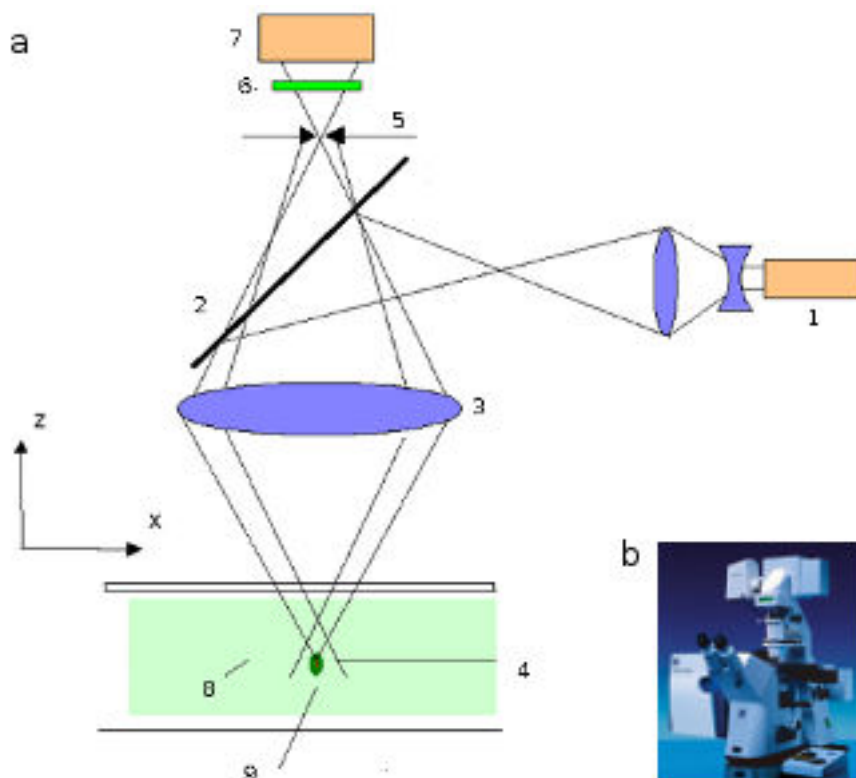
A konfokális mikroszkóp elvét Marvin Minszky vezette be 1957-ben (Pawley 2006). Az egyszerű konfokális mikroszkóp a hagyományos gyűjtőlencse helyett a fényt a minta egy pontjára fókuszálta, a fényforrás sugarait előtte egy kis nyíláson vezette át (*pinhole*), majd ugyanezzel a technikával gyűjtötte a mintáról jövő fényt (3.1 ábra a). A módszer javította a jel-zaj viszonyt, a jelet kevésbé jellemezte az elmosódás (*blur*), növelte a mikroszkóp effektív felbontását, lehetővé tette a vastag minták elemzését a minta bizonyos mélységére fókuszálva.

Az 1970-es évektől fényforrásként lézer sugarat használtak egyes konfokális mikroszkópokban, a lézer forrás által biztosított monokróm, erős és jól fókuszálható fény miatt. Biológiai minták elemzésére 1985-től kezdődően (Pawley 2006) terveztek lézersugarat használó konfokális mikroszkópokat, ezek fluoreszcens festékekkel festett minták esetében biztosítottak jó minőségű jeleket.

Munkánk során a Zeiss cég LSM 510 / LSM 510 META, illetve LSM 5 LIVE típusú mikroszkópokat használtuk (3.1 ábra b).

A konfokális mikroszkóp használata kalciumfelszabadulási események tanulmányozásában

Az LSM510 szériába tartozó mikroszkópok 4 konfokális csatornával dolgoznak, mindegyik külön fényelektromos sokszorozóval (*photomultiplier*, a továbbiakban *PMT*) rendelkezik, ezek külön-külön állíthatóak, és más-más lézerrel működtethetőek.



3.1. ábra. Konfokális mikroszkóp és felépítése

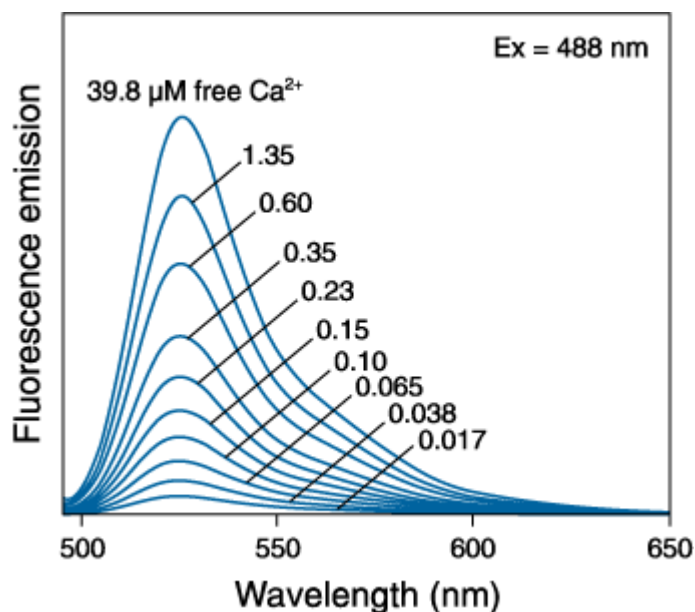
a. A mikroszkóp felépítése: 1 lézer, 2 dichroikus tükör, 3 objektív, 4 fókális sík, 5 pinhole, 6 szűrő, 7 detektor, 8 minta háttere, 9 detektált térfogat. b. Zeiss LSM 510 META konfokális mikroszkóp. Forrás: Zeiss.

3.2.2. Fluoreszcenciára épülő mérések

A fluoreszcenciára épülő mérések rendkívül elterjedtek a biológiai kutatásokban, molekulák, ionok követése kapcsán. A módszer olyan fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező molekulákat („festékeket”) használ, amelyek kötődnek (pl. reakción keresztül) a tanulmányozott molekulához vagy ionhoz. Így követhetővé válnak a cél molekulák vagy ionok. A fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező molekulák (fluorofórok) meghatározott hullámhosszú fény hatására gerjesztett állapotba

kerülnek, majd rövid idő (nanoszekundum rendű) relaxálódnak, és fényt bocsátanak ki. A folyamat ciklikus, a gerjesztés és fénykibocsátás ismétlődő. Mikroszkópos alkalmazásoknál a festéket gerjesztő és a festék által kibocsátott fény spektruma jól meghatározott. Intenzitásának amplitúdója viszont függ a megvilágító fény intenzitásától és a fluorofór koncentrációjától (Merchant és mtsai. 2008).

Mikroszkópos kísérletekben jól meghatározott hullámhosszú fényt használnak a gerjesztéshez, vagy szűrőkkel oldják meg mind a gerjesztő mind pedig a gerjesztett fény kezelését.



3.2. ábra. A fluo-3 festék kalcium függő emissziós spektruma

Kalciumot nem tartalmazó oldatban az emisszió gyakorlatilag 0, egyébként a koncentrációtól függ az ábra szerint. $K_d = 390\text{ nM}$, $\lambda_{ex} = 488\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525$ (maximális).
Forrás: Life Technologies Corporation (LTC 2012).

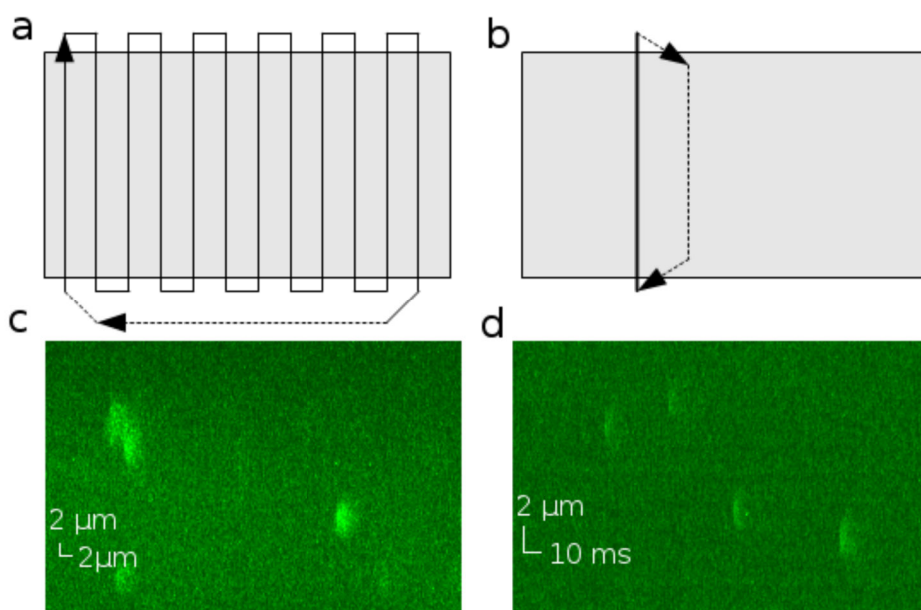
Kísérlettől függően (a követett jelenség típusa), a festékek más és más tulajdonsággal kell rendelkezzenek. Sejten belüli Ca^{2+} ionok festésére, abban az esetben ha gyors koncentrációváltozásokat kell követni, a fluo-3, fluo-4, rhod-2 és Oregon Green 488 BAPTA-1 festékek bizonyultak a legjobban használhatóknak az utóbbi években (Cheng és mtsai. 2008). Ezekre jellemző, hogy kalciummal történő kötődés után az emittált fény intenzitása akár 100-szorosára is nő a kötetlen festékének. A festékek disszociációs állandója (K_d) μM körüli, így az ehhez közelítő koncentrációk jól követhetőek (a fluo-3 esetében $K_d = 390\text{ nM}$). Mindegyik a

A konfokális mikroszkóp használata kalciumfelszabadulási események tanulmányozásában

látható fény tartományban található hullámhosszal gerjeszthető. Mindezek a tulajdonságok megengedik a lokális, gyorsan változó koncentrációk követését a sejtben. A fluo-3 emissziós spektruma a 3.2 ábrán látható. A dolgozatban használt konfokális mérések fluo-3 vagy fluo-4 festékkel készültek (*Life Technologies Corporation*), a gerjesztő Argon lézer hullámhossza pedig 488 nm. Elemzési szempontból a fluo-3, illetve 4-el készült képek között nincs különbség.

3.2.3. Line-scan képek

A mechanikai módszerrel pásztázó mikroszkópokban galvanométerek forgatják el a pásztázást kontrolláló tükröket. A pásztázott felület többnyire téglalap alakú, modern mikroszkópok megengedik más alakzatok pásztázását is.



3.3. ábra. XY és Xt pásztázás

A konfokális pásztázó fej mozgása XY (a), illetve line-scan mérésen (b). A c és d ábra a pásztázásoknak megfelelő kép részletet tartalmaz: c - 051215b02 XY mérés részlete (244x160 pixel), illetve d - 051215b20 line-scan mérés részlete (244x160 pixel). Mindkét kép 12 bites kódolással készült, a pixelek minimum és maximum értéke 0-4096 közötti (a detektor által szolgáltatott egységek).

Az LSM 510 és 510 META modellek X, Y és Z irányú pásztázást biztosítanak egy hosszú fejlesztés eredményeként létrejött pásztázó modul segítségével. A modul

vezérelt kollimátorokat, pásztázó galvanométeres tükörrendszert és nagy érzékenységgű detektort tartalmaz. A berendezés több lézer modullal működhet. A műszer vezérlése saját számítógéppel történik. A mikroszkóp többféle pásztázási módot biztosít.

A line-scan képek előállításánál a lézer sugár egyetlen vonal mentén pásztázza a mintát, ezt a pásztázás x tengelyének nevezzük. Amennyiben az x, y síkot tekintjük a sugárra merőleges síknak (fókusz sík), a fluoreszcens jelet a tér mindhárom irányából, a mikroszkóp pont-kiterjedés függvényének (3.3.4) megfelelően érzékeli. A pásztázás folyamán a kisebb, nagyobb amplitúdójú vagy kiterjedésű sparkokat kialakító fluoreszcens jel bármely radiális irányból jöhet a pásztázott x tengely körül, az sem dönthető el egyértelműen, hogy sikerült-e egy-egy sparkot a forrás közvetlen közelében, vagy a forrást keresztezve pásztázni. Ugyanakkor a fluoreszcens háttér szintje, valamint a jelenlevő zaj elnyomja az kis amplitúdójú jeleket. Egy adott kísérlet sorozaton belül a fluoreszcens háttér módosulhat az egyes képek között. A leggyakrabban normalizált értékeket használunk, ez a referencia különbözhet akár egymás után felvett képeken is. A képeken jelen levő háttérzaj miatt a kis amplitúdóval rendelkező sparkok nem detektálhatóak és előfordulhatnak hamisan detektált, zajból származó események.

Ebben a dolgozatban line-scan módban és XY módban (lásd 3.3 ábra) is használtuk kalciumfelszabadulási események rögzítésére (a módszereket line-scan mérésekre fejlesztettük, de azok alkalmazhatóak az XY mérésekre is). Line-scan módban 1.3 kHz – 2.6 kHz pásztázási frekvencia érhető el, a pásztázások közti idő így 640 ns - 2.3 ms. A készülék a pixeleket analóg-digitális konverzió után 8 vagy 12 szintes kódolással rögzíti (ebben a munkában az utóbbit használtuk).

Az LSM 5 Live mikroszkóp egy 512 pixelt detektáló lineáris CCD (töltéscsatolt eszköz - *Charged Coupled Device*, a továbbiakban *CCD*) tömbbel rendelkezik. A lézerről érkező fénynyalábot egy optikai rendszer vonal mentén fókuszálja, és egy galvanométer-tükör rendszerrel ezzel pásztázza a mintát. A pásztázást és a detektálást egy bonyolult optikai rendszer felügyeli (lásd Pawley (2006), 232. oldal). A párhuzamos pásztázás miatt nagy sebesség érhető el, ez line-scan módban 60 kHz pásztázási frekvencia, a pixelek közti idő 16 μ s - 20 ms (Pawley 2006).

A mérések technikai paramétereit és a dolgozatban felhasznált mérések leíró adatait az A Függelék: A felhasznált konfokális mérések adatai fejezetében adom meg.

3.3. Konfokális mikroszkóp képek jellemzői

3.3.1. A jel-zaj szint jellemzése

A zaj formális jellemzése a szűrések, feldolgozások kiválasztása miatt fontos, az algoritmusok jellemzőinek megállapításakor a szimulált képek előállítása is erre épül. Mivel a konfokális mikroszkóp fluoreszcens jelenségekre épülő képeiben több

zajforrás hatása vegyül (Sheppard és mtsai. 2006), pontos zajmodellt nehéz készíteni.

A zaj mindig jelen van a foton sokszorozó csövek (*Photo Multiplier Tube - PMT*) és a töltéscsatolt eszközökkel detektált mikroszkóp jelekben. PMT van a Zeiss LSM510, illetve LSM 510 META készülékekben is (az 510 META-ban PMT tömb található). A CCD megoldás pedig a Zeiss LSM5-LIVE készülék detektáló eleme (512 x 1 lineáris CCD tömb). A zaj több forrásból tevődik össze, egyik komponense a készülékekre jellemző háttérzaj (ez a készüléktől és annak pillanatnyi használati módjától függ), a másik a detektálás jellegéből adódó fotonzaj. Ezekhez társulnak a mintából származó háttérzajok (ezek fluoreszcens technika esetén szintén számottevőek lehetnek). A konfokális mikroszkóppal készült, fluoreszcenciára épülő képekre jellemző az alacsony jelszint így a háttérzaj erős zajként jelenik meg.

A fotonzaj (*shot noise*) a mérési zajok legfontosabb forrása (Sheppard és mtsai. 2006; Merchant és mtsai. 2008). A PMT csövek és CCD kamerák foton érzékelését egy random jellegű jel jellemzi, amelyet Poisson eloszlással lehet egyszerűen modellezni. A detektált fotonok számának valószínűségét az alábbi kifejezéssel lehet közelíteni (Sheppard és mtsai. 2006):

$$P(N_p) = \frac{\mu^{N_p} e^{-\mu}}{N_p!}$$

ahol N_p a detektált fotonok száma, μ az eloszlás középértéke. Ugyanezt a megközelítést alkalmazzák más biológiai és orvosi képalkotó technikáknál, pl. a röntgen képeknél is (Webb 2003).

A Poisson eloszlás szórása:

$$\sigma = \sqrt{\mu} \quad (3.1)$$

nagy N értékekre μ jól közelíthető N_p -vel.

Képfeldolgozási feladatoknál általános gyakorlattá vált, hogy a detektált jel-zaj szintet (*Signal to Noise Ratio - SNR*) az alábbi kifejezéssel adják meg (Schroeder 2000; Webb 2003; Sheppard és mtsai. 2006):

$$SNR = \frac{\mu}{\sigma} \quad (3.2)$$

ami a Poisson eloszlás esetében így alakul:

$$SNR = \sqrt{N_p}$$

Az eloszlás kis számú foton esetében jobbra ferde, nagy N_p esetén viszont szimmetrikus és a normális eloszláshoz közelít.

Részletesebben, más jellegű zajok miatt a detektorok jel-zaj-szintjét az alábbi képlettel lehet megközelíteni (Schroeder 2000; Sheppard és mtsai. 2006):

$$SNR = \frac{N_p}{\sqrt{N_p + N_b + N_d}}$$

ahol N_d a detektor működéséből, N_b a háttérzajok jelenlétéből adódó többlet detektált foton szám. A detektor működéséből PMT csövek esetében a sötétzaj, sötétáram, CCD-k esetében a kiolvasási zaj a meghatározó (Schroeder 2000); modern készülékeknél ezek a tényezők kisebb mértékben járulnak hozzá a zajszinthez.

Bár a gyakorlatban közelítő eljárásokkal és több egyszerűsítéssel fogunk élni, látható, hogy (Young 1996):

- a zaj nem független a jeltől,
- a zaj nem additív,
- a zaj nem normális eloszlású.

Mindezek ellenére, a zaj normális és/vagy Poisson eloszlással történő közelítése általános gyakorlat egyszerűsítési szempontok miatt.

Konfokális mikroszkóp képek esetében a jel-zaj szint a fény konfokális módszerrel történő szűrése miatt ezen kívül még több tényezőtől függ (részletesen lásd Sheppard és mtsai. (2006) - ezek az alábbiak:

- a háttérzaj,
- az apertúra állapota,
- a kiválasztott pixelméret,
- a fluoreszcens festék szintje a mintában,
- a pásztázási sebesség hatása.

3.3.2. A háttér fluoreszcencia

A háttér vagy autofluoreszcencia (*background fluorescence*) a természetesen fluoreszkáló molekulák által okozott fluoreszcens jel, amely akkor is megjelenik, ha a minta nem tartalmaz fluoreszcens festéket. Mivel ez általában jelen van a sejtek citoplazmájában, kísérőjelenséggként számolni kell vele, és ez is hozzájárul mint komponens a háttérzajhoz. Képi feldolgozást zavaró mértéke lehet nagy, ha átfedődik az alkalmazott festék fluoreszcenciájával, és a festett elemek által kibocsátott fluoreszcens jel szintje alacsony. Mivel egyenletes fluoreszcens kibocsátásról van szó, általában alkalmazható olyan háttér beállító képi feldolgozás, amely nagyrészt eltünteti jelenlétét (Merchant és mtsai. 2008).

3.3.3. A fotokioltság

A konfokális mikroszkóp lézersugárral világít meg kis területeket a mintában, így az ott jelenlevő fluoreszcens molekulákat jelentősen károsíthatja többszöri pásztázás után. Ezt a jelenséget fotokioltságnak (*photobleaching*) nevezzük. Vannak mérések, amelyek pont ezt a jelenséget használják ki (FRAP, FLIP), az elemi kalciumfelszabadulási események esetében az érdekünk általában a fluoreszcens jel ugyanolyan szinten tartása, tehát a minta minél kisebb mértékű károsodása az alatt az idő alatt amíg a mérés tart. Az alkalmazott festékek fluoreszcens kibocsátása csökken a megfigyelés alatt, mert fotokémiai módosuláson megy át, ez többféle folyamaton keresztül is történhet (leggyakrabban oxigén molekulákkal történő reakció áll mögöttük). A jelenség csökkentését több módszerrel is el lehet érni a kísérletek előkészítése során, lásd Diaspro és mtsai. (2006). A minél kisebb mértékű fotokioltsást okozó kísérleti paraméterek megtalálása lényeges, eredményeként jobb kontrasztú és időben stabilabb jeleket lehet mérni. Fotokioltsást tartalmazó mérések képfeldolgozó módszerekkel javíthatóak. Erre az egyik lehetőség a fotokioltság mértékének meghatározása a használt festékekre. A kioltsást a méréseken egy mono- vagy biexponenciális intenzitás csökkenő folyamatként érzékeljük, amely az alábbi, időtől függő összefüggéssel adható meg (Diaspro és mtsai. 2006; Kolin és mtsai. 2006):

$$I_t(t, x) = I_0(t, x) \cdot e^{-kt} \quad (3.3)$$

ahol I_t és I_0 egy azonos helyen végzett egy vagy két dimenziós pásztázás intenzitásának átlaga, k pedig a kioltsást jellemző konstans, értékét fordított időmértékegységgel adjuk meg. A folyamatot sok esetben biexponenciális eséssel lehet jobban jellemezni:

$$I_t(t, x) = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} \quad (3.4)$$

ahol A_1 és A_2 amplitúdó konstansok, k_1 és k_2 pedig az intenzitás csökkenését jellemző konstansok. Kísérletileg ezek értéke megállapítható megfelelő mérésekkel (Diaspro és mtsai. 2006). Így meghatározható minden idő koordinátára a fotokioltság következtében kialakult intenzitás csökkenés aránya, és nemlineáris illesztéssel kiszámolhatóak a szükséges konstansok. Az így kapott függvényből számolt arányokkal korrigálhatóak a megfelelő időpillanathoz rendelt intenzitás értékek.

Így line-scan képeknél a korrekciót kétféleképpen lehet elvégezni:

1. Az idő függvényében a mérések fluoreszcens háttérének intenzitását átlagoljuk (azokat az x szerinti pontokat amelyeken nincs a háttértől eltérő jel - esemény). Az így kapott pontokból kiszámítható az első időponthoz viszonyított intenzitás csökkenés.
2. Az előző pontban kapott értékekhez a 3.3 vagy 3.4 függvényt illesztve egy

pontosabb közelítést kapjuk a csökkenő intenzitásnak.

Az előfeldolgozások folyamán mindkét módszer használtam (lásd 4.1.1).

3.3.4. A pont-kiterjedés függvény hatása

A konfokális mikroszkóp által előállított egy vagy többdimenziós méréseket eltorzítja a mikroszkóp pont kiterjedés függvénye (*pontátviteli függvény*, *pont kiszélesedési függvény* - *point spread function* - a továbbiakban PSF). A PSF optikai torzítás, amivel minden mikroszkóp rendelkezik, a konfokálisok esetében lényegesen kisebb mint a hagyományos mikroszkópoknál. A méréseken ez a hatás mint elmosódottság (*blur*) jelentkezik.

A PSF paraméterei függnek az objektív numerikus apertúrájától, a használt fény hullámhosszától, valamint mint a törésmutatójától (Egner és mtsai. 2006), de a mikroszkóp optikai rendszerének állapota (rossz beállítás, szennyezett lencsék) is befolyásolhatják (Cannell és mtsai. 2006).

Ha v egy három dimenziós (x, y, z) koordináta, a mikroszkóp képalkotását az alábbi három dimenziós konvolúcióval lehet modellezni (Van Kempen és mtsai. 2003):

$$g(v) = \int_x h(x-\chi) f(\chi) d\chi, \quad (3.5)$$

ahol $f(v)$ a megfigyelt objektum, $g(v)$ az előállított kép, $h(v)$ pedig a PSF. A képalkotás során jelentkező összetett zaj ($N(v)$) valamint a háttér miatt ($b(v)$) a regisztrált $m(v)$ kép így fejezhető ki:

$$m(v) = N(g(v) + b(v)). \quad (3.6)$$

A 3.5 vagy 3.6 összefüggéseket egy, kettő vagy három dimenziós képalkotásra lebontva lehet kép javító módszereket kidolgozni.

A konfokális mikroszkópban a z (optikai tengely) irányban történő elmosódás nagyobb, mint az x és y irányokba történő (párástázási sík), ezekben általában egyforma értéket lehet mérni, a nagyságrend a kibocsájtott fény hullámhossza (Rios és mtsai. 2002). A PSF közelíthető egy három dimenziós normális eloszlást megjelenítő függvényvel, (Hollingworth és mtsai. 2001), amelynek szórása az x és y irányokban ugyanakkora, a z irányban pedig nagyobb. Így jellemzőként célszerű a három normális eloszlás félérték-szélességének ($FWHM$) értékeivel jellemezni. Egy tipikus konfokális mikroszkóp esetében az elméleti értékek az x és y tengelyek szerinti $FWHM_x$ és $FWHM_y \sim 0.1 \mu m$, míg a z tengely szerinti $FWHM_z \sim 0.4 \mu m$ (Cheng és mtsai. 2008). A kísérleti módszertanok szerint a konkrét mérés körülményeire általában a felbontásnál kisebb méretű fluoreszcens golyókkal mérik a PSF jellemzőit, amelyeket a mintához hasonló törésmutatójú közegben

helyeznek el. Ezzel a módszerrel mért kalcium spark kísérletek során használt konfokálisok jellemző értékei a pásztázási sík x és y irányára ($FWHM_x$ és $FWHM_y$): $0.3-0.5\ \mu\text{m}$ közöttiek, a z irány $FWHM_z$ értéke pedig $0.8-1.55\ \mu\text{m}$ közötti (Izu és mtsai. 1998; Ríos és mtsai. 1999; Soeller és mtsai. 1999; Hollingworth és mtsai. 2001; Launikonis és mtsai. 2005; Rios és mtsai. 2008; Shkryl és mtsai. 2012). Tehát a z tengely szerinti $FWHM_z$ érték kb. háromszorosa az x vagy y -on mértnek. A mért PSF jellemzői pedig általában 20%-al nagyobbak mint a számított elméleti értékek (Cannell és mtsai. 2006).

Izu és mtsai. (1998) szimulált line-scan képek segítségével, a PSF $FWHM_z$ értékét 0.2 és $1.2\ \mu\text{m}$ között változtatva kimutatták, hogy jelentős amplitúdó, illetve spark szélesség változás áll elő az említett határértékekre¹.

3.4. Kép és jelfeldolgozási módszerek

3.4.1. Zajmodell

A line-scan képek zajeloszlása összetett így az elemző algoritmusok tervezésénél egyszerűsítéseket kell alkalmazni. A zaj várható legfontosabb összetevője Poisson jellegű a detektorok működéséből adódóan, erre normális eloszlású, általában additív zajként modellezhető háttér zajok tevődnek. Az egyik gyakran alkalmazott modell a zaj normális eloszlással történő közelítése, ami, ha a Poisson eloszlás λ paramétere lényegesen nagyobb mint 1 (von Wegner 2006) - ez általában igaz konfokális képekre.

A zaj visszavezetése normális eloszlásra a küszöbölő algoritmusok miatt fontos (Starck és mtsai. 1998a) ezek többnyire a normális eloszlás szórásából vezetik le a küszöbértéket. Ha Poisson eloszlást használunk modellként, ezt az Anscombe transzformációval (Starck és mtsai. 1998a) vagy annak módosított változataival visszavezethető normális eloszlásra, a módszert Bankhead és mtsai. (2011) használták egyenlőtlen háttérű line-scan képeknél. Ebben a munkában normális eloszlású modellel közelítettem a line-scan képek háttérzaját az elemző algoritmusok használatakor.

3.4.2. A pont-kiterjedés függvény hatásának kijavítása

A pont-kiterjedés függvény által okozott elmosódás területi mérete (lásd 3.3.4) nagyságrendileg a spark méretéhez közeli lehet (nem fókuszban levő sparkok), a mérésben megjelenő objektumok amplitúdóját csökkenti, így hatását számításba kell venni, még akkor is ha a képjavításra nem találunk jó megoldást.

Az elmosódottság megszüntetését célzó képjavítás vagy élesítés (*deblurring*) további képi problémákat hoz be a javított képbe mert növelheti a zajt. Konfokális

1. Lásd Izu és mtsai. (1998), 3. ábra.

mikroszkóp mérésekhez több képjavító dekonvolúciós módszert dolgoztak ki (Agard és mtsai. 1989; van Kempen 1998; Rooms 2005). Ezek három dimenziós méréseken alkalmazhatóak hatékonyan, de vannak megoldások az egy vagy két dimenziós esetre is (Agard és mtsai. 1981). Három dimenziós mérések esetében jól bevált algoritmusok léteznek (*blind deconvolution*, *nearest neighbor*, Wiener szűrő, *nonlinear constrained iterative deconvolution*) (Cannell és mtsai. 2006). Az iteratív nemlineáris módszereknek is több változatát használják, például a *maximum likelihood* módszerre épülő Richardson-Lucy algoritmust vagy Tikhonov-Miller módszert. Összehasonlításukat Van Kempen és mtsai. (2003) tárgyalják.

A szakirodalom szerint line-scan mérések esetén az alábbi szerzők alkalmaztak dekonvolúciós javítást. Szív, illetve vázizom kalcium jeleihez kötődő kísérletekben Launikonis és mtsai. (2005) (SR és citoplazma kalcium koncentrációjának változása), Soeller és mtsai. (1999) (T tubulusok lokalizálása), Soeller és mtsai. (2002) (SR kalcium fluxusának meghatározása sparkok képződésekor) használtak dekonvolúciós algoritmusokat (*constrained iterative*, Richardson-Lucy) x-y-z méréseken.

A line-scan méréseken a sparkok alacsonyabb amplitúdóval (lásd a sparkok térbeli jellemzőit: 3.7.4) és x irányban szélesebben jelennek meg, mint valódi méreteik (Rios és mtsai. 2001). Az időbeli jellemzők (3.7.3) kevésbé módosulnak.

Egydimenziós sparkokat tartalmazó line-scan mérésekre Rios és mtsai. (1999) dolgoztak ki dekonvolúciós eljárást. Az eljárásban a PSF méretére jellemző szóródásból numerikusan számítottak ki egy korrekciós - skálázó - paramétert, amit minden egyes line-scan pontra alkalmaztak.

Eljárásukat csak szimulált sparkokra lehetett megbízható eredményekkel alkalmazni, a kísérleti line-scan-ekre jellemző zaj esetén csak részleges korrekciót tudtak végezni (keskenyebb PSF értékkel dolgozva mint a valódi), a zaj erősítése miatt. Rios és mtsai. (1999) kiszámolták a kalcium áram értékét a mért fluoreszcencia amplitúdóból és összevetették azt szimulált sparkok esetében kapott értékekre. Élesítési korrekciót alkalmazva különböző $FWHM_z$ értékekre ($FWHM_x$ és $FWHM_y = FWHM_z / 3.5$) arra a következtetésre jutottak, hogy $FWHM_z = 1 \mu m$ fölött a zaj miatt lehetetlen korrekciót alkalmazni. Részleges korrekcióval (kis $FWHM$ értéket használva a PSF definíciójakor) is elég jó közelítő eredményt lehet kapni a kalcium kibocsátás számítására (kissé alábecsülve azt). Így a pont-kiterjedés függvény méretéhez képest lényegesen nagyobb sparkok esetében élesítés nélkül is jó közelítést lehet kapni a kalcium kibocsátás számításakor (Shkryl és mtsai. 2012).

Ezért a legtöbb kutató nem végzi ezt el a line-scan, illetve XY képeken (3 dimenziós esetben már jobb megoldások vannak). Így különösen az $FWHM$ (spark térbeli szélesség) számításánál vagy „észlelt” $FWHM$ -et adnak meg (Shirokova és mtsai. 2008), vagy egy korrekciós paramétert alkalmaznak az észlelt szélességre, és a javított értéket használják a kalcium kibocsátás számításokban (Rios és mtsai. 2008).

Ebben a munkában line-scan mérések elemzésekor nem használtam dekonvolúciós elésítést, ezt az eredmények biológiai értelmezésekor figyelembe kell venni.

3.4.3. Az *à trous* wavelet transzformáció alkalmazása

3.4.3.1. Jelfeldolgozás wavelet transzformációval

A wavelet transzformációk a Fourier transzformációhoz hasonló felbontást állítanak elő, amelynek során az $f(t) \in L^2(\mathbb{R})$ négyzetesen integrálható függvényeket speciális bázisfüggvények felhasználásával fejtik ki. A felbontás során használt

$$\psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right), a \in \mathbb{R}^+ \setminus \{0\}, b \in \mathbb{R} \quad (3.7)$$

alakú függvények nem periodikusak, általában kompakt intervallumon értelmezettek, és egy skála (a) valamint egy eltolás (b) paraméterrel rendelkeznek, amelyek a függvényt a t változó szerint „szélesítik” és eltolják. A felbontás során a különböző méretre skálázott függvények frekvencia sávoknak megfelelő komponenseket határoznak meg $f(t)$ -ből, ugyanakkor az eltolt változatok képesek a t változó szerint lokalizálni ezeket. Az elmélet alkalmazható stacionárius és nem stacionárius jelek tér/idő/frekvencia elemzésére, egyik legfontosabb jellemzője, hogy a jelben található frekvenciák időben vagy térben lokalizálhatóak. Az alkalmazható bázisfüggvényeit már a 20. század elején megadták (Haar Alfréd, 1909), az elmélet az 1980-90-es évek alatt kezdett fejlődni (Hubbard 1998).

Legfontosabb gyakorlati alkalmazási területei az adattömörítés és kódolás, forma felismerés, digitális jel analízis és szűrés.

Általános alakban a folytonos wavelet transzformáció a $\psi(t)$ függvény eltolt és skálázott változatait használja az egy dimenziós, valós értékű $f(t)$, $f(t) \in L^2(\mathbb{R})$ függvények felbontására, előállítva a függvény W wavelet transzmáltját:

$$W(a,b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \psi^*\left(\frac{t-b}{a}\right) dt = f * \bar{\psi}_a(b), \quad (3.8)$$

ahol a $\psi(t)$ valós vagy komplex függvény, $a \in \mathbb{R}^+ \setminus \{0\}$ a skála paraméter, $b \in \mathbb{R}$ az eltolás paraméter. A $\psi(t)$ függvényt analizáló („anya”) waveletnek nevezzük, és speciális tulajdonságokkal rendelkezik. $\psi^*(t)$ a függvény komplex konjugáltja, $\bar{\psi}_a(t) = (1/\sqrt{a}) \psi^*(-t/a)$ (Starck és mtsai. 2010). A $W(a,b)$ számok a transzformáció együtthatói.

A wavelet függvények speciális tulajdonságokkal rendelkeznek (Burrus és mtsai.

1998; Starck és mtsai. 2010).

A transzformációnak van inverze, kimutatható (Starck és mtsai. 2010), hogy:

$$f(t) = \frac{1}{C_\psi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sqrt{a}} W(a, b) da db, \quad (3.9)$$

ahol

$$C_\psi = \int_0^\infty \frac{|\hat{\psi}(v)|^2}{|v|} dv.$$

A visszaállítás akkor lehetségesek, a C_ψ véges (elfogadási vagy megengedhetőségi feltétel, *admissibility*), ennek következménye, hogy a $\hat{\psi}$ Fourier transzformált függvényre fennáll $\hat{\psi}(0)=0$, tehát a wavelet függvény átlaga 0. Ezeknek a függvényeknek zéró a momentuma, és sáváteresztő szűrő jellegük van.

A wavelet transzformáció alkalmazási területei közé tartozik a mintavételezett digitális jelek transzformációja, amelyeket az elmélet az $L^2(\mathbb{R})$ térben található véges energiájú funkcióknak tekint. A transzformációt többféleképpen el lehet végezni, a felbontási módszerek egyik meghatározója a skála és eltolás paraméterek értelmezése.

Egyik fontos módszer az ún. *diszkrét wavelet transzformáció*, amelynek során a skála paramétert a mintavételezett jel pontjain diadikus, 2 hatványainak megfelelő skálán tervezik meg, az eltolást is ezeknek a skáláknak a többszöröseire alkalmazzuk. Számítógépen futtatott algoritmusok esetében ennek az értelmezésnek előnyei vannak.

Ezzel ellentétben, a diszkrét jelekre alkalmazott folytonos wavelet felbontás a skála, illetve eltolás paraméterekre valós számokat alkalmaz (ezeket ugyancsak a mintavételezett jel jellemzőiből következteti).

A *folytonos transzformáció* jelek frekvenciaspektrumának, fáziseltolódásának elemzésére, adattömörítésre használt leggyakrabban, a transzformáció diszkrét változataira inkább formafelismerési, osztályozási feladatok és zajszűrés kategóriába tartozó alkalmazások jellemzőek (Gonzalez és mtsai. 2008; Starck és mtsai. 2010).

Ebben a munkában csak a diszkrét transzformációt, és annak is egy speciális változatát, az *à trous* típusú transzformációt alkalmaztam.

Ha a skálaparaméter értékeit egy diadikus felosztású rácson választjuk, és figyelembe vesszük a digitalizált jelek számítógépes feldolgozásánál a 2 hatványaiból adódó felbontást, az a skálaparaméter $a=2^i$, $i \in \mathbb{N}$ alakú. Az eltolás paramétert minden skálán a kiválasztott skála méret többszöröseként választjuk:

$b = n \cdot 2^i$, $n \in \mathbb{N}$. A skálázás i szintjeit oktávoknak nevezzük. Az így definiált transzformáció:

$$W(2^i, n \cdot 2^i) = \frac{1}{\sqrt{2^i}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \psi^*\left(\frac{t}{2^i} - n\right) dt, \quad (3.10)$$

ennek diszkrét kifejtése:

$$W(2^i, n \cdot 2^i) = \frac{1}{\sqrt{2^i}} \sum_k \psi^*\left(\frac{k}{2^i} - n\right) f(k). \quad (3.11)$$

A wavelet függvények az $L^2(\mathbb{R})$ négyzetesen integrálható függvény térben a tér egy, a skála paraméter által meghatározott részét feszítik ki. A skálázott wavelet függvények definíciója egy segéd függvény, az ún. skála függvény segítségével történik. A skála függvények (diadikus felbontást alkalmazva)

$$\varphi_{j,k}(t) = 2^{\frac{j}{2}} \varphi(2^j x - k), \quad j, k \in \mathbb{Z}, \varphi(t) \in \mathbb{R} \quad (3.12)$$

alakúak, és a j paraméter szerint egymásba ágyazott

$$V_j = \overline{\text{Span}\{\varphi_{j,k}(t)\}}$$

tereket feszítenek ki $L^2(\mathbb{R})$ -ben (Burrus és mtsai. 1998):

$$V_0 \subset V_1 \subset V_2 \dots \subset V_\infty(L^2(\mathbb{R})).$$

Ennek megfelelően a wavelet függvények mint W_j tereket kifeszítő függvények adódnak, amelyek két egymásba ágyazott V_j különbségeként jönnek létre:

$$V_1 = V_0 \oplus W_0, V_2 = V_1 \oplus W_1, \dots$$

(ahol $\oplus$ függvény terek egyesítését jelenti).

A φ skála függvények ortogonális, ortonormális bázisokat, illetve kereteket (*frame*) határozhatnak meg a megfelelő alterekben, így mint bázisfüggvények alkalmasak az $L^2(\mathbb{R})$ térben található függvények V_j terek szerinti felbontására², ezek felhasználásával hozzájutunk a wavelet függvények szerinti felbontáshoz is. A kompakt intervallumon diszkrétizált skálafüggvények sáváteresztő szűrőkhöz hasonló feldolgozást végeznek, és megadják a bemeneti függvény felbontását a megfelelő V_j terekben.

3.4.3.2. A diszkrét wavelet transzformáció

Az diszkrét wavelet transzformációnak több algoritmikus megvalósítása ismert. Ilyen

2. A sokskálás felbontás elméletének rövid áttekintését lásd Gonzalez és mtsai. (2008), részletes matematikai alapjait Mallat (2009) munkában.

a már említett Mallat algoritmus (Mallat 2009) vagy az ún. *à trous* algoritmus (nevét a végrehajtás során a konvolúciós szűrőbe illesztett 0-k: „lyukak”-ról kapta).

Mindkét algoritmus az egymás utáni diszkrét wavelet együtthatók közti rekurzív formulákra épül, és alul, felül- és sáváteresztő szűrőket használ az együtthatók számításánál.

Mallat algoritmus a speciálisan tervezett ortogonális vagy ortonormális wavelet bázisokra épül, amelyek teljesítik a skála, illetve wavelet függvény követelményeit, és azokat a feltételeket, amelyek az inverz transzformáció megvalósításához szükségesek (Mallat, 2009). A transzformáció köztes lépéseiben az előállított wavelet együtthatókat, valamint a továbbvitt, alacsony frekvenciájú jeleket decimálni kell.

3.4.3.3. *Az à trous algoritmus*

À trous algoritmust Holschneider, Tchamitchian és Dutilleux fogalmazták meg 1989-ben (Shensa 1992; Mallat 2009). Elméleti hátterét Mallat (2009) adja meg részletesen, a Mallat algoritmussal történő elméleti és gyakorlati kapcsolatát Shensa (1992) vizsgálja.

Az algoritmus translációinvariáns (ellentétben Mallat diszkrét algoritmusával), és a használt skála függvény, illetve wavelethez rendelt szűrőknek nem szükséges ortonormálisnak lenniük. Ez a transzformáció is diadikus skálán definiált, akárcsak Mallat diszkrét transzformációja.

À trous transzformáció redundáns: a wavelet szintek számítása folyamán nem történik decimálás, így a transzformált diszkrét jel mérete megegyezik a bementi jel méretével (mintavételezett pontok számával). Ez megkönnyíti a forma felismerés, illetve zajszűrés típusú alkalmazásokban történő használatát. A wavelet szintekben jelenlevő redundancia nem kényszerít annyira szoros feltételeket a wavelet tulajdonságaira (nincs szükség a decimált transzformációk esetén esetleg jelentkező *aliasing* – élek szakadozottsága – jelenség kivédésére, amely külön feltételt jelent a diszkrét transzformációnál használt waveletek tervezésekor).

A transzformáció különböző változatait kitűnő eredményekkel alkalmazták csillagászati kutatásokban (Starck és mtsai. 1994; Starck és mtsai. 1998a; Starck és mtsai. 1998b) ahol a feldolgozások egyik alap algoritmusává vált (Starck 1993; Starck és mtsai. 2006). Később biológiai jelek feldolgozásában is sikerrel használták (Olivo-Marin 2002; von Wegner és mtsai. 2006).

À trous algoritmus egy négy szűrőből: h , g (transzformáció) és ezek duálisaiból (fordított transzformáció), $\hat{h}$, $\hat{g}$ álló szűrő bankot használ a diszkrét transzformáció megvalósításához³.

3. A szűrők használatára a transzformáció egyes lépései közt több lehetőség van, a különböző megoldásokat lásd Starck és mtsai. (2010) szerzők munkájában.

Mivel az algoritmusok folyamán nem történik decimálás, közös angol megnevezésük *Undecimated Wavelet Transform* (UWT). Az alábbiakban az általam is használt változatot ismertetjük, amelyet a használt izotróp alakú wavelet az miatt *Isotropic Undecimated Wavelet Transform* (IUWT) nevet viseli. Mivel első alkalmazása a csillagászat terén történt, a *starlet transform* elnevezést is használjuk (Starck és mtsai. 2010).

Az algoritmus során alkalmazott szűrőknek speciális tervezési feltételt kell teljesíteniük (diadikus skálára tervezik, keretet (*frame*) alkotnak, és teljesítenek egy, az inverz transzformáció megvalósításához szükséges feltételt (lásd Mallat (2009)).

Legyenek $\varphi(t)$ és $\psi(t)$ a skála és wavelet függvények, $f(t)$ pedig legyen az eredeti analóg jel. Jelöljük $c_0[n]$ -el a diszkrét egy dimenziós jel mintavételezett pontjait a $t=n$ pont közelében. Mivel $\varphi(t)$ skála függvény, az analóg jel mintavételezett pontjait úgy tekinthetjük⁴, hogy előállíthatóak (Mallat 2009) az alábbi módon:

$$c_0[n] = f * \bar{\varphi}(k) = \langle f(t), \varphi(t-k) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \varphi(t-n) dt ,$$

ahol $\bar{\varphi}(t) = \varphi^*(-t)$.

Ha $h_j[k]$, $g_j[k]$ -vel jelöljük azokat a szűrőket amelyeket úgy kapunk, hogy $2^j - 1$ darab 0-t szúrunk be az eredeti szűrő pontjai közé ($j \geq 0$), és w_j -vel a j -edik wavelet szint együtthatóit, az *à trous* algoritmus egyszerű alakú konvolúciós formulákat ad meg a mintavételezett jel és annak a szűrőbank által transzformált kimenete között (Mallat 2009) a transzformációra:

$$c_{j+1}[n] = a_j * \bar{h}_j(n) \quad , \quad w_{j+1}[n] = c_j * \bar{g}_j(n) \quad ,$$

illetve a fordítottjára:

$$c_j[n] = \frac{1}{2} (a_{j+1} * \bar{h}_j[n] + w_{j+1} * \bar{g}_j[n]) \quad ,$$

ahol $\bar{h}[l] = h[-l]$, $\bar{g}[l] = g[-l]$.

A konvolúciós lépések közt nincs decimálás, tehát a kimeneti jel mérete megegyezik a bemenetivel. Ha speciális waveleteket használunk, ezek a formulák tovább egyszerűsödhetnek.

Starck és Murtagh az algoritmus implementációjánál a következő követelményeket fogalmazta meg a wavelet minél jobb analízáló képességének megvalósításáért

-
4. A digitális jelet, mint az analóg jel mintavételezése során kapott jelet úgy tekinthetjük, mint a skálafüggvény és az analóg jel konvolúcióját. Részletes indoklást lásd Mallat, 2009 301. oldal.

(Starck és mtsai. 2010):

- az előállított szűrők legyenek szimmetrikusak, ($\bar{h}=h$, $\bar{g}=g$),
- több dimenziós (2 vagy 3) alkalmazásban h , g illetve φ és ψ legyenek közel izotróp alakúak.

Az *à trous* algoritmusban történő használathoz a létrehozott szűrőknek nem kell ortogonálisnak vagy biortogonálisnak (Starck és mtsai. 2010) lennie, ez a feltétel megkönnyíti a kiválasztásukat.

Wavelet függvényként a köbös B-spline (a továbbiakban B_3 -spline) skálafüggvényre épülő waveletet használták. Ennek tulajdonságai különlegesen alkalmassá teszik orvos-biológiai képek elemzésére: véges intervallumon definiáltak, egyszerű algoritmusok alakíthatóak használatukkal, szimmetrikusak, optimális idő-frekvencia lokalizáló tulajdonságaik vannak (Unser 1997; Unser 1999). A függvény az alábbi:

$$\varphi(t) = \frac{1}{12} (|t-2|^3 - 4|t-1|^3 + 6|t|^3 - 4|t+1|^3 + |t+2|^3) . \quad (3.13)$$

A wavelet függvény két egymás utáni dilatált változata közt az alábbi összefüggés adható meg:

$$\frac{1}{2} \psi\left(\frac{t}{2}\right) = \varphi(t) - \frac{1}{2} \varphi\left(\frac{t}{2}\right) . \quad (3.14)$$

A függvényből az alábbi h :

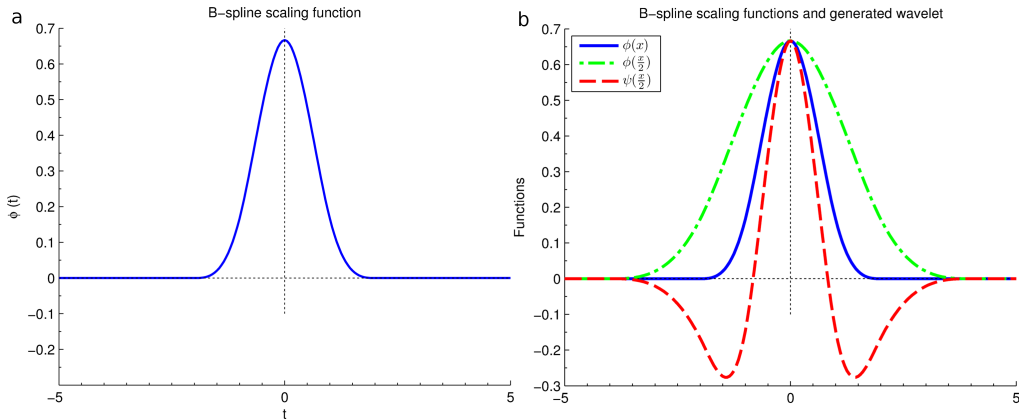
$$h[k] = \frac{1}{16} [1 , 4 , 6 , 4 , 1] , \quad k = -2, \dots, 2 \quad (3.15)$$

és g szűrők határozhatóak meg (Starck és mtsai. 2010):

$$g[k] = \delta[k] - h[k] ,$$

ahol δ definíciója: $\delta[0]=0$ minden $k \neq 0$ -ra.

Bebizonyítható, hogy ez a szűrő bank egy keret (*frame*) felosztást hoz létre és a wavelet együtthatókból visszaállítható az eredeti jel (Starck és mtsai. 2007).



3.4. ábra. A starlet transzformációban alkalmazott skála függvény és wavelet

a: A B_3 spline függvény, mint skála függvény. b: A $j=0$ és $j=1$ -es oktávoknak megfelelő $\phi(t)$ és $\phi(t/2)$ skála függvények, illetve a (3.14)-es kifejezés szerinti különbséggel képzett $\psi(t/2)$ wavelet függvény.

Más wavelet is tervezhető hasonló tulajdonságokkal, de nem mindegyiknél áll elő az alakbeli szimmetria ilyen előnyösen, mint a B_3 spline-nál. A wavelet együtthatók két egymás utáni lépés során a

$$w_{j+1}[k] = c_j[k] - c_{j+1}[k] , \quad (3.16)$$

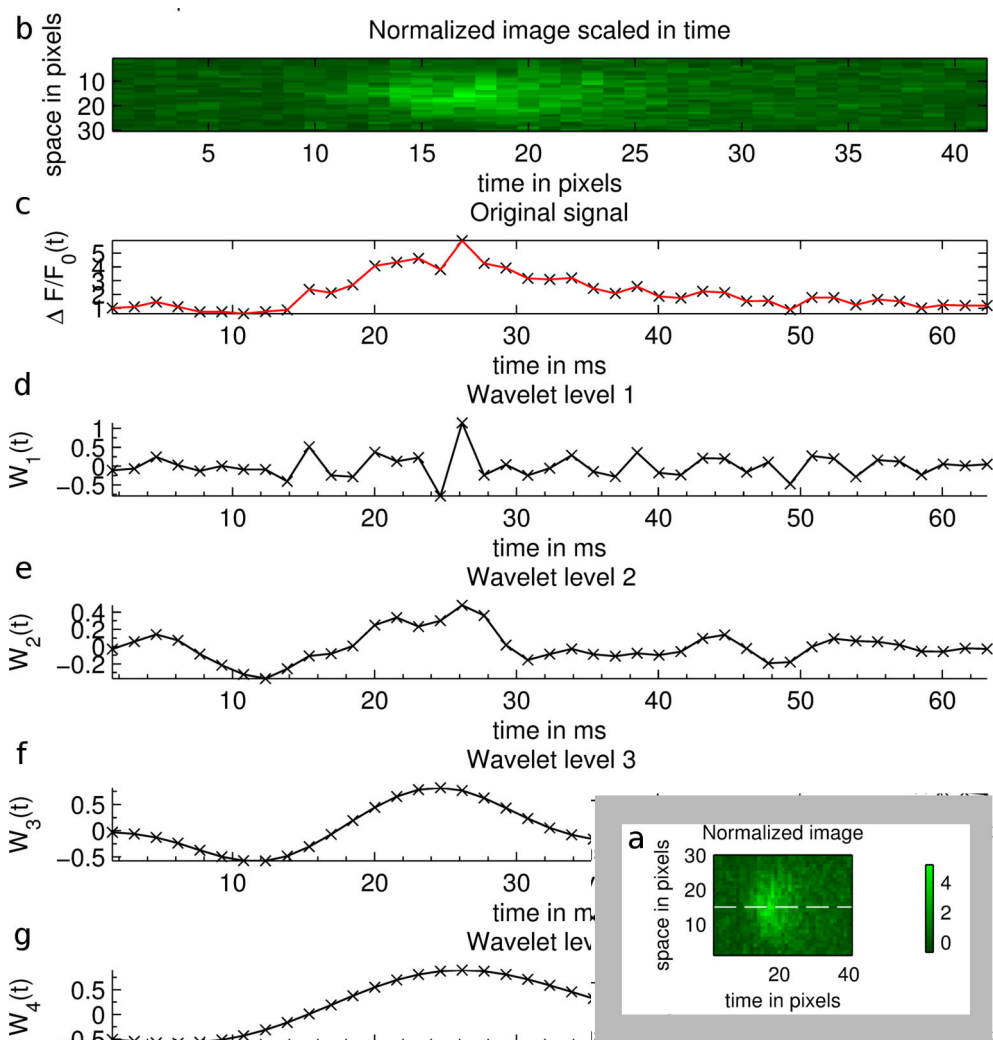
különbségből adódnak, ahol a következő szint együtthatóit a

$$c_{j+1}[k] = c_j[k] * \bar{h}_j \quad (3.17)$$

konvolúció kimeneteként kapjuk. Így a wavelet szintek együtthatói egymás utáni egyszerű konvolúcióval állíthatók elő, mivel nincs decimálás az egyes szinteken a jel mérete ugyanakkora mint a bemeneti jel. A (3.16) különbség a két aluláteresztő h_j és h_{j+1} szűrők közti magasabb frekvenciájú wavelet szint együtthatóit tartalmazza. Az együtthatók amplitúdója a szintek előre haladásával csökken. A gyakorlatban néhány szint (4-8) számítása elég a szegmentálási vagy zajszűrési feladatokhoz. Az utolsó $c_j[k]$ szint a jel háttérét tartalmazza, ami egy konstanshoz közelít. Az inverz transzformációt a

$$c_0[k] = c_L[k] + \sum_{j=1}^L w_j[k] , \quad (3.18)$$

kifejezés szerint számítjuk, ahol L az előállított wavelet szintek száma. Egydimenziós normalizált line-scan jelre történő alkalmazását lásd a 3.5 ábrán. A c. grafikonon látható jel egy spark középpontján áthaladó t függvényében lefutó jel, a következő grafikonon az első 4 szint együtthatói láthatóak.



3.5. ábra. Az egydimenziós wavelet transzformáció alkalmazása line-scan jelre

a. Normalizált $\Delta F/F_0$ kép, (060130b07_9 spark); b. Ugyanaz a kép időben skálázva, 1.54 ms/pixel; c. a spark középvezetési áthaladó, t függvényében ábrázolt, egyetlen x koordináta szerinti normalizált jel; d-g. az első 4 wavelet szint együtthatói. Magasabb szintek felé haladva, egyre alacsonyabb frekvenciájú jel komponensek maradnak az együtthatókban.

Hatékony algoritmus implementálása gyakorlatilag a konvolúció számításának sebességétől függ. A jel határait ki kell terjeszteni a konvolúció elvégzése miatt. Az algoritmus tervezőinek a tükröző megoldás a javaslata (Starck és mtsai. 2006):

$$c[k+N]=c[N-k] \text{ ,}$$

(ahol N a jel hossza), de más megoldás is megfelel (periodicitás, vagy folytonos jel alkalmazása). Így látható, hogy a jel „szélén” nem lesz tökéletes a számítás és számításba kell venni, hogy a végrehajtó szűrő hossza a 2 hatványaival nő minden lépésben, tehát nem alkalmazható olyan rövid jelekre, amelyeknek hosszát a szűrő közelíti a számítás felső szintjein.

3.4.3.4. *A két dimenziós à trous algoritmus*

Amennyiben diadikus skálán alkalmazzuk, a B_3 -spline skálafüggvénnyel képzett wavelet transláció invariáns (Mallat 2009; Starck és mtsai. 2010). Ez jelentősen megkönnyíti a két dimenziós implementációt képfeldolgozási alkalmazásokhoz.

Így a két dimenziós skála függvény az alábbi (Starck és mtsai. 2006; Starck és mtsai. 2007)

$$\varphi(t, x) = \varphi(t) \varphi(x)$$

a wavelet függvény pedig:

$$\frac{1}{4} \psi(t, x) = \varphi(x, t) - \frac{1}{4} \varphi(x, t) \text{ .}$$

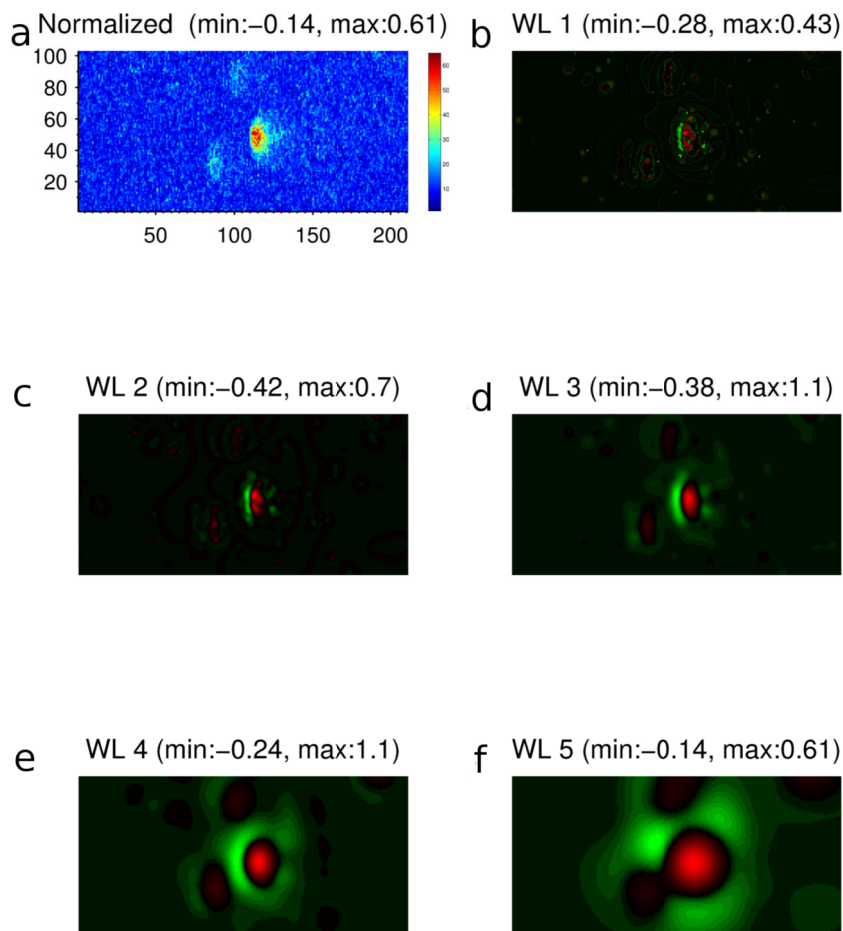
Kimutatható (Starck és mtsai. 2007), hogy az algoritmus ugyanolyan alakú formulákkal végezhető el két dimenzióban is mint egyben, ha a szintek száma L :

$$w_{j+1}[k, l] = c_j[k, l] - c_{j+1}[k, l] \text{ ,} \quad (3.19)$$

és a visszaállító formula is megegyezik:

$$c_0[k, l] = c_L[k, l] + \sum_{j=1}^L w_j[k, l] \text{ .} \quad (3.20)$$

A transzformált wavelet szintek dimenziója ugyanakkora, mint a bemeneti két dimenziós jelé, ami lehet egy digitális kép. A decimálás tehát itt sem történik meg, és ellentétben Mallat diszkrét algoritmusával, illetve az UWT más megoldásaival (Starck és mtsai. 2010), a wavelet együttthatókat egyetlen transzformált képben kapjuk meg minden szinten (a Mallat algoritmus és az UWT esetében 3 vagy annál is több együtttható tömböt kapunk egy-egy wavelet szinten).



3.6. ábra. A starlet transzformációval előállított wavelet együttható szintek

a: Normalizált line-scan kép részlete, 200 x 100 pixeles terület (060 130b07 mérés, $t=480-690$, $x=55-157$). b-f: a 2 dimenziós starlet transzformációval kapott wavelet együtthatók (WL). A transzformációt a teljes képre alkalmaztuk. A grafikonok címében a kép, illetve a wavelet szintek minimuma és maximuma található. A wavelet együtthatókat tartalmazó képeken a pozitív értékek piros, a negatívak zöld színnel vannak kirajzolva. A sötét területeken az együtthatók értéke zéró közeli.

A transzformáció egy-egy szintje elvégezhető 2 dimenziós konvolúció alkalmazásával, az alkalmazott szűrő (Starck és mtsai. 2006):

$$h = \frac{1}{256} \begin{bmatrix} 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 6 & 24 & 36 & 24 & 6 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.21)$$

Gyorsabb implementáció valósítható meg a (3.15) kifejezésben megadott szűrő egyszer t , és utána x irányban történő alkalmazásával (sorok és oszlopok szerinti konvolúció képek esetében).

A 3.6 ábra egy line-scan képre alkalmazott 2 dimenziós starlet transzformációt mutat be. A teljes normalizált képnek (060130b07) egy részletét emeltük ki a teljes képre alkalmazott transzformáció 5 első szintjével. Jól látható, hogy az első szinten csak a zaj jellegű frekvenciák jelennek meg, a továbbiakban pedig a nagyobb frekvenciájú alakzatok rajzolódnak ki, a zaj jellegű struktúrák tompulnak. Az 5. szinten jól észlelhető a transzformáció izotróp jellege.

3.4.3.5. *Objektum azonosítás (detektálás) à trous transzformációval*

A zajos képeken történő objektum azonosítás vagy detektálás során meghatározzuk a zajos jelben a számunkra fontos információt tartalmazó területet (kalciumfelszabadulási eseményeket). Starck és mtsai. több módszert adtak csillagászatban használt felvételek kapcsán, amelyekkel normális vagy Poisson eloszlású zaj tartalmazó háttérben objektumokat lehet detektálni. Az egyik ilyen a sokskálás látás modell (*Multiscale Vision Model*, a továbbiakban MSV) (Starck és mtsai. 1998a; Starck és mtsai. 2006), amely alkalmas konfokális mikroszkóp képek feldolgozására is. A módszer folyamán az objektum keresést egy sokskálás felbontás segíti, ezt meg lehet valósítani az *à trous* transzformációval, egyéb wavelet transzformációkkal, illetve más típusú transzformációval (pl. sokskálás medián). Az előállított szinteken küszöböléssel vagy más feldolgozással bináris területeket alakítunk ki, amelyek potenciális objektum helyeket jelenthetnek. Utána egyesítjük a több skálákról származó helyet, valamilyen *a priori* logikát használva, attól függően, hogy mit keresünk. Az *à trous* transzformáció alkalmas ilyen keresés támogatására, lásd a 4.3.2 szakaszt⁵.

3.4.4. Zajszűrés

3.4.4.1. *A zaj kezelésére alkalmazott módszerek konfokális képeknél*

A háttérzaj (különösen a Poisson-jellegű zaj) megnehezíti a Ca^{2+} események

5. A módszer formális leírását és általánosítását lásd Starck és mtsai. (2006) munka 4.3 fejezetében.

paramétereinek számítását (görbék illesztése), így zaj szűrő eljárások használata általános gyakorlat. A szakirodalomban leggyakrabban két egyszerű térbeli szűrő módszert használtak erre a feladatra, a futó átlag (*boxcar*) (Izu és mtsai. 1998; Ríos és mtsai. 1999) illetve medián szűrőt (Song és mtsai. 1997; Brum és mtsai. 2000; Gonzalez és mtsai. 2000). A szűrők általában 3×3 -as maszkokkal kerültek alkalmazásra, minden pontban felülírva az eredeti jelet. A wavelet alapú zajsztűrés (lásd 4.3.1 szakasz, von Wegner és mtsai. (2006), Szabó és mtsai. (2010)) az események éleit és jellegét jobban megjelenítő képet ad line-scan képek esetében, de jelentősen csökkenti a jel amplitúdóját, így paraméter számításra nem mindig alkalmazható. A szakirodalomban a paraméterszámítás legtöbb esetben a nemlineáris medián szűrő alkalmazása után történik, ez jobban megőrzi a magas frekvenciájú éleket mint a lineáris átlagoló szűrők, a wavelet alapú zajsztűrés viszont jelentősen megkönnyíti az esemény detektálás elvégzését. Frekvencia tartományt használó nem lineáris szűrők nem válnak be ezeknél a képeknél az igen magas zajsztűrés miatt.

Ebben a munkában medián, illetve futó átlag szűrőket használtam egyes esetekben előfeldolgozásra. Használatukat mindig jelzem.

3.4.4.2. Zajsztűrés a *starlet* transzformációval

A zaj a line-scan képekben egy kevert zaj, de közelítéssel tekinthető normális vagy Poisson eloszlásúnak. Ha elfogadjuk a zaj normális eloszlással történő közelítését, az alább bemutatott módszer használható a zaj szűrésére. Ha Poisson közelítést fogadunk el, akkor az Anscombe transzformáció segítségével normális zaj eloszlásra transzformáljuk a mért jeleket, és utána alkalmazhatjuk a normális eloszlásra kidolgozott procedúrát (Starck és mtsai. 1998a; Starck és mtsai. 2006).

Stacionárius normális eloszlású zaj esetében a szűrés a zaj szórásának értékére épül, így normális eloszlású zaj esetében a következő lépéseket kell végigjárni:

- a zaj szórásának durván közelítő megállapítása,
- a szórás közelítésének finomítása,
- a zaj szűrése.

Az utóbbi kettőre Starck és Murtagh dolgozott ki a *à trous* transzformációval kivitelezhető algoritmusokat (Starck és mtsai. 1998a,b; Starck és mtsai. 2006), ezeket ismertetjük röviden az alábbiakban.

A zaj szórásának durva közelítését több módszerrel el lehet végezni⁶ (Starck és mtsai. 1998a), egy jól használható módszer az átlagoló módszer. A jelet (képet) egy átlagoló szűrővel módosítjuk, és a módosított képet kivonjuk az eredetiből. A kapott különbség jó közelítése pixel szinten a szórásnak. Ennek a közelítésnek nincs nagy

6. Lásd (Starck és mtsai. 1998a) munka 2.1 szakaszát.

jelentősége, mert az alábbi iteratív módszer néhány lépésben konvergál egy jó közelítéshez.

A Starck és Murtagh által megadott zaj szórását közelítő eljárás a sokskalás felbontásra (*Multiresolution Support*, MRS) épül.

A felhasznált kontroll információ az eredeti jelben található zaj szórásának terjedése a wavelet együtthatók skáláin. Amennyiben a wavelet transzformációt egy szimulált, $\sigma^e=1$ szórással rendelkező adathalmazra alkalmazzuk, a $j=1, L$ -ig generált együttható szintek szórásai σ_j^e lesznek. A wavelet transzformáció tulajdonságai miatt (Starck és mtsai. 2006), egy σ_I szórással rendelkező jel $j=1, L$ wavelet szintjein az együtthatók szórása:

$$\sigma_j = \sigma_I \cdot \sigma_j^e . \quad (3.22)$$

A módszer elkülöníti az eredeti jel szignifikáns (információt tartalmazó) és nem szignifikáns pontjait, ezek zajt tartalmaznak. A szignifikancia teszt minden wavelet szinten az együtthatóknak a $k \cdot \sigma_j$ értékkel történő összehasonlítása, ahol k egy konstans, amelynek leggyakrabban alkalmazott értéke 3, σ_j pedig a szint szórása.

Starck és Murtagh a 3.1 táblázatban található értékeket adta meg σ_j -re egy és kétdimenziós jelekre (Starck és mtsai. 2006). Az értékeket végrehajtás közben is előállíthatjuk a megadott procedúra szerint egy $N_{0,1}$ standard normális eloszlású zajt tartalmazó egy vagy kétdimenziós adatból kiindulva.

j szint	1	2	3	4	5	6	7
1 D	0.7	0.323	0.21	0.141	0.099	0.071	0.054
2 D	0.889	0.2	0.086	0.041	0.02	0.01	0.005

3.1. táblázat. A szórás terjedése a wavelet együtthatókban

Egység szórással rendelkező szimulált, egy és kétdimenziós jel szórásának terjedése az első 7 wavelet szint együtthatóiban.

Az algoritmus lépései (Starck és mtsai. 1998b):

1. Kiszámítjuk az első közelítést egy gyors és egyszerű algoritmust alkalmazva⁷, legyen I a feldolgozandó egy vagy kétdimenziós jel (idősor vagy kép), a zaj szórásának első közelítése σ_{I_0} . Az alábbiakban kétdimenziós $I(t, x)$ jelle adjuk meg az algoritmust.

7. Az általam alkalmazott megoldást lásd az eredmények fejezetben (4.3.1).

2. Kiszámítjuk L szintre a jel wavelet transzformáltját (egy vagy 2 dimenzióban):

$$I(x, t) = c_L(x, t) + \sum_{j=1}^L w_j(x, t).$$

A c_L alacsony frekvenciájú háttérben a zaj már elhanyagolható.

3. $n=0$; az iteráció kezdő pontja.
4. Kiszámítunk egy sokskálás felbontást lásd Starck és mtsai. (1998a) $M(j, t, x)$, $j=1, L$, azokat a wavelet együtthatókat tekintjük szignifikánsnak (jelet tartalmazó), amelyekre igaz a $w_j(x, t) > 3 \cdot \sigma_j$ kifejezés, ahol σ_j a j -edik wavelet szint szórása a (3.22) kifejezésnek megfelelően.
5. Kialakítjuk az felbontásból következő bináris maszkot, amelyben 1-re állítjuk mindazokat a pixeleket amelyekre minden szint a nem szignifikáns kategóriába tartozik. Feltételezhető, hogy ezek zajos területek. A maszk által takart területen kivonjuk az eredeti képből a $c_L(x, t)$ háttérrel – a háttérrel így gyakorlatilag kivesszük a közelítésből.
6. $n=n+1$, és kiszámítjuk σ_{I_n} -et, az n -edik lépés közelítését a kiválasztott területből.
7. Ha $\frac{|\sigma_{I_n} - \sigma_{I_{n-1}}|}{\sigma_{I_n}} > \epsilon$ ismételjük a számítást a 4. lépéstől. Az ϵ relatív hibára megfelelő értéket választunk.

Mivel a $3 \cdot \sigma_j$ -nál nagyobb együtthatókat tartjuk szignifikánsnak, ezek közt lesz zaj komponens is. Ez a végső megoldásban egy eltolódást okoz, amit egy konstans együtthatóval lehet korrigálni, ezt az algoritmus szerzői empirikusan állapítottak meg (Starck és mtsai. 1998b). Az együttható értéke 0.974, amellyel a becsült szórást osztjuk be.

Harmadik műveletként a tulajdonképpeni zaj szűrést végezzük el, ekkor már rendelkezünk a zaj szórásának egy jó közelítésével.

Waveletekkel kapcsolatos zajszűrési módszerek általános elve a wavelet transzformáció alkalmazása, a kiszámolt együtthatók módosítása (az értékek vágása) és inverz transzformáció alkalmazása. A wavelet együtthatók módosítására több módszert dolgoztak ki, ezek, a jelben található, zajra következtető információra épülnek⁸ (Mallat 2009).

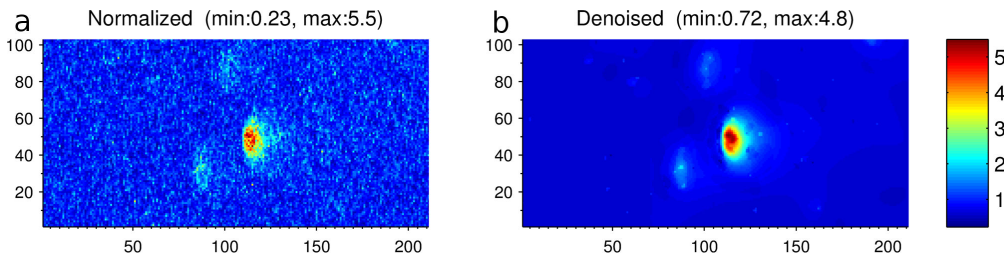
Kézenfekvő módszer az együtthatók küszöbölése valamennyi skálán és a küszöbértéknek a zaj szórása függvényében történő megválasztása. Így

8. A módszerek összefoglalását lásd Mallat (2009) munkájában, illetve Donoho (1992)-ben.

meghatározható egy:

$$T_j = \delta \cdot \sigma_j \quad (3.23)$$

küszöb minden egyes wavelet szintre, amelyet legegyszerűbb esetben a szint együtthatóinak σ_j szórásából és egy δ paraméterből számolunk. A küszöbölésnél használt szignifikancia tesztet és az együtthatók módosítását többféleképpen lehet elvégezni, ezt a 4.3.1 szakaszban tárgyaljuk. A δ értéke egy 3-4 körüli valós szám. A 3.7 ábra egy, a bemutatott módszerrel zaj szűrt, kétdimenziós line-scan képet mutat.



3.7. ábra. Zajszűrés line-scan képen

a: A line-scan mérés (060 130b07 mérés, $t=480-690$, $x=55-157$) normalizált képe. b: A zaj szűrt kép. A szűrésnél hard (kemény) küszöbölést alkalmaztunk (lásd 4.3.1 szakasz). Megfigyelhető 10%-körüli amplitúdó csökkenés.

A küszöbölés miatt a zajszűrt képen szintvonalak jelenhetnek meg, amennyiben szükséges ezeket simító szűrőkkel (pl. 3×3 -as medián vagy átlagoló szűrővel) lehet eltüntetni. Ebben a munkában detektálásra használtam a zajszűrt képet, és nem alkalmaztam ilyen korrekciót.

3.4.4.3. Fotonzaj szűrés

A fotonzaj következtében keletkezett tüskéket több módszerrel lehet kiszűrni. Bár a feladatot megoldja az egyszerű átlagoló vagy medián szűrő is, ezek a minden kép vagy jelpontra történő alkalmazás során jelentősen megváltoztatják a jelet. Így célszerű olyan megoldásokat alkalmazni, amelyek lokálisan határozzák meg a kiugró pontokat, és kontextus függő küszöböt alkalmaznak a szűrésre. Ilyen megoldás az adaptív medián (Gonzalez és mtsai. 2008) vagy lokális statisztikai megoldások, mint a Lee szűrő (kalcium jelenséget tartalmazó konfokális képekre történő alkalmazásáért lásd Parsons és mtsai. (2010)). Ugyanerre a feladatra Haar wavelet transzformációt alkalmaztak Starck és mtsai. (2006; p. 51).

A Fotonzaj szűrése alfejezetben (4.3.3) megadok egy saját megoldást amelyik a starlet transzformációt alkalmazza.

3.5. Line-scan képek normalizálása

3.5.1. A normalizálási eljárás

A konfokális mikroszkóppal készült mérések vagy képek különböző intenzitású hátttereket, jeleket és artefaktumokat tartalmazhatnak, ezek egy kísérletsorozaton belül akár egymás után következő méréseken is változhatnak. Már egy mérésen belül is van különbség a mért háttér intenzitása között a különböző x (térbeli) pontokban, mert a sejtstruktúra egye helyein más-más mértékben halmozódik fel a festék, és a mért fluoreszcens intenzitás függ az adott pontban levő festékmolekulák számától. A feldolgozáshoz, valamint paraméterszámításhoz szükséges, hogy egy közös referencia szinthez képest határozzuk meg a mért jelek intenzitásszintjeit.

Fluoreszcens képek feldolgozásánál elterjedt gyakorlat egy kísérletsorozat képeinek egységes intenzitásra történő normalizálása (Wu és mtsai. 2008). Ez az előfeldolgozó művelet a sejtstruktúrákban egyenlőtlenül felhalmozódó festékmolekulák miatt szükséges (a mért jel függ az adott pontban található festékmolekulák számától).

A spark paraméterek számítását a legtöbb munka normalizált képekből végzi $F(t, x)$ ($t=1, T; x=1, X$) idő, illetve tér koordinátájú *line-scan* képek esetében. A pásztázott vonal tér koordinátáinak idő koordináták szerinti $F_0(x)$ átlagát tekintjük a háttér fluoreszcencia referencia értékének az egyes x koordinátákra. Az átlagot azokból a képpontokból számoljuk, amelyeken nincs kalciumfelszabadulási esemény jel, ezeket a pontokat valamilyen jel detektálási módszerrel eltávolítjuk az átlagolásnál (Shirokova és mtsai. 1997; Song és mtsai. 1997; Cheng és mtsai. 1999; Rios és mtsai. 1999; Brum és mtsai. 2000). A módszer alkalmazható XY képek esetében, akár azok sorozatánál is (Brum és mtsai. 2000).

A

$$\frac{\Delta F(x, t)}{F_0(x)} = \frac{F(x, t) - F_0(x)}{F_0(x)}, x=1, X \quad (3.24)$$

képet használtam, mint normalizált képet (a számítást külön végeztem az x koordinátákra, lásd 4.1.1). Ebben, ha a zajtól eltekintünk, az egyes x koordináták referencia szintje $F_0(x)$. A $\Delta F/F_0$ kép pontjai valós számként, normalizált értéként jelennek majd meg. A háttér jelentősen változhat a rögzített képek sorozatában (ez a jelenség egy kép egymás után pásztázott pontjai esetében kevésbé valószínű).

3.6. Eseménydetektálási módszerek line-scan képeken

A jelek rögzítési sebessége miatt a line-scan képek a leggyakrabban használt módszerré váltak a sparkokhoz kötődő kutatások első 15 évében. Az alábbiakban a

line-scan képekből kinyerhető spark jellemzőkkel foglalkozunk. Ennek a folyamatnak az első lépése általában a sparkokat vagy más kalciumfelszabadulási eseményeket tartalmazó területek meghatározása. Erre a feladatra több algoritmust fejlesztettek ki, amelyeket az alábbiakban röviden ismertetek.

3.6.1. A detektáló algoritmusok teljesítményének jellemzői

A detektálás hatékonyságát és megbízhatóságát teszt képeken történő futtatások során kapott statisztikai eredményekből számolt jellemzőkkel adjuk meg. A módszert az alább bemutatásra kerülő (3.6.2-3.6.9) detektálási algoritmusok esetében alkalmazták a szerzők (Cheng és mtsai. 1999; von Wegner és mtsai. 2006; Bray és mtsai. 2007; Picht és mtsai. 2007; Kong és mtsai. 2008; Bankhead és mtsai. 2011). A paramétereket tulajdonképpen ROC (*Receiver Operating Characteristics*) analízis alapján számítjuk, amely standard eljárás a képfeldolgozásokon alapuló orvosi diagnosztikában és a statisztikai osztályozási feladatokban (Webb 2003; Davies és mtsai. 2005; Alpaydin 2010).

A statisztikai jellemzők összegyűjtésekor használt bemeneti adatok (teszt mérések, képek, jelek) előállítása fontos előfeltétele a kapott jellemzőknek. A szerzők különböző zaj modelleket használtak a fluoreszcens háttérzaj szimulációjához, normális vagy Poisson eloszlásút, illetve ezek keverékét (Cheng és mtsai. 1999; von Wegner és mtsai. 2006; Kong és mtsai. 2008). A háttérzaj előállításához használhatóak még kalciumfelszabadulási eseményeket nem tartalmazó képek, amelyeket ugyanolyan kísérleti körülmények közt készítünk mint az eseményeket tartalmazó képek. Ezeken a pixeleket randomizáljuk (Shen és mtsai. 2004; Szabó és mtsai. 2010). A teszt képeken található zaj szint jellemzésére normális eloszlású zaj esetében a zaj középértékének és szórásának arányát használtam: $BSNR = m/\sigma$ (lásd 3.3.1).

A képekre a szimulált eseményeket additív vagy más módszerekkel illesztjük. Szimulált, eseményt tartalmazó kép előállítható valódi események átlagolásával vagy a diffúziós jelenség szimulálásával, és a szimulációs tér egy egyenes menti pásztázásával (lásd 4.4.1). A szimulált eseményt tartalmazó zaj nélküli kis képeket a pásztázásnak megfelelő skálázással lehet a képekbe illeszteni, a különböző méretű események arányát megfelelő eloszlással lehet megállapítani (lásd ezzel kapcsolatban Izu és mtsai. (1998).

Ha az események detektálását osztályozó algoritmusnak tekintjük, ennek eredménye *valódi pozitív*, *tévesen pozitív*, *valódi negatív* és *tévesen negatív* találatokból összegződik. Minden detektáló algoritmus függ néhány érzékenységet kontrolláló paramétértől, ezek húzzák meg azt a határt, ahol a zaj következtében tévesen pozitív találatok jelennek meg, illetve valódi pozitív találatokat veszíthetünk.

A detektáló algoritmusok jól értékelhetőek a következő két jellemzővel: szenzitivitás

(*sensitivity*) és pozitív prediktív érték (*positive predictive value*), az elsőt a valódi pozitív találatok mértékeként, a második komplementerét a tévesen negatív találatok mértékeként használhatjuk. Jelöljük (Bushberg 2002):

- *TP* -vel (*true positive*) a valódi pozitív találatok számát, tehát találat olyan kép pozíción ahol valóban esemény van,
- *FP* -vel (*false positive*) a tévesen pozitív találatokat, ezek olyan találatok amik a zaj vagy egyéb háttér formációk miatt, olyan helyeken keletkeztek ahova nem helyeztünk eseményt,
- *FN* -nel (*false negative*) a tévesen negatív eseményeket, ezek a meg nem talált szimulált események.

A szenzitivitás (*S*) a valódi pozitív találatok számának és az összes, a szimulált képre helyezett esemény számának arányával valódi (pozitív+tévesen negatív) közelítjük, és az alábbi összefüggéssel számítjuk: $S = TP / (TP + FN)$.

A pozitív prediktív érték (*PPV*) a találatok megbízhatóságát fejezi ki, ezt a valódi pozitív találatok és az összes találat arányával fejezzük ki: $PPV = TP / (TP + FP)$.

A specificitás (*specitivity*) a ROC görbékben a hamisan detektált eseményekre ad egy mértéket: $(\text{valódi negatív}) / (\text{tévesen pozitív} + \text{valódi negatív})$ találatok aránya. E helyett használhatjuk az $1 - PPV$ értéket, mint a hamis találatokat jellemző mérték (von Wegner és mtsai. 2006).

A 4.17 ábra *S* és *PPV* görbéket alkalmaz. Ha a görbéket egyetlen paraméterrel akarjuk jellemezni, a detektálási szint 50%-át elérő pontokat lehet jellemzőként megadni: D_{50} (amplitúdó, amelyre az események 50%-a detektált) az *S* görbe és PPV_{50} a *PPV* görbe esetében (von Wegner és mtsai. 2006).

3.6.2. A hagyományos, kettős küszöbölést alkalmazó algoritmus

A sparkokhoz kötődő kutatások kezdetén a detektálásra egy kettős küszöbölést alkalmazó algoritmust fejlesztettek (Song és mtsai. 1997; Cheng és mtsai. 1999). Az eredeti megoldást többen módosították, javítottak a hatékonyságon és megbízhatóságon. A Cheng által fejlesztett algoritmus (Cheng és mtsai. 1999) azon a feltevésen alapszik, hogy a sparkokat tartalmazó területek kiemelkednek a line-scan képek háttér zajából (statisztikailag a fluoreszcens háttér középértékét meghaladják a háttér szórásának legkevesebb kétszeresével), és a kiemelkedő részek összefüggő területet alkotnak. Ezeket a területeket kizárva, a megmaradó területek statisztikai jellemzőit újraszámítva (a háttér területei), a sparkok úgy jelennek meg, mint a háttérből kiemelkedő összefüggő területek, amelyek meghaladnak egy gyengébb küszöbértéket. Ugyanazon spark többszörös detektálását elkerülendő, a területek megerősítése egy erősebb küszöb alkalmazásával történik (lásd 4.4 ábra, a kettős küszöbölést megvalósító algoritmus általam implementált verziójának

folyamatábrája).

Az algoritmus első lépése a line-scan kép normalizálása, a második az események detektálása. A háttér fluoreszcenciájának területi (t, x képeken x dimenzió) eloszlását számítjuk ki, egy ciklikus számítással: a minden térbeli ponton átlagoljuk a pásztázott sorokat (m – átlag, σ – szórás), utána kizárjuk az $m+k\cdot\sigma$ fölötti pontokat. A kizárt pontokból bináris maszkot képzünk: a műveletet a k paraméter két értékére végezzük, $k=2$ és $k=Cri$, a felhasználó által megadott paraméter. A sparkokat úgy definiáljuk, mint olyan, az első maszkon talált összefüggő területek, amelyekhez létezik kis összefüggő „sziget” a második maszkon. Az algoritmus hatékonyabban működik, ha a normalizálás előtt valamilyen simító algoritmust futtatunk a képen (medián szűrőt).

Cheng és mtsai. (1999) úgy találták, hogy a Cri paraméter 3.8 -as értékére kapunk olyan eredményeket, mint amelyeket spark feldolgozásban járatos személyek kézi bejelöléssel elvégezhetnek. Szigorúbb kritérium esetén az amplitúdó hisztogramban egy módusz alakul ki, mert a kis amplitúdójú sparkokat a módszer kevésbé detektálja, így a módusz az erősebb kritérium hatására jobbra tolódik. A zaj miatt a kis amplitúdójú sparkokat detektálni lehet, egyes, küszöb közelében levő nagyobb amplitúdójú sparkokat viszont nem. A zaj hatása és az algoritmus nem lineáris jellege miatt a sparkok amplitúdója eltolódással detektálódik, ez az eltolódás az amplitúdó értékével fordított arányú (Cheng és mtsai. 1999). Így a kis amplitúdók eleve túlzott értékkel kerülnek a hisztogramba.

A hamis pozitív találatok egy adott SNR értéknél a Cri kritériumtól függenek, míg a hamis negatívak a zajszinttől.

Cheng és mtsai. (1999) átlagolással kapott szimulált sparkokat használtak és ezeket amplitúdóban skálázták a teszt képekre történő illesztéskor, ilyen körülmények mellett SNR=3 esetében $Cri=3.5$ értéket találták ideálisnak a feldolgozásokhoz.

Ideális, kis zajszintet és kis számú sparkot (127 spark) tartalmazó mintán Cheng és mtsai. kimutatták az amplitúdó hisztogram móduszának hiányát (Cheng és mtsai. 1999). Nagyobb sorozat elemzésekor a módusz megjelent, de a predikciónak megfelelően, a Cri paraméter szigorításával (nagyobb értékek) jobbra tolódott, és ami fontosabb: mindig az 50%-os detektálási szintnek megfelelő amplitúdónál jelent meg. A megfigyelt amplitúdó hisztogramok megerősítették, hogy a hisztogram módusz nélküli. A D_{50} értékek az következő módon alakultak: $Cri = 4.8, 4.2, 3.8$, és 3.5 értékei mellett $0.43, 0.39, 0.34$, és $0.31 \Delta F/F_0$ szintet adtak, a módusz is ezen a szinten jelent meg (38 sejten történő elemzés, 2000 körüli spark esetében, SNR=3.3). A módszer ezzel párhuzamosan biztosítja alacsony amplitúdójú, szemmel nem látható események detektálását is.

Az elemzés során a képsimító lépések miatt a detektált amplitúdó kb. 16%-kal lett kisebb mint valójában, az amplitúdó detektálásánál az eltolódás a valódi és detektált között nem volt lineáris (szimulált képekből kapott mérés).

Az algoritmus több, tömböket feldolgozó műveletre épül, gyakorlatilag egyetlen paramétert, az $m + Cri \cdot \sigma$ felső küszöböt beállító Cri értéket kell kívülről megadni. Ez jól működik olyan képeken, amelyen a háttér eloszlása egyenletes. Ha ez nem áll fenn, akkor nem lehet ezzel a relatív küszöböléssel dolgozni, és csak egy abszolút érték beállításával alkalmazható az algoritmus. A gyakorlati megvalósítás IDL (*Exelis Visual Information Solutions*) programozási nyelven történt.

3.6.3. A kettős küszöbölést alkalmazó algoritmus változatai

A kettős küszöbölésre épülő algoritmust több kutatócsoport alkalmazta módosításokkal. Ez az algoritmus nem robusztus ha a képek különböző zaj formációkat és jel szinteket tartalmaznak, ez pedig fennállhat, ha más és más kísérleti körülmények közt készülnek (Song és mtsai. 1997; Gonzalez és mtsai. 2000).

Hollingworth és mtsai. (2001) egy a 3x3-as futó átlag szűrővel simított $\Delta F/F$ képen futtatott algoritmust alkalmaztak, amely csak részben hasonlít az eredetire. Egyszintű küszöbölést alkalmaztak, pontos kritériumot közöltek a küszöbölés után kapott kis szigetek méretére vonatkozóan: legalább 2 egymás melletti pixel a pásztázott x tengely mentén és 1 pixel a következő pásztázott vonalon. A teljes procedúrát (normalizált kép újrászámítása a detektált sparkok területének meghatározása után, és a detektálás megismétlése) addig ismételték, amíg a detektált sparkok száma és a számukra kijelölt területek mérete nem változott. Küszöbértékként $\Delta F/F = 0.3$ normalizált értéket használtak.

Az algoritmus alsó küszöbét alacsonyabb értékre ($1.5 \cdot \sigma$) állító változatot használtak Seville és mtsai. (2005), következésképpen a felső küszöb értéke az így kapott háttér szórásának 5-10-szerese (megvalósítás: IDL).

(Picht és mtsai. 2007) módszerében pontosan alkalmazták a klasszikus algoritmust, de a képet területekre bonthatóvá tették (maximum 5 terület), így a zajszint külön kezelhető a területeken, így más-más háttér értékkel lehet ezeken a területeken dolgozni változó zajszintek esetében. A már detektált sparkok közelében detektált eseményeket nem tekintették külön eseménynek, így hosszabb időintervallumon elhúzódó eseményeket (*calcium „ember”*) is tanulmányozhattak. A Cri paraméter optimális értékeként 3.8-at javasoltak. Szintetikus képekkel tesztelték az algoritmus hatékonyságát, ezekben normális eloszlású zajt (SNR=3, 4 és 5) és additív, mesterségesen előállított eseményeket használtak. A programot tesztelték szív és vázizom sejteken mért sparkokat tartalmazó képeken.

Megemlítjük, hogy Seville és mtsai. (2005) beépítettek az elemző programba spark találatokat törölő opciót, míg Picht és mtsai. (2007) tudatosan elkerülték ezt, azzal érvelve, hogy a hamis találatokat törlésével is szubjektív szempont szerint módosulnak a kapott hisztogramok, pedig az elemzést minden esetben ugyanarra az automata módszerre kell építeni. Megállapításaik szerint SNR=2-4-ig szinteknél a $Cri=3.8$ -as küszöb nem, vagy alig (1%) visz be tévesen pozitív találatokat, míg az

ennél megengedőbb küszöbök igen, értelemszerűen a nagyobb zaj szintnél több ilyen találat jelenik meg. A D_{50} , 50%-os detektálási szintet az $SNR=2$, 3 és 4 értékekre 0.42, 0.30 és 0.22 értékben jelölték meg a szenzitivitás grafikonokon. A 90%-os szenzitivitásra külön megadták a jellemző amplitúdó értékeket: 0.48, 0.36 és 0.26, ugyancsak 3.8-as küszöbre (Picht és mtsai. 2007). Tehát 0.1 és 0.2-körüli amplitúdókat detektálva, a line-scan képek tipikus zaj szintjein ($SNR=2-4$) mindenképpen tévesen pozitív találatokkal is kell számolni. Megvalósítás: az *ImageJ* képfeldolgozó eszköz (Rasband 2012; Schneider és mtsai. 2012) kierjesztéseként (Eckard 2007).

3.6.4. Sejtautomatát használó megközelítés

Izu és mtsai. (1998) sejtautomataszerű algoritmussal detektálták a sparkok területét. Az általuk használt algoritmus azokat a területeket keresi, amelyeken egy adott küszöbértéket meghaladó pixelek sűrűsége nagy. Az első lépés egy bináris kép készítése, amelyen a küszöböt meghaladó értékek helyén 1 áll, a többi pont értéke 0 (a küszöb tipikus értéke a háttér képező jel szórásának 1.4-szerese, ez a felhasználó által állítható paraméter). A nagy sűrűségű területeket az alábbi iteratív módszerrel detektálja az algoritmus: minden (i,j) pixelre kiszámítja egy négyzet alakú N_{size} méretű területre az 1-esre állított pixelek számát. Ha ez kisebb mint egy adott N_{live} szám, akkor nullázza az (i,j) pixel értékét, ellenkező esetben 1-re emeli. A procedúrát $N_{generation}$ -szor ismétli a kép minden pontjára. Az algoritmus alapötlete a celluláris automaták sűrűségtől függő populáció növekedésére emlékeztet. Végül a pixelek 1-esen álló szomszédainak számát egy futó átlag ($N_{size} \times N_{size}$ méretű) számítja ki, utána ezen a simított képen N_{live} szintű küszöböléssel határozza meg a sparkok területét. A procedura előtt a line-scan képekre jellemző csíkokat eltávolítja egy előfeldolgozás: a kép Fourier transzformáltján a zéró frekvenciának megfelelő komponenst nullára állítva (az időnek megfelelő dimenzióban), majd az inverz transzformációt végrehajtva, a kapott szűrt képen kezdi az előzőekben leírt procedúrát. Az algoritmust szívizom sejtekre és szimulált képekre alkalmazták.

Az N_{size} és N_{live} paraméterek növelése növeli a szenzitivitást, az $N_{generation}$ csak kis mértékben hat rá. A szimulált képeken $N_{size} = 7$, $N_{live} = 12$ és $N_{generation} = 3$ értékek detektáltak minden beépített sparkot, a szemmel nem észrevehetőket is beleértve, kb. 2%-os tévesen pozitív találattal.

3.6.5. Lokális maximum pontok kiemelése

A sparkok lokális maximum pontjainak kiemelése is alkalmazható mint detektálási algoritmus. Cleemann és mtsai. (1998) valamint Woo és mtsai. (2002) egy speciális konvolúciós kernel-lel emelték ki ezeket a területeket. A kernel (*centre-minus-surround kernel*) egy kör alakú maszk, középen pozitív súlyozású körrel, a kör körül pedig egy negatív súlyozású gyűrűvel. A belső kör sugara a sparkok középpontjai méretéhez van igazítva.

3.6.6. Statisztikai módszerek

Bányász és mtsai. (2007) statisztikai hipotézis tesztekre épülő módszert alkalmaztak patkány szívizom sejteken készült XY képeken. Az eljárás XY képekre alkalmazható, és statisztikai hipotézis vizsgálatra épül, mely a zaj eloszlásának jellegétől különböző eloszlásként keresi a sparkokat a több síkban regisztrált képeken. A módszer csak ismert eloszlású (pl. normális eloszlású) zaj háttérre alkalmazható.

3.6.7. Wavelet transzformációt alkalmazó módszerek

Az *à trous* diszkrét wavelet transzformációt erős háttérzajt tartalmazó felvételekre Starck és mtsai. (2002) alkalmazták először a csillagászat területén, meghatározták a módszer részleteit és az általam is használt wavelet kiválasztását. A módszer kétdimenziós változatát konfokális képekre Wegner és mtsai. alkalmazták először (von Wegner és mtsai. 2006; von Wegner és mtsai. 2007).

A transzformációt részletesen a 3.4.3.3 szakaszban mutattam be, általam megvalósított implementációt pedig a 4.3.1 és 4.3.2 szakaszokban tárgyalom. Ebben a munkában az egy és kétdimenziós transzformációt is használtam zajsűrésre és detektálásra.

Az egy dimenziós *à trous* transzformációt később Bankhead és mtsai. (2011) is használták kalciumfelszabadulási események elemzésére.

Megemlítem, hogy a normális eloszlásra épített *Mexican Hat* waveletet (folytonos valós transzformáció) is használták kalcium sparkok detektálására és osztályozására (Zhou és mtsai. 2007).

3.6.8. Mintaillesztés

A kalciumfelszabadulási események kiemelése a háttérből statisztikai osztályozási módszerekkel is történhet, ennek a lehetőségnek egyik megvalósítása a sablon illesztés (*template matching*) kategóriájába tartozó algoritmusok (Cannell és mtsai. 1994; Kong és mtsai. 2008; Soeller és mtsai. 2009). Ezek a detektáló módszerek feltételezik, hogy a keresett alakzat (esemény) alakja ismert, és egy referencia alakzathoz (sablon) hasonló alakzatot keresnek a képeken, line-scan képek esetében ez egy 2 dimenziós alakzat, a módszer alkalmazható több dimenzióra is (Soeller és mtsai. 2009). Az összehasonlítás alapja valamilyen mérték, amivel jellemezhető a távolság a sablon, illetve a képen található ugyanolyan méretű alakzatok között. Képfeldolgozás esetében ezt a legkézenfekvőbb kereszt korrelációs együtthatóra visszavezetni (Theodoridis és mtsai. 2009). A sparkok esetében az összehasonlításnak meg kell oldania a sablon méretarányaiban történő változtatását, de nem áll fenn annak szükségessége, hogy rotációra invariáns legyen ez a mérték.

Sparkok detektálására alkalmazható módszert (*matched filter*) Kong és mtsai. (2008) mutattak be részletesen. Az algoritmus a normalizált kép és egy sablon spark közti

keresztkorrelációs tömböt számolja ki (a kép gyors Fourier transzformáltja és a sablon komplex konjugáltja szorzataként), utána normalizálással és középérték levonással Pearson korrelációs együtthatóját állítja elő az eredmény tömb minden pontjára. A kapott tömb iteratív módszerrel keresi a maximum pontokat ($PreXY_i$, az i . iterációban), egészen addig, amíg az utolsó maximum még meghalad egy RSTOP küszöböt. A randomizált képből és a sablonból ugyanolyan eljárással előállított korrelációs együtthatókat tartalmazó tömbből határozza meg az RSTOP értékét, mint az átlag fölött a szórás hatszorosának megfelelő érték. A kapott maximum pontok potenciális spark középpontokat jelenthetnek, az algoritmus a továbbiakban ezek környezetén újabb keresést végez. A sablon szignifikánsan háttér fölötti pontjaiból egy kernelt képez, és azt egy 10×10 pixeles területen csúsztatva a $PreXY_i$ pontok körül Pearson rangkorrelációs együtthatóját (3.25) számolja ki. A ρ értékére szignifikancia tesztet végez, permutációs tesztel (3.26), és egy kétoldali P értéket számol ki (a t közelíti a Student eloszlást $N-2$ -es szabadságfokkal, R_i , S_i a rangsorolt kép és sablon pontok, N azon sablon pontok száma, amelyek megfelelnek a szignifikánsan háttér fölötti kritériumnak).

$$\rho = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R})(S_i - \bar{S})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2} \cdot \sqrt{\sum_i (S_i - \bar{S})^2}} \quad (3.25)$$

$$t = \rho \sqrt{\frac{N-2}{1-\rho^2}} \quad (3.26)$$

A P érték minimumát adó kép koordináták lesznek a spark középpontjának legvalószínűbb pontjai. Ha a legkisebb P érték kisebb mint egy, a felhasználó által meghatározott szignifikancia szint ($SIGP=0.0005-0.002$), az esemény nem lesz sparkként elfogadva. A következő iteráció előtt a sablon autokorrelációs tömbjét kivonja a kép korrelációs tömbből a találatot jelző maximum pontra igazítva (így a következő maximum pont kereshetővé válik).

A kétdimenziós, a sparkok alakjához hasonló sablonokat analitikusan, exponenciális függvényeket használva állították elő (lásd Kong és mtsai. (2008): 3, 4, 5 egyenlet).

A módszer a klasszikus algoritmusnál lényegesen jobb szenzitivitást mutat: több fókuszon kívüli kis eseményt és kevesebb tévesen pozitív találatot ad. A szerzők mérései szerint a klasszikus algoritmus négyszer annyi foton/pixel esetén éri el a detektálási határt mint a sablonon alapuló. A diszkrét wavelet alapú keresésekkel viszont hasonló szenzitivitást produkál. Megjegyezzük, hogy a szerzők szintetikus képeken használt zaj generálási eljárása más, mint a többi ismert algoritmus tesztelésénél használt módszer.

A szerzők az algoritmus előnyének tartják, hogy csak a sablon sparkra van szükség a futtatásához, ellentétben a klasszikus vagy wavelet alapúakkal, amelyeknél mindig legalább két paramétert (többnyire ezek küszöbölésekhez kötöttek) a felhasználónak kell beállítania. Az algoritmus nemparaméteres teszttel állapítja meg a detektálás igaz vagy téves voltát, ami ismét kiemeli azt a tényt, hogy nincs szükség kézig beállított paraméterekre.

Az algoritmus hátránya a lényegesen hosszabb futási idő (kb. háromszorosa a klasszikus algoritmusnak).

Kiemelendő, hogy többféle sablont használva, olyan jellegű kereséseket lehetséges vele megoldani, amit a többi algoritmus nem biztosít: ezek nem rendelkeznek forma felismerő képességgel (ez viszont jelentősen nehezíti és lassítja az eljárást).

3.6.9. Szórás stabilizálásának alkalmazása

Bankhead és mtsai. (2011) retina sima izom kalciumfelszabadulási eseményeinek elemzésére dolgoztak ki egy detektálási módszert, a mérések háttere változó intenzitású volt, és ezen Poisson zaj eloszlást mutattak ki.

A képek előfeldolgozásaként a Poisson jellegű zaj eloszlást szórás stabilizálás módszerrel alakították normális eloszlásúvá az Anscombe transzformáció (3.4.1) egy módosított változatát használva, figyelembe véve az alacsony, $SNR=2$ körüli zajszintet is. Erre a zajszintre egy feltételeknek megfelelő (a szűrő intervalluma alatt a jel viszonylag konstans) normális (Gauss) szűrőt kell alkalmazni előfeldolgozásként (Zhang és mtsai. 2008) a szkennelt sorok x irányában. A módszer az eredeti (nem normalizált képen) kerül alkalmazásra, és feldolgozás előtt a kép hátterét kísérleti (hátter kimérése nem festett sejteken) vagy becslési módszerekkel le kell vonni.

Az így előfeldolgozott képen a detektálást t irányba alkalmazott egy dimenziós $\hat{a}$ *trous* (starlet) (3.4.3.3) transzformációval végezték. Két köztes képet állítottak elő:

- az első kép a zaj kiküszöbölését oldja meg (kis méretű $\hat{a}$ *trous* szűrő),
- a második a hátteret közelíti (nagy méretű $\hat{a}$ *trous* szűrő)⁹.

Az elsőből a másodikat levonva küszöbölésre alkalmas képet kapunk, a küszöböt a normális eloszlású zaj szórására építve lehet skálázni. Ezt több módszerrel is meg lehet becsülni, például a szoft wavelet vágásnál alkalmazottal (Donoho 1995).

A szerzők jó eredményeket értek el a módszer alkalmazásával, amelyet a küszöbölő, a minta illesztő és az $\hat{a}$ *trous* wavelet módszerekkel hasonlítottak össze kísérleti és szimulált képeken (lásd 5.2).

9. A részleteket lásd Bankhead és mtsai. (2011) 720. oldal.

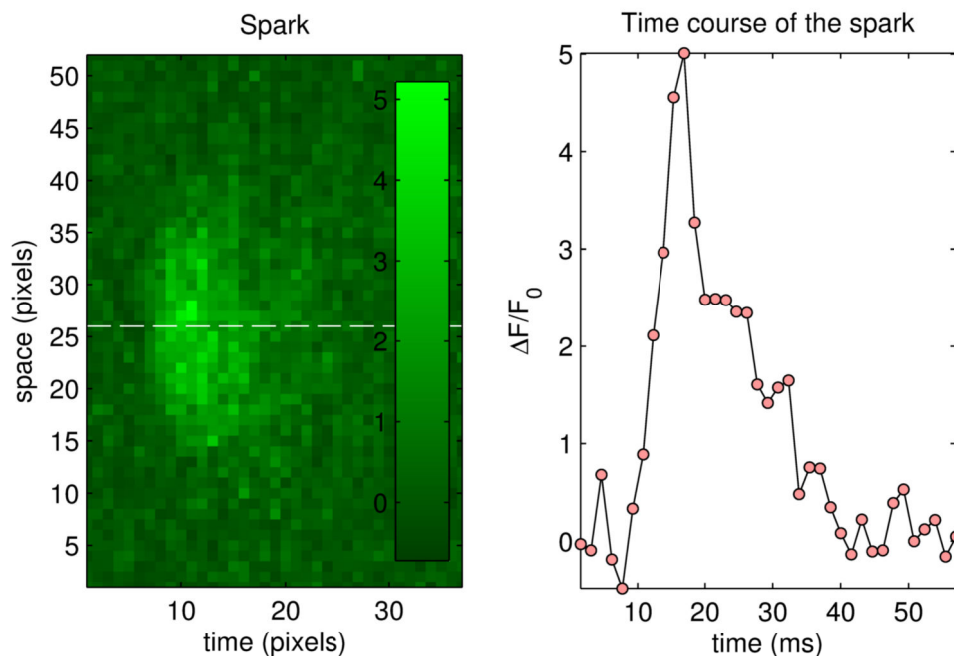
3.7. Kalciumfelszabadulási események jellemzői

3.7.1. Tanulmányozott események típusai

Ebben a munkában kalcium *spark* (gyors, rövid) és *ember* (lassú, hosszan tartó) események (lásd 1.3.6) paramétereit ismertetem, elsősorban a szakirodalomban általánosan alkalmazott módszerek szerint, saját, munkacsoportunk által alkalmazott módszerek esetében ezt külön jelölöm.

A továbbiakban külön foglalkozunk az 1-2 ms pásztázási periódussal (500-1000 Hz, az LSM 510, illetve 510 META készülékekre jellemző) rögzített line-scan képek eseményeivel, majd később külön kitérünk a nagy sebességű 50 μ s körüli pásztázási periódussal (20 kHz, LSM LIVE készülékre jellemző) készült képek eseményeinek paramétereire.

A sparkokkal kapcsolatos kutatások első szakaszára a pásztázó vonal 1-2 ms intervallumonkénti ismétlése a jellemző, ekkor alakultak ki az alábbiakban megadott paraméter számítási módszerek. A 3.8 ábrán látható kép tipikus (060130b06_5 mérés részlete), 1.54 ms/pixel sebességgel line-scan módszerrel rögzített sparkot ábrázol. Tipikus kalcium „ember” jelenséget a 4.8 ábra tartalmaz.



3.8. ábra. Tipikus line-scan módszerrel rögzített spark

- a. Az 1.54 ms/pixel sebességgel rögzített eredeti $F(t,x)$ jel részlete (060130b06_5 mérés)
 b. A spark amplitúdójának időbeli lefutása az a. ábrán fehér szaggatott vonal mentén számolva.

3.7.2. Ca spark paraméterek 1-2 ms körüli pásztázási sebességnél

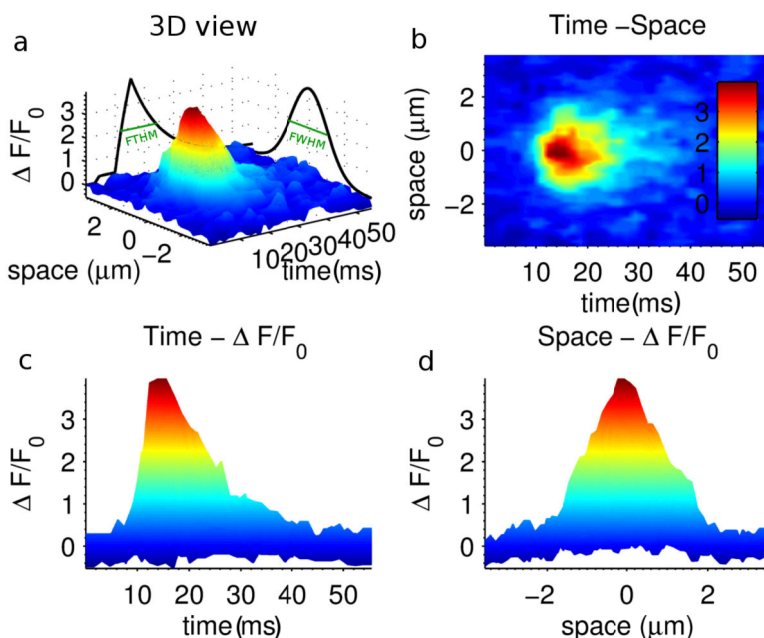
A line-scan kísérletekben észlelt sparkok jellemzőire alkalmazott első paraméter számítások a megjelenített képeken mért térbeli és időbeli távolságokra épültek (Shirokova és mtsai. 1997; Cheng és mtsai. 1999).

A sparkok fontosabb jellemzőinek matematikai leírása a kutatások első szakaszában vált általánosan elfogadottá (Lacampagne és mtsai. 1999; Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003). A fontosabb és általánosan használt paraméterek:

- amplitúdó,
- félérték-szélesség (teljes szélesség a maximum felénél, FWHM - *full width at half maximum*),
- időtartam (*duration*),
- felfutási idő (*rise time*), illetve

- a csúcs eléréséhez szükséges idő (*time to peak*).

Ezeket a paramétereket több szerző alkalmazta a sparkok jellemzésére, és jelenleg is használatosak *line-scan* módszerrel rögzített sparkok jellemzésére (Cheng és mtsai. 2008).



3.9. ábra. Line-scan módszerrel rögzített spark térbeli ábrázolása

A 3.8 ábrán bemutatott spark térbeli ábrázolása a spark normalizált és medián szűrt képéből készült, a képpontok számát x és t irányban is négyszeresére növeltük lineáris interpolációval. a. Három dimenziós megjelenítés (tér, idő, amplitúdó), a két háttér oldalon a spark paraméterek számításakor használt időbeli és térbeli profilokra illesztett görbék; b. az interpolációval kapott kép; c. a spark az időbeli kiterjedése; d. a spark térbeli kiterjedése.

A jellemzők számítása a spark időbeli és térbeli profiljára illesztett görbékre épül (3.9 ábra). Az illesztésnél használt pontokat a $\Delta F/F_0$ normalizált képből nyerjük (egyes szerzők a normalizálás előtt vagy után használhatnak zajszűrő vagy simító eljárásokat a képen). A módszer szerint nem várható el, hogy az illesztés tökéletes legyen, de olyan mértékekhez jutunk, amelyek jól jellemzik a sparkot¹⁰. Valamennyi

10. A spark idő profiljára (3.27 egyenlet) illesztett görbével kapcsolatban Hollingworth és mtsai. megjegyzik: „Although there is no a priori reason to expect Eq. 1 to exactly fit the time course of a spark, it can be used to characterize its main features.”(Hollingworth

illesztésnél legkisebb négyzetek módszerét alkalmaztam, a görbék nem lineárisak. Jelen munkában a Levenberg-Marquardt módszert használtam (Seber és mtsai. 2003) a sparkok idő és térbeli profiljainak illesztésére.

Az alább bemutatott jellemzőket Hollingworth és mtsai. (2001) 2.048 ms/line és 0.2 µm/pixel felbontásra alkalmazták, jelen munkában az LSM510 és LSM510 META mikroszkópok esetén 1.54 ms/line és 0.14 µm/pixel felbontásra alkalmaztuk őket.

Más szerzők által megadott illesztési görbék hasonlóak a Hollingworth és mtsai. (2001) munkában megadottakhoz (Lacampagne és mtsai. 1999).

3.7.3. A sparkok időbeli profiljának jellemzői

A sparkok időbeli profiljának jellemzésére két exponenciális függvényből felépített funkcionális formát alkalmazunk (Lacampagne és mtsai. 1999; Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003). Erre egy megoldás az alábbi (Hollingworth és mtsai. 2001):

$$\begin{aligned} (\Delta F/F_0)(t) &= A_0 & t < t_1 \\ (\Delta F/F_0)(t) &= A_0 + A_1 \left\{ 1 - \exp\left[-\frac{(t-t_1)}{\tau_{on}}\right] \right\} & t_1 \leq t < t_2 \\ (\Delta F/F_0)(t) &= A_0 + (A_1 \left\{ 1 - \exp\left[-\frac{(t_2-t_1)}{\tau_{off}}\right] \right\} - A_2) \exp\left[-\frac{(t-t_2)}{\tau_{off}}\right] + A_2 & t_2 \leq t \end{aligned} \quad (3.27)$$

A görbe illesztésnél a felhasznált pontokat a sparkot tartalmazó detektált területből kapjuk, ennek határai a használt spark keresési módszer és küszöbölési eljárástól függően a spark legmagasabb pontjai értékének kb. 10-15%-ánál vannak. Az idő profil illesztéséhez a detektált terület tér koordináta szerinti középvezetét vesszük, és a középvezet körüli oszlopokból átlagolunk hármat¹¹.

A sikeres illesztéshez a területet mindkét idő szerinti irányban, a spark előtt és után ki kell terjeszteni (kb. 25 pixellel a spark előtt és 50 pixellel a spark után (Hollingworth és mtsai. 2001), ezt az értéket paraméterként lehet változtatni). A sparkot a detektált terület x koordinátái szerint szimmetrikusnak tekintjük.

Illesztés után a görbe félérték-szélessége adja a sparkok félérték-szélesség paraméterét (FTHM – *full time at half maximum* vagy FDHM – *full duration at half maximum*), amely jól jellemzi a diffúziós jelenség kinetikáját.

A görbék illesztése további jellemzők kinyerését biztosítja. Ezek meghatározásához referencia pontnak tekintjük a háttér szintjét a görbe maximális amplitúdójának 10%-ával meghaladó pontját a spark előtt és után (a háttér szintje numerikusan 0, amennyiben normalizálásnál kivonjuk a mért pontokból az F_0 értéket). Legyenek

2001).

11. Line-scan képekhez kötött számítások esetében általános gyakorlat a 3 tér vagy idővonalon kapott értékek átlagolása a magas szintű zaj miatt.

ezek t_1 és t_3 , a görbe maximum pontja pedig legyen t_2 -nél.

Az idő profil felfutási ideje (*rise time*): a t_1 és t_2 közti intervallum, ez megfelel a sparkot kiváltó kalcium csatorna aktív időtartamának.

Jellemzőnek lehet használni még az illesztett függvény paramétereit: A_0 , A_2 (kezdeti és végső jel szint) és a τ_{on} és τ_{off} időkonstansokat.

A csúcs amplitúdója (t_2 időpont) ugyancsak felhasználható jellemzőként mint az idő profil maximális amplitúdója, ez $A_1(1 - \exp(-(t_2 - t_1)/\tau_{on}))$ kifejezéssel számolható.

2 ms-os pásztázási periódus esetében a felfutó ág rövid, általában néhány (2-5) illesztési pontot jelent. Így a τ_{on} konstansot nehéz meghatározni, értékét lehet rögzíteni a pásztázási sebességtől függően, pl. $\tau_{on} = 6 \text{ ms}$, 2.048 ms/line esetében (Hollingworth és mtsai. 2001).

Az időprofil leszálló ága (*fall time*) és a spark teljes időtartama (*duration*) nem egyértelmű paraméterek. A t_3 időpont nagyon messzire kitolódhat a kalcium lassú eltávolítása miatt, és a háttér fölötti kis amplitúdójú oszcilláció (ez meghaladhatja a maximális amplitúdó 10%-át) miatt nehezen detektálható. Ha használjuk jellemzőként, a leszálló ágnak a maximális amplitúdó 15%-át még meghaladó pontot lehet erre felhasználni.

A t_1 és t_3 pontok meghatározásának alternatív módszere lehet még a háttér középértékének kétszeres szórással történő meghaladása közti intervallum (Shen és mtsai. 2004).

Az általam megoldott implementáció szerinti időprofil görbe illesztés a 4.6 ábrán látható a 4.2.2 szakaszban.

3.7.4. A spark térbeli jellemzői

A térbeli profilt a t_2 időpillanat utáni vagy körüli 2 vagy 3 pásztázott sor átlagából számítjuk, a detektált területet kb. 25 pixellel (kb. $5 \mu\text{m}$) terjesszük ki x irányban. A felhasznált függvény az alábbi (Hollingworth és mtsai. 2001):

$$(\Delta F/F_0)(x) = A_3 + A_4 \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2 \text{var}}\right), \quad (3.28)$$

ahol A_3 , A_4 , x_0 és var a Gauss függvény paraméterei. A módszer elvárásai ugyanazok, mint a megelőző illesztés esetében, nem pontos hanem hozzávetőleges jellemzése a spark térbeli kiterjedésének. A Gauss függvény félérték-szélességét a következő kifejezésből számítjuk:

$$FWHM = \sqrt{8 \ln(2) \cdot \text{var}} \approx 2.35482 \cdot \text{std} \quad (3.29)$$

Ez az érték adja a spark térbeli kiterjedésének félérték-szélességét ($FWHM$ - full

width at half maximum), *std* a Gauss függvény szórása.

Az illesztések nem alkalmazhatóak minden detektált spark esetében, különböző okok miatt (nagyon kis amplitúdó, sikertelen illesztés a zaj miatt vagy rossz illesztési paraméterek, az A_i paraméterek fizikailag értelmetlenek az illesztés után). Ezek az esetek kikerülnek az analízisből és a detektált sparkok kb. 5-15 %-át jelenthetik.

Az általam megoldott implementáció szerinti térbeli profil görbe illesztés a 4.7 ábrán látható a 4.2.3 szakaszban.

3.7.5. A signal mass függvény

A *signal mass* (jel tömeg) függvényt először Sun és munkatársai alkalmazták (Sun és mtsai. 1998), utána több munkacsoport használta (Zou és mtsai. 2004) különböző változatokban kalciumfelszabadulási események elemzési paramétereként (Shirokova és mtsai. 1999; Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003; Zou és mtsai. 2004)(Zhou és mtsai. 2005). A jellemző a fluoreszcens festék által kötött Ca^{2+} ionok mennyiségére ad meg egy értéket az idő függvényében. A függvény a kalcium kibocsátás mértékére, így közvetetten a megnyílt csatornák számára is enged következtetni.

A módszer egyszerre veszi figyelembe a spark amplitúdóját és térbeli kiterjedését, a kétdimenziós *line-scan* jelből a kalcium kibocsátás három dimenziós nézetére próbál következtetni. A számítás csak akkor működik gyakorlatban használhatóan, ha a pásztázás az esemény középpontján át történik (fókuszban van a kalciumfelszabadulási esemény) és az események jól elkülönültek, nincsen a jeleknek átfedése egyik dimenzióban sem (Sun és mtsai. 1998; Zou és mtsai. 2004).

Sun és mtsai. (1998) fókuszban levő eseményekre alkalmazták a módszert, és a számítást csak a spark zajtól jól elkülönülő részére végezték el (magas amplitúdójú pontok). Az esemény középpontját a vizuálisan állapították meg, a kiválasztott terület minden egyes pásztázott sorára összeadták a $\Delta F/F_0$ jel pontjait, súlyozva a pontok középponttól történő távolságának köbével.

A Hollingworth és mtsai. (2001) által használt módszer az alábbi térbeli integrállal definiálja a *signal mass* függvényt:

$$smass = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} (\Delta F/F_0)(x, y, z) dx dy dz \quad (3.30)$$

A *smass* érték a t idő függvénye, amelyet az egyszerűbb jelölés miatt elhagytunk, elvileg a *line-scan* bármely időpillanatában számolható.

Konfokális kísérletekben a felhasznált festék fluo-3, vagy hasonló karakterisztikájú, a Ca^{2+} -t kötött festék, *CaFluo* fluoreszcenciájának intenzitása a citoplazmában legalább 100-szor nagyobb, mint a szabad festék fluoreszcenciájának intenzitása

(Harkins és mtsai. 1993; Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003). Ha F_{fluo} -val jelölünk egy virtuális fluoreszcens festék koncentrációt, amelynek fluoreszcenciáját észleljük, F_{min} és F_{max} -szal a szabad, illetve a kötött festék fluoreszcens intenzitását, $Fluo$ -val a szabad festék koncentrációt, az alábbi összefüggés szerint az észlelt fluoreszcenciát közelítéssel a $CaFluo$ kötött festék fluoreszcenciájának tulajdoníthatjuk:

$$[F_{fluo}] = [CaFluo] + \frac{F_{min}}{F_{max}} \cdot [Fluo] \quad (3.31)$$

A $\Delta F/F_0$ észlelt normalizált értéket a $\Delta[F_{fluo}]/[F_{fluo}]_R$ koncentráció hányados és a mikroszkóp pont kiterjedés függvényének konvolúciójából kapjuk, itt $[F_{fluo}]_R$ a fluoreszcens háttér szabad festék koncentrációja. Bebizonyítható¹² (Chandler és mtsai. 2003), hogy a *signal mass* függvény a következő értéket közelíti:

$$smass \approx \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{[CaFluo](x, y, z)}{[F_{fluo}]_R} \right) dx dy dz, \quad (3.32)$$

így az összefüggés kifejezi, hogy az észlelt $CaFluo$ mennyisége közelítőleg egyenlő az $smass$ érték és az $[F_{fluo}]_R$ háttér koncentráció hányadosával, így közvetlenül jellemzi a jelen levő $[CaFluo]$ koncentrációt.

Az integrál számítását egy közelítő módszerrel végezték el, az alábbi gondolatmenet alapján (Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003). Feltételezzük, hogy a pásztázó vonal a spark középpontján halad át, és ezt tekintjük a koordináta rendszer középpontjának. A spark három dimenziós térbeli kiterjedését közelítjük három Gauss függvény szorzatával:

$$(\Delta F/F)(x, y, z) = A \cdot \exp\left(\frac{-x^2}{2 var_x}\right) \cdot \exp\left(\frac{-y^2}{2 var_y}\right) \cdot \exp\left(\frac{-z^2}{2 var_z}\right), \quad (3.33)$$

amelyek térben izotrópikusak. Mindkét feltételezés közelít, és pontatlanságot vezet be, mert a kiterjedés sem Gauss függvény alakú, és a konfokális pont kiterjedés függvény a z irányban nagyobb, mint az x és y tengelyek szerinti. Amennyiben A a jel amplitúdója a középpontban, a (3.30) egyenlet így alakul:

$$smass = A \cdot (2\pi)^{3/2} \sqrt{var_x \cdot var_y \cdot var_z} \quad (3.34)$$

A $var_x = var_y = var_z$ feltétel és (3.29) felhasználásával az alábbi kapjuk:

12. A bizonyítás az $[F_{fluo}]$ koncentráció pont-kiterjedés függvénnyel történő konvolúciójára épül, és elhanyagolja a szabad festék fluoreszcenciáját, lásd: Chandler, Hollingworth és Baylor (2003), 313. o.

$$smass = A \cdot \left(\frac{\pi}{4 \ln 2} \right)^{3/2} \cdot FWHM^3 = A \cdot 1.206 \cdot FWHM^3 \quad (3.35)$$

A (3.35)-es egyenlet használható a *signal mass* jellemző közelítésére.

A módszer rendkívül érzékeny a zajra az *FWHM* érték köbével történő súlyozás miatt, mivel a jel/zaj arány romlik a forrástól mért távolsággal, és ez pontatlan lehet, így a zaj hozzájárulása a *signal mass* értékhez megnő (Zou és mtsai. 2004).

Shirokova és mtsai. (1999) más módszert használtak: az esemény térfogatát egy gömbbel közelítették, ez a sparkot az amplitúdó felénél metszi és kisebb térfogatot ad mint az előző számítás (0.434-szeresét):

$$smass = A \cdot (4/3) \pi \cdot (FWHM/2)^3 = A \cdot 0.524 \cdot FWHM^3$$

Ugyanezt a számítást más munkacsoportok is átvették (Hollingworth és mtsai. 2001; Chandler és mtsai. 2003).

A *signal mass* függvény használatát lásd még Chandler és mtsai. (2003) , valamint Zhou és mtsai. (2005) munkáiban. Spark jellemzőként az *smass* értéket meg lehet adni az idő függvényében, vagy a spark maximum pontjában (Chandler és mtsai. 2003).

3.8. Kalcium „ember” típusú események jellemzői

A kalcium „ember” típusú események (1.3.6) jellemzőire nincs általánosan elfogadott számítás az irodalomban, az általam definiált paraméterek bemutatását a 4.2.4 pontban tárgyaljuk (Kalcium „ember” típusú események paraméterei).

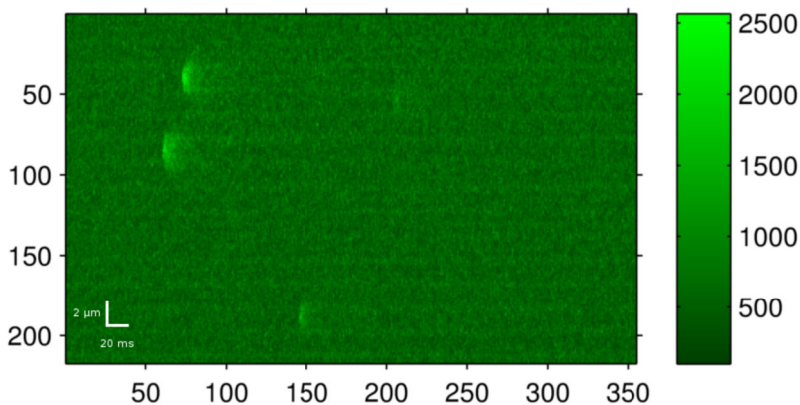
4. Eredmények

Az eredmények bemutatásánál használt line-scan képek LSM 510 META, illetve LSM LIVE mikroszkópokkal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország) készültek, a kísérletek és publikációk listáját lásd a 4.5 pontban (A kiértékelési módszerek használata kísérletekben). Az egyes konkrét mérések azonosító adatait lásd az A Függelékben (A. A felhasznált konfokális mérések adatai), ezek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Élettani Intézetében folytatott kísérletek során készültek.

4.1. Elemzés a klasszikus módszerrel

4.1.1. Normalizálási és fotókioltás korrekciós eljárás

A két eljárást együtt tárgyalom, mindkettő része az eredeti mérés előfeldolgozásának, amely után a mérés alkalmassá válik paraméterek számítására. A normalizálás (3.5), a sejtstruktúrákban egyenlőtlenül felhalmozódó festékmolekulák miatt szükséges, így egy kísérletsorozat alatt kapott mérésekből számolt paraméterek összehasonlíthatóak lesznek.



4.1. ábra. line-scan mérés részlete

t, x felbontás 355×217 pixel, 060 209b31 mérés.

Az általam alkalmazott eljárás a következő:

a.) Az $F(t, x)$ mikroszkóp által előállított (általában egész számokkal kódolt, 12 vagy 8 bites) képet valós számmá konvertáljuk (sorok: idő dimenzió $1, T$; oszlopok:

tér dimenzió 1, X). Kép részlet a 4.1 ábrán látható, mérés azonosító 060 209b31. A detektor által rögzített 12 bites értékek 98 és 2565 közöttiek (a készülék egységei). A normalizálási eljárás második paramétere a kalciumfelszabadulási események helyét tartalmazó $B(t, x)$ bináris maszk, az események helyén a képpontok értéke 0. Ezt különböző eljárásokkal határozhatjuk meg, lásd például a kettős küszöbölést alkalmazó eljárást (4.1.2).

b.) Opcionálisan elvégezzük a fotókioltást korrigáló eljárást:

$$\begin{aligned} P(t) &= \frac{\sum_x F(t, x)}{X} & x=1, X; B(t, x)=1 \\ k(t) &= \frac{P(1)}{P(t)} & t=1, T \\ F_c(t, x) &= k(t) \cdot F(t, x) & t=1, T; x=1, X \end{aligned} \quad (4.1)$$

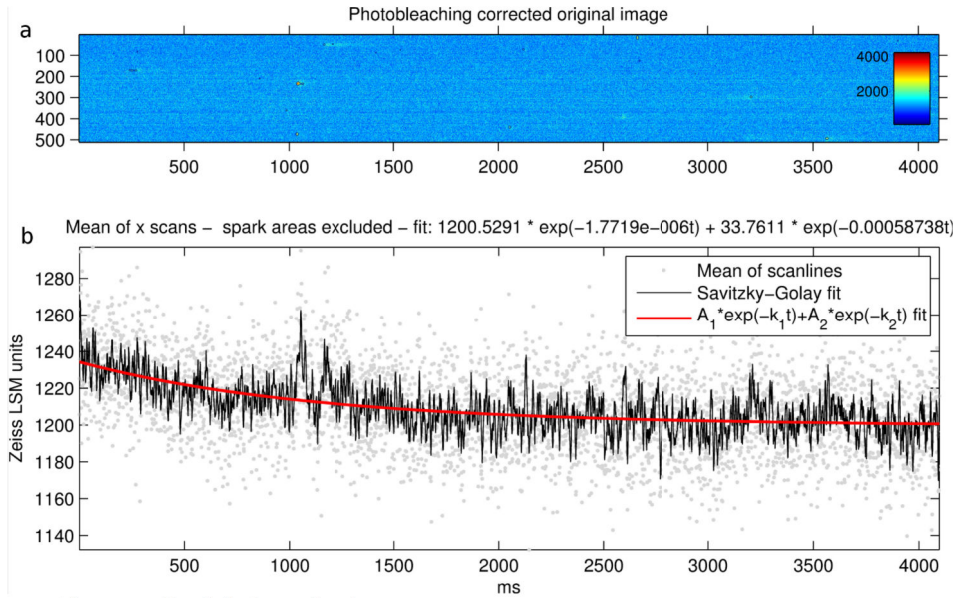
amellyel az egyes képpontok értékét korrigáljuk a $k(t)$ vektor értékeivel a megfelelő t koordinátákban. A korrekciós értékeket az egyes tér koordinátáknak megfelelő pontok átlagértékéből számítjuk, az első idő koordinátának megfelelő pontokat tekintjük kiinduló szintnek (pl. első 5-10 pont átlagát). A $P(1)$ pont helyett lehet az első néhány pont átlagával is számolni.

Elméletileg jobban megalapozott korrekcióhoz felhasználható a 3.3 vagy 3.4 függvénynek megfelelő görbe. A $P(t)$ átlagvektorhoz illesztett negatív exponenciális a 4.2 ábrán látható. A bemutatott line-scan 4095 időpontot tartalmaz, és erős lézer intenzitással készült (20 120 123_19 mérés), így a jelenség és a negatív exponenciális alakú intenzitás csökkenés jól látható (a képen a potenciális eseményeket vékony fekete vonallal vettük körül). Ha ezt, az exponenciálisan csökkenő korrekciót alkalmazzuk, a $k(t)$ számításánál a $P(t)$ helyett az illesztett görbe pontjait használjuk. Tapasztalatunk szerint, a korrekciónak normál lézer intenzitás mellett 2000 időpont fölött van értelme. Az illesztést Levenberg-Marquardt módszerrel végeztem, és a 3.4 függvénynek megfelelő modellt használtam.

Az illesztést korreláció számítással ellenőrizve (lásd 4.2.3), zajos képeken, 4096 adatponton (a 4.2 ábrán látható példa esetében is) $R=0.70$ körüli érték.

c.) A tulajdonképpeni normalizálás a következő lépés: minden egyes tér koordinátának megfelelő átlagot számítunk (ez a háttér fluoreszcencia átlaga):

$$F_0(x) = \frac{\sum_t F(t, x)}{T} \quad t=1, T; B(t, x)=0 \quad (4.2)$$



4.2. ábra. Fotókioltás korrekciója

a. 4048 pásztázott sort tartalmazó line-scan kép a korrekciós eljárás után, a sparkok vékony fekete vonallal bejelölve. b. A fotókioltás korrekciójához használt görbe. A korrekcióhoz a pásztázott sorok átlagát számítjuk ki, a számítás folyamán az eseményeket tartalmazó pontokat kizárjuk. Az így kapott pont halmazhoz illesztjük a 3.3 vagy 3.4 függvénynek megfelelő negatív exponenciális, az illesztett görbe pontjait használjuk korrekcióra. A Savitzky-Golay illesztést csak az átlag pontok tendenciájának követésére használtuk.

és ezzel beosztjuk a megfelelő képpontokat:

$$F_n(t, x) = \frac{F_c(t, x)}{F_0(x)} \quad t=1, T \quad (4.3)$$

A 4.1 ábrán bemutatott képrészlet normalizált alakja a 4.3 ábrán látható.

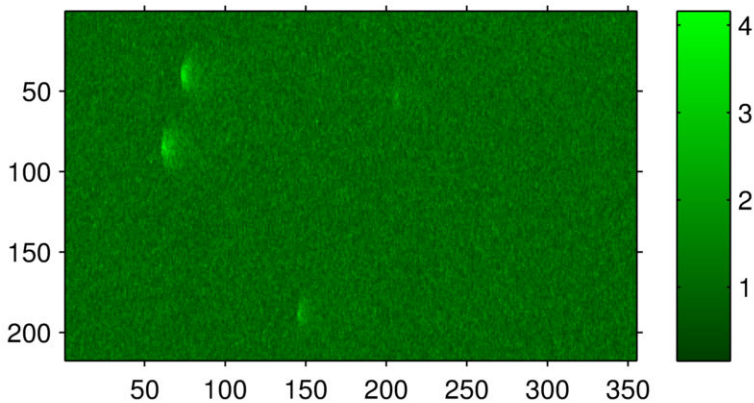
A normalizálás után a háttér fluoreszcencia referencia szintje 1. A megelőző számítást elvégezhetjük úgy is, hogy a beosztásnál az $F_0(x)$ -et kivonjuk a képpontokból, ekkor a referencia szint 0:

$$F_n(t, x) = \frac{F_c(t, x) - F_0(x)}{F_0(x)} \quad t=1, T \quad (4.4)$$

Jelen munkában ezzel a konvencióval dolgoztam, így a mért értékek normalizált referencia szintje 0. Ebben az esetben a normalizált képen a zaj miatt negatív

Eredmények

értékek is megjelennek a fluoreszcens háttérben.



4.3. ábra. line-scan mérés normalizált alakja

Felbontás idő-tér: 355 x 217 pixel, a 4.1 ábrán látható 060209b31 mérés normalizált formája.

4.1.2. Detektálás kettős küszöböléssel

Az általam implementált algoritmust a 4.4 ábra folyamatábrája szemlélteti.

Az eredeti képet ($F(t, x); t=1, T; x=1, X$) simítjuk (ez a lépés opcionális, a szoftver implementációban konfigurálható), erre medián és vagy 3×3-as futó átlag szűrőt használtam.

Az így kapott $FS(t, x)$ kép minden x koordinátáját rögzítve kiszámoljuk az idő koordináták szerinti átlagot:

$$\bar{X}(x) = \frac{\sum_{t=1}^T F(t, x)}{T} \quad t=1, T \quad (4.5)$$

és $\sigma(x)$ szórást. Kizárjuk azokat a pontokat a simított képből amelyekre:

$$FS(t, x) > \bar{X}(x) + CRI \cdot \sigma(x) \quad t=1, T \quad (4.6)$$

A CRI paraméter tipikus értéke 2, ez paraméterként használható, értéke változtatható 1.8-2.2 között. Ezt a műveletet ismételjük addig, amíg olyan ciklust kapunk amelyben nincs újabb kizárható pont. Az eredmény egy $B(t, x)$ bináris kép, a kizárt pontok helyén 0.

A következő lépésben megkeressük azokat az összefüggő területeket a kizárt pontok

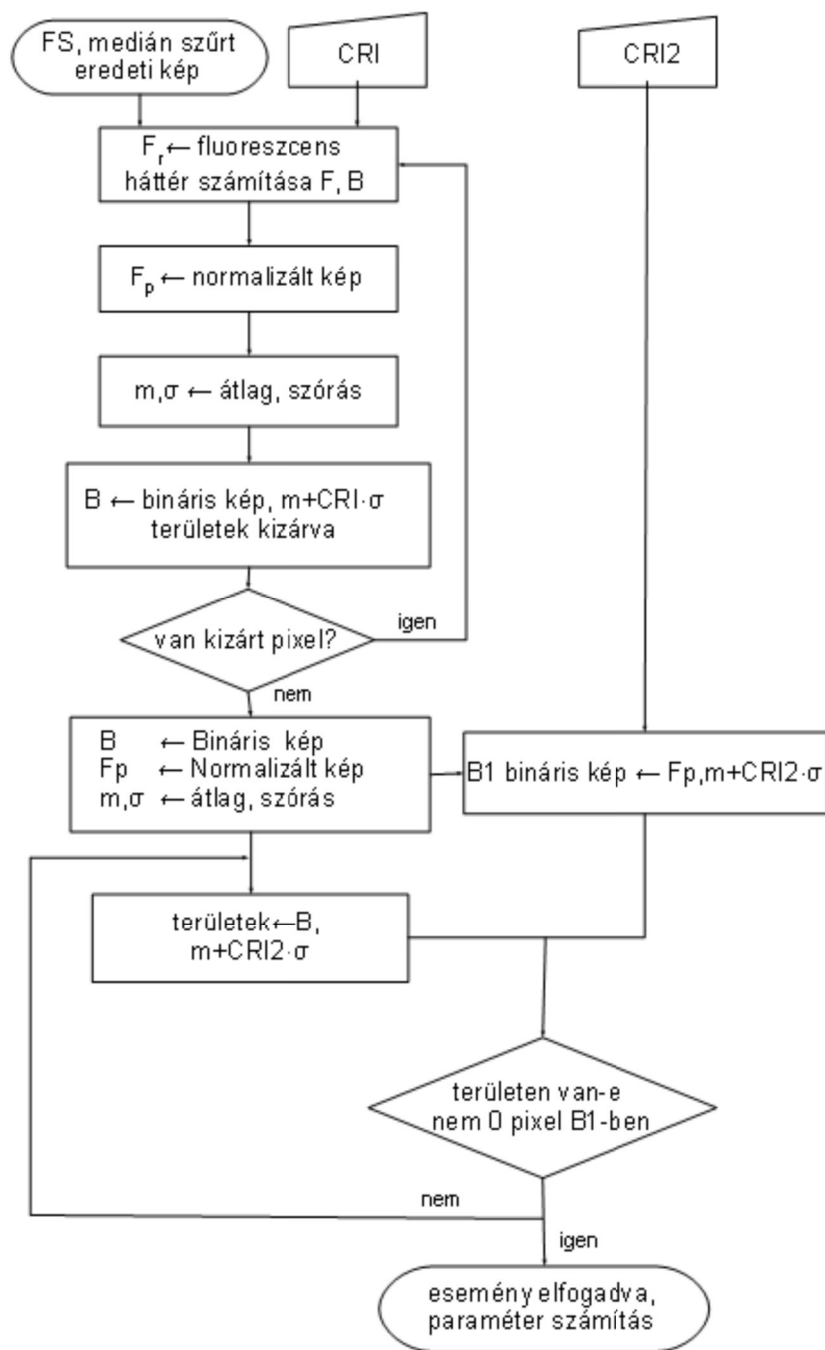
között, amelyeknek mérete meghalad egy adott *dropsmall* területet (értéke konfigurálható, például 1.5 ms pásztázási sebességnél *spark* típusú eseményeket keresve célszerű az x dimenzióban 8, a t dimenzióban legalább 10 pixel méretet venni, a gyakorlatban 20-30 pixeles területeket eldobva az algoritmus jól működik). Az így kapott $B(t, x)$ bináris maszk (potenciális események helyén 0) felhasználásával az eredeti $F(t, x)$ képen elvégezzük a normalizálási eljárást, az eredmény a $F_p = \Delta F / F_0$ normalizált kép.

Ekkor rendelkezünk a normalizált képpel és a potenciális esemény helyekkel. Ezek elfogadását egy magasabb küszöb értékkel történő tesztel végezzük, ezt a paramétert *CRI2* -vel fogjuk jelölni.

A F_p normalizált képet használva, ugyanazzal a módszerrel, mint (4.5) kiszámoljuk az $m2(x)$ (középérték) és $s2(x)$ (szórás) vektorokat, és egy *B2* bináris maszkot képzünk azokból a pontokból, amelyekre az alábbi kifejezés igaz:

$$F_p(t, x) > m2(x) + CRI2 \cdot s2(x) \quad t=1, T \quad (4.7)$$

Amennyiben az így kapott *B2* maszk pontjai a potenciális események területére esnek, elfogadjuk azokat eseményként. A második küszöb által alkotott kis területekre alkalmazhatunk erősebb (több összefüggő pont által alkotott terület) vagy gyengébb (legalább egy pixelt tartalmazó terület) kritériumot. Például 3 összefüggő pont már erős kritériumként működik. Az elfogadást megerősítő kritérium tehát konfigurálható a *CRI2* küszöb (értékek 2.4 – 4 között) és az összefüggő kis terület pixeleiben adott mérete által. Az elemzést megvalósító függvényeket grafikus interfészen keresztül vagy batch módban futhatnak. A grafikus interfész lehetővé teszi események kézi kijelölését, és az alább megadott módszerrel történő kiértékelését. Ezt csak a kutatások első fázisában használtuk, a dolgozat további részében, ha nem hivatkozom más módszerre, mindig automatikus detektálásra utalok. A grafikus interfészek által biztosított kézi kijelölési lehetőségeket lásd a B Függelékben.

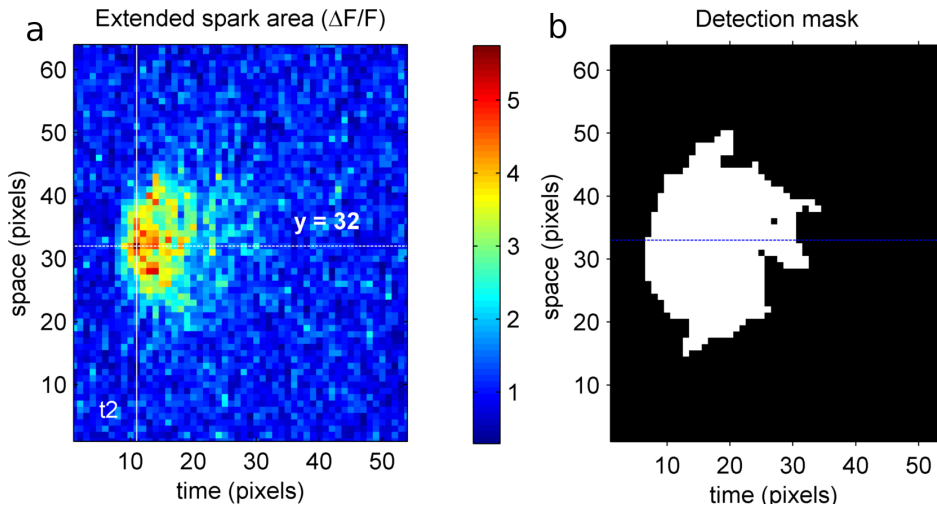


4.4. ábra. A kettős küszöbölést megvalósító algoritmus folyamatábrája

4.2. Spark paraméterek számítása

4.2.1. line-scan méréseken észlelt sparkok jellemzői

A 1-2 ms pásztázási periódussal készült line-scan képeken detektált sparkok jellemzőit az események időbeli (3.7.3) és térbeli (3.7.4) profiljaiból számolom. A számításokhoz használt adatok a detektáló algoritmusok által meghatározott, normalizált line-scan képen kiválasztott területek. A detektálás által megadott maszkot (4.5 b ábra) négyyszög alakúra terjesztjük ki (4.5 a ábra). Ezt a $data(t, x)$ területet kiterjesztjük mind a négy irányban, mivel határainál az esemény amplitúdók még meghaladnak egy, a maximális amplitúdóhoz viszonyított küszöbértéket (a kiterjesztés értékeit pixelekből adjuk meg az alábbi számításoknál). Az alább megadott számítások tesztadatai, amennyiben külön nem jelölöm, LSM510 META készülékkel készültek, 1.54 ms pásztázási periódussal és 0.1395 μm pixelek közti távolsággal.



4.5. ábra. Kontroll mérésen detektált spark paraméter számításra használt területe

Béka vázizomban észlelt spark (060130b07_9). a: A normalizált képen detektálás által meghatározott terület, amelyet kiterjesztünk az illesztések elvégzése miatt (részletek a szövegben). b: A hagyományos detektálási algoritmus által meghatározott, sparkot kiválasztó maszk bináris képe. A szaggatott vonal a spark szimmetriatengelye.

A paraméterek bemutatásánál minta eseményként a 060130b07 mérés 060130b07_9 eseményét használjuk. Az esemény detektálás utáni, normalizált mérésen kijelölt területét lásd a 4.5 ábrán. A detektálási maszk körvonalaként adódó területet néhány pixellel kiterjesztettük (a pontos értékeket lásd alább az illesztések ismertetésénél).

4.2.2. A spark időbeli profiljához kötődő paraméterek

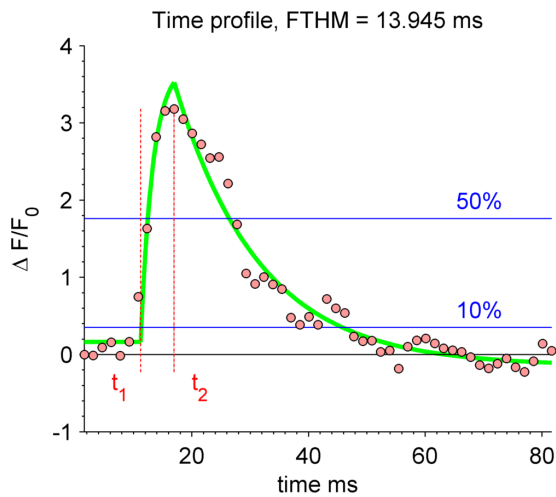
A számításhoz használt területet kiterjesztjük az idő (minimum 6 pixel a spark előtt és minimum 10 pixel a spark után; 9.24 és 15.4 ms) és tér koordináták (14 pixel mindkét irányban; 1.6741 μm) szintjén is. Ha a spark a kép szélén van, és a művelet nem megoldható, akkor kivesszük az analízisből, a számítások nem végezhetőek el.

A területet az idő koordináta szerint szimmetrikusra választom¹³ és egy medián szűrővel végzett simítás után a szimmetriatengely, illetve a körülötte levő 2 idősort (összesen 3 sort) átlagolok, ez alkotja a számításhoz szükséges spark idővonalát (a továbbiakban y -al jelölöm). Az idő szerinti kinetikai paramétereket a (3.27) egyenletben megadott összetett exponenciális függvény spark idővonalra történő illesztéséből számítom. A függvény paraméterei A_0 , A_1 , A_2 amplitúdót megadó paraméterek, illetve a τ_{on} és τ_{off} időállandók. A nemlineáris illesztés elvégzésére a Levenberg-Marquart algoritmus (Seber és mtsai. 2003) MATLAB implementációját (NLINFIT) használtuk (nemlineáris legkisebb négyzetek, nem robusztus illesztés). Az amplitúdó paraméterek kezdeti értékei:

- A_0 az y idővonal első eleme,
- A_1 az y idővonal maximuma (egyenlő értékek estén az első),
- A_2 az y idővonal utolsó eleme.

A t_2 időpontot az A_2 maximum pontnak megfelelő helyen választom a t tengelyen. A t_1 időpont meghatározása körülményesebb. Kiinduló értéként meghatározom az A_1 maximum 20%-át nem meghaladó amplitúdójú első pontot az y idővonalból, ha ez számolható (létezik, és nem esik közvetlenül a t_2 elé), akkor ezt tekintem t_1 -nek. A t_1 ennél a pásztázási frekvenciánál nem minden esetben határozható így meg. Fókuszon kívüli, sparkok vagy nagy zaj esetén empirikus kritériumok alapján választok egy pontot az idővonal elején. Az általam megvalósított implementációban, amennyiben t_1 túl közel - 1 vagy 2 pixel távolságra - kerül t_2 -höz csökkentem t_1 meghatározási küszöbét és megismétlem az eljárást; ha nem meghatározható a kiterjesztett területen, akkor növelem a terület kiterjesztését ciklikusan 2 pixellel, addig amíg megfelelő értéket találok. A spark felfutó éle ennél a pásztázási sebességnél maximum 4-5 pixelen történik - a zaj miatt, átlagolás és simítás ellenére sem kapunk minden esetben megfelelő adatokat az illesztéshez.

13. A spark detektáló algoritmus által megtalált területet időtengely szerint szimmetrikusnak tekintjük. Megjegyezzük, hogy a szimmetria nem mindig áll fenn, így a középvonalat amplitúdó tesztel ellenőrizni kell. Ez a zaj miatta kis amplitúdójú, nem fókuszban található sparkoknál fordul ez elő.



4.6. ábra. A spark időprofilját adó exponenciálisok

A spark szimmetriatengelyén kialakított idővonalra a (3.27) egyenletet illesztjük. A görbe félérték szélességét (FTHM) és felfutási idejét (rise time) valamint a 10%-os küszöb által meghatározott időtartamot (duration) használjuk jellemzőként. Részletek a szövegben.

Az illesztés lefuttatásánál célszerű a t_2 pontot rögzítettként kezelni. Így megadhatóak a τ_{on} és τ_{off} időállandók kezdeti értékei (az implementáció lehetőséget ad opcionálisan a t_1 pont rögzítésére is, az említett igen rövid idő miatt, ebben az esetben ez nem paraméter).

Amennyiben az illesztést el lehet végezni, meghatározhatjuk az idő profilra jellemző paramétereket:

- t_1 - az illesztés által visszaadott paraméter,
- *fitted_max* - a görbe maximum pontjának értéke,
- *FTHM* - félérték-szélesség (teljes szélesség a maximum felénél),
- *ttp* - a csúcs elérési ideje, a számolt $t_2 - t_1$ különbség,
- *rise_time* - a felfutási idő, a görbe maximális amplitúdója 10%-át *ampl10*-el jelölve, az *ampl10*-et meghaladó és t_2 -et el nem érő görbeszakasz t alatti idő.

A spark teljes időtartalmát jellemző *duration* - paraméter kiszámolható az illesztett görbe *ampl10*-et meghaladó időtartamából. A spark befejező szakaszán ez az érték a zaj miatt pontatlan lehet, így ennek egy elég jó közelítését kapjuk, ha kiszámoljuk a detektálási maszk idővonalán (pontosabban a 3 átlaghoz felhasznált idővonalán) található leghosszabb szakasz hosszát (pixelekből).

Az időprofilból számolt legfontosabb jellemző az *FTHM* érték, ez önmagában jól

jellemzi az időbeli lefutást és alkalmas a detektált sparkok osztályozására, illetve statisztikai jellemzők számítására.

Az illesztést jóságát az R korrelációs együtthatóval ellenőriztük (Weisstein 2013) :

$$R = \sqrt{\frac{SSR}{SSE + SSR}} \quad (4.8)$$

$$SSR = \sum (y_{fit} - \text{mean}(y))^2, \quad SSE = \sum (y_{fit} - y)^2$$

ahol y -al jelöljük a mért adatpontokat és y_{fit} -el az illesztett görbe pontjait az y -nak megfelelő függvény helyen. A gyakorlati kép elemzések folyamán az R elfogadott értéke beállítható 1 közeli értékre, és a küszöböt el nem érő események automatikusan ki lesznek véve az elemzésből (általában a nem fókuszban levő kis sparkok egy része).

Az illesztés ellenőrizhető Pearson korrelációs együtthatójával (Press és mtsai. 1992) is (3.25 összefüggés).

Ugyanezeket az ellenőrzéseket alkalmaztam a spark térbeli profiljára történő illesztéskor is.

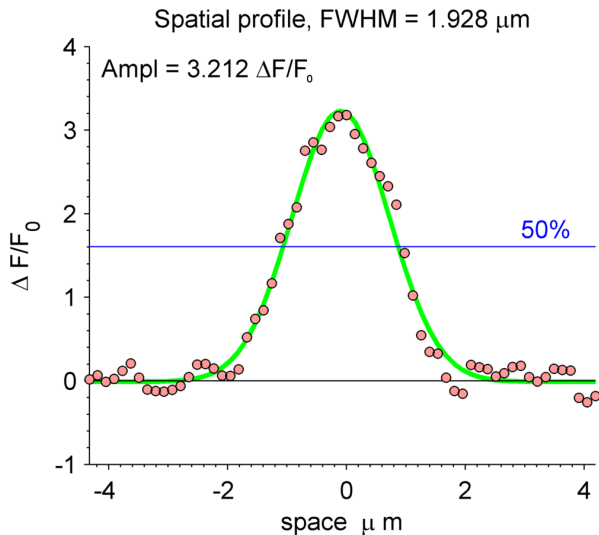
4.2.3. A spark térbeli profiljához kötődő paraméterek

A térbeli profil meghatározásához a spark detektált területét a 4.2.2 pontban megadott módszerrel terjeszttem ki, a területet medián szűrővel simítom.

Első lépésben az időbeli profilt határozom meg, így ennél az illesztésnél t_2 már ismert. Az illesztéshez a t_2 pontot metsző, és az utána következő 2 (összesen 3 pásztázott sor) átlagát használjuk fel. Az így kapott adatsorra a (3.28) Gauss függvényt illesztjük az előzőekben is említett Levenberg-Marquart algoritmussal.

Az illesztés kezdeti paraméterei:

- A_3 az adatsor első és utolsó pontjának átlaga,
- A_4 az adatsor maximuma,
- x_0 az adatsor empirikus középértéke,
- var az adatsor empirikus szórásnégyzete.



4.7. ábra. A spark térbeli profilja

A spark maximum pontja körüli 3 pásztázott sor átlagából kialakított adatokra illesztett Gauss függvény adja meg a spark térbeli profilját. A számításokat a normalizált adatokból végezzük. A görbe maximum pontját (Ampl) és térbeli félérték-szélességét (FWHM) használjuk jellemzőként.

Az illesztett görbe a 4.7 ábrán látható. A továbbiakban az illesztés által visszaadott A_3 , A_4 , x_0 és var paraméterek segítségével számítom ki az illesztett görbe maximumát. Ezt a $\Delta F/F_0$ normalizált egységben megadott értéket használok mint a spark amplitúdóját. A görbéből nyert térbeli félérték szélesség (FWHM) a spark térbeli kiterjedésének lesz a jellemzője.

4.2.4. Kalcium „ember” típusú események paraméterei

A kalcium „ember” (parázs) típusú események (1.3.6) jellemzőinek számítását a következő szempontok szerint végeztem:

- A jelenség igen kis amplitúdójú, alig emelkedik a zaj szint fölé (relatív amplitúdó értékekben 0.1-0.2 körül van a szintkülönbség), így gyakran szemmel is alig érzékelhető, így nehéz amplitúdóhoz kötött jellemzőt számolni.
- Gyakran található ugyanazon a területen spark típusú esemény: ez legtöbbször időben közvetlenül az ember előtt jelentkezik, de előfordul, hogy más pontban tevődik egymásra a két esemény.
- Az ember által fedett terület automatikus kijelölése nem oldható meg akkora biztonsággal (S, PPV) mint a sparkoké, így általában kézi ellenőrzést, illetve kézi kijelölést is kell alkalmazni (lásd 4.3.4).
- A mérés (kép) időtartamához közelítő hosszúságú emberök esetében a kép normalizálása problematikus, mert kevés, a jelenséghez nem tartozó pont

Eredmények

áll rendelkezésünkre a háttér számításához.

Munkánk folyamán egy grafikus interfésszel rendelkező eszközt fejlesztettem, ezzel bejelölhető az *ember* által fedett terület. Amennyiben ezt a kézi kijelölést alkalmazom, mind a négy irányban kb. 20-30 pixelre a jelenség érzékelhető, háttértől még különböző részétől kezdve kell ezt a behatároló területet kell kijelölni. A kijelölést el lehet végezni egy algoritmussal is automatikusan (lásd 4.3.4).



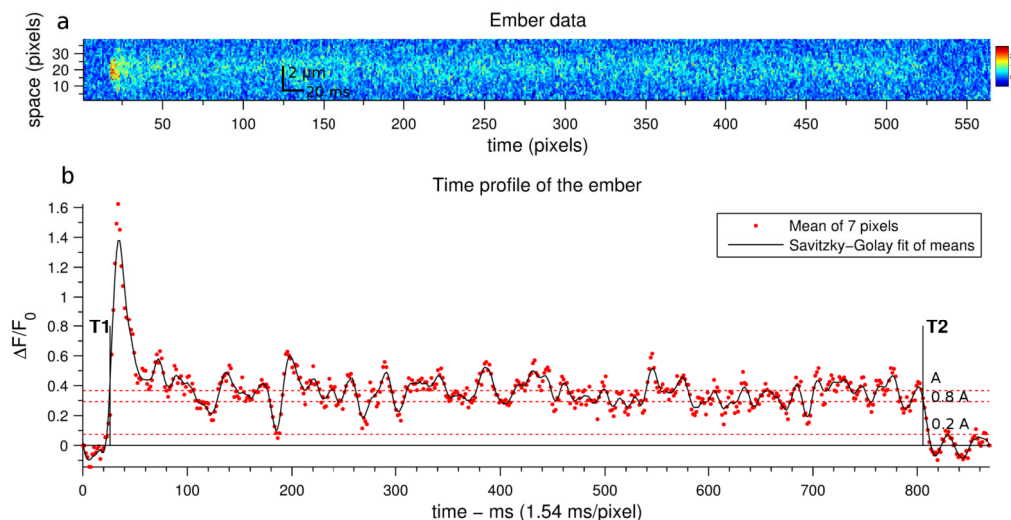
4.8. ábra. Kalcium „ember” típusú esemény normalizált képen

A bejelölést algoritmus végezte. A 060130b21_6 „ember” típusú esemény, a bekeretezett terület pixeleiben adott mérete 564 (t) és 50 (x), a jelenség átlag amplitúdója 0.15 $\Delta F/F_0$, időtartama 748 ms.

Amennyiben a kijelölt terület létezik, a további számításokat egy algoritmus végzi. A jelenséghez a kijelölt terület méretén kívül három jellemzőt csatoltam, egy átlag amplitúdót (*avamp*), térbeli félérték-szélességet (*FWHM*) és egy időtartamot. Ezeket az alább megadott számítással kapom, amelyet a normalizált képen végezek. Akár kézi, akár automatikus a kijelölés (amely általában a sparkok kijelölése után fut le) a végső eseményeket bejelölő maszk rögzítése után a normalizálási algoritmust ismét le kell futtatni (az *ember* területe már nem háttér). Számításokhoz a bejelölt területet kiterjesztem (30 pixel mindkét idő, 10 pixel mindkét tér irányban).

A jelenség szimmetrikus, a kijelölt keret, különösen kézi bejelölés esetén nem biztos, hogy az, így megkeressük a terület x szerinti legmagasabb átlag amplitúdóval rendelkező oszlopát és kiválasztjuk az x koordináta szerinti *m* középvonalat, valamint a körülötte található $m \pm a$ idősort, ezen a sávon számolom az átlagos amplitúdót (legyen ez a terület *D*). Az *a* paraméter, értéke állítható (a kiértékelések folyamán $a=3$ -at használtam). Az esemény elején az átlag amplitúdó 80%-át meghaladó idő pontot T_1 -nek, a végén a 80%-ot már nem meghaladó pontot T_2 -nek

nevezve, a $T_2 - T_1$ értéket fogom mint időtartam használni (4.9 ábra). A T_1 és T_2 keresése nem valósítható meg csak simított görbéken az alacsony amplitúdó, illetve a zaj miatt. Így a $m \pm a$ területen az időpontokra átlagolt görbét simítjuk egy 3 vagy 5 pixeles csúszó átlaggal, és ezen már el lehet végezni a meghatározást. Az átlag amplitúdó 80%-ának fölé, valamint az esemény végén 80% alá kerülését 5 egymás utáni pontra teszteltem. A számítást iteratívan végzem az átlagos amplitúdó újraszámításával minden ciklus végén, addig amíg két egymás utáni ciklusban a különbség $\epsilon = 0.001$ alá kerül. Az *ember* elején keresett T_1 pontra a küszöböt meg lehet állapítani alacsonyabban is (pl. $0.2 \cdot avamp$), de a zaj miatt ezt nehéz detektálni, úgy találtuk, hogy egy magas küszöb jobban működik.



4.9. ábra. Kalcium „ember” jelenség időbeli lefutása

a. Automatikusan detektált kalcium sparkkal kezdődő ember jelenség bejelölt területe. Normalizált kép, béka, 100nM MCa_8 , a 06 214a mérés eseményei, a kijelölt terület elején spark található 50 ms-ig, utána pedig ember (06 214a_2_7). b. Az ember amplitúdójának időbeli lefutása. Az adatpontok a középvonalra merőleges 7 pixel (3+3+1) átlagát jelölik minden idő pontban, erre Savitzky-Golay illesztéssel kaptuk a folytonos görbét, amelyik jól jelzi a lefutás tendenciáit. A T_1 és T_2 időpontokat automatikusan jelöltük be, az időbeli lefutás pontjainak átlagára illesztett Gauss görbe amplitúdóját (A) tekintve referenciának (az A meghatározásakor kihagytuk a spark területét). Az A amplitúdó 80, illetve 20%-os szintjei biztosítják a T_1 és T_2 megállapításához szükséges referenciákat.

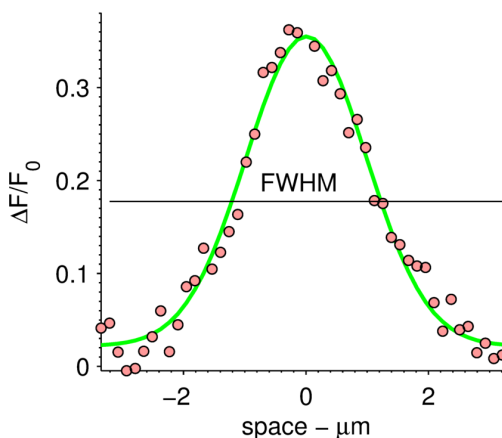
A térbeli félérték-szélesség számításához a kijelölt terület T_1 és T_2 pontjai közti részét x irányba átlagoltuk (amennyiben az ember-re sparkok tevődnek, ez utóbbiak területeit kihagyva), és erre az adatra végeztük el a sparkok térbeli profiljának

Eredmények

meghatározásakor végzett normális görbe illesztést (4.10 ábra).

A számítás bonyolódik, ha az *ember* területén sparkok is vannak (a 4.9 ábra számítása is ilyen eset), ez gyakori bizonyos kísérleteknél, amennyiben spark típusú jelenség után egy vagy néhány kalciumcsatorna hosszabb ideig nyitva marad.

Spatial profile of the ember



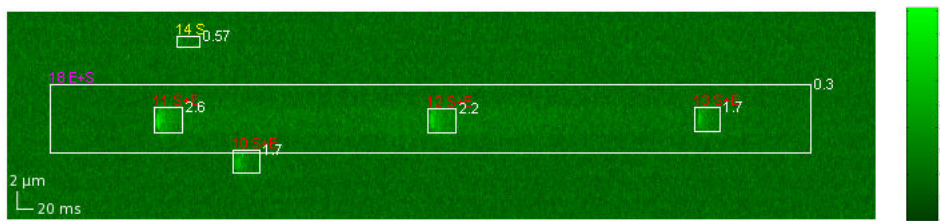
4.10. ábra. Kalcium „ember” jelenség térbeli profilja

A Gauss görbét a jelenség (a 4.9 ábrán is bemutatott 06214a_2_7 események) teljes időtartamára vonatkozó x – tér irányú pásztázott sorok átlagára illesztettük. Az átlagolásban nem vesznek részt a sparkokat tartalmazó sorok. A görbe maximális amplitúdója az ember-t jellemző. Az amplitúdó (lásd 4.9 ábra), illetve térbeli félérték szélesség (FWHM).

Ezeknek a jelenségeknek az osztályozására az alábbi jelöléseket vezettem be:

- S spark;
- E *ember*;
- E+S *ember*, lefutása alatt spark jelenik meg a területén;
- S+E spark, *ember*-ben folytatódik.

A jelölést jellemzőként használtuk olyan kísérletekben ahol az *ember* típusú esemény gyakori volt (Lukács és mtsai. 2008).



4.11. ábra. Spark és ember jelenségek egymásra tevődése line-scan képen

A kijelölés automatikusan történt (mérés: 060202a41).

A spark-*ember* egymásra tevődése (4.11 ábra) esetében a számításokat elvégeztem a

területtel és egy olyan $D1$ -el, amelyet úgy képzünk, hogy a D -ből kivesszük azokat a területeket amelyen sparkok találhatóak, és a számításokat csak ezen végezzük. Így megkapjuk a sparkokon kívüli területeken a relatív fluoreszcenciát, ebből számoljuk az FWHM, illetve amplitúdó értékeket. Az *ember* időtartama a kijelölésből adódik. Amennyiben az *ember* közvetlenül spark-al kezdődik, a T_1 pont a spark elejére kerül (mint a 4.9 vagy 4.11 ábrán), de a spark területe nem vesz részt az *ember* amplitúdó és FWHM számításaiban.

Az „ember” jelenség tanulmányozásához grafikus felületet is készítettünk, amelyen a feldolgozás paraméterei beállíthatók (lásd B Függelék).

4.3. Elemzés wavelet módszerrel

A módszer folyamán alkalmazott műveleteket a 4.12 ábra szemlélteti. Az elemzés két lépésben valósul meg, egy zajszűrést és egy detektálást megvalósító algoritmusban. Az eredeti képet előfeldolgozásként normalizálom, illetve opcionálisan egy fotonzajt tompító, túske szűrő algoritmussal szűröm. Az algoritmus konfigurálását megvalósító bemeneti paramétereket az alábbiakban ismertetem.

4.3.1. Zajszűrés

Az *à trous* wavelet módszerrel végzett elemzés első lépése a zaj szűrt kép előállítása a detektáláshoz. A feladatot el lehet végezni az eredeti képpel is, az implementációmban a normalizáltat használtam, amelyet ugyanolyan módszerrel állítottam elő, mint a 4.1.1-szakaszban. Az első normalizálás ideiglenes, megismétlem detektálás után.

A zajszűrés Starck és Murtagh 3.4.4.2-ban megadott módszerét követi. Feltételezem, hogy a zaj normális eloszlású, vagy közelíti azt. Az *à trous* módszerrel végzett zajszűréshez első lépésben kiszámolom az eredeti kép zaj szórásának közelítő értékét, ez σ_1 , így hozzájutok a wavelet szintek együtthatóinak szórásához is, ezeket σ_j -vel jelölöm, $j=1, L$.

A standard eloszlás σ_j^e értékei kiszámolhatóak egy saját generált eloszlás segítségével, illetve használhatom a módszerekben megadott 3.1 táblázatot (mindkét megoldást implementáltam).

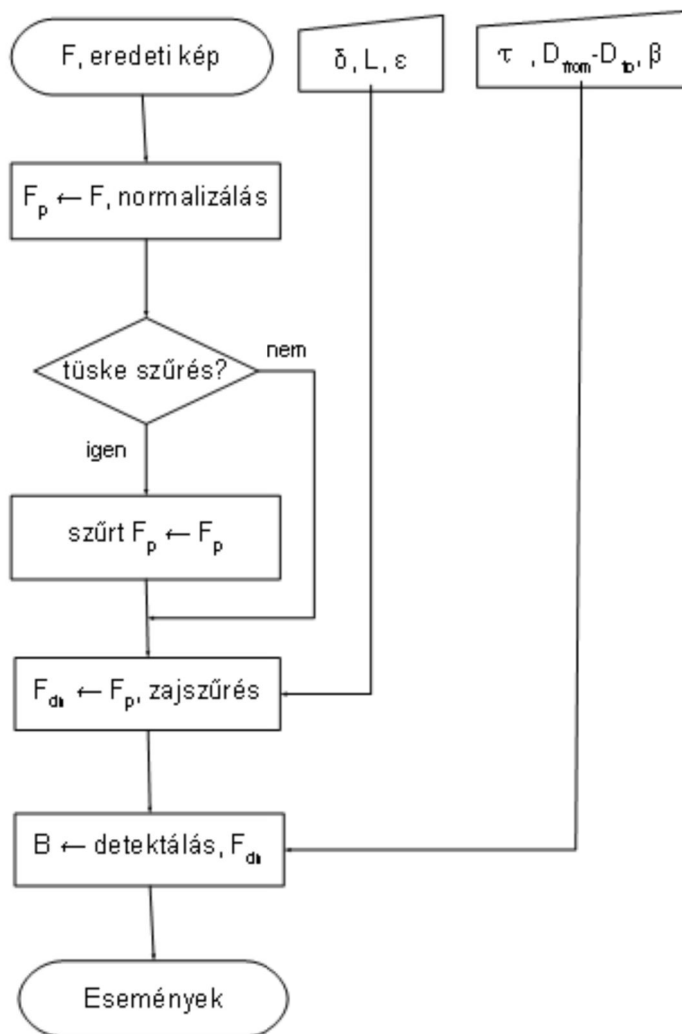
A transzformációt L szinten végezzük, a gyakorlatban az együtthatók azt mutatják, hogy 4-5 szintre elégséges elvégezni a műveletet, utána az együtthatók értéke elhanyagolhatóan kicsi. A zajszűréséhez (3.4.4.2), a

$$T_j = \delta \cdot \sigma_j \quad (4.9)$$

küszöbérték a legkézenfekvőbb, amelyet külön alkalmazunk minden $j=1, L$ szintre. A δ a zajszűrő algoritmus paramétere lesz, amely felhasználó által állítható. Az

Eredmények

értékére vonatkozóan az algoritmus hatékonyságára vonatkozó vizsgálatnál vonok le következtetéseket (4.4).



4.12. ábra. Wavelet módszerrel történő detektálás folyamatábrája

Az algoritmusokhoz és paraméterekhez kötődő részleteket lásd a szövegben.

A küszöbölés során végzett együtttható érték vágást több módszerrel végezhetem,

ezek más és más jellegű kimenetet hoznak létre az inverz transzformáció alkalmazása után. Ha x -el jelölöm a wavelet együtthatók értékét, a küszöbölés az alábbi operátorokkal végezhetem (Jin és mtsai. 2005). Kemény (*hard*) küszöbölés:

$$\rho_H(x) = \begin{cases} x & |x| > T_j \\ 0 & |x| \leq T_j \end{cases},$$

lágý (*soft*) küszöbölés:

$$\rho_S(x) = \begin{cases} x - T_j & x \geq T_j \\ x + T_j & x \leq -T_j \\ 0 & |x| \leq T_j \end{cases},$$

és affin (*affine*) küszöbölés:

$$\rho_A(x) = \begin{cases} x & |x| \geq T_j \\ 2x + T_j & -T_j \leq x \leq -T_j/2 \\ 2x - T_j & T_j/2 \leq x \leq T_j \\ 0 & |x| < T_j \end{cases}.$$

A három különböző küszöbölésnek szemmel is jól látható, eltérő hatása van (4.13 ábra).

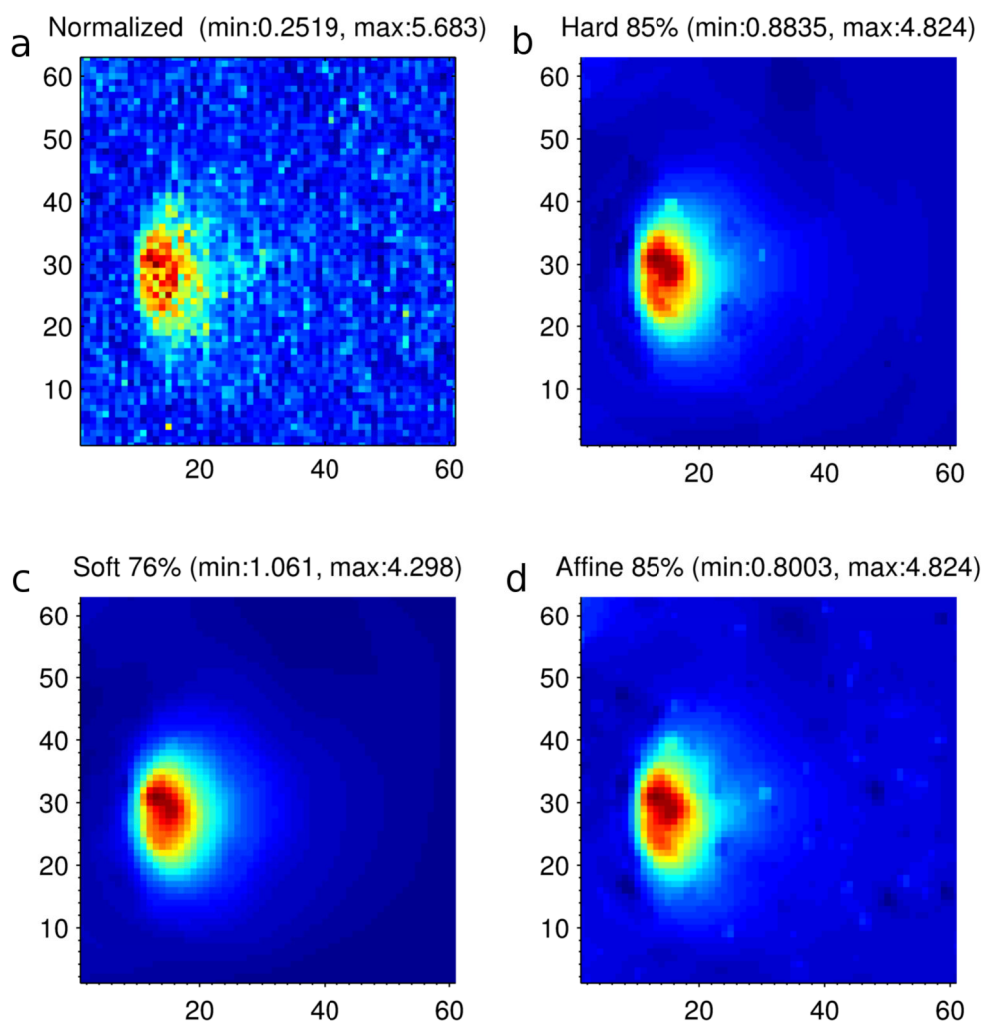
A legtöbb részletet és legnagyobb érték intervallumot az affin küszöbölés őriz meg, de itt maradnak meg a legerősebb hatások a háttérzajból. A legsimább eredményt a lágý küszöbölés adja, itt viszont nagy az értékintervallum veszteség. A kemény küszöbölés köztes megoldás. A δ értékét szándékosan nagynak választottuk. A gyakorlatban 3-4 közti értékek már jól működnek.

4.3.2. Sparkok detektálása 1.5 ms körüli pásztázási sebességnél

Az algoritmust 1.5 ms pásztázási periódussal készült line-scan mérések esetében mutatom be.

A wavelet alapú kalciumfelszabadulási esemény detektálás megvalósításához ugyanazt a *starlet* (*à trous*) transzformációt használtam mint a zajsűréshez.

A módszer bemeneti jele lehet az eredeti kép is, de jobb megoldás a zaj szűrt egy dimenziós idősor vagy kétdimenziós kép, és ezen hajtjuk végre ismét a *starlet* transzformációt.



4.13. ábra. Küszöbölési operátorok hatása a zaj szűrt képre

a: A 060130b07_9 spark normalizált képe; b-d: küszöbölési operátorok hatása; b: kemény; c: lágy, d: affin. A δ paraméter értéke 4.5. A képek fölött százalékban a az egyes képek maximumának a normalizált kép maximumához viszonyított amplitúdó csökkenése. A 4 kép ugyanazt a színskálát használja a maximum és minimum értékek közé skálázva.

Az egyes wavelet szintekre egy második küszöbölést alkalmazok, amelyet az előzőleg (3.22) szerint számolt σ_j értékekhez igazítunk minden egyes j wavelet szinten:

$$TD_j = \tau \cdot \sigma_j, \quad j = 1, L, \quad (4.10)$$

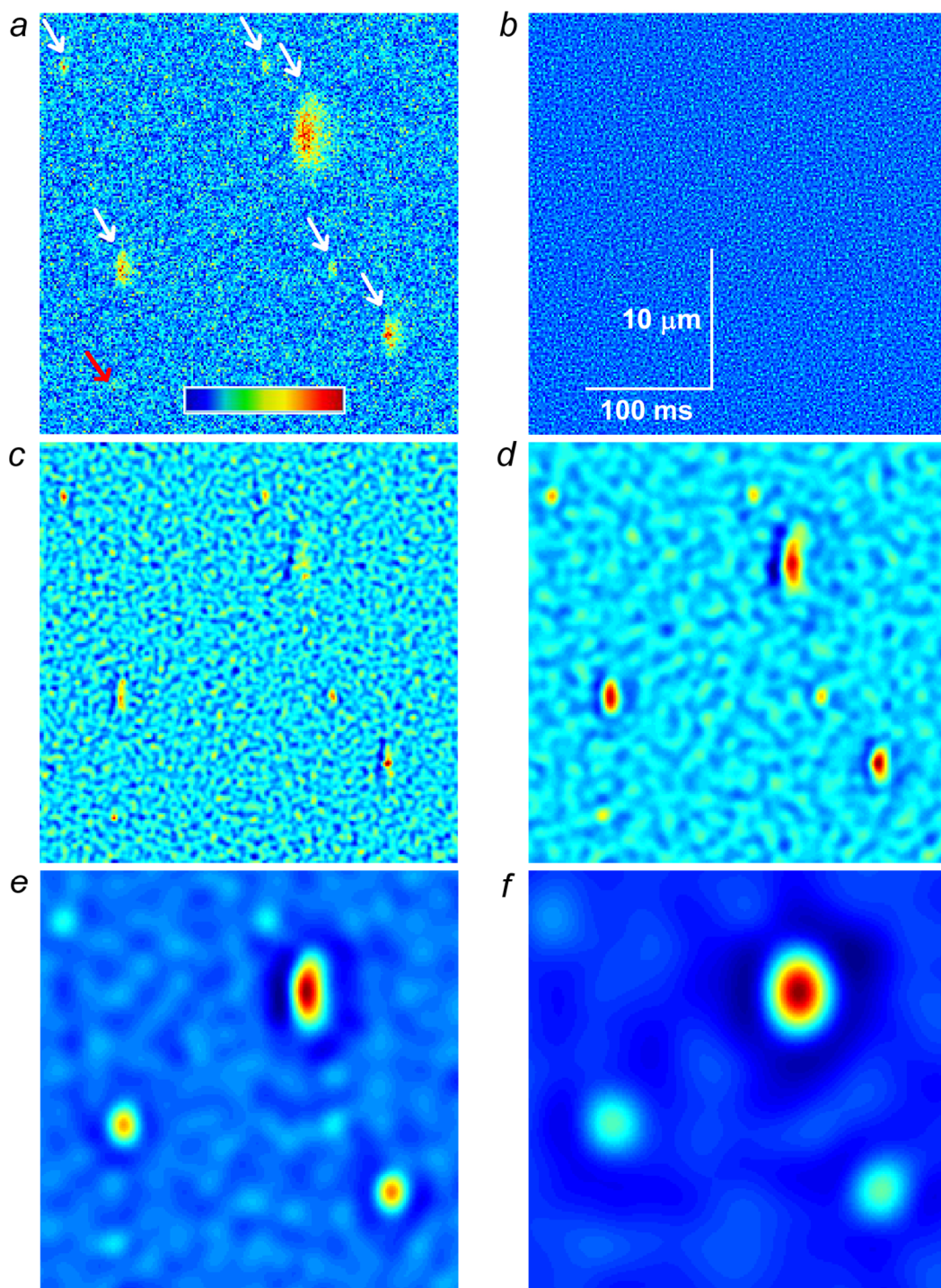
ahol τ egy állítható paraméter. Ennek segítségével alakul ki minden wavelet szint számára egy-egy bináris maszk.

Wavelet szint	pixel	idő 1.54 ms skála	tér 0.1799 μm skála
1	5	7.5	0.8995
2	9	13.5	1.6191
3	17	25.5	3.0583
4	33	49.5	5.9367
5	65	97.5	11.6935

4.1. táblázat. A B_3 spline függvény diadikus pontokon skálázott méretei

A *starlet* transzformáció együtthatói tulajdonképpen a skálafüggvénnyel történő korreláció mértékét jelentik (a konvolúciót végző függvény szimmetrikus). Így gyakorlatilag minta illesztések különbségének eredményét kapjuk a wavelet együtthatókban (Gonzalez és mtsai. 2008), ezek a skálafüggvény dilatált változataival való hasonlóságot mérik. A skálázott B_3 -spline konvolúciós maszkok méretéből előre vetíthető azoknak az eseményeknek a mérete (diadikus felosztáson), amelyek a küszöbölés után legjobban érvényesülnek a maszkban. Az 4.1 táblázat a konvolúciós maszkok hosszát tartalmazza 1.54 ms pásztázás (t irány) és 0.1799 μm (x irány) esetében. A kis méretű események (sparkok) a 2.-dik és 3.-dik wavelet szinten jelennek meg, hosszabb események a felsőbb szinteken (lásd 4.3.4, Ember típusú események detektálása). Kis háttérzajjal rendelkező kísérleti képeken a 4.-dik szint is használható sparkok detektálására. A 4.14 ábra egy szimulált line-scan kép felbontását mutatja be az 5.-dik szintig.

A sokskálás felbontás létrehozása után a kiválasztott szinteken a küszöbölést elvégezve, a küszöböt meghaladó pontokban 1-re, a többiben 0-ra állítjuk a pontokat, a maszkokat logikai VAGY művelettel egyesítjük, a közös maszkon kapott területeket lesznek a potenciális események. A közös maszk előállítható logikai ÉS művelettel is, ebben az esetben az eseménydetektálás szigorúbb feltétellel történik (von Wegner és mtsai. 2006).



4.14. ábra. Szimulált line-scan kép és a starlet transzformáció első öt szintje.

Magyarázat a 4.14 ábrához:

a. Normális eloszlású zajt és 6 szimulált sparkot tartalmazó kép (a fehér nyilak mutatják az elhelyezésüket, a relatív amplitúdók: 0.33, 0.45, 0.57, 0.93, 1.0 és 1.2 $\Delta F/F_0$). A képen egyetlen pixel van fotonzaj szintre állítva (piros nyíl). b-f. Az első 5 wavelet szint együtthatói. A melegebb színek magasabb értékeket jelentenek az a. képen látható skála szerint.

A sparkok mellett a módszer kis területeket is detektálhat, ezek a háttérben található zaj minták következményei. Megállapítottam, hogy objektum detektálás esetén az *à trous* felbontást használó algoritmusok nem robusztusak, erre Starck és Murtagh is utal (Starck és mtsai. 2002). A fotonzajra jellemző tüskék, amennyiben néhány magasabb szinten álló zaj minta mellé kerülnek detektálódhatnak kis eseményként. Ezeket el kell távolítani a további elemzési folyamból.

Egyszerű módszerként bevezettem az „esemény mérete” fogalmat, amellyel a bináris maszkon található, összefüggő területek által tartalmazott pixelek számát jelöltük. A detektáló algoritmus egyik β -val jelölt és a felhasználó által beállítható paramétere azt az esemény méret határt tartalmazza, amelyet még megtartunk. Az ennél kisebbeket töröljük az elemzésből.

Bizonyos kísérletekben az egymáshoz közel álló események detektálási maszkja egymásba folyhat, ezeket *watershed* szegmentálással lehet elválasztani (ugyanaz a jelenség megjelenik a kettős küszöbölést alkalmazó módszernél is). A gyakorlatban Vincent és mtsai. (1991) algoritmusát használtam erre a feladatra¹⁴.

4.3.3. Fotonzaj szűrése

A fotonzaj kiugró pontjainak szűrését több módszerrel el lehet végezni (3.4.4.3). A line-scan képeken jelentkező tüskék szűrésére ugyancsak a starlet transzformációra építettem egy módszert. A tüske szűrőt a normalizált képre alkalmaztam, amelyet ugyanazzal a módszerrel állítottam elő mint a hagyományos módszer esetében (4.1.1), de nem végeztem el a medián szűrővel végzett simítást. A zajsűrés előtt kiválasztottam a normalizált kép legmagasabb frekvenciáit (Koshino és mtsai. 2002). Az *à trous* transzformáció együtthatóinak első két szintjét állítottam elő az $F_n(t, x)$ normalizált képre:

$$F_n(t, x) = c_2(t, x) + \sum_{i=1}^2 w_i(t, x)$$

Az első két szint együtthatóival elvégeztem a fordított irányú transzformációt, elhagyva a $c_2(t, x)$ háttérteret.

14. Konkrétan az ImageJ (Rasband 2012) keretrendszerben található implementációt.

$$hf(t, x) = \sum_{i=1}^2 w_i(t, x)$$

A nagyfrekvenciás $hf(t, x)$ kép középértékét (m) és szórását (σ) számolva, egy küszöbértéket alkalmaztam:

$$| hf(t, x) - m | > H \cdot \sigma,$$

amely egy $B(t, x)$ bináris képet eredményez, ezen jól kirajzolódnak a kép nagy frekvenciás helyei (élek, tüskék). A H paraméterrel a küszöbölő vágás szintjét állítjuk. A line-scan mérések tesztelése folyamán a legjobb eredményeket a szűrő H értékeire 3.5 és 4.5 között kaptuk. Küszöbölés után a 2 vagy több pixelt tartalmazó összefüggő területeket eldobjuk. Ezt meg lehet oldani a bináris képnek a

$$\begin{array}{ccc} \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \end{array} \quad (4.11)$$

kernel-el történő konvolúciójával és 0.33 értékre történő szűrésével. Ez a lépés megóv attól, hogy sparkokon található magas szintű pixeleket átírjam.

A kiválasztott, külön álló magas amplitúdójú pixeleket a körülöttük levők átlagával helyettesítem. A tüske szűréssel és nélküle végzett zajszűrés közti különbség a 4.18 ábra e-h képein követhető.

Az igen kis méretű események miatt ezeken a képeken a tüske szűrés nem lehet tökéletes. Így kis mértékben befolyásolni fogja ezeknek az eseményeknek a detektálását. Az összehasonlításinkban megjelenik a szenzitivitásnak egy kis értékkel történő csökkenése, de ez nem olyan nagy, mint a naiv nagy β értékeket használó méretre történő küszöbölés esetében. A legjobb értékeket $H=3.5$ -re kaptuk, és ebben az esetben is a szenzitivitás csökkenés minimális volt.

4.3.4. Ember típusú események detektálása

Az *ember* típusú jelenségeket (Kirsch és mtsai. 2001; Zhou és mtsai. 2003) ugyanolyan line-scan képeken (pásztázási intervallum 1.54 ms) vizsgáltuk (Szigeti és mtsai. 2007; Lukács és mtsai. 2008) mint a sparkokat, ezek tipikus időbeli kiterjedése 100 és 1300 ms közötti (ez 60-850 pixelt jelent), térbeli kiterjedésük körülbelül akkora mint a sparkoké, 4-5 μm körüli (30-40 pixel).

Az *ember* típusú események automatikus detektálására két módszert adtunk (Szabó és mtsai. 2010) az első a kétdimenziós, a második pedig az egy dimenziós

algoritmusra épül. A kettő közül az egy dimenziós transzformációra épültöt mutatom be, mert ennek jobb a szenzitivitás és PPV értékei.

Mindkét módszer az *à trous* (*starlet*) transzformációt alkalmazza, az első a kétdimenziós transzformáció ötödik, a második az egy dimenziós transzformáció 8 és 9.-dik szintjét használja detektálásra.

Az *ember* típusú jelenségek nem azonos kiterjedésűek a line-scan képek t és x irányába, így a kétdimenziós transzformáció magasabb szinteken már nem ad annyira jó információt ezeknek a jelenségeknek a kiterjedéséről. A második módszer ezért az egy dimenziós transzformációt használja a kép idősoraira alkalmazva (4.15 és 4.16 ábra).

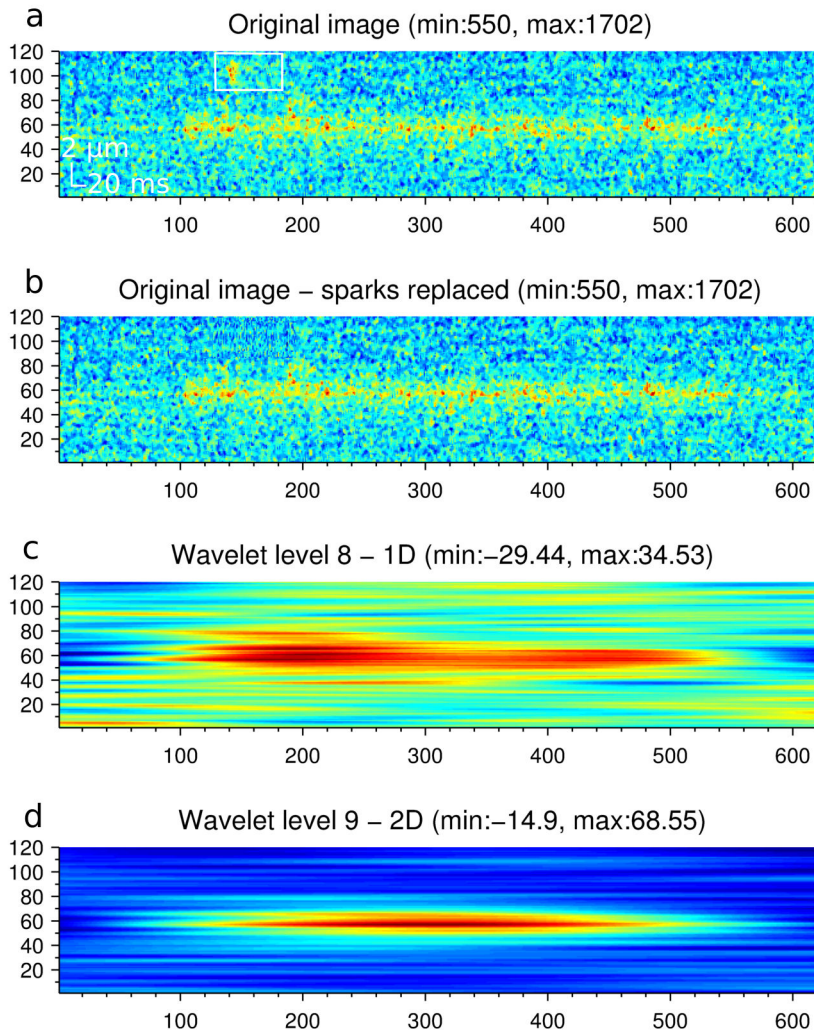
A bementi kép az eredeti mérés (4.15 ábra a). Először lefuttatjuk a spark kereső algoritmust az említett módszerek (4.1.2, 4.3.2) valamelyikével utána az eredeti kép sparkként jelölt helyein helyettesítjük a mérés értékeit egy randomizáló módszerrel, amit többféleképpen is megtervezhetünk, úgy, hogy hasonló legyen a spark közelében található háttér pontokra. Az általunk használt módszer a kis feltöltendő terület idősorain lépked (x koordinátákon), ugyanarról az idő sorról vett, *nem* a sparkokhoz tartozó pontokat randomizálja, és azokkal tölti fel a spark területét (4.15 ábra b). A módszer jól működik akkor is, ha a sparkok az ember területén vannak - az *ember* lényegesen hosszabb időbeli kiterjedése miatt ezek a helyettesítések nem befolyásolják a továbbiak számára érezhetően a 8 és 9.-dik wavelet szint együtthatóit. Opcionálisan az így kapott bementi képen egy túske szűrőt futtatunk, és az így kapott kép lesz a wavelet transzformációt alkalmazó *ember* kereső algoritmus $F_e(t, x)$ bemenete.

Az egy dimenziós *starlet* transzformációt (3.4.3.3) minden egyes idő soron (t irány) külön futtatjuk le, így kimenetként ugyancsak $W_k(t, x)$ alakú együtthatókból alkotott képeket kapunk minden egyes k szintre, ezek közül a W_8 és W_9 szinteket használjuk a továbbiakban (4.15 ábra c és d). Mivel a transzformáció ezeken a szinteken igen hosszú konvolúciós szűrőket használ, minden idősort kiterjesztünk mindkét irányban a kép t dimenziójának 1/4-ével, ezekre a kiterjesztésekre is a sor háttérének random pontjait használjuk. A kiterjesztést a transzformáció után levágjuk.

A 8.-dik szint az esemény szélén, a 9.-dik az esemény közepén magasabb amplitúdójú. Ezért első lépésként egy, a két esemény maximumát tartalmazó képet állítunk elő:

$$W_{8+9} = \max(W_8, W_9) \quad (4.12)$$

Eredmények



4.15. ábra. Ember típusú események automata detektálása I.

a: Eredeti mérés kijelölt sparkkal. b: Eredeti mérés, a sparkot random háttér pontokkal felülírtuk. c-d: a 8 és 9-es wavelet szint. Minden képen ugyanazt a színskálát alkalmaztuk a kép maximum és minimum pontjai közé skálázva, ezek értéke megtalálható a kép címében.

Ez után kettős küszöbölést alkalmazunk, amelyben felhasználjuk a W_{8+9} kép pontjainak középértékét (μ), valamint két, egy alacsonyabb (ϵ) és egy magasabb (γ) küszöböt beállító paramétert:

$$M_B(x, y) = \begin{cases} 0 & W_{8+9} < \mu \cdot \epsilon \\ 1 & \mu \cdot \epsilon \leq W_{8+9} < \mu \cdot \gamma \\ 2 & |W_{8+9}| \geq \mu \cdot \gamma \end{cases} \quad (4.13)$$

A két szintű küszöbölés a 4.16 ábra f és g képein, a végső 3 szintes maszk pedig a h képen látható. Az *ember* elfogadását az így kapott maszk 1-es és 2-es szintjeinek pixeleiben adott mérete alapján tesszük: az 1-es szint idő szerinti hossza feleljen meg az *ember* várt hosszának, a 2-es szinten legyen legalább 10 pixel. A küszöböt beállító paraméterekre az említett kontextusban (line-scan kép típusa) $\gamma = 0.0350$, $\epsilon = 0.0150$ tipikus értékek. A közös maszk (4.16 h) minden irányban 10-20 pixellel kiterjesztett változata adja az *ember* területét.

Az automatikus ember detektálást manuálisan felül kell vizsgálni, a PPV és szenzitivitás értékek nem annyira jók, hogy megbízható eredményt nyújtson (Szabó és mtsai. 2010).

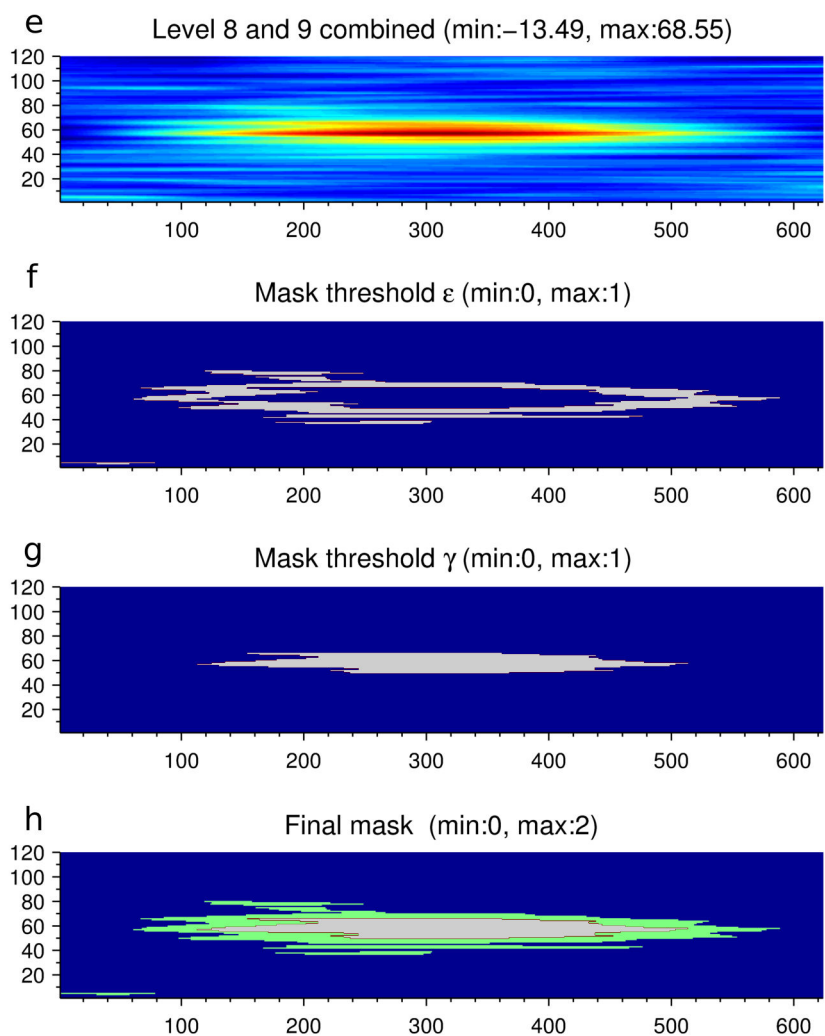
4.4. Az algoritmusok megbízhatóságának és hatékonyságának elemzése

4.4.1. Az elemzés során használt képek

A detektálási algoritmusok tesztelésére használt képek egy része kísérleti kép, a másik része pedig szimulált kép volt. Ez utóbbiak esetében pontosan tudható a tartalmazott események helye és mérete.

Két módszert használtunk ismert struktúrájú szimulált képek előállítására. Az első módszer folyamán a képek háttérét ismert paraméterű normális eloszlás alkotta. Ez jó közelítése olyan line-scan képeknek amelyeken a foton zaj szintje alacsony (Cheng és mtsai. 1999; von Wegner és mtsai. 2006). A második módszer folyamán olyan kísérleti képeket használtam amelyeken erős foton zaj volt látható, de nem tartalmaztak szemmel észlelhető kalciumfelszabadulási eseményeket. Az események hiányát detektáló algoritmussal is teszteltem, és a pásztázott sorok sorrendjét randomizáltam, hogy kiküszöböljem az események jelenlétét.

Mesterségesen előállított sparkokat (modell spark) illesztettem additív módszerrel a zajra mindkét háttér esetén. Mesterséges sparkot két módszerrel állítottam elő. Az első egy átlagoló módszer: 10 ugyanolyan méretű és paraméterű kísérleti spark területét átlagoltam, az eredményt simítottam. A modell spark paraméterei: FWHM: $\sim 1.7 \mu\text{m}$, FTHM: $\sim 9 \text{ ms}$, időtartam: $\sim 14 \text{ ms}$. A modell spark képét különböző méretűre és amplitúdójúra skáláztam.



4.16. ábra. Ember típusú események automata detektálása II.

A 4.15 ábra folytatása. e: A 8 és 9-es wavelet szintek maximumaiból kapott kép. f-g. A kettős küszöbvel kapott maszkok. h: Az ember teljes területét lefedő két szint.

A mesterséges spark előállításának második módszere a kalciumfelszabadulási események reakció-diffúziós modellre épülő szimulációja, a megoldás 3 dimenziós terének egy egyenessel való pásztázása, és az így kapott kép pont kiterjedés függvénnyel történő konvolúciója (lásd C Függelék).

A szimulált képek méretét általános line-scan méretre generáltuk ($t, x=1024, 512$ pixel) és minden képbe 6 sparkot illesztettünk úgy, hogy nem kerülhettek egymás közelébe vagy ugyanarra az x és t sávra (4.14 ábra A). Egy adott paraméter beállításra 240 képet használtam.

4.4.2. A hagyományos és wavelet alapú elemzés összehasonlítása

4.4.2.1. Összehasonlítás szimulált képeken

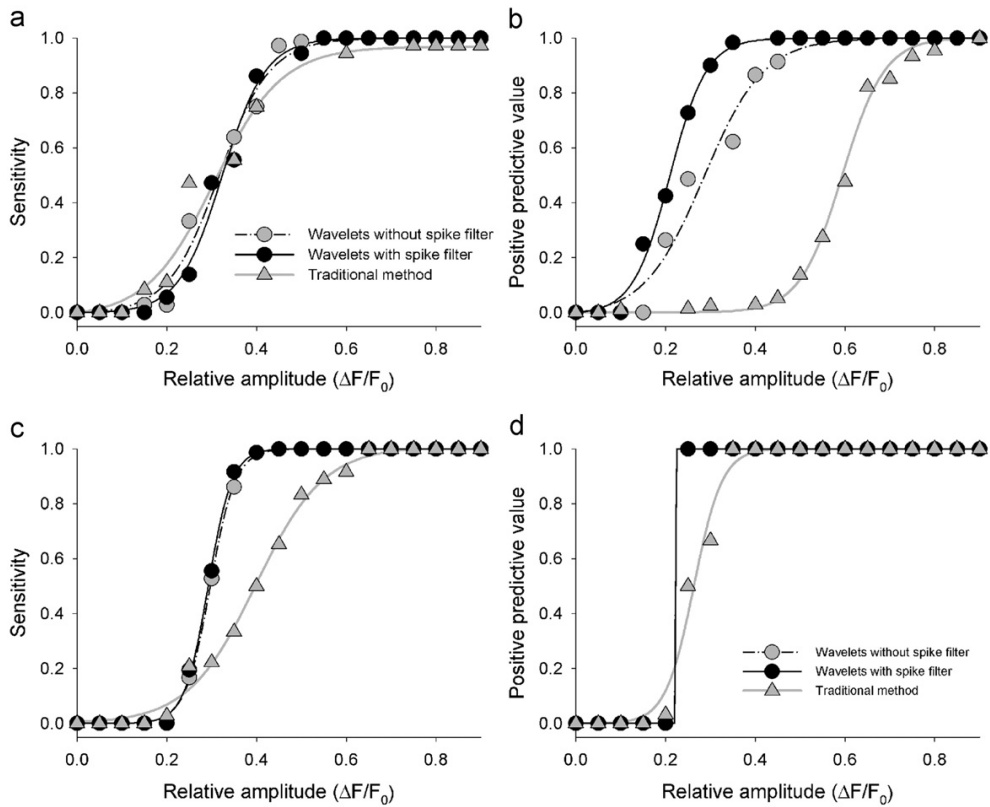
Összehasonlítottam a hagyományos (kettős küszöbölés) és wavelet alapú elemzést, szimulált, mesterségesen előállított képeket használva. Az összehasonlítás 1.54 ms körüli pásztázási sebességgel előállított képekre készült (a kísérleti képek paramétere), amelyekre a háttér kísérleti képekből (4.17 ábra a és b), illetve normális eloszlású zajból generáltam (4.17 ábra c és d).

Az első esetben a hagyományos algoritmussal elég jó szenzitivitás érhető el a detektált amplitúdó 0.2-0.5 értékű régiójában. Ez a terület jellemző az emlősökben mért sparkokra.

Ebben a régióban a wavelet módszerrel $\tau=3$, $\delta=4$ paramétereket használva a detektálás pozitív prediktív értéke nagyon kicsi volt, kisebb mint 0.2, (lásd 4.17 ábra b), A hagyományos módszer 0.55 értékéhez képest, jelezve, hogy a hagyományos módszer nagyszámú hamis pozitív találatot ad vissza, amit manuálisan kell eltávolítani.

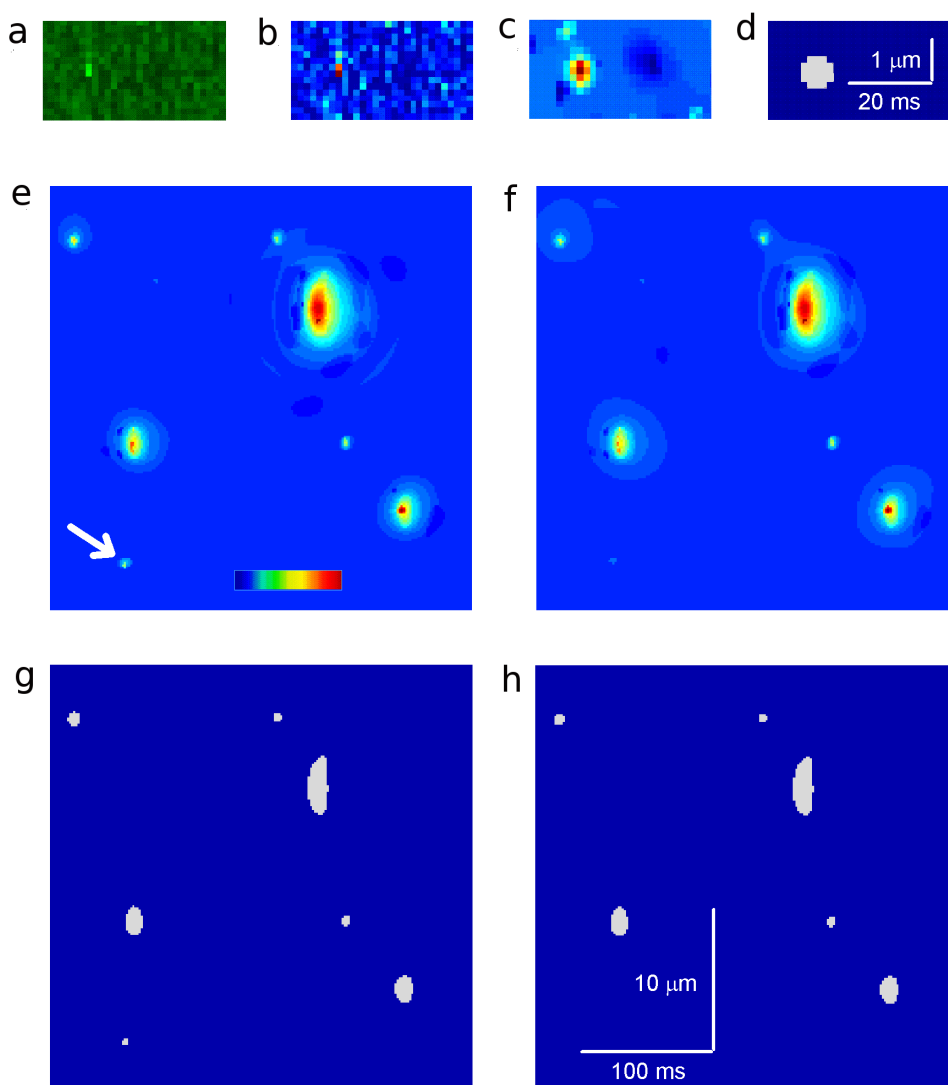
Ezzel szemben, ha ugyanazt a beállítást normális eloszlású háttérzajon használjuk, a hagyományos módszer magas PPV értékeket ad (4.17 ábra d). Így látható, hogy a háttérzaj jellege meghatározó ezekben a tesztekben. Míg a szenzitivitás vonatkozásában mindkét háttér esetében a wavelet alapú keresés a hagyományossal összevethető eredményt mutat (4.17 ábra a és c), lényegesen jobban teljesít a kísérleti háttér esetében ugyanazoknál a relatív fluoreszcencia egységekben kifejezett amplitúdóknál.

Az algoritmus PPV_{50} értéke ebben az esetben több mint 0.3 relatív fluoreszcencia egységgel (0.287 a 0.59-höz képest) jobb mint a hagyományos módszeré. Így ez a PPV görbe kevésbé meredek mint a hagyományos módszeré, és nem éri el azt a meredekséget sem amit von Wegner és mtsai. jeleztek (von Wegner és mtsai. 2006). A különbségek kis méretű hamis pozitív találatok következményei, amelyeket „tüskék”-nek fogok nevezni a továbbiakban. Ezek nincsenek jelen a normális eloszlású háttérrel képzett szimulált képeken.



4.17. ábra. Szenszitivitás és PPV érték a relatív amplitúdó függvényében

Eseményamplitúdótól függő szenzitivitás (a és c) valamint pozitív prediktív értékek (b és d) különböző detektáló algoritmusok esetében. Az a és b esetben kísérleti képek háttérét használtuk, a c és d esetben szimulált normális eloszlású háttérzajt. Három különböző algoritmus hatékonyságát és megbízhatóságát mértük: hagyományos küszöbölő algoritmus ($CRI_2=3.6$), wavelet alapú algoritmus fotonzaj szűrés nélkül és szűréssel ($H=4.5$, $\tau=3$), $\delta=4$, detektálás a 2-es és 3-as szinten). Az S_{50} és PPV_{50} értékek 0.315, 0.315, 0.325 (a), 0.285, 0.21, 0.595 (b), 0.3, 0.3, 0.41 (c) és 0.23, 0.23, 0.26 (d) a wavelet módszer esetében (fotonzaj szűrő nélkül és szűrővel) valamint a küszöbölő módszer esetében.

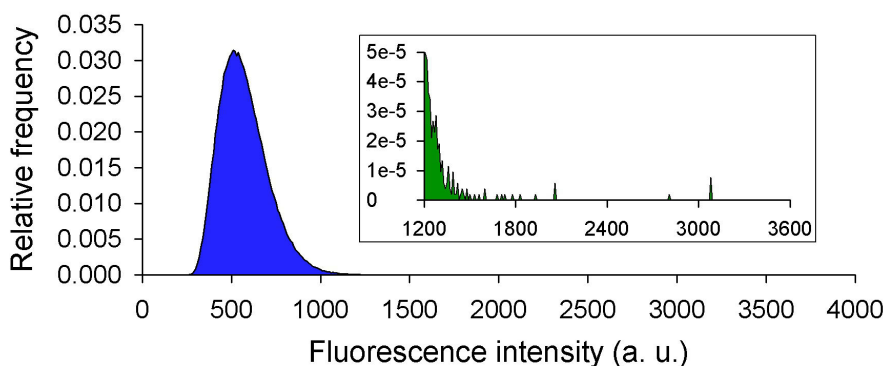


4.18. ábra. A foton zaj hatása a wavelet alapú detektálási algoritmusra

a-d. Foton zaj tüskéinek hatása a wavelet alapú detektálásra. a-b. Foton zaj tüske magas zajszintű szomszédos pixelek mellett, a - eredeti, b - normalizált kép. c. a mintázat megjelenése a zajszűrt képen és d. a detektálási maszkon. e. a 4.14 ábra szimulált line-scan képének zajszűrt változata foton zaj szűrés nélkül, f. foton zaj szűréssel. Detektálás utáni maszkok: g. foton zaj szűrés nélkül és h. foton zaj szűréssel. A nyíllal jelölt esemény a h maszkon nem jelenik meg.

Eredmények

A kísérleti képek háttér zajának eloszlása nem normális eloszlás, még csak tiszta Poisson sem, mert a magas, kiugró pixelek jelenléte nagyobb, mint az említett eloszlásokon (4.19 ábra).



4.19. ábra. line-scan képek háttérzajára jellemző hisztogram

Kalcium felszabadulási eseményeket nem tartalmazó line-scan kép háttérének zaj eloszlása. A jobb felső sarokban levő nagyítás kiemeli az eloszlás jobb oldalának elnyúló jellegét, amely a magas szintű fotonzajra jellemző pixelek következménye.

A hamisan detektált kis területeket a wavelet alapú algoritmusok (zajszűrés és detektálás) hozzák létre a 2. wavelet szintben, ha a Poisson típusú fotonzajra jellemző pixel kiugrások környékén a kevert zaj minták még tartalmaznak 1-2 magasabb amplitúdójú pontot (4.18. ábra a-d). Ezeket a területeket a detektáló algoritmus hamis pozitív találatoknak látja (4.18. ábra e-h). Elvégeztem egy összehasonlítást a különböző háttér eloszlást tartalmazó teszt képeket használva, a detektálási paraméterek ugyanazok voltak minden esetben (4.2 táblázat). A PPV_{50} érték 0.3 egység körüli különbséget mutatott a tipikus kísérleti hátterek (BSNR 3.24) és az ugyanolyan BSNR értékkel rendelkező normális eloszlású hátterek esetében. Rendkívülien zajos kísérleti hátterek esetében (BSNR < 2.5) a különbség még hangsúlyosabb.

4.4.2.2. A küszöbölési operátor

A zajszűrés küszöbölési operátorának is van hatása a hamis pozitív találatok számára. A 4.3.1 fejezetben megadott három operátor közül a lágy (soft) küszöbölés biztosítja a legjobban simított képeket (lásd 4.13 ábra c) és ez vágja meg legjobban a wavelet együtthatók értékét.

Az affin operátor (4.13 ábra d) ugyancsak sima képet ad, de sokkal jobban megtartja a zaj mintázatait mint a kemény (hard) operátor (4.13 ábra b), ez utóbbi kettő esetében a zaj szűrt amplitúdó közelítően ugyanakkora.

Háttér zaj eloszlás	BSNR	S_{50}	D_{50}
Normális	2.0	0.37	0.28
Kísérleti	2.38	0.47	0.90
Normális	2.5	0.37	0.28
Kísérleti	3.24	0.35	0.58
Normális	3.5	0.30	0.23

4.2. táblázat. A háttér zaj hatása a detektálási statisztikára

A wavelet alapú detektálás esetében a paraméterek $\delta=3.5$ és $\tau=3.5$.

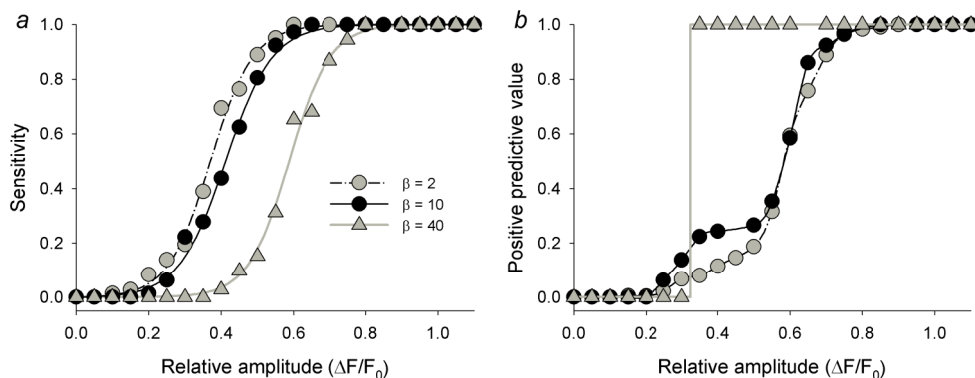
Következésképpen a teszthejnyben minden esetben a kemény küszöbölést használtam. Gyakorlati feldolgozásokban, kis háttérzaj esetén az affin megoldás is jó alternatíva.

4.4.2.3. Az események mérete

Mivel a túske szerű hamis találatokat néhány szomszédos pixel generálja a line-scan képeken, a pixeleken kifejezett területük általában kisebb mint a valódi eseményeké. Így első (naiv) közelítésként, ezek kiszűrésére be lehet állítani egy, az események pixelben megadott méretére alkalmazott küszöböt. Méret alatt itt a detektálási maszk által generált eseményt mutató területet értem (4.18 ábra d, valamint g, h). Így az algoritmusokba beépítettem egy paramétert (β) amellyel követhető és szűrhető a detektált események mérete.

Felmértem a β küszöb hatását a detektálásra 2 és 40 közti értékekre (4.20 ábra, a grafikon β 2, 10 és 40 értékeire kapott eredményeket mutatja). $\beta=2$ -nél kisebb érték már 1 pixeles területeket jelentene, ezt az esetet mindig kizárom, mert abban az esetben ha valódi pozitív találatok lennének, nem különböztethetők meg a háttértől. A $\beta=40$ -es értéktől kezdve a PPV érték 100%-osra alakul, ennél nagyobb értékkel ismét nincs értelme próbálkozni, mert nem javíthatja a szenzitivitást. Mindez a használt pásztázási paraméterekre érvényes (1.54 ms, 0.179 μ m), más pásztázási értékeknél ezek módosulhatnak.

Ez a naiv szűrés, amely az esemény méretekre épít nem hatékony kezelése a túskek problémájának. A β növelése csak enyhén javítja a PPV görbét (lásd 4.20 ábra b, $\beta=2$ és $\beta=10$ -nek megfelelő görbék), így magas β értékek lényegesen ronthatják a szenzitivitást (4.20 a ábra).



4.20. ábra. Szenzitivitás és pozitív prediktív érték

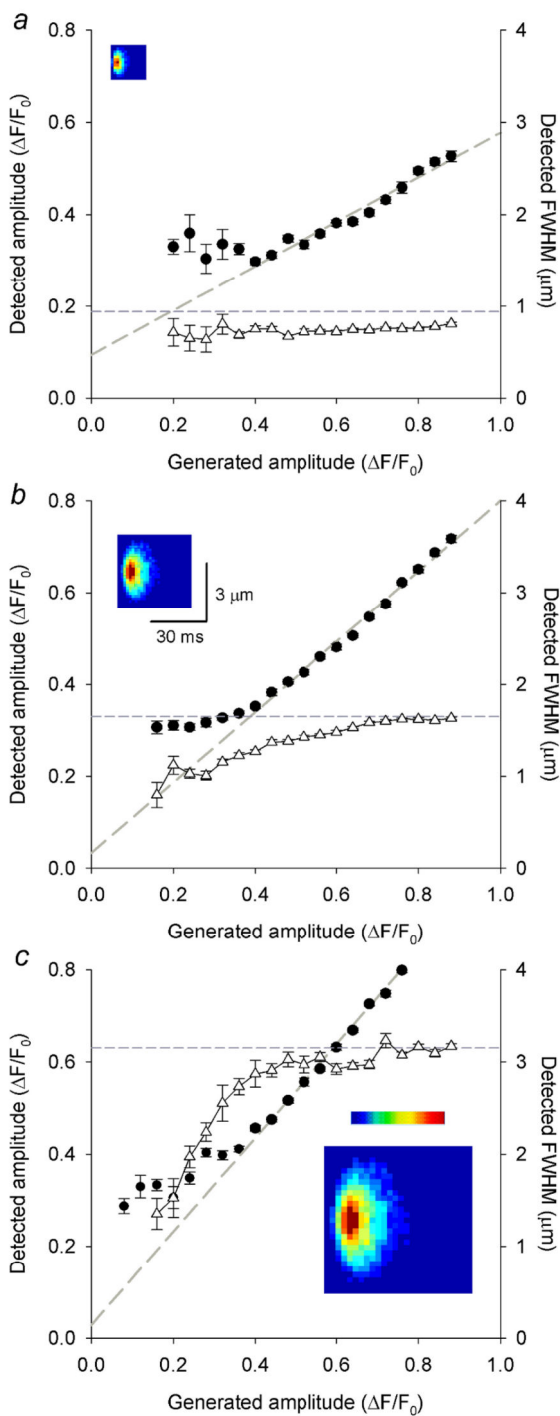
Szenzitivitás (a) és pozitív prediktív érték (b) az esemény amplitúdó függvényében. A kis méretű (β paraméter mint esemény méret) események kizárásával kapott grafikonok. A foton zaj szűrő nélküli wavelet alapú detektálást használtuk. Az eredményeket három különböző β esetre adjuk meg (2, 10 és 40). A görbék S_{50} és PPV_{50} értékei 0.37, 0.41, 0.585 és 0.583, 0.576, 0.325 $\beta = 2, 10, 40$ értékekre. További részletek a szövegben.

4.4.2.4. Tüske szűrés alkalmazása

A 4.3.3 szakaszban bemutatott módszerrel eredményes tüske szűrést értem el, gyakorlatilag a szenzitivitás nem változik (4.17.a ábra). Megállapítottam, hogy line-scan képeink esetében emlősökben jelentkező sparkok detektálására az optimális paraméterek $\delta=4.0$, $\tau=3$, $\beta=2$ és a tüske szűrő beállítása $H=4.5$, így jobb PPV görbét kapunk szenzitivitás veszteség nélkül. A tüske szűrőt a normalizált képre alkalmaztam a 4.3.3 szakaszban bemutatott módon.

4.4.2.5. Szimulált események paraméterei

Az esemény paraméterek számítása függ az eseményt megjelenítő terület tulajdonságaitól (esemény méret, zaj szint, stb.). A paraméterszámítás pontosságának felmérése végett kiszámoltam különböző méretre skálázott szimulált események paramétereit (4.21 ábra). A modell spark három skálázott változatát használtam, az eredeti méretű mellett ($FWHM=1.78 \mu m$ és $FTHM=18.4 ms$) a kétszeresére és felére skálázott változatait. A skálázást az idő és tér irányokban is elvégeztem. Minden skálázott változattal szimulált képeket generáltam, amelyeken a tartalmazott sparkok amplitúdója 0.2 és 0.9 $\Delta F/F_0$ relatív amplitúdó között váltakozott (0.1 relatív amplitúdó lépésekben).

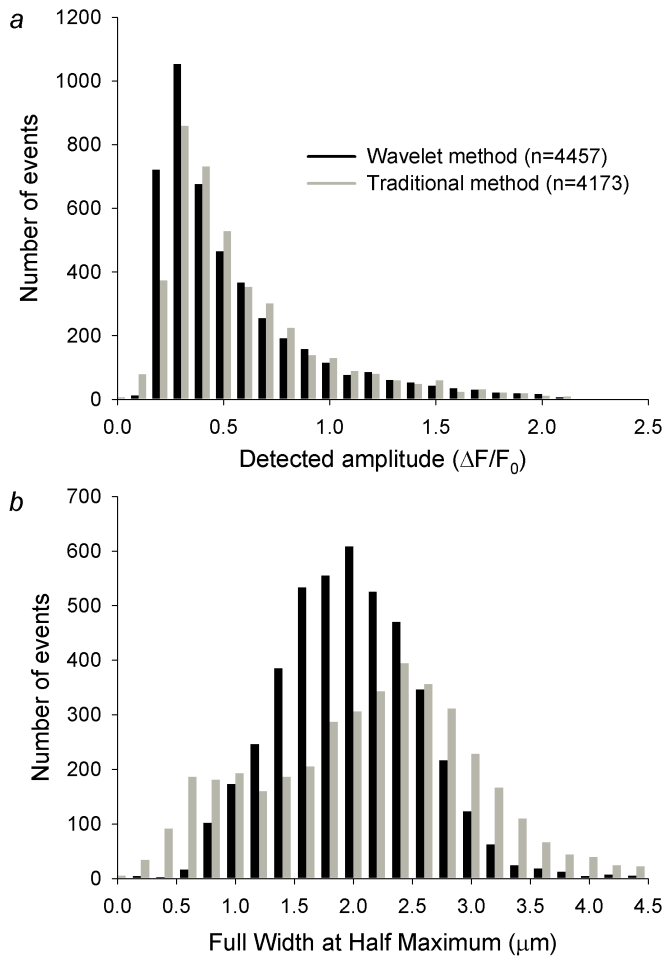


4.21. ábra. Eredeti és detektált paraméterek közti összefüggés

A sparkok eredeti és detektálás után számolt paramétereit (● amplitúdó, Δ FWHM) közti összefüggés. Részletek a szövegben.

Eredmények

A tesztek szerint a számolt amplitúdó lineáris függvénye a képekre generált amplitúdóknak, minden FWHM-re ha a generált amplitúdó 0.4 fölött van. A 0.4 amplitúdó fölötti sparkokat 100% szenzitivitással detektálunk. A számolt amplitúdó nem lineáris jellege kisebb amplitúdók alatt annak köszönhető, hogy pozitív és additív jellegű zaj esetében nagyobb eséllyel detektálhatjuk. Ezért kis amplitúdójú sparkok esetében a számolt amplitúdó egy közelítése az esemény eredeti amplitúdójának.



4.22. ábra. Spark paraméterek eloszlása kísérleti képek elemzése esetében

(a) amplitúdó, (b) FWHM. Az eseményeket a hagyományos (szürke), illetve a wavelet módszerrel (fekete) azonosítottuk, ez utóbbi esetében tüske szűrőt is használtunk. A módszereket 300 kísérleti képen futtattuk. Az esemény paramétereiket a 4.2 fejezetben bemutatott módszerekkel számoltuk. A hisztogram tartalmaz minden detektált eseményt.

Egy másik érdekes következtetése az eredeti és számolt amplitúdók közti összefüggésnek, hogy a lineáris szakaszon a görbe meredeksége az FWHM monoton

növekvő függvénye (a legkisebb a felére skálázott és legnagyobb a kétszeresre skálázott modell esetében). Az eredeti méretű modell esetében ez egység körüli érték (4.21 ábra b).

Összehasonlítottam a számított és eredeti FWHM értékeket is. Általános következtetésként, a számított FWHM legjobb esetben egyenlő a modellével, általában alul becsüli azt. A felére skálázott modell esetében a számított FWHM minden amplitúdó esetében kisebb volt mint az eredeti (4.21 ábra a), és amplitúdótól független volt az eltérés. A többi esetben a számolt FWHM növekedett az események méretének a függvényében, és az eredeti méret 90%-át érte el a 0.64 relatív amplitúdó értéknél (az eredeti méretű modellenél 4.21 ábra b) illetve a 0.4 értéknél (a kétszeresére skálázott modellenél 4.21 ábra c).

4.4.2.6. Összehasonlítás kísérleti képeken

A számolt spark jellemzők összehasonlítása végett elvégeztem a hagyományos és wavelet módszerrel számolt paraméterek összehasonlítását, ezúttal kísérleti képeken (4.22 ábra). A wavelet módszer megtalál olyan eseményeket is, amelyeket a hagyományos nem. Egy második fontos következtetésünk, hogy mind az amplitúdó, mind pedig az FWHM számításánál, a wavelet módszer középértékei ($0.490 \pm 0.005 \Delta F/F_0$ és $1.90 \pm 0.01 \mu\text{m}$) szignifikánsan kisebbek voltak mint a hagyományos módszer által számítottak ($0.523 \pm 0.006 \Delta F/F_0$ és $2.33 \pm 0.03 \mu\text{m}$) (4.22 ábra). Az FWHM esetében szembetűnő, hogy a wavelet módszerrel kapott eredmény adataiban a szórás kisebb (0.706 a wavelet módszer adataiban és 1.787 a hagyományos módszerében), tehát kevesebb középértéktől különböző eseménnyel rendelkezünk ebben az esetben. Ez a különbség ugyancsak szignifikáns ($p < 0.001$ Brown–Forsythe teszt szerint).

Ezeket a tulajdonságokat két tényezőnek tulajdonítottuk. Elsősorban, a wavelet módszer szenzitivitása nagyobb, így nagyobb valószínűséggel detektál kis amplitúdójú és nehezen érzékelhető eseményeket. Másodsorban, mivel ennél az összehasonlításnál zajszűrt képeket használtunk a számításhoz, így a görbék illesztése a tér és időbeli profilokhoz pontosabbak, mint a hagyományos módszer medián szűrővel simított képei esetében.

4.5. A kiértékelési módszerek használata kísérletekben

A bemutatott módszereket az alábbi publikációkban használtam kísérleti adatok feldolgozására:

„Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats” (Szigeti és mtsai. 2007) publikációban posztmiokardiális infarktusos (PMI) állatmodell (patkány) izomrostjaiban történő módosulásokat tanulmányoztunk 24 héttel az infarktus után. A sparkok és ember típusú jelenségek tanulmányozásával kimutattuk az izomsejtekben történő Ca^{2+}

felszabadulás jellegének megváltozását ezekben az állatokban a kontroll csoporthoz képest. A kalciumfelszabadulási jelenségek amplitúdója és volumene szignifikánsan csökkent, a sparkok frekvenciája és felfutási ideje (rise time) nőtt. Az *ember* típusú jelenségek relatív száma nőtt. Mindezek arra utaltak, hogy a megnyíló Ca^{2+} csatornák száma csökkent és a rianodinreceptorok működése megváltozott.

„Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor” (Lukács és mtsai. 2008) publikációban a *maurocalcine* (MCa) nevű skorpió toxin mutációinak vázizom sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. A toxin módosítja a rianodinreceptor Ca^{2+} csatornák tulajdonságait. A tanulmány kimutatta, hogy a MCa és mutációi koncentrációtól függő szubkonduktancia állapotokat okoznak a vázizomsejtek rianodinreceptoraiiban, amennyiben a citoplazma oldaláról kerülnek ezzel kapcsolatba (a tanulmány feltételezi, hogy a jelenség a MCa felszíni töltésmintázatának következménye). A kutatás egyik részeként line-scan képek segítségével tanulmányoztuk a MCa hatását vázizomban. A spark és *ember* paramétereket a bemutatott módszerekkel számoltuk. Az utóbbiak megjelenését nagyban segítette a Mca jelenléte, mivel szubkonduktancia szinteken nyitvatartja a Ry receptorokat.

„Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle” (Almassy és mtsai. 2008) publikációban egy RyR befolyásoló gyógyszerjelölt vegyület, a K201 hatását (amely képes megelőzni a miokardiális infarktus utáni izomgyengeség kialakulását) vizsgáltuk.

„Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture” (Fodor és mtsai. 2008) publikációban a SR egyik fehérjéjének, a triadinnak (pontosabban a Trisk 95, 95 kDa molekulásúlyú izoformájának) a hatását vizsgáltuk, amelyről feltételezik, hogy befolyásolja a RyR működését. A kísérletek egyik fázisában LSM 510 META mikroszkóppal vizsgáltunk patkány kontroll és módosított Trisk 95 expressziójú vázizomsejteket.

„Caffeine Treatment and Depolarization Alter the Spatial and Temporal Characteristics of Calcium Sparks on Intact Amphibian Skeletal Muscle” (Vincze és mtsai. 2012) publikációban koffeinnel kezelt, valamint depolarizált béka izomsejteket vizsgáltunk nagyfrekvenciás (60 kHz) line-scan valamint x-y (30 kHz) képeken.

5. Diszkusszió

A line-scan képek Ca^{2+} eseményeinek detektálása a következő fázisokon keresztül történik:

- zaj kezelés és kép előkészítés,
- események területek keresése,
- események elfogadása,
- paraméterek számítása,
- paraméterek értelmezése.

A következő szakaszokban ezekhez a műveletekhez kapcsolódó kérdések néhány gyakorlati vonatkozását tárgyalom.

5.1. Kép javítás és előkészítés

A megvalósított módszerek detektálás és/vagy paraméter számítás előtt használnak képjavító szűrőket. Ezek esetében normális eloszlású additív zaj jelenlétét feltételezzük. Amennyiben ez nincs így, más előfeldolgozást is kell végezni (lásd alább).

A kettős küszöbölésre épülő detektálás esetében a zajszűrés 3×3 -as medián szűrővel történik, így a kép kis mértékben módosul (a négyzetes különbség az eredeti kép és a módosított között kisebb, mint más térben használható zajszűrők esetében (Young és mtsai. 1998)) és nem állít elő artefaktumokat. Így a normalizálás és küszöbölés alkalmazása előtt a kép nem szenved olyan módosításokat, amelyek miatt kis összefüggő struktúrák elvesztődnének.

Az *à trous* transzformációval végzett detektálás előtt is végeztem zajszűrést, de az a detektáló folyamat része, nem befolyásolja a paraméterszámítást.

Előfeldolgozásként nem alkalmaztam dekonvolúciós élesítést. Ez a művelet nem vált általános gyakorlattá a line-scan mérések feldolgozásakor. A line-scan képek egy dimenziós mérések sorozatából állnak elő, és a nagy zaj szint miatt nehezen végezhető el a dekonvolúció. Amennyiben mégis működik, csak részlegesen, a reális PSF-nél kisebb FWHM értékkel rendelkező PSF-el (3.4.2). Ezért a paraméterek számításánál mindenképp a Ca^{2+} események amplitúdójának, illetve reális FWHM értékének eltolódásával kell számolni (különösen az utóbbiével). Ez az eltolódás nem jelentős a sparkok időhöz kötött paramétereinek számításánál (és nincs jelentősége, ha kontroll csoporthoz mért komparatív kísérletekben használjuk őket). A nagyobb FWHM viszont jelentős eltolódást okoz a jel tömeg (*signal mass*) és Ca^{2+} kibocsátás fluxusának számításakor. Így ebben az esetben korrekciós paramétert kell alkalmazni. X-Y-t képek esetében a dekonvolúciós műveletek alkalmazásának

kérdését már fel lehet vetni.

Az algoritmusok jelentős részében a konfokális képek háttérzaját normális eloszlásúnak, vagy azt közelítőnek tekintettem. Ez indokolható a mérési pontok számértékével, ezek nem jeleznek nagyon kis foton számokat detektáláskor. Valójában a nyers képekből nyert hisztogramok jobbra elnyúló jellege a fotonzajnál erősebb zaj jelenlétét jelzi.

A képek előfeldolgozása elvégezhető Poisson eloszlású zaj feltételezése esetében is. Erre egy megoldás a zaj szórásának stabilizálása az Anscombe transzformáció módosított változatával (Starck és mtsai. 2006), így a zaj közelítőleg normális eloszlású lesz, és alkalmazni lehet az erre kidolgozott módszereket konfokális képek esetében is, lásd Bankhead és mtsai. (2011).

5.2. Detektálási módszerek

Detektáláshoz előkészített képként a normalizált képet használtam (4.1.1) egyenletes háttér esetében. Ha a háttér zaj eloszlása nem egyenletes, másként kell eljárni (az elemzett területet részekre osztva lehet elemezni, lásd Picht és mtsai. (2007)). Az általunk elemzett line-scan-ekben ez a probléma nem jelentkezett.

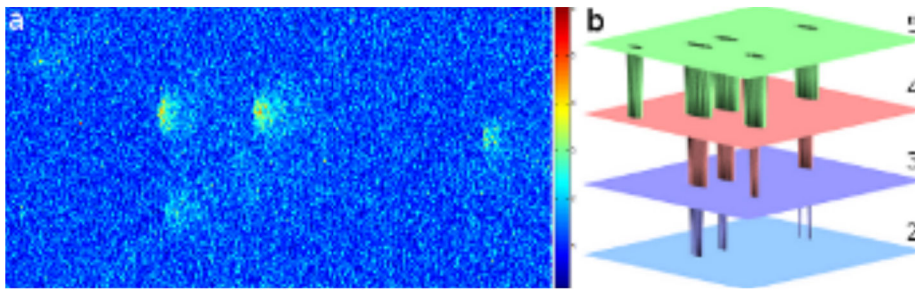
A területek meghatározásához Cheng „klasszikus” algoritmusa kettős küszöbölést használ, az *à trous* waveletre épülő algoritmusok izotrópikus, egy vagy kétdimenziós, a skála függvény alakjával korreláló területeket határoznak meg.

Az előálló MRS bináris maszkokat rugalmasan lehet felhasználni, a keresési algoritmusok könnyen alakíthatóak. Az *à trous* waveletre épülő módszer több kombinációra ad lehetőséget. Az MRS maszkokat keresztmetszet vagy egyesítés logikai műveletekkel is fel lehet használni detektálásra (von Wegner és mtsai. 2006; Szabó és mtsai. 2010) vagy a háttér és a zaj levonásával lehet detektálni az eseményeket (Bankhead és mtsai. 2011).

A detektálási kritériumként felhasználhatóak az MRS maszkokban található bináris alakzatok (alak, kiterjedés, egymás utáni szintekben megjelenő fölöttiség). Az általam készített függvénycsomag biztosítja ezeknek a jellemzőknek a kinyerését detektálási vagy osztályozási feladatokhoz (lásd 5.1 ábra).

A keresési algoritmusok legkényesebb része a találatok elfogadása, különösen a kis méretű, fókuszon kívüli sparkok esetében. A küszöbölési módszerek általában néhány, egy második küszöbvel kiválasztott kis összefüggő területet használnak erre a célra. Például Hollingworth és mtsai. (2001) 2 pixel x irányban és 1 pixel t irányban összefüggő területet használtak¹⁵.

15. Bankhead és mtsai. (2011) kimutatták, hogy az x irányban egymás mellett található pixelek intenzitás értékének korrelációja nagyobb, mint a t irányban egymás melletti pixeleké.



5.1. ábra. MRS maszkok használata detektálásra

Az MRS maszkok tetszés szerint kombinálhatók objektum detektálás vagy jellemzők kinyerése céljából. a. LSM 510 META készülékkel készített line-scan kép (1.5 ms pásztázási periódus). b. A kétdimenziós *à trous* algoritmus által előállított wavelet szintek küszöbölése után kapott maszkok (a küszöbölést a 4.3.2 szakaszban bemutatott módszerrel végeztem). A maszkok melletti számok a wavelet szintet jelentik, a küszöbölés a 2-5 szintekre történt.

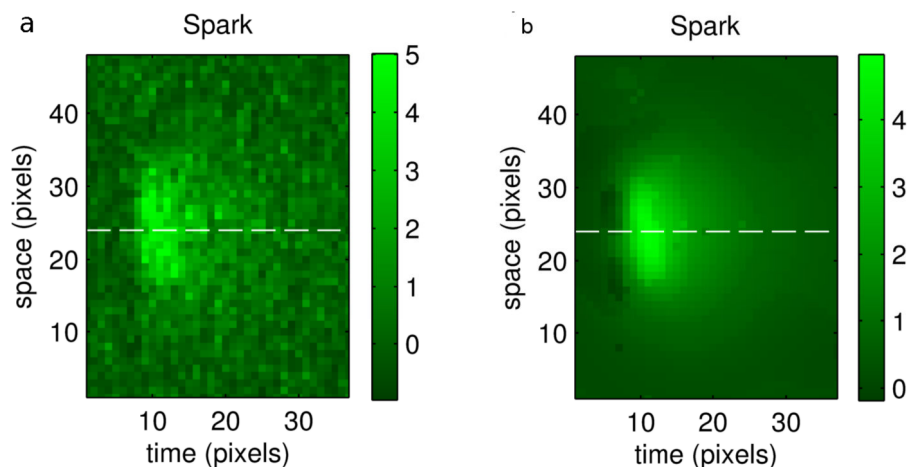
A wavelet alapú módszereknél az elfogadást meg lehet oldani egy vagy több kiválasztott wavelet szinten végzett ellenőrzéssel, például második küszöböléssel, ahogy azt az ember típusú események keresésénél történik (4.3.4), a szintek gyakorlatilag az eseményen belüli jellemzők meghatározására is alkalmasak (pl. több csúcsú esemény csúcsainak meghatározása). Ezeket a módszereket alkalmazva LSM LIVE mikroszkóp line-scan képeire állítottam össze spark detektáló algoritmust.

Elméletileg a minta illesztő módszer (Kong és mtsai. 2008) biztonságosabban oldja meg az esemény elfogadás kérdését (korreláció és nem paraméteres statisztikai teszt). Ennek ellenére, amint azt a szerzők tesztjei mutatják, itt is csökken a módszer érzékenysége és megbízhatósága a kis, illetve az elmosódó események esetében (Kong és mtsai. 2008). A szerzők korrekcióként több, különböző méretű minta illesztését ajánlják, ezt viszont körülményes és időigényes a gyakorlatban kivitelezni.

A jelenlegi algoritmusok S_{50} és PPV_{50} értékeit különböző zajszinten nehéz összehasonlítani, mert

- nem rendelkezünk minden szükséges implementációval,
- a szerzők által használt zaj szintek, illetve azok eloszlása sem egyezik a publikációkban,
- más és más módszerrel előállított modell sparkokat használtak a szimulált

képekben.



5.2. ábra. Wavelet módszerrel zajszűrt spark

jellegzetes spark (060131a02_09) normalizált (a) és wavelet módszerrel zajszűrt ($\delta=4$, 4 wavelet szint) képe (b).

Ennek ellenére a detektálási határt már erősen korlátozó BSNR=2-es szint esetében megállapíthatjuk, hogy az *à trous* és VST (Variance Stabilization Transform) algoritmus (Bankhead és mtsai. 2011) ugyanazon a szinten valósítja meg a D_{50} értéket ($\Delta F/F_0 \sim 0.3$), a hagyományos algoritmus esetében ez nagyobb érték ($\Delta F/F_0 \sim 0.48$). Ugyanez a helyzet a PPV_{50} értékkel ($\Delta F/F_0 \sim 0.2$ és $\Delta F/F_0 \sim 0.3$). A szerzők értékelése szerint a VST jobban teljesít Poisson jellegű zaj esetében. Ugyanakkor a 100%-osan megbízható detektálást az algoritmusok kb. 0.9-1.0 relatív amplitúdónál érik el, tehát kis amplitúdójú események esetében a hamisan pozitív találatokkal mindenképpen számolni kell.

Ezek az értékek másként alakulnak, ha kísérleti képek háttérét használjuk a szimulált képek előállítására (lásd 4.4.2.6).

Tapasztalatom szerint a háttér, illetve a zaj jellege és szintje kísérlet sorozatonként változik, így minden sorozat esetében ajánlott mérni kísérleti képek háttérét használó szimulációval a D_{50} és a 100%-os detektálási szintet, és meghatározni azokat a relatív amplitúdókat ahol már hamis pozitív találatokkal kell számolni.

Itt emlitem meg, hogy az *à trous* waveletre épülő detektálási algoritmusok hátrányaként fogható fel a módszer paraméterezése, a zajszűrést és detektálást szabályozó paramétereket a tesztjeink során használt zajoktól, illetve detektált

formáktól jelentősen különböző esetekben be kell állítani a megfelelő feladatra.

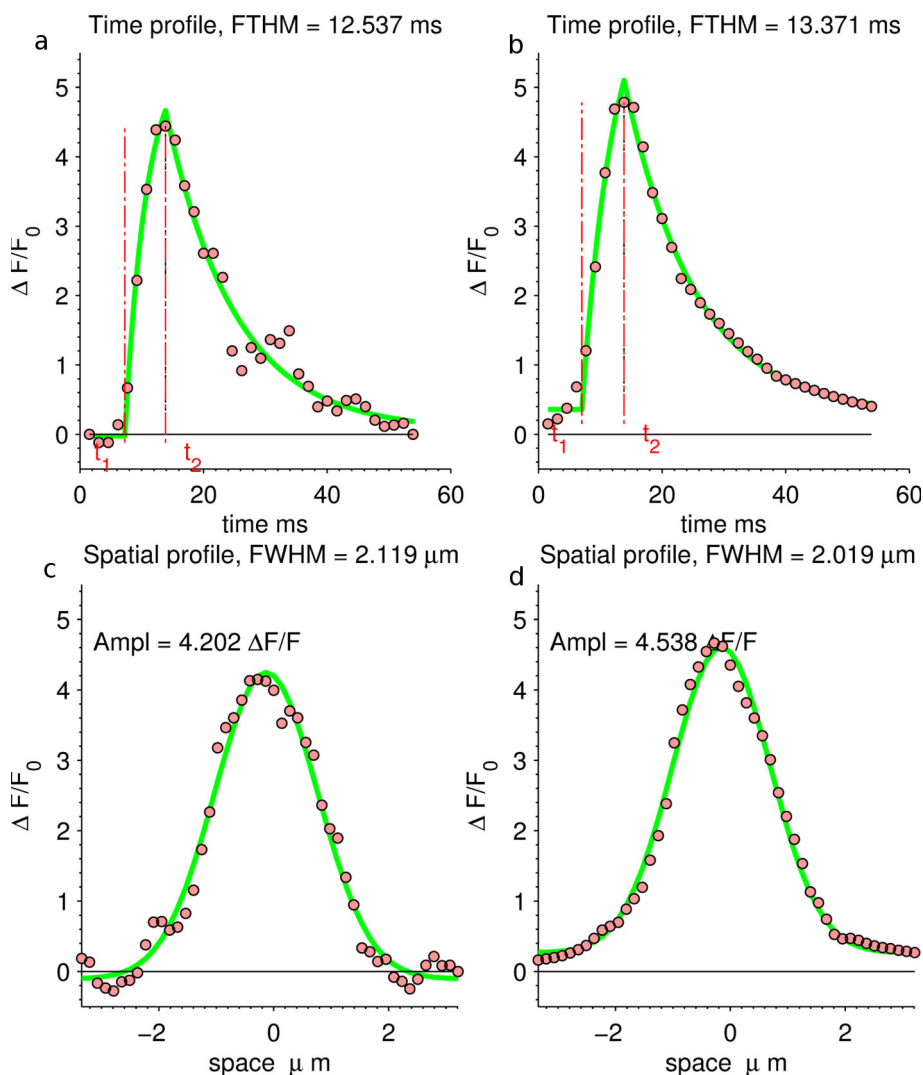
A sparkok területének meghatározása és eseményként történő elfogadása feltételezésem szerint megvalósítható gépi tanulást alkalmazó módszerekkel is (osztályozással), ebbe az irányba történő munka folyamatban van.

5.3. Paraméter számítás

A paraméter számításokat (4.2) a kutatások számára készült elemzésekben a normalizált képből végeztük, és nem alkalmaztunk további javító műveleteket.

Kísérletként számítottunk paramétereket wavelet módszerrel zajszűrt képből is. A wavelet módszerrel zajszűrt kép, bár sokkal jobb függvény illesztéseket tesz lehetővé nem ajánlott paraméterek számítására, részben a jelentős amplitúdó csökkenés, részben az előálló alakzatok (sima, éles csúcsok nélküli formációk) miatt. Az elemző programjaimban lehetőség van ennek a képnek a használatára is paraméter számításakor, de a torzulások jelentősek. Az 5.2 ábra a egy tipikus spark normalizált (a) és zajszűrt képét tartalmazza (b). Mivel a spark (060131a02_09) szabályos, a torzulás viszonylag kicsi, de kisebb amplitúdójú és nem fókuszban lévő sparkok esetében jelentősek a különbségek. Az 5.2 ábrán látható spark esetében az FTHM és amplitúdó értékek kb. 7%-al nőnek, míg az FWHM érték 5%-al csökken, a zaj szűrt adatok következtében előálló paraméter változást az 5.3 ábra szemlélteti.

A szakirodalomban a spark elemzések egyik fontos része a bemutatott módszerekkel számított paraméterekből számított, különböző kísérletekből számított hisztogramok (amplitúdó, FWHM, lásd 5.4 ábra) összehasonlítása. Számolni kell azzal, hogy a paraméterek számítása a kis amplitúdójú sparkok esetében torzul, amit az alacsonyabb ellenőrző korrelációs értékek is jeleznek.



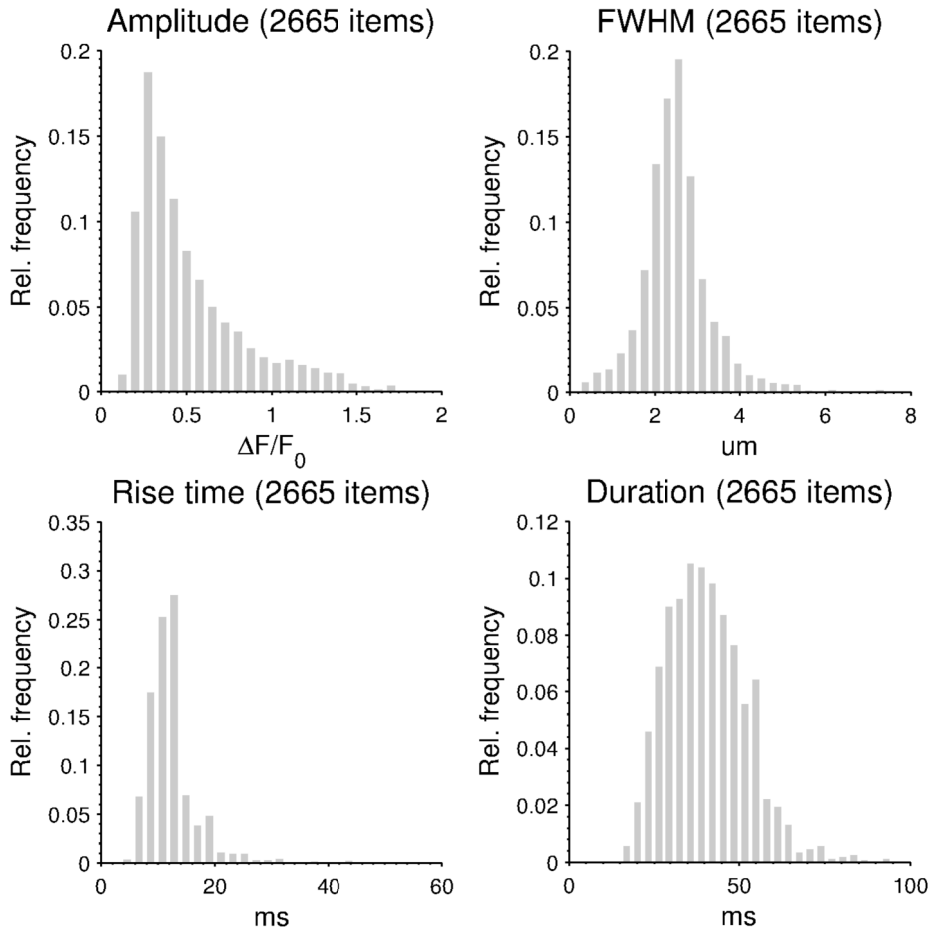
5.3. ábra. Spark paraméter számítás normalizált és zajszűrt képen

A számításokat az 5.2 ábrán látható sparkon végeztük. a,c: Normalizált képen számított FWHM és FTHM görbék; b,d: zajszűrt képen számított paraméterek.

5.4. A line-scan mérések jellegéből adódó kérdések

A sparkok megfigyelésére alkalmazott line-scan módszer kapcsán már a kutatások kezdetén megfogalmazták a módszer jellegéből fakadó bizonytalansági tényezőket (Izu és mtsai. 1998; Cheng és mtsai. 1999; Rios és mtsai. 2001). A mérés folyamán

pásztázott egyenes sparkoktól mért távolsága ismeretlen, és a módszer jellegéből adódóan a távolabbi, kisebb amplitúdóval regisztrált sparkok elmosódottabban, kisebb amplitúdóval, a nagyobb térbeli kiterjedéssel és lassabb kinetikával jelennek meg a line-scan képeken (Pratusevich és mtsai. 1996). Szimulációt is alkalmazó, mesterségesen előállított line-scan képeken sikerült összefüggést megállapítani a sparkok line-scan regisztrált amplitúdó eloszlása és a sparkok valódi amplitúdója között (Rios és mtsai. 2001).



5.4. ábra. Sparkok morfológiai paramétereinek empirikus eloszlása

a. Amplitúdó: a sparkok legkisebb amplitúdója $0.1 \Delta F/F_0$, jól megfigyelhető az empirikus eloszlás hiperbolikus esése, illetve a megjelenő módusz; b. FWHM; c. Felfutási idő; d. Időtartam. 061128b mérés, 300. 1024x512-es kép, 2665 spark adataiból készült hisztogramok.

Az elemző program megadja egy adott kísérletsorozat képeire a bemutatott módszerekkel számolt paraméter statisztikákat. Az 5.4 ábrán látható spark paraméter eloszlások értelmezése minden kísérletsorozat esetében új feladat marad.

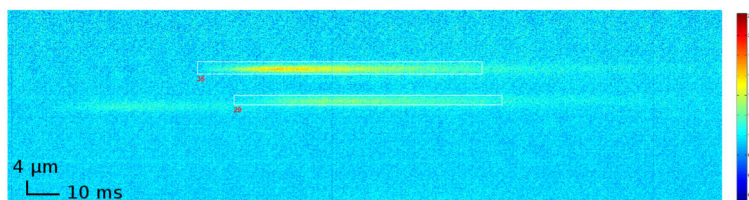
5.5. Alkalmazás nagyfrekvenciás konfokális méréseken

5.6. LSM LIVE nagyfrekvenciás képek elemzése

5.6.1. Detektálás

Az LSM 5 LIVE típusú line-scan képek esetében egy 20 ms időtartamú¹⁶ spark 0.05 ms pásztázási sebességgel 400 képpontot fog át idő irányban (ugyanaz a spark 1.54 ms-os periódus esetében 13 képpontra vetül ki). A LIVE line-scan mérések így lényegesen több képpontot rögzítenek t irányban, ezek száma az általam elemzett kísérletekben 20 000 és 80 000 között változott, ez jelentősen növeli a számítógépes erőforrások használatát elemzéskor (memória, processzoridő).

Ha az egy dimenziós *starlet* transzformáció dilatált skálafüggvényeinek pixelekben megadott szélességét tekintjük (5.1 táblázat), akkor 15-35 ms időtartamú sparkok átfogásához a transzformáció 8.-dik szintjét kell használnunk.



5.5. ábra. LSM Live készülékkel készült nagyfrekvenciás line-scan

A 04 060 625 kép részlete ($t=1181$, $x=354$ pixel), az teljes kép méretei $t=30\,000$ pont, $x=512$ pont (koffeinnel kezelt béka izomsejt).

Amennyiben a 4.3.4 szakaszban bemutatott *ember* típusú eseményekre kidolgozott algoritmushoz hasonló algoritmust alkalmazunk a 8-9.-dik szintekre, $\epsilon=0.01$ és $\gamma=0.35$ paraméterekkel, megfelelően detektáló algoritmust kapunk, ezzel párhuzamosan a találatokat leszűkítettem például 3 ms-nál hosszabb találatokra (60 pixel). Az általam elemzett képek tartalmaztak olyan detektált alakzatokat is amelyekben a kalcium kiáramlási folyamatnak több lokális maximum pontja volt egy eseményen belül, ezek jól detektálhatóak a 3-as és 4-es wavelet szintek

16. Itt a spark időtartama alatt itt a 4.2.2 pontban meghatározott „duration” paramétert értem.

küszöbölésével a már detektált teljes eseményen belül.

Az 5.5 ábra egy LSM Live készülékkel készített line-scan részletet ($t=1181$, $x=354$ pixel) ábrázol (04060625 kép részlete, az teljes kép méretei $t=30\,000$, $x=512$). A bejelölést az említett algoritmussal végeztük.

Wavelet szint	pixel	idő 0.05 ms skála	tér 0.2070 μm skála
1	5	0.25	1.035
2	9	0.45	1.863
3	17	0.85	3.519
4	33	1.65	6.831
5	65	3.25	13.455
6	129	6.45	26.703
7	257	12.85	53.199
8	513	25.65	106.191
9	1025	51.25	212.175

5.1. táblázat. A starlet transzformáció skálafüggvényeinek kiterjedése

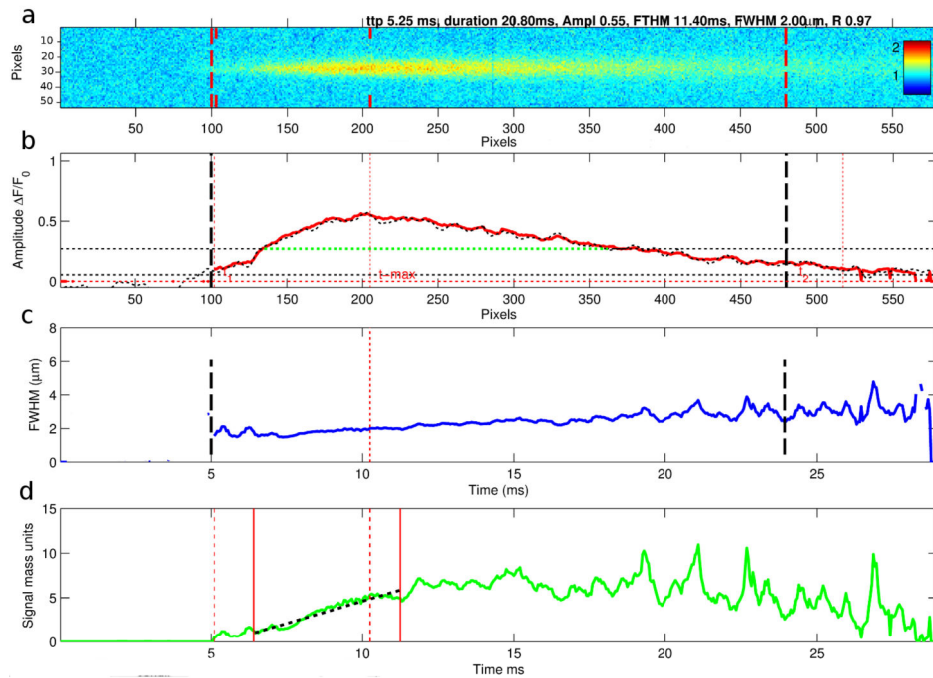
5.6.2. Paraméterszámítás

Nagyfrekvenciás képeken más paraméter számítást alkalmaztam (5.6 ábra). Ebben az esetben az esemény fel és leszálló ágai lényegesen több mérési pontot tartalmaznak, így hosszabb szakaszokon végezhető el az amplitúdó, illetve FWHM számolás.

A klasszikus sebességű line-scan képekre kifejlesztett detektálás és paraméterszámításhoz kötődő algoritmusok is jól alkalmazhatóak nagyfrekvenciás méréseken. A már ismert paramétereket ki lehet számítani a spark teljes időtartamára. Így az alábbi jellemzőket vezettem be a sparkok osztályozására:

- amplitúdó – a folyamatosan számolt amplitúdó maximum pontja,
- félérték szélesség – a maximális amplitúdó t koordinátájában számolt FWHM,

- *signal mass* görbe meredeksége.



5.6. ábra. Paraméterszámítás nagyfrekvenciás LSM Live képen

Koffeinnel kezelt béka izomsejtjében regisztrált spark (04060625_35). a. Az automata kereső algoritmus által bejelölt terület, t irányban 100 (szaggatott vonaltól mindkét irányban), x irányban 20 pixellel kiterjesztve szimmetrikusan. A spark maximális amplitúdójának 10%-os elérését, illetve maximum pontját a kép szélén található rövid vonalak jelzik. b. Összefüggő görbe: a spark térbeli kiterjedésére illesztett Gauss görbéből számolt amplitúdó minden olyan pontban ahol az illesztés elvégezhető. A szaggatott vonal a spark középvonalán 3 pontból képzett átlagra illesztett Savitzky-Golay görbe. c. A térbeli kiterjedésre történő illesztéssel számolt FWHM görbe minden számolható pontban. d. Signal mass görbe, az emelkedő szakaszra illesztett egyenes dőlésszöge felhasználható a Ca^{2+} forrás intenzitásának jellemzésére. Az egyenes illesztésének módszerét lásd a szövegben.

Mivel az amplitúdó, illetve FWHM értékekkel a spark teljes időtartamán rendelkezünk, a *signal mass* jellemző a Módszerekben bemutatott 3.35 kifejezés szerint számolható a felfutó ág minden pontjában. Ezt a számítást csak fókuszban levő sparkokon lehet elvégezni, alacsony szintű háttérzaj esetében. A meredekséget megadó egyenest az amplitúdó maximumának 10%-át elérő és a maximum utáni 1 ms-ot elérő t pontok között illesztettem a *signal mass* görbére.

5.7. Következtetések

A terület ismert kép és jelfeldolgozó módszereit alkalmaztam, illetve új módszereket vezettem be amelyek lehetővé teszik kalciumkoncentráció méréseknél a kiértékelés automatizálását (4.1.1, 4.1.2, 4.2, 4.3).

A spark típusú események paraméter számításánál igazodtam a spark kutatásokban résztvevő tudományos közösség gyakorlatához, míg az *ember* típusú jelenségek esetében kialakítottam egy jellemző számítást, ami lehetővé tette az események osztályozását (4.3.4, 4.3.4).

Tanulmányoztam a detektáló algoritmusok érzékenységet és megbízhatóságát, valamint paramétereik hatását az algoritmus viselkedésére és az optimális paraméter beállítást (4.4.2). Javítottam a detektálási algoritmusok megbízhatóságán, és pontos határokat adok ennek vonatkozásában.

Eredményként jelenleg két verziójú kiértékelő program használható az intézetben, amelyek lehetővé tették a Debreceni Egyetem – Orvos- és Egészségtudományi Centrum – Élettani Intézetében a sejten belüli Ca^{2+} felszabadulási eseményekhez kötődő konfokális line-scan és XY képek elemzését. Ennél fontosabb, hogy a képek kiértékeléséhez szükséges algoritmusok és számítások saját implementációjú függvények formájában elérhetőek, így bármilyen, a területen végzett kísérletsorozat esetében kiértékelő programok összeállításában felhasználhatóak (lásd B Függelék).

Az algoritmusokat sikerült nagy sebességű LSM 5 LIVE készülékkel készült line-scan képek elemzéséhez is használni. A kidolgozott algoritmusok kis módosítással használhatóak XY típusú 2, illetve 3 dimenziójú (XY-t) képek elemzéséhez.

6. Irodalomjegyzék

1. Agard D. A., Hiraoka Y., Shaw P., Sedat J. W. (1989). *Chapter 13 Fluorescence Microscopy in Three Dimensions*. In: Taylor D. L., Wang Y.-L. (Ed.), *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture Part B. Quantitative Fluorescence Microscopy –Imaging and Spectroscopy*, Academic Press.
2. Agard D., Steinberg R., Stroud R., others (1981). *Quantitative analysis of electrophoretograms: A mathematical approach to super-resolution*, Analytical biochemistry 111 : 257-268.
3. Almasy J., Sztretye M., Lukacs B., Dienes B., Szabo L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L., Jona 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.
4. Alpaydin E., (2010). *Introduction to Machine Learning*. The MIT Press.
5. Bankhead P., Scholfield C. N., Curtis T. M., McGeown J. G. (2011). *Detecting Ca²⁺ sparks on stationary and varying baselines.*, Am J Physiol Cell Physiol 301 : C717-C728.
6. Baylor S. M. (2005). *Calcium sparks in skeletal muscle fibers*, Cell Calcium 37 : 513 - 530.
7. Bray M.-A., Geisse N. A., Parker K. K. (2007). *Multidimensional detection and analysis of Ca²⁺ sparks in cardiac myocytes.*, Biophys J 92 : 4433-4443.
8. Brum G., González A., Rengifo J., Shirokova N., Rios E. (2000). *Fast imaging in two dimensions resolves extensive sources of Ca²⁺ sparks in frog skeletal muscle*, The Journal of physiology 528 : 419.
9. Burrus C., Gopinath R., Guo H., (1998). *Introduction to wavelets and wavelet transforms. A primer*. Prentice Hall.
10. Bushberg J., (2002). *The essential physics of medical imaging*. Williams & Wilkins.
11. Bányász T., Chen-Izu Y., Balke C. W., Izu L. T. (2007). *A new approach to the detection and statistical classification of Ca²⁺ sparks.*, Biophys J 92 : 4458-4465.
12. Cannell M., Cheng H., Lederer W. (1994). *Spatial non-uniformities in [Ca²⁺]_i during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes.*, Biophysical Journal 67 : 1942.
13. Cannell M. B., McMorland A., Soeller C. (2006). *Image Enhancement by Deconvolution*. In: Pawley J. B. (Ed.), *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Springer US.
14. Carl Zeiss Jena A. I. M. (2003). *File Formats LSM 510/LSM 5 PASCAL*, .
15. Chandler W., Hollingworth S., Baylor S. (2003). *Simulation of Calcium Sparks in Cut Skeletal Muscle Fibers of the Frog*, Journal of General Physiology 121 : 311-324.
16. Cheng H., Lederer W. J. (2008). *Calcium sparks.*, Physiological reviews 88 : 1491-1545.
17. Cheng H., Lederer W. J., Cannell M. B. (1993). *Calcium sparks: elementary events*

- underlying excitation-contraction coupling in heart muscle.*, Science 262 : 740-744.
18. 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.
 19. Crank J., (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.
 20. Csernoch L. (2007). *Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation.*, Pflugers Arch 454 : 869-878.
 21. Csernoch L., Zhou J., Stern M. D., Brum G., Ríos E. (2004). *The elementary events of Ca²⁺ release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle*, The Journal of Physiology 557 : 43-58.
 22. Davies E., Davies E., (2005). *Machine vision: theory, algorithms, practicalities*. Elsevier.
 23. Diaspro A., Chirico G., Usai C., Ramoino P., Dobrucki J. (2006). *Photobleaching*, Handbook of biological confocal microscopy : 690-702.
 24. Donoho D. (1992). *Wavelet shrinkage and W.V.D.: A 10-minute tour*, .
 25. Donoho D. (1995). *De-noising by soft thresholding*, IEEE Transactions on Information Theory 41 : 613:627.
 26. Eckard (2007). *SparkMaster - Calcium Spark Analysis with ImageJ*, , <http://sites.google.com/site/sparkmasterhome/>.
 27. Egner A., Hell S. (2006). 20. In: Pawley J. (Ed.), *Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch*, Springer.
 28. 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.
 29. Gonzalez A., Kirsch W., Shirokova N., Pizarro G., Stern M., Rios E. (2000). *The Spark and Its Ember: Separately Gated Local Components of Ca²⁺ Release in Skeletal Muscle*, The Journal of General Physiology 115 : 139-158.
 30. Gonzalez R., Woods R., (2008). *Digital Image Processing*. Pearson International Edition.
 31. Harkins A., Kurebayashi N., Baylor S. (1993). *Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3*, Biophysical journal 65 : 865-881.
 32. Hollingworth S., Peet J., Chandler W. K., Baylor S. M. (2001). *Calcium sparks in intact skeletal muscle fibers of the frog.*, J Gen Physiol 118 : 653-678.
 33. Hubbard B., (1998). *The world according to wavelets: the story of a mathematical technique in the making*. A.K. Peters.
 34. Izu L. T., Wier W. G., Balke C. W. (1998). *Theoretical analysis of the Ca²⁺ spark amplitude distribution.*, Biophys J 75 : 1144-1162.
 35. Jiang Y. H., Klein M. G., Schneider M. F. (1999). *Numerical simulation of Ca²⁺ "sparks" in skeletal muscle.*, Biophys J 77 : 2333-2357.
 36. Jin Y., Angelini E., Laine E. (2005). *Wavelets in Medical Image Processing: denoising, segmentation and registration*. In: (Ed.), *Handbook of Biomedical Image*

- Analysis*, Springer, Berlin.
37. van Kempen G. M. (1998). *Image Restoration in Fluorescence Microscopy*, Technische Universiteit Delft.
 38. Kirsch W. G., Uttenweiler D., Fink R. H. (2001). *Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle.*, The Journal of Physiology 537 : 379-389.
 39. Kolin D. L., Costantino S., Wiseman P. W. (2006). *Sampling effects, noise, and photobleaching in temporal image correlation spectroscopy.*, Biophys J 90 : 628-639.
 40. Kong C. H., Soeller C., Cannell M. B. (2008). *Increasing Sensitivity of Ca²⁺ Spark Detection in Noisy Images by Application of a Matched-Filter Object Detection Algorithm*, Biophysical Journal 95 : 6016 - 6024.
 41. Koshino K., Saito N., Suzuki S., Tamaki J. (2002). *Spike noise removal in the scanning laser microscopic image of diamond abrasive grain using a wavelet transform*, Optics communications 211 : 73-83.
 42. Lacampagne A., Ward C. W., Klein M. G., Schneider M. F. (1999). *Time Course of Individual Ca²⁺ Sparks in Frog Skeletal Muscle Recorded at High Time Resolution*, Journal of General Physiology 113 : 187-198.
 43. Launikonis B., Zhou J., Royer L., Shannon T., Brum G., Rios E. (2005). *Confocal imaging of [Ca²⁺] in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence*, The Journal of physiology 567 : 523-543.
 44. LTC (2012). *Fluo-3 Calcium Indicator*, Life Technologies Corporation, http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/g-protein_coupled_html/cell-based-second-messenger-assays/Fluo-3-calcium-indicator.html.
 45. 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.
 46. Mallat S., (2009). *A Wavelet Tour of Signal Processing: The Sparse Way*. Elsevier/Academic Press.
 47. Merchant F., Periasamy A. (2008). *Fluorescence Imaging*. In: Wu Q., Merchant F., Castleman K. (Ed.), *Microscope image processing*, Academic Press.
 48. Morton K. W., Mayers D., (2006). *Numerical Solution of Partial Differential Equations*. Cambridge University Press.
 49. Olivo-Marin J. (2002). *Extraction of spots in biological images using multiscale products*, Pattern Recognition 35 : 1989-1996.
 50. Parsons S. P., Harhun M. I., Huizinga J. D. (2010). *Theory and applications of geometric scaling of localized calcium release events*, American Journal of Physiology - Cell Physiology 299 : C1036-C1046.
 51. Pawley J. Pawley J. (Ed.), (2006). *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Verlag.
 52. Picht E., Zima A. V., Blatter L. A., Bers D. M. (2007). *SparkMaster: automated*

- calcium spark analysis with ImageJ*, American journal of physiology. Cell physiology 293 : C1073-C1081.
53. Pratusевич V., Balke C. (1996). *Factors shaping the confocal image of the calcium spark in cardiac muscle cells*, Biophysical journal 71 : 2942-2957.
 54. Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A., Vetterling W. T., (1992). *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press.
 55. Rasband W. (2012). *Image Processing and Analysis in Java*, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA., <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>.
 56. Ríos E., Shirokova N., Kirsch W., Pizarro G., Stern M., Cheng H., Gonzalez A. (2001). *A preferred amplitude of calcium sparks in skeletal muscle*, Biophysical Journal 80 : 169-183.
 57. Rooms F. (2005). *Nonlinear methods in image restoration applied to confocal microscopy*, Ghent University, Belgium.
 58. Ríos E., Brum G. (2002). *Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in skeletal muscle*, Frontiers in bioscience: a journal and virtual library 7 : d1195.
 59. Ríos E., Zhou J., Brum G., Launikonis B., Stern M. (2008). *Calcium-dependent inactivation terminates calcium release in skeletal muscle of amphibians*, The Journal of general physiology 131 : 335-348.
 60. Ríos E., Stern M. D., González A., Pizarro G., Shirokova N. (1999). *Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle*, J Gen Physiol 114 : 31-48.
 61. Schneider C., Rasband W., Eliceiri K. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*, Nature Methods 9 : 671-675.
 62. Schroeder D., (2000). *Astronomical optics*. Academic Press.
 63. Seber G., Wild C., (2003). *Nonlinear regression*. LibreDigital.
 64. Sebillé S., Cantereau A., Vandebrouck C., Balghi H., Constantin B., Raymond G., Cognard C. (2005). *Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series*, Comput Methods Programs Biomed 77 : 57-70.
 65. Shen J.-X., Wang S., Song L.-S., Han T., Cheng H. (2004). *Polymorphism of Ca²⁺ sparks evoked from in-focus Ca²⁺ release units in cardiac myocytes*, Biophysical Journal 86 : 182-190.
 66. Shensa M. (1992). *The discrete wavelet transform: Wedding the a trous and Mallat algorithms*, Signal Processing, IEEE Transactions on 40 : 2464-2482.
 67. Sheppard C., Gan X., Gu M., Roy M. (2006). *Signal-to-Noise Ratio in Confocal Microscopes*. In: Pawley J. (Ed.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
 68. Shirokova N., González A., Kirsch W. G., Ríos E., Pizarro G., Stern M. D., Cheng H. (1999). *Calcium sparks: release packets of uncertain origin and fundamental role*, The Journal of General Physiology 113 : 377-384.
 69. Shirokova N., Niggli E. (2008). *Studies of RyR function in situ*, Methods 46 : 183 - 193.

70. Shirokova N., Ríos E. (1997). *Small event Ca^{2+} release: a probable precursor of Ca^{2+} sparks in frog skeletal muscle.*, Journal of Physiology 502 (Pt 1) : 3-11.
71. Shkryl V. M., Blatter L. A., Ríos E. (2012). *Properties of Ca^{2+} sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle*, The Journal of General Physiology 139 : 189-207.
72. Smith G. D., Keizer J. E., Stern M. D., Lederer W. J., Cheng H. (1998). *A Simple Numerical Model of Calcium Spark Formation and Detection in Cardiac Myocytes*, Biophysical Journal 75 : 15 - 32.
73. Sobie E. A., Dilly K. W., dos Santos Cruz null J., Lederer W. J., Jafri M. S. (2002). *Termination of cardiac Ca^{2+} sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release.*, Biophysical journal 83 : 59-78.
74. Soeller C., Cannell M. (1999). *Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image--processing techniques*, Circulation research 84 : 266.
75. Soeller C., Cannell M. B. (2002). *Estimation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release Flux Underlying Ca^{2+} Sparks*, Biophysical Journal 82 : 2396 - 2414.
76. Soeller C., Jayasinghe I. D., Li P., Holden A. V., Cannell M. B. (2009). *Three-dimensional high-resolution imaging of cardiac proteins to construct models of intracellular Ca^{2+} signalling in rat ventricular myocytes*, Experimental Physiology 94 : 496-508.
77. 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.*, The Journal of physiology 505 (Pt 3) : 665-675.
78. Starck J., Murtagh F., (2002). *Handbook of Astronomical Data Analysis*. Springer-Verlag.
79. Starck J., Murtagh F., (2006). *Astronomical image and data analysis*. Springer.
80. Starck J., Murtagh F., Fadili J., (2010). *Sparse image and signal processing: wavelets, curvelets, morphological diversity*. Cambridge Univ Press.
81. Starck J.-L. (1993). *The à trous algorithm (ESO-MIDAS)*, European Southern Observatory, <http://www.eso.org/sci/software/esomidas/>.
82. Starck J.-L., Bijaoui A., (1998a). *Image Processing and Data Analysis. The Multiscale Approach*. Cambridge University Press.
83. Starck J.-L., Fadili J., Murtagh F. (2007). *The Undecimated Wavelet Decomposition and its Reconstruction*, Image Processing, IEEE Transactions on 16 : 297 –309.
84. Starck J.-L., Murtagh F. (1994). *Image restoration with noise suppression using the wavelet transform*, aap 288 : 342-348.
85. Starck J.-L., Murtagh F. (1998b). *Automatic Noise Estimation from the Multiresolution Support*, The Publications of the Astronomical Society of the Pacific 110 : 193-199.
86. Sun X., Callamaras N., Marchant J., Parker I. (1998). *A continuum of InsP_3 -mediated elementary Ca^{2+} signalling events in *Xenopus* oocytes*, The Journal of physiology 509 : 67.
87. 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.
88. Szentesi P., Szappanos H., Szegedi C., Gönczi M., Jóna I., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2004). *Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle.*, Biophysical journal 86 : 1436-1453.
 89. 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.*, Pflügers Archiv : European journal of physiology 455 : 541-553.
 90. Sztretye M., Deli T., Szentesi P., Szigeti G., Csernoch L. (2007). *Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes*, Journal of Muscle Research and Cell Motility 28 : 421-428.
 91. Sztretye M. T. (2009). *Modulation and alteration of the elementary calcium release events under normal and pathological conditions*, Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen.
 92. Tan W., Fu C., Fu C., Xie W., Cheng H. (2007). *An anomalous subdiffusion model for calcium spark in cardiac myocytes*, Applied Physics Letters 91 : 183 901-183 901.
 93. Theodoridis S., Koutroumbas K., (2009). *Pattern recognition*. Elsevier Inc..
 94. Unser M. (1997). *Ten good reasons for using spline wavelets*, 3169 : 422-431.
 95. Unser M. (1999). *Splines: A perfect fit for signal and image processing*, Signal Processing Magazine, IEEE 16 : 22-38.
 96. Uttenweiler D., Kirsch W. G., Schulzke E., Both M., Fink R. H. A. (2002). *Model-based analysis of elementary Ca(2+) release events in skinned mammalian skeletal muscle fibres.*, Eur Biophys J 31 : 331-340.
 97. Van Kempen G., Van Vliet L., Verveer P., Van Der Voort H. (2003). *A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy*, Journal of Microscopy 185 : 354-365.
 98. Vincent L., Soille P. (1991). *Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations*, IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence 13 : 583-598.
 99. 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.
 100. Wang S. Q., Song L. S., Lakatta E. G., Cheng H. (2001). *Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells.*, Nature 410 : 592-596.
 101. Webb A., (2003). *Introduction to Biological Imaging*. Wiley Interscience.
 102. von Wegner F. (2006). *Elementary Calcium Release Events in Muscle Studied with a New Automated Detection and Analysis Algorithm*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät.

103. 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.
104. von Wegner F., Both M., Fink R. H. A., Friedrich O. (2007). *Fast XYT Imaging of Elementary Calcium Release Events in Muscle With Multifocal Multiphoton Microscopy and Wavelet Denoising and Detection*, IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING 26 : 925-934.
105. Weisstein E. W. (2013). *Correlation Coefficient. From MathWorld. A Wolfram Web Resource*, , <http://mathworld.wolfram.com/CorrelationCoefficient.html>.
106. Wu Q., Merchant F., Castleman K., (2008). *Microscope image processing*. Academic Press.
107. Young I. (1996). *Quantitative microscopy*, Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE 15 : 59 –66.
108. Young I., Gerbrands J., Van Vliet L. (1998). *Fundamentals of image processing*, Delft University of Technology, Netherlands .
109. Zhang B., Fadili J., Starck J. (2008). *Wavelets, ridgelets, and curvelets for Poisson noise removal*, Image Processing, IEEE Transactions on 17 : 1093-1108.
110. Zhou J., Brum G., González A., Launikonis B., Stern M., Ríos E. (2003). *Ca²⁺ Sparks and Embers of Mammalian Muscle. Properties of the Sources*, The Journal of General Physiology 122 : 95-114.
111. Zhou J., Brum G., González A., Launikonis B. S., Stern M. D., Ríos E. (2005). *Concerted vs. Sequential. Two Activation Patterns of Vast Arrays of Intracellular Ca²⁺ Channels in Muscle*, The Journal of General Physiology 126 : 301-309.
112. Zhou Z., Du Y., Rodney G. G., Schneider M. F. (2007). *Ca²⁺ Sparks Detection and Classification using Gaussian-Mexican Hat Wavelet*, 6.
113. Zou H., Lifshitz L. M., Tuft R. A., Fogarty K. E., Singer J. J. (2004). *Using total fluorescence increase (signal mass) to determine the Ca²⁺ current underlying localized Ca²⁺ events.*, J Gen Physiol 124 : 259-272.

Összefoglaló

Háttér

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 térészben történő kalciumkoncentráció változásokat összefoglalóan elemi kalciumfelszabadulási eseményeknek nevezzük, amelyekből léteznek egész sejtre kiterjedő (globális) és csak kis térészben megjelenő (lokális) események.

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 térészből 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.

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, mikroszkóp képek feldolgozását biztosító módszerek, különös tekintettel a fluoreszcens képalkotásra.

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

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.

Célkitűzések

A tézis fontosabb célkitűzései:

- 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 detektálási 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.

Módszerek

A fejezetben a konfokális képalkotás területére jellemző kérdések kerülnek bemutatásra, utána a területre jellemző fontosabb kép és jelfeldolgozási módszerekkel foglalkozom. Ebben a részben mutatom be részletesen a line-scan típusú, tér és idő koordinátájú képek jellegzetességeit, és az elemzésükhöz szükséges előfeldolgozó eljárásokat (normalizálás, zajszűrés).

A tézis egyik fontos témája a line-scan képeken való eseménydetektálás, bemutatásra kerülnek az irodalomba fellelhető fontosabb detektáló módszerek.

A képeken található háttérzaj kezelése centrális kérdés, így foglalkozom a zajszűrés lehetőségeivel is.

A kalcium eseményekhez kötött biofizikai paraméterek számítása ugyancsak megoldandó gyakorlati célkitűzés, így itt mutatom be a tudományos közösség által általánosan elfogadott módszereket kalcium spark eseményekre.

A dolgozatban alkalmazott algoritmusok egy csoportja diszkrét wavelet transzformációra épül, így a módszertani részben az alkalmazott transzformáció is bemutatásra kerül. A transzformációt Starck és Murtagh alkalmazta először csillagászati képek elemzésére (Starck és mtsai. 1998a), illetve von Wegner és mtsai. (2006) konfokális képekre. Az transzformáció egyik 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).

Eredmények

Ebben a fejezetben négy pontban mutatom be az elért eredményeket, és ezzel támasztom alá a célkitűzésben felsorolt célokat.

Az első részben bemutatom a klasszikus, úgynevezett kettős küszöbölő detektáló módszer alkalmazásával elért eredményeket, ezt munkám első időszakában használtam. A képek előfeldolgozására egy fotókorrekciós eljárást fejlesztettem, ezt is ebben a részben mutatom be előfeldolgozó eljárásként.

A fejezet második részében a sparkok biofizikai paraméterszámításával kapcsolatos megoldásokat ismertetem. Ugyanitt mutatok be egy új módszer kalcium „ember” (parázs) típusú események paraméterszámítására.

A fejezet harmadik részében az *à trous* wavelet alapú zajsűrés és detektálás saját implementációját mutatom be egy és kétdimenziós esetekre. Foglalkozom egy előszűrési eljárással is (tűskeszűrés, amelyet szintén az *à trous* waveletre építék). A Továbbiakban az egy dimenziós detektáló algoritmus használatának lehetőségével kalcium „ember” események esetében, mivel ez az eljárás jobb eredményeket ad nem izotróp kiterjedésű események esetében. Itt megadok egy eljárást „ember” típusú események detektálására.

Végül a negyedik részben a wavelet alapú detektálás megbízhatóságát, illetve szenzitivitását elemzem egy, a klasszikus módszerrel összehasonlító mérés sorozatban. A mérésben elvégzett tesztek szimulált képeken végeztem, itt mind a háttérzaj, mind pedig az események szimulálására saját módszereket is alkalmaztam (háttérzaj generálása kísérleti képek felhasználásával, esemény szimuláció). A fejezetben konkrét detektálási és zajsűrés paraméter értékekre adok meg megbízhatóság és szenzitivitást jellemző valószínűségeket. Ezek alátámasztják az a feltevést, hogy a wavelet módszer megbízhatóbb és nagyobb szenzitivitást mutat kalcium sparkok esetében. A wavelet módszert teszteltem egy tűskeszűrő előfeldolgozás esetére is, amely növeli a módszer megbízhatóságát jelentős szenzitivitás veszteség nélkül. A mérések figyelembe vételével a detektálási és

zajszűrési algoritmusok paramétereinek választása lényegesen egyszerűbbé válik gyakorlati kísérletek kiértékelésében.

Diszkusszió

A tézis befejező fejezetében tárgyalom a módszerek Élettani Intézetben történő kutatásokban való alkalmazása folyamán felmerült kérdéseket.

Ugyanitt mutatom be a módszerek alkalmazásának lehetőségét nagy frekvenciás line-scan képekre is. Ezeken a képeken a spakok más alakzatban jelennek meg a nagyobb sebességű pásztázás miatt, így a nem izotróp formációkat az egy dimenziós à trous transzformációra épülő módszerekkel lehet detektálni. Ugyanitt adok meg egy paraméterszámítási eljárást nagyfrekvenciás képeken regisztrált sparkokra.

A kutatás folyamán megvalósított eredmények összefoglalója megtalálható a Tézisfüzetben.

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. Következményeként a fontosabb eljárások egy-egy függvénycsomag részeként felhasználhatóak új feldolgozások gyors előállítására.

A módszereket több kutatás keretén belül használtuk az Élettani Intézetében, amint a „A kiértékelési módszerek használata kísérletekben” című szakaszban megadott publikációk tükrözik.

Summary (angol összefoglaló)

Background

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.

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 the detected events.

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.

Goals

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.

Methods

First the confocal imaging methods related to the thesis are mentioned, next the most used image and signal processing methods are presented. Properties of line scan (main image type used in this thesis, coordinates in space and time) images are presented also in this chapter with the most important image preprocessing methods (normalization, photobleaching correction).

Elementary calcium event detection on confocal images is one of the main topics of the thesis, in consequence the known signal and image processing methods to achieve this goal are presented.

Noise handling is a central task when working with line-scan images, so filtering methods are discussed.

Calculation of elementary calcium release events characterizing biophysical parameters represents also a practical task of the research, correspondingly the established methods used by the scientific community are enumerated for calcium sparks.

A part of the algorithms used in the thesis are built on a discrete wavelet transform, so in addition the Methods chapter presents the *à trous* or stationary wavelet transform. Previously the transform was first used for image processing by Starck and Mourtagh (1998) in astronomy and von Wegner et al. (2006) for confocal images. As wavelet function the wavelet based in the cubic B-spline was used, notably for the excellent properties in medical and biological image processing (compact support, simple and fast implementation, symmetric scaling and wavelet function, optimal time-frequency localizing properties).

Results

In this chapter four areas are covered in order to support the goals of the thesis.

The first part covers results obtained during the beginning period of the research

work by using the classical double threshold algorithm. A photobleaching correction algorithm implementation is presented here also as a preprocessing solution for line scans.

Secondly methods for spark parameter calculations are discussed. Afterwards a new method of parameter calculation for elementary calcium release event of type calcium „ember” is presented.

Third part of the Results chapter presents the applied implementation of the *à trous* algorithm in one and two dimensions, used for noise filtering and event detection. A new spike filter built upon the first two, high frequency component wavelet levels is presented. Next the detection of non isotropic events by the one dimensional transform is discussed and an algorithm to detect calcium „ember” events is presented.

Finally, the fourth area evaluates the reliability and sensitivity of the *à trous* wavelet based detection in measurements comparing it to the classical solution. Results of tests performed on simulated images are evaluated. As for creating simulated images a method based on experimental images is also presented (outside methods of generating noise with a known distribution) moreover, methods of creating simulated events are discussed. Probabilities characterizing positive predictive value (PPV) and sensitivity (S) are given for selected parameter values and amplitude of calcium spark events (in relative fluorescence units). We conclude, that wavelet based detection is characterized by better PPV and S values on calcium spark events containing line scans. The wavelet detection method is evaluated in case of prefiltering for spikes also, and achieves better reliability without significant sensitivity loss. Based on the conducted tests, parameter selection for noise filtering and detection algorithms in experiment analysis is straightforward.

Discussion

Eventually this chapter discusses some aspects revealed by applying the methods in calcium release event experiments at the Department of Physiology.

The chapter also presents the analysis of high frequency line-scans by the presented methods. On high frequency line-scans (scanning period around 50 $\mu\text{s}/\text{line}$) calcium sparks appear with a different shape compared to classical line scans (scanning period around 1 ms/line). A method based on the one dimensional *à trous* transform considering detection of this non isotropic shaped events is presented. Next parameter calculation for high frequency line-scans is discussed, and the calculation of a new parameter characterizing calcium release is mentioned (slope of signal mass).

Results of the research are summarised in the Thesis document.

To solve the practical tasks related to data analysis we used the MATLAB (*The*

Summary (angol összefoglaló)

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 methods were implemented.

The methods were used during various research projects at Department of Physiology, Research Centre for Molecular Medicine, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen (Szigeti et al. 2007; Lukács et al. 2008; Almássy et al. 2008; Fodor et al. 2008; Szabó et al. 2010; Vincze et al. 2012).

Függelékek

A. A felhasznált konfokális mérések adatai

LSM510 és LSM510 META mérések

Az LSM510 mikroszkóp a méréseket egy szoftver segítségével írja ki a mikroszkóp számítógépének merevlemezére. Egy kísérlet méréseit külön könyvtárba menti, az ott található adatok összesítésére egy Microsoft Access formátumú adatbázist hoz létre (ezt egy .mdb típusú fájlban található). Ebben tárolja a mérési paramétereket, valamint a konkrét mérési adatokra vonatkozó referenciákat. A mérési adatok külön fájlokban találhatóak, ugyanabban a könyvtárban vagy alkönyvtárban, a fájlok típusa egy saját formátumú TIF típusú fájl, ezek állomány név kiterjesztése LSM. Az adatbázis, illetve az LSM típusú fájlok tartalmának részletes leírását a Zeiss cég által kiadott leírások tartalmazzák, információforrásunk a File Formats LSM 510/LSM 5 PASCAL Release 3.2, 2003-ban kiadott technikai leírás volt (Carl Zeiss Jena 2003). Az egyes LSM adatfájlok tartalmazzák a konkrét mérésre vonatkozó paramétereket TIFF címkék (*tag*) formájában, ezek Zeiss specifikusak. Az adatbázis 10 táblában tárolja a mikroszkóp beállításainak, valamint a méréseknek az adatait.

Az általunk használt LSM *line-scan* mérések a mérés ScanMode TIFF paramétere után azonosíthatóak (értéke 'line'). Legtöbb mérésünk 1024×512 képpontból áll (idő és tér koordináták), de használtunk 2048 vagy 4096 képpontos méréseket az idő dimenzióban. A leggyakoribb beállításokat az A.1 táblázat tartalmazza – egyes méréseknél változnak a paraméterek, azokat a megfelelő TIFF címkékből ki lehet olvasni.

Az A.1 táblázat a mérések feldolgozás szempontjából legfontosabb adatait tartalmazza, a rögzített paraméterek száma nagy, ezek a TIFF címkéken keresztül kiolvashatóak. A TIFF állományok belső kódolása 12 bites mintavételezés után 16 bites egész számmal történik pixelenként, ezek kódolják a detektor által mért foton számokat (nyers mért adat).

LSM LIVE mérések

Az elemzett LSM 5 LIVE mérések esetében a pásztázási periódus 0.05 ms, ez azt jelenti, hogy 1000-1500 ms átfogásához (sparkok esetében ennyi szükséges az események megfigyeléséhez) több tízezer térbeli sor rögzítésére van szükség. A fenti példában ez a szám 30000, ami 30000×512 képpontból álló képet eredményez, de nem ritka a 60000 vagy 80000 sort rögzítő mérés sem.

TIFF címke	LSM 510 META érték	LSM 5 LIVE érték	Megjegyzés
ScanType	line	line	pásztázás típusa
DimensionX	512	512	méret pixelben
DimensionTime	1024	30000	méret pixelben
TimeInterval	1.54	0.05	pásztázási periódus miliszekundumban
ENTRY_OBJECTIVE	C- Apochromat 63x/1.2 W cor	C- Apochromat 63x/1.2 W cor	tárgylencse típusa
SAMPLE_SPACING	0.139509	0.207	pixelek közti távolság az X irányban mikrométerben
LASER_NAME	Argon		a használt lézer neve
PIXEL_TIME	1.3	1.1	az egy pixelre szánt idő mikroszekundomban, az integrálási idő $0.7 * \text{PIXEL_TIME}$
BITS_PER_SAMPLE	12	12	hány biten történik a mintavételezés
PINHOLE_DIAMETER	160	16.6	a pinhole átmérője mikrométerben

A.1 táblázat. LSM 510 META és LSM 5 LIVE line-scan mérések adatai

Minkét műszer esetében a fenti adatok általánosan jellemző adatok. A munkánk folyamán használt konkrét mérések jellemzői megtalálhatóak a következő alfejezetben.

Tesztekben és példákban használt mérések

A TPEN-el végzett kísérletek leírása megtalálható a következő publikációban: Sztretye (2009) 37, 46, 66-73 oldal, Sztretye és mtsai. (2007).

A Maurokalcin-al (MCA) végzett kísérletek leírása megtalálható a következő publikációban: (Lukács és mtsai. 2008; Lukács és mtsai. 2008).

Az ábrák elkészítésénél az Élettani Intézetben készített képeket használtam, ezeket az alábbi fájl nevek szerint lehet visszakeresni:

060 209b31 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, 50nM MCA₈, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

060 130b07 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, glutamát, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

060 130b21 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, 50 nM MCA, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

060 202a41 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, 100 nM MCAWT, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

060 130b06 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, glutamát, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

060 130a LSM 510 META, line-scan, sorozat, 1.54 msec x 0.1395 μ m, kontroll+50nm Mca

060 131a LSM 510 META, line-scan, sorozat, 1.54 msec x 0.1395 μ m, kontroll

06 214a LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, 100nM MCA₈, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

20 120 123_19 LSM 510 META, line-scan, 1.0 msec x 0.328 μ m, egér, Objektív EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M2, Lézer Diode 488-10, Pinhole 27.6 μ m, Zoom 1.

051 215b02 LSM 510 META, x-y-z scan, első frame, 983 msec-frame, x-y: 0.279 μ m x 0.279 μ m, béka, alacsony Mg (4mM), Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, ZoomX 1, ZoomY 1, Gain 1, Lézer erősség 7.5

051 215b20 META, line-scan, 1.54 msec x 0.14 μ m, béka, alacsony Mg (4mM), Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1, Lézer erősség 7.5, Pinhole: 16.6 μ m, Zoom: 1

060 130a07 LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μ m, béka, kontroll, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μ m, Zoom 2, Gain 1.

04 060 625 LSM Live, line-scan, 0.05 ms x 0.207 μ m, béka - koffeinnel kezelt (1mM/l), teljes méret: 30 000×512, Objektív: C-Apochromat 63x/1.2 W cor, Lézer: Diode 488-10.

061128b LSM 510 META, line-scan, 1.54 msec x 0.1395 μm , béka, Objektív C-Apochromat 63x/1.2 W, Lézer Argon, Pinhole 160 μm , Zoom 1.

Tesztekben és példákban használt események

060130b07_9 Béka, glutamat, kontroll

Image: 060130b07, detection: Traditional, spark no: 9, Area in pixels $t_{\min}=217$, $t_{\max}=254$, $x_{\min}=144$, $x_{\max}=179$, $\text{Ampl}=3.262 \Delta F/F_0$, $\text{FWHM}=2.156 \mu\text{m}$, $\text{FTHM}=13.88 \text{ ms}$, Duration: 38.50, Rise Time: 7.31

060130b21_6 Béka, 50 nM maurokalcin

Image: 060130b21, detection: Wavelet 1D, ember no: 6, Area in pixels $t_{\min}=75$, $t_{\max}=638$, $x_{\min}=408$, $x_{\max}=457$, Average $\text{Ampl}=0.15 \Delta F/F_0$, $\text{FWHM}=2.27 \mu\text{m}$, Duration: 748 ms

060202a41_18 Béka, 100 nM maurokalcin

Image: 060202a41, detection: Wavelet 1D, ember no: 17, Area in pixels $t_{\min}=228$, $t_{\max}=797$, $x_{\min}=367$, $x_{\max}=417$, Average $\text{Ampl}=0.214 \Delta F/F_0$, $\text{FWHM}=2.54 \mu\text{m}$, Duration: 650 ms

060130b06_5 Béka

Image: 060130b06, detection: Wavelets, spark no: 5, Area in pixels $t_{\min}=863$, $t_{\max}=883$, $x_{\min}=52$, $x_{\max}=75$, $\text{Ampl}=3.556 \Delta F/F_0$, $\text{FWHM}=2.427 \mu\text{m}$, $\text{FTHM}=11.20 \text{ ms}$, Duration: 16.94, Rise Time: 5.30

06214a_2 (spark) és 06214a_7 (ember) Spark paraméterei: detection: Wavelets, spark no: 2, Area in pixels $t_{\min}=35$, $t_{\max}=53$, $x_{\min}=189$, $x_{\max}=203$, $\text{Ampl}=1.502 \text{ dF/F}$, $\text{FWHM}=1.472 \mu\text{m}$, $\text{FTHM}=11.94 \text{ ms}$, Duration: 13.86, Rise Time: 3.17 2; Ember paraméterei: Av. Amp. $0.367 \Delta F/F_0$, $\text{FWHM}=2.36 \mu\text{m}$, Duration 775 ms.

060131a02_09

Image: 060131a02, detection: Wavelets, spark no: 9, Area in pixels $t_{\min}=489$, $t_{\max}=509$, $x_{\min}=265$, $x_{\max}=284$, $\text{Ampl}=4.538 \text{ dF/F}$, $\text{FWHM}=2.019 \mu\text{m}$, $\text{FTHM}=13.37 \text{ ms}$, Duration: 16.94, Rise Time: 6.65

04060625_35, detection: Wavelets, spark no: 35, Area in pixels $t_{\min}=790$, $t_{\max}=1234$, $x_{\min}=401$, $x_{\max}=419$, $\text{Ampl}=0.554 \text{ dF/F}$, $\text{FWHM}=2.008 \mu\text{m}$, $\text{FTHM}=11.40 \text{ ms}$, Duration: 20.80, Rise Time: 5.15

B. Grafikus interfésszel rendelkező alkalmazások, függvénycsomagok

A programok és függvénycsomagok MATLAB környezet (MATLAB, The MathWorks,

Inc., Natick, Massachusetts, United States) alatt készültek. Az algoritmusok egy részét átírtam C nyelvre is, ezek MEX fájlként futtathatóak MATLAB alatt. A két függvény csomag készült:

- LSM: az LSM 510 META által készített képek elemzését biztosító, grafikus felhasználói felülettel rendelkező csomag.
- LIVE: az LSM 510 META és LSM LIVE által készített nagy méretű képek elemzését is biztosító, grafikus felhasználói felülettel rendelkező csomag (gyakorlatilag bármilyen Zeiss készülékkel előállított line-scan kép elemzésére alkalmas, és kiterjeszthető XY vagy más képek elemzésére). Ebből a csomagból több detektáló algoritmus, illetve azok kombinációit lehet használni, újakat lehet beilleszteni. A csomag beépített szűrőket és a morfológiai paraméterek empirikus eloszlásának vizsgálatát is tartalmazza. Az egyedi algoritmusok és számítások külön használhatóak, amennyiben más típusú elemzést kell végezni mint az eddigiek. Az összeállított elemzési láncokat a LIVE interfész alatt lehet használni minimális programozási munkával.

Az LSM grafikus felület

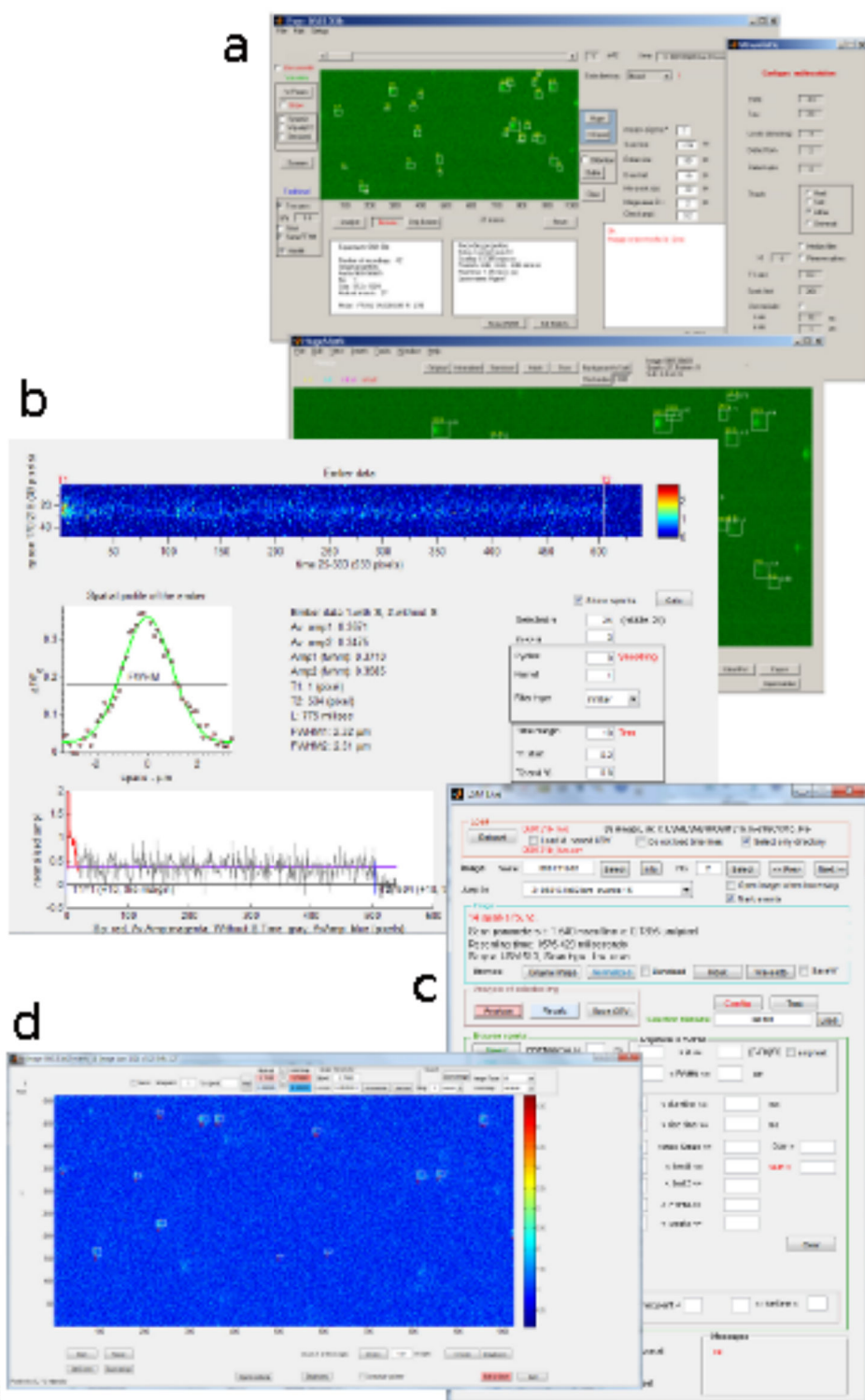
A LSM 510 META mikroszkóppal készült képek elemzéséhez egy grafikus felület készült ami megkönnyíti a képek kezelését elemzés alatt és interaktív kézi kiértékelési lehetőségeket is biztosít.

LIVE grafikus felület

Az LSM LIVE típusú mikroszkóp nagy méretű képeihez fejlesztett interfész bármilyen LSM line-scan-t tud elemezni. A feldolgozási lánc konfigurálható, a függvény könyvtár használatával.

A grafikus felületek egy része az alábbi ábrán látható.

- a. LSM felület részlete
- b. „Ember” típusú események elemzése
- c. LIVE felület indítóablaka
- d. LIVE felület megjelenítő ablaka



C. Mesterséges sparkok előállítása szimulációval

Az elemi kalciumfelszabadulási események szimulációját egy diffúzió-reakció szimulációt végrehajtó programmal végeztem, ez Douglas-Gunn (Morton és mtsai. 2006) véges differencia módszerrel oldja meg a 3 dimenziós diffúzió-reakció egyenletrendszer (1.1, 1.2, 1.3 -nak megfelelő egyenleteket), tetszőleges számú Ca^{2+} pufferral.

A szimulált spark előállítása a következő paraméterekkel történt (D-diffúziós állandó $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, Kplus, Kminus asszociációs, illetve disszociációs reakció sebesség állandói, T teljes koncentráció μM -ban): a tér kiterjedése $8.78 \mu\text{m}$ oldalú kocka; 63 rácspont egy élen, kalcium forrás: 2 pA, 1.2 ms időtartamig, egy lépés időtartama 0.01 ms; kalcium pufferek: fluo-3 (D 0.02, Kplus 0.23, Kminus 0.17, T 100), troponin (D 0.0, Kplus 0.057, Kminus 0.0114, T 240), parvalbumin (D 0.026, Kplus 0.125, Kminus 0.0005, T 1000). A kalcium paraméterei D 0.35, háttér koncentráció $0.1 \mu\text{M}$.

A szimulációs teret egy egyenes mentén pásztázva szimulált line-scan állítható elő (az egyenes távolsága a forrástól $0.278 \mu\text{m}$). A tér koncentráció értékeket tartalmazó pontjain a mikroszkóp pont kiterjedési függvényét szimulálva egy 3 dimenziós Gauss függvénnyel végrehajtott konvolúció futott le (a szórás x, y irányban 0.5 , z irányban $0.9 \mu\text{m}$). Egy szimulált line-scan és spark az 1.3 ábrán látható, ez a CaFluo koncentráció (1.4 egyenlet) konvolúció által módosított értékeit tartalmazza.

Az egyenletet megoldó program FORTRAN 90-ben készült és Linux disztribúciókon fut.

D. Publikációk jegyzéke

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., Lukacs 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 Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} 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, **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.

Poszterek

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, Philadeplhia.

Oktatással kapcsolatos publikációk és tananyagok

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 informatikusképzésben, Informatika a felsőoktatásban Konferencia, Debrecen, 2008. augusztus 27-29, ISBN 978-963-473-120-0

E. Köszönetnyilvánítások

Köszönöm elsősorban témavezetőimnek Pethő Attilának és Csernoch Lászlónak a munka folyamán nyújtott segítséget, tanácsokat, illetve a lehetőséget, hogy ezen a tézisen és a hozzá kötődő kutatáson dolgozhattam.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet munkatársainak. Elsősorban Szentesi Péternek a munka során folytatott beszélgetésekért, türelméért, valamint Dienes Beatrixnak, Sztretye Mónikának a kísérletek kiértékelése folyamán nyújtott segítségért.

Köszönöm Vincze János PhD hallgatónak (DE), akivel több témán dolgoztunk együtt a közös munka lehetőségét, ötletek megbeszélését.

Köszönöm munkahelyi kollégáimnak az utóbbi évek alatt tanúsított türelmét és megértését.

Köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek a több éves munka folyamán nyújtott biztatást, türelmet.