

TDK pályamunka

Kétdimenziós kalciumjel-sorozatok teljes körű automatikus elemzésére szolgáló algoritmusok fejlesztése

Készítette:

Vincze János

DE IK programtervező informatikus BSc III. évf.
DE ÁOK általános orvos V. évf.

Témavezetők:

Dr. Fazekas Gábor
egyetemi docens

Dr. Csernoch László
egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
INFORMATIKAI KAR
INFORMÁCIÓ TECHNOLÓGIAI TANSZÉK

2012.

Tartalomjegyzék

ÖSSZEFOGLALÓ	2
BEVEZETÉS	3
Az egyes mérési technikák biológiai jelentősége	3
Sejttípusok azonosítása neurális túlélőszelet felvételeken	3
Elemi kalciumfelszabadulási események vázizomban	5
Hámsejtek spontán aktivitásának vizsgálata	6
A KÉTDIMENZIÓS KALCIUMJEL-SOROZATOK ELEMZÉSÉRE ALKALMAZOTT	
MÓDSZEREK	7
Általános leírás	7
Wavelet-alapú jelelemzés	7
SEJTTÍPUSOK AZONOSÍTÁSA NEURÁLIS TÚLÉLŐSZELET FELVÉTELEKEN	10
Célkitűzés	10
Módszerek	10
Alkalmazott mérőmódszer	10
Az elemzéshez használt algoritmus	10
Eredmények	13
ELEMI KALCIUMFELSZABADULÁSI ESEMÉNYEK VÁZIZOMBAN	14
Célkitűzés	14
Módszerek	14
Alkalmazott mérőmódszer	14
Az elemzéshez használt algoritmus	15
Eredmények	17
HÁMSEJTEK SPONTÁN AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	18
Célkitűzés	18
Módszerek	18
Alkalmazott mérőmódszer	18
Az elemzéshez használt algoritmus	18
Eredmények	19
DISZKUSSZIÓ	20
A MUNKÁHOZ NYÚJTOTT SAJÁT HOZZÁJÁRULÁS	21
IRODALOMJEGYZÉK	22
FÜGGELÉK	23

Összefoglaló

Számos, az élő szervezetekben végbemenő folyamat szabályozásában fontos szerepet töltenek be a kalciumionok. Ezen ionok koncentrációját valós időben meg lehet határozni olyan kalciumkötő fluoreszcens festékek segítségével, melyek kvantumhatásfoka a kalciumkötéstől függően változik, így a kapott fluoreszcenciaintenzitás arányos a kalciumkoncentrációval. A modern képalkotó eljárások segítségével nagy idő- és térbeli felbontású felvételek készíthetők, melyek feldolgozása számítógépes módszereket igényel.

Dolgozatomban három kutatási területhez kapcsolódóan készített kalciumjel-sorozatok elemzését mutatom be. Mindhárom esetben közös, hogy térben kétdimenziós, idősoros felvételek elemzése történik

Az első általam fejlesztett algoritmus alkalmazására az idegélettan területén került sor. Itt egy egyszerre sok sejtet tartalmazó agyszelet vizsgálata történik, ahol a feladatot az aktivitást mutató sejtek azonosítása és az aktivitás alapján a sejtípus azonosítása jelenti. Az aktivitást mutató területek (ROI, Region Of Interest) azonosítására az egyes képpontokhoz tartozó idősoros adatokat használtam a dolgozatban részletezett kettős küszöböléses technikát alkalmazva. Ennek segítségével a ROI-k azonosítása 90% feletti pontossággal történhet. Az egyes ROI-k tipizálására egy neurális hálózatot tanítottam be, mely hálózat 98%-os pontossággal azonosította be a sejtípusokat mindössze az aktivitásuk alapján.

A második algoritmus a vázizomban megfigyelhető elemi kalciumfelszabadulási eseményekről készült nagysebességű konfokális mikroszkópos felvételek elemzéséhez került kifejlesztésre. Ezen algoritmus is először az egyes ROI-kat azonosítja, majd meghatározza az ezeket jellemző paramétereket. Fontos elem a sejtstruktúra pontos meghatározása és a ROI-k térbeli kiterjedésének a struktúrához képesti meghatározása. Ez esetben is 90% feletti pontossággal történt az egyes kalcium-események azonosítása,

A harmadik algoritmust a bizonyos körülmények között spontán kalciumfelszabadulási eseményeket mutató hámsejtek azonosítására fejlesztettem ki. Itt a felvételeken az egyes sejtek azonosítása kézzel történt, ám az események megtalálása csak automatizált módszerrel volt kellőképpen pontos.

Bevezetés

Az alábbiakban először röviden bemutatom az általam fejlesztett szoftverek három alkalmazási területét, a mögöttük álló biológiai hátteret. Ezt követően röviden bemutatom azon pontokat, melyek az egyes területeken alkalmazott algoritmusokban közösek. A dolgozat következő részében részletezem az egyes problémakörök esetén elérni kívánt célt, a felvételek készítésére használt mérőrendszereket, az általam fejlesztett szoftvereket, valamint az ezekkel elért eredményeket. A záró szakaszban összefoglalom az elért eredményeket és kitekintést adok a jövőre vonatkozóan.

Az egyes mérési technikák biológiai jelentősége

Mindhárom, általam kutatott területben közös, hogy kétdimenziós kalciumjel-sorozatok kerülnek felvételre valamilyen mérőrendszerrel, a cél pedig ezen képeken az aktivitást (kalciumkoncentráció-változást) mutató területek azonosítása és jellemzése. A kalciumkoncentráció változását fluoreszcens kalciumkötő festékek segítségével mérhetjük, melyek kvantumhatásfoka megnő a kalciumkötés hatására. A kalciumkoncentráció növekedésével a festékmolekulák egyre nagyobb részéhez kapcsolódik kalciumion, így a fluoreszcencia egyre magasabb lesz. A módszer külön – nehezen kivitelezhető – kalibráció nélkül nem alkalmas az abszolút kalciumkoncentráció meghatározására, de a kalciumkoncentráció idő- és térbeli változása kiválóan felmérhető segítségével.

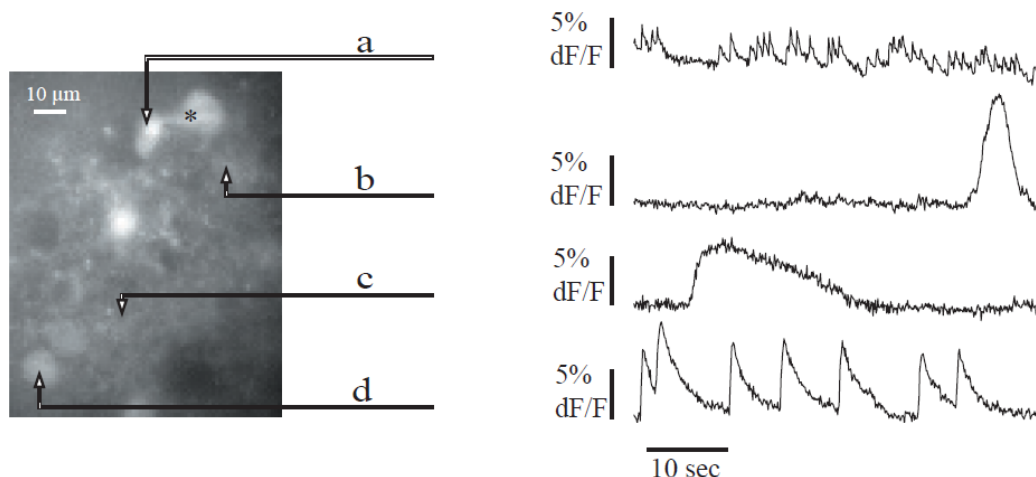
További közös pont mindhárom esetben, hogy az alkalmazott képalkotó eszköz látóterének megfelelő, számos sejtet vagy egy nagyméretű sejt jelentős felületét tartalmazó kétdimenziós felvételek kerülnek rögzítésre bizonyos, a rendszer sajátosságai által meghatározott időközönként. Ez lehetővé teszi a kalciumkoncentráció időbeli változásának meghatározását, melyet szükséges helyileg is lokalizálni a kétdimenziós felvételeken.

Sejttípusok azonosítása neurális túlélőszelet felvételeken

Neurális túlélőszelet felvételek segítségével egy-egy agyterület működése vizsgálható az *in vivo* (élőben tapasztalható) körülményekhez hasonló körülmények között. A szeleten belül található egyes sejtek a mérés ideje alatt élnek és a normálisnak megfelelően működnek. Bár a szeleten kívüli kapcsolatok fizikailag mindenképpen megszakításra kerülnek, a szeleten belüli kapcsolatok szükség esetén megtarthatóak.

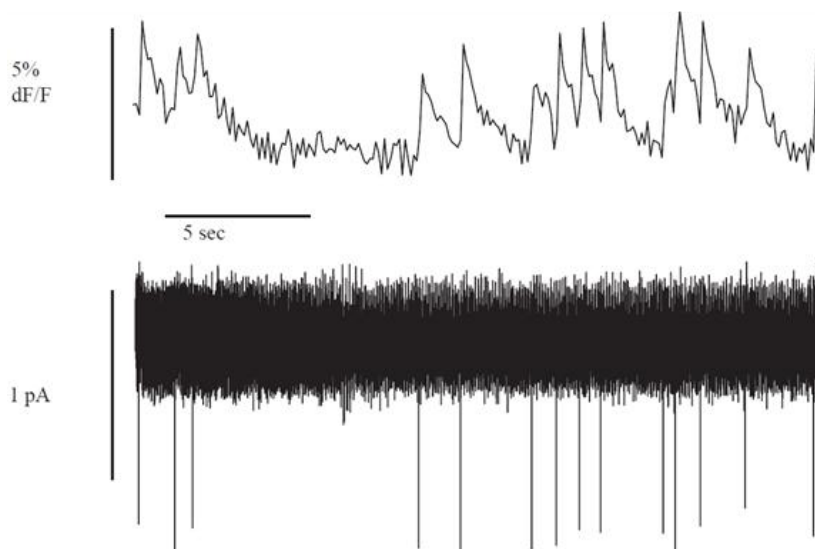
Az egyes szeletekben alapvetően kétféle sejttípus található: az idegi működést mutató *neuronok* és a nélkülözhetetlen kiegészítő funkciókat ellátó *glia* sejtek. Mindkét sejttípus aktív-

lódása során a sejten belüli, intracelluláris kalciumkoncentráció időlegesen megnő. A neuronok aktiválódása elsősorban a más sejtektől származó ingerületek hatására létrejövő akciós potenciálok nyomán, igen gyors kinetikával történik. A gliasejtek aktiválódása ezzel szemben az akciós potenciáloktól függetlenül, alapvetően lassabb lefolyással történik.



1. ábra: Tipikus akciós potenciálhoz kötött (neuronális) és akciós potenciálhoz nem kötött (gliális) kalciumjelek. Az *a* és *d* jel neuronális, a *b* és *c* jel gliális jel. A bemutatott jelek az ideális esetet mutatják, melyhez képest a gyakorlatban jóval kevésbé elkülönülő jelek fordulnak elő.

Az egyes jelek akciós potenciálhoz kötött volta pontosan ellenőrizhető a kalciummérés közben kivitelezett ún. *patch clamp* mérés segítségével, amikor is a vizsgálni kívánt sejtbe egy elektródás helyezünk, majd pedig ezen keresztül rögzítjük a sejt membránpotenciáljának időbeli változását. Ezen technika legfőbb hátránya, hogy a kalciumméréssel ellentétben egyszerre mindössze egy sejt vizsgálható. Nagy jelentőséggel bírt egy olyan algoritmus kifejlesztése, amely képes automatikusan és megbízhatóan eldönteni párhuzamos *patch clamp* mérés nélkül egy adott kalciumjelről, hogy akciós potenciálhoz kapcsolódóan jelent-e meg.

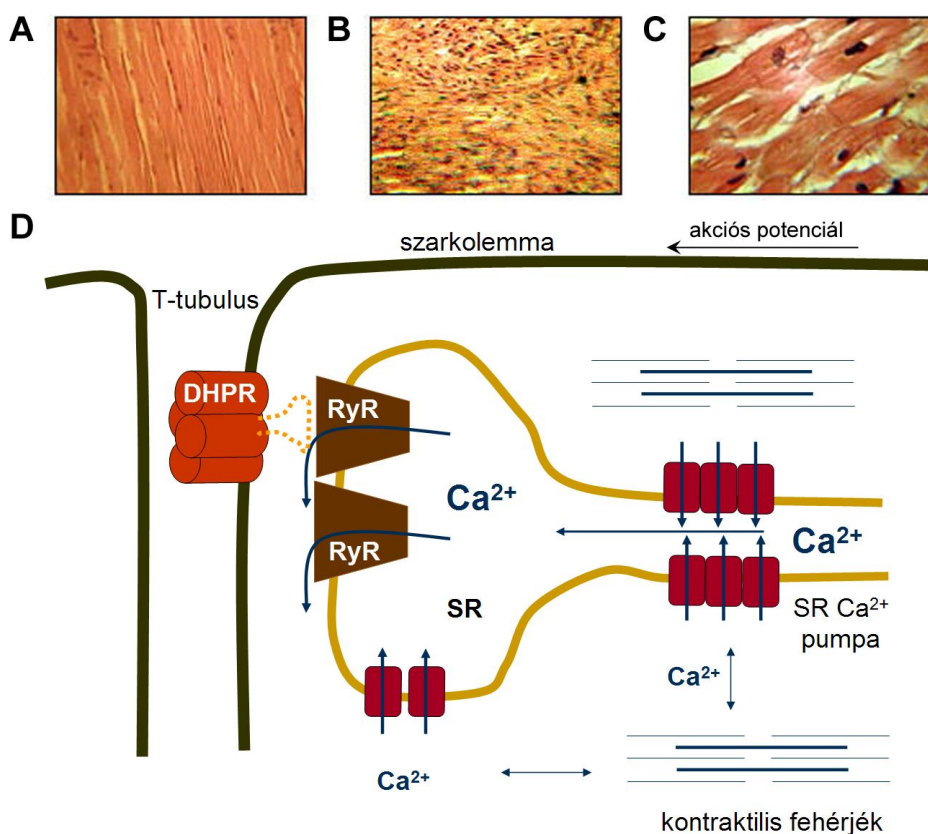


2. ábra: Párhuzamos kalciummérés (felül) és patch clamp mérés (alól). Jól megfigyelhető, hogy minden egyes kalciumjelet egy akciós potenciálnak megfelelő áramtüske előz meg.

Elemi kalciumfelszabadulási események vázizomban

A vázizom az emberi test mozgásáért felelős szövettípus. Az egyes izmokat alkotó izomsejtek az adott izom teljes hosszán, akár több tíz centiméteren keresztül végigfutnak. A vázizom a harántcsíkolt izmok közé tartozik, mivel a sejtek hosszában ismétlődő szerkezeti és funkcionális egységekből, ún. szarkomerekből állnak, melyek mikroszkópban jellegzetes haránt irányú csíkolat formájában jelennek meg.

A vázizom összehúzódásában alapvető szerepet töltenek be a kalciumionok. A sejt belsejében található kalciumraktárakból, az ún. szarkoplazmatikus retikulumból a kalciumionok a kívülről érkező akciós potenciál hatására megnyíló rianodinreceptorokon (RyR) keresztül áramlanak ki. Bizonyos körülmények között ezek a csatornák külső inger nélkül is megnyílnak (Cheng, 1993). Ezen megnyílések nem terjednek ki a sejt egészére és így nem okozzák a sejt összehúzódását, viszont időegység alatt nagy számban fordulnak elő. Ezeket a megnyíléseket, illetve az általuk okozott kalciumfelszabadulást elemi kalciumfelszabadulási eseménynek nevezzük.



3. ábra: Az izomtípusok és az elektromechanikai kapcsolat vázizomban. **A:** A vázizom képe szövettani metszetben. **B:** A simaizom képe szövettani metszetben. **C:** A szívizom képe szövettani metszetben. **D:** Az összehúzódást irányító elektromechanikai kapcsolat elemei vázizomban.

Ezen események pontos szerepe az izomműködésben máig nem tisztázott, azonban ismert, hogy számos kóros állapotban megváltozik – általában megnő – a frekvenciájuk és megváltoznak a tulajdonságai (Zucchi, 1997). Az események pontos jellemzése közelebb vihet az események jelentőségének megismeréséhez.

Hámsejtek spontán aktivitásának vizsgálata

Tradicionálisan a hámsejteket statikus, nem ingerlékeny sejteknek tartották, melyek funkciója kimerül a kültakaró alkotásában.

Az elmúlt években számos kutatás foglalkozott a fejlődő hámsejtek vizsgálatával. Egyetemükön kimutatásra került, hogy a hámsejtek fejlődésében nagyon fontos szerepet játszik a kalciumion-koncentráció változása. A hámsejtek nem csak külső ingerek hatására, hanem spontán is változtatják a kalciumszintjüket.

Problémát jelent, hogy a mikroszkópiával általánosan vizsgált folyamatokhoz képest ezen folyamatok lefolyása sokkal lassabb, az egyes mérések összes időtartama tízperces nagyságrendű. Ezen idő alatt a mikroszkóp fókuszsíkjának helyzete a rendszer hibája miatt nem állandó. A fókuszsíkba be- ill. onnan kikerülő sejtalkotók olyan fluoreszcencia-változást okozhatnak, melyek összetéveszthetők a sejtek spontán aktivitásával. Fontos volt egy olyan algoritmus kifejlesztése, ami a kétféle okból bekövetkező kalciumszint-változást automatizáltan és következetes feltételrendszer alapján elkülöníti.

A kétdimenziós kalciumjel-sorozatok elemzésére alkalmazott módszerek

Általános leírás

Mindhárom esetben egy közös sémára épül az alkalmazott elemzés:

1. A képeken található műtermékek eltávolítása
2. Az aktivitást mutató területek (Region of Interest, ROI) azonosítása
3. A ROI-kon belül az aktivitást jellemző időbeli szakaszok meghatározása
4. Az egyes események paramétereinek meghatározása

A neurális túlélőszület felvételek és az elemi kalciumfelszabadulási eseményekről készített felvételek esetében mind a négy pont elvégzésére teljesen automatizált algoritmust fejlesztettem ki. A hámszövegről készült felvételek esetén a ROI-k azonosítása kézzel történt, ám az összes többi lépés itt is automatikusan történt.

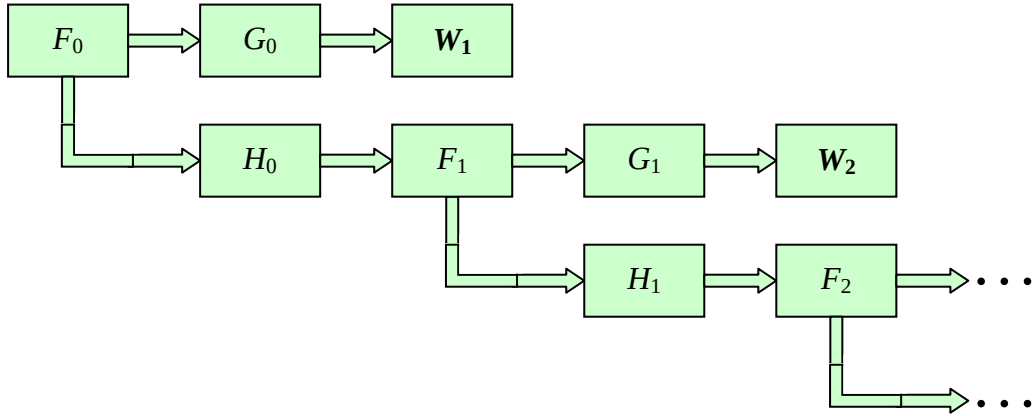
Közös pont volt mindhárom esetben az, hogy nem az egyes képeket, hanem az adott ponthoz tartozó idősoros adatokat elemző algoritmust készítettem. Ez teljes mértékben kiküszöböli az esetleges, leginkább konstans fluoreszcenciaszint-növekedést vagy esetleg csökkenést eredményező – szennyeződések hatását.

Wavelet-alapú jelelemzés

Az alábbiakban röviden összefoglalom a korábbi munkámban (Vincze, 2008) már ismertett Stationary Wavelet Transform módszert, melynek mind egy-, mind kétdimenziós változatát használtam az ismertetett algoritmusokban.

Az ún. *stationary wavelet transform* (SWT) vagy más néven *à trous* („lyukas”) *wavelet transzformáció* a diszkrét wavelet transzformációk családjába tartozik, segítségével a bemenő jel (F_0) különböző komponensekre bontható. A bemenő jelen egy felüláteresztő szűrő (G) és egy aluláteresztő szűrő (H) kerül alkalmazásra, melyek közül az előbbi adja meg a wavelet-együtthatókat az első szinten (W_1), az utóbbi pedig bemenő jelként (F_1) szolgál a következő hasonló ciklus számára (4. ábra). A ciklus előre megadott véges számban fut le, így adja meg a kép különböző „részletességi szintekre” való bontását. Fontos megjegyezni azt a különbséget az általánosan használt diszkrét wavelet transzformációhoz képest, hogy a SWT-ban nem történik meg a képi pixelek felének elhagyása (*downsampling*) az egyes ciklusok közt. Ez ugyan azzal a hátrányos tulajdonsággal jár, hogy az ily módon elvégzett dekompozíció redundáns, azonban az így keletkezett többlet-memóriaigény okozta hátrány eltörpül azon előnyhöz

képest, hogy így az egyes wavelet-szintek pontjai egyszerűen megfeleltethetők az eredeti kép pontjainak.



4. ábra: A stationary wavelet transform kivitelezésének folyamatábrája (Vincze, 2008). A jelölések magyarázata: F_i – bemenő jel az adott szinten, W_i – wavelet koeficiensek az adott szinten, G_i – az adott szinten alkalmazott feluláteresztő szűrő, H_i – az adott szinten alkalmazott aluláteresztő szűrő.

Az alkalmazott feluláteresztő és aluláteresztő szűrők a diszkrét wavelet transzformációknál szokásos módon állíthatók elő, bázisfüggvényként egy harmadfokú B-spline-t használtam (Unser, 1999). Az alkalmazott aluláteresztő szűrő együtthatói egy dimenzióban a következők: $1/16 \cdot [1, 4, 6, 4, 1]$, ebből egyszerűen előállíthatók az együtthatók két dimenzióban:

$$\frac{1}{256} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 6 & 24 & 36 & 24 & 6 \\ 4 & 16 & 24 & 16 & 4 \\ 1 & 4 & 6 & 4 & 1 \end{bmatrix}.$$

Magát a wavelet transzformációt a Mallat-algoritmussal (Mallat, 1989; Shensa, 1992) valósítottam meg, melynek elve igen egyszerű: minden ciklusban a bemenő jel (F_{i-1}) és a fentebb ismertett aluláteresztő szűrő megfelelően skálázott változatának (H_{i-1}) konvolúciójaként állítja elő a következő szint bemenő jelét (F_i):

$$F_i = F_{i-1} * H_{i-1}, \quad (1)$$

majd a kettő különbségeként a wavelet-együtthatókat (W_i):

$$W_i = F_{i-1} - F_i. \quad (2)$$

Az aluláteresztő szűrő megfelelően skálázott változatát az algoritmus úgy kapja meg, hogy a koeficiensek közé $2^{(i-1)-1}$ db nullát illeszt be. Innen származik az algoritmus másik elnevezése, az *à trous* („lyukas”) wavelet transzformáció.

A transzformáció tulajdonságaiból következik, hogy a wavelet együtthatók és az utolsó (N -edik) ciklus után megmaradt jelből rekonstruálható az eredeti jel:

$$F_0 = F_N + \sum_{i=1}^N W_i . \quad (3)$$

A felüláteresztő és az aluláteresztő szűrők egymásután történő alkalmazásának hatása jól látható az algoritmus által generált wavelet-együtthatókon, az egyes szintek kifejezett band-pass karaktert mutatnak. Ez azt jelenti, hogy az eredeti jelben fellelhető különböző frekvenciájú ill. kiterjedésű komponensek különböző wavelet-szinteken jelennek meg. Az alkalmazott wavelet transzformáció tulajdonságai biztosítják a wavelet-együtthatók azon tulajdonságát, hogy egy adott szint összes együtthatójának összege nulla.

Sejttípusok azonosítása neurális túlélőszelet felvételeken

Célkitűzés

Ebben az esetben a célkitűzésem volt az aktivitást mutató, az egyes sejteknek megfelelő ROI-k helyének meghatározása, valamint ezen belül az egyes jelek időbeli helyzetének meghatározása. A jelek meghatározása mellett célkitűzésem volt egy olyan algoritmus létrehozása, ami kizárólag a kalciumjelek segítségével meg tudja határozni azt, hogy az adott jel akciós potenciálhoz kötött-e vagy sem.

Módszerek

Alkalmazott mérőmódszer

Az általam vizsgált agyszeletek patkány *nucleus cochlearis dorsalis*ából származtak. A szeletek Oregon Green 488-AM kalciumkötő fluoreszcens festékkel kerültek feltöltésre. A minták vizsgálata Zeiss Axioskop mikroszkóppal 20x-os ill. 63x-os nagyítású objektívek használatával történt. A Till Photonics gyártmányú fluoreszcens képalkotó rendszer legfontosabb elemei a gerjesztéshez szükséges 488 nm-es fényt kibocsátani képes fényforrás és a képek felvételére szolgáló CCD kamera. A kamera 10 Hz-es frekvenciával rögzít 172x130 pixel felbontású, egycsatornás 12 bites képeket, melyeket tömörítetlen TIFF (Tagged Image File Format) formátumban tárol.

Az elemzéshez használt algoritmus

Az agyszeletekről készült képek elemzésére fejlesztett algoritmust három részre bontottam: a ROI-k azonosítására, az egyes ROI-kon belül a jelek megtalálására és az egyes jelek akciós potenciálhoz kötött voltának eldöntésére. Az első két lépésre kifejlesztett algoritmust Borland Delphi 7 integrált fejlesztői környezetben valósítottam meg, a harmadik lépést pedig Matlab 7-ben (2010a) implementáltam.

A képelemzés legelső lépéseként a kép minden egyes képpontjára vonatkozóan meghatározásra kerül az adott képpontra vonatkozó alapvonali fluoreszcencia-érték. Ezen érték meghatározásához az adott képponthoz tartozó idősor azon pontjainak átlagos fluoreszcencia-értékét használom, melyek az idősor összes pontjának átlaga ($Mean$) + $NormCri^1 \cdot SD$ érték alatt vannak. A következő lépésként az egyes képpontokhoz tartozó idősorokat az egydimenziós SWT transzformáció (Vincze, 2008) segítségével komponenseire bontom, majd ennek segítségével sávszűrést végzek: a W_{1-2} szinteket eltávolítva a nagyfrekvenciás zaj jelentős

¹ A meghatározott optimális érték: $NormCri = 1,05$

része eltávolításra kerül, az F_8 -as wavelet-maradékkal elosztva az idősor összes adatát pedig az igen lassú kinetikájú, a vizsgálni kívánt jelenségek által biztosan nem okozott kalcium-szint-változások kiszűrésre kerülnek.

A ROI-k azonosítására a korábban már elemi kalciumfelszabadulási események elemzésére már használt kettős küszöböléses módszer (Cheng et al., 1999) általam módosított változatát használom. Ennek lényege, hogy a $Mean + LoCri^2$ érték feletti olyan összefüggő területek, melyek tartalmaznak legalább egy $Mean + HiCri^3$ értéket elérő pontot ROI-ként kerülnek azonosításra.

A ROI-kon belül az egyes jelek helyének azonosítására a sávszűrt, ez által zajszűrt jel első deriváltján végzett küszöbölést alkalmaztam, az egybefüggően $D1thresh^4$ feletti szakaszok jelként kerültek azonosításra. Ezzel a módszerrel a jelek felszálló szára azonosítható, így a teljes jel azonosítására mindkét irányban megkeresem a legközelebbi lokális minimumot, és a jel határának ezt a két helyet veszem.

Az egyes jelek akciós potenciálhoz kötött voltának meghatározására a következő paramétereket határoztam meg:

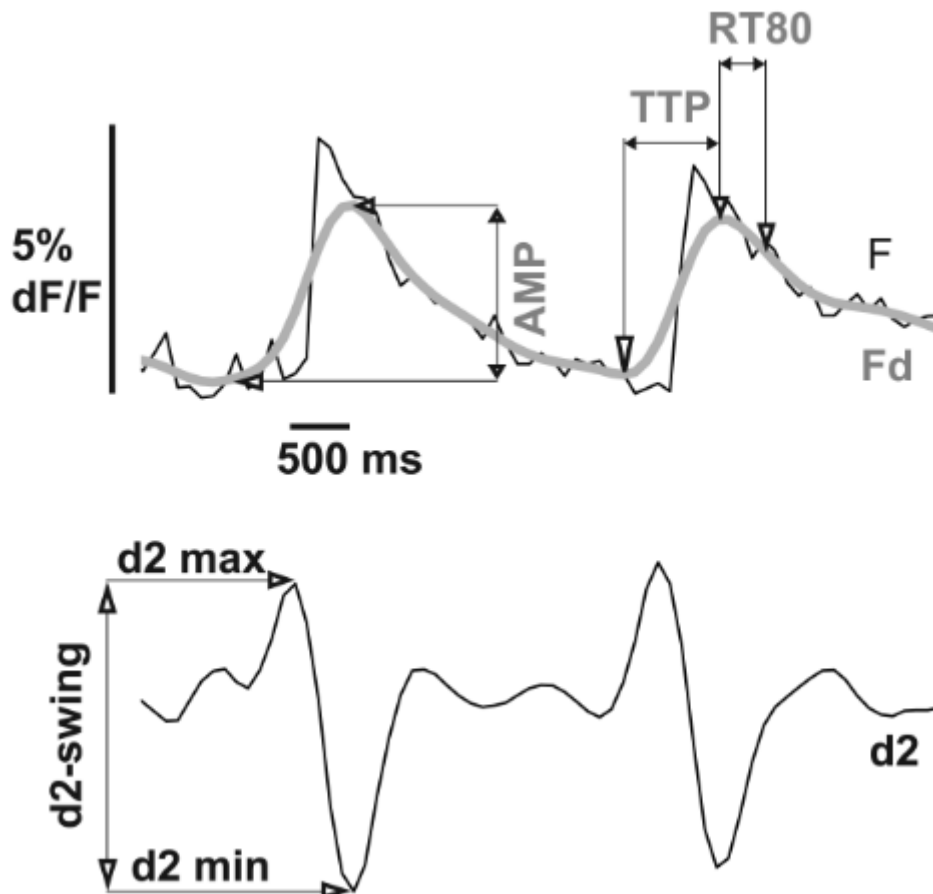
- amplitúdó (*Amp*),
- meredekség (*Slope*),
- integrál (*Integral*),
- a csúcsig eltelt idő (Time To Peak, *TTP*),
- az amplitúdó 80, 50 ill. 20%-ának eléréséig eltelt idő (*RT80*, *RT50*, *RT20*),
- a jel második idő szerinti deriváltján mért maximális kitérés (*d2-swing*),
- a *d2-swing* és az amplitúdó aránya (*Discriminator*).

Ezen paraméterek közül a *Discriminator* maga is 80% feletti pontossággal képes a jel akciós potenciálhoz kötött voltát meghatározni $0,03\text{ s}^{-2}$ -os küszöbértékkel.

² A meghatározott optimális érték: $LoCri = 1,2$

³ A meghatározott optimális érték: $HiCri = 1,55$

⁴ A meghatározott optimális érték: $D1thresh = 0,04$

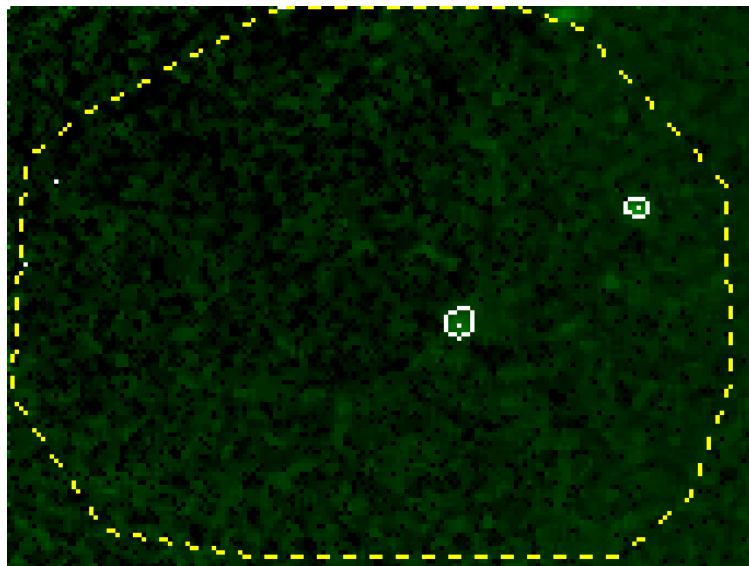


5. ábra: Az egyes idősorokból meghatározott paraméterek. A felső ábrán a vékony fekete vonal jelöli az eredeti jelet, a vastag szürke vonal pedig a zajszűrt jelet. Az alsó ábrán a fekete vonal a zajszűrt jel második idő szerinti deriváltja. Az egyes paraméterek az ábrán látható módon számíthatóak.

A pontosság további javítása érdekében az összes meghatározott paraméter alkalmazásával létrehoztam Matlab 7-ben egy 15 rejtett neuront tartalmazó feed-forward mesterséges neurális hálót, melynek forrása a Függelékben olvasható. A neurális háló betanítására olyan jeleket használtam, melyek akciós potenciálhoz kötött voltát előzetesen kézi elemzéssel ellenőriztem.

Eredmények

A ROI-k azonosítása 90% feletti pontossággal történt, ami megfelel az algoritmussal szemben támasztott követelményeknek. Az alábbi ábrán látható egy reprezentatív felvétel a ROI-ként automatikusan kijelölt sejthatárokkal.



6. ábra: Egy reprezentatív felvétel a megtalált aktivitást mutató területekkel. A sárga körvonal a vizsgálandó terület manuálisan kijelölt határát mutatja. A fehér színnel jelzett sokszögek jelentik a megtalált ROI-kat.

A ROI-k idősorán belül a jelek azonosítására meghatározott küszöbértékkel azonosított jelek 95%-a valódi kalciumjel volt, azaz azonosítás pozitív prediktív értéke 95%. A kalciumjelek kb. 15%-át (a későbbiekben akciós potenciálhoz nem kötötként azonosított jelek 55%-át) az automata elemzés nem találta meg, ezek kézzel kerültek kijelölésre.

A betanított neurális háló a párhuzamos patch clamp méréssel megerősített 84 akciós potenciálhoz kötött jel mindegyikét, a 15 akciós potenciálhoz nem kötött jel közül 14-et helyesen azonosított. A kísérletsorozatban felvett 1551 jel 97,6%-át a neurális háló akciós potenciálhoz kötöttek, így a vizsgálatba bevonhatónak azonosítónak találta.

Elemi kalciumfelszabadulási események vázizomban

Célkitűzés

A sejt területének automatikus meghatározása, a sejt strukturális elemeinek azonosítása, az elemi kalciumfelszabadulási események helyének meghatározása, az egyes elemi kalciumfelszabadulási események következő paramétereinek meghatározása:

- amplitúdó (*Amp*)
- térbeli félérték-szélesség hosszirányban (*FWHM-X*)
- térbeli félérték-szélesség harántirányban (*FWHM-Y*)
- a legközelebbi szarkomer távolsága (*Pos*)
- az esemény excentricitása ($FWHM-X / FWHM-Y$)
- az esemény középpontjának elmozdulása két kép között hosszirányban (*MovX*)
- az esemény középpontjának elmozdulása két kép között harántirányban (*MovY*)

Módszerek

Alkalmazott mérőmódszer

Az elemzésre került ill. jövőben elemzendő kétdimenziós képeksorozatok a DE OEC Élettani Intézet ill. a University of Maryland School of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology (Baltimore, USA) keretein belül működő, Zeiss LSM 5 LIVE típusú konfokális lézerpásztázó egységgel készültek. Ez a rendszer lehetővé teszi, hogy egy teljes vonalon egy időben készüljön el a konfokális fluoreszcencia-mérés, így 512x512 pixel felbontású képek készítésénél elméletileg akár 120 Hz-es pásztázási frekvencia is elérhető. A fluoreszcens festék kiégését is figyelembe véve a képek többsége 30 Hz-es pásztázási frekvencia mellett lett felvéve.

A képinformáció mellett tárolásra került paraméterek segítségével az elemző szoftver a felvétel paramétereinek közti különbségeket automatikusan figyelembe veszi az elemzésnél, ahol szükséges. A képek rögzítésére lehetőség van 8 és 12 bites színmélységgel, a számítógépesen elemzendő képek esetén kivétel nélkül ez utóbbi kerül alkalmazásra. Az egyes képsorozatok egy-egy módosított, többlapos TIFF állományban kerülnek tárolásra. A konfokális mérőrendszerre specifikus információkat az állomány *tag*jeiben rögzíti a rendszer.

Az elemzéshez használt algoritmus

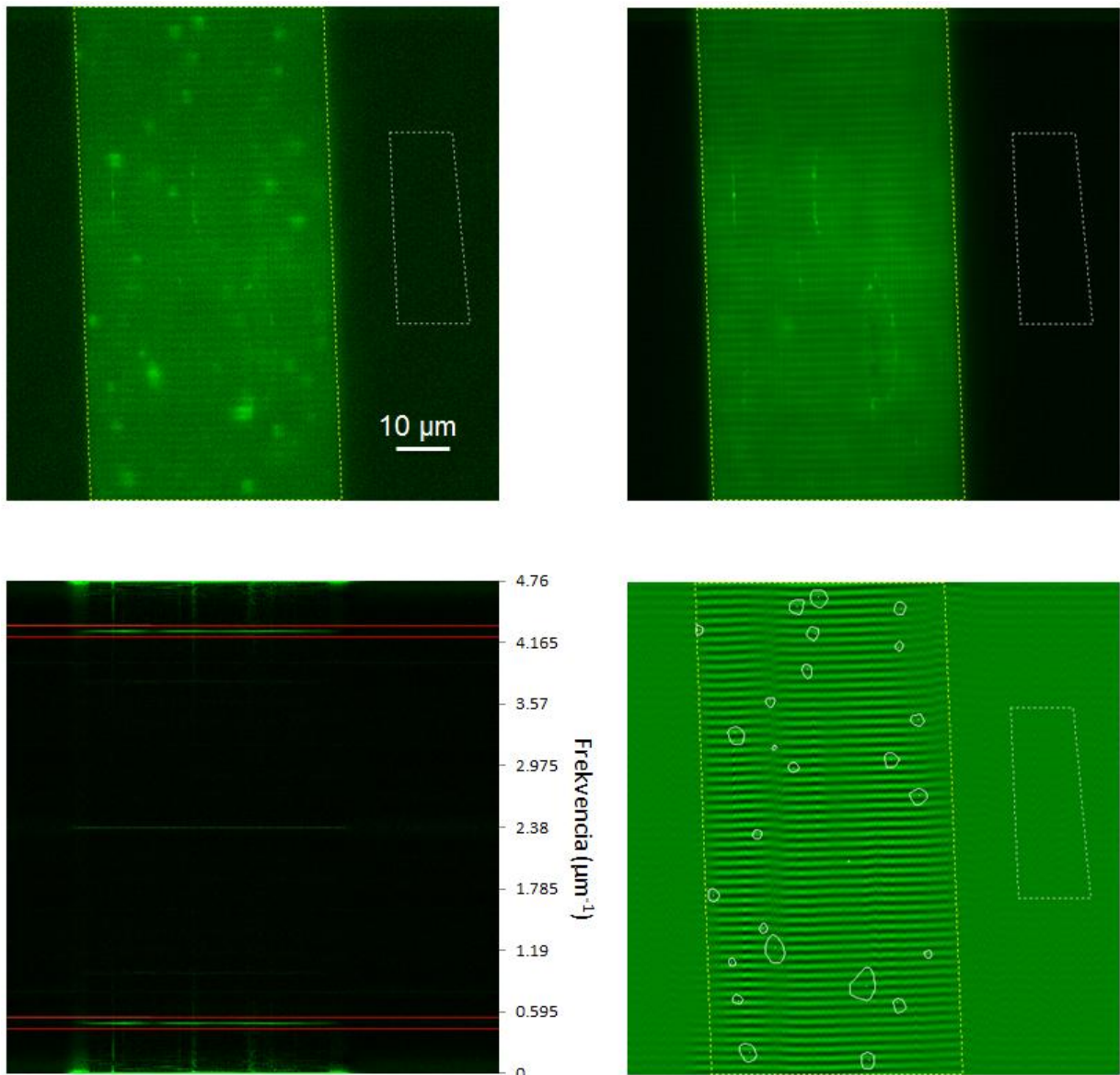
Az alábbiakban ismertetett algoritmus az általam korábban már leírt (Vincze, 2008) algoritmus módosított, továbbfejlesztett változata. Jelen dolgozatban az egész algoritmust ismertetem, különös figyelmet fordítva a korábban már ismertetett algoritmushoz képest megjelenő különbségekre.

A képelemzés legelső lépéseként a kép minden egyes képpontjára vonatkozóan meghatározásra kerül az adott képpontra vonatkozó alapvonali fluoreszcencia-érték. Ezen érték meghatározásához az adott képponthez tartozó idősor azon pontjainak átlagos fluoreszcencia-értékét használom, melyek az idősor összes pontjának átlaga (*Mean*) + $NormCri^5 \cdot SD$ érték alatt vannak. A következő lépésként az egyes képpontokhoz tartozó idősorokat az egydimenziós SWT transzformáció (Vincze, 2008) segítségével komponenseire bontom, majd ennek segítségével felüláteresztő szűrést végzek: az F_4 -es wavelet-maradékkal elosztva az idősor összes adatát pedig az igen lassú kinetikájú, a vizsgálni kívánt jelenségek által biztosan nem okozott kalciumszint-változások kiszűrésre kerülnek.

Az egyes képpontokhoz tartozó alapvonali fluoreszcencia-értékekből készült nagyon jó jel/zaj arányú képen először meghatározom, hogy mely terület tartozik a sejthez. Ahogyan az jól látható, a sejthez tartozó képpontok fluoreszcenciája jóval magasabb a sejten kívüli képpontok fluoreszcenciájától; az intenzitások eloszlása egyértelműen bimodális. Iteratív módszerrel meghatároztam a két halmaz közötti optimális vágást, majd a küszöb feletti egybefüggő területet a sejthez tartozóként rögzítettem.

A sejt strukturális elemeit a sejt hosszirányának megfelelően elhelyezkedő oszloponkénti Fourier-transzformáció segítségével határoztam meg. A $0,5 \mu m^{-1}$ -nél megfigyelhető – a kb. $2 \mu m$ hosszú szarkomereknek megfelelő – csúcs körüli területet kivéve a többi együttható értékét kinulláztam, és így végeztem inverz Fourier-transzformációt. Az így kapott képen csak a strukturális elemeknek megfelelő komponensek maradtak meg, melyen oszloponként lokális maximumkereséssel meghatározható a szarkomerek helyen. Az esetlegesen megtörő szarkomerek lefutása is követhető, így az események paraméterei meghatározhatóak a szarkomerek lefutására merőleges (X) és azzal párhuzamos (Y) irányban is.

⁵ A meghatározott optimális érték: $NormCri = 1,1$



7. ábra: A sejtstruktúra azonosítása egy reprezentatív felvételen. A bal felső panelen az eredeti képsorozat egy kép látható. A jobb felső képen az egyes képpontok alap fluoreszcencia-értékeiből készült kép látható, ami jó jel/zaj aránnyal megmutatja a statikus képelemeket, így a szarkomereket. A bal alsó panelen látható frekvenciaspektrumon jól látható $0,5 \mu\text{m}^{-1}$ -nél (és az inverzénél) az éles sáv, ami a szarkomereknek felel meg. A jobb alsó ábrán az inverz transzfomáció eredményeként készült kép látható, melyen a szarkomerek kiválóan követhetőek.

A ROI-k azonosítása és paramétereik meghatározása előtt az általam már korábbi munkámban ismertetett (Vincze, 2008; Starck, 1998) módon végzett, nagy hatékonyságú Wavelet zajszűrést végeztem ($\delta = 3$) az egyes normalizált képeken. Az elemi kalciumfelszabadulási események elemzésére már régóta használt kettős küszöböléses módszer (Cheng et al., 1999) általam módosított változatát használtam a ROI-k azonosítására. Ennek lényege, hogy az egyes képeken a $Mean + LoCri$ ⁶ érték feletti olyan összefüggő területek, melyek tartalmazznak legalább egy $Mean + HiCri$ ⁷ értéket elérő pontot ROI-ként kerülnek azonosításra.

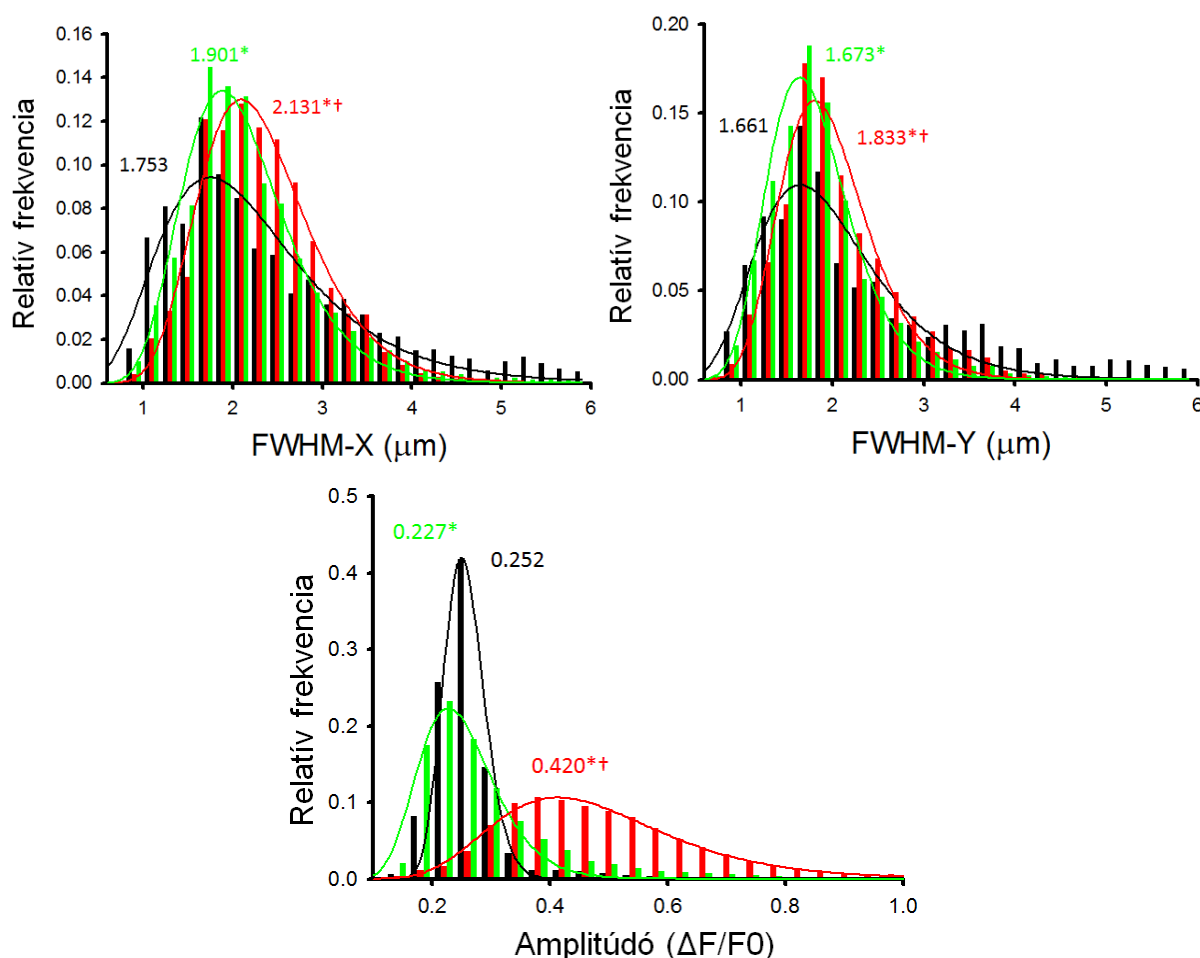
⁶ A meghatározott optimális érték: $LoCri = 1,7$

⁷ A meghatározott optimális érték: $HiCri = 2,8$

Az azonosított ROI-n belül megkeresem a legmagasabb átlagú 3x3-as területet, melynek középpontját jelölöm meg az adott esemény csúcspontjaként. Az itt mért fluoreszcencia-intenzitás és az alapvonal különbsége az adott esemény amplitúdója. Innen a szarkomerekkel párhuzamos irányban ill. arra merőleges irányban elindulva kerestem meg azon pontokat, ahol három pont átlagában az intenzitás az amplitúdó értékének fele alatt van. Ezen pontok lettek az FWHM-X és az FWHM-Y határpontjai. A legközelebbi lokális maximumtól való távolság eltárolásra kerül, mint *Pos* érték. Az egymás közötti képeken átfedő sparkok csúcspontjai közötti távolság komponenseiből meghatározható a *MovX* és a *MovY* értéke is.

Eredmények

A ROI-k azonosítása a felvételek jó jel/zaj arányának köszönhetően igen pontosan történt az általam készített program segítségével. Az alábbiakban egy reprezentatív mérőhalmaz elemzésével kapott paramétereket mutatom be:



8. ábra: Egy reprezentatív mérőhalmaz térbeli félérték-szélesség és amplitúdó hisztogramjai. A fekete szín a kontroll körülmények között (n=1856), a zöld szín a depolarizáció után (n=23714), a piros szín a koffeinkezelés után (n=22426) látható elemi kalciumfelszabadulási események paramétereinek eloszlását mutatja. A görbék log-normális illesztéssel készültek, a számok a görbe maximumhelyét mutatják. *: $p < 0,05$ vs kontroll; †: $p < 0,05$ vs depolarizáció

Hámsejtek spontán aktivitásának vizsgálata

Célkitűzés

A hámsejtek spontán aktivitásának vizsgálata esetén a feladat annyiban különbözött az eddigiektől, hogy itt az aktivitást mutató ROI-k kijelölése nem az algoritmus által történt, hanem a felhasználó maga jelölte ki az egyes sejteket. Ebben az esetben tehát csak az egyes ROI-khoz tartozó idősoros adatok álltak rendelkezésre, és ezeken belül kellett a kalciumszint-változásokat megtalálni. Ebben az esetben a legfőbb cél az volt, hogy a hosszú felvételi idő alatt bekövetkező fókusz-sík-elmozdulás által okozott fluoreszcencia-változásokat megbízhatóan megkülönböztessék a valódi kalciumeseményektől.

Módszerek

Alkalmazott mérőmódszer

A mérőrendszer megegyezik az elemi kalciumfelszabadulási eseményeknél leírttal, annyi különbséggel, hogy a biológiai folyamat kinetikáját figyelembe véve itt a képek 2 Hz-es frekvenciával kerültek rögzítésre.

Az elemzéshez használt algoritmus

Ebben az esetben a program az adott képen kijelölt összes ROI idősoros adatát kapja meg bemenő adatként. Az egyes idősorokra a már ismertetett módon elvégzi az SWT transzformációt, majd sávszűrést végez ennek eredményét alkalmazva. A W_1 szintet eltávolítva a nagyfrekvenciás zaj jelentős része eltávolításra kerül, az F_6 -os wavelet-maradékkal elosztva az idősor összes adatát pedig az igen lassú kinetikájú, a vizsgálni kívánt jelenségek által biztosan nem okozott – tehát feltehetőleg a fókusz-sík mozgása által okozott – kalciumszint-változások kiszűrésre kerülnek.

Az egyes kalciumesemények azonosítása a W_4 és W_5 szinten történik: amennyiben az adott helyen a W_4 szint értéke meghaladja a $W4_{cri}$ ⁸ vagy a W_5 szint értéke a $W5_{cri}$ ⁹ értékét, akkor a program eseményt detektál. Tapasztalatok alapján a zaj az alacsonyabb, a mikroszkóp fókusz-síkjának mozgásából eredő változások pedig a magasabb számú wavelet-szinteken jelennek meg.

Sajnálatos módon a mikroszkóp fókuszának mozgása bizonyos esetekben tartalmaz olyan frekvenciakomponenseket, melyek nagyságrendileg egybeesnek a detektálni kívánt jelek

⁸ A meghatározott optimális érték: $W4_{cri} = 0,01$

⁹ A meghatározott optimális érték: $W5_{cri} = 0,01$

frekvenciájával, így a detektálásra használ wavelet-szinteken megjelennek. Az ilyen fókuszmozgások által okozott fals pozitív találatok kiszűrése érdekében amennyiben egy adott esemény $\pm Range^{10}$ képmi közelében az előzetesen manuálisan kijelölt ROI-k legalább $DropRatio^{11}$ arányában található detektált esemény, akkor az esemény eldobásra kerül.

Az egyes detektált események amplitúdója és időbeli félérték-szélessége meghatározásra kerül, valamint a program rögzíti, hogy az előzetesen kijelölt ROI-k mekkora része mutat valamilyen aktivitást.

Eredmények

Tapasztalataink alapján jól látható, a mikroszkóp fókuszsíkjának mozgásából adódó intenzitás-változásokat az alkalmazott algoritmus jól kiszűri és csak a valódi események kerülnek detektálásra.

A detektálási paraméterek úgy lettek meghatározva, hogy a detektálás pozitív prediktív értéke magas (95% feletti) legyen, akár annak árán is, hogy az események egy részét ne találja meg a program. Ennek oka az, hogy egy adott sejt a mérés során sokszor több oszcillációt is mutat, és a kísérletsorozatban a biológiailag releváns kérdés mindössze annyi, hogy a sejtek mekkora része mutat bármiféle aktivitást is. Ebben az esetben, még ha nem is találja meg a program egy adott sejten az összes jelet, ha legalább egyet már megtalál, akkor a feltett biológiai kérdésre helyes válasz adható.

¹⁰ A meghatározott optimális érték: $Range = 5$

¹¹ A meghatározott optimális érték: $DropRatio = 0,9$

Diszkusszió

Dolgozatomban három, sok tekintetben hasonló, ám részleteiben mégis különböző problémát rejtő biológiai kutatási területen alkalmazható, általam kifejlesztett jelelemző eljárást mutattam be. Közös elem, hogy kétdimenziós kalciumjel-sorozatok elemzése a feladat, és hogy a korábban már számos területen sikeresen alkalmazott Stationary Wavelet Transform segítségével az elemzés legfőbb lépései hatékonyan megvalósíthatóak.

Mindhárom ismertett területen az általam készített szoftverek napi használatban vannak a DE OEC Élettani Intézetében. Az egyes területekért felelős vezető kutatók áttekintették a programok által adott eredményeket és értékelhetőnek ismerték el azokat.

Fontos megemlíteni, hogy más kutatócsoportok az említett problémák megoldására más stratégiákat alkalmaztak. Különösen az első két terület, az agyszeletek kalciumfelvételeinek elemzése és az elemi kalciumfelszabadulási események detektálása sokat kutatott terület.

Az agyszeletek kalciumfelvételeinek elemzésére használt másik legfontosabb technika az általam kidolgozott algoritmushoz képest teljesen más megközelítéssel dolgozó Independent Component Analysis (Mukamel, 2009). Jelenleg folyamatban van a kétféle algoritmus összevetése és esetleges összekapcsolása, ám az alapvető feladatokra az általam fejlesztett elemző-szoftver hasonlóképpen alkalmasnak bizonyult. Az agyszeletek kalciumfelvételeinek elemzésében egyedülálló módon neurális hálóra alapuló eseménnytípus-azonosítás pontossága csaknem 100%, így az analízis ezen része minden további fejlesztés nélkül tökéletesen alkalmazható.

Az elemi kalciumfelszabadulási események kapcsán jóval szélesebb körű irodalom áll rendelkezésre az ún. line-scan képek elemzésére (Cheng, 1999; v Wegner, 2006; Picht, 2007), melyek egydimenziós idősoros adatok. A kétdimenziós idősoros adatok megfelelő sebességű rögzítésére csak néhány éve áll rendelkezésre megfelelő mérőrendszer, így bár már létezik az irodalomban közölt elemzési technika (Bányász, 2007; v Wegner, 2007), nincs egyetlen egy, teljes körű elfogadottságot élvező elemzési algoritmus sem. Úgy vélem, hogy az általam kidolgozott, teljes körű elemzést lehetővé tevő módszer válhat a közeli jövőben az egyik leggyakrabban alkalmazott elemzési technikává.

Összességében úgy látom, hogy a bemutatott algoritmusok a kézi elemzéshez túlságosan nagy mennyiségű adatok elemzésére már jelen formájukban is alkalmasak, hasonló jellegű felvételek elemzésére a jövőben széles körben használhatóak lesznek. Rájuk építve újabb problémák megoldására alkalmas módszerek kifejlesztése is várható.

A munkához nyújtott saját hozzájárulás

A három területen használt algoritmusok kifejlesztése és implementálása Borland Delphi 7 és Matlab 7 környezetben. Az elemi kalciumfelszabadulási események elemzésének alapjául szolgáló mérések egy részének végzése. A mindhárom területen elvégzett mérések kiértékelése, az eredmények értelmezése.

Irodalomjegyzék

- Bányász, T., Y. Chen-Izu, C. W. Balke, and L. T. Izu. A new approach to the detection and statistical classification of Ca^{2+} sparks. *Biophys. J.* 2007;**92**:4458–4465.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993 Oct 29;**262**(5134):740-744.
- Cheng H, Song LS, Shirokova N, González A, Lakatta EG, Ríos E, Stern MD. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J.* 1999 Feb;**76**(2):606-617.
- Mallat SG. Multiresolution approximations and wavelet orthonormal bases of $L^2(\mathbb{R})$. *Trans. Am. Math. Soc.* 1989;**315**:69–87.
- Mukamel EA, Nimmerjahn A, Schnitzer MJ. Automated Analysis of Cellular Signals from Large-Scale Calcium Imaging Data. *Neuron*. 2009 Sep;**63**:747-760.
- Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Sep;**293**(3):C1073-1081.
- Ríos E, Shirokova N, Kirsch WG, Pizarro G, Stern MD, Cheng H, González A. A preferred amplitude of calcium sparks in skeletal muscle. *Biophys J.* 2001 Jan;**80**(1):169-183.
- Shensa MJ. The discrete wavelet transform: wedding the à trous and Mallat algorithms. *IEEE Trans. Signal Process.* 1992;**40**:2464–2482.
- Starck J-L, Murtagh F. Automatic noise estimation from the multiresolution support. *Publ. Astron. Soc. Pac.* 1998;**110**:193–199.
- Strang, G. Wavelets and dilation equations: a brief introduction. *SIAM Review*. 1989;**31**:614–627.
- Unser, M. Splines. A perfect fit for signal and image processing. *IEEE Signal Process. Mag.* **1999**:22–38.
- Vincze J. Wavelet-alapú képelemzés az izomkutatásban. *TDK pályamunka*. 2008.
- v Wegner F, Both M, Fink RH. Automated detection of elementary calcium release events using the à trous wavelet transform. *Biophys J.* 2006 Mar 15;**90**(6):2151-2163.
- v Wegner F, Both M, Fink RH, Friedrich O. Fast XYT imaging of elementary calcium release events in muscle with multifocal multiphoton microscopy and wavelet denoising and detection. *IEEE Trans Med Imaging*. 2007 Jul;**26**(7):925-934.
- Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* 1997;**49**, 1-51.

Függelék

Az egyes jelek tipizálására használt Matlab program forrása.

```
% Tanító adatok beolvasása
fid = fopen('betanito_adatok.csv');
C = textscan(fid, '%f%f%f%f%f%f%f%f%s', 'delimiter', ';');
fclose(fid);

% A jelek karakterisztikájának kinyerése
signalCharacteristics = [C{1} C{2} C{3} C{4} C{5} C{6} C{7} C{8} C{9}];

% A jeltípusok beolvasása
neuron = strncmpi(C{10}, 'NEURON', 1);
glia = strncmpi(C{10}, 'GLIA', 1);

% A célváltozók meghatározása
signalType = double([neuron glia]);
signalCharacteristics = signalCharacteristics';
signalType = signalType';

% Egy 15 rejtett neuront tartalmazó feed-forward
net = newff(signalCharacteristics, signalType, 15);

% A hálózat tanítása
net.divideParam.trainRatio = 0.70;
net.divideParam.valRatio = 1 - net.divideParam.trainRatio;
net.divideParam.testRatio = 0;
net.trainFcn = 'trainbfg';
[net, tr] = train(net, signalCharacteristics, signalType);

% Tesztadatok beolvasása
fid = fopen('validalo_adatok.csv');
C = textscan(fid, '%f%f%f%f%f%f%f%f%s', 'delimiter', ';');
fclose(fid);

% A jelek karakterisztikájának kinyerése a tesztadatok esetén
signalCharacteristicsTest = [C{1} C{2} C{3} C{4} C{5} C{6} C{7} C{8} C{9}];

% A jeltípusok beolvasása a tesztadatok esetén
neuronTest = strncmpi(C{10}, 'NEURON', 1);
gliaTest = strncmpi(C{10}, 'GLIA', 1);

% A tesztváltozók meghatározása
signalTypeTest = double([neuronTest gliaTest]);
signalCharacteristicsTest = signalCharacteristicsTest';
signalTypeTest = signalTypeTest';
testInputs = signalCharacteristicsTest;
testTargets = signalTypeTest;

% A hálózat alkalmazása a tesztadatokra
out = sim(net, testInputs);
```

```

% Az eredmények kiolvasása a tesztadatokból
[y_out,I_out] = max(out);
[y_t,I_t] = max(testTargets);

diff = [I_t - 2*I_out];

n_n = length(find(diff==-1));
n_g = length(find(diff==0));
g_g = length(find(diff==2));
g_n = length(find(diff==3));

% Az eredmények kiíratása
N = size(testInputs,2);
fprintf('Tesztadatok száma: %d\n', N);
cm = [n_n n_g; g_n g_g]
cm_p = (cm ./ N) .* 100
fprintf('Helyesen osztályozott jelek aránya : %f%%\n',
100*(cm(1,1)+cm(2,2))/N);
fprintf('Hibásan osztályozott jelek aránya : %f%%\n',
100*(cm(1,2)+cm(2,1))/N);

```